การผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสในถังหมักที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนโดย alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1

ชนิดา เลิศศลารักษ์ [1]
สถาบันราชภัฏราชนครินทร์ ฉะเชิงเทรา 24000
คิน เลย์ คู [2] **และ กนก รัตนะกนกชัย** [3]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 4 ธันวาคม 2546 ตอบรับเมื่อ 13 พฤษภาคม 2547

บทคัดย่อ

จากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ใน shake flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำหมัก 20 มิลลิลิตร ผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสที่มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการช่วยฟอกสีเยื่อกระดาษ เพื่อผลิตไซลาเนสในขนาดที่ใหญ่ขึ้นงานวิจัยนี้จึงทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยใช้น้ำหมัก 500 มิลลิลิตร เมื่อมีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1.0 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน พบว่าการผลิตไซลาเนส เพิ่มขึ้นตามปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ การเจริญของเซลล์ และปริมาณโปรตีน สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 คือที่พีเอช 10.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยไซลาเนสที่ผลิตได้มีแอคติวิตี 0.96 U/มิลลิลิตร ที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

คำสำคัญ : alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 / ไซลาเนสปราศจากเซลลูเลส / เปลือกข้าวโพด / ถังหมัก

---

[1] *อาจารย์ โปรแกรมเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (อดีตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี)*

[2] *ผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Extracellular Cellulase-free Xylanase Production by Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 in Fermentor Using Corn Hull as a Carbon Source

Chanida Leartslarus [1]

Rajabhat Institute Rajanagarindra, Chachoengsao 24000

Khin Lay Kyu [2] **and Khanok Ratanakhanokchai** [3]

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

Received 4 December2003 ; accepted 13 May 2004

Abstract

In our previous work, we found that an extracellular cellulase-free xylanase produced by alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 in 250 ml shake flasks with 20 ml working volume had a potential for using in pulp prebleaching process. In this work, to scale up the production of xylanase, the cultivation of *Bacillus firmus* K-1 using 500 ml working volume in a liter commercial fermentor was optimized using 1.0% corn hull as a carbon source and 0.4% urea as a nitrogen source under non sterile condition. The results showed that the production of xylanase was found to increase along with dissolved oxygen, the cell growth and protein content. The optimal conditions were at initial pH at 10.5 and temperature at 37°C with agitation speed at 400 rpm and aeration rate at 1 vvm for 24 h. Xylanase production was in a yield of 0.96 U/ml of culture supernatant.

Keywords : alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 / cellulase-free xylanase / corn hull / fermentor

[1] *Lecturer, Chemistry Program, Faculty of Science and Technology (Former Graduate Student, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology, KMUTT).*

[2] *Expert, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

มีการนำไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสมาใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณสารคลอรีนที่นิยมใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษที่ก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำ [1] และปรับปรุงคุณสมบัติของกระดาษ [2] จากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัย พบว่า alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เมื่อเจริญในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนใน สภาวะเป็นด่าง ผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลส ซึ่งย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำในเศษพืช และเยื่อกระดาษต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการช่วยฟอกสีเยื่อกระดาษ [3] ดังนั้นงานวิจัยนี้จะทำการขยายการผลิตไซลาเนสจาก shake flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยเพาะเลี้ยง *Bacillus firmus* K-1 ในสภาวะที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่พีเอช 10.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 [4] โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมัก และขยายการผลิตไซลาเนสในโอกาสต่อไป

2. ระเบียบวิธีวิจัย อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 แหล่งจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ซึ่งแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา [5] ที่เก็บรักษาบน xylan agar slant

2.2 การเตรียมจุลินทรีย์ตั้งต้น

เตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสูตรอาหารของ Berg และคณะ [6] ซึ่งประกอบด้วย $NaNO_3$ ร้อยละ 0.2, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.05, $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.02, $MnSO_2.H_2O$ ร้อยละ 0.002, $FeSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.002 และ $CaCl_2.2H_2O$ ร้อยละ 0.002 ซึ่งมีเปลือกข้าวโพด 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอน นึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 10.5 ด้วย Na_2CO_3 10% ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 จาก xylan agar slant ลงในอาหารที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน

2.3 การเตรียมเปลือกข้าวโพด

เปลือกข้าวโพดที่ใช้เป็นเปลือกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่แห้งสนิท นำมาตัดให้มีขนาดเล็ก หลังจากนั้นปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 40 mesh

2.4 การผลิตไซลาเนสในถังหมัก

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้เปลือกข้าวโพด 1.0% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ใน Berg's mineral salt medium [6] ที่มียูเรีย 0.4% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 1 ลิตร (BIOSTAT Q Mutiple Fermenter Unit., B. Braun Co., Ltd.) ที่พีเอช 10.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ศึกษารูปแบบการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 โดยศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศต่อการผลิตไซลาเนส ปริมาณเซลล์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ ค่าพีเอช และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่เวลาต่างๆ

2.5 การตรวจวัดการเจริญของ *Bacillus firmus* K-1

ตรวจนับจำนวนเซลล์โดยการ pour plate บน nutrient agar (2%) ที่ปรับพีเอชเป็น 10.5 นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วัน แล้วนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร โดยเลือกนับจากจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 30-300 โคโลนี

2.6 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

ตรวจวัดกิจกรรมไซลาเนสโดยนำ crude enzyme (ส่วนใสที่ได้จากการนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) 0.15 มิลลิลิตร เติมลงใน 0.15 มิลลิลิตรของไซแลน 0.50% ใน Tris/HCl บัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ พีเอช 9 หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อย oat spelt xylan (1.0%, w/v) โดยวิธี dinitrosalicylic acid [7] และใช้ไซโลสในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

1 ยูนิตของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนใน crude enzyme โดยวิธีของ Lowry [8] และใช้สารละลาย bovine serum albumin ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

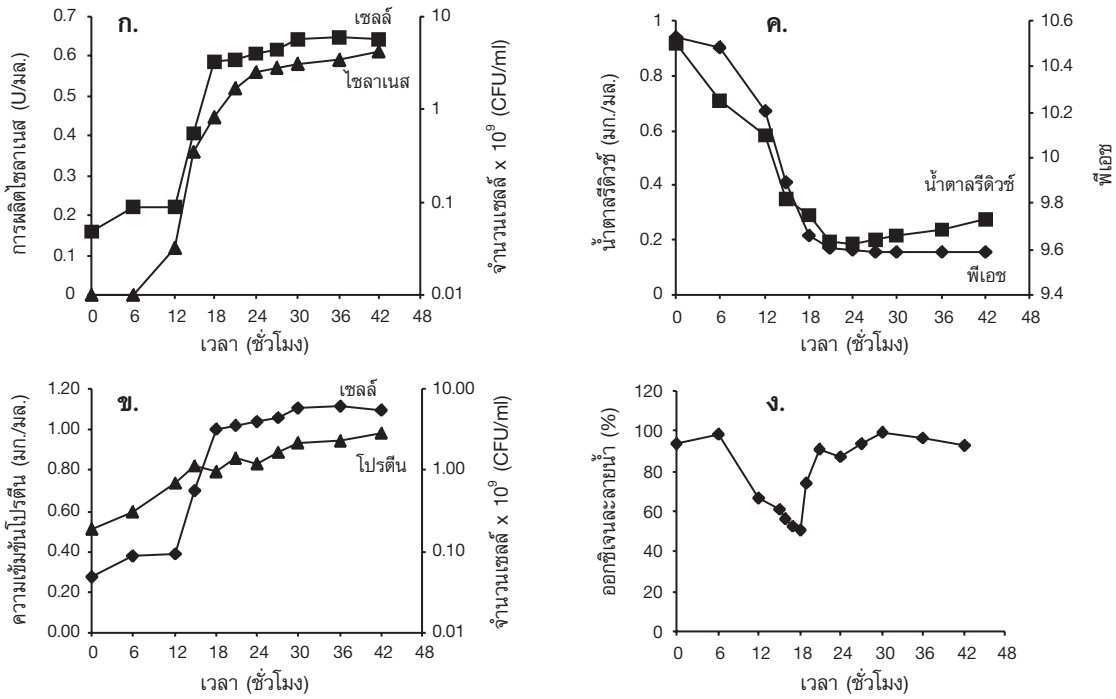
3.1 การเพาะเลี้ยง *Bacillus firmus* K-1 ในสภาวะที่ปราศจากการนึ่งฆ่าเชื้อ

ปัญหาหนึ่งของการผลิตเอนไซม์ในระดับใหญ่คือการทำให้ระบบการหมักปลอดจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นซึ่งต้องใช้ความร้อนสูง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน และเสียค่าใช้จ่ายสูง *Bacillus firmus* K-1 สามารถเจริญในสภาวะเป็นด่างสูง จึงทำการทดลองเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเหลวที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ใน shake flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารของ Berg [6] ที่มีเปลือกข้าวโพด 1% และยูเรีย 0.4% เป็นแหล่งคาร์บอน

และไนโตรเจน ตามลำดับ ที่พีเอช 10.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 [4] ภายหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ เมื่อตรวจสอบด้วยการ pour plate บน nutrient agar ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีสาเหตุจากการใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในปริมาณสูง (7.26×10^7 CFU/มิลลิลิตร) *Bacillus firmus* K-1 เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็วในสภาวะความเป็นด่างสูง นอกจากนี้ mineral salt ที่ใช้เป็น minimal medium ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus* spp. มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของไซลาเนส โดยเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวที่ผ่านและไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน พบว่าสูตรอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนตรวจพบกิจกรรมของไซลาเนสมากกว่าเล็กน้อย (1.17 เท่า) ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุจากการให้ความร้อนมีผลทำให้เปลือกข้าวโพดมีการอุ้มน้ำและพองตัวมากขึ้น จุลินทรีย์จึงสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตามเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ตรวจวัดได้จากทั้ง 2 กรณีมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก จึงเลือกสภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เนื่องจากเมื่อนำไซลาเนสไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมจะสามารถลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนดังกล่าวได้มาก

3.2 การเจริญและการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมัก

ผลของการเจริญ การผลิตไซลาเนส ปริมาณโปรตีน การเปลี่ยนแปลงพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักของการผลิตไซลาเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.50 vvm แสดงดังรูปที่ 1 ในช่วงแรกของการเจริญ *Bacillus firmus* K-1 มีความต้องการปริมาณออกซิเจนน้อย (รูปที่ 1ง) เนื่องจากอยู่ในช่วง lag phase จึงมีการปรับตัวเพื่อจะเจริญต่อไป หลังจากนั้น *Bacillus firmus* K-1 ต้องการออกซิเจนในการเจริญมาก เนื่องจากเข้าสู่ log phase ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็ว และ *Bacillus firmus* K-1 มีการนำน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็น xylooligosacharides สายสั้นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในไซแลน ซึ่งตรวจวัดได้ประมาณ 0.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไปใช้ในการเจริญ และผลิตสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการ metabolite ไซโลส (ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการย่อยไซแลน) โดยที่ไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส จากนั้นเปลี่ยนไซลูโลสเป็น xylulose-5-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่กระบวนการ pentose phosphate pathway ได้ผลิตภัณฑ์เป็น fructose-6-phosphate [9] จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ glycolysis โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เช่น lactate และ acetate มีผลให้พีเอชของน้ำหมักลดลง ซึ่งจากรูปที่ 1ค พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ลดลงแปรผันโดยตรงกับความเป็นกรดของน้ำหมัก นอกจากนี้พบว่าไซลาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus firmus* K-1 แปรผันตามปริมาณโปรตีนและการเจริญของจุลินทรีย์ (รูปที่ 1ก และ 1ข) เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญในช่วง log phase การผลิตไซลาเนสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะที่เมื่อการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase การสร้างเอนไซม์เริ่มคงที่ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Tachaapaikoon และคณะ [10] ที่ศึกษาการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus halodurans* C-1 ซึ่งพบว่าการผลิตไซลาเนสแปรผันตามการเพิ่มขึ้นของเซลล์จุลินทรีย์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Adamsen และคณะ [11] ที่พบว่าการผลิตไซลาเนสของ *Dictyoglomus* sp. B1 แปรผันตามปริมาณจุลินทรีย์



รูปที่ 1 Time course ของการเพาะเลี้ยง *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

(ก.) จำนวนเซลล์และการผลิตไซลาเนส (ข.) จำนวนเซลล์และความเข้มข้นโปรตีน

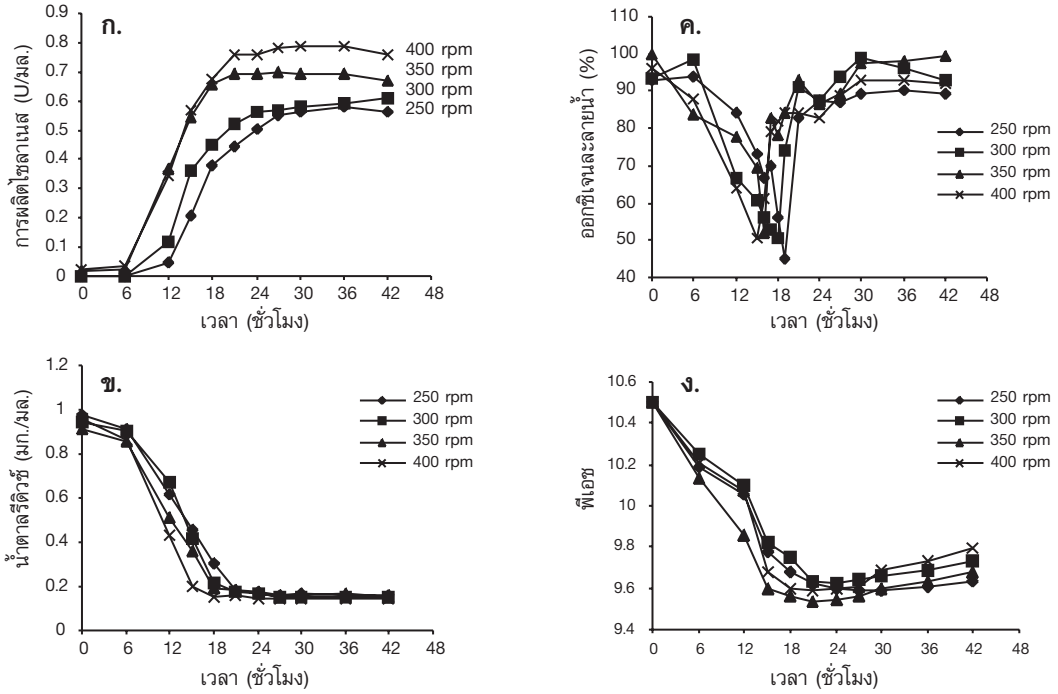
(ค.) น้ำตาลรีดิวซ์และพีเอช (ง.) ออกซิเจนละลายน้ำ

จากรูปที่ 1 *Bacillus firmus* K-1 ต้องการออกซิเจนในการเจริญมากในช่วง log phase ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณออกซิเจนในช่วงนี้ลดลงอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ตรวจวัดค่าต่ำสุดได้ร้อยละ 50.6 ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุจากในการทดลองมีการเติมออกซิเจนในน้ำหมักอย่างต่อเนื่องในปริมาณมาก ทำให้ออกซิเจนละลายน้ำในน้ำหมักไม่ลดลงเป็นศูนย์ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง log phase เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญและผลิตไซลาเนสออกมานอกเซลล์ โดยไซลาเนสจะย่อยไซแลนในเปลือกข้าวโพดให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส และไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้นๆ [12] ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ส่วนหนึ่งจะถูกส่งผ่านเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ active transport โดยไปเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตไซลาเนสออกมาอย่างต่อเนื่อง [13] เมื่อจำนวนของจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ (stationary phase) ปริมาณความต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญมีน้อยลงทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำหมักสูงขึ้น ส่วนปริมาณของไซลาเนสที่เพิ่มขึ้นน้อยในช่วง stationary phase อาจเนื่องจากเซลล์ผลิตไซลาเนสระหว่างการเจริญ และหลังช่วง stationary phase เซลล์จะสร้างสปอร์และหยุดการสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ปริมาณของไซแลนในเปลือกข้าวโพดที่มีในน้ำหมักเหลือน้อยลง

3.3 ผลของอัตราการกวนต่อการผลิตไซลาเนสในถังหมัก

Bacillus firmus K-1 เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ [12] การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ซึ่งคาดว่าความเร็วรอบที่เพิ่มขึ้นจะมีผลให้จำนวนเซลล์และการผลิต

ไซลาเนสเพิ่มขึ้น โดยระหว่างการหมักจะทำการศึกษาการผลิตไซลาเนส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมักที่มีอัตราเร็วในการกวนต่างๆ ที่อัตราการให้อากาศ 0.50 vvm ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการผลิตไซลาเนสในถังหมักขนาด 1 ลิตรที่อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm (ก.) การผลิตไซลาเนส (ข.) น้ำตาลรีดิวซ์ (ค.) ออกซิเจนละลายน้ำ (ง.) พีเอช

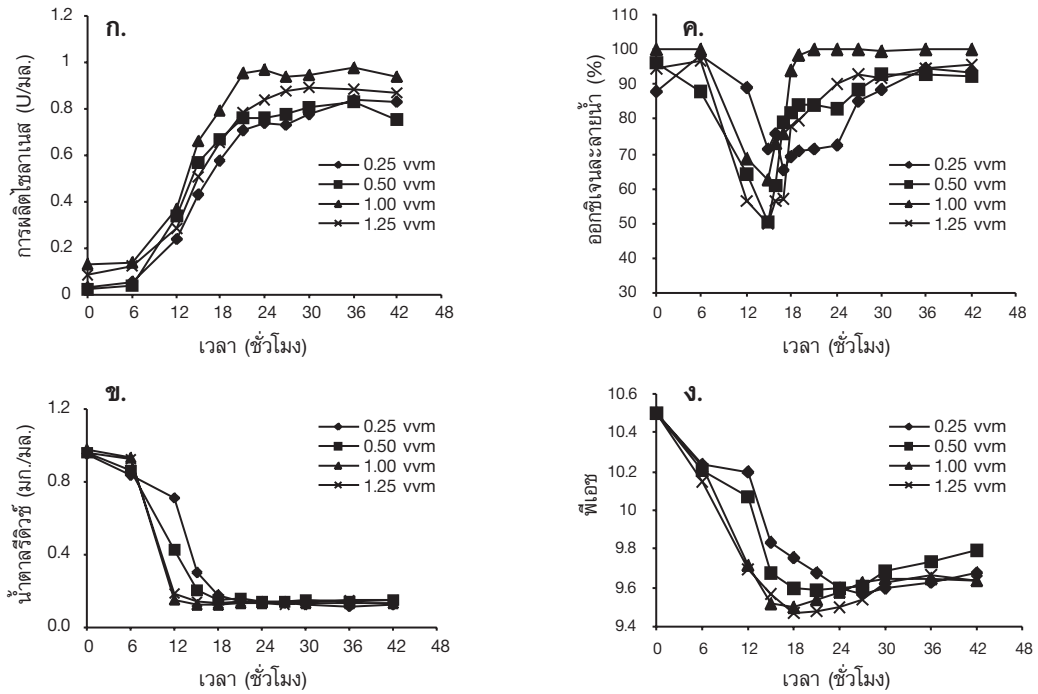
จากรูปที่ 2 พบว่ารูปแบบในการผลิตไซลาเนสในทุกอัตราการกวนที่ใช้ศึกษาเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองในหัวข้อที่ 2 ที่อัตราเร็ว 400 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราเร็วสูงสุดของการศึกษา ตรวจวัดแอคติวิตีของไซลาเนสได้สูงสุด (0.79 U/มิลลิลิตร) ขณะที่อัตราเร็ว 350 300 และ 250 รอบต่อนาที ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ 0.69 0.60 และ 0.57 U/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 2 ก) ซึ่งจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในชั่วโมงที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าที่อัตราเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที ปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้สูงสุด (1.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้ที่อัตราเร็ว 350 300 และ 250 รอบต่อนาที เท่ากับ 0.93 0.86 และ 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 2 ปริมาณโปรตีนแปรผันตามปริมาณเซลล์ที่ตรวจวัดได้ แสดงว่าที่อัตราเร็วในการกวนสูง *Bacillus firmus* K-1 น่าจะมีการเจริญมากกว่าจึงผลิตไซลาเนสได้มากกว่าที่ความเร็วรอบต่ำ นอกจากนี้การกระจายตัวของออกซิเจนที่ละลายน้ำ เซลล์ และเปลือกข้าวโพดซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในน้ำหมัก ที่อัตราเร็วรอบสูงเกิดได้ดีกว่าที่อัตราเร็วรอบต่ำ ดังนั้นโอกาสที่จุลินทรีย์จะสัมผัสกับออกซิเจน และเปลือกข้าวโพดจึงเกิดได้มากกว่า [14] รูปที่ 2 ค พบว่าในทุกอัตราการกวนที่ใช้ศึกษา แม้ว่าการเพิ่มอัตราเร็วในการกวนเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำแต่ปริมาณออกซิเจนต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ในแต่ละความเร็วไม่แตกต่างกันมากนัก

ซึ่งอาจมีสาเหตุจากที่อัตราเร็วสูงจุลินทรีย์มีการเจริญมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วต่ำ ทำให้ความต้องการออกซิเจนในการเจริญมากเช่นกัน และพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ตรวจวัดได้ในขณะที่ *Bacillus firmus* K-1 มีการเจริญในช่วง log phase ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำสุดมีค่าไม่เป็นศูนย์ เนื่องจากตลอดการทดลองควบคุมการเติมออกซิเจนในน้ำหมักให้อิ่มตัวที่ร้อยละ 90-100 ขณะที่ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ (รูปที่ 2 ข.) และค่าพีเอช (รูปที่ 2 ง.) ในน้ำหมักมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน

จากการศึกษามีแนวโน้มว่าเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการกวน ปริมาณของไซลาเนสที่ *Bacillus firmus* K-1 ผลิตเพิ่มขึ้น แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถเพิ่มอัตราเร็วในการกวนให้มากกว่า 400 รอบต่อนาที เนื่องจากเป็นข้อจำกัดของเครื่องมือ โดยเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการกวนมากกว่า 400 รอบต่อนาที จะทำให้เกิดการกระเซ็นของน้ำหมัก ทำให้การกระจายตัวของเปลือกข้าวโพดในน้ำหมักไม่สม่ำเสมอและมีเปลือกข้าวโพดบางส่วนเกาะติดกับผนังของถังหมัก

3.4 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตไซลาเนสในถังหมัก

ในหัวข้อที่ 3 เมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ โดยการเพิ่มอัตราเร็วในการกวน ปริมาณไซลาเนสที่ *Bacillus firmus* K-1 ผลิตเพิ่มขึ้น แสดงว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีผลต่อการผลิตไซลาเนส แต่จากข้อจำกัดของเครื่องมือทำให้ไม่สามารถเพิ่มอัตราเร็วในการกวนให้มากกว่า 400 รอบต่อนาที ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศต่อการผลิตไซลาเนส โดยผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตไซลาเนส



รูปที่ 3 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตไซลาเนสที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที
(ก.) การผลิตไซลาเนส (ข.) น้ำตาลรีดิวซ์ (ค.) ออกซิเจนละลายน้ำ (ง.) พีเอช

ที่อัตราเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที แสดงดังรูปที่ 3

จากรูปที่ 3 ที่อัตราการให้อากาศ 1.00 และ 1.25 vvm *Bacillus firmus* K-1 ผลิตไซลาเนสได้มากกว่าที่อัตราการให้อากาศต่ำ (รูปที่ 3 ก.) ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (รูปที่ 3 ข.) และพีเอช (รูปที่ 3 ง.) ในน้ำหมักที่อัตราการให้อากาศสูงลดลงเร็วกว่าที่อัตราการให้อากาศต่ำ และจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในชั่วโมงที่ 21 ของการทดลอง พบว่าปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้ที่อัตราการให้อากาศ 1.00 มีค่าสูงสุด (1.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่อัตราการให้อากาศ 0.50 และ 0.25 vvm ตรวจวัดปริมาณโปรตีนได้ 1.05 และ 0.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้คาดว่าที่อัตราการให้อากาศสูงการเจริญของจุลินทรีย์น่าจะเกิดขึ้นมากกว่าที่อัตราการให้อากาศต่ำ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 1 ก. และ 1 ข. ที่พบว่าการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 แปรผันตามการเจริญของจุลินทรีย์และปริมาณโปรตีน รูปที่ 3 ค พบว่าอัตราการให้อากาศ 0.25 vvm ซึ่งเป็นอัตราการให้อากาศต่ำสุดที่ใช้ในการศึกษา ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักลดลงช้าที่สุดเมื่อเปรียบเทียบ กับอัตราการให้อากาศอื่นๆที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งอัตราการให้อากาศที่ต่ำเกินไปอาจมีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้การผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 เกิดน้อยกว่าที่อัตราการให้อากาศสูง

จากการศึกษาพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.00 vvm จุลินทรีย์ผลิตไซลาเนสออกมาได้มากกว่าที่ 1.25 vvm ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีสาเหตุจากการให้อากาศที่ระดับ 1.25 vvm ทำให้เกิดแรงดันที่สามารถพยุงเปลือกข้าวโพดขึ้นไปเกาะติดบริเวณ body probe และบริเวณขอบ jacket ของถังหมักที่ใช้ เนื่องจากถังหมักมีขนาดเล็กและแคบ ดังนั้นเปลือกข้าวโพดในน้ำหมักจึงมีปริมาณลดลง ทำให้ปริมาณของไซลาเนสที่ผลิตได้น้อยกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.00 vvm นอกจากนี้อัตราการให้อากาศที่สูงเกินไปยังทำให้เกิดฟองอากาศที่มีขนาดใหญ่ เป็นสาเหตุให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับจุลินทรีย์ลดลง และอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ลดลง [15] ซึ่ง Hoq และคณะ [14] พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.00 vvm การผลิตไซลาเนสของ *Trichoderma lanuginosus* RT9 ที่อัตราเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาที สูงกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.50 vvm

4. สรุปผลการทดลอง

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร เมื่อมีเปลือกข้าวโพด 1.0% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรีย 0.4% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่พีเอช 10.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 คือที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ซึ่งไซลาเนสที่ผลิตได้มีแอคติวิตี 0.96 U/มิลลิลิตร ที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง โดยการผลิตไซลาเนสเพิ่มขึ้นตามปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ การเจริญของเซลล์ และปริมาณโปรตีน ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบถังหมักขนาด 100 ลิตร เพื่อนำ crude xylanase จาก *Bacillus firmus* K-1 ไปประยุกต์ใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษในโอกาสต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ภายใต้โครงการแลกเปลี่ยนระหว่างไทยและญี่ปุ่น (NRCT-JSPS) ที่ให้ทุนวิจัยสนับสนุนงานวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

1. Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M., 1994, "Xylanases in Bleaching : from an Idea to the Industry," *FEMS Microbiology Reviews,* Vol. 13, pp. 335-350.

2. Tolan, J. S., 1996, "Pulp and Paper," *Industrial Enzymology,* Edited by Godfrey, T. and West, S., Macmillan Press, London, pp. 327-338.

3. Kyu, K. L., Ratanakhanokchai, K., Ratanarojmongkol, T., Chen, S-T., and Tanticharoen, M., 2001, "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials and Kraft Pulps by Xylanolytic Enzymes from Alkaliphilic *Bacillus* sp. K-1," *Journal of National Research Council of Thailand,* Vol. 33, pp. 39-54.

4. Leartslarus, C., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K. L. 2002, "Optimization of Extracellular Cellulase-free Xylanase Production by Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1," *KMUTT Research and Development Journal,* Vol. 25, pp. 3-13. (in Thai)

5. Ratanakhanokchai, K., Noiduang, P., and Kyu, K. L., 2002, "Two Extracellular Endoxylanases from Alkaliphilic *Bacillus firmus* Differ in Their Synthesis," *Biotechnology Letters,* Vol. 24, pp.1487-1,490.

6. Berg, B., Hofstan, B. V., and Petterson, B., 1972, "Growth and Cellulase Formation by *Celluvibrio fulvus,*" *Journal of Applied Bacteriology,* Vol. 35, pp. 201-214.

7. Miller, L. G., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Analytical Chemistry,* Vol. 31, pp. 246-248.

8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry,* Vol. 193, pp. 265-275.

9. Eliasson, A., Boles, E., Johansson, B., Osterberg, M., Thevelein, J. M., Spencer-Martins, I., Juhnke, H., and Hahn-Hagerdal, B., 2000, "Xylulose Fermentation by Mutant and Wild-type Strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae,*" Applied Microbiology *and Biotechnology,* Vol. 53, pp. 376-382.

10. Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L., and Ratanakhanokchai, K., 2003, "Specificity of Purified Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus halodurans* Strain C-1 on Hydrolysis of Soluble Xylans," *KMUTT Research and Development Journal,* Vol. 26, pp. 201-217.

11. Adamsen, A. K., Lindhagen, J., and Ahring, B. K., 1995, "Optimization of Extracellular Xylanase Production by *Dictyoglomus* sp. B1 in Continuous Culture," *Applied Microbiology and Biotechnology,* Vol. 44, pp. 327-332.

12. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., and Tanticharoen M., 1999, "Purification and Properties of a Xylan-binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1," *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 65, pp. 694-697.

13. Biely, P., 1985, "Microbial Xylanolytic System," *Trends in Biotechnology,* Vol. 3, pp. 286-290.

14. Hoq, M. M., Hempel, C., and Deckwer, W. D., 1994, "Cellulase-Free Xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9 : Effect of Agitation and Medium Components on Production," *Journal of Biotechnology,* Vol. 37, pp. 49-58.

15. Lee, M. J., 1992, *Biochemical Engineering,* Eaglewood Cliffs, Prentice-Hall, pp. 240-279.