บทที่ 5

วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

ดังที่กล่าวมาแล้วในบทนำว่า จุลชีพที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นมีทั้งแบคทีเรียและรา แต่ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะเลือกเฉพาะเชื้อราเท่านั้น เนื่องจาก

1) เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อรา โดยมากจะเป็นเอนไซม์ที่เมื่อเชื้อราสังเคราะห์ขึ้นมาแล้วจะถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (**extracellular enzyme**) ทำให้เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสได้ง่าย แต่เซลลูเลสของแบคทีเรียมักจะพบว่าฝังตัวอยู่ติดกับเซลล์ ทำให้การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทำได้ยากกว่าการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา (**Norkrans** ,1967)

2) รูปร่างลักษณะของเชื้อราซึ่งมีไฮฟี (**hyphae**)มากมาย ไฮฟีของราสามารถชอนไชเข้าไปในเนื้อเยื่อของวัสดุที่ประกอบด้วยเซลลูโลสในกรณีที่เป็นของแข็งได้ทำให้สัมผัสกับเซลลูโลสได้ดีกว่า และย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีกว่าแบคทีเรีย

3) แบคทีเรียที่พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงมักจะเป็นอะแนโรบิคแบคทีเรีย (**anaerobic bacteria**) ดังนั้นการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะต้องเลี้ยงในสภาวะที่ขาดออกซิเจน และต้องควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนตลอดเวลา ซึ่งทำได้ยากมาก

เมื่อทดลองแยกเชื้อราจากกองขยะ ที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าสามารถแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเซลลูโลสได้ประมาณ 10 ชนิด แต่มีเพียงชนิดเดียว (คือ V_1 ซึ่งภายหลังได้จัดจำแนกว่าเป็น **Aspergillus fumigatus Presenius**) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน **T. viride** QM 9414 ซึ่งได้รับการรายงานว่าเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้สูงมากที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (**Reese**,1975; **Mandels** และ **Sternberg** ,1976) ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา **A.fumi-**

gatus Fres.(V_1) เปรียบเทียบกับ T.viride QM 9414 พบว่า การเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา A.fumigatus Fres. (V_1) จะสูงสุดในวันที่ 8 ในขณะที่ T.viride จะต้องใช้เวลาถึง 10 วัน เมื่อเลี้ยงในสภาวะเดียวกันตามผลการทดลองในรูปที่ 6 ซึ่งจากจุดนี้ชี้ให้เห็นว่าในสภาวะของการเลี้ยงเช่นเดียวกันนี้ A.fumigatus Fres.(V_1) มีประสิทธิภาพในการใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นคอคาร์บอนสูงกว่า T.viride QM 9414

จากการติดตามการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งติดตามการเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีนซึ่งเป็นองค์ประกอบย่อยของไคตินที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา และติดตามการสังเคราะห์เอนไซม์โดยการติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ในผลการทดลองรูปที่ 15 จะเห็นว่าแอคติวิตีของเซลลูเลสของ A.fumigatus Fres.(V_1)มีค่าสูงสุดในวันที่ 8 จากนั้นแอคติวิตีจะลดลงทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะเชื้อราหยุดเจริญ โดยพิจารณาจากปริมาณกลูโคซามีนซึ่งจะมีค่าสูงสุดในวันเดียวกันด้วย แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ในรูปเดียวกันนั้นจะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ในระยะ 5 วันแรกจะมีค่าลดลง (ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราสามารถใช้เปปโทน (0.1 %) ซึ่งมีในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งต้นตอของไนโตรเจน) หลังจากนั้นความเข้มข้นของโปรตีนจะค่อยๆเพิ่มขึ้น อาจจะเป็นผลเนื่องจากมีโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกจากไมซีเลียมของเชื้อรามาสู่ภายนอกมากขึ้น และการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนจะสอดคล้องกับการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้ หลังจากวันที่ 8 แล้วแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงในขณะที่อัตราการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนก็จะช้าลงด้วย แต่ความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ยังอยู่ในระดับเดิมหรือสูงขึ้นเล็กน้อย อาจจะเป็นไปได้ว่ามีการสะสมของโปรตีนที่ได้จากการสลายหรือแตกของเซลล์ของเชื้อรา จึงมีผลทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นในขณะที่การสังเคราะห์โปรตีน และเอนไซม์รวมทั้งการเจริญได้สิ้นสุดลงแล้ว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mandels และ Reese ในปี 1957 ที่สรุปว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ของเชื้อรา T.viride มีความสัมพันธ์โดยตรงกับเซลลูเลสแอคติวิตี ดังนั้นการรายงานผลจึงใช้ค่าเซลลูเลสแอคติวิตีเป็นดัชนีแสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ส่วนการติดตามการเจริญของเชื้อราซึ่งใช้วิธีวัดปริมาณของกลูโคซามีนนี้อาจจะใช้วิธีติดตามปริมาณโปรตีนซึ่งถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ก็ได้ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากความเข้มข้นของโปรตีนที่วัด

ได้ไม่ใช่ค่าสัมบูรณ์ (absolute value) จึงได้ใช้วิธีวัดปริมาณกลูโคซามีนในการติดตามการเจริญของเชื้อราแทนการวัดปริมาณโปรตีน

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา <u>**A.fumigatus**</u> Fres.(V_1) ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ไม่ใช่อุณหภูมิเดียวกัน การเจริญสูงสุดของ <u>**A.fumigatus**</u> Fres.(V_1) จะพบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสคือ 45 องศาเซลเซียส ในทำนองเดียวกันกับ <u>**T.viride**</u> ซึ่งสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่การสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส (Mandels และ Sternberg ,1976)

การเปลี่ยนแปลง pH และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อขณะที่มีการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ <u>**A.fumigatus**</u> Fres.(V_1) มีรูปแบบค่อนข้างที่จะแน่นอน (รูปที่ 11 และ 15) กล่าวคือ การเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ <u>**A.fumigatus**</u> Fres.(V_1) จะเริ่มไปพร้อมๆกัน เมื่อการเจริญของ <u>**A.fumigatus**</u> Fres.(V_1) สูงขึ้น การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสก็จะสูงขึ้นด้วย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร เลี้ยงเชื้อจะค่อยๆสูงขึ้น ส่วน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงและลดลงต่ำสุดอยู่ในช่วง 2.5-3.5 ในขณะที่การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส และการเจริญมีค่าสูงสุด แต่จะเห็นได้ว่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจนมีค่าต่ำสุดก่อนที่จะวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูงสุดประมาณ 2-4 วัน และเมื่อการเจริญของเชื้อราลดลงในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงด้วย pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถใช้กลูโคสซึ่งได้จากการย่อยสลายจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนได้ และการใช้กลูโคสนี้จะมีผลให้มีการปลดปล่อยกรดออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ <u>**T.viride**</u> (Mandels และคณะ, 1975; Mandels และ Sternberg ,1976) เมื่อการเจริญของเชื้อราสูงสุดซึ่งหมายถึงการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดแล้วหลังจากนั้นจึงลดลงก็ย่อมมีการใช้กลูโคสน้อยลง ผลทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

การที่วัดแอคติวิตีของเอนไซม์หลังจากมีการสังเคราะห์สูงสุดแล้วลดลงอาจจะเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น อาจจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เสียสภาพ (**denaturation**) ไปบางส่วน เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนั้น ในระยะแรกๆมีเซลลูโลสอยู่มาก จะช่วยป้องกันการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่หลังจากวันที่ 8 เซลลูโลสมีอยู่น้อยมากหรืออาจจะหมด การป้องกันการสูญเสียแอคติวิตีน้อยลง อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียสอาจจะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไปบ้างก็เป็นได้ จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลส (รูปที่ 52) พบว่าแอคติวิตีของเซลลูเลสของ **A.fumigatus** **Fres.(V_1)** สามารถจะทนต่ออุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้นาน 4 ชั่วโมง โดยที่แอคติวิตีลดลงประมาณ 10 เปอร์เซนต์ แต่เนื่องจากการติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทำทุก 48 ชั่วโมงจึงเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสบางส่วนเสียสภาพไป ซึ่งส่งผลให้แอคติวิตีของเซลลูเลสลดลงด้วย

สาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของ **A.fumigatus** **Fres.(V_1)** ลดลง อาจจะเนื่องมาจากอายุของเชื้อราทั้งนี้สังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงระยะเวลาหลังจากที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดแล้ว จะเริ่มสร้างสปอร์ขึ้นและปริมาณสปอร์จะขึ้นกับระยะเวลาของการเลี้ยง จากรายงานของ **Norkrans** (1967) พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดจากไมซีเลียมที่มีอายุน้อยโดยเฉพาะบริเวณส่วนของไฮฟี ในระยะที่เป็นสปอร์จะไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส จึงอาจเป็นไปได้ว่าในระยะหลังจาก 8 วันไปแล้วไมซีเลียมของ **A.fumigatus** **Fres.(V_1)** มีอายุมากขึ้น การสังเคราะห์เอนไซม์จึงลดลง ผลการทดลองที่สนับสนุนข้อคิดนี้อีกประการหนึ่งคือ จากรูปที่ 15 เช่นกัน จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสลดลง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะยังมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่สูงเป็นปริมาณซึ่งน่าจะเพียงพอที่จะทำให้การเจริญของราดำเนินต่อไปได้อีกระยะหนึ่ง เหตุการณ์นี้อาจจะอธิบายได้ว่า เมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์ลดลง แน่นอนอัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ย่อมลดลง ซึ่งเหมือนกับเป็นการจำกัดการใช้น้ำตาลในการเจริญของเชื้อราลงด้วย ทำให้การเจริญของราลดลงเมื่อเทียบกับตอนที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสสูงอัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูง เชื้อราสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญได้อย่างเต็มที่ ส่วนการที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสลดลง น่าจะเป็นเพราะอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อรานั้นสูงกว่าอัตราการผลิตน้ำตาล จึงทำให้ผลลัพธ์ที่ได้คือปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง

จากการศึกษาผลของกลูโคสที่เติมลงไปในอาหารต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ **A.fumigatus** Fres.(V_1) ตามรูปที่ 14 จะเห็นว่าความเข้มข้นของกลูโคส 25 มิลลิโมล/ลิตร จึงเริ่มมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสทั้งปริมาณและช่วงเวลาในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของกลูโคสที่ Sterberg (1976) ใช้เติมลงในเชื้อ **T.viride** ที่กำลังเจริญบนเซลลูโลสคือ 30 มิลลิโมล/ลิตร แล้วทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสลดลงทันที และจะเห็นผลชัดเจนขึ้นที่ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 100 มิลลิโมล/ลิตร เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่แสดงไว้ในรูปที่ 14ก และ 14ข ไปพร้อมๆกัน จะเห็นผลของการเกิดคาตาบอไลต์รีเพรสชัน ต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสอย่างชัดเจน เมื่อเลี้ยง **A.fumigatus** Fres.(V_1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลลูโลสและกลูโคสอยู่รวมกัน **A.fumigatus** Fres.(V_1) จะใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนก่อน ซึ่งเห็นได้ชัดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 50 มิลลิโมล/ลิตร pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจนถึงวันที่ 6 pHจึงเริ่มสูงขึ้นนั่นคือกลูโคสถูกใช้หมด จึงเริ่มใช้เซลลูโลสเป็นสารต้นตอคาร์บอนและเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส โดยที่ปริมาณเซลลูเลสที่สังเคราะห์สูงสุดมีค่าต่ำกว่า และช่วงเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดนานกว่าเมื่อเลี้ยง **A.fumigatus** Fres.(V_1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นตอคาร์บอนเพียงอย่างเดียว และผลกระทบโดยกลูโคสแบบคาตาบอไลต์ รีเพรสชันนี้จะยิ่งเห็นได้ชัดขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสขึ้นไปถึง 100, 250 และ 500 มิลลิโมล/ลิตร ผลการทดลองในรูปนี้ยังแสดงให้เห็นอีกด้วยว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ 250 และ 500 มิลลิโมล/ลิตร น่าจะเพียงพอสำหรับการเจริญของ **A.fumigatus** Fres.(V_1) ในระยะเวลาที่ทำการทดลอง (16 วัน) โดยที่ไม่จำเป็นต้องใช้เซลลูโลสเลย จึงไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสหรือถ้ามีก็มีค่าต่ำมาก และpH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าคงที่ประมาณ 2.0-2.5 โดยไม่เพิ่มขึ้นเลย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยง A.fumigatus Fres.(V_1) นี้ได้เติมทวีน-80 ลงไปด้วย เพราะหวังว่าทวีน-80 นี้จะช่วยทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ A.fumigatus Fres.(V_1) สูงขึ้น ดังที่มีการทดลองของ T.viride (Mandels และ Weber,1969; Reese และ Maguire ,1971) และของ T.reesei (Reese ,1972) ซึ่งพบว่าการเติมทวีน-80 ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราทั้งสองสูงขึ้นเป็น 2 เท่าของการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเมื่อไม่เติมทวีน-80 และอีกอย่างหนึ่งทวีน-80 ช่วยลดการฟุ้งกระจายของสปอร์ของเชื้อราด้วย

ในเชื้อราหลายชนิดพบว่าจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสไปพร้อมกับเอนไซม์เซลลูเลส เช่นใน T.viride (Toda และคณะ,1971; Hurst และคณะ, 1978) Irpex lacteus (Hurst และคณะ,1978) และใน A.fumigatus Fres.4-45-1F (สวารซร,2524) สำหรับ A.fumigatus Fres.(V_1) ก็พบว่านอกจากจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสแล้วยังมีการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสไปพร้อมกันด้วย (รูปที่ 16) เมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นคอคาร์บอน มีแอคติวิตีเพียง 75 หน่วย/มิลลิลิตร แต่เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นสารต้นคอคาร์บอน พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นเกือบ 20 เท่า (รูปที่ 17) ที่เป็นเช่นนี้อาจอธิบายได้ว่า แอลฟา-เซลลูโลสเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ไม่มีสารที่จะไปเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส แต่ในฟางข้าวมีทั้งเซลลูโลสและไซแลนเป็นองค์ประกอบประมาณ 30-50 และ 20-30 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (Stephens และ Heichel ,1975 ; Lotong และคณะ,1980) และไซแลนที่อยู่ในฟางข้าวนี่เองที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสสูงขึ้น

ผลการศึกษาความสามารถของเอนไซม์จาก A.fumigatus Fres.(V_1) ในการใช้สับสเตรตชนิดต่างๆดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 3 จะเห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่สังเคราะห์โดย A.fumigatus Fres.(V_1) นี้สามารถใช้แอลฟา-เซลลูโลสและกระดาษกรองเป็นสับสเตรตได้ และน่าจะประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดเช่นเดียวกับเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น T.viride (Selby และMaitland ,1967 ; Berghem และPettersson ,1973,1974;Pettersson ,1975) T.koningii (Wood ,1968 ; Wood และ McCrae ,1972 ; Wood ,1975) A.niger (Hurstและคณะ,1978) A.aculeatus (Murao และคณะ,1979) T.reese (Dwivedi และ Ghose ,1979) และ T.aurantiacus (Tong และคณะ, 1980) เป็นต้น คือ น่าจะประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดมาทำงานร่วมกันเป็นมัลติคอมโพเนนท์เอนไซม์ ได้แก่เอกโซกลูคาเนสหรืออะวิเซลเลสซึ่งศึกษาได้โดยใช้อะวิเซลเป็นสับสเตรต เอนโดกลูคาเนสหรือคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ศึกษาโดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรต และเบตา-กลูโคซิเดสซึ่งใช้ออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์เป็นสับสเตรต นอกจากนี้ยังพบว่าในเอนไซม์ที่เตรียมจาก A.fumigatus Fres.(V_1) ไม่สามารถใช้เคซีน (Casein) เป็นสับสเตรตได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสโดย A.fumigatus Fres.(V_1) เลยหรือเนื่องจากสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมจาก A.fumigatus Fres.(V_1) นี้มีpH ประมาณ 5.0 ซึ่งอาจจะไปทำให้เอนไซม์โปรตีเอสที่สังเคราะห์ขึ้นนี้สูญเสียสภาพไป แต่อย่างไรก็เป็นการดีที่ไม่ต้องคำนึงถึงว่าเอนไซม์จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรตีเอส

จากการเปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของเชื้อรา A.fumigatus Fres.(V_1) (รูปที่ 18 ก,ข,ค,ง) จะเห็นว่า A.fumigatus Fres.(V_1)สามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด เป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ดีเช่นเดียวกับแอลฟา-เซลลูโลส โดยที่การเจริญของราชนิดนี้ในฟางข้าวเป็นไปได้ดีเท่ากับในแอลฟา-เซลลูโลส การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเมื่อใช้ฟางข้าวและซังข้าวโพดสูงกว่าเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสไม่มากนัก ส่วน

เมื่อใช้ชานอ้อยต่ำกว่าเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเพียงเล็กน้อย การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเมื่อใช้ชานอ้อยและซังข้าวโพดเป็นสารต้นคอคาร์บอนจะขึ้นสูงสุด 2 ครั้ง อาจจะเป็นไปได้ว่าในชานอ้อยและซังข้าวโพดมีสารซึ่งเป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด ตัวอย่างเช่น ลิกนิน เป็นองค์ประกอบมากกว่าฟางข้าว ในช่วงแรกจะเป็นการย่อยสลายลิกนินที่ล้อมรอบเซลลูโลสไว้ เพื่อให้เชื้อรามีโอกาสสัมผัสกับเซลลูโลสได้มากขึ้น ส่วนในช่วงหลังจะเป็นการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ จึงทำให้ระดับเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งวัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นนั้นสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่ง สำหรับการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสมีไม่มากนักเมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารต้นคอคาร์บอน อาจจะเป็นไปได้ว่าวัสดุเหลือใช้เหล่านี้ซึ่งไม่บริสุทธิ์มีสารบางอย่างที่คอยควบคุม pH ของอาหารให้ค่อนข้างคงที่ และด้วยเหตุนี้เองอาจจะมีส่วนทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ <u>A</u>.<u>fumigatus</u> Fres.(V_1) เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารต้นคอคาร์บอนสูงกว่าเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลส เป็นที่น่าสนใจว่าความสามารถของ <u>A</u>.<u>fumigatus</u> Fres.(V_1) ในการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีจำนวนมากในประเทศไทยเป็นสารต้นคอคาร์บอนได้ และยังสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้ในระดับสูงพอๆกับเมื่อใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์ น่าจะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการผลิตกลูโคสในระดับอุตสาหกรรมอย่างมากได้

การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณมากจาก <u>A</u>.<u>fumigatus</u> Fres.(V_1) สามารถเตรียมได้ 2 วิธี คือ โดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ตามวิธีในข้อ 3.13.1 และโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าตามวิธีในข้อ 3.13.2 พบว่าการเตรียมเอนไซม์โดยวิธีทั้งสองนี้มีความแตกต่างกันหลายประการ <u>ประการแรก</u> เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ การสังเคราะห์เอนไซม์จะสูงสุดในวันที่ 4 ขณะที่การสังเคราะห์เอนไซม์เมื่อเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าจะสูงสุดในวันที่ 8 (รูปที่ 15 และ 19) <u>ประการที่สอง</u> ปริมาณเอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าจะสูงกว่าที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ ดังผลการทดลองในข้อ 4.9 เมื่อเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตีต่อแอลฟา-เซลลูโลสในช่วงตั้งแต่ 300-560 หน่วย/มิลลิลิตร และการเตรียมโดยเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีต่อแอลฟา-เซลลูโลสเพียง 177.25-250.0 หน่วย/มิลลิลิตรเท่านั้น <u>ประการที่สาม</u> เอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยวิธีทั้ง

สองจะแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิดขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสด้วย เอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์จะมีอัตราส่วนของแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะวิเซลเลสต่อแอคติวิตีของเซลลูเลสมีค่าเท่ากับ 0.70 1.09 และ 0.43 ตามลำดับ (ตารางที่ 6,7 และ 8) เอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าจะมีอัตราส่วนของแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะวิเซลเลสต่อแอคติวิตีของเซลลูเลสจะมีค่าเท่ากับ 0.20,0.55 และ 0.58 ตามลำดับ (ตารางที่ 10,11 และ 12) เอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์จะประกอบด้วยเบตา-กลูโคซิเดส 3 ชนิดคือ β-Glu I, β-Glu II และ β-Glu III ซึ่ง β-Glu II มีปริมาณน้อยมาก คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 2 ชนิด คือ CMCaseI และ CMCase II (รูปที่ 23-24) แต่เอนไซม์ที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า พบว่าประกอบด้วยเบตา-กลูโคซิเดสเพียง 2 ชนิดคือ β-Glu I β-Glu II ไม่พบ β-Glu III แม้ว่าจะทำการทดลองซ้ำถึง 3 ครั้งก็ตาม คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 2 ชนิด คือ CMCase I และ CMCase II และอะวิเซลเลส 1 ชนิด คือ Avi (รูปที่ 25-27) การที่เตรียมเอนไซม์ปริมาณมากโดยวิธีทั้งสองนี้ให้ผลที่แตกต่างกัน อาจจะเป็นไปได้ว่าเป็นผลเนื่องมาจาก 1) การเตรียมเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อ ในเฟอร์เมนเตอร์เริ่มจากไมซีเลียม ส่วนการเตรียมเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าเริ่มจากสปอร์ จะเห็นว่าการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์นั้นเชื้อรามีความพร้อมที่จะสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสมากกว่าเชื้อราที่เลี้ยงในขวดแบบเขย่าซึ่งจะต้องใช้เวลาในการเจริญจากสปอร์เป็นไมซีเลียมเสียก่อน เมื่อเริ่มต้นด้วยอายุของเชื้อราที่แตกต่างกัน ทำให้อัตราเร็วของการเจริญแตกต่างกันและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกันทั้งปริมาณและองค์ประกอบของเซลลูเลส เชื้อราที่เลี้ยงในขวดแบบเขย่าเริ่มต้นจากสปอร์ เชื้อราน่าจะมีอายุอ่อนกว่าเชื้อราที่เลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ เป็นไปได้ว่าการสังเคราะห์เอนไซม์อะวิเซลเลสอาจจะเกิดขึ้นได้ดีในเชื้อราที่มีอายุอ่อนๆ จึงทำให้เซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่ามีอะวิเซลเลสเป็นองค์ประกอบมากกว่าในเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ 2) การเลี้ยงเชื้อราทั้งสองวิธีนั้นมีการถ่ายเทอากาศ (aeration) แตกต่างกัน วิธีที่เลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ย่อมมีการถ่ายเทอากาศดีกว่าวิธีที่เลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า และการสังเคราะห์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเบตา-กลูโคซิเดสอาจจะต้องการออกซิเจนมากกว่าการ

สังเคราะห์เอนไซม์อะวิเซลเลส จึงทำให้เซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์-เมนเตอร์มีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะวิเซลเลสเป็นองค์ประกอบมากกว่าในเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า 3) การที่เอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยวิธีทั้งสองวัดแอคติวิตีได้แตกต่างกันเนื่องจากองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยวิธีทั้งสองแตกต่างกันนั่นเอง การวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสในงานวิจัยนี้ใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสับสเตรต แอลฟา-เซลลูโลสจะมีโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นอะมอร์ฟัสและคริสตัลไลน์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลสต้องอาศัยเอนไซม์องค์ประกอบของเซลลูเลสหลายตัว โดยเฉพาะส่วนของคริสตัลไลน์เซลลูโลสจำเป็นจะต้องอาศัยเอนไซม์อะวิเซลเลส ซึ่งจะทำหน้าที่ทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ทำให้เกิดโครงสร้างคริสตัลไลน์และย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดออกทีละ 2 หน่วยกลูโคส (**Dwivedi** และ **Ghose**, 1979 ; **Tangnu** ,1982) เพื่อให้ได้เซลลูโลสซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปโดยการทำงานร่วมกันขององค์ประกอบของเซลลูเลส เซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมน-เตอร์มีอะวิเซลเลสเป็นองค์ประกอบน้อยกว่าเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า จึงวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสที่ได้จากการเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ได้ต่ำกว่าแอคติวิตีของเซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า นอกจากนี้จากผลการทดลองเตรียมเอนไซม์โดยวิธีที่แตกต่างกันนี้ยังชี้ให้เห็นด้วยว่า การเตรียมเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์น่าจะเหมาะสำหรับการเตรียมเอนไซม์เบตา-กลูโค-ซิเดส และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ส่วนการเตรียมเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าน่าจะเหมาะสำหรับการเตรียมเอนไซม์อะวิเซลเลส

เมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์และการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่ามาทำให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มต้นจากการทำให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นขั้นตอนแรก แล้วนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซนต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตแฟรคชันละ 20 เปอร์-เซนต์ (ตารางที่ 4) พบว่าที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 0-20 และ 20-40 เปอร์เซนต์ไม่มีตะกอนโปรตีน คงจะเป็นเพราะมีความเข้มข้นของโปรตีนที่จะตกตะกอนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตทั้งสองช่วงนั้นต่ำมากหรือไม่มีโปรตีนชนิดนั้นเลย และที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80 เปอร์เซนต์ พบว่ามีโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสถึง 111.84 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น จึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซนต์

ในการตกตะกอนโปรตีนที่มีเซลลูเลสแอคติวิตี และนำไปแยกโปรตีนต่อไปโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 อาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลขององค์ประกอบเอนไซม์ของเซลลูเลส ซึ่งคาดว่าสามารถแยกเบตา-กลูโคซิเดสที่มีขนาดโมเลกุลค่อนข้างใหญ่กว่าองค์ประกอบอื่น (47,000-400,000, **Pettersson** ,1975 ; **Tong** และคณะ,1980 ; **Wood**,1969) ได้ แต่จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 21 และ 22 พบว่าแม้จะได้โปรตีนส่วนที่มีแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดสเป็นส่วนใหญ่ (β-Glu I และ β-Glu II) แต่ก็ยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดอื่นรวมอยู่ด้วย ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเบตา-กลูโคซิเดสของ <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) มีขนาดโมเลกุลไม่แตกต่างไปจากองค์ประกอบชนิดอื่นมากนัก ดังผลที่ได้จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์องค์ประกอบในข้อ 4.13.1 β-Glu I มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดาลตันซึ่งแตกต่างจาก CMCase I, CMCase II และ Avi (ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28,750,28,750 และ 32,000 ดาลตัน) ไม่มากนัก หลังจากนั้นนำเอนไซม์แต่ละส่วนที่แยกได้โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 มาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 อาศัยความแตกต่างของประจุ ซึ่งคาดว่าจะสามารถแยกเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะวิเซลเลสออกจากกัน และออกจากเบตา-กลูโคซิเดสได้อย่างที่ **Wood** (1968,1972) แยก C_1 ออกจาก C_x ของ <u>T.koningii</u> **Wood** และ **McCrae** (1977) แยก C_1 ออกจาก C_x ของ <u>F.solani</u> **Selby** และ **Maitland** (1967); **Berghem** และ **Pettersson** (1973) แยก C_1 และ C_x ของ <u>T.viride</u> ออกจากกัน ผลที่ได้คือคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 สามารถแยกคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสออกจากอะวิเซลเลสได้บ้าง และเบตา-กลูโคซิเดสบริสุทธิ์ขึ้น โดยเฉพาะ β-Glu III บริสุทธิ์ขึ้นมาก ไม่มีแอคติวิตีขององค์ประกอบอื่นปนอยู่เลย มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเกือบ 15 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 23-27 และตารางที่ 5-12 จากผลการทดลองทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่างๆดังที่กล่าวมานี้ชี้ให้เห็นว่า ถึงแม้จะไม่สามารถแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจาก <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) ให้บริสุทธิ์อย่างแท้จริงได้ แต่ก็สามารถทำให้องค์ประกอบนั้นบริสุทธิ์ขึ้นมาก โปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์องค์ประกอบถูกกำจัดออกไปมาก (รูปที่ 21 และ 22) และผลการแยกโปรตีนโดยอีเลคโตรโฟรีซิส (ข้อ 4.12 และรูปที่ 28) ซึ่งจะเห็นได้ชัดว่าแถบของโปรตีนลดจำนวนลงมาก ถ้าต้องการจะแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจาก <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) ให้บริสุทธิ์อย่างแท้จริง อาจจะต้องการขั้นตอนมากกว่านี้

ตัวอย่างเช่น ต้องการเทคนิคของแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟฟี (**Shoemaker** และ **Brown,** 1978) หรือไอโซอิเลคตริก โฟกัสซิง (Berghem และ Pettersson , 1973,1974; **Pettersson** ,1975) นอกจากนี้จากอัตราส่วนของแต่ละองค์ประกอบต่อแอคติวิตีของเซลลูเลส (ตารางที่ 5-12) ยังชี้ให้เห็นด้วยว่า เอนไซม์เซลลูเลสน่าจะทำงานได้โดยไม่จำเป็นจะต้องมีสัดส่วนขององค์ประกอบที่แน่นอน และการทำงานของเบตา-กลูโคซิเดสไม่น่าจะขึ้นกับองค์ประกอบชนิดอื่น

จากขั้นตอนการแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 และดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (รูปที่ 21-27) นี้จะสังเกตเห็นว่าส่วนของโปรตีนที่มีแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะวิเซลเลสจะมีแอคติวิตีของเซลลูเลสควบคู่ไปเสมอ เป็นไปได้ว่าเนื่องจากโดยลำพังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและอะวิเซลเลสเองก็สามารถใช้เซลลูโลสเป็นสับสเตรตได้ (Reese ,1975 ; Wood, 1975) และการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสเป็นการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังจากที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรต อะวิเซลเลสจะตัดเซลโลไบโอสซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ออกจากปลายด้านที่ไม่มีอำนาจรีดิวซ์ของสายเซลลูโลสทีละ 1 หน่วย คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะมีหน้าที่ตัดสายเซลลูโลสตรงพันธะเบตา-1,4-กลูโคซิดิกอย่างสุ่ม ซึ่งมีโอกาสจะได้กลูโคส เซลโลไบโอสและโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เช่นกัน จึงทำให้วัดแอคติวิตีของเซลลูเลสได้ในโปรตีนส่วนที่มีแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและอะวิเซลเลส ข้อสังเกตอีกข้อหนึ่งนอกจากที่กล่าวแล้วจะเห็นว่าไม่สามารถแยกเอนไซม์ไซลาเนสออกจากโปรตีนส่วนที่มีแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส CMCase I ได้ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ไซลาเนสคงจะมีขนาดของโมเลกุลและประจุใกล้เคียงกับ CMCase I มากจึงทำให้ไม่สามารถแยกออกจาก CMCase I ได้โดยวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และการจำแนกชนิดขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีสในรูปที่ 28,29 และ 30 ชี้ให้เห็นว่าในขณะที่ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์สามารถแยกคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ <u>*A.fumigatus*</u> Fres. (V_1) ได้ 2 ชนิด แต่จากการทำโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีสสามารถแยกคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ 3 ชนิด โดยที่ชนิดหลัง **salt gradient** มี 2 ชนิดที่มี R_f เท่ากับ 0.5-0.6 และ 0.75-0.76 (จากอีเลคโตรโฟรีซีส) รวมอยู่ด้วยกันไม่ว่าจะ

เป็น 2 หรือ 3 ชนิดก็ตามจะมีความแตกต่างกันที่ประจุ ไม่แตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล หรืออาจจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย การที่แฟรคชันหลัง **salt gradient** ได้พีคแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพียง 1 พีค แต่เมื่อนำไปทำอีเลคโตรโฟรีซิส ปรากฏว่ามีพีคแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 2 พีค ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นเพราะว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 2 ชนิดในแฟรคชันหลัง **salt gradient** มีประจุต่างกันไม่มากนัก เมื่อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสชนิดที่ II ออกมาพร้อมกันนั้นความเข้มข้นของเกลือก็ค่อยๆเพิ่มขึ้น อาจจะทำให้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสชนิดที่III ออกมาในขณะที่ชนิดที่II ยังออกมาไม่หมด ทำให้ไม่เห็นเป็น 2 พีคชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าแถบของโปรตีนที่มี R_f ตกอยู่ในพีคที่มีแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสคงอยู่ตลอดมาทุกขั้นตอนของการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 29 ก-ฉ) ข้อสำคัญอีกประการหนึ่งคือพีคแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เป็นพีคกว้างต่อเนื่องกันอาจจะเป็นเพราะคาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลลูเลสจาก <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) ซึ่งพิจารณาจากอัตราส่วนของแอคติวิตีขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (ตารางที่ 5-12) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีหลายชนิดด้วย ในบรรดาคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 3 ชนิดนี้ ชนิดที่I (CMCase I ,R_f 0.25-0.38) น่าจะมีประจุบวกมากกว่าชนิดที่II (CMCase II,R_f 0.5-0.6) และมากกว่าชนิดที่ III (ที่มี R_f 0.75-0.76) ในสภาวะที่ทำการทดลอง

จากการจำแนกชนิดของเบตา-กลูโคซิเดสใน **crude enzyme** และ β-Glu_1 โดยอีเลคโตรโฟรีซิส (รูปที่ 29ค และ 29ฅ) จะเห็นว่าน่าจะมีเพียงชนิดเดียว แต่จากการนำ β-Glu_1 ไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 พบว่าใน β-Glu_1 มีเบตา-กลูโคซิเดสถึง 3 ชนิด คือ β-Glu I , β-Glu II และβ-Glu III β-GluII มีปริมาณและแอคติวิตีน้อยมากจึงไม่ได้นำมาศึกษาคุณสมบัติ จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเบตา-กลูโคซิเดส β-GluI และ β-Glu IIIโดยการกรองผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 พบว่าβ-Glu III มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 240,000 ดาลตันขนาดใหญ่กว่าβ-Glu I (55,000 ดาลตัน) มาก การที่ β-Glu IIIมีขนาดใหญ่มากนี้เองอาจจะทำให้ผลการจำแนกชนิดของเบตา-กลูโคซิเดสใน **crude enzyme** และβ-Glu_1 โดยอีเลคโตรโฟรีซิสได้เพียงชนิดเดียวทั้งๆที่เมื่อนำ β-Glu_1 ไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์แยกได้เบตา-กลูโคซิเดสอย่างน้อย 2 ชนิด เพราะ β-Glu III อาจจะไม่สามารถผ่านช่องของ 8%

โพลีอะไครลาไมด์เจลได้ โดยมีรายงานของ Ornstein (1964) กล่าวว่าโปรตีนขนาดโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน ผ่านช่องของ 8% โพลีอะไครลาไมด์เจลได้ไม่ค่อยดีนัก เนื่องจาก β-Glu III มีขนาดใหญ่กว่า β-Glu I ประมาณ 4 เท่า และมีรายงานของ **Rudick** และ **Elbein** (1973) ว่าเบตา-กลูโคซิเดสของ <u>A. fumigatus</u> เป็นไกลโคโปรตีนซึ่งมีส่วนของคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าโมเลกุลของ β-GluIII อาจจะเกิดจากการรวมตัว (aggregation)ของ β-Glu I 4 โมเลกุล ซึ่งทำให้ดูเหมือนว่ามีเบตา-กลูโคซิเดส 2 ชนิด ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปได้ เช่น น้ำหนักโมเลกุล ค่า K_m และคุณสมบัติในการยับยั้งของสับสเตรตต่อการเกิดปฏิกิริยา

ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส β-Glu I และ β-Glu III ศึกษาโดยเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 พบว่า β-Glu I มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดาลตัน น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเบตา-กลูโคซิเดสของ <u>T.viride</u> ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุล 47,000 ดาลตัน (Pettersson ,1975) <u>A.fumigatus</u> มีค่า 40,805 ดาลตัน (Rudick และ Elbein ,1973) <u>T.aurantiacus</u> มีค่า 85,000 ดาลตัน (Tong และคณะ,1980) และ β-Glu III มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากถึง 240,000 ดาลตัน น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่นเดียวกับเบตา-กลูโคซิเดสของ <u>F.solani</u> ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 400,000 ดาลตัน (Wood ,1969) ส่วนคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสทั้ง 2 ชนิด คือ CMCaseI และ CMCase II และอะวิเซลเลส ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 พบว่า CMCase I และ CMCase IIมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 28,750 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ C_x ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำของ <u>Sporotrichum pulverulentum</u> (Eriksson และ Pettersson ,1975) และ C_x ของ <u>A.aculeatus</u> (Murao และคณะ,1979) สำหรับอะวิเซลเลส Avi พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 32,000 ดาลตัน ขนาดค่อนข้างเล็กกว่า C_1 ที่แยกได้จากเซลลูเลสของ <u>T.viride</u> (Selby และ Maitland ,1967; Okada และคณะ,1968; Berghem และ Pettersson ,1973) <u>T.koningii</u> (Wood ,1968) และ <u>F.solani</u> (Wood ,1969) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ใน

ช่วง 45,000-57,000 ดาลตัน การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันผ่านเซฟา-เด็กซ์ จี-100 และจี-200 นี้เป็นเพียงการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลวิธีหนึ่งเท่านั้น ทั้งนี้เพียงเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ว่ามีความแตกต่างกันบ้างหรือไม่ การศึกษาเพียงวิธีเดียวไม่สามารถจะบอกได้แน่ชัดว่าเอนไซม์องค์ประกอบเหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนมากนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกไกลโคโปรตีน ผลที่ได้จะบอกเพียงคร่าวๆเท่านั้น ถ้าต้องการทราบค่าที่แน่นอน จะต้องศึกษาโดยวิธีอื่นประกอบด้วยอย่างเช่น ศึกษาโดยเอสดีเอส-เจลอีเลคโตรโฟรีซีส (SDS-gel electrophoresis) และศึกษาโดยเซดิเมน-เตชัน วีลอซิตี เซนตริฟิวเกชัน (sedimentation velocity centrifugation) เหล่านี้เป็นต้น

การศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ และการศึกษาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ต่างๆ ได้ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อวิเคราะห์ดูความแตกต่างของการใช้สับสเตรตและจลนศาสตร์ที่อุณหภูมิต่างกัน นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบกับจลนศาสตร์ของเอนไซม์เหล่านี้เมื่ออยู่ในลักษณะธรรมชาติคือ crude enzyme ด้วย จากการศึกษานี้พบว่าอาจจะจำแนกเอนไซม์ออกเป็น 2 กลุ่มได้คือ กลุ่มที่ใช้สับสเตรตที่ไม่ละลาย (insoluble substrate) กับกลุ่มที่ใช้สับสเตรตที่ละลาย (soluble substrate) กลุ่มที่ใช้สับสเตรตที่ไม่ละลายได้แก่ เซลลูเลสซึ่งใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสับสเตรต และอะวิ-เซลเลสซึ่งใช้อะวิเซลเป็นสับสเตรต การศึกษาผลของสับสเตรตต่อการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของแอลฟา-เซลลูโลสกับแอคติวิตีของเซลลูเลสที่อุณหภูมิทั้งสองให้ผลคล้ายกัน (รูปที่ 35) แต่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสจะเกิดได้ดีกว่า เมื่อพิจารณาค่า K_m และ V_{max} (ตารางที่ 13) จะเห็นได้ชัดว่าเซลลูเลสสามารถใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสับสเตรตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่ 37 องศาเซล-เซียส จากผลดังกล่าวอาจจะนำไปอธิบายได้ว่าทำไมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของ <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1)ที่ 45 องศาเซลเซียสจึงสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ 45 องศาเซลเซียสเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส ได้น้ำตาลมากกว่า <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) มีน้ำตาลใช้ในการเจริญมาก การเจริญของราจึงมีมากกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสก็ย่อมมีมากกว่าด้วย ส่วนอะวิเซลเลสใน crude enzyme กลับพบว่าการใช้อะวิเซลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นไปได้ดีกว่าที่ 45 องศาเซลเซียสประมาณ 8 เท่า แต่ V_{max} ที่ 45 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าผลไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากอะวิเซลเป็นสับสเตรตที่ไม่ละลาย ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของสับสเตรตกับส่วนผสมของปฏิกิริยา ทำให้เกิดผลที่ไม่สามารถจะอธิบายได้อย่างเอนไซม์ที่ใช้สับสเตรตที่ละลายได้ทั่วไป ส่วนอะวิเซลเลส Avi เมื่อเปรียบเทียบกับอะวิเซลเลสใน crude enzyme พบว่า Avi มีค่า K_m ต่ำกว่าของอะวิเซลเลสใน crude enzyme เล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการทำงานของอะวิเซลเลส Avi เมื่อแยกเป็นอิสระไม่แตกต่างไปจากอะวิเซลเลสในลักษณะธรรมชาติที่อยู่ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นมากนักในสภาวะที่ทดลองนี้

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มซึ่งใช้สับสเตรตที่ละลายได้ ได้แก่ เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส สำหรับเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสพบว่าใน crude enzyme และ β-GluI ปฏิกิริยาของเบตา-กลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งโดยสับสเตรต (substrate inhibition) ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส แต่ใน β-GluIII ไม่พบปรากฏการณ์นี้ การเกิดปรากฏการณ์เช่นนี้อาจจะอธิบายได้จากรูปที่ 23 ซึ่งแสดงการแยกเอนไซม์ขั้นดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์นั้นจะเห็นว่าเอนไซม์ β-GluIII ได้ถูกแยกออกจาก β-GluI และองค์ประกอบอื่นๆของเอนไซม์เซลลูเลสอย่างเด็ดขาด ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดอื่นปะปนด้วยเลย จึงไม่น่าประหลาดที่จะมีคุณสมบัติต่างไปจาก β-GluI ซึ่งยังพบทั้งแอคติวิตีของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและอะวิเซลเลสรวมอยู่ด้วยบ้าง ดังนั้นใน crude enzyme ซึ่งมีเอนไซม์ทั้ง β-GluI และ β-GluIII รวมอยู่ด้วยกัน การเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาโดยสับสเตรตใน crude enzyme นี้จึงเป็นผลเนื่องมาจาก β-GluI นั่นเอง และจากการศึกษาค่า K_m (ตารางที่ 13) ก็เช่นเดียวกัน β-GluIII ย่อมให้ผลที่แตกต่างไปจาก β-GluI และเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme โดยที่ β-GluIII สามารถใช้ออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์เป็นสับสเตรตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ β-GluI และเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme ไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูงมีแนวโน้มที่ปฏิกิริยาของเบตา-กลูโคซิเดสจะเกิดได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำซึ่งก็สอดคล้องกับผลการศึกษา

ผลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาของเบตา-กลูโคซิเดสในรูปที่ 50 แต่ก็มีขีดจำกัด ถ้าอุณหภูมิสูงมากๆเอนไซม์อาจจะสูญเสียสภาพไป

ส่วนคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสนั้นผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อการเกิดปฏิกิริยาของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme , CMCaseI และ CMCaseII ไม่แตกต่างกันทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส (รูปที่ 39 และ 40) แต่ค่า K_m ที่ 37 องศาเซลเซียสของเอนไซม์ทั้งสามแตกต่างกันมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การทำงานของ CMCaseI และ CMCaseII แตกต่างไปจากเมื่ออยู่ใน crude enzyme ที่มีเอนไซม์อื่นปนอยู่ด้วย โดยที่ CMCaseI สามารถใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรตได้ดีที่สุด และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme ใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ดีกว่า CMCaseI ทั้งนี้เนื่องจากใน crude enzyme มีทั้ง CMCaseI และ CMCaseII อยู่รวมกันนั่นเอง

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆจะเห็นว่าการใช้สารละลายบัฟเฟอร์หลายชนิดซึ่งประกอบด้วยอิออนต่างชนิดกันไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส จึงได้ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้ในการศึกษาเอนไซม์ชนิดอื่นๆด้วย เอนไซม์เซลลูเลสจะทำปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 5.0-6.0 (รูปที่ 41) pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ β-GluI ต่างกัน คือ 3.5-4.0 และ 4.2-5.0 ตามลำดับ (รูปที่ 42) เบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme ทำปฏิกิริยาได้ดีใน pH ที่เป็นกรดมากกว่าเบตา-กลูโคซิเดสใน β-GluI และเอนไซม์ทั้งสองสามารถทำปฏิกิริยาที่ pH เป็นกรดได้ดีกว่าที่ pH เป็นด่าง ซึ่งแตกต่างไปจากเบตา-กลูโคซิเดสของ _T. aurantiacus_ (Tong และคณะ , 1980) และ _A. fumigatus_ (Rudick และ Elbein , 1973) pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ 5.0 pH ที่ต่ำกว่านี้และสูงกว่านี้จะทำให้แอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็ว ที่ pH 3.0 เบตา-กลูโคซิเดสของ _T. aurantiacus_ และ _A. fumigatus_ มีแอคติวิตีเหลืออยู่น้อยมากประมาณ 5 และ 10 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีสูงสุด ในขณะที่เบตา-กลูโคซิเดสของ _A. fumigatus_ Fres.(V_1)นี้ยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึง 90 เปอร์เซนต์ ในรูปที่ 43 แสดงผลของ

pH ต่อการเกิดปฏิกิริยาของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จะเห็นว่า แอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะไวต่อ pH มากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme , CMCaseI และ CMCaseII คือ 5.5,5.3 และ 5.0 ตามลำดับ เมื่อ pH เปลี่ยนไปจากนี้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นแอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ <u>A. aculeatus</u> (Kanamoto และคณะ,1979) และ <u>T. aurantiacus</u> (Tong และคณะ,1980)

สำหรับอะวิเซลเลสpH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยานั้นมีช่วงกว้างมากคือ pH 3.0-5.5 (ใน crude enzyme)และ 3.0-4.5 (Avi) (ดูรูปที่ 44) ซึ่ง pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของ Avi นี้คล้ายกับอะวิเซลเลสใน <u>T. viride</u> (Berghem และ Pettersson ,1975)

ในรูปที่ 45 (ก,ข) จนถึงรูปที่ 48 แสดงผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ต่างๆ เนื่องจาก pH ที่เหมาะสมในเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทุกชนิดจะตกอยู่ที่ pH 4.0 ขึ้นไป จึงศึกษาผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ต่างๆจาก pH 4.0 เป็นต้นไปจนถึง pH 10.0 เพื่อดูว่าตลอดช่วงเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้น เอนไซม์ยังไม่สูญเสียสภาพไป พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก <u>A. fumigatus</u> Fres. (V_1) มีความสามารถทนต่อ pH ตั้งแต่ 4.0-10.0 นานถึง 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme CMCaseI และ CMCaseII และอะวิเซลเลสใน crude enzyme และ Avi สามารถทนต่อ pH 4.0-8.0 ได้นาน 1 ชั่วโมง เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่มีเอนไซม์อะวิเซลเลสพอที่จะทำการทดลองผลของ pH ได้นานจนถึง 20 ชั่วโมง สำหรับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme , CMCaseI และ CMCaseII สามารถทนต่อ pH 4.5-6.0,4.0-8.0 และ 4.0-9.0 ได้นาน 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ C_x ของ <u>T. aurantiacus</u> (Tong และคณะ,1980) เพียงแต่ทนต่อ pH ช่วงแคบกว่า ส่วนเบตา-กลูโคซิเดสใน crude

enzyme และใน β-Glu I จะแตกต่างกันมาก ตรงกันข้ามเลย คือ เบตา-กลูโค-ซิเดสใน crude enzyme จะทนต่อ pH 4.0-8.0 แต่ β-Glu I จะทนต่อ pH 7.0-10.0 นาน 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของเบตา-กลูโคซิเดสของ <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) ที่แตกต่างไปจากเบตา-กลูโคซิเดสของ <u>T.viride</u> (Berghem และ Pettersson ,1974) <u>T.aurantiacus</u> (Tong และคณะ,1980) และนอกจากนี้จากผลการทดลองผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ทุกตัว ชี้ให้เห็นว่าสมควรที่จะเก็บเอนไซม์เซลลูเลสไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.0 เหมาะสมที่สุดเพราะเอนไซม์องค์ประกอบทุกชนิดสามารถทนต่อ pH 5.0 ได้นานถึง 20 ชั่วโมง และการที่แอคติวิตีของเอนไซม์องค์ประกอบโดยมากจะสูญเสียแอคติวิตีเมื่อเก็บไว้ที่ pH สูงๆที่เป็นด่างได้ ชี้ให้เห็นว่าอาจจะเป็นเพราะตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา (active site)ของอะวิเซลเลสมีกรดอะมิโนประเภทที่มีประจุเป็นบวก (basic amino acid) เกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา ที่ pH สูงๆจะมีผลทำให้ประจุหรือรูปร่างของตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปลี่ยน ยังผลให้เอนไซม์ไม่มีโอกาสที่จะจับกับสับสเตรตได้พอดี จึงวัดแอคติวิตีได้น้อยลง

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆจะเห็นว่าไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ใน crude enzyme กับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไม่แตกต่างกันยกเว้นอะวิเซลเลสจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างไปจากเอนไซม์ชนิดอื่นๆ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของอะวิเซลเลสใน crude enzyme แตกต่างไปจาก Avi ซึ่งเป็นอะวิเซลเลสที่บริสุทธิ์บางส่วนด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของอะวิเซลเลสใน crude enzyme คือ 60-70 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมือนกับองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจาก <u>T.aurantiacus</u> (Tong และคณะ, 1980) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของ Avi หลังจากแยกออกมาแล้วจะมีค่าเพียง 45 องศาเซลเซียสเท่านั้น แสดงให้เห็นว่า การทำงานของอะวิเซลเลสของ <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) นี้จะขึ้นกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบอย่างมาก (รูปที่ 49-52)

เอนไซม์เซลลูเลส เบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ β-Glu I อะวิเซลเลสใน crude enzyme และ Avi สามารถจะทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30-60

องศาเซลเซียสได้นานถึง 4 ชั่วโมง โดยเกือบไม่สูญเสียแอคติวิตีไปเลย (เพียง 5-10 เปอร์เซนต์) นอกจากคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme CMCase I และ CMCase II เท่านั้นที่จะมีการสูญเสียแอคติวิตีไปมากกว่าเอนไซม์อื่นเล็กน้อยประมาณ 15-25 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีค่าอยู่ในช่วง 60-70 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะเวลาที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีนานเพียง 1 ชั่วโมง แอคติวิตียังไม่สูญเสียไปมากนัก (รูปที่ 53-56) หรือในการวัดแอคติวิตีนั้นมีสับสเตรตอยู่ด้วย สับสเตรตอาจจะเป็นตัวช่วยป้องกันการสูญเสียแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในขณะที่ตอนศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ เราเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมงโดยไม่มีสับสเตรตอยู่ด้วย

ในตารางที่ 14 เป็นตารางที่สรุปค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ของเอนไซม์ต่างๆที่อุณหภูมิ 70,80 และ 90 องศาเซลเซียสไว้ แน่นอนที่อุณหภูมิสูงค่า $t_{\frac{1}{2}}$ จะต้องต่ำกว่าค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ที่อุณหภูมิต่ำ ค่า $t_{\frac{1}{2}}$นี้จะเป็นค่าที่แสดงถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ ซึ่งจะช่วยชี้ความแตกต่างของเอนไซม์ได้ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ที่ 80 และ 90 องศาเซลเซียสจะเป็นค่าที่ใช้เป็นดัชนีที่ดีที่สุด ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบค่า $t_{\frac{1}{2}}$นี้จะเห็นได้ว่าค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ของเบตา-กลูโคซิเดส β-GluI และอะวิเซลเลสAvi แตกต่างไปจากเบตา-กลูโคซิเดสและอะวิเซลเลสใน crude enzyme โดยที่เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ต่ำกว่าใน crude enzyme ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเบตา-กลูโคซิเดสและอะวิเซลเลสใน crude enzyme สามารถจะทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์ที่แยกออกมา ส่วนค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ของคาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลส CMCase I สูงกว่าใน crude enzyme แต่ค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ของคาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส CMCase IIไม่แตกต่างจากใน crude enzyme มากนัก ซึ่งชี้ให้เห็นว่า CMCase I สามารถจะทนต่ออุณหภูมิได้ดีกว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน crude enzyme แต่ CMCaseII มีคุณสมบัติในการคงทนต่ออุณหภูมิแตกต่างจาก crude enzyme น้อยมาก

เนื่องจากเบตากลูโคซิเดสซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลโลไบโอสเป็นกลูโคส และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการช่วยให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสจนได้กลูโคสนั้นดำเนินไปอย่างสมบูรณ์ การเกิดปฏิกิริยาของเบตา-กลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งโดยกลูโคส (Woodward และArnold ,

1981) ดังนั้นจึงได้ศึกษาดูว่าเบตา-กลูโคซิเดสจาก <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) นี้จะถูกยับยั้งโดยกลูโคสมากน้อยเพียงไร และเป็นแบบไหน เมื่อเอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วจะแตกต่างไปจากเมื่อเป็น crude enzyme หรือไม่ พบว่าการยับยั้งปฏิกิริยาของเบตา-กลูโคซิเดสจาก <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) โดยกลูโคสทั้งใน β-Glu I และใน crude enzyme เป็นแบบ competitive inhibition (รูปที่ 57 และ 58) ค่า K_i ของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ β-Glu I เมื่อมีกลูโคสเป็นตัวยับยั้งเท่ากับ 5.0 และ 6.20 มิลลิโมล/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 15) แสดงให้เห็นว่า β-GluI มีแอฟฟินิตีต่อกลูโคสน้อยกว่าเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme β-Glu I -กลูโคสคอมเพล็กซ์จะแตกตัวได้ง่ายกว่าเบตา-กลูโคซิเดส-กลูโคสคอมเพล็กซ์ใน crude enzyme นั่นคือ β-Glu I จะถูกยับยั้งโดยกลูโคสน้อยกว่าเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme

สำหรับ β-GluIII นั้นมีปริมาณน้อย ดังนั้นคุณสมบัติของ β-Glu III บางคุณสมบัติจึงไม่ได้รับการศึกษา

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์อาจทำได้อีกวิธีหนึ่งโดยวิเคราะห์จากการทดลองเก็บเอนไซม์เซลลูเลสของ <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) ที่อุณหภูมิ -20,4 และ 30 องศาเซลเซียส เมื่อมีและไม่มี 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์ (ตารางที่ 17) พบว่าสามารถเก็บเอนไซม์เซลลูเลสของ <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) ที่ -20 และ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 6 เดือนโดยที่มีหรือไม่มีโซเดียมเอไซด์ก็ได้ และเมื่อพิจารณาอัตราการสูญเสียแอคติวิตีคาดว่าอาจจะเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสนี้ได้นานเป็นปี แต่ถ้าจะเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจำเป็นจะต้องมีโซเดียมเอไซด์ด้วย จะเก็บได้นานถึง 1 เดือน การเก็บนี้จะต้องเก็บในขวดที่มีจุกปิดด้วย โซเดียมเอไซด์ที่เติมลงไปนี้จะป้องกันการเจริญของจุลชีพในสารละลายเอนไซม์ โปรตีนไม่ถูกใช้ไปในการเจริญของจุลชีพ แอคติวิตีจึงไม่สูญเสีย โซเดียมเอไซด์ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ จะเห็นได้จากเมื่อเก็บ crude enzyme ที่ -20 และ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่เหมาะในการเจริญของจุลชีพ พบว่าเมื่อมีและไม่มีโซเดียมเอไซด์แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองในข้อ 4.16 และรูปที่ 18 จะเห็นว่า <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) นั้นสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อยได้ และยังสามารถเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสที่ปราศจากเซลล์ของราได้ด้วย

จึงนำเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมได้นั้นมาทดสอบดูว่าจะสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือใช้เหล่านี้ได้ไหม และจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้มากน้อยเพียงใด พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้โดยตรง โดยเฉพาะฟางข้าว และชานอ้อยถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงกว่าแอลฟา-เซลลูโลส ทั้งนี้อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้เป็น **crude enzyme** ซึ่งพบว่ามีเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ด้วย (ตารางที่ 3 และรูปที่ 16 และ 17) ฟางข้าวและชานอ้อยจะมีไซแลนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยนอกจากเซลลูโลสแล้ว ไซแลนจะถูกเอนไซม์ไซลาเนสย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ไซโลส จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวและชานอ้อยโดยเอนเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลส แต่ผลิตผลที่ได้จนถึงระดับน้ำตาลกลูโคสปริมาณต่ำมากไม่ว่าจะเป็นการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลสหรือวัสดุเหลือใช้ชนิดใดก็ตาม อัตราส่วนระหว่างกลูโคส : น้ำตาลรีดิวซ์ตัวอื่นเมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลส ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต คือ 1:3, 1:10.5, 1:7 และ 1:6 ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเซลลูเลสของ <u>*A. fumigatus*</u> Fres.(V_1) ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีเบตา-กลูโคซิเดสเป็นองค์ประกอบในปริมาณค่อนข้างต่ำ สำหรับข้อนี้อาจจะแก้ไขได้ เนื่องจากปริมาณและชนิดขององค์ประกอบของเซลลูเลสใน <u>*A. fumigatus*</u> Fres.(V_1) นี้ขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมเอนไซม์ ดังนั้นถ้าพยายามศึกษาวิธีเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมเพื่อให้มีเบตา-กลูโคซิเดสเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงขึ้นก็น่าจะช่วยได้ หรืออาจจะพยายามปรับปรุงสายพันธุ์ของ <u>*A. fumigatus*</u> Fres.(V_1) เสียใหม่ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีเบตา-กลูโคซิเดสเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม <u>*A. fumigatus*</u> Fres.(V_1) นี้น่าจะเป็นเชื้อราที่เหมาะสมตัวหนึ่งที่จะใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้ด้วยเหตุผลหลายประการ อาทิเช่น

1) <u>*A. fumigatus*</u> Fres.(V_1) สามารถเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส และในช่วง pH ที่กว้างตั้งแต่ 4.0-6.0 หรืออาจจะถึง pH 7.0 (รูปที่ 7,8 และ 12) ทำให้เหมาะที่จะใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส เนื่องจากมีรายงานของ Stutzenberger และคณะ (1970) ที่ทำการศึกษาแอคติวิตีของเซลลูเลสในกองขยะหมัก พบว่าในการย่อยสลายเซลลูโลสจะมีการสะสม

ความร้อน อุณหภูมิจะสูงขึ้นจากอุณหภูมิห้องจนถึง 60 องศาเซลเซียส แล้วจะค่อยๆลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงของ pH จาก 5.0 ถึง 7.5 จะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและ pH มาก จุลชีพที่จะสามารถเจริญอยู่ได้จะต้องมีความสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและ pH ได้

2) เอนไซม์ที่เตรียมได้จาก <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) นอกจากจะมีแอคติวิตีของเซลลูเลสสูงแล้ว ยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซลาเนสสูงมากด้วยเมื่อมีตัวเหนี่ยวนำ เหมาะที่จะนำมาใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งมักจะมีไซแลนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่รองจากเซลลูโลส

3) <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสได้ในระดับสูงมาก เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอน ซึ่งน่าจะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่จะนำไปใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส ให้ได้ผลิตผลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

แม้ว่า <u>A.fumigatus</u> Fres.(v_1) จะเป็นตัวที่เหมาะสมที่จะใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสก็ตาม แต่มีปัญหาอยู่ข้อหนึ่งที่จะต้องคำนึงถึง คือ มีรายงานว่า <u>A.fumigatus</u> บางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ (Aspergillosis) กับคนและสัตว์ (Lacey ,1968) แต่อย่างไรก็ดีได้เคยมีผู้นำเอา <u>A.fumigatus</u> มาใช้ประโยชน์ในการอุตสาหกรรม อาทิเช่น Pringshem และ Lichtenstein (1920) ได้เพาะเลี้ยง <u>A.fumigatus</u> เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้แก่ฟางข้าวสำหรับเป็นอาหารสัตว์ Reade และ Gregory (1975) ได้เพาะเลี้ยง <u>A.fumigatus</u> บนมันสำปะหลัง ผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรตีนเพื่อใช้เป็นอาหารหนู แสดงว่า <u>A.fumigatus</u> เหล่านี้ไม่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ สำหรับ <u>A.fumigatus</u> Fres.(V_1) นี้ Dr. R.A. Samson ที่ Mycology Section of Baarn ผู้ที่ทำการวิเคราะห์เชื้อราชนิดนี้ได้ให้คำรับรองว่ายังไม่เคยมีผู้ป่วยเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้มาก่อนเลย

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถแยกเชื้อรา **A.fumigatus** Fres.(V_1) ได้จากกองขยะที่โรงกำจัดมูลฝอย รามอินทรา กรุงเทพมหานคร ซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้สูงกว่าเชื้อรามาตรฐาน **T.viride** QM 9414

2. เมื่อเลี้ยง **A.fumigatus** Fres.(V_1) ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด คือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลลูโลส (1%) เป็นแหล่งของคาร์บอน ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน (เขย่าขวดที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที) พบว่าได้เซลลูเลสที่มีแอคติวิตีโดยเฉลี่ย 450 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อใช้แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสับสเตรตหรือ 0.17 หน่วย /มิลลิลิตร และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซลาเนส 75 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตีโดยเฉลี่ย 475 หน่วย/มิลลิลิตร และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซลาเนส 1150 หน่วย/มิลลิลิตร

3. กลูโคสความเข้มข้น 25 มิลลิโมล/ลิตร จึงเริ่มมีผลกระทบต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งปริมาณและช่วงเวลาในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด

4. สามารถเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสจาก **A.fumigatus** Fres.(V_1) ปริมาณมากได้ 2 วิธีคือ โดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์และโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า เมื่อมีแอลฟา-เซลลูโลส (1%) เป็นสารต้นตอคาร์บอน ในสภาวะที่เหมาะสมการเตรียมเอนไซม์โดยวิธีทั้งสองนี้ให้ความแตกต่างกันหลายประการคือ ช่วงเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่สังเคราะห์ได้ ปริมาณและชนิดขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

5. จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% ผ่านคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-100 และคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก **A.fumigatus** Fres.(V_1) ประกอบด้วย อะวิเซลเลส 1 ชนิด คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างน้อย 2 ชนิด คือ CMCase I และ CMCase II และเบตา-กลูโคซิเดส 3 ชนิด คือ β-Glu I, β-Glu II และ β-Glu III

6. อะวิเซลเลส มีน้ำหนักโมเลกุล 32,000 ดาลตันโดยเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเด็กซ์ จี-100) pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ pH 3.0-4.5

และ 45 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อpH ช่วง 4.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้นาน 20 ชั่วโมง และทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 30-60 องศาเซลเซียสที่pH 5.0 นาน 4 ชั่วโมง ค่า K_m เมื่อใช้อะวิเซลเป็นสับสเตรตมีค่า 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

7. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส CMCaseI และ CMCase II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 28,750 ดาลตันโดยเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเด็กซ์ จี-100) pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของ CMCase I คือ pH 5.3 และ 55 องศาเซลเซียส CMCase I สามารถทนต่อ pH ในช่วง 4.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานถึง 20 ชั่วโมง และทนต่ออุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียสที่ pH 5.0 ได้นาน 1 ชั่วโมง สำหรับ CMCase II pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ pH5.0 และ 65-70 องศาเซลเซียส CMCaseII สามารถทนต่อ pH ในช่วง 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานถึง 20 ชั่วโมง และทนต่ออุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส ที่ pH5.0 ได้นาน 1 ชั่วโมง ค่า K_m ของ CMCase I และ CMCase II เมื่อมีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรต ที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 1.80 และ 4.72 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 3.82 และ 4.20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

8. เบตา-กลูโคซิเดส จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเด็กซ์ จี-200) พบว่า β-GluI มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดาลตัน และ β-Glu III มีน้ำหนักโมเลกุล 240,000 ดาลตัน pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของ β-GluI คือ pH4.0-5.0 และ 60 องศาเซลเซียส β-Glu I สามารถทนต่อ pH ในช่วง 6.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้นาน 20 ชั่วโมง และทนต่ออุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.0 ได้นาน 4 ชั่วโมง สำหรับ β-GluIII มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่ 50-55 องศาเซลเซียส ค่า K_m ของ β-GluI และ β-GluIII เมื่อมีออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์เป็นสับสเตรต ที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่า 0.88 และ 0.47 มิลลิโมล/ลิตร ตามลำดับ

9. จากการศึกษาค่า K_i ของเบตา-กลูโคซิเดสใน crude enzyme และ β-GluI เมื่อมีกลูโคสเป็นตัวยับยั้ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 5.0 และ 6.20 มิลลิโมล/ลิตร ตามลำดับที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

10. ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ A.fumigatus Fres.(V_1) สามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด เป็น

สารตั้นตอคาร์บอนได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอน จะได้เอนไซม์เซลลูเลสปริมาณสูงที่สุด

11. สามารถเก็บเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดย **A. fumigatus** Fres.(V_1) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 เดือน เมื่อมีหรือไม่มี 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์โดยสูญเสียแอคติวิตีไปประมาณ 5 เปอร์เซนต์เท่านั้น และเมื่อมี 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์จะเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน โดยที่สูญเสียแอคติวิตีไปประมาณ 5 เปอร์เซนต์

12. เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดย **A. fumigatus** Fres.(V_1) สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพดได้โดยให้อัตราส่วนผลผลิตน้ำตาลกลูโคส : น้ำตาลรีดิวซ์อื่นๆเท่ากับ 1 : 10.5, 1 : 7 และ 1 : 6 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย