บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตเซลลูเลสและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย

ชื่อผู้วิจัย ดร.กนกพร สังขรักษ์
หน่วยวิจัยชีวโมเลกุลพืช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยทักษิณ
อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110
โทรศัพท์ 0 7460 9600 ต่อ 2355

ได้รับงบประมาณเงินแผ่นดิน ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท การวิจัยประยุกต์
ประจำปี พ.ศ. 2554 จำนวน 350,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2553 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2554

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสโดยการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Cellulomonas* sp. TSU-03 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากดินและมีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูเลสสูง รวมถึงการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลส และการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม จากการพัฒนาสายพันธุ์ด้วยวิธีการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีและการใช้รังสียูวี จะได้เชื้อสายพันธุ์กลายทั้งหมด 328 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนดังกล่าว พบว่าเชื้อพันธุ์กลาย สายพันธุ์ M27 ที่เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ NTG เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตของเซลลูเลสสูงที่สุด เท่ากับ 2.93±0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสายพันธุ์ M17 ที่ให้ผลผลิต 2.57±0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร CMC

เมื่อทำการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตเซลลูเลสที่สูงขึ้นด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม โดยทำการคัดลอกยีนเอนโดกลูคาเนส (Cen_{sp}) ที่ควบคุมการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อ *Cellulomonas* sp. ผลการทดลองพบว่ายีนที่คัดลอกได้มีความเหมือนกับยีนเอนโดกลูคาเนส (*Cen*) จากเชื้อจุลินทรีย์ *Cellulomonas fimi* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำยีนดังกล่าวไปทำการศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* และ *Cellulomonas* sp. พบว่ายีนดังกล่าวมีการ

แสดงออกได้ต่ำและให้ผลผลิตของเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างจาก *Cellulomonas* sp. TSU-03 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) ดังนั้นในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกเฉพาะจุลินทรีย์พันธุ์กลาย M17 และ M23 เท่านั้นในการทดลอง

อาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลส ประกอบไปด้วย CMC ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร และ $NaNO_3$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45^{o}C ค่าความเป็นกรดและด่างของอาหาร เท่ากับ 6 และความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าว จุลินทรีย์ *Cellulomonas* sp. สายพันธุ์ M27 ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.11±1.28 กรัมต่อลิตร และให้กิจกรรมของเอนไซม์ FPase, CMCase และ β-glucosidase เท่ากับ 3.25±0.20, 4.51±1.15, 1.52±0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กิจกรรมของเซลลูเลสที่ได้พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากเชื้อพันธ์กลาย M17 ถึง 1.2 เท่า และสูงกว่า 2.8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อสายพันธุ์กลาย *Cellulomonas* sp. M23 เป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเซลลูเลส และให้ผลผลิตของเซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงในอาหารที่มี CMC เป็นองค์ประกอบ

An objective of this study was to develop a high cellulase production by improve the prominent cellulase producing bacteria, increased enzyme production by optimization studies and strain improvement by genetic engineering. Among 328 mutant strains of *Cellulomonas* sp. TSU-03, the mutant strain M23, NTG mutant, gave the highest value of cellulase activity (2.93±0.11 U/mL) followed by mutant M17 (2.57±0.14 U/mL) in CMC medium.

Strain improvement for higher production of cellulase from *Cellulomonas* sp. TSU-03 was conducted by cloning of gene encoding the endoglucanase of *Cellulomonas* sp. (Cen_{Csp}) through complementation to cellulase accumulation of *Cellulomonas* sp. (wild type) was investigated. The Cen_{Csp} sequence of DNA from *Cellulomonas* sp. was analyzed and the fragment showed 100% identity with *Cen* gene from *Cellulomonas fimi* (accession number 15823). Cloning was confirmed by enzymatic studies and results showed that cellulase activity was low expression in *E. coli* and *Cellulomonas* sp. Therefore, mutant M17 and M23 (NTG mutant) were selected and used throughout this study.

The optimum medium and environmental for cellulase production consisted of 10 g/L CMC, 1 g/L $NaNO_3$ under cultivatation temperature at 45^{o}C with initial pH and agitation speed at 6 and 100 rpm, respectively. *Cellulomonas* sp. strain M23 produced the highest cellular growth (7.11±1.28 g/L) and FPase, CMCase as well as β-glucosidase activities at 3.25±0.20, 4.51±1.15, 1.52±0.40 U/mL, respectively. The cellulase activity achieved from strain M23 is 1.2 and 2.8 folds higher than cellulase from mutant M17

(2.50±1.02 U/mL) and wild type (1.12±0.50 U/mL), respectively. The results suggested that *Cellulomonas* sp. M23 had a good potential for production of cellulase by fermentation using a cultivation medium containing CMC as the main substrate.

Keywords: β-glucosidase, Cellulase, *Cellulomonas* sp., CMCase, FPase