การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา

นางสาว ชุลีพร จูงสาย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาอาหารเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-045-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018139 I14556923

STUDY ON ENZYME CELLULASE FROM FUNGI

MISS CHULEEPORN CHOONGSAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Food Chemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-045-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา
โดย	นางสาว ชุลีพร จูงสาย
ภาควิชา	อาหารเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิราภรณ์ สุขุมาวาสี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สุหร่าย สายศร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ สุธี สุนทรธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. จิราภรณ์ สุขุมาวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ สุหร่าย สายศร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุลีพร จูงสาย : การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา (STUDY ON ENZYME CELLULASE FROM FUNGI) อ.ที่ปรึกษา ดร. จิราภรณ์ สุขุมาวาสี. อ.ที่ปรึกษาร่วม รศ. สุหร่าย สายคร, 132 หน้า. ISBN 974-581-045-2

เชื้อรา Aspergillus sp. ชนิด TISTR 3335 เป็นเชื้อราที่คัดเลือกจากเชื้อรา 30 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บอยู่ในศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์กรุงเทพ (Bangkok MIRCEN) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับขวดเขย่าได้ดี โดยจัดสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดยีสต์-มอลต์ที่ประกอบด้วย คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 2 เปปโตนร้อยละ 3 เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบ/นาที หลังจากการทำไดแอลิซิส แล้วทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE-Bio-Gel A คอลัมน์ไอออนเอกเซนจุ์โครมาโทกราฟี Sephacryl-S 200 HR คอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี และ Mono Q HR คอลัมน์ฟาสต์โปรตีนลิควิดโครมาโทกราฟี ทำให้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,3, 9.2 และ 71.8 เท่า ตามลำดับ เซลลูเลสที่ผลิตได้มีปริมาณโปรตีน 31 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตรวจวัดโดยวิธีลาวรี (Lowry method) หลังจากทดสอบการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้าผ่านเจลชนิดโซเดียม โดดีซิลซัลเฟต โพลีเอคริลเลไมด์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55,000 ดาลตัน สามารถทำการย่อยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส สามารถทนต่ออุณหภูมิระหว่าง 55-70 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 15 นาที เซลลูเลสนี้จะมีประสิทธิภาพในการทำงานดีขึ้นโดย 2-เมอแคฟโตเอทธานอล แมกนีเซียมคลอไรด์ ไดไธโอทรีออล และประสิทธิภาพการทำงานจะลดลงโดยเมอคิวริคคลอไรด์ และกรดพารา-คลอโรเมอคิวริเบนโซอิค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา อาหารเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อาหารเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C275290 : MAJOR FOOD CHEMISTRY
KEY WORD : CELLULASE/CELLULASE PRODUCING FUNGI
CHULEEPORN CHOONGSAI : STUDY ON ENZYME CELLULASE FROM FUNGI.
THESIS ADVISOR : DR. JIRAPORN SUKHUMAVASI, THESIS CO-ADVISOR
ASSO.PROF. SURAI SAISORN, 132 pp. ISBN 974-581-045-2

Aspergillus sp. (TISTR 3335) was chosen from 30 fungal varieties which were preserved in Bangkok MIRCEN collection. TISTR 3335 was grown on YM broth medium in shaking flask, using various carbon and nitrogen substrates (carboxymethylcellulose, cellulose, KC floc, avicel as carbon sources and peptone, glycine, urea, ammonium sulfate, sodium nitrate as nitrogen sources). Crude cellulase were produced on carboxymethylcellulose 2%, peptone 3%. Using various condition for growth and best enzyme production found that optimal started pH was 7, shaking rate was 200 rpm. After dialysis crude cellulase was purified by DEAE Bio-Gel-A anion exchange chromatography, sephacryl S-200 HR gel filtration chromatography and Mono Q HR column for fast protein liquid chromatography. Purification fold increased from 1.3, 9.2, 71.8 in order. Protein determination was 31 micrograms/millilitre by lowry method. The molecular weights was 55,000 dalton analysed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The optimal catalysis condition for purified cellulase ranged from pH 5-9 and 55-90°, optimal pH was 6, optimal temperature was 50°C. A close relation of enzyme stability to their optimal pH range was observed. Purified cellulase was stable for 15 minute at 55-70°C. Purified enzyme required 2-mercaptoethanol, $MgCl_2$ and dithiothreithol for their catalytic activities, $HgCl_2$ and p-chloromercuribenzoic acid inhibited enzyme activity.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา อาหารเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา อาหารเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ดร. จิราภรณ์ สุขุมาวาสี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ แห่งห้องปฏิบัติการการหมัก แผนกเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งท่านได้สละเวลาอันมีค่าในการฝึกสอน และให้คำแนะนำแนวทางแก้ไขปัญหาในทุกขั้นตอนการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุหร่าย สายศร อาจารย์ประจำภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นกำลังใจอันสำคัญของผู้ทำวิจัยให้ไม่ท้อถอยต่ออุปสรรคในการปฏิบัติงานและที่สำคัญอย่างยิ่งคือ ผู้ทำวิจัยยังซาบซึ้งในพระคุณของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์การวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณผู้ร่วมงานทุกท่านในห้องปฏิบัติการการหมัก และ Bangkok MIRCEN ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก แก่ผู้ทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ซึ่งประกอบด้วย อาจารย์สุธี สุนทรธรรม รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิบิพันธ์ ดร. จิราภรณ์ สุขุมาวาสี และรองศาสตราจารย์ สุหร่าย สายศร ที่ได้สละเวลาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์และเสนอข้อแนะนำต่าง ๆ ให้ครบถ้วน

สุดท้าย ผู้ทำวิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ซึ่งเป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยสามารถฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ จนได้รับความสำเร็จโดยสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญรูปภาพ ..... ฏ
คำอธิบายสัญญลักษณ์ ..... ฑ
บทที่ 1
บทนำ 1
บทที่ 2
วารสารปริทัศน์ 3
เซลลูโลส 3
การย่อยสารประกอบเซลลูโลส 7
การพัฒนาการผลิตเซลลูเลส 9
เซลลูเลส 14
การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส 22
การทำงานของเอนโดกลูคาเนส 27
การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูเลส 29
เซลลูเลสทั้งระบบ 29
C_1 32
เอนโดกลูคาเนส 32
เบต้า-กลูโคซิเดส 32
จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส 33
รา 33
แบคทีเรีย 33
การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี 34
ไอออน-เอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี 34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เจล ฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี 36
ฟาสต์ โปรตีน ลิควิด โครมาโทกราฟี 38
การเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า 39

บทที่ 3

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 45
สารเคมีและแหล่งที่มา 45
อุปกรณ์ 49

บทที่ 4

วิธีทำการทดลอง 50
วิธีเตรียมเอนไซม์ 50
วิธีวิเคราะห์หาเซลลูเลส แอคทิวิตีโดยวิธี Dye release assay . 50
วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson 51
วิธีวิเคราะห์หา CMCase activity 52
วิธีทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส 52
ค่าความเป็นกรด-ด่าง 52
อัตราการเขย่า 53
แหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจน 53
วิธีทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค โครมาโทกราฟี 54
แอนไอออน-เอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี 54
เจล-ฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี 55
ฟาสต์-โปรตีน-ลิควิด โครมาโทกราฟี 55
การเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า 55
วิธีทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส . 57
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา 57
ความคงตัวต่ออุณหภูมิ 58
ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา 58
ความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง 58
ผลของสารเคมีต่อการทำงานของเอนไซม์ 59
วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลาวรี 59

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5
ผลการทดลอง 61
บทที่ 6
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 92
เอกสารอ้างอิง 101
ภาคผนวก 1 120
ประวัติผู้เขียน 132

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสูตรสารอาหารของห้องปฏิบัติการกองทัพอากาศสหรัฐอเมริกา สำหรับ T. reesei	11
2	ตารางแสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส	24
3	แสดงความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเซลลูเลส	28
4	แสดงการวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูเลสด้วยสารตั้งต้นที่เหมาะสม	31
5	แสดงชนิดของ electrophoresis จำแนกตามชนิดของตัวกลางค้ำจุน	41
6	แสดงความเข้มข้นของ acrylamide (% T) ที่ใช้ในการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน	43
7	แสดงปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมเจล	44
8	แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมของวัว ..	60
9	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรต่อ % เซลลูคลาส	61
10	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส	63
11	แสดงการคัดเลือกเชื้อพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ดีที่สุดจากเชื้อรา 30 สายพันธุ์	65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	แสดงผลการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส	67
13	แสดงผลการทดลองหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส	68
14	แสดงผลการทดลองคัดเลือกแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส	69
15	แสดงผลการทดลองคัดเลือกแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส	70
16	แสดงผลการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	71
17	แสดงการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีแอนไอออน-เอกเชนจ์โครมาโทกราฟี ...	72
18	แสดงการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น โครมาโทกราฟี	76
19	แสดงการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีฟาสต์-โปรตีน-ลิควิด-โครมาโทกราฟี ...	79
20	แสดงผลการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ...	84
21	แสดงผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์	86
22	แสดงผลการทดลอง หาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	88
23	แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ต่อความคงตัวของเอนไซม์ ...	89
24	แสดงผลของสารเคมีต่อการทำงานของเอนไซม์	90

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างเซลลูโลส	4
2	ลักษณะของไมโครไฟบริล	4
3	โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป	5
4	แสดงลำดับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส	15
5	แสดงกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	16
6	แสดงการควบคุมการสร้างเซลลูเลสโดยเชื้อรา	21
7	แสดงวิธีการใช้ประโยชน์สารเหลือทิ้งเซลลูโลส	25
8	แสดงการเปลี่ยนแปลงชีวสารโดยวิธีทางชีววิทยา	26
9	แสดงความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเซลโลไบโอไฮโดรเลส I, II	30
10	กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณเอนไซม์ โดยใช้เซลลูคลาสเป็นมาตรฐาน	62
11	กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กลูโคสเป็นมาตรฐาน	64
12	กราฟแสดงการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีแอนไอออน-เอกเซนจุ์โครมาโทกราฟี .	75
13	กราฟแสดงการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น โครมาโทกราฟี	78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	กราฟแสดงการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีฟาสต์ โปรตีน-ลิควิด-โครมาโทกราฟี .	82
15	กราฟแสดงการทำให้บริสุทธิ์จากเครื่องฟาสต์-โปรตีน-ลิควิด-โครมาโทกราฟี	83
16	กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	85
17	กราฟแสดงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	87
18	รูปแสดงการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า (SDS-PAGE)	91
19	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ในรูปของอนุมูล $[HE^-]$ กับค่าความเป็นกรด-ด่าง	97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญญลักษณ์

%	=	เปอร์เซนต์
°C	=	องศาเซลเซียส
pKa	=	ค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว
V_e	=	ปริมาตรที่ใช้ในการล้างดูดซับสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์
V_t	=	ปริมาตรของคอลัมน์
V_o	=	ปริมาตรของคอลัมน์ส่วนที่เหลือหลังจากใส่ตัวดูดซับ
K_{av}	=	ค่าสัมประสิทธิ์ที่แสดงความสามารถในการแยกสาร
M.wt.	=	น้ำหนักโมเลกุล
KD_a	=	กิโลดาลตัน
%T	=	ค่าความเข้มข้นของเจลที่ใช้ทำตัวกลางค้ำจุนในการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า
®	=	เครื่องหมายการค้า
M	=	โมลาร์
μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ
e	=	พลังงานการกระตุ้นของอาเรเนียส
T	=	อุณหภูมิองศาเคลวิน
R	=	ค่าคงที่ของก๊าซ = 8.31 จูล/โมล/กิโลกรัม
e_o	=	ความเข้มข้นรวมของไอออนที่ปรากฏในสารละลาย
h	=	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน
α	=	แอลฟา
β	=	เบต้า
K_m	=	ค่าคงที่ของไมเซลลิส
K_o	=	ค่าคงที่ของการคะตะไลท์
a	=	ความเข้มข้นของสารตั้งต้น
K_a	=	K_o/K_m

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย