สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

(Study of Appropriate Nitrogen Sources for Cellulase Production of Bacteria isolated from Natural Resources)

จัดทำโดย

นางสาวจิตราวดี สมศรี รหัสนักศึกษา 46041049

นางสาวศุภพร อินทร์พรหม รหัสนักศึกษา 46041075

ป พ.
ค 461ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 97010
วัน,เดือน,ปี 5 JUN 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

(Study of Appropriate Nitrogen Sources for Cellulase Production of Bacteria isolated from Natural Resources)

สว.
จ 461 ก
2549

.b 11179238
.i

จัดทำโดย

นางสาวจิตราวดี สมศรี รหัสนักศึกษา 46041049
นางสาวศุภพร อินทร์พรหม รหัสนักศึกษา 46041075

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา)
อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

22/3/50
วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปัจจุบันปัญหาขยะมูลฝอยและน้ำเสียนับวันจะมีมากขึ้นจนเป็นปัญหาระดับชาติ ปัญหาจะเกิดความรุนแรงขึ้นในเมืองใหญ่ที่มีชุมชนหนาแน่นและมีโรงงานอุตสาหกรรมตั้งอยู่ ขยะนั้นมีสารประกอบหลากหลายชนิดรวมกันอยู่ และแต่ละประเภทนั้นมีอายุการสลายตัวที่แตกต่างกัน การแยกขยะและการบำบัดขยะจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวปัจจุบันจึงมุ่งเน้นที่จะหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารประกอบในขยะเปียกและในน้ำเสียเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการบำบัดให้ทันกับการเกิดขยะและน้ำเสียในปัจจุบัน

แหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญและเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก คือ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโ เสที่เป็นองค์ประกอบในขยะต่างๆ ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นี้ จะต้องคำนึงถึงเมทาบอลิซึมที่หลากหลายและความต้องการสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นจึงควรทำการหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดให้กับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาใช้เองภายในประเทศและยังเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีขึ้นใช้ในประเทศแทนการพึ่งพาหรือการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จิตราวดี สมศรี และศุภพร อินทร์พรหม , 2549 : การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติ ภาควิชาอุสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการขณะอุสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

ปัจจุบันพบปัญหาขยะมูลฝอยและน้ำเสีย ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมที่มีเพิ่มขึ้น จึงทำให้การแยกและการบำบัดขยะเป็นสิ่งจำเป็น ปัจจุบันจึงมุ่งเน้นที่จะหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารประกอบต่างๆ ในขยะ และได้มีการศึกษาหาสภาพแวดล้อมและสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติและสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ปริมาณสูง โดยแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ สายพันธุ์ O_2, B1, B8, B12, B17 และ B43 ซึ่งในการทดลองหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้กับแบคทีเรียได้ใช้แหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ Yeast extract, Peptone และ Ammonium sulfate จากการศึกษาพบว่า Ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด โดยสายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ B17 มีกิจกรรมเอนไซม์ 1035.51 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ O_2, B12, B43, B8 และ B1 ให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ สำหรับการทดลองหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้ศึกษาปริมาณของไนโตรเจน 3 ระดับ คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ B8 มีกิจกรรมเอนไซม์ 1,250.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน B17, O_2, B43, B12 และ B1 ให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ โดยสายพันธุ์ B8 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ Ammonium sulfate 0.5 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ O_2 และ B1 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ Ammonium sulfate 1.0 กรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ B12, B17 และ B43 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ Ammonium sulfate 1.5 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ B8 และ B17 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์ O_2 ซึ่งเป็นตัวควบคุม

จิตราวดี สมศรี ....

ศุภพร อินทร์พรหม ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 22/3/50 .....

ลายมือชื่อนักศึกษา วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ และอาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทดลองปัญหาพิเศษเรื่อง การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ตลอดจนแนะนำการเขียนและตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ควบคุมเครื่องมือ เจ้าหน้าที่เบิกสารเคมี ประจำคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือการปฏิบัติงานในทุกๆด้าน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ ให้ทุกสิ่งทุกอย่าง และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา

จิตราวดี สมศรี

ศุภพร อินทร์พรหม

มีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาคผนวก	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	15
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างสายเซลลูโลส	3
2 โครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลส	3
3 ลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส	5
4 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส	5
5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์	20
6 ผลของปริมาณ Ammonium sulfate ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว nutrient broth เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน	15
2 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว nutrient broth เพื่อศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจน	16
3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ O_2	17
4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B1	17
5 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B8	18
6 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B12	18
7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B17	19
8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B43	19
9 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ O_2	22
10 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B1	23
11 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B8	23
12 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B12	24
13 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B17	25
14 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ B43	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวก	หน้า
ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	31
ข วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส	32
ค กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสและวิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันมีการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายเศษวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบอยู่มากมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันและพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆเช่น เซลลูเลส และอื่นๆมาย่อยเศษวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการเกษตรได้เป็นกลูโคส และถ้ามีการย่อยสลายต่อก็จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และยิวมัส และจากการพัฒนาอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านอาหาร ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะใช้จุลินทรีย์เร่งการสลายตัวของสารประกอบอินทรีย์ต่างๆที่มีในขยะและน้ำเสียให้เร็วยิ่งขึ้น มีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบในขยะและน้ำเสียได้ดีมาผลิตเป็นหัวเชื้อเพื่อใช้ในด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในต่างประเทศมีผู้สนใจศึกษาการนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาเติมในขยะและน้ำเสีย เนื่องจากจุลินทรีย์มีเมทาบอลิซึมที่หลากหลายและต้องการสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน การนำจุลินทรีย์จากต่างประเทศมาใช้ในประเทศอาจไม่ได้ผลเท่าที่ควรและมีราคาแพง ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดขยะ และบำบัดน้ำเสียแต่ละชนิดในท้องถิ่นจึงน่าจะให้ผลที่ดีกว่า (สุมาลี , 2542)

จากการที่พบว่าจุลินทรีย์มีบทบาทในการย่อยสลายสารประกอบจากซากพืชและสัตว์จึงมีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยมีการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนแหล่งคาร์บอนและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการย่อยสลายขยะ การคัดเลือกมักพิจารณาจากความสามารถในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายสารประกอบในขยะได้ดี แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่จะต้องระวัง คือ จุลินทรีย์ที่ใช้ไม่ควรเป็นเชื้อโรค ควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีการจำแนกชนิดเป็นที่แน่นอนแล้ว (สุมาลี , 2542)

ในปัญหาพิเศษนี้เป็นการศึกษาชนิดของแหล่งและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียให้ได้สูงที่สุด และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

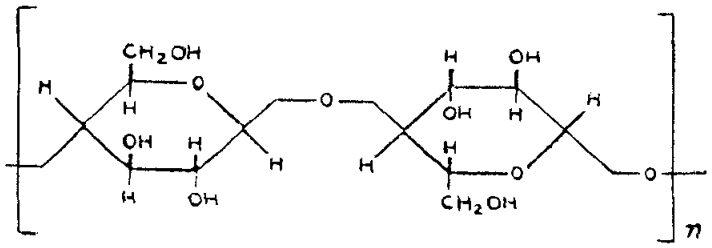
บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจาก ก่อนที่จุลินทรีย์จะย่อยสลายขยะได้นั้นจะต้องเจริญได้ดีก่อน เนื่องจากการสร้างเอนไซม์จะเกี่ยวข้องกับการการเจริญของจุลิทรีย์ เมื่อสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้มากและนำสารที่ได้จากการย่อยสลายไปใช้ในการเพิ่มชีวมวลได้ดี ซึ่งจะมีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นไปอีก ตลอดจนทำให้จำนวนจุลินทรีย์มากพอที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีอยู่ตามธรรมชาติ การศึกษาปัจจัยในด้านโภชนาการ เช่น ความต้องการสารอาหารชนิดต่างๆซึ่งจะเน้นสารประกอบที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากการเกษตรเป็นหลัก เพื่อให้มีต้นทุนราคาถูก และปัจจัยด้านกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจน ปัจจัยเหล่านี้มีผลในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ (สุมาลี ,2542)

2.1 เซลลูโลส (cellulose) (รุจิกาญจน์ , 2546)

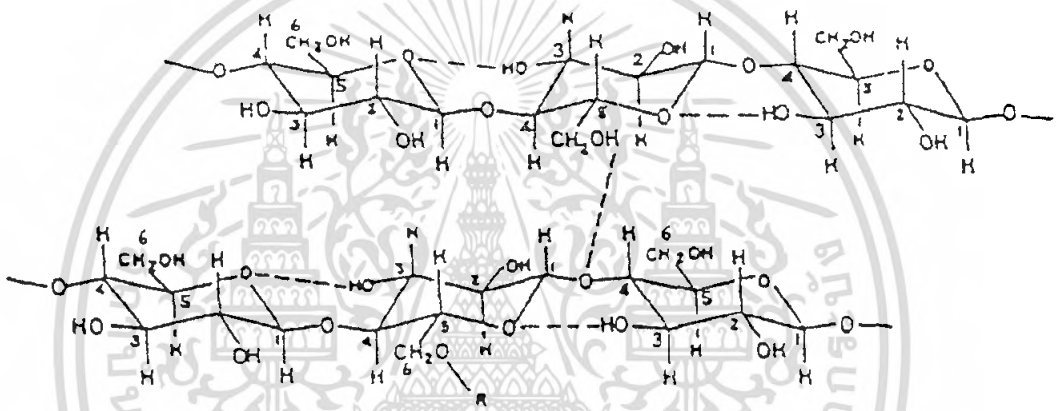
เซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่พบมากและเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช โดยเซลลูโลสเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ของกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 –glycosidic อย่างมีระเบียบ แต่ละโมเลกุลของกลูโคสในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 กับหมู่ออกซิเจนของโมเลกุลถัดไป และสายเซลลูโลสที่ขนานกันจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนอะตอมที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคสในอีกสายหนึ่งดังแสดงในภาพที่ 2 ทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ โดยในส่วนของผนังเซลล์ชั้นที่สองของผนังเซลล์พืชนั้น เซลลูโลสและองค์ประกอบชนิดอื่นของผนังเซลล์พืชจะเรียงตัวเป็นกลุ่มยาวเรียกว่าไมโครไฟบริล(microfibril) ซึ่งแต่ละสายจะเชื่อมต่อระหว่างสายที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน บริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูงเรียกว่าบริเวณ crystalline ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่าเรียกว่าบริเวณ amorphous หรือ paracrystalline โดยบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบจะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 โครงสร้างสายเซลลูโลส

ที่มา : รุจิกาญจน์ (2546)



ภาพที่ 2 โครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลูโลส

Carboxymethyl cellulose : R = $-CH_2COONa$

Cellulose acetate : R = $-C-CH_3$ (‖ O)

Methyl cellulose : R = $-CH_3$

ที่มา : รุจิกาญจน์ (2546)

2.2 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลลูโลสเป็นกลูโคสนั้นเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มที่เรียกว่า เซลลูเลส ซึ่งจะย่อยเซลลูโลสโดยตัดพันธะ glycosidic เอนไซม์เซลลูเลสแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ Endo-β-glucanase , Exo-β-glucanase และ β-glucosidase ซึ่งมีกิจกรรมแตกต่างกันดังนี้ (ปราณี , 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

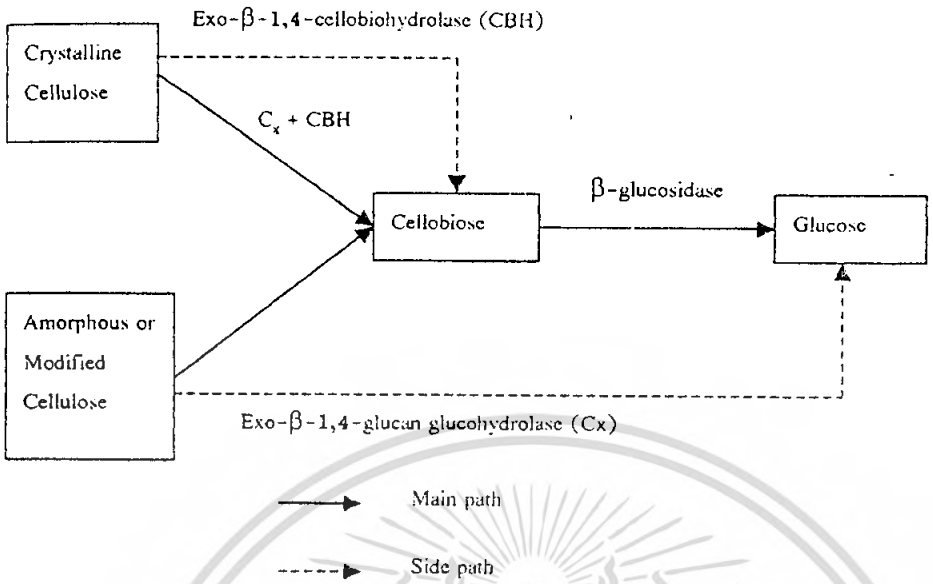
2.2.1. Endo-β-glucanase หรือ 1,4 -β -D-glucan glucanohydrolase หรือ CMCase (C_x) ตัดพันธะ β -1,4 –glycosidic bond ภายในสายเซลลูโลสอย่างสุ่มได้กลูโคส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ทำให้ลดความยาวของโพลีเมอร์ลงอย่างรวดเร็ว แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นช้า

2.2.2. Exo-β-glucanase หรือ 1,4 -β -D-glucan cellobiohydrolase หรือ avicelase (C_1) ตัดสายเซลลูโลสจากด้านปลาย non-reducing ได้กลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ความยาวของโพลีเมอร์เปลี่ยนปลงเล็กน้อย

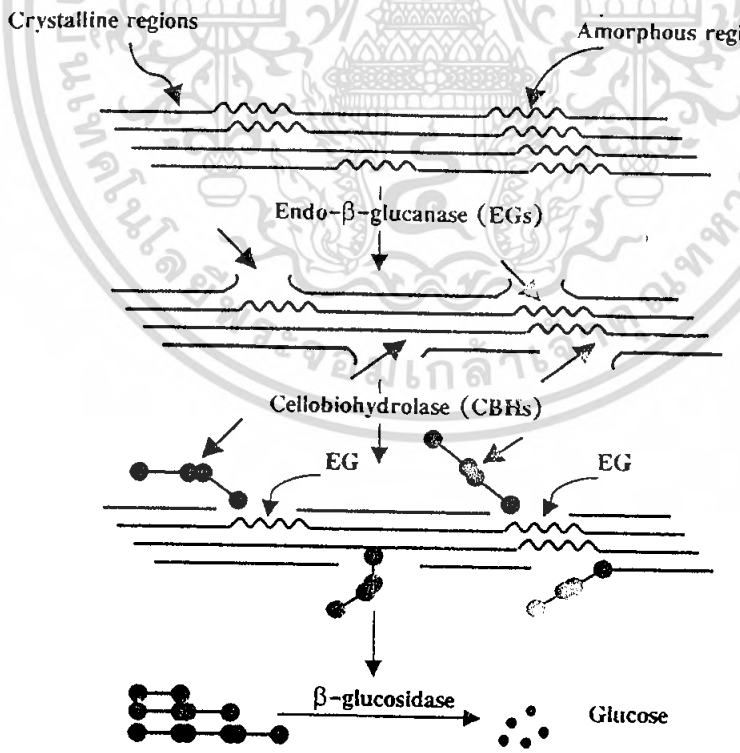
2.2.3. β-glucosidase หรือ cellobiase ย่อยเซลโลไบโอส(cellobiose)และโอลิโกแซคคาไรด์เป็นกลูโคส

ดังนั้น crystalline cellulose จะถูกย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ส่วนสับสเตรทที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียว คือ acid-swollen cellulose, carboxymethyl-cellulose (CMC) , cellulose azure และ trinitrophenyl-cellulose ซึ่งจะถูกย่อยโดย endoglucanase ส่วนสับสเตรทที่ถูกย่อยได้ด้วย exoglucanase ได้แก่ MUC (methylumbelliferyl-β-D-cellobiose) และ pNPC (p-nitrophenyl- β-D-cellobioside) ส่วน MUG (methylumbelliferyl-β-D-glycopyranoside) และ pNPG (p-nitrophenyl-β-D-glycopyranoside) ถูกย่อยด้วย β-glucosidases นอกจากนี้สับสเตรทที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกันได้แก่ filter paper และ avicel ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase ภาพที่ 4 แสดงลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส และภาพที่ 5 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลส โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ได้แก่ รา แบคทีเรีย และแอคทิโนมัยสีท โดยเฉพาะในรานั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ แต่เอนไซม์จากราเกิดกิจกรรมได้ดีที่สภาวะเป็นกรด ส่วนเอนไซม์จากแบคทีเรียนั้นมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูง และทนต่อความเป็นด่างได้ดี ทำให้สามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้อย่างกว้างขวาง (รุจิกาญจน์ , 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 ลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา : รุจิกาญจน์ (2546)



ภาพที่ 4 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส
ที่มา : รุจิกาญจน์ (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีรายงานว่า Bacillus หลายชนิด เช่น *Bacillus brevis* , *B. firmus* , *B. polymyxa* , *B. pulmilus* , *B. subtilis* , *B. licheniformis* และ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ แบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ขจีนาฎ , 2540)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ที่มา
Acetobacter xylinum	Okamoto *et al.* (1994)
Bacillus circulans	Kim (1995)
Bacillus subtilis	Nakamura *et al.* (1987)
Caldocellum saccharolyticum	Teo *et al.* (1995)
Cellulomonas biazotea	Rajoka and Malik (1997)
Cellulomonas fimi	Gilkes *et al.* (1997)
Cellvibrio mixtus	Fontes *et al.* (1998)
Clostridium absonum	Rani and Nand (2000)
Clostridium celluloticum	Belaich *et al.* (1997)
Clostridium papyrosolvens	Pohlschroder *et al.* (1995)
Clostridium thermocellum	Yague *et al.* (1990)
Fibrobacter succinogenes	Ozcan *et al.* (1996)
Ruminococcus albus	Attwood *et al.* (1995)
Ruminococcus flavefaciens	Flint *et al.* (1989)
Thermotoga maritima	Bronnenmeier *et al.* (1995)

ที่มา : ขจีนาฎ (2542)

2.3 ปัจจัยทางโภชนาการที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ (สุมาลี , 2542)

2.3.1. แหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ autotrophic prototrophs ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ ในขณะที่ heterotrophic prototophs ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน มีรายงานการใช้ soluble starch , glucose , maltose , lactose และ dextrin เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ได้ดี มีรายงานการใช้น้ำมัน 1-2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.3.2. แหล่งไนโตรเจน อาจเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ก็ได้ สารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์ และก๊าซไนโตรเจน ส่วนสารประกอบอินทรีย์อาจได้จากการสลายตัวของเซลล์พืชและสัตว์ จุลินทรีย์บางชนิดเปลี่ยนแอมโมเนียให้เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนแล้วปล่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกมานอกเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกันสามารถนำไปใช้ได้ มีรายงานว่า Yeast extract , Peptone , Tryptone และกากถั่วเหลือง เป็นสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี มีการรายงานการใช้ Peptone 3 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ Yeast extract 1 เปอร์เซนต์ ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* บางสายพันธุ์เพื่อผลิตเอนไซม์ Lipase

2.3.3. แหล่งพลังงาน จุลินทรีย์หลายชนิดใช้สารประกอบอินทรีย์ชนิดเดียวกันเป็นทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งพลังงาน เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก ในขณะที่บางชนิดใช้แป้ง น้ำตาล เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

2.3.4. ธาตุชนิดอื่นๆและสารช่วยการเจริญ เช่น กำมะถัน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก และสารช่วยการเจริญอื่นๆ จุลินทรีย์ต้องการใช้ในปริมาณไม่มากเท่าคาร์บอนและไนโตรเจน และมักได้รับจากสภาพแวดล้อมในขยะหรือน้ำเสียในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการอยู่แล้ว

2.4 แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (สมใจ , 2547)

จุลินทรีย์ มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย และไนโตรเจน เป็นต้น

แอมโมเนีย อาจใช้ในรูปแก๊ส หรือสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น25 เปอร์เซนต์ การใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะต้องระมัดระวังในเรื่องการเก็บรักษา เนื่องจากแอมโมเนียระเหยง่ายจึงต้องเก็บในภาชนะบรรจุที่ป้องกันการระเหยและทนต่อการกัดกร่อนได้

เกลือแอมโมเนีย ที่มีราคาถูกที่สุดได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป เพราะจะเกิด SO_4^{2-} ขึ้น ในทางตรงข้ามแก๊สแอมโมเนียและไนเตรทเมื่อถูกเมทาบอไลซ์ ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ในกรณีที่ใช้แอมโมเนียไนเตรท ตามปกติจะในระยะแรก NH_4^+ ถูกใช้ไปก่อน ทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรด จนกระทั่ง NH_4^+ หมด จุลินทรีย์จึงสังเคราะห์เอนไซม์ nitrate reductase และใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดด่างสูงขึ้น ยกเว้น *Gibberella fujikuroi* ที่ไนเตรทจะยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลาย NH_4^+ ที่ pH 2.8-3.0 ดังนั้นไนเตรทจึงถูกใช้ไปก่อน จนกระทั่งความเป็นกรดด่าง สูงมากพอ จึงจะมีการเมแทบอไลซ์ NH_4^+ ได้

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย ก็ได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน จุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะพวกมิวแดนท์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนชนิดที่มันต้องการอยู่ด้วยเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน เช่น การผลิตไลซีน จะใช้ soya bean hydrolysate เป็นแหล่งเมทไธโอนีน และทรีโอนีน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ตามในบางกรณี เช่น การผลิตวัคซีนบางชนิดสำหรับมนุษย์ มีความจำเป็นต้องใช้ chemically defined amino acid media ซึ่งไม่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่เลย

วัตถุอื่นๆที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่งลิสง ฟาร์มามีเดีย Distillers' soluble , Casein hydrolysate , Fish meal และ Yeast extract เป็นต้น

2.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน (สมใจ , 2547)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน จึงขึ้นกับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย เช่น เชื้อราโดยทั่วไปสามารถใช้เกลือแอมโมเนียมได้ดี ดังนั้นจึงนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักบางอย่าง ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนที่จุลินทรีย์เมเทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วอาจทำให้สร้างผลผลิตที่ต้องการได้น้อย โดยเฉพาะการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงนิยมใช้แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์เมเทบอไลซ์ได้อย่างช้าๆ เช่น การผลิตโพลีอีน (polyene) นิยมใช้กากถั่วเหลือง เนื่องจากมีโปรตีนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ย่อยสลายและดูดซึมไปใช้ได้อย่างช้า นอกจากนี้ยังมีธาตุอาหารอื่นๆ อย่างสมดุลและมีฟอสฟอรัสปริมาณต่ำอีกด้วย

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสารประกอบในขยะและน้ำเสียต่างๆได้แก่เอนไซม์เซลลูเลส จัดเป็น extracellular , hydrolytic enzyme พบได้ในเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergilus* spp. ,*Chaetomium* spp. , *Penicillium* spp. , *Fusarium* spp. ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Cellulomonas* spp. , *Bacillus* spp ., *Pseudomonas* spp. และ ในแอคติโนมัยสิท เช่น *Streptomyces* spp. , *Thermonospora* spp. (Bellamy,1977) เอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วย endo 1,4-β-glucanases , exo 1,4-β-glucanases และ 1,4-β-glucosidase ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะรวมกันย่อยเซลลูโลสได้กลูโคส (Bhat ,S. 1997 ; Eriksson *et al.* , 1990)

Asha , C. and Prema , P. (2006) ได้ทำการศึกษาความสามารถของเชื้อ *Bacillus pumilus* ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเชื้อตัวนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส โดยทำการศึกษาถึงระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ พบว่าการ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงด้วยระบบ Solid State Fermentation (SSF) จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ Submerged Fermentation (SmF) วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ SSF เป็นวิธีที่ง่าย ราคาไม่แพงและยังสามารถสกัดเอนไซม์ออกมาได้ในปริมาณมากอีกด้วย นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวสาลีเป็นองค์ประกอบ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะมีค่าสูงเมื่อมีค่า pH อยู่ระหว่าง 7-8 และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6-7 อุณหภูมิ 50 °C และยังสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 50-60 °C เนื่องจากความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้ของเอนไซม์ไซลาเนสทำให้เหมาะอย่างยิ่งต่อการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง

Asha , C. and Prema , P. (2007) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus pumilis* โดยทำการทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารประกอบจากแหล่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ ดังนี้ เปลือกข้าว, ฟางข้าว, ขี้เลื่อย, ชานอ้อย , กากมะพร้าวและ รำข้าวสาลี จากการศึกษาพบว่า รำข้าวสาลี เป็นแหล่งอาหารที่ทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด ทั้งนี้เพราะในรำข้าวสาลีประกอบด้วยน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ เช่น glucose 42.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง , xylose 15.4 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง, arabinose 3.1 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง และ galactose 2.7 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาผลของความชื้นและ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วย พบว่าที่ความชื้นมากกว่า 75 เปอร์เซนต์ เป็นความชื้นที่เหมาะสมที่สุด สำหรับ pH 8-9 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์

Hakamada *et al.* (1997) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ชนิด endo 1,4-β-glucanase ของ *Bacillus* sp. KMS-S237 โดยทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal คือ EGNTREDNFKHLGDNVKR โดยเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 86 กิโลดาลตัน และค่า pI เท่ากับ 3.8 และพบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการทำงานในช่วง pH 8.6-9.0 ได้ดี และเกิดกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 °C โดยมีความคงตัวได้เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 °C และยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 30 เปอร์เซนต์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 100 °C pH 9.0 เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krishna , C. (1999)ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเปลือกกล้วยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเป็นจำนวนมากจึงนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยทำการหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดให้กับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ซึ่งแยกได้จากเปลือกกล้วยตามแหล่งธรรมชาติ ในการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมให้กับเชื้อ โดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Beef extract และ Peptone พบว่า $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 3.7 และ 3.6 $IUgds^{-1}$ ตามลำดับซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกันมากจึงสามารถเลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่งก็ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าการใช้สารอินทรีย์จึงทำให้การเลือกใช้ $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ดีกว่าการใช้ Beef extract และ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมให้กับเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ เปลือกกล้วย, รำข้าวจ้าว, รำข้าวสาลี และฟางข้าว พบว่า เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ส่วนระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ Solid State Fermentation (SSF) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบ Submerged Fermentation (SmF) และ pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 7 ,อุณหภูมิ 35 °C , ความชื้น 70 เปอร์เซนต์ และระยะเวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากรายงานของ ขจีนาฏ สุมาลี และสมใจ (2541) ได้ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างน้ำเสียและดินจากแหล่งต่างๆที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ skim milk, tributyrin, starch, xylan และ carboxy methyl cellulose ได้จำนวน 259 isolates และได้คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบทั้ง 5 ชนิดไว้จำนวน 20 และคัดเลือกเชื้อมาใช้ในการบำบัดขยะ พบว่าการเติมเชื้อเพิ่มเติมจากเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ทำให้การย่อยสลายสารประกอบเกิดขึ้นได้ในอัตราที่รวดเร็วกว่าขยะชุดควบคุม (ขยะที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์) และทำให้น้ำหนักของขยะลดลงได้มากกว่าขยะชุดควบคุมถึง 2 เท่า และนอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในการคัดเลือกเชื้อมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศ พบว่า การเติมเชื้อสามารถลดค่าBOD ในน้ำเสียที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วันได้ดีกว่าชุดควบคุมถึง 70.86 เปอร์เซนต์ และแบบให้อากาศโดยการเขย่าการเติมเชื้อสามารถลดค่า BODในน้ำเสียได้ดีกว่าชุดควบคุมถึง 30.48 เปอร์เซนต์

จากรายงานของ สุมาลี ขจีนาฏและสมใจ (2542) ได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ 5 กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ xylan, carboxy methyl cellulose, skim milk และ tributyrin ตามลำดับ โดยวิธีการย้อมสีแกรมแบคทีเรียและเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์แล้วศึกษาเปรียบเทียบกับคู่มือการวิเคราะห์เชื้อ พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดของจุลินทรีย์ทุกกลุ่มอยู่ใน Genus

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus ส่วนเชื้อราทุกชนิดอยู่ใน Genus *Aspergillus* การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและพลังงานและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนพลังงานและอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรีย Sb1เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 เมื่อใช้หญ้าบดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลาการบ่มนาน 60 ชั่วโมง แบคทีเรีย Hbb3.2 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 เมื่อใช้รำข้าวจ้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลาการบ่มนาน 60 ชั่วโมง แบคทีเรีย Ma5 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลาการบ่มนาน 48 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรีย Sk7 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 เมื่อใช้รำข้าวจ้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลาการบ่มนาน 24 ชั่วโมง และแบคทีเรีย T5 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 5 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลาการบ่มนาน 96 ชั่วโมง นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า Yeast extract ส่วนเชื้อราให้ผลตรงข้ามกับแบคทีเรียคือใช้ Yeast extract ได้ดีกว่า ผลจากการแปรผันอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรียทุกกลุ่มเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วนเชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 °C ผลการแปรผันความชื้น pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ Solid State พบว่าความชื้น 60 เปอร์เซนต์ pH7 เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย ในขณะที่ความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ pH6-8 เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

Juhasz *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 โดยทำการหาชนิดของแหล่งคาร์บอน (carbon source) ที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ ต้นสนใบสั้น, ต้นหลิว, ซังข้าวโพด และSolka Floc ซึ่งก่อนนำวัตถุดิบเหล่านั้นมาใช้เป็นซับสเตรทนั้นต้องนำมาผ่านการแปรรูปทางเคมีที่เหมาะสมก่อน จากการศึกษาพบว่า ซังข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ *Trichoderma reesei* RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด ส่วน Solka Floc , ต้นหลิว และ ต้นสนใบสั้นให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมี
2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Centrikon T-42K
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrometer) รุ่น Spectro 22
4. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Adventurer Ohaus
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น M00
6. เตาแก๊ส
7. เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ GFL รุ่น 3017
8. ขวดรูปชมพู่
9. ขวดปรับปริมาตร
10. ปิเปต
11. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
12. หลอดทดลองขนาด 16x150
13. บีกเกอร์
14. กระบอกตวง
15. ลูปเขี่ยเชื้อ
16. กรวยแก้ว
17. ลูกแก้ว
18. แท่งแก้ว
19. ช้อนตักสาร
20. ขวดสีชา
21. ขวดพลาสติก
22. ตะเกียงแอลกอฮอล์
23. กระดาษทิชชู่
24. หม้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25. คิวเวทแก้ว

26. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแบบไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tommy รุ่น SS-325

27. Vortex mixer

28. ตู้เขี่ยเชื้อ ยี่ห้อ Microflow รุ่น ABS 1200

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ CMC

4. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Production medium

3.4 สารเคมี

1. Beef extract ยี่ห้อ MERCK

2. Peptone ยี่ห้อ MERCK

3. Yeast extract ยี่ห้อ MERCK

4..Glucose ยี่ห้อ MERCK

5. Ammonium sulfate ยี่ห้อ Carlo Erba Reagent

6. $NH_4H_2PO_4$ ยี่ห้อ Carlo Erba Reagent

7. KH_2PO_4 ยี่ห้อ MERCK

8. K_2HPO_4 ยี่ห้อ MERCK

9. $MgSO_4.7H_2$ ยี่ห้อ BDH

10. Tris HCl buffer ยี่ห้อ MERCK

11. สารละลาย Samogyi

12. สารละลาย Nelson

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว (รุจิกาญจน์ , 2546)

เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นดูดหัวเชื้อใส่ใน Production medium (อาหารเหลว CMC) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงบน

เอกสารนี้ได้รับการคุ้มครองลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนน้ำใส ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

3.5.2 การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน Production medium ซึ่งแปรผันแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ คือ Yeast extract , Peptone และ Ammonium sulfate และแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นดังนี้ 0.5 , 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 3.5.1 ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

3.6 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีของรุจิกาญจน์ (2546) (ภาคผนวก ข)

3.7 สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ห้อง D 317 D 318 โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth

จากการเตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติจำนวน 6 สายพันธุ์ได้แก่ O_2 , B1 , B8 , B12 , B17 และ B43 ในอาหารเหลว nutrient broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ใน อาหารเหลว nutrient broth เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร
O_2	1.285
B1	0.872
B8	0.813
B12	0.865
B17	0.817
B43	1.252

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ใน อาหารเหลว nutrient broth เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร
O_2	1.218
B1	0.905
B8	0.984
B12	0.916
B17	0.847
B43	1.275

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เพื่อดูความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.800-1.200 โดยสายพันธุ์ O_2 และ B43 มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด และสายพันธุ์ B1 , B8 , B12 และ B17 มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.800-1.000 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน

2. ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ดูดหัวเชื้อใส่มาปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ใน Production medium (อาหารเหลว CMC) ซึ่งแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ Yeast extract , Peptone และ Ammonium sulfate ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรบ่มเป็นเวลา 3 วัน สำหรับเชื้อ B8 , B17 และ เป็นเวลา 2 วัน สำหรับเชื้อ O_2 , B1 , B12 , B43 บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสที่ได้ ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งผลการทดลองวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน แสดงผลดังตารางที่ 3-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ O_2

แหล่งอาหาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Yeast extract/1	0.199	0.224	0.214	**0.212**	509.35	**516.56**
Yeast extract/2	0.217	0.206	0.230	**0.218**	523.77	
Peptone/1	0.245	0.257	0.230	**0.244**	586.23	**617.47**
Peptone/2	0.269	0.280	0.262	**0.270**	648.70	
Ammonium sulfate/1	0.418	0.427	0.415	**0.420**	1,009.09	**999.48**
Ammonium sulfate/2	0.408	0.417	0.410	**0.412**	989.87	

จากตารางที่ 3 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย O_2 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ Ammonium sulfate โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 999.48หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Peptone และ Yeast extract ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B1

แหล่งอาหาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Yeast extract/1	0.294	0.285	0.270	**0.283**	679.94	**685.95**
Yeast extract/2	0.291	-	0.285	**0.288**	691.95	
Peptone/1	0.238	0.245	0.228	**0.237**	569.42	**570.62**
Peptone/2	0.241	0.243	0.230	**0.238**	571.82	
Ammonium sulfate/1	0.360	0.357	0.355	**0.357**	857.73	**849.32**
Ammonium sulfate/2	0.344	0.348	0.357	**0.350**	840.91	

จากตารางที่ 4 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย B1 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ Ammonium sulfate โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 849.32 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Yeast extract และ Peptone ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97010

ตารางที่ 5 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B8

แหล่งอาหาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Yeast extract/1	0.247	-	0.231	**0.239**	574.22	**515.36**
Yeast extract/2	0.183	-	0.198	**0.190**	456.49	
Peptone/1	0.306	0.303	0.291	**0.300**	720.78	**713.57**
Peptone/2	0.284	0.301	0.298	**0.294**	706.36	
Ammonium sulfate/1	0.403	0.410	0.392	**0.401**	963.44	**940.62**
Ammonium sulfate/2	0.373	0.390	0.382	**0.382**	917.80	

จากตารางที่ 5 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย B8 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ Ammonium sulfate โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 940.62 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Peptone และ Yeast extract ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B12

แหล่งอาหาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Yeast extract/1	0.339	0.327	0.334	**0.333**	733.39	**711.37**
Yeast extract/2	0.314	0.322	0.302	**0.313**	689.35	
Peptone/1	0.389	0.383	0.375	**0.382**	841.31	**844.62**
Peptone/2	0.379	0.391	0.386	**0.385**	847.92	
Ammonium sulfate/1	-	0.430	0.437	**0.433**	953.63	**971.25**
Ammonium sulfate/2	0.451	-	0.446	**0.447**	988.87	

จากตารางที่ 6 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย B12 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ Ammonium sulfate โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 971.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Peptone และ Yeast extract ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B17

แหล่งอาหาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Yeast extract/1	0.248	0.256	0.270	**0.258**	619.87	**601.85**
Yeast extract/2	0.250	0.230	0.248	**0.243**	583.83	
Peptone/1	0.305	0.325	0.318	**0.316**	759.22	**760.42**
Peptone/2	0.320	0.315	0.316	**0.317**	761.62	
Ammonium sulfate/1	0.458	0.423	0.438	**0.440**	1,057.14	**1,035.51**
Ammonium sulfate/2	0.426	0.424	0.416	**0.422**	1,013.89	

* ใช้กราฟมาตรฐานครั้งที่ 2 ในการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

จากตารางที่ 7 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย B17 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ Ammonium sulfate โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,035.51 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Peptone และ Yeast extract ตามลำดับ

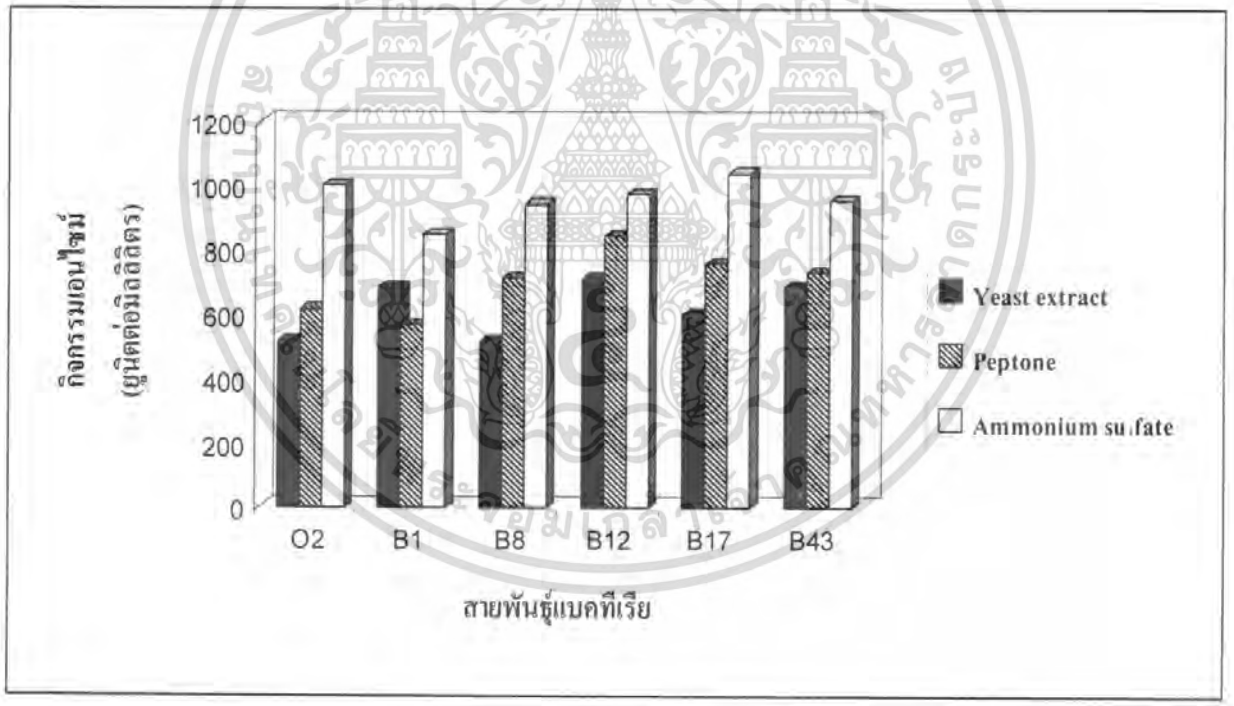
ตารางที่ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B43

แหล่งอาหาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Yeast extract/1	0.287	0.281	0.285	**0.284**	682.34	**688.35**
Yeast extract/2	0.282	0.298	0.288	**0.289**	694.35	
Peptone/1	0.310	0.323	0.304	**0.312**	749.61	**730.39**
Peptone/2	0.284	0.306	0.298	**0.296**	711.17	
Ammonium sulfate/1	0.395	0.398	0.403	**0.399**	958.64	**949.03**
Ammonium sulfate/2	0.381	0.399	0.392	**0.391**	939.42	

จากตารางที่ 8 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย B43 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ Ammonium sulfate โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 949.03 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Peptone และ Yeast extract ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์สูงในแหล่งไนโตรเจน **Ammonium sulfate** โดยเชื้อแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ สายพันธุ์ B17 ให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,035.51 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ O_2 , B12 , B43, B8 และ B1 ให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจน Yeast extract และ Peptone ให้กิจกรรมเอนไซม์ในระดับต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Ammonium sulfate เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจน **Peptone** พบว่าเชื้อแบคทีเรีย B12 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 844.62 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ B17, B43 , B8 , O_2 , และ B1 ให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ และเมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจน **Yeast extract** พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ B12 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 711.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ B43, B1, B17, O_2 และ B8 ให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ



ภาพที่ 5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟแสดงการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ O_2 ,B1, B8, B12, B17, B43 โดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ จะเห็นว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ Ammonium sulfate รองลงมาคือ Peptone และ Yeast extract ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Ammonium sulfate มีความสามารถในการแตกตัวเป็นประจุบวก (NH_4^+) และประจุลบ (SO_4^{2-}) ทำให้มีความสามารถผ่านเข้า-ออกเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี และจากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการใช้ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า Yeast extract ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ สุมาลี ขจีนาฏ และสมใจ (2542) ที่กล่าวว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่คือใช้ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า Yeast extract นอกจากนั้นความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ (สมใจ , 2547) จากการวิจัยของ Krishna, C. (1999) ได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมให้กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Beef extract และ Peptone พบว่า $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 3.7 และ 3.6 $IUgds^{-1}$ ตามลำดับซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกันมาก จึงสามารถเลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่งก็ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าการใช้สารอินทรีย์จึงทำให้การเลือกใช้ $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ดีกว่าการใช้ Beef extract และ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3. ผลการศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนเที่เหมาะสมต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ Ammonium sulfate จึงถ่ายเชื้อลงใน Production medium ซึ่งมี Ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และผันแปรปริมาณของ Ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.5 , 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจน แสดงผลดังตารางที่ 9 – 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ O_2

แหล่งไนโตรเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Ammonium sulfate0.5g/l (1)	0.410	0.416	0.412	**0.413**	909.58	**895.26**
Ammonium sulfate0.5g/l (2)	0.407	0.402	0.390	**0.400**	880.95	
Ammonium sulfate1.0g/l (1)	0.492	0.497	-	**0.495**	1,090.18	**1,081.37**
Ammonium sulfate1.0g/l (2)	0.481	0.485	0.495	**0.487**	1,072.56	
Ammonium sulfate1.5g/l (1)	0.457	0.454	-	**0.456**	1,004.28	**995.48**
Ammonium sulfate1.5g/l (2)	0.447	0.450	-	**0.448**	986.67	

จากตารางการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ O_2 โดยใช้ Ammonium sulfate ในปริมาณ 3 ระดับ พบว่า Ammonium sulfate 1.0 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 1,081.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ระดับ 1.5 และ 0.5 กรัมต่อลิตรโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 995.48 และ 895.26 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยเมื่อใช้ปริมาณ Ammonium sulfate 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียมีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ Ammonium sulfate เป็น 1.5 กรัมต่อลิตรกลับส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก Ammonium sulfate ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เกิดสภาวะความเป็นกรด ซึ่งถ้ามีปริมาณมากเกินไปก็จะส่งผลให้สภาวะในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจาก NH_4^+ ถูกใช้หมดไปและทำให้เกิด SO_4^{2-} ขึ้น ดังนั้นถ้าในอาหารเลี้ยงมี SO_4^{2-} มากก็จะส่งผลให้มีความเป็นกรดสูงในทางตรงกันข้ามถ้ามี SO_4^{2-} น้อยก็จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดต่ำตามไปด้วย (สมใจ , 2547) นอกจากนี้ยังเกิดจากการกดการสังเคราะห์เอนไซม์โดยแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Nitrogen source repression)ที่ใช้ โดยเมื่อถ้ามีปริมาณของ Ammonium sulfate มากเกินไปเอนไซม์จะถูก repress โดย NH_4^+ ซึ่งจะไปกดดันการทำงานของเอนไซม์ Ribonuclease ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนหรือการผลิตเอนไซม์ลดน้อยลง (บุญเทียม , 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B1

แหล่งไนโตรเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Ammonium sulfate0.5g/l (1)	0.382	0.390	0.428	**0.400**	880.95	**809.37**
Ammonium sulfate0.5g/2 (2)	0.342	-	0.328	**0.335**	737.79	
Ammonium sulfate1.0g/l (1)	0.383	0.382	0.380	**0.382**	841.31	**834.71**
Ammonium sulfate1.0g/l (2)	0.369	-	0.384	**0.376**	828.10	
Ammonium sulfate1.5g/l (1)	0.283	0.366	0.326	**0.325**	715.77	**798.36**
Ammonium sulfate1.5g/l (2)	0.394	-	0.406	**0.400**	880.95	

จากตารางการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ B1 โดยใช้ Ammonium sulfate ในปริมาณ 3 ระดับ พบว่า Ammonium sulfate 1.0 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 834.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ระดับ 0.5 และ 1.5 กรัมต่อลิตรโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 809.37 และ 798.36 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งAmmonium sulfate ทั้ง 3 ระดับนี้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ B1 ให้กิจกรรมเอนไซม์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ B1 มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดได้ในช่วงกว้าง และเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Ammonium sulfate ระดับ 0.5-1.5 กรัมต่อลิตรได้โดยไม่มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถผลิดเอนไซม์ได้โดยไม่มีพิษต่อจุลินทรีย์ (บุญเทียม , 2549)

ตารางที่ 11 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B8

แหล่งไนโตรเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Ammonium sulfate0.5g/l (1)	0.546	0.505	0.526	**0.525**	1,261.36	**1,250.55**
Ammonium sulfate0.5g/l (2)	0.427	0.574	0.548	**0.516**	1,239.74	
Ammonium sulfate1.0g/l (1)	0.407	0.434	0.425	**0.422**	1,013.89	**1,005.49**
Ammonium sulfate1.0g/l (2)	-	0.410	0.421	**0.415**	997.08	
Ammonium sulfate1.5g/l (1)	-	0.445	0.453	**0.449**	1,078.77	**1,048.74**
Ammonium sulfate1.5g/l (2)	0.422	0.420	0.431	**0.424**	1,018.70	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ B8 โดยใช้ Ammonium sulfate ในปริมาณ 3 ระดับ พบว่า Ammonium sulfate 0.5 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 1,250.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ระดับ 1.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,048.74 และ 1,005.49 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรีย B8 มีความสามารถทนต่อความเป็นกรดได้น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรีย O_2 และเมื่อมีปริมาณ Ammonium sulfate มากเกินไป NH_4^+ ก็จะไปกดดันการทำงานของเอนไซม์ Ribonuclease ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนหรือการผลิตเอนไซม์ลดน้อยลง นอกจากนั้นการเติมสารอาหารมากเกินไปจะเกิดเป็นผลิตผลปริมาณมากแล้วผลิตผลนั้นจะไปกด(repress) ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้น ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ จนกว่าผลิตผลจะถูกใช้หมดไปหรือลดลงจนถึงระดับหนึ่งแล้วจึงเกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ต่อไปได้ (บุญเทียม , 2549) ดังจะเห็นได้จากเมื่อปริมาณ Ammonium sulfate เพิ่มขึ้นส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

ตารางที่ 12 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B12

แหล่งไนโตรเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Ammonium sulfate0.5g/l (1)	0.413	0.408	0.425	**0.415**	913.99	**909.59**
Ammonium sulfate0.5g/l (2)	0.402	-	0.420	**0.411**	905.18	
Ammonium sulfate1.0g/l (1)	0.436	0.422	0.433	**0.430**	947.02	**949.23**
Ammonium sulfate1.0g/l (2)	0.420	-	0.444	**0.432**	951.43	
Ammonium sulfate1.5g/l (1)	0.468	0.446	0.444	**0.453**	997.68	**1,011.91**
Ammonium sulfate1.5g/l (2)	-	0.465	0.467	**0.466**	1,026.31	

จากตารางการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ B12 โดยใช้ Ammonium sulfate ในปริมาณ 3 ระดับ พบว่า Ammonium sulfate 1.5 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 1,011.91 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องมาจากมีปริมาณ Ammonium sulfate ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยไม่มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้โดยไม่มีพิษต่อจุลินทรีย์ (บุญเทียม , 2549) รองลงมาคือที่ระดับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 909.59 และ 949.23 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version. 11 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จะสูงขึ้นเมื่อปริมาณ Ammonium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sulfate เพิ่มขึ้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B17

แหล่งไนโตรเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Ammonium sulfate0.5g/l (1)	0.421	0.413	0.409	**0.414**	994.68	**973.06**
Ammonium sulfate0.5g/l (2)	0.398	0.409	0.381	**0.396**	951.43	
Ammonium sulfate1.0g/l (1)	0.457	0.450	0.422	**0.449**	1,078.77	**1,089.58**
Ammonium sulfate1.0g/l (2)	0.467	0.451	0.458	**0.458**	1,100.39	
Ammonium sulfate1.5g/l (1)	0.489	0.495	0.503	**0.496**	1,191.69	**1,206.11**
Ammonium sulfate1.5g/l (2)	0.510	0.499	0.514	**0.508**	1,220.52	

จากตารางการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ B17 โดยใช้ Ammonium sulfate ในปริมาณ 3 ระดับ พบว่า Ammonium sulfate 1.5 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 1,206.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องมาจากมีปริมาณ Ammonium sulfate ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยไม่มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้โดยไม่มีพิษต่อจุลินทรีย์ (บุญเทียม , 2549) รองลงมาคือที่ระดับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 973.06 และ 1,089.58 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version. 11 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้สูงขึ้นเมื่อปริมาณ Ammonium sulfate เพิ่มขึ้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

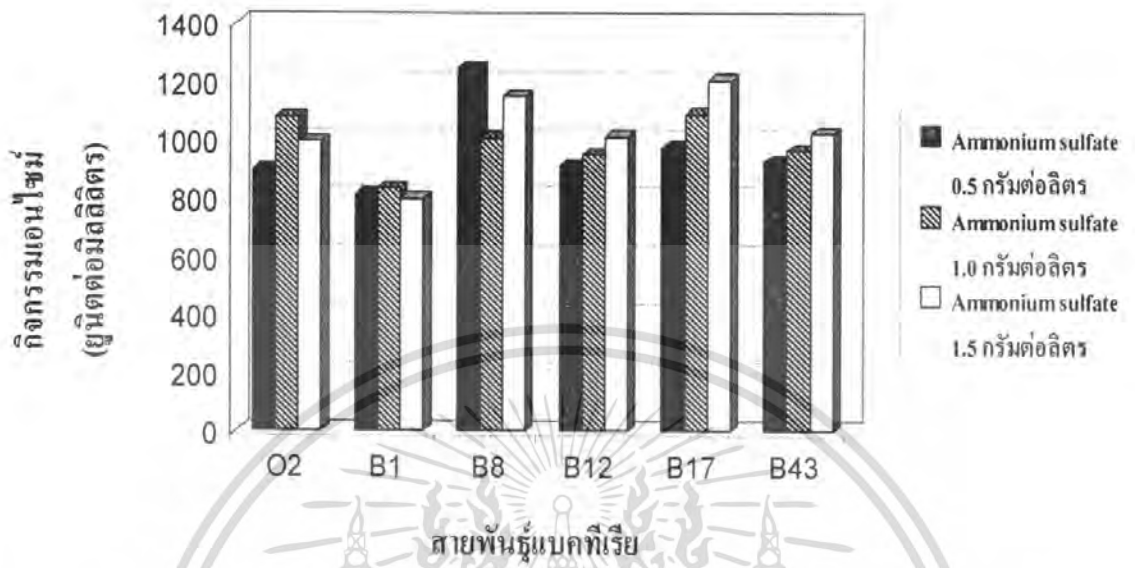
ตารางที่ 14 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติสายพันธุ์ B43

แหล่งไนโตรเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร				กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย		
Ammonium sulfate0.5g/l (1)	0.420	0.414	0.417	**0.417**	918.40	**925.01**
Ammonium sulfate0.5g/l (2)	0.428	0.415	0.425	**0.423**	931.61	
Ammonium sulfate1.0g/l (1)	0.450	0.443	0.433	**0.422**	973.45	**964.64**
Ammonium sulfate1.0g/l (2)	0.436	0.415	0.450	**0.434**	955.83	
Ammonium sulfate1.5g/l (1)	0.470	0.464	0.460	**0.464**	1,021.90	**1,020.80**
Ammonium sulfate1.5g/l (2)	0.458	0.462	0.470	**0.463**	1,019.70	

จากตารางการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ B43 โดยใช้ Ammonium sulfate ในปริมาณ 3 ระดับ พบว่า Ammonium sulfate 1.5 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 1,020.80 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องมาจากมีปริมาณ Ammonium sulfate ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยไม่มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้โดยไม่มีพิษต่อจุลินทรีย์ (บุญเทียม , 2549) รองลงมาคือที่ระดับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 925.01 และ 964.64 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version. 11 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้สูงขึ้นเมื่อปริมาณ Ammonium sulfate เพิ่มขึ้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองการหาปริมาณ Ammonium sulfateที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยศึกษาปริมาณ Ammonium sulfate 3 ระดับ คือ 0.5 , 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ B8 โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,250.55 หน่วยต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้ปริมาณ Ammonium sulfate 0.5 กรัมต่อลิตร ขณะที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ O_2 และ B1 ให้กิจกรรมเอนไซม์1,081.37 และ 834.71 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับเมื่อใช้ Ammonium sulfate 1.0 กรัมต่อลิตร และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ B12 ,B17 และ B43 ให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,011.99 , 1,206.11 และ 1,020.80 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับเมื่อใช้ Ammonium sulfate 1.5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ผลของปริมาณ Ammonium sulfate ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์

จากกราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ O_2, B1, B8, B12, B17, B43 โดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ โดยจะสังเกตได้ว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ให้กิจกรรมเอนไซม์สูง (มากกว่า 500 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ทั้งนี้เนื่องมาจากในอาหารเหลว CMC ที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีทั้งแหล่งและปริมาณคาร์บอน (carbon source) , แหล่งและปริมาณไนโตรเจน (nitrogen source) ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจึงส่งผลให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงตามไปด้วย โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงคือ B8 และ B17 เมื่อเปรียบเทียบกับ O_2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. 2004. [online]. เข้าถึงได้จาก: www.appjob.com/detailresume.php?gid =0000287261 - 34k

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์. 2006. [online]. เข้าถึงได้จาก: th.wikipedia.org/wiki/การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ - 41k

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล,สุมาลี เหลืองสกุลและสมใจ ศิริโภค. 2541.**รายงานการวิจัย เรื่องการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2549. **การควบคุมเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์.** โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2550. **เทคโนโลยีเอนไซม์.** โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร.** กรุงเทพ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 129-130 .

รุจิกาญจน์ นาสนิท . 2546. **วิทยานิพนธ์ เรื่องการศึกาเอนไซม์เซลลูเลสและยีนที่เกี่ยวข้องจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**, กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโภค. 2547. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรมเกษตร.** กรุงเทพ: สำนักพิมพ์ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. หน้า 87- 88

สุมาลี เหลืองสกุล,ขจีนาฏ โพธิเวชกุลและสมใจ ศิริโภค. 2542. **รายงานการวิจัย เรื่องการวิเคราะห์ชนิดและการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

Asha , C. and Prema , P. 2006. Production and partial characterization of endoxylanase by Bacillus pumilus using agro industrial residues. **Biochemical Engineering**. (106-112)

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

Bhat ,S. 1997. Cellulase degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechol.Adv**.15: 583-620

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bhat,K.M. and Maheshwari,R. 1987. *Sporotrichum thermophile* growth, cellulose degradation and cellulose activity. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol.53,No.9: 2175-2182.

Eriksson,K-E.L., Blanchette,R.A. and Ander,P. 1990. **Microbial and enzymatic dgradation of wood and woodcomponents**. Springer-Verlag Berlin heiberg, Newyork.

Hakamada,Y., Kenzo,K.,Tadashi,Y., Hajime,M., Tohru,K. and Susumu,I. 1997. Thermostable alkaline cellulose from an alkaliphilic isolate, Bacillus sp. KSM-S237. **Extremophiles**. 1: 151-156.

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

Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulose by solid state bioprocessing of banana wastes. **Bioprocess Teachnology**.(231-239)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Production medium

Soluble starch	10	กรัม
Casamino acid	5	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร pH 7.0

2. Nutrient broth (NB)

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	กรัม

3. อาหารเหลว CMC

$NH_4H_2PO_4$	2.0	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
K_2HPO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
CMC	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	กรัม

4. Nutrient agar(NA)

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส
2. การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย CMC ความเข้มข้น 0.5% ที่ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาจากนั้นนำมาหาน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Samogyi method (Nelson,1994) และสำหรับหลอดควบคุมใช้สารละลายเอนไซม์ซึ่งนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ในการหากิจกรรมของเอนไซม์นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสารตั้งต้นได้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้กลูโคสเป็นสรมาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

หมายเหตุ

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Samogyi-Nelson

1. การเตรียม reagent

- <u>การเตรียม Samogyi</u>

1. $CuSO_4.5H_2O$ 10 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
2. ชั่ง Na_2HPO_4 28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium Potassium Tartate 120 กรัม คนให้ละลายจนหมดแล้วเติมสารละลาย NaOH 1 M 100 มิลลิลิตร เติม Na_2SO_4 anhydrous 120 กรัมเมื่อละลายจนหมดปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตรตั้งที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4
3. ผสม ข้อ1 และ ข้อ 2 ก่อนใช้

- <u>การเตรียม Nelson</u>

1. ละลาย Ammoniummolybdate $[(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 21 มิลลิลตร ผสมให้เข้ากัน
2. ละลาย Disodium Arsenate ($Na_2HaSO_4.7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายข้อ1 และข้อ 2เข้าด้วยกันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเก็บไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์น้ำตาล

- เตรียมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 0 25 50 75 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น

- เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลม่เกิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน) 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมน้ำยา Samogyi 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

- นำมาเติมน้ำยา Nelson 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

- อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

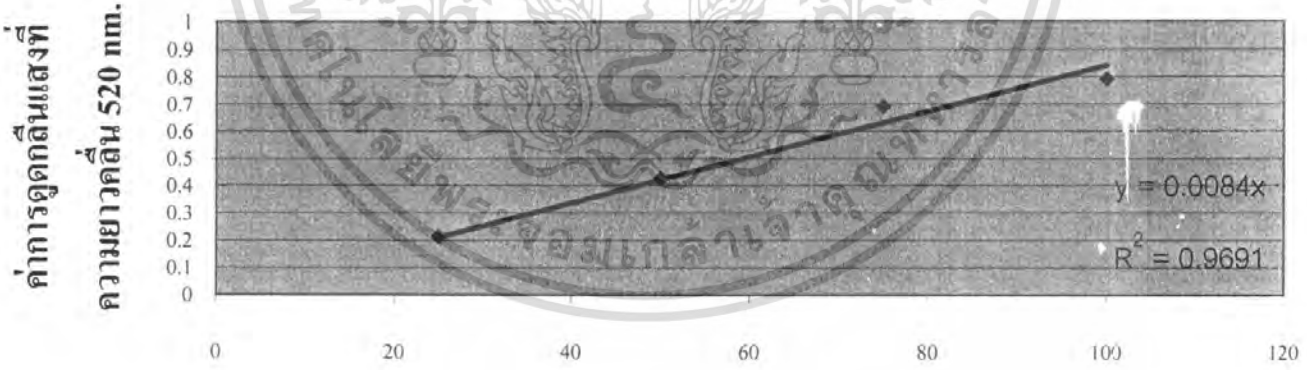
ภาคผนวก ค

1.กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ตารางผนวกที่1ค ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 520 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
25	0.228	0.205	0.213	0.215
50	0.377	0.416	0.489	0.427
75	0.650	0.727	0.701	0.692
100	0.793	0.799	0.782	0.791

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm.

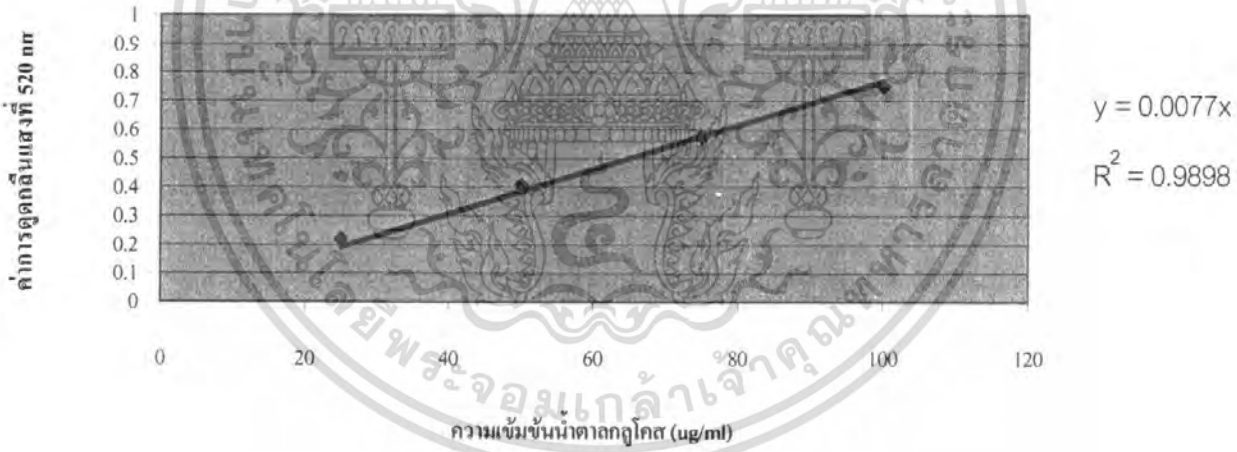


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่2 ค ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 520 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
25	0.213	0.232	0.219	0.221
50	0.398	0.412	0.408	0.406
75	0.558	0.592	0.573	0.574
100	0.728	0.750	0.778	0.752

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสค่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ตัวอย่างการคำนวณ unit enzyme

1 unit enzyme = 1 mole ของสับสเตรทที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 mole ของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 180 ไมโครกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที = 1 unit enzyme

1.000 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 30 นาที = 1/(0.18030)

= 0.185

จากกราฟมาตรฐานกลูโคส ได้สมการ คือ Y = 0.0077X

Dilution factor = 50 เท่า

เชื้อ B1/1 ค่าเฉลี่ย (glucose) แทนค่า 0.212 = 0.0077X

= 27.53

Dilution factor 50 เท่า = 27.53 x 50 = 1376.62

โดย X คือ ปริมาณกลูโคสที่ได้ในเวลา 30 นาที

แทนค่า = X(0.185) unit enzyme

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร = 1,376.62(0.185) unit enzyme

1 มิลลิลิตร = 1,376.62(0.185)/0.5 units/มิลลิลิตร

= 509.35 units/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3ค ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้ง 3 ระดับของ B8 ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ACTIVITY

	ปริมาณ	N	Subset for alpha = .05
			1
Duncan[a]	B	2	1005.485
	C	2	1152.040
	A	2	1250.550
	Sig.		.111

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

หมายเหตุ A : 0.5 g/l , B : 1.0 g/l , C : 1.5 g/l

ตารางผนวกที่ 4ค ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้ง 3 ระดับของ B17 ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ACTIVITY

	ปริมาณ	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan[a]	A	2	973.0550		
	B	2		1089.580	
	C	2			1206.105
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

หมายเหตุ A : 0.5 g/l , B : 1.0 g/l , C : 1.5 g/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ O_2 , B1 , B8 , B12 , B17 และ B43 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติและสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ปริมาณสูงมาเลี้ยงในอาหารเหลว production medium เพื่อผลิต crude enzyme จากนั้นนำ crude enzyme ที่ได้ไปทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณสูง โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ Yeast extract , Peptone และ Ammonium sulfate

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์สูงในแหล่งไนโตรเจน **Ammonium sulfate** ดังนั้นสารนี้จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์

สำหรับการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ ได้ศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจน 3 ระดับ คือ Ammonium sulfate 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงเมื่อใช้ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณมากโดยพิจารณาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ O_2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุม ให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,081.37 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ B8 ให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,250.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ Ammonium sulfate 0.5 กรัมต่อลิตร และ B17 ให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,206.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ Ammonium sulfate 1.5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ B8 และ B17 จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณสูง ซึ่งสามารถนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้นี้ไปทำการศึกษาต่อไปเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้