ลักษณะสมบัติของเซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp.

นางสาวเสาวนีย์ อาภาวศิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-53-1046-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF CELLULASE FROM *Acrophialophora* sp.

Miss Saowanee Arpawasin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1046-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลักษณะสมบัติของเซลลูเลสจาก *Acrophialophor*a sp.
โดย	นางสาวเสาวนีย์ อาภาวศิน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสาวนีย์ อาภาวศิน: ลักษณะสมบัติของเซลลูเลสจาก *Acrophialophor*a sp.
(CHARACTERIZATION OF CELLULASE FROM *Acrophialophora* sp.)
อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: อ.ดร. รัฐ พิชญางกูร;
80 หน้า. ISBN 974-53-1046-8

การศึกษา *Acrophialophor*a sp. โดยเปรียบเทียบความสามารถการผลิตเซลลูเลสของสายพันธุ์กลาย (UV10-2) ที่ได้มีการศึกษามาก่อนกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร production (pH เริ่มต้น 5.0) ที่มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าสายพันธุ์กลายให้ค่าแอคติวิตีเซลลูเลส (เอกโซกลูคาเนส 0.466 U/ml เอนโดกลูคาเนส 2.761 U/ml และเบตา-กลูโคซิเดส 0.051 U/ml) สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เอนไซม์อย่างหยาบจากสายพันธุ์กลายมี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 60 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสมคือ 5.0 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์อย่างหยาบ (จากสายพันธุ์กลาย) ด้วยการผ่านอัลตราฟิลเทรชัน การตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต (ความเข้มข้นอิ่มตัว 50-70 เปอร์เซ็นต์) แล้วนำไปทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ด้วย Hitrap DEAE Sepharose และ Sepharyl-S-200 HR สามารถแยกเอนโดกลูคาเนส 2 ชนิด (Endo I และ Endo II) เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.93 เท่า (Endo I) และ 13.41 เท่า (Endo II) การตรวจสอบแอคติวิตีในเอสดีเอสพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี carboxymethylcellulose (CMC) พบว่ามีแถบ CMCase ทั้งหมด 2 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 และ 60 กิโลดาลตัน ในขณะที่ขนาดของเอนไซม์เท่ากับ 60 กิโลดาลตัน และ 43 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ด้วยวิธีเจลฟิลเทรชั่นโครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR เอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนทำงานได้ดีในภาวะเดียวกับเอนไซม์อย่างหยาบ โดยเอนไซม์ค่อนข้างเสถียรในช่วง pH 4.0-8.0 (เป็นเวลา 2 วัน) และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (เป็นเวลา 105 นาที) เอนไซม์สามารถย่อยสลาย CMC ไซแลน กระดาษกรอง Avicel และแอลฟา-เซลลูโลส ได้ดีตามลำดับ แต่ไม่ย่อยสลายเซลโลไบโอส D(-) salicin และ p-NPG เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วย Mn^{2+} มีผลยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ Hg^{2+} ส่วนไอออน Cu^{2+} กระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472475823: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS: CELLULASE/ ACROPHIALOPHORA/ PURIFICATION //

SAOWANEE ARPAWASIN: CHARACTERIZATION OF CELLULASE FROM *Acrophialophora* sp. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: RATH PICHYANGKURA, Ph.D.; 80 pp. ISBN 974-53-1046-8

Acrophialophora sp. mutant (strain UV 10-2) of this fungus has been previously generated and was used to compare the ability to produce cellulases with the wild type. The fungi were subjected to cellulases production by growing cultures in the production medium (with initial pH at 5.0) containing α-cellulose as a sole carbon source cultivating for 15 days, at 40°C. The mutant gave cellulase activities (exoglucanase 0.466 U/ml, endoglucanase 2.761 U/ml and β-glucosidase 0.051 U/ml) higher than those of the wild type. Crude cellulases from the mutant had optimal temperature at 60°C and optimal pH at 5.0. A partial purification of these crude enzymes (from the mutant) was purified by ultrafiltration, ammonium sulfate (50-70%) precipitation, Hitrap DEAE Sepharose ion-exchange and Sepharyl-S-200 HR gel-filtration chromatography. After purification, two endoglucanases (Endo I and Endo II) were elucidated and activities increased 13.93 fold (Endo I) and 13.41 (Endo II). The activity staining in SDS-PAGE containing with carboxymethylcellulose (CMC) exhibited two CMCase bands with molecular weights 66 kDa (Endo I) and 60 kDa (Endo II) while the molecular weights of 60 (Endo I) and 43 kDa (Endo II) was shown after purification by Sephacryl-S-200 HR gel-filtration. These partial purified enzymes functioned well at the same condition of crude enzymes. They had pH and thermal stabilities at pH 4.0-8.0 (for 2 days) and 60°C (for 105 min), respectively. The enzymes hydrolyzed CMC, xylan, filter paper, avicel and α-cellulose but could not hydrolyze cellobiose, salicin and p-NPG. . The enzymes were inhibited by Mn^{2+} and Hg^{2} while they were activated by Cu^{2+}.

Field of study Biotechnology Student's signature Saowanee Arpawasin

Academic year 2004 Advisor's signature

Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี จากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายๆ ท่าน ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ แนะแนวทางในการทำวิจัย และสนับสนุนด้านต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้เสร็จสมบูรณ์อย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำปรึกษา อันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่กรุณามาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความกรุณา ช่วยเหลือด้านเครื่องมือ และคำแนะนำดีๆ สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยบางส่วนในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่สุนันท์ ลิ้มเทียนเจริญ เจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยช่วยเหลือ ประสานงาน ให้ข้อมูลที่ดียิ่งแก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณพี่สีหนาท ประสงสุข ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ความรู้ และเทคนิคอันเป็นโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาพฤกษศาสตร์และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน รวมทั้งพี่ๆ น้องๆ ในหน่วยปฏิบัติการการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช รวมทั้งเพื่อนๆ ทุกคนที่ค่อยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ อำนวยความสะดวก รวมทั้งเป็นกำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้าย ขอกราบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งน้องชาย ที่เป็นกำลังใจ กำลังทรัพย์ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนความรัก ความเข้าใจ ความเป็นห่วงใยและกำลังใจ จนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ญ
บทที่
1. บทนำ 1
2. การตรวจเอกสาร
2.1 เซลลูโลส 3
2.2 เซลลูเลส 4
2.3 องค์ประกอบของเซลลูเลส 4
2.4 แหล่งการผลิตเซลลูเลส 7
2.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน 8
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเซลลูเลส 11
2.7 การศึกษาผลของไอออนบางชนิดและตัวยับยั้งเอนไซม์บางชนิดต่อ
แอกติวิตีของเอนไซม์ 12
3. วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย
3.1 เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย 18
3.2 การศึกษาการเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา
Acrophialophora sp. และการผลิตเซลลูเลสของเชื้อราในอาหารสูตร
Production 18
3.3 การวิเคราะห์ 19
3.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อย่างหยาบ 21
3.5 การผลิตเอนไซม์ 21
3.6. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน 21

หน้า

3.7 การศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลสที่บริสุทธิ์บางส่วน 24
4. ผลการทดลอง
4.1 เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย 27
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Acrophialophora* sp. 27
4.3 การศึกษาการเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร Production เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม 29
4.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อย่างหยาบ 31
4.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน 34
4.6 การศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลสที่บริสุทธิ์บางส่วน 43
5. วิจารณ์ผลการทดลอง 50
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 57
รายการอ้างอิง 59
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก 69
ภาคผนวก ข 71
ภาคผนวก ค 75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

บทที่ 2

2.1 ตัวอย่างเชื้อราบางชนิดที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้.....7

2.2 ค่าความเป็นกรดและด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสจากจุลินทรีย์บางชนิด.....11

บทที่ 4

4.1 แอคติวิตีเซลลูเลสของเชื้อรา *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *Acrophialophora* sp. UV10-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Production ที่ pH 5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน 29

4.2 ผลการเตรียมเอนโดกลูคาเนสจาก *Acrophialophora* sp. UV10-2 ให้บริสุทธิ์บางส่วน 40

4.3 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของ Endo I ต่อซับสเตรตต่างๆ เมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH 5.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

บทที่ 2

2.1 ลักษณะการจัดเรียงตัวของไฟบริล ไมโครไฟบริล และเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช.....3

2.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วย C1และ Cx 4

2.3 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส 6

บทที่ 4

4.1 ลักษณะเส้นใยและการเจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....27

4.2 การเจริญของ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม 28

4.3 การเติบโตของเชื้อรา การผลิตเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ
บีตา-กลูโคซิเนส ปริมาณกลูโคซามีน ของ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม.....30

4.4 การเติบโตของเชื้อรา การผลิตเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และ
บีตา-กลูโคซิเนส ปริมาณกลูโคซามีน ของ *Acrophialophora* sp. UV10-2 30

4.5 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของเอกโซกลูคาเนส จากเชื้อ
Acrophialophora sp. UV10-2 ในช่วง pH 3.0 ถึง 8.0 31

4.6 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของเอนโดกลูคาเนส จากเชื้อ
Acrophialophora sp. UV10-2 ในช่วง pH 3.0 ถึง 8.0 31

4.7 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของบีตา-กลูโคซิเดส จากเชื้อ
Acrophialophora sp. UV10-2 ในช่วง pH 3.0 ถึง 8.0 32

4.8 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของเอกโซกลูคาเนส เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา
ที่ค่า pH เท่ากับ 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 80
องศาเซลเซียสจากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2.....32

4.9 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของเอนโดกลูคาเนส เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา
ที่ค่า pH เท่ากับ 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 80
องศาเซลเซียสจากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2.....33

รูปที่ **หน้า**

4.10 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของบีตา-กลูโคซิเดส เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา ที่ค่า pH เท่ากับ 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 80 องศาเซลเซียสจากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2 33
4.11 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ 35
4.12 ผลการแยกและทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow ชะด้วยบัฟเฟอร์ piperazine-HCl 0.05 โมลาร์ pH 5.0 แล้วตามด้วย linear salt gradient ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-1.0 โมลาร์ อัตราการไหล 60 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มิลลิลิตร 36
4.13 ผลการแยกและทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นของ พีค I ด้วยคอลัมน์ Sephcryl-S-200 HR (ขนาด 2.6×40 เซนติเมตร) ชะด้วยโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 อัตราการไหล 12 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มิลลิลิตร 38
4.14 ผลการแยกและทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นของ พีค II ด้วยคอลัมน์ Sephcryl-S-200 HR (ขนาด 2.6×40 เซนติเมตร) ชะด้วยโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 อัตราการไหล 12 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มิลลิลิตร 39
4.15 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์เอนโดกลูคาเนสด้วย SDS-PAGE 41
4.16 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์เอนโดกลูคาเนสด้วย SDS-PAGE (ก) และ Activity stain (ข) 42
4.17 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของ Endo I ที่ pH ในช่วง 3.0 ถึง 8.0 43
4.18 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และความเสถียรของ Endo I ในช่วง pH 3.0 ถึง 8.0 เมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 และ 2 วัน 44
4.19 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของ Endo I เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา ที่ค่า pH เท่ากับ 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 80 องศาเซลเซียส 45
4.20 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และความเสถียรของ Endo I ที่ pH 5.0 เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 15 30 45 60 75 90 105 120 นาที 45

รูปที่ **หน้า**

4.21 แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) ผลของไอออนและสารเคมีที่มีการต่อยับยั้ง
การทำงานของเอนไซม์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 47
4.22 แสดงความสัมพันธ์ระฟว่าง Kav และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของ
โปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสจาก
Acrophialophora sp UV 10-2 โดยคอลัมน์ขนาด 2.6×40 เซนติเมตร 48
4.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุล
ของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสโดยวิธี
เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอีเล็กโทรโฟรีซีส 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์พืช และเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมากที่สุดในโลก (Fogarty, 1983) ในแต่ละปีจะพบว่ามีเซลลูโลสจากพืชประมาณ 10^{15} กิโลกรัม (Anne และคณะ, 1996) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา-1, 4-ไกลโคซิดิก (β-1, 4-glycosidic) เป็นสายโซ่ตรง พบในปริมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง การย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์จะมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพียงชนิดเดียวคือ กลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะประกอบด้วย กลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ โดยทั่วไปการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การย่อยสลายโดยใช้สารเคมี เป็นการย่อยสลายด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งปฏิกิริยาจะไม่มีความจำเพาะ (nonspecificity) ต่อเซลลูโลส ทำให้ได้กลูโคสในปริมาณต่ำ รวมทั้งมีผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการปะปนอยู่ด้วย ในขณะที่การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่ามีประสิทธิภาพสูง และมีความจำเพาะต่อซับสเตรต ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลส คือ เซลลูเลสซึ่งมีหลายองค์ประกอบ (multicomponent enzymes) ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน (Ooshima และคณะ, 1985; Beldman และคณะ, 1985) คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และ บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ผลจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สำคัญคือ น้ำตาลกลูโคสซึ่งมีคุณค่าอย่างยิ่งในอุตสาหกรรม เพราะสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์ (Saddler, 1992) กรดอะซิติก (Singh และคณะ, 1990) กรดแลคติก (Ade และ Takagi, 1991) โปรตีนเซลล์เดียว ไวตามิน กรดอินทรีย์ ยาปฏิชีวนะ อาหารสัตว์และเคมีภัณฑ์ต่างๆ โดยกระบวนการหมัก (Goksoyr และ Eriksen, 1980) นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยา อุตสาหกรรมผลิตอาหาร และอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ เป็นต้น

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ พบว่าเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ในปริมาณที่มากและขับออกนอกเซลล์ มีผู้ให้ความสนใจศึกษาและนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยเชื้อราส่วนใหญ่จะเป็นพวก mesophiles เช่น *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger* (Saha และ Bothast, 1997) แต่กระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสใช้อุณหภูมิสูง การศึกษาเชื้อราทนร้อน (Thermotolerant) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้

ในอุตสาหกรรม ซึ่ง *Acrophialophora* sp. เป็นเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ (*Agave sisalana* Perrine) ในประเทศไทย สามารถผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูงและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีลักษณะที่ค่อนข้างทนร้อน (Punnapayak, Kuhirun และ Tanonkeo, 1999) การศึกษาสายพันธุ์กลายให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม และสูงกว่า *T. reesei* QM9414 ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (พิสุทธิ์ พวงนาค, 2542) จึงน่าจะมีการศึกษาเซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp. เพื่อนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรม และปรับปรุงเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ให้ดียิ่งขึ้น โดยในงานวิจัยนี้มีแนวทางในการศึกษาลักษณะสมบัติของเซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp. และการแยกเซลลูเลสที่ได้ให้บริสุทธิ์บางส่วน เพื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมี ความคงตัวของเอนไซม์ในสภาพความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ผลของสารเคมีต่อการทำงานของเอนไซม์ และผลของความจำเพาะต่อซับสเตรต เพื่อทราบองค์ประกอบที่จำเป็นต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม อันมีผลต่อการใช้เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้สารที่มีประโยชน์และมีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของเซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp. รวมถึงวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน เพื่อให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเซลลูเลสต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้ลักษณะสมบัติและเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนของเซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp. ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตและใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

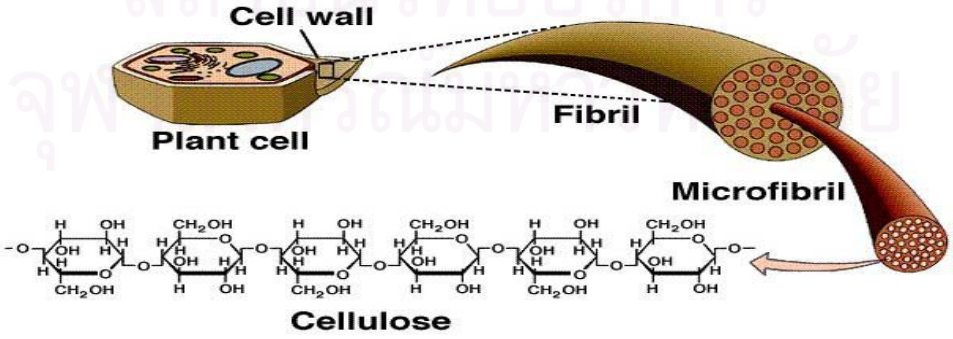
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 **เซลลูโลส** (Cellulose)

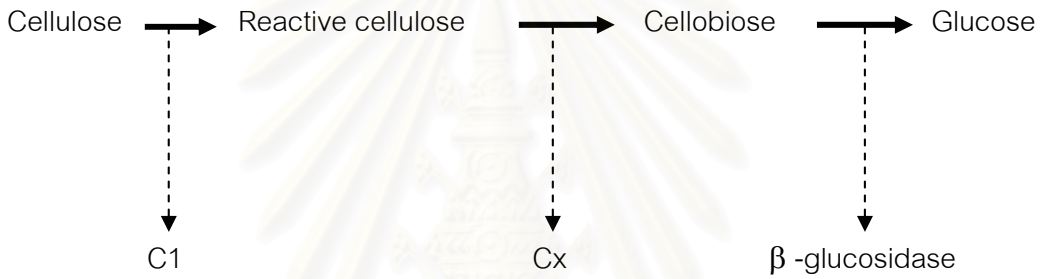
เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักที่มีปริมาณมากที่สุดในเซลล์พืช โดยในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักจะพบรวมกับลิกนิน (lignin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) กัม (gum) เพนโตแซน (pentosan) แทนนิน (tannins) ไขมัน (lipid) และสารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Cowling และ Kirk, 1976) ซึ่งเซลลูโลสประกอบด้วยโมเลกุลของ ดี-กลูโคส (D-Glucose) ในรูปบีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) หลายโมเลกุล เรียงต่อกันเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ แต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะไกลโคสิดิก (glycosidic bond) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุลถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 อยู่ในตำแหน่งบีตา (beta) เรียกพันธะนี้ว่า พันธะบีตา-1,4 ไกลโคซิดิก (β-1, 4 glycosidic bond) (รูปที่ 2.1) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุล ซึ่งบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นจะเรียกว่า มีรูปแบบที่เป็น crystalline ซึ่งยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ส่วนบริเวณที่เป็น amorphous จะมีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นน้อย จึงย่อยสลายได้ง่ายกว่า ขนาดของโมเลกุลเซลลูโลสจะนิยามในรูปของ Degree of polymerization (DP) ซึ่งบอกถึงจำนวนกลูโคสในสายพอลิเมอร์ (Eriksson, Blanchette และ Ander, 1990) โดยทั่วไปสายของเซลลูโลสจะประกอบด้วยกลูโคส 8,000-12,000 หน่วย (Saha และ Bothast, 1997) และอาจมากถึง 14,000 หน่วย ในพืชชั้นสูงบางชนิด (Eriksson Blanchette และ Ander, 1990)



รูปที่ 2.1 ลักษณะการจัดเรียงตัวของไฟบริล ไมโครไฟบริล และเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช (ที่มา: http: www.ualr.edu/~botany/cellulose_microfibrils.jpeg)

2.2 เซลลูเลส (Cellulases)

การศึกษาการทำงานของเซลลูเลสเริ่มต้นโดย Reese และคณะในปี ค.ศ. 1950 (Wike และคณะ,1983) พบว่ามี จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ โดยอาศัยเอนไซม์ C1 และ Cx ปฏิกิริยาเริ่มจาก จุลินทรีย์หลั่ง C1 ออกมานอกเซลล์เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้สั้นลงและกลายเป็นสายเซลลูโลสเส้นตรงยาวก่อน หลังจากนั้น Cx จะเข้าทำงานต่อเพื่อย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลสายสั้นๆ (cello-oligosaccharides) เช่น เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กจะแพร่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์จากนั้นบีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) จะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส ให้กลายเป็นกลูโคสต่อไป ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วย C1 และ Cx (Eriksson, Blanchette และ Ander, 1990)

จากการศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่า C1 คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (EC 3.2.1.91) และ Cx คือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (EC 3.2.1.4) (Wike และคณะ,1983) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ ถ้ามีกลูโคสอยู่ในระบบมากจะยับยั้งการทำงานของบีตา-กลูโคซิเดส ทำให้เซลโลไบโอสถูกสะสมมากขึ้น ซึ่งถ้ามีมากพอจะไปยับยั้งการทำงานของ C1 และ Cx ต่อไป (Eriksson Blanchette และ Ander, 1990)

2.3 องค์ประกอบของเซลลูเลส

เซลลูเลส เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยเอนไซม์หลายองค์ประกอบ (multicomponent enzymes) โดยมีเอนไซม์องค์ประกอบอย่างน้อย 3 กลุ่ม ทำงานร่วมกัน คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (EC 3.2.1.91) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (EC 3.2.1.4) และ บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) (EC 3.2.1.21) (Xiemenes และคณะ,1996; Wike และคณะ,1983; Domingues และคณะ, 2000)

เอกโซกลูคาเนส (EC 3.2.1.91, 1,4-β-D-glucan-cellobiohydrolase **หรือ** C1)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะบีตา-1,4 ไกลโคซิดิก ที่ปลายด้าน non-reducing end ของ crystalline cellulose ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลสสั้นขึ้น เช่น เซลโลไบโอส และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้กลูโคส สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง และ Avicel เป็นต้น (Wike และคณะ,1983) ซึ่งยังมีชื่อที่เรียกทั่วไป ได้แก่ cellobioahydrolase, exocellulase. cellobiosidase และ avicellase

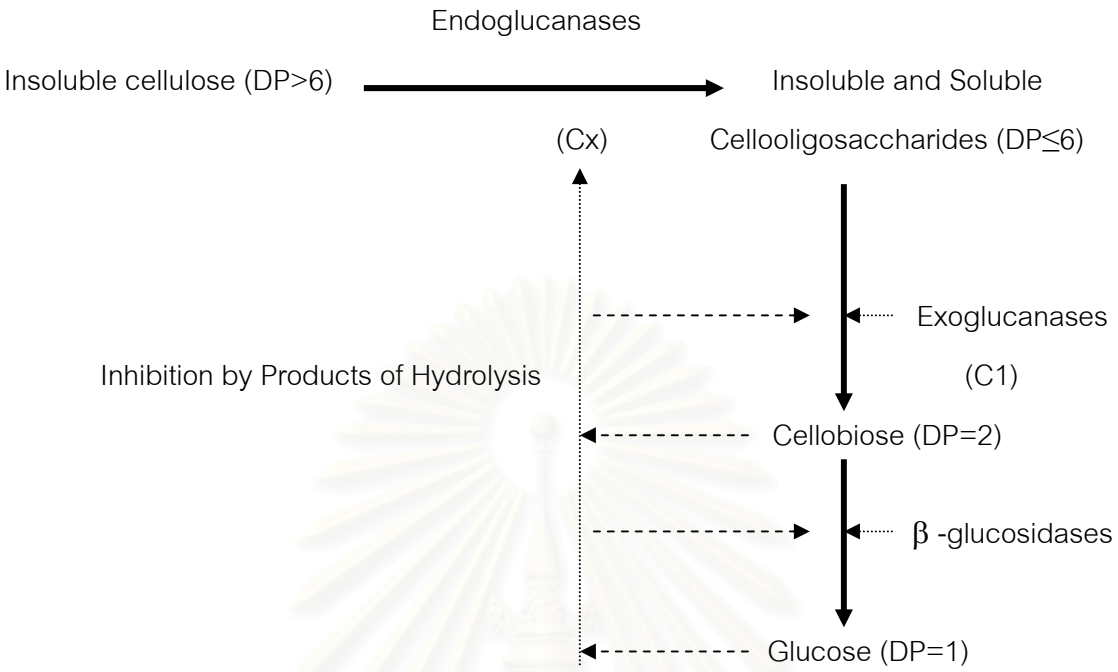
เอนโดกลูคาเนส (EC 3.2.1.4, 1,4- β-D-glucan 4-glucanohydrolase **หรือ** Cx)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ β-1,4-glycosidic linkage ภายในสายเซลลูโลสบริเวณ amorphous cellulose อย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้นๆ เช่น เซลโลไบโอส และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้กลูโคส สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ carboxymethylcellulose (CMC) เป็นต้น (Wike และคณะ,1983) นอกจากนี้ยังมีชื่อที่เรียกทั่วไป คือ CM-cellulase

บีตา-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21, β-D-glucoside glucohydrolase **หรือ** cellobiase)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลโลไบโอสบริเวณพันธะ β-glucosidic bond ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส (β-D-glucose) 2 โมเลกุล สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ cellobiose และ p-nitrophenyl- β-D-glucopyranoside (p-NPG) เป็นต้น (Wike และคณะ ,1983) นอกจากนี้ยังมีชื่อที่เรียกทั่วไป คือ cellobioase

ดังนั้นการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสอย่างสมบูรณ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคสนั้น ต้องอาศัยการทำงานของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดสร่วมกัน เช่น จุลินทรีย์จะผลิตเอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนสจากนั้นจึงขับออกนอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เซลโลไบโอส จากนั้นเซลโลไบโอสจะซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ และบีตา-กลูโคซิเดสจะย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้เป็นพลังงานต่อไป โดยเซลโลไบโอส 1 โมเลกุล จะย่อยสลายได้น้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.3



ENDOGLUCANASES : G-G-G-G-G-G-G-G

Cx

Random Action

EXOGLUCANASE : G-G-G-G-G

C1

Endwise Action

β -GLUCOSIDASE : G-G

β -G

Hydrolysis of Cellobiose to Glucose

DP = Degree of polymerization

รูปที่ 2.3 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส (Tangnu,1982; Wike และคณะ ,1983)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 แหล่งการผลิตเซลลูเลส

ปัจจุบันเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการต่างๆ มาก โดยเฉพาะในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อการผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมอาหารเพื่อการผลิตน้ำตาล ไวน์ อุตสาหกรรมเชื้อเพลิงเพื่อการผลิตเอทธานอล หรืออุตสาหกรรมสิ่งทอ เพื่อการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย (Bhat, 2000) ดังนั้นการผลิตเซลลูเลสให้ได้ปริมาณมากและมีสมบัติตรงความต้องการ กระบวนการผลิตจึงมีส่วนสำคัญ เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเซลลูเลส เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งอาหารเสริม ระยะเวลาที่ผลิต ค่า pH อุณหภูมิ และที่สำคัญคือ จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งผลิตเซลลูเลส ได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนไมซิทีส และเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราได้มีผู้ทำการศึกษาหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ดีมาเป็นระยะเวลานานแล้ว เช่น เชื้อรา *Trichoderma reesei* (Wike และคณะ ,1983) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่ผลิตเซลลูเลสได้ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างเชื้อราบางชนิดที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้

ชนิด	เอกสารอ้างอิง
Acrophialophora sp.	Punnapayak, Kuhirun และ Tanonkeo, 1999
Aspergillus aureoviride	Zaldivar และคณะ, 2001
A. fumigatus	Dahot และ Noomrio, 1996; Ximenes และคณะ, 1996
A. niger	Juhasz และคณะ, 2003; Coral และคณะ, 2002
A. flavus	Razak และคณะ, 1999
A. terreus	Elshafei และคณะ, 1990
Coriolus versicolor	Evans, 1985
Fusarium sp.	Misukoshi และคณะ, 1977
Fusarium oxysporum	Christakopoulos และคณะ, 1996
Helicomyces sp.	Limtong และคณะ, 1990
Humicola insolens	Azevedo Bishop และ Cavaco-Paulo, 2000
Irpex lacteus	Kanda และคณะ, 1978
Trichoderma reesei QM 9414	Acebal และคณะ, 1986; Krishna และคณะ, 2000
T. reesei Rut C30	Xiao-Bin, Yun และ Koo, 1999; Szengyel และ Zacchi, 2000

2.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากในแต่ละขั้นตอนอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพหรือสูญเสียสารที่เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไป (ชุลีพร จูงสาย, 2535) เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เชื้อราหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzymes) ซึ่งมักติดอยู่บริเวณที่เป็นผนังเซลล์ด้านนอกของเชื้อรา และปนอยู่ในสารละลายนอกเซลล์ (Busto, Ortega และ Perez, 1996) การแยกเอนไซม์ออกจากส่วนของเซลล์และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ต้องการโดยการปั่นแยก (centrifugation) แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการกรองผ่านเนื้อเยื่อที่มีรูขนาดเล็ก (ultrafiltration) ซึ่งจะช่วยขจัดสารที่มีขนาดเล็กมากๆ และการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เหล่านี้เป็นวิธีการเบื้องต้นในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น แต่เอนไซม์ที่ได้ยังไม่มีความบริสุทธิ์มากนัก (Chen และคณะ, 2004 และ Kim และคณะ, 1994) ต้องอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีเพื่อให้เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งมีตัวอย่างรายงานการเกี่ยวกับการทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์ดังนี้

Beldman และคณะ (1985) ทำการแยกส่วนประกอบเซลลูเลสจาก *T. viride* โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า “Maxazyme” จากการใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีบน Bio-Gel, DEAE-Bio-Gel A, SE-Sephadex และโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) พบว่าสามารถแยกเอนโดกลูคาเนสได้ 6 ชนิด มี 1 ชนิดที่มีแอกติวิตีต่อเซลลูโลสรูปผลึก มีน้ำหนักโมเลกุล 58 กิโลดาลตัน เอกโซกลูคาเนส 3 ชนิด และบีตา-กลูโคซิเดส 1 ชนิด

Jin และ Toda (1989) ได้ทำการศึกษาเซลลูเลสจาก *Clostridium thermocopriae* sp. Nov.JT3-3 (IAM13577) ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 45-90 เปอร์เซ็นต์ นำมาไดอะไลส์ แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650 M และ Sephadex G-100 สามารถแยกเอนโดกลูคาเนสได้ 1 ชนิด และบีตา-กลูโคซิเดส 1 ชนิด เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเจลฟิลเตรชั่นโครมาโทกราฟีพบว่ามีเอนโดกลูคาเนสน้ำหนัก 51 กิโลดาลตัน และและบีตา-กลูโคซิเดส 50 กิโลดาลตัน และเมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลด้วยเอสดีเอส-พอลิอะคิรลาไมด์ อีเล็กโทรโฟริซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) โดยที่ทั้งสองมีน้ำหนัก 46 กิโลดาลตัน เท่ากัน ผลผลิตเอนไซม์ (yield) เหลือ 3.2 และ 2.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Yazdi และคณะ (1990) ได้แยกเซลลูเลสจาก *Neurospora crassa* พบ เอกโซกลูคาเนส 3 ชนิด เอนโดกลูคาเนส 4 ชนิด และบีตา-กลูโคซิเดส 1 ชนิด โดยใช้วิธีการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาผ่าน Sephadex G-100 Q-Sepharose และ PBE 94 column เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลพบว่า เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักระหว่าง 22 กิโลดาลตัน และ 70 กิโลดาลตัน

Takashima และคณะ (1996) พบว่า สามารถแยกเอนโดกลูคาเนสได้ 2 ชนิด เอกโซกลูคาเนสได้ 1 ชนิด และบีตา-กลูโคซิเดสได้ 6 ชนิด จากเชื้อรา *Humicola grisea* var. *Thermoidea* IFO9854 โดยใช้วิธีการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีต่างๆ เช่น Phenyl Toyopearl Q-Sepharose Superdex 200 Superdex 75 Mono S เป็นต้น ซึ่งเซลลูเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38.5 ถึง 115 กิโลดาลตัน

Bok, Yernool และ Eveleigh (1998) ได้ศึกษาเอนโดกลูคาเนสที่ทนร้อน จากแบคทีเรียทนร้อน *Thermotoga neapolitana* โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ แล้วตกตะกอนซ้ำ จากนั้นไปกำจัดเกลือด้วยอัลตราฟิลเตรชั่น แล้วใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ FFQ-Sepharose และ Sephadex G-25 แยกเอนโดกลูคาเนสได้ 2 ชนิด คือ CelA และ CelB มีน้ำหนักโมเลกุล 29 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 322 และ 406 เท่า ผลผลิตเอนไซม์เหลือ 17.5 และ 27.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Decker, Visser และ Schreier (2001) ใช้ Mono P HR 5/20 gel filtration และ Sephacryl S-200 gel filtration ร่วมกับวิธี ไอออน-เอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี เพื่อแยกเซลลูเลสจาก *Aspergillus tubingenesis* CBS 643.92 พบว่าสามามารถแยกเซลลูเลสในกลุ่มบีตา-กลูโคซิเดสได้ 4 กลุ่ม

Ding, Ge และ Buswell (2001) ได้ศึกษาการทำเอนโดกลูคาเนสจากเห็ด *Volvariella volvacea* ให้บริสุทธิ์ โดยนำเอนไซม์มากรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน ที่มี MW cut off เท่ากับ 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose Sephacryl-S 100 และ Preparative PAGE สามารถแยกเอนโดกลูคาเนส (EG1) 1 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุล 42 กิโลดาลตัน มีค่า pI 7.7 เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 42 เท่า ผลผลิตเอนไซม์เหลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์

George, Ahmad และ Rao (2001) ศึกษาการแยกเอนโดกลูคาเนสจากแอคติโนมัยซีสทนร้อน *Thermomonospora* sp. โดยเทคนิคการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-55 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกำจัดเกลือด้วยวิธีไดอะไลสีส นำเอนไซม์ที่ได้ผ่านโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพและ Sephacryl S-200 พบว่าเอนโดกลูคาเนสมีน้ำหนักโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน และมีค่า pI 4.1 เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.1 เท่า

Chen และคณะ (2004) ศึกษาเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรีย *Sinorhizobium fredii* CCRC 15769 ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นผ่านคอลัมน์ DEAE Sepharose และ Phenyl-Sepharose พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 9.08 เท่า ผลผลิตเอนไซม์เหลือ 26.4 เปอร์เซ็นต์

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเซลลูเลส

โดยทั่วไปเซลลูเลสจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด (Nevalainen และ Penttila, 1996) ซึ่งเซลลูเลสมีความคงทนต่อค่า pH ในช่วงกว้างประมาณ 4.0 ถึง 8.0 สามารถเก็บเซลลูเลสที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 และ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอะซิโตน หรือเอทานอล โดยไม่สูญเสียสมบัติ (Ryu และ Mandel, 1980) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน การศึกษาลักษณะสมบัติของเซลลูเลสนั้นจะทำให้ทราบถึงสมบัติต่างๆของเอนไซม์เพื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ได้อย่างถูกต้อง

ค่า pH และอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเซลลูเลสซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยมีความแตกต่างกัน ดังนั้นในการนำเซลลูเลสไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรมจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษา ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ด้วย เพื่อให้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพตามที่ต้องการ ดังตารางที่ 2.2 เป็นตัวอย่างเซลลูเลสที่มีสภาวะการทำงานซึ่งแตกต่างกันตามสายพันธุ์จุลินทรีย์

ตารางที่ 2.2 ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสจากจุลินทรีย์บางชนิด

ชนิดเชื้อจุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสมในการทำงาน		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิ (^{O}C)	pH	
Anaerocellum thermophilum	85–90	5.0–6.6	Zverlov, Riedel และ Bronnenmeier 1998
Bacillus subtilis	65–70	5.0–6.5	Mawadza และคณะ, 2000
Pyrococcus furiosus	102–105	–	Kengen และคณะ,1993
Pyricularia oryzae	55	5.5	Hirayama และคณะ, 1978
Humicola grisea	50 -70	5.0 – 7.0	Takashima และคณะ, 1996
Thermotoga neapoltana (EndocellulaseA)	95	6.0	Bok และคณะ,1998
Alkalothermophilic actinomycete	50	5	George, Ahmad และ Rao, 2001
Sinorhizobium fredii	35	7	Chen และคณะ, 2004
Neurospora crassa	45-65	4.0-7.0	Yazdi และคณะ, 1990
Cladosporium sp.	60	5	Abrha and Gashe, 1992
Rhizopus oryzae	55	5-6	Murashima และคณะ, 2002
Trichoderma reesei	50-70	4.5-5.5	Busto, Ortega และ Perez-Mateos, 1996

การศึกษาหาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตบางชนิด

เนื่องจากเซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มาทำงานร่วมกัน ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะมีความจำเพาะต่อซับสเตรตต่างกัน เช่น เอกโซกลูคาเนสมีความจำเพาะต่อพวก crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง microcrystalline cellulose หรือ Avicel เอนโดกลูคาเนสมีความจำเพาะต่อ carboxylmethyl cellulose (CMC) และ บีตา-กลูโคซิเดส มีความจำเพาะต่อ เซลโลไบโอสและ salicin เป็นต้น ดังนั้นในการการศึกษาหาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรตบางชนิด จะทำให้ทราบถึงการทำงานของเซลลูเลสได้ดียิ่งขึ้น เช่น

Kanda และคณะ (1978) ศึกษาการย่อยสลาย cellooligosaccharides ด้วยเซลลูเลสที่ผลิตจาก *Irpex lacteus* พบว่า มีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ต่อซับสเตรตหลายชนิด เช่น เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส เซลโลเททราโรส และเซลโลเฮกโซส เป็นต้น

Takashima และคณะ (1996) พบว่าจากการศึกษาเอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส จากเชื้อรา *Humicola grisea* var. *thermoidea* IFO9854 พบว่า ความจำเพาะต่อซับสเตรตต่างกัน ขึ้นอยู่กับเซลลูเลสแต่ละกลุ่ม คือ เอกโซกลูคาเนส มีความจำเพาะต่อ Avicel และ CMC เอนโดกลูคาเนส มีความจำเพาะต่อ CMC และบีตา-กลูโคซิเดส มีความจำเพาะต่อ เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส เซลโลเททราโรส p-NPG p-NPC เป็นต้น

Yan และ Lin (1997) ศึกษาบีตา-กลูโคซิเดส ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก *Aspergillus niger* CCRC 31494 มีความจำเพาะสูงมากต่อซับสเตรตที่เป็น p-NPG และ เซลโลไบโอส

Okamoto และคณะ (2000) พบว่า บีตา-กลูโคซิเดส ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก *Flavobacterium johnsonae* มีความจำเพาะต่อซับสเตรตหลายชนิด เช่น p-NPG phenyl β-glucoside และ salicin เป็นต้น

Tuophy และคณะ (2002) ได้ศึกษาความจำเพาะของเอกโซกลูคาเนสจาก *Talarmyces emersonii* ที่มีต่อความจำเพาะต่อซับสเตรตพบว่า เอกโซกลูคาเนส มีความจำเพาะต่อ Avicel มากที่สุด ส่วน CMC และ 1, 4-β-D-glucan (barley) เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายได้

2.7 การศึกษาผลของไอออนบางชนิดและตัวยับยั้งเอนไซม์บางชนิดต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์ทั่วไปสามารถถูกกระตุ้นหรือ ยับยั้งได้ด้วยสารเคมีและไอออนบางชนิด เช่น ถ้าภายในระบบมีไอออนจำพวก Fe^{2+} Fe^{3+} Cu^{2+} Hg^{2+} และ p-chloromercuric benzoate (Yan และ Lin, 1997; Okamoto และคณะ, 2000) จะทำให้สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเซลลูเลสได้มากหรืออาจถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ ซึ่งการยับยั้งเนื่องมาจากสารดังกล่าวทำหน้าที่ออกซิไดซ์หมู่ฟังก์ชันของโปรตีน เช่น ซีสเตอีน ทริปโตเฟน ไทโรซีน ฮีสติดีน และเมทธิโอดีน ให้เสียสภาพทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง (ชุลีพร จุงสาย, 2535) ดังนั้นในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์จะต้องคำนึงถึงชนิดและตัวยับยั้งต่างๆ ด้วย Mizukoshi และคณะ (1977) ได้ศึกษาผลของไอออนบางชนิดและตัวยับยั้งเอนไซม์บางชนิดต่อเซลลูเลส จากเชื้อ *Pellicularia filamentosa* พบว่าไอออนของ Cu^{2+} Fe^{3+} N-

Bromosucinimide และ SDS มีผลยับยั้งเซลลูเลส ต่อมา Jin และ Toda (1989) ได้ทำการศึกษาผลของไอออนบางชนิดต่อเอนโดกลูคาเนสที่ผลิตได้จาก *Clostridium thermocopriae* sp. nov. JT3-3 พบว่าที่ความเข้มข้นของ Hg^{2+} 5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ถูกยับยั้งมากที่สุดในขณะที่ไอออนของ Zn^{2+} มีผลในการยับยั้งน้อยที่สุด Yamanobe และ Mitsuishi (1990) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเซลลูเลสจากเชื้อรา Y-94 พบว่าความเข้มข้นไอออนของ Hg^{2+} 1 มิลลิโมลาร์ และ Mn^{2+} 10 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งเอนโดกลูคาเนสมากที่สุด Murashima และคณะ (2002) พบว่าเอนโดกลูคาเนสชนิดใหม่ จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ถูกยับยั้งด้วยไอออนของ Zn^{2+} Cu^{2+} Co^{2+} และ Pb^{2+} เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์/ ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ larminar flow รุ่น BV 123 และ B∀T 123	ISSCO, USA
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius, Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC205	Denver Instrument Company, USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius, Germany
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 8453	Hewlett Packard, USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpec 4049	LKB Biochrom, England
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)	New Brunswick Scientific Co. Inc., USA
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)	Lab-Line, USA
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Heto-Holten, Denmark
กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200	Olympus, Japan
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (steam sterilizer/autoclave)	Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan
เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Servall refrigerated-automatic)	Ivan Servall, INC., Norwalk, Connecticut, USA
ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven) รุ่น U50 790, 387	Memmert, Germany
ตู้อบ (oven)	Clayson, New Zealand
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius, Germany

วัสดุอุปกรณ์/ ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
Hot plate รุ่น 210T	Thermix, Fisher Scientific, USA
ปิเปตอัตโนมัติขนาด 5-50, 100-1,000 และ 1,000- 5,000 ไมโครลิตร	Biohit, Finland
ชุดเครื่องแก้ว	Pyrex, New York, USA
ชุดเครื่องแก้ว Duran Scott	Schott Duran, Germany
กระดาษกรอง Whatman No.1	Whatman International Ltd., England
ถุงไดอะไลซีส รุ่น Spectra 1 Por moleculerporous membrane tubing	Spectrum Medical Industries, Inc., USA
ชุดกรอง Ultrafiltration รุ่น Viva science 250	Sartorius, Germany
Econo Pump รุ่น EP-1	Bio-Rad, USA
Econo UV monitor รุ่น EM-1	Bio-Rad, USA
Fraction Collector รุ่น Bio Frac ™	Bio-Rad, USA
Vertical electrophoresis system รุ่น VIO-CDC	Scie-Plas limited (SDE-PIAS), England
Power Pac 1000	Bio-Rad, USA
Microcentrifuge รุ่น Denville 260 D	Denville Scientific, USA

สารเคมี

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
วุ้นผงตรานางเงือก	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
Ethanol 95% (C_2H_5OH)	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต จ. ฉะเชิงเทรา ประเทศไทย
Calcium hydrogen phosphate dehydrate ($CaHPO_4.2H_2O$) Methanol (CH_3OH)	Scharlau, Spain

Citric acid ($C_6H_2O_7.2H_2O$) di-Sodium ethylendiaminetetraacetate (EDTA) dehydrate($CH_2N(CH_2COOH)CH_2COONa)_2.2H_2O$ Barium chloride ($BaCl_2$) Copper chloride ($CuCl_2$) Glycerol ($CH_2OHCHOHCH_2OH$)	Asia Pacific Specialty Chemicals Ltd, Australia
Carboxymethylcellulose (Sodium salt, low viscosity) α-cellulose Cornsteep liquor D-cellobiose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 3, 5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) Triton ® X-100, for eletrophoresis Xylan from brichwood	Sigma Chemical, St. Louis, MO., USA
Acetic acid (CH_3COOH) Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$ Congo red Manganese sulphate ($MnSO_4$) Phenol (C_6H_5OH) Potassium permanganate ($KMnSO_4$) Sodium hydroxide (NaOH) Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$) Sodium chloride (NaCl) Absolute Ethanol (CH_3CH_2OH)	Merck, Darmstadt, Germany
Acetylacetone ($CH_3COCH_2COCH_3$) Copper sulphate ($CuSO_4$) Magnesium sulphate ($MgSO_4$) Sulfuric acid (H_2SO_4) Potassium di-Chromate ($K_2Cr_2O_7$)	Carlo Erba, Milan, Italy

Avicel Bovine serum albumin (BSA) 3, 5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) D-Salicin ($C_{13}H_{18}O_7$) Folin-ciocalteu phenol reagent Piperzine 4-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (p-NPG) Sodium Carbonate (Na_2CO_3) Tween 80 tri-Sodium citrate dihydrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$)	Fluka AG. Buch, Switzerland
Acrylamide Ammonium persulfate Coomassie Blue R-250 N, N'-methylene bis acrylamide Prestained SDS-PAGE Standards Low Range Tris-glycine electrode buffer Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Bio-Rad, USA
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	USB Corporation, USA
HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow β-mercaptoethanol TEMED (N, N, N' N'-tetramethylenediamine) Low Molecular Weight Gel filtration Sephacryl-S-200 HR	Amersham biosciences, Sweden
Ferrous sulphate ($FeSO_4$) Zinc sulphate ($ZnSO_4$) Manganese sulphate ($MnSO_4$) Cobalt chloride ($CoCl_2$) Sodium bi-sulfite ($NaHSO_3$)	May & Baker Ltd., Dagenham, England

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เชื้อรา *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์โดย Punnapayak, Kuhirun และ Tanonkeo (1999)

3.1.2 เชื้อรา *Acrophialophora* sp UV10-2 ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธี UV โดย พิสุทธิ์ พวงนาค (2542)

เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ได้รับจากห้องปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์ชีวมวลพืช (Plant Biomass Utilization Research Unit) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การศึกษาการเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *Acrophialophora* sp. และการผลิตเซลลูเลสของเชื้อราในอาหารสูตร Production (Punnapayak, Kuhirun และ Tanonkeo, 1999)

นำเชื้อรา *Acrophialophora* sp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาโครงสร้างต่างๆ โดยดูลักษณะต่างๆ เช่น การเจริญบนของเชื้อราบนอาหาร ลักษณะของเส้นใย สี ขนาด ผนังและรูปร่างของสปอร์ เป็นต้น ตามวิธีของ Edward (1959) และ Barnette (1967) หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารแข็งสูตร Production (Punnapayak, Kuhirun และ Tanonkeo, 1999) (ภาคผนวก ก) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่เต็มด้วยแท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 24 ขวด ที่มีอาหารสูตร Production ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีแอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) 3 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จำนวน 3 ซ้ำ นำมาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที (7441.4 g, r = 10.4 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำส่วนน้ำใสมาวัดแอคติวิตีเซลลูเลส 3 กลุ่ม คือ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส และวิเคราะห์การเจริญของเชื้อราโดยวัดปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine)

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1. การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา FPA (Ghose, 1987)

3.3.1.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.1.2 เติมสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1.0×6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน

3.3.1.3 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3.3.1.4 เติมสารละลาย DNS reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.3.1.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

3.3.2 การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา CMCase (Ghose, 1987)

3.3.2.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.2.2 เติม CMC ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.2.3 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.3.2.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

3.3.3 การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเบตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) โดยการวิเคราะห์หา β-glucosidase ตามวิธีการของ (Sternberg และคณะ, 1976)

3.3.3.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.3.2 เติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.3.3 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.3.3.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ pH 4.5 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

3.3.4. การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และคณะ (1951)

ทำการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) (ภาคผนวก ข) โดยนำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรมาผสมกับสารละลาย Lowry reagent I ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Lowry reagent II ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างเป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

3.3.5. การวิเคราะห์การเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารสูตร Production ที่มี α-cellulose โดยวิธีวัดค่ากลูโคซามีน (ดัดแปลงจากวิธีของ Dare, Clark และ Chu-Chou 1988)

นำตัวอย่างที่อบแห้งและบดละเอียดปริมาณ 1 กรัม เติม กรดไฮโดรคลอริก 4 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับ pH ให้ได้ 5-6 และปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 25 มิลลิลิตร และทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของกลูโคซามีน โดยเติมสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรในสารละลาย อะซีติล อะซีโตน (acetyl acetone) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดให้ได้ 5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม

เอทานอล 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Erhich's reagent 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และเติมเอทานอล 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างเป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณกลูโคซามีนจากกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (ภาคผนวก ค)

3.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อย่างหยาบ

3.4.1 การศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส 3 กลุ่ม

นำเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรามาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม โดยปรับให้ภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีค่า pH ต่างๆ กัน คือ 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เพื่อศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ เป็นตัวปรับค่า pH ได้แก่

โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 3.0 และ 4.0

โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.0 7.0 และ 8.0

3.4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส 3 กลุ่ม

นำเอนไซม์จากเชื้อรามาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส 3 กลุ่ม โดยปรับภาวะค่า pH ที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.4.1 เนื่องจากเป็นค่า pH ที่เซลลูเลสทำงานดีที่สุด วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส

3.5 การผลิตเอนไซม์

การผลิตเซลลูเลสโดยการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร Production ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ค่า pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 วัน ทำการเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที (7441.4 g, r = 10.4 cm) เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใสเพื่อตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และปริมาณโปรตีน

3.6. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

3.6.1 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน (Utrafiltration) นำเอนไซม์ที่ผลิตได้ข้างต้นจากเชื้อรา 2 ชนิด มากรองผ่านด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชั่น Viva flow 25 ที่มี

membrane cut off 10,000 Da ภายใต้ความดันของแก๊สไนโตรเจนประมาณ 3 บาร์ นำมาวัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แอคติวิตีเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และปริมาณโปรตีน

3.6.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Kanda **และคณะ** (1978))

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วน คือ 0-40 40-50 50-60 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร หลังใส่จนหมดให้กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ในแต่ละลำดับส่วนทิ้งไว้ข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปปั่นแยกส่วนตะกอนและน้ำใสออกจากกัน นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้มาละลายด้วย สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด จากนั้นนำไปไดอะไลซิสข้ามคืนในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ นำไปวัดแอคติวิตีเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่มเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำการวัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ และปริมาณโปรตีน

3.6.3 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยแอนไอออน-เอกซ์เชน โครมาโทกราฟี

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.6.2 มาผ่านคอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow ขนาด 7×25 มิลลิเมตร (1 มิลลิลิตร) โดยค่อยๆ ใส่เอนไซม์ลงในคอลัมน์ชะโปรตีนด้วยสารละลาย Piperazine-HCl 0.02 โมลาร์ pH 5.0 ด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 5 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ จึงเปลี่ยนมาชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ และวัดแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส รวมหลอดที่มีแอคติวิตีสูงเข้าด้วยกันกำจัดเกลือและทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แอคติวิตีของแซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และปริมาณโปรตีน

3.6.4 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยเจล-ฟิลเทรชัน โครมาโทกราฟี

แช่ Sephacryl-S-200 HR ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยการดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.6×40 เซนติเมตร ผ่านสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 ลงในคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆ ใส่เอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.6.3 ลงบนหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนด้วยสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 อัตราเร็ว 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 3

มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีสูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตร แอคติวิตีเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และปริมาณโปรตีน

3.6.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเอสดีเอส-พอลิอะคลิลาไมด์เจลอีเล็กโทร โฟริซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.6.5.1 เตรียมสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (seperating gel) ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์

โดยผสมสารอะคริลาไมด์ (ภาคผนวก ข) 4.1 มิลลิลิตร สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.9 (ภาคผนวก ข) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 3.3 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ภาคผนวก ข) 75 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ จากนั้นนำไปบรรจุลงในแผ่นแก้วขนาด 2 มิลลิเมตร × 10 ×10 เซนติเมตรให้มีความสูง 6 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูง 2 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ซับน้ำออกแล้ววางพลาสติกรูปหวี (comb) เพื่อเตรียมช่องใส่ตัวอย่างลงระหว่างแผ่นกระจก

3.6.5.2 เตรียมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์

โดยผสมสารอะคริลาไมด์ 1.2 มิลลิลิตร สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 6.8 (ภาคผนวก ข) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 6.3 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 75 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ดึงแผ่นพลาสติก หลังจากนั้นล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

3.6.5.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และการทำอีเล็กโทรโฟริซีส

นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดอีเล็กโทรโฟริซีส เติมสารละลายทริส-เอสดีเอสอีเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเล็กโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานละลายในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ (ภาคผนวก ข) ต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องก่อนไปหยอดลงในหลุมเจลที่เตรียมได้ โดยให้ความเข้มข้นปริมาณสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างอยู่ในช่วง 20 ไมโครกรัมต่อหลุมเจล ทำการอีเล็กโตรโฟริซิสที่ 40 มิลลิแอมเปร์ จนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนมาถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วและแช่ในน้ำยาย้อมสี Commassie Blue (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายล้างสี (ภาคผนวก ข) จนเห็นโปรตีนชัดเจน

3.6.6 การตามแอคติวิตีของเซลลูเลสในแผ่นเอสดีเอสพอลิอะคริลาไมด์เจล (ดัดแปลงจากวิธีของ Ye Ng และ Cheng (2001))

ทำเหมือนข้อ 3.6.5 แต่เติม CMC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อปริมาตร) เฉพาะในเซพาเรติงเจล หลังจากทำอีเล็กโทรโฟริซีสเสร็จแล้วถ่ายเจลออกจากแผ่นแก้ว นำไปแช่ในสารละลาย Triton X-100 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งเขย่าเบาๆ จากนั้นนำเจลมาแช่ใน อะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นเทบัฟเฟอร์ที่แช่เจลออก แล้วเติมบัฟเฟอร์ข้างต้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เทบัฟเฟอร์ออก แช่เจลใน Congo red 0.01 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 30 นาที แล้วล้างเจลด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที จะเห็นแถบแอคติวิตีของเซลลูเลสเป็นแถบสีขาวใสบนพื้นเจลสีแดง

3.7 การศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลสที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.7.1 การศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส

นำเอนไซม์จากข้อ 3.6.4 มาปรับภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีค่า pH ต่างๆ กัน คือ 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เพื่อศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ เป็นตัวปรับค่า pH (ตามข้อ 3.5.1)

3.7.2 การศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อความเสถียรของเซลลูเลส

นำเอนไซม์จากข้อ 3.6.4 มาปรับค่า pH ต่างๆ คือ 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์จากข้อ 3.5.1 ทำการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส จากนั้นจึงนำเอนไซม์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 วัน แล้วนำมาวัดแอคติวิตีอีกครั้งหนึ่งเพื่อศึกษาความเสถียรของเซลลูเลสที่ค่า pH ต่างๆ โดยวัดที่ pH ที่เหมาะสมในการทำงานตามข้อ 3.8.1

3.7.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส

นำเอนไซม์จากข้อ 3.6.4 มาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส โดยปรับภาวะค่า pH ที่เหมาะสม ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส

3.7.4 การศึกษาความเสถียรของเซลลูเลสต่ออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน

นำเอนไซม์จากข้อ 3.6.4 มาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส โดยปรับภาวะค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยมีการแปรผันเวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์ก่อนทำปฏิกิริยา คือ 0 15 30 45 60 75 90 105 และ 120 นาที เพื่อศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส

3.7.5 การศึกษาหาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรตบางชนิด

นำเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไปบ่มกับเซลลูโลสและอนุพันธุ์ของเซลลูโลสชนิดต่างๆ ได้แก่ Avicel แอลฟาเซลลูโลส กระดาษกรอง CMC D(+) cellobiose D(-) salicin 4-Nitrophenyl-β-D-gaclactopyranoside (p-NPG) และไซแลน (Xylan) โดยความเข้มข้นของซับสเตรตแต่ละชนิดเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/ปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำไปหาแอคติวิตีเซลลูเลส

3.7.6 การศึกษาผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่ได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายบัฟเฟอร์ซิเตรต 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ ของไอออนของโลหะและสารเคมีบางชนิด ได้แก่ $MgCl_2.2H_2O$ $CaCl_2.2H_2O$ $MnCl_2.2H_2O$ $FeCl_3.6H_2O$ $CuCl_2.2H_2O$ $ZnCl_2$ $CoCl_2.6H_2O$ $BaCl_2.2H_2O$ $HgCl_2$ SDS และ EDTA เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 เซลเซียส นำไปหาแอคติวิตีของเซลลูเลส จากนั้นนำมาคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) โดยคิดจากการเทียบแอคติวิตีเฉลี่ยที่วัดได้ในแต่ละไอออนกับแอคติวิตีที่ไม่ได้เติมไอออนและสารเคมีใดๆ คูณด้วย 100

3.7.7 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลส

3.8.7.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสโดยการทำเจลฟิลเตรชั่น

โดยผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR เตรียมจากบลูเด็กซ์แทรน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปแตสเซียมไดโครเมท 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายโปรตีนมาตรฐานได้แก่ Albumin น้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดาลตัน Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน Chymotrypsinogen A น้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน Ribonuclease น้ำหนักโมเลกุล 13.7 กิโลดาลตัน ในภาวะเดียวกับที่ทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์ นำแต่ละส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า K_{av}

โดย $K_{av} = (V_e-V_o) / (V_t-V_o)$

V_e คือ elution volume ของโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์

V_o คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเด็กซ์แทรนผ่านออกมา

V_t คือ Total bed volume ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมทผ่านคอลัมน์

3.8.7.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสโดยการทำอีเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

โดยการทำอีเล็กโทรโฟริซิสของเซลลูเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ประกอบด้วย Phosphorylase B น้ำหนักโมเลกุล 113 กิโลดาลตัน Bovine Serum Albumin (BSA) น้ำหนักโมเลกุล 92 กิโลดาลตัน Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 52.3 กิโลดาลตัน Carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุล 36.3 กิโลดาลตัน Soybean trypsin inhibitor น้ำหนักโมเลกุล 28.700 กิโลดาลตัน Lysozyme น้ำหนักโมเลกุล 21.3 กิโลดาลตัน ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของเซลลูเลสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

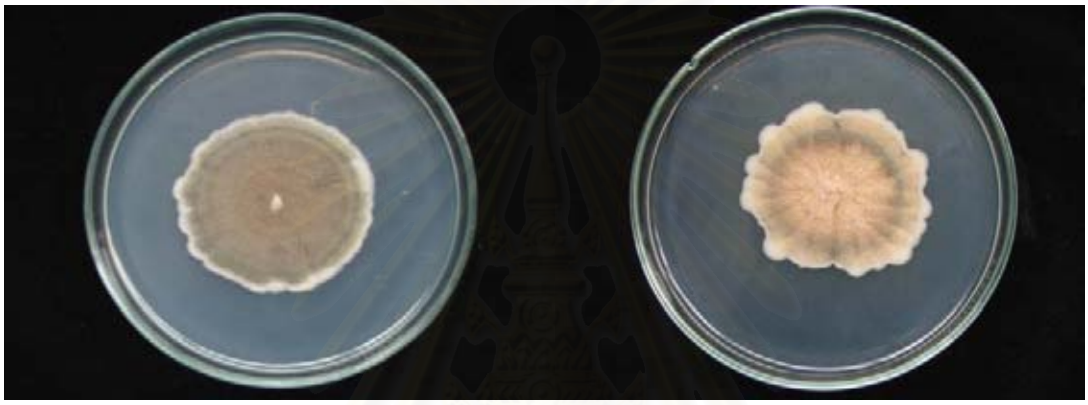
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย

4.1.1 เชื้อรา *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม รูปที่ 4.1 (ก.)

4.1.2 เชื้อรา *Acrophialophora* sp. สายพันธ์กลาย UV10-2 รูปที่ 4.1 (ข.)



ก. ข.

รูปที่ 4.1 ลักษณะเส้นใยและการเจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

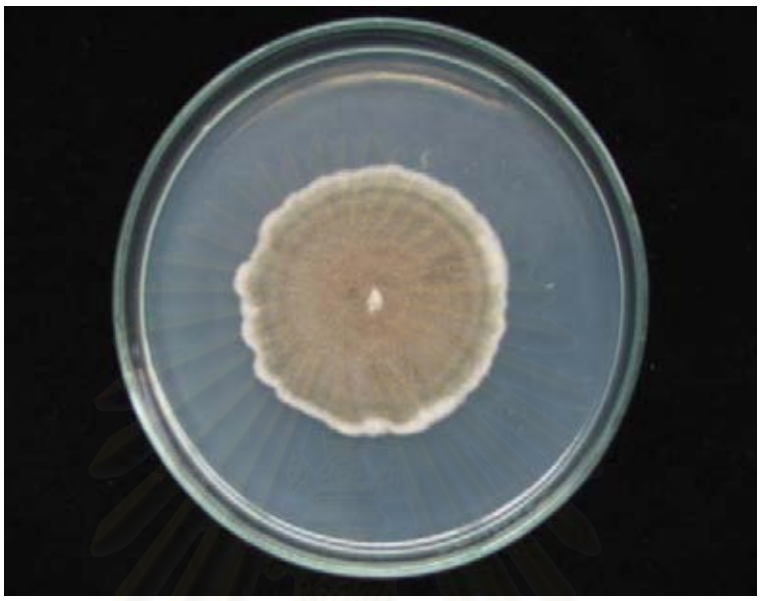
ก. *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม

ข. *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์กลาย UV10-2

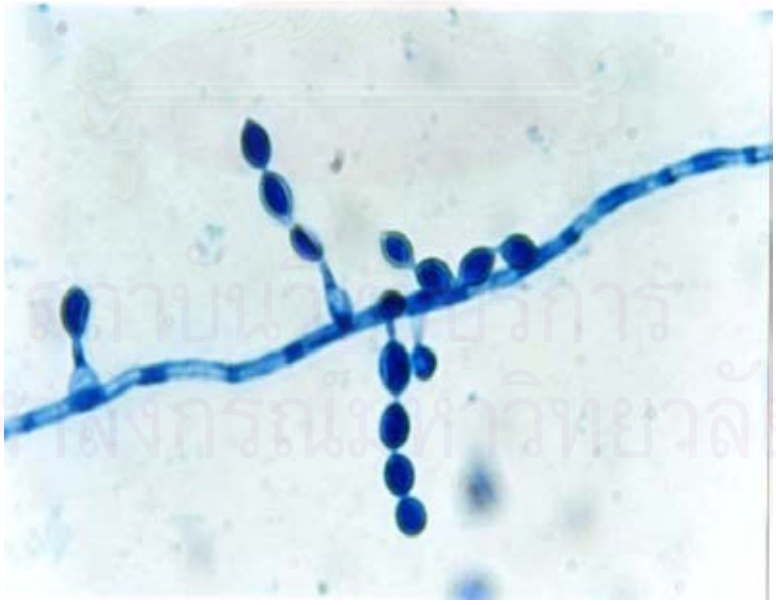
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Acrophialophora* sp.

นำเชื้อรา *Acrophialophora* sp. มาศึกษาหาสายพันธุ์ที่ถูกต้องโดยดูลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA และลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตปานกลาง และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบการเจริญในอาหารแข็งสูตร Production ที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการเจริญของเชื้อราอย่างรวดเร็ว ลักษณะโคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อน เมื่อเจริญนานขึ้นจะมีสีดำบริเวณขอบเส้นใย ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้นแบ่งเป็นเซลล์ๆ มีการสร้างก้านชูสปอร์ (conidiophores) ซึ่งมีสปอร์ (conidia) สีน้ำตาลหลายๆ อันเชื่อมติดกันคล้ายลูกปัด รูปร่างแบบไข่ มีปลายเรียวทั้ง 2 ด้าน ไม่มีสี ผนัง conidia ค่อนข้างหนา เรียบแต่อาจขรุขระและเป็นรูปเกลียวเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.2 และเมื่อศึกษาถึงความสามารถในการใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *Acrophialophora* สายพันธุ์นี้สามารถใช้

เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ที่นำมาศึกษามีความน่าจะเป็นชนิด *Acrophialophora nainiana*



ก.



ข.

รูปที่ 4.2 การเจริญของ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม

ก. ลักษณะเส้นใยและการเจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ข. ลักษณะเส้นใยและสปอร์ จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4000 เท่า

Class Deuteromycetes

Order Moniliales

Family Moniliaceae

Genus *Acrophialophora*

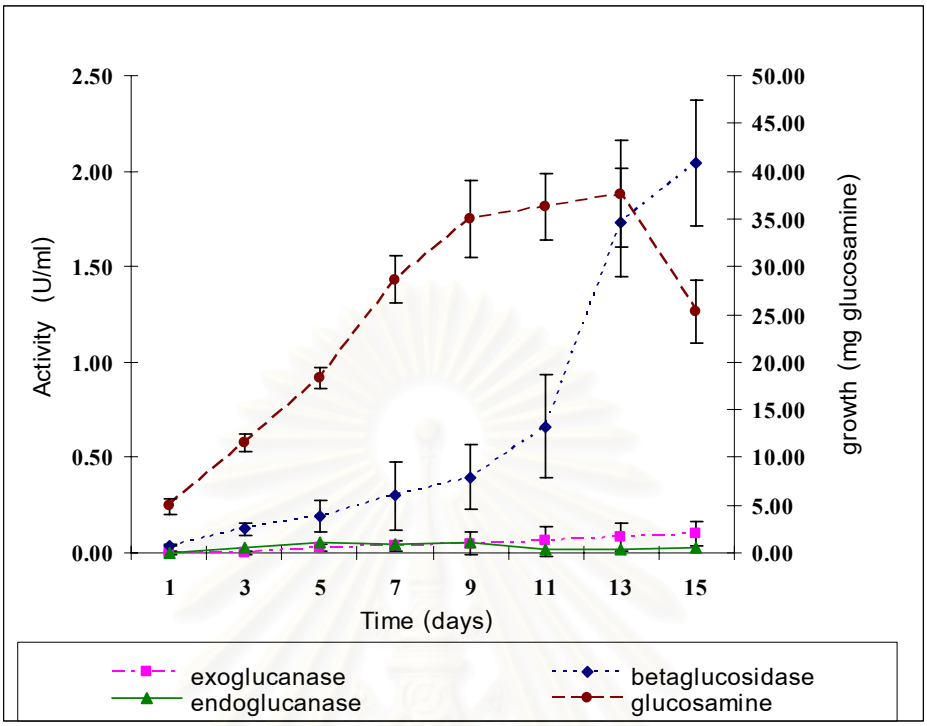
Species *Acrophialophora nainiana*

4.3 การศึกษาการเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร Production **เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม**

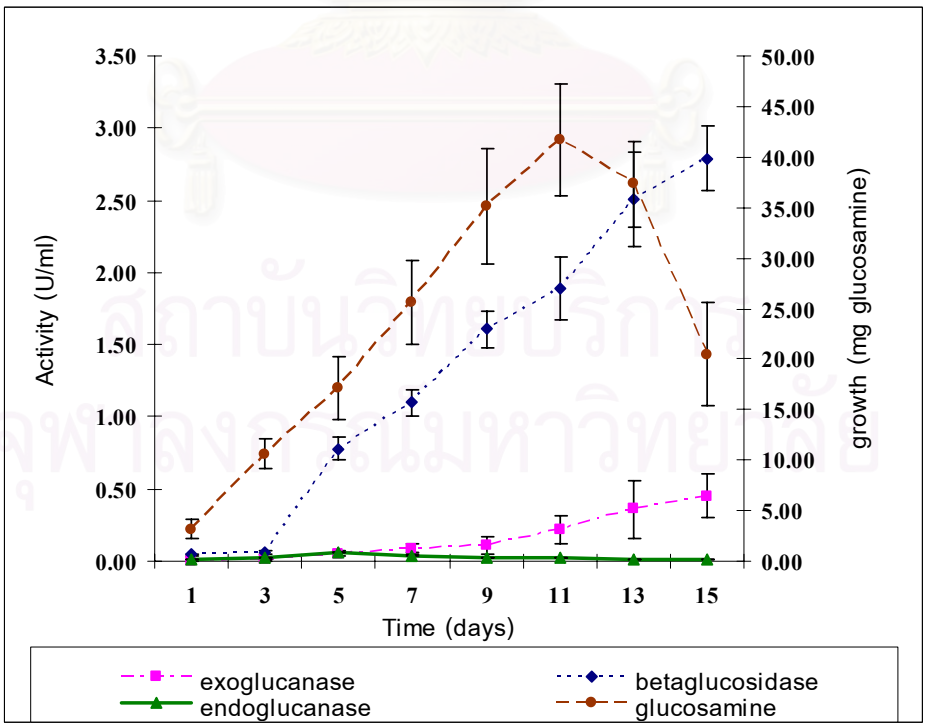
การศึกษาการเติบโตของเชื้อรา การผลิตเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส บีตา-กลูโคซิเดส และปริมาณกลูโคซามีน เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Production ที่มีแอลฟาเซลลูโลส (3%) เป็นแหล่งคาร์บอน pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย UV10-2 ให้ผลสอดคล้องกันคือ มีการผลิตเอนโดกลูคาเนสปริมาณมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอกโซกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส โดยพบว่า*Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม (รูปที่ 4.3) มีการเติบโตเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากวันที่ 1 จนถึงวันที่ 13 หลังจากนั้นการเติบโตของเชื้อรามีแนวโน้มลดลง (การเติบโตของเชื้อราวัดจากปริมาณกลูโคซามีน) ส่วน *Acrophialophora* sp.สายพันธุ์กลาย UV10-2 (รูปที่ 4.4) มีการเติบโตเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เช่นกัน โดยจากวันที่ 1 จนถึงวันที่ 11 หลังจากนั้นการเติบโตของเชื้อรามีแนวโน้มลดลง ซึ่งการผลิตเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนสมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แม้ว่าการเติบโตของเชื้อราของทั้ง 2 สายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงก็ตาม ส่วนการผลิตบีตา-กลูโคซิเดสของเชื้อรา 2 สายพันธุ์มีแนวโน้มลดลง เมื่อเชื้อราเติบโตมากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ 2 สายพันธุ์ พบว่า *Acrophialophora* sp. UV 10-2 ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 กลุ่มมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังตารางที่ 4.1 ดังนั้นจึงเลือก *Acrophialophora* sp. UV10-2 ในการผลิตเอนไซม์เพื่อจะศึกษาในขั้นต่อไป และทำการเก็บเอนไซม์วันที่ 15

ตารางที่ 4.1 ค่าแอคติวิตีเซลลูเลสของเชื้อรา *Acrophialophora* sp. wild type และ *Acrophialophora* sp. UV 10-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Production ที่ pH 5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

เชื้อรา	แอคติวิตีเซลลูเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)		
	เอกโซกลูคาเนส	เอนโดกลูคาเนส	บีตา-กลูโคซิเดส
Acrophialophora sp. wild type	0.177	2.135	0.007
Acrophialophora sp. UV 10-2	0.476	2.861	0.049



รูปที่ 4.3 การเติบโตของเชื้อรา การผลิตเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเนส ปริมาณกลูโคซามีน ของ *Acrophialophora nainiana* สายพันธุ์ดั้งเดิม

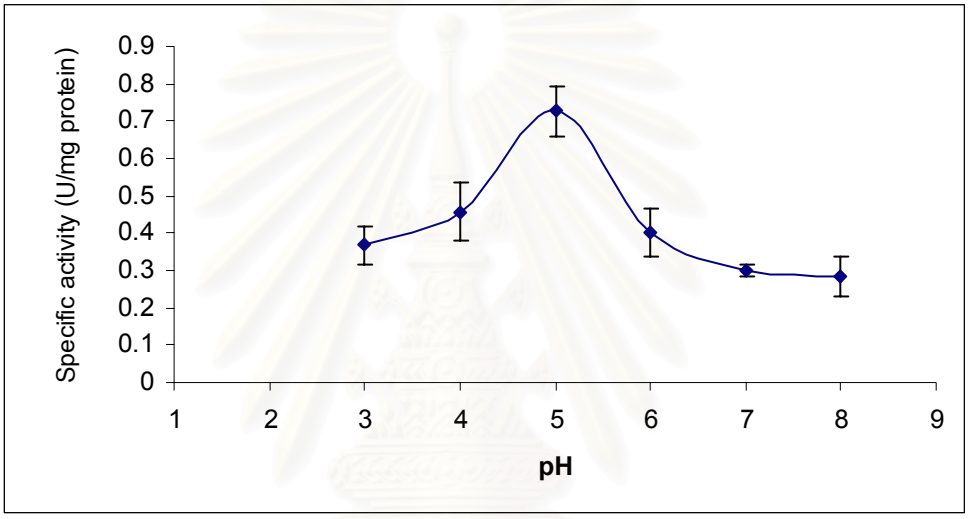


รูปที่ 4.4 การเติบโตของเชื้อรา การผลิตเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเนส ของ *Acrophialophora nainiana* UV10-2

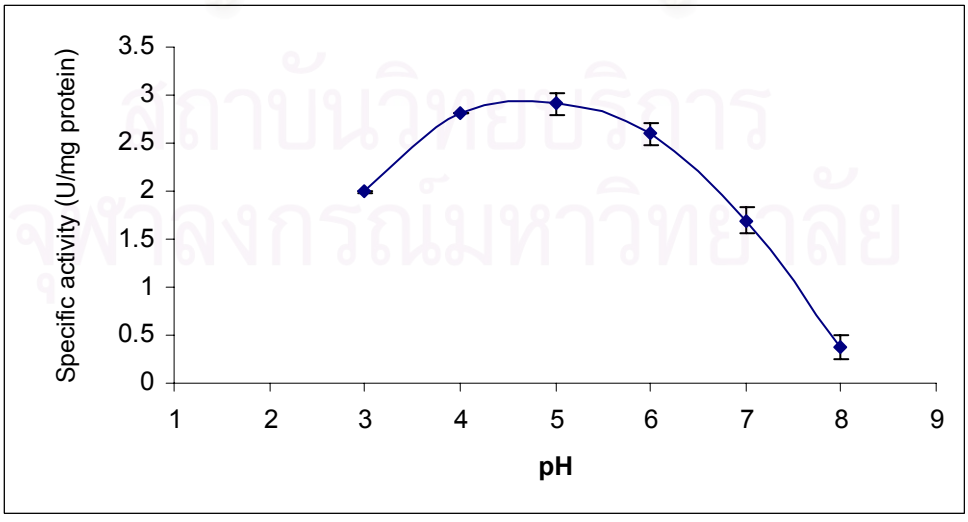
4.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อย่างหยาบ

4.4.1 การศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส 3 กลุ่ม

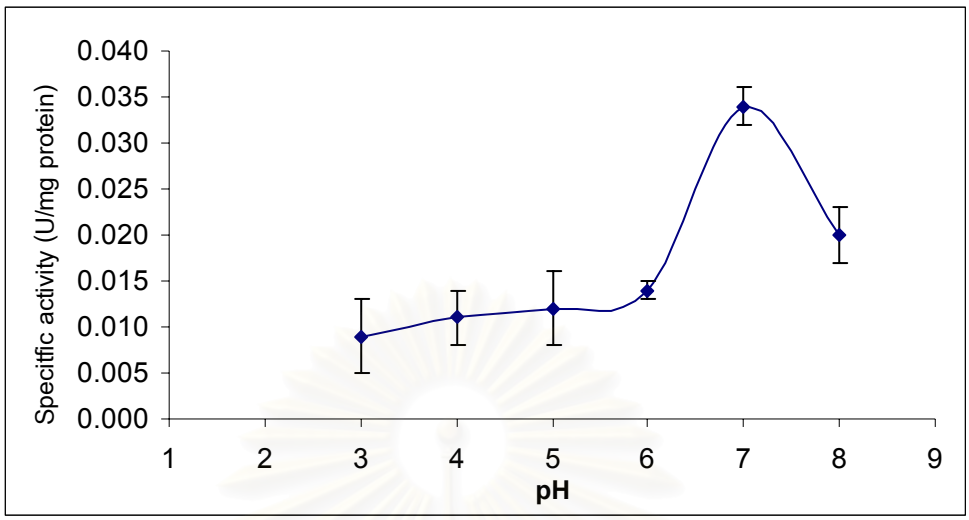
นำเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรามาวัดแอคติวิตีทั้ง 3 กลุ่ม โดยปรับให้ภาวะการทำงานให้มีค่า pH ต่างๆ กัน คือ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสอย่างหยาบ พบว่า ทั้งเอกโซกลูคาเนส (รูปที่ 4.5) และเอนโดกลูคาเนส (รูปที่ 4.6) ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกรดอ่อน โดยมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5 ส่วนบีตา-กลูโคซิเดส (รูปที่ 4.7) ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง (pH 7)



รูปที่ 4.5 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของเอกโซกลูคาเนส จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2 ในช่วงค่า pH 3.0 ถึง 8.0



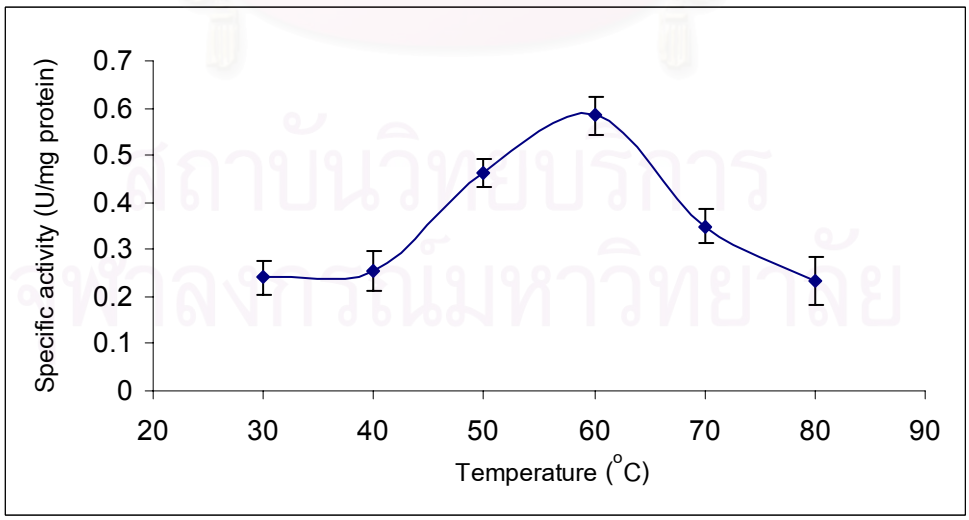
รูปที่ 4.6 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของเอนโดกลูคาเนส จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2 ในช่วงค่า pH 3.0 ถึง 8.0



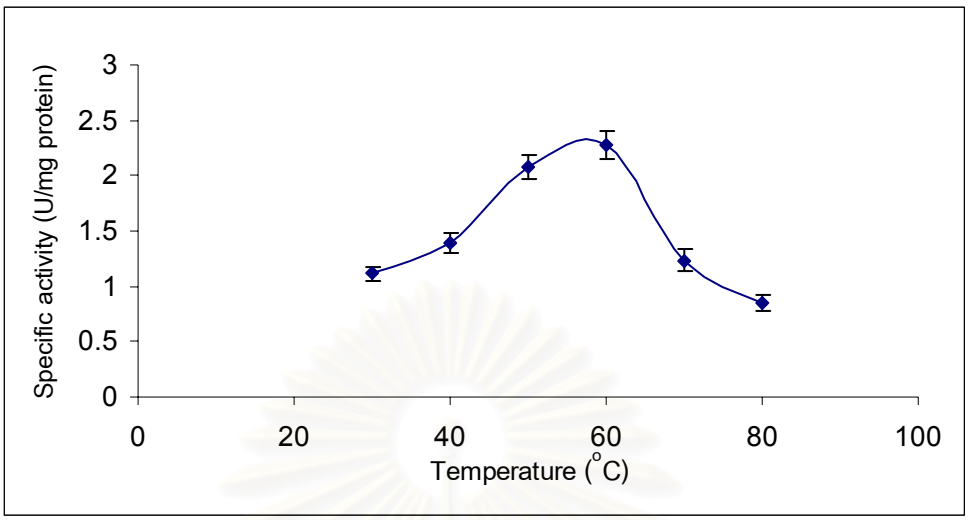
รูปที่ 4.7 แอคติวิตีจำเพาะของบีตา-กลูโคซิเดส จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2 ในช่วงค่า pH 3.0 ถึง 8.0

4.4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส 3 กลุ่ม

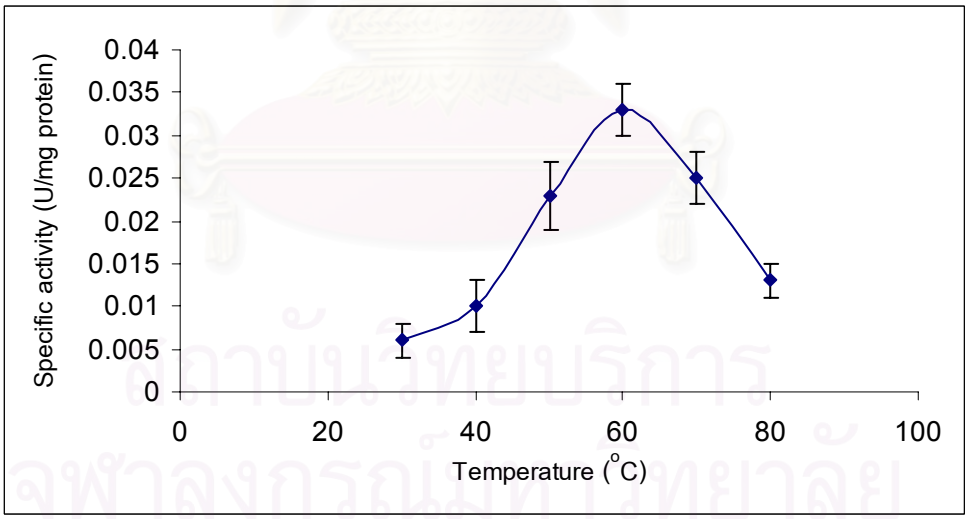
นำเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรามาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม โดยทำการบ่มวัดแอคติวิตีเป็นเวลา 30 นาที ที่ภาวะความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 แต่มีการแปรผันอุณหภูมิต่างๆ คือ 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ พบว่าเอนไซม์อย่างหยาบทั้ง 3 กลุ่มทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.8 4.9 และ 4.10)



รูปที่ 4.8 แอคติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาที่ค่า pH เท่ากับ 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2



รูปที่ 4.9 แอคติวิตีจำเพาะของเอนโดกลูคาเนส เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาที่ค่า pH เท่ากับ 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2



รูปที่ 4.10 แอคติวิตีจำเพาะของบีตา-กลูโคซิเดส เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาที่ค่า pH เท่ากับ 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2

4.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

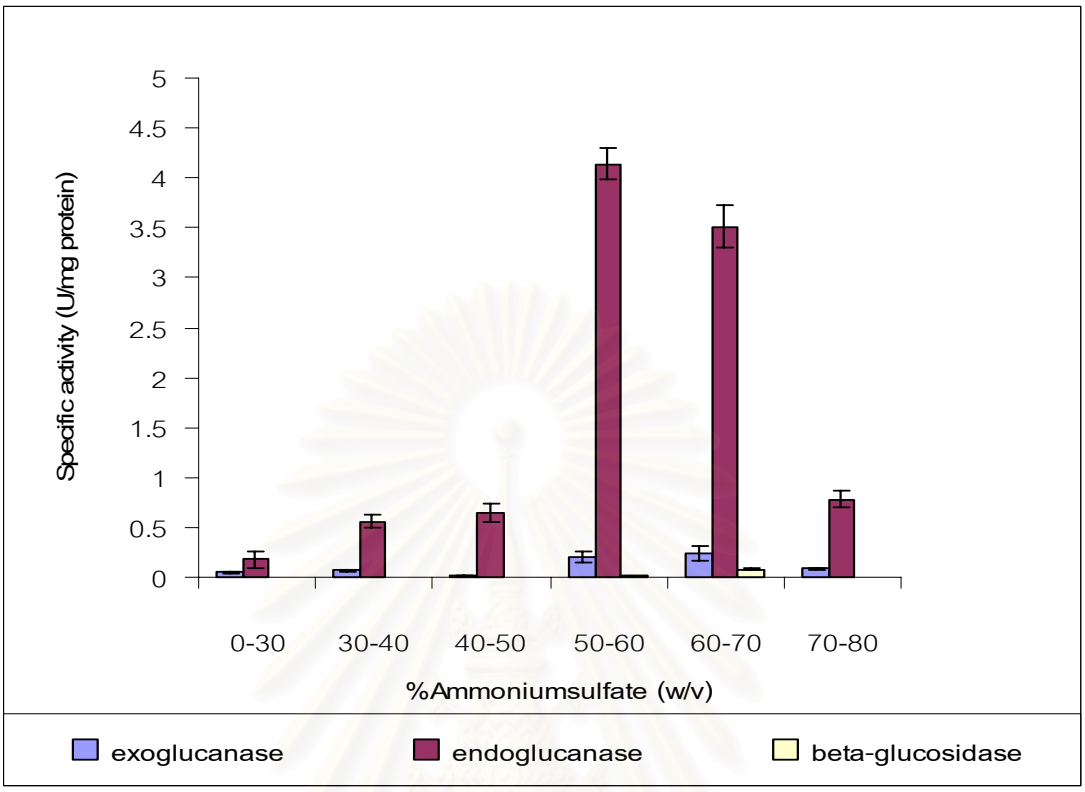
ทำการผลิตเซลลูเลสจาก จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2 โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร Production ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 15 วัน นำมาปั่นเหวี่ยง แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างหยาบ พบว่ามีปริมาตรรวมของเอนไซม์อย่างหยาบ 1,140 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนรวม 1914.63 มิลลิกรัม แอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนสรวม 265.62 หน่วย เอนโดกลูคาเนส 1573.77 หน่วย และบีตา-กลูโคซิเดส 58.14 หน่วย โดยมีแอคติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส 0.139 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนโดกลูคาเนส 0.882 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และบีตา-กลูโคซิเดส 0.015 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

4.5.1 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยเครื่องอัลตราฟิลเทรชัน (Utrafiltration)

นำเอนไซม์ที่ผลิตได้ข้างต้น มากรองผ่านด้วยเครื่องอัลตราฟิลเทรชัน Viva Flow 250 ที่มี membrane cut off 10,000 Da ภายใต้ความดันของแก๊สไนโตรเจน 3 บาร์ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีปริมาณโปรตีนรวม 966.555 มิลลิกรัม เอกโซกลูคาเนสรวม 170.77 หน่วย เอนโดกลูคาเนส 896.05 หน่วย และบีตา-กลูโคซิเดส 20.92 หน่วย โดยมีแอคติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส 0.151 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนโดกลูคาเนส 0.927 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และบีตา-กลูโคซิเดส 0.021 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อคิดเป็นผลผลิตของเอนโดกลูคาเนส 69.05 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.05 เท่า (ตารางที่ 4.2)

4.5.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation)

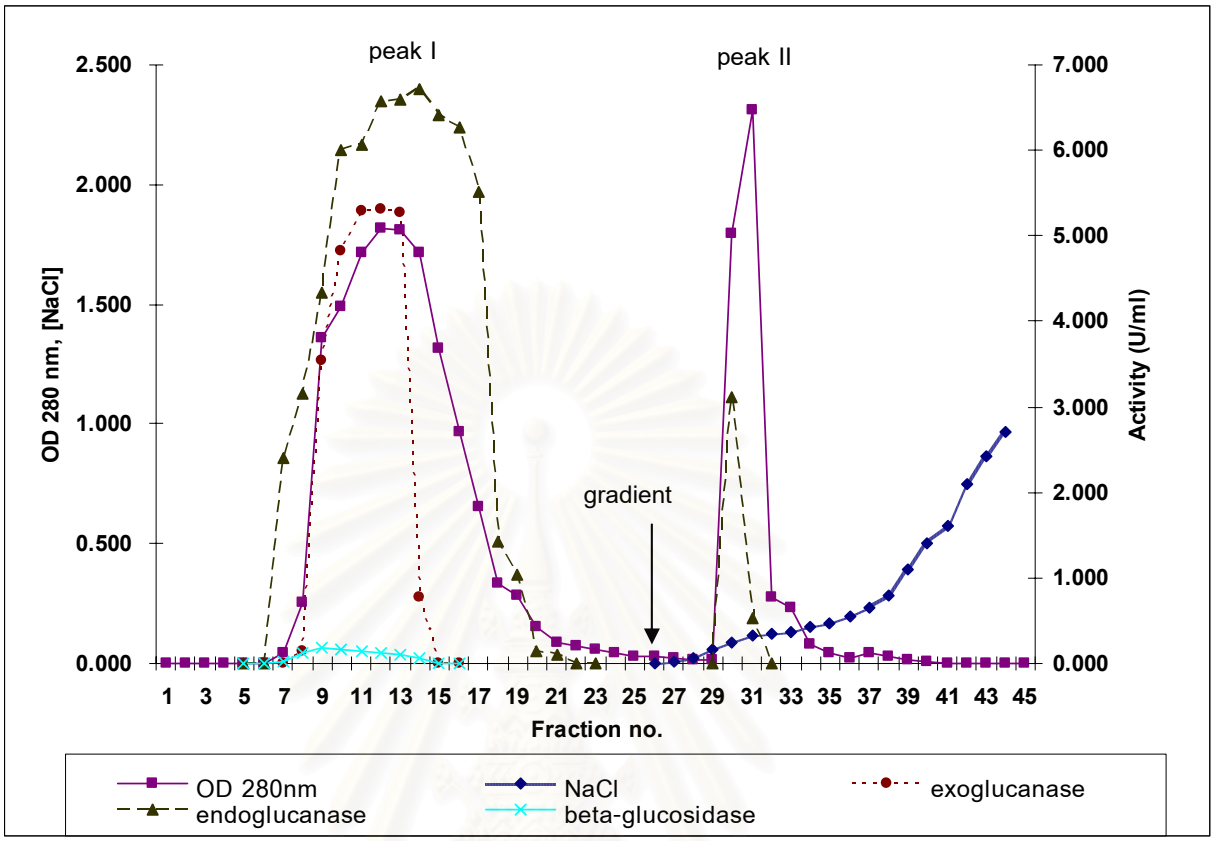
นำเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องอัลตราฟิลเทรชัน มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วน คือ 0-30 30-40 40-50 50-60 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำแต่ละลำดับส่วนไปละลายในอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 จากนั้นนำไปไดอะไลซิสข้ามคืน แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส พบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดสของ จากเชื้อ *Acrophialophora* sp. UV10-2 อยู่มาก ในโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 50-60 และ 60-70 (รูปที่ 4.11) ซึ่งเมื่อรวมทั้ง 2 ลำดับส่วนจะมีผลผลิตของเอนโดกลูคาเนส 21.25 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.98 เท่า



รูปที่ 4.11 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.5.3 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยแอนไอออน-เอกซ์เชน โครมาโทกราฟี

นำโปรตีนได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 50-70เปอร์เซ็นต์ มาผ่านคอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) ชะโปรตีนด้วยสารละลาย 0.02 โมลาร์ Piperazine-HCl pH 5.0 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค (รูปที่ 4.12) ซึ่งพีค I จะไม่จับคอลัมน์ จึงถูกชะออกมาก่อน (หลอดที่ 8-18) และเมื่อเปลี่ยนมาชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ 0-1.0 โมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.12 โมลาร์ มีโปรตีนพีคที่สองออกมา คือ พีค II (หลอดที่ 30-32) และตรวจสอบแอคติวิตีพบว่า พีค I มีแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส (0.138 U/ml) เอนโดกลูคาเนส (4.628 U/ml) และบีตา-กลูโคซิเดส (0.026 U/ml) ส่วนพีค II มีแอคติวิตีเอนโดกลูคาเนสเพียงอย่างเดียว (0.334 U/ml) โดยพีค I ให้ผลผลิตเอนไซม์ 17.64 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ 3.88 เท่า และพีค II ให้ผลผลิตของเอนโดกลูคาเนส 0.21 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ 0.25 เท่า (ตารางที่ 4.2)



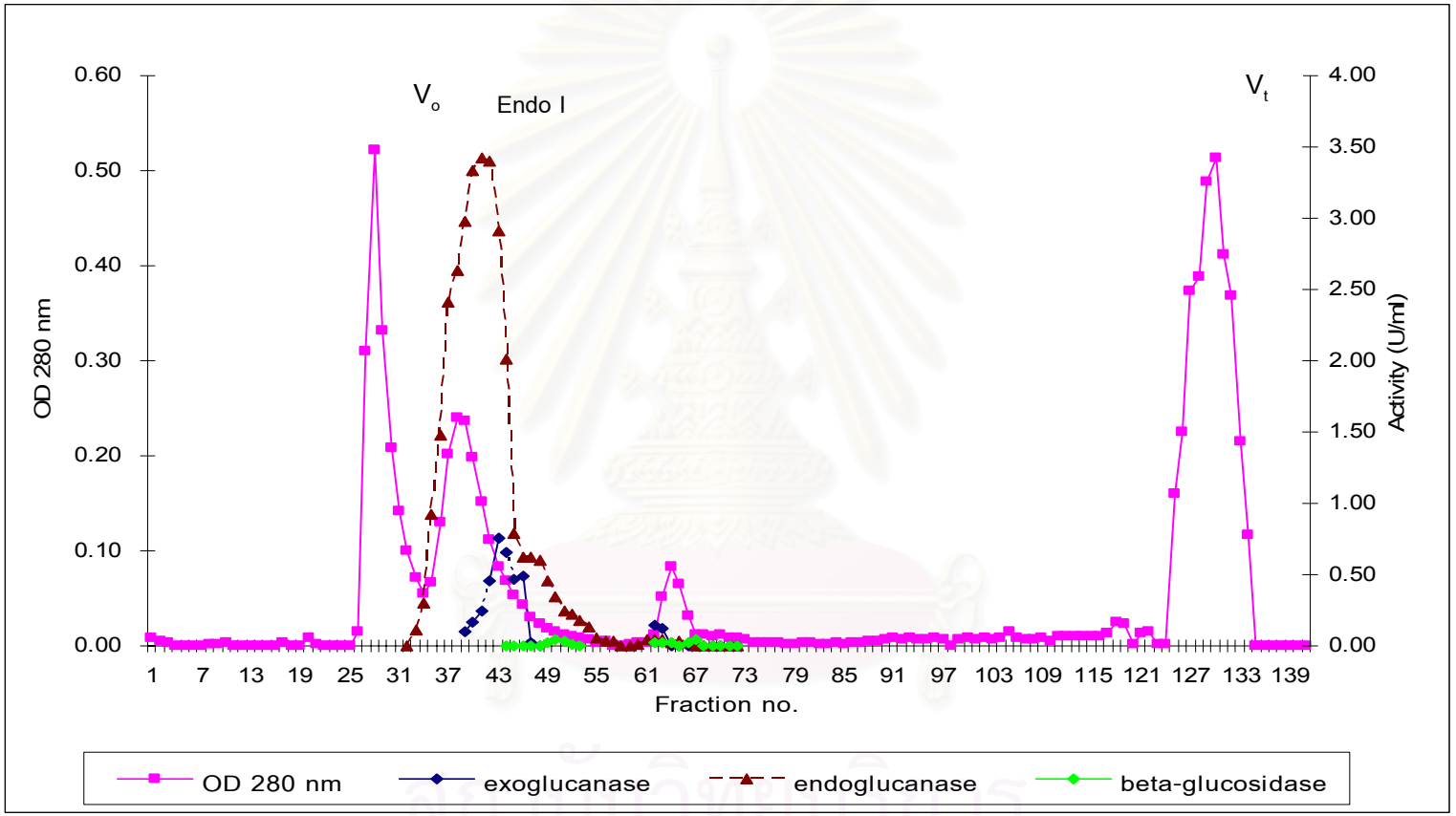
รูปที่ 4.12 ผลการแยกและทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow ชะด้วยบัฟเฟอร์ piperazine-HCl 0.05 โมลาร์ pH 5.0 แล้วตามด้วย linear salt gradient ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-1.0 โมลาร์ อัตราการไหล 60 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มิลลิลิตร

4.5.4 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยเจล-ฟิลเทรชั่น โครมาโทกราฟี

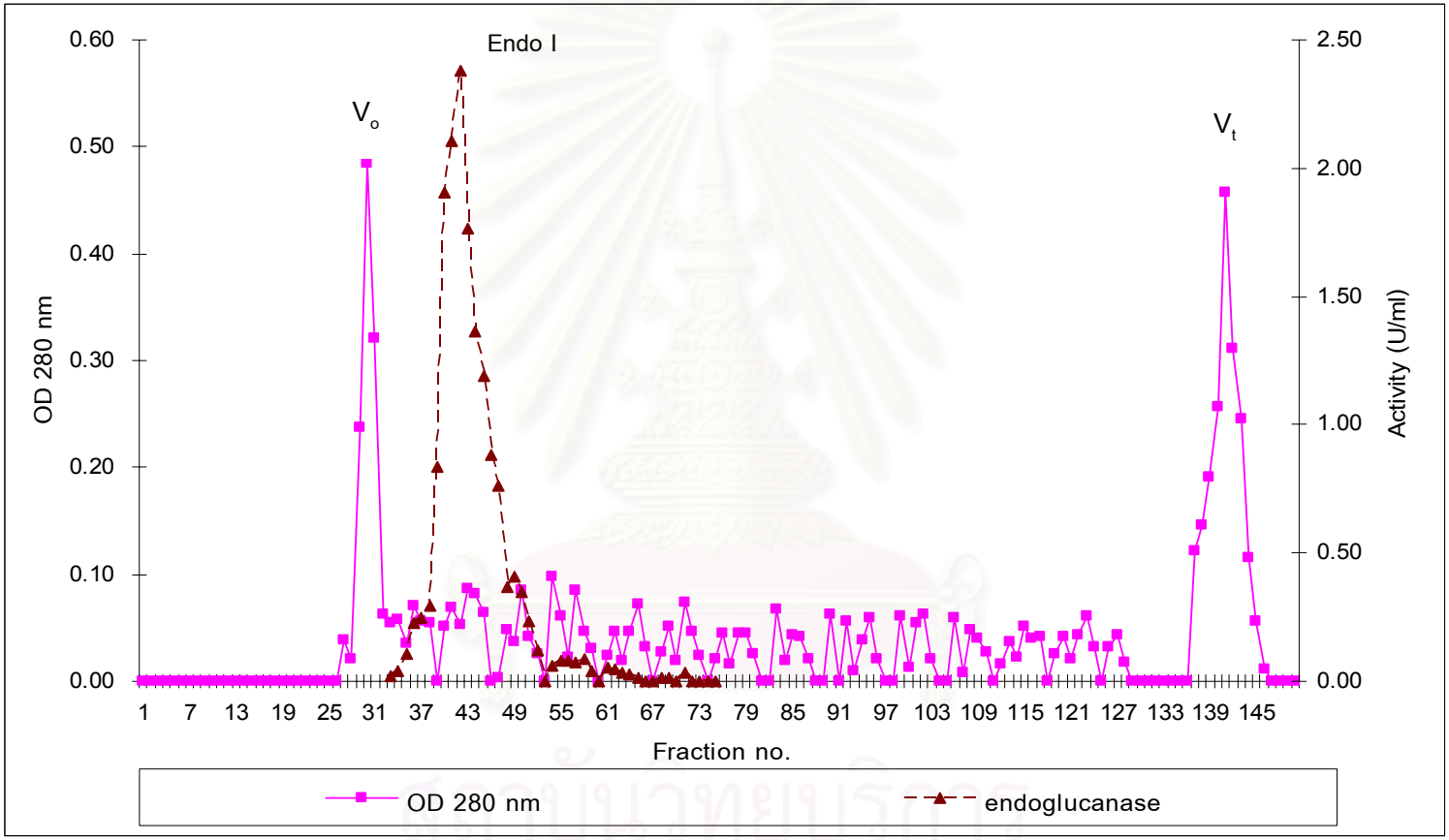
นำโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ไอออน-เอกซ์เชนโครมาโทกราฟี พีค I มาผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR โดยชะด้วยสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 (รูปที่ 4.9) พบว่าสามารถแยกโปรตีนอื่นออกจากเอนไซม์ได้ โดยปรากฏโปรตีน 1 พีคใหญ่ (หลอดที่ 35-45) และพีคเล็ก 1 พีค (หลอดที่ 62-67) โดยโปรตีนจะเริ่มออกในหลอดที่ 35 เมื่อติดตามแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสพบว่ามีปริมาณสูง (3.3942 U/ml) ส่วนเอกโซกลูคาเนสที่ได้มีปริมาณน้อย (0.051 U/ml) และพบบีตา-กลูโคซิเดสน้อยมาก (0.001 U/ml) เรียกพีคนี้ว่า Endo I ส่วนพีคหลังไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด เอนไซม์ให้ผลผลิต 6.47 เปอร์เซ็นต์ และทำให้เอนโดกลูคาเนสนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 13.93 เท่า (ตารางที่ 4.2)

ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไอออน-เอกเซนโครมาโทกราฟี พีค II ได้นำมาผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR ชะด้วยสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 เช่นกัน จากรูปที่ 4.10 พบว่าสามารถแยกโปรตีนอื่นออกจากเอนไซม์ โดยปรากฏโปรตีนหลายพีค ซึ่งโปรตีนที่อ่านได้มีค่าน้อย และเมื่อติดตามเอนไซม์ด้วยการวัดแอคติวิตีทั้ง 3 กลุ่ม จะพบเอนโดกลูคาเนสเพียงชนิดเดียว (0.355 U/ml) ในโปรตีนพีคที่ II เรียกพีคนี้ว่า Endo II แอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสที่ได้นั้นมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับพีค Endo II เอนไซม์ให้ผลผลิต 0.74 เปอร์เซ็นต์ และเอนโดกลูคาเนสนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 13.41 เท่า (ตารางที่ 4.2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 ผลการแยกและทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นของ พีค I ด้วยคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR (ขนาด 2.6 × 40 เซนติเมตร) ชะด้วยโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 อัตราการไหล 12 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.14 ผลการแยกและทำให้เซลลูเลสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นของพีค II ด้วยคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR (ขนาด 2.6 × 40 เซนติเมตร) ชะด้วยโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.0 อัตราการไหล 12 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มิลลิลิตร

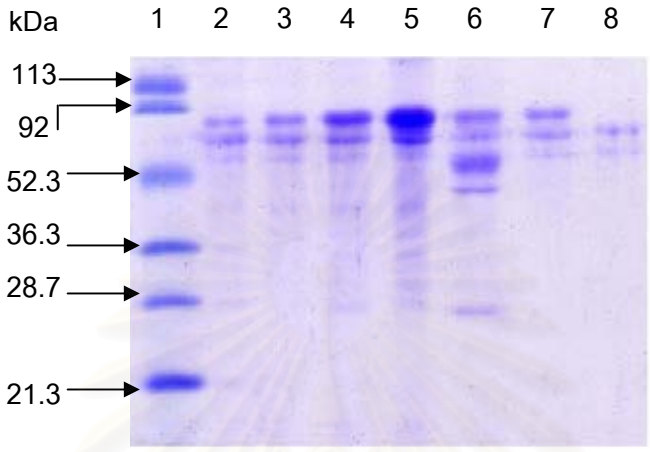
ตารางที่ 4.2 ผลการเตรียมเอนโดกลูคาเนสจาก *Acrophialophora* sp. UV 10-2 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม/โปรตีน)	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์แอคติวิตี (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
1.เอนไซม์อย่างหยาบ	1914.63	1573.77	0.882	100	1
2.เอนไซม์เข้มข้น	966.74	896.05	0.927	69.05	1.05
3.ตกตะกอนด้วย 50-70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต	126.92	334.35	2.634	21.25	2.98
4.DEAE Saphorase					
peak I	81.23	277.68	3.418	17.64	3.87
peak II	5.41	3.34	0.217	0.21	0.24
5.Sephacryl-S-200 H					
Endo I	8.98	101.83	11.33	6.47	13.93
Endo II	0.99	11.72	11.83	0.74	13.41

4.5.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเอสดีเอส-พอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

นำสารละลายโปรตีนส่วนต่างๆ ที่เตรียมได้คือ โปรตีนอย่างหยาบ โปรตีนที่ทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเทรชัน โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 50-70 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Sepharose พีค I และ II โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR พีค Endo I และ Endo II มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ (วิธีข้อ 3.7.5) โดยที่แต่ละแถวมีปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม จากผลการทดลอง พบว่า แต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.11 แถวที่ 3-8) สามารถลดโปรตีนที่เจือปนออกไปได้มาก ส่วนโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR พีค Endo I และ Endo II (แถวที่ 6-7) พบว่า Endo I มีโปรตีนชัดเจน 3 แถบ โดยชัดเจน 2 แถบ และจาง 1 แถบ ส่วน Endo II พบว่ามีโปรตีน 2 แถบ จะ

เห็นชัด 1 แถบส่วนอีก 1 แถบจาง แสดงให้เห็นว่าการทดลองนี้สามารถทำให้เอนโดกลูคาเนสบริสุทธิ์บางส่วน

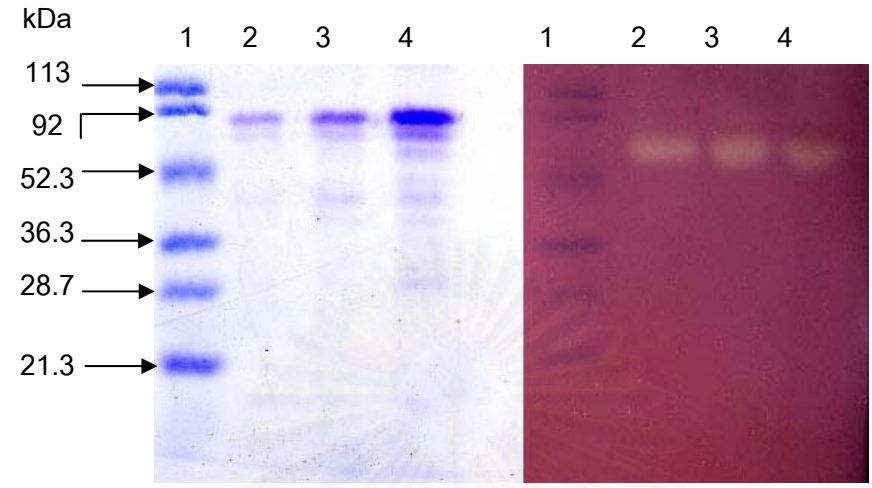


รูปที่ 4.15 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์เอนโดกลูคาเนสด้วย SDS-PAGE

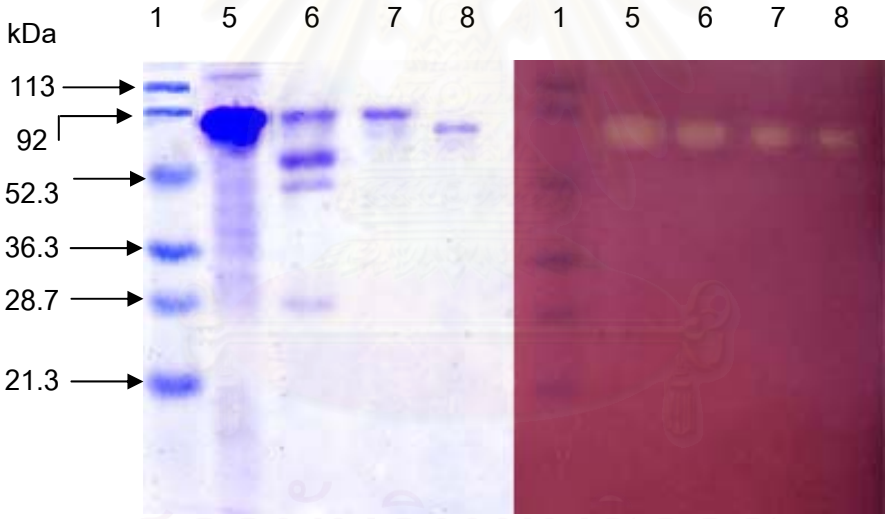
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 โปรตีนอย่างหยาบ
แถวที่ 3 โปรตีนที่เข้มข้นจากการทำอัลตราฟิลเทรชัน
แถวที่ 4 โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50-70 %
แถวที่ 5 โปรตีนที่ผ่าน DEAE Sepharose พีค I
แถวที่ 6 โปรตีนที่ผ่าน DEAE Sepharose พีค II
แถวที่ 7 โปรตีนที่ผ่าน Sephacryl-S-200 HR พีค Endo I
แถวที่ 8 โปรตีนที่ผ่าน Sephacryl-S-200 HR พีค Endo II

4.5.6 การตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสในแผ่นเอสดีเอสพอลิอะคริลาไมด์เจล

เมื่อย้อมเจลที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบ ด้วยสารละลาย Congo red 0.01 เปอร์เซ็นต์เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจล โดยในแต่ละแถวมีปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม จากการทดลองพบว่า โปรตีนอย่างหยาบปรากฏแถบแอคติวิตีชัดเจน 1 แถบใหญ่ซึ่งให้ลักษณะใสบนพื้นเจลสีแดง ส่วนโปรตีนที่เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเทรชัน โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Sepharose ทั้ง 2 พีค และโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR พีค Endo I และ Endo II ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมดโดยปรากฏแถบแอคติวิตีชัดเจน 1 แถบเช่นกัน แต่ขนาดความกว้างของแถบจะแตกต่างกัน โดยที่ Endo I จะอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่า Endo II เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.16) ซึ่งสังเกตความแตกต่างจากรูปเจลได้ไม่ชัดเจนมากนัก



ก. ข.



ก. ข.

รูปที่ 4.16 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์เอนโดกลูคาเนสด้วย SDS-PAGE (ก) และ Activity stain (ข)

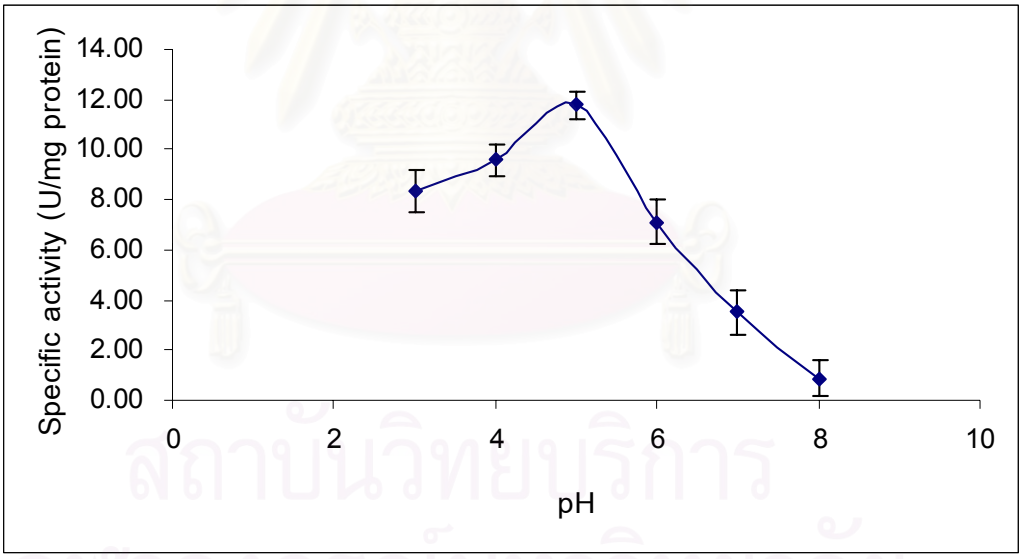
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 โปรตีนอย่างหยาบ
แถวที่ 3 โปรตีนที่เข้มข้นจากการทำอัลตราฟิลเทรชัน
แถวที่ 4 โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50-70 เปอร์เซ็นต์
แถวที่ 5 โปรตีนที่ผ่าน DEAE Sepharose พีค I
แถวที่ 6 โปรตีนที่ผ่าน DEAE Sepharose พีค II
แถวที่ 7 โปรตีนที่ผ่าน Sephacryl-S-200 HR พีค Endo I
แถวที่ 8 โปรตีนที่ผ่าน Sephacryl-S-200 HR พีค Endo II

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

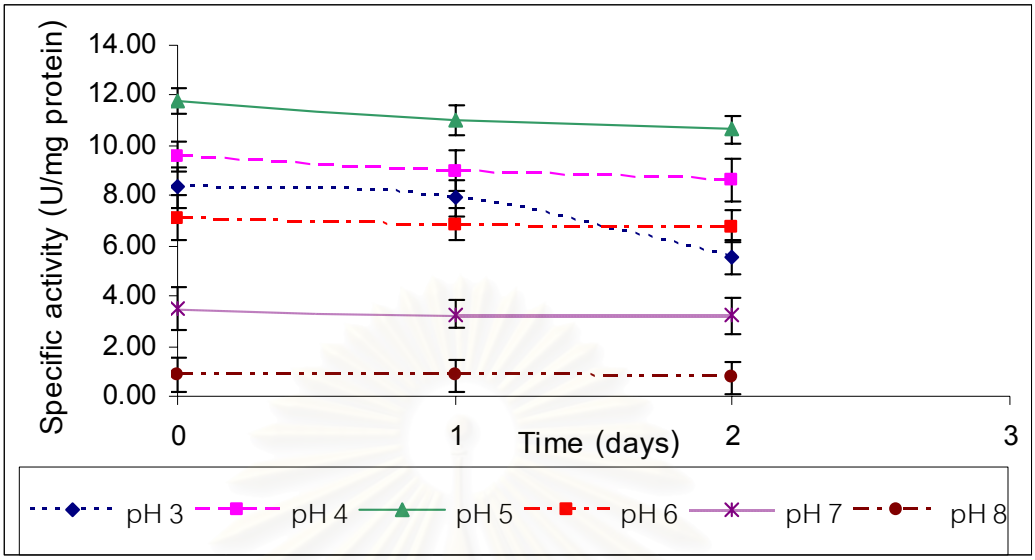
4.6 การศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลสที่บริสุทธิ์บางส่วน

4.6.1 การศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส

ในการทดลองนี้ได้เลือกเอนไซม์ Endo I ซึ่งมีแอคติวิตีดีที่สุดมาศึกษาผลของ pH ต่างๆ กัน คือ 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน และความเสถียรของเซลลูเลสที่บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า เอนโดกลูคาเนส ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกรดอ่อน และทำงานได้ดีที่สุด pH 5 ส่วน pH ที่เป็นด่างจะทำงานได้ไม่ดีโดยแอคติวิตีจะลดลงอย่างมาก (รูปที่ 4.17) การทดลองหาความเสถียรต่อ pH เมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าวันที่ 1 และ 2 แอคติวิตีจำเพาะของ Endo I ในช่วง pH 4.0-8.0 มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น ส่วนที่ pH 3.0 แอคติวิตีจำเพาะในวันที่ 1 และ 2 มีค่าลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นเ (รูปที่ 4.18) จะเห็นได้ว่า Endo I จะมีความเสถียรมากในช่วง pH 4.0-8.0 ส่วน pH 3.0 ความเสถียรจะน้อย



รูปที่ 4.17 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของ Endo I ที่ pH ในช่วงค่า pH 3.0 ถึง 8.0

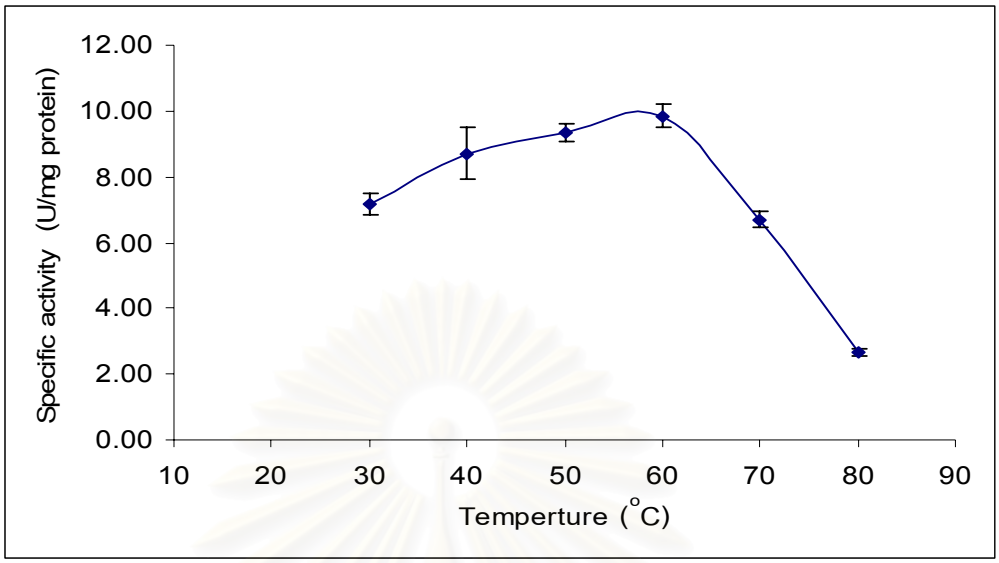


รูปที่ 4.18 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และความเสถียรของ Endo I ในช่วง pH 3.0 ถึง 8.0 เมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 และ 2 วัน

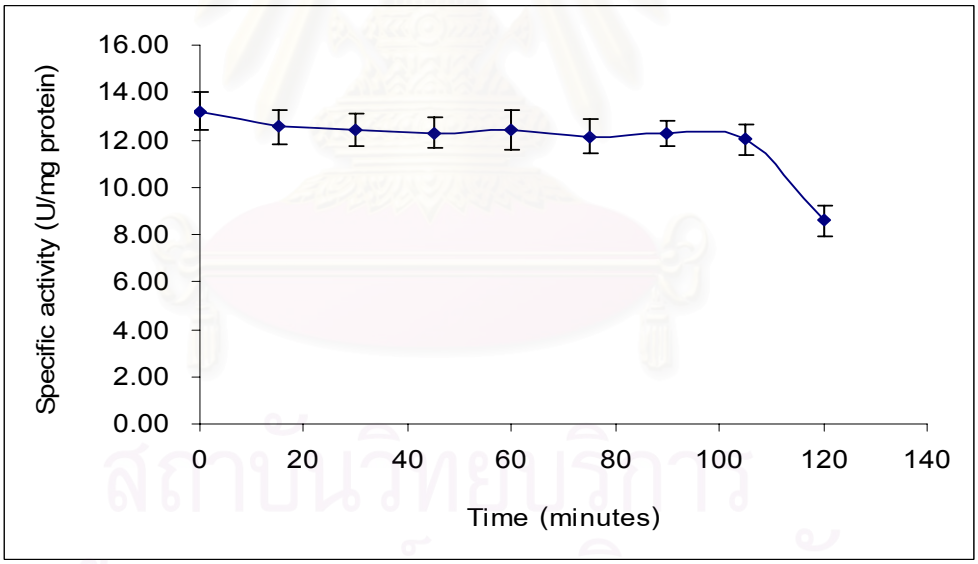
4.6.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลส

นำ Endo I มาศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิสูงขึ้นแอคติวิตีจำเพาะก็จะลดลงเป็นอย่างมาก (รูปที่ 4.19) และเมื่อหาภาวะความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าแอคติวิตีจำเพาะตั้งแต่เวลา 0-105 นาที มีค่าไม่แตกต่างจากแอคติวิตีเริ่มต้นมากนัก แสดงว่าเอนไซม์มีความเสถียรเป็นเวลา 105 นาที หลังจากนั้นเอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะเริ่มต้น (รูปที่ 4.20)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาที่ค่า pH 5.0 และมีการแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.20 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และความเสถียรของ Endo I ที่ pH 5.0 เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 15 30 45 60 75 90 105 120 นาที

4.6.5 การศึกษาหาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรตบางชนิด

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาหาความจำเพาะต่อซับสเตรตที่เป็นเซลลูโลส อนุพันธ์เซลลูโลส และไซแลน พบว่า Endo I มีความจำเพาะต่อ CMC ได้ดีที่สุดเนื่องจากย่อยสลายมากที่สุด รองลงมาคือ ไซแลน กระดาษกรอง ส่วน Avicel และแอลฟา-เซลลูโลส ย่อยสลายได้เพียง

เล็กน้อย ในขณะที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลโลไบโอส D(-)salicin และ 4-Nitrophenyl-β-D-gaclactopyanoside (p-NPG) (ตารางที่ 4.3)

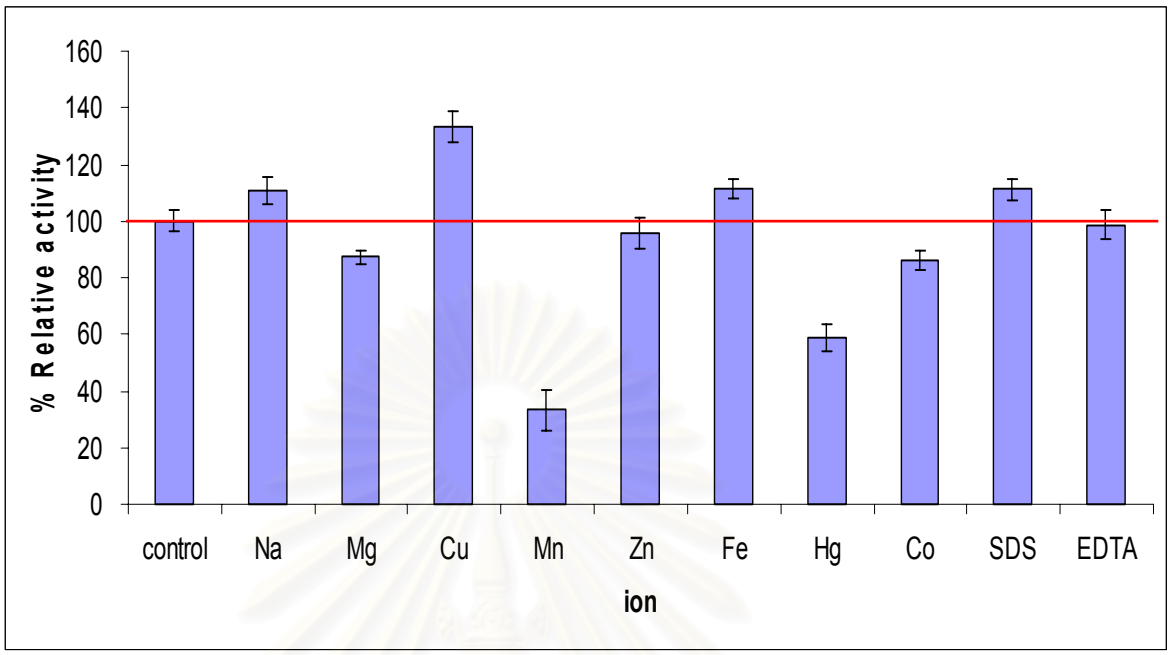
ตารางที่ 4.3 แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของ Endo I ต่อซับสเตรตต่างๆ เมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH 5.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ซับสเตรต	แอคติวิตีจำเพาะ(ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
Avicel	0.01
α-Cellulose	0.06
filter paper	0.17
CMC	11.36
Cellobiose	0
Salicin	0
pNPG	0
Xylan	1.29

4.6.6 การศึกษาผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR พบว่า Mn^{2+}มีผลยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ Hg^{2+} ส่วนไอออน Cu^{2+} กระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ ส่วน Na^{2+} Mg^{2+} Zn^{2+} Fe^{3+} Co^{2+}SDS และ EDTA ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (รูปที่ 4.21)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

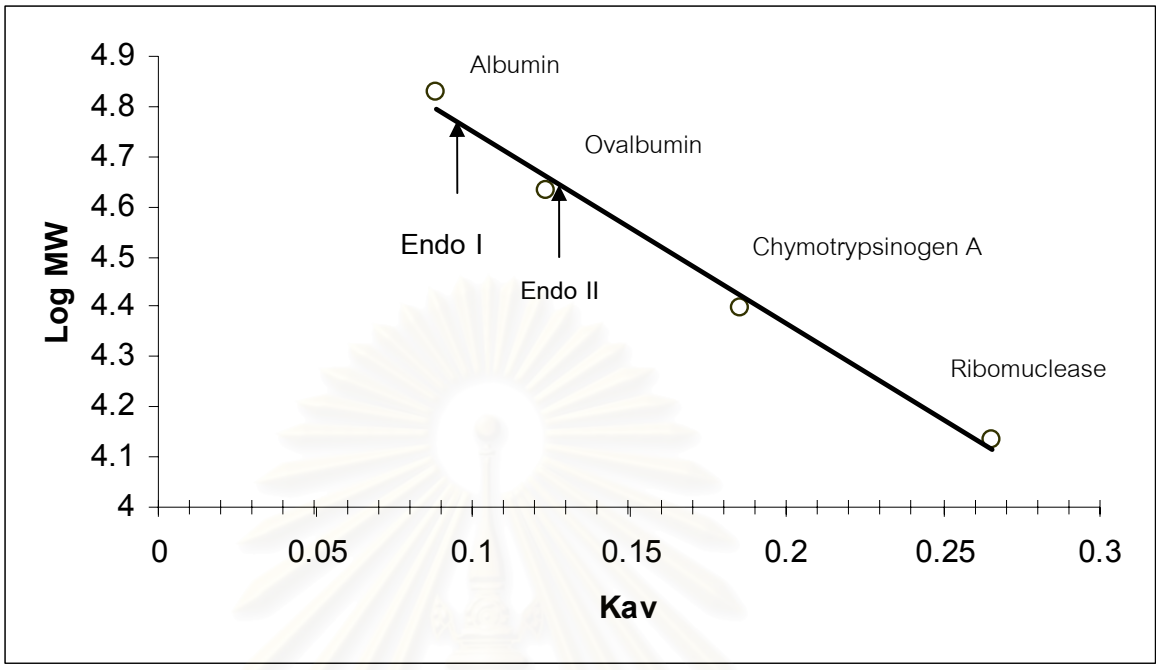


รูปที่ 4.21 แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) ผลของไอออนและสารเคมีที่มีการต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH 5.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.6.7 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลส

4.6.7.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสโดยการทำเจลฟิลเทรชั่น

เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานต่างๆ ได้แก่ Albumin น้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดาลตัน Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน Chymotrypsinogen A น้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน Ribomuclease น้ำหนักโมเลกุล 13.7 กิโลดาลตัน ในภาวะเดียวกับการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์นำค่าที่ได้นำมาคำนวณหา K_{av} แล้วสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปที่ 4.22 แล้วทำการเปรียบเทียบค่า K_{av} ของเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ โดย Endo I มีค่า K_{av} = 0.0926 และ Endo II มีค่า K_{av} = 0.13 จากกราฟมาตรฐานพบว่า Endo I มีน้ำหนักโมเลกุลของเอนโดกลูคาเนสอยู่ในช่วง 60 กิโลดาลตัน Endo II มีน้ำหนักโมเลกุลของเอนโดกลูคาเนสอยู่ในช่วง 43 กิโลดาลตัน

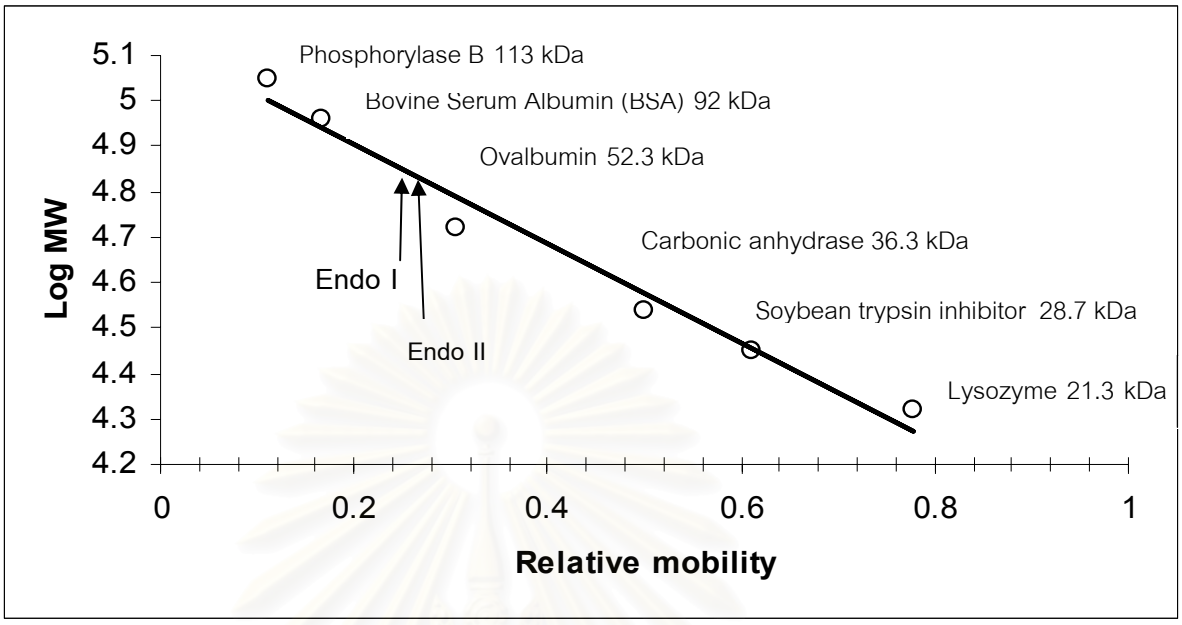


รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ระหว่าง Kav และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp.UV 10-2 โดยคอลัมน์ขนาด 2.6×40 เซนติเมตร

4.6.7.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสโดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4.15 พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ยังมีแถบโปรตีนหลายแถบในเอนไซม์ จึงนำเอนไซม์มาติดตามแอคติวิตีใน SDS-PAGE ที่มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตรวจสอบแอคติวิตีด้วยการย้อม Congo red 0.01 เปอร์เซ็นต์ พบแถบแอคติวิตี 2 แถบ จากเอนไซม์ 2 ชนิด สรุปได้ว่าแถบแอคติวิตี มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 และ 60 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสโดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอีเล็กโทรโฟรีซีส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะของสายเซลลูโลส ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ให้ผลผลิตเป็นกลูโคสและสายโอลิโกแซ็คคาไรด์สายสั้นๆ เซลลูเลสถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร สิ่งทอ อาหารสัตว์ เยื่อและกระดาษ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้มีหลายประเภท ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอกติโนมัยซีส โดยเฉพาะ เชื้อรามีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำเชื้อราที่แยกได้จาก บริเวณที่มีการปลูกป่านศรนารายณ์ (Punnapayak, Kuhirun และ Tanonkeo, 1999) ซึ่งได้ปรับปรุงสายพันธุ์ (พิสุทธิ์ พวงนาค , 2542) มาเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูเลส เพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม

นำเชื้อรา *Acrophialophora* sp. ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่อยู่ในคลาส Deuteromycetes มาศึกษาหาสายพันธุ์ที่ถูกต้องโดยดูลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA และลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อรา *Acrophialophora nainiana* เนื่องจากเชื้อรา *Acrophialophora* sp. มี 3 สายพันธุ์ คือ *Acrophialophora levis Acrophialophora fusispora* และ *Acrophialophora nainiana* (Samson และ Mahmood, 1970) โดยที่เชื้อรา *Acrophialophora* sp. ที่นำมาศึกษานี้มีลักษณะการเจริญเติบโตปานกลาง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อน เมื่อเจริญนานขึ้นจะมีสีดำบริเวณขอบเส้นใย ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น มีการสร้างก้านชูสปอร์ (conidiophores) ซึ่งมีสปอร์ (conidia) หลายๆ อันเชื่อมติดกันคล้ายลูกปัด รูปร่างแบบไข่ มีปลายเรียวทั้ง 2 ด้าน ไม่มีสี ผนัง conidia ค่อนข้างหนา เรียบแต่อาจขรุขระและเป็นรูปเกลียวเล็กน้อย (Barnette, 1967 และ Edward, 1959) จึงสรุปได้ว่าเชื้อราชนิดนี้อาจเป็น *Acrophialophora nainiana* ซึ่งลักษณะนี้ต่างจาก *Acrophialophora fusispora* คือ เชื้อราชนิดนี้มี conidia สีน้ำตาล และผนังของ conidia จะนูนขึ้นมามีลักษณะเป็นรูปเกลียว ในขณะที่ *Acrophialophora levis* ผนัง conidia จะไม่เป็นรูปเกลียว และ conidia มักเจริญอัดอยู่ที่ปลายยอดของเส้นใย (apical region) (Samson และ Mahmood, 1970) และเมื่อศึกษาถึงความสามารถในการใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาสามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเจริญเติบโตได้ (Punnapayak *et al*., 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sandhu และ Arora

(1981); Sandhu และ Arora (1985) ที่พบว่า *Acrophialophora nainiana* สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ *Acrophialophora fusispora* ไม่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในขณะที่ *Acrophialophora levis* ไม่พบรายงานถึงความสามารถในการใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และยังพบว่าเชื้อราชนิดนี้มีสามารถผลิตไซแลนเนสในอาหารสูตร Production ได้ (ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ, 2546 และ สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา, 2546) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Ximenes และคณะ (1999); Salles และคณะ (2000); Cardoso และ Filho (2003) ที่พบว่า *A. nainiana* สามารถผลิตไซแลนเนสได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาเป็นสายพันธุ์ *Acrophialophora nainiana* แต่การตรวจสอบข้างต้นเป็นการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและการใช้แหล่งคาร์บอนเท่านั้น ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนได้จึงต้องมีการตรวจสอบในระดับของจีโนมต่อไป เช่น ITS sequencing เป็นต้น

การศึกษาการเจริญในอาหารสูตร Production ที่มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *Acrophialophora* sp. UV 10-2 ให้ผลการเจริญของเชื้อราและการผลิตเซลลูเลสคล้ายกันทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยพบว่าค่าแอคติวิตีเอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนส มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น มีค่าสูงสุดในวันที่ 15 (เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน) ส่วนแอคติวิตีของบีตา-กลูโคซิเดส มีแนวโน้มลดลง ซึ่งเอนโดกลูคาเนสมีแอคติวิตีสูงที่สุด โดย *Acrophialophora* sp. UV 10-2 ให้ผลผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมากกว่า *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ พิสุทธิ์ พวงนาค (2542) และ สุภาภรณ์ โสภณพัฒนโภคา (2546) การศึกษาการเติบโตของเชื้อราในงานวิจัยนี้ วัดจากปริมาณกลูโคซามีนซึ่งเป็นองค์ประกอบย่อยของไคตินที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา เนื่องจากอาหารสูตร Production ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรามีองค์ประกอบเป็นแอลฟาเซลลูโลสทำให้ไม่สามารถใช้การชั่งน้ำหนักเซลล์ได้ ทำให้การวัดปริมาณกลูโคซามีนจึงเหมาะสมกว่า จากการศึกษาพบว่าการเติบโตของเชื้อราในช่วงแรกมีการผลิตเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่มในปริมาณที่น้อย และเพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อรามีการเจริญมากขึ้น ซึ่งเชื้อรามีการเจริญสูงสุดในวันที่ 13 หลังจากนั้นการเจริญจะลดลง สำหรับ *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม ส่วน *Acrophialophora* sp. UV 10-2 มีการเจริญสูงสุดวันที่ 11 หลังจากนั้นการเจริญจะลดลง แต่เอนไซม์ยังคงมีการผลิตต่อไป แสดงให้เห็นว่าเซลลูเลสเป็น primary metabolite ซึ่งรูปแบบการเจริญและการผลิตเซลลูเลสนี้คล้ายกับ *T. reesei* Rut C-30 ในอาหารที่มี Avicel และข้าวสาลี (Xiao-Bin, Yun และ Koo, 1998) สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไปจึงได้เลือกใช้ *Acrophialophora* sp. UV 10-2 เพราะให้ผลผลิตเอนไซม์ที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

การผลิตเซลลูเลสเพื่อเตรียมทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ได้ทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเอนไซม์หลังจากที่เลี้ยงเชื้อได้ 15 วัน เพื่อให้ได้เซลลูเลสสูงและมีปริมาณที่มากเพียงพอที่จะทำให้บริสุทธิ์ต่อไป เมื่อเตรียมเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยการกรองผ่านอัลตราฟิลเทรชัน ซึ่งเลือกใช้เมมเบรนที่เป็น polycarbonate มี MW cut off เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลส ประมาณ 30-110 กิโลดาลตัน (Nevelaine และ Penttla, 1996) จาการทดลองทำให้เอนไซม์เข้มข้นประมาณ 2 เท่า ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.05 เท่า ผลผลิตเอนไซม์ 69.05 เปอร์เซ็นต์ แอคติวิตีมีการสูญเสียอาจเนื่องมาจากการกรองด้วยอัลตราฟิลเทรชันอาจมีเอนไซม์เล็ดลอดไปได้ เพราะมีการใช้แก๊สไนโตรเจนในอัลตราฟิลเทรชันอาจเกิดออกซิไดซ์กับหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ ซึ่งความบริสุทธิ์ที่ได้ไม่มากนักจึงต้องทำการทดลองในขั้นต่อไป

จากนั้นนำเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70 เปอร์เซ็นต์ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดและมีผลผลิตเอนไซม์ 21.25 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.98 เท่า ซึ่งจากการทดลองในขั้นนี้พบว่าผลผลิตเอนไซม์ลดลงอย่างมาก อาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์มีการสูญเสียแอคติวิตีไประหว่างการไดอะไลซิส หรือเอนไซม์อาจเสียสภาพจากการออกซิไดซ์บริเวณหมู่ไธออลของซิลดีอีน การปนเปื้อนของโลหะหนัก ซึ่งล้วนมีผลต่อการเสียสภาพโปรตีน (ชุลีพร จูงสาย, 2535) ผลการตกตะกอนเอนไซม์ที่ได้นี้ต่างจากการทดลองของ Jin และ Toda (1989) พบว่าเอนโดกลูคาเนสจาก *Clostridium thermocopriae* sp. nov.JT3-3 ตกตะกอนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 40 -60 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองของ George, Ahmad และ Rao (2001) พบว่าเอนโดกลูคาเนสจาก *Thermomonospora* sp. ตกตะกอนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 30-55 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน

การทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow ซึ่งเป็นแอนไอออน-เอกซ์เชน โครมาโทกราฟี มีความเป็นรูพรุนสูง หลักการแยกจะอาศัยความแตกต่างของประจุโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งสารตัวกลางที่ใช้แยกนี้มีประจุเป็นบวก เมื่อผ่านเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่ามีพีคโปรตีน 2 พีค โดยพีค I จะออกมาพร้อมกับสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการชะแสดงว่าโปรตีนพีคนี้ไม่นี้ไม่จับกับคอลัมน์ เมื่อวัดแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดสพบว่ามีเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จึงทำให้แยกเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดออกจากกันไม่ได้ ส่วนพีค II ถูกชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.12 โมลาร์ โปรตีนจะเริ่มออกมา นำ

สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะเมื่อนำไปตรวจสอบแอคติวิตีพบเอนโดกลูคาเนสเพียงชนิดเดียว ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Kim และคณะ (1994) ซึ่งใช้คอลัมน์ DEAE Bio-Gel พบว่าทั้งเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดสบางตัวจะไม่จับกับคอลัมน์แอนไอออน-เอกซ์เชน ทำให้ยากในการแยกเอนไซม์ทั้ง 3 จึงต้องใช้คอลัมน์อื่นช่วยในการแยกเอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น การที่ความบริสุทธิ์ของเอนโดกลูคาเนส พีค II มีค่า 0.24 เท่า เป็นเพราะว่ามีปริมาณเอนไซม์น้อย ในขณะที่มีปริมาณโปรตีนมากเมื่อคิดค่าความบริสุทธิ์ที่ได้จึงต่ำกว่าเอนไซม์อย่างหยาบ ซึ่งมีโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์อยู่มากจึงทำให้ความบริสุทธิ์ที่ได้ต่ำ และผลผลิตของเอนโดกลูคาเนส พีค II มีค่า 0.21 เปอร์เซ็นต์เป็นค่าที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีการเสียสภาพไปอย่างมาก อาจเนื่องจากเซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ การผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จึงมีผลทำให้โปรตีนบางตัวที่ช่วยในการส่งเสริมแอคติวิตีเอนไซม์อาจหายไป หรือเสียสภาพได้ เอนไซม์ที่ได้อาจมีแอคติวิตีลดลง เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (Takashima และคณะ, 1995)

จากนั้นนำเอนไซม์ทั้ง 2 พีค ไปผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟีซึ่งอาศัยหลักการแยกตามขนาดของโปรตีนด้วยตัวกลางที่มีรูพรุน (gel matrix) โปรตีนใดที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าก็จะออกมาก่อน ส่วนสารละลายโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนก็จะสามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนทำให้ใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์มากกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ โดยใช้ Sephacryl-S-200 HR ที่แยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5,000-250,000 ดาลตัน จากผลการทดลองสามารถแยกเซลลูเลส ออกจากโปรตีนอื่นๆ ได้ ทั้งในพีค I และ พีค II โดยพีค I พบเอนโดกลูคาเนสปริมาณมากที่สุด ส่วนเอกโซกลูคาเนสพบน้อย และบีตา-กลูโคซิเดสแทบจะไม่พบ การใช้คอลัมน์ HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow และคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR ไม่สามารแยกเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนสออกจากกันได้ ส่วนพีค II พบว่าสามารถแยกเอนโดกลูคาเนสออกจากโปรตีนชนิดอื่น อาจเป็นเพราะเอกโซกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดส มีปริมาณ แอคติวิตีน้อย (บีตา-กลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ชนิดผลิตภายในเซลล์ (intracellular enzyme) จึงหลั่งออกนอกเซลล์น้อย แอคติวิตีของบีตา-กลูโคซิเดสจึงมีน้อย) ซึ่งในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนอาจทำให้เอกโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดสสูญเสียแอคติวิตีไปได้ ทำให้พบแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนสน้อย และบีตา-กลูโคซิเดสน้อยมาก อาจเป็นไปได้ว่าบีตา-กลูโคซิเดสมีการสูญเสียแอคติวิตีไปเพราะ pH ที่เหมาะสมในการทำงานคือ 7.0 ในการทดลองนี้เลือกใช้บัฟเฟอร์ pH 5.0 ทำให้เอนไซม์สูญเสียการทำงาน ส่วนเอกโซกลูคาเนส Takashima และคณะ (1996) รายงานว่า โดยปกติเอนไซม์จากเชื้อรามีระบบที่ซับซ้อนมาก ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นั้นจะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีที่ลดลง ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพได้ง่าย

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสอย่างหยาบพบว่าเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส มี pH เหมาะสมคือ 5.0 ส่วนบีตา-กลูโคซิเดสมี pH เหมาะสม ที่ 7.0 ซึ่งหลังจากเอนไซม์ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนพบว่าเอนโดกลูคาเนสมี pH ที่เหมาะสม 5.0 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชันพบว่ามีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 4.0-8.0 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับหลายรายงาน เช่น Bledman และคณะ (1985) ได้ศึกษาเซลลูเลสจากเอนไซม์ทางการค้า Maxazyme CI พบว่าเอกโซกลูคาเนสทำงานได้ดีที่ pH 4.5-7.0 เอนโดกลูคาเนสทำงานได้ดีที่ pH 4.0-5.0 Okamoto และคณะ (2000) รายงานว่า บีตา-กลูโคซิเดส ทำงานได้ดีที่ pH 7.0 ในขณะที่ George, Ahmad และ Rao (2001) ได้ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส จากแอกติโนมัยซีส *Thernomonospora* sp. ที่ pH 5.0 และมีความเสถียรที่ pH 8 ส่วน Murashima และคณะ (2002) ระบุค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนโดกลูคาเนส จาก *Rhizopus oryzae* คือ 5.0-6.0

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างหยาบทั้ง 3 ชนิด ไม่ต่างจากเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยอุณหภูมิที่เหมาะสม 60 องศาเซลเซียส และเมื่อหาภาวะเสถียรของ 60 องศาเซลเซียส พบว่ามีความเสถียรเป็นเวลา 105 นาที ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ผลสอดคล้องรายงานวิจัย Bledman และคณะ (1985) ซึ่งได้ทำการศึกษาเซลลูเลสจากเอนไซม์ทางการค้า Maxazyme CI พบว่าเอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส Jin และ Toda (1989) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อ *Clostridium thermocopriae* sp. nov. JT3-3 ที่ 80 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และการทดลองของ George, Ahmad และ Rao (2001) พบว่าอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสเหมาะสมในการทำงานของเอนโดกลูคาเนสจากแอกติโนมัยซีส *Thermomonospora* sp.

เอนโดกลูคาเนสสามารถย่อยซับสเตรตได้หลายชนิด ซึ่งในการศึกษานี้ได้หาความจำเพาะต่อซับ สเตรตที่เป็นเซลลูโลส อนุพันธ์เซลลูโลส และไซแลน พบว่า Endo I มีความจำเพาะต่อ CMC ได้ดีที่สุดเนื่องจากย่อยสลายมากที่สุด รองลงมาคือ ไซแลน กระดาษกรอง Avicel แอลฟา-เซลลูโลส แต่ไม่สามารถย่อยสลายเซลโลไบโอส D (-) salicin และ p-NPG เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะกับพันธะ 1,4- β-glucosyl ของ CMC กระดาษกรอง Avicel แอลฟา-เซลลูโลส โดยที่กระดาษกรอง Avicel และแอลฟา-เซลลูโลส ไม่ละลายน้ำทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีนัก แต่ไซแลน (ประกอบด้วยพันธะ1, 4- β-xylopyranosidic) มีการย่อยสลายรองลงมา อาจเป็นได้ว่า ไซแลนนี้อาจไม่บริสุทธิ์ จึงทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตี หรืออาจเป็นได้ว่ามีเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR มีไซแลนเนสอยู่ในเอนไซม์

ด้วยเพราะมีรายงานว่า *Acrophialophora* sp.UV10-2 สามารถผลิตไซแลนเนส (common activity) ปริมาณต่ำร่วมกับการผลิตเซลลูเลส ในอาหารสูตร Production ที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ, 2546 และ สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา, 2546) ซึ่งเอนโดกลูคาเนสมีความจำเพาะต่อ CMC มากที่สุดสอดคล้องกับงานวิจัย Mizukoshi และคณะ (1977); Sanwal (1999); Ye และคณะ (2001); Murashima และคณะ (2002)

จากการศึกษาผลของไอออนและสารเคมีบางชนิด ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR พบว่า Mn^{2+} มีผลยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ Hg^{2+} ส่วนไอออน Na^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Co^{2+} Mg^{2+} Zn^{2+} EDTA และ SDS ไม่มีผลต่อแอคติวิตีเอนไซม์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jin และ Toda (1989) ได้ศึกษา เอนโดกลูคาเนสจาก *Clostridium thermocopriae* sp. nov. JT3-3 พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย Mn^{2+}และ Hg^{2+} นอกจากนี้ Yamanobe และ Mitsuishi (1990) ที่ศึกษาสักษณะสมบัติของเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์ Y-94 พบว่าถูกยับยั้งด้วย Mn^{2+}และ Hg^{2+} การที่เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย Mn^{2+}และ Hg^{2+} อาจเนื่องมาจากสารดังกล่าวทำหน้าที่ออกซิไดซ์หมู่บริเวณหมู่ไธออลของซิลดีอีนในเอนไซม์ ทำให้เสียสภาพได้ (Murashima และคณะ, 2002)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอีเล็กโทรโฟริซีส พบว่า แต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ สามารถลดโปรตีนที่เจือปนออกไปได้มากและไม่หมด ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl-S-200 HR พีค Endo I และ Endo II พบว่า Endo I มีโปรตีนชัดเจน 3 แถบ โดยชัดเจน 2 แถบ และจาง 1 แถบ ส่วน Endo II พบว่ามีโปรตีน 2 แถบ จะเห็นชัด 1 แถบ ส่วนอีก 1 แถบจาง ทำให้ไม่สามารถจะหาน้ำหนักของเอนไซม์ได้ จึงได้นำมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสในเจลโดยได้เติมซับสเตรตลงไปในเจลโดยตรงเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบแอคติวิตี แต่เนื่องจากวิธีเดิมใช้เติมซับสเตรตใน overlay gel ซึ่งอาจมีการสูญเสียโปรตีนบางส่วนจากการแพร่ ซึ่ง CMC เป็นอนุพันธุ์ของเซลลูโลสซึ่งละลายน้ำได้เป็นเนื้อเดียวกับเจล เป็นซับสเตรตที่เหมาะสมในการตรวจสอบแอคติวิตีเอนโดกลูคาเนส การย้อมด้วยสี congo red ซึ่งให้สีแดงกับเจลที่มี CMC แล้วล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ จะปรากฏแถบใสบนเจลพื้นสีแดง 1 แถบเท่านั้น แต่เมื่อทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นแถบนั้นก็จะกว้างขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าเอนโดกลูคาเนสมีหลายตัว จากการทดลองนี้สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบแอคติวิตี พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 และ 60 กิโลดาลตัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการคำนวณด้วยการทำเจลฟิลเทรชัน พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน และ 43 กิโลดาลตัน ทั้ง 2 วิธีให้ค่าที่แตกต่างกันอาจเนื่องจากการที่

เอนไซม์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ จึงทำให้มีหลายแถบขึ้นและการตรวจสอบแอคติวิตีที่ได้เป็นแถบที่ค่อนข้างกว้าง อาจจะมีโปรตีนที่น้ำหนักใกล้เคียงย่อยสลาย CMC ได้ น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จาก 2 วิธีจึงไม่เท่ากัน แต่ค่อนข้างจะใกล้เคียง ไม่แตกต่างกันมากนัก ผลที่ได้นี้อาจสรุปได้เบื้องต้นว่าจากขนาดของโปรตีนที่ได้แสดงว่าเอนไซม์ไม่มีซับยูนิต (subunit)

จากงานวิจัยนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมการฟอกผ้า อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ เป็นต้น เนื่องจากอุตสาหกรรมการเหล่านี้ต้องใช้สารเคมีในการทำงานที่สภาวะเป็นกรดและอุณหภูมิที่สูง ประมาณ 80-100 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า (Bhat, 2000) การใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดมลภาวะจากการใช้สารเคมี ซึ่งการนำเอนไซม์ไปใช้จึงมีความเหมาะสม เพราะเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้สามารถมีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้ลดพลังงานที่ใช้สารเคมี น้ำเสียจากการใช้เอนไซม์ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเตรต และสามารถใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ได้ (Li และ Hardin, 1997) การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์จึงเป็นทางเลือกใหม่ให้กับอุตสาหกรรมเพื่อลดปัญหามลภาวะได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เชื้อรา *Acrophialophora* sp. ที่ใช้ในงานวิจัยนี้น่าจะเป็นเชื้อรา *Acrophialophora nainiana* และสามารถผลิตเซลลูเลสในอาหารสูตร Production ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สูงสุดในวันที่ 15 โดย *Acrophialophora* sp. UV 10-2 ให้ผลิตเซลลูเลสมากกว่า *Acrophialophora* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม

2. เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Acrophialophora* sp. UV 10-2 เมื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยการกรองผ่านอัลตราฟิลเทรชัน การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การผ่านคอลัมน์ไอออน-เอกซ์เชน โครมาโทกราฟีและการผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชัน พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ออกจากโปรตีนชนิดอื่น แต่เอนไซม์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้ได้เอนโดกลูคาเนส 2 ตัว คือ Endo I และ Endo II มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.93 และ 13.41 เท่า ผลผลิตเอนไซม์ 6.47 และ 0.74 ตามลำดับ

3. เมื่อคำนวณแถบแอคติวิตีพบว่า Endo I มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตันและ Endo II มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน ส่วนเมื่อคำนวณด้วยการทำเจลฟิลเทรชันได้น้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน (Endo I) และ 43 กิโลดาลตัน (Endo I)

4. pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างหยาบของเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนสคือ 5.0 ส่วนบีตา-กลูโคซิเดสคือ 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้ง 3 กลุ่ม คือ 60 องศาเซลเซียส

5. ส่วนค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยที่เอนไซม์ค่อนข้างเสถียรที่ช่วง pH 4.0-8.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมีความเสถียรที่เวลา 105 นาที

6. เอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนมีความจำเพาะต่อ CMC มากที่สุด รองมาคือไซแลน กระดาษกรอง Avicel และแอลฟา-เซลลูโลส แต่ไม่ย่อยสลายเซลโลไบโอส D(-) salicin และ p-NPG

7. เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยไอออนของ Mn^{2+}มากที่สุด รองลงมาคือ Hg^{2+} ส่วนไอออน Cu^{2+} มีผลเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยาของเชื้อรา *Acrophialophora* sp. เป็นการศึกษาเพียงเบื้องต้นเท่านั้น จึงควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้สายพันธุ์ที่แท้จริง เช่น การศึกษาในระดับจีโนม เป็นต้น

การศึกษาเอนไซม์จาก *Acrophialophora* sp. UV 10-2 ต้องผลิตให้ได้ปริมาณมากๆ ซึ่งในการทดลองนี้ผลิตเพียง 1,140 มิลลิลิตร จึงไม่เพียงพอในการแยกเอกโซกลูคาเนส บีตา-กลูโคซิเดส และต้องเลือกใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีอื่น เพื่อแยกเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้น และลดการสูญเสียแอคติวิตีให้น้อยที่สุด

เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *Acrophialophora* sp. UV 10-2 น่าจะได้มีการศึกษาต่อไปเพื่อเพิ่มศักยภาพให้มากขึ้นเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมการฟอกผ้า เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ. 2546. การผลิตเอนโด-เอนริซเซลลูเลสจากเชื้อราและการนำไปประยุกต์ในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชุลีพร จูงสาย. 2535. การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาอาหารเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิสุทธิ์ พวงนาค. 2542. การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา. 2546. วัชพืชที่มีศักยภาพเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Abrha, B. and Gashe, B. A. 1992. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. W. J. Micro and Biotech. 8: 164 – 166.

Acebal, C., Castillon, M. P., Estrada, P., Mata, I., Costa, E., Aguado, J., Romero, D. and Jimenez, F. 1986. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat straw. App. Micro. Biotech. 24: 218-223.

Ade, S. and Takagi, M. 1991. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. Biotech. Bioeng. 37: 93-96.

Anne, B.B., Anne, B.O., Tomas, F., Annette, P., and Anette, S.S. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. Biotech. Bioeng. 49: 568-577.

Azevedo, H., Bishop, D., and Cavaco-Paulo, A. 2000. Effect of agitation level on the adsorption, desorption, and activities on cotton fabrics of full length and core domains of EGV (*Humicola insolens*) and CenA (*Cellulomonas fimi*). Enz. Micro. Tech. 27: 325-329.

Barnett, H. L. 1967. Illustrated genera of imperfect fungi. 2nd. USA : Burgess Publishing Company.

Bastawde, K. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. W. J. Micro and Biotech. 8: 45-49.

Bigelow, M., and Wyman, C. E. 2002. Cellulase production on bagasse pretreated with hot water. App. Biochem and Biotech. 98: 921-934.

Beldman, G., Searly-Van, L.M.F., Rombouts, F.R., and Voragen, F.G.J. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization, and comparison of all detectable endoglucanase, exoglucanase and β-glucosidase. Eur.J. Biochem. 146: 304-308.

Bhat, M.K. 2000. cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotech Advan. 18: 355-383.

Bok, J., Dienesh, A., Yernool, D., and Eveleigh, D. 1998. Purification,characterization and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. App Environ Micro. 64: 4774–4781.

Busto, M. D., Ortega, N., and Perez-Mateos, M. 1997. Stabilisation of cellulases by cross-linking with glutaraldehyde and soil humates. Bioresource Tech. 60: 27-33.

Cardoso, O. A. V. and Filho, E. X. F. 2003. Purification and characterization of *a* novel cellulose-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. FEMS Mico. Letters. 223: 309-314.

Castellanos, O. F., Sinitsyn, A. P., and Vlasenko, E. Y. 1995. Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases. Bioresource Tech. 52: 119-124.

Chen, P. J., Wei, T. C., Chang, Y. T., and Lin, L. P. 2004. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 111–118.

Coral, G., Akikan, B., Unaldi, M. N., and Guvenmez, H. 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. Turk J. Bio. 26: 209-213.

Cowling, E. B., and Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrate for enzymatic conversion process. Biotech and Bioeng Sym. 6: 95-123

Dahot, M. U. and Noomrio, M. H. 1996. Microbial production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* using wheat straw as a carbon source. J Islamic Aca Sci. 9: 1-7.

Dare, P. H., Clark, T. A., Chu-Chou, M. 1988. Consumption of substrate components by the cultivated mushroom Lentinus edodes during growth and fruiting on softwood and hardwood-based media. P. Biochem. 10: 156-160.

Decker, C. H., Visser, J., and Schreier, P. 2001. β-glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β-glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. App. Micro and Biotech. 55: 157-163.

Dijkerman, R., Op den Camp, H. J. M., and Van der Drift, C. 1996. Cultivation of anaerobic fungi in a 10-l fermenter system for the production of hemi-cellulolytic enzymes. App. Micro and Biotech. 46: 85-91.

Ding, S., Ge, W., and Buswell, J.A. 2001. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella vovacea*. Purification, characterization, cloning, and expression. Eur. J. Biochem. 268: 5687-5695.

Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S., and Fonseca, L. P. 2000. The influence of culture conditions on mycelia structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enz. and Micro Tech. 26 : 394-401.

Edward, J. C. 1959. A new Genus of the Moniliaceae. Mycol 51: 781-786

Ericksson, K. E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Germany: Ozach Gmbh and Co.,

Elshafei, A. M., Vega, J. L., Klasson, K. T., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L. 1990. Cellulase and hemicellulase formation by fungi using corn stover as the substrate. Bio. Wastes. 32 : 209-218.

Evans, C. 1985. Properties of the β-D-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*. App. Micro and Biotech. 22: 128-131.

Freire, S. V. P., da Silva, M. P. C., de Luna-Alves Lima, E. A., Maia, L. C., and Kennedy, J. F. 1999. Production of endo-1,4-β-D-glucanase by *Curvularia pallescens*. Carbo. Polymer. 39: 61-65.

Fogarty, W.M. 1983. Microbial Enzymes and Biotechnology. London: Applied Science Publisher Ltd.

George, S. P., Ahmad, A., and Rao, M. B. 2001. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. Bioresource Tech. 77: 171-175.

Ghose,T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Inter Union Pure and App Chem. 59 : 257-268.

Giorgini, J. F. 1992. Purification and partial characterization of two isozymes of cellulase from GA_3-treated coffee endosperm. R. Bras. Fisiol. Veg. 4: 75-80.

Goksoyr, J.C., and Eriksen, J. 1980. Microbial Enzyme and Bioconversion. In Rose, A.H. (ed.), Economic Microbiology, vol 5 pp. 283-330. New York: Academic Press.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. App. Micro and Biotech. 36: 701-707.

Hirayama, T., Horie, S., Nagayama, H., and Matsuda, K. 1978. Studies on cellulases of a phytopathogenic fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. J. Biochem. 84: 27-37.

Jin, F. and Toda, K. 1989. Purification and characterization of cellulase from *Clositridium thernocoproae* sp.Nov. JT3-3. J. Ferment and Bioeng. 67: 8-13.

Juhasz, T., Kozma, K., Szengyel, Z., and Recey, K. 2003. Production of β-glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. Food Tech and Biotech. 41 : 49-53.

Kanda, T., Nakakubo, S., Wakabayashi, K., and Nisizawa, K. 1978. Purification and properties of an exo-cellulase of avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). J. Biochem. 84: 1217-1226.

Kader, A. J. and Omar, O. 1998. Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu park, Sabah. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC). Article II: 1-6.

Kang, S. W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., and Kim, S. W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource Tech. 91: 153-156.

Kengen, S., Luesink, E., Stams, A., and Zehnder, A. 1993. Purification and characterization of an extremely thermostable β-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococccus furiosus*. Euro J. Biochem. 213 : 305–312.

Kim, D. W., Jeong, Y. K., Jang, Y. H., and Lee, J. K. 1994. Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. J Fermen and Bioeng. 77: 363 – 369.

Kim, D. W., Yang, J. H. Y., And Jeong, Y. K. 1988. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on microcrystalline cellulose. App Micro and Biotech. 28 : 148-154.

Krikstaponis, A., Lugauskas, A., Krysinska-Traczyk, E., Prazmo, Z., and Dutkiewicz, J. 2001. Enzymatic activities of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from the air at waste landfills. Ann Agric Environ Med. 8: 227-234.

Krisna, H. S., Rao, S. K. C., Babu, S. J., and Reddy, S. D. 1999. Studies on the Production and Application of Cellulase from *Trichoderma reesei* QM 9414. Department of Botany, University of Auxin, USA.

Kvesitadze, E., Adeishvili, E., Gomarteli, M., Kvachadze, K., and Kvesitadze, G. 1999. Cellulase and xylanase activity of fungi in a collection isolated from the southern Caucasus. I. Biodeter and Biodegrad. 43: 189-196.

Li, Y., and Hardin, I. R. 1997. Enzymatic scouring of cotton: Effects on structure and properties. Text Chem and Color. 29: 71-76.

Limtong, P., Vangnai, S., Sunanthapongsuk, V., and Piriyaprin, S. 1990. Isolation and selection of thermophilic cellulolytic microorganisms for compost production in Thailand. Kasetsart J Nat Sc. 24: 108-115.

Lowry, O. H., Rosobrugh, N.J., Farr, A. L. and Ramda, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Bio Chem. 193: 265-275.

Macris, B. J., Kekos, D., and Evangelidou, X. 1989. A simple and inexpensive method for cellulose and β-glucosidase by *Neurospora crassa*. App Micro and Biotechnology. 31: 150-151.

Maheswari, D. K., Jahan, H., Paul, J., and Varma, A. 1993. Wheat straw, a potential substrate for cellulase production using *Trichoderma reesei*. W. J. Micro and Biotech. 9: 120-121.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 31: 426-428.

Mizukoshi, S., Sugi, H., Mori, H., and Ichihashi, M. 1977. Production of cellulase from *Pellicularia filamentosa*. Ferment Techn. 55: 548-552.

Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y.,Koga J.,Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T. and Kono, T. 2002. Purification and Charaterization of new endo-1, 4-β-D-glucanases from Rhizopus oryzae. Enz and Micro Tech. 30: 319-326.

Nevalainen, H. and Penttila, M. 1996. "Molecular Biology of Cellulolytic Fungi," in The Mycota II Genetics and Biotechnology, eds Kuck, B. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. USA.

Okamoto, K., Nakano, H., Yatake, T., Kiso, T., and Kitahata, S. 2000. Purification and some properties of a β-glucosidase from *Flavobacterium johnsonae*. Biosci Biotech and Biochem. 64: 333-341.

Ortega, N., Busto, M. D., and Perez-Mateos, M. 2000. Enzymatic saccharification of pretreated wheat staw by *T. reesei* cellulase and *A. niger* β-glucosidase. Biocats and Biotras. 18: 311-330.

Punnapayak, H., Kuhirun, M., and Thanonkeo, P. 1999. Cellulolytic fungi and the bioconversion of fiber from *Agave sisalana*. Sci Asia. 25: 133 -136.

Ratto, M., Ritschkoff, A. C., and Viikari, L. 1997. The effect of oxidative pretreatment on cellulose degradation by *Poria placenta* and *Trichoderma reesei* cellulases. 1997. App Micro and Biotech 48: 53-57.

Razak, A. A., Bachmann, G., Ali, Th. M., and Farrag, R. 1999. Activities of microflora in soils of upper and lower Egypt. Afri J. Mycol and Biotech. 7: 1-19.

Rao, M. N.A., and Mithal, B. M. 1983. Productions of cellulase from *Pestalotiopsis versicolor*. Biotech and Bioeng. 25: 2395-2398.

Reddy, G. V., Babu, P. R., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., and Kothari, I. L. 2003. Utilization of banana waste for the production of ligninolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). Pro Biochem. 38: 1457-1462.

Reczey, K., Szengyel, Zs., Eklund, R. and Zacchi, G. 1996. Cellulase production by *T. reesei*. Bioresource Tech. 57 : 25-30.

Ryu, D. and Mandels, M. 1980. Cellulase: biosynthesis and applications. Enz Micro Tech 2: 91-102.

Saddler, J. N., Hogan, C. M., and Louis-Seize, G. 1985. A comparision between the cellulase systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. App Micro and Biotech. 22: 139-145.

Salles, B. C., Cunha, R. B. Fontes, W., Souoa, M. V. and Filho, E. X. F. 2000. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. J. Biotech. 81: 199-204.

Sandhu. D.K, and Arora D.S. 1981. Changes in fungal populations during storage of Dalbergia bark. Can. J. Bot. 59: 1102-1106.

Sandhu. D.K, and Arora D.S. 1985. cellulose production by species of *Acrophialophora* sp. And Thielavia sp. Indian Phyto. 38: 267-269.

Samson, R.A. and Tariq, M. 1970. The Genus Acrophialophora (Fungi, Moniliales) Acta Bot. Neerl 19: 804-808.

Sanwal, G.G , 1999. . Purification and characterization of cellulase from *Catharanthussrseus stems*. Phytochem. 52: 7-13.

Sreenath, H. K., Shah, A. B., Yang, V. W., Gharia, M. M., and Jeffries, T. W. 1996. Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. J. Ferment Bioeng. 81: 18-20.

Szengyel, Z., and Zacchi, G. 2000. Effect of acetic acid and furfural on cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C30. App Biochem and Biotech. 89: 31-42.

Takashima, S., Nakamura, A., Masaki, H., and Uozumi, T. 1996. Purification and characterization of cellulases from *Humicola grisea*. Biosci Biotech and Biochem. 60: 77 -82.

Tangnu, S.K. 1982. Process development of ethanol production based on enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. Pro Biochem. 5: 36-49.

Tuohy, M.G., Walsh, D.J., Murray, P.G. Claeyssens, M., Cuffe, M.M., Savage, A.V., Savage, Coughlan, M.P. 2002. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by Talaromyces emersonii. B. B. A. 1596: 366-380.

Vlasenko, E. Y., Ding, H., Labavitch, J. M., and Shoemaker, S. P. 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. Bioresource Tech. 59: 109-119.

Vlaev, S. D., Djejeva, G., Raykovska, V., and Schugerl, K. 1997. Cellulase production by *Trichoderma* sp. Grown on corn fiber substrate. Pro Biochem. 32: 561-565.

Wayman, M., Chenm, S., and Doan, K. 1992. Bioconversion of waste paper to ethanol Pro Biochem. 27: 239-245.

Wojtezak, G., Breuil, C., Yamada, J., and Saddler, J. N. 1987. A comparison of the thermostability of cellulases from various thermophilic fungi. App Micro and Biotech. 27: 82-87.

Wike, C. R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D., and Wong, H. 1983. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Park Ridge, New Jersey, USA: Noyes Data Corporation.

Xiao-Bin, Y., Yun, H. S., and Koo, Y-M. 1999. Cellulase production in fed-batch culture by *Trichoderma reesei* Rut C30. J Micro and Biotech. 9: 44-49.

Xiemens, F. A., Sousa., M. V., Puls, J., Silva Jr., F. G. and Filho, E. X. F. 1999. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. Cur Micro. 38: 18-21.

Ximenes, E. A., Felix, C. R., and Ulhoa, C. J. 1996. Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β-glucosidase. Cur Micro. 32: 119-123.

Xiao-Bin, Y., Yun, H. S., and Koo, Y-M. 1999. Cellulase production in fed-batch culture by *Trichoderma reesei* Rut C30. J Micro and Biotech. 9 : 44-49.

Yamanobe, T. and Mitsushi, Y. 1990. Some enzymatic properties of endo-1, 4-β-glucanases components from fungal strain Y-94. Agric Bio Chem. 54: 309-317.

Yan, T. R., and Lin, C. L. 1997. Purification and characterization of a glucose-tolerant β-glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. Biosci Biotech and Biochem. 61: 965–970.

Ye, X. Y., Ng, T. B. and Cheng, K.J. 2001. Purification and characterization of cellulase from the runimal fungus *Orpinomyces joyonii* cloned in Escherichia coli. The International J Biochem and Cell Bio. 33: 87-94.

Zaldivar, M., Velasquez, J. C., Contreras, I., and Perez, L. M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes : its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Elect J Biotech. 4: 160-168.

Zverlov, V., Riedel, K., and Bronnenmeier, K., 1998. Properties and gene structure of a bifunctional cellulytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile *Anaerocellum thermophilum* with separateglycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. Microbio. 144: 457–465.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกโตรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีการเตรียม

1.1 นำมันฝรั่งปอกเปลือก ล้างให้สะอาด และนำมาหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 200 กรัม นำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตรเพื่อให้สุก สังเกตได้จากการใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งนุ่มแตกออกง่าย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.2 นำมากรองแต่ส่วนน้ำ เติมน้ำตาลเดกโตรส 20 กรัม ลงไปผสมให้ละลาย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยให้มีปริมาตรของอาหารประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในช่วง 5.0 – 5.5 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล

1.3 เติมวุ้นผง 20 กรัม และนำไปต้มให้วุ้นละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายของอาหารให้เป็น 1 ลิตร ด้วยนำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Production medium (Punnapayak และคณะ, 1999)

$MgSO_4$	1.0	กรัม
Corn steep liquor	7.0	กรัม
$CaHPO_4$	5.0	กรัม
α-cellulose	30.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
$FeSO_4$	5.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	3.6	มิลลิกรัม
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น $CaHPO_4$ และ α-cellulose เนื่องจากไม่ละลายน้ำ และ Tween 80 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรใกล้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เท่ากับ 5.0 ด้วย HCl 1 นอร์มอล หรือ NaOH 1 นอร์มอล แล้วจึงเติม Tween 80 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ -$CaHPO_4$ และ α-cellulose ไม่ละลายน้ำ ต้องแบ่งชั่งใส่ภาชนะไว้ก่อน

-การเตรียม Production agar ทำเหมือนการเตรียม Production media แต่เติมวุ้นลงไปในอัตราส่วนที่เหมือนกับการ PDA และไม่เติม Tween 80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

1. เตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร

2. ชั่ง Potassium sodium tartrate ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) จำนวน 255 กรัม ละลายในสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 69 มิลลิลิตร ใส่ $NaHSO_3$ 6.9 มิลลิลิตร

4. ผสมสารละลายจากข้อ 2.1 และ 2.2 ให้เข้ากัน จากนั้นจึงใส่สารละลายข้อ 2.3 ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืนก่อนนำมาใช้

2. การเตรียมสารละลายเพื่อวัดโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

1. Lowry reagent I

ผสม 4 % Sodium carbonate 49 มิลลิลิตร ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ 49 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 1 มิลลิลิตรของ 1% กรัมต่อปริมาตร ของ $CuSo_4$ และ 1 มิลลิลิตรของ 1 % โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต

2. Lowry reagent II

เจือจางสารละลาย Foolin-Ciocalteu phenol reagent ให้มีปริมาณ 2 เท่า

3. การวิเคราะห์การเจริญของเส้นใยโดยวิธีวัดกลูโคซามีน (Dare, Clark และ Chu-Chou 1988)

<u>การเตรียมสารวัด Glucosamine</u>

1.acetylacetone

ละลาย acetylacetone 1 มิลลิลิตร ใน 100 มิลลิลิตร ของ 0.1 M $NaCO_3$ buffer pH 9.8 เก็บไว้นาน 1 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. p-ไดเมทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์

ละลาย PDAB 2 กรัม ใน 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 20% กรด HCl เข้มข้นใน Absolute ethanol

3.กรด 4 N HCl 500 มิลลิลิตร

เตรียม HCl 328.46 มิลลิลิตร ในน้ำ 1000 มิลลิลิตร หรือ เตรียม HCl 164.23 มิลลิลิตร ในน้ำ 500 มิลลิลิตร

**เตรียม NaOH 1 N โดยการชั่ง NaOH 20 g ในน้ำ 500 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. เตรียมตัวอย่างโดยบดละเอียด 1 กรัมให้แห้งเติม 4 N HCl 5 มิลลิลิตร นำไปอบที่ตู้อุณหภูมิ 110 องศา นาน 8 ชั่งโมง ปรับ pH ให้ 5-6 และปรับสารละลายด้วยน้ำให้ได้ 25 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไปวิเคราะห์กลูโคซามีนต่อไป

2. การวิเคราะห์ โดยดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร (สารตัวอย่าง) หลังจากนั้นเติม 1 มิลลิลิตร acetylacetone ปรับให้ได้ 5 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็น เติม 2 มิลลิลิตร EtOH แล้วเติม 1 มิลลิลิตร PDAB ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร

4. การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา

1. นำสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และแท่นวางสไลด์ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เตรียมอาหาร PDA เทใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วอีกชุดหนึ่ง ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัด ตัดชิ้นวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร

3. นำชิ้นอาหารที่ตัดได้มาวางไว้บนสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมจากข้อ 7.1

4. ใช้เข็มเขี่ยลนไฟ ตั้งทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปเขี่ยสปอร์ของเชื้อราที่ต้องการศึกษามาแตะที่มุมทั้งสี่ด้านของชิ้นอาหาร

5. ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยต้องระวังไม่ให้กระจกปิดสไลด์เอียงมาแตะกับสไลด์ที่อยู่ด้านล่าง

6. เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย แต่ไม่ให้ท่วมสไลด์ เพื่อให้เกิดความชื้น

7. นำไปบ่มเลี้ยงเพื่อให้เชื้อราเจริญ สังเกตเชื้อราจะค่อยๆ เจริญแผ่เส้นใยไปบนสไลด์และกระจกปิดสไลด์

8. นำสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่มาเขี่ยชิ้นอาหารออก แต่ต้องระวังไม่ให้เส้นใยของเชื้อราติดมาด้วย ดังนั้นจะได้ส่วนที่มีเส้นใยเชื้อราติดอยู่ 2 ส่วนคือ ที่สไลด์และกระจกปิดสไลด์

9. หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ลงบนสไลด์หรือกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยเชื้อราอยู่ เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราแผ่กระจาย ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้แอลกอฮอล์ระเหย

10. หยดสี Lactophenol-cotton blue หรือ Lactophenol-anelene blue ลงไปเพื่อย้อมเส้นใยเชื้อรา

11. นำกระจกปิดสไลด์ที่สะอาดแผ่นใหม่ปิดทับลงไป ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออกให้หมด และปิดทับขอบกระจกปิดสไลด์ทั้ง 4 ด้านด้วยน้ำยาทาเล็บ

12. นำสไลตัวอย่างเชื้อราที่ได้ไปดูรายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์

5. การเตรียมถุงไดอะไลซีส

1 นำถุงไดอะไลซีสของบริษัท Spectrum Medical Industries, Inc. รุ่น Spectra 1 Por molecularporous membrane tubing ต้มในสารละลาย Na_2SO_3 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 80° เซลเซียส เป็นระยะเวลา1 นาที

2 ล้างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

3 นำไปแช่ในกรดซัลฟูริค ที่มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นล้างออกด้วยน้ำร้อนนาน 5 นาที

4 นำถุงไดอะไลซีสที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมไว้เรียบร้อยนี้ไปบรรจุเอนไซม์ที่ต้องการทำไดอะไลซีสเพื่อแยกสารละลายเกลือออกจากเอนไซม์

6. สารละลายที่ใช้ในการทำเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซีส

1 สารละลายอะคลิลาไมด์ (30 เปอร์เซ็นต์อะคลิลาไมด์ 0.8 เปอร์เซ็นต์ บิส-อะคลิลาไมด์) นำอะคลิลาไมด์ 30 กรัม และบิส-อะคลิลาไมด์ 0.8 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2 สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.9 เตรียมโดยการชั่งทริส 18.15 กรัม และ SDS 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติม 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ปรับ pH เป็น 8.9 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3 สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.50 โมลาร์ pH 6.8 (4×Stacking Buffer) เตรียมโดยการชั่งทริส 6.0 กรัม และ SDS 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติม 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ปรับ pH 6.8 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (10 เปอร์เซ็นต์) ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเตรียมทุกครั้งที่ใช้

5 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (staining solution)

ละลาย Coomassie Blue R250 1.25 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล 500 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผสมกับ 15 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก (ถ้าสารละลายที่ได้ขุ่นต้องกรอง)

6 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution)

ผสมกรดอะซิติก 210 มิลลิลิตร กับเมทานอล 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 3 ลิตร

7 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (2× sample buffer)

เติมกลีเซอรอล 2.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติม SDS 0.2 กรัม เติม 0.5 มิลลิลิตร β-mercaptoethanol 0.2 มิลลิลิตร 1% bromophenol blue และเติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานและการคำนวณค่าแอคติวิตี

1. การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ละลายในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 โดยมีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 1.40 และ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ใส่สารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

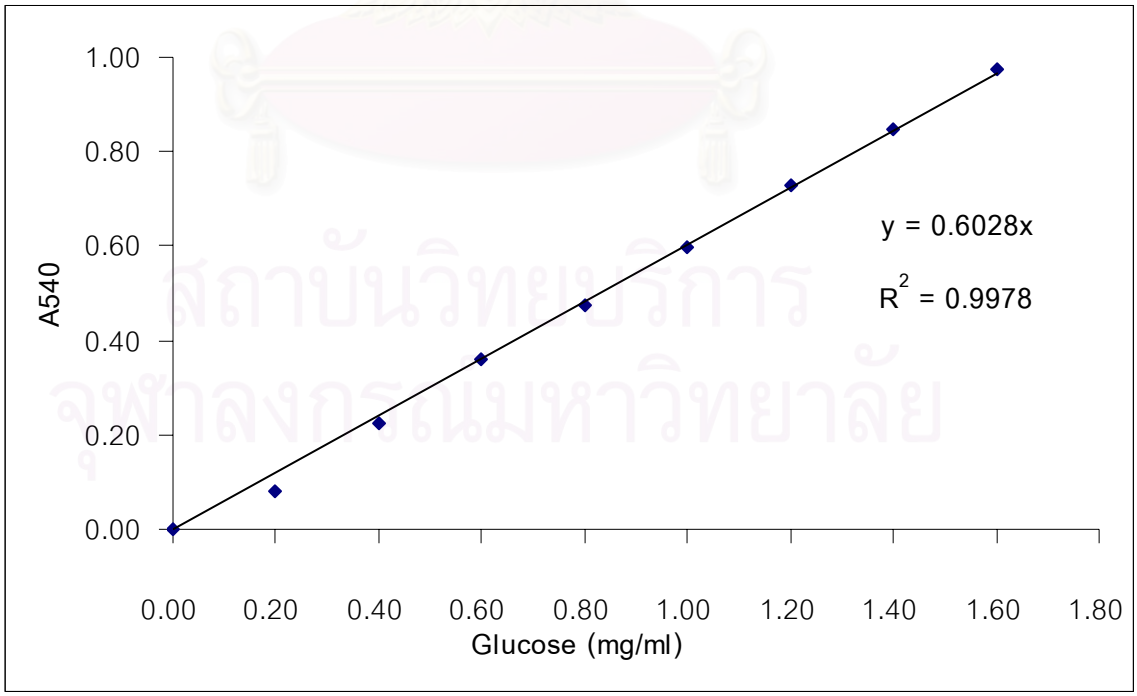
1.3 ใส่สารละลาย DNS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

1.4 นำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร

1.6 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส

1.7 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณน้ำตาลกลูโคส



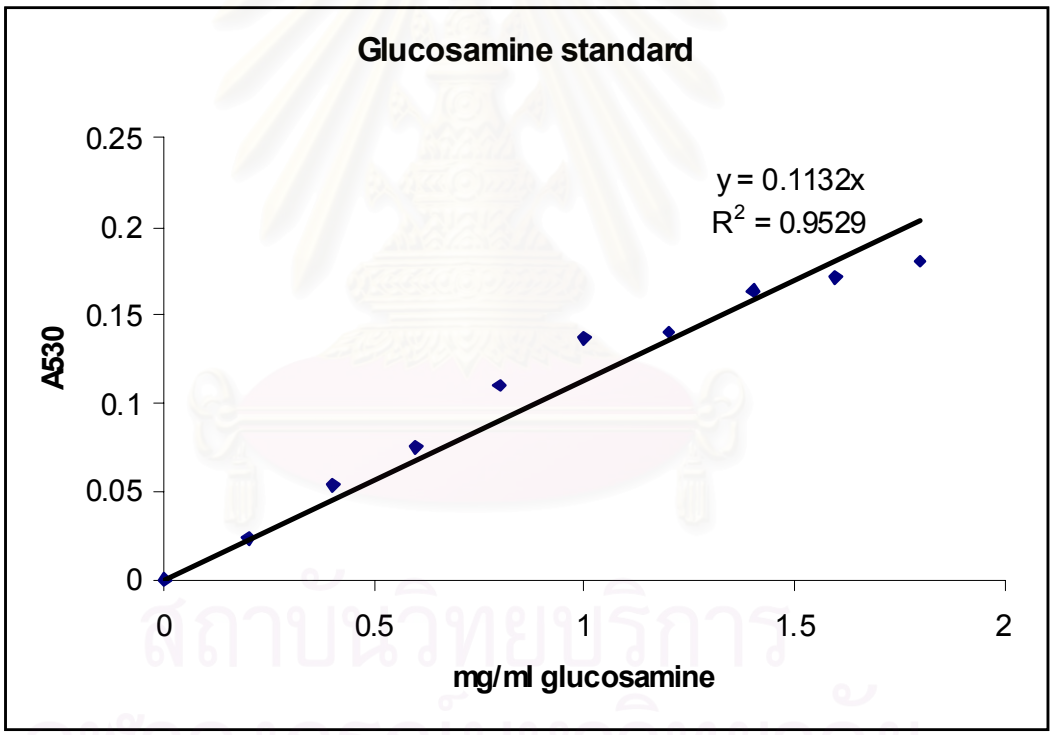
กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2.กราฟมาตรฐานกลูโคซามีน

2.1. เตรียมสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2. เตรียมสารละลาย acetyl acetone 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดให้ได้ 5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 2 มิลลิลิตร ของ absolute ethanol จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย p-dimethylaminobenzaldehyde และ 2 มิลลิตรของ absolute ethanol ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

2.3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน



กราฟมาตรฐานกลูโคซามีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

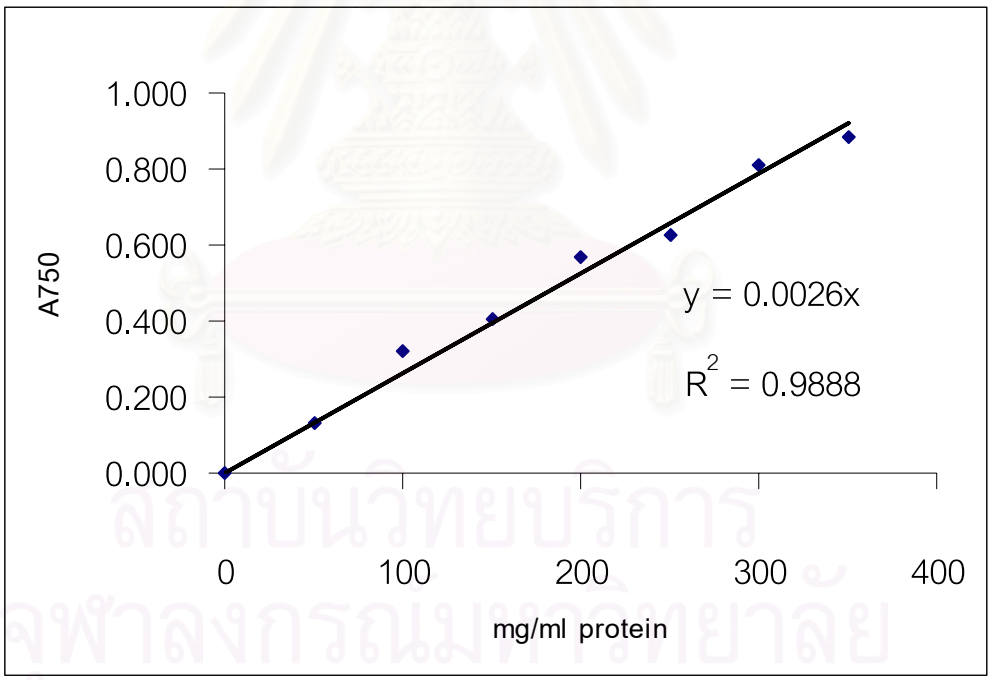
3.1 เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 0 50 100 150 250 300 และ 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 ใส่สารละลาย BSA ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

3.3 เติมสารละลาย Lowry reagent I (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดจากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเติม Lowry reagent II (ภาคผนวก ข) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 750 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน BSA

3.5 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน



กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

4. การคำนวณค่า Unit of enzyme **ตามวิธีของ** The International Union of Biochemistry

4.1 การคำนวณแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับ ปริมาณของกลูโคส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

เท่ากับ กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม	เท่ากับ	1	ไมโครโมล
กลูโคส A มิลลิกรัม	เท่ากับ	(1 X A) / 0.180	ไมโครโมล
	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 5.556 ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 60 นาที

60 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล
1 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 5.556)) / 60	ไมโครโมลต่อนาที
	เท่ากับ	A X 0.093	ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 0.093 ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร

ใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 0.093	ไมโครโมลต่อนาที
ใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 0.093)) / 0.5	ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร

เท่ากับ A X 0.186 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร

เท่ากับ A X 0.186 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การคำนวณแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสและเบตากลูโคซิเดส

1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) เท่ากับ ปริมาณของกลูโคส 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ
เท่ากับ กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม	เท่ากับ	1	ไมโครโมล
กลูโคส A มิลลิกรัม	เท่ากับ	(1 X A) / 0.180	ไมโครโมล
	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 5.556 ไมโครโมล เกิดขึ้นภายใน 30 นาที

10 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 5.556	ไมโครโมล
1 นาที มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 5.556)) / 30	ไมโครโมลต่อนาที
	เท่ากับ	A X 0.185	ไมโครโมลต่อนาที

จากการทดลองน้ำตาลกลูโคส A X 0.185 ไมโครโมลต่อนาที เกิดจากการใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร

ใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	A X 0.185	ไมโครโมลต่อนาที
ใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีน้ำตาลกลูโคส	เท่ากับ	(1 X (A X 0.185)) / 0.5	ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร

เท่ากับ A X 0.370 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร
เท่ากับ A X 0.370 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเสาวนีย์ อาภาวศิน เกิดวันที่ 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2522 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2544 และเข้าเรียนศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา พ.ศ. 2544 และสำเร็จการศึกษาปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย