

**Cellulase-free Xylanase จาก Alkaliphilic
Thermotolerant *Bacillus halodurans*
สายพันธุ์ C-1 ต่อการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
และเยื่อกระดาษคราฟท์ต่างๆ**

จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ¹ กนก รัตนะกนกชัย² และ คิน เลย์ คุ³
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

บทคัดย่อ

Alkaliphilic thermotolerant *Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 ผลิตไซลานเนสที่ปราศจากเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส เมื่อเจริญในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในภาวะเป็นด่าง ไซลานเนสทำงานได้ดีที่พีเอช 6.0 และที่พีเอช 9.0 ยังคงเหลือกิจกรรมไซลานเนสสูงถึงร้อยละ 78 มีเสถียรภาพดีในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 9.0 นาน 1 ชั่วโมง ขณะที่ไซลานเนสทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพดีในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าไซลานเนสสามารถย่อยไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเยื่อกระดาษต่างๆ ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ โดยอัตราการย่อยไซแลนในเปลือกข้าวโพดสูงสุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว ชังข้าวโพด และรำข้าว ตามลำดับ ขณะที่อัตราการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษ พบว่าเยื่อชานอ้อยถูกย่อยได้มากที่สุด โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าเยื่อคาลิปต์สและเยื่อสน 2.7 และ 7.5 เท่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอัตราการปลดปล่อย chromophore จากเยื่อคาลิปต์สสูงสุด รองลงมาคือ เยื่อชานอ้อย และเยื่อสน ตามลำดับ

คำสำคัญ : ไซลานเนส / Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* Strain C-1 / วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร / เยื่อกระดาษคราฟท์ / Chromophore

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

² รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

³ ผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Cellulase-free Xylanase from Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* Strain C-1 for Hydrolysis of Agricultural Residues and Kraft Pulps

Chakrit Tachaapaikoon¹ Khanok Ratanakhanokchai² and Khin Lay Kyu³

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Abstract

An alkaliphilic thermotolerant bacterium, *Bacillus halodurans* strain C-1, produces cellulase-free xylanase when grown in an alkaline xylan medium. The optimum pH of the enzyme activity was 6.0 and it retained 78% activity at pH 9.0. The enzyme was stable at pH 5.0 to 9.0 for 1 hour. The optimum temperature of the enzyme was 70°C and it was stable at 40 to 60°C for 30 minutes. The hydrolysis of agricultural residues and kraft pulps by xylanase was studied at 50°C and pH 9.0. The hydrolysis rate of xylan in corn hull was better than those of sugarcane bagasse, rice straw, corn cop and rice bran. Alternatively, the hydrolysis rate of xylan in sugarcane pulp was 2.7 and 7.5 folds higher than those of eucalyptus and pine pulps, respectively. However, rate of releasing chromophores from eucalyptus pulp was greater than sugarcane and pine pulps, respectively.

Keywords : Xylanase / Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* Strain C-1 /
Agricultural Residue / Kraft Pulp / Chromophore

¹ Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

² Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

³ Expert, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

1. บทนำ

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืช โครงสร้างของไซแลนมีลักษณะเป็นสายโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -D-1,4-linkage และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล [1] ไซแลนเป็นเอนไซม์หลักและมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลน ซึ่งมีรายงานว่าทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซีต และยีสต์สามารถผลิตไซแลเนสได้ โดยจุลินทรีย์ต่างๆ มักผลิตไซแลเนสออกมามากกว่า 1 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยไซแลนต่างกัน โดยให้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลขนาดต่างกัน และไซแลเนสต่างๆทำงานร่วมกันในการย่อยไซแลนให้สมบูรณ์ [2]

ปัจจุบันมีการนำไซแลเนสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูงขึ้น ได้แก่ แหล่งพลังงานเชื้อเพลิง เอธิลแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ต่างๆ การนำไซโลโบโอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยไซแลนไปใช้เป็นอาหารของ *Bifidobacteria* ที่พบบริเวณลำไส้เล็กของมนุษย์ โดยเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ช่วยรักษาสภาพสมดุลย์ภายในลำไส้เล็กให้อยู่ในสภาวะปกติ การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยพบว่าไซแลเนสสามารถช่วยให้สัตว์ปีกนำเศษพืชต่างๆมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น [3] และในปัจจุบันมีการนำไซแลเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษคราฟท์ที่ผ่านกระบวนการต้มด้วยต่าง [4] และมีความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสามารถช่วยรักษาสภาพสิ่งแวดล้อม โดยลดปริมาณสาร adsorbable organic halogen ซึ่งย่อยได้ยากมากในธรรมชาติที่เกิดจากการฟอกสีเยื่อกระดาษคราฟท์ด้วยสารคลอรีน ส่วนในด้านผลิตภัณฑ์พบว่าช่วยลดปริมาณคลอรีนอิสระที่มีอยู่ในเยื่อกระดาษ ปรับปรุงคุณสมบัติของเส้นใยกระดาษ การดูดซับน้ำของเยื่อกระดาษเพิ่มขึ้น และช่วยเพิ่มความสว่างให้แก่เยื่อกระดาษ [5]

ไซแลเนสจากจุลินทรีย์บางชนิดประกอบด้วย catalytic domain และ non-catalytic xylan-binding domain (XBD) ซึ่งมีความจำเพาะต่อการจับกับไซแลนที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ และเป็นส่วนสำคัญในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท โดยทำหน้าที่ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทบนเอนไซม์ ซึ่งส่วนที่เป็น XBD แยกจากบริเวณ catalytic domain อย่างชัดเจน [6] XBD พบน้อยมากในธรรมชาติ ปัจจุบันยังไม่มีการจัดกลุ่ม XBD เนื่องจากการค้นพบไม่มากและมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่ผลิตได้ XBD มีบทบาทสำคัญต่อการช่วยย่อยสลายสารประกอบไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่ทำให้การย่อยสลายไซแลนในเยื่อกระดาษมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น Fernandes และคณะ [6] รายงานว่าคุณสมบัติของส่วนที่ยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำช่วยส่งเสริมให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำเพิ่มมากขึ้นโดยช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท

B. halodurans สายพันธุ์ C-1 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากระบบบำบัดน้ำทิ้งโรงงานผลิตเยื่อกระดาษของบริษัทเยื่อกระดาษสยาม จำกัด จังหวัดราชบุรี [7] ซึ่งเจริญได้ดีในภาวะที่เป็นด่าง เเพาะเลี้ยงได้ง่าย และโตเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก ผลิตไซแลเนสที่ทำงานได้ในสภาวะที่เป็นด่าง และปราศจากเซลล์เลส จึงไม่ทำลายเซลล์ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเยื่อกระดาษ [8] นอกจากนี้ยังพบว่าไซแลเนสที่ผลิตจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ประกอบด้วยไซแลเนสอย่างน้อย 6 ชนิด และสองชนิดที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก (16 และ 17 กิโลดาลตัน) มีคุณสมบัติ

ยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ [7] จากคุณสมบัติดังกล่าวไซแลนจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาค้นคว้าถึงคุณสมบัติต่างๆของไซแลน การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการย่อยและปลดปล่อย chromophore ออกจากเยื่อกระดาษต่างๆ ภายใต้ภาวะที่เป็นต่าง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การจำแนกจุลินทรีย์

จำแนกจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rDNA ตามวิธีของ Giovannoni และคณะ [9] ซึ่ง 16S rDNA จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยเครื่อง DNA thermal cycler (model 9600; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) โดยใช้ sense primer (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') และ antisense primer (5'-AGG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') ซึ่งสังเคราะห์โดยหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ชิ้นส่วน DNA fragment ของ 16S rDNA ถูกเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega Corporation; USA) และนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งใช้เป็น competent cell จากนั้นคัดเลือก cloning colony และเพิ่มจำนวนชิ้นยีน 16S rDNA ที่อยู่ใน cloning colony ด้วย T7 และ SP6 primer (Promega Corporation; USA) แล้วหาลำดับเบสของ 16S rDNA ด้วยเครื่อง Sequencing analyzer (377 DNA sequencer, ABI) ซึ่งวิเคราะห์โดยหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และจัดเรียงลำดับเบสด้วยโปรแกรม Clustal X นำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบส 16S rDNA ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information databases (NCBI)

2.2 การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เพาะเลี้ยง alkaliphilic thermotolerant *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 [7] ในสูตรอาหารเหลวของ Berg และคณะ [10] ซึ่งประกอบด้วย NaNO_3 ร้อยละ 0.2, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.02, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.002, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.002 และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.002 ซึ่งปรับพีเอชเป็น 10.0 หลังจากผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 10 และมีไซแลนร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ใน incubator shaker ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้คือ crude enzyme ซึ่งเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

ตรวจสอบกิจกรรมไซแลนเนส โดยเติม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายไซแลนร้อยละ 1 ใน 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson

[11] โดยใช้โซโลสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบกิจกรรมเซลลูเลสมีขั้นตอนการวิเคราะห์และภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมของไซลานเนส แต่ใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสแทนไซแลน และใช้กลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐานแทนโซโลส [12]

1 ยูนิต (U) ของเอนไซม์ไซลานเนสหรือเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโซโลสหรือกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ ภายใต้ภาวะที่ทำการทดสอบ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง โดยวิธีของ Lowry และคณะ [13] และใช้สารละลาย bovine serum albumin ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

2.5 การศึกษาคุณสมบัติของไซลานเนส

ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของไซลานเนส

ตรวจสอบผลของพีเอชต่อการทำงานของ crude enzyme โดยใช้วิธีการเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมไซลานเนส แต่ผสมไซแลนใน 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่มีค่าพีเอช ระหว่าง 5.0-11.0 ซึ่งประกอบด้วยซिटริกบัฟเฟอร์ (พีเอช 5.0-6.0) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0-7.0) Tris-HCl บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0-9.0) และคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ (พีเอช 9.0-11.0) ส่วนการตรวจสอบเสถียรภาพของ crude enzyme ทำการทดลองโดยบ่มเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชระหว่าง 5.0-11.0 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตรวจวัดกิจกรรมที่เหลืออยู่ตามวิธีการข้างต้น และเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงสุด (คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์)

ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของไซลานเนส

การตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude enzyme ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมไซลานเนส โดยนำเอนไซม์บ่มกับไซแลนใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 ระหว่างอุณหภูมิ 40 ถึง 90 องศาเซลเซียส ส่วนเสถียรภาพของ crude enzyme ทำการทดสอบโดยบ่มเอนไซม์กับ Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่เหลืออยู่ตามวิธีการข้างต้น และเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงสุด (คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์)

2.6 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และรำข้าว ถูกนำมาบดให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องบดน้ำผลไม้ และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh ล้างน้ำตาลที่ปนอยู่ออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง และทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบ่มวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ร้อยละ 0.5 (น้ำหนักแห้ง/ปริมาตร) ใน 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 กับ crude enzyme ความเข้มข้น 1.6 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาตรทั้งหมด 2.5 มิลลิลิตร แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีของ Somogyi-Nelson [11]

2.7 การย่อยเยื่อกระดาษ

นำเยื่อกระดาษที่ผลิตจากชานอ้อย ยูคาลิปตัส และสน ที่ได้รับจากบริษัทเยื่อกระดาษสยาม จำกัด มาบดให้มีความละเอียดและล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง นำเยื่อกระดาษแต่ละชนิดร้อยละ 2 (น้ำหนักแห้ง/ปริมาตร) ผสมใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 จากนั้นบ่ม crude enzyme ความเข้มข้น 0.70 ยูนิตกับเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายหลังจากบ่มนำตัวอย่างไปปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกผลิตขึ้น

2.8 การตรวจสอบ chromophore

ภายหลังจากการย่อยเยื่อกระดาษในภาวะการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 7 นำส่วนใสมาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร [14] เพื่อตรวจวัดปริมาณ chromophore ที่ถูกผลิตขึ้น โดยเปรียบเทียบกับชุดตัวอย่างที่ไม่เติมเอนไซม์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

จำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามวิธีของ Bergey ซึ่งผลการศึกษาคุณสมบัติของ Gram-reaction ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ความต้องการออกซิเจน การสร้างสปอร์ และการผลิตเอนไซม์คะตะเลส แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจากผลที่ได้เมื่อนำมาจำแนกชนิดจุลินทรีย์ตามวิธีของ Sneath [15] จุลินทรีย์สายพันธุ์ C-1 ถูกจัดอยู่ในแฟมิลี *Bacillaceae* จีนัส *Bacillus* และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA gene ตามวิธีของ Giovannoni และคณะ [9] พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ C-1 มีลำดับเบสของ 16S rRNA gene เหมือนกับ *Bacillus halodurans* ถึงร้อยละ 99 (รูปที่ 1) ดังนั้น *Bacillus* สายพันธุ์ C-1 จึงเป็น *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ซึ่งเป็น alkaliphilic bacterium นอกจากนั้นพบว่า *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-55 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกจุลินทรีย์สายพันธุ์ C-1

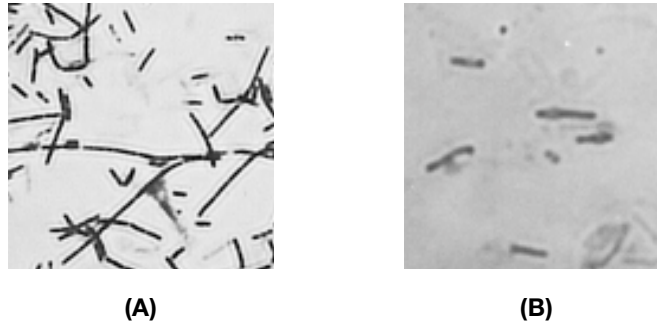
คุณสมบัติ	ผลการทดสอบ
การย้อมติดสี Gram	Gram-positive
รูปร่าง	Rod-shape
ความต้องการออกซิเจน	Aerobic
การสร้างสปอร์	+
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	+

สัญลักษณ์ + หมายถึง positive

ผลของ Gram-reaction และการตรวจสอบ endospore ของ *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 แสดงในรูปที่ 2(A) และ 2(B) ตามลำดับ

Query	: 1	agagttgatcctggctcaggacgacgctggcgcgctcctaaacatgcaagtcgag	60
Sbjct	: 11	agagttgatcctggctcaggacgacgctggcgcgctcctaaacatgcaagtcgag	69
Query	: 61	cggaccaaaggagctgctcctggaggttagcgcgaacgggtgagtaacacgtgggca	120
Sbjct	: 70	cggaccaaaggagctgctcctggaggttagcgcgaacgggtgagtaacacgtgggca	129
Query	: 121	acctgacctgaagactgggataacatcgagaatcgggtcctaaacggataaaaaag	180
Sbjct	: 130	acctgacctgaagactgggataacatcgagaatcgggtcctaaacggataaaaaag	189
Query	: 181	aactgcatggtctttttgaaagatggttcggctatcacttacagatggcccggc	240
Sbjct	: 190	aactgcatggtctttttgaaagatggttcggctatcacttacagatggcccggc	249
Query	: 241	gcattagctagttgggtggaacggctaccaagcgacatgctagccgacctgaga	300
Sbjct	: 250	gcattagctagttgggtggaacggctaccaagcgacatgctagccgacctgaga	309
Query	: 301	gggtgctgcccacactgggactgagacagccagactcctacggagcagcagtag	360
Sbjct	: 310	gggtgctgcccacactgggactgagacagccagactcctacggagcagcagtag	369
Query	: 361	ggaatctccgcaatggagcaaatctgacgggcaacgcccgctgagtgatgaagttt	420
Sbjct	: 370	ggaatctccgcaatggagcaaatctgacgggcaacgcccgctgagtgatgaagttt	429
Query	: 421	tcggatcgtaaaactctgtttagggaagaacaagtgccggtcgaaggcgccacct	480
Sbjct	: 430	tcggatcgtaaaactctgtttagggaagaacaagtgccggtcgaaggcgccacct	488
Query	: 481	fgacggtaactaacgaaagccacggctaacctgacgagcagccggttaactgta	540
Sbjct	: 489	fgacggtaactaacgaaagccacggctaacctgacgagcagccggttaactgta	548
Query	: 541	ggtagcaagcgttgcggaattatggcgtaa-gcgcgcgagcggtctcttaagtc	599
Sbjct	: 549	ggtagcaagcgttgcggaattatggcgtaaagcgcgcgagcggtctcttaagtc	608
Query	: 600	fgatgtaagccccggctcaaccggggagggctcattgaaactgggagactgagtac	659
Sbjct	: 609	fgatgtaagccccggctcaaccggggagggctcattgaaactgggagactgagtac	668
Query	: 660	agaagaggagatggaattccacgtgtagcgtgaaatcgtagagatgtaggaacac	719
Sbjct	: 669	agaagaggagatggaattccacgtgtagcgtgaaatcgtagagatgtaggaacac	728
Query	: 720	cagtggcgaaggcactctggtctgtaactgacgctgagggcgaaagcgtggggagc	779
Sbjct	: 729	cagtggcgaaggcactctggtctgtaactgacgctgagggcgaaagcgtggggagc	788
Query	: 780	aaacagattagataccctgtagtccacgctaaacatgagtgctaggttttagggg	839
Sbjct	: 789	aaacagattagataccctgtagtccacgctaaacatgagtgctaggttttagggg	848
Query	: 840	ttcgtatgccccttagtgcggaaattaacacattaagcactcgcctggggagtagacc	899
Sbjct	: 849	ttcgtatgccccttagtgcg-gaagttaacacattaagcactcgcctggggagtagacc	907
Query	: 900	gcaagttgaaactcaaggaattgacggggcccgcaacaagcagtgagcatgtgttt	959
Sbjct	: 908	gcaagttgaaactcaaggaattgacggggcccgcaacaagcagtgagcatgtgttt	967
Query	: 960	aattcgaagcaacgcgaagaacctaccaggtctgacatccttgaccacctagagat	1019
Sbjct	: 968	aattcgaagcaacgcgaagaacctaccaggtctgacatccttgaccacctagagat	1027
Query	: 1020	agggttcccctcgggggacaagaatgacaggtggtgcatggtgtctgactcgtgt	1079
Sbjct	: 1028	agggttcccctcgggggacaagaatgacaggtggtgcatggtgtctgactcgtgt	1087
Query	: 1080	cgtgagatgtgggttaagtcgcaacgagcgaacctgacctagttgccagcatt	1139
Sbjct	: 1088	cgtgagatgtgggttaagtcgcaacgagcgaacctgacctagttgccagcatt	1147
Query	: 1140	cagttggcactcctaaagtgactgctggcggcaacaaccgaggaagtgaggatgactca	1199
Sbjct	: 1148	cagttggcactcctaaagtgactgctggcggcaacaaccgaggaagtgaggatgactca	1207
Query	: 1200	aatcatcatgccccttagtacctgggtacacacgtgctacaatggtgtacaagggt	1259
Sbjct	: 1208	aatcatcatgccccttagtacctgggtacacacgtgctacaatggtgtacaagggt	1267
Query	: 1260	fgcgaagccgtagggtgaaagcaatcccagaagccattctagttcgattgcaaggctg	1319
Sbjct	: 1268	fgcgaagccgtagggtgaaagcaatcccagaagccattctagttcgattgcaaggctg	1327
Query	: 1320	caactcgcctgcatgaagccggaattgctagtaatcgcgatgcatgcccgggtgaat	1379
Sbjct	: 1328	caactcgcctgcatgaagccggaattgctagtaatcgcgatgcatgcccgggtgaat	1387
Query	: 1380	aogttccgggctctgtaacacacgcccgtcacaccagagagttgtaacaccggaagt	1439
Sbjct	: 1388	acgttccgggctctgtaacacacgcccgtcacaccagagagttgtaacaccggaagt	1447
Query	: 1440	cggtgggttaacctttgagccagccgctaaggtgggacagatgattgggtgaagtc	1499
Sbjct	: 1448	cggtgggttaacctttgagccagccgctaaggtgggacagatgattgggtgaagtc	1507
Query	: 1500	gtaacaaggtagccgtatcggaaggtgcccgtgacacctcctt	1544
Sbjct	: 1508	gtaacaaggtagccgtatcggaaggtgcccgtgacacctcctt	1552

รูปที่ 1 เปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA gene ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C-1 กับ *B. halodurans* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับเบสถึงร้อยละ 99 (Query = *Bacillus* sp. C-1; Sbjct = *B. halodurans*) อักษรตัวเข้มที่ขีดใต้เส้น หมายถึง ลำดับเบสที่แตกต่างกันระหว่าง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C-1 กับ *B. halodurans* ซึ่งมีทั้งหมด 7 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 1544 ลำดับเบส



รูปที่ 2 ภาพถ่ายการย้อมสี Gram-reaction (A) และ endospore (B) ของ *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1

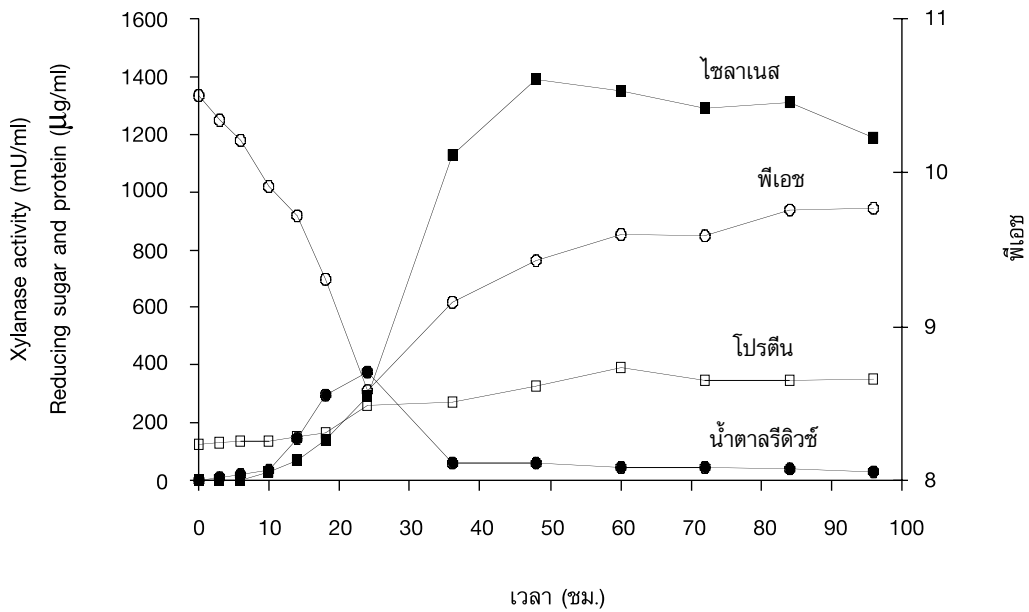
3.2 การผลิตไซลानเนสและเซลลูเลสของ *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1

ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจากพีเอชเริ่มต้น 10.5 เป็น 8.6 ภายใน 24 ชั่วโมง ในระหว่างการเจริญของเชื้อ ซึ่งการลดลงของพีเอชอาจมีสาเหตุจากระหว่างการเจริญมีการนำไซแลนไปใช้และผลิตสารประเภทกรดอินทรีย์ออกมา [16] หลังจากนั้นค่าพีเอชของน้ำเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังชั่วโมงที่ 36 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าเพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่หลังชั่วโมงที่ 36 ขณะที่กิจกรรมไซลานเนสเริ่มเพิ่มสูงขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างชั่วโมงที่ 24 ถึง 36 โดยผลิตไซลานเนสสูงสุดชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นการผลิตลดลงเล็กน้อย ซึ่งความสัมพันธ์ที่ไม่สอดคล้องกันระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และกิจกรรมไซลานเนสช่วงชั่วโมงที่ 24 ถึง 36 อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์มีอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าอัตราการผลิต ขณะเดียวกันไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นส่วนหนึ่งถูกส่งผ่านเข้าไปภายในเซลล์ เพื่อทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างไซลานเนสแล้วส่งออกมาภายนอกเซลล์ [17] จึงทำให้กิจกรรมไซลานเนสเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีน โดยอัตราการผลิตโปรตีนเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมง 18 และอัตราการเพิ่มขึ้นลดลงระหว่างชั่วโมงที่ 24 ถึง 60 ภายหลังจากชั่วโมงที่ 70 ปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่ ส่วนกิจกรรมของเซลลูเลสไม่สามารถตรวจพบตลอดระยะเวลาการทดลอง แม้ว่า จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แล้ว ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3

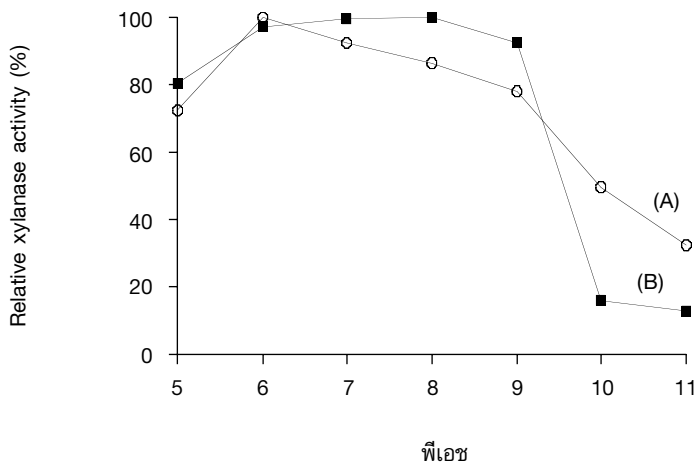
3.3 การตรวจสอบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซลานเนสที่ผลิตจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1

ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของไซลานเนส

ในรูปที่ 4(A) crude enzyme จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 มีกิจกรรมไซลานเนสสูงสุดที่พีเอช 6.0 (คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่พีเอช 8.0 และ 9.0 กิจกรรมของไซลานเนสเหลือประมาณร้อยละ 86 และ 78 ตามลำดับ ส่วนที่พีเอช 10.0 กิจกรรมไซลานเนสยังคงเหลือประมาณร้อยละ 50 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า crude enzyme ยังสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ส่วนเสถียรภาพของ crude enzyme พบว่าไซลานเนสมีเสถียรภาพดีในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 9.0 (พีเอช 8.0 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) โดยที่พีเอช 9.0 ยังคงเหลือกิจกรรมไซลานเนสสูงถึงร้อยละ 92 ส่วนที่พีเอช 10.0 และ 11.0 มีกิจกรรมเหลือเพียงร้อยละ 16 และ 13 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4(B)



รูปที่ 3 Time courses ของฟิโอส ปริมาณโปรตีน น้ำตาลรีดิวซ์ และกิจกรรมไซลันเนสในน้ำเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยง *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ไม่พบกิจกรรมเซลล์ตลอดระยะเวลาการทดลอง)

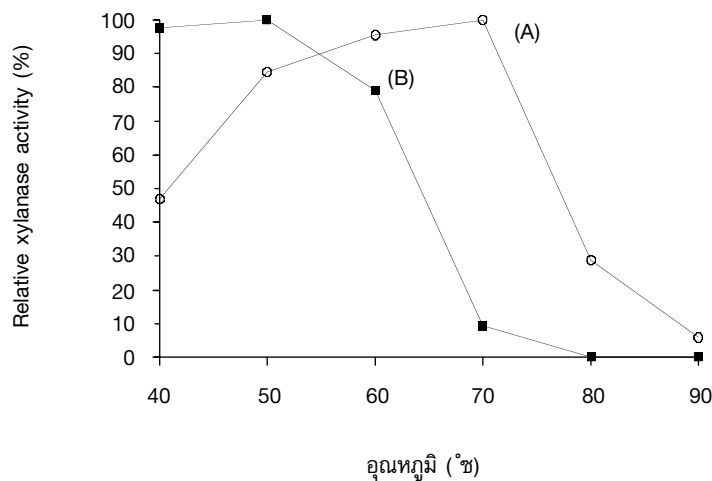


รูปที่ 4 ผลของฟิโอสต่อการทำงาน (A) และเสถียรภาพ (B) ของ crude enzyme

ปกติเอนไซม์ในกลุ่มไซลานเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างๆ ทำงานได้ดีในช่วงที่เป็นกรด (พีเอช 5.0-6.0) แต่ทำงานได้น้อยมากในช่วงที่เป็นด่าง [18] อย่างไรก็ตามไซลานเนสที่ผลิตจาก alkaliphilic bacteria เช่น *Bacillus* sp. K-1 [12] และ *B. holodurans* สายพันธุ์ C-1 ทำงานได้สูงสุดในช่วงที่เป็นกรด และยังคงสามารถทำงานได้ดีในช่วงที่เป็นด่าง

ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของไซลานเนส

crude enzyme มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 5(A) และมีเสถียรภาพที่ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมลดลงเหลือประมาณร้อยละ 80 ดังแสดงในรูปที่ 5(B) นอกจากนี้เมื่อต้ม crude enzyme กับสารละลายคาร์บอนไดออกไซด์ (พีเอช 9.0) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมไซลานเนสยังคงเหลืออยู่ร้อยละ 90 (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) และเป็นที่น่าสังเกตว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แม้ว่าเอนไซม์จะมีการทำงานสูงสุด แต่เสถียรภาพของ crude enzyme ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 10 ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการทดสอบเสถียรภาพ เอนไซม์ถูกต้มกับบัพเฟอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ เท่านั้น ขณะที่การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน เอนไซม์อยู่ร่วมกับสับสเตรท ซึ่งเป็นไปได้ว่าสับสเตรทช่วยป้องกันเอนไซม์จากการเสียสภาพด้วยความร้อน ภายใต้ภาวะการทดสอบ [19] นอกจากนี้ในการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานใช้เวลาเพียง 10 นาที ขณะที่การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ใช้เวลา 30 นาที

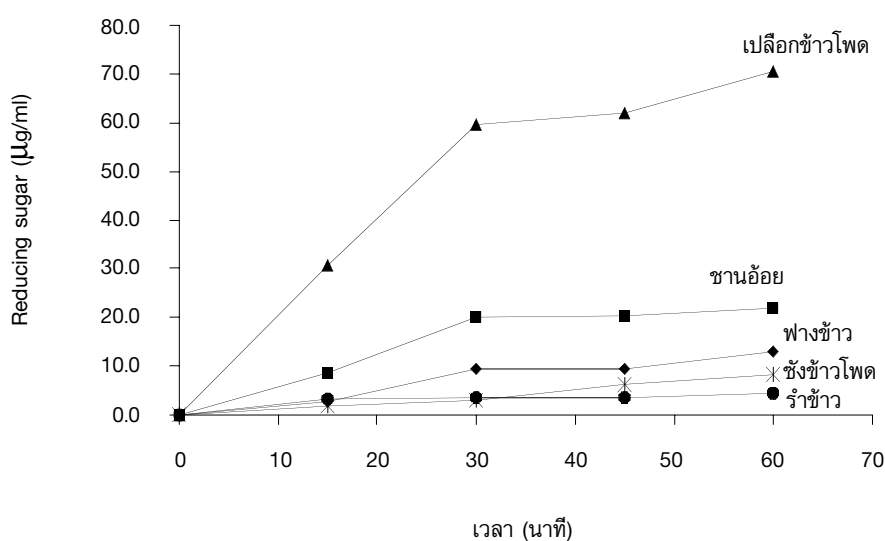


รูปที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงาน (A) และเสถียรภาพ (B) ของ crude enzyme

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า crude enzyme ที่ผลิตจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง และมีเสถียรภาพดีในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส สามารถทำงานและมีเสถียรภาพในช่วงพีเอชกว้างเมื่อเปรียบเทียบกับไซลानเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น เช่น ไซลानเนสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. NCIM 59 ซึ่งมีเสถียรภาพดีที่พีเอช 7.0 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิเพียง 50 องศาเซลเซียส [20] หรือไซลานเนสที่ผลิตจาก *Cellulomonas fimi* ที่ให้กิจกรรมไซลานเนสสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสเท่านั้น [21]

3.4 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และรำข้าว พบว่า crude enzyme ย่อยสลายไซลานในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ได้ โดยเฉพาะเปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว ชังข้าวโพด และรำข้าว ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6 โดย 30 นาทีแรกเปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้เร็วมาก หลังจากนั้นอัตราการย่อยลดลง ขณะที่ชานอ้อยและฟางข้าวถูกย่อยได้ดีในช่วง 30 นาทีแรกเช่นกัน หลังจากนั้นเริ่มคงที่ ส่วนชังข้าวโพดถูกย่อยเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ขณะที่รำข้าวถูกย่อยได้น้อยมาก



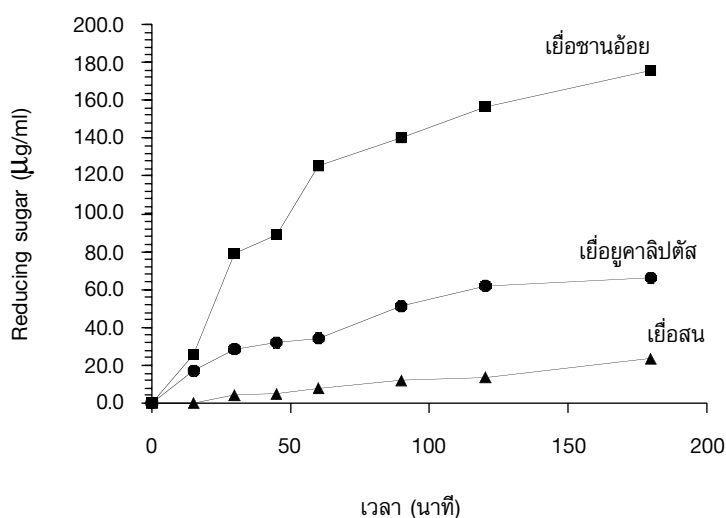
รูปที่ 6 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ หลังจากบ่มด้วย crude enzyme ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 9.0

crude enzyme จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ย่อยสลายเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ อาจเนื่องมาจาก crude enzyme ประกอบด้วยไซลานเนสหลายชนิดจึงช่วยกันในการย่อยไซลาน [2] นอกจากนี้ยังประกอบด้วยไซลานเนสที่สามารถยึดเกาะกับไซลานที่ไม่ละลายน้ำ [7] ดังนั้นจึงส่งผลให้เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายที่ดีขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Black และคณะ [22] และ Fernandes และคณะ [6] ที่พบว่า xylan-binding domain มีผลให้ไซลานเนสเข้ายึดเกาะและย่อยผนังเซลล์พืชที่อยู่ในฟอรัมที่ไม่ละลายน้ำได้มากขึ้น โดยช่วยเพิ่ม

ความเข้มข้นของลัสเตรทบนเอนไซม์ ส่วนเปลือกข้าวโพดถูกย่อยสลายโดย crude enzyme จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ได้มากที่สุด อาจเนื่องมาจากปริมาณของไซแลน ตำแหน่งของไซแลน และโครงสร้างของไซแลน ที่อยู่ร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆในเปลือกข้าวโพดเหมาะสมต่อการย่อยมากกว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น ซึ่ง crude enzyme ที่ผลิตจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 สามารถย่อยไซแลนที่มีโครงสร้างอยู่ร่วมกับสารประกอบโพลีเมอร์อื่นในเศษพืชต่างๆ เช่น เซลลูโลส และลิกนิน ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพ เช่นเดียวกับรายงานของ Kyu และคณะ [23] ที่พบว่า crude enzyme ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. K-1 สามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ดี

3.5 การย่อยเยื่อกระดาษ

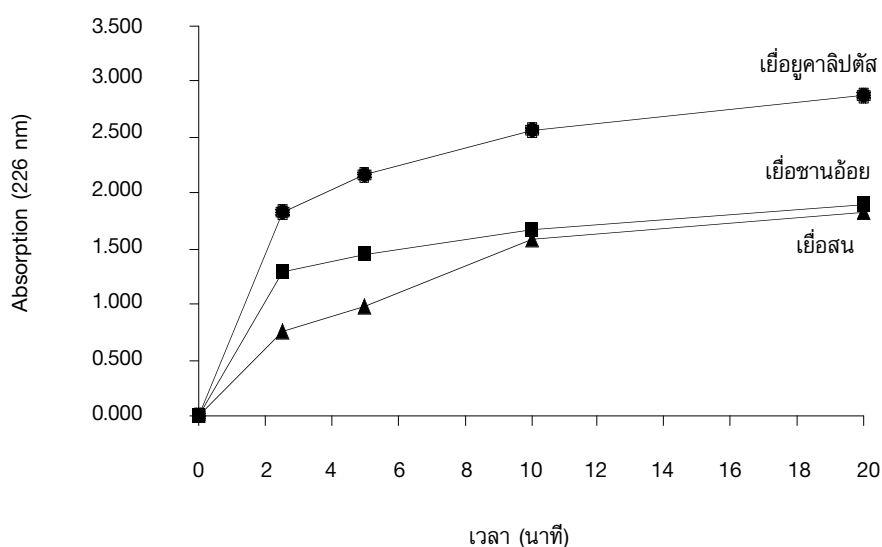
มีการนำไซแลนจากแหล่งต่างๆไปใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษในการลดปัญหามลภาวะทางน้ำ ซึ่งเกิดจากการใช้สารคลอรีน Senior และคณะ [24] รายงานว่าความสามารถของการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยความสามารถในการย่อยของไซแลนขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของไซแลน ดังนั้นจึงตรวจสอบความสามารถการย่อยเยื่อกระดาษของ crude enzyme จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 กับเยื่อกระดาษคราฟท์ 3 ชนิด ได้แก่ เยื่อกระดาษจากชานอ้อย (พืชตระกูลหญ้า) เยื่อยูคาลิปตัส (ไม้เนื้อแข็ง) และเยื่อสน (ไม้เนื้ออ่อน) พบว่า crude enzyme ย่อยไซแลนในเยื่อชานอ้อยได้ดีที่สุด โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าเยื่อยูคาลิปตัส และเยื่อไม้สนถึง 2.7 และ 7.5 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 7) crude enzyme ย่อยไซแลนในเยื่อชานอ้อย โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด อาจเนื่องมาจากปริมาณไซแลนในเยื่อชานอ้อยมากกว่าเยื่อกระดาษชนิดอื่น โดยเยื่อชานอ้อย ยูคาลิปตัส และไม้สนมีปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 15.7, 8.3 และ 8.0 ตามลำดับ [23]



รูปที่ 7 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากเยื่อชานอ้อย เยื่อยูคาลิปตัส และเยื่อสน ภายหลังจากบ่มด้วย crude enzyme ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 9.0

3.6 การปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษ

หน่วยย่อยต่างๆ ในโครงสร้างของสารประกอบลิกนิน มีคุณสมบัติเป็น chromophore ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตได้ [25] ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของไซแลนต่อการปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษทั้ง 3 ชนิด พบว่า crude enzyme จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 สามารถปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษทั้ง 3 ชนิด โดยเยื่อคาลิปต์สถูกปลดปล่อย chromophore ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ เยื่อชานอ้อย และเยื่อสน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่ง crude enzyme ทำงานได้เร็วมากในช่วง 2 นาทีครึ่ง หลังจากนั้นอัตราการปลดปล่อยลดลง และเพิ่มขึ้นน้อยมากหลังนาที่ที่ 10 เยื่อคาลิปต์สถูกปลดปล่อย chromophore ได้มากที่สุด ขณะที่การย่อยสลายไซแลนกลับเป็นเยื่อชานอ้อยที่ถูกย่อยและปลดปล่อยน้ำตาลได้มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณและตำแหน่งของไซแลนและลิกนินในเยื่อกระดาษทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกัน และอาจเป็นไปได้ว่าไซแลนในเยื่อชานอ้อยที่ถูกย่อยโดย crude enzyme ส่วนใหญ่ไม่ได้อยู่ใกล้หรือเชื่อมกับลิกนิน ขณะที่ไซแลนในเยื่อคาลิปต์สที่ถูกย่อยด้วย crude enzyme อยู่ร่วมกันกับลิกนิน (xylan-lignin complexes) มากกว่า [26] นอกจากนี้ลิกนินในเยื่อคาลิปต์สมีปริมาณมากกว่าเยื่อชานอ้อย [25] และจากผลการย่อยไซแลนและปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษต่างๆ โดย crude enzyme จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 อาจสรุปได้ว่าความสามารถในการย่อยไซแลนเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ และการย่อยไซแลนบริเวณที่อยู่ใกล้กับลิกนินน่าจะมีความสำคัญต่อการสกัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษมากกว่า [27]



รูปที่ 8 ผลของการปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ หลังจากบ่มด้วย crude enzyme ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 9.0

มีรายงานว่าไซลานเนสต่างๆ ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ 1 ชนิด ทำงานร่วมกันในการย่อยไซลแลน [2] ดังนั้นจึงน่าจะใช้ crude enzyme ในการประยุกต์ใช้เพื่อย่อยสลายไซลแลนในเยื่อกระดาษ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kyu และคณะ [23] ที่พบว่าการใช้ crude enzyme จาก alkaliphilic *Bacillus* sp. K-1 ต่อการย่อยสลายเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ purified xylan-binding xylanase

crude enzyme ที่ผลิตจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 สามารถย่อยไซลแลนในเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ และปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษได้ดี อาจมีสาเหตุจาก crude enzyme ประกอบด้วยไซลแลนมากกว่า 1 ชนิด และประกอบด้วยไซลแลนขนาดเล็กที่สามารถยึดเกาะกับไซลแลนที่ไม่ละลายน้ำ [7] จึงสามารถแทรกผ่านช่องว่างระหว่างเยื่อกระดาษเข้าไปย่อยไซลแลนที่อยู่ภายในเส้นใยเยื่อกระดาษได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Grethlein [28] ที่พบว่า specific surface area และขนาดของรูพรุนของเยื่อกระดาษเป็นปัจจัยหลักของการเข้าถึงของเอนไซม์ต่อไซลแลนในเยื่อกระดาษ จากผลการทดลอง crude enzyme ที่ผลิตจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับโรงงานที่ผลิตเยื่อกระดาษจากยูคาลิปตัสและชานอ้อยมากกว่าสน โดยปัจจุบันโรงงานผลิตเยื่อกระดาษในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้ยูคาลิปตัสและชานอ้อยเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการผลิตกระดาษ

4. สรุปผลการวิจัย

B. halodurans สายพันธุ์ C-1 ผลิตไซลแลน โดยไม่พบกิจกรรมของกลุ่มเซลล์ เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของ crude enzyme พบว่ามีกิจกรรมไซลแลนสูงสุดที่พีเอช 6.0 ขณะที่พีเอช 9.0 กิจกรรมของไซลแลนเหลือประมาณร้อยละ 78 ส่วนเสถียรภาพของ crude enzyme ที่พีเอชต่างๆ ในเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าไซลแลนมีเสถียรภาพดีในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 9.0 โดยที่พีเอช 9.0 ยังคงเหลือกิจกรรมไซลแลนสูงถึงร้อยละ 92 นอกจากนี้ crude enzyme ทำงานได้กิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพที่ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เมื่อย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และรำข้าว ด้วย crude enzyme ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว ชังข้าวโพด และรำข้าว ตามลำดับ ขณะที่การย่อยไซลแลนในเยื่อกระดาษ เยื่อชานอ้อยถูกย่อยได้ดีที่สุด โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ซึ่งมากกว่าเยื่อคาลิปตัส และเยื่อไม้สนถึง 2.7 และ 7.5 เท่าตามลำดับ แต่เยื่อคาลิปตัสถูกปลดปล่อย chromophore ได้มากที่สุด รองลงมาคือ เยื่อชานอ้อย และ ไม้สน ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า crude enzyme ที่ผลิตจาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 สามารถทำงานได้ดีในภาวะเป็นด่างและอุณหภูมิสูง รวมทั้งสามารถย่อยไซลแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และไซลแลนในเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ และสามารถปลดปล่อย chromophore ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ถึงปริมาณลิกนินที่ถูกปลดปล่อยจากเยื่อกระดาษได้ดี ดังนั้น crude enzyme จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 มีแนวโน้มที่จะนำไปย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเฉพาะเปลือกข้าวโพดเพื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปเปลี่ยนให้เป็นสารอื่นที่มีมูลค่าสูงขึ้น และนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษแบบ kraft process โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการเลือกใช้ยูคาลิปตัสและชานอ้อยเป็นวัตถุดิบ

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนวิจัยสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณบริษัทเยื่อกระดาษสยาม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เยื่อกระดาษต่างๆ

6. เอกสารอ้างอิง

1. Bachmann, S. L. and McCarthy, A. J., 1991, "Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting the Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*." *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, pp. 2121-2130.
2. Wong, K. K. Y, Tan, L. U. L., and Saddler, J. N., 1988, "Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications." *Microbiological Reviews*, Vol. 52, pp. 305-317.
3. Gerand, A. W., Ronar, F. P., and Denis, R. H., 1993, "Enzyme in the Animal-Feed Industry," *Trends in Biotechnology*, Vol. 11, pp. 424-430.
4. Sunna, A. and Antranikien, G., 1997, "Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria," *Critical Review in Biotechnology*, Vol. 17, pp. 39-67.
5. Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., and Hoondal, G. S., 2000, "Enhanced Production of a Thermostable Xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and Its Application in Biobleaching of Eucalyptus Kraft Pulp," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 27, pp. 459-466.
6. Fernandes, A. C., Fontes, C. M., Gilbert, H. J., Hazelewood, G. P., Fernandes, T. H., and Ferreira, L. M., 1999, "Homologous Xylanase from *Clostridium thermocellum*: Evidence for Bi-functional Activity, Synergism between Xylanase Catalytic Modules and the Presence of Xylan-Binding Domains in Enzyme Complexes," *Biochemical Journal*, Vol. 342, pp. 105-110.
7. Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K. L., 2000, "Selection of Xylanase from Alkaliphilic Thermophilic Xylanolytic Microorganisms for Application in Pulp Prebleaching Process," *Proceedings of the 38th Kasetsart University Annual Conference*, pp. 384-392.
8. Higuchi, T., 1997, "Biosynthesis of Wood Component," *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*, Berlin, Springer-Verlag, pp. 93-97.
9. Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., and Field, K. G., 1990, "Genetic Diversity in

Sargasso Sea Bacterioplankton,” *Nature (London)*, Vol. 345, pp. 60-63.

10. Berg, B., Hofstan, B. V., and Petterson, B., 1972, “Growth and Cellulose Formation by *Cellulivibrio foivus*,” *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 35, pp. 201-214.

11. Somogyi, M., 1952, “Notes in Sugar Determination,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 195, pp. 265-275.

12. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., and Tanticharoen, M., 1999, “Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1,” *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp. 690-697.

13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951, “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 93, pp. 265-275.

14. Patel, R. N., Grabski, A. C., and Jeffries, T. W., 1993, “Chromophore Release from Kraft Pulp by Purified *Streptomyces roseiscleroticus* Xylanases,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 39, pp. 405-412.

15. Sneath, P. H. A., 1986, “Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.), *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*,” Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1104-1139.

16. Kohli, U., Nigam, P., Singh, D., and Chaudhary, K., 2001, “Thermostable, Alkalophilic and Cellulase Free Xylanase Production by *Thermoactinomyces thalophilus* Subgroup C,” *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 28, pp. 606-610.

17. Godden, B., Legon, T., Helvenstein, P., and Penninckx, M., 1989, “Regulation of the Production of Hemicellulolytic and Cellulolytic Enzymes by a *Streptomyces* sp. Growing on Lignocellulose,” *Journal of General Microbiology*, Vol. 135, pp. 258-292.

18. Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S., 2001, “Microbial Xylanases and Their Industrial Applications,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 56, pp. 326-338.

19. Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y., and Izaki, K., 1992, “Purification and Properties of a Maltotetraose- and Maltotriose-Producing Amylase from *Chloroflexus aurantiacus*,” *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, pp. 2490-2494.

20. Dey, D., Hinge, J., Shendye, A., and Rao, M., 1992, "Purification and Properties of Extra-cellular Endoxylanase from Alkalophilic Thermophilic *Bacillus* sp.," *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 38, pp. 436-442.
21. Khanna, S. and Gauri, P., 1993, "Regulation, Purification and Properties of Xylanase from *Cellulomonas fimi*," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 15, pp. 990-995.
22. Black, G. W., Hazlewood, G. P., Millward-Sadler, S. J., Laurie, J. I. and Gillbert, H. J., 1995, "A Modular Xylanase Containing a Novel Non-Catalytic Xylan-Specific Binding Domain," *Biochemical Journal*, Vol. 307, pp. 191-195.
23. Kyu, K. L., Ratanakhanokchai, K., Tanticharoen, M., Ratanarajmongkol, T., and Chen, S. T., 2001, "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials and Kraft Pulps by Xylanolytic Enzymes from Alkaliphilic *Bacillus* sp. K-1," *Journal of the National Research Council of Thailand*, Vol. 33, pp.40-54.
24. Senior, D. J., Miller, D. J., Sutcliffe, R., Tan, L. U., and Saddler, J. N., 1988, "Selective Solubilization of Xylan in Pulp Using a Purified Xylanase from *Trichoderma hazianum*," *Biotechnology Letters*, Vol. 10, pp. 907-912.
25. Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmuller, H., Sinner, M., and Esterbauer, H., 1993, *Basic Research and Pilot Studies on the Enzymatic Conversion of Lignocellulosic*. In Saddler, J. N. (ed). *Biocconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*, C.A.B International Pub, Wallingford, pp. 33-72.
26. Subramaniyan, S. and Prema, P., 2002, "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application," *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 22, pp. 33-64.
27. Lundgren, K. R., Berkvist, L., Hogman, S., Joves, H., Eriksson, G., Bartfai, T., Laan, J. V. D., Rosenberg, E., and Shoham, Y., 1994, "TCF Mill Trial on Softwood Pulp with Korsnas Thermostable and Alkaline Stable Xylanase T6," *FEMS Microbiology Review*, Vol. 13, pp. 365-368.
28. Grethlein, H. E., 1985, "The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates," *Bio/Technology*, Vol. 3, pp.155-160.