ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเชื้อ *Thermobifida fusca* PA1-1

Production in Bioreactor and Characterization of Carboxymethylcellulase of *Thermobifida fusca* PA1-1

นามผู้วิจัย นางสาวศุภางคนางค์ จอมสืบ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเชื้อ *Thermobifida fusca* PA1-1

Production in Bioreactor and Characterization of Carboxymethylcellulase of *Thermobifida fusca* PA1-1

โดย

นางสาวศุภางคนางค์ จอมสืบ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุภางคนางค์ จอมสืบ 2557: การผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเชื้อ *Thermobifida fusca* PA1-1 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D. 91 หน้า

Thermobifida fusca PA1-1 เป็นแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมักทลายปาล์ม ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิเซลูเลสได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในระดับถังหมัก และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ในอาหาร basal medium โดยมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยพบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.977 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ ในการศึกษาผลของน้ำตาล พบว่า น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ จากนั้นจึงศึกษาในระดับถังหมัก 2.0 ลิตร ในอาหาร basal medium โดยมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่สภาวะพีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง โดยปัจจัยที่นำมาศึกษา คือ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในระดับถังหมัก คือ สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิเซลูเลสสูงสุดที่ได้เท่ากับ 2.027 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 60 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งการเพาะเลี้ยงในถังหมักใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่าและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีค่าสูงกว่า โดยเพิ่มขึ้น 2.07 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ และการศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0 - 11.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 - 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นด้วย K^+ และ Mn^{2+} และถูกยับยั้งเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} และ EDTA เอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1 สามารถย่อยสลายสารในกลุ่มเซลลูโลส (CMC และ avicel) และกลุ่มเฮมิเซลลูโลส (xylan) ได้

_____ _____ ____/____/____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Supangkanang Jomsueb 2014: Production in Bioreactor and Characterization of Carboxymethylcellulase of *Thermobifida fusca* PA1-1. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Mangkorn Rodprapakorn, Ph.D. 91 pages.

Thermobifida fusca PA1-1 is an actinomycetes which was isolated from palm empty bunch compost and determined as carboxymethylcellulase (CMCase) producer in high temperature condition. The objectives of this research were to optimize the CMCase production in bioreactor and to characterize CMCase of *T. fusca* PA1-1. Study on cultivation under shake flask condition was carried out in basal medium containing 1 % (w/v) CMC as sole carbon source. The result showed 50^{o}C was optimal temperature for growth which gave maximum CMCase activity of 0.977 unit/ml at 4th day. The effect of sugars was also investigated. The results indicated that glucose, maltose and sucrose at concentration 0.1%, 0.5% and 1% inhibited CMCase production. Furthermore, production of CMCase in 2 liter bioreactor was carried out at 1 vvm aeration rate and at 200 rpm agitation speed. In comparison with optimized condition in shake flask, the observed value of maximum CMCase production was 2.027 units/ml which was a 2.07-fold increase and production time was shortened to only 60 h. Characterization of crude CMCase exhibited optimal activity at pH 4.0 and 60 ^{o}C. Stability was highest in the range of pH 5.0 – 11.0 and 30 - 70 ^{o}C. The activity of CMCase was significantly activated by K^{+} and Mn^{2+} and inhibited by Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} and EDTA. Moreover, CMCase from *T. fusca* PA1-1 can be degraded cellulose substrate such as CM and avicel and hemicellulase substrate such as xylan.

_____ _____ ___/___/___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มังกร โรจน์ประภากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำที่ปรึกษาและคำแนะนำในด้านการเรียน การวิจัยและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณเบนซ์ เก๋ พี่ฝ้าย จุ๋ม หวาน แพร แคล ทราย เบน หมวย เดียร์ กิ๊ฟ พี่เอมมี่ พี่ตาล พี่อีฟ พี่มุนีย์ และพี่วันชัย สำหรับมิตรภาพและการให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณบุคลากร พี่เจ้าหน้าที่ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ช่วยเหลือในด้านต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อธำรงรัฐ - คุณแม่ลดาวัลย์ จอมสืบ ขอบพระคุณ คุณตาผล นันทเสรี คุณน้าบุษบา นันทเสรี และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่สนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้ามาตลอดในทุกเรื่อง

ศุภางคนางค์ จอมสืบ

กรกฎาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	20
อุปกรณ์	20
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	26
สรุปและข้อเสนอแนะ	50
สรุป	50
ข้อเสนอแนะ	51
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	52
ภาคผนวก	63
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	64
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทดลอง	67
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบจากการทดลอง	71
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	91

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แบคทีเรียกลุ่มต่างๆที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	10
2	น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์	11
3	ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสที่มีการผลิตในทางการค้า	19
4	ผลการทำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltraion	40
5	ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1	47
6	ผลการศึกษาสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1	48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 72

ค2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 73

ค3 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 74

ค4 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 75

ค5 ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 76

ค6 ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 77

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค7 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 78

ค8 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 79

ค9 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm 80

ค10 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm 81

ค11 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm 82

ค12 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm 83

ค13 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm 84

ค14 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค15 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ของ *T. fusca* PA1-1 86

ค16 ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่พีเอชต่างๆ ของ *T. fusca* PA1-1 87

ค17 ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิต่างๆ ของ *T. fusca* PA1-1 88

ค18 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ของ *T. fusca* PA1-1 89

ค19 ผลการทดสอบสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จาก *T. fusca* PA1-1 90

ค20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆจากเอนไซม์ที่ผลิต จาก *T. fusca* PA1-1 โดยใช้สับสเตรทเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที 90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของสายเซลลูโลส	6
2	กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส	7
3	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน	27
4	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน	27
5	ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน	29
6	ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อ ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน	29
7	ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน	30
8	ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อ ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน	30

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

9 ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อ ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 31

10 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน 31

11 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm 35

12 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมัก ขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm 35

13 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมัก ขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ ต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm 36

14 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมัก ขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อัตราการกวน 100 rpm 38

15 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมัก ขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อัตราการกวน 300 rpm 38

16 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 41

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ของ *T. fusca* PA1-1	42
18	ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่พีเอชต่างๆ	43
19	ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	44
20	การย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1 โดยใช้สับสเตรทเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที	49

ภาพผนวกที่

ข1	กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส	69

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเชื้อ *Thermobifida fusca* PA1-1

Production in Bioreactor and Characterization of Carboxymethylcellulase of *Thermobifida fusca* PA1-1

คำนำ

ลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่พบมากทั่วโลก ประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และองค์ประกอบอื่นๆ โดยพบเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช แหล่งเซลลูโลสที่สำคัญนอกจากพืชในป่าไม้และพื้นที่ทำการเกษตร ได้แก่ วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปไม้ อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ และขยะเทศบาล เป็นต้น (Lynd *et al*., 2002; Tengerdy and Szakacs, 2003; Zhang *et al*., 2006) สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อนำวัสดุทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ทั้งโดยกระบวนการทางเคมี เช่นการย่อยด้วยกรด หรือกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับเซลลูโลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการแปรรูปเซลลูโลส การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทำให้ได้สารตั้งต้นในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น กลูโคส และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเชื้อเพลิง อาหาร สิ่งทอ กระดาษ หรือเอนไซม์บริสุทธิ์ทางการค้า เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลสในลักษณะของปฏิกิริยาต่อสับสเตรทต่างๆกัน การย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสให้สมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันหรือต่อเนื่องกันของเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) เอนไซม์กลุ่ม endoglucanase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในบริเวณที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน (amorphous) และอนุพันธุ์ของเซลลูโลสที่ตำแหน่ง β-1,4 glycosidic แบบสุ่ม (2) เอนไซม์กลุ่ม exoglucanase ทำหน้าที่ย่อยสายเซลลูโลสบริเวณปลายด้าน non-reducing ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ และ (3) เอนไซม์ β-glucosidase ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส หรือเซลโล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส (Fan and Lee, 1983; Wood, 1985, 1992; Lynd *et al*., 2002)

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมมากเป็นอันดับ 3 (Wilson, 2009; Singhania *et al*,. 2010) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้ามีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตสูง ต้องใช้เซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูงเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ จึงมีการศึกษาค้นคว้าการใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้วิธีการทางเคมี การใช้กรดย่อยเซลลูโลสทำให้เกิดสนิมขึ้นในระบบ อีกทั้งโครงสร้างของเซลลูโลสที่เป็น crystalline cellulose สามารถต้านทานการย่อยสลายโดยกรดได้ในระดับหนึ่ง ทำให้ต้องใช้อุณหภูมิสูงและใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งจะได้ปริมาณกลูโคสน้อย แต่ได้พอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ต้องการมากขึ้น ตรงข้ามกับการใช้เซลลูเลส ซึ่งมีความจำเพาะต่อสับสเตรท ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีความจำเพาะสูงและไม่รุนแรงทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจำนวนมากและมีความบริสุทธิ์สูง (ศุภลักษณ์, 2543; Mandels, 1985)

ในธรรมชาติพบว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ทั้ง รา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีท แต่ความสามารถในการย่อยสลายมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ คุณสมบัติในการนำมาใช้ย่อยสลายเซลลูโลสและผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงมีความแตกต่างกันตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าส่วนใหญ่จะผลิตโดยเชื้อรา แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาและการวิจัยเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทมีข้อได้เปรียบ คือ มีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Irwin *et al*. 1993, Lynd *et al*., 2002; Wilson, 2004) รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทนความร้อน ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมภายใต้สภาวะที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง

จากวิทยานิพนธ์ของวาทินี (2554) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (Carboxymethylcellulase: CMCase) ซึ่งเป็นเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่ม endoglucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่เป็น amorphous หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น carboxymethyl-cellulose และได้คัดเลือกสายพันธุ์ *Thermobifida fusca* PA1-1 ซึ่งจัดเป็นแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

thermophile และเป็นสายพันธุ์ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส นอกจากนี้ยังแสดงกิจกรรมเอนไซม์เอวิเซลเลส (Avicelase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นระเบียบ หรือ crystalline cellulose

งานวิจัยนี้เป็นงานต่อเนื่องจากงานวิจัยข้างต้น ซึ่งเป็นการนำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ *Thermobifida fusca* PA1-1 มาศึกษาสารที่มีผลต่อการยับยั้งและการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เพื่อให้ผลงานวิจัยข้างต้นสมบูรณ์มากขึ้น รวมทั้งศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในระดับถังหมัก และศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ (crude enzyme) เพื่อให้ได้ข้อมูลและแนวทางในการนำจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไปพัฒนาและปรับปรุงใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในระดับถังหมัก

3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (crude enzyme)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

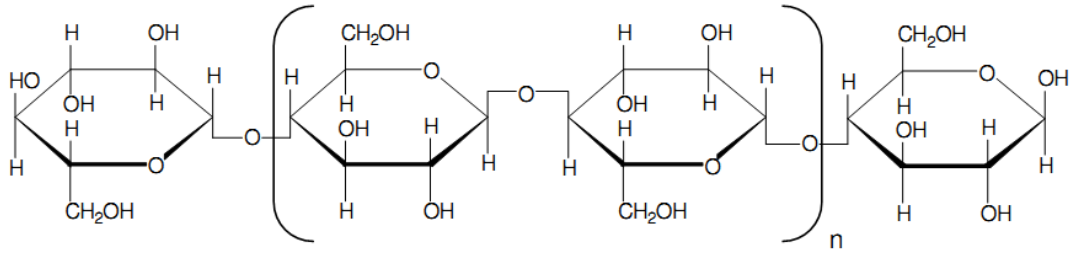
การตรวจเอกสาร

1. เซลลูโลส (cellulose)

สารประกอบลิกโนเซลลูโลส ประกอบไปด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส 35 - 50 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 20 - 30 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 10 - 20 เปอร์เซ็นต์ โดยสารประกอบเหล่านี้จะทำหน้าที่ร่วมกันเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์และชั้นมิดเดิลลาเมลลา (middle lamellae) ของพืชชั้นสูง (Kirk, 1983; Lynd *et al*., 2002; Kuhad and Singh, 2007)

เซลลูโลสจัดเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติมากที่สุด เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช โดยเซลลูโลสเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็น homopolysaccharide มีหน่วยย่อยที่สุดคือน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic อย่างมีระเบียบ (ภาพที่ 1) แต่ละโมเลกุลของกลูโคสในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 กับหมู่ออกซิเจนของโมเลกุลถัดไป และสายเซลลูโลสที่ขนานกันจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนอะตอมที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคสในอีกสายหนึ่ง ทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ พบเซลลูโลสมากที่ผนังเซลล์ชั้นที่สองของพืช (secondary cell wall) คือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด (Franz and Blaschek, 1990) โดยเซลลูโลสและองค์ประกอบชนิดอื่นของผนังเซลล์พืชจะเรียงตัวเป็นกลุ่มยาวรวมกันเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) แต่ละสายของไมโครไฟบริลจะเรียงขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน บริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูงเรียกว่าบริเวณ crystalline ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่าเรียกว่าบริเวณ amorphous หรือ paracrystalline การจัดเรียงตัวของไฟบริลในลักษณะที่แตกต่างกันจะมีผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการเข้าทำปฏิกิริยา ทำให้อัตราในการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณต่างๆมีความแตกต่างกัน กล่าวคือส่วนที่เป็น amorphous จะถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ง่ายกว่าส่วนที่เป็น crystalline (Reese, 1975, 1976; Eriksson *et al*., 1990)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสายเซลลูโลส

ที่มา: Herbert (2006)

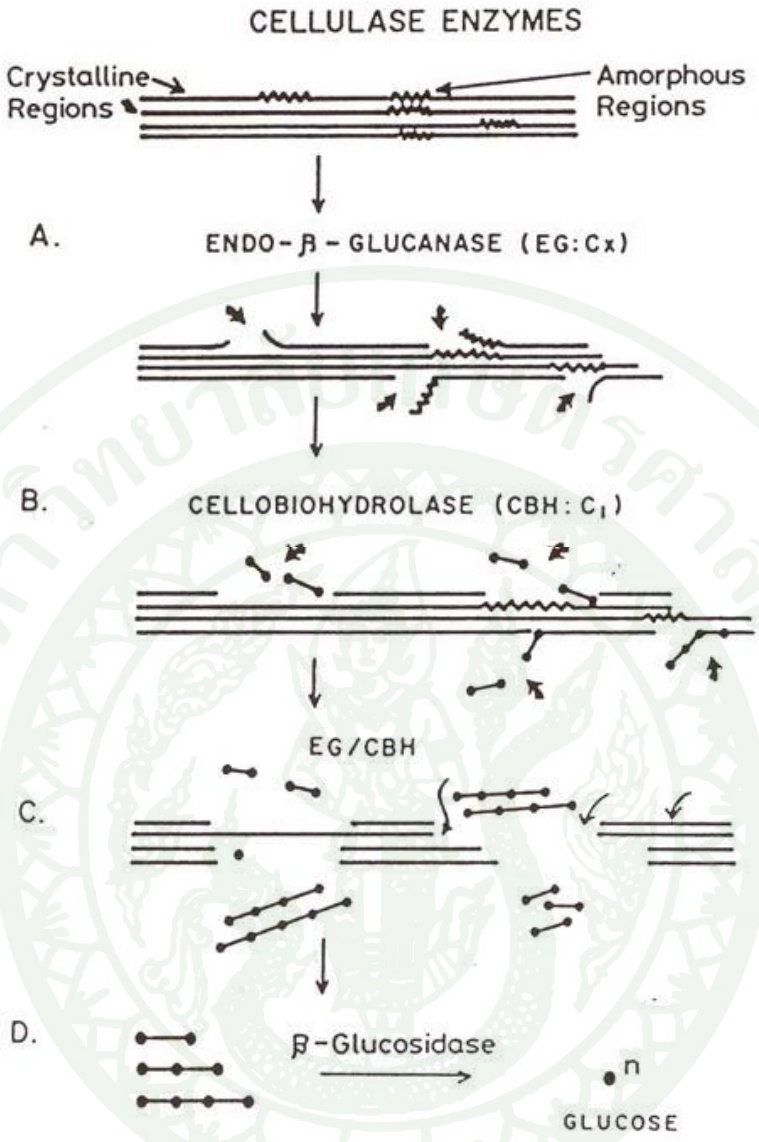
2. เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับสับสเตรทจำพวกเซลลูโลส โดยจะย่อยเซลลูโลสโดยการตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ภายในโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลส ซึ่งการย่อยสลายเซลลูโลสตามธรรมชาติโดยสมบูรณ์นั้นจำเป็นต้องมีเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน

จากการศึกษาระบบของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase system) โดยการแยกเอนไซม์เซลลูเลส แต่ละชนิดให้บริสุทธิ์นั้น ทำให้สรุปการจัดระบบของเอนไซม์เซลลูเลสได้ว่า ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ตามระบบ Enzyme Classification (EC) ซึ่งมีกิจกรรมแตกต่างกันดังนี้ (Bhat and Bhat, 1997; Sandgren *et al*., 2005)

2.1. Endoglucanase หรือ Endo-β-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่เป็น amorphous หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ เช่น carboxymethyl cellulose, เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose), hydroxyethyl cellulose และ cello-oligomers โดยย่อยสลายที่พันธะ β-1,4 glycosidic แบบสุ่ม ทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส

ที่มา: Enari (1983) อ้างโดย Apiraksakorn (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2. Exoglucanase หรือเรียก Exo-β-1,4-glucanase, Exo- β-1,4-glucan glucohydrolase หรือ Exo-β-1,4-cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) ตัดสายเซลลูโลสจากด้านปลาย non-reducing ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ความยาวของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเซลโลไบโอสหรือกลูโคส โดยพบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

2.3. β-1,4-glucosidase หรือ cellobiase (EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสโดยตรงได้ เอนไซม์ β-glucosidase จะเป็นตัวส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำให้ย่อยสลายได้กลูโคสมากขึ้น การย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ปริมาณกลูโคสมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเอนไซม์ β-glucosidase ในเซลลูเลสว่าจะมีมากหรือน้อย ดังนั้นเอนไซม์ตัวนี้จึงเป็นกุญแจสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาล

ในปัจจุบันเมื่อมีการศึกษาถึงระดับโมเลกุลของเอนไซม์และยีนที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในจุลินทรีย์ จึงได้มีการจัดกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสโดยอาศัยความเหมือนกันของลำดับเบสของยีนที่สร้างเอนไซม์ รวมถึงการแบ่งกลุ่มที่อาศัยความแตกต่างของบริเวณ catalytic domains บนโครงสร้างของโมเลกุลเอนไซม์เซลลูเลส โดยจัดเป็นแฟมิลี่ต่างๆได้ โดยอาศัยความเหมือนกันของลำดับเบส นอกจากนี้ยังมีการจัดแบ่งกลุ่มของเอนไซม์เซลลูเลสโดยอาศัยโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ (3-dimentional of enzyme) หรือใช้เทคนิคการเปรียบเทียบ hydrophobic cluster analysis (HCA) (อมรรัตน์, 2547)

การแบ่งแฟมิลี่ของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการนี้ในขั้นต้นสามารถจำแนกได้ 6 แฟมิลี่ โดยจะเรียกเป็น glycoside hydrolases (GHs) แฟมิลี่ ซึ่งจะไม่เกี่ยวกับความจำเพาะต่อสับสเตรท ทำให้การจัดกลุ่มเอนไซม์แบบใหม่นี้ไม่เป็นไปตามระบบของการจำแนกแบบ EC ซึ่งการจำแนกเอนไซม์แบบใหม่จะอาศัยโครงสร้างของเอนไซม์เป็นสิ่งสำคัญ โดยจะดูความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสกับโครงสร้างและการม้วนเกลียวของเอนไซม์ หลังจากที่มีการศึกษา GHs กันกว้างขวางขึ้น ภายหลังจึงได้จัดจำแนกแฟมิลี่ GHs เพิ่มขึ้นเป็น 86 แฟมิลี่ ในปี 2001 (Lynd *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การกำหนดชื่อของ Glycoside Hydrolases เป็น GHs ข้างต้น โดย Lynd *et al*. (2002) แสดงถึงความหมายต่อไปนี้

1. ตัวอักษรชุดแรกแสดงถึงสับสเตรทของเอนไซม์
2. ตัวที่สอง (ตัวเลข) แสดงถึง glycoside hydrolase แฟมิลี่
3. ตัวอักษรสุดท้ายแสดงถึงลำดับของเอนไซม์ที่มีการรายงานหรือขึ้นทะเบียน

ตัวอย่างการเรียกชื่อเอนไซม์แบบใหม่ เช่น CBH I (cellobiohydrolase I) จะเรียกเป็น Cel7A หรือ CBH II เรียกเป็น Cel6A และ EGI เรียกเป็น Cel6B

3. จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (Tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatinafulica) และจุลินทรีย์เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท และเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าส่วนใหญ่จะผลิตโดยเชื้อรา แต่จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทนั้นมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้เช่นกัน โดยมีข้อดี คือ แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าและสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่ายกว่า นอกจากนี้เอนไซม์จากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทยังมีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้าง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Lynd *et al*., 2002; Wilson, 2004) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมที่มีปัจจัยความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบได้ในหลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศ เช่น *Clostridium*, *Acetivibrio* และ *Rhuminococcus* แบคทีเรียที่ใช้อากาศ เช่น *Bacillus*, *Cellulomonas* และ *Acetobactor* และแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีท เช่น *Micromonospora, Streptomycetes* และ *Thermobifida* (Lynd *et al*., 2002) ดังแสดงในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 แบคทีเรียกลุ่มต่างๆที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ชนิดของจุลินทรีย์	จีนัส	สายพันธุ์จุลินทรีย์
แบคทีเรีย	*Acetobacter*	*Acetobacter xylinum*
	Bacillus	*Bacillus circulans*
		Bacillus subtilis
	Caldocellumus	*Caldocellum saccharolyticum*
	Cellulomonas	*Cellulomonas biazotea*
	Cellvibrio	*Cellulomonas fimi*
		Cellvibrio mixtus
		Clostridium absonum
	Clostridium	*Clostridium celluloticum*
		Clostridium thermocellum
		Fibrobacter succinogenes
	Fibrobacter	*Ruminococcus albus*
	Ruminococcus	*Ruminococcus flavefaciens*
แอคติโนมัยสีท	*Microbispora*	*Microbispora bispora*
	Streptomyces	*Streptomyces* sp.
	Thermomonospora	*Thermomonospora fusca*

ที่มา: Lynd *et al*. (2002)

สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่ชอบอุณหภูมิสูงอย่าง *Thermobifida fusca* (เดิม *Thermomonospora fusca*) เป็นแอคติโนมัยสีทที่ต้องการอากาศ ชอบอุณหภูมิสูง สามารถพบได้ทั่วไปในดิน ซึ่งเป็นตัวย่อยสลายที่สำคัญของผนังเซลล์พืชในสารอินทรีย์ เช่น กองปุ๋ยหมักหญ้าแห้งที่เน่าเปื่อยหรือกองปุ๋ย เป็นต้น โดย extracellular enzyme ที่ผลิตโดย *T. fusca* รวมทั้งเซลลูเลสได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางเพราะทนความร้อน สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชกว้าง 4 - 10 และมีกิจกรรมสูง โดย *T. fusca* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมด 6 ชนิดที่แตกต่างกันและจากการทำให้บริสุทธิ์สามารถจัดจำแนกได้เป็นเอนโดเซลลูเลส 3 ชนิด คือ Cel9B Cel6A และ Cel5A และเอกโซเซลลูเลส 2 ชนิด คือ Cel6B และ Cel48A และ processive endocellulase Cel9A 1 ชนิด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีทั้งกิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส (Zhou *et al*., 2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ *T. fusca* ยังสามารถผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสได้ ซึ่งเฮมิเซลลูเลสที่พบใน *T. fusca* มี 2 ชนิด คือ (1) xylanases (xyl11A และ xyl10B) 1 ชนิด คือ xyloglucanase (xg74A) และ (2) คือ mannanase (manB) (Zhang *et al*., 2000) โดยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆที่ผลิตจาก *T. fusca* สามารถทำงานร่วมกันเพื่อย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำหรือมีโครงสร้างที่เป็นระเบียบ ให้เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคส หรือน้ำตาลอื่นๆได้ (Zhang *et al*., 1995; Sharmili and Rao, 2005; Deng and Fong, 2010)

4. สมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

เอนไซม์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและโครงสร้างของเอนไซม์ รวมถึงชนิดและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ประกอบด้วย

4.1 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์เซลลูเลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ที่มา
รา	*Aspergillus niger* CCRC 31494	49	Yan and Lin, 1997
	Sinorhizobium fredii CCRC 15769	94	Chen *et al*., 2004
แบคทีเรีย	*Bacillus amyloliquefaciens* DL-3	55.1	Lee *et al*., 2008
	Bacillus subtilis KSM-635	40	Ozaki *et al*., 1995
	Bacillus circulans F-2	72	Kim and Kim, 1995
	Cellulomonas uda CS1-1	50	Yoon and Choi, 2007
	Clostridium thermocellum	60	Ahsan *et al*., 1997
แอคติโน-มัยสีท	*Streptomyces flavogriseus*	45	Mackenzie *et al*., 1984
	Thermobifida fusca	43	Zhang *et al*., 1995

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

4.2.1 พีเอช

เอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงของพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย อาจทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีการแตกตัวตรงหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิล หรือ side chain ได้ต่างกัน ในสภาวะที่พีเอชแตกต่างกันจะมีผลให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป โดยเอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชค่าหนึ่ง เรียกว่า พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ณ จุดที่พีเอชมีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะลดลง

4.2.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพหรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์แต่ละชนิดย่อมมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานต่างกัน

เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิด มีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานต่างกัน โดยเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Cellulomonas uda* CB4 ซึ่งแยกได้จาก brewery sewage มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซลลูโลสที่พีเอช 5.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 45 - 50 องศาเซลเซียส (Nakamura and Kitamura, 1982) และจากการศึกษาของ Johnson *et al*. ในปี 1982 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Clostridium thermocellum* จะมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 5.7 เมื่อมี avicel เป็นสับสเตรท และที่พีเอชเท่ากับ 6.1 เมื่อมีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรท และกิจกรรมเอนไซม์ถูกยับยั้งได้ด้วยผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาเอง (feed back inhibition)

Mackenzie *et al*. (1984) ได้ศึกษาเอนไซม์จากแอคติโนมัยสีท *Streptomyces flavogriseus* และจำแนกเอนไซม์ที่เชื้อผลิตได้เป็น 2 ชนิด คือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (CMCase)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเอวิเซลเลส (Avicelase) เอนไซม์ของแอคติโนมัยสีทนี้มีความคงตัวสูงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ที่ 40 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า เอนไซม์จะไม่คงตัว และค่าพีเอช 5.5 - 7.0 เป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสับสเตรต

จากการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Clostridium stercorarium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงและไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Creuzet and Frixon, 1983) พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 6.4 และมีค่า pI เท่ากับ 3.85 และพบว่าเอนไซม์ทนความร้อนได้สูง โดยเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

ในปี 1998 Bok *et al*. ศึกษาเอนไซม์ endoglucanase 2 ชนิด คือ CelA และ CelB จากเชื้อ *Thermotoga neapolitana* พบว่ามีค่า pI เท่ากับ 4.6 และ 4.1 ตามลำดับ ขณะที่ Endo *et al*. (2001) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ endo-1,4-β-glucanase (Egl) จาก *Bacillus* sp. KSM-N252 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์คือที่ช่วงพีเอช 10 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้มีกิจกรรมต่อ p-nitrophenyl, cello-oligosaccharide และ acid-swollen cellulose โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นได้โดยเซลโลไบโอสที่มีความเข้มข้นสูง

George *et al*. (2001) ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Thermomonospora* sp. ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและชอบสภาวะที่เป็นด่าง พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้มีค่า pI เท่ากับ 4.1

Hakamada *et al*. (2002) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่สร้างจาก *Bacillus circulans* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย CMC คือ พีเอช 8.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในปี 2003 Akila and Chandra ทำการแยกเชื้อ *Clostridium* sp. PXYL1 จากถังหมักปุ๋ยคอกโดยการลดอุณหภูมิในการหมักจนถึง 15 องศาเซลเซียส เชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5 ถึง 50 องศาเซลเซียส และสามารถสร้างเอนไซม์ CMCase และ Fpase โดยเอนไซม์ทั้งสองสามารถเกิดกิจกรรมได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยใช้ CMC และ filter paper เป็นสารตั้งต้นและให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 35.75 และ 23.68 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ในปี 2007 Salah *et al*. ได้แยกเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Anoxybacillus*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

flavithermus EHP1 จากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศอียิปต์ และศึกษาการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 75 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Lee *et al*. (2008) พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3

4.3 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ หรือ enzyme inhibitor เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น และลักษณะของ functional group ที่บริเวณ active site ทำให้เข้าใจและสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ จากการศึกษาของ Thomas and Zeikus (1981) พบว่า Ag^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Clostridium thermocellum* LQRI ในขณะที่ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* QM9414

Iwashita *et al*. (1998) พบว่าเอนไซม์ β-glucosidase ที่ผลิตจาก *Aspergillus kawachii* ถูกยับยั้งโดย Ag^{2+} และ Hg^{2+} ในขณะที่ Fe^{3+} มีส่วนช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในปี 1998 Okolo *et al*. รายงานการศึกษาเอนไซม์ 2 ชนิด คือ CMCase I และ II จากเชื้อ *Paecilomyces* sp. พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 จะถูกยับยั้งในสภาวะที่มี Zn^{2+}, Hg^{2+}, glycine และ EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกับรายงานของ Singh and Kumar (1998) ที่พบว่า Ag^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus brevis* VS-1

นอกจากนี้ Lee *et al*. (2008) พบว่า Hg^{2+}, EDTA, Mn^{2+}, N-bromosuccinimide, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+} และ K^{+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3

5. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์เซลลูเลสทั้งในอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อาหารสัตว์ เครื่องนุ่งหุ่ม ผงซักฟอก เยื่อกระดาษ การย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร เป็นต้น โดยในปัจจุบันการวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์เซลลูเลสมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง รวมถึงการศึกษาในระดับโมเลกุลด้วย (รุจิกาญจน์, 2546; วาทินี, 2554)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1 อุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้

มีการนำเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสมาใช้ร่วมกับเอนไซม์เพคติเนสและเฮมิเซลูเลส ในกระบวนการสกัด การทำให้ใส รวมทั้งสามารถคงสภาพของสารที่มีประโยชน์ในการผลิตน้ำผลไม้และทำให้น้ำผลไม้ที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน (Galante *et al*., 1998) นอกจากนี้ยังอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวมาช่วยทำให้เนื้อผลไม้เปื่อยยุ่ย กรองง่ายและผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีความคงตัวภายหลังผ่านการบีบหรือบดด้วยวิธีเชิงกล ซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตให้ได้น้ำผลไม้เร็วขึ้น

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะย่อยเพคตินและพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นส่วนของผนังเซลล์พืช จึงสามารถลดความหนืดของน้ำผลไม้และคงเนื้อสัมผัสของน้ำผลไม้ไว้ได้ (Galante *et al*., 1998; Uhlig, 1998) โดยหลังจากการย่อยสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เป็นพรีไบโอติกและส่วนผสมในอาหารบางชนิดที่ให้แคลอรีต่ำอีกด้วย (Mandels, 1985; Bhat and Bhat, 1997) นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์เบต้ากลูคาเนสร่วมกับเอนไซม์แมนนาเนสเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของราและแบคทีเรียบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของอาหารด้านความปลอดภัย (Fuglsang *et al*., 1995)

นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ร่วมกับเอนไซม์เพคติเนสฉีดเข้าไประหว่างผิวของผลไม้ ทำให้สามารถปอกง่ายขึ้น และคงความกรอบและกลิ่นรสของผลไม้ไว้ได้ (Crocco, 1976; Baker and Bruemmer, 1989; Baker and Wicker, 1996)

5.2 อุตสาหกรรมเบียร์และไวน์

การผลิตเบียร์เริ่มต้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ ได้แก่ เอลฟ่า และเบต้าอะไมเลส คาร์บอกซีเพปทิเดส และเบต้ากลูคาเนสเพื่อกระตุ้นกระบวนการงอกของข้าวบาร์เล่ย์เป็นข้าวมอลต์ ในบางฤดูกาลเกิดปัญหาจากการเก็บเกี่ยวทำให้เอนไซม์ที่อยู่ในเมล็ดข้าวมีการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะเอนไซม์เบต้ากลูคาเนสที่ผลิตออกมาน้อยกว่าปกติ ซึ่งจะส่งผลให้เมล็ดข้าวมอลต์ที่ได้ไม่สมบูรณ์ โดยเกิดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide, NSP) หรือเป็นเบต้ากลูแคนที่ละลายน้ำเกิดเป็นเจล ทำให้ต้องใช้เวลาในการหมักเพิ่มขึ้น กระบวนการหมักและการกรองน้ำเวิร์ท (wort) ทำได้ยาก รวมทั้งทำให้ผลผลิตสุดท้ายที่ได้น้อยลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมเอนไซม์เบต้ากลูคาเนสจากจุลินทรีย์บางชนิด เพื่อกำจัด β-1,3 และ β-1,4 glucan

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำให้ความหนืดในน้ำเวิร์ทน้อยลงและปลดปล่อยน้ำตาลริดิวซ์ซึ่งช่วยส่งเสริมการหมักให้เร็วยิ่งขึ้น (Pajunen, 1986; Canales, 1988; Galante *et al*., 1998)

ในการผลิตไวน์มีเอนไซม์ 3 กลุ่มที่นำมาใช้ ได้แก่ เอนไซม์เพคติเนส เบต้ากลูคาเนส และเฮมิเซลลูเลส (Galante *et al*., 1998) โดยเอนไซม์ดังล่าวมีหน้าที่ช่วยให้ผลไม้เปื่อยยุ่ยเร็วขึ้น ช่วยให้การสกัดแยกสีดีขึ้น กระบวนการกรองและทำให้ใสสามารถทำได้ง่ายขึ้น รวมทั้งปรับปรุงคุณภาพและรักษาความคงตัวของไวน์ได้ดี นอกจากนี้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสยังทำให้เกิดการเปลี่ยนหมู่อโรเมติกบางกลุ่มทำให้กลิ่นและรสชาติของไวน์ดีขึ้น (Caldini *et al*., 1994) และจากการศึกษาของ Galante *et al*. (1998) พบว่า ในการผลิตไวน์ เมื่อนำเอนไซม์เบต้ากลูคาเนสจากรา *Trichoderma harzianum* มาใช้ในการย่อยสลายกลูแคนซึ่งเป็นผนังเซลล์ยีสต์ ช่วยทำให้การกรองไวน์และทำไวน์ให้ใสทำได้ง่ายขึ้น

5.3. อุตสาหกรรมอาหาร

มีการประยุกต์ใช้เซลลูเลสในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิต เช่น การสกัดน้ำมันจากเมล็ดพืช แยกโปรตีนจากถั่วเหลืองและมะพร้าว แยกแป้งจากข้าวโพดและมันฝรั่ง การสกัดวุ้นจากสาหร่ายทะเล รวมถึงการกำจัดเปลือกของถั่วเหลืองในการหมักเพื่อผลิตซอสถั่วเหลือง การกำจัดผนังเซลล์ซึ่งจะช่วยให้มีการปล่อยกลิ่นรส เอนไซม์ พอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีน หรืออาจใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการปรับปรุงคุณภาพของอาหารหมัก หรือการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ กลูโคส และน้ำตาลที่ละลายได้อื่นๆจากวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นเซลลูโลส เป็นต้น

5.4. อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

มีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ ทั้งในสัตว์กระเพาะเดี่ยวและสัตว์เคี้ยวเอื้อง ร่วมกับเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีบทบาทในการปรับปรุงคุณภาพของอาหารสัตว์กระเพาะเดียว คือ กำจัดปัจจัยที่ส่งผลให้คุณค่าทางอาหารในธัญพืชลดลง เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับธัญพืชโดยการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เปลือกธัญพืช และกำจัด เบต้ากลูแคนซึ่งทำให้ความหนืดลดลง ทำให้สัตว์สามารถย่อยอาหารประเภทแป้ง ไขมัน โปรตีนได้ง่ายและเพิ่มความสามารถในการดูดซึมอาหารในลำไส้เล็กได้ดีขึ้น (Bedford and Classen, 1992; Beauchemin *et al*., 1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในปี ค.ศ. 2008 มีรายงานการทดลองจาก Onderci *et al*. พบว่าเมื่อใช้ยีนที่ผลิตเบต้ากลูคาเนสจาก *Streptococcus bovis* ในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* จากนั้นนำเซลล์ลูกผสมที่ได้ผสมลงในอาหารลูกไก่สูตรปกติด้วยข้าวบาร์เล่ย์เพียงชนิดเดียวได้เป็นอาหารสูตรดัดแปลง เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของลูกไก่อายุ 21 วัน ที่ได้รับอาหารสูตรปกติและสูตรดัดแปลง พบว่าลูกไก่ที่ได้รับอาหารสูตรดัดแปลงมีอัตราการเจริญและกินอาหารได้มากกว่าลูกไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรปกติ

เอนไซม์เบต้ากลูคาเนสและเอนไซม์ไซลาเนสถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์โดยสามารถกำจัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (NSP) เช่น เบต้ากลูแคนในข้าวบาร์เล่ย์และอะราบินอกไซแลน ซึ่งถ้ามีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวจำนวนมากจะทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยและน้ำหนักตัวลดลง (Bedford and Classen, 1992) อัตราส่วนของเอนไซม์ไซแลเนสต่อเอนไซม์เบต้ากลูคาเนสที่เหมาะสมเท่ากับ 6:1 พบว่าทำให้น้ำหนักตัวลูกไก่มากที่สุด โดยอาหารมีส่วนผสมของข้าวสาลีอยู่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (Galante *et al*., 1998) อาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องจะมีส่วนผสมที่ซับซ้อนกว่า ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคติน ดังนั้นจึงต้องใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพื่อปรับปรุงคุณภาพอาหาร มีรายงานว่าการเติมเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสทางการค้าลงในอาหารสามารถเพิ่มน้ำหนักให้วัวได้มากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ (Beauchemin *et al*., 1995)

5.5 อุตสาหกรรมสิ่งทอและผงซักฟอก

กระบวนการฟอกสียีนสมัยเริ่มต้น มีการนำหินพัมมิส (Pumice) มาใช้เพื่อขัดสีเกิดเป็นสีฟ้าซีดตามที่ต้องการของตลาด แต่ในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้เพื่อฟอกสี กำจัดด้ายและปุ่มปมที่ไม่ต้องการในผ้าฝ้ายออกไป ข้อดีของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการฟอกสียีนนั้นสามารถลดการฉีกขาดของเนื้อผ้าที่เกิดขึ้นระหว่างการขัดด้วยหินแบบวิธีดั้งเดิม รวมทั้งสามารถใช้เทคโนโลยีเข้ามาควบคุมให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่การใช้เอนไซม์เพื่อฟอกสียีนอาจทำให้เกิดปัญหาสีตก แต่จากการศึกษาของ Galante *et al*. (1998) พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Humicula insolens* และ *Trichoderma ressei* ที่มีคุณสมบัติทนกรดร่วมกับเอนไซม์โปรตีเอสเติมลงไปก่อนเข้าเครื่องซักผ้าช่วยลดปัญหานี้ได้

เนื้อผ้าที่ผลิตจากเส้นใยธรรมชาติ เช่น ผ้าฝ้ายและลินิน ที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลส ใยผ้าจะมีลักษณะเป็นปุ่มปมอยู่มาก ซึ่งเป็นลักษณะที่ทำให้ผ้าคุณภาพต่ำ ดังนั้นกระบวนการกำจัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปุ่มปมของใยผ้าจึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับผ้าใยธรรมชาติได้ มีการนำเอนไซม์เซลลูเลสเข้ามาใช้ร่วมกับวิธีเชิงกลต่างๆ เพื่อกำจัดปุ่มปมผ้าส่วนเกิน นอกจากนี้ข้อดีของการใช้เอนไซม์ คือ สามารถปรับปรุงสีผ้าให้สดใส ทำให้รูปทรงของผ้าสวยงาม ทำให้ผ้ามีสัมผัสนุ่มและมันเงา อีกทั้งยังเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Bhat, 2000)

ผ้าฝ้ายทั่วไปเมื่อมีการซักซ้ำจะหมองคล้ำและเกิดลักษณะเป็นขุยเนื่องจากการเคลื่อนตัวชิดกันของใยผ้า การเติมเอนไซม์เซลลูเลสในผงซักฟอกจะช่วยให้ใยผ้าเรียงตัว กำจัดใยผ้าที่เป็นขุย ทำให้สีสันของเนื้อผ้าสดใสและมีสัมผัสนุ่ม เอนไซม์เซลลูเลสจาก *H. insolens* นำมาใช้ในผงซักฟอกเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกในใยผ้า ทำให้ผ้าสะอาดและนุ่มขึ้น ทำงานได้ดีภายใต้สภาวะด่าง คือในช่วงพีเอช 8.0 - 9.0 อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยผสมลงไปประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณผงซักฟอกทั้งหมด (Uhlig, 1998)

เอนไซม์ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สามารถทำงานได้ในสภาวะด่างเป็นที่สนใจในการนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบกับผงซักฟอกที่มีใช้ในทางการค้า เอนไซม์เซลลูเลสจากแอคติโนมัยสีท *Thermomonospora* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณที่มีความร้อนสะสมตามธรรมชาติในอินเดีย (George *et al*., 2001) โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้มีความเสถียรอยู่ในช่วงพีเอช 7.0 - 10.0 และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เอนไซม์ร่วมกับผงซักฟอกที่ผลิตทางการค้าพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานร่วมกันได้กับผงซักฟอกทดสอบ เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Streptomyces drozdowiczii* ทำงานได้ดีร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าเช่นกัน (Lima *et al*., 2005) โดยสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังทดสอบร่วมกับผงซักฟอกทางการค้าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.6 อุตสาหกรรมกระดาษ

เอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม จะช่วยลดเวลาในการตี (beating time) และช่วยต้านไข (grease resistancc) ในกระบวนการผลิตกระดาษ ทำให้กระดาษที่ได้มีคุณภาพดี

นอกจากนี้ยังพบการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมยา การผลิตโปรโต-พลาสต์ รวมทั้งการจัดการของเสียและสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์มาผลิตเพื่อการค้าโดยมีการผลิตอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีจำหน่ายในบริษัทยักษ์ใหญ่ทางด้านสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์หลายแห่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เช่น บริษัท Novozymes มีการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส จาก *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp. *Trichoderma reesei* และ *Trichoderma longibrachiatum* (Novozymes, 2003, 2010, 2012) บริษัท Rapidase มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* นอกจากนั้นยังมีการผลิตเซลลูเลสทนร้อนจาก *Clostridium thermocellum* และเอนไซม์เบต้ากลูคาเนสที่สามารถย่อยสลายเซลูโลสและไซแลนจาก *Bacillus subtilis* บริษัท Sigma (Ayyad *et al*., 1991; Sigma-Aldrich. 2014)

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ต่างๆในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีมูลค่าทางการตลาดสูงถึง 1,600 ล้านเหรียญสหรัฐ หรือประมาณ 5 หมื่นล้านบาท เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส คาร์โบไฮเดรส เอนไซม์ไคโมซิน (chymosin) ในอุตสาหกรรมการผลิตชีสและเอนไซม์ไลเปสลูกผสม (recombinant lipase) ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ลูกผสมในการรักษาโรค เช่นใช้ในการรักษาการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด ความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร ความผิดปกติของไขข้อและกระดูก โรคทางเมตาโบลิค รวมถึงโรคมะเร็ง โดยเอนไซม์เหล่านี้มีแนวโน้มมูลค่าทางการตลาดสูงถึง 2 พันล้านเหรียญสหรัฐ หรือประมาณ 6 หมื่นล้านบาท (Arnold, 2000)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสที่มีการผลิตในทางการค้า

เอนไซม์ทางการค้า	บริษัทที่ผลิต
Biocellulase	Biocon Ltd., Cork, Ireland
Cellubrix	Rapidase, France
Cellulase 9108	Rapidase Seclin, France
Celluclast	Novozymes Corp, Denmark
Maxazyme CL2000	Gist Brocades NV, Delft, Netherlands
Novozyme	Novozymes Corp, Denmark
Hemicellulase AS	Novozymes Corp, Denmark
Pulpzyme HC	Novozymes Corp, Demark
SPEZYME	Genencor, Danisco, US
Viscozyme	Novozymes Corp, Demark

ที่มา: Ayyad *et al*. (1991); Novozymes (2003, 2010, 2012); Genencor (2014)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ *Thermobifida fusca* PA1-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ คัดแยกมาจากทลายปาล์ม เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อซึ่งผสมกับกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 ตู้เขี่ยเชื้อ (biological safety cabinet)

2.2 ตู้บ่มเชื้อ (temperature incubator)

2.3 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)

2.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

2.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (VS - 8480SFN: Vision, Scientific Co, L.TD)

2.6 ถังหมักขนาด 2 ลิตร (MD - 250, Marubishi, Japan) พร้อมอุปกรณ์ควบคุมการกวนและการให้อากาศ

2.7 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ร่วมกับถังหมัก ได้แก่ เครื่องสูบอากาศ (air pump) เครื่องทำความเย็น (cooling) ขวดแก้ว และสายยางซิลิโคน เป็นต้น

2.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

2.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

2.10 เครื่อง Ultrafiltration

2.11 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.12 Automatic pipette

2.13 เครื่องแก้วที่จำเป็นสำหรับใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อ *Thermobifida fusca* PA1-1 ซึ่งเก็บโดยวิธีแช่เยือกแข็ง มาหลอมละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง nutrient agar ที่เติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชเริ่มต้น 8.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 - 4 วัน ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหาร basal medium ซึ่งมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส 250 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อมาทำซ้ำอีกครั้งตามขั้นตอนข้างต้น แล้วปรับค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 0.2 - 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้ในการทดลองการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

2. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermobifida fusca* PA1-1 ในระดับฟลาสก์

2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับฟลาสก์

ถ่ายกล้าเชื้อ *T. fusca* PA1-1 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว basal medium ค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0 (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1) จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปหาน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเหนี่ยวนำการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับฟลาสก์

ถ่ายกล้าเชื้อ *T. fusca* PA1-1 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว basal Medium ที่มีพีเอชเริ่มต้น 8.0 (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำตาลชนิดต่างๆได้แก่ กลูโคส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1) และนำตะกอนเซลล์ไปหาน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

3. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermobifida fusca* PA1-1 ในระดับถังหมัก

3.1 การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมัก

ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) โดยถ่ายเชื้อ *T. fusca* PA1-1 ที่มีอายุประมาณ 3 - 4 วัน ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหาร basal medium พีเอชเริ่มต้น 8.0 (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 250 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร (MD - 250, Marubishi, Japan) ซึ่งบรรจุอาหารเหลว basal medium ที่เติม CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราการให้อากาศที่ 0.2, 0.5 และ 1.0 vvm ตามลำดับ และกำหนดอัตราการกวนให้คงที่ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง โดยเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1) จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปหาน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมัก

กำหนดอัตราการให้อากาศคงที่ โดยเลือกอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.1 และแปรผันการกวนที่ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที ตามลำดับ ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1) จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปหาน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

4. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสหยาบ (crude enzyme) จาก *Thermobifida fusca* PA1-1

4.1 การทำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสให้เข้มข้นด้วยวิธีการ Ultrafiltration

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีท *T. fusca* PA1-1 มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำให้เข้มข้นผ่านเครื่อง ultrafiltraion โดยใช้แผ่นกรองเซลลูโลสขนาด 1,000 ดาลตัน ให้มีความเข้มข้น 5 เท่า เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาช่วงของพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ระบบ Sorrensen ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ คือ ในช่วงพีเอช 3.0 - 5.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium Citrate-HCl ในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0 - 8.0 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และในช่วงพีเอชระหว่าง 9.0 - 11.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Glycine-NaOH (ภาคผนวก ก ข้อ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในสภาวะพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ทำการทดลองในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 - 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่พีเอชต่างๆ

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ค่าพีเอชต่างๆ โดยทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 3.0 – 11.0 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาจึงนำสารละลายเอนไซม์มาปรับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

4.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิต่างๆ

ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำไปบ่มในช่วงอุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่เหลืออยู่ (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

4.6 การศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำเอนไซม์บ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอิออนโลหะ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่เหลือ (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.7 การศึกษาสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำเอนไซม์บ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารยับยั้งการทำงาน ได้แก่ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิ-โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที นำเอนไซม์มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่เหลือ (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

4.8 การศึกษาการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1

นำ crude enzyme มาทำปฏิกิริยากับสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ CMC, avicel, xylan ฟางข้าว ซังข้าวโพด และขี้เลื่อย โดยใช้สับสเตรต เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มกับสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA 1-1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

5. วิธีวิเคราะห์

5.1 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method ดัดแปลงมาจากวิธีของ Miller (1959)

6. สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

6.1 สถานที่ทดลอง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มต้นตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2554 สิ้นสุดเดือน เมษายน 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermobifida fusca* PA1-1 ในระดับฟลาสก์

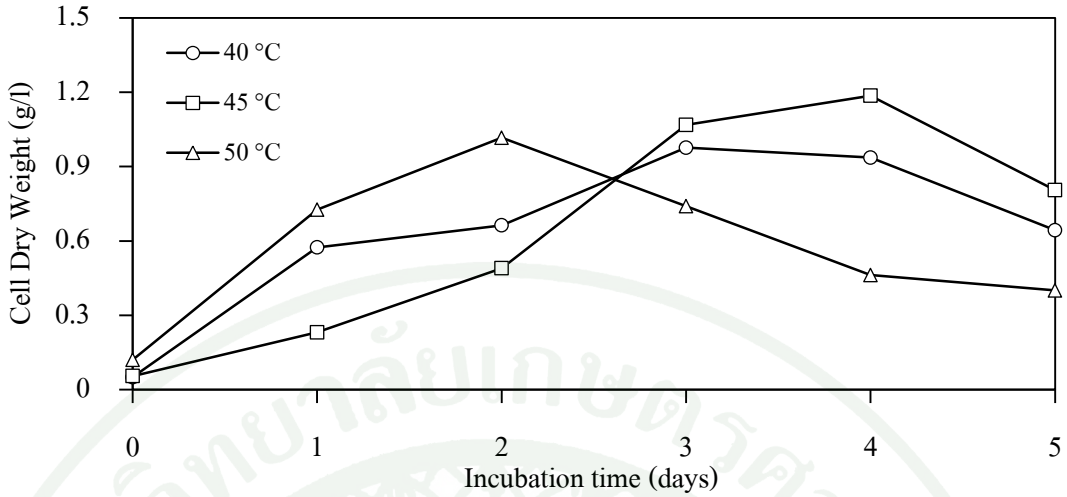
1.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลู-เลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับฟลาสก์

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จาก *T. fusca* PA1-1 ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วย CMC 1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al*., 1988) ปรับค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 8.0 ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) และกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

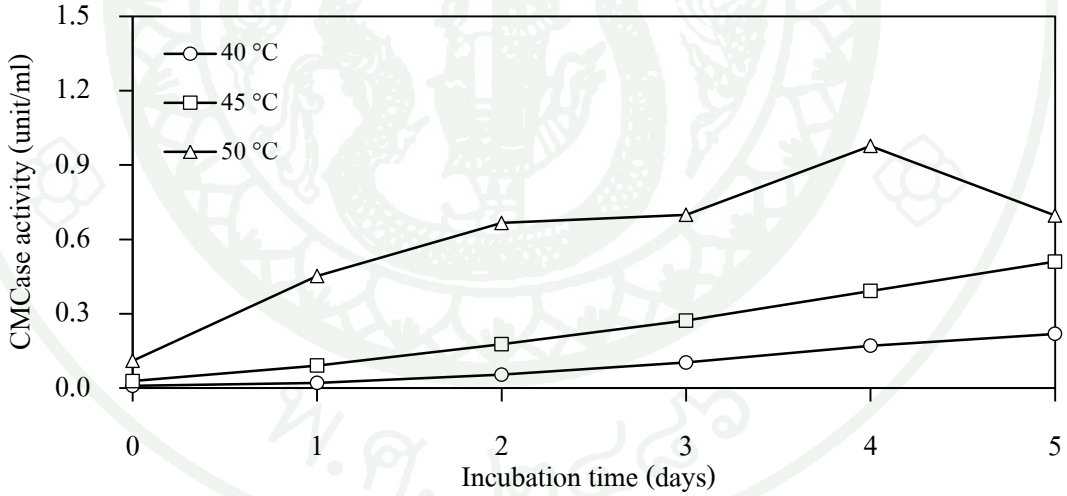
จากผลการทดลองพบว่า *T. fusca* PA1-1 มีการเจริญของเซลล์และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4 ตามลำดับ ในการทดลองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึงวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นการเจริญจะค่อยๆลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกันกับที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นการเจริญจะลดลง ในขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสพบการเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่เข้าสู่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และสูงสุดในวันที่ 2 จากนั้นการเจริญจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในการทดลองที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียสพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างคงที่ และมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าเท่ากับ 0.219 และ 0.510 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง โดยกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.977 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่าสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน



ภาพที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

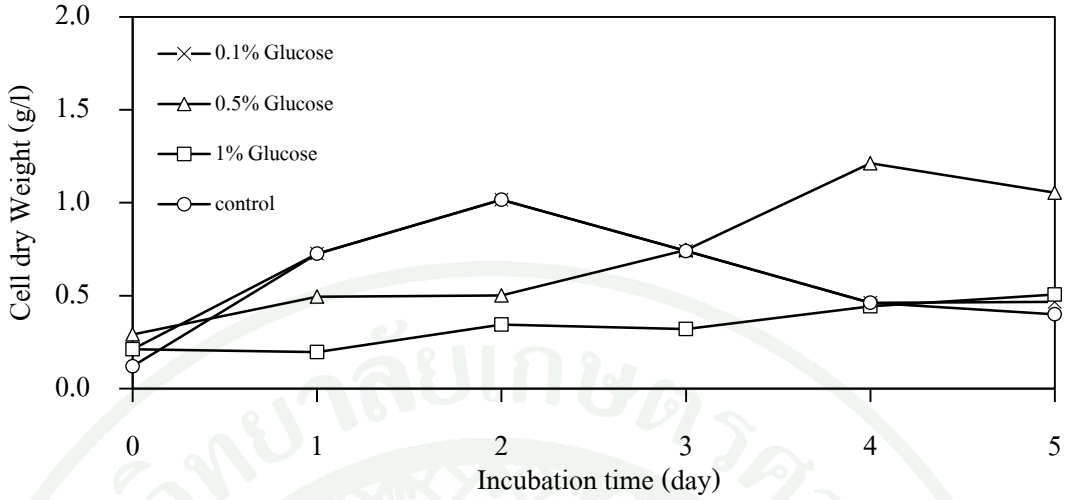
1.2 การศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

ศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหาร basal medium พีเอช 8.0 (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988) ที่มีการเติมน้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุมที่เพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium พีเอช 8.0 ที่ไม่มีการเติมน้ำตาล โดยมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

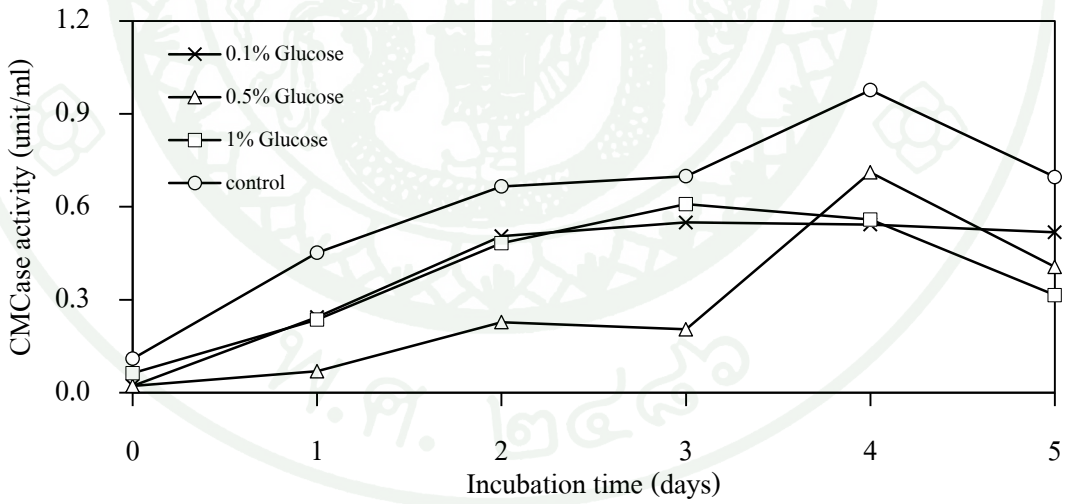
จากการศึกษาพบว่า *T. fusca* PA1-1 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลที่ความเข้มข้น 0.1 – 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำตาล พบว่า ในการเพาะเลี้ยงที่มี กลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มอลโตส 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ และ ซูโครส 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบการเจริญที่สูงกว่าในสภาวะควบคุม ดังภาพที่ 5, 7 และ 9 โดยในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลนั้นจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และลดลงในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมซึ่งไม่มีการเติมน้ำตาล จะพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะค่อยๆลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะที่มีการเติมกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของเซลล์ในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง อยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับสภาวะอื่น ดังแสดงในภาพที่ 5 ทั้งนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นของอาหารลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสสูง ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Stewart and Leatherwood (1976) ซึ่งพบว่าเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Cellulomonas* sp. จะทำให้เกิด catabolite repression ขึ้นได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

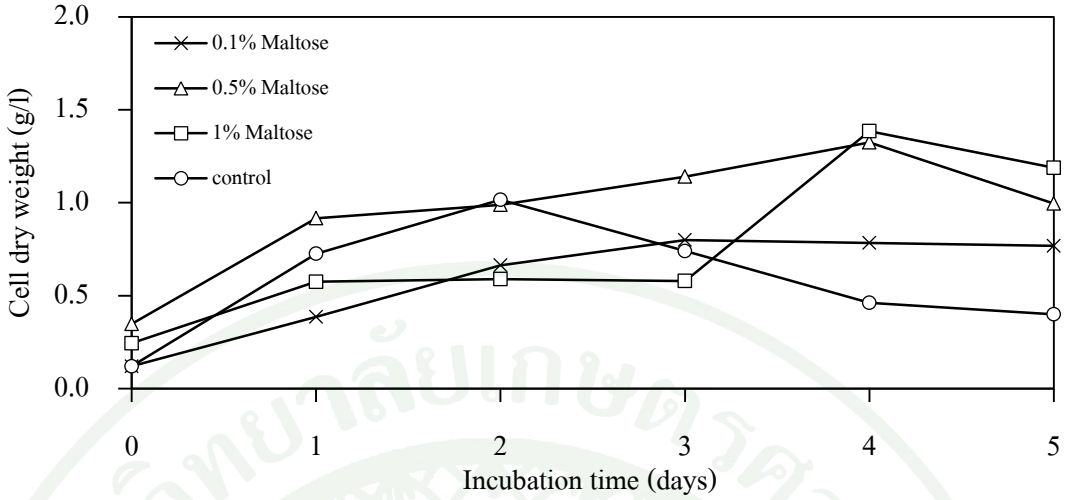


ภาพที่ 5 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

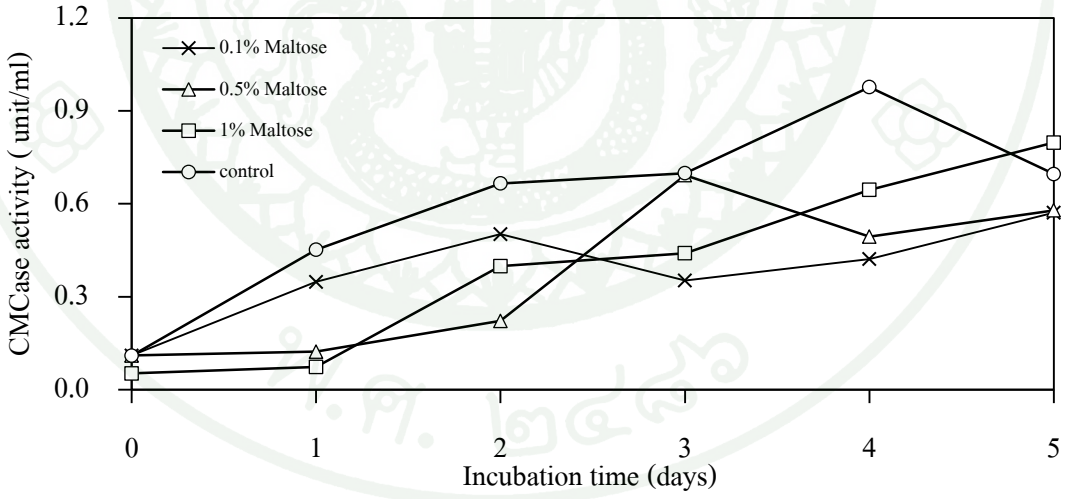


ภาพที่ 6 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

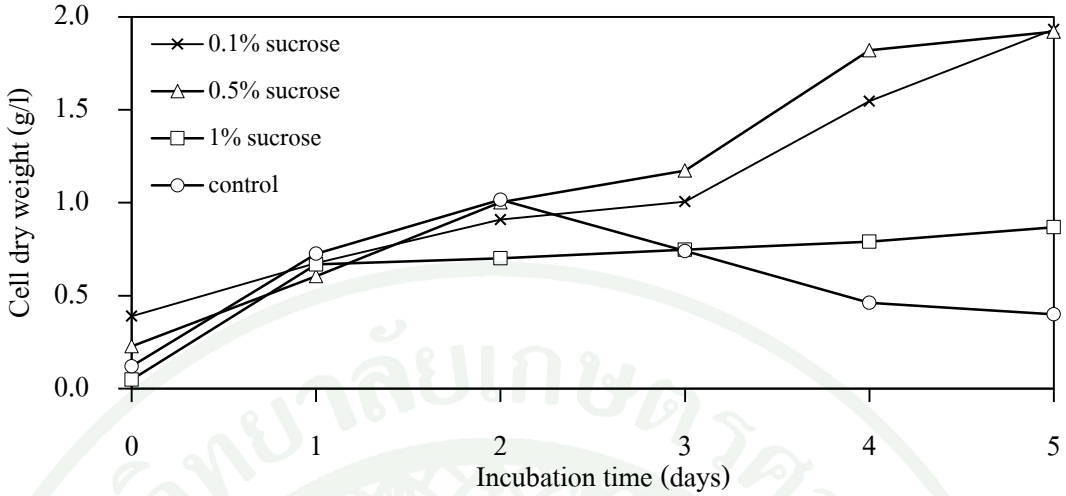


ภาพที่ 7 ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

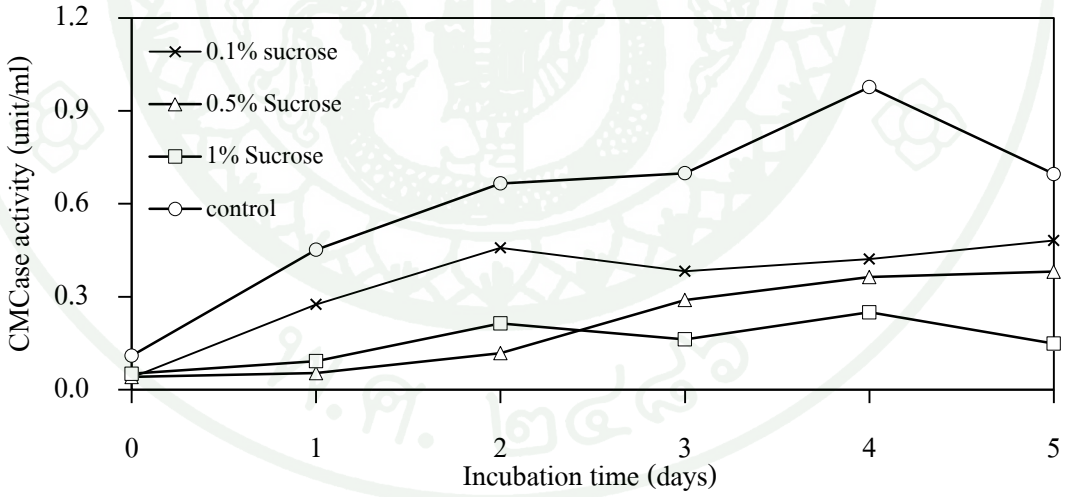


ภาพที่ 8 ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน



ภาพที่ 10 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่า ในสภาวะที่มีการเติม 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส มอลโตส และซูโครส ไม่กระตุ้นการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และซูโครสมีค่าต่ำกว่าในสภาวะควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 6, 8 และ 10

โดยในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีกิจกรรมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดที่ 0.549 และ 0.535 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และสภาวะที่เติมกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า มีกิจกรรมสูงสุด 0.570 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 6

สำหรับการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลมอลโตส 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แสดงผลในภาพที่ 8 โดย พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ในวันที่ 5 (0.571 หน่วยต่อมิลลิลิตร) วันที่ 3 (0.693 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (0.866 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

นอกจากนี้ ในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงที่ 0.482 และ 0.381 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสภาวะที่มีการเติมซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (0.151 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 10 ในขณะที่การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในสภาวะควบคุมซึ่งไม่มีการเติมน้ำตาล พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.977 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Basidiomycete* sp. ของ Shewale and Sadhana (1978) พบว่าแม้เชื้อราจะมีการเจริญเติบโตดี แต่เอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อใช้กลูโคส และมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปี 1982 Johnson *et al*. รายงานว่ากลูโคสสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย *Clostridium thermocellum* เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Fukumori *et al*. (1985) ที่พบว่าในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และซูโครสไม่ช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อ *Bacillus* ap. 1139

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาลมีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงดังผลการทดลองที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงวันที่ 0 - 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงพบว่าการเจริญอยู่ในระดับต่ำ เมื่อเซลล์ปรับตัวได้จะเกิดการเจริญขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยวันที่ 4 น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสามารถนำน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ด้วย แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญซึ่งแสดงผลในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในการเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลทั้งสามชนิด พบว่า มีความสอดคล้องกัน คือ เมื่อมีการเจริญของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น อัตราการผลิตเอนไซม์ก็จะสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากมีจำนวนเซลล์ที่มากขึ้น โอกาสที่จะผลิตเอนไซม์ก็จะมีมากขึ้นตามไปด้วย

3. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermobifida fusca* PA1-1 ในระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร

3.1 การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมัก

การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร (MD-250, Marubishi, Japan) ซึ่งบรรจุอาหารเหลว basal medium ที่เติม CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราการให้อากาศที่ 0.2, 0.5 และ 1.0 vvm ตามลำดับ และกำหนดอัตราการกวนให้คงที่ที่ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ และค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ดังผลการทดลองในภาพที่ 11, 12 และ 13

จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1 ที่อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm (ภาพที่ 11) มีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 42 จากนั้นการเจริญจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และลดลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 72 โดยพบการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 สำหรับการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

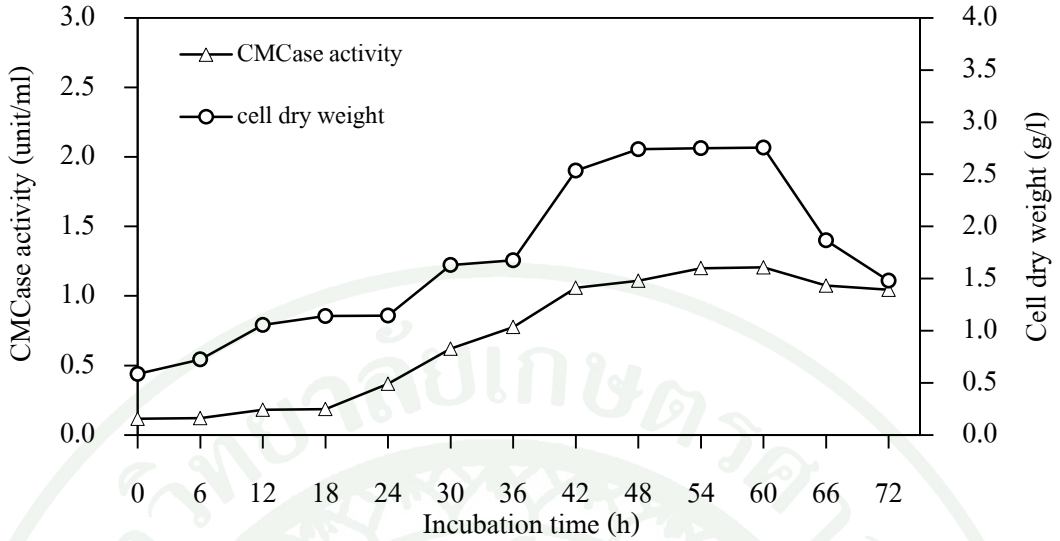
ต่อเนื่องหลังชั่วโมงที่ 18 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเท่ากับ 1.205 หน่วยต่อมิลลิลิตร

การเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1 ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm (ภาพที่ 12) พบว่า มีการเจริญเพิ่มขึ้นต่อเนื่อง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 36 จากนั้นมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและลดลงหลังชั่วโมงที่ 60 สำหรับการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสพบกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 1.9001 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

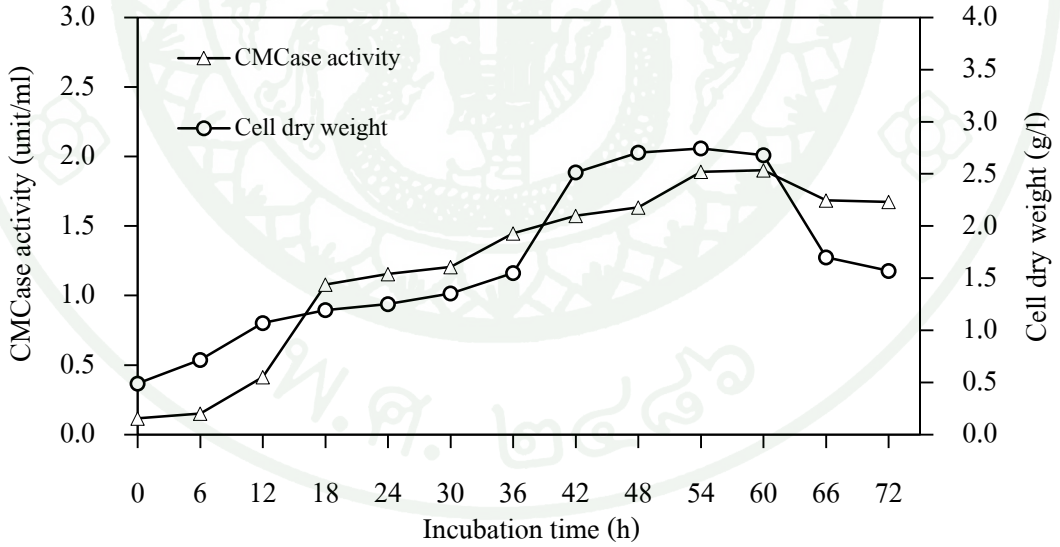
การเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (ภาพที่ 13) พบว่า มีการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นพบการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงสุดเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นค่อยๆลดลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่า เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังผ่านไป 12 ชั่วโมง โดยกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 2.027 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

จากการทดลองพบว่า แอคติโนมัยสีทที่ชอบอุณหภูมิสูง *T. fusca* PA1-1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร กำหนดอัตราการกวนให้คงที่ที่ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm มีการเจริญอย่างรวดเร็วโดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่า และมีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่มีอัตราการให้อากาศที่ 0.2 และ 0.5 vvm ทั้งนี้เนื่องจาก *T. fusca* PA1-1 เป็นแอคติโนมัยสีทที่ต้องการอากาศในการเจริญ การที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีส่งผลต่อการผลิตสารต่างๆรวมถึงเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ทำให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ ปริมาณอากาศที่ได้รับมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ การให้อากาศซึ่งควบคุมได้ในถังหมักนั้นมีผลโดยตรงต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการทดลองของ Deng and Fong (2010) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศมากขึ้น จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* ATCC BAA-629 เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาในระดับเซลล์พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ส่งผลให้ปริมาณ ATP ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ถึง 3 เท่า หมายความว่าปริมาณพลังงานที่เกิดจำนวนมากในเซลล์จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักนั้นมีผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีนซึ่งรวมทั้งเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

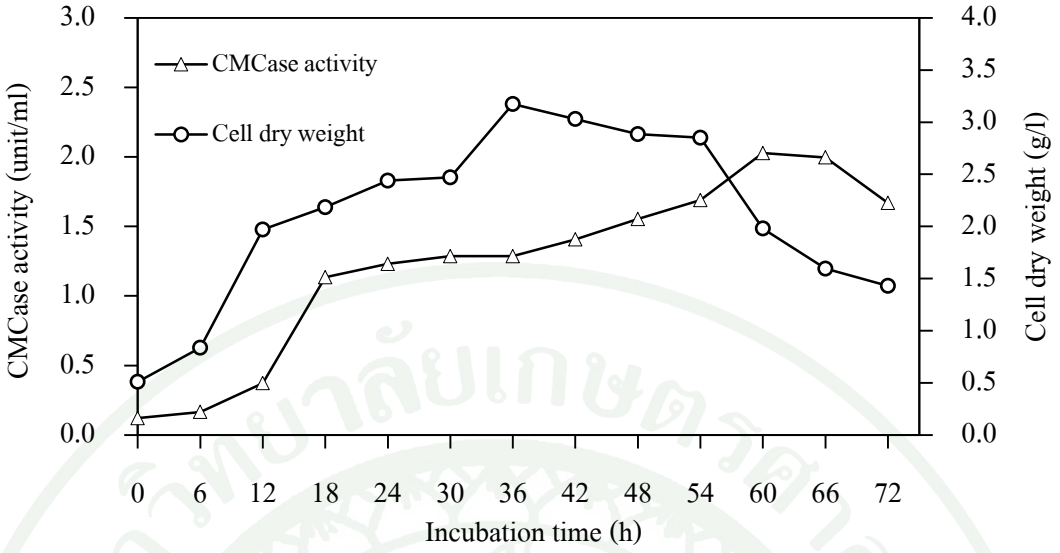


ภาพที่ 11 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm



ภาพที่ 12 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

3.2 การศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลู-เลส จาก *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมัก

ศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จาก *T. fusca* PA1-1 โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร (MD-250, Marubishi, Japan) ซึ่งบรรจุอาหารเหลว basal medium ที่เติม CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอัตราการกวนที่ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยกำหนดอัตราการให้อากาศที่ 1.0 vvm ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ และค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ดังผลการทดลองในภาพที่ 13, 14 และ 15

จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1 ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที (ภาพที่ 14) มีการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆและมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 42 จากนั้นการเจริญจะค่อยๆลดลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 30 หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 72 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเท่ากับ 1.548 หน่วยต่อมิลลิลิตร

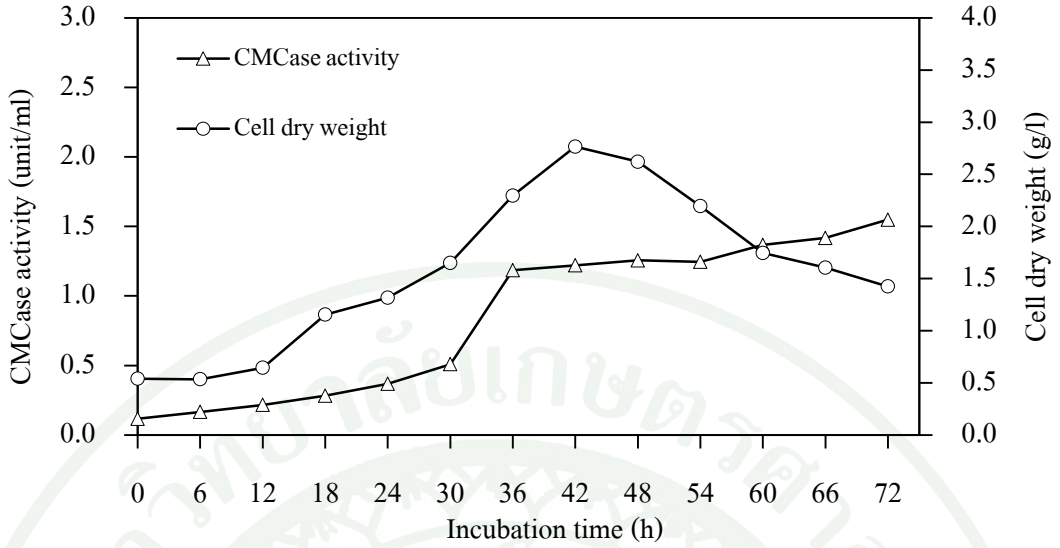
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (ภาพที่ 15) พบว่า มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นในชั่วโมงที่ 36 การเจริญลดลงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 54 พบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 30 และมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยพบกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 1.729 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 42 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆลดลงเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

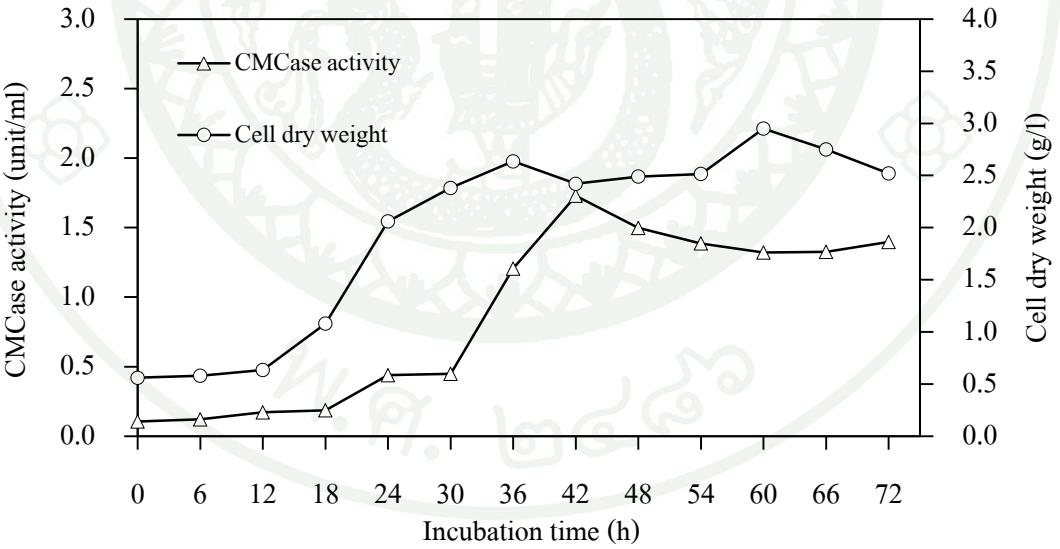
เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการกวนทั้ง 3 ระดับ พบว่า อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด (2.027 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ในระยะเวลาที่สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่มีอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และถึงแม้ว่าในการเพาะเลี้ยงที่กำหนดอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที จะให้กิจกรรมเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 การทดลองแต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าน้อยกว่า (1.729 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 42 ของการเพาะเลี้ยง)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *T. fusca* PA1-1 พบว่าเป็นแอคติโนมัยสีทที่มีการสร้างเส้นใย ในสภาวะการเลี้ยงที่มีการกวนในถังหมักแบบ stirred tank นั้น จะทำให้เกิดแรงเฉือน ซึ่งมีผลโดยตรงต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ รวมถึงส่งผลต่อโครงสร้างและความเสถียรของเอนไซม์ได้ (Gusek *et al.*, 1991; Deng and Fong, 2010) จากการศึกษาอิทธิพลของอัตราการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ของ Kao *et al.* (2007) พบว่าอัตราการกวนและการให้อากาศที่สูงเกินไปจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้เซลล์แตก และยังมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง โดยสารต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์อาจหลุดออกมาภายนอกเซลล์และละลายอยู่ในน้ำหมัก ทำให้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเกิดความแปรปรวน เช่น ค่าพีเอชลดลง อาจส่งผลทำให้การเจริญของเชื้อรวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดลง เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อัตราการกวน 100 rpm



ภาพที่ 15 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อัตราการกวน 300 rpm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีท *T. fusca* PA1-1 มีรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในการเพาะเลี้ยงระดับถังหมักเหมือนกับการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ โดยการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญ หรือ growth associated product formation คือ มีการเจริญควบคู่กันไปกับการผลิตเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ George *et al*. (2001) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora* sp. ในอาหาร basal medium โดยมี cellulose paper powder (CPP) 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์เป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญ โดย George *et al*.ได้ทำการวัดการเจริญทางอ้อมจากโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ พบว่า โปรตีนมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 และพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดในชั่วโมงเดียวกันเท่ากับ 23 หน่วยต่อมิลลิลิตร

4. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสหยาบ (crude enzyme) จาก *Thermobifida fusca* PA1-1

4.1 การทำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ให้เข้มข้นด้วยวิธีการ ultrafiltration

ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีท *T. fusca* PA1-1 ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำให้เข้มข้นผ่านเครื่อง ultrafiltraion ที่ความดัน 50 psi โดยใช้แผ่นกรองเซลลูโลสขนาด 1,000 ดาลตัน

ผลการทำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสให้เข้มข้นแสดงดังตารางที่ 4 เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า ด้วยวิธี ultrafiltraion พบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.25 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดคงเหลือ 73.79 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ผลการทำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ขั้นตอนการทำเอนไซม์เข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (เท่า)	ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)	ผลผลิต (เปอร์เซนต์)
Culture filtrate	150	19.57	460.90	23.55	1	1	100
Ultrafiltration	30	12.91	340.09	29.34	5.59	1.25	73.79

หมายเหตุ กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ หมายถึง กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)/ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)

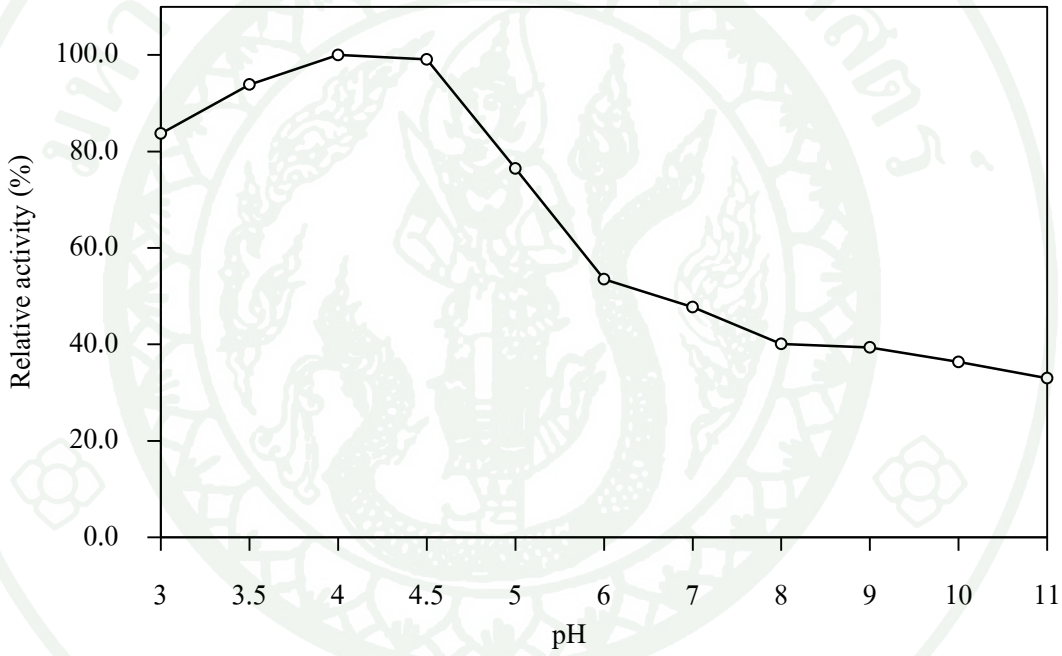
ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ หมายถึง กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)/กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

เปอร์เซ็นต์ผลผลิต หมายถึง กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)/กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดจาก culture filtrate (หน่วย)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

การศึกษาช่วงของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยศึกษาในช่วงพีเอชระหว่าง 3.0 - 11.0 พบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ช่วงพีเอช 4.0 โดยเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสามารถทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอช 3.0 – 5.0 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่มีความเป็นกรดและความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงในช่วงพีเอชที่มีความเป็นกลางถึงด่าง

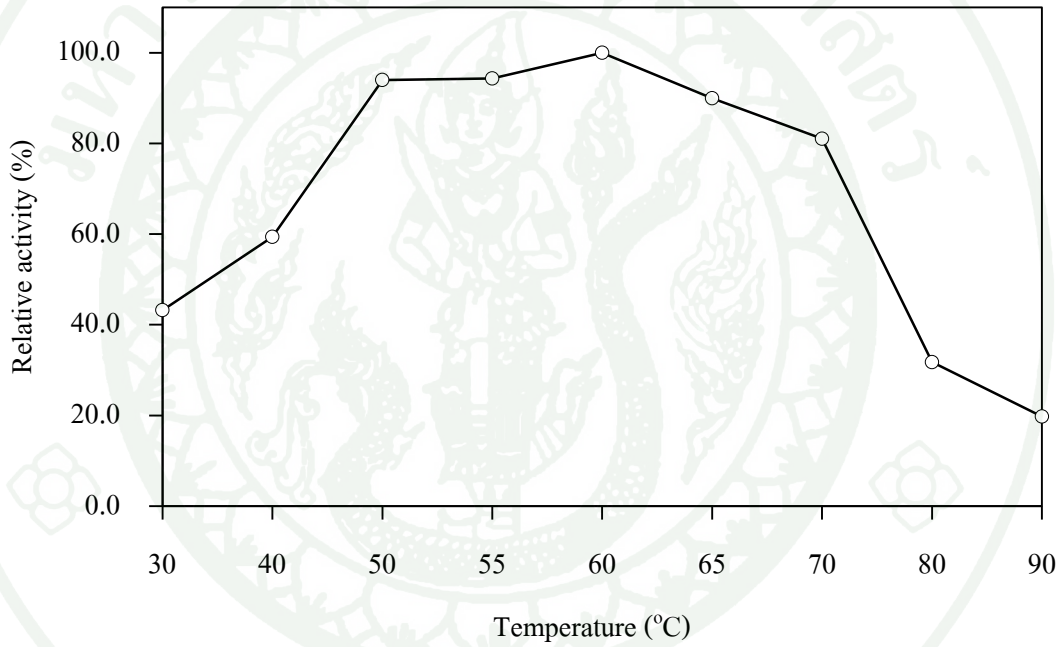


ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ศึกษาในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 - 90 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 4 พบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลู-เลสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 17 และพบว่าสามารถทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 50 – 70 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเกิน 70 องศาเซลเซียสความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลง

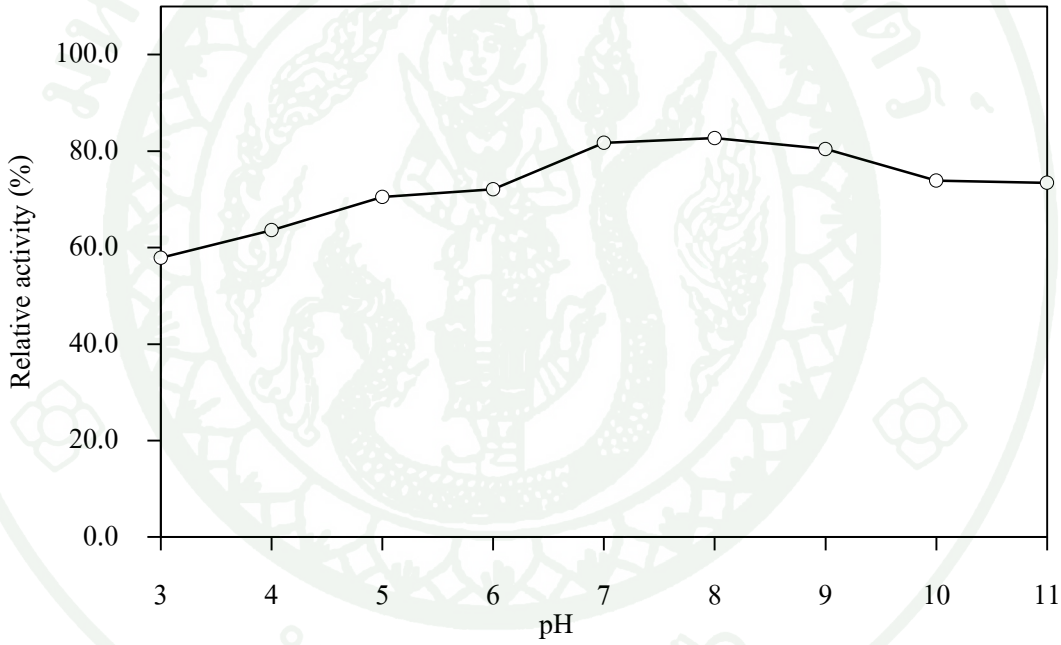


ภาพที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ช่วงพีเอชต่างๆ

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ค่าพีเอชต่างๆ โดยทำการศึกษาในช่วงพีเอชระหว่าง 3.0 – 11.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้างตั้งแต่ 5.0 – 11.0 โดยสามารถทำงานได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และพบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 8.0 และในช่วงพีเอช 7.0 – 9.0 เอนไซม์ มีกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือมากกว่า 78 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 18

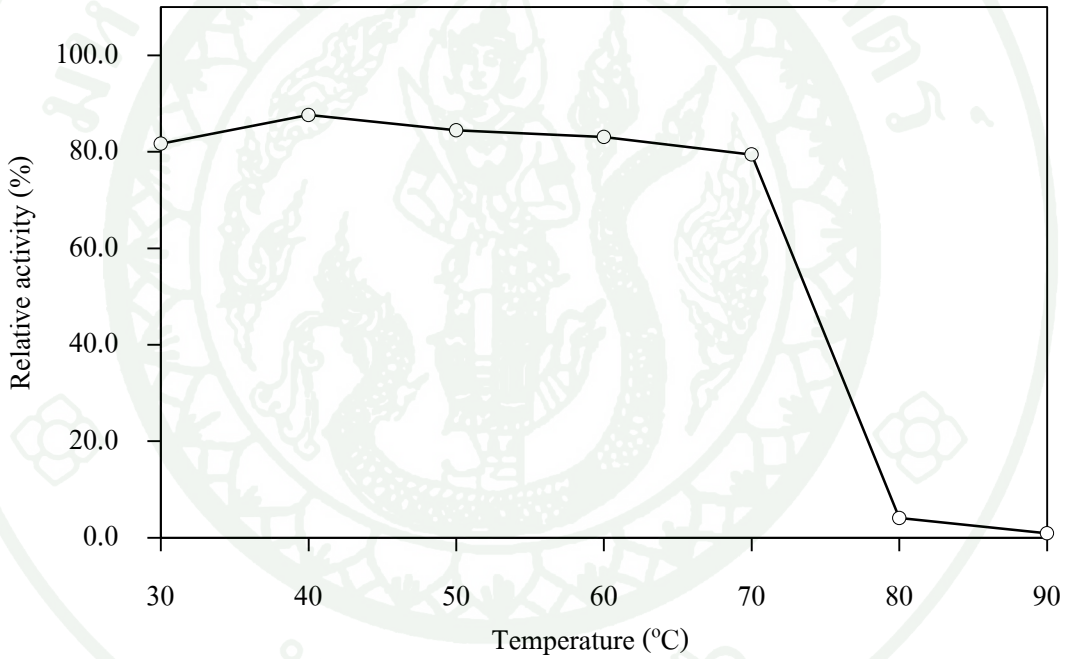


ภาพที่ 18 ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่พีเอชต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิต่างๆ โดยบ่มเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 30 - 90 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่เหลืออยู่ พบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความเสถียรมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นในช่วงอุณหภูมิ 30 – 70 องศาเซลเซียส โดยมีความเสถียรสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ช่วงอุณภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรอยู่ในระดับต่ำ ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ทำงานได้ดีที่พีเอชในช่วงเป็นกรดและมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ค่อนข้างสูง มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 - 70 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง ตั้งแต่ 5.0 – 11.0 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Okeke and Paterson (1992), Alani *et al*. (2008) และ Saratale *et al*. (2012) โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Thermomonospora curvata* โดย Stutzenberger (1972) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน มีอุณหภูมิที่เหมาะกับการทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส และทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอช 6.0 – 6.5 และจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora* sp. ภายหลังการทำบริสุทธิ์ ของ George *et al*. (2001) พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอชช่วงกรดอ่อน (4.0 - 5.0) และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลือมากกว่า 60% หลังบ่มนาน 72 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 7 ชั่วโมง เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้างตั้งแต่ 6.0 – 10.0

นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก *Thermomonospora* sp. T-EG มีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง ตั้ง 4.0 - 10.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอช 8.0 (Anish *et al*., 2006) และจากการศึกษาของ Hagerdal *et al*. (1980) พบว่า เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก *Thermomonospora* sp. ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0

ในขณะที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่สร้างจาก *Streptomyces drozdowizii* ทำงานได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 5.0 และมีความเสถียรในพีเอชช่วงกว้าง โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงพีเอช 3.0 - 10.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงที่เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Lima *et al*., 2005)

และจากรายงานของ Okoshi *et al.* (1990) ที่ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. KSM-522 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส EI, EII และ EII ได้ โดยพบว่า เอนไซม์เซลลูเลส EI มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ EII และ EIII มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการศึกษาของ Singh *et al*. (2004) ที่พบว่า *Bacillus sphaericus* JS1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 – 70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ นฤมล (2544) พบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่สร้างจาก *Bacillus subtilis* CMU4-44 และ *Bacillus coagulans* TI-5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตามเอนไซม์โดยทั่วไปจะมีความสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชและอุณหภูมิช่วงหนึ่ง สภาวะที่มีพีเอชหรืออุณหภูมิที่ต่างกันย่อมส่งผลให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกัน พีเอชที่ช่วง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่างๆ จะส่งผลให้เอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา โดยเฉพาะในตำแหน่งกัมมันต์ (active site) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จะมีรูปร่างเฉพาะ หากเกิดการเปลี่ยนแปลงจะทำให้จับกับโมเลกุลของสับสเตรทได้อย่างไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุให้เกิดการลดลงของอัตราการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้พีเอชในบางช่วงจะส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพไปโดยโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนถูกทำลาย เป็นผลให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวร นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำล้วนมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพหรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา อย่างไรก็ตาม เอนไซม์แต่ละชนิดย่อมมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานต่างกัน

ด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สร้างจาก *T. fusca* PA1-1 ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูง และมีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง จึงเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตจากราซึ่งมีความเสถียรในช่วงพีเอชแคบกว่า (Wilson, 2004; Lykidis *et al*., 2007) อย่างไรก็ตามเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ผลิตได้จาก *T. fusaca* PA1-1 ยังมีกิจกรรมอยู่ในระดับต่ำ หากมีการพัฒนาปรับปรุงให้สามารถผลิตเอนไซม์ให้มีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นได้ จะเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่น่าสนใจอีกแหล่งที่สามารถนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้จริง

4.6 การศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

จากการศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ดังตารางที่ 5 พบว่า KCl ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ $MnSO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 100.46, 115.82 และ 138.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุมที่ไม่มีการเติมอิออนโลหะลงไป สำหรับ $CaCl_2$, $FeSO_4$ และ $MgSO_4$ ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ และ KCl ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ แสดงผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เพียงเล็กน้อย โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 93.55, 92.01, 91.09, 98.93, 95.08, 95.24 และ 96.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Thomas and Zeikus (1981) พบว่าอิออนโลหะ Ca^{2+}และ Mg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* QM9414 และ Lee *et al*. (2008) พบว่า Mn^{2+} และ K^{+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Annamalai *et al.* (2012) พบว่า ในสภาวะที่มี $MnSO_4$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และ 5 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* AU01 ในขณะที่ในสภาวะที่มี $FeSO_4$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ จะให้ผลตรงกันข้าม และจากรายงานของ Saratale *et al*. (2012) พบว่าในสภาวะที่มีอิออนโลหะ Mg^{2+} จะยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. MDS

ตารางที่ 5 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

Metalic ion	Concentration (mM)	Relative activity (เปอร์เซ็นต์)
Control	-	100.0
$CaCl_2$	1	93.55
	5	92.01
KCl	1	100.46
	5	96.77
$FeSO_4$	1	91.09
	5	98.93
$MgSO_4$	1	95.08
	5	95.24
$MnSO_4$	1	115.82
	5	138.10

อิออนของโลหะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิดโดยอาจไปส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปของ โคแฟคเตอร์ ซึ่งช่วยให้เอนไซม์สามารถไปจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น หรือช่วยให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่เหมาะสมแก่การเร่งปฏิกิริยา แต่อิออนของโลหะบางชนิดจะมีผลไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้น้อยลงหรือได้ช้าลง หรืออาจมีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเตรท (enzyme-subtrate complex) ไปเป็นผลผลิต ซึ่งความสามารถในการส่งเสริมหรือยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์แต่ละชนิดด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.7 การศึกษาสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

จากการศึกษาสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส *T. fusca* PA1-1 แสดงดังตารางที่ 6 โดยพบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 87.59 และ 82.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สอดคล้องกับรายงานของ Lee *et al*. (2008) พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 ในขณะที่ Okolo *et al*. (1998) ได้ศึกษาเอนไซม์ 2 ชนิด คือ CMCase I และ II จากเชื้อ *Paecilomyces* sp. พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ในสภาวะที่มี EDTA 50 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้ทราบว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอิออนโลหะบางชนิดร่วมอยู่ด้วย ดังนั้น เมื่อมีการเติม chelating agent (EDTA) ลงไปและอิออนโลหะถูกกำจัดไปแล้ว จึงส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดต่ำลง

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

Metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (เปอร์เซ็นต์)
Control	-	100.0
EDTA	1	87.59
	5	82.39

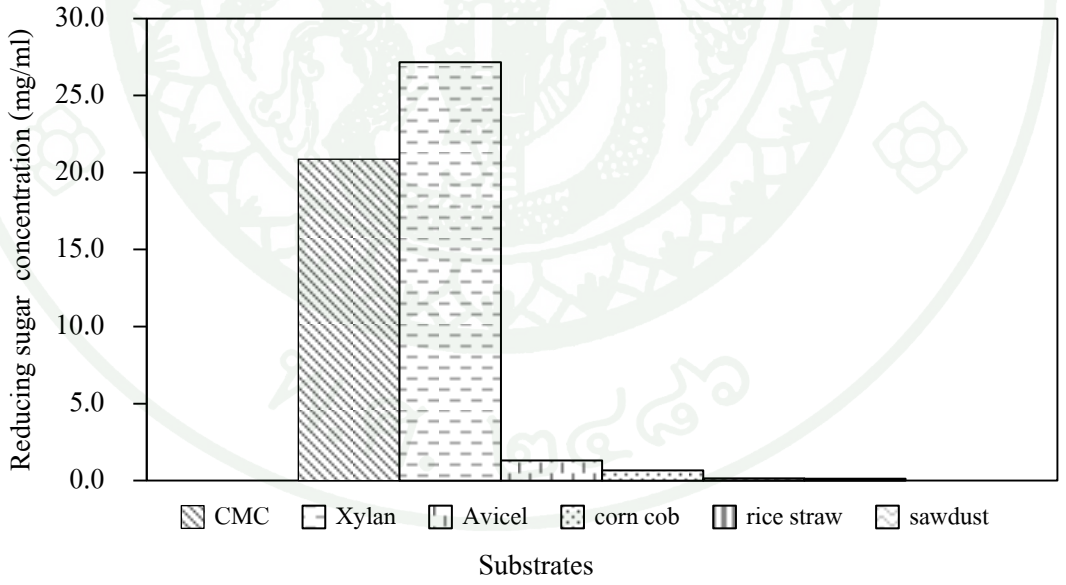
4.8 การศึกษาการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธีการ ultrafiltration โดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรทชนิดต่าง ๆ (CMC, avicel, xylan, ฟางข้าว ซังข้าวโพด และขี้เลื่อย) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์บ่มกับสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1 สามารถย่อยสลาย xylan เกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุดที่ 27.166 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อมิลลิลิตร รองมา คือ CMC และ avicel โดยพบการย่อยสลายได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณ 20.879 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.302 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อทดสอบการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ไม่ผ่านกระบวนการทางเคมี เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด และขี้เลื่อย ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *T. fusca* PA1-1 พบว่าสามารถย่อยสลายได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในระดับต่ำ ดังภาพที่ 20

เมื่อเปรียบเทียบชนิดสับสเตรทระหว่างเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสบริสุทธิ์ ได้แก่ CMC, avicel และ xylan กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ไม่ผ่านกระบวนการทางเคมี เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด และขี้เลื่อย พบว่า สับสเตรททั้ง 2 ชนิดมีอัตราส่วนขององค์ประกอบภายในแตกต่างกัน โดยวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน คิดเป็นอัตราส่วน 4:3:2 โดยประมาณ (Tangnu, 1981) ดังนั้น เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *T. fusca* PA1-1 จึงสามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสบริสุทธิ์ได้ดีกว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เนื่องจากไม่มีลิกนินขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสเข้าสลายพันธะ β-1,4 glycosidic ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในเซลลูโลสได้โดยตรง



ภาพที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1 โดยใช้สับสเตรทเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

แอคติโนมัยสีท *Thermobifida fusca* PA1-1 ที่แยกได้จากกองปุ๋ยหมักทลายปาล์ม สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหาร basal medium พีเอช 8.0 ที่มี คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

T. fusca PA1-1สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน โดยสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.977 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาล กลูโคส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า น้ำตาลไม่กระตุ้นการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมน้ำตาล

จากการเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA1-1 ในระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อกำหนดอัตราการกวนให้คงที่ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm มีการเจริญอย่างรวดเร็วโดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่า และมีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศที่ 0.2 และ 0.5 vvm นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ให้กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 2.027 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลาที่สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่มีอัตราการกวน 100 และ 300 รอบต่อนาที และมีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0 – 11.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 - 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นด้วย KCl ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ $MnSO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 5 มิลลิโมลาร์ และถูกยับยั้งเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MgSO_4$ และ EDTA ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ และ KCl ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

และจากการทดสอบการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1 นอกจากจะย่อยสลายสารในกลุ่มเซลลูโลส เช่น CMC และ avicel ซึ่งเป็น microcrystalline cellulose เกิดผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์แล้ว ยังมีความสามารถในการย่อย xylan ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเฮมิเซลลูโลสได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. หากต้องการนำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสไปใช้ประโยชน์จริงในระดับอุตสาหกรรม อาจต้องปรับปรุงสภาวะในการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูง โดยใช้สารเหนี่ยวนำหรืออิออนโลหะเป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์

2. จากการทดสอบการย่อยสลายสับสเตรตต่างๆด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Thermobifida fusca* PA1-1 เห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถย่อยสลายไซแลนได้ดี ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์นี้ เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นฤมล นะธรรมโม. 2544. **สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทนร้อน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รุจิกาญจน์ นาสนิท. 2546. **การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและยีนที่เกี่ยวข้องจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วาทินี คุณเผือก. 2554. **การคัดแยก ศึกษาสมบัติ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภลักษณ์ สุดขาว. 2543. **การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ endoglucanase และสภาวะในการสร้างเอนไซม์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรรัตน์ บุญมาศิริ. 2547. **การทำเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากเชื้อรา *Pseudeurotium* sp. HTN 14/1 ให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ahsan, M., M. Matsumoto, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka and K. Ohmiya. 1997. Purification and characterization of the family J catalytic domain derived from the *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelJ. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 61(3): 427-431.

Akila, G. and T.S. Chandra. 2003. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase. **FEMS Microbiol. Lett**. 219: 63-67.

Alani, F.A., A. William, A. Anderson and M.Y. Murray. 2008. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. **Biotechnol. Lett**. 30: 123-126.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Anish, R., M.S. Raman and M. Rao. 2006. Application of cellulases from alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. In biopolishing of denims. **Biotechnol. Bioeng**. 96: 48-56.

Annamalai, N., M.V. Rajeswari, S. Elayaraja, R. Thavasi, S. Vijayalakshmi and T. Balasubramanian. 2012. Purification and characterization of thermostable alkaline cellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01 by utilizing cellulosic wastes. **Waste and Biomass Valorization**. 3: 305-310.

Apiraksakorn, J. 2006. Characterization of β-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* GN156 for Silage Fermentation. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

Arnold, L.D. 2000. Microbial biotechnology. **Trends Biotechnol**. 18: 26-31.

Ayyad, K., A. EI-Makhazangy and H. Siliha. 1991. Application of polysaccharide enzymes in sugar cane bagasse. **Carbohydr. Polym**. 15: 309-315.

Baker, R.A. and J.H. Bruemmer. 1989. Quality and stability of enzymitically peeled and sectioned citrus, pp. 140-148. *In* S. Nagy and J.A. Attaway, eds. **Citrus Nutrition and Quality**. American chemical society, Washington DC.

_____. and L. Wicker. 1996. Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. **Trends Food Sci. Technol**. 7: 279-284.

Beauchemin, K.A., L.M. Rodes and V.J.H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of streers fed dry forages. **Can. J. Anim. Sci**. 75: 641-644.

Bedford, M.R. and H.L. Classen. 1992. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chicks, pp 361-370. *In* J. Visser, G. Kusters-van Someren MA and A.G.I. Voragen, eds. **Xylan and Xylanases, Progress in Biotechnology, Vol.7**. Elseveir, Amsterdam.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bhat, M.K. and Bhat, S. 1997**.** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications**. Biotechnol. Adv**. 15(3-4): 583-620.

_____**.** 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv**. 18: 355-383.

Bok, J. D., D.A. Yernool and D.E. Eveleigh. 1998. Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. **Appl. Environ. Microbiol**. 64(12): 4774-4781.

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.

Caldini, C., F. Bonomi, P.G. Pifferi, G. Lanzarini and Y.M. Galante. 1994. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidase for aroma enhancement in wine**. Enzyme Microb. Technol**. 16: 286-291.

Canales, A.M., R. Garza, J.A. Sierra and R. Arnold. 1998. The application of β-glucanase with additional side activities in brewing. **MBAA TQ**. 25: 27-31.

Chen, P.J., T.C.Wei, Y.T. Chang and L.P. Lin. 2004. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. **Bot. Bull. Acad. Sin**. 45: 111-118.

Creuzet, N. and C. Frixon. 1983. Purification and characterization of an endoglucanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium. **Biochimie**. 65: 149-156.

Crocco, S. 1976. New way to modify flavor. **J. Food Eng**. 1(9): 9-10.

Deng, Y. and S. S. Fong. 2010**.** Influence of culture aeration on the cellulase activity of *Thermobifida fusca*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 85: 965-974.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Enari, T. 1983. Microbial cellulases. pp.183-223. *In* W.M., Fogarty, ed. **Microbial Enzymes and Biotechnology.** Applied Science Publishers, London.

Endo, K., Y. Hakamada, S. Takizawa, H. Kubota, N. Sumitomo, T. Kobayashi and S. Ito. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 57: 109-116.

Eriksson, K.E., R.A. Blanchette and P. Ander. 1990**. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. Springer-Verag Berlin Heidelberg, Germany.

Fan, L.T. and Y.H. Lee. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model. **Biotechnol. Bioeng**. 25: 2707-2733.

Franz, G. and W. Blaschek. 1990. Cellulose, pp. 291-322. *In* P.M. Dey and J.B. Harborne, eds. **Method in Biochemistry: V.2 Carbohydrate**. Academic Press, London.

Fuglsang, C.C., C. Johansen, S. Christgau and J. Adler-Nissen. 1995. Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. **Trends Food Sci. Technol**. 6: 390-396.

Fukumori, F., T. Kudo and K. Horikoshi. 1985. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139. **J. Gen. Microbiol**. 131: 3339-3345.

Galante, Y.M., A.D. Conti and R. Monteverdi. 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in textile industry, pp 327-342. *In* G.F. Harman and C.P. Kubicek, eds. ***Trichoderma* & *Gliocladium*-Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Vol2**. Taylor & Francis, London.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Genencor. 2014. **Genecor product info sheet**. Available source: http://www.genencor.com/fileadmin/user_upload/genencor/documents/ACCELLERASE_R__BG_0020209.pdf, April 1, 2014.

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

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

Hagerdal, B., J.D. Ferchak and E.K. Pye. 1980. Saccharification of cellulose by the cellulolytic enzyme system of *Thermomonospora* sp. I. Stability of cellulolytic activities with respect of time, temperature and pH. **Biotechnol. Bioeng**. 22: 1515–1526.

Hakamada, Y., K. Endo., S. Takizawa., T. Kobayashi., T. Shirai., T. Yamane and S. Ito. 2002. Enzymatic properties, crystallization and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. **Biochim. Biophy. Acta**. 1570: 174-180.

Herbert, S. 2006. **Handbook of Pulp**. Wiley-Vch, Austria.

Irwin, D.C., M. Spezio, L.P. Walker and D.B. Wilson**.** 1993. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain effects. **Biotechnol. Bioeng**. 42**:** 1002–1013.

Iwashita, K., K. Todoroki, H. Kimura, H. Shimoi and K. Ito. 1998. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound beta-glucosidases from *Aspergillus kawachii.* **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62(10): 1938-1946.

Johnson, E.A., E.T. Reese and A.L. Demain. 1982. Inhibition of *Clostridium thermocellum* cellulase by end product of cellulolysis. **J. Appl. Biochem.** 4: 64-71.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Kim C.H. and D.S. Kim. 1995. Purification and specificity of a specific endo-β-1,4-glucanase (Avicelase II) resembling ex-cellobiohydrolase from *Bacillus circulans*. **Enzyme Microb. Technol.** 17: 248-254.

Kirk, T.K. 1983. Degradation and conversion of lignocelluloses, pp. 226-295. *In* J.E. Smith, D.R. Berry and B. Kristiansen, eds. **The Filamentous Fungi. Fungal Technology.** John Wiley & Sons Inc., New York.

Kuhad, R.C. and A. Singh. 2007. **Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects**. I.K. International publishing House, New Delhi.

Lee, Y.J., B.K. Kim, B.H. Lee, K.I. Jo, N.K. Lee, C.H. Chung, Y.C. Lee and J.W. Lee. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresour. Technol**. 99: 378-386.

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. Technol**. 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, W.H. Zyl and I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamental and Biotechnology**. Microbiol. Mol. Biol. Rev**. 66(3): 506-577.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mackenzie, C.R., D. Bilous and K.G. Johnson. 1984. *Streptomyces flavogriseus* cellulase: Evaluation under various hydrolysis conditions. **Biotechnol. Bioeng.** 25: 590-594.

Mandels, M. 1985. Applications of cellulases. **Biochem. Soc. Trans**. 13: 414-416.

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

Nakamura, K. and K. Kitamura. 1982. Isolation and identification of crystalline cellulose hydrolyzing bacterium and enzymatic properties. **J. Ferment. Technol**. 60: 343-348.

Novozymes. 2003. **Hydrolysis of biomass - Hemicellulases**. Available source: http://www.bioenergy.novozymes.com/Documents/Hyd_PR_Hemicellulases.pdf , April 1, 2014.

_____. 2010. **Novozymes Viscozyme® wheat HT**. Available source: http://www.novozymes.com/en/solutions/bioenergy/starch-based-ethanol/viscosity-reduction/Viscozyme/Pages/default.aspx, April 1, 2014.

_____. 2012. **Celluclast®**. Product data sheets. Available source: http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/PDS Celluclast 1.5L 09-07-2012.pdf, April 1, 2014.

Okeke, B.C. and A. Paterson. 1992. Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in a *Streptomyces* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 8(5): 483-487.

Okolo, J.C., S.K.C. Obi and F.J.C. Odibo. 1998. Purification and characterization of two distinct carboxymethylcellulases of *Paecilomyces* sp. **Bioresour. Technol**. 66: 231-234.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Okoshi, H., K. Ozaki, S. Shikata, K. Oshino, S. Kawai and S. Ito. 1990. Purificaion and characterization of multiple carboxymethylcellulase from *Bacillus* sp. KSM-522. **Agric. Biol. Chem.** 54(1): 83-89.

Onderci, M., N. Sahin, G. Cikim, A. Aydin, I. Ozercan, E. Ozkose, S. Ekinci, A. Hayirli and K. Sahin. 2008. β-Glucanase-producing bacterial culture improves performance and nutrient utilization and alters gut morphology of broilers fed a barley-based diet. **Anim. Feed Sci. Technol.** 146(1): 87-97.

Ozaki,K., Y.Hayashi , N. Sumitomo, S. Kawai and S. Ito. 1995. Construction, purification, and properties of a truncated alkaline endoglucanase from *Bacillus* sp. KSM-635. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 59: 1613-1618.

Pajunen, E. 1986. Optimal use of β-glucanase in worth production, pp. 137-148. *In* EBC-Symposium on Worth Production. **Monograph XI**. Maffliers, France.

Ramachandra, M., D.L., Craeford and G. Hertel. 1988. Characterisation of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 3057-3063.

Reese, E.T. 1975. Summary statement on the enzyme system. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5: 77-80.

_____. 1976. History of the cellulase program at the U.S. army natick development center. **Biotechnol. Bioeng. Symp**. 6: 9-20.

Salah, A., S. Ibrahim and A.I. El-diwany. 2007. Products, isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. **Aust. J. Basic. Appl. Sci**. 1(4): 473-478.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sandgren M., J. Stahlberg and C. Mitchinson. 2005. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Prog. Biophys. Mol. Biol**. 89:246-291.

Saratale G.D., R.G. Saratale and S.E. Oh. 2012. Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. MDS. **Biomass Bioenergy**. 47. 302-315.

Sharmili J. and M. Rao. 2005. Purification and properties of a low molecular weight 1,4-β-glucan glucohydrolase having one active site for carboxymethyl cellulose and xylan from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp**. Biochem. Biophys. Res. Commun**. 329: 111–116.

Shewal, J.G. and J.C. Sadhana. 1978. Cellulase and β-glucosidase production by *Basidiomycete* sp. **Can. J. Microbiol**. 24: 1204-1216.

Sigma-Aldrich. 2014. **β-glucanase from *Bacillus subtilis***. Available source: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma, April 1, 2014.

Singh, J., N. Batra and R.C. Sobti. 2004. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31: 51–56.

Singh, V.K. and A. Kumar. 1998. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* VS-1. **Biochem. Mol. Biol. Int**. 45(3): 443-452.

Singhania, R.R., R.K. Sukumarana, A.K.Patelb, C. Larrocheb, A.P. Singhania and R. Rani. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technology using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulase. **Enzyme Microb. Technol.** 46: 541-549.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Stewart, B.J and J.M. Leatherwood. 1976. Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. **J. Bacteriol.** 128(2): 609-615.

Stutzenberger F.J. 1972. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*: Optimal assay conditions, partial purification and product of the cellulase. **Appl. Microbiol**. 24(1): 83-90.

Tangnu, S.K., H.W. Blanch, and C.R. Wilke. 1981. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and ß-glucosidase by *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. Bioeng**. 23: 1837-1849.

Tengerdy, R.P. and G. Szakacs. 2003. Bioconversion of lignocelluloses in solid substrate fermentation. **Biochem. Eng. J**. 13: 169-179.

Thomas, K.N. and J.G. Zeikus. 1981. Comparison of extracellular cellulase activity of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414. **Appl. Environ. Microbiol**. 42(2): 231-240.

Uhlig, H. 1998. **Industrial Enzymes and Their Applications**. John Wiley & Sons Inc, New York.

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

_____. 2009. Cellulases and biofuels. **Curr. Opin. Biotechnol**. 20: 295–299.

Wood, T.M. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. **Biochem. Soc. Trans.** 13: 407-410.

_____. 1992. Fungal cellulases. **Biochem. Soc. Trans**. 20: 46–53.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yan, T.R. and C.L. Lin. 1997. Purification and characterization of a glucose-tolerant β-glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 61(6): 965-970.

Yoon, M.H. and W.Y. Choi. 2007. Characterization and action patterns of two β-1,4-glucanases purified from *Cellulomonas uda* CS1-1. **J. Microbiol. Biotechnol**. 17(8): 1291-1299.

Zhang, S., G. Lao and D.B. Wilson. 1995. Characterization of a *Thermomonospora fusca* exocellu1ase. **Biochemistry.** 34: 3386-3395.

_____, D.C. Irwin and D.B. Wilson. 2000. Site-directed mutation of noncatalytic residues of *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. **Eur. J. Biochem**. 267: 3101-3115.

Zhang Y.H.P., M.E. Himmel and J.R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnol. Adv**. 24: 452-481.

Zhou, W., D.C. Irwin, J. Escovar-Kousen and D.B. Wilson. 2004. Kinetic studies of *Thermobifida fusca* Cel9A active site mutant enzymes. **Biochemistry**. 43: 9655-9663.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายบัฟเฟอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Basal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988)

Carboxymethylcellulose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
$(NH_4)_2 SO_4$	0.1	กรัม
NaCl	0.3	กรัม
$MgSO_4. 7H_2O$	0.1	กรัม
$CaCO_3$	0.02	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
$MnSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.9	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. สารละลายบัฟเฟอร์

2.1 สารละลาย Sodium Citrate-HCl บัฟเฟอร์

สารละลาย A : สารละลาย Sodium Citrate เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง citric acid 10.507 กรัม และ NaOH 2 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B : สารละลาย HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

2.2 สารลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลาย A : สารละลาย Na_2HPO_4 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง Na_2HPO_4 13.403 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B : สารละลาย KH_2PO_4 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง KH_2PO_4 6.80459 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

2.3 สารลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์

สารละลาย A : สารละลาย Glycine เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง Glycine 3.7535 กรัม และ NaCl 2.922 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B : สารละลาย NaOH เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง NaOH 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Miller (1959)

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงระหว่างช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร

1.1.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารละลายไดไนโตรซาลิซิลิคเอซิด (Dinitrosalicylic acid หรือ DNS) ชั่ง 3,5-dinitrosalicylic acid 10 กรัม K-Na-Tartrate 200 กรัม ละลายในสารละลาย NaOH 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1.3.1 ผสมสารละลายสับสเตรท ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน พร้อมวางลูกแก้วปิดปากหลอด และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.3.2 จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 5 นาที พร้อมวางลูกแก้วปิดปากหลอด หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3.2 วัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเทียบหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3.3 เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แทนสายละลายสับสเตรท และสารละลายเอนไซม์ ทดลองเหมือนตัวอย่างข้างต้น

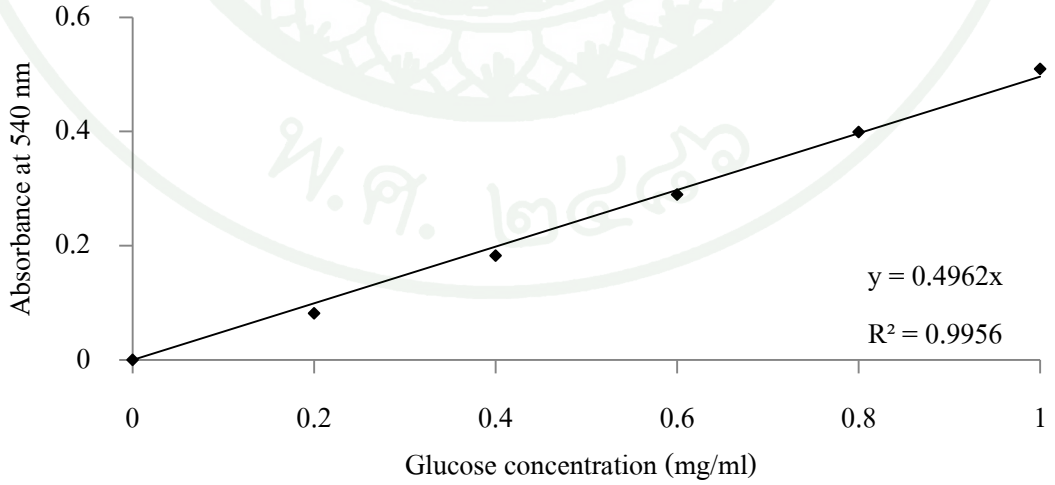
กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (unit/ml) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

1.4 การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1.4.1 เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายกลูโคสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

1.4.2 นำไปต้มน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.4.3 นำสารละลายมาตรฐานไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 เครื่องอบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

2.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

2.3 โถดูดความชื้น (desicator)

2.2 วิธีการหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.2.1 นำน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใส (supernatant) เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

2.2.2 เติมน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ เหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อีกครั้ง เท ส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้ใส่ลงบนแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแห้งแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

2.2.3 นำแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์มาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desicator) ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์และเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์(กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบจากการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time	Cell dry weight (g/l)		
(days)	40 °C	45 °C	50 °C
0	0.05±0.00	0.055±0.00	0.120±0.00
1	0.574±.37	0.231±0.22	0.726±0.02
2	0.663±.07	0.245±0.35	1.016±0.01
3	0.976±.00	1.068±0.06	0.740±0.01
4	0.936±0.02	0.593±0.84	0.462±0.00
5	0.643±0.16	0.805±0.04	0.400±0.00

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)		
(days)	40 °C	45 °C	50 °C
0	0.009±0.02	0.028±0.02	0.110±0.06
1	0.021±0.01	0.091±0.02	0.452±0.05
2	0.0535±0.00	0.177±0.01	0.666±0.17
3	0.1034±0.01	0.272±0.08	0.699±0.08
4	0.1705±0.04	0.392±0.05	0.977±0.19
5	0.2193±0.02	0.510±0.09	0.696±0.17

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time (days)	Cell dry weight (g/l)			
	Concentration of glucose (% w/v)			
	0	0.1	0.5	1
0	0.120±0.00	0.212±0.00	0.292±0.03	0.212±0.00
1	0.726±0.02	0.726±0.00	0.495±0.07	0.197±0.02
2	1.016±0.01	1.016±0.00	0.501±0.15	0.345±0.01
3	0.740±0.01	0.740±0.00	0.746±0.25	0.321±0.24
4	0.462±0.00	0.462±0.00	1.212±0.03	0.443±0.17
5	0.400±0.00	0.466±0.00	1.054±0.02	0.506±0.13

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค4 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมกลูโคส ความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time (days)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)			
	Concentration of glucose (% w/v)			
	0	0.1	0.5	1
0	0.110±0.06	0.022±0.01	0.019±0.12	0.220±0.13
1	0.452±0.05	0.244±0.03	0.069±0.04	0.367±0.02
2	0.666±0.17	0.505±0.05	0.133±0.14	0.420±0.22
3	0.699±0.08	0.549±0.04	0.186±0.05	0.535±0.02
4	0.977±0.19	0.543±0.02	0.570±0.17	0.488±0.17
5	0.696±0.17	0.439±0.13	0.548±0.12	0.252±0.07

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค5 ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time (days)	Cell dry weight (g/l)			
	Concentration of maltose (% w/v)			
	0	0.1	0.5	1
0	0.120±0.00	0.012±0.00	0.348±0.00	0.260±0.14
1	0.726±0.02	0.386±0.00	0.917±0.04	0.573±0.12
2	1.016±0.01	0.664±0.00	0.989±0.15	0.592±0.06
3	0.740±0.01	0.008±0.00	1.141±0.14	0.587±0.34
4	0.462±0.00	0.784±0.00	1.325±0.00	1.376±0.20
5	0.400±0.00	0.768±0.00	0.996±0.04	1.192±0.32

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค6 ผลของน้ำตาลมอลโตสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมมอลโตส ความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time (days)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)			
	Concentration of maltose (% w/v)			
	0	0.1	0.5	1
0	0.110±0.06	0.110±0.02	0.110±0.02	0.047±0.14
1	0.452±0.05	0.348±0.02	0.123±0.08	0.063±0.12
2	0.666±0.17	0.502±0.02	0.222±0.06	0.283±0.06
3	0.699±0.08	0.353±0.08	0.693±0.09	0.456±0.34
4	0.977±0.19	0.422±0.01	0.494±0.07	0.803±0.02
5	0.696±0.17	0.571±0.02	0.579±0.08	0.866±0.32

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค7 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time (days)	Cell dry weight (g/l)			
	Concentration of sucrose (% w/v)			
	0	0.1	0.5	1
0	0.120±0.00	0.390±0.08	0.228±0.00	0.049±0.03
1	0.726±0.02	0.675±0.06	0.605±0.12	0.445±0.21
2	1.016±0.01	0.909±0.04	1.002±0.09	0.701±0.06
3	0.740±0.01	1.006±0.10	1.173±0.07	0.747±0.13
4	0.462±0.00	1.546±0.01	1.820±0.08	0.791±0.08
5	0.400±0.00	1.932±0.02	1.920±0.11	0.869±0.25

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค8 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และมี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน

Incubation time (days)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)			
	Concentration of sucrose (% w/v)			
	0	0.1	0.5	1
0	0.110±0.06	0.022±0.00	0.044±0.00	0.051±0.01
1	0.452±0.05	0.275±0.02	0.054±0.00	0.092±0.02
2	0.666±0.17	0.458±0.03	0.118±0.09	0.214±0.02
3	0.699±0.08	0.382±0.00	0.290±0.11	0.163±0.04
4	0.977±0.19	0.422±0.07	0.364±0.02	0.151±0.17
5	0.696±0.17	0.482±0.05	0.381±0.37	0.149±0.02

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค9 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm

Incubation time (h)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Cell dry weight (g/l)
0	0.116±0.01	0.585±0.12
6	0.121±0.03	0.725±0.07
12	0.182±0.04	1.055±0.03
18	0.187±0.06	1.140±0.00
24	0.368±0.04	1.145±0.02
30	0.620±0.02	1.630±0.08
36	0.777±0.03	1.675±0.03
42	1.059±0.04	2.535±0.06
48	1.109±0.00	2.740±0.01
54	1.200±0.04	2.750±0.05
60	1.205±0.02	2.756±0.04
66	1.074±006	1.867±0.01
72	1.044±0.06	1.480±0.03

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค10 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

Incubation time (h)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Cell dry weight (g/l)
0	0.116±0.01	0.490±0.00
6	0.151±0.01	0.717±0.10
12	0.413±0.03	1.070±0.05
18	1.079±0.00	1.195±0.00
24	1.155±0.01	1.252±0.12
30	1.205±0.09	1.355±0.10
36	1.447±0.01	1.550±0.12
42	1.573±0.04	2.515±0.00
48	1.634±0.11	2.705±0.00
54	1.891±0.14	2.745±0.07
60	1.901±0.22	2.680±0.00
66	1.709±0.09	1.700±0.12
72	1.674±0.09	1.57±0.00

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค11 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

Incubation time (h)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Cell dry weight (g/l)
0	0.121±0.00	0.510±0.01
6	0.166±0.06	0.837±0.00
12	0.373±0.00	1.970±0.10
18	1.135±0.11	2.184±0.07
24	1.230±0.01	2.439±0.03
30	1.286±0.11	2.47±0.06
36	1.286±0.06	3.173±0.18
42	1.407±0.09	3.030±0.03
48	1.553±0.04	2.885±0.07
54	1.689±0.01	2.850±0.02
60	2.027±0.01	1.980±0.04
66	1.997±0.04	1.595±0.04
72	1.669±0.08	1.430±0.01

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค12 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

Incubation time (h)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Cell dry weight (g/l)
0	0.116±0.01	0.540±0.00
6	0.166±0.02	0.535±0.01
12	0.217±0.05	0.645±0.06
18	0.282±0.09	1.155±0.19
24	0.368±0.02	1.317±0.06
30	0.509±0.16	1.650±0.19
36	1.185±0.05	2.295±0.14
42	1.220±0.09	2.765±0.04
48	1.256±0.05	2.620±0.05
54	1.245±0.02	2.195±0.05
60	1.366±0.26	1.745±0.12
66	1.417±0.06	1.605±0.08
72	1.548±0.08	1.425±0.00

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค13 การเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

Incubation time (h)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Cell dry weight (g/l)
0	0.106±0.02	0.27±0.14
6	0.121±0.03	0.58±0.06
12	0.171±0.04	0.29±0.09
18	0.187±0.08	1.08±0.15
24	0.439±0.02	0.93±0.04
30	0.449±0.02	2.52±0.04
36	1.205±0.01	2.14±0.08
42	1.729±0.02	2.42±0.06
48	1.498±0.02	1.99±0.00
54	1.387±0.04	2.52±0.03
60	1.321±0.06	2.95±0.13
66	1.326±0.01	2.75±0.07
72	1.397±0.01	2.52±0.01

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค14 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

pH	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
3	9.153±0.02	83.73
3.5	10.264±0.28	93.89
4	10.932±0.22	100.00
4.5	10.832±0.41	99.08
5	8.359±0.12	76.46
6	5.851±0.14	53.52
7	5.218±0.17	47.73
8	4.384±0.24	40.11
9	4.305±0.22	39.38
10	3.975±0.11	36.36
11	3.608±0.18	33.00

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอย่างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค15 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

Temperature (°C)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
30	4.765±0.13	43.22
40	6.548±0.16	59.39
50	10.364±0.24	94.00
55	10.400±0.29	94.33
60	11.026±0.55	100.00
65	9.919±0.45	89.96
70	8.934±0.64	81.03
80	3.500±0.47	31.75
90	2.178±0.16	19.75

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอย่างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค16 ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่พีเอชต่างๆ

pH	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
3	6.328±0.17	57.89
4	6.956±0.12	63.63
5	7.708±0.18	70.50
6	7.881±0.23	72.09
7	8.934±0.30	81.73
8	9.040±0.13	82.70
9	8.792±0.14	80.42
10	8.078±0.33	73.89
11	8.029±0.16	73.44

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอย่างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค17 ผลความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

Temperature (°C)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
30	8.912±0.31	81.69
40	9.559±0.25	87.62
50	9.214±0.12	84.45
60	9.063±0.24	83.07
70	8.668±0.34	79.45
80	0.446±0.21	4.08
90	0.101±0.08	0.92

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอย่างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค18 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

Metal ion	Concentration (mM)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
Control	-	10.528±0.07	100
Ca^{2+}	1	9.849±0.11	93.55
	5	9.687±0.02	92.01
K^{+}	1	10.576±0.14	100.46
	5	10.188±0.14	96.77
Fe^{2+}	1	9.59±0.11	91.09
	5	10.415±0.09	95.24
Mn^{2+}	1	12.194±0.09	115.82
	5	14.538±0.21	138.10
Mg^{2+}	1	10.010±0.7	95.08
	5	10.027±0.09	95.24

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอย่างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค19 ผลการทดสอบสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1

Inhibitor	Concentration (mM)	Carboxymethylcellulase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
Control	-	7.180±0.24	100
EDTA	1	6.289±0.52	87.59
	5	5.915±0.32	82.39

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอย่างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ตารางผนวกที่ ค20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *T. fusca* PA1-1 โดยใช้สับสเตรทเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Substrate	Reducing sugar concentration (mg/ml)
CMC	20.879±0.30
avicel	1.302±0.22
Xylan	27.166±0.08
ซังข้าวโพด	0.657±0.06
ฟางข้าว	0.153±0.17
ขี้เลื่อย	0.121±0.22

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอย่างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวศุภางคนางค์ จอมสืบ
เกิดวันที่	9 พฤษภาคม 2529
สถานที่เกิด	อำเภอเมืองแพร่ จังหวัดแพร่
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์