การศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและการผลิตในระดับถังหมัก จาก *Thermobifida fusca* PA1-1

Characterization and production in bioreactor of Carboxymethylcellulase from *Thermobifida fusca* PA1-1

ศุภางคนางค์ จอมสืบ[1] มังกร โรจน์ประภากร[1] และ วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย[1]

Supangkanang Jomsueb[1] Mangkorn Rodprapakorn[1] and Werasit Sanpamongkolchai[1]

บทคัดย่อ

Thermobifida fusca PA1-1 เป็นแอคติโนมัยสีทในดินที่ชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสภายใต้สภาวะการเจริญที่เหมาะสมที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง จากการบ่มแบบเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอาหาร basal medium ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและยีสต์ขนมปัง 1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในช่วงพีเอช 3 ถึง 10 และอุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 4 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอช 4 ถึง 10 และเหลือกิจกรรมเอนไซม์อยู่มากกว่า 80% ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมักที่สภาวะพีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศและการกวนเท่ากับ 1.0 VVM และ 200 รอบต่อนาทีตามลำดับ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง

ABSTRACT

Thermobifida fusca PA1-1 is thermophilic soil actinomycetes that produces carboxymethylcellulase (CMCase) with optimum growth at pH 8 and 50°C. The highest enzyme activities were obtained at 96 h by incubating under shaking (250 rpm) at 50°C in basal medium containing 1% (w/v) CMC and baker yeast as carbon source and nitrogen source, respectively. In this study, the effect of different pH (3-10) and temperature (30-70°C) on CMCase activity were determined. The CMCase showed highest activity at pH 4 and temperature of 60°C. In addition, the enzyme was stable in the pH range 4-10 and the residual activity retained up to 80% at 30-60°C. The high level of enzyme production by *T. fusca* PA1-1 achieved under bioreactor conditions at temperature 50°C and pH 8 when agitation speeds and aeration rates were controlled at 200 rpm and 1.0 VVM, respectively. Maximum enzyme activity was 1.21 U/ml after 60 h of incubation.

Key Words: Carboxymethylcellulase (CMCase), *Thermobifida fusca*, enzyme activity

e-mail address: scootte@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900.

คำนำ

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นแหล่งชีวมวลสำคัญ และเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45% ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทำให้เกิดเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น กลูโคส และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเชื้อเพลิง อาหาร สิ่งทอ กระดาษ เป็นต้น เอนไซม์เซลลูเลสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส หรือ เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ทำหน้าที่ในการตัดพันธะ ß-1,4-glycosidic ของโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม จำเพาะต่อโครงสร้างเซลลูโลสที่ไม่เป็นระเบียบ ผลิตภัณฑ์จากการย่อยจะได้โพลีแซคคาไรด์สายสั้น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลเซลโลไบโอส เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส หรือเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำหน้าที่ตัดพันธะ ß-1,4 glycoside จากปลายของสายโซ่เซลลูโลส ทั้งปลายรีดิวซ์ หรือปลายนอนรีดิวซ์ จำเพาะต่อโครงสร้างที่เรียงตัวเป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลเซลโลไบโอส หรือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ

เอนไซม์เซลลูเลสพบในจุลินทรีย์ทั่วไป ได้แก่ รา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีท แต่จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาใช้ย่อยสลายเซลลูโลสและผลิตเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าส่วนใหญ่จะผลิตโดยเชื้อรา แต่ปัจจุบันมีการศึกษาและวิจัยเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียอย่างกว้างขวาง เนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นข้อได้เปรียบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย คือ มีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้าง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Lynd และคณะ, 2002; Wilson, 2004) รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทนความร้อน ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมภายใต้สภาวะที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermobifida fusca* PA1-1 ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งการผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักเพื่อให้ได้ข้อมูลในการนำจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในอาหาร basal medium (Lima และคณะ, 2005) ที่มีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 1% และยีสต์ขนมปัง 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงและเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยเตรียมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย

ทั้งสองเข้าด้วยกันและบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS (Dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3. การศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

3.1 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในช่วงพีเอชและอุณหภูมิต่างๆ โดยวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยวิธี DNS โดยใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุมพีเอชในช่วง 3-6 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 6-8 สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 8-9 และใช้สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 9-10

3.2 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความเสถียรของกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่พีเอช 3-10 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เช่นเดียวกับในข้อ 3.1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี DNS

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ทำได้โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี DNS

4. การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมัก

ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 แบบเบ็ดเสร็จในถังหมักขนาดความจุ 2.5 ลิตร (MD-250, Marubishi, Japan) กำหนดอัตราการกวนและการให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาทีและ 1.0 VVM ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการผลิตในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอาหาร basal medium พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 โดยมี CMC และยีสต์ขนมปังชนิดละ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter)

เตรียมกล้าเชื้อโดยเขี่ยเชื้อ *T. fusca* PA1-1 ลงบนอาหารแข็ง nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร nutrient broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง

4.2 การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ

4.2.1 เติมอาหาร basal medium 1.5 ลิตร ลงในถังหมัก จากนั้นปิดท่อที่สัมผัสกับของเหลวทั้งหมดด้วย clamp นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4.2.2 ถ่ายกล้าเชื้อจาก 4.1 ลงถังหมัก ตั้งค่าการทำงานของเครื่อง โดยกำหนดค่าความเร็วรอบของการ

กวนที่ 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 VVM

4.2.3 เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยวิธี DNS วัดค่าพีเอช และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยชุดวิเคราะห์โปรตีนสำเร็จรูปด้วยวิธี Bradford (1976)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

1.1 ผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ทำงานดีที่สุดที่ค่าพีเอช 4 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลงเท่ากับ 82.87 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าพีเอช 5 และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่าพีเอช 7 คือเหลือเพียง 26.97 เปอร์เซ็นต์ และค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ต่ำสุดเท่ากับ 19.10 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอช 10 ดังแสดงใน Figure 1a

ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสดังแสดงใน Figure 1b พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์เหลือเท่ากับ 98.17 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และมีค่าต่ำสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 21.99 เปอร์เซ็นต์

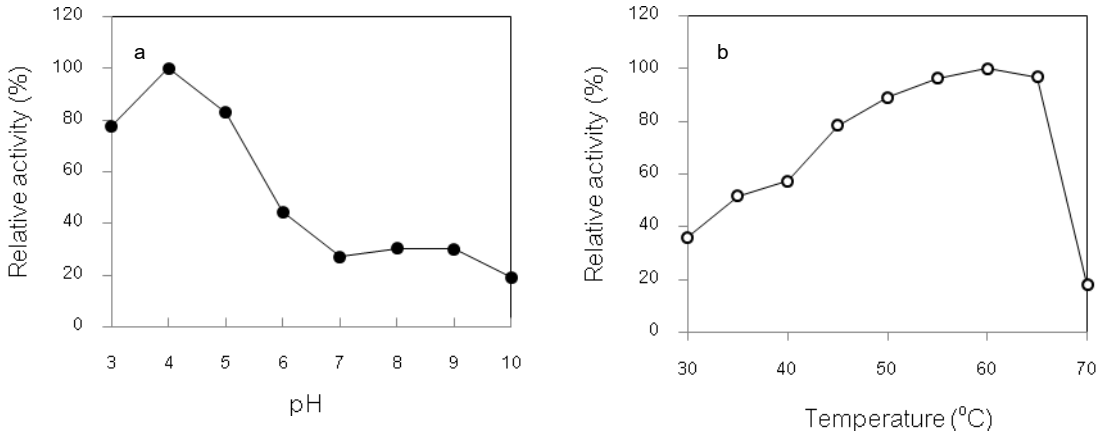

Figure 1 Effect of pH (a) and temperature (b) to CMCase produced by *T. fusca* PA 1-1.

1.2 ค่าพีเอชและอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง ระหว่าง 4-10 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และในช่วงพีเอช 5-10 กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าเหลือสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสนี้มีความเสถียรสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าพีเอช 10 ดังแสดงใน Figure 2a

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเหลือสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส (Figure 2b) ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เหลือเพียง 14.15 เปอร์เซ็นต์ โดยเอนไซม์มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส คือค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

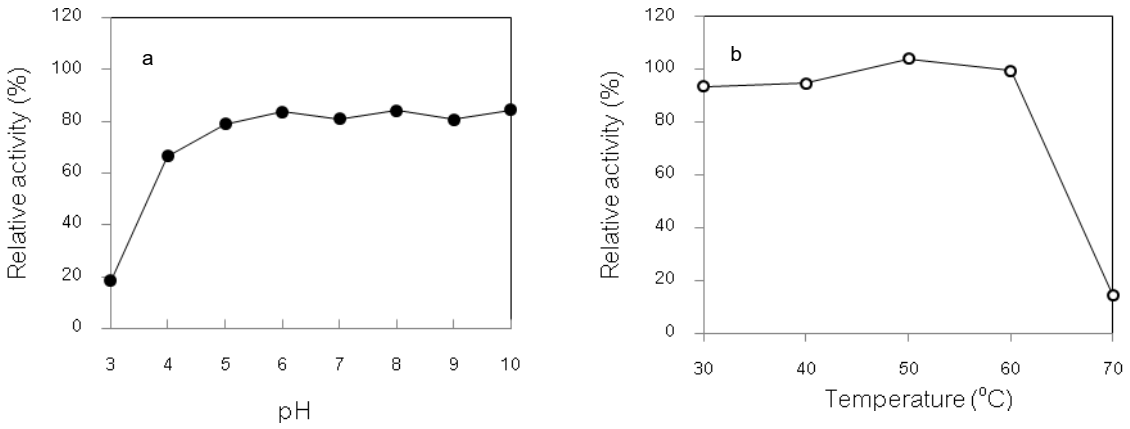

Figure 2 The pH stability (a) and thermal stability (b) of CMCase produced by *T. fusca* PA 1-1.

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 มีความเสถียรที่พีเอชช่วง 5-10 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำงานดีที่สุดที่พีเอช 4 แม้ว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์จะอยู่ในช่วงที่เป็นด่าง สอดคล้องกับรายงานของ George และคณะ ในปี ค.ศ.2001 ซึ่งศึกษาสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora* sp. พบว่าพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญจะอยู่ที่พีเอช 9 ในขณะที่เอนไซม์ที่ได้ทำงานดีที่พีเอช 5 และมีความเสถียรที่อุณหูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้างตั้งแต่ 6-10 Lima และคณะ (2005) พบว่า เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก *Streptomyces drozdowiczii* ทำงานดีที่ค่าพีเอช 5 และมีความเสถียรในพีเอชช่วงกว้าง (3-10) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม สภาวะการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ซึ่งส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยตรงนั้นอยู่ในช่วงที่เป็นด่าง อาจเกิดจากสารละลายที่มีสารอาหารและสารต่างๆที่เซลล์ผลิตออกมา รวมถึงค่าประจุบนเยื่อหุ้มเซลล์ ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญจะเกี่ยวข้องกับตัวเซลล์ ทำให้เซลล์เจริญได้ดีและมีจำนวนมาก สารต่างๆที่เซลล์ผลิตออกมาจะมีปริมาณมากตามไปด้วย รวมถึงเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเอง ในขณะที่พีเอชที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์ที่มีค่าเป็นกรด เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์พียงอย่างเดียวเท่านั้น ไม่เกี่ยวกับตัวเซลล์หรือสารอื่น ทำให้พีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่แสดงจึงไม่สอดคล้องกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญหรือการผลิตเอนไซม์ และด้วยสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1 ซึ่งทนความร้อนสูงและเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง (4-10) จึงเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตจากราซึ่งมีความเสถียรในช่วงพีเอชแคบกว่า (Lynd และคณะ, 2002; Wilson, 2004; Lykidis และคณะ, 2007) ดังนั้นถ้าพัฒนาปรับปรุงการผลิตได้เพิ่มมากขึ้นน่าจะมีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจริงได้

2. การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมักเปรียบเทียบกับการผลิตในระดับฟลาสก์

จากผลการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในระดับฟลาสก์ พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 0.977 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงหลังชั่วโมงที่ 96 ในทางตรงข้ามปริมาณโปรตีนมีค่าลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และต่ำสุดในชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยง โดยเหลือเท่ากับ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Figure 3

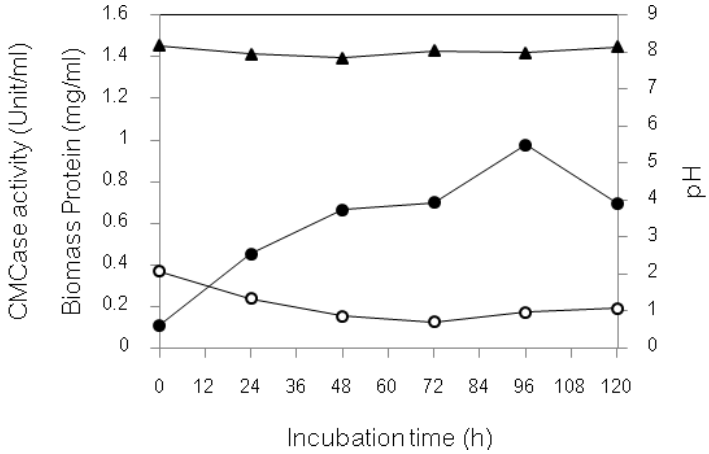

Figure 3 The CMCase production of *T. fusca* PA1-1 in shaking flask. Experiment was conducted at 50°C and shaken at 250 rpm in basal medium supplement with 1% (w/v) of CMC and baker yeast as carbon and nitrogen source, respectively; CMCase activity(●), biomass protein (○) and pH (▲).

การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร พบว่าการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยพบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงและมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 84 (Figure 4) และผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนพบว่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 42 หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นซึ่งตรงกับช่วงที่มีการผลิตเอนไซม์ที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 60 ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่เซลล์หลั่งโปรตีนบางชนิดออกนอกเซลล์เพิ่มขึ้นหรือเซลล์อาจเริ่มแตก จึงทำให้เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ปะปนออกมาในน้ำหมัก

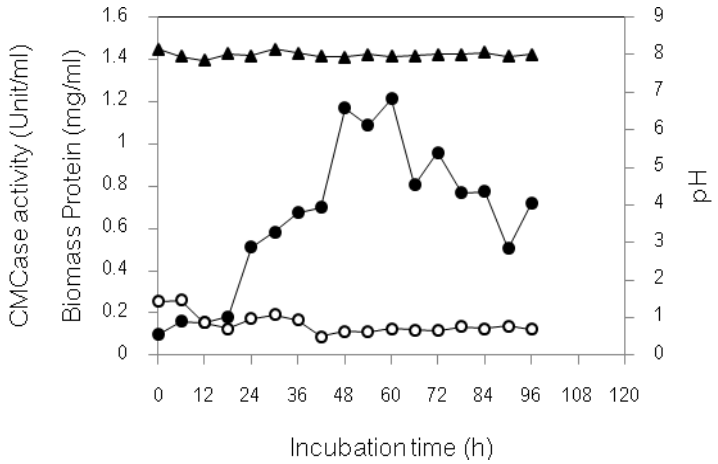

Figure 4 The CMCase production of *T. fusca* PA1-1 in fermentor. Experiment was conducted at 50°C with aeration rate at 0.1 vvm and stir speed of 200 rpm in basal medium supplement with 1% (w/v) of CMC and baker yeast as carbon and nitrogen source, respectively; CMCase activity (●) biomass protein (○) and pH (▲).

เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 การทดลอง พบว่าการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมักจะให้ผลผลิตสูงกว่าด้วยเวลาเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่าการผลิตระดับฟลาสก์ ซึ่งการทดลองระดับฟลาสก์จะไม่สามารถควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น อัตราการให้อากาศ พีเอช และอุณหภูมิได้แม่นยำเท่ากับการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอัตโนมัติซึ่งมีระบบควบคุมการทำงาน และสามารถกำหนดความเร็วการกวนซึ่งจะส่งผลต่อการละลายของออกซิเจนน้ำหมัก โดยปริมาณอากาศที่ได้รับมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ (มลนพรรษ, 2551) การให้อากาศซึ่งควบคุมได้ในถังหมักนั้นมีผลโดยตรงต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการทดลองของ Deng และFong (2009) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศมากขึ้น จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* ATCC BAA-629 เพิ่มสูงขึ้น เมื่อศึกษาในระดับเซลล์แล้วพบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักส่งผลให้ปริมาณ ATP ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ถึง 3 เท่า หมายความว่าปริมาณพลังงานที่เกิดจำนวนมากในเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักนั้นมีผลให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งรวมถึงเอนไซม์สูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *T. fusca* PA1-1 พบว่าเป็นแอคติโนมัยสีทที่มีการสร้างเส้นใย ในสภาวะการเลี้ยงที่มีการกวนในถังหมักแบบ stirred tank นั้น จะทำให้เกิดแรงเฉือน ซึ่งมีผลโดยตรงต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ รวมถึงส่งผลต่อโครงสร้างและความเสถียรของเอนไซม์ได้ (Gusek และคณะ, 1991 และ Deng และ Fong, 2009) จากการศึกษาอิทธิพลของอัตราการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ของ Kao และคณะ (2007) พบว่าอัตราการกวนและการให้อากาศที่สูงเกินไปจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้เซลล์แตก และยังมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

สรุป

การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 พบว่าเอนไซม์ทำงานดีที่สุดที่พีเอช 4 และกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์พบในช่วงพีเอชกว้างเท่ากับ 4-10 และกิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าเหลืออยู่มากกว่า 80% ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมักที่สภาวะพีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM และการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 โดยให้ผลผลิตที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตในระดับฟลาสก์ ซึ่งพบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 0.977 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากข้อได้เปรียบของสมบัติของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชกว้างและทนอุณหภูมิสูง รวมทั้งประสิทธิภาพการผลิตในระดับถังหมักซึ่งให้ค่าผลผลิตของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลู-เลสสูง ข้อมูลพื้นฐานสำคัญเหล่านี้จึงสามารถใช้ในการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์และเพิ่มศักยภาพการผลิตเพื่อใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

มลนพรรษ สงพิมพ์ 2551. **การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 ด้วยวิธีการหาพื้นผิวการตอบสนอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 72:248-254.

Deng, Y. and S. S. Fong. 2009. Influence of culture aeration on the cellulase activity of *Thermobifida fusca*. **Appl Microbiol Biot**. 9:2155-2159.

George, S.P., A. Ahmad and M.B. Rao. 2001. Studies on carboxymethylcellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technol**. 77:171–175.

Gusek, T. W., R. D. Johnson, M. T. Tyn, and J. E. Kinsella. 1991. Effect of agitational shear on growth and protease production by *Thermomonospora fusca*. **Biotechnol Bioeng**. 37:371-374.

Kao, P.M., C.I. Chen, S.C. Huang, Y.C. Chang, P.J. Tsai and Y.C. Liu. 2007. Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. **Biochem Eng J**. 34: 172-178.

Lima, A.L.G., R.P. Nascimento, E.P.S. Bon and R.R.R. Coelho. 2005. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme Microb Tech**. 37: 272-277.

Lykidis A., K. Mavromatis, N. Ivanova, I. Anderson, M. Land, G. DiBartolo, M. Martinez, A. Lapidus, S. Lucas, A. Copeland, P. Richardson, D. B. Wilson and N. Kyrpides. 2007. Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. **J Bacteriol**. 189:2477–2486.

Lynd L.R., P.J. Weimer, Zyl W.H. and I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization : Fundamental and Biotechnology. **Microbiol Mol Biol R**. 66: 506-577.

Miller G.M., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**. 31:426-428.

Wilson, D. B. 2004. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. **The Chemical Record**. 4:72-82.