

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกเชื้อราจากกองขยะที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลส

จากการนำขยะหมักจากโรงกำจัดขยะรามอินทรา มาแยกเชื้อราที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสตามวิธีในข้อ 3.3 พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ 10 ชนิด และมีเพียง 3 ชนิดที่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ดี ให้ชื่อว่า V_1 , V_2 และ V_3 (รูปที่ 5) ซึ่ง V_1 แยกโดย ผศ.ดร.วิภาดา สุรัตน์กุล

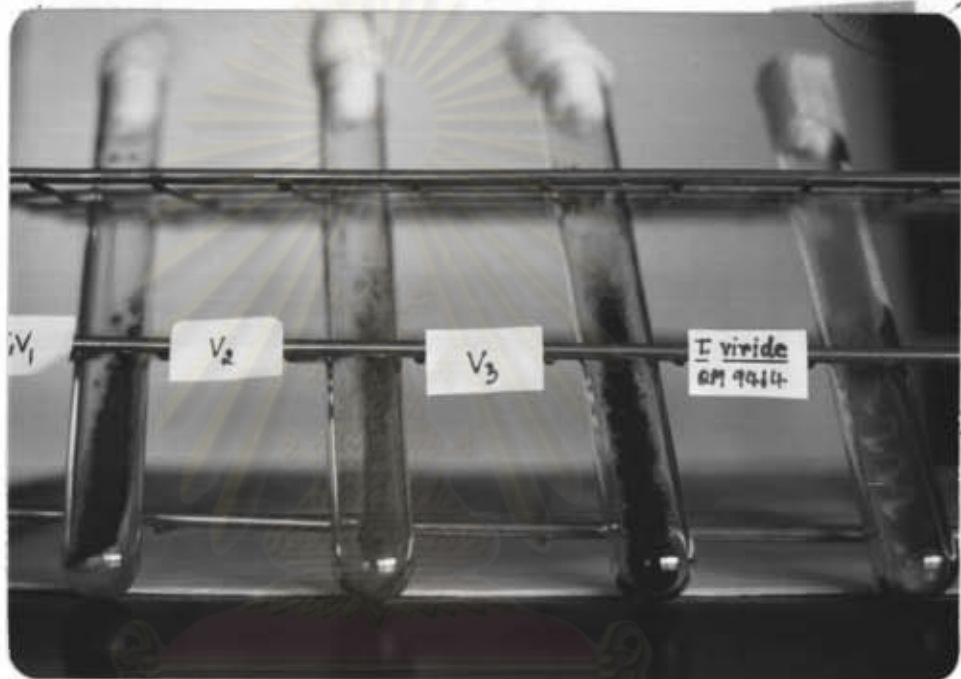
4.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อราที่แยกได้

ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อราที่แยกได้เปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน Trichoderma viride QM 9414 ซึ่ง Reese (1975) รายงานว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลสที่ค้ำที่สุด สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อทั้งสามที่แยกได้จากกองขยะมีสีของสปอร์แตกต่างกัน ส่วนสภาวะที่เหมาะสมและเวลาที่ใช้ในการสร้างสปอร์ไม่แตกต่างกันเลย และคุณสมบัติดังกล่าวมาของเชื้อที่แยกได้แตกต่างจากเชื้อมาตรฐาน T. viride QM 9414 โดยสิ้นเชิง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

4.3.1 ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อราทั้งสามที่แยกได้จากกองขยะและ T. viride QM9414 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นต่อคาร์บอน และติดตามการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีในข้อ 3.12.1 ผลการทดลองดัง



รูปที่ 5 เชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ V_1 , V_2 , V_3 และ *T. viride*
 เมื่อเลี้ยงบน PDA slant ที่อุณหภูมิห้อง (~ 30 องศา
 เซลเซียส)

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติบางประการของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะเปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน Trichoderma viride QM 9414 เมื่อเลี้ยงบน PDA slant ที่อุณหภูมิห้อง

Fungi	Colour of Spores	Condition of Spore Forming	Time for Spore Forming(days)
<u>Trichoderma viride</u> QM 9414	green	light	5-7
V ₁	black-green	dark	3-4
V ₂	yellowish-green	dark	3-4
V ₃	black	dark	3-4

แสดงในรูปที่ 6ก และ 6ข พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 5.0 V_1 สามารถเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์ไคค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับอีก 2 สายพันธุ์ แต่ยังคงต่ำกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน V_1 เจริญและสังเคราะห์เอนไซม์ไคค่อนข้างใช้เวลา 8 วัน ในขณะที่ *T. viride* ต้องใช้เวลานานถึง 10 วัน

4.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

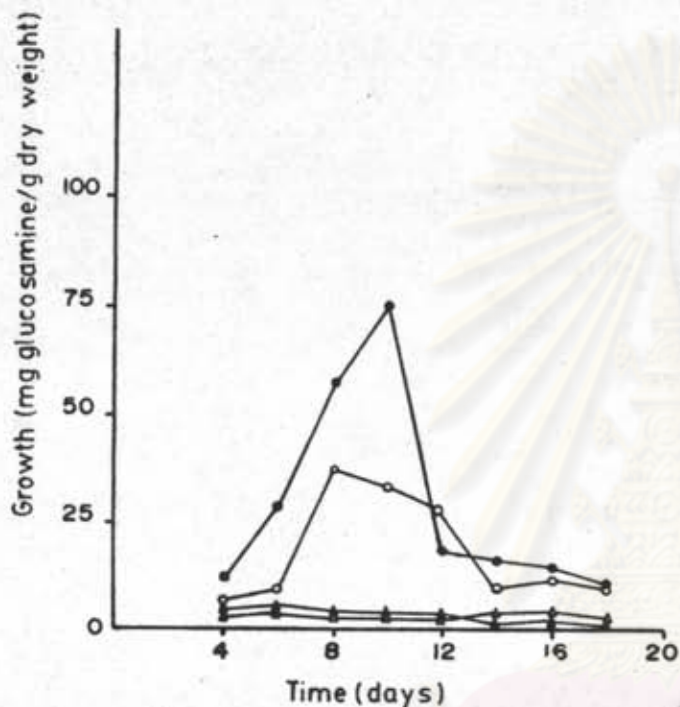
เชื้อรา V_1 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30-45 องศาเซลเซียส (ดูรูปที่ 7 ก, ข, ค, ง) ในขณะที่เชื้อมาตรฐานเจริญได้ดีที่อุณหภูมิเดียวคือ 30 องศาเซลเซียส ส่วนราชนิดอื่น ๆ มีการเจริญต่ำมาก เมื่อเทียบกับ V_1 และ *T. viride* ในกรณีของการสังเคราะห์เอนไซม์ (ดูรูปที่ 8 ก, ข, ค, ง) ก็เช่นเดียวกัน V_1 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30-45 องศาเซลเซียส ขณะที่ *T. viride* สังเคราะห์เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่านั้น และปริมาณเอนไซม์ที่สังเคราะห์โดย V_1 ที่ 45 องศาเซลเซียสมีค่าถึง 350 หน่วย/มิลลิลิตร สูงกว่าปริมาณเอนไซม์ที่สังเคราะห์โดย *T. viride* ที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 250 หน่วย/มิลลิลิตร

ในรูปที่ 9(ก, ข) แสดงผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ในแบบกราฟรูปแท่ง (Bar chart) เพื่อให้เห็นชัดยิ่งขึ้นว่า การเจริญของ V_1 ดีที่สุดที่ 40 องศาเซลเซียส *T. viride* เจริญได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส ในทำนองเดียวกัน การสังเคราะห์เอนไซม์ของ V_1 ใ้ปริมาณสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณเอนไซม์ที่สังเคราะห์โดย *T. viride* อีกด้วย

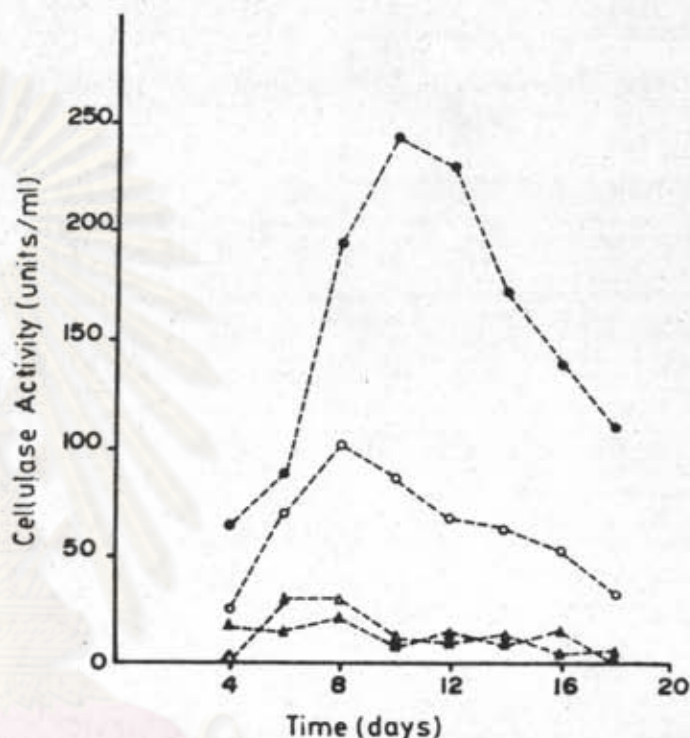
4.3.3 อิทธิพลของจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

V_1 เจริญได้ดีเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 9×10^6 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 10ก และ 10ข) และการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 9×10^6 สปอร์เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อจำนวนสปอร์สูงขึ้นทั้งการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสไม่สูงขึ้น โดยเฉพาะการเจริญมีแนวโน้มที่จะลดลงด้วย

รูปที่ 6 ก



รูปที่ 6 ข



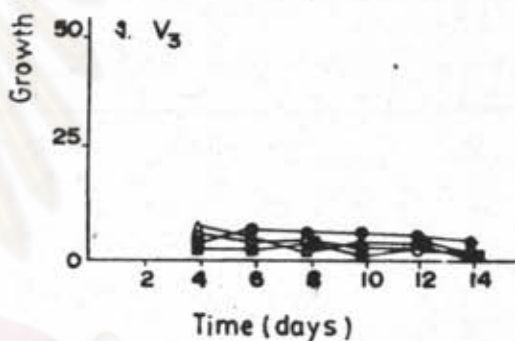
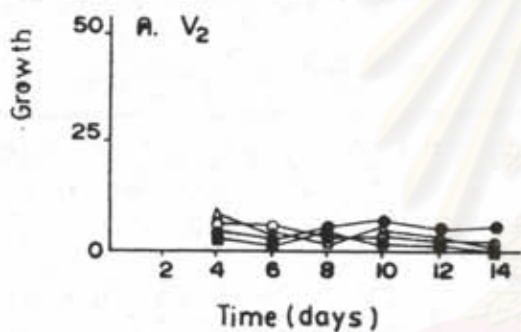
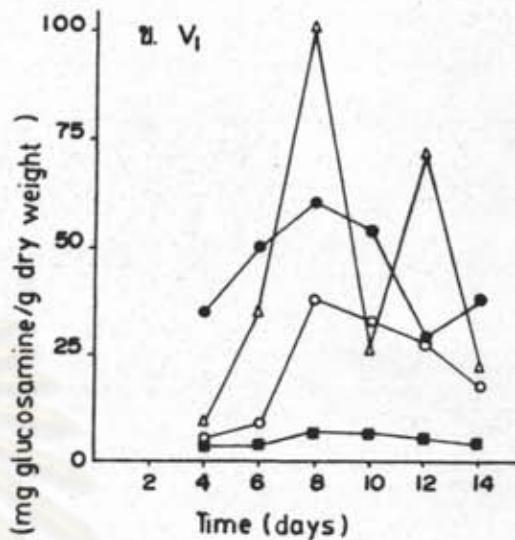
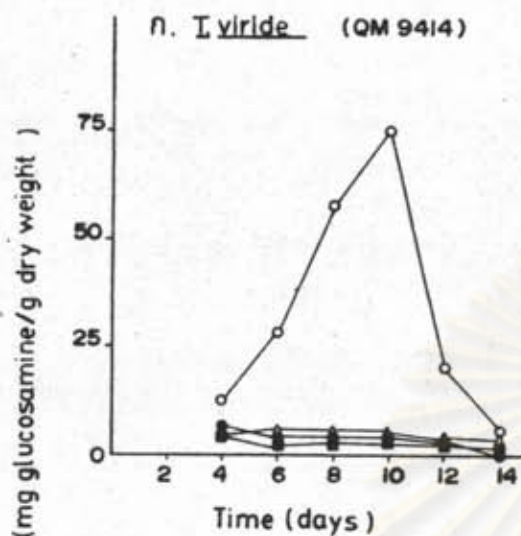
รูปที่ 6 (ก,ข) เปรียบเทียบการเจริญและแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลสของ *Trichoderma*

viride (QM 9414), V₁, V₂, V₃ ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ -

แอลฟา-เซลลูโลส เป็นต้นตอคาร์บอน pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 30°ซ.

(รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 3.12.1)

การเจริญ		เซลลูเลสแอกติวิตี	
●—●	<i>T. viride</i> (QM 9414)	●- - ●	<i>T. viride</i> (QM 9414)
○—○	V ₁	○- - ○	V ₁
▲—▲	V ₂	▲- - ▲	V ₂
△—△	V ₃	△- - △	V ₃

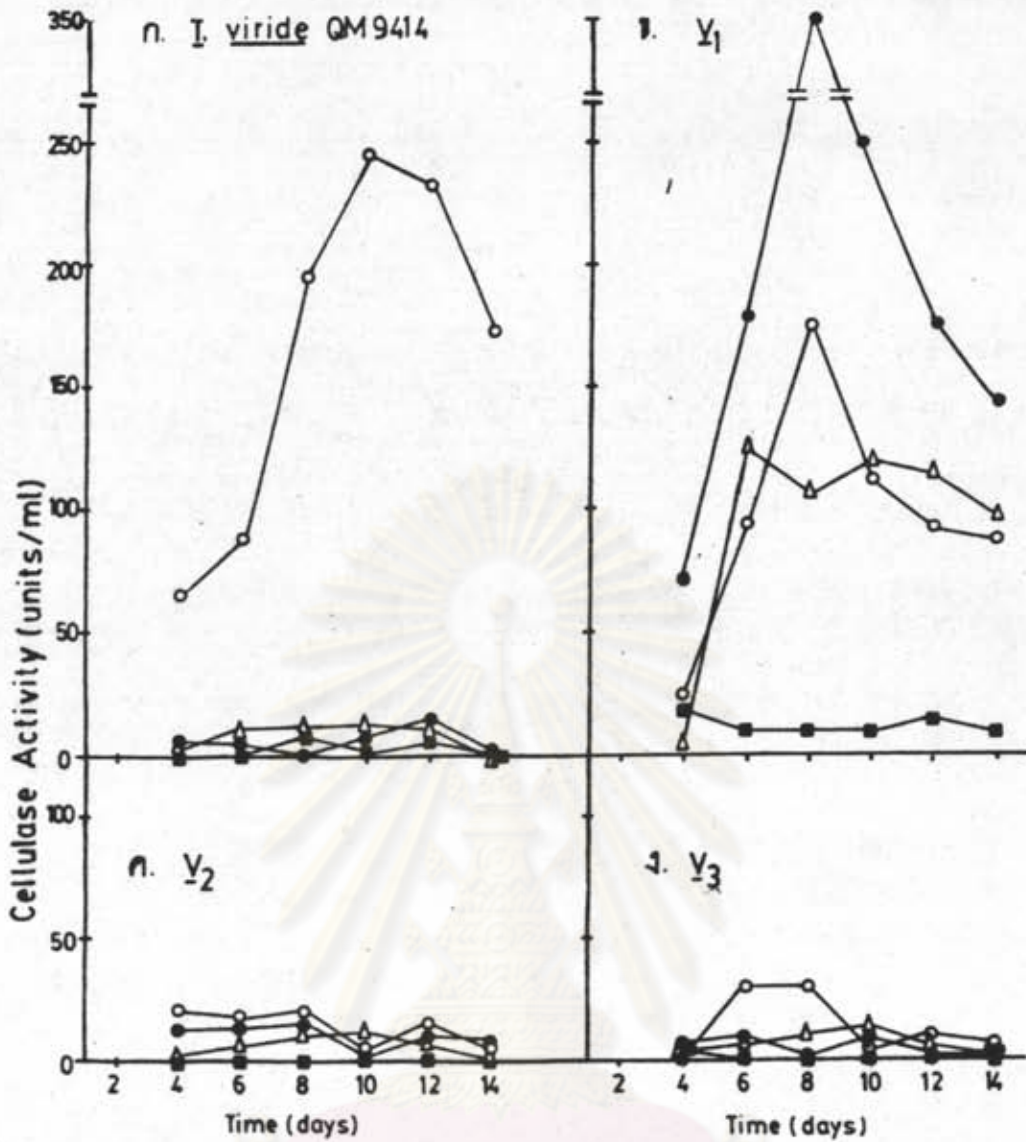


รูปที่ 7 (ก,ข,ค,ง) เปรียบเทียบการเจริญของ *T. viride* (QM 9414), V₁, V₂ และ V₃ เมื่อเลี้ยง -

ในอาหารเหลวที่มีแอลฟา-เฮลลูโลส เป็นต้นต่อคาร์บอน pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 45 และ 50° C
 (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 3.12.2)

การเจริญของราที่อุณหภูมิ

- — ○ 30° C.
- △ — △ 40° C.
- — ● 45° C.
- — ■ 50° C.



รูปที่ 8 (ก,ข,ค,ง) เปรียบเทียบแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลสของ *I. viride* (QM 9414)

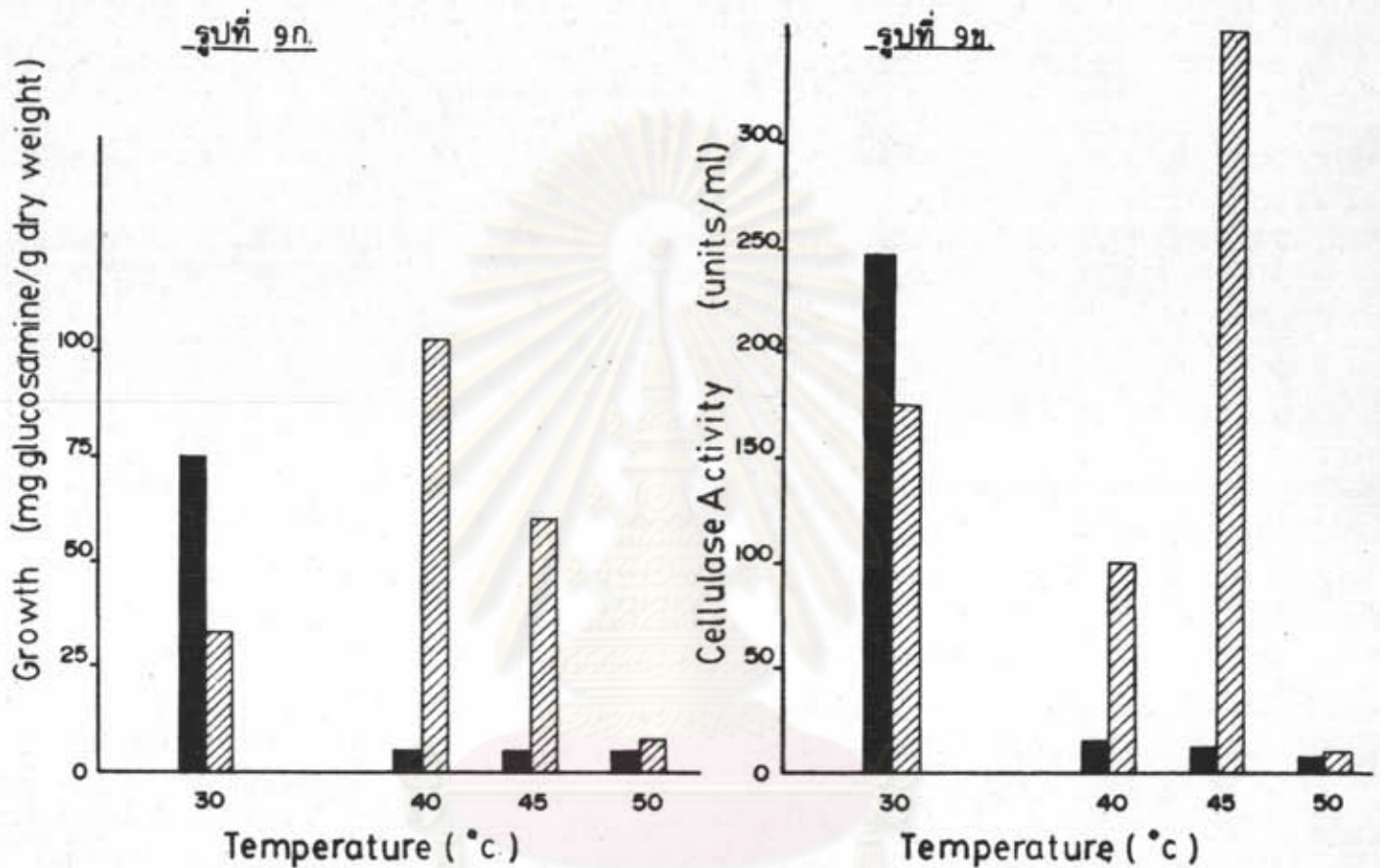
V_1, V_2, V_3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแอลฟา เซลลูโลส เป็นต้นตอคาร์บอน pH 5.0

ที่อุณหภูมิ 30°, 40°, 45° และ 50° ซ. (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการ

ทดลองข้อ 3.12.2)

เซลลูเลสแอกติวิตี ที่อุณหภูมิ

- — ○ 30° ซ.
- △ — △ 40° ซ.
- — ● 45° ซ.
- — ■ 50° ซ.



รูปที่ 9 (ก, ข) เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลส

ของ *Trichoderma viride* (OM 9414) และ V₁ เมื่อใช้ -

แอลฟา - เซลลูเลส เป็นสารตั้งต้นคาร์บอนเลี้ยงไว้เป็นเวลา 8 วัน

(รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 3.12.2)

Trichoderma viride (OM 9414).

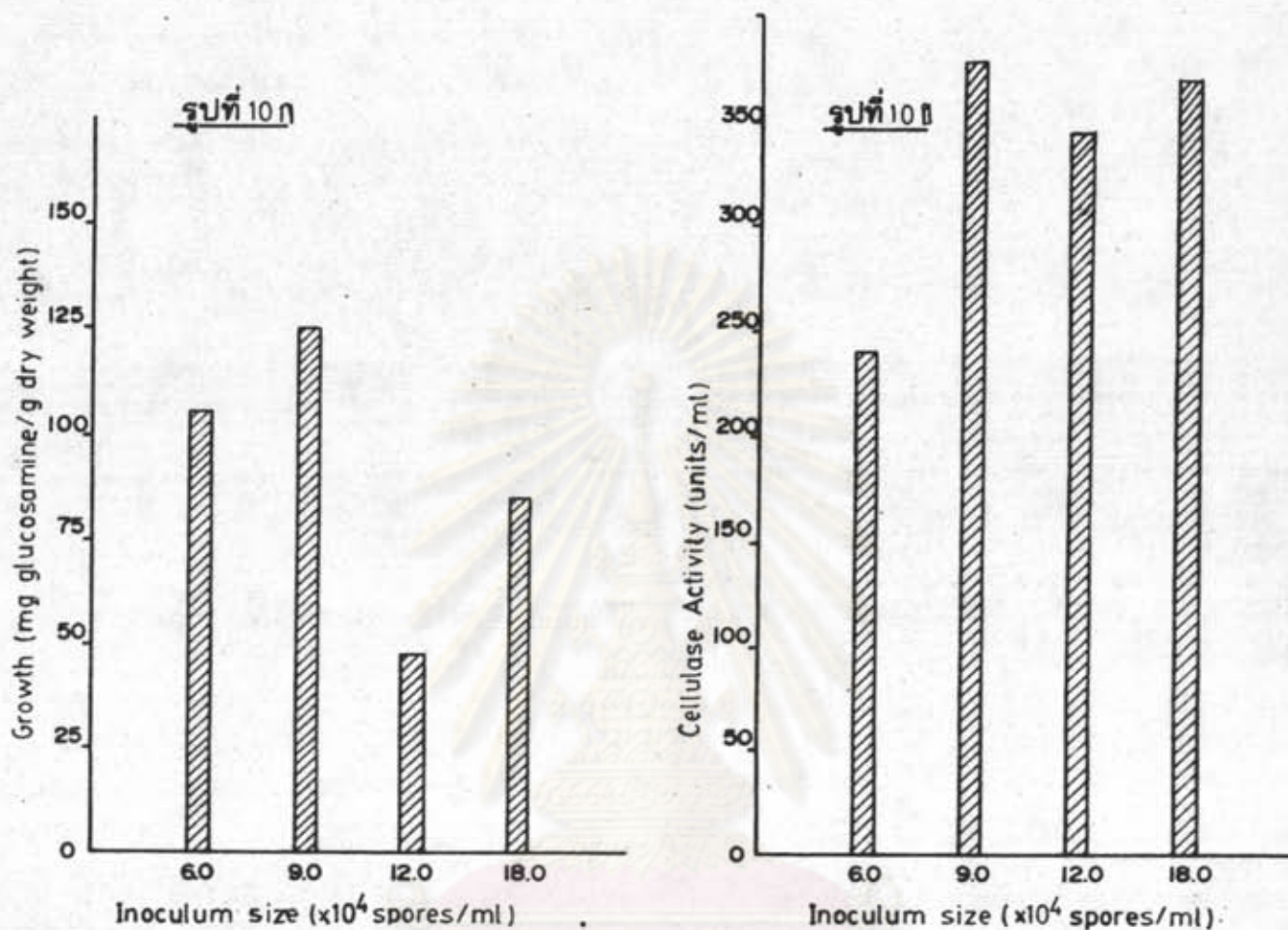


V₁.



ก. การเจริญของรา.

ข. แอกติวิตีของเซลลูเลส.



รูปที่ 10 (ก, ข) แสดงผลของจำนวนสปอร์ต่อการเจริญและแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรที่มีแอลฟา - เซลลูโลส เป็นต้นตอคาร์บอน อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 8 วัน (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 3.12.3)

ก. การเจริญของเรา

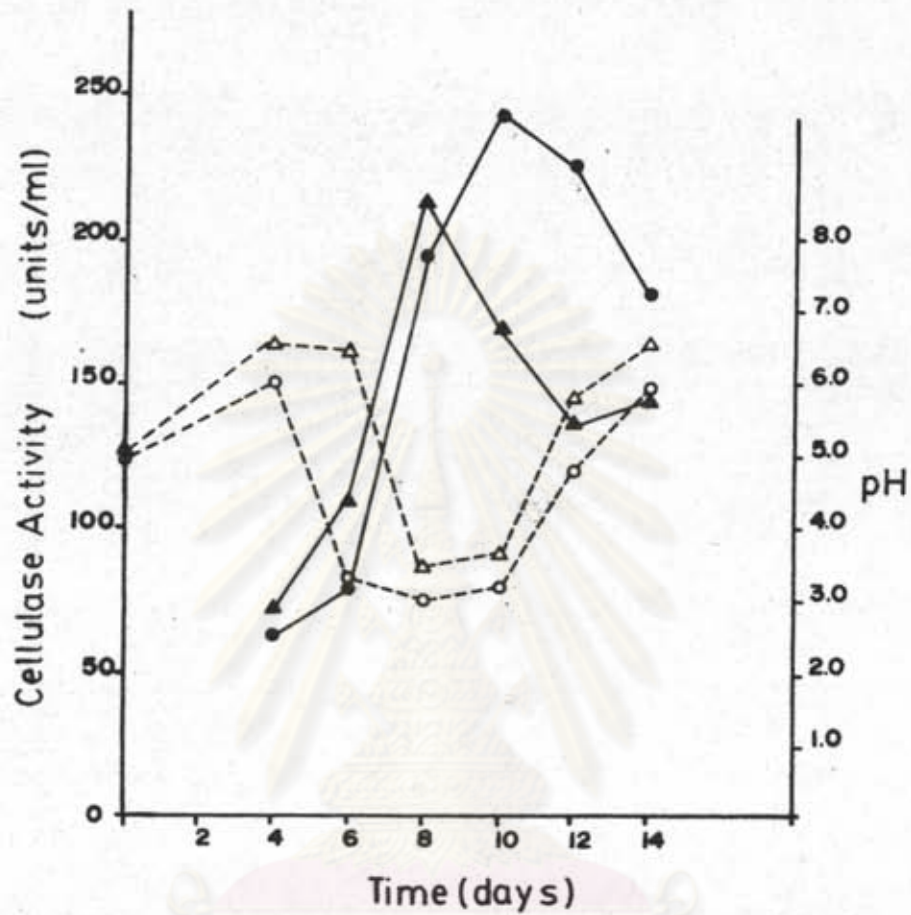
ข. แอกติวิตีของเซลลูเลส

4.3.4 ผลของ pH ต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1

ในระหว่างที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ของ V_1 และ *T. viride* ได้ทำการเปลี่ยนแปลง pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า pH จะลดลงในขณะที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด (รูปที่ 11) จึงคิดว่าน่าจะเป็นไปได้ว่า pH อาจจะมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1 จึงได้ทดลองเลี้ยงเชื้อรา V_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้นต่างๆตั้งแต่ 3.0 ถึง 7.0 และวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ จากผลการทดลองในรูปที่ 12 จะเห็นว่า pH ไม่น่าจะมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์มากนัก ที่ pH 4.0, 5.0 และ 6.0 ช่วงเวลาในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด คือ 8 วัน แต่ที่ pH 6.0 การสังเคราะห์เอนไซม์ต่ำกว่าที่ pH 4.0 และ 5.0 และที่ pH ค่าถึง 3.0 และสูงถึง 7.0 จะมีผลต่อทั้งช่วงเวลาในการสังเคราะห์เอนไซม์ และปริมาณเอนไซม์ที่สังเคราะห์

4.3.5 ผลกระทบของกลูโคสต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1

การศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *T. viride* และ V_1 เมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอนนั้น แน่นอนที่แอลฟา-เซลลูโลสจะต้องถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้น แต่อัตราการเพิ่มของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าอัตราการเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะสูงสุด (160 ไมโครกรัม กลูโคส/มิลลิลิตร) หลังจากการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด และจากนั้นจะคงที่หรือลดลง (รูปที่ 13 ก, ข) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของกลูโคสต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส เพื่อศึกษาว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นจะมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1 หรือไม่ จากผลการทดลองศึกษาผลกระทบของกลูโคสต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1 เมื่อเลี้ยง V_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสจาก 0-500 มิลลิโมล/ลิตร ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 14ก จะเห็นว่าปริมาณกลูโคสสูงถึง 25 มิลลิโมล/ลิตรจึงเริ่มมีผลกระทบต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งปริมาณและช่วงเวลาในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด และจะเห็นผลกระทบได้ชัดที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงถึง 100 มิลลิโมล/ลิตร รูปที่ 14ข แสดงการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารที่มีกลูโคส 0-10



รูปที่ 11.

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลสของ *Trichoderma viride* (QM 9414) และ *V1* กับการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเลี้ยงเชื้อของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งลงในอาหารเหลวที่มีแอลฟา - เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นต่อคาร์บอน pH เริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 30°C.

●—●—●

เซลลูเลสแอกติวิตีของ *T. viride* (QM 9414)

▲—▲—▲

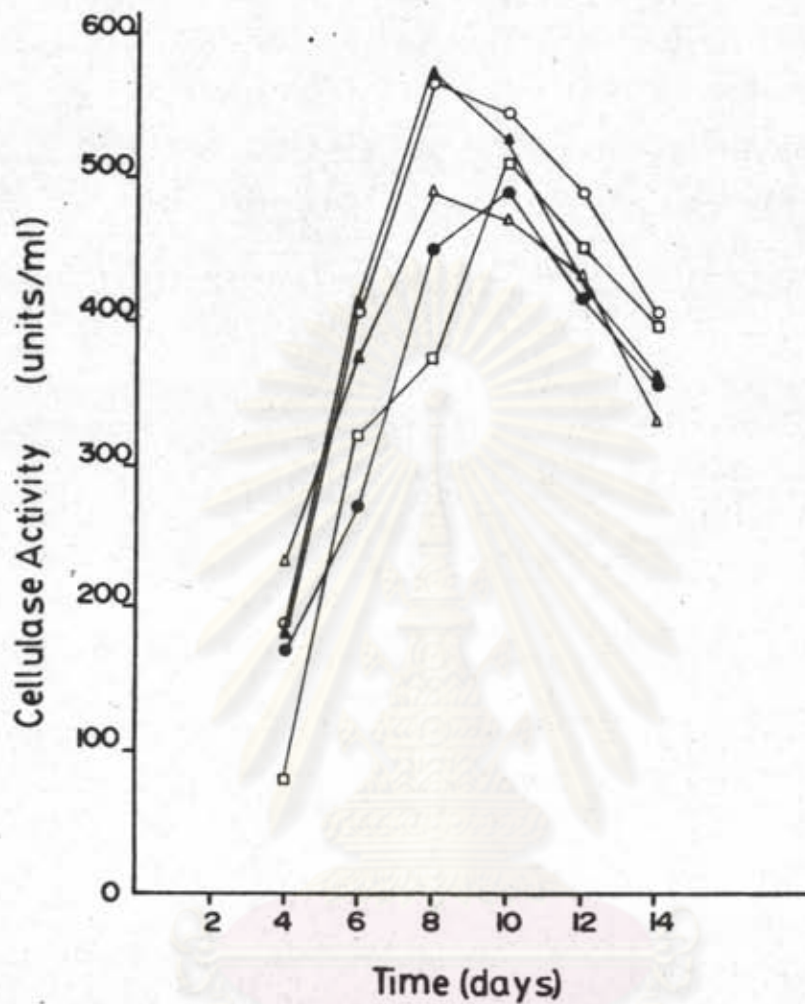
เซลลูเลสแอกติวิตีของ *V1*

○---○---○

pH ของอาหารในระหว่างการเลี้ยงเชื้อของ *T. viride* (QM 9414)

△---△---△

pH ของอาหารในระหว่างการเลี้ยงเชื้อของ *V1*



รูปที่ 12 เปรียบเทียบแอดติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อ v, เมื่อใช้แอลฟา - ดีลฟีโลล

เป็นสารตั้งต้นคาร์บอนที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0

ที่อุณหภูมิ 45°C (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 3.12.4)

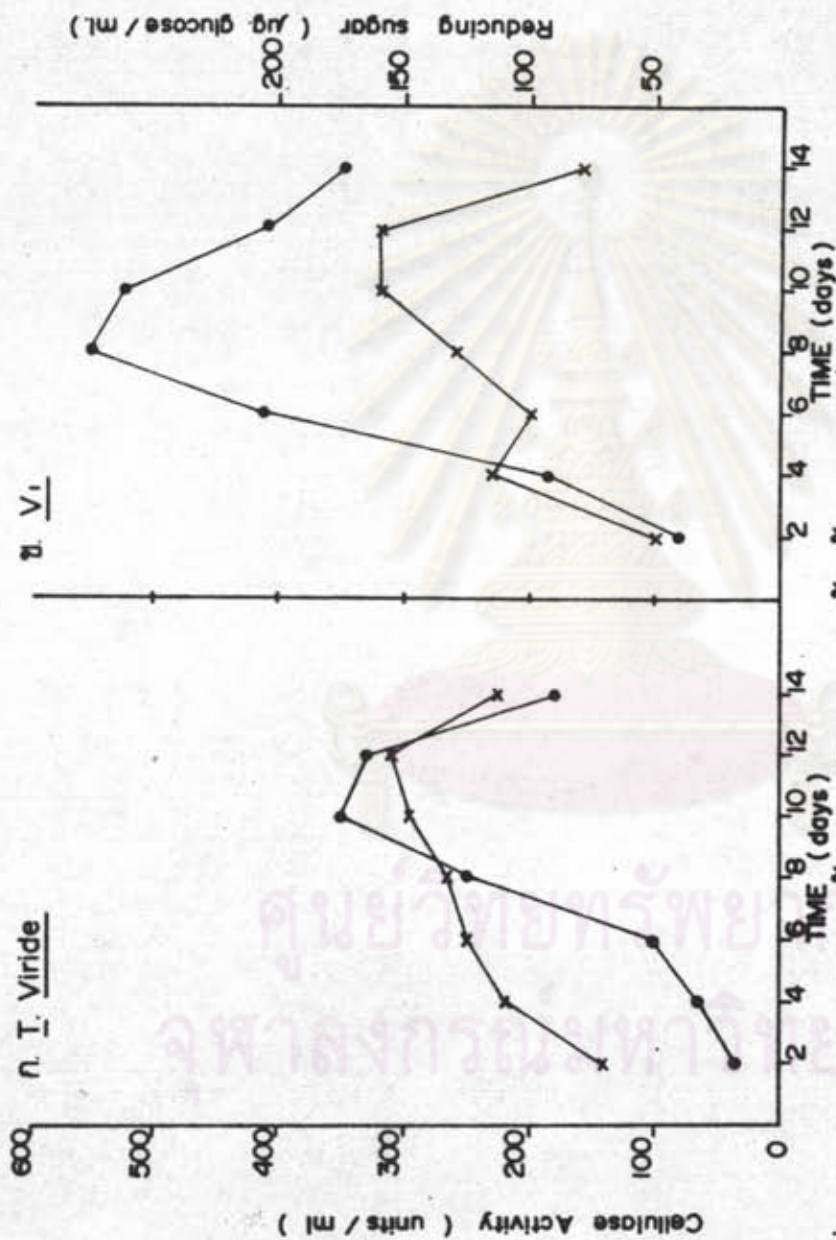
● — ● pH 3.0

▲ — ▲ pH 5.0

□ — □ pH 7.0

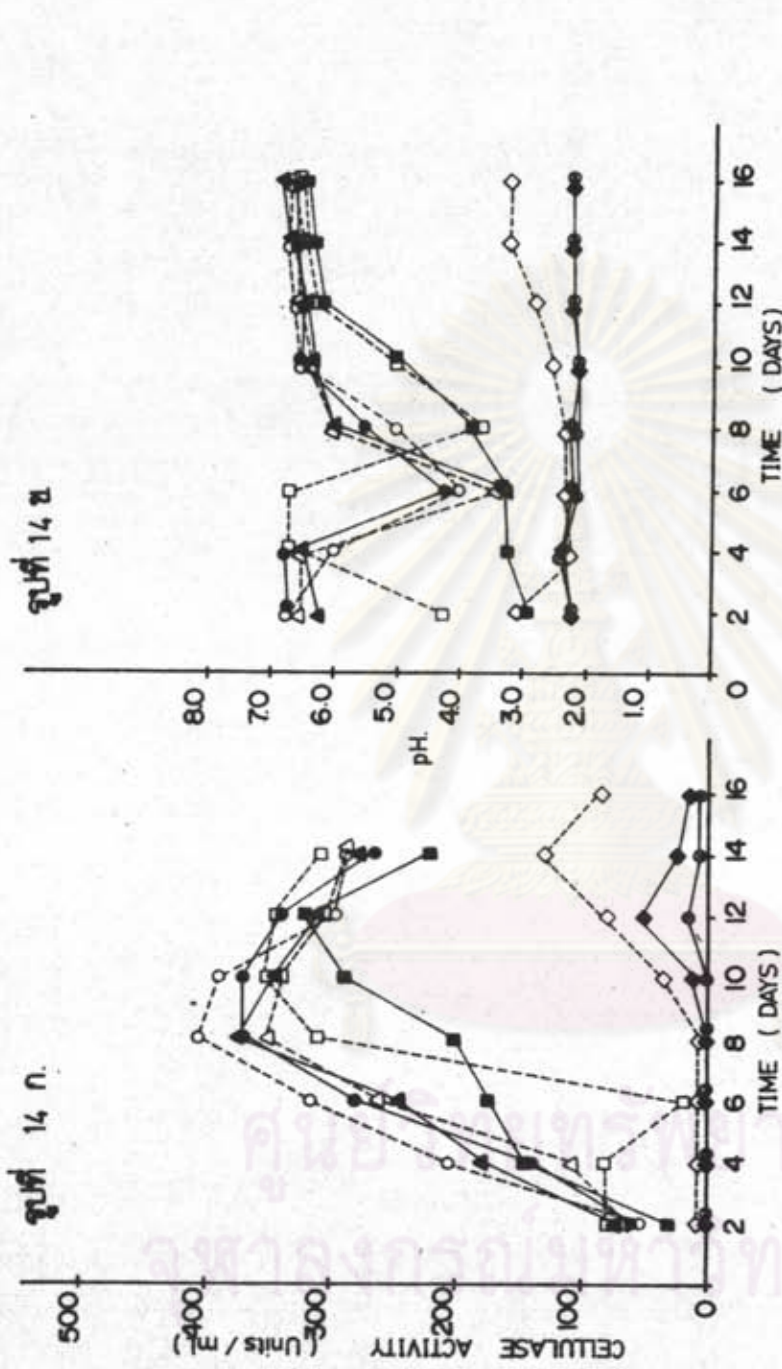
○ — ○ pH 4.0

△ — △ pH 6.0



รูปที่ 13 (ก,ข) แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ระหว่างที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *I. viride* (ก) และ *V.1* (ข) เมื่อเลี้ยงเชื้อในห้องอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี แอสตา - เซลลูโลส เป็นสารตั้งต้นคาร์บอน pH. เริ่มต้น

5.0 จำนวนสปอร์เริ่มต้น 8.0×10^6 สปอร์/100 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ. สำหรับ *I. viride* และ 45°ซ. สำหรับ *V.1* (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 3.12.1) : (●—●) เซลลูเลสแอสตาวิต, (x—x) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 14 (ก.ข) ผลของกลูโคสต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูโลสของ *V. (ก)* และการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในขณะที่มีการเลี้ยงเชื้อหอยเชอรี่ในอาหารที่มีแอลฟา - ดีออกไซด์ pH. 5.0 ที่

อุณหภูมิ 45 °C โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 0 (○-○), 1 (●-●), 5 (◐-◐), 10 (◑-◑), 25 (◒-◒),

50 (◓-◓), 100 (◔-◔), 250 (◕-◕) และ 500 (◖-◖) มิลลิโมล / ลิตร (รายละเอียดของการทดลอง

ระบุในวิธีทดลองข้อ 3, 12, 5)

มิลลิโมล/ลิตรจะเป็นแบบเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารที่มีกลูโคสตั้งแต่ 25 มิลลิโมล/ลิตรเป็นต้นไปจะมีรูปแบบเปลี่ยนไป โดยเฉพาะในอาหารที่มีกลูโคส 100-500 มิลลิโมล/ลิตร รูปแบบของการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารจะเปลี่ยนไปอย่างมาก pH จะอยู่ในระดับต่ำ คือ เป็นกรดไปตลอดการทดลอง

4.4 การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสในรา V_1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

ในรูปที่ 15 แสดงผลการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส การเจริญ การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารขณะที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมคือใช้แอลฟา-เซลลูโลส (1%) เป็นสารตั้งต้นคาร์บอน จำนวนสปอร์เริ่มต้น 9×10^6 สปอร์/อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิ-ลิตร pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของ V_1 จะดำเนินไปพร้อมๆกัน การสังเคราะห์เอนไซม์สูงขึ้น การเจริญก็สูงขึ้นด้วย การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของ V_1 จะสูงสุดวันที่ 8 เช่นเดียวกัน เมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์ลด การเจริญก็ลด ในทำนองเดียวกันปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารจะเพิ่มขึ้นเมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์สูงขึ้น และจะลดลงเมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์ลดลง แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะสะสมอยู่ระยะหนึ่งแล้วจึงลด ในทางกลับกันเมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์สูงขึ้น pH ของอาหารจะลดลง การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด pH ก็ลดลงต่ำสุด และเมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์ลดลง pH ของอาหารจะสูงขึ้น

4.5 การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสในรา V_1

4.5.1 เมื่อเลี้ยง V_1 ในอาหารซึ่งมีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน
นอกจากเซลลูโลสจะเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชแล้ว เซมิเซลลูโลสก็เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่มากรองจากเซลลูโลส ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายวัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ มักจะพบว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสไปพร้อมกัน จึงได้วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไซลาเนสของ V_1 ในขณะที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส พบว่านอกจากการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสแล้ว V_1 ยังสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสซึ่งย่อยสลายเซมิเซลลูโลสอีกด้วย โดยรูปแบบของการ

สังเคราะห์คล้ายกับการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (รูปที่ 16) แต่ระดับของแอกติวิตีของเอนไซม์โซลานีสที่สังเคราะห์ได้มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับเซลลูเลส

4.5.2 เมื่อเลี้ยง V_1 ในอาหารซึ่งมีฟางข้าวเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน

จากการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส และโซลานีสของ V_1 เมื่อใช้ฟางข้าวซึ่งมีทั้งเซลลูโลสและไซแลนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ในสภาวะที่เหมาะสมตามวิธีทดลองในข้อ 3.21 (รูปที่ 17) พบว่า รูปแบบของการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส และโซลานีสยังคงเหมือนเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน แต่ระดับของเอนไซม์โซลานีสมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอนเกือบ 20 เท่า

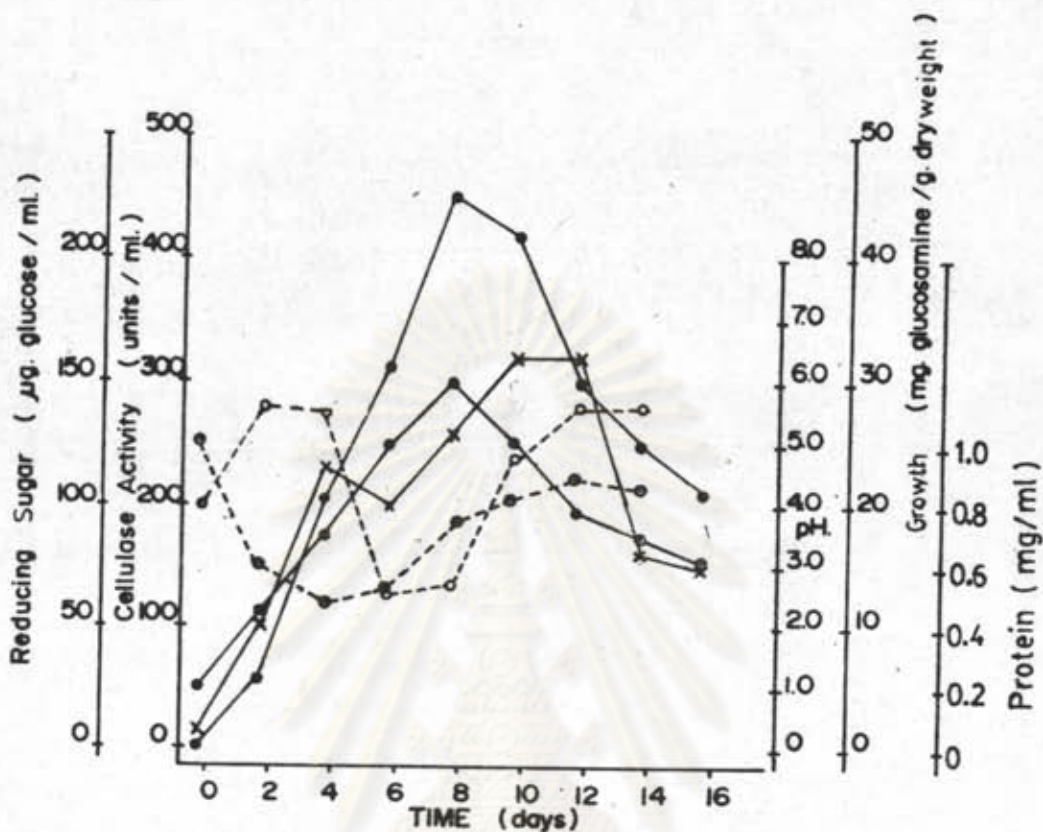
4.6 ความสามารถของเซลลูเลสในการใช้สับสเตรตต่างๆ

เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเป็นมัลติคอมโพเนนท์เอนไซม์คอมเพล็กซ์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดมาทำงานร่วมกัน และเอนไซม์โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรต จึงได้ทำการศึกษาเพื่อวัดความสามารถของเซลลูเลสในการใช้สับสเตรตต่างๆ พบว่าเอนไซม์จาก V_1 นี้สามารถใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส อะวิเซล แอลฟา-เซลลูโลส กระดาษกรอง และออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์เป็นสับสเตรตได้ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังได้แสดงแอกติวิตีของเอนไซม์โซลานีสและโปรติโอไลติกแอกติวิตี (proteolytic activity) ไวด้วย ซึ่งพบว่าไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในสารละลายเอนไซม์จากเชื้อราชนิดนี้

4.7 การจำแนกชนิดของเชื้อรา V_1

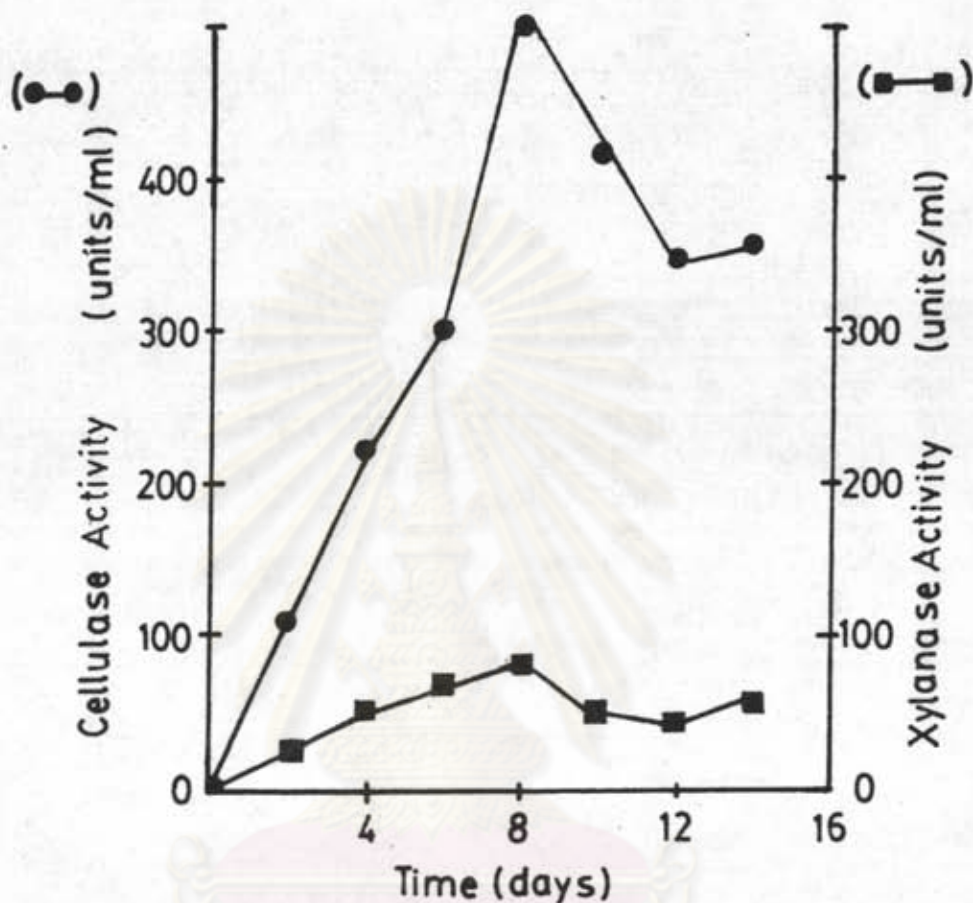
เชื้อรา V_1 ซึ่งแยกได้จากกองขยะนี้มีสีของสปอร์เป็นสีเขียวในระยะแรก และเมื่อสปอร์แก่จะมีสีเขียวดำ จากลักษณะของไมซีเลียม สีของสปอร์ และโครงสร้างของ conidiophore รศ.ดร.สุมาลี พิษณุางกูร¹⁾ ให้ความเห็นว่า เป็นราใน genus *Aspergillus* แต่ไม่ทราบ species ที่แน่นอน จึงส่งเชื้อ V_1 นี้ไปที่ Mycology Section of Baarn, Netherlands. ปรากฏว่าเชื้อรา V_1 คือ *Aspergillus fumigatus* Fresenius.

1) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

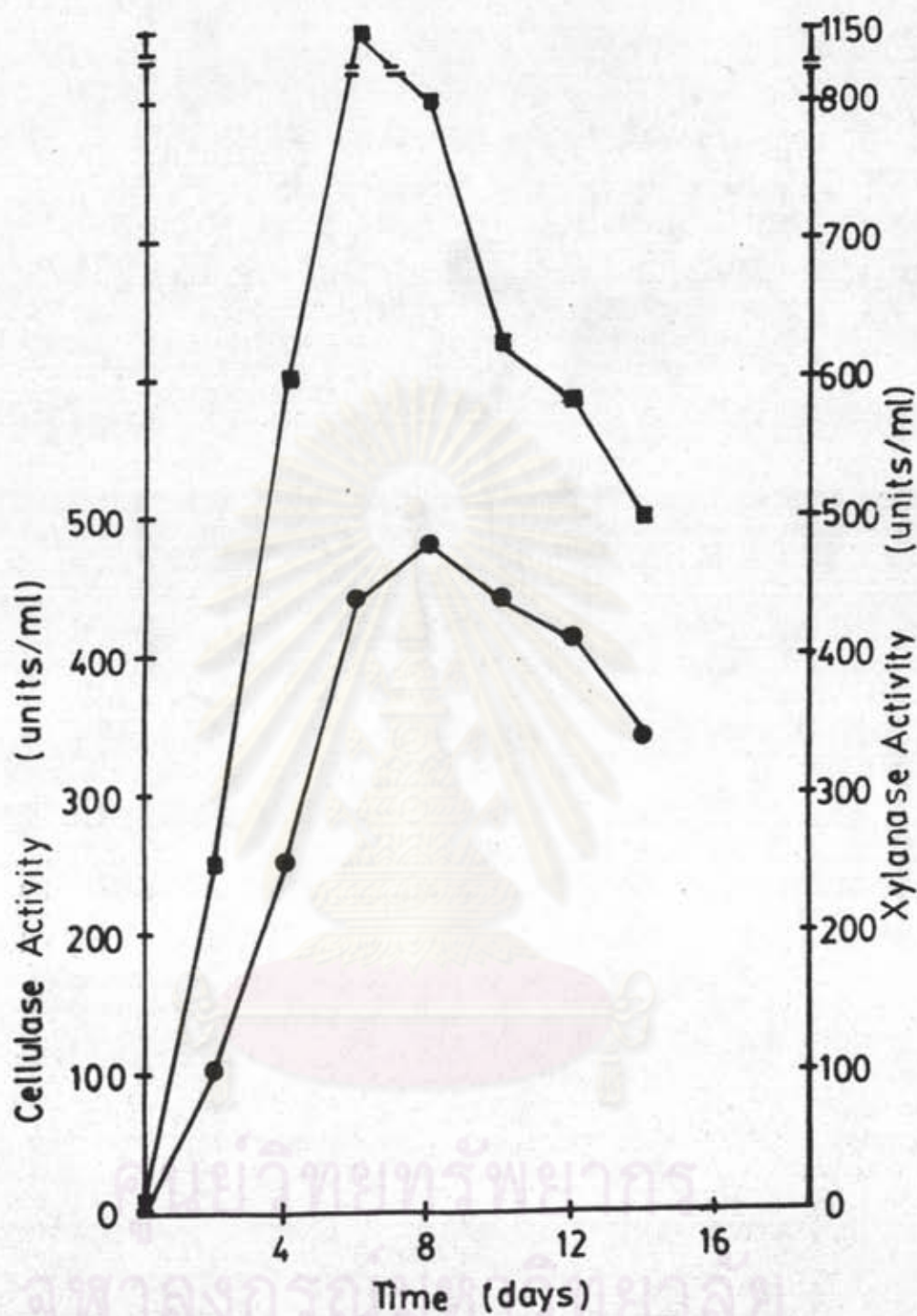


รูปที่ 15 แลคงแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส การเจริญ การเปลี่ยนแปลง pH. ของอาหาร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีนขณะที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *V.* เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมคือใช้ แอลฟา - เซลลูโลส (1%) เป็นสารตั้งต้นคาร์บอน จำนวนสปอร์เริ่มต้น 9.0×10^6 สปอร์/100 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ pH. เริ่มต้น 5.0 ที่อุณหภูมิ 45°C . (รายละเอียดระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 3.12)

- | | | | |
|-------|-------------------|-----|---------------------|
| —●— | เซลลูเลสแอกติวิตี | —●— | ปริมาณกลูโคซามีน |
| ○---○ | pH | ×—× | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ |
| ●---● | ปริมาณโปรตีน | | |



รูปที่ 16 แสดงแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลส และไซทาเนส
ของ V_1 เมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลส เป็นสารตั้งต่อ
คาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45°C . pH 5.0 (รายละเอียด
ของการทดลองระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 3.12.1 และข้อ
3.6.3): ●—● เซลลูเลสแอกติวิตี, ■—■
ไซทาเนสแอกติวิตี



รูปที่ 17 แสดงแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลส และไซทาเนสของ V_1 เมื่อให้ฟางข้าวเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45°C . pH 5.0 (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 3.12.1 และ ข้อ 3.6.3): (●—●) เซลลูเลสแอกติวิตี (■—■) ไซทาเนสแอกติวิตี

ตารางที่ 3 ความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ที่เตรียมจาก V_1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน pH 5.0 อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 4 วันในเพอร์เมนเตอร์ตามวิธีในข้อ 3.13.1

Substrate	Activity
Filter paper	0.05 FP units/ml
α -Cellulose	170.00 units/ml
Carboxymethyl cellulose	193.00 units/ml
Avicel(Microcrystalline cellulose)	76.20 units/ml
o-Nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside	20.40 units/ml
Xylan (Xylanase Activity)	60.00 units/ml
Casein (Proteolytic Activity)	0 units/ml



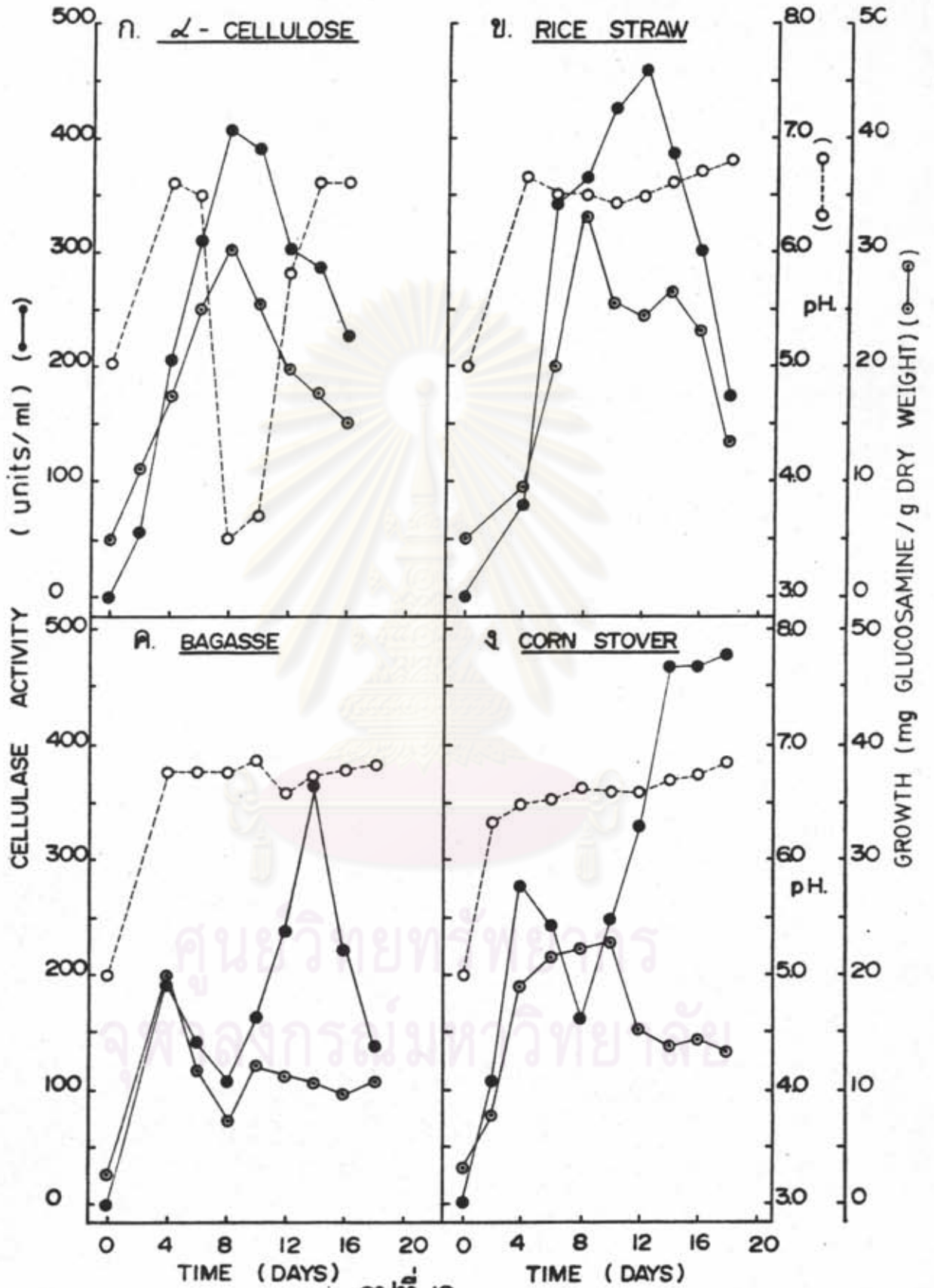
4.8 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของ A. fumigatus Fres. (V₁) เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นนั้นพบว่า A. fumigatus Fres. (V₁) สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้สูง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน pH 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน เมื่อเทียบกับ T. viride และเชื้อตัวอื่นที่แยกได้ จึงเลือก A. fumigatus Fres. (V₁) มาศึกษาต่อไป ในการทดลองใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน ในการเลี้ยง A. fumigatus Fres. (V₁) ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และติดตามการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเมื่อใช้ฟางข้าว ชานอ้อย และขี้ข้าวโพดเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน การเจริญของ A. fumigatus Fres. (V₁) จะสูงสุดใช้เวลา 8, 4 และ 10 วันตามลำดับ ทั้งนี้แตกต่างไปจากเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน การเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสจะสูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 วันเท่ากัน สำหรับปริมาณการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสนั้นมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ขี้ข้าวโพดเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน คือ วัตแอกติวิตีได้ถึง 475 หน่วย/มิลลิลิตร รองลงมาเมื่อใช้ฟางข้าว แอลฟา-เซลลูโลส และชานอ้อยเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน (รูปที่ 18 ก, ข, ค, ง)

การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าว ชานอ้อย และขี้ข้าวโพด ในขณะที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส มีไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลลูโลส

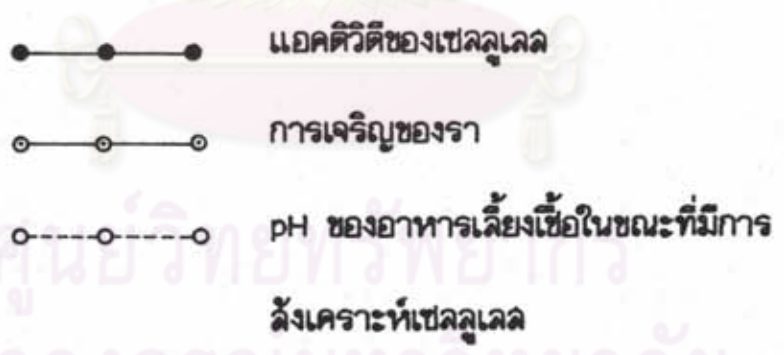
4.9 ผลการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา A. fumigatus Fres. (V₁) ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาดจุ 10 ลิตร ตามวิธีทดลองในข้อ 3.13.1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้วข้างต้น คือ ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และติดตามการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสว่าจะสูงสุดใช้เวลานานเช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าหรือไม่ จากผลการทดลองในรูปที่ 19 พบว่า การเจริญของ A. fumigatus Fres. (V₁) สูงขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเมื่อเลี้ยงไว้นาน 96 ชั่วโมง (4 วัน) ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าการเลี้ยงในขวดแบบเขย่า pH ของ

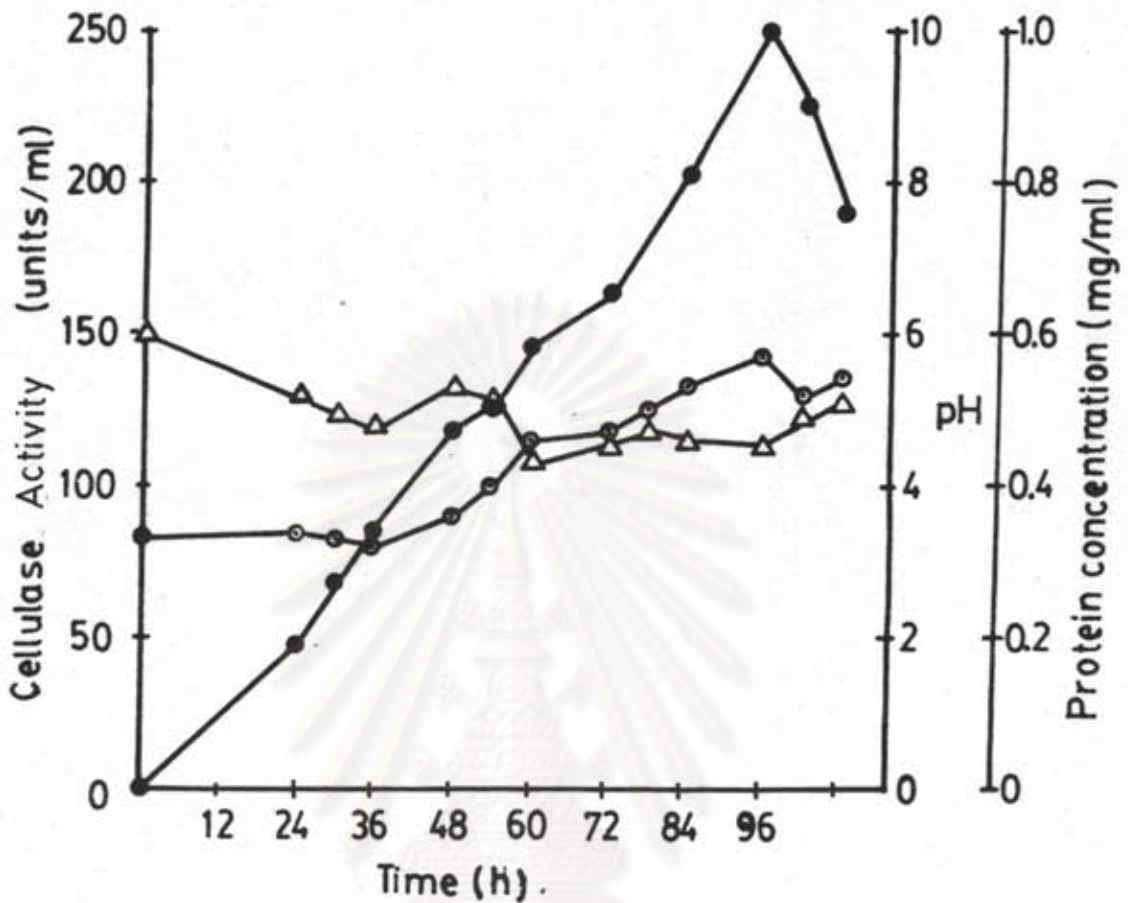


รูปที่ 18.

รูปที่ 18 (ก,ข,ค,ง) เปรียบเทียบแอกติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลส การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* Fres (Vi) และการเปลี่ยนแปลง pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง เชื้อรานี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1% ของแอลฟา-เซลลูโลส ฟางข้าว ชานอ้อย และขังข้าวโพด เป็นสารตั้งต้นคาร์บอน pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 45°C. และใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 9×10^6 สปอร์ / 100 มิลลิเมตรของอาหาร เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 วัน



ศูนย์วิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 รูปแบบของแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณโปรตีน และการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *A. fumigatus* Fres. (V₁) ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 10 ลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 300 รอบ ต่อนาที อัตราถ่ายอากาศ 2.5 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน pH 5.0 อุณหภูมิ 45°ซ. ตามวิธีทดลองในข้อ 3.13.1

●—● เซลลูเลสแอกติวิตี ○—○ ปริมาณโปรตีน
 △—△ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลงเมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเริ่มสูงขึ้น และเมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์ลดลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อก็สูงขึ้นเช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า จากนั้นเลี้ยงเชื้อรา A. fumigatus Fres. (V₁) ในเฟอร์เมนเตอร์ขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ลิตร pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน ได้ crude enzyme 2,600 มิลลิลิตรที่มีแอกติวิตีของเซลลูเลส 177.25-250.00 หน่วย/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 0.57-0.60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (จากการทดลอง 3 ครั้ง)

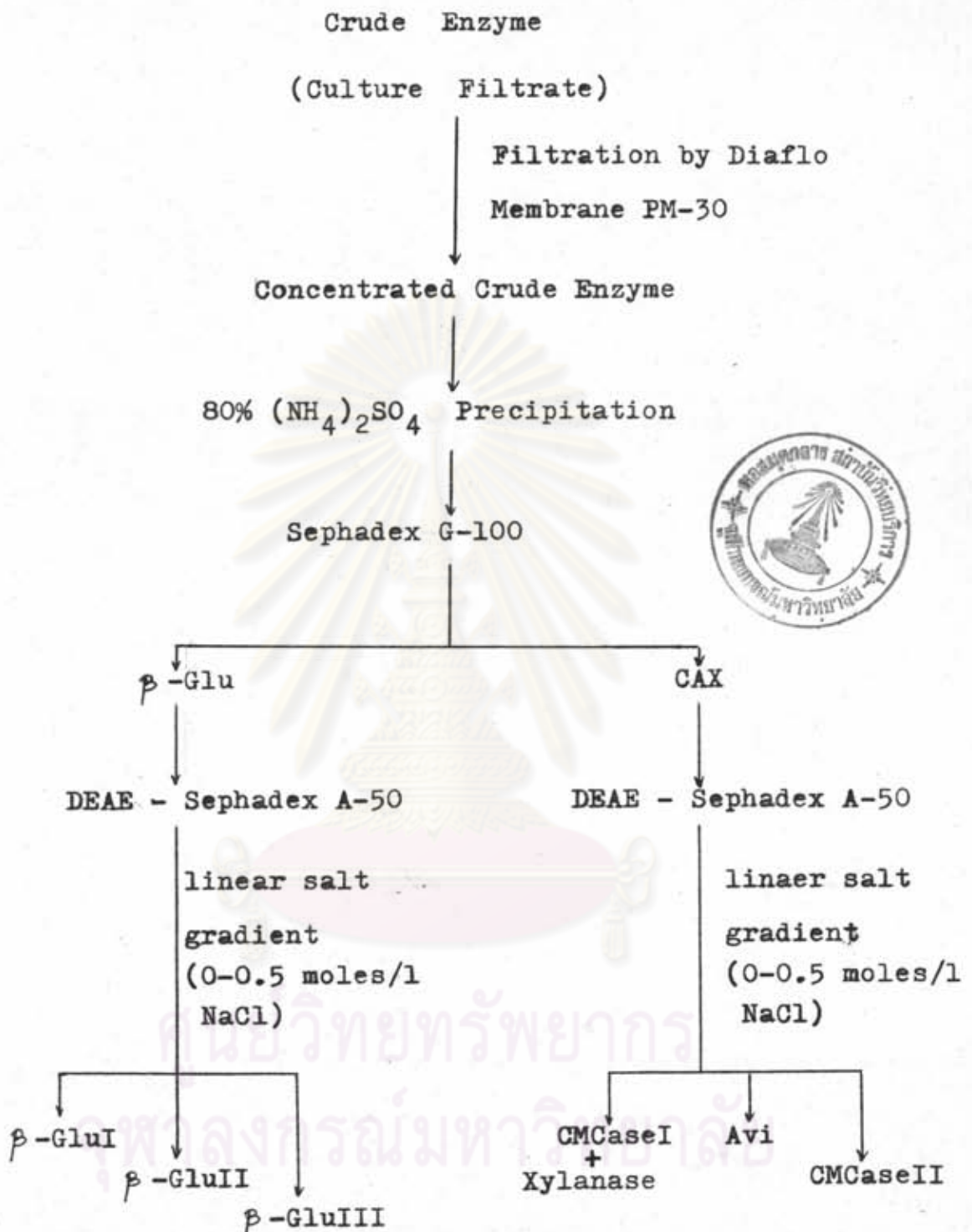
สำหรับผลการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณมากโดยวิธี 3.13.2 โดยเลี้ยงเชื้อราในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 วัน ได้ crude enzyme 2120 มิลลิลิตร แอกติวิตีของเซลลูเลส 300-560 หน่วย/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 0.55-1.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (จากการทดลอง 5 ครั้ง)

4.10 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นำ crude enzyme ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์หรือจากการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าตามข้อ 4.9 มาทำให้เข้มข้นขึ้นประมาณ 3 เท่า โดยกรองผ่าน Diaflo Membrane PM-30 ด้วยเครื่องอุลตราฟิลเตรชัน (Ultra-filtration) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านชั้นตอนต่างๆ (รูปที่ 20) ดังนี้คือ (ทุกชั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส)

4.10.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ได้ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตละเอียด โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-20, 20-40, 40-60 และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ 0-20 และ 20-40 เปอร์เซ็นต์ไม่ปรากฏตะกอนของโปรตีนเลย เริ่มเห็นตะกอนโปรตีนที่ 40-60 และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของเอนไซม์ (% enzyme yield) ที่ได้มีค่าเท่ากับ 72.76 และ 39.08 ตามลำดับดังในตารางที่ 4 จึงเลือกตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทำให้เอนไซม์



รูปที่ 20 สรุปขั้นตอนการทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตแปรคั่นละ 20 เปอร์เซ็นต์

Fraction	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Cellulase Activity (units)	Specific Activity (units/mg prot.)	%Yield
Concentrated Crude Enzyme	100.0	186.00	4.81×10^4	2.59×10^2	100.00
0-20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ *	-	-	-	-	-
20-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ *	-	-	-	-	-
40-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10.0	56.00	3.50×10^4	6.25×10^2	72.76
60-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	30.00	1.88×10^4	6.27×10^2	39.08

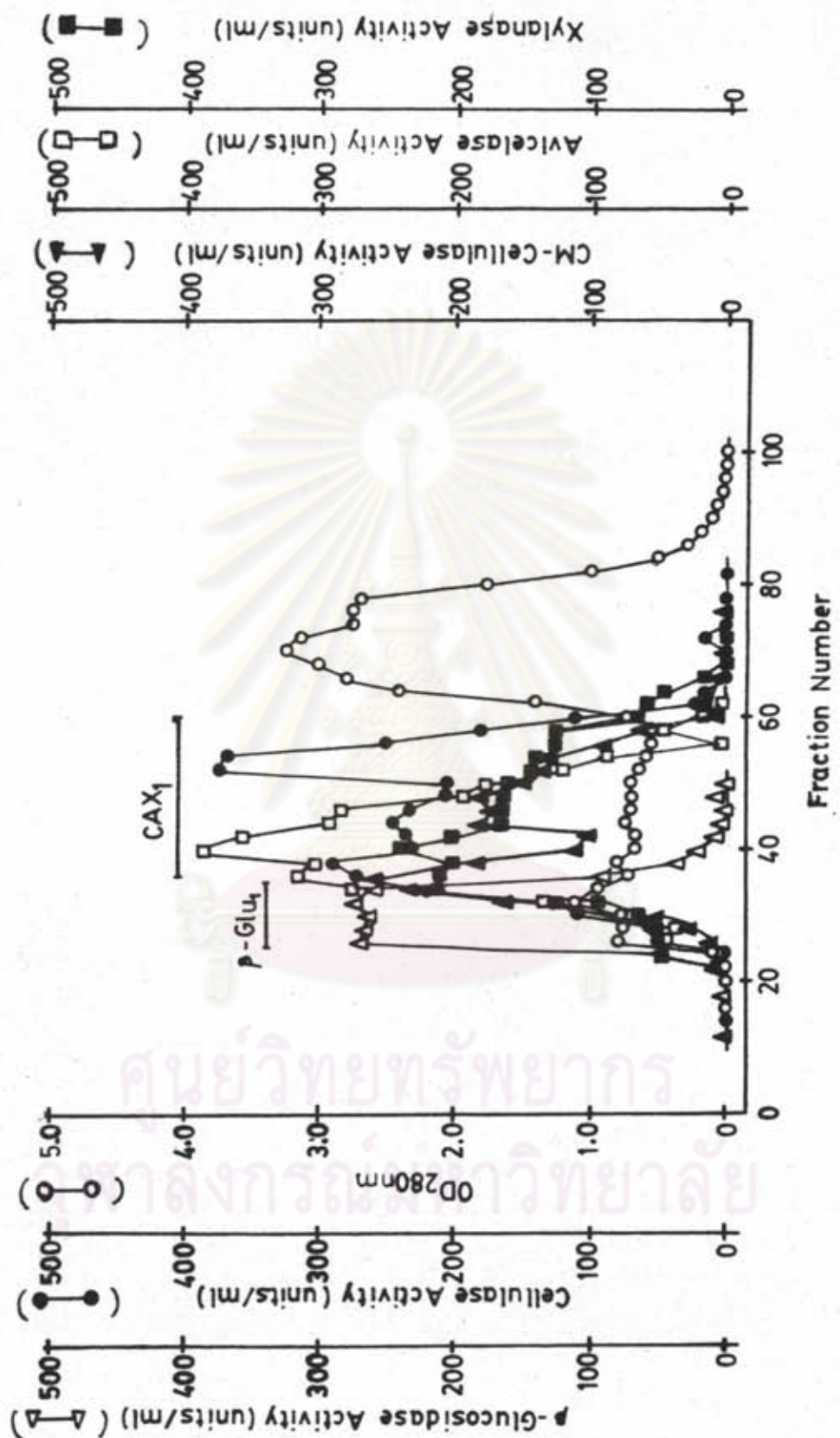
* No precipitate of protein.

เซลลูเลส เบตา-กลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะมิเซลเลส มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.69, 2.30, 5.07 และ 1.36 เท่า (crude enzyme ที่เตรียมจากการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์) และ 1.10, 1.10, 1.30 และ 1.00 เท่า (crude enzyme ที่เตรียมจากการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า) (ตารางที่ 5-12) จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100 ต่อไป

4.10.2 ผลการทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ด้วยการกรองผ่านเจลโดยใช้คอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100

เพื่อที่จะทำให้เอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จึงนำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100 ขนาด 2.0 x 90 เซนติเมตร โดยใช้เอนไซม์จากข้อ 4.10.1 ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร (โปรตีนประมาณ 100 มิลลิกรัม) มี 0.1 โมล/ลิตรอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นตัวชะในอัตราเร็ว 6 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 5.0 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนจำนวน 102 หลอด จากผลการทดลองในรูปที่ 21 ซึ่งเป็นผลของการแยกเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์เริ่มต้น (crude enzyme) ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเครื่องเฟอร์เมนเตอร์ตามวิธีในข้อ 3.13.1 จะเห็นว่าแยกโปรตีนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ 2 ส่วน ส่วนแรกมีแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสเป็นส่วนใหญ่ให้ชื่อว่า β -Glu₁ ส่วนที่สองมีแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เซลลูเลส อะมิเซลเลส และไซลาเนสปะปนกันจึงให้ชื่อส่วนนี้ว่า CAX₁ โปรตีนส่วนที่เหลือซึ่งมีปริมาณมากเป็นพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์

ในรูปที่ 22 เป็นรูปแบบของการแยกเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์เริ่มต้น (crude enzyme) ที่เตรียมตามวิธี 3.13.2 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า พบว่าได้โปรตีนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ 3 ส่วน ส่วนแรกมีแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสเป็นส่วนใหญ่ให้ชื่อว่า β -Glu₂ ส่วนที่สองมีแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเล็กน้อย แต่มีแอกติวิตีส่วใหญ่เป็นเซลลูเลส อะมิเซลเลส และไซลาเนสปะปนกัน ให้ชื่อว่า CAX₂ ส่วนที่สามเป็นส่วนที่มีแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็นส่วนใหญ่ ให้ชื่อว่า CMCase สำหรับโปรตีนส่วนที่เหลือเป็นโปรตีนที่ไม่ต้องการ

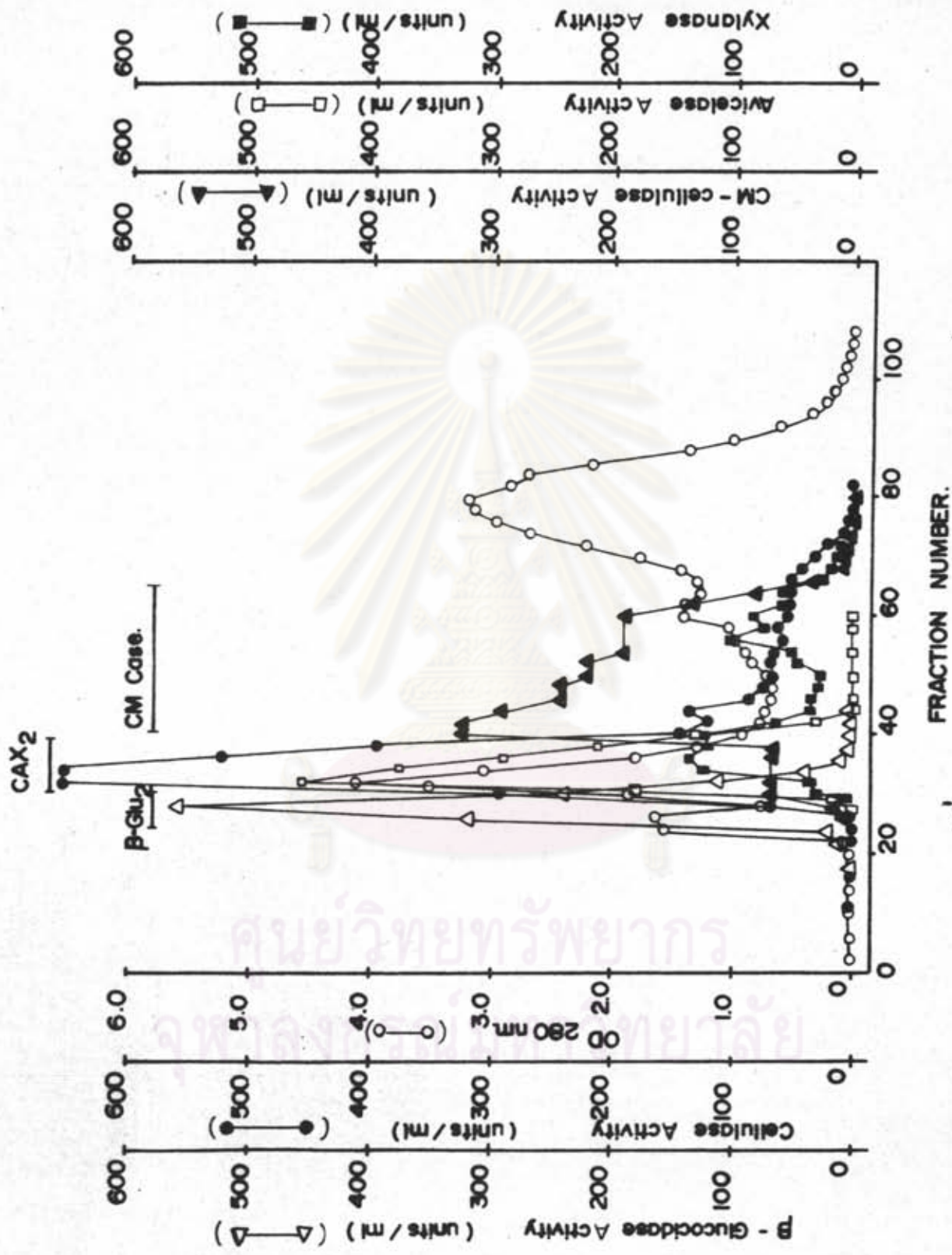


รูปที่ 21

รูปที่ 21 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยการใช้เอนไซม์ในเฟอร์เมนเตอไรน์

- 80% $(NH_4)_2SO_4$ เฟรคชัน โคยโซลล์มันเชฟาคีส์ 3-100 (2.0 X 90.0 เซนติเมตร)
ชะทวย 0.1 โมล/ลิตรอะซิเตตพีเออร์พีเอช 5.0 ในอัตราการไหล 6.0 มิลลิลิตร/ชั่วโมง
แบ่งเก็บแยกส่วนหลอกละ 5.0 มิลลิลิตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 3.14.3.2
- ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
 - แอคทีวิตีของเซลลูเลส
 - △—△ แอคทีวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส
 - ▲—▲ แอคทีวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส
 - แอคทีวิตีของอะมิเซลเลส
 - แอคทีวิตีของไซลันเนส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22

รูปที่ 22 ผลการแยกปฏิกิริยาของธูปไม้ขมิ้นเปลวสุลล ที่เตรียมปฏิกิริยาการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบยี่ภายใน 80% (NH₄)₂SO₄

แฟรคชันโคลอยิมัมเซฟาเติกซี่ลี - 100 (ขนาด 2.0 x 90.0 เซนติเมตร) ๕ ด้วย 0.1 ไมล์ / ลิตรอะซีเตต

บัฟเฟอร์ PH 5.0 ในอัตราเร็ว 6 มิลลิลิตร / ชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มิลลิลิตร

รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 3.14.3.2

○ ————— คำการจุดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

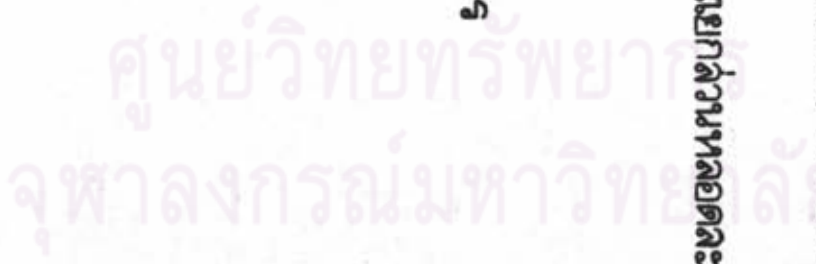
● ————— แอคทีวิตีของปะดูลล

▲ ————— แอคทีวิตีของเบตา - กลูโคซิเดส

▼ ————— แอคทีวิตีของคาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส

□ ————— แอคทีวิตีของอะวีเซลล

■ ————— แอคทีวิตีของไซลซาน



หลังจากนั้นนำ p -Glu₁ , p -Glu₂ , CAX₁ , CAX₂ และ CMCCase ไปผ่านคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 อีกทีหนึ่ง

4.10.3 ผลการทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ด้วยการแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50

เนื่องจากเอนไซม์ส่วนที่ไต่จากคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100 ในข้อ 4.10.2 ยังมีแอกติวิตีของเอนไซม์หลายชนิดปะปนกันอยู่ จึงนำมาผ่านคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 ขนาด 1.7×25 เซนติเมตรโดยใช้เอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 10 มิลลิกรัม สะด้วย 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ในอัตราเร็ว 12 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 5.0 มิลลิลิตรจำนวน 45-50 หลอด แล้วเปลี่ยนเป็นสะด้วย linear salt gradient (0-0.5 โมล/ลิตรโซเดียมคลอไรด์) เก็บแยกส่วนละ 5.0 มิลลิลิตร จากผลการทดลองในรูปที่ 23 เมื่อนำ p -Glu₁ ผ่านคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 ปรากฏว่าไต่เบตา-กลูโคซิเดส 3 ชนิด ซึ่งให้ชื่อว่า p -GluI, p -GluII และ p -GluIII. p -GluI ออกมาก่อนที่สะด้วย salt gradient มีแอกติวิตีของเอนไซม์ชนิดอื่นปนอยู่ด้วย p -GluII ซึ่งมีเอนไซม์ชนิดอื่นปนอยู่ด้วยเช่นกัน แต่มีปริมาณเอนไซม์น้อยมากเมื่อเทียบกับ p -GluI และ p -GluIII p -GluIII นั้นมีแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสอย่างเดี่ยวและเป็นแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสเกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ของเบตา-กลูโคซิเดสทั้งหมดที่รวบรวมได้จากคอลัมน์

สำหรับส่วนของ CAX₁ เมื่อผ่านคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ พบว่าแยกโปรตีนได้ 2 ส่วนตามรูปที่ 24 ส่วนแรกออกมาก่อนสะด้วย linear salt gradient เรียกว่า CMCCaseI และอีกส่วนออกมาหลังสะด้วย salt gradient เรียกว่า CMCCaseII และทั้งสองส่วนนี้มีแอกติวิตีของเซลลูเลส อะมิเซลเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ไซลาเนส และแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสบ้างเล็กน้อย

ในทำนองเดียวกันเมื่อนำเอาเอนไซม์ส่วน p -Glu₂ มาผ่านคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 พบว่าไต่เบตา-กลูโคซิเดส 2 ชนิดคือ p -GluI และ p -GluII (ซึ่งมีแอกติวิตีน้อยมากจนเกือบวัดไม่ได้ แต่มีแอกติวิตีของเซลลูเลสเป็นส่วนใหญ่) (รูปที่ 25) ส่วนแอกติวิตีของ p -GluIII ไม่พบในชั้นคอนนี้เลย

ในรูปที่ 26 แสดงผลการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเท็กซ์ของ CMCCase พบว่า ได้โปรตีนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ 2 ส่วน ออกจากคอลัมน์ก่อนและหลังชะด้วย linear salt gradient ซึ่งโปรตีนทั้งสองส่วนมีแอกติวิตีของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสเป็นส่วนใหญ่ และออกจากคอลัมน์ที่เฟรคชันเดียวกับ CMCCaseI และ CMCCaseII ของ CAX₁ จึงเรียกว่า CMCCaseI และ CMCCaseII เช่นเดียวกัน นอกจากนี้โปรตีนสองส่วนนี้มีแอกติวิตีของเซลลูเลสร่วมอยู่ด้วยค่อนข้างสูง และมีแอกติวิตีของอะวิเซลเลสควบคู่ไปด้วย

สำหรับ CAX₂ จากเซฟาเท็กซ์ จี-100 นั้น หลังจากผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 พบว่าแยกโปรตีนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ 3 ส่วน ส่วนแรกคือ CMCCaseI มีแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็นส่วนใหญ่ และแอกติวิตีของเซลลูเลส ไชลานะร่วมอยู่ด้วยเล็กน้อย ส่วนที่สองมีแอกติวิตีของเซลลูเลสและอะวิเซลเลสค่อนข้างสูง เรียกว่า Avi ส่วนที่สามคือ CMCCaseII ออกจากคอลัมน์เมื่อชะด้วย salt gradient พบว่าแอกติวิตีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์เป็นแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (รูปที่ 27)

ผลการทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์นั้นได้สรุปไว้ในตารางที่ 5, 6, 7 และ 8 จะเห็นว่าเอนไซม์เริ่มต้น (crude enzyme) ที่เตรียมจากการเลี้ยงเชื้อในเพอร์เมเตอร์ เมื่อผ่านขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ตามวิธีทดลองในข้อ 3.14 แล้วแยกได้เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส 3 ชนิดคือ β -GluI, β -GluII และ β -GluIII ซึ่งมีแอกติวิตีเป็นอัตราส่วนประมาณ 161:1:104 ส่วนของ β -GluI ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่นปนอยู่มาก ในขณะที่ β -GluIII ประกอบด้วยแอกติวิตีของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสแต่เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ตามตารางที่ 6 จะเห็นว่าเบตา-กลูโคซิเดสทั้งสามนี้เมื่อทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีดังกล่าวแล้ว ผลสุดท้ายจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.97, 0.21 และ 14.82 เท่าตามลำดับ

สำหรับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเชื่อว่ามีอย่างน้อย 2 ชนิดคือ CMCCaseI และ CMCCaseII ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองส่วนนี้จะมีแอกติวิตีของเซลลูเลส และอะวิเซลเลสรวมอยู่ด้วยตลอดเวลาโดยที่เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.13, 3.26 เท่า (ตารางที่ 7) ในขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.88, 5.33 เท่า และอะวิเซลเลสเพิ่มขึ้น 7.89,

4.13 เท่า (ตารางที่ 5 และ 8) ตามลำดับ

โดยวิธีเดียวกันนี้เมื่อใช้เอนไซม์เริ่มต้นที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบ เซย่า ปรากฏว่าโคแบคตา-กลูโคซิเดสเพียง 2 ชนิด คือ β -GluI และ β -GluII มีความบริสุทธิ์ถึง 73.64 และ 1.09 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 10) คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสแยกได้ 2 ชนิด CMCaseI และ CMCaseII ซึ่งทั้งสองชนิดนี้จะมีแอกติวิตีของเซลลูเลสร่วมอยู่ด้วย ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน CMCaseI และ CMCaseII จะเพิ่มขึ้น 2.26 และ 3.30 เท่า (ตารางที่ 11) เซลลูเลสเพิ่มขึ้น 2.62 และ 2.12 เท่า (ตารางที่ 9) โดยที่พบอะมิเลสเพียง 1 ชนิดเท่านั้นคือ Avi ซึ่งตามตารางที่ 12 จะเห็นว่ามีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.48 เท่า

หลังจากนั้นนำ β -GluI, β -GluIII, CMCaseI, CMCaseII และ Avi ไปศึกษาต่อไป

4.11 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์

นำเอนไซม์จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แต่ละขั้น มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยโพลีอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแห้ง พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ตั้งแต่ crude enzyme จนถึงเอนไซม์ที่ได้จากคีโอเออี-เซฟาเค็กซ์ ถึงแม้ว่าขั้นตอนสุดท้ายจะไม่ได้แถบโปรตีนแถบเดียว (single band) แต่จำนวนแถบโปรตีนก็ลดลงไปมาก โดยเฉพาะ CMCaseI, CMCaseII และ Avi ซึ่งเป็นเอนไซม์จากคีโอเออี-เซฟาเค็กซ์มีแถบโปรตีนน้อยลงไปมาก จนเกือบจะเห็นเป็นแถบเดียว (รูปที่ 28) เมื่อวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในแห้งเจลพบว่า พิกของแอกติวิตีตรงกับแถบโปรตีนแถบใหญ่ หรือแถบที่มีสีเข้มในแห้งโพลีอะโครลาไมด์เจลของเอนไซม์แต่ละองค์ประกอบที่ทำให้บริสุทธิ์บ้างแล้ว (ดังแสดงในรูปที่ 29จ, 29ฉ และ 30ข)

4.12 ผลการใช้โพลีอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแห้งในการจำแนกชนิดของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้จากทุกขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มาทำโพลีอะโครลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแห้งตามวิธีในข้อ 3.15 โดยแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดหนึ่งนำมาย้อมสีโปรตีนตามวิธีข้อ 3.15.4 อีกชุดหนึ่งนำมาตัดและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตาม

วิธีในข้อ 3.15.5

4.12.1 การจำแนกชนิดของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ในรูปที่ 29(ก-ด) จะเห็นว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมี 3 ชนิดซึ่งมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า (Electrophoretic field) ต่างกันคือ ชนิดที่ 1 มีค่า R_F อยู่ในช่วง 0.25-0.38 ซึ่งได้จาก CMCase I จากคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ ชนิดที่ 2 และ 3 มีค่า R_F ระหว่าง 0.50-0.60 และ 0.75-0.76 ทั้งสองชนิดหลังนี้รวมอยู่ใน CMCase II จากคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ แม้ว่าในแฟรคชันของ 80 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟตและ β -Glu_{1,2} จากเซฟาเท็กซ์ จี-100 จะมีแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพียง 2 พิกก็ตาม แต่ก็มีความโน้มที่จะเป็น 3 พิก และแถบโปรตีนที่อยู่ในบริเวณเจลที่มีแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส คือ แถบโปรตีนที่มีค่า R_F 0.28-0.79 ปรากฏอยู่ในทุกขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

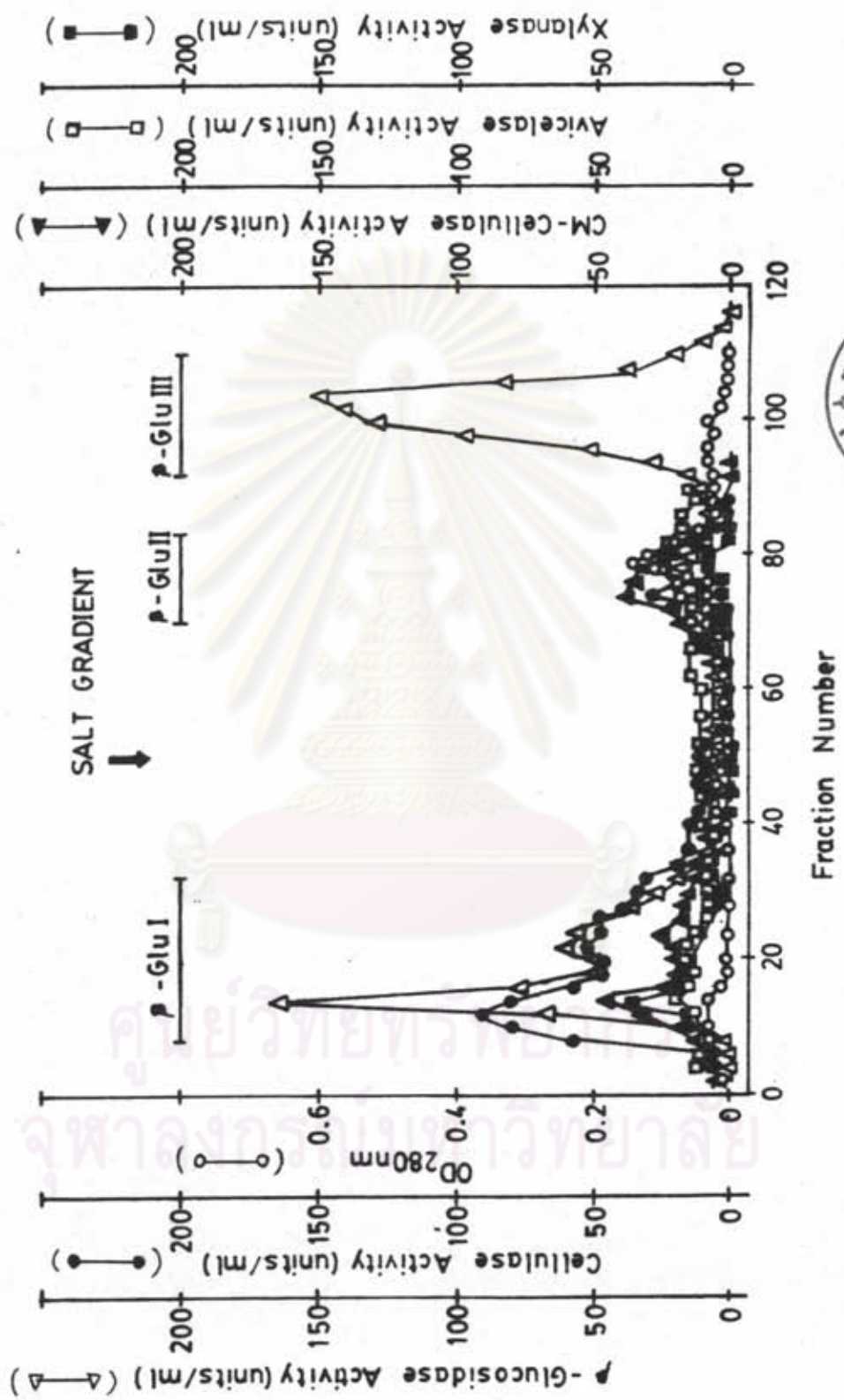
4.12.2 การจำแนกชนิดของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส

จากผลการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ที่ได้ทุกขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ตามรูปที่ 29(ก-ด) พบว่าได้แอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสเพียงพิกเดียวไม่ว่าจะใช้ β -Glu₁ หรือ β -Glu₂ ก็ตาม ทั้งๆที่ β -Glu₁ เมื่อผ่านคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ได้เบตา-กลูโคซิเดส 3 ชนิด ถึงแม้ว่าจะรวบรวมส่วนของเจลของ β -Glu₁ ที่มีแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสสูง แล้วนำเอนไซม์นี้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้งหนึ่งก็ยังคงพบว่ามีเบตา-กลูโคซิเดสเพียง 1 ชนิดเท่านั้นจากรูปที่ 30 (ก,ข) และจะเห็นว่าได้แถบโปรตีนแถบใหญ่ซึ่งมีแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส (ค่า R_F ของแถบโปรตีนมีค่า 0.25 ซึ่งใกล้เคียงกับ R_F ของพิกแอกติวิตี (0.26))

4.12.3 การจำแนกชนิดของอะมิเลส

การวัดแอกติวิตีของอะมิเลสในแท่งเจลวัดไม่ได้ เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ในแท่งเจลมีน้อยเกินกว่าที่จะให้แอกติวิตีที่วัดได้ แต่อย่างน้อยก็เชื่อได้ว่าอะมิเลสมี 1 ชนิด จากผลการผ่านคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์

4.13 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน



รูปที่ 23

รูปที่ 23 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน β -GI₂ จากเซฟาเท็กซ์ จี-100 ของเอนไซม์ที่

เตรียมโดยวิธีการซึ่งใช้ในเฟอร์เมนเตอร์ (6.48 มิลลิกรัมโปรตีน) ในคอลัมน์คีย์เอซี-

เซฟาเท็กซ์ 10-50 (1.7 x 25.0 เซนติเมตร) ระยะเวลา 0.1 มิลลิกรัมเซฟาเท็กซ์เพื่อ

pH 5.0 ในอัตราการไหล 12 มิลลิกรัม/ชั่วโมง จำนวน 50 หลอด แล้วจึงชะด้วย

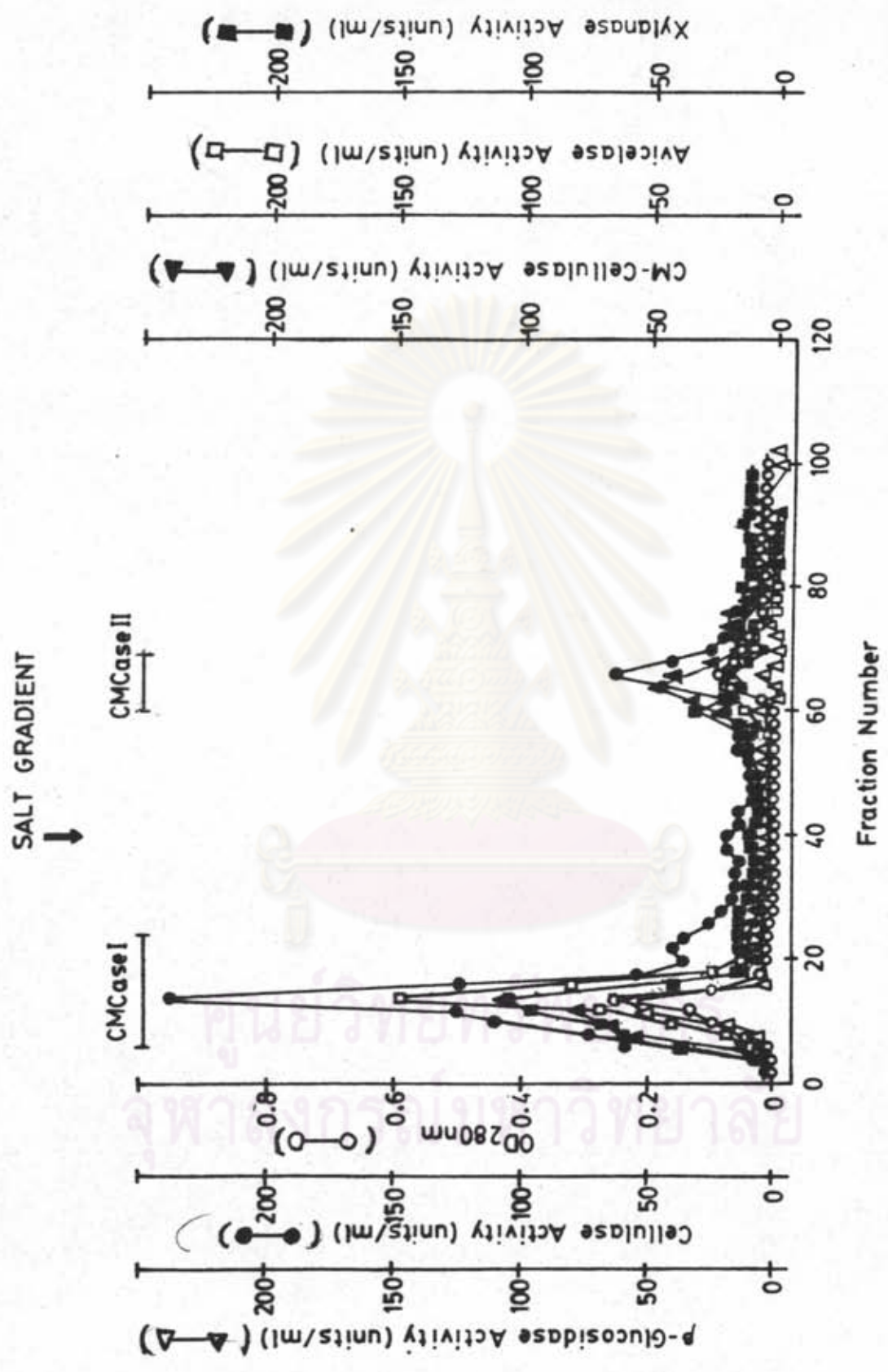
Linear salt gradient (150 มิลลิกรัม 0.1 มิลลิกรัมเซฟาเท็กซ์เพื่อ

pH 5.0 และ 150 มิลลิกรัม 0.1 มิลลิกรัมเซฟาเท็กซ์เพื่อ pH 5.0 ที่มี 0.5 มิลลิกรัม

ไซเคียมคลอไรด์) แบ่งแยกส่วนหอคณะ 5.0 มิลลิกรัม รายละเอียดของการทดลอง

ตามวิธีข้อ 3.14.4.2

- การการถูกแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของเซลลูเลส
- △—△ แอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส
- ▲—▲ แอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส
- แอคติวิตีของอะมิเลส
- แอคติวิตีของไซลาลเนส



รูปที่ 24

รูปที่ 24 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน CAX₁ จากเซฟาเท็กซ์ 4-100 ของเอนไซม์ที่

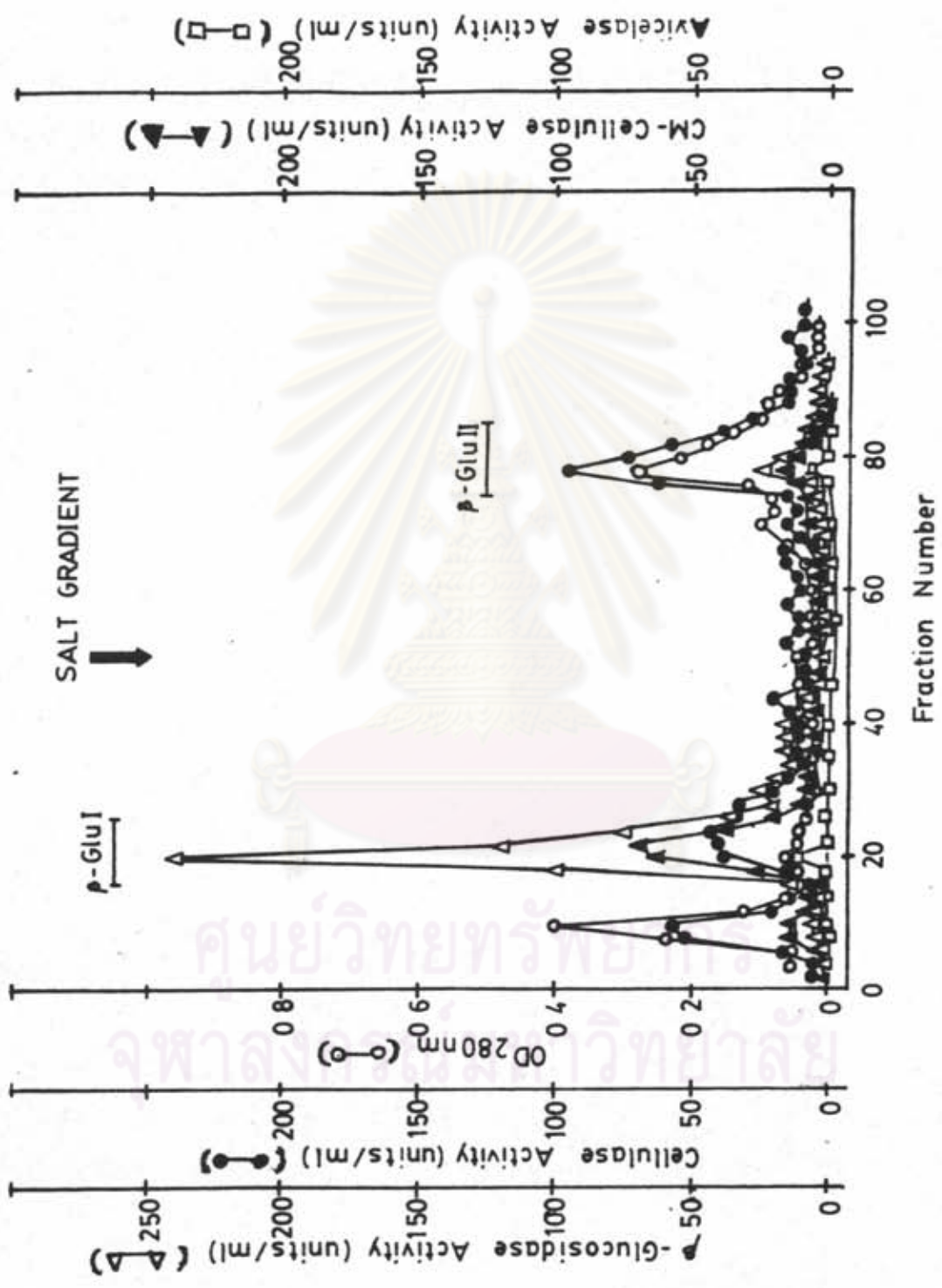
เตรียมโดยการใช้เอนไซม์เพอร์แมนเตอร์ (โปรตีน 11.94 มิลลิกรัม) โดยใส่คอลลิมัน (ขนาด 1.7X 25.0 เซนติเมตร) ขนาดยว 0.1 ไมล/ลิตรอะซิเตตพีเออร์ PH 5.0

จำนวน 40 หลอด แล้วเปลี่ยนเป็นระดับ Linear salt gradient

(150 มิลลิตร 0.1 ไมล/ลิตรอะซิเตตพีเออร์ PH 5.0 และ 150 มิลลิตร 0.1 ไมล/ลิตร อะซิเตตพีเออร์ PH 5.0 ที่มี 0.5 ไมล/ลิตร โซเดียมคลอไรด์) แบ่งเก็บแยกส่วน

หลอดละ 5.0 มิลลิตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 3.14.4.2

- การดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของเซลลูเลส
- △ แอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส
- ▲ แอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส
- แอคติวิตีของอะมิเลส
- แอคติวิตีของไพลานเนส



รูปที่ 25

รูปที่ 25 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน β -Glu₂ จากเซฟาเท็กซ์ 5-100 ของเอนไซม์ที่

เตรียมโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อในชาวแบบเซฮา ไซโคลมันคีอีเออี-เซฟาเท็กซ์ 10-50

(1.7 X 25.0 เซกต์เมตร) ระยะเวลา 0.1 ไมล/ลิตรอะซีเตทพีเออร์ pH 5.0

ในอัตราการไหล 12 มิลลิตร/ชั่วโมง จำนวน 50 หลอด แล้วจึงระยะเวลา Limesat

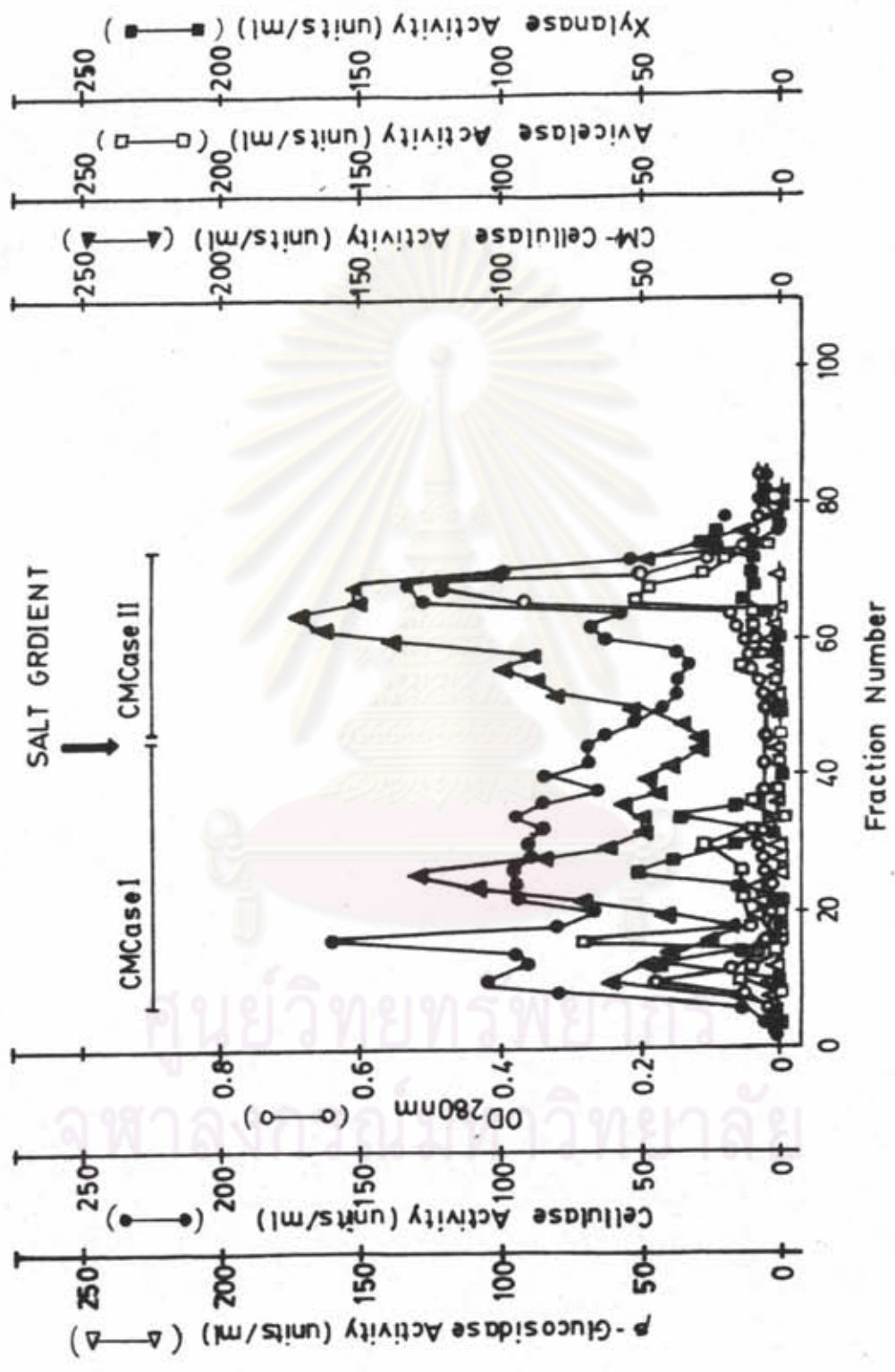
salt gradient (150 มิลลิตร 0.1 ไมล/ลิตรอะซีเตทพีเออร์ pH 5.0

และ 150 มิลลิตร 0.1 ไมล/ลิตรอะซีเตทพีเออร์ pH 5.0 ที่มี 0.5 ไมล/ลิตร

ไซเคียมคลอไรด์) แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 5.0 มิลลิตร รายละเอียดของการ

ทดลองตามวิธีข้อ 3.14.4.2

- คากาการถูกแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคทีวิตีของเริเซลลูเลส
- △—△ แอคทีวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส
- ▲—▲ แอคทีวิตีของการบอกรีเมทิลเซลลูเลส
- แอคทีวิตีของอะริเซลลูเลส



รูปที่ 26

รูปที่ 26 ผลการแยกโปรตีนส่วน CMCase จากพืชผักชนิด จี-100 ของเอนไซม์ที่เตรียมโดยวิธีการ

เลี้ยงเชื้อในขวดแบบขวดโทชไอซอลกับเกลือเออี-เฟสเฟสชนิด 10-50 (1.7 X 25.0

ชนิดเมตร) ชะงัก 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตพีเอช 5.0 ในอัตราการใช้

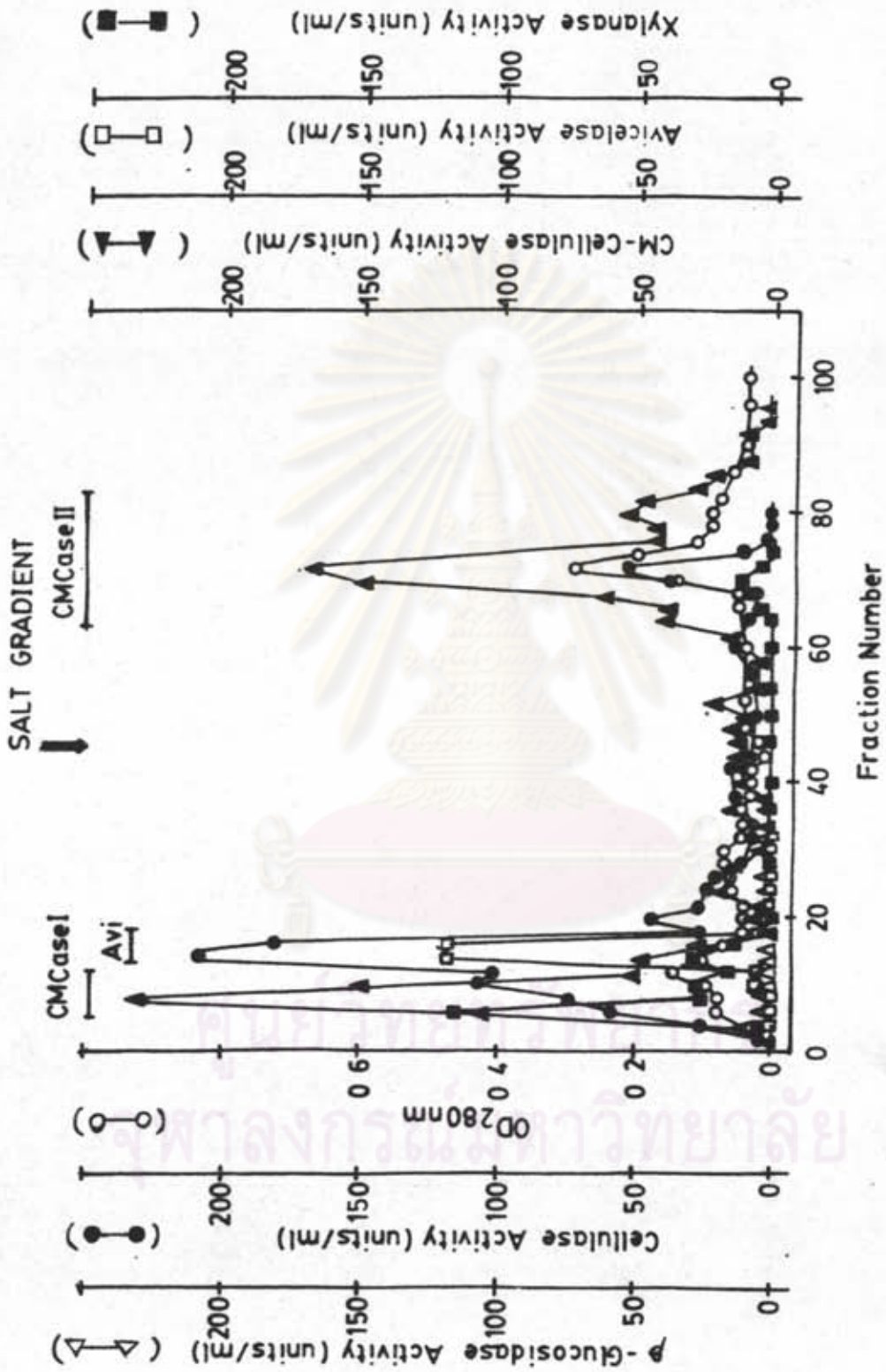
12.0 มิลลิกรัม/ชั่วโมง จำนวน 45 หลอด แล้วจึงชะงัก Linear salt

gradient (150 มิลลิกรัม 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตพีเอช 5.0 และ 150

มิลลิกรัม 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตพีเอช 5.0 ที่มี 0.5 โมล/ลิตรโซเดียมคลอไรด์)

แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 5.0 มิลลิกรัม รายละเอียดของการทดลองตามวิธีในข้อ 3.14.4.2

- ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของเซลลูเลส
- แอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส
- แอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส
- แอคติวิตีของอะมิเลส
- แอคติวิตีของไพลานเนส



รูปที่ 27

รูปที่ 27 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน CaX_2 จากเซฟาเท็กซ์ 4-100 ของเอนไซม์ที่

เตรียมโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเซฟาเท็กซ์ใช้คอลัมน์กัอีเออี-เซฟาเท็กซ์ 10-50

(ขนาด 1.7X25.0 เซนติเมตร) ระยะเวลา 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0

ในอัตราการไหล 12 มิลลิตร/ชั่วโมง จำนวน 45 หลอด แล้วจึงระยะเวลา Linear

salt gradient (150 มิลลิตร 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0

และ 150 มิลลิตร 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่มี 0.5 โมล/ลิตร

โซเดียมคลอไรด์) แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 5.0 มิลลิตร รายละเอียดของการ

ทดลองตามวิธีข้อ 3.14.4.2

- คากาการผูกแ่งที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของเอนไซม์
- △—△ แอคติวิตีของเบนตา-กลูโคซิเดส
- ▲—▲ แอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส
- แอคติวิตีของอะมิเลส
- แอคติวิตีของไธลาลเนส

ตารางที่ 5 การแยกเอนไซม์เซลล์ของ *A. fumigatus* Fres. (V₁) ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในฟอรัมเมเตอร์โทบริคัส

Step of Purification	Cellulase					
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act.to Cellulase
Crude Enzyme	567.00	159,525.00	281.35	1	100.00	-
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrane	408.00	162,000.00	397.06	1.41	101.55	-
80%(NH ₄) ₂ SO ₄	228.00	108,600.00	476.32	1.69	68.08	-
Sephadex G-100	23.76	35,511.00	1494.57	5.31	22.26	-
β-Glu _I	51.84	73,800.00	1423.61	5.06	46.26	-
β-Glu _I	13.44	21,006.94	1563.02	5.56	13.17	-
β-Glu _{II}	4.00	250.00	62.50	0.22	0.16	-
β-Glu _{III}	5.81	0	0	0		-
CMCase I	14.11	27,321.17	1936.30	6.88	17.13	-
CMCase II	5.97	8,956.57	1500.26	5.33	5.61	-

ตารางที่ 6 การแยกเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสของเซลล์สเตรปโตค็อกคัสเชื้อในเฟอร์เมนเทอร์ไฮบริดส์

Step of Purification	β -Glucosidase					
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act.to Cellulase
Crude Enzyme	567.00	110,880.00	195.56	1	100.00	0.70
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrane	408.00	108,820.00	266.72	1.36	98.14	0.67
80%(NH ₄) ₂ SO ₄	228.00	102,200.00	448.24	2.30	92.17	0.94
Sephadex G-100						
β -Glu _I	23.76	57,354.00	2413.89	12.34	51.73	1.62
CAX _I	51.84	720.00	13.89	0.07	0.65	0.01
DEAE-Sephadex A-50						
β -Glu _I	13.44	26,216.67	1950.64	9.97	23.64	1.25
β -Glu _{II}	4.00	162.50	40.62	0.21	0.15	0.65
β -Glu _{III}	5.81	16,836.11	2897.78	14.82	15.18	
CMCase I	14.11	5,880.58	416.77	2.13	5.30	0.22
CMCase II	5.97	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 การแยกเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเซลล์สเต็มโดยการเลี้ยงเชื้อในฟอโตไบโอมเตอร่าไนบริฟอ

Step of Purification	CM-Cellulase						
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act. to Cellulase	
Crude Enzyme	567.00	173,700.00	306.35	1	100.00	1.09	
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrane	408.00	195,840.00	480.00	1.57	112.75	1.21	
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	228.00	177,000.00	1552.63	5.07	101.90	3.26	
Sephadex G-100	23.76	33,660.00	1416.67	4.62	19.38	0.95	
β-Glu _I	51.84	96,336.00	1858.33	6.07	55.46	1.30	
CAX _I							
DEAE-Sephadex A-50							
β-Glu _I	13.44	7,117.65	500.16	1.63	4.10	0.32	
β-Glu _{II}	4.00	416.00	104.00	0.34	0.24	1.66	
β-Glu _{III}	5.81	0	0	0	0	0	
CMCase I	14.11	13,525.33	958.56	3.13	7.78	0.50	
CMCase II	5.97	5,971.05	1000.18	3.26	3.44	0.67	

ตารางที่ 8 การแยกเอนไซม์ของเซลล์ของเขตรวมโครงการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ไนบริฟท์

Step of Purification	Avicelase					
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act.to Cellulase
Crude Enzyme	567.00	68,580.00	120.95	1	100.00	0.43
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrane	408.00	53,520.00	131.18	1.08	78.04	0.33
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	228.00	37,500.00	164.47	1.36	54.68	0.34
Sephadex G-100	23.76	9,900.00	416.67	3.44	14.44	0.28
β -Glu _I	51.84	26,640.00	513.89	4.25	38.84	0.36
CAX _I						
DEAE-Sephadex A-50						
β -Glu _I	13.44	3,361.11	250.08	2.07	4.90	0.16
β -Glu _{II}	4.00	260.00	65.00	0.54	0.38	1.04
β -Glu _{III}	5.81	0	0	0	0	0
CMCaseI	14.11	13,466.52	954.40	7.89	19.64	0.49
CMCaseII	5.97	3,985.52	500.08	4.13	4.35	0.33

ตารางที่ 9 การแยกเอนไซม์เซลล์ของ A. fumigatus Fres. (V₁) ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าไนโตรสัท

Step of Purification	Cellulase					
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act.to Cellulase
Crude Enzyme	1653.00	784,400.00	474.36	1	100.00	-
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrane	1282.50	751,500.00	585.96	1.24	95.80	-
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	1198.12	693,000.00	578.41	1.22	88.35	-
Sephadex G-100	111.04	103,162.50	929.06	1.96	13.15	-
β-Glu ₂	280.80	241,200.00	858.97	1.81	30.75	-
CAX ₂	274.05	219,712.50	801.72	1.69	28.01	-
CMCase						
DEAE-Sephadex A-50						
β-GluI	5.78	11,068.75	1915.01	4.04	1.41	-
β-GluII	31.85	24,938.55	783.00	1.65	3.18	-
CMCaseI	110.25	136,894.50	1241.67	2.62	17.45	-
CMCaseII	128.23	128,989.75	1005.92	2.12	16.44	-
Avi	20.18	77,785.48	3854.58	8.12	9.92	-

ตารางที่ 10 การแยกเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสของเซลล์ยีสต์โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าให้บริสุทธิ์

Step of Purification	β -Glucosidase						
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act. to Cellulase	
Crude Enzyme	1653.60	156,880.00	94.87	1	100.00	0.20	
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrans	1282.50	139,500.00	108.77	1.15	88.92	0.18	
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1198.12	126,000.00	105.16	1.11	80.32	0.18	
Sephadex G-100	111.04	110,250.00	992.88	10.46	70.28	1.07	
β -Glu ₂ CAX ₂	280.80	10,440.00	37.18	0.39	6.65	0.04	
CMCase	274.05	1,134.00	4.14	0.04	0.72	0.01	
DEAE-Sephadex A-50	5.78	40,378.80	6985.95	73.64	25.74	3.65	
β -GluI	31.85	3,298.75	103.57	1.09	2.10	0.13	
β -GluII	116.25	9,000.00	81.63	0.86	5.74	0.06	
CMCase I	128.23	2,500.00	19.50	0.20	1.94	0.02	
CMCaseII							
Avi	20.18	0	0	0	0	0	

ตารางที่ 11 การแยกเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเชยน์บริสต์

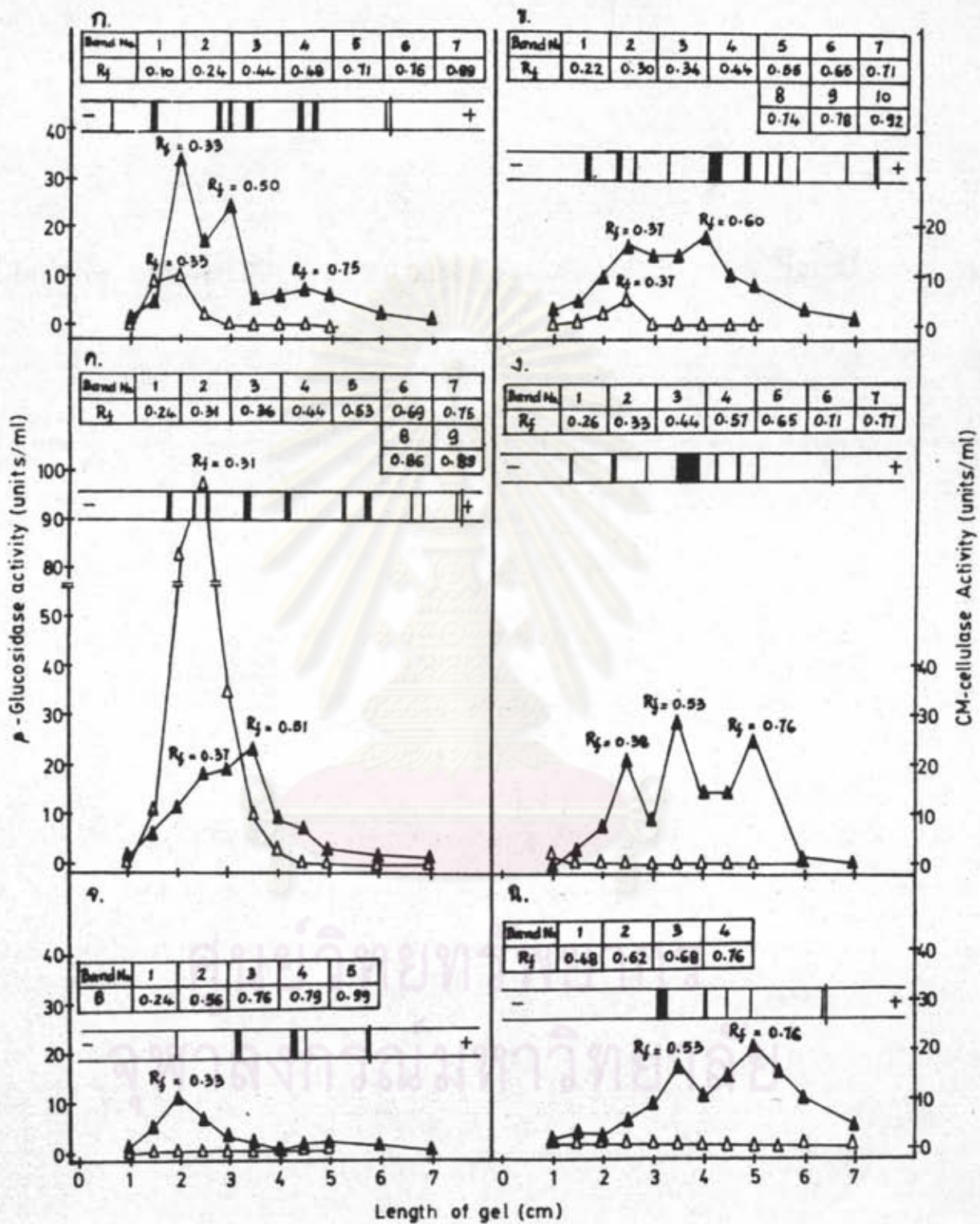
Step of Purification	CM-Cellulase					
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act. to Cellulase
Crude Enzyme	1653.60	433,540.00	262.18	1	100.00	0.55
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrane	1282.50	511,200.00	398.59	1.52	117.91	0.68
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	1198.12	501,750.00	418.78	1.60	115.73	0.72
Sephadex G-100	111.04	2,407.38	21.68	0.08	0.56	0.02
β-Glu ₂	280.80	82,620.00	294.23	1.12	19.06	0.34
CAX ₂	274.05	261,351.56	953.66	3.64	60.28	1.19
CMCase						
DEAE-Sephadex A-50	5.78	2,004.00	346.71	1.32	0.46	0.18
β-GluI	31.85	380.38	11.94	0.04	0.09	0.02
β-GluII	110.25	65,335.00	592.79	2.26	15.07	0.48
CMCaseI	128.23	110,923.83	865.04	3.30	25.58	0.86
CMCaseII						
Avi	20.18	9,646.84	478.04	1.82	2.22	0.12

ตารางที่ 12 การแยกเอนไซม์อะมิเลสของเอนไซม์เซลล์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเซ้าพิวรีฟิเคชัน

Step of Purification	Avicelase						
	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)	Ratio of Sp.Act.to Cellulase	
Crude Enzyme	1653.60	455,800.00	275.64	1	100.00	0.58	
Concentrated Enzyme by Amicon PM-30 Membrane	1282.50	337,500.00	263.16	0.95	74.04	0.45	
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	1198.12	241,875.00	201.88	0.73	53.07	0.35	
Sephadex G-100							
β-Glu ₂	111.04	1,575.00	14.18	0.05	0.34	0.02	
CAX ₂	280.80	40,050.00	142.63	0.52	8.79	0.17	
CMCase	274.05	24,215.62	88.36	0.32	5.31	0.11	
DEAE-Sephadex A-50							
β-GluI	5.78	0	0	0	0	0	
β-GluII	31.85	0	0	0	0	0	
CMCaseI	110.25	18,981.75	172.17	0.62	4.16	0.14	
CMCaseII	128.23	20,060.00	156.44	0.57	4.40	0.16	
Avi	20.18	24,950.00	1236.37	4.48	5.47	0.32	

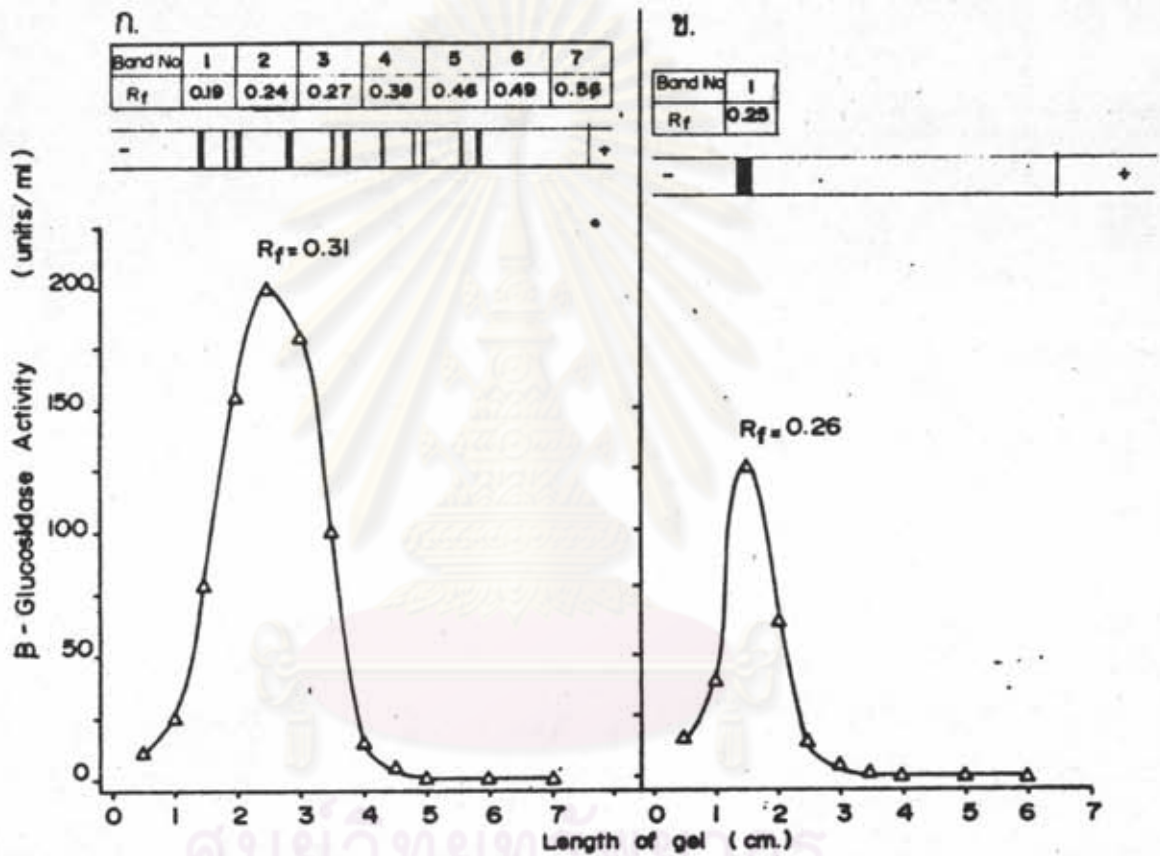


- รูปที่ 28 รูปแบบของโปรตีนที่ไค้จากชั้นคอนต่างๆในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส รายละเอียดของการทดลอง ตามวิธีในข้อ 3.15
- A) crude enzyme เข้มข้น (312 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - B) 80% แอมโมเนียมซัลเฟต (500 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - C) β -Glu_I จากคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100 (108 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - D) CAX₁ จากคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100 (156 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - E) β -GluI จากคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 (60 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - F) CMCaseI จากคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 (60 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - G) CMCaseII จากคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 (60 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - H) Avi จากคอลัมน์คีโอเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 (80 ไมโครกรัมโปรตีน)



- รูปที่ 29 (ก-ฉ) รูปแบบของโปรตีน แอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส (Δ) และ
 แอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (▲) ในแฟรคชันต่างๆที่ได้จากชั้น
 ตอนต่างๆในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะโครลาไมด์เจล
 อีเลคโตรโฟรีซิส รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 3.15
- ก) crude enzyme เข้มข้น (312 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - ข) 80% แอมโมเนียมซัลเฟต (500 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - ค) β -Glu₁ จากคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100 (108 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - ง) CAX₁ จากคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ จี-100 (156 ไมโครกรัมโปรตีน)
 - จ) CMCCaseI จากคอลัมน์คีอีเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 (60 ไมโครกรัม
โปรตีน)
 - ฉ) CMCCaseII จากคอลัมน์คีอีเออี-เซฟาเท็กซ์ เอ-50 (60 ไมโครกรัม
โปรตีน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 (ก, ข) รูปแบบของโปรตีนและแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสที่ได้จากการแยกโดยวิธีโพลีอะคริลามิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
 ก) เมื่อใช้แฟรคชันของเอนไซม์ β-Glu₂
 ข) เมื่อนำเฉพาะส่วนที่มีแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสซึ่งแยกได้จาก (ก) รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 3.15

4.13.1 ผลการศึกษาหน้าหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ในรูปที่ 31 แสดงผลการศึกษาหน้าหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยการกรองผ่าน เจล โดยใช้เซฟาเท็กซ์ จี-200 จะเห็นว่าเมื่อใช้ β -GluIผสมกับ β -GluIIIใน อัตราส่วน 8:1 โดยแอกติวิตีจะโคแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส 2 พิค (peak) พิคแรกน่าจะเป็น β -GluIIIเพราะมีแอกติวิตีส่นน้อย ออกจากคอลัมน์ที่ตำแหน่งเดียวกับโปรตีนมาตรฐานคาคาเลส มี elution volume 240 มิลลิลิตร พิคที่สอง β -GluI ซึ่งมีแอกติวิตีเป็นส่วนใหญ่ ออกจากคอลัมน์หลังโปรตีนมาตรฐาน BSA เล็กน้อย คือมี elution volume 310 มิลลิลิตร เมื่อนำมาคำนวณค่า K_{av} และเทียบจาก กราฟมาตรฐานรูปที่ 32 พบว่าหน้าหนักโมเลกุลของ β -GluIมีค่า 55,000 คาลตัน และของ β -GluIIIมีค่า 240,000 คาลตัน

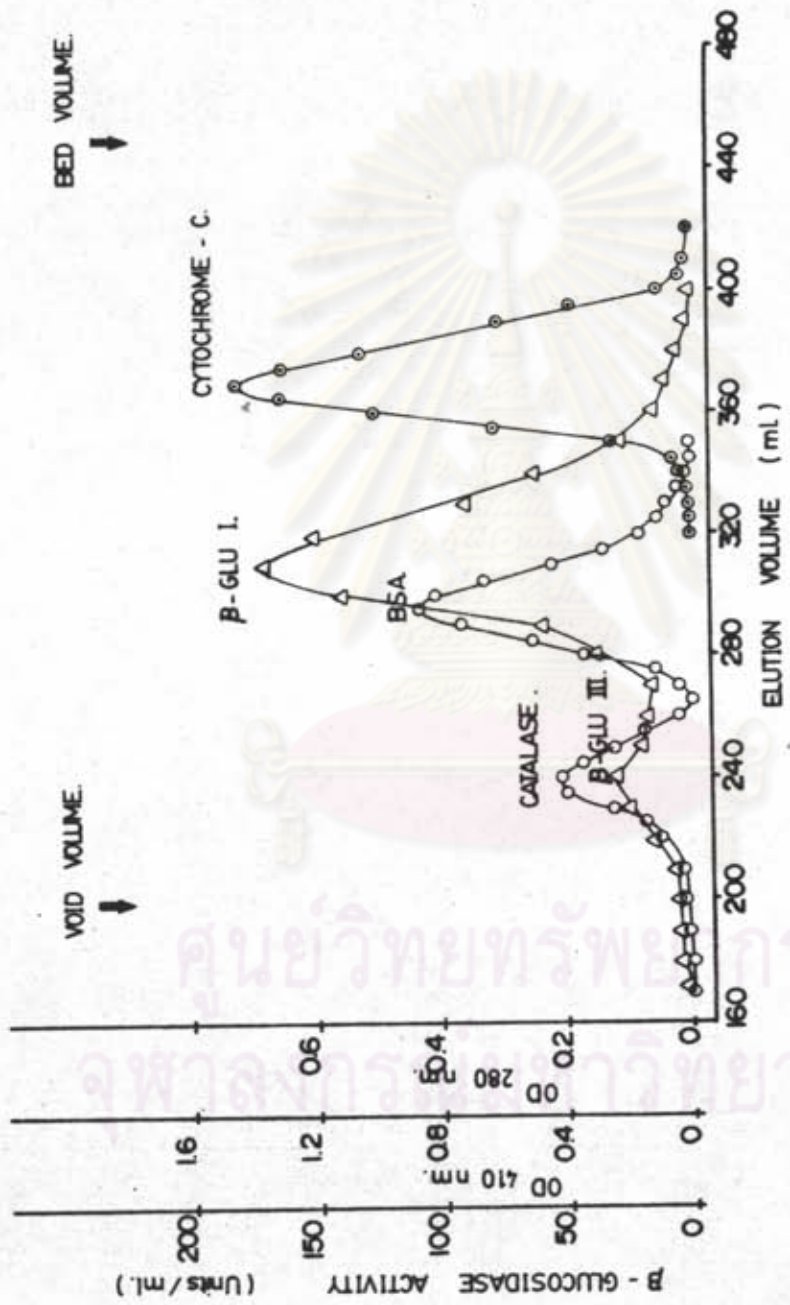
ส่วนคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยใช้CMCaseI ผสมกับ CMCaseII ในอัตราส่วน 1:21 โดยแอกติวิตีในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุล (รูปที่ 33) จะเห็นว่าพิค แอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสออกมาเพียงพิคเดียวเท่านั้น ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่า CMCaseI และ CMCaseII มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 28,750 คาลตัน เมื่อนำค่า K_{av} ที่คำนวณได้ไปเทียบจากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 34

ในทำนองเดียวกันจากผลการทดลองในรูปที่ 33 จะเห็นว่าอะมิเลสมี elution volume มากกว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA แต่น้อยกว่าโปรตีนมาตรฐานโคโมทริปซินในเจเน-เอ และเมื่อนำค่า K_{av} ที่คำนวณได้ไปเทียบจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 34) พบว่า อะมิเลสมีน้ำหนักโมเลกุล 32,000 คาลตัน

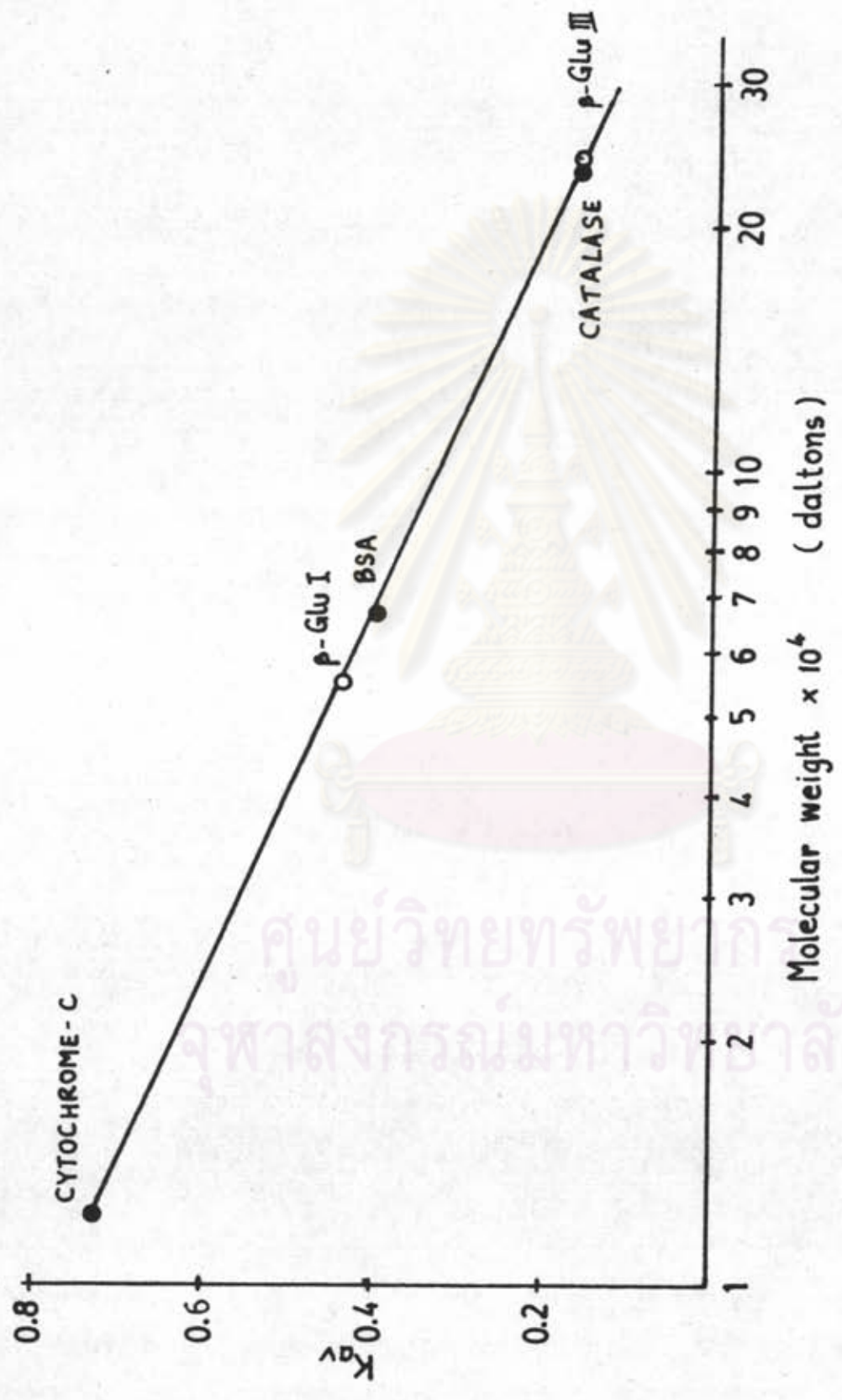
4.13.2 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ต่างๆ

4.13.2.1 เอนไซม์เซลลูเลส

วัดแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียสตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยใช้แอลฟา-เซลลูโลสซึ่งเป็นสับสเตรต ที่ไม่ละลาย (insoluble substrate) ความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าที่อุณหภูมิทั้งสองความเข้มข้นของแอลฟา-เซลลูโลสจะมีผลต่อแอกติวิตีในรูปลักษณะ เดียวกันคือมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรตกับแอกติวิตีของเอนไซม์แบบ



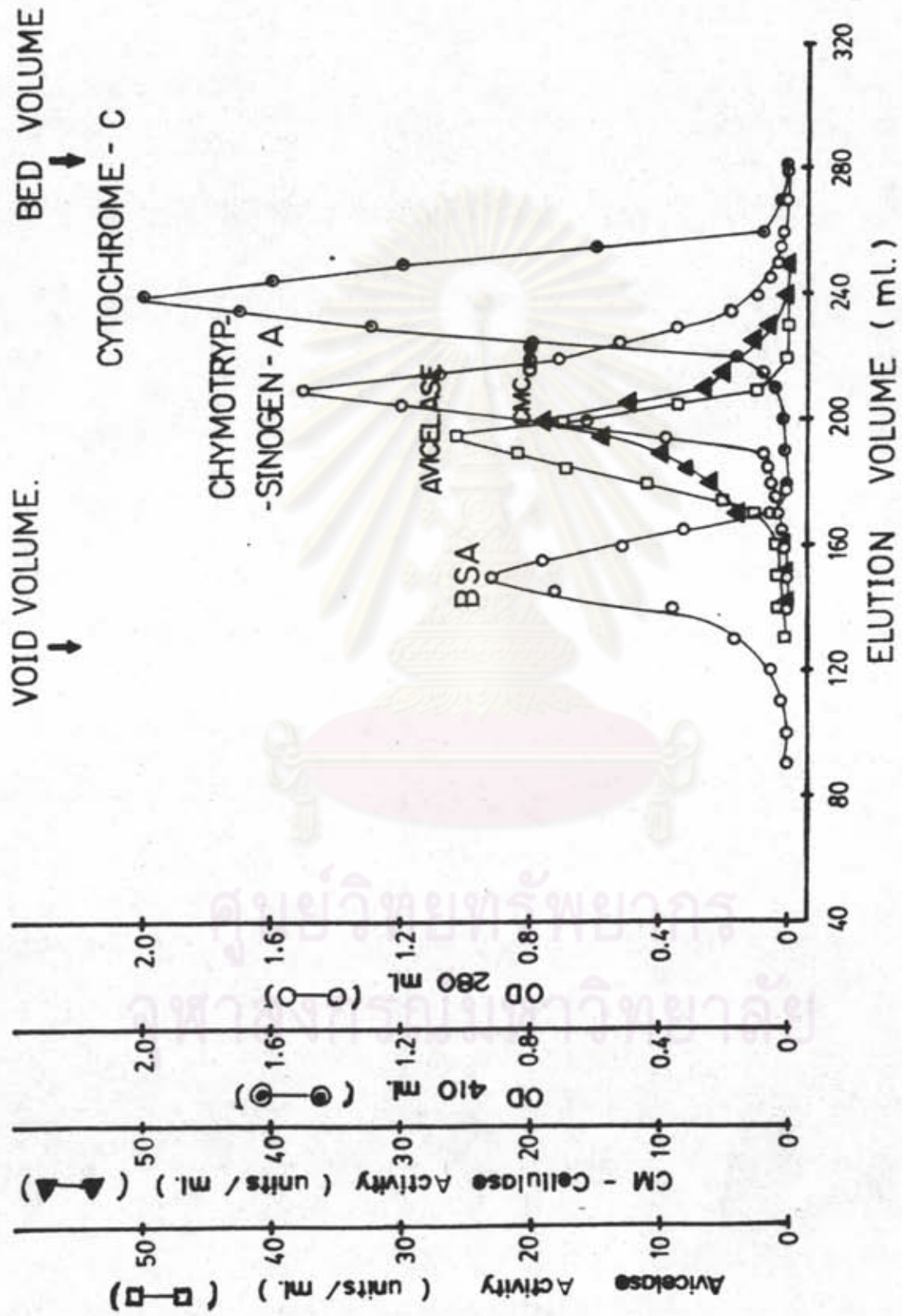
รูปที่ 31 รูปแบบของปริมาณสารฐานและเบตา - กลูโคซิเดส ในการทำน้ำกัมมิลเลตของ β -Glu I และ β -Glu II โดยดัดแปลงส่วนที่ 200 (ขนาด 2.6 x 90 ซม.) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.16.1 โดยใช้ β -Glu I ผสมกับ β -Glu II ในอัตราส่วน 8 : 1 (โดยแอกติวิตี) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 16.0 มิลลิกรัม : (○—○) ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (○—○) ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (●—●) แอกติวิตีของ เบตา - กลูโคซิเดส



รูปที่ 32 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{0v} ของโปรตีนมาตรฐานและ \log ของน้ำหนักโมเลกุล ในการศึกษา

น้ำหนักโมเลกุลของ p-Glu I และ p-Glu III โดยใช้คอสัมมูลของเฟาเด็กส์ -200 (2.6 x 90.0 ไร่) ตามวิธีทดลอง

ในข้อ 3.16.1 และใช้ p-Glu I สัมกับ p-Glu III ในอัตราส่วน 8:1 (โดยแอกทิวิตี) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 16.0 มิลลิกรัม



รูปที่ 33

รูปที่ 33

รูปแบบของโปรตีนมาตรฐาน, สารบอกรีตและเซลล์และอะมิโนเซลล์ ในการทำน้ำดื่มโดย

คอมปานีพีพีที จี-100 (ขนาด 2.0 X 900 ซีซี) ตามวิธีทดลองข้อ 3.16.1 ที่สารบอกรีต -

-ที่เซลล์ (CMCase I + CMCase II ในปริมาณที่ต่างกัน) 14.0 มิลลิกรัมโปรตีน และอะมิโนเซลล์ (AMI)

20 มิลลิกรัมโปรตีน ไปด้วย 0.1 มิล / ลิตร อะมิโนเซลล์ pH.5.0 ในอัตราเร็ว 12 มิลลิกรัม / ซีซี



ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



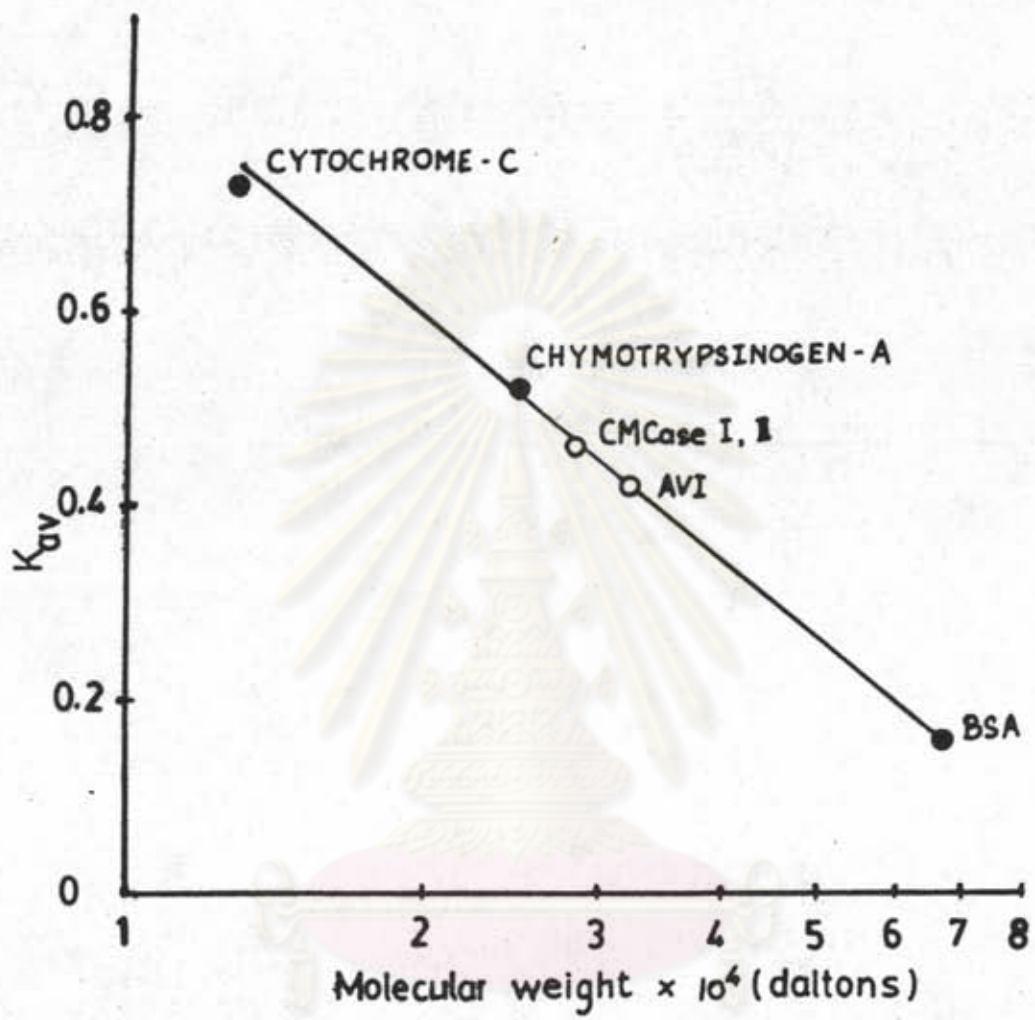
ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร



แอคทิวิตีของสารบอกรีตเซลล์



แอคทิวิตีของอะมิโนเซลล์



รูปที่ 32 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน และ \log ของน้ำหนักโมเลกุล ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ CMCCase I, CMCCase II และ Avi โดยใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-100 (2.0 \times 90.0 ซม.) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.16.1

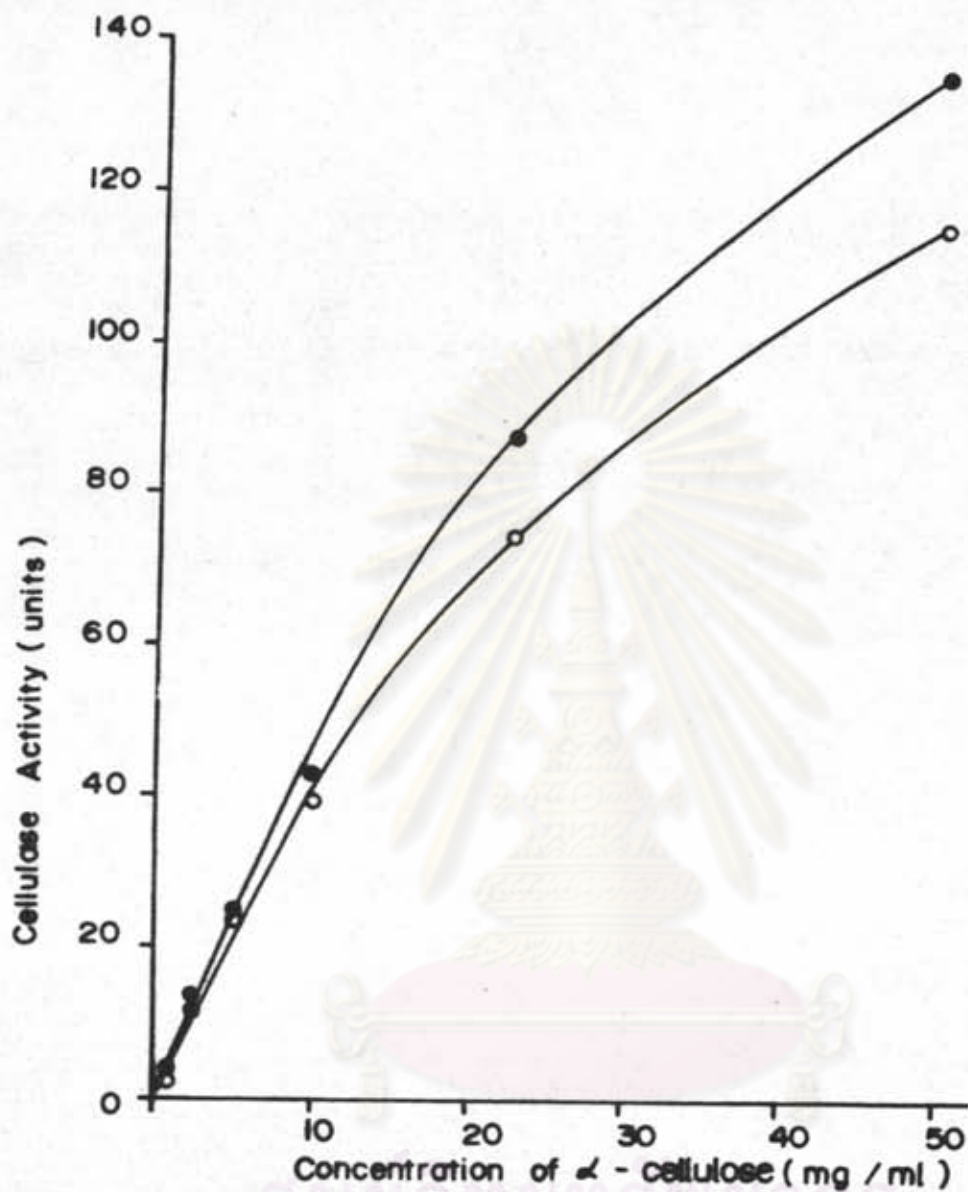
ไฮเพอร์โบลิก (hyperbolic) (รูปที่ 35) เพียงแต่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลของความเข้มข้นของแอลฟา-เซลลูโลสต่อแอกติวิตีของเซลลูเลสมีมากกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทำ Lineweaver-Burk plot และคำนวณค่า K_m และ V_{max} (ตารางที่ 13) จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะให้ค่า K_m ต่ำกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส และค่า V_{max} ที่ 45 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส

4.13.2.2 เอนไซม์อะมิเลส

ได้ทำการทดลองทำนองเดียวกับเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีในข้อ 3.16.6 โดยใช้อะมิเลสซึ่งเป็นสับสเตรคที่ไม่ละลายเช่นเดียวกัน ความเข้มข้น 0-7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน crude enzyme เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของอะมิเลสต่อแอกติวิตีของอะมิเลสที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส (รูปที่ 36) จะเห็นว่าผลที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะสูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของอะมิเลสกับความเข้มข้นของอะมิเลสที่เป็นเส้นตรงนั้นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะยาวกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส สำหรับการเปรียบเทียบ crude enzyme กับเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน Avi ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ในช่วงความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อัตราการเพิ่มแอกติวิตีของอะมิเลสจะสูงมาดใน Avi และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นคั่นไป อัตราการเพิ่มแอกติวิตีของอะมิเลสจะลดลง ส่วนใน crude enzyme อัตราการเพิ่มแอกติวิตีของอะมิเลสจะสูงในช่วงความเข้มข้นของอะมิเลสจาก 0-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ต่ำกว่าใน Avi และจากการทำ Lineweaver-Burk plot เพื่อหาค่า K_m และ V_{max} (ตารางที่ 13) จะเห็นว่าใน crude enzyme ค่า K_m ที่ 37 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 45 องศาเซลเซียส V_{max} ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบ crude enzyme กับอะมิเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (Avi) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า K_m ของ Avi จะต่ำกว่าของ crude enzyme และ V_{max} ของ Avi สูงกว่าของ crude enzyme

4.13.2.3 เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส

จากผลการทดลองวัดแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme

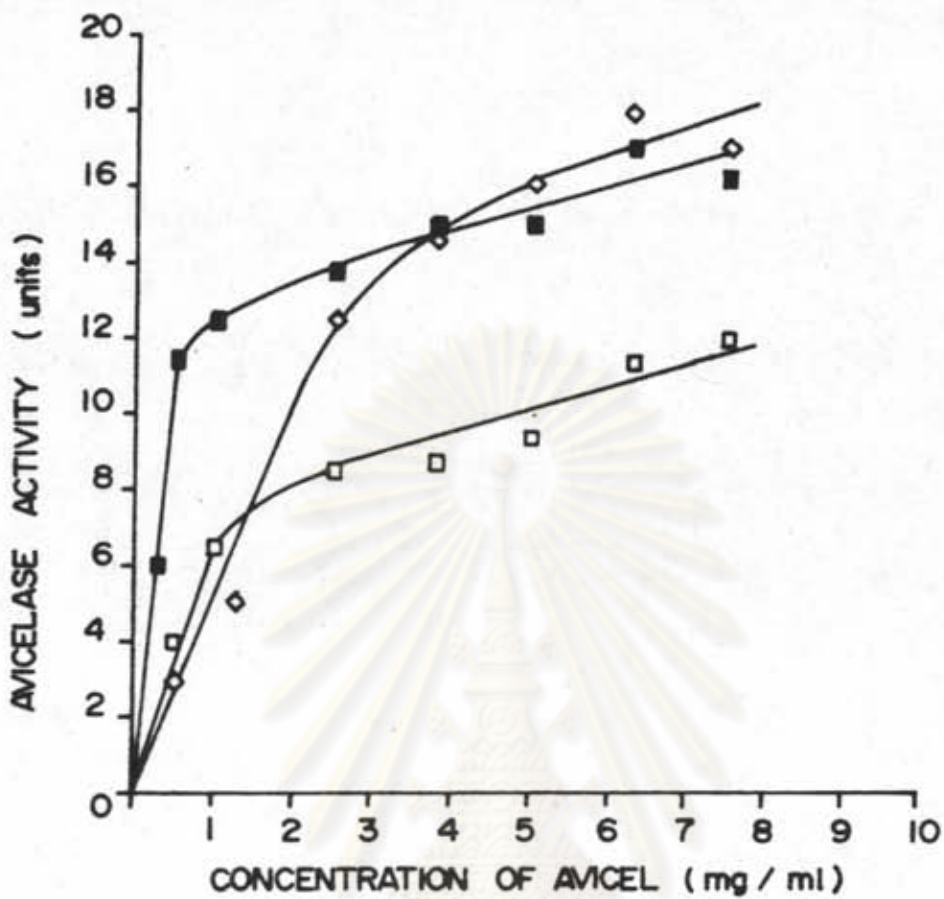


รูปที่ 35 ผลของความเข้มข้นของแอลฟา-เซลลูโลสต่อแอกติวิตีของเซลล์ูเลส

ใน crude enzyme วัดแอกติวิตีที่ 37°ซ. (○) และ 45°ซ. (●)

วัดแอกติวิตีของเซลล์ูเลสที่ 37 และ 45°ซ. ตามวิธีในข้อ 3.6.1

โดยใช้แอลฟา-เซลลูโลส ความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร.



รูปที่ 36 ผลของความเข้มข้นของอะวิเซลต่อแอกติวิตีของอะวิเซลเลส

ใน crude enzyme และ Avi ที่อุณหภูมิ 37°ซ. และ 45°ซ.

วัดแอกติวิตีของอะวิเซลเลสที่อุณหภูมิ 37°ซ. และ 45°ซ.

ตามวิธีในข้อ 3.6.6 โดยใช้อะวิเซลความเข้มข้น 0-7.5

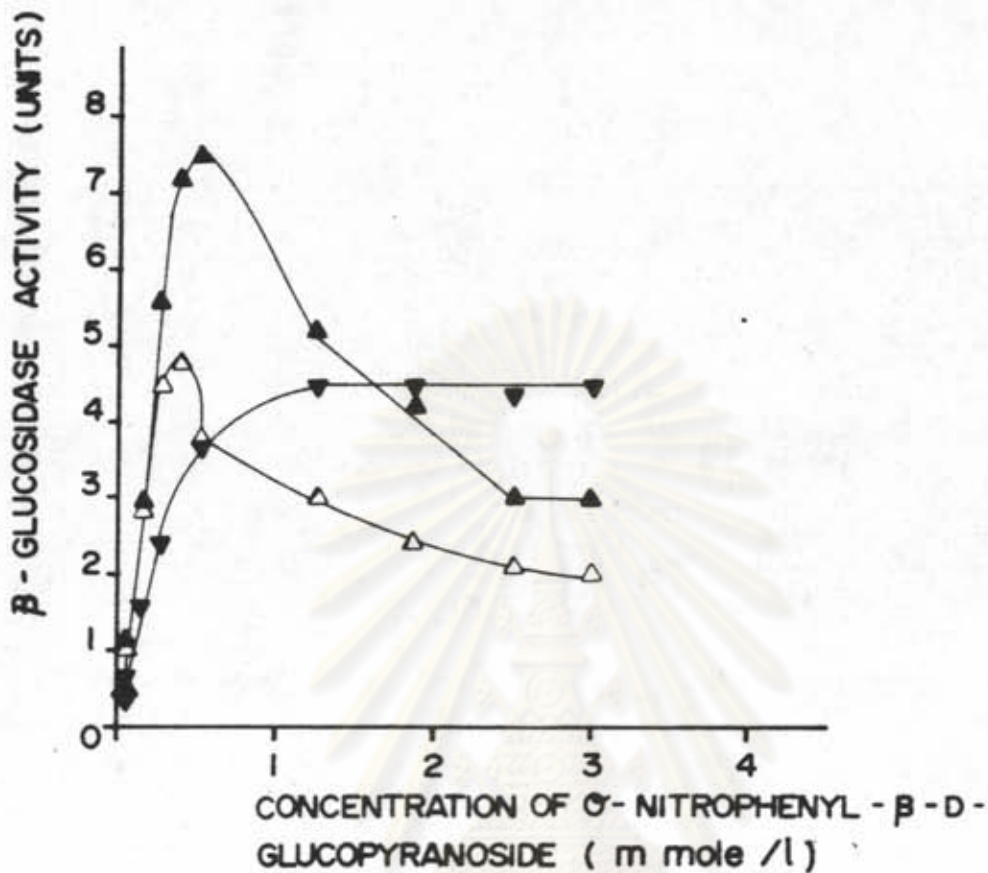
มิลลิกรัม / มิลลิลิตร (□) crude enzyme ที่ 37°ซ. (◇)

crude enzyme ที่ 45°ซ. (■) Avi ที่ 37°ซ.

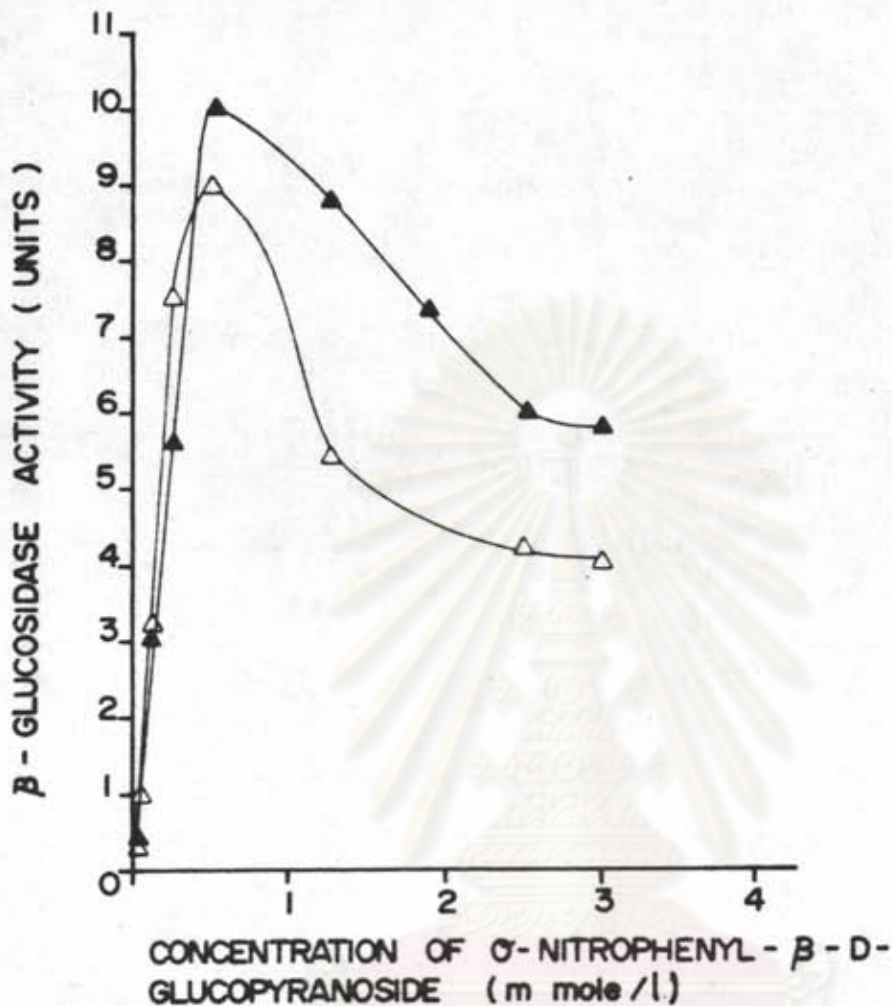
β -GluI และ β -GluIII ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยใช้ออร์โธ-ไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ที่ความเข้มข้น 0-3 มิลลิโมล/ลิตร ตามรูปที่ 37 จะเห็นว่าอัตราการเพิ่มแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสจะสูงในช่วงความเข้มข้นของสับสเตรตจาก 0-0.375 มิลลิโมล/ลิตรสำหรับ crude enzyme และ 0-0.5 มิลลิโมล/ลิตรสำหรับ β -GluI และ β -GluIII ใน crude enzyme และ β -GluI เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรตสูงกว่า 0.375 และ 0.50 มิลลิโมล/ลิตรตามลำดับ แอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสจะลดลง ปรากฏการณ์นี้เรียกว่าการยับยั้งโดยสับสเตรต (substrate inhibition) แต่ใน β -GluIII ไม่มีปรากฏการณ์นี้ ในห่านองเดียวกันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (รูปที่ 38) crude enzyme และ β -GluI ก็เกิดปรากฏการณ์การยับยั้งโดยสับสเตรต และพบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนี้ อัตราการเพิ่มของเบตา-กลูโคซิเดสแอกติวิตีในช่วงความเข้มข้นของสับสเตรต 0-0.50 มิลลิโมล/ลิตร สูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียสมาก หลังจากทำ Lineweaver-Burk plot เพื่อหาค่า K_m และ V_{max} ดังได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 13 จะเห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบ crude enzyme, β -GluI และ β -GluIII ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า K_m ของ β -GluI มีค่าใกล้เคียงกับของ crude enzyme ค่า K_m ของ β -GluIII ต่ำกว่าของ β -GluI และของ crude enzyme ส่วน V_{max} ของ β -GluI สูงที่สุด รองลงมาเป็น V_{max} ของ crude enzyme และ β -GluIII ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่า K_m ของ β -GluI ต่ำกว่าของ crude enzyme เล็กน้อย แต่ค่า V_{max} เท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิต่างกันพบว่า ทั้ง crude enzyme และ β -GluI มีค่า K_m และ V_{max} ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะต่ำกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส

4.13.2.4 เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

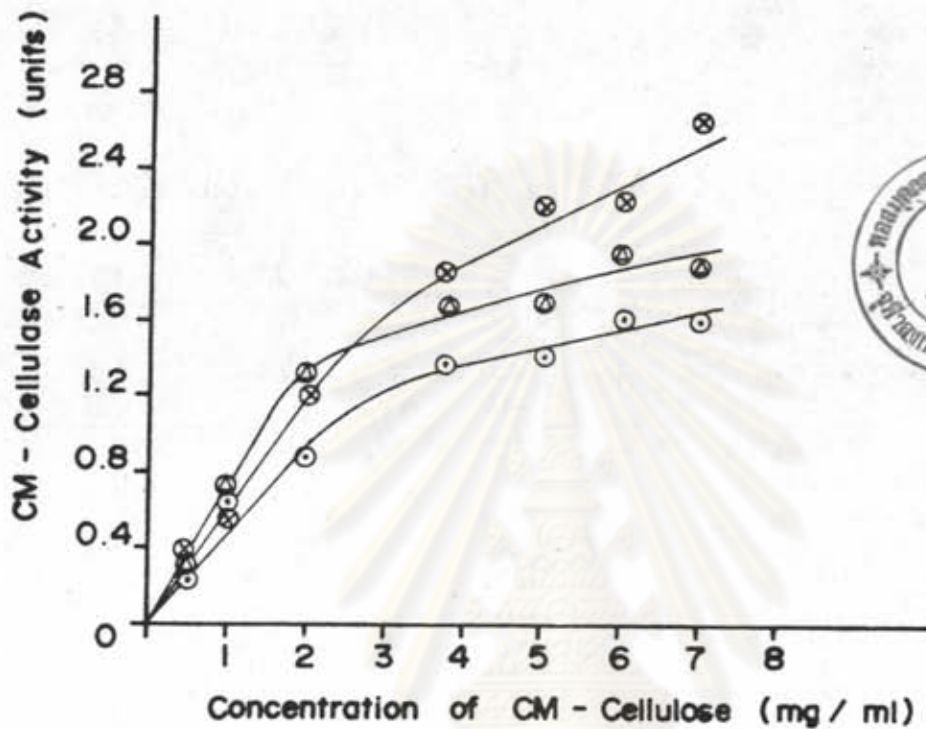
จากผลการทดลองผลของความเข้มข้นของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสต่อแอกติวิตีของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCCaseI และ CMCCaseII ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 39 และ 40 จะเห็นว่าจะมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรตกับแอกติวิตีของเอนไซม์เป็นแบบไฮเปอร์โบลิก ผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิล-



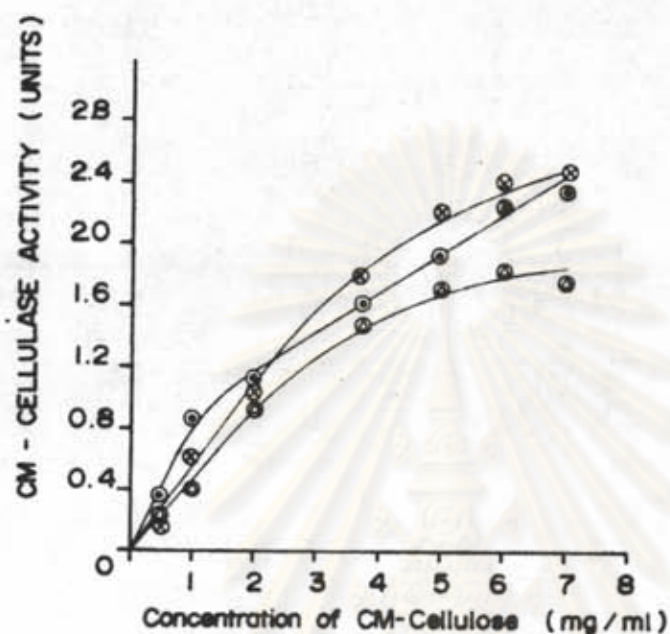
รูปที่ 37 ผลของความเข้มข้นของออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ต่อแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme (Δ) , β -Glu I (\blacktriangle) และ β -Glu III (\blacktriangledown) ที่อุณหภูมิ 37°C . วัดแอกติวิตีของ เบตา-กลูโคซิเดส ที่อุณหภูมิ 37°C . ตามวิธี ในข้อ 3.6.4 โดยใช้ออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ความเข้มข้น 0-3 มิลลิโมล / ลิตร



รูปที่ 38 ผลของความเข้มข้นของออริโคโนโรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ต่อแอกติวิตีของ เบตา-กลูโคซิเดส ใน crude enzyme (Δ) และ β -GLU I (\blacktriangle) ที่อุณหภูมิ 45°ซ. วัดแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส ที่อุณหภูมิ 45°ซ. ตามวิธีในข้อ 3.6.4 โดยใช้ ออริโคโนโรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ความเข้มข้น 0-3 มิลลิโมล / ลิตร



- รูปที่ 39 ผลของความเข้มข้นของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสต่อแอกติวิตีของ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ใน crude enzyme (⊙), CM Case I (⊙) และ CM Case II (⊗) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. วัดแอกติวิตีของ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ที่ 37°ซ. ตามวิธีในข้อ 3.6.5 โดยใช้ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 0-7.0 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร



รูปที่ 40

ผลของความเข้มข้นของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสต่อแอกติวิตีของ

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ใน crude enzyme (●) ,

CM Case I (⊙) และ CM Case II (⊗) ที่อุณหภูมิ 45° C.

วัดแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่ 45° C. ตามวิธีในข้อ

3.6.5 โดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 0-7.0 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

ตารางที่ 13 K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์องค์ประกอบใน crude enzyme และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์. วัคแคตทีวิตีของเอนไซม์ต่างๆตามวิธีในข้อ 3.6 ที่อุณหภูมิ 37°ซ และ 45°ซ ค่า K_m และ V_{max} หาได้โดยอาศัย Lineweaver-Burk Plot.

Substrate	Crude Enzyme			Purified Enzyme		
	37°c		45°c	37°c		45°c
	* K_m	** V_{max}	* K_m	** V_{max}	* K_m	** V_{max}
Cellulase	25.00	133.33	18.86	160.00	-	-
β -Glucosidase	0.88	20.00	0.53	13.33	0.88 ^a	13.33 ^a
CM-Cellulose	2.35	2.50	3.64	2.67	0.47 ^b	7.25 ^b
Avicelase	0.63	10.81	5.00	35.33	1.80 ^c	1.69 ^c
					4.72 ^d	4.35 ^d
					0.50	17.39
					-	-
					3.82 ^c	3.66 ^c
					4.20 ^d	3.33 ^d

* Expressed as μ moles/l for β -glucosidase and mg/ml for cellulase, cm-cellulase and avicelase.

** Expressed as units for every kind of enzyme following the method number 3.6.
a) β -GluI, b) β -GluIII, c) CMCaseI and d) CMCaseII.

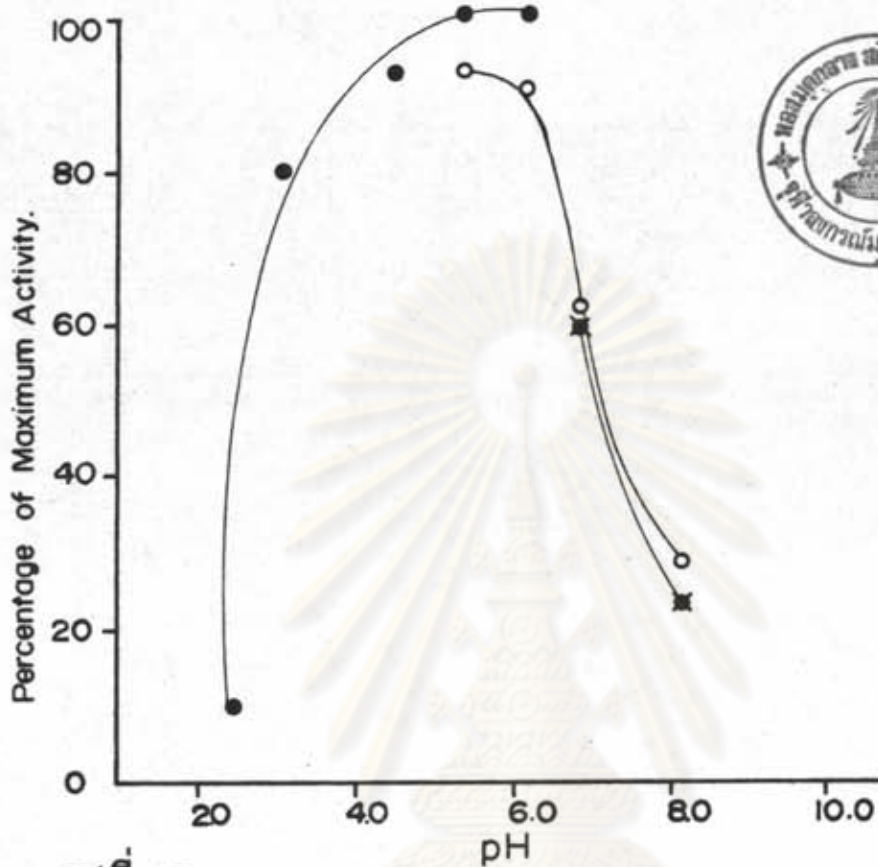
เซลลูเลสใน crude enzyme, CMCaseI และ CMCaseII ไม่ค่อยจะแตกต่างกันนัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรตสูงกว่า 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไป แอคติวิตีจะเริ่มเข้าสู่จุดอิ่มตัว แต่ที่ 45 องศาเซลเซียส แอคติวิตียังคงค่อยๆเพิ่มขึ้นต่อไปเรื่อยๆ จะเริ่มเข้าสู่จุดอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากการทำ Lineweaver-Burk plot และคำนวณค่า K_m และ V_{max} (ตารางที่ 13) พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า K_m ของ CMCaseI ต่ำกว่า CMCaseII และต่ำกว่า crude enzyme K_m ของ CMCaseII สูงกว่าของ crude enzyme V_{max} ของ CMCaseII สูงกว่า crude enzyme และสูงกว่าของ CMCaseI สำหรับที่ 45 องศาเซลเซียสค่า K_m และ V_{max} ของ crude enzyme, CMCaseI และ CMCaseII แตกต่างกันอย่างที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบ K_m และ V_{max} ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าทั้ง crude enzyme และ CMCaseI ทั้งค่า K_m และ V_{max} ที่ 45 องศาเซลเซียสจะสูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ CMCaseII ให้ผลตรงข้าม

4.13.3 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำการทดลองวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสและเอนไซม์องค์ประกอบทั้งใน crude enzyme และที่ทำไพบริสุทธ์ที่ pH ต่างๆคือ pH 2.0-5.0 (อะซีเตตบัฟเฟอร์) pH 6.0-7.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) pH 8.0 (ทริสบัฟเฟอร์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความวิธทดลองในข้อ 3.6 จากผลการทดลองในรูปที่ 41 จะเห็นว่าการเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเซลลูเลส และ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในช่วง pH 5.0-6.0 pH ที่เป็นกรดมากๆและด่างมากๆจะไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส

การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme จะเกิดขึ้นได้ดีที่ pH 3.5-4.0 แต่ใน β -GluI จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 4.2-5.0 และที่ pH สูงกว่า 7.0 การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสจะเกิดขึ้นน้อยมากหรือไม่เกิดเลย (ดูรูปที่ 42)

สำหรับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme จะทำปฏิกิริยาได้



รูปที่ 41

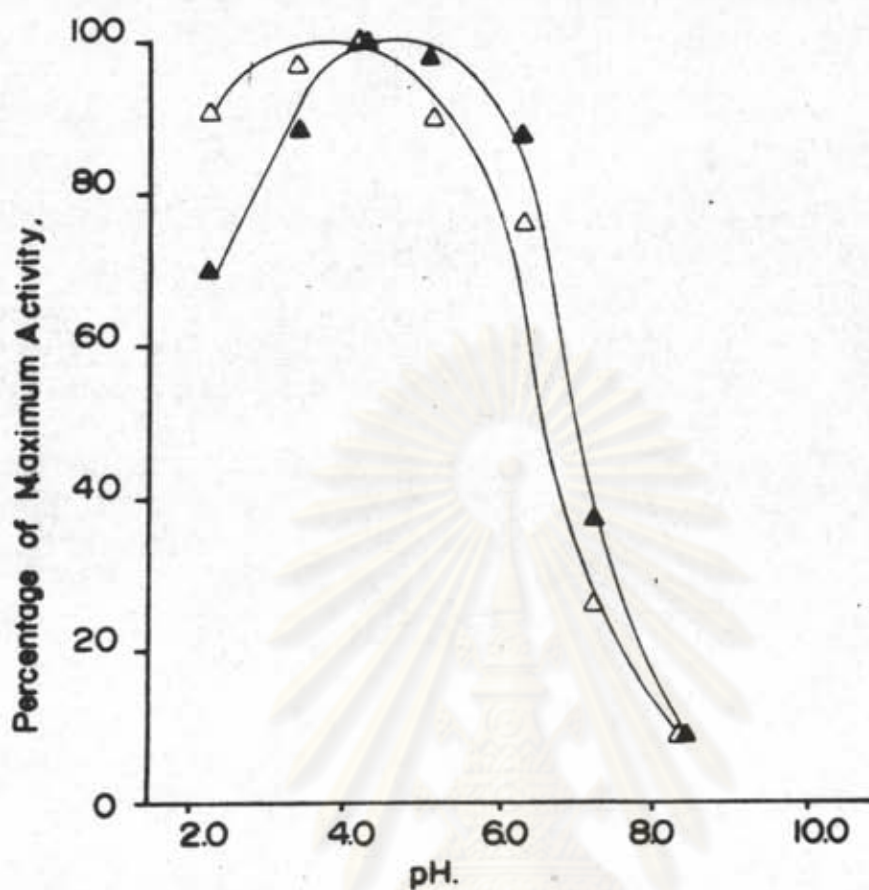
ผลกระทบของ pH ต่อแอกติวิตีของ เซลล์ ใน

crude enzyme วัดแอกติวิตี ที่ 37°ซ. ในสารละลายบัฟเฟอร์

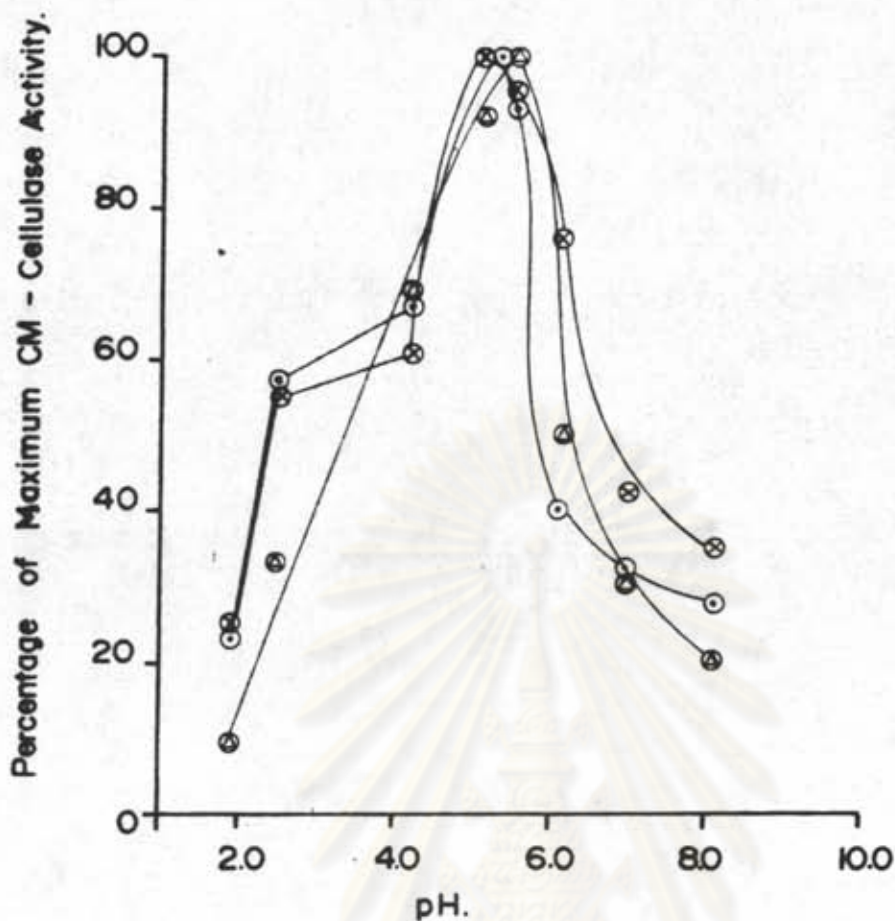
(0.05 โมล/ลิตร) pH ต่างๆคือ 2.5-6.2 (อะซิเตตบัฟเฟอร์, ●)

5.4-8.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, ○) และ 7.0-8.0 (ทริล -

กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์, ✱) ตามวิธีในข้อ 3.6.1 และ 3.16.2



รูปที่ 42 ผลกระทบของ pH. ต่อแอกติวิตีของ เบตา-กลูโคซิเดส ใน crude enzyme (Δ) และ β -Glu I (\blacktriangle) วัดแอกติวิตี ที่อุณหภูมิ 37 °C. ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 โมล / ลิตร) pH. ต่าง ๆ คือ 2.25 - 5.10 (อะซิเตตบัฟเฟอร์) , 6.30 - 7.20 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ 8.4 (ทริล-กรด ไโอโตรคลอริกบัฟเฟอร์) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.4 และ 3.16.2



รูปที่ 43 ผลกระทบของ pH. ต่อแอกติวิตีของ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ใน crude enzyme (●) CM Case I (○) และ

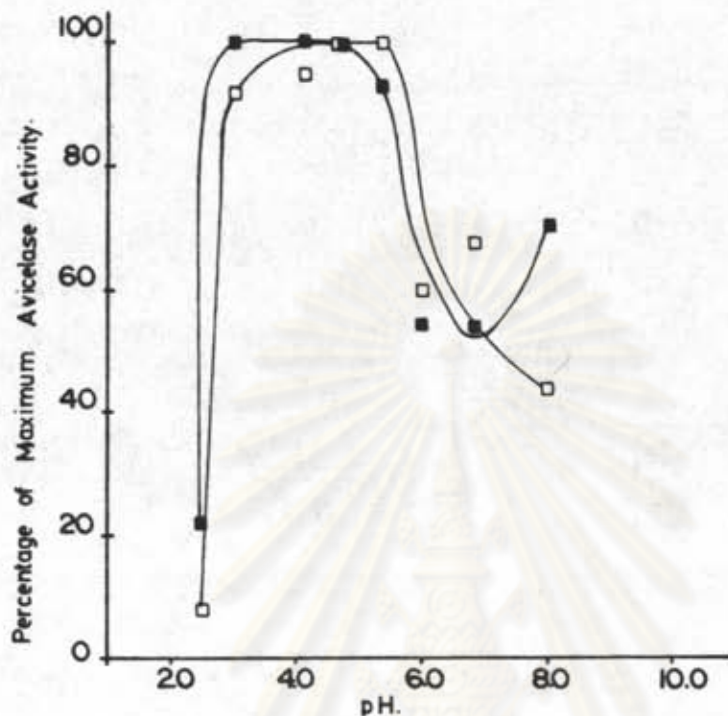
CM Case II (⊗) วัดแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมล / ลิตร)

pH. ต่าง ๆ คือ 1.90 - 5.50 (อะซิเตตบัฟเฟอร์) ,

6.10 - 7.00 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ 8.10 (ทริล-กรดไฮโดรคลอริก

บัฟเฟอร์) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.5 และ 3.16.2



- รูปที่ 44 ผลกระทบของ pH. ต่อแอกติวิตีของ อะวิเซลเลส ใน crude enzyme (□) และ Avicelase (■) วัดแอกติวิตีของอะวิเซลเลสที่อุณหภูมิ 37°C. ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมล / ลิตร) pH. ต่างๆ คือ 2.5-5.35 (อะซิเตตบัฟเฟอร์) 6.0-6.8 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ 8.0 (ทรล-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.6 และ 3.16.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ pH 5.5 ซึ่งไม่ค่อยแตกต่างจาก CMCaseI และ CMCaseII จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 5.3 และ 5.0 ตามลำดับ และแอกติวิตีของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายค่อนข้างมาก (รูปที่ 43)

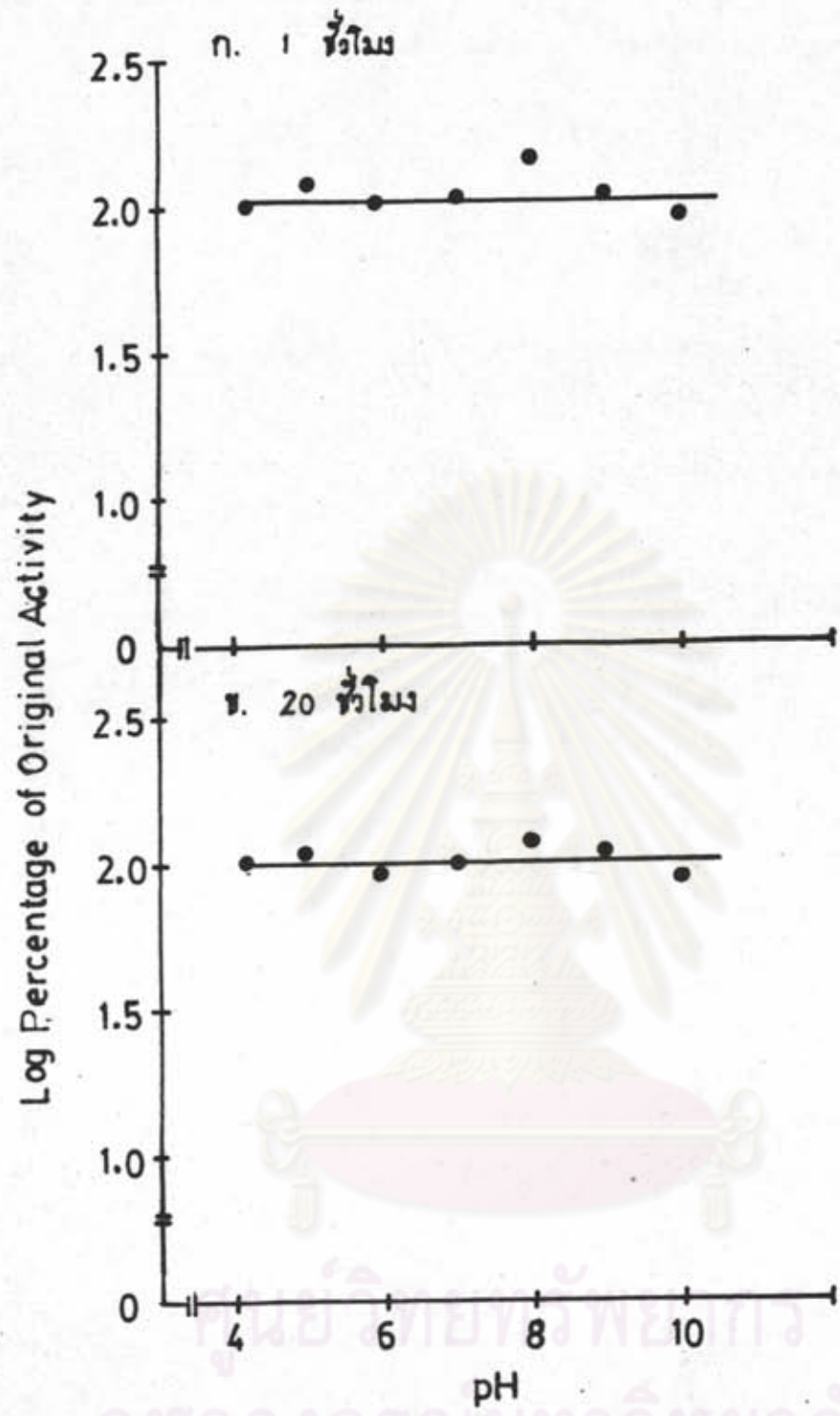
ในรูปที่ 44 แสดงผลของ pH ต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อะมิเลส พบว่า การทำปฏิกิริยาของอะมิเลสจะเกิดได้ดีที่ pH 3.0-5.5 และ pH 3.0-4.5 สำหรับใน crude enzyme และ Avi ตามลำดับ ที่ pH นอกเหนือจากช่วงดังกล่าวการทำปฏิกิริยาของอะมิเลสจะเกิดได้ต่ำมาก

4.13.4 ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

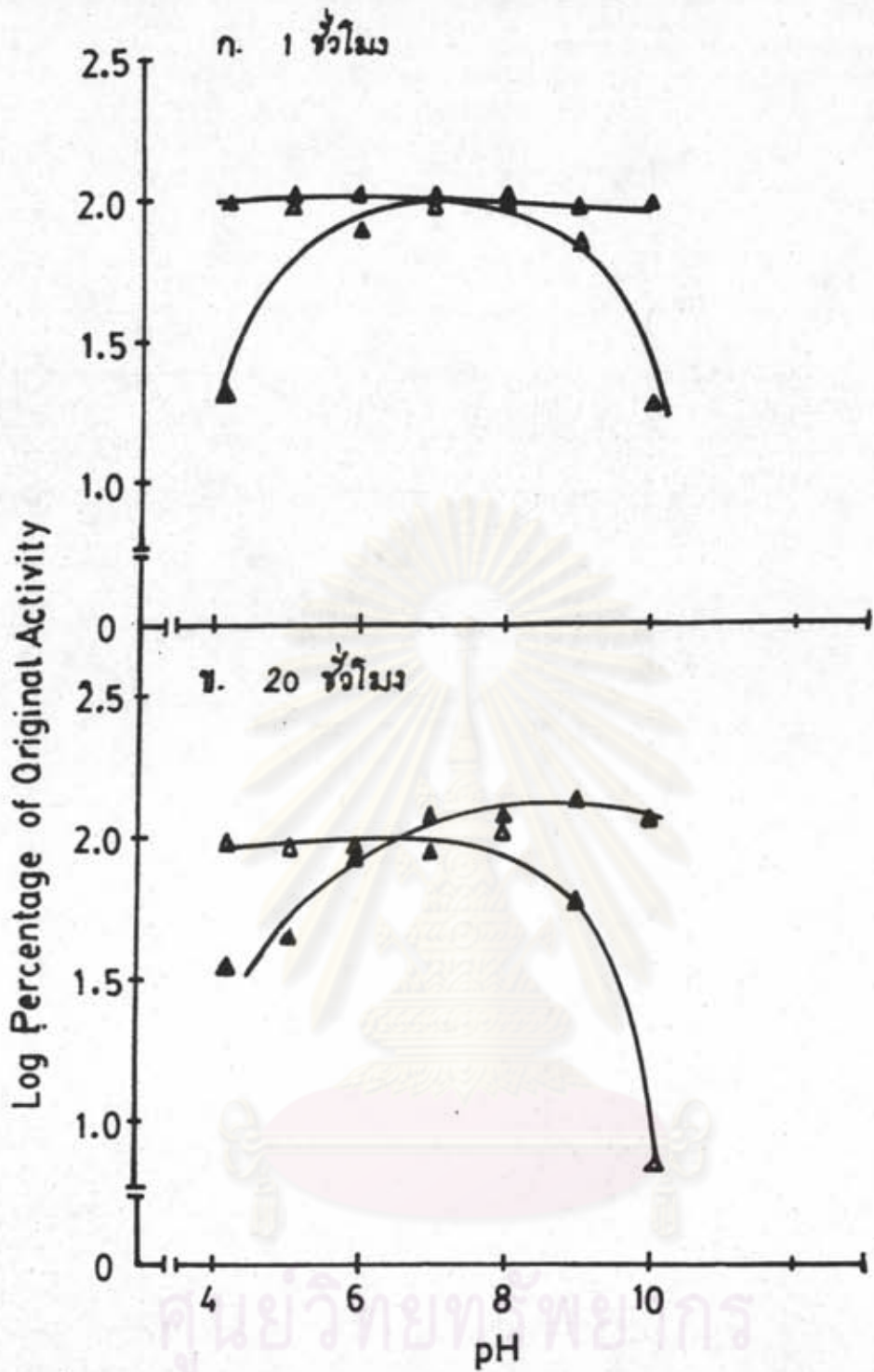
จากผลการศึกษาผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์องค์ประกอบใน crude enzyme และที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยนำเอนไซม์ต่าง ๆ มาอินคิวเบตกับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 โมล/ลิตร) pH ต่างๆ ตั้งแต่ 4.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 20 ชั่วโมงตามวิธีทดลองในข้อ 3.16.3 แล้วจึงนำมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ต่างๆตามวิธีในข้อ 3.6 ในรูปที่ 45 (ก,ข) แสดงผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme ปรากฏว่าสามารถเก็บเอนไซม์เซลลูเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.0-10.0 ได้นานถึง 20 ชั่วโมงโดยที่ไม่สูญเสียแอกติวิตีเลย

ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสของ crude enzyme และ β -GluI ดังแสดงในรูปที่ 46 (ก,ข) จะเห็นว่าเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme จะเก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.0-8.0 ได้นานถึง 20 ชั่วโมง ส่วนใน β -GluI จะสามารถเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง pH สูงๆ ได้ดีกว่าใน pH ต่ำๆ ซึ่งเป็นกรด และเมื่อเก็บไว้นาน 20 ชั่วโมง ดูเหมือนว่าจะเป็นการกระตุ้น (activate) เอนไซม์ด้วย

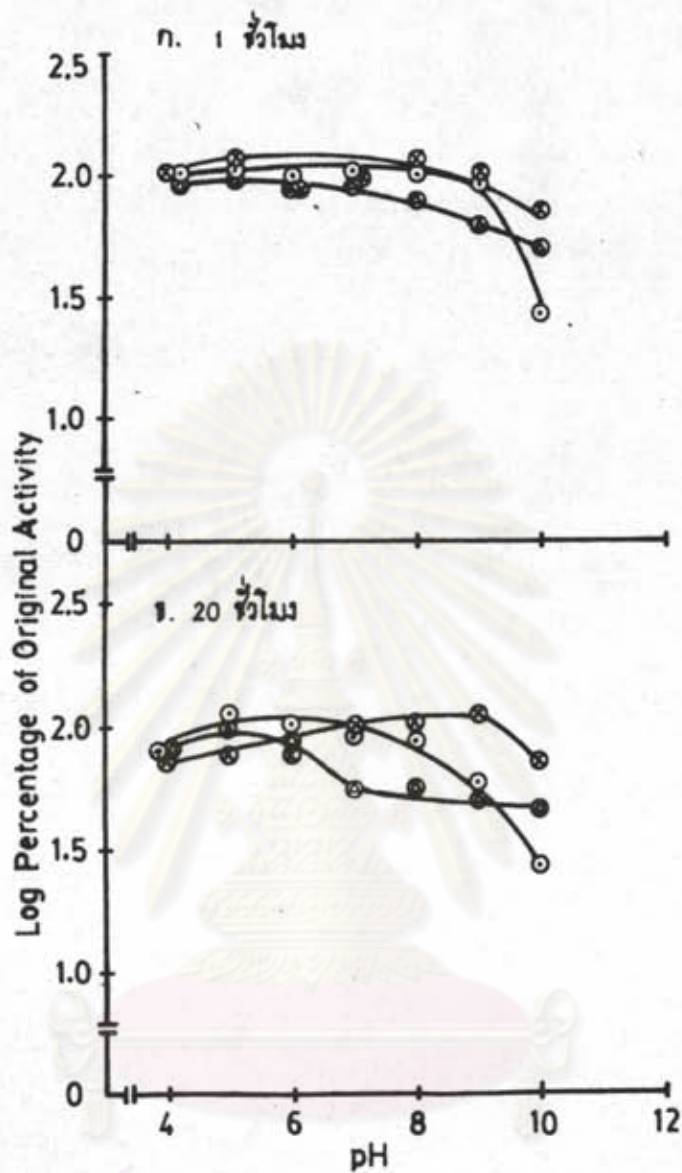
เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCaseI และ CMCaseII จะทนต่อ pH 4.0-7.0, 4.0-9.0 และ 4.0-9.0 ตามลำดับในเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 47ก) และสามารถเก็บเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme ที่ pH 4.5-6.0, CMCaseI ที่ pH 4.0-8.0 และ CMCaseII ที่ pH 4.0-9.0 ได้นานถึง 20 ชั่วโมงโดยไม่มีการสูญเสียแอกติวิตี (รูปที่ 47ข)



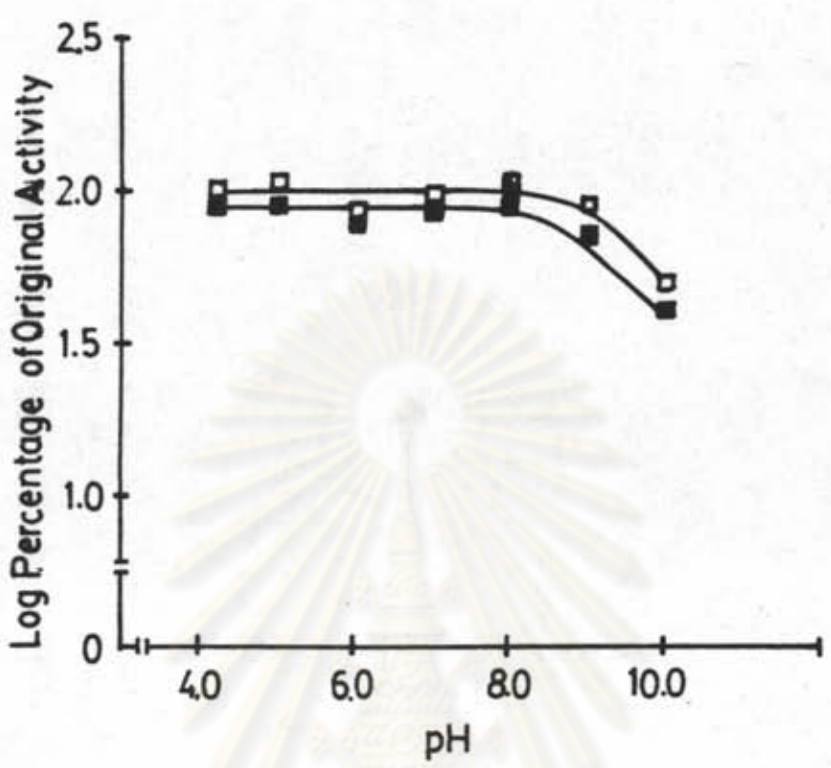
รูปที่ 45 (ก, ข) ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของ เซลล์เลส ของ Crude enzyme เมื่ออินคิวเบตเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 โมล/ลิตร) pH ต่างๆ: 4.0-5.0 (อะซีเตตบัฟเฟอร์) 6.0-7.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) 8.0 (ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) และ 9.0-10.0 (ไกลซีนบัฟเฟอร์) ในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) นาน 1 ชั่วโมง (ก) และ 20 ชั่วโมง (ข) แล้ววัดแอกติวิตีของเซลล์เลสตามวิธีในข้อ 3.6.1



รูปที่ 46 (ก, ข) ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของ เบตา-กลูโคซิเดส ใน Crude enzyme (Δ) และ β -Glu I (\blacktriangle) เมื่ออินคิวเบตเอนไซม์ทั้งสองกับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 โมล/ลิตร) pH ต่างๆ: 4.0-5.0 (อะซิเตตบัฟเฟอร์) 6.0-7.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) 8.0 (ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) และ 9.0-10.0 (ไกลซีนบัฟเฟอร์) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ก) และ 20 ชั่วโมง (ข) แล้ววัดแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสตามวิธีในข้อ 3.6.4



รูปที่ 47 (ก, ข) ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของ เอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ใน crude enzyme (●) CMCCase I (○) และ CMCCase II (●) เมื่ออินคิวเบตเอนไซม์ทั้งสามกับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 โมล/ลิตร) pH ต่างๆ ที่ 30 °ซ. : 4.0-5.0 (อะซิเตตบัฟเฟอร์) 6.0-7.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) 8.0 (ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) และ 9.0-10.0 (ไกลซีนบัฟเฟอร์) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ก) และ 20 ชั่วโมง (ข) แล้วนำโปรตีนแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสตามวิธีในข้อ 3.6.5



รูปที่ 48 ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อะวิเซลเลสใน crude enzyme (□) และ Avi (■) เมื่ออินคิวเบตเอนไซม์ทั้งสองกับ สารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 โมล/ลิตร) pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. 4.0 - 5.0 (อะซีเตตบัฟเฟอร์) 6.0-7.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) 8.0 (ทริส-กวตไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) และ 9.0-10.0 (ไกลซีนบัฟเฟอร์) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดแอกติวิตี ของอะวิเซลเลสตามวิธีในข้อ 3.6.6

สำหรับอะวิเซลเลสทั้งใน crude enzyme และ Avi สามารถเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.0-8.0 ในเวลา 1 ชั่วโมงโดยที่ไม่สูญเสียสภาพไปดังแสดงในรูปที่ 48

4.13.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ในการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ต่างๆทั้งใน crude enzyme และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 30-90 องศาเซลเซียสพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และยังมีแอกติวิตีค่อนข้างสูงจนถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่ปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสต่อสับสเตรต(แอลฟา-เซลลูโลส) ที่อุณหภูมิสูงถึง 80 หรือ 90 องศาเซลเซียสจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนเกือบไม่เกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 49)

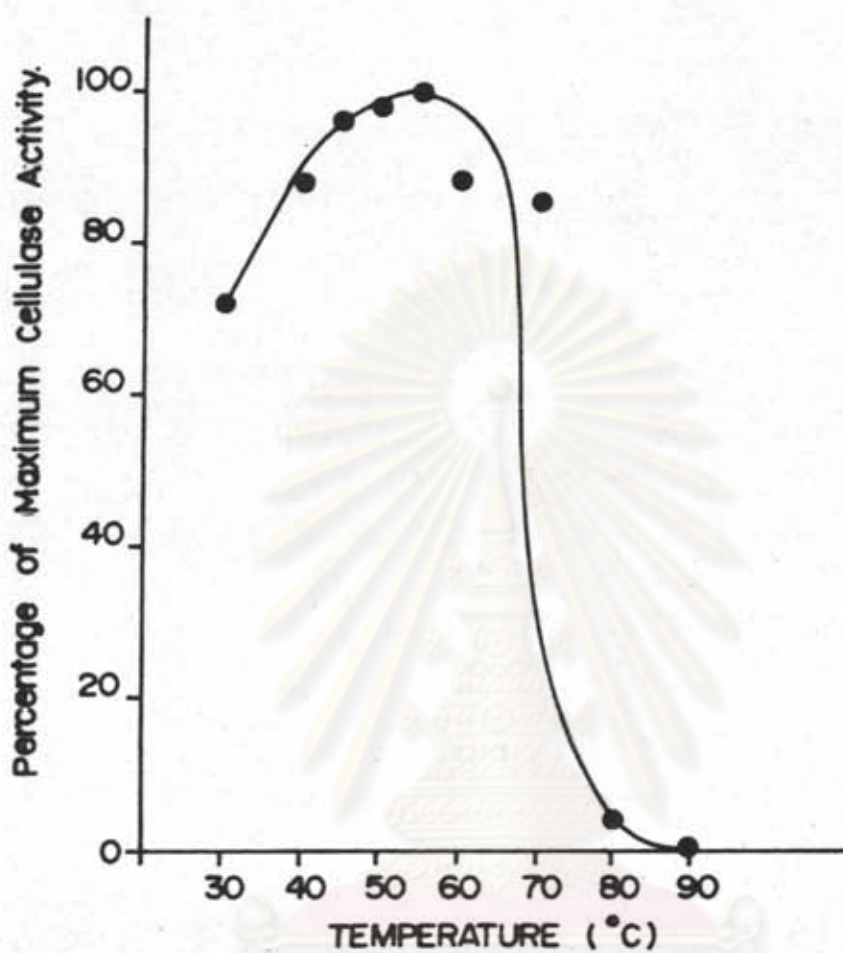
เบตา-กลูโคซิเดส crude enzyme และ β -GluI จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55-60 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งแตกต่างไปจาก β -GluIII จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 50)

ผลของอุณหภูมิต่อการทำปฏิกิริยาของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCCaseI และ CMCCaseII ในรูปที่ 51 พบว่าการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCCaseI และ CMCCaseII จะเกิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60, 55 และ 65-70 องศาเซลเซียสตามลำดับ

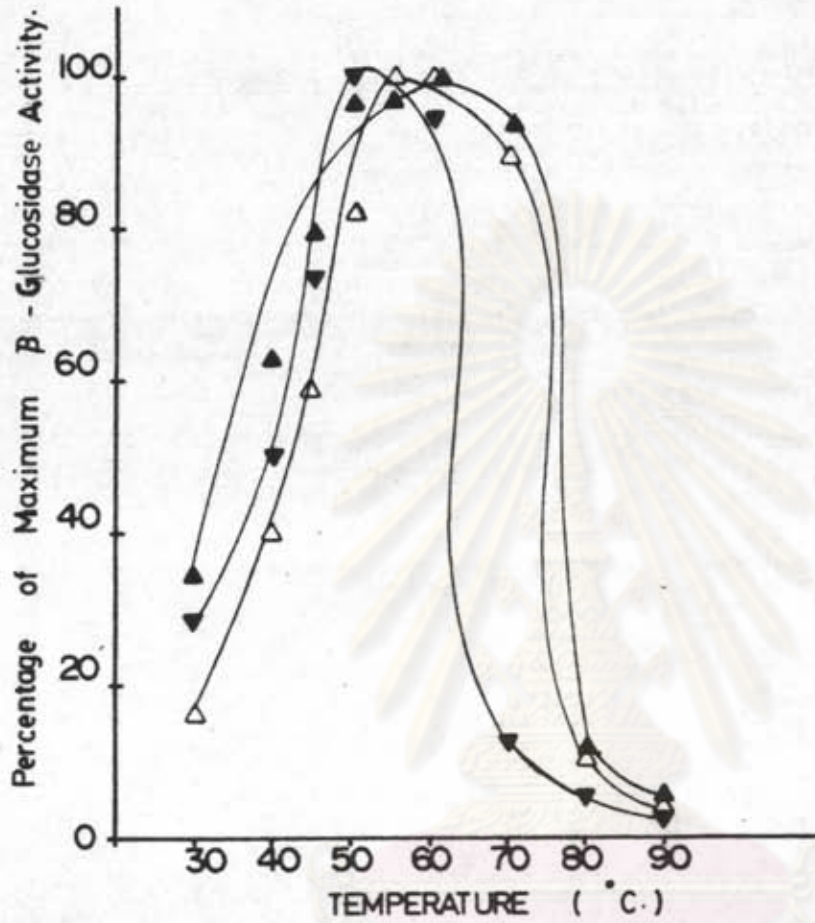
ส่วนอะวิเซลเลสใน Avi จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างไปจากอะวิเซลเลสใน crude enzyme จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส (รูปที่ 52)

4.13.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ส่วนต่างๆทั้ง crude enzyme และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 ชั่วโมง และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ต่างๆตามวิธีในข้อ 3.6 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme จะไม่สูญเสียแอกติวิตี เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง และจะเริ่มสูญเสียแอกติวิตีอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเก็บ



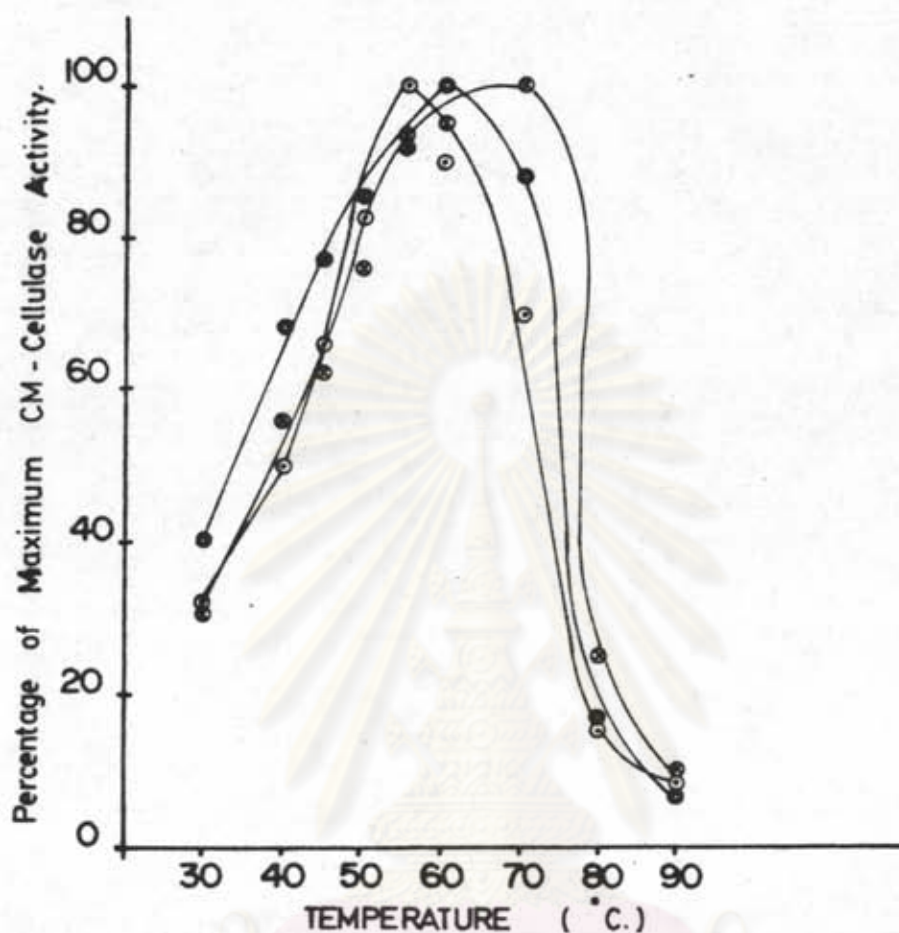
รูปที่ 49 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ เซลล์ูลส ใน crude enzyme
วัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 - 90°ซ. ตามวิธีทดลอง
ในข้อ 3.6.1



รูปที่ 50 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ เบตา-กลูโคซิเดส ใน crude enzyme (Δ)

β-Glu I (▲) และ β Glu II (▼) วัดแอกติวิตีของ เบตา-กลูโคซิเดส

ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 30-90°ซ. ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.4

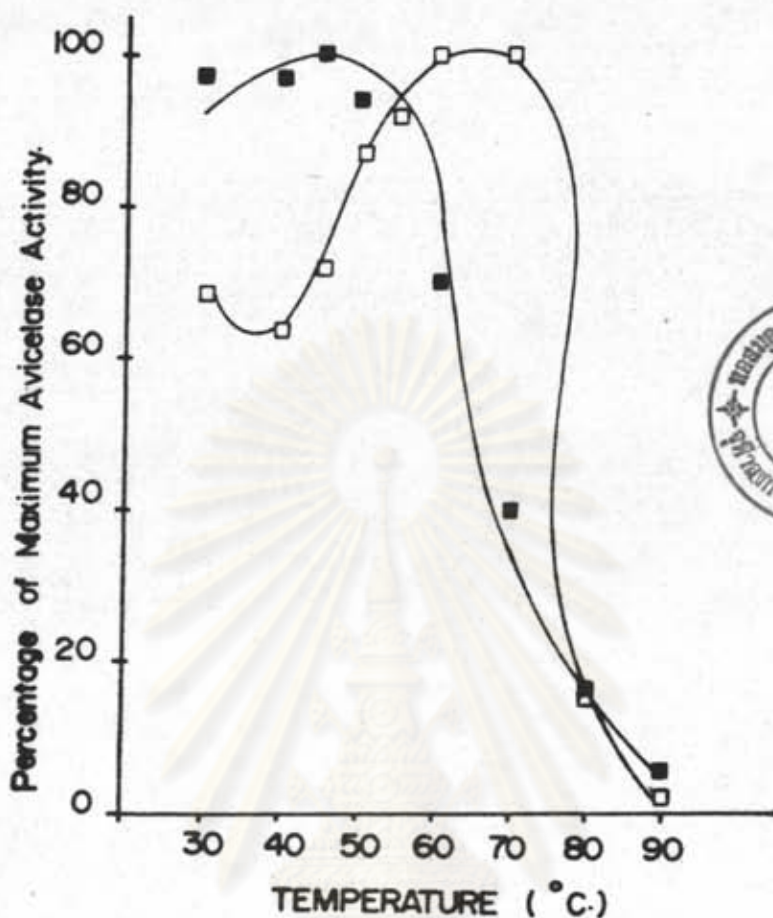


รูปที่ 51 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของคาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส ใน

Crude enzyme (●), CMCase I (○) และ CMCase II (⊙)

วัดแอกติวิตีของคาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆ 30-90°ซ.

ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.5



รูปที่ 52 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ อะวิเซลเลส ใน crude enzyme (□) และ Avi (■) วัดแอกติวิตีของอะวิเซลเลสที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 - 90° ซ. ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.6

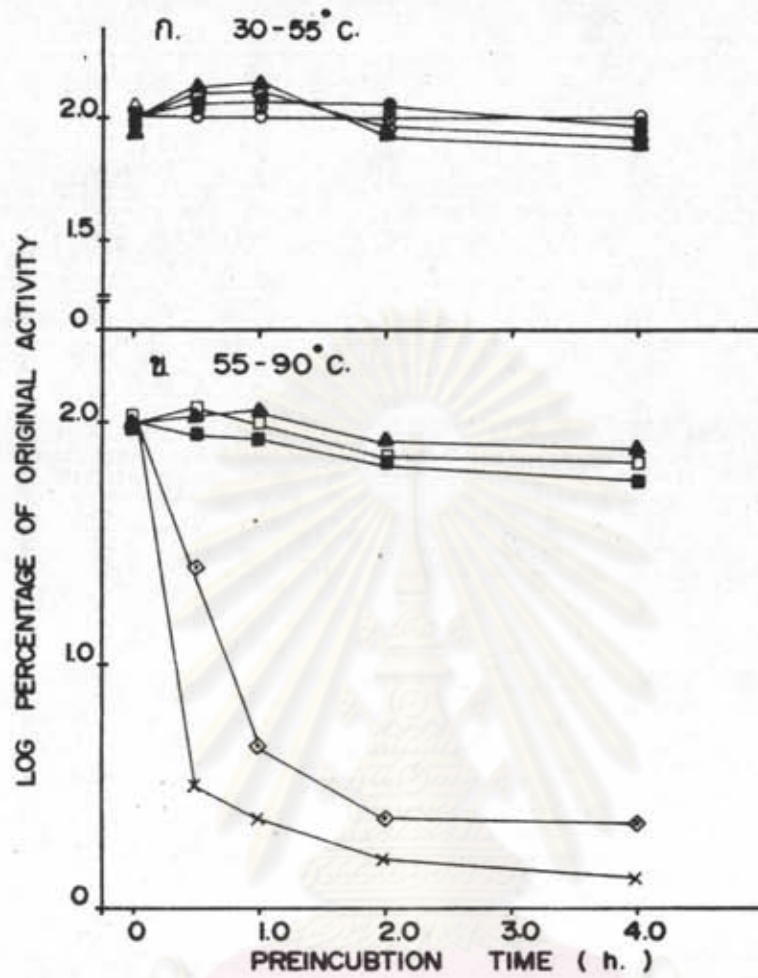
ไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป (ดูรูปที่ 53) โดยที่ $t_{1/2}^*$ ที่ 80 และ 90 องศาเซลเซียสมีค่า 0.80 และ 0.10 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 14)

เบตา-กลูโคซิเดสจากผลการทดลองในรูปที่ 54 จะเห็นว่าเบตา-กลูโคซิเดส ทั้งใน crude enzyme และใน β -GluI เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมง จะไม่ทำให้สูญเสียแอกติวิตี การสูญเสียแอกติวิตีจะเริ่มปรากฏเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยที่ค่า $t_{1/2}^*$ ของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme ที่ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสจะเท่ากับ 1.00, 0.38 และ 0.27 ชั่วโมงตามลำดับ ใน β -GluI ค่า $t_{1/2}^*$ ที่ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสจะมีค่า 2.04, 0.22 และ 0.14 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 14)

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme สามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30-50 องศาเซลเซียสได้นานถึง 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเริ่มมีการสูญเสียแอกติวิตี เมื่อเก็บไว้ที่ 55-60 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงไปยังบางส่วน และที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสจะมีการสูญเสียแอกติวิตีมากขึ้น สำหรับใน CMCCaseI และ CMCCaseII จะเห็นว่าสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้นาน 4 ชั่วโมงโดยไม่สูญเสียแอกติวิตีเลย และสามารถทนต่ออุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียสใน 1 ชั่วโมงแรกสำหรับ CMCCaseI และ 0.5 ชั่วโมงแรกสำหรับ CMCCaseII (รูปที่ 55) และไม่สามารถเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส โดยที่ $t_{1/2}^*$ ของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCCaseI และ CMCCaseII ที่ 70 องศาเซลเซียสมีค่า 0.40, 1.00 และ 1.00 ตามลำดับ ที่ 80 องศาเซลเซียสมีค่า 0.15, 0.30 และ 0.17 และที่ 90 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 0.15, 0.20 และ 0.14 ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ในรูปที่ 56 แสดงผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อะวีเซลเลส พบว่าเอนไซม์อะวีเซลเลสใน crude enzyme สามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30-55 องศาเซลเซียสได้นานถึง 4 ชั่วโมง การสูญเสียแอกติวิตีจะเริ่มปรากฏที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป ส่วนอะวีเซลเลสใน Avi เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิช่วง 30-60 องศาเซลเซียส จะไม่สูญเสียแอกติวิตี จะเริ่มมีการสูญเสียแอกติวิตีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป โดยที่มีค่า $t_{1/2}^*$ ใน crude enzyme ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศา

$t_{1/2}^*$ คือเวลาที่ใช้ในการทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูญเสียไปครึ่งหนึ่งของแอกติวิตีตั้งต้น



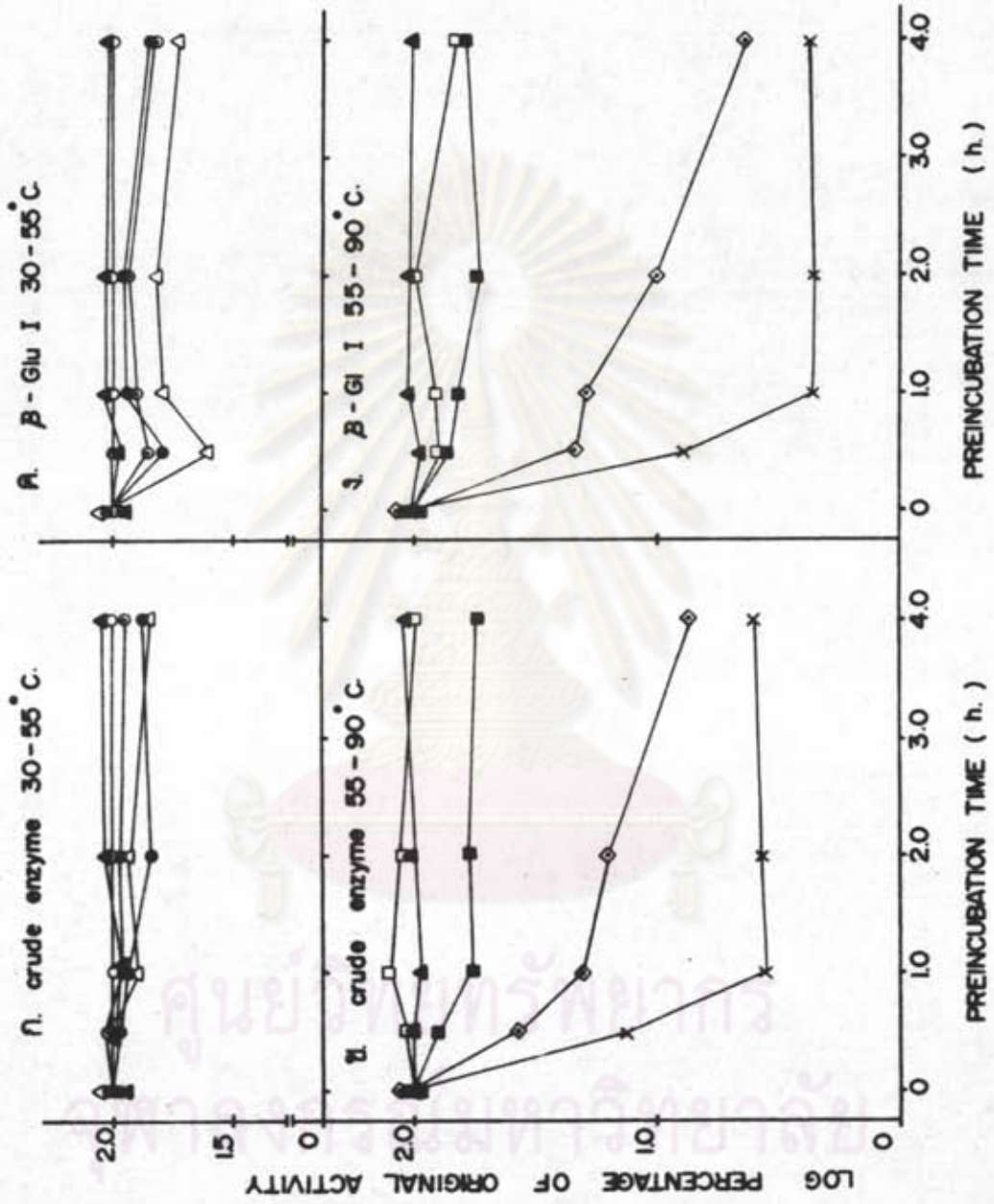
รูปที่ 53 (ก, ข) ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สกัดได้จาก crude enzyme

โดยอินคิวเบตเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ: 30-90°ซ. เป็นเวลา 0, 0.5, 1.0, 2.0

และ 4.0 ชั่วโมง วัดแอกติวิตีที่ 37°ซ. ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.1 30°ซ.(○),

40°ซ.(●), 45°ซ.(●), 50°ซ.(Δ), 55°ซ.(▲), 60°ซ.(□), 70°ซ.(■),

80°ซ.(◇) และ 90°ซ.(x)



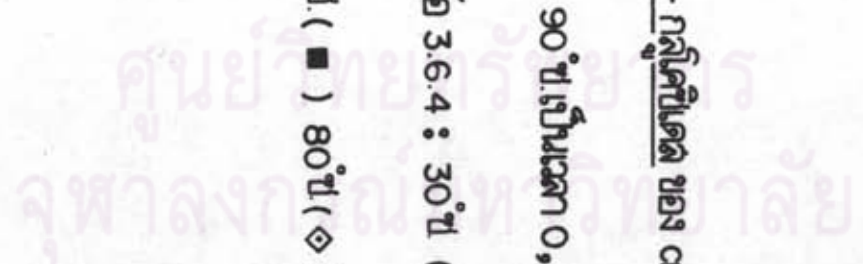
รูปที่ 54

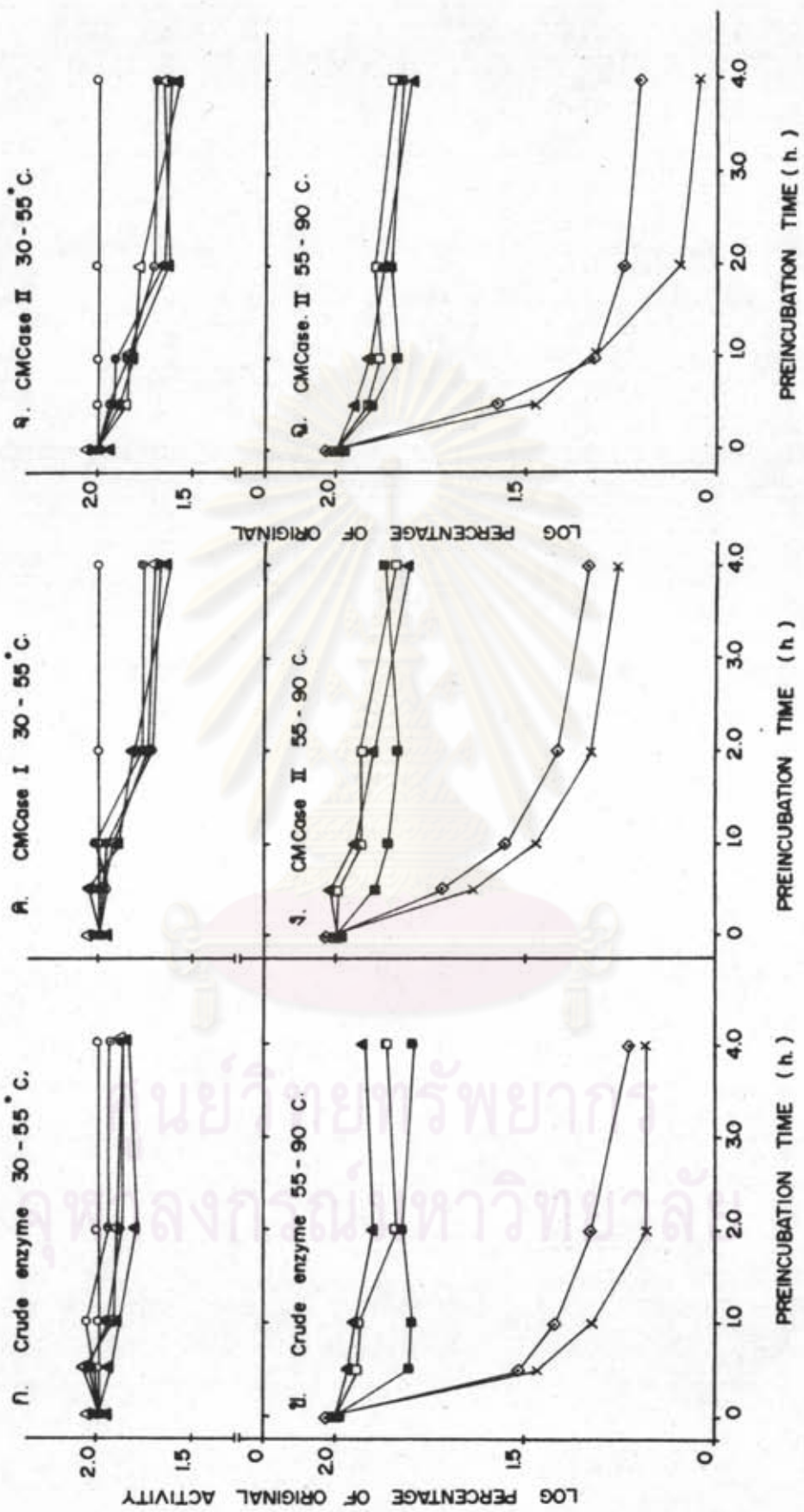
รูปที่ 54 (ก,ข,ค,ง) ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส ของ crude enzyme

และ B-Glu I โดยอินคิวเบชันในช่วงที่อุณหภูมิต่างๆ: 30 - 90 องศาเซลเซียส 0, 0.5, 1.0, 2.0

และ 4.0 ชั่วโมง วัดแอกติวิตีที่ 37 องศาเซลเซียส ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.4 : 30 องศาเซลเซียส (○), 40 องศาเซลเซียส (●),

45 องศาเซลเซียส (●), 50 องศาเซลเซียส (△), 55 องศาเซลเซียส (▲), 60 องศาเซลเซียส (□), 70 องศาเซลเซียส (■) 80 องศาเซลเซียส (◇) และ 90 องศาเซลเซียส (×)





รูปที่ 55

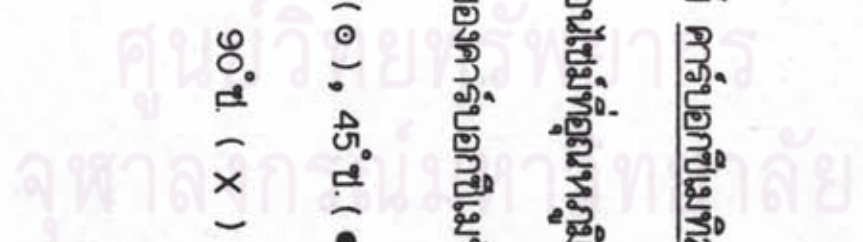
รูปที่ 55 (ก, ข, ค, ง, จ, ฉ) ผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ของ

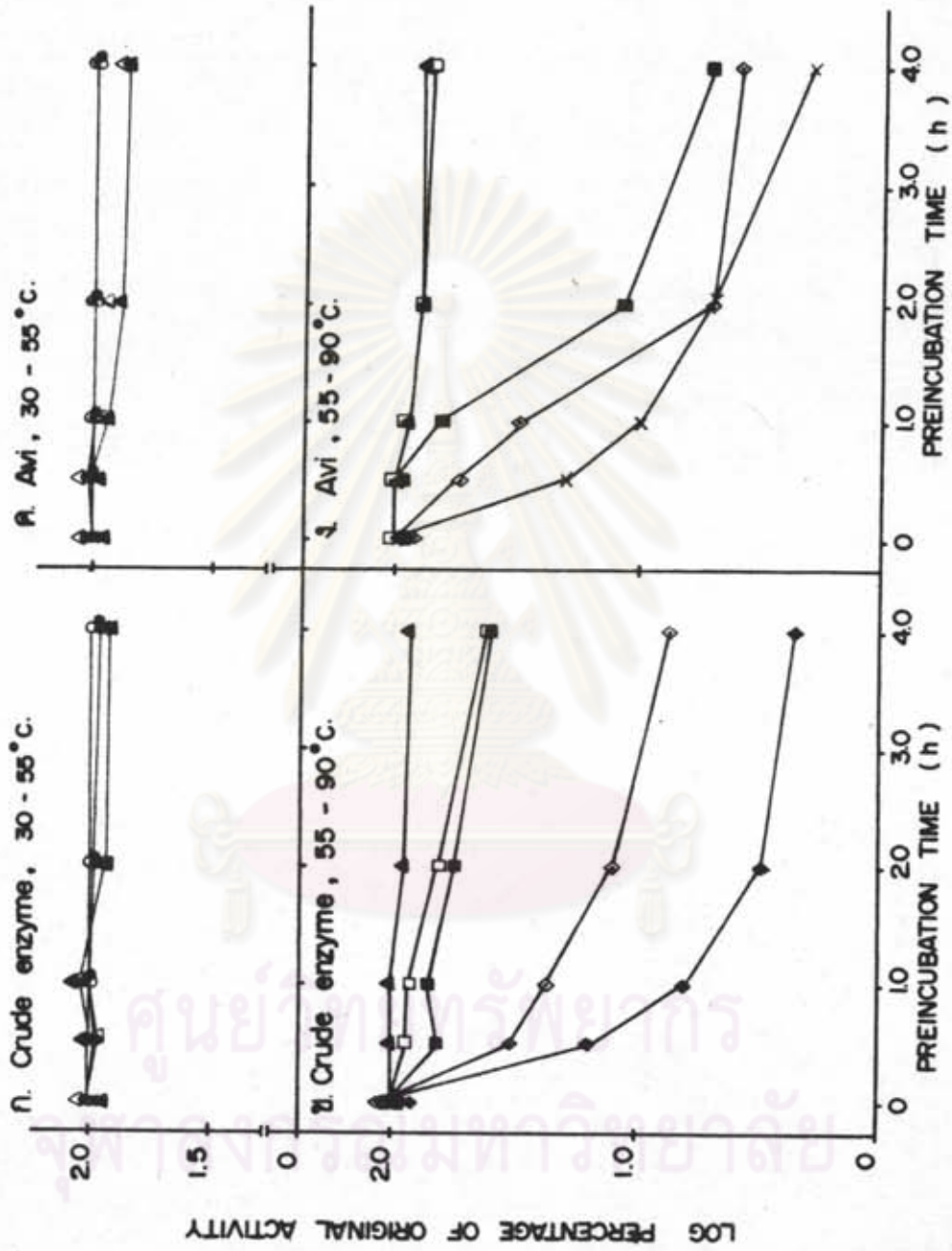
crude enzyme , CMCase I และ CMCase II โดยอินคิวเบตเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ : 30 - 90°ซ.

เป็นเวลา 0 , 0.5, 1.0, 2.0 และ 4 ชั่วโมง และวัดแอกติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่

37°ซ. ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.5 : 30°ซ. (○) , 40°ซ. (◉) , 45°ซ. (●) , 50°ซ. (▼) ,

55°ซ. (▲) , 60°ซ. (□) , 70°ซ. (■) , 80°ซ. (◆) และ 90°ซ. (X)





รูปที่ 56

รูปที่ 56 (ก,ข,ค,ง) ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อะไมเลส ของ Crude enzyme และ Avi

โดยอินทรียภาพใหม่ที่ถูกหกรูมิต่าง ๆ : 30 - 90 °ข. เป็นเวลา 0, 05, 1.0, 2.0 และ 4.0 ชั่วโมง

• และวัดแอกติวิตีของอะไมเลส ที่ 37 °ข. ตามวิธีทดลองในข้อ 3.6.6 : 30 °ข. (○), 40 °ข. (●),

45 °ข. (●), 50 °ข. (Δ), 55 °ข. (▲), 60 °ข. (□), 70 °ข. (■), 80 °ข. (◇) และ 90 °ข. (×)

ตารางที่ 14 แสดงค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของเอนไซม์ (เวลาที่ใช้ในการทำให้
แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงไปครึ่งหนึ่งของแอกติวิตีเริ่มต้น) ที่อุณหภูมิ
70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส

Enzyme	$t_{1/2}^*$ (hrs.)		
	70 °c	80 °c	90 °c
Cellulase (crude enzyme)	-	0.80	0.10
β -Glucosidase (crude enzyme)	1.00	0.38	0.27
(β -GluI)	2.04	0.22	0.14
CM-Cellulase (crude enzyme)	0.40	0.15	0.15
(CMCaseI)	1.00	0.30	0.20
(CMCaseII)	1.00	0.17	0.14
Avicelase (crude enzyme)	3.01	0.60	0.40
(Avi)	0.50	0.43	0.27

* Calculated from the equation : $k = \frac{0.693}{t_{1/2}}$ and k is
calculated from the slope of each line illustrated
in Fig. 53-56. (slope = $-\frac{k}{2.3}$)

เซลเซียสเท่ากับ 3.01, 0.60 และ 0.40 ชั่วโมง และใน Avi มีค่า $t_{1/2}$ เท่ากับ 0.50, 0.43 และ 0.27 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 14)

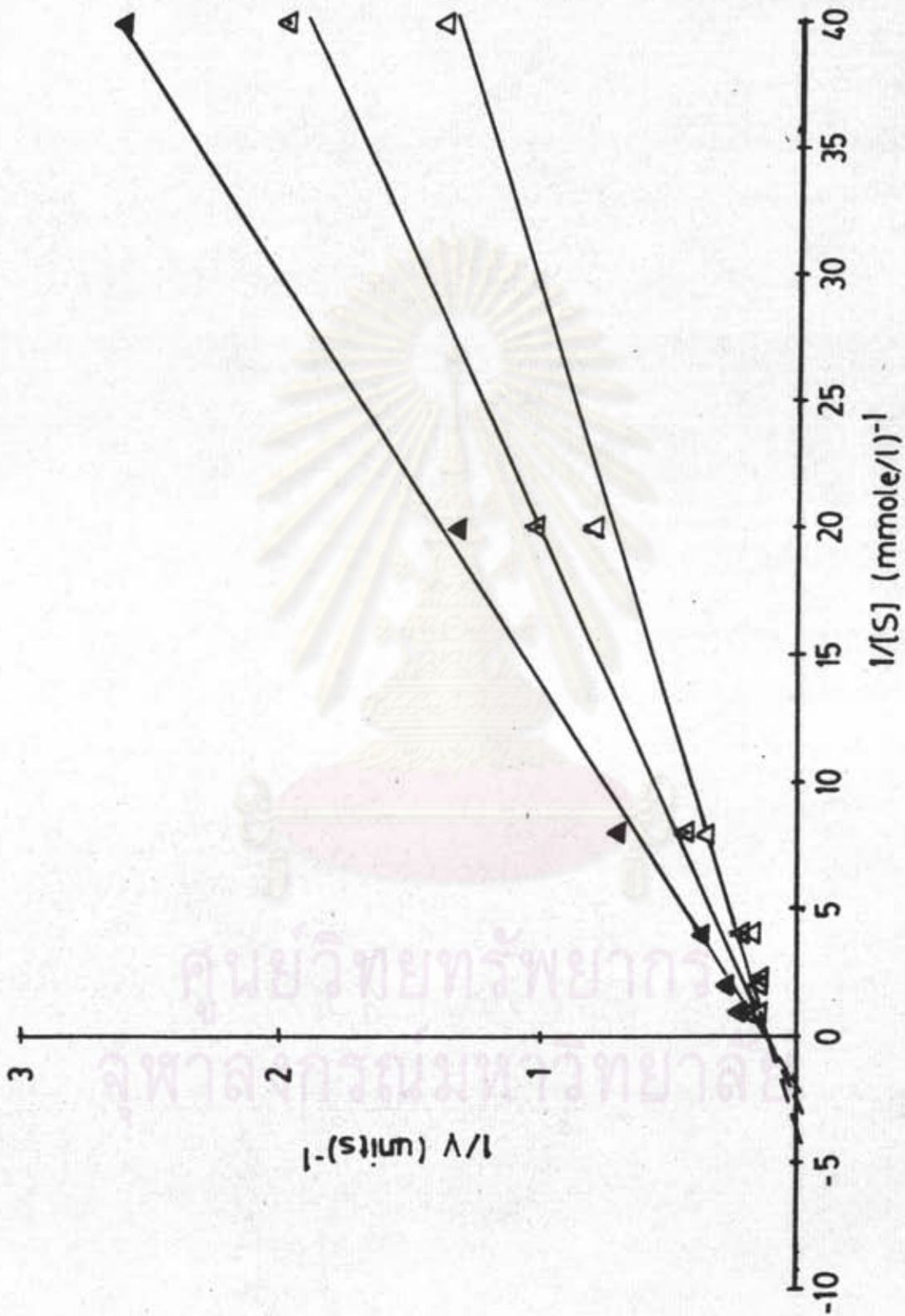
4.13.7 ผลการศึกษาค่า K_i ของกลูโคสต่อเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส

เนื่องจากเบตา-กลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลโลไบโอส ให้ได้กลูโคส และมีรายงานว่าเบตา-กลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกลูโคส จึงได้ทำการศึกษายับยั้งเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสทั้งใน crude enzyme และใน β -GluI ตามวิธีทดลองในข้อ 3.16.7 โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 2.0 และ 5.0 มิลลิโมล/ลิตร ซึ่งทดสอบแล้วว่าสามารถยับยั้งแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส ได้ประมาณ 15 และ 35 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองในรูปที่ 57, 58 และตารางที่ 15 จะเห็นว่าเมื่อมีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้น จะทำให้ค่า K_m เพิ่มขึ้น แต่ V_{max} ยังคงเดิม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการยับยั้งแอกติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสเป็นแบบ competitive inhibition และค่า K_i ใน crude enzyme มีค่าเท่ากับ 5.0 มิลลิโมล/ลิตร ส่วนใน β -GluI มีค่า 6.2 มิลลิโมล/ลิตร

สรุปผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสใน crude enzyme และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 16

4.14 ผลการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme จาก A. fumigatus Fres. (V_I)

ในตารางที่ 17 แสดงเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่างๆ เมื่อมีและไม่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ ($NaNO_3$) จะเห็นว่าเมื่อมี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์อยู่ด้วย การสูญเสียแอกติวิตีเกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อไม่มี และสามารถเก็บเอนไซม์เซลลูเลสไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 30 องศาเซลเซียสได้นานถึง 6 เดือน โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสูญเสียแอกติวิตีไปเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์จะเก็บเอนไซม์เซลลูเลสที่ -20 และ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 6 เดือน และที่ 30 องศาเซลเซียสได้นาน 14 วันก็จะมี การสูญเสียแอกติวิตีไป



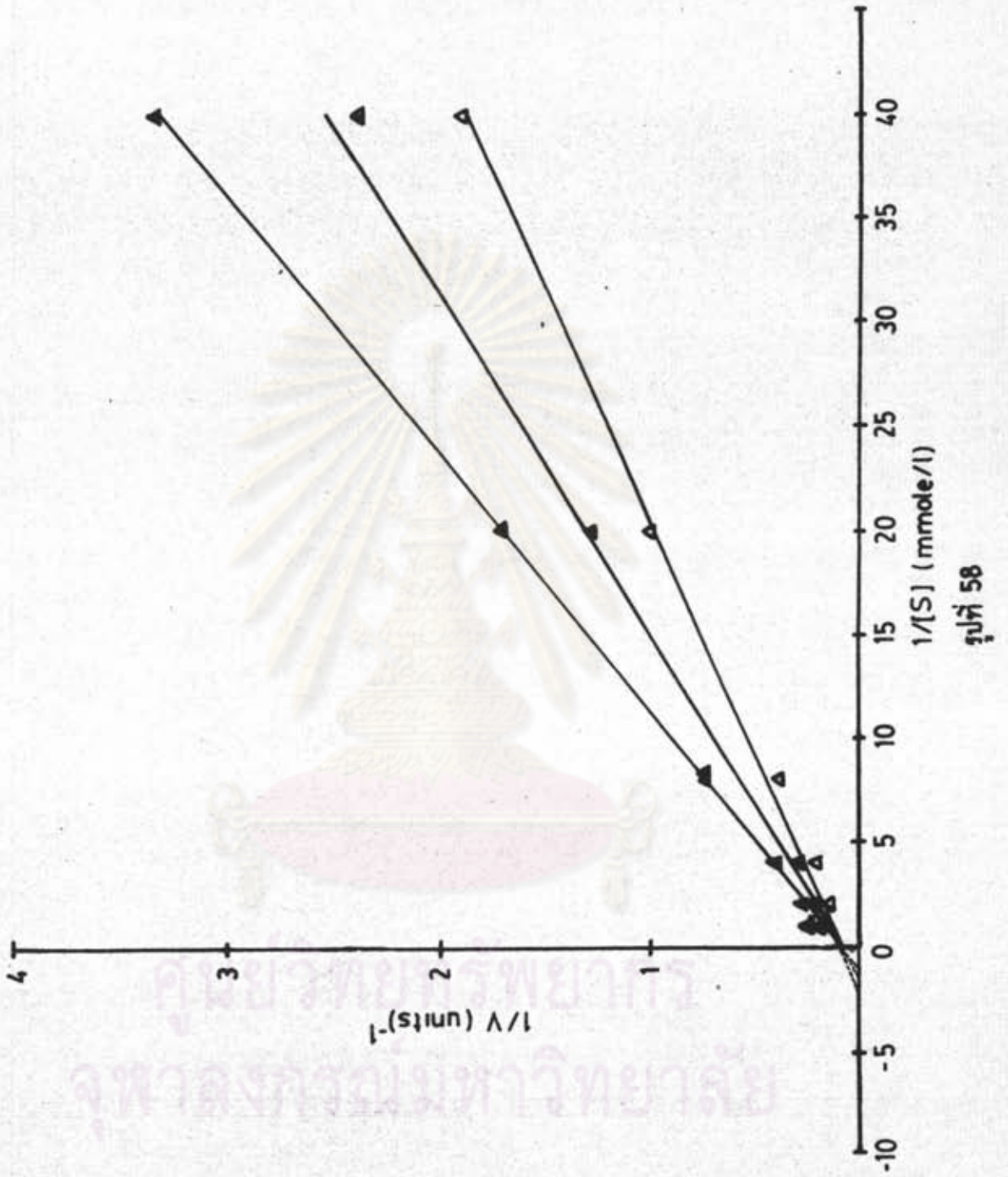
รูปที่ 57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 57 Reciprocal Plot ของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme ซึ่งถูก

ยับยั้งโดยกลูโคสที่อุณหภูมิ 45°ซ วัดแอกทิวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสที่อุณหภูมิ 45°ซ
ตามวิธีในข้อ 3.6.4 โดยใช้ออร์โทปไทรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโบไซท์ที่ความ
เข้มข้น 0-9 มิลลิโมล/ลิตร ที่ความเข้มข้นของกลูโคสคงที่ 0, 2.0 และ 5.0 มิลลิโมล/ลิตร
(Δ) กลูโคส 0 มิลลิโมล/ลิตร , (▲) กลูโคส 2.0 มิลลิโมล/ลิตร และ (▲)
กลูโคส 5.0 มิลลิโมล/ลิตร



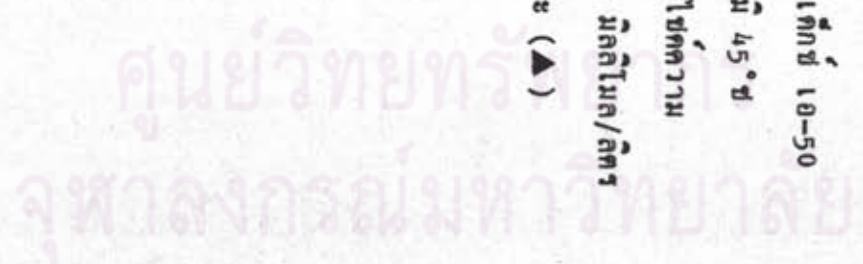


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะวิทยาศาสตร์
ภาควิชาชีววิทยา

รูปที่ 58

รูปที่ 58 Reciprocal Plot ของเบตา-กุกโคซิเคตจากกลีเม็นทีเออี-เซฟาเท็กซ์ 10-50

(P-G1UI) ที่อุณหภูมิ 45°ซ วัตถุประสงค์ของเบตา-กุกโคซิเคตที่อุณหภูมิ 45°ซ
 ตามวิธีในข้อ 3.6.4 โดยใช้ออร์โธไบนไตรเพนิล-เบตา-คี-กุกโคไพราโนโซลค์ความ
 เข้มข้น 0-3.0 มิลลิโมล/ลิตรที่ความเข้มข้นกุกโคสคที่ 0, 2.0 และ 5.0 มิลลิโมล/ลิตร
 (Δ) กุกโคส 0 มิลลิโมล/ลิตร, (▲) กุกโคส 2.0 มิลลิโมล/ลิตร และ (▼)
 กุกโคส 5.0 มิลลิโมล/ลิตร



ตารางที่ 15 ค่า K_i ของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ เอนไซม์ที่ทำให้อริสซูร์ (β -GluI) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ วัด แอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสที่ 45 °ซ ตามวิธีในข้อ 3.6.4 เมื่อใช้ ความเข้มข้นของออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ตั้งแต่ 0-3.0 มิลลิโมล/ลิตรที่ความเข้มข้นของกลูโคสคงที่ (0, 2.0 และ 5.0 มิลลิโมล/ลิตร) ค่า K_i หาได้โดย Lineweaver-Burk Plot

Kinetic parameter	Crude Enzyme			Purified β -GluI		
	Glucose concentration *			Glucose Concentration *		
	0	2	5	0	2	5
K_{m}^{**}	0.29	0.40	0.57	0.50	0.67	0.89
V_{max} (units)	10.00	10.00	10.00	10.67	10.67	10.67
K_i^{***}	5.0			6.2		

* Expressed as mmoles/l.

** $K_{m(app)}$ is K_m when glucose as inhibitor and expressed as mmoles o-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside/l.

*** Expressed as mmoles glucose/l.

ตารางที่ 16 สรุปผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสที่ทำไบโริสโท

ของ A. fumigatus Pres. (V₁)

	Cellulase	β-Glucosidase			CM-Cellulase			Avicelase	
		Crude Enzyme	β-GluI	β-GluIII	Crude Enzyme	CMCaseI	CMCaseII	Crude Enzyme	Avi
Molecular Weight by Gel Filtration	-	55,000	240,000	-	-	28,750	28,750	-	32,000
Michaelis-Menten Constant	25.00	0.88	0.47	-	2.35	4.72	0.63	0.50	-
K _m (37°C)	18.86	0.53	0.47	-	3.64	4.20	-	-	-
Optimum pH	5.0-6.0	3.5-4.0	4.2-5.0	-	5.5	5.0	4.5-5.5	3.0-4.5	-
pH Stability (1h)	4.0-10.0	4.0-8.0	6.0-10.0	-	4.0-7.0	4.0-9.0	4.0-8.0	4.0-8.0	-
pH Stability (20h)	4.0-10.0	4.0-8.0	6.0-10.0	-	4.5-6.0	4.0-9.0	-	-	-
Optimum Temperature (°C)	55	55-60	50-55	-	60	55	60-70	45	-
Thermal Stability (°C)	30-70	30-60	30-60	-	30-55	30-40	30-55	30-60	-

ตารางที่ 17 เติษณภาพของเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme จาก *A. fumigatus* Fres. (V₁) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 30 °C ในสารละลายที่ pH 5.0 เป็นเวลาต่างๆ แลวนำมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีในข้อ 3.6.1

Storage Time (days)	Residual Activity (%) of Crude Enzyme					
	-20°C		4°C		30°C	
	-	0.02% NaN ₃	-	0.02% NaN ₃	-	0.02% NaN ₃
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	100.0	105.4	99.6	100.0	99.4	99.8
7	105.4	114.8	98.4	99.8	88.0	99.4
14	99.2	100.0	98.0	99.2	78.4	98.6
30	98.8	99.8	97.6	99.6	57.2	95.8
60	99.0	100.0	95.0	97.5	32.5	90.0
180	96.8	98.4	90.7	95.0	-	80.8

เท่ากับเก็บโดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 เดือน

4.15 ผลการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

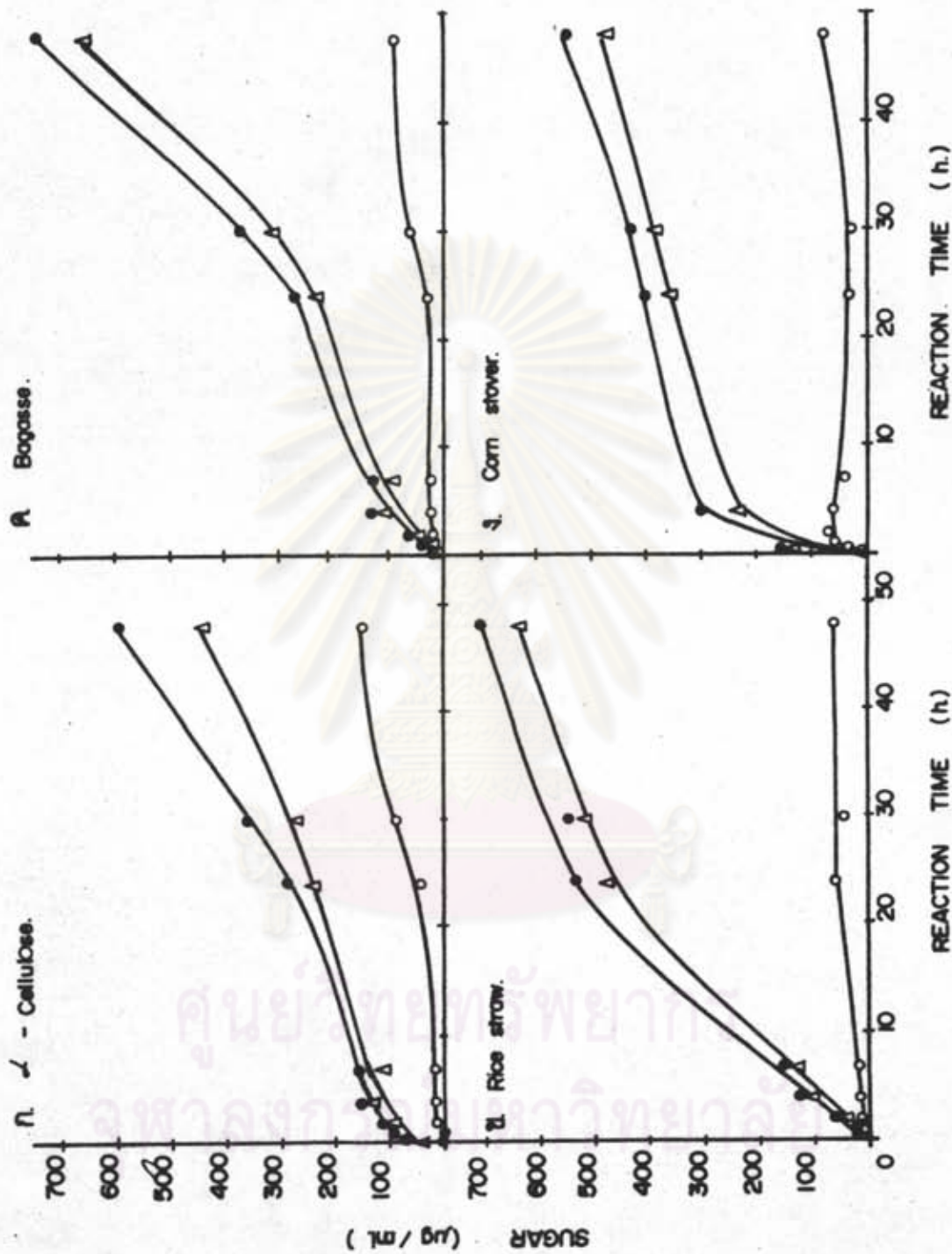
ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 18 จะเห็นว่าเอนไซม์ทุกตัวสามารถจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 3 เดือน (90 วัน) โดยสูญเสียแอกติวิตีไปประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ เบตา-กลูโคซิเดสจะมีเสถียรภาพดีที่สุด รองลงมาคือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส CMC_{Case I} , CMC_{Case II} และอะมิเซลเลส Avi ตามลำดับ

4.16 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสจาก *A. fumigatus* Fres. (V_1)

ในรูปที่ 59(ก, ข, ค, ง) แสดงผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและแอลฟา-เซลลูโลสของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสของ *A. fumigatus* Fres. (V_1) ซึ่งมีแอกติวิตีเริ่มต้น 11.36 หน่วย/มิลลิลิตรของเบตา-กลูโคซิเดส 30.35 หน่วย/มิลลิลิตรของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ 12.00 หน่วย/มิลลิลิตรของอะมิเซลเลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 5.0 พบว่าการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลสและชานอ้อยเป็นไปอย่างรวดเร็วใน 2 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจะช้าลง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 การย่อยสลายจะดำเนินไปอย่างรวดเร็วอีกครั้ง โดยเฉพาะการย่อยสลายชานอ้อยเร็วกว่าแอลฟา-เซลลูโลสมาก การย่อยสลายฟางข้าวและซังข้าวโพดจะดำเนินไปอย่างรวดเร็วในช่วง 20 และ 4 ชั่วโมงแรก และจากนั้นการย่อยสลายจะเป็นไปอย่างช้าๆ ในการย่อยสลายสับสเตรททั้ง 4 นี้ฟางข้าวและชานอ้อยจะถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด ซึ่งใช้เวลา 48 ชั่วโมง การย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลสซึ่งเทียบออกมาเป็นอัตราส่วนของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกันเป็น 3:1 จะเห็นว่าให้ปริมาณกลูโคสสูงกว่าการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น การย่อยสลายชานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด ซึ่งได้อัตราส่วนของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกันเป็น 7:1, 10.5:1 และ 6:1 ตามลำดับ และในบรรดาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเองเมื่อเทียบกันแล้ว จะเห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสของ *A. fumigatus* Fres. (V_1) สามารถย่อยสลายซังข้าวโพดเป็นกลูโคสได้สูงที่สุด

ตารางที่ 18 เสถียรภาพของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและอะมิเลส
 ที่ทำในบริษัทบางส่วน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C วัคซีนคิตวีซีของเอนไซม์ตามวิธีทดลอง
 ในข้อ 3.6

Storage Time (days)	Residual Activity (%) at 4°C			
	β -Gluc	CMCaseI	CMCaseII	Avi
7	99.56	98.42	98.28	96.75
60	90.05	86.87	79.54	72.25
90	80.70	74.28	68.72	60.67



รูปที่ 59

รูปที่ 59 เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อรา A. fumigatus Fres. (V.) ที่เข้มข้น 5 เท่า

ในการย่อยละลาย แอลฟา - เซลลูโลส (2%) และเซลลูโลสในวัสดุเคลือบใช้ทางการเกษตร (2%) เช่น

พางข้าว ชานอ้อย และขี้ข้าวโพด ที่ 45°ซ. ใน 0.1 ไมล / ลิตร. (5.0) อะซีเตทบัฟเฟอร์

แอกติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้น : 11.36 หน่วย / มิลลิลิตร เบตา - กลูโคซิเดส 30.35 หน่วย / มิลลิลิตร

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และ 12.00 หน่วย / มิลลิลิตร อะมิเลส ●—● น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด

○—○ กลูโคส △—△ น้ำตาลรีดิวซ์อื่นๆ นอกจากกลูโคส.