เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสของ Aspergillus fumigatus Fresenius(V_1) ที่แยกได้จากกองขยะ

นางสาวนฤมล เรืองฤทธินนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2526

ISBN 974-561-848-9

008643

I15916490

The Cellulolytic Enzymes Produced by Aspergillus fumigatus Fresenius (V_1) Isolated from Active Compost Piles.

Miss Narumol Ruangrittinont

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1983

ISBN 974-561-848-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสของ **Aspergillus fumigatus** Fresenius(V_1) ที่แยกได้จากกองขยะ
โดย	นางสาวนฤมล เรืองฤทธินนท์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาดา สุรัตนกวีกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ หรัพยโสภก)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาดา สุรัตนกวีกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศิริพร สิทธิประณีต)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสของ Aspergillus fumigatus Fresenius(V_1) ที่แยกได้จากกองขยะ
ชื่อนิสิต	นางสาวนฤมล เรืองฤทธินนท์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาดา สุรัตนกวีกุล
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2525

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ได้พยายามคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุดโดยเปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน Trichoderma viride QM 9414 พบว่าสามารถแยกเชื้อราV_1 ซึ่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงจากกองขยะที่รามอินทรา ซึ่งตามคุณลักษณะของเชื้อราV_1 นี้พบว่าเป็น Aspergillus fumigatus Fresenius จึงเรียกว่า A.fumigatus Fres.(V_1) พบว่าราชนิดนี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงถึง 450 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงใน Czapex's dox mediaที่มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นคอคาร์บอน ที่ pH5.0 อุณหภูมิ 45°ซ เป็นเวลา 8 วัน ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดที่ผลิตโดย T.viride QM 9414 ในสภาวะที่มี pH 5.0 อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีแอคติวิตี 75 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นคอคาร์บอน และ 1,150 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นสารต้นคอคาร์บอนในสภาวะเดียวกัน กลูโคสที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมล/ลิตร จะมีผลกระทบต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งปริมาณและช่วงเวลาในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด ในการเตรียมเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์และการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าพบว่าให้ผลที่แตกต่างกันทั้งช่วงเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณและชนิดขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 % คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 และคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสของ A.fumigatus Fres.(V_1) ประกอบด้วยอะวิเซลเลส 1

ชนิดเรียกว่า Avi คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 2 ชนิดเรียกว่า CMCaseI และCMCaseII และเบตา-กลูโคซิเดส 3 ชนิดเรียกว่าβ-GluI, β-GluII และ β-GluIII คุณสมบัติทางฟิซิโคเคมิคัลและจลนศาสตร์ของเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลส เช่น น้ำหนักโมเลกุล pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ ตลอดจนค่า K_m และ K_i ของเอนไซม์บางตัวได้รับการศึกษาเปรียบเทียบในระหว่างเอนไซม์ชนิดเดียวกันและเทียบกับ crude enzyme ด้วย ซึ่งพบว่าเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสส่วนใหญ่จะทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 4.0-5.0 และอุณหภูมิ 50-60 °ซ สามารถทนต่อ pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.0-8.0 ที่ 30 °ซ นาน 20 ชั่วโมง และทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 °ซ ที่ pH 5.0 ได้นาน 4 ชั่วโมง นอกจาก CMCaseI และ CMCaseII เท่านั้นที่การเกิดปฏิกิริยาจะไวต่อการเปลี่ยนแปลงของpH และอุณหภูมิมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ยิ่งไปกว่านั้นจากผลการศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นด้วยว่าการทำงานของอะวิเซลเลสของ A.fumigatus Fres.(V_1)จะขึ้นกับเอนไซม์องค์ประกอบชนิดอื่นๆอย่างมาก CMCaseI และCMCaseII มีคุณสมบัติต่างๆใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 28,750 ดาลตัน แต่การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าอีเลคโตรโฟรีซิสต่างกัน และค่าK_m ของ CMCaseI และCMCaseIIเมื่อมีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรต ที่ 37 °ซ ก็ต่างกันคือมีค่า 1.80 และ 4.72 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเบตา-กลูโคซิเดสทั้งสามชนิดต่างกันที่ประจุ และβ-GluI กับβ-GluIII มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันด้วยคือ 55,000 และ 240,000 ดาลตัน ค่าK_m ของβ-GluI มากกว่า β-GluIIIประมาณ 2 เท่า และปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรตออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ของ β-GluI จะถูกยับยั้งโดยกลูโคสแบบ competitive inhibition ซึ่งมีค่า K_i 6.20 มิลลิโมล/ลิตร

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยA.fumigatus Fres.(V_1)สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 °ซ ได้นาน 6เดือน และ 30 °ซ โดยเติม 0.02% โซเดียมเอไซด์ได้นาน 1 เดือนโดยสูญเสียแอคติวิตีไปไม่เกิน 5 % A.fumigatus Fres.(V_1) สามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพดเป็นสารตั้นตอคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญได้โดยตรงอีกด้วย โดยเฉพาะเมื่อใช้ฟางข้าวจะได้เอนไซม์เซลลูเลสปริมาณสูงที่สุด และยังพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดย A.fumigatus Fres.(V_1)สามารถย่อยสลายฟางข้าว ชานอ้อย และซัง-

ข้าวโพดได้โดยให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส : น้ำตาลรีดิวซ์อื่นๆ เท่ากับ 1 : 10.5 , 1 : 7 และ 1 : 6 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis title	The Cellulolytic Enzymes Produced by *Aspergillus fumigatus* Fresenius(V_1) Isolated from Active Compost Piles.
Name	Miss Narumol Ruangrittinont.
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Sanha Panichajakul,Ph.D.
Thesis Coadvisor	Assistant Professor Vipada Suratanakavikul, Ph.D.
Academic Year	1982

ABSTRACT

This research is determined to selectively isolate the fungi which exhibits the ability to produce active cellulase by comparing to the standard strain, *Trichoderma viride* QM 9414. The fungus, strain V_1, which would produce active cellulase in the culture filtrate , was isolated from active compost piles at Ram Indra. Based on taxonomical characteristics, the organism was identified as *Aspergillus fumigatus* Fresenius. The growth and the enzyme production of *A.fumigatus* Fres.(V_1) at pH 5.0 were found to be at the maximum at 45°C, in the Czapex's dox media in the presence of α-cellulose as the sole source of carbon. The activity of the cellulase enzyme was 450 units/ml after the fungus had been grown under above conditions for 8 days which is 2 days quicker than what was discovered in *T.viride* QM 9414 grown at 30°C and pH 5.0. Furthermore, 75 and 1150 units/ml xylanase enzyme activity was also isolated from this particular organism in the medium containing respectively α-cellulose and rice straws as C-sources. The concentration at 25 mmoles/l of glucose in

the growing medium affects both the enzymatic activity and the time required for maximum enzyme production. Fermentation and flask shaking techniques yielded the striking differences concerning the various properties of enzyme obtained for example; the period of the maximal production, level of enzyme activity and the proportion of multienzyme components.

Through the following purification steps; 80% $(NH_4)_2SO_4$ precipitation, Sephadex G-100 and DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, one peak of avicelase(Avi), two peaks of carboxymethyl cellulases (CMCaseI and CMCaseII) and three peaks of β-glucosidases (β-GluI, β-GluII and β-GluIII) were obtained from the culture filtrate of A.fumigatus Fres.(V_1). Physicochemical and kinetic properties including the determination of the molecular weight, optimal pH, optimal temperature, pH and thermal stability and finally K_m and K_i of some cellulase components were comparatively studied with the other similar enzymes together with the crude enzyme. Most of the enzyme components were found to be optionally active at pH range of 4.0-5.0, 50-60°C, the enzyme was stable at pH 4.0-8.0,30°C for 20 h and could with stand to the high temperature of 60°C,pH 5.0 for 4 h. However, the activities of CMCaseI and CMCaseII were more affected by the pH and temperature than the other components, In addition, these results indicated that avicelase activity of A.fumigatus Fres.(V_1) appeared to depend on the other components. Interestingly CMCaseI and CMCaseII share various common properties, in

particular, the molecular weight which was estimated to be 28,750 daltons. On the other hand, the differences in electrophoretic mobility and K_m in the presence of carboxymethyl cellulose as the substrate at 37°C, were resulted. The value of K_m of CMCaseI and CMCaseII were measured as 1.80 and 4.72 mg/ml, respectively. Similarly, three β-glucosidase enzymes were shown to be charged different. The molecular weight of β-GluI, estimatedly 55,000 daltons, is different from that of β-GluIII which is 240,000 daltons but K_m of β-GluI was found to be 2 folds larger than that of β-GluIII. The activity of β-GluI with o-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside was competitively inhibited by glucose. The K_i is 6.20 mmoles/l.

The cellulase activity of A.fumigatus Fres.(V_1) can be maintained at -20°C or 4°C for 6 months and at 30°C in the presence of 0.02% NaN_3, for only one month, with only utmost of 5% loss activity. Besides α-cellulose, cellulase could be produced from A.fumigatus Fres.(V_1) present in agricultural waste such as rice straws, bagasses and corn stovers as c-sources. The resulted enzyme produced can also degrade these agricultural waste, yielding considerable glucose and other reducing sugars in the ratio of 1:10.5, 1:7 and 1:6 respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภาดา สุรัตนกวีกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพยโสภก

รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศิริพร สิทธิประณีต

รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร

คุณดารารัตน์ รอดพยาธิ์

คุณสุพร บุชคำรงค์

คุณชนิดา พลานุเวช

คุณจันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ

คุณสมศักดิ์ เชียวแสงใส

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ฉ
กิตติกรรมประกาศ		ญ
สารบัญ		ฎ
รายการตารางประกอบ		ฒ
รายการรูปประกอบ		ต
คำย่อ		บ
บทที่		
1	บทนำ	1
2	วัสดุภัณฑ์ เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ	
	2.1 วัสดุภัณฑ์	16
	2.2 เคมีภัณฑ์	16
	2.3 เครื่องมือ	17
	2.4 จุลชีพมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง	19
3	วิธีการทดลอง	
	3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	20
	3.2 การเตรียมสารละลาย	21
	3.3 การแยกเชื้อราที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกองขยะ	26
	3.4 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง	26
	3.5 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ	26
	3.6 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆ	26
	3.7 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson	30

บทที่ หน้า

3.8 การวัดการเจริญของเชื้อราโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน ... 30
3.9 การวัดปริมาณของกลูโคซามีนโดยวิธีของ Morgan-Elson (ที่ปรับปรุง) 31
3.10 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของลอรี (Lowry)..... 31
3.11 วิธีวัดปริมาณกลูโคสด้วยกลูโคสออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส .. 31
3.12 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ 32
3.13 การเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก 33
3.14 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 34
3.15 วิธีแยกโปรตีนด้วยไฟลือะไดรลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสชนิดแท่ง 37
3.16 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 38
3.17 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ 41
3.18 การศึกษาเสถียรภาพขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ .. 41
3.19 การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะซึ่งมีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสเมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารตั้นคอคาร์บอน .. 41
3.20 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 42
3.21 การศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ 42

บทที่ หน้า

4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกเชื้อราจากกองขยะที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลส 44

4.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อราที่แยกได้ 44

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ.. 44

4.4 การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสในรา V_1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม 58

4.5 การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสในรา V_1 58

4.6 ความสามารถของเซลลูเลสในการใช้สับสเตรตต่างๆ 59

4.7 การจำแนกชนิดของเชื้อรา V_1 59

4.8 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของ A.fumigatus Fres.(V_1) เมื่อใช้วัตุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารต้นคอาร์บอน 64

4.9 ผลการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลส 64

4.10 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 67

4.11 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ 75

4.12 ผลการใช้โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสชนิดแท่งในการจำแนกชนิดของเอนไซม์ 75

4.13 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 76

4.14 ผลการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme จาก A. fumigatus Fres. (V_1) 128

4.15 ผลการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 134

บทที่ หน้า

4.16 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสจาก *A.fumigatus* Fres. (V_1) 134

5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 137

เอกสารอ้างอิง 163

ภาคผนวก 173

ประวัติผู้เขียน 185

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์	10
2	แสดงคุณสมบัติบางประการของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน T. viride QM 9414	46
3	ความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ที่เตรียมจาก V_1	63
4	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซนต์	69
5	การแยกเอนไซม์เซลลูเลสของ A. fumigatus Fres.(V_1) ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ให้บริสุทธิ์	82
6	การแยกเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสของเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ให้บริสุทธิ์	83
7	การแยกเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ให้บริสุทธิ์	84
8	การแยกเอนไซม์อะวิเซลเลสของเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ให้บริสุทธิ์	85
9	การแยกเอนไซม์เซลลูเลสของ A. fumigatus Fres.(V_1) ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าให้บริสุทธิ์	86
10	การแยกเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสของเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าให้บริสุทธิ์	87
11	การแยกเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าให้บริสุทธิ์	88
12	การแยกเอนไซม์อะวิเซลเลสของเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าให้บริสุทธิ์	89
13	K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์องค์ประกอบใน crude enzyme และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์	106

ตารางที่		หน้า
14	แสดงค่าครึ่งชีวิต($t_{\frac{1}{2}}$) ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70,80 และ 90 องศาเซลเซียส	127
15	ค่า K_i ของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ (β-Glu1) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ เมื่อมีกลูโคสเป็นตัวยับยั้ง	131
16	สรุปผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์ของ A. fumigatus Fres.(V_1)	132
17	เสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสใน crude enzyme จาก A. fumigatus Fres.(V_1) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ	133
18	เสถียรภาพของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและอะวิเซลเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	135
19	แสดงคุณสมบัติบางประการของเชื้อรา A. fumigatus Fres. (V_1) เปรียบเทียบกับ A. fumigatus Fres. 4-45-1F	181

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส	1
2	รูปร่างของโครงสร้างของเซลลูโลสที่พบในผนังเซลของพืชทั่วไป	3
3	ลำดับการเข้าทำปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลส	7
4	วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดยฟิลเตอร์เปเปอร์แอสเสย์ ..	28
5	เชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ V_1 , V_2, V_3 และ เชื้อรามาตรฐาน *T. viride* QM 9414	45
6	เปรียบเทียบการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *T. viride* QM 9414, V_1, V_2และ V_3 ในระยะเวลาต่างๆ ..	48
7	เปรียบเทียบการเจริญของ *T. viride* QM 9414 , V_1, V_2 และ V_3 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30,40,45 และ 50 °ซ	49
8	เปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *T. viride* QM 9414 , V_1, V_2และ V_3 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30,40, 45 และ 50 °ซ	50
9	เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *T. viride* QM 9414 และ V_1	51
10	แสดงผลของจำนวนสปอร์ต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1	52
11	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *T. viride* QM 9414 และ V_1กับการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	54
12	เปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ V_1 ในอาหารที่มี pH เริ่มต้นในช่วง 3.0-7.0	55
13	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเชื้อระหว่างที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *T. viride* และ V_1	56

รูปที่ หน้า

14 ผลของกลูโคสต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1 และการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 57

15 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส การเจริญ การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารขณะที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ V_1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม 60

16 การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของ V_1 เมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นคอาร์บอน 61

17 การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของ V_1 เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นสารต้นคอาร์บอน 62

18 เปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส การเจริญของเชื้อรา A. fumigatus Fres.(V_1)และการเปลี่ยนแปลง pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลส ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพดเป็นสารต้นคอาร์บอน 65

19 รูปแบบของการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณโปรตีน และการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเมื่อเลี้ยง A. fumigatus Fres.(V_1) ในเฟอร์เมนเตอร์ 66

20 สรุปขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 68

21 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ใน 80%$(NH_4)_2SO_4$ แฟรคชัน 71

22 ผลการแยกเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าใน 80%$(NH_4)_2SO_4$ แฟรคชัน 72

23 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน β-Glu_1 จากเซฟาเด็กซ์ จี-100 ของเอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 77

24 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน CAX_1 จากเซฟาเด็กซ์ จี-100 ของเอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 78

รูปที่ หน้า

25 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน β-Glu_2 จากเซฟาเด็กซ์ จี-100 ของเอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าโดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 79

26 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน CMCase จากเซฟาเด็กซ์ จี-100 ของเอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าโดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 80

27 ผลการแยกโปรตีนของเอนไซม์ส่วน CAX_2 จากเซฟาเด็กซ์ จี-100 ของเอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าโดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 81

28 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์แยกโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส 90

29 รูปแบบของโปรตีน แอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในแฟรคชันต่างๆที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส 91

30 รูปแบบของโปรตีนและแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสที่ได้จากการแยกโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส 92

31 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเบตา-กลูโคซิเดสในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ β-GluI และ β-GluIII โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 94

32 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} ของโปรตีนมาตรฐานและ log ของน้ำหนักโมเลกุลในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ β-GluI และ β-GluIII 95

33 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐาน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและอะวิเซลเลส ในการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 96

34 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน และ log ของน้ำหนักโมเลกุล ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ CMCaseI, CMCaseII และ Avi โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 .. 97

รูปที่ หน้า

35 ผลของความเข้มข้นของแอลฟา-เซลลูโลสต่อแอคติวิตีของเซลลูเลส ใน crude enzyme ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 °ซ 99

36 ผลของความเข้มข้นของอะวิเซลต่อแอคติวิตีของอะวิเซลเลสใน crude enzyme และAvi ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 °ซ 100

37 ผลของความเข้มข้นของออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ต่อแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme β-GluI และ β-GluIII ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 102

38 ผลของความเข้มข้นของออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ต่อแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ β-GluI ที่อุณหภูมิ 45 °ซ 103

39 ผลของความเข้มข้นของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสต่อแอคติวิตีของ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCaseI และ CMCaseII ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 104

40 ผลของความเข้มข้นของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสต่อแอคติวิตีของ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCaseI และ CMCaseII ที่อุณหภูมิ 45 °ซ 105

41 ผลกระทบของ pHต่อแอคติวิตีของเซลลูเลสใน crude enzyme 108

42 ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ β-GluI 109

43 ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCaseI และ CMCaseII 110

44 ผลกระทบของ pH ต่อ แอคติวิตีของอะวิเซลเลสใน crude enzyme และ Avi 111

45 ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเซลลูเลสของ crude enzyme ... 113

46 ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ β-GluI 114

รูปที่ หน้า

47 ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme, CMCaseI และ CMCaseII 115

48 ผลของ pH ต่อเสถียรภาพของอะวิเซลเลสใน crude enzyme และ Avi 116

49 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเซลลูเลสใน crude enzyme 118

50 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme, β-GluI และ β-GluIII 119

51 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme , CMCaseI และ CMCaseII 120

52 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของอะวิเซลเลสใน crude enzyme และ Avi 121

53 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสของ crude enzyme 123

54 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส ของ crude enzyme และ β-GluI 124

55 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ของ crude enzyme ,CMCaseI และ CMCaseII... 125

56 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อะวิเซลเลสของ crude enzyme และ Avi 126

57 Reciprocal Plot ของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme ซึ่งถูกยับยั้งโดยกลูโคสที่ 45°ซ 129

58 Reciprocal Plot ของเบตา-กลูโคซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (β-GluI) ที่ 45°ซ 130

59 เปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา A. fumigatus Fres.(V_1) ที่เข้มข้น 5 เท่าในการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลสและเซลลูโลสในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 136

รูปที่		หน้า
60	เส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธีของ Lowry...	172
61	เส้นกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานกลูโคสโดยวิธีของ Somogyi-Nelson	173
62	เส้นกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานไซโลสโดยวิธีของ Somogyi-Nelson	174
63	เส้นกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนมาตรฐานโดยวิธีของ Morgan-Elson	175
64	เส้นกราฟมาตรฐานของออร์โธไนโตรฟีนอล	176
65	เส้นกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานกลูโคสโดยวิธี DNS ..	177
66	ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเซลลูเลสในหน่วยที่ใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสับสเตรตกับแอคติวิตีของเซลลูเลสในหน่วย FP	178
67	เปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ A. fumigatus Fres.(V_1) กับ A. fumigatus Fres.4-45-1F และการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	182
68	เปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสของ A. fumigatus Fres.(V_1) กับ A. fumigatus Fres.4-45-1F	183

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

OD = optical density

nm = nanometre

K_m = Michaelis-Menten constant

K_i = Inhibitor constant

V_{max} = Maximum velocity

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย