การศึกษาลักษณะเฉพาะและสมบัติของเอนไซม์ Endo-1,4-β-Glucanases จาก *Clostridium josui*

ส.ค. 2535

ปริญญานิพนธ์

ของ

อรวรรณ แซ่โค้ว

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2535

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

181829

คณะกรรมการควบคุม และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน

(ดร.จิราภรณ์ สุขุมาวาสี)

.....กรรมการ

(ดร.สายสนม ธรรมพิทักษ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน

(ดร.จิราภรณ์ สุขุมาวาสี)

.....กรรมการ

(ดร.สายสนม ธรรมพิทักษ์)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผศ.พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศ.ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่...๕...เดือน.....พ.ศ. 2535

ขอขอบคุณ พี่ ๆ และเพื่อนนิสิต หลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ในภาควิชาเคมีชีวภาพ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนจัดสรรเงินทุนอุดหนุนการวิจัย ซึ่งใช้ในการศึกษาวิทยานิพนธ์นี้

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้สละแรงกายและใจเพื่อสนับสนุนการศึกษาและเป็นผู้ให้กำลังใจอันสำคัญยิ่งต่อข้าพเจ้า ทำให้สามารถฟันฝ่าอุปสรรคต่าง ๆ มาได้ ขอบคุณ พี่ และน้อง ๆ ทุกคนในครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นแรงใจที่สำคัญโดยตลอด

อรวรรณ แซ่โค้ว

พฤษภาคม 2535

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส	10
	การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์	11
	เอนไซม์เซลลูเลส	12
	เอนไซม์เซลลูเลสจากรา	13
	เอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ	21
	แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Clostridium josui*	23
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	28
2	วิธีการวิจัย	
	วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และก๊าซที่ใช้	29
	การเลี้ยงเชื้อ	35
	การแยกและทำเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์	44
	การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์	56
3	ผลการวิจัย	
	ผลการศึกษาตัวแปรต่างๆในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์	58
	ผลการทำเอนไซม์ให้เข้มข้น	62
	ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี	64
	ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์	78

บทที่ หน้า

4 สรุปผลการวิจัย

อภิปรายและสรุปผล..... 87

ข้อเสนอแนะ..... 95

บรรณานุกรม..... 97

ภาคผนวก..... 103

ประวัติผู้วิจัย..... 113

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 การใช้ประโยชน์จากสารประกอบเซลลูโลส..... 2

2 ส่วนผสมของแผ่นเจลสำหรับการทำ อิเลคโตรฟอรีซิส..... 49

3 สรุปขั้นตอนการแยกเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสให้บริสุทธิ์..... 70

4 ผลของสารเคมีและไอออนโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์..... 86

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 การแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช..... 4

2 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส..... 5

3 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส..... 6

4 ลักษณะของไฟบริล..... 7

5 โครงสร้างของเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป..... 8

6 ลำดับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส..... 15

7 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลส..... 16

8 ความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆในระหว่างการผลิตเอนไซม์..... 60

9 การแยกโปรตีนของเอนไซม์ โดยใช้คอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ขนาด
2x67 เซนติเมตร ชะด้วย เกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์
ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เก็บแยกส่วนหลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.2.2..... 65

10 การแยกโปรตีนของเอนไซม์จากคอลัมน์ เซฟาดริล เอส-200 ขนาด
1.2x120 เซนติเมตร ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์
ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง
6.8 ด้วยอัตราเร็ว 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เก็บแยกส่วนหลอดละ
5 ลูกบาศก์เซนติเมตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.3.2..... 67

ภาพประกอบ หน้า

11 การแยกโปรตีนของเอนไซม์ด้วยเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์ โมโนคิว ขนาด 0.5x5 เซนติเมตร ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.4..... 69

12 แถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรฟอริซิส รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.2.3..... 72

13 แถบโปรตีนของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรฟอริซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 9 รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.5.3.3..... 73

14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Mobility ของโปรตีนมาตรฐาน และ log ของน้ำหนักโมเลกุล ในการหาน้ำหนักหน่วยย่อยของ CMCase I, CMCase II โดยวิธี SDS PAGE รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.5.3..... 74

15 การประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ด้วยวิธีของเจล ฟิลเตรชัน โดยใช้คอลัมน์ เซฟาคริล เอส-200 ขนาด 1x70 เซนติเมตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.6.1..... 76

16 ความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} กับ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน บน เซฟาคริล เอส-200 รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.6.3..... 77

17 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของ CMCase I รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.1..... 79

ภาพประกอบ หน้า

18 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของ CMCase II
รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.1..... 80
19 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ CMCase
รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.2..... 81
20 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase I
รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.3..... 83
21 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase II
รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.3..... 84
22 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase
รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.4..... 85
23 อุปกรณ์และตู้ถ่ายเชื้อ..... 104
24 อาหารเลี้ยงเชื้อใน Sakaguchi flask..... 105
25 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก..... 106
26 การเจริญเติบโตของเชื้อ หลังจากเลี้ยงในถังหมักเป็นเวลา 50 ชั่วโมง..... 107
27 Crude enzyme ที่ได้หลังการเก็บเกี่ยวออกจากถังหมัก ซึ่งจะใช้ในการทำให้บริสุทธิ์..... 108
28 อัลตราฟิลเตอร์ ที่มี crude enzyme บรรจุอยู่..... 109
29 การทำเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน..... 110
30 อุปกรณ์สำหรับวัดหาความหนืดของสารละลาย CMC..... 111
31 กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA ตามวิธีทดลองของลาวรี..... 112

บทที่ 1

บทนำ

ในอดีตพลังงานที่นำมาใช้ในชีวิตประจำวันไม่ว่าจะเป็นน้ำมันเชื้อเพลิง หรือกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในบ้านเรือน ส่วนใหญ่ได้จากน้ำมันดิบประมาณร้อยละ 43 ก๊าซธรรมชาติร้อยละ 35 และถ่านหินร้อยละ 19 (Spano. 1976) เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า แหล่งพลังงานเหล่านี้มีจำนวนจำกัด และนับวันก็จะหมดไปจากโลกโดยไม่สามารถสร้างทดแทนขึ้นมาได้อีก ดังนั้น จึงได้มีการค้นคว้าและพัฒนาแหล่งพลังงานในรูปแบบต่าง ๆ ให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่และให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับความต้องการของผู้บริโภค

แสงอาทิตย์เป็นต้นกำเนิดของพลังงานในสิ่งมีชีวิต พืชทำการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยแสงอาทิตย์และสารสีเขียวที่เรียกว่า "คลอโรฟิล" (chlorophyll) ผลที่ได้จากการสังเคราะห์แสงคือ พลังงานที่ถูกเก็บสะสมไว้ในพืชสีเขียว ที่พร้อมจะนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป รวมทั้งอินทรียสารพวกเซลลูโลส(cellulose) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของเซลล์พืชทุกชนิด ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเซลลูโลสเป็นอินทรียสารที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ และจะคงมีอยู่ตลอดไปตราบเท่าที่โลกยังมีแสงอาทิตย์ และพืชสีเขียวอยู่

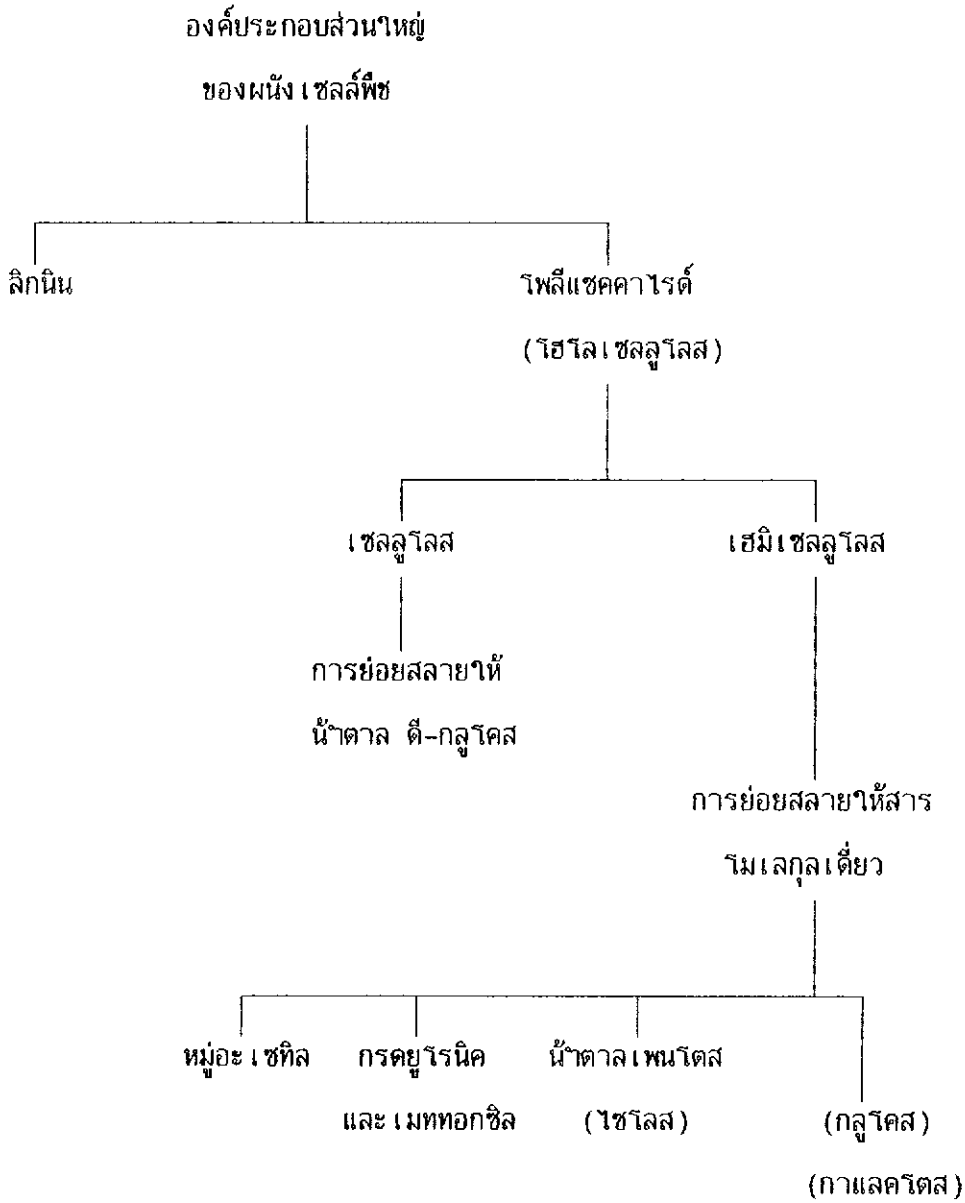
ประเทศไทยเป็นประเทศแถบเอเชียอาคเนย์ ที่ประชากรส่วนใหญ่มีรายได้หลักจากการประกอบอาชีพเกษตรกรรม ภายหลังการเก็บเกี่ยวพืชผลจะมีวัสดุเหลือทิ้งอยู่หลายประเภท เช่น ฟางข้าว แกลบ ชานอ้อย ซังข้าวโพด ขุยมะพร้าว ฯลฯ วัสดุเหล่านี้ เกษตรกรมักจะนำออกจากไร่นาโดยไม่ได้ใช้ประโยชน์ การกำจัดวัสดุเหลือทิ้งที่พบอยู่เสมอคือ การเผาทิ้งซึ่งเป็นการสูญเสียธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชออกไปจากดิน และยังทำให้ธาตุอาหารในดินลดปริมาณลงด้วย ปัจจุบันได้พยายามที่จะนำวัสดุเหลือใช้เหล่านี้ กลับมาทำให้เป็นประโยชน์แทนการกำจัดทิ้ง เนื่องจากวัสดุเหล่านี้มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรงในอุตสาหกรรมหลายประเภท ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 การใช้ประโยชน์จากสารประกอบเซลลูโลส

วัสดุเซลลูโลสเหลือใช้	การใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน
- ชานอ้อย, ฟางข้าว, พืชไม้เนื้ออ่อน	อุตสาหกรรมการทำเยื่อและกระดาษ, อุตสาหกรรมการย่อยสลายด้วยกรด, เชื้อเพลิง
- ไม้พุ่ม, วงปีสั้น	อุตสาหกรรมการทำเยื่อและกระดาษ, อุตสาหกรรมไม้อัด
- เศษไม้จากในป่า	อุตสาหกรรมการทำเยื่อและกระดาษ, อุตสาหกรรมไม้อัด
- พีต (Peat)	เชื้อเพลิง, เป็นตัวปรับปรุงคุณภาพดิน
- เส้นใยเหลือใช้จากโรง-ทำเยื่อกระดาษ	นำกลับไปใช้ในอุตสาหกรรมแผ่น-กระดาษ, เชื้อเพลิง
- เศษกระดาษ	นำกลับไปใช้ในอุตสาหกรรมแผ่น-กระดาษ, อุตสาหกรรมการย่อยสลายด้วยกรด
- เศษเปลือกไม้ต่าง ๆ	เชื้อเพลิง, เป็นตัวปรับปรุงคุณภาพดิน

และเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส พบว่าเป็นสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ สามารถนำมาย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง จนเป็นน้ำตาลกลูโคส(glucose)ในที่สุด (Linko. 1979) ซึ่งน้ำตาลกลูโคสนี้สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน(carbon source)ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อผลิตสารที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เช่น โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein), วิตามิน(vitamin), กรดอินทรีย์(organic acid), ยาปฏิชีวนะ (antibiotic), แอลกอฮอล์(alcohol) และเคมีภัณฑ์(chemical products)บางชนิด ซึ่งได้จากน้ำมันปิโตรเลียม(petrolium oil)(Mandels and Sternberg. 1976 ; Ohmiya, Kurachi and Shimizu. 1985 ; Ghose and Ghosh. 1978 ; Shinmyo, Martinez and Deman. 1979) รวมทั้งใช้ในการผลิตอะซิโตบิวทานอล (acetobutanol) โดยเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มคลอสตริเดียม(*Clostridium*)ในกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน ในส่วนของแอลกอฮอล์ซึ่งนอกจากจะใช้ทำเครื่องดื่มหลายชนิดแล้ว ยังเป็นแหล่งสำคัญทางพลังงานอีก คือใช้เป็นส่วนประกอบในก๊าซโซฮอล์ (gasohol ; เป็นส่วนผสมระหว่างเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)ร้อยละ 10 กับ ก๊าซโซลีน (gasoline) ร้อยละ 90) ประมาณว่า เศษกระดาษ 1 ตัน สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 0.5 ตัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการหมักให้เกิดเอธิล-แอลกอฮอล์ได้ 78 แกลลอน (Schlgel and Barnea. 1976)

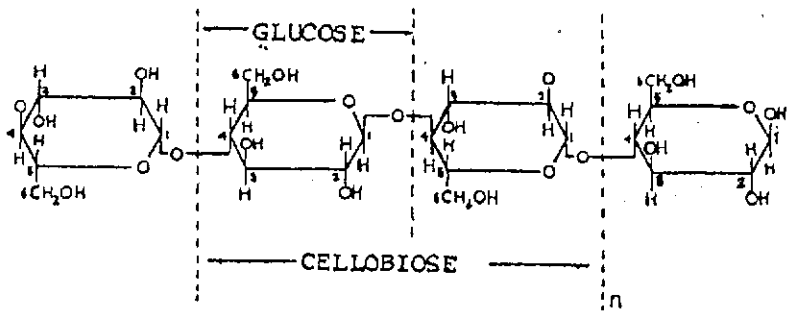
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ พบว่ามีอินทรียสาร(organic material)เป็นองค์ประกอบ 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ เซลลูโลส (cellulose) ประมาณ ร้อยละ 30-50 , เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)ร้อยละ 20-40 และลิกนิน (lignin) ร้อยละ 10-15 ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 การแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช (Grenlch. 1973)

1.1 เซลลูโลส (cellulose)

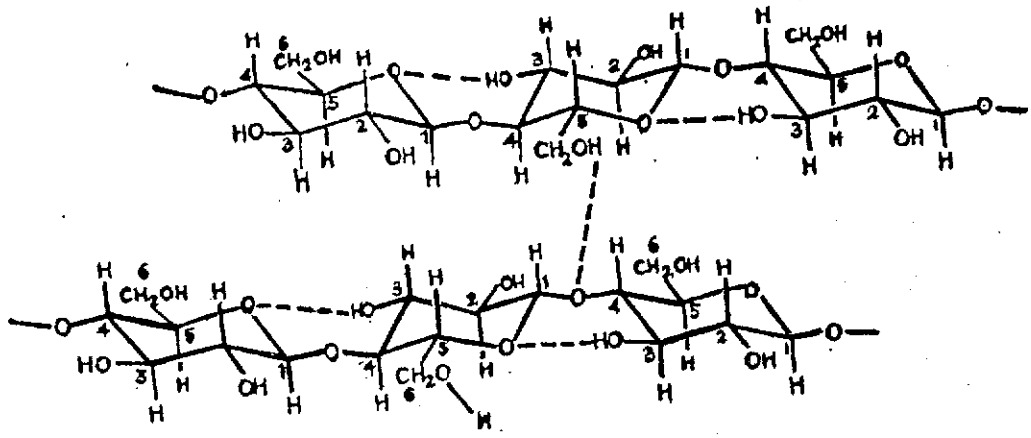
เป็นคาร์โบไฮเดรต(carbohydrate) ชนิดพอลิแซคคาไรด์(polysaccharide) มีมากในผนังเซลล์ของพืช เซลลูโลสที่ได้จากฝ้ายเป็นเซลลูโลสที่บริสุทธิ์กว่าเซลลูโลสที่ได้จากต้นพืชชนิดอื่น ๆ (Rosenberg. 1978) เซลลูโลสประกอบด้วย โมเลกุลของดี-กลูโคส(D-glucose) ในรูปเบตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก(glycosidic linkage) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 ของโมเลกุลของดี-กลูโคสกับ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุลถัดไป ดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส (Devidson. 1967)

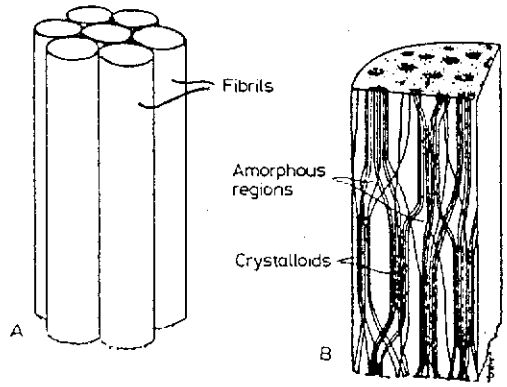
ลำดับขั้นของการเกิดพอลิเมอร์ของโมเลกุลของเซลลูโลส (degree of polymerization) จะมีหน่วยย่อยของดี-กลูโคส ตั้งแต่ 15 หน่วย จนถึง 14,000 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลมีค่า 0.2-2 x 10^6 ดาลตัน (น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสเท่ากับ 180.16 ดาลตัน) ความยาวของหน่วยดี-กลูโคสเท่ากับ 0.515 นาโนเมตร และความยาวทั้งหมดของโมเลกุลเซลลูโลส มีค่ามากกว่า 5 ไมโครเมตร

รูปแบบ (conformation)ของการจัดเรียงตัวของหน่วย ดี-กลูโคส ในสายเซลลูโลส จะมีลักษณะเป็นรูปเก้าอี้ (chair form) แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลส(intramolecule) จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน(hydrogen bond) สองแห่งคือ ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับ ออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับ 2 ของโมเลกุลถัดไป นอกจากนี้ยังมีการเชื่อมต่อ (link) ระหว่างสายเซลลูโลส (intermolecule) ที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ในอีกสายหนึ่ง ดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 ลักษณะโครงสร้างเซลลูโลส(Nisizawa. 1973)

การจัดเรียงตัวเหล่านี้ทำให้สายเซลลูโลสขนานกันเป็นชั้น ๆ อย่างมีระเบียบในลักษณะที่เรียกว่า คริสตัลไลน์ไมเซลล์ (crystalline micelles) โดยแต่ละไมเซลล์ประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา ไมเซลล์ประมาณ 10-20 ไมเซลล์จะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) ดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 ลักษณะของไฟบริล (Nisizawa. 1973)

A : กลุ่มไฟบริลที่เรียงตัวขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

B : ภาพตัดตามยาวของไฟบริล

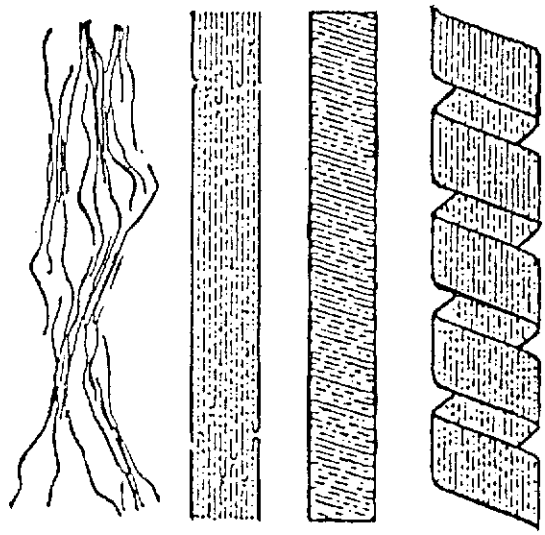
สามารถจะแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช ตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ คือ

1. ฟริงจ์ ไมเซลล์(fringe micelles) คือไมโครไฟบริลที่เรียงตัวเป็นริ้ว ๆ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก(crystalline) และ อสัณฐาน(amorphous) ภาพประกอบ 5 ก

2. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส ภาพประกอบ 5 ข

3. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้ง-ฉากกับแกนของริบบิน และริบบินจะม้วนเป็นเกลียว (helix) ภาพประกอบ 5 ค

ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบ ๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน นอกจากนี้ยังมีพอลิแซคคาไรด์อื่น ๆ ที่ปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน (xylan), แมนแนน (mannan), พอลิยูโรไนด์ (polyuronide), อะระแบน(araban), กาแลคแตน(galactan) พอลิแซคคาไรด์เหล่านี้มักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส



ก. ข. ค.

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป

ก. ฟริงจ์ ไมเซลล์(fringe micelles) ในไมโครไฟบริล

ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา

(Nisizawa. 1973)

ปกติเซลลูโลสไม่ละลายน้ำ, ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ สารละลายด่างอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรด หรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่างได้เป็น 3 ชนิดคือ

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(sodium hydroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 17.5

2. เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5

3. แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สุด สามารถละลายได้ดีทั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 และสารละลายกรดเจือจาง

1.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เป็นอินทรียสารที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส และถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์(polymer)ของน้ำตาลเพนโตส(pentose)มีลักษณะเป็นเฮเทอโรจีเนียส(heterogenous)โดยประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์หลายชนิดมารวมกัน มีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา ซึ่งแตกต่างจากเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงอย่างมีระเบียบ น้ำหนักโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสจะต่ำกว่าเซลลูโลส ขนาดของโมเลกุลมีความยาว 30-50 หน่วย และมีองค์ประกอบหลักคือ ไซแลน นอกจากนี้ยังมี กลูแคน(glucan), แมนแนน และกาแลคแตน เฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อยสลายจะได้เป็นน้ำตาลเพนโตส และเฮกโซส (hexose) ได้แก่ ไซโลส(xylose), แมนโนส(mannose), กาแลคโตส(galactose) และอะราบิโนส (arabinose)

1.3 ลิกนิน (Lignin)

เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืช รองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบใน secondarylayer ของผนังเซลล์และใน middle lamella ของพืช โดยทั่วไปลิกนินจะอยู่ภายในโครงสร้างของพืช บริเวณรอบ ๆ เซลลูโลส และจะช่วยป้องกันเซลลูโลสจากการถูกย่อยสลาย ในพืชที่อ่อนอยู่มีลิกนินเพียงเล็กน้อยและจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อพืชแก่ขึ้น โครงสร้างของลิกนินเป็นสารประกอบอะโรมาติก(aromatic compound) ที่ประกอบด้วยหมู่เมททอกซิล (methoxyl group, $-OCH_3$), หมู่ไฮดรอกซิล(hydroxyl group, -OH) และส่วนที่เป็นฟีโนลิก (phenolic) โดยปกติไม่สามารถระบุได้ว่าลิกนินเป็นสารประกอบประเภทใดเพราะประกอบ

ไปด้วยหมู่ฟังก์ชันหลายหมู่ ทั้งนี้เนื่องจากลิกนินจะไม่อยู่ในลักษณะตัวเดียวโดด ๆ แต่จะเกาะกันเป็นสายยาวซึ่งมีอยู่หลายรูปแบบ ลิกนินไม่ละลายในน้ำและสารอินทรีย์ทุกชนิด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของลิกนินมีหลายชนิด ได้แก่ กรดน้ำส้ม(acetic acid), กรดออกซาลิค (oxalic acid), กรดซัคซินิค(succinic acid), วานิลลิน(vanillin), กรดวานิลลิค (vanillic acid) และดีไฮโดรไดวานิลลิน(dehydrodivanillin)

นอกจากนั้นแล้วยังมีปฏิกิริยาอื่น ในการย่อยสลายลิกนินอีกคือ ปฏิกิริยาเมทธิลเลชั่น (methylation) และการย่อยสลายด้วยด่างเข้มข้น ได้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากกว่า 30 ชนิด ซึ่งชี้ให้เห็นถึงลักษณะโครงสร้างของลิกนินที่ประกอบไปด้วยหมู่ฟังก์ชันหลายหมู่

2. <u>การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส</u>

เซลลูโลสในธรรมชาติหรือวัสดุเหลือใช้ที่เป็นเซลลูโลส ก่อนที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งของสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จะต้องนำมาปรับให้มีขนาดหรือมีสภาพที่เหมาะสมเนื่องจากสารประกอบเซลลูโลสเป็นพอลิแซคคาไรด์ เมื่อถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีเพียงชนิดเดียวคือ กลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะประกอบไปด้วยกลูโคส, เซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกแซคคาไรด์(oligosaccharide)ชนิดต่าง ๆ

การย่อยสลายสารประกอบที่เป็นเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

2.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis) เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดเช่น กรดไฮโดรคลอริค(hydrochloric acid) หรือกรดซัลฟุริค (sulfuric acid) ปกติเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นผลึก (crystalline structures) จะมีความต้านทานต่อกรดได้สูงมาก จำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงในการย่อยสลาย อีกทั้งจะต้องใช้อุณหภูมิสูงเพื่อที่จะให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส การใช้กรดที่เข้มข้นและมีความสามารถในการกัดกร่อนสูง อุปกรณ์ที่ใช้จะต้องทนต่อกรดได้เป็นอย่างดี ซึ่งส่วนใหญ่จะมีราคาค่อนข้างแพง ทำให้การผลิตกลูโคสวิธีนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก ภายใต้สภาวะเช่นนี้ กลูโคสที่เกิดขึ้นบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับกรดที่ใช้ในการย่อยสลาย เกิดเป็นสารประกอบชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ

เช่นเฟอร์ฟูรัล(furfural) และไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟูรัล(hydroxy methyl furfural) นอกจากนี้ กรดที่ใช้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น ๆ ที่ปนมากับเซลลูโลสได้ด้วย นั่นก็คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยใช้กรดจะไม่มีความจำเพาะ (nonspecificity) ต่อเซลลูโลส จากการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้กลูโคสในปริมาณต่ำ รวมทั้งมีผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการปะปนอยู่ด้วย วิธีการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยสารเคมีจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

2.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เป็นการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะได้จากรา(fungi)และแบคทีเรีย(bacteria) เอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยสลายเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคส เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่สภาวะไม่รุนแรง จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการย่อยสลายเป็นเวลาหลายชั่วโมงถึงหลายวัน แต่การใช้เอนไซม์นี้มีข้อดีกว่าการใช้กรดคือ เอนไซม์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อสารประกอบเซลลูโลส โดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ นอกจากนี้กลูโคสที่เกิดขึ้นจะถูกใช้ต่อไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันไปตามธรรมชาติของจุลินทรีย์

3. <u>ผลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์</u>

จากการศึกษาแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีจุลินทรีย์ (microorganism)หลายชนิดที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ เช่น แบคทีเรีย, รา และ แอคติโนมัยซิส (actinomyces) จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้แตกต่างกัน ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน ทั้งนี้สภาพแวดล้อมจะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุพวกเซลลูโลสแตกต่างกันออกไป เมื่อเซลลูโลสถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ที่ละลายน้ำได้(soluble fragment) โมเลกุลเหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานและสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ ผลจากการย่อยสลาย

โดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาพที่มีออกซิเจนคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารประกอบไฮโดร - คาร์บอน นอกจากนี้ยังมีสารตัวกลาง (intermediate product)อื่น ๆ ในปริมาณที่ไม่มากนัก (Prescott and Dunn. 1959) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้ จะต่างจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน เพราะการย่อยสลายจะเกิดไม่สมบูรณ์มีสารตัวกลางเกิดขึ้นในปริมาณมากเช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, ก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen gas), เอธานอล(ethanol), กรดน้ำส้ม(acetic acid), กรดฟอร์มิค(formic acid), กรดซัคซินิค, กรดบิวทิริค(butyric acid) และกรดแลคติค(lactic acid) (Alexander. 1977)

4. <u>เอนไซม์เซลลูเลส</u>

จากวิธีการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นวิธีที่ดีกว่าการย่อยสลายด้วยสารเคมี ทำให้การศึกษาค้นคว้าจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเป็นไปอย่างกว้างขวาง ในปี 1899 เอนไซม์เซลลูเลสถูกจัดเป็นเอนไซม์จากพืช เนื่องจากสารละลายที่สกัดได้จากเมล็ดพืชที่กำลังงอก สามารถย่อยผนังเซลล์ของพืชซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนได้

การศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสบริสุทธิ์ พบว่าเซลลูโลสบางส่วนที่ตกตะกอนหลังจากการละลายใน Cuprammonium สามารถถูกย่อยสลายเป็นกลูโคสได้โดยน้ำย่อยที่ได้จากหอยทาก (*Helix pomatia*)(Scilliere. 1907) ในปี 1911 เอนไซม์เซลลูเลสจึงถูกจัดเป็นเอนไซม์จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดย Biederman

ต่อมาได้มีการศึกษาเซลลูเลสจากราและพบว่า ราสามารถผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จึงนิยมนำเอนไซม์จากรามาศึกษามากขึ้น

4.1 เอนไซม์เซลลูเลสจากรา

จากที่ได้มีการศึกษาระบบเอนไซม์เซลลูเลสของรามาจนถึงปัจจุบัน ทำให้ทราบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ แล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์(extra cellular enzyme) เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ (multicomponent enzyme) จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางโครมาโตกราฟีและอิเลคโตรฟอรีซิส สามารถแยกองค์ประกอบที่ซับซ้อนของเอนไซม์ได้เป็นส่วน ๆ พบว่าเซลลูเลสมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน ดังนี้

4.1.1 เอนโด-เบตา-1,4-กลูแคน กลูคานโนไฮโดรเลส (endo-β-1,4-glucan glucanohydrolase) หรือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ C_X (EC.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลายขั้นต้นมาก่อน หรือย่อยสลายสารพวก swollen soluble แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสธรรมชาติ (native cellulose) เช่น ใยฝ้ายได้ โดยเอนไซม์ดังกล่าวนี้ จะตัดพันธะเบตา-1,4(β-1,4-linkage)ภายในสายเซลลูโลส ตรงบริเวณโครงสร้างส่วนที่เป็นอสัณฐานอย่างสุ่ม (randomly acting)ซึ่งจะทำให้ความยาวของสายเซลลูโลสสั้นลงอย่างรวดเร็วบริเวณปลายสายของเซลลูโลสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ จะเป็นบริเวณที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์(reducing sugar) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคือ โอลิโกเซลลูโลส(oligocellulose), เซลโลไบโอส และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก

การจำแนกเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสนี้ โดยทั่วไปจะอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อสารตั้งต้น สารตั้งต้นที่นิยมใช้คือคาร์บอกซีเมทธิล เซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) การวัดแอคติวิตี(activity) ของเอนไซม์สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การวัดความหนืดที่ลดลงของสารละลาย CMC และการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยสารละลาย CMC

4.1.2 เอกโซ-เบตา-1,4-กลูแคน กลูคานโนไฮโดรเลส (exo-β-1,4-Glucan glucanohydrolase) หรือ เอกโซกลูคาเนส(exoglucanase)หรือ C_1 (EC. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลาย เซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลส ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดจากปลายด้านที่ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ (non-reducing end)ของสายเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น

เซลโลไบโอส

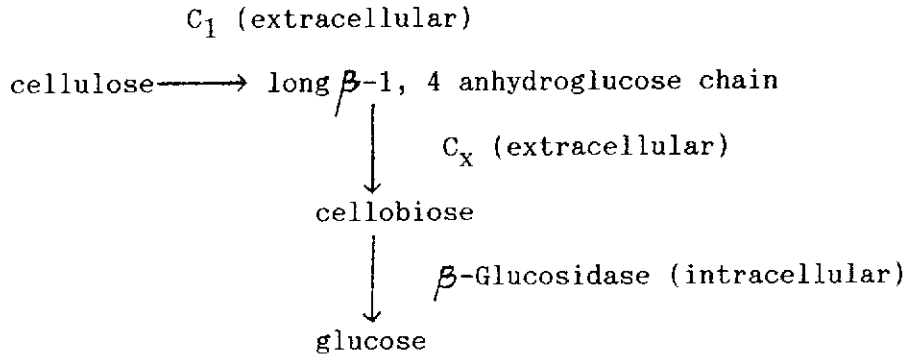
4.1.3 เบตา-กลูโคซิเดส (β-Glucosidase)หรือ เซลโลไบเอส (Cellobiase) (EC.3.2.1.21) จะเป็นตัวเสริมการทำงานของเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส และ เอกโซกลูคาเนส โดยทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

ในปี 1939 Riere ได้ศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus* sp. และ *Mucor* sp. พบว่าเอนไซม์จากราทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสธรรมชาติได้ แต่สามารถย่อยสลาย hydrocellulose ได้

ในปี 1942 Norman และ Fuller พบว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (insoluble cellulose dextrin) แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นได้

จากการเพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp. รวมถึงราอีกหลายชนิดพบว่า ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองหรือฝ้าย นั่นคือ ราเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่มีในธรรมชาติได้ และการเจริญเติบโตจะเกิดขึ้นเมื่อนำรานั้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivative) แทนเซลลูโลส อนุพันธ์เซลลูโลสได้แก่ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส(carboxymethyl cellulose), ไฮดรอกซีเมทธิลเซลลูโลส (hydroxymethyl cellulose) และเซลลูโลสซัลเฟต(cellulose sulphate) (Reese, Siu and Levinson. 1950)

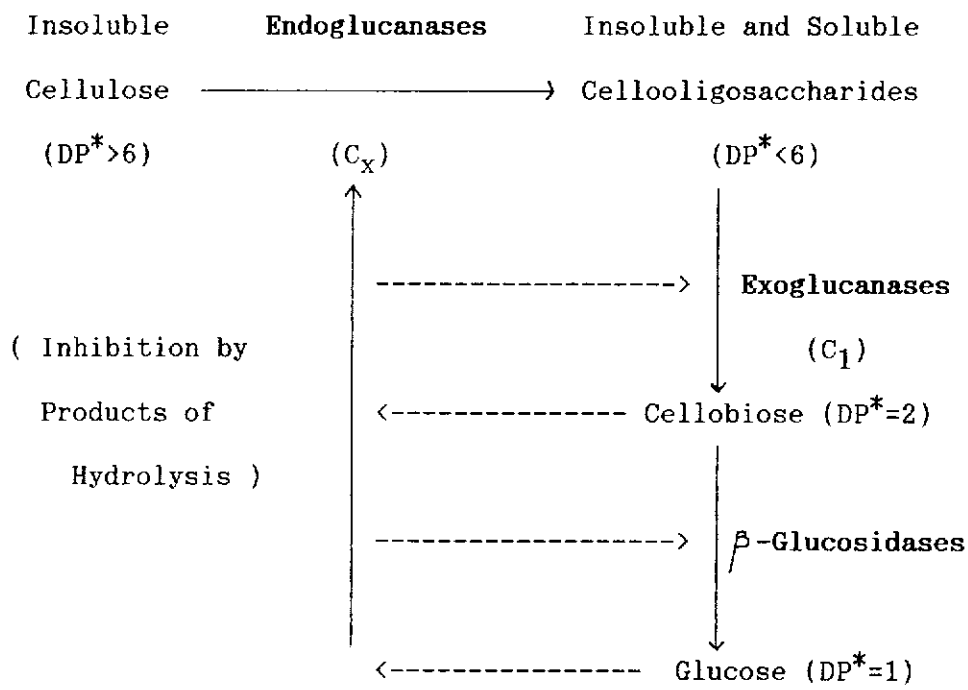
ในปี 1950 Reese ได้ตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Trichoderma ressei* ซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลสจากฝ้ายได้ ดังสมการ



สมมุติฐานนี้แสดงให้เห็นว่า เซลลูโลสถูกย่อยโดยน้ำย่อย C_1 ให้เป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่เป็นเส้นตรงสายยาว ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสหลายหน่วยต่อเข้าด้วยกัน ต่อมาน้ำย่อย C_x จะย่อยสลายอนุพันธ์เซลลูโลสที่เกิดจากการย่อยสลายของ C_1 ให้กลายเป็นเซลโลไบโอส ทั้งหมดนี้เป็นปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ จะเห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย $C_1 + C_x$ หลังจากนั้นเซลโลไบโอสซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กจะซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส(β-glucosidase) ก็จะย่อยสลายเซลโลไบโอสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป และจากการทดลองของ Levinson, Mandels and Reese ในปี 1951 ซึ่งพบว่าเซลโลไบโอสเป็นน้ำตาลที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของราได้ และในการย่อยสลายเซลลูโลสจะมีกลูโคสเป็นผลิตผลสุดท้าย การทดลองนี้เป็นการสนับสนุนสมมุติฐานของ Reese

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสธรรมชาติได้จะผลิต extracellular enzyme ที่มี C_1 เพื่อย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสให้มีขนาดเล็กลง จากนั้น C_x จะทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสนี้ต่อไปจนกระทั่งเป็นเซลโลไบโอส จากนั้นเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสจะย่อยเซลโลไบโอสให้ได้กลูโคส 2 โมเลกุลแล้วกลูโคสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน อันเป็นการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ (Stutzenberger, Kaufman and Lossin. 1970)

ในเวลาต่อมา ได้มีการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* พบว่า องค์ประกอบแต่ละส่วนของเอนไซม์ในเชื้อรานี้ให้ผลที่แตกต่างไปจากสมมุติฐานของ Reese (Selby and Maitland. 1967 ; Pettersson. 1975) คือ C_x จะเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสธรรมชาติก่อน จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยสลายต่อด้วย C_1 ดังภาพประกอบ 6 นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์ จะถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเอนไซม์ C_x , C_1 และเบตา-กลูโคซิเดส จะถูกยับยั้งโดยกลูโคส ส่วนเซลโลไบโอสก็จะยับยั้งการทำงานของ C_x และ C_1 ด้วยเช่นกัน



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

C_x

Random Action

EXOGLUCANASES : G-G-G-G-G-G

C_1

Endwise Action

β-GLUCOSIDASES : G-G

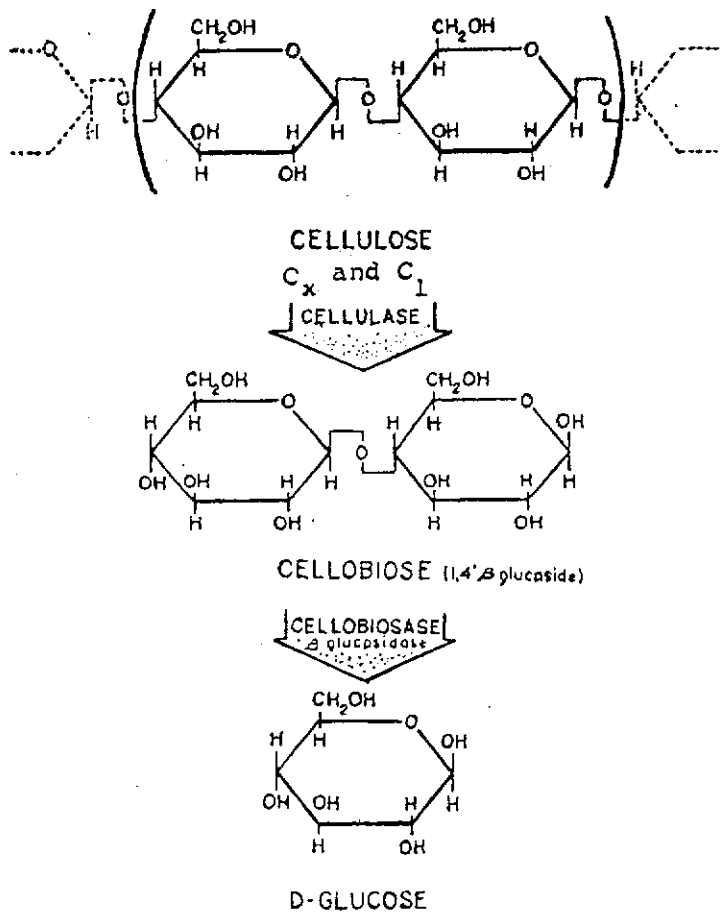
β-Glucosidases

Hydrolysis of Cellobiose to Glucose

DP* = Degree of Polymerization

ภาพประกอบ 6 ลำดับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส

จากรายงานของ Ghose ได้อธิบายถึงกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ดังในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์พวก *Thermoactinomyces* sp. strain YX ในขณะที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตจะผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสและอะวิเซลเลส(avicelase)ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจัดว่าเป็น extracellular enzyme พบว่า เอนไซม์มากกว่าร้อยละ 50 จะถูกดูดซับบนสารประกอบพวกเซลลูโลส (Hagerdal, Ferchak and Pye. 1978)

ราที่เจริญในที่มีอากาศและสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ที่นำมาศึกษา เช่น *Trichoderma viride, T. reesei, T. koningii, Aspergillus niger, Fusarium solani, Penicillum funiculosum* และ *Sporotrichum pulverulentum* (Wood. 1985) ส่วนใหญ่สามารถย่อยเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งกลูโคสที่ได้จะใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ยีสต์ (yeast) และ แบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตสารที่มีคุณค่า เช่น เอธิลแอลกอฮอล์, กรดน้ำส้ม, กรดฟอร์มิก การที่ต้องปรับสภาพเบื้องต้นของเซลลูโลสนั้น เนื่องจากในโครงสร้างของเซลลูโลสเองมีสารประกอบอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีผลขัดขวางการแพร่ผ่านของเอนไซม์ที่จะเข้าไปทำการย่อยสลาย ดังนั้นการปรับสภาพเบื้องต้นจึงเป็นการลดปริมาณลิกนินและผลึกของเซลลูโลสลง อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้กับเอนไซม์ด้วย ทำให้เอนไซม์ทำงานได้สะดวกยิ่งขึ้น

จากการเพาะเลี้ยง *Trichoderma reesei* F522 บนฟางข้าวสาลีที่ได้ทำการปรับสภาพเบื้องต้นโดยแช่ข้าวสาลีในเอธานอล เข้มข้นร้อยละ 96 แล้วสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถเปลี่ยนฟางข้าวให้เป็นน้ำตาลได้ร้อยละ 95 (Szczodrak. 1988)

จะเห็นว่าการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคสนั้น จะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ จึงจะเกิดการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์และกลไกการย่อยสลายเซลลูโลส การแยกองค์ประกอบของเอนไซม์ให้เป็นเอนไซม์เดี่ยว ๆ แต่ละชนิดในรูปที่บริสุทธิ์ จึงเป็นสิ่งสำคัญอันดับแรก จากนั้นจึงศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์นั้น

ทำการแยกเอนโดกลูคาเนสได้ 3 ชนิดจาก *Trichoderma viride* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CMC เป็นสารเซลลูโลส เอนโดกลูคาเนสทั้ง 3 ชนิด มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีลำดับขั้นของการเกิดพอลิเมอร์แตกต่างกัน และให้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยสลายกระดาษกรองเป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นการทำงานร่วมกันของเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส (Shoemaker and Brown. 1978)

การศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยรา พบว่า เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญมากในการทำให้เกิดการหมุนเวียนของคาร์บอนในธรรมชาติ เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อย ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งมีผลทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสเกิดได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในช่วง 4-6 (Sen, Abraham and Chakrabarty. 1982)

Wood และ McCrae (1978) สามารถแยกเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้ 4 ชนิด ที่สกัดจาก *Trichoderma koningii* พบว่า เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีอัตราการจับกับสารตั้งต้นต่างกัน และอัตราการย่อยสลายใยฝ้ายจะเป็นไปได้น้อยและอย่างช้า ๆ แต่การย่อยสลายใยฝ้ายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์เมื่อมีการทำงานร่วมกับเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

จากการศึกษาเอนไซม์ CMCase ที่สกัดจาก *Erwinia chrysanthemi* ซึ่งเป็น แอคติโนมัยซิส ที่เจริญได้ในที่มีอากาศ และทนอุณหภูมิสูงได้ โดยมี Solka floc เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน พบว่า สามารถแยกเอนโดกลูคาเนสให้มีความบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate), โดกลูคาเนสทั้ง 2 ชนิด แม้ว่าจะมี CMCase activity เหมือนกัน แต่จะมีคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน (Calza, Irwin and Wilson. 1985)

แยกองค์ประกอบของเซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า(commercial cellulase) "Maxazyme" จากการใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี และวิธี สัมพรรคภาพ(affinity) พบว่าสามารถแยกเอนโดกลูคาเนสได้ 6 ชนิด มี 1 ชนิดที่มีแอคติวิตีต่อเซลลูโลสรูปผลึก เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 58,000 ดาลตัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส (Beldman and others. 1985)

ได้มีการสกัดเอนไซม์ CMCase จาก *Erwinia chrysanthemi* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน เอนไซม์ที่สกัดได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ CMCase ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3 เท่า เอนไซม์ที่ได้เป็น monomeric มีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน ค่าความเป็นกรด-ด่างสำหรับการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.2-7.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 52 องศาเซลเซียส (Boyer and others. 1984)

จากที่กล่าวมาสรุปได้ว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราต้องใช้เวลานานกว่า 1 สัปดาห์ ยังผลให้มีการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสเป็นสารที่มีคุณค่าโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นเกิดขึ้นภายหลังการย่อยสลายเซลลูโลส (Deshpande and others. 1986) จะเห็นว่าการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากรา ไปย่อยสลายสารประกอบที่เป็นเซลลูโลสให้เป็นเอธิลแอลกอฮอล์ จะต้องผ่านขั้นตอนอย่างน้อย 3 ขั้นตอน (Szczodrak. 1988) คือ

1. การปรับสภาพเซลลูโลสให้เหมาะสมสำหรับการย่อยสลาย (cellulose pretreatment)

2. การผลิตและย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์จากเชื้อรา

3. การเปลี่ยนเป็นเอธิลแอลกอฮอล์โดยจุลินทรีย์ชนิดอื่น

4.2 เอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ

ได้มีการศึกษาค้นคว้าหาแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยเซลลูโลสในที่ที่ไม่มีอากาศ พบว่า *Clostridium thermocellum,*

181829

Ruminococcus albus เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นเอธิลแอลกอฮอล์และสารอินทรีย์อื่น ๆ ในเวลาอันรวดเร็ว ภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน ซึ่งเป็นการหมักโดยใช้เชื้อสายพันธุ์เดียว (single strain fermentation) (Tabassum, Rajoka and Malik. 1990 ; Bhadra, Scharer and Moo-Young. 1986 ; Giuliano and Khan. 1985 ; Taya, Suzuki and Kobayashi. 1984) ทำให้การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์ และสารอินทรีย์ต่าง ๆ เป็นไปอย่างสะดวก และเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตน้อยลง

โดยปกติแล้ว สัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถบริโภคอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบได้ แสดงให้เห็นว่า ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เหล่านี้จะต้องมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้ จึงมีการนำน้ำจากกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องมาศึกษา เพื่อทำการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลสได้

4.2.1 *Ruminococcus albus* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องเจริญได้ดีในที่ที่ไม่มีอากาศ สามารถย่อยเซลลูโลสให้เป็นเอธิลแอลกอฮอล์ได้ แต่เซลลูโลสนั้นจะต้องผ่านการย่อยสลายขั้นต้นทางเคมีก่อน จึงจะทำให้การย่อยสลายเกิดได้อย่างสมบูรณ์ (Sukhumavasi and others. 1984)

R. albus จะผลิต CMCase ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีบอลมิลล์เซลลูโลส (ball-milled cellulose ; BMC) เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนในปริมาณมาก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานกว่า 70 ชั่วโมง CMCase ที่ได้จะนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ (DEAE-Sephadex A-25, เซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200) และ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-Gel A) เอนไซม์ที่ได้มีค่าไอโซอิเลคตริก เท่ากับ 4.3 เมื่อทดสอบด้วยวิธีไอโซอิเลคตริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing) น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้โดยผ่านลงในคอลัมน์ ไบโอ-เจล พี-100 (Bio-Gel P-100) เปรียบเทียบกับ Gradient Slab-PAGE พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 ดาลตัน อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส และ 7.2 ตามลำดับ (Maeda. 1986)

4.2.2 *Coprococcus* sp. เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในที่ไม่มีอากาศ สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสารที่เป็นเซลลูโลสชนิดโครงร่างผลึก (crystalline cellulose, avicel) ในขณะที่ *R. albus* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสดังกล่าวได้ ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการย่อยสลายโดย *Coprococcus* sp. คือ กรดบิวทิริค ส่วนเอธิลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจะเป็นผลพลอยได้ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (35-37 องศาเซลเซียส) (Sukhumavasi and others. 1984) ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปผลิตเซลลูเลสทางอุตสาหกรรม เพราะในกระบวนการผลิตเอนไซม์ อุณหภูมิภายในถังหมักจะเพิ่มสูงขึ้น จำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับเชื้อในการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นจะทำให้ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์สูงขึ้น เพื่อความเป็นไปได้ทางอุตสาหกรรมจึงได้มีการพยายามค้นหาจุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสภายใต้อุณหภูมิสูงมาใช้

จากการศึกษาค้นคว้า พบว่าในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ จะเกิดได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงมีการนำจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในกองปุ๋ยหมักมาศึกษา พบว่า จุลินทรีย์จากกองปุ๋ยหมักสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง คือ จุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิสูงมีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่า และพร้อมกันนี้จะเกิดการย่อยสลายสารอาหารให้ได้ผลิตภัณฑ์ในอัตราเร็วที่ใกล้เคียงกับอัตราการเจริญเติบโต (Sukhumavasi and others. 1988) เอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความคงตัว และทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง ยิ่งไปกว่านั้นการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูง ยังเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลางอีกด้วย

4.2.3 <u>แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Clostridium josui*</u>

จากการศึกษาเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในที่ไม่มีอากาศ และสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ เช่น *Clostridium thermocellum, C. stercorarium* จะผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสออกมานอกเซลล์ และเอนไซม์นั้นสามารถย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึกได้ (Johnson and others. 1982) ในการค้นหาจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆที่จะนำมาใช้ในการ

ย่อยวัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบยังคงดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง จนในปี 1988 ได้มีผู้ที่สามารถแยกแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศออกจากปุ๋ยหมักด้วยวิธี Roll-Tube ได้สำเร็จ แบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ให้ชื่อว่า ***Clostridium josui*** **FERM P-9684** (Sukumavasi and others. 1988) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) จากการเพาะเลี้ยง *C. josui* ในถังหมัก พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อคือ 6.8 แต่ในขณะที่มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง

การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จาก *C. josui* นั้นพบว่า เอนไซม์สามารถย่อยสลายวัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบได้ โดยไม่ต้องผ่านการย่อยสลายขั้นต้นทางเคมี นั่นก็คือ เอนไซม์นี้สามารถย่อยได้ทั้งเซลลูโลสรูปผลึกและอสัณฐาน ได้มีการเปรียบเทียบการย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึก ระหว่าง *C. josui*, *Coprococcus* sp. และ *R. albus* พบว่า *C. josui* ย่อยอะวิเซล (Avicel) ซึ่งเป็นเซลลูโลสรูปผลึก ได้ 4.0 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ เอธิลแอลกอฮอล์ และกรดน้ำส้ม ส่วน *Coprococcus* sp. ย่อยอะวิเซลได้ 3.5 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ กรดบิวทิริก ส่วน *R. albus* ไม่สามารถย่อยอะวิเซลได้ (Sukhumavasi and others. 1989)

แม้ว่าแบคทีเรียในตระกูล *Clostridium* จะผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึกได้ แต่คุณสมบัติและกลไกการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลสนี้ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด ยังไม่มีรายงานใดที่อธิบายถึงกลไกหรือปัจจัยที่เป็นตัวควบคุมการย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึกได้ การศึกษากลไกของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *C. josui* จึงเป็นสิ่งที่น่าติดตาม แต่จากการค้นคว้าพบว่า *C. josui* นี้ ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาในปริมาณที่ไม่มากนัก ยิ่งไปกว่านั้น เอนไซม์ที่ผลิตได้ยังเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน (complex enzyme) ซึ่งเป็นการยากแก่การทำให้บริสุทธิ์ (Omiya and others. 1989)

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยง *Clostridium thermocellum* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน หลังจากเก็บเกี่ยวเอนไซม์จากถังหมัก นำน้ำใสที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และจากการทำ Disc Electrophoresis ให้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ในขณะที่ SDS-PAGE มีแถบโปรตีนมากกว่า 2 แถบ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่แยกได้นั้นเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน (Ait, Creuzet and Forget. 1979)

สกัดเอนไซม์จาก *Clostridium thermocellum* LQRI ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลโลไบโอสเป็นแหล่งธาตุคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถแยกและทำเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสให้บริสุทธิ์ได้ 22 เท่า โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 80 , โครมาโตกราฟีแบบแลกไอออนบน ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 (DEAE Sephadex A 50) และจากการทำ ไอโซอิเลคตริก โฟกัสซิง และ PAGE ชี้ให้เห็นว่าเอนโดกลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์นี้ เป็นโปรตีนชนิด Homogeneous มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 83,000-94,000 ดาลตัน มี ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานที่ 5.2 และ 62 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Ng and Zeikus. 1981)

แบคทีเรีย *Clostridium* สายพันธุ์ใหม่ซึ่งเจริญได้ดีในที่อุณหภูมิสูง และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ พบว่า แบคทีเรียนี้ผลิตเอนโดกลูคาเนสที่มีแอคติวิตีต่อเซลลูโลสได้ดีกว่า *Clostridium thermocellum* เมื่อใช้เซลโลไบโอสเป็นสารตั้งต้น การทำเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0-40 และวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกไอออนบน ดีอีเออี ทริสซาคริล (DEAE Trisacryl) เอนโดกลูคาเนสถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของเกลือ 0.17 โมลาร์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 4 เท่า เอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน โดยไม่เสียแอคติวิตี (Creuzet and Frixon. 1983)

แยกเอนโดกลูคาเนสได้ 2 ชนิด จาก *Bacteroides succinogenes* S85 เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธีทางโครมาโตกราฟี พบว่าเป็นไกลโคโปรตีน

(glycoprotein) ซึ่งนอกจากจะมีน้ำหนักโมเลกุลและคุณสมบัติทางกายภาพอื่น ๆ ที่แตกต่างกันแล้ว ความจำเพาะในการยึดเกาะและการย่อยสารตั้งต้นของเอนไซม์ยังแตกต่างกันอีกด้วย (Gavin and Forsberg. 1988)

จากการศึกษาเซลลูเลสของ *Clostridium stercorarium* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยเซลโลไบโอสเป็นแหล่งธาตุคาร์บอน น้ำใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และแยกลำดับส่วนโดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) บน Mono Q พบว่ามีอะวิเซลเลส (Avicelase) 2 ชนิด, เบตา-เซลโลไบโอซิเดส (β-Cellobiosidase) 2 ชนิด และ เบตา-กลูโคซิเดส (β-Glucosidase) 1 ชนิด ซึ่งอะวิเซลเลส I จัดเป็น เอนโดกลูคาเนส เพราะมีแอคติวิตีต่อคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึกเป็นการทำงานร่วมกันของอะวิเซลเลส 2 ชนิด(Bronnenmeier and Staudenbauer. 1988)

ได้ทำการสกัดเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส จาก *C. josui* และทำให้บริสุทธิ์โดยเติมสารที่ป้องกันการรวมตัวของโปรตีน คือ ยูเรีย (urea) ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ลงในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่บริสุทธิ์นี้ มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 50 เท่า, Recovery Yield ร้อยละ 13 เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์คือ 6.8 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สามารถย่อยสารตั้งต้นที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีลำดับขั้นของการเกิดพอลิเมอร์สูง ๆ เช่น เซลโลเฮกโซส (cellohexaose), เซลโลเพนโตส (cellopentaose) ได้ดีกว่าสารตั้งต้นที่มีลำดับขั้นของการเกิดพอลิเมอร์ต่ำ ๆ เช่น เซลโลไบโอส (cellobiose), เซลโลไตรโอส (cellotriose) (Fujino and others. 1989)

ระบบเอนไซม์จาก *C. josui* ที่สามารถย่อยเซลลูโลสโครงร่างผลึก และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่า ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์มากขึ้น จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อให้ทราบถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ให้ลึกซึ้ง โดยอาศัยความรู้และเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม สามารถเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ที่มีอยู่จำนวนน้อยให้มีมากขึ้น โดยการนำยีน (gene) ที่ผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเชื่อมติดกับ chromosomal DNA ของ *Escherichia coli* ซึ่ง

เจริญเติบโตได้ดีและรวดเร็วในสภาพที่มีอากาศ และมีอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโต คือ 37 องศาเซลเซียส การผลิตเอนไซม์จำนวนมากจะเกิดขึ้นในเวลา 10 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth) รักษาระดับความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 6.5 และมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (Ohmiya and others. 1989)

เอนโดกลูคาเนสที่ผลิตได้จาก *E. coli* นี้ ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี พบว่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ อยู่ในช่วง 7.2-7.5 และ 65-70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่เอนไซม์จะมีความคงตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.5-9.0 เอนไซม์ที่ได้นอกจากมีแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสแล้ว ยังมีแอคติวิตีของเซลโลไบโอส-ทรานเฟอร์เรส (cellobiose-transferase activity) ด้วย เพราะสามารถรวมเซลโลไบโอสเข้ากับเซลโลเตตระโอส (cellotetraose) ได้เป็นเซลโลเฮกโซสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การจัดเรียงลำดับของกรดอะมิโนจากปลายหมู่แอมโมเนียของเอนไซม์จาก *E. coli* นี้ มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *C. josui* ในอาหารเหลวเป็นอย่างมาก ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ได้จากการ โคลน (clone) นี้ มียีนที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงจากเอนโดกลูคาเนสที่แยกได้จาก *C. josui* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Fujino and others. 1990)

การแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านมา ทำได้โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น โครมาโตกราฟีแบบแลกไอออน (Ion-exchange chromatography) อาศัยความแตกต่างของประจุของสารที่ต้องการจะแยกกับประจุของสารที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยน, โมเลคิวลาร์-ซีฟ โครมาโตกราฟี (molecular-sieve chromatography) อาศัยความแตกต่างของขนาดหรือมวลโมเลกุลของโปรตีนที่มีอยู่ในสารที่ต้องการจะแยก, โครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้คุณสมบัติทางชีวภาพที่จำเพาะของโปรตีนในการแยกโปรตีนนั้น ๆ และไอโซอิเลคโตร โฟกัสซิง (isoelectro focusing) อาศัยค่าไอโซอิเลคตริก-พีเอช (isoelectric pH) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด เป็นต้น

คุณสมบัติต่าง ๆ ของแต่ละองค์ประกอบของเอนไซม์ที่แยกได้ จะเป็นความรู้พื้นฐานนำไปสู่ความเข้าใจถึงกระบวนการหรือกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสจากจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสที่แยกได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ จุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสารตั้งต้นได้ในอัตราที่แตกต่างกัน

จากความซับซ้อนของระบบเอนไซม์ดังที่กล่าวมาข้างต้นนี้ เพื่อเป็นการค้นหาคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *C. josui* จึงได้ทำการแยกองค์ประกอบของเอนไซม์ให้เป็นเอนไซม์เดี่ยว ๆ ในรูปที่ยังไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ (original active form) ซึ่งทำได้โดยไม่เติมสารที่ป้องกันการรวมตัวของโปรตีน (dissociating agent)ในระหว่างการทดลอง เพราะสารที่เติมลงไป อาทิเช่น เมอร์แคปโตเอธานอล (mercaptoethanol) หรือ ยูเรีย อาจมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป โครงสร้างของเอนไซม์ที่แยกได้อาจมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น เพราะไปเกิดพันธะกับโปรตีนอื่น หรือมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง เนื่องจากพันธะบางส่วนในโมเลกุลถูกทำลาย ซึ่งโครงสร้างที่ผิดปกติไปของเอนไซม์แม้เพียงเล็กน้อย ก็จะมีผลทำให้คุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการแยกองค์ประกอบของเซลลูเลสจาก *C. josui* ให้มีความบริสุทธิ์ โดยเน้นที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของเอนไซม์เซลลูเลส

6. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium josui* ให้มีปริมาณมาก
2. แยกเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี
3. ศึกษาคุณสมบัติและสภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ, ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม, ความคงตัวและผลของสารเคมีบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์ที่แยกได้

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และก๊าซที่ใช้

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium josui* ในรูปผงแห้ง (lyophilized) 0.5 กรัม ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.จิราภรณ์ สุขุมาวาสี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.1.2 อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน

1.1.2.1 หลอดเลี้ยงเชื้อชนิดทนแรงดัน พร้อมจุกยางชนิดพิเศษ

1.1.2.2 ซาคากูจิ ฟลาสก์ (Sakaguchi flask) พร้อมจุกยาง

1.1.2.3 ถังหมักขนาด 5 ลูกบาศก์เดซิเมตรรุ่น MD-125 ผลิตโดย L.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

1.1.2.4 หม้ออบความดัน(autoclave)ผลิตโดย SEMCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.2.5 ตู้บ่มเชื้อ

1.1.2.6 ตู้ถ่ายเชื้อ

1.1.2.7 hot plate บริษัท Sybron ประเทศเยอรมัน

1.1.3 เครื่องบอลมิลล์ (ball-mill)

1.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 60 A ผลิตโดย Merck

1.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ชนิดอุณหภูมิต่ำ (superspeed refrigerated centrifuge) รุ่น RC-5B บริษัท Dupont ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.6 ออสวาล วิสโคมิเตอร์ (Oswald viscometer No.3) บริษัท Ito garasu ประเทศญี่ปุ่น

1.1.7 อ่างน้ำร้อน (water bath) บริษัท J-Kotter mann-KG ประเทศเยอรมัน

1.1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectronic 21)บริษัท Bausch and Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.9 เซลโลเฟน ชีท (cellophane sheath) ซึ่งให้สารขนาดเล็กกว่า 1,000 ดาลตัน ผ่านออกไปได้

1.1.10 อัลตราฟิลเตอร์ (ultrafilter)รุ่น UHP-76 ประเทศญี่ปุ่น

1.1.11 เยื่อ (membrane) ที่ให้สารโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 10,000 ดาลตัน ผ่านไปได้ รุ่น UK-10 บริษัท Tomoegawa paper ประเทศญี่ปุ่น

1.1.12 อุปกรณ์สำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1.1.12.1 คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร สูง 67 เซนติเมตร

1.1.12.2 คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร สูง 120 เซนติเมตร

1.1.12.3 คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร

1.1.12.4 คอลัมน์สำเร็จรูป โมโน คิว (mono Q column) บริษัท Pharmacia ประเทศสวีเดน

1.1.12.5 เครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) รุ่น frac-100 บริษัท Pharmacia ประเทศสวีเดน

1.1.12.6 เครื่องแยกโปรตีน (fast protein liquid chromatography ; FPLC) รุ่น LC-500 บริษัท Pharmacia ประเทศสวีเดน

1.1.12.7 ปั๊ม (peristatic pump) บริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

1.1.12.8 ฐานตั้งสำหรับยึดจับคอลัมน์

1.1.12.9 ใยแก้ว

1.1.12.10 หลอดทดสอบ

1.1.13 ชุดเตรียมแผ่นเจลสำหรับการทำอิเลคโตรฟอรีซิส รุ่น SM-90S ประเทศญี่ปุ่น ประกอบด้วย

1.1.13.1 กล่องใส่บัฟเฟอร์ (buffer chamber)

1.1.13.2 กระจกใส 2 แผ่น

1.1.13.3 แผ่นยาง

1.1.13.4 หวี (comb)

1.1.13.5 สายไฟ 2 เส้น

1.1.13.6 ที่หนีบกระดาษ (clip) 4 ตัว

1.1.14 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น EC-400 บริษัท EC Apparatus ประเทศญี่ปุ่น

1.1.15 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Finnpipette ประเทศฟินแลนด์

1.2 สาร และ/สารเคมี

กรดน้ำส้ม (acetic acid) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

กรดบิวทิริก (butyric acid) บริษัท Katayama chemical ประเทศญี่ปุ่น

กรดเมทธิลบิวทิริก (methyl butyric acid) บริษัท Katayama ประเทศญี่ปุ่น

กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) บริษัท Wako pure chemical ประเทศญี่ปุ่น

กรดวาลิริก (n-valeric acid) บริษัท Katayama chemical ประเทศญี่ปุ่น

กรดไอโซบิวทิริก (isobutyric acid) บริษัท Katayama chemical ประเทศญี่ปุ่น

กรดไอโซวาลิริก (isovaleric acid)บริษัท Katayama chemical ประเทศญี่ปุ่น

กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

กลีเซอรอล (glycerol) laboratory grade บริษัท J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

ไกลซีน (glycine) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

คอปเปอร์ซัลเฟต (cupper sulfate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose ; CMC, MW=128,000 DS=0.65, DP=600-630) บริษัท Daiichi Kogyo Seiyaku ประเทศญี่ปุ่น

แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โคมาสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250 (coomasie brilliant blue R 250)บริษัท Sigma chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

โคบอลต์(II)คลอไรด์ (cobalt(II)chloride hexahydrate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

ซิงค์คลอไรด์ (zinc chloride) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ (cysteine hydrochloride) บริษัท Katayama chemical ประเทศญี่ปุ่น

เซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200) บริษัท Pharmacia Fine Chemical ประเทศสวีเดน

เซลลูโลสบริสุทธิ์ (KC-floc W-300)บริษัท Sanyo Kokusaku Pulp ประเทศญี่ปุ่น

เซลโลไบโอส (cellobiose) บริษัท Katayama chemical ประเทศญี่ปุ่น

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate ; SDS)บริษัท Fluka Chemic ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium dihydrogen phosphate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรต (sodium potassium tatrate) laboratory

grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-Gel A) บริษัท Bio-Rad Laboratories California ประเทศสหรัฐอเมริกา

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

ไดไทโอทริทอล (dithiothreithol)บริษัท Nakarai Chemicals ประเทศญี่ปุ่น

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

เตตระเมทธิลีนไดอะมีน (N, N, N', N'-tetramethylenediamine; TEMED) บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ทริส (Tris-(hydroxymethyl) aminomethane) บริษัท Nakarai Chemicals ประเทศญี่ปุ่น

บลูเดกซ์แทรน (blue dextrane)

บิส อะคริลาไมด์(Bis acrylamide)บริษัท Wako pure chemical ประเทศญี่ปุ่น

โบรโมฟีนอล บลู (bromophenol blue) บริษัท Carlo erba ประเทศอิตาลี

โปรตีนมาตรฐานสำหรับเจลฟิลเตรชัน บริษัท Pharmacia Fine Chemical ประเทศสวีเดน ประกอบด้วย

อัลโดเลส (aldolase)

อัลบูมิน (albumin)

ไคโมทริปซิโนเจน (cymotrypsinogen A)

โปรตีนมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีน บริษัท Sigma chemical ประเทศ

สหรัฐอเมริกา

โปรตีนมาตรฐานสำหรับอิเลคโตรฟอรีซิส บริษัท Pharmacia Fine Chemical ประเทศสวีเดน ประกอบด้วย

ฟอสโฟรีเลส บี (phosphorelase B)

บอวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin)

สารยับยั้งทริปซิน (trysin inhibitor)

อัลบูมินจากไข่ขาว (ovalbumin)

พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต (p-chloromercuribenzoate) Nakarai Chemicals ประเทศญี่ปุ่น

โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

โพแทสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์ (potassium ferricyanide)laboratory grade บริษัท J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

โฟลิน-ฟีนอล (folin-phenol)laboratory gradeบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

เฟอร์รัสซัลเฟต(ferrous sulfate)laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

เมทธิลแอลกอฮอล์(methanol)laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

เมอร์คิวรีคลอไรด์ (mercury chloride) บริษัท Carlo erba ประเทศอิตาลี

เมอร์แคปโตเอธานอล (2-mercaptoethanol)

แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) laboratory grade บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

ยูเรีย (urea) บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

รีซาซูริน (resazurin) บริษัท Wako pure chemical ประเทศญี่ปุ่น

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco

อะคริลาไมด์ (acrylamide) บริษัท Wako pure chemical ประเทศญี่ปุ่น

เอทิลีนไดอะมีน เตตระอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA)

แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) บริษัท Fluka Chemic ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) บริษัท Wako pure chemical ประเทศญี่ปุ่น

ไอโอโดอะเซตาไมด์ (iodoacetamide)

1.3 ก๊าซ

1.3.1 คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) บริษัท ไทยอินดัสเตรียล ก๊าซ

1.3.2 ไนโตรเจน (nitrogen gas) บริษัท ไทยอินดัสเตรียล ก๊าซ

1.3.3 ไฮโดรเจน (hydrogen gas) บริษัท ไทยอินดัสเตรียล ก๊าซ

2. การเลี้ยงเชื้อ

เชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการทดลองนี้คือ *Clostridium josui* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ 0.9 % Ball- Milled Cellulose Yeast Extract Synthetic Medium (Sukhumavasi and others. 1984) ซึ่งมี Ball-Milled Cellulose (BMC) เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอด สูตรอาหารประกอบด้วย

* K_2HPO_4	75.00	ลูกบาศก์เซนติเมตร
** Mineral	75.00	ลูกบาศก์เซนติเมตร
*** VFA	3.10	ลูกบาศก์เซนติเมตร
**** Ball-Milled Cellulose	300.00	ลูกบาศก์เซนติเมตร
Yeast Extract	1.00	กรัม
Resazurin	0.01	กรัม

นำอาหารที่เตรียมได้นี้ไปปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปทำให้มีอุณหภูมิสูงขึ้นประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส บน Hot Plate เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จำนวน 5 กรัม เขย่าให้เข้ากัน พ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 30 นาที หรือจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีชมพูอ่อน แล้วจึงเติม ซิสเตอีน (Cystein) 25 มิลลิกรัม พ่นคาร์บอนไดออกไซด์ต่อจนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีสีชมพู ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ใส่ในหลอดทดลอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร สูง 150 มิลลิเมตร หลอดละ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดหลอดด้วยจุกยางบิวทิล(butyl rubber stopper) ในขณะที่ทำการแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพต่างๆ ต้องอยู่ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน (พ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในหลอดตลอดเวลา) นำหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไปเรียงใส่ตะแกรงวางหลอด โดยมีแผ่นเหล็กปิดด้านบนเพื่อป้องกันไม่ให้จุกยางกระเด็นออก ขณะทำการฆ่าเชื้อ หลังจากปิดฝาเรียบร้อย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

<u>หมายเหตุ</u> *, **, *** เป็นสารละลายผสมที่เตรียมเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

* ประกอบด้วย 0.045 % K_2HPO_4

** ประกอบด้วย 0.009 % $CaCl_2$, 0.045 % KH_2PO_4, 0.09 % NaCl, 0.09 % $(NH_4)_2SO_4$

*** Volatile Fatty Acid (VFA) ประกอบด้วย

Acetic Acid	17	ลูกบาศก์เซนติเมตร
Propionic Acid	6	ลูกบาศก์เซนติเมตร
n-Butyric Acid	4	ลูกบาศก์เซนติเมตร
n-Valeric Acid	1	ลูกบาศก์เซนติเมตร
Isobutyric Acid	1	ลูกบาศก์เซนติเมตร
Isovaleric Acid	1	ลูกบาศก์เซนติเมตร
DL-∝Methylbutyric Acid	1	ลูกบาศก์เซนติเมตร

นำสารละลายผสมนี้ไปปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์

**** Ball-Milled Cellulose (BMC) เตรียมได้จากการชั่งผงเซลลูโลสบริสุทธิ์ (KC floc W-300) จำนวน 30 กรัม เติมน้ำกลั่น 200-300 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปบดด้วยเครื่อง บอลมิลล์ (Ball-Mill) เป็นเวลา 5 วัน เติมน้ำกลั่นเพิ่มจนมีปริมาตร 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เซลลูโลสที่ได้หลังการบดนี้เรียกว่า Ball-Milled Cellulose เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส

2.2.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใน Sakaguchi flask

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดเตรียมส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารลงใน Sakaguchi flask โดยตรง ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.1.1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในถังหมักมีปริมาตร 2,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เนื่องจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีการดำเนินการเป็นขั้นตอน ดังนั้นการเตรียมอาหารในถังหมักนี้จึงต้องเตรียมอาหารแยกเป็นส่วน ๆ ดังนี้

2.1.1.3.1 ส่วนที่เตรียมในถังหมักประกอบด้วย BMC และน้ำ

2.1.1.3.2 เตรียมใน บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 400 ลูกบาศก์เซนติเมตร ได้แก่ K_2HPO_4, Mineral, VFA, Resazurin, Yeast Extract และ $NaCO_3$

2.1.1.3.3 เตรียมในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร คือ Cystein

จากนั้นนำอาหารแต่ละส่วนที่เตรียมได้ไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำส่วนประกอบของอาหารเหล่านี้ออกจากหม้อนึ่ง ให้เติมอาหารในข้อ 1.3.2 ลงในถังหมักทันที (ขณะยังร้อน) จากนั้นพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะเติม cystein เป็นอันดับสุดท้าย

<u>หมายเหตุ</u> ปริมาณอาหารแต่ละชนิดที่เตรียมคำนวณได้จากสูตรอาหารในข้อ 2.1.1

2.2 วิธีการเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 การเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง

นำหลอดแอมพูล (ampoule) ที่บรรจุเชื้อ *C. josui* จำนวน 0.5 กรัม ในรูปของผงแห้งแข็ง (lyophilization) มาทำความสะอาดผิวด้านนอกของหลอดด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ใช้ตะไบเลื่อยเบา ๆ ตรงกึ่งกลางสำลีในหลอดให้ลึกพอประมาณ จากนั้นใช้แท่งแก้วเผาไฟให้ร้อนแดงตรงปลาย กดลงตรงรอยตะไบจะทำให้หลอดแก้วหัก ทันทีที่ ampoule เปิดออก ต้องพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในหลอดตลอดเวลา เพื่อมิให้เชื้อภายในหลอดสัมผัสกับออกซิเจนในบรรยากาศ ใช้ ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ (plasture pipette) ดูดน้ำใสส่วนบนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาละลายผงเชื้อใน ampoule ดูดสารแขวนลอยทั้งหมดนี้ไว้ในปิเปต นำไปใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม พ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออีกประมาณ 10 วินาที แล้วจึงปิดปากหลอดด้วยจุกยางให้แน่น นำไปเรียงใส่ตะแกรงวางหลอด (rack) ปิดด้านบนของตะแกรงวางหลอดด้วยแผ่นเหล็ก เพื่อป้องกันจุกยางกระเด็นออกมาขณะบ่ม (เนื่องจากเชื้อมีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งถ้าก๊าซมีปริมาณมากพอจะดันให้จุกยางหลุดกระเด็นออกมาได้ ทำให้เชื้อสัมผัสออกซิเจน จนไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้) นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

การเจริญของเชื้อภายในหลอดสังเกตได้จาก ร่องก๊าซที่เกิดอยู่ทั่วไปใน BMC, ปริมาณฟองก๊าซที่ผุดขึ้นเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณของ BMC ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 หรือ 4 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อเชื้อในหลอดมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่อีกหลายครั้งเพื่อให้เชื้อมีความแข็งแรง การถ่ายเชื้อแต่ละครั้งต้องทำในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน และใช้เชื้อจำนวน 10 หยดต่ออาหารใหม่ 1 หลอด

2.2.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับถังหมัก

จากเชื้อที่แข็งแรงและเจริญเติบโตเต็มที่ จำนวน 10 หลอด นำไปถ่ายลงใน Sakaguchi flask ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันนี้อยู่ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร (วิธีการเตรียมอาหารดังข้อ 2.1.2) ขณะทำการถ่ายเชื้อจากหลอดลงใน Sakaguchi flask นั้นต้องทำด้วยวิธีที่ปราศเชื้อ (aseptic technique) และต้องพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตลอดเวลา อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อใน Sakaguchi flask ไม่ควรต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันมิให้เชื้อเกิดอาการช็อค เนื่องจากความแตกต่างของอุณหภูมิ หลังจากถ่ายเชื้อเสร็จให้พ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงใน flask ต่ออีกประมาณ 30 วินาทีเพื่อให้ภายใน flask ปราศจากออกซิเจน ปิดจุกให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.2.3 การผลิตเอนไซม์ในถังหมัก

จากหัวเชื้อที่บ่มจนได้ที่ นำไปถ่ายลงในถังหมัก (fermenter) ขนาด 5,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร (วิธีการเตรียมแสดงใน 2.1.3) ดังนั้นปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักจะมีความเข้มข้นร้อยละ 15 ของอาหารเหลวทั้งหมดในถังหมัก กวนอาหารเหลวในถังหมักด้วยใบพัด ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บก๊าซที่ออกจากถังหมักโดยการแทนที่น้ำในกระบอกตวง (cylinder) ติดตามการสังเคราะห์เอนไซม์โดยการเก็บตัวอย่างจากถังหมักทุก 12 ชั่วโมงและหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงให้เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เพื่อดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากนั้นนำตัวอย่างจากถังหมักไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ชนิดอุณหภูมิต่ำ ที่ความเร็ว 9,150 X g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำใสที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เพื่อติดตามการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ, วัดค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นจากเมตาบอลิซึมของเชื้อ และทดสอบการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส(CMCase)เมื่อพบว่าภายในถังหมักมีเอนไซม์ปริมาณมาก จะทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ออกจากถังหมัก โดยนำไปปั่นแยกด้วยความเร็วเท่ากับตอนเก็บตัวอย่างในข้างต้น ส่วนของน้ำใสใช้เป็น crude enzyme เพื่อนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3. การหาปริมาณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส หรือ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส

3.1 การเตรียมสารตั้งต้นสำหรับทดสอบเอนไซม์

ชั่งผง คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose ; CMC, MW=128,000, DP=600-630, DS=0.65) 1 กรัม กวนจนเป็นเนื้อเดียวกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับหาปริมาณของเอนไซม์ เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 48 ชั่วโมง

3.2 การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

แอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสวัดได้ในรูปของของไหล (fluidity) ซึ่งจะเป็นส่วนกลับของค่าความหนืด (viscosity ; η)

$$\text{Fluidity} = 1/\eta \ (\text{Centipoise}^{-1}, \text{cp}^{-1})$$

ดังนั้นการหาค่าแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนส จึงเป็นการหาค่าความหนืดที่ลดลงของสารละลาย CMC ในหน่วยของเวลาเปรียบเทียบกับการไหลของน้ำ

$$1/\eta = \frac{T_o}{T - T_o}$$

เมื่อ T_o = เวลา (นาที) ที่น้ำไหลใน viscometer

T = เวลา (นาที) ที่สารละลายไหลใน viscometer

1 หน่วย (Unit ; U) ของเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้สารละลาย CMC กลายเป็นของเหลวในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

ดังนั้น ปริมาณของเอนไซม์สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$U = (1/\eta_{/s} - 1/\eta_{/c}) \times 1/\text{เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา}$$

เมื่อ $1/\eta_{/s}$ = cp^{-1} ของสารละลาย CMC เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

$1/\eta_{/c}$ = cp^{-1} ของสารละลาย CMC เมื่อทำปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์

3.3 วิธีการหาปริมาณเอนไซม์

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย CMC อยู่ 4.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที วัดความหนืดของสารละลายที่ได้ด้วย Oswald viscometer No.3 เวลา (นาที) ที่สารละลายไหลในเครื่องวัด นำไปคำนวณหาปริมาณเอนไซม์ได้ตามข้อ 3.2

4. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (Lowry, 1957)

4.1 การเตรียมสารสำหรับหาปริมาณโปรตีน

4.1.1 สารละลาย เอ

โซเดียมคาร์บอเนต	20.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	4.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรต	0.2	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร	1,000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.2 สารละลาย บี

คอปเปอร์ซัลเฟต	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.3 สารละลาย ซี

สารละลาย เอ	50	ส่วน
สารละลาย บี	1	ส่วน

สารละลายผสมนี้เมื่อเตรียมแล้วให้ใช้ภายใน 1 วัน

4.1.4 สารละลาย ฟีนอล (folin-phenol)

ผสมสารละลาย ฟีนอล 1 ส่วน ในน้ำกลั่น 1 ส่วน โดยปริมาตร

4.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

ชั่งโปรตีนมาตรฐาน บอวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin)จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมได้ตามตารางข้างล่าง จะได้โปรตีนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาณโปรตีน **
0.00	0.50	0
0.05	0.45	50
0.10	0.40	100
0.20	0.30	200
0.30	0.20	300

นำสารละลายทุกหลอดที่เตรียมได้ ไปทำปฏิกิริยาตามวิธีของลาวรี หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง (ภาพประกอบ 31) ใช้กราฟนี้สำหรับเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างหลังจากทำปฏิกิริยาโดยวิธีเดียวกัน

** มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

4.3 การหาปริมาณโปรตีน

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนจำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร และน้ำกลั่น 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ผสมลงใน 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของสารละลายผสม ซี (วิธีการเตรียมดังข้อ 4.1.3) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายฟีนอล (วิธีเตรียมดังข้อ 4.1.4) 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อยเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectonic 21) ปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างสามารถหาได้จากการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-300 ไมโครกรัม (วิธีการเตรียมดังข้อ 4.2)

5. ขั้นตอนการแยกและทำเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์

5.1 การทำเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นขึ้น

น้ำใสที่ได้หลังจากการปั่นแยก (crude enzyme) จะนำไปใส่ใน cellophane sheath (molecular weight cut off = 1,000) ขนาด 45x45 เซนติเมตร มัดเป็นถุง นำไปแช่ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (NaPB) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโปรตีนหรือเกลือแร่ขนาด

เล็กออกไป จากนั้น crude enzyme ที่ได้จะนำไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการกรองผ่านเยื่อ (membrane) molecular weight cut off 10,000 ด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน (ultra filtration) ภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 6 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยอุณหภูมิสำหรับการทดลองคือ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน วัดปริมาตรทั้งหมด, หาปริมาณโปรตีน,และทดสอบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (CMCase)

5.2 <u>การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบแลกไอออน</u>

5.2.1 การเตรียมคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-Gel A)

DEAE Bio-Gel A ซึ่งพองตัวเต็มที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ก่อนการใช้ควรทำให้เจลอยู่ในสภาพเป็นกลางโดยล้างเจลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นจึงนำเจลไปแช่ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 นาน 12 ชั่วโมง เพื่อให้เจลอยู่ในสภาพสมดุลย์กับบัฟเฟอร์ที่จะใช้

บรรจุ DEAE Bio-Gel A ลงในคอลัมน์ขนาด 2x67 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูง 65 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.8 ลงในคอลัมน์อย่างน้อย 2-3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในคอลัมน์อย่างเป็นระเบียบสมบูรณ์

5.2.2 การใช้คอลัมน์ DEAE Bio-Gel A

นำเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น เติมลงในคอลัมน์ ชะ (eluted) เจลในคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8 ปริมาตร 130 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ได้หลังจากการชะ จากนั้นเริ่มการเกรเดียนท์เส้นตรง (linear salt gradient) ด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ติดต่อกัน 80 หลอด ด้วยเครื่อง

เก็บแยกส่วน(fraction collector) นำสารละลายทุกหลอดมาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี ลาวรี จากนั้นนำสารละลายทุกหลอดเว้นสองหลอดมาตรวจสอบแอคติวิตีของ CMCase และรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรทั้งหมด และวัดแอคติวิตีรวมอีกครั้ง

5.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี เจลฟิลเตรชัน

5.3.1 การเตรียมคอลัมน์ เซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200)

แช่ Sephacryl S-200 ให้พองตัวในสารละลายผสมของฟอสเฟต บัฟเฟอร์ และโซเดียมเอไซด์ (Na_2S) ร้อยละ 0.04 ก่อนใช้นำเจลไปล้างให้ปราศจากโซเดียมเอไซด์ ด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง และแช่เจลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ใน 0.01โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำเจลที่ได้ไปบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.2 x 120 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูง 110 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ใน โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เพื่อให้เม็ดเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์ในคอลัมน์ หลังจากนั้นตรวจสอบความสม่ำเสมอของการบรรจุเจลลงในคอลัมน์ ด้วยการผ่านสารละลาย บลูเดกซ์แทรน (blue dextran) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์-เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ ในการนี้จะทำให้ทราบปริมาตรช่องว่างระหว่างเจลในคอลัมน์ (void volume) ด้วย

5.3.2 การใช้คอลัมน์ Sephacryl S-200

เติมเอนไซม์ลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 เก็บแยกส่วนสารละลายจากคอลัมน์หลอดละ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ติดต่อกัน 70-80 หลอด ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายทุกหลอดมาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี ลาวรี และวัดแอคติวิตีของ CMCase หลังจากนั้นนำหลอดที่มีแอคติวีตีของเอนไซม์สูงมารวมเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรทั้งหมดและหาแอคติวิตีรวม

5.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบแลกไอออน

การใช้คอลัมน์ Mono Q

การแยกสารในขั้นนี้จะใช้เครื่องมือ Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) คอลัมน์ที่ใช้คือ โมโน คิว(Mono Q HR)ขนาด 0.5x5 เซนติเมตร เตรียมคอลัมน์ให้เหมาะสมกับการนำไปใช้โดยการผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ NaPB ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8 จำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นจึงผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์ ชะด้วย linear salt gradient (0-0.3 โมลาร์ NaCl) ใน NaPB ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8 ด้วยอัตราการไหล 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที

5.5 การแยกโปรตีนด้วยวิธี อิเลคโตรฟอรีซิส (electrophoresis)

5.5.1 การเตรียมสารเคมี

5.5.1.1 อะคริลาไมด์ : บิส (ร้อยละ 30 : 0.8)

อะคริลาไมด์	30.0	กรัม
บิส	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

ละลายให้เข้ากัน กรองเอาตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออกและเก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายนี้ใช้ได้ไม่เกิน 2 เดือน

5.5.1.2 ทริส-บัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.9 ความเข้มข้น 1.5โมลาร์

ทริส	36.3	กรัม
น้ำกลั่น	180.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายที่ได้ไปเก็บในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.5.1.3 ทริส-บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทริส	6.05	กรัม
น้ำกลั่น	85.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายที่ได้ไปเก็บในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.5.1.4 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น ร้อยละ 10

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายนี้เตรียมแค่พอใช้ในแต่ละครั้งเท่านั้น

5.5.1.5 โซเดียมโดเดซิล ซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น ร้อยละ 10

SDS	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	10.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

เก็บสารละลายนี้ในขวดธรรมดาที่อุณหภูมิห้อง

5.5.1.6 ส่วนผสมที่ใช้เป็นองค์ประกอบของเจล

ส่วนผสมของเจล	Stacking Gel	Separating Gel	
		7 %*	9 %**
น้ำกลั่น	6.3	14.9	12.9
อะคริลาไมด์ : บิส	1.0	7.0	9.0
ทริส-บัฟเฟอร์ pH 8.9	-	7.5	7.5
ทริส-บัฟเฟอร์ pH 6.8	2.5	-	-
TEMED (ไมโครลิตร)	10.0	10.0	10.0
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	0.3	0.3
SDS	0.1	-	0.3

หมายเหตุ ปริมาตรที่ใช้มีหน่วยเป็น ลูกบาศก์เซนติเมตร ยกเว้น TEMED

*Separating Gel ร้อยละ 7 ใช้ใน Polyacrylamide Gel Electrophoresis(PAGE)

**Separating Gel ร้อยละ 9 ใช้ใน SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylenediamine

ตาราง 2 ส่วนผสมของแผ่นเจลสำหรับการทำอิเลคโตรฟอรีซิส

5.5.1.7 บัฟเฟอร์สำหรับการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี PAGE

กลีเซอรอล	1.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ทริส-บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8	2.5	ลูกบาศก์เซนติเมตร
โบรโมฟีนอล บลู	12.5	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	5.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.5.1.8 บัฟเฟอร์สำหรับการเตรียมโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	34.0	มิลลิกรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	100.0	มิลลิกรัม
SDS	100.0	มิลลิกรัม
ยูเรีย	3.6	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เมอร์แคปโตเอธานอล	0.1	ลูกบาศก์เซนติเมตร
น้ำกลั่น	10.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.5.1.9 สีที่ใช้ในการติดตามการเคลื่อนที่ (tracking dye)

โบรโมฟีนอล บลู บี	25	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.5.1.10 ทริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.3 (electrode buffer)

ทริส	3.0	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

บัฟเฟอร์ที่เตรียมนี้ใช้สำหรับ PAGE เท่านั้น ในกรณี SDS-PAGE ให้เติม SDS ความเข้มข้น ร้อยละ 10 จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในสารละลายก่อนปรับปริมาตรเป็น 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.5.1.11 น้ำยาย้อมโปรตีน (staining solution)

โคมาสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250	0.5	กรัม
กรดน้ำส้ม	8.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เมทธานอล	45.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร
น้ำกลั่น	200	ลูกบาศก์เซนติเมตร

เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เมื่อใช้แล้วถ้ามีตะกอน ให้กรองเอาตะกอนออก สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

5.5.1.12 น้ำยาล้างสีย้อม (destaining solution)

เมทธานอล	100	ลูกบาศก์เซนติเมตร
กรดน้ำส้ม	75	ลูกบาศก์เซนติเมตร
น้ำกลั่น	1000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.5.2 การทำพอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอรีซิส ชนิดไม่ต่อเนื่อง (discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis ; disc PAGE)

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Davis, 1964 โดยใช้อุปกรณ์การเตรียมเจลชนิดแผ่น (slab gel)

5.5.2.1 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นเจล

วางแผ่นยาง (spacer) ที่มีความหนา 0.1 มิลลิเมตร ที่ขอบทั้ง 3 ด้านของแผ่นแก้วขนาด 8.5x10 เซนติเมตร จากนั้นประกบแผ่นแก้วที่มีขนาดเท่ากันอีกแผ่นเข้าไว้ด้วยกัน ใช้คลิป (clip) หนีบแผ่นแก้วให้แน่น เทสารละลายผสมเซพาเรติง เจล (separating gel)ร้อยละ 7 (เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 5.5.1.6)ลงในแผ่นแก้วให้ได้ความสูง 6 เซนติเมตร หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที หรือ จนกระทั่งเจลแข็งตัว ซึ่งจะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล เติมสารละลายผสมของสแตกกิง เจล (staging gel) (ส่วนผสมแสดงไว้ในข้อ 5.5.1.6) ลงบนเซพาเรติง เจล ที่แข็งตัวดีแล้ว จากนั้นสอดแผ่นพลาสติก

สำหรับเตรียมเป็นช่องใส่สารตัวอย่าง (comb) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว เมื่อเจลแข็งตัว ถอดแผ่นพลาสติกดังกล่าวและ spacer ออก โดยระวังอย่าให้เจลที่อยู่ระหว่างซี่ของ comb ขาด ล้างช่องใส่สารตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ (การเตรียมดังข้อ 5.5.1.10) นำแผ่นแก้วที่มีเจลแข็งตัวอยู่นี้ไปตั้งติดกับกล่อง (chamber) ที่มีอิเลคโทรด บัฟเฟอร์ (electrode buffer) อยู่ทั้งด้านบนและล่าง เติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ให้ท่วมช่องใส่สารตัวอย่าง ไล่อากาศที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วด้านล่างออกให้หมด

5.5.2.2 การเตรียมเอนไซม์โปรตีน

นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมาผสมกับสีติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนและสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (วิธีการเตรียมดังข้อ 5.5.1.7) ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นำไปหยอดลงในช่องสำหรับใส่สารตัวอย่างบนเจลช่องละ 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.5.2.3 การดำเนินการทดลอง

หลังจากเติมโปรตีนลงในช่องของแผ่นเจลแล้ว ต่อสายไฟจาก chamber เข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้ chamber บนต่อเข้ากับขั้วลบ chamber ล่างต่อเข้ากับขั้วบวก ผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ขนาด 10 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีในแผ่นเจลเคลื่อนที่ลงจากแผ่นเจลหมดพอดี แกะเจลออกจากแผ่นแก้ว นำไปย้อมสี

5.5.2.4 วิธีการย้อมสีโปรตีนในพอลิอะคริลาไมด์ เจล

นำแผ่นเจลมาย้อมสีด้วยน้ำยาย้อมโปรตีน (staining solution) (วิธีเตรียมดังข้อ 5.5.1.11) เพื่อดูตำแหน่งของโปรตีน โดยแช่เจลในน้ำยาย้อมโปรตีน เป็นเวลา 45 นาที เทสีที่ใช้ย้อมออก แล้วล้างสีส่วนเกินที่ติดอยู่บนแผ่นเจลด้วยน้ำยาล้างสีย้อม (destaining solution) (วิธีเตรียมดังข้อ 5.5.1.12)

5.5.3 การทำอิเลคโตรฟอรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลพอลิอะคริลาไมด์ เจล (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS PAGE)

การทำอิเลคโตรฟอรีซิสวิธีนี้ใช้วิธีของ Laemmli. 1970

5.5.3.1 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นเจล

ทำได้ในทำนองเดียวกันกับการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์ เจลชนิดแผ่นไม่ต่อเนื่องในข้อ 5.5.2.1 แต่เปลี่ยนแปลงส่วนผสมของเนื้อเจลในเซพาเรติงเจล เป็นร้อยละ 9 ตามวิธีในข้อ 5.5.1.6

5.5.3.2 การเตรียมเอนไซม์โปรตีน

โปรตีนมาตรฐานผสม (mixed standard protein) ที่ใช้ในการทำอิเลคโตรฟอรีซิสนี้ ประกอบด้วย ฟอสโฟรีเลส บี (phosphorylase B) น้ำหนักโมเลกุล 94,000 ดาลตัน, บอวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน, อัลบูมินจากไข่ขาว (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน, สารยับยั้งทริปซิน (saybean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 20,000 ดาลตัน ผสมอยู่ในขวดแก้วเล็ก (vial) ในรูปผงแห้ง การนำไปใช้ทำได้โดยเติมน้ำกลั่นจำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าเบา ๆ ให้ผงโปรตีนละลาย ควรเก็บในช่องแช่แข็งหลังการใช้

นำโปรตีนมาตรฐานผสมและเอนไซม์ที่จะวิเคราะห์ จำนวน 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร แยกใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก เติมบัฟเฟอร์ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในข้อ 5.5.1.8 จำนวน 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และทำให้เย็นลงทันทีด้วยน้ำเย็น จากนั้นนำไปเติมสารละลายสีที่ใช้ในการติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีน (tracking dye) (วิธีเตรียมดังข้อ 5.5.1.9) และกลีเซอรอล อย่างละ 0.01 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้เข้ากันนำไปใส่ในช่องใส่สารตัวอย่างบนแผ่นเจล ช่องละ 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.5.3.3 การดำเนินการทดลอง

ทำในทำนองเดียวกันกับข้อ 5.5.2.3 แต่ใช้สารละลายทริส-ไกลซีน อิเลคโทรด บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.3 ที่มี SDS ร้อยละ 10 แทนบัฟเฟอร์เดิม กระแสไฟฟ้าที่ใช้ผ่านเจลมีขนาด 10 มิลลิแอมแปร์

5.5.3.4 การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ทำได้โดยวัดระยะทางของแถบโปรตีนที่เคลื่อนที่ในแผ่นเจลเริ่มวัดจากก้นหลุม (well) ที่ใส่โปรตีนจนถึงแถบโปรตีน และระยะทางที่ใช้แยกโปรตีน (ระยะจากก้นหลุมถึงสุดแผ่นเจล) ค่าที่วัดได้นำไปคำนวณหา Mobility ดังนี้

Mobility = ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ใช้แยกโปรตีน

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Mobility กับ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด ใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่เคลื่อนที่ในเจลแผ่นเดียวกันนี้ โดยวัดระยะทางที่เอนไซม์เคลื่อนที่ได้ นำไปคำนวณค่า Mobility แล้วจึงนำค่าที่ได้ไปเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากเส้นกราฟมาตรฐานโปรตีนที่เตรียมไว้

5.6 <u>การประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธี เจลฟิลเตรชัน</u>

5.6.1 การเตรียมคอลัมน์ เซฟาคริล เอส-200

บรรจุเจล เซฟาคริล เอส-200 (การเตรียมเจลดังข้อ 5.3.1) ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1x70 เซนติเมตร ปล่อยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ชะผ่านคอลัมน์เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวเป็นระเบียบในคอลัมน์ เป็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง จากนั้นหาปริมาตรระหว่างช่องเจล และปริมาตรของเจลทั้งหมดในคอลัมน์ โดยการเติมสารละลายผสมของ บลูเดกซ์แทรน และโพแทสเซียมเฟอร์-

ริไซยาไนด์ อย่างละ 0.001 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ดังกล่าวข้างต้น เก็บแยกส่วนสารละลายที่ได้จากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน ลำดับส่วนละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.6.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ใช้โปรตีนมาตรฐาน อัลโดเลส น้ำหนักโมเลกุล 158,000 ดาลตัน, อัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน และไคโมทริปซิโนเจน น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อบัฟเฟอร์ 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผ่านลงในคอลัมน์ครั้งละ 1 ชนิด เก็บสารละลายจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ปริมาตรของโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์นำไปคำนวนค่า K_{av} ดังสมการ

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e (elution volume) คือปริมาตรของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์

V_o (void volume) คือปริมาตรช่องว่างระหว่างเจล

V_t (total volume) คือปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์

เขียนกราฟระหว่างค่า K_{av} และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

5.6.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ผ่านเอนไซม์ที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในคอลัมน์ ชะด้วยบัฟเฟอร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ได้จากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ปริมาตรของเอนไซม์ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์นำไปคำนวนค่า K_{av} ค่าที่ได้เมื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้ จะทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

6. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่บริสุทธิ์

6.1 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์(Optimum pH)

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.3 โดยบ่มเอมไซม์ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับ สารละลายสับสเตรท (CMC) 4.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ คือ 4.0-6.0 (0.05 โมลาร์ อะซิเตต บัฟเฟอร์), 6.0-8.0 (0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์), 8.0-10.0 (0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์)

6.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์(Optimum temperature)

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับสารละลายสับสเตรท 4.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 10-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดอีก 5 นาที จากนั้นนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย Oswald viscometer No. 3

6.3 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ (pH stability)

บ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ตั้งแต่ 4.0-10.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับในข้อ 6.1 ด้วยอัตราส่วนเอนไซม์ต่อบัฟเฟอร์เป็น 0.1 : 0.4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปหาแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.3

6.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ (Thermal stability)

บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 20-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.3

6.5 ศึกษาผลของสารเคมีบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ที่มีสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.01 โมลาร์ จำนวน 0.9 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ ไปทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ ตามวิธีในข้อ 3.3 สารเคมีที่ใช้ทดสอบได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$), โคบอล(II)คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$), คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$), EDTA, เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$), เมอร์คิวรีคลอไรด์ ($HgCl_2$), แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$), ไดไทโอทริทอล (dithiothreitol ; $C_4H_{10}O_2S_2$), เมอร์แคปโตเอธานอล (mercaptoethanol), ไอโอโดอะเซทตาไมด์ (iodoacetamide ; CH_2ICONH_2), พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต (p-chloromercuribenzoate)

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 ผลการศึกษาพฤติกรรมของตัวแปรต่าง ๆ ในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส Carboxymethylcellulase (CMCase)

ในการผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (Carboxymethylcellulase) หรือ CMCase นี้ ได้จากการนำเชื้อ ***Clostridium josui*** ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่และเจริญเติบโตได้ดีในที่ที่ไม่มีออกซิเจน ที่เก็บอยู่ในรูปผงแห้ง (lyophilized) มากระตุ้นการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีเซลลูโลสซึ่งเป็นสารอาหารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ สภาวะการเพาะเลี้ยงจะต้องปราศจากออกซิเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 6.8-7.0 เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เชื้อจะมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ขั้นตอนการผลิตเอนไซม์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อที่อยู่ในรูปผงแห้ง ซึ่งไม่มีกิจกรรมของเซลล์ ให้กลับมาใช้สารอาหารและแสดงกิจกรรม

2. การเตรียมหัวเชื้อสำหรับถังหมัก เป็นการเลี้ยงเชื้อให้มีการเจริญอยู่ในระยะ log phase ในปริมาณมาก ๆ เพื่อนำไปย่อยเซลลูโลสในถังหมัก

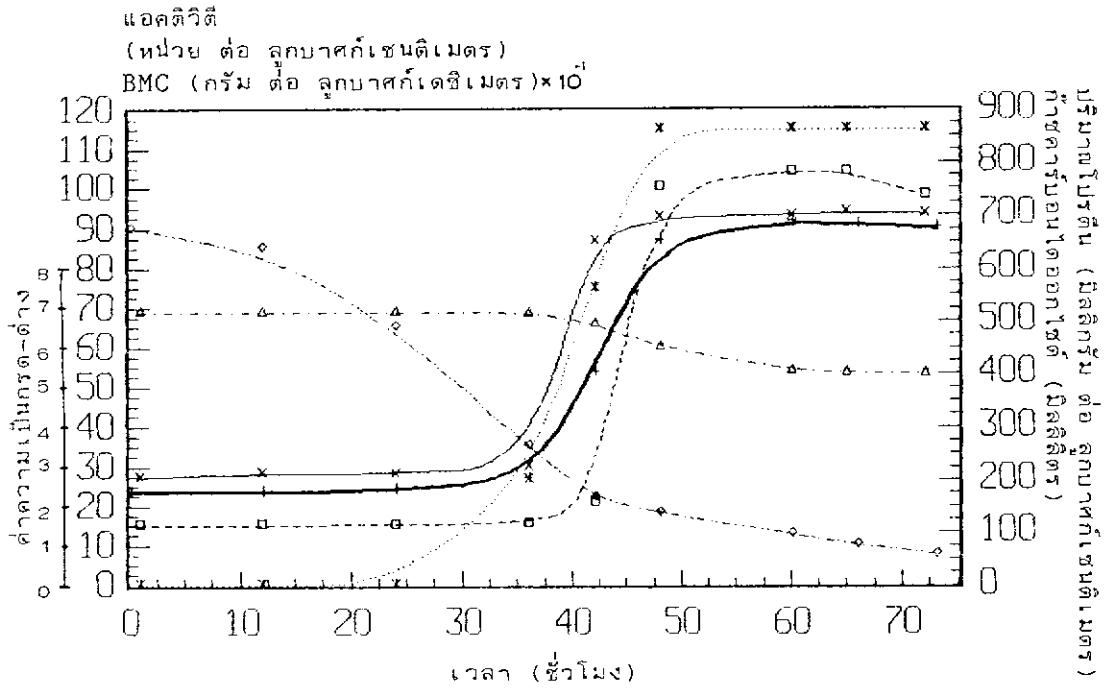
3. การผลิตเอนไซม์ในถังหมัก เป็นขั้นตอนที่ใช้เชื้อจำนวนมากผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดลอง

จากแผนการทดลองที่กำหนดขึ้นดังกล่าวไว้ในวิธีดำเนินการวิจัย ได้มีการศึกษาตัวแปรต่าง ๆ ดังนี้คือ

3.1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เมื่อนำเชื้อ *C. josui* ไปบ่มตามขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไว้ข้างต้น ระยะเวลาที่เชื้อผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ย่อยเซลลูโลสในถังหมักขนาด 5,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากภาพประกอบ 8 แสดงให้เห็นว่าช่วงระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase พิจารณาจากค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase(ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3) ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในถังหมักทุก ๆ 12 ชั่วโมง และทุก ๆ 2 ชั่วโมงหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าแอคติวิตีจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ และค่าแอคติวิตีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้น กล่าวคือเมื่อเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ CMCase เพื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสมาก ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะมากตามไปด้วย ในช่วงแรกของการผลิตเอนไซม์ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าน้อยและจะเริ่มสูงขึ้นภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนค่าแอคติวิตีสูงสุดที่ 60 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แอคติวิตีของเอนไซม์จะคงมีปริมาณสูงต่อไปเป็นเวลาเกือบ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นแอคติวิตีจะค่อย ๆลดลงเป็นลำดับ แสดงให้เห็นว่า เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากอยู่ในช่วง 60-66 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง แต่ถ้าใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่าช่วงเวลาดังกล่าวแล้ว จะมีผลทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณลดลง ซึ่งเห็นได้จากแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงตามไปด้วย การลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส อาจมีสาเหตุจากเอนไซม์ชนิดอื่นที่เชื้อผลิตออกมา คือนอกจากแบคทีเรียนี้จะผลิต CMCase เพื่อย่อยเซลลูโลสแล้ว ยังผลิตเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ ซึ่งเอนไซม์ CMCase ก็เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งจึงถูกย่อยได้เช่นกัน

นอกจากจะพิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แล้ว ตัวแปรอื่น ๆ มีการเปลี่ยนแปลงไป ในขณะที่มีการผลิตเอนไซม์เช่นกัน



ภาพประกอบ 8 ความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ในถังหมัก

การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ความเป็นกรด-ด่าง

ปริมาณโปรตีน

แอคติวิตีของเอนไซม์

BMC

3.1.2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การผลิตเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *C. josui* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มแรกมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในสภาพที่เป็นกลางคือ 6.8-7.0 ขณะที่มีการผลิตเอนไซม์ในถังหมักค่าความเป็นกรด-ด่างจะค่อย ๆ ลดลง พร้อมกันนี้ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในกระบอกเก็บก๊าซ โดยการแทนที่น้ำจะมีปริมาตรเพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงอย่างรวดเร็วและปริมาณก๊าซที่เพิ่มมากขึ้นจะเห็นได้ชัดเมื่อเอนไซม์ถูกผลิตออกมามาก จากภาพประกอบ 8 จะเห็นว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักเป็นเวลา 60 ชั่วโมงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจาก 7 เป็น 5.5 ทั้งนี้เนื่องมาจากกลไก(metabolism) ของการย่อยสลายสารอาหารของเชื้อซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน จะให้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ เอธิลแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น กรดน้ำส้ม เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้หลังจากเชื้อผลิตได้จะถูกนำออกนอกเซลล์ จึงมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง

อนึ่ง ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างในขณะเลี้ยงเชื้อ จะเห็นว่า ที่ความเป็นกรดเท่ากับ 5.5 เชื้อจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด หลังจากนั้นความเป็นด่างจะเพิ่มขึ้น แต่แอคติวิตีของเอนไซม์จะเริ่มลดลง ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่า ที่ความเป็นกรดเท่ากับ 5.5 หรือต่ำกว่า ไม่เหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ เพราะเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานแตกต่างกัน

สำหรับก๊าซที่เกิดขึ้นในกระบอกเก็บก๊าซขณะที่เชื้อทำการย่อยสลายเซลลูโลส (มีแอคติวิตีของเอนไซม์) จะพบว่าปริมาณก๊าซจะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น ปริมาตรสูงสุดที่วัดได้คือ 430 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ที่ 60 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก เมื่อนำก๊าซไปทดสอบกับสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าก๊าซที่เกิดขึ้นมีส่วนประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซที่ได้เกิดจากขบวนการย่อยสลายสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ค่อย ๆ เพิ่มมากขึ้น และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลง สามารถนำมาใช้เป็นค่าวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อสะดวกต่อการหาช่วงเวลาในการผลิตเอนไซม์ได้ นั่นคือเมื่อสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเริ่มมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เริ่มเกิดขึ้นมาก จะเป็นช่วงเวลาที่ควรเก็บตัวอย่าง

ให้ดีขึ้น เพราะค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะเริ่มมากขึ้น ซึ่งหมายถึงใกล้จะถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อการเก็บเกี่ยวเอนไซม์นั่นเอง

การพิจารณาพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรต่าง ๆ ในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ CMCase ดังกล่าวข้างต้น ไม่ได้ทำการศึกษาสภาวะต่าง ๆ สำหรับการผลิตเอนไซม์ ซึ่งในขั้นตอนที่กล่าวมายังมีตัวแปรอื่น ๆ ที่จะต้องทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมอีกหลายประการ อาทิเช่น ชนิดและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ สภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ ปริมาณเชื้อและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เนื่องจากขอบเขตการวิจัยครั้งนี้ เพียงต้องการศึกษาการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส โดยอาศัยการพิจารณาตัวแปร 2 ตัว คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์

การทำวิจัยได้เน้นถึงการผลิตเอนไซม์ CMCase จากเชื้อแบคทีเรีย และนำเอนไซม์ที่ได้นี้ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อไปใช้ประโยชน์ต่อไป โดยในแต่ละขั้นตอนของการทดลอง จะมีการทดสอบค่าแอคติวิตีและโปรตีนของเอนไซม์ที่ผลิตได้

3.2 ผลการทำเอนไซม์ให้เข้มข้น ด้วยวิธี ไดอะลิซิส และ อัลตราฟิลเตรชัน

หลังจากเก็บเกี่ยวเอนไซม์ออกจากถังหมัก ด้วยวิธีที่กล่าวไว้ในการทดลองข้อ 2.2.3 น้ำใสที่ได้จากการปั่นแยก (crude enzyme) มีปริมาตร 1,905 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาณโปรตีน 270 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปทำไดอะลิซิส (dialysis) ตามวิธีทดลองข้อ 5.1 การทำไดอะลิซิสนี้มีจุดประสงค์เพื่อกำจัดสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งเป็นสารอาหารที่เหลืออยู่ หรือสารที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ออกจาก crude enzyme โดยอาศัยหลักการแพร่ผ่านเยื่อ (membrane) เป็นสำคัญ ดังนั้นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารูของเยื่อ (มากกว่า 1,000 ดาลตัน) เช่น เอนไซม์โปรตีน จะไม่สามารถแพร่ออกไปได้ จึงถูกเก็บไว้ในถุง ขณะเดียวกันบัฟเฟอร์จากภายนอกถุงก็สามารถแพร่เข้าสู่ภายในถุงได้ ทำให้ปริมาตรรวมของ crude enzyme หลังการทำไดอะลิซิสมีปริมาตรเพิ่มขึ้น

การทำไดอะลิซิสควรทำที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เพื่อเป็นการป้องกันการสูญเสียเอนไซม์ และควรจะใช้เวลาในการทำไดอะลิซิสนานหลายชั่วโมงถึงหลายวัน โดยต้องการให้ชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็กถูกกำจัดออกจาก crude enzyme อย่างสมบูรณ์ และง่ายแก่การทำเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป แต่ในการทดลองนี้ไม่สามารถทำไดอะลิซิสนานเป็นวันได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่สกัดได้เป็นเอนไซม์เซลลูเลส และเยื่อเมมเบรนที่ใช้ มีองค์ประกอบที่ทำจากวัสดุพวกเซลลูโลส ซึ่งเอนไซม์สามารถย่อยเยื่อให้ขาดได้ แต่เพื่อมิให้ crude enzyme มีชีวโมเลกุลหลายชนิด ซึ่งจะเป็นปัญหาต่อการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จึงทำไดอะลิซิสเป็นเวลาสั้น ๆเพื่อลดจำนวนชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงบางส่วน สังเกตจากปริมาตรรวมของ crude enzyme หลังการทำไดอะลิซิสมีมากขึ้นและสีชมพูของ crude enzyme ในถุงจางลง ในขณะที่บัฟเฟอร์ในถังหลังการทำไดอะลิซิสมีสีชมพูปรากฏอยู่ด้วย (crude enzyme มีสีชมพูเนื่องจาก เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติม resazurin ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) สำหรับออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากออกซิเจน อาหารนั้นจะไม่มีสี แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีออกซิเจนละลายอยู่ อาหารนั้นจะปรากฏสีชมพูขึ้น การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ออกจากถังหมักเป็นการทำให้อาหารสัมผัสกับออกซิเจนในบรรยากาศ ดังนั้น crude enzyme ที่ได้จึงมีสีชมพู)

crude enzyme ที่ได้หลังการทำไดอะลิซิส (2,065 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาณโปรตีน 103 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) นำไปทำให้มีปริมาตรเข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) ดังในวิธีการทดลองข้อที่ 5.1 โดยอาศัยแรงดันของก๊าซเฉื่อย (ก๊าซไนโตรเจน) ดันสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ให้ผ่านเยื่อที่มีขนาดของรู (pore size) จำกัด ชีวโมเลกุลที่ขนาดเล็กกว่ารูของเยื่อ (น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000) ก็จะถูกดันให้ผ่านเยื่อไปได้พร้อมกับ บัฟเฟอร์, เกลือแร่ต่าง ๆ รวมทั้งชีวโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกกำจัดออกจาก crude enzyme อย่างมากมายโดยวิธีนี้ ทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

3.3 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

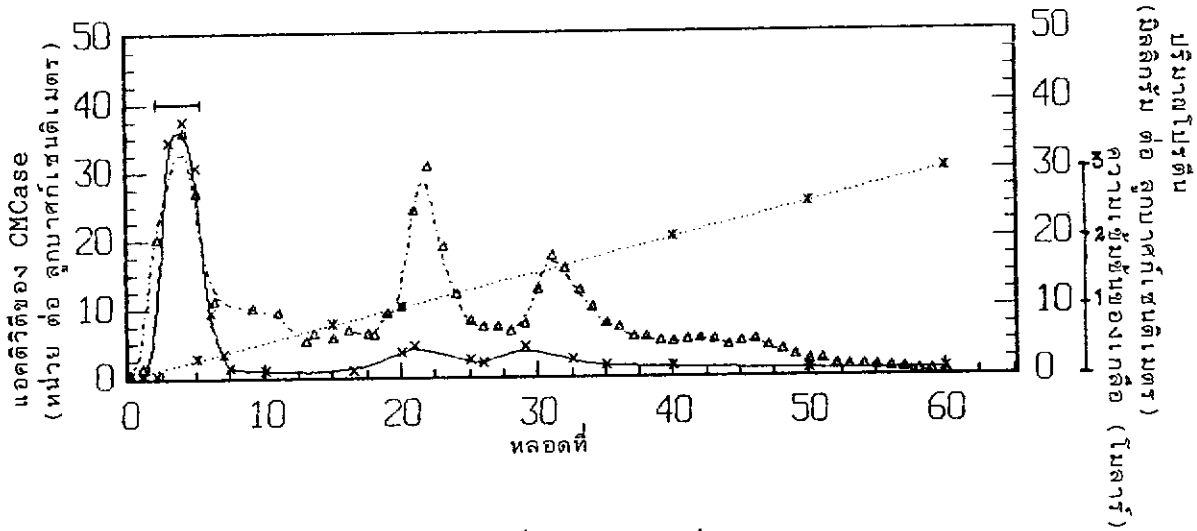
(purification of enzyme by chromatography technique)

เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นจำนวน 89 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาณโปรตีน 47 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จะใช้ในการศึกษาทำให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ผลการทดลองดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.3.1 ผลการทำเอนไซม์ CMCase ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกไอออนด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-Gel A column)

เอนไซม์ปริมาตร 89 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 47 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (ดังในวิธีดำเนินการทดลองข้อที่ 5.2.2) เริ่มต้นชะเจลในคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อทำให้โปรตีนที่ไม่ยึดติดกับเจลถูกชะออก ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase ในบัฟเฟอร์หลังการชะไม่พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ จากนั้นชะเจลในคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรง (linear gradient) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นจาก 0-1 โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี และหาแอคติวิตีของ CMCase ผลการทดลองดังภาพประกอบ 9 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่มีแอคติวิตีของ CMCase มี 2 ยอด (peak) ยอดแรกเป็นยอดที่มีแอคติวิตีสูงและมีปริมาณมาก ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.04 โมลาร์ ส่วนยอดหลังเป็นยอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์น้อย ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.33โมลาร์

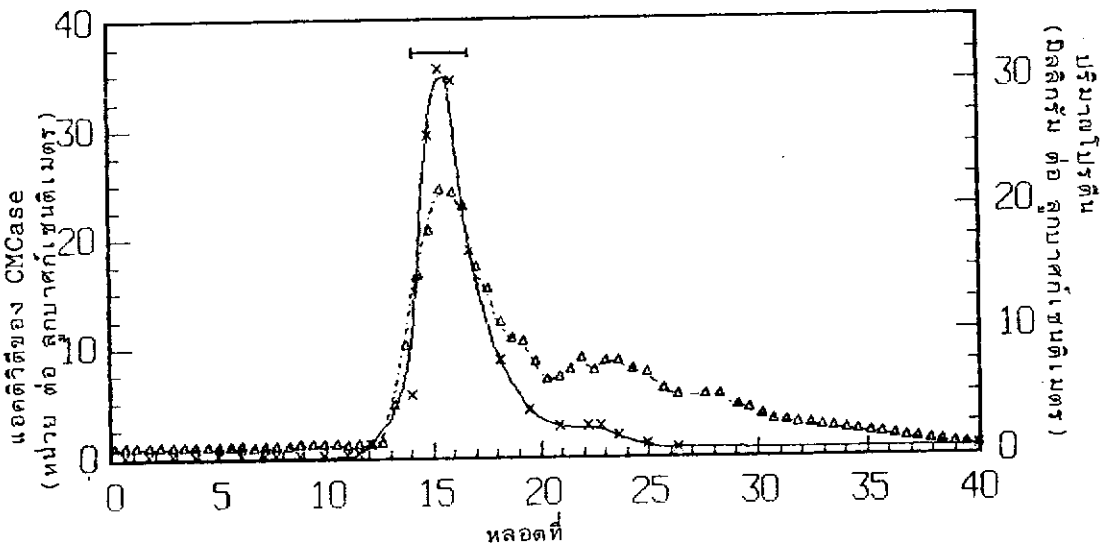
เนื่องจากเอนไซม์ในส่วนหลังนี้มีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพียง 22 หน่วยต่อ - ลูกบาศก์เซนติเมตร และมีปริมาณเอนไซม์จำนวนน้อย ดังนั้นจึงเก็บเฉพาะเอนไซม์ในส่วนแรก ที่มีปริมาณมาก โดยนำแต่ละลำดับส่วนที่ได้มารวมกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชันก่อนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป



ภาพประกอบ 9 การแยกโปรตีนของเอนไซม์ โดยใช้คอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ขนาด 2 x 67 เซนติเมตร ชะด้วย เกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เก็บแยกส่วนหลอดละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.2.2 (·····*····· เส้นเกรเดียนท์, —*— แอคติวิตีของเอนไซม์, ---▲--- ปริมาณโปรตีน, ⊢⊣ หลอดที่นำมารวมเพื่อทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป)

3.3.2 ผลการทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยใช้คอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200 Column)

เอนไซม์จากคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ปริมาตร 22 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีปริมาณโปรตีน 21 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1x110 เซนติเมตร) วิธีเตรียมคอลัมน์ได้กล่าวไว้ในวิธีดำเนินการทดลองข้อ 5.3.1) ผลที่ได้จากการเก็บแยกลำดับส่วน ดังแสดงในภาพประกอบ 10 พบว่ายอดที่มีแอคติวิตีของ CMCase มีเพียงยอดเดียว จากการชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่า CMCase นี้ถูกชะออกจากคอลัมน์หลังปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ (void volume) เพียงเล็กน้อย แสดงว่า เอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างมาก เก็บเอนไซม์เฉพาะหลอดที่มีแอคติวิตีสูงมารวมกัน (หลอดที่ 14-17) ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 70 เท่า



ภาพประกอบ 10 การแยกโปรตีนของเอนไซม์จากคอลัมน์ เซฟาคริล เอส-200 ขนาด 1.2x120 เซนติเมตร ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ด้วยอัตราเร็ว 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.3.2 (-·-·-△-·-·- ปริมาณโปรตีน, —×— แอคติวิตีของเอนไซม์, ⊢—⊣ หลอดที่นำมารวมเพื่อทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป)

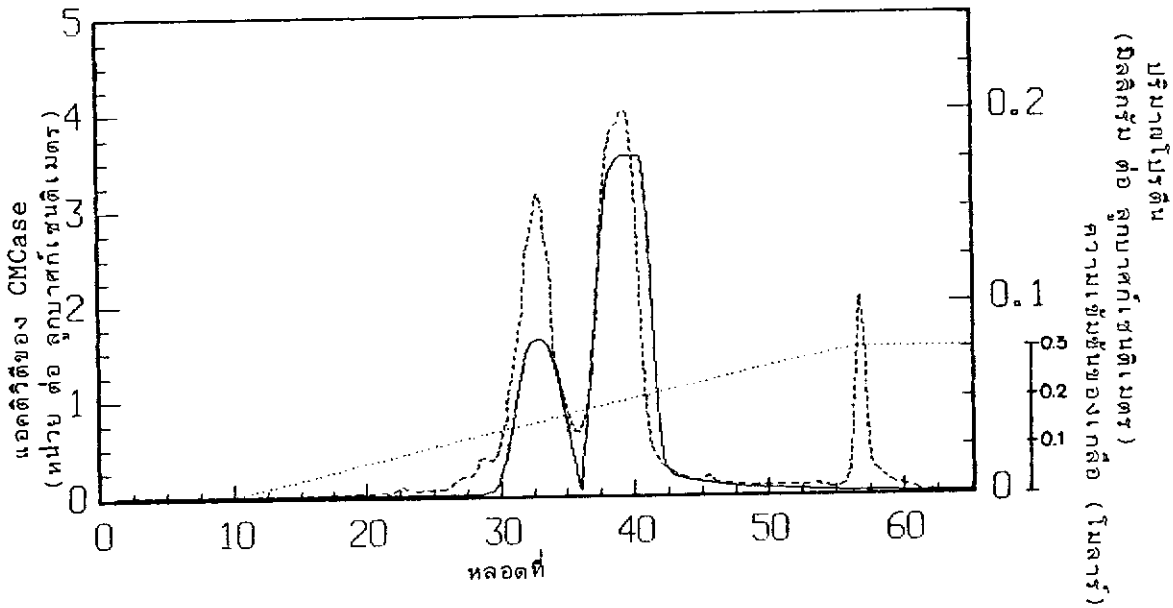
3.3.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกไอออนบนคอลัมน์โมโนคิว (Mono Q column)

เนื่องจากบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าจะทำให้เอนไซม์จับยึดกับเจลในโมโนคิวได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการเจือจางปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีอยู่ในเอนไซม์ จึงต้องเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 จำนวน 10 เท่าลงในเอนไซม์ ก่อนที่จะนำเอนไซม์ไปผ่านลงในคอลัมน์โมโนคิว

สารละลายเอนไซม์จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาณโปรตีน 16 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้สำหรับเริ่มต้นในการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ โมโน คิว หลังจากชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0-0.3 โมลาร์ เก็บสารละลายที่ได้จากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผลที่ได้ดังภาพประกอบ 11 พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่มีแอคติวิตีของ CMCase ได้ 2 ส่วน ส่วนแรกถูกชะออกก่อนด้วยความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.14 โมลาร์ กำหนดให้เป็น CMCase I และส่วนที่ 2 ชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.18 โมลาร์ กำหนดให้เป็น CMCase II

การทำ CMCase ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ โมโน คิว นี้ นับเป็นการแยกที่มีประสิทธิภาพสูงมาก เพราะสามารถแยกโปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีของ CMCase ออกจากโปรตีนที่มีแอคติวิตีได้อย่างแท้จริง โดยเมื่อนำเอนไซม์ไปตรวจสอบแอคติวิตีพบว่า CMCase I มีแอคติวิตี 2.1 หน่วย และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 389 เท่า ในขณะที่ CMCase II มีแอคติวิตี 4.2 หน่วย ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 700 เท่า

ผลการทำเอนไซม์ CMCase ให้บริสุทธิ์นั้นสรุปไว้ในตาราง 3 จะเห็นว่า เอนไซม์เริ่มต้น(crude enzyme) ที่เตรียมจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ดังการทดลองข้างต้น สามารถแยกเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสได้ 2 ชนิด คือ CMCase I และ CMCase II



ภาพประกอบ 11 การแยกโปรตีนของเอนไซม์ด้วยเครื่อง FPLC โดยใช้คอลัมน์โมโนคิว ขนาด 0.5x5 เซนติเมตร ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.4 (--------- ปริมาณโปรตีน, ———— แอคติวิตีของเอนไซม์, ... เส้นเกรเดียนท์)

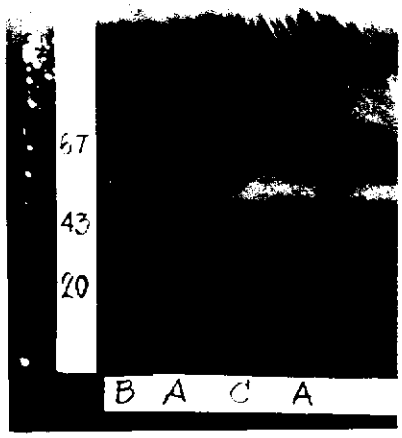
ตาราง 3 สรุปขั้นตอนการแยกเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสของ *C. josui* ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรทั้งหมด (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	แอคติวิตีที่ได้ (ร้อยละ)	ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (เท่า)	รีคอฟเวอรี (ร้อยละ)
เอนไซม์ที่สกัดได้จากถังหมัก	1,905	15,240	514,350	0.03	100	1	
ไดอะไลซิส	2,065	15,487.5	212,690	0.07	98.4	2	100
ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ	57	1,539	1,368	1.1	45.5	37	75
เซฟาคริล เอส 200	11	374	176	2.1	24.3	70	24
โมโนคิว							
CMCase I	1	2.1	0.18	11.67	0.56	389	1
CMCase II	2	4.2	0.2	21.0	1.12	700	3

3.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธี อิเลคโตรฟอรีซิส (electrophoresis)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ทำได้โดยใช้วิธีอิเลคโตรฟอรีซิส บนพอลิ-อะคริลาไมด์ เจล (acrylamide gel electrophoresis; PAGE, ตามวิธีของ David. 1964) ความเข้มข้นร้อยละ 7 พบว่าทั้ง CMCase I และ II ปรากฏแถบโปรตีน (protein band)ให้เห็นเอนไซม์ละ 1 แถบดังภาพประกอบ 12 เนื่องจากแถบโปรตีนที่ได้นี้อยู่ชิดกับส่วนของสแตกกิง เจล มาก ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าเอนไซม์นี้บริสุทธิ์หรือไม่ เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ ความเข้มข้นของเจลในชั้น เซพาเรติง ไม่เหมาะสมกับขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ วิธีแก้ไขคือลดความเข้มข้นของเจลลง แต่จากภาพที่ได้พอจะทำให้ทราบว่าเอนไซม์โปรตีนของ CMCase I และ II มีขนาดค่อนข้างใหญ่ และไม่พบว่ามีโปรตีนขนาดเล็กอื่นใดอยู่

การตรวจสอบหน่วยย่อยของเอนไซม์โดยวิธีอิเลคโตรฟอรีซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์ เจล (sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS PAGE) ให้เจลในชั้นเซพาเรติง (separating gel) มีความเข้มข้นร้อยละ 9 ผลที่ได้ดังภาพประกอบ 13 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CMCase I ให้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และเมื่อเปรียบเทียบค่า relative mobility ของแถบโปรตีนที่ได้กับแถบโปรตีนมาตรฐาน (ภาพประกอบ 14) จะได้น้ำหนักโมเลกุลของ CMCase I เท่ากับ 92,000 ดาลตัน ส่วน CMCase II นั้นจะปรากฏแถบโปรตีนให้เห็น 2 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 115,000 และ 73,000 ดาลตัน แสดงให้เห็นว่า CMCase II เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย แต่ละหน่วยมีขนาดแตกต่างกัน



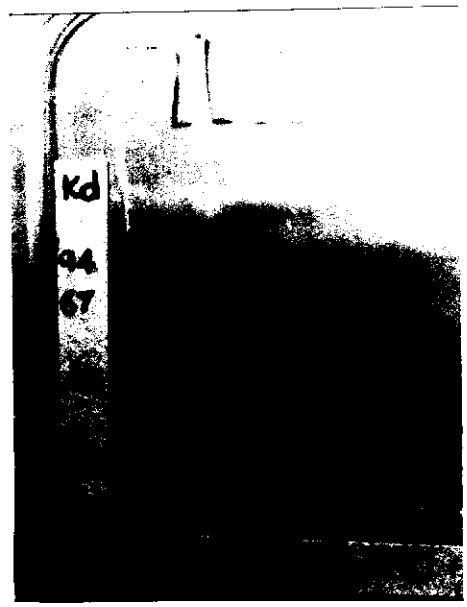
ภาพประกอบ 12 แถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบโดยวิธี พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรฟอรีซิส รายละเอียดของการทดลองตามข้อ 5.5.2.3

แกนตั้ง Kd คือ หน่วยของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (กิโลดาลตัน)

แกนนอน A คือ แถวที่แสดงแถบโปรตีนมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย ฟอสโฟรีเลส บี น้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน, บอวาย ซีรัม อัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดาลตัน, อัลบูมินจากไข่ขาว น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน และสารยับยั้งทริปซิน น้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน

B คือ แถวที่แสดงแถบโปรตีนของเอนไซม์ CMCase I

C คือ แถวที่แสดงแถบโปรตีนของเอนไซม์ CMCase II



ภาพประกอบ 13 แถบโปรตีนของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบด้วยวิธี อิเลคโตรฟอรีซิส บนโซเดียมไดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์ เจล ความเข้มข้นของเจล ร้อยละ 9 รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.5.3.3

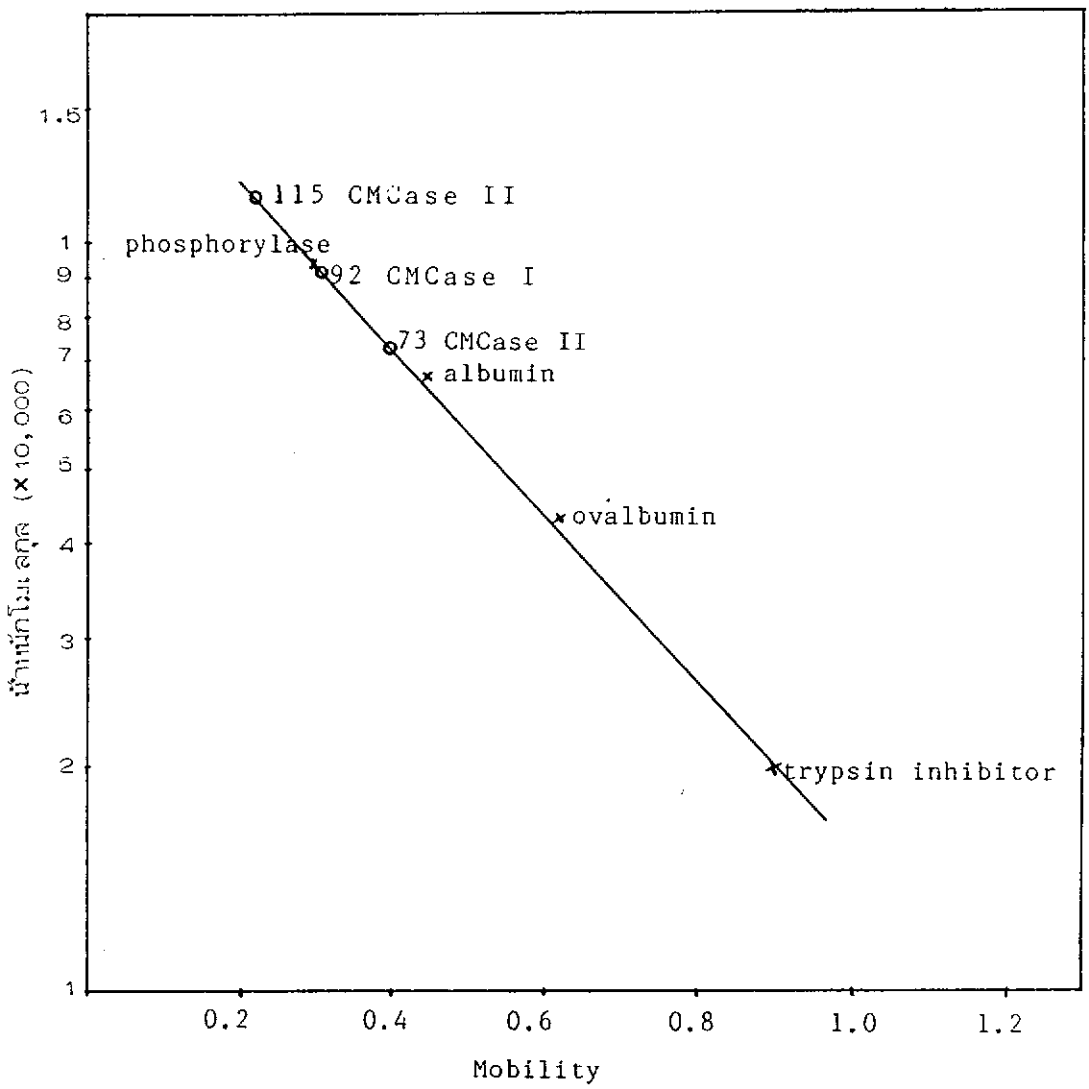
แนวตั้ง Kd หน่วยของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (กิโลดาลตัน)

แนวนอน A คือ แถวที่แสดงแถบโปรตีนมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย ฟอสโฟรีเลส บี น้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน, บอวาย ซีรัม อัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดาลตัน, อัลบูมินจากไข่ขาว น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน และสารยับยั้งทริปซิน น้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน

B, B_1 คือ แถวที่แสดงแถบโปรตีนของเอนไซม์ CMCase II

B_2 คือ แถวที่แสดงแถบโปรตีนของเอนไซม์ CMCase II ที่เจือจางลงเท่าตัว

C คือ แถวที่แสดงแถบโปรตีนของเอนไซม์ CMCase I

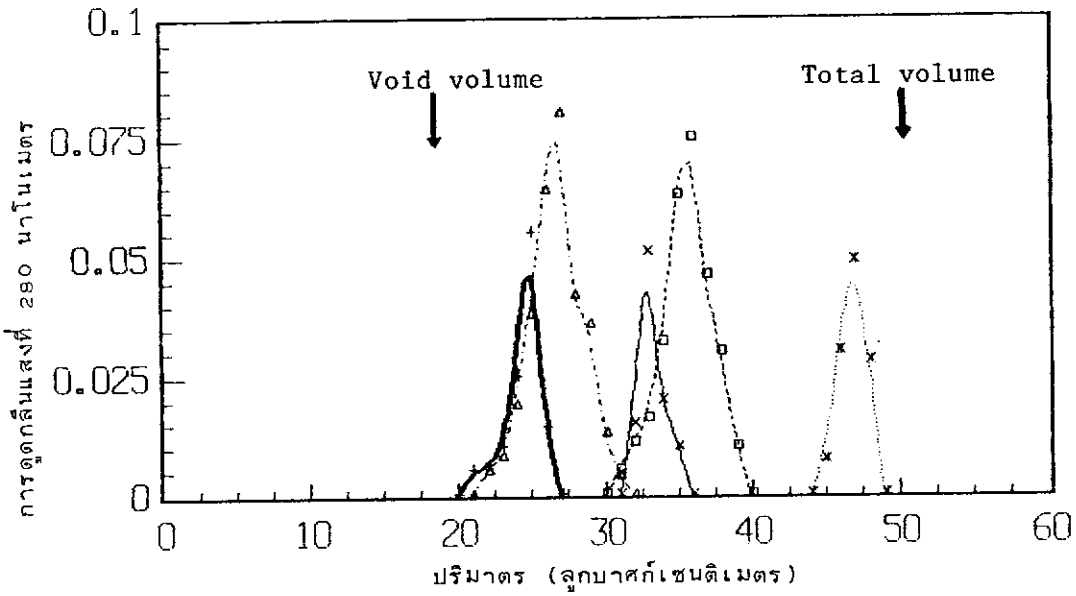


ภาพประกอบ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Mobility ของโปรตีนมาตรฐาน และ log ของน้ำหนักโมเลกุล ในการหาน้ำหนักหน่วยย่อยของโมเลกุลของเอนไซม์ CMCase I และ CMCase II โดยใช้วิธี SDS PAGE รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.5.3

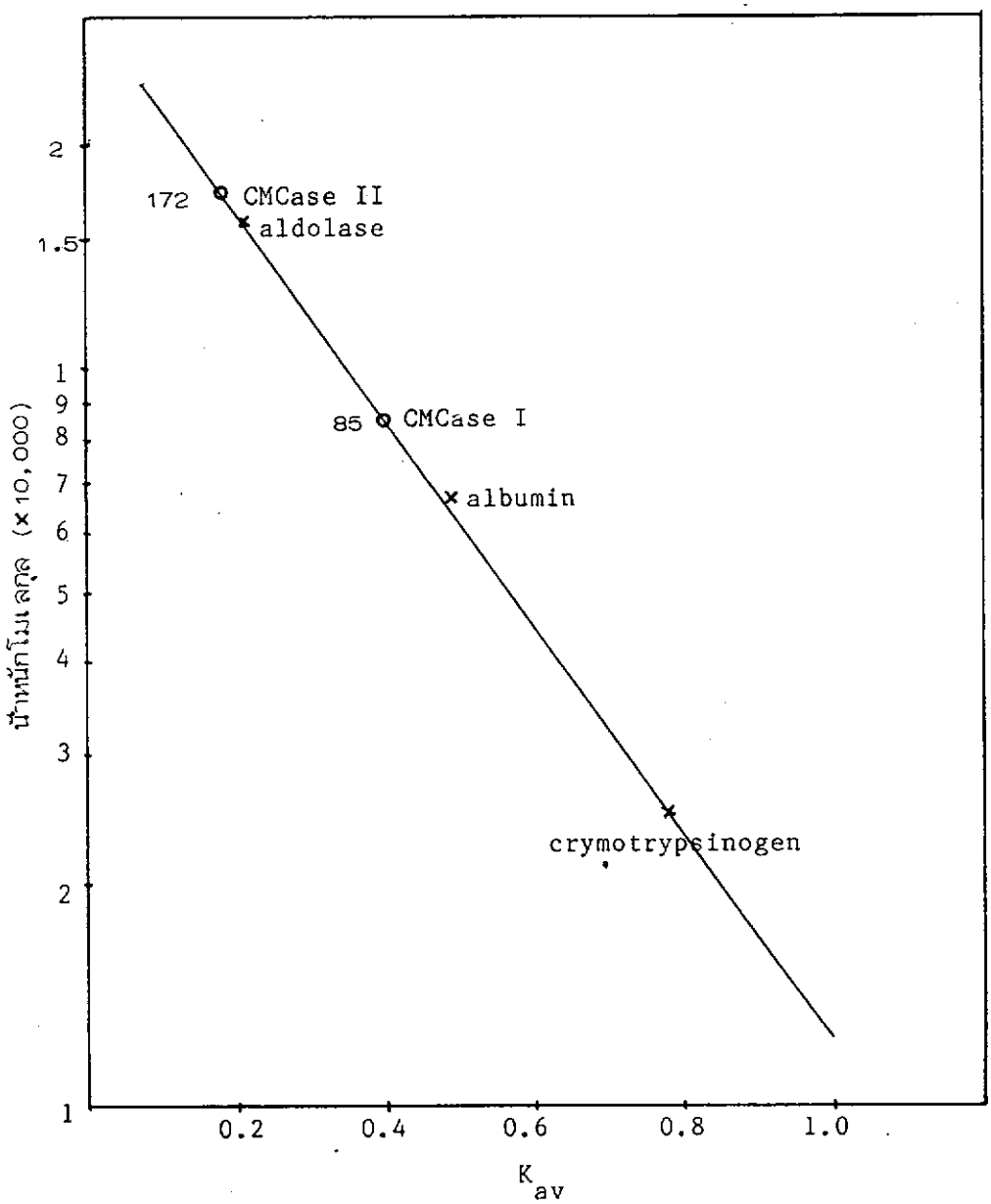
3.5 ผลการประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี เจล ฟิลเตรชัน

จากการนำเอนไซม์จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 0.05 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรไปหาน้ำหนักโมเลกุล ดังภาพประกอบ 15 แสดงผลการประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ด้วยการกรองผ่านเจลโดยใช้ เซฟาคริล เอส-200 จะเห็นว่าเอนไซม์ CMCase I และ II ถูกชะออกจากคอลัมน์ชนิดละ 1 peak เท่านั้น เมื่อนำปริมาตรที่เอนไซม์ถูกชะออกจากคอลัมน์ไปคำนวนค่า K_{av} และเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน พบว่า เอนไซม์ CMCase I มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 ดาลตัน เอนไซม์ CMCase II มีน้ำหนักโมเลกุล 172,000 ดาลตัน

การประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ เพื่อให้ได้ค่าที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุดควรจะทำควบคู่ไปกับวิธี PAGE แต่เนื่องจากความเข้มข้นของแผ่นเจลที่ใช้ในวิธี PAGE ไม่เหมาะสมกับขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ และปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนน้อย จึงใช้วิธีการประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันแทน



ภาพประกอบ 15 การประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โดยใช้คอลัมน์ เซฟาคริล เอส-200 ขนาด 1x70 เซนติเมตร รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 5.6.1(-·-·-▲-·-·- อัลโดเลส, ---■--- อัลบูมิน, ·····*····· ไครโมทริปซิโนเจน, —*— เอนไซม์ CMCase I, —+— เอนไซม์ CMCase II)



ภาพประกอบ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{av} กับ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ด้วยวิธี เจลฟิลเตรชัน บน เซฟาดริล เอส-200 รายละเอียดของการทดลองตามวิธี 5.6.3

3.6 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase ที่บริสุทธิ์

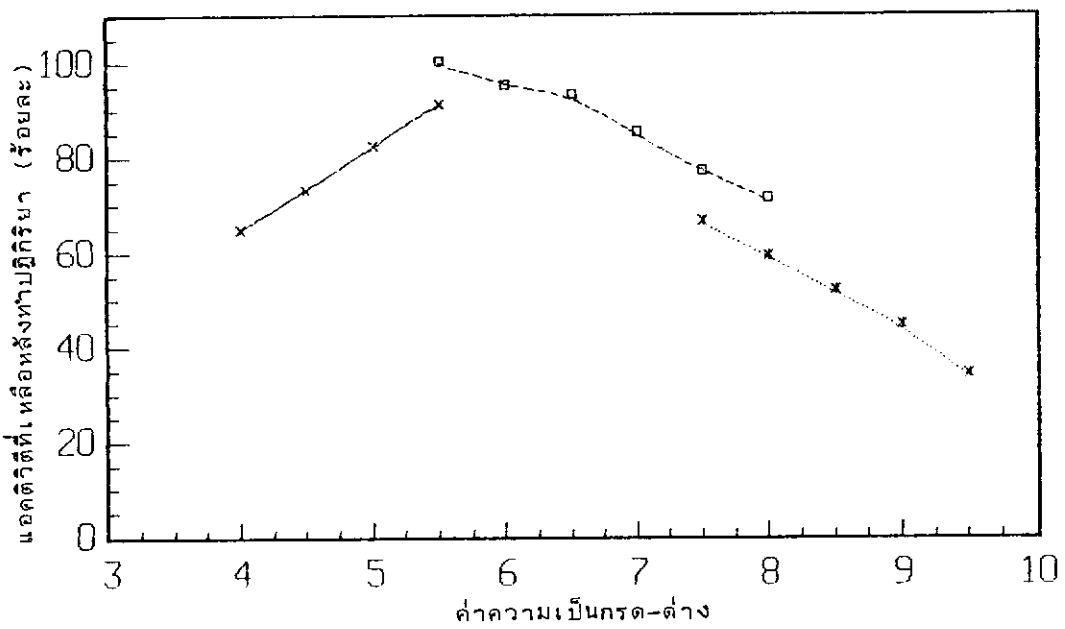
3.6.1. ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

จากการบ่มเอนไซม์ CMCase I และ II กับสารละลายตั้งต้น (CMC)ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ตั้งแต่ 4-9 (ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 6.1) ผลการทดลองแสดงไว้ในภาพประกอบ 17 และ 18 ตามลำดับ เนื่องจากบัฟเฟอร์แต่ละชนิดมีความสามารถในการรักษาสมดุลย์ค่าความเป็นกรด-ด่างได้ดีในช่วงที่ต่างกัน ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้บัฟเฟอร์ 3 ชนิดในการทดสอบการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ภาพประกอบ 17 จะเห็นว่า CMCase I สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.5 ในขณะที่ CMCase II (ภาพประกอบ 18) ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ ความเป็นกรด-ด่าง 6 นอกจากนี้ยังพบว่าใน CMCase II นี้ แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เกินร้อยละ 60 จะอยู่ในช่วงที่เป็นกรด แสดงว่าเอนไซม์ CMCase II สามารถทำปฏิกิริยาในช่วงที่มีค่าความเป็นกรดได้ดีกว่าในช่วงที่เป็นด่าง

3.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ CMCase I และ II ที่บริสุทธิ์ ศึกษาได้จากการบ่มเอนไซม์กับสารละลายสับสเตรท (CMC) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 20-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากภาพประกอบ 19 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ เอนไซม์จะแสดงแอคติวิตีได้ไม่เท่ากัน พบว่า CMCase I จะค่อย ๆ มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น และแสดงแอคติวิตีสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส จากนั้นแอคติวิตีจะเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 70 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ CMCase II สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีและให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากการเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์กับอุณหภูมิที่เชื้อใช้ในขณะผลิตเอนไซม์ออกจากถังหมัก (43 องศาเซลเซียส) พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ แตกต่างจากอุณหภูมิในการผลิตค่อนข้างมาก แต่อุณหภูมิขณะผลิตเอนไซม์ในช่วง 40-45 องศาเซลเซียส นั้น เอนไซม์ก็ยังมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาได้ แต่ไม่มากเท่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงาน



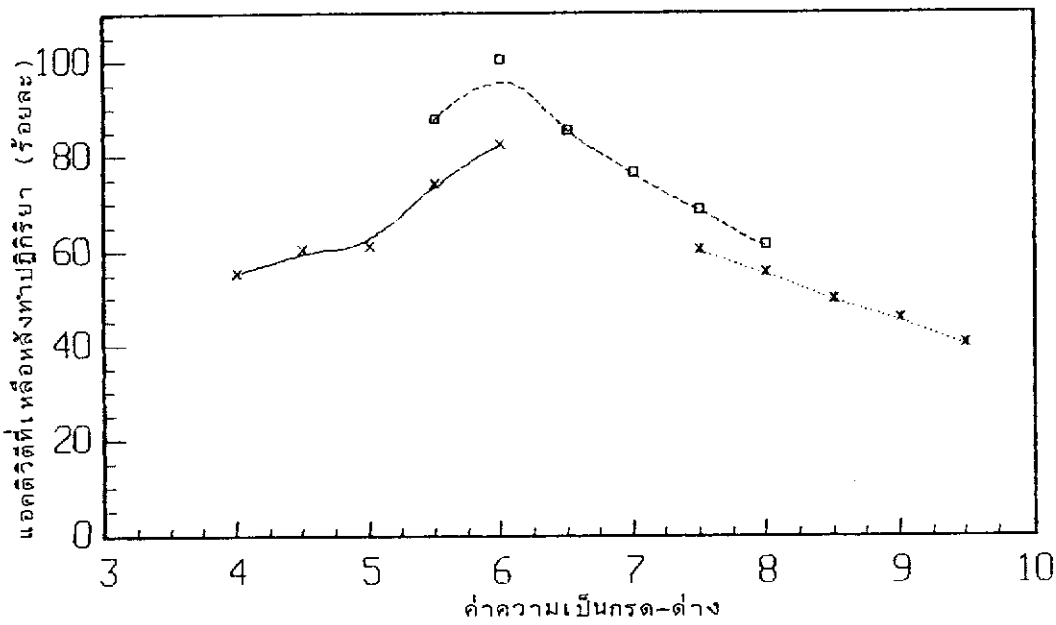
ภาพประกอบ 17 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase I

รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.1

—*— แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 4.0-5.5

---▫---- แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.5-8.0

·····*····· แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในทริสบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5-9.5



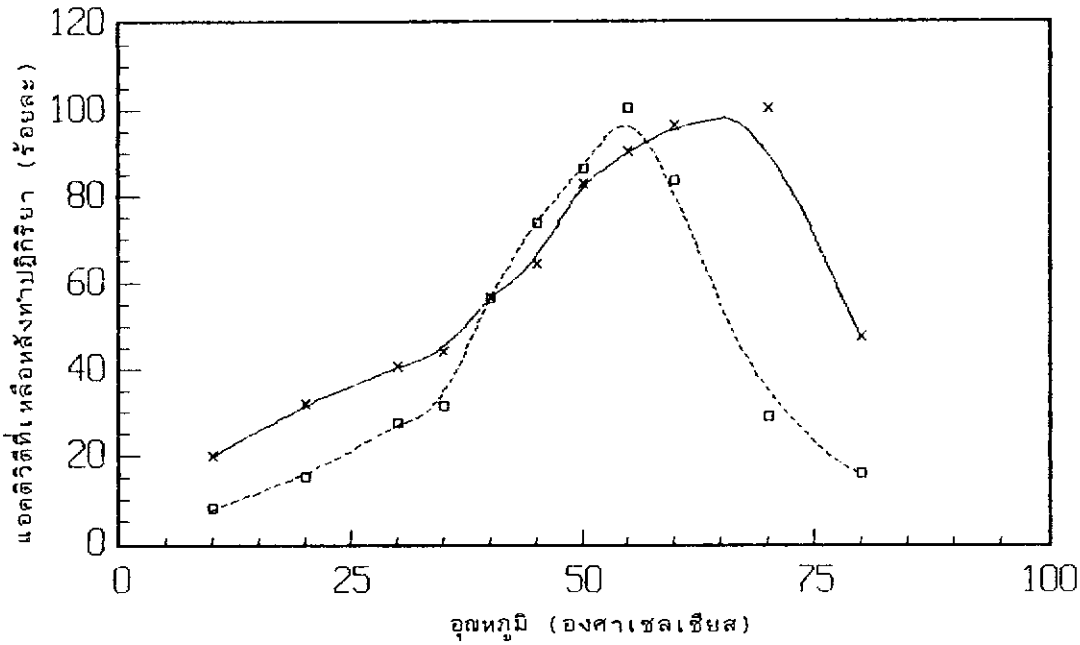
ภาพประกอบ 18 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CMCase II

รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.1

—×— แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0

---o--- แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.5-8.0

·····*····· แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในทริสบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5-9.5



ภาพประกอบ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ CMCase รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.2 (—*— เอนไซม์ CMCase I, ---□--- CMCase II)

3.6.3 ผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

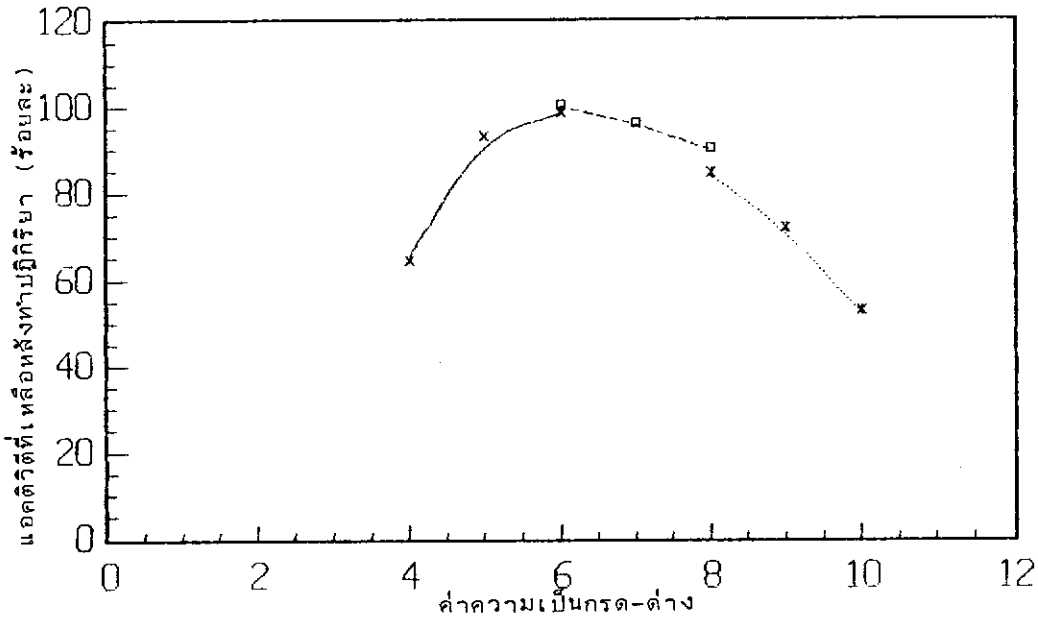
ผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase I และ II แสดงในภาพประกอบ 20 และ 21 จะเห็นว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่เป็นกลางเหมือนกัน นั่นก็คือ สามารถเก็บเอนไซม์ CMCase I ได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 5-6 และความเป็นกรด-ด่าง 6-7 สำหรับ CMCase II ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าวจะทำให้เอนไซม์ทั้ง 2 เสียแอคติวิตีน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าบ่มเอนไซม์ทั้ง2 ชนิดไว้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เอนไซม์ทั้ง 2 ยังสามารถแสดงแอคติวิตีได้ แสดงว่าสามารถเก็บเอนไซม์ CMCase I และ II ในสารละลายที่มีความเป็นกรด-ด่าง 6 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงได้ โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี

3.6.4. ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase I และ II แสดงในภาพประกอบ 22 CMCase I มีความเสถียรได้ดี ตั้งแต่อุณหภูมิต่ำจนกระทั่งสูงถึง 70 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไปเกือบหมด ส่วน CMCase II มีความเสถียรต่ออุณหภูมิน้อยกว่า CMCase I คือ เสถียรถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว

3.6.4 ผลของสารเคมีและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

ผลของสารเคมีและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของ CMCase I และ II ดังแสดงในตาราง 4 แอคติวิตีของ CMCase I ถูกกระตุ้นโดยไอออนของโลหะ เช่น Ca^{2+}, K^{+}, Mg^{2+} และสารในกลุ่ม thiol เช่น mercaptoethanol, DTT และถูกยับยั้งโดย Cu^{2+}, Fe^{2+} ส่วน CMCase II ถูกกระตุ้นโดย Ca^{2+}, Fe^{2+}, K^{+}, Mg^{2+}, DTT, EDTA และ mercaptoethanol เอนไซม์ CMCase II นี้ ถูกยับยั้งโดย Hg^{2+}, PCMB และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์จนไม่เหลือแอคติวิตีเลยโดย iodoacetamide



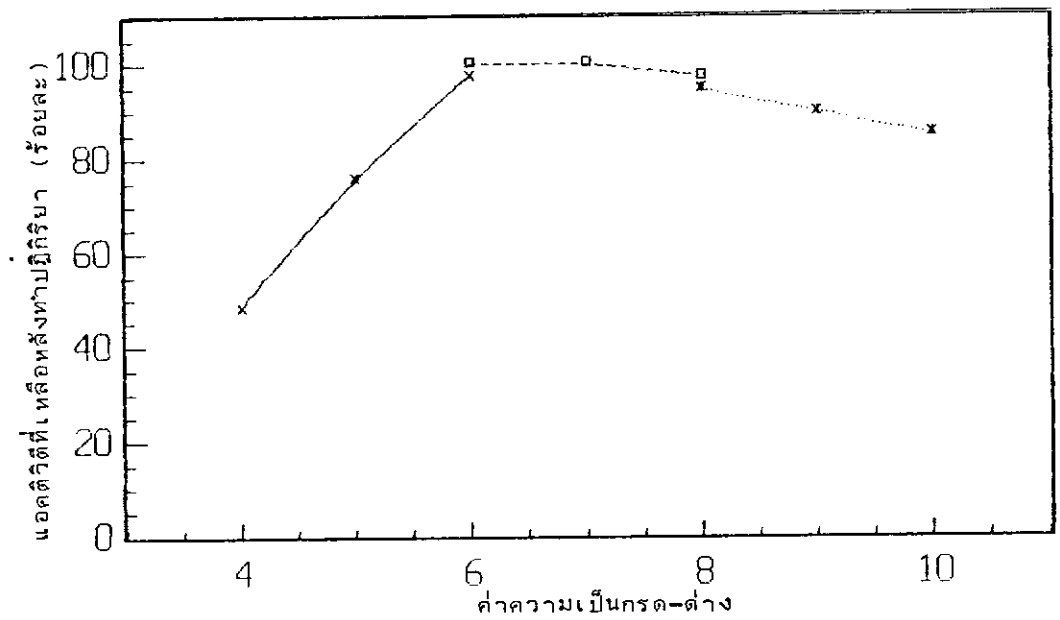
ภาพประกอบ 20 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase I

รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.3

—×— แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0

---□--- แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.0-8.0

·····*····· แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในทริสบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0-10.0



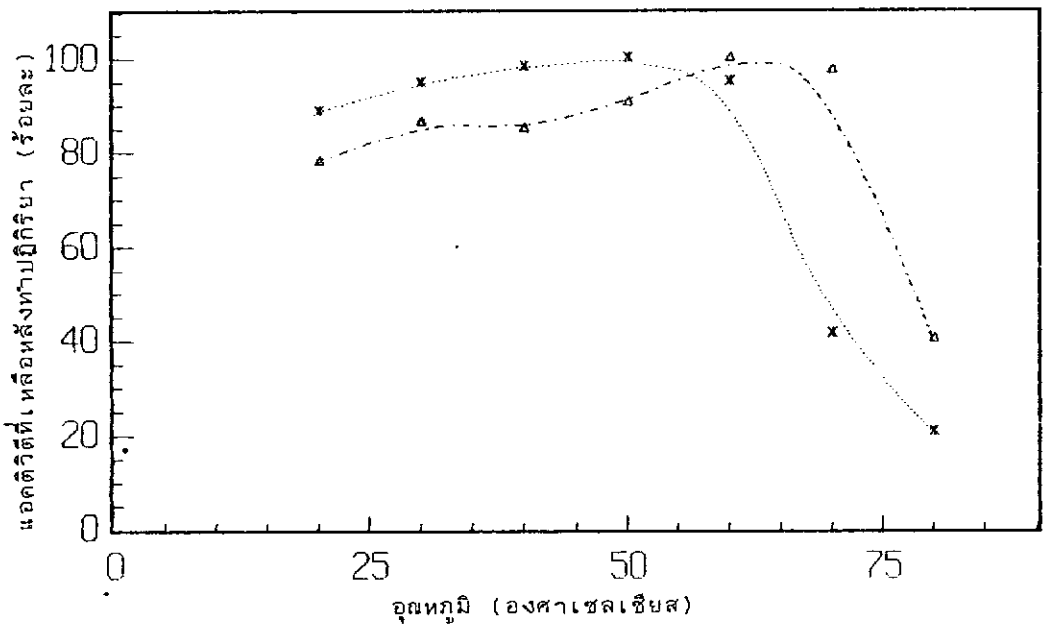
ภาพประกอบ 21 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase II

รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.3

—×— แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0

---▪--- แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.0-8.0

·····*····· แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อบ่มในทริสบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0-10.0



ภาพประกอบ 22 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ CMCase รายละเอียดของการทดลองตามวิธีข้อ 6.4 (-·-·-▲-·-·- CMCase I, ·····✱····· CMCase II)

ตาราง 4 แสดงผลของสารเคมีและไอออนของโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

ชนิดของสารที่ใช้	แอคติวิตีที่เหลือหลังทำปฏิกิริยา (ร้อยละ)	
	CMCase I	CMCase II
ไม่เติมสาร	100	100
$CaCl_2$	109	111
$CoCl_2.6H_2O$	89	85
$CuSO_4.5H_2O$	24	65
* DTT (10 mM)	112	125
** EDTA	92	105
$FeSO_4.7H_2O$	35	150
$HgCl_2$	65	54
Iodoacetamide (10 mM)	88	0
KCl	102	105
$MgCl_2.6H_2O$	142	105
Mercaptoethanol	106	102
***PCMB	22	46
$ZnCl_2$	68	90

*DTT = Dithiothreitol

**EDTA = Ethylene diamine tetraacetic acid

***PCMB = p-Chloromercuribenzoate

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Clostridium josui* ให้มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน สามารถทำได้โดยอาศัยการพ่นก๊าซเฉื่อย (inert gas) เข้าไปแทนที่ออกซิเจน เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไนโตรเจน ก๊าซเฉื่อยจะปกคลุมบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรีย ทำให้ออกซิเจนไม่สามารถเข้าไปสัมผัสกับแบคทีเรียได้ แต่เนื่องจากก๊าซที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป มักจะเป็นก๊าซที่ไม่บริสุทธิ์ กล่าวคือ มีออกซิเจนปนอยู่ ซึ่งหากนำก๊าซเฉื่อยนี้มาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง จะไม่สามารถทำให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนได้ ดังนั้นการทำก๊าซให้บริสุทธิ์โดยไม่มีออกซิเจนปนอยู่จึงเป็นสิ่งจำเป็น สามารถทำได้โดย ผ่านก๊าซเข้าไปในคอลัมน์ ควอทซ์ (quartz) ที่บรรจุผงลวดทองแดง (copper wire) ที่ถูกทำให้ร้อน โดยความร้อนจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยากันระหว่าง - ทองแดงกับออกซิเจนในก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เกิดเป็นสารประกอบออกไซด์ของทองแดง ทำให้ก๊าซที่ได้หลังจากการผ่านคอลัมน์เป็นก๊าซที่ปราศจากออกซิเจน ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ การนำทองแดงที่อยู่ในรูปของออกไซด์กลับมาใช้ใหม่จะต้องพ่นก๊าซไฮโดรเจนลงไป จับกับออกซิเจนและดึงออกมาเพื่อให้ได้เป็นโลหะทองแดง พร้อมที่จะนำไปใช้งาน

จากรายงานของ *Clostridium* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Ng and others. 1977 ; Ait and others. 1979) เพื่อย่อยสลายวัสดุพวกเซลลูโลส ฉะนั้นการศึกษาเอนไซม์จาก *C. josui* จึงทำได้โดยการปั่นแยกเซลล์และวัสดุพวกเซลลูโลสออกจากอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์ (KC-floc) ที่ผ่านการบดโดยใช้เครื่อง บอลมิลล์ (Ball-Mill) เพื่อตัดเส้นใยเซลลูโลสให้สั้นลง และง่ายต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การเหนี่ยวนำ(inducing)ให้แบคทีเรียมีการผลิตเอนโดกลูคาเนสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่ง การใช้สารตั้งต้นที่ย่อยยากเป็นตัวเริ่มต้นในการผลิต

เอนไซม์ จะทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์เป็นไปได้ค่อนข้างช้า และได้จำนวนเอนไซม์น้อย โดยทั่วไปพฤติกรรมการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ มักจะใช้สารอาหารที่ย่อยง่าย สะดวกแก่การดูดซึมหรือนำไปใช้ได้ทันที เช่น กลูโคส, เซลโลไบโอส แต่เมื่อใดที่สภาวะแวดล้อมนั้นขาดแคลนสารอาหารที่ย่อยง่าย จุลินทรีย์จึงจะทำการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสารอาหารที่ย่อยยาก ซึ่งจะพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญเติบโตในอาหารที่มีเซลลูโลสได้ช้ากว่า ในอาหารที่มีเซลโลไบโอส (Lin and wilson. 1987) ดังนั้นการเลี้ยงจุลินทรีย์จะต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม อาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องไม่มีสารอาหารที่ย่อยง่ายมากเกินไป เพราะจะมีผลทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถผลิต-เอนไซม์ได้ตามต้องการ

การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในปริมาณมากนั้น ขั้นตอนแรกจำเป็นต้องให้สารอาหารตั้งต้นที่จุลินทรีย์ย่อยได้ง่ายและสามารถนำไปใช้ได้ทันที เพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เมื่อจุลินทรีย์มีจำนวนมากขึ้น สารอาหารย่อยง่ายซึ่งให้ในปริมาณจำกัดจะหมดลง จุลินทรีย์ที่เติบโตเต็มที่จำเป็นต้องผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสารอาหารที่ย่อยยาก การทำวิจัยครั้งนี้ได้อาศัยหลักการดังกล่าวข้างต้นในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย

หลังจากการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตได้ นำมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ย่อยสารอาหารคาร์บอนนี้ ทำได้โดยการใช้ Oswald Viscometer No.3 วัดความหนืดที่เปลี่ยนแปลงไปของสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส(CMC) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ แม้จะมีเอนไซม์ในปริมาณน้อย (Waltrand, Peter and Fritz. 1982) นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วไม่ต้องใช้อุปกรณ์มาก เอนไซม์ที่สามารถทำให้ความหนืดของ CMC ลดลงได้ เป็นเอนไซม์ชนิด เอนโดกลูคาเนส เรียกเอนไซม์นี้ว่า CMCase สาเหตุที่นำ CMC มาใช้เป็นตัวตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจาก CMC เป็นสารประเภทเซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่มากนัก และสามารถทำให้อยู่ในรูปของ water soluble ได้ นอกจากนี้ ในโครงสร้างของ CMC ประกอบด้วยหน่วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 มากมาย ดังนั้นเอนไซม์ที่ย่อย CMCได้ จึงจัดว่าเป็น เอนโดกลูคาเนส

จากการติดตามการสังเคราะห์เอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ ในผลการทดลองภาพประกอบ 8 จะเห็นว่าแอคติวิตีของ CMCase ของ *C. josui* มีค่าสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง จากนั้นแอคติวิตีจะลดลง ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยง *C. thermocellum* ที่เวลา 63 ชั่วโมง แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ออกมามากที่สุด (Ait. 1979) เมื่อพิจารณา curve ความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ จะเห็นว่าความเข้มข้นของโปรตีนในระยะแรกมีค่าไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์เริ่มใช้สารอาหารต่าง ๆ ซึ่งมีในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์ หลังจากนั้นความเข้มข้นของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการสร้างเอนไซม์มากขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนจะสอดคล้องกับการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ หลังจากชั่วโมงที่ 66 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง พร้อมกับความเข้มข้นของโปรตีนจะลดลงด้วย

ความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลกระทบต่อกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะเป็นไปได้ดี ต้องมีความเป็นกรด-ด่างที่พอเหมาะสำหรับการเจริญเติบโต มิฉะนั้นการเจริญจะลดลงหรือหยุดชะงักทันที นอกจากนี้ ความเป็นกรด-ด่างยังมีผลกระทบต่อเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ขับออกมาอีกด้วย เพราะความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับประจุของเอนไซม์หรือของสับสเตรท ที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือสูงเกินไป มักจะทำให้ประจุของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรท หรืออาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปด้วย (Hagerdal and others. 1978)

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อขณะที่มีการเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ *C. josui* มีรูปแบบที่ค่อนข้างจะแน่นอน กล่าวคือ การเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์จะเริ่มไปพร้อม ๆ กัน เมื่อการสังเคราะห์เอนไซม์สูงขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง และลดลงต่ำสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 พร้อมกับการสังเคราะห์เอนไซม์ของ *C. josui* มีค่าสูงสุด ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า เมื่อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์สูงสุด สารอาหารพวกเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น กลายเป็น

กลูโคส และการใช้กลูโคสนี้จะมีผลทำให้มีการปลดปล่อยกรดน้ำส้ม, กรดคาบอนิกออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ *R. albus* (Meada. 1986) เมื่อการเจริญเติบโตหยุดลงและเกิดการตายของเซลล์ขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น และการผลิตเอนไซม์ลดลง

พิจารณาปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากภายในถังหมัก สามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือ เมื่อแบคทีเรียใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ในขบวนการเมตาโบลิซึมของแบคทีเรียเอง จะทำให้มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการที่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงหลังจากมีการเจริญเติบโตสูงสุด อาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการเช่น อาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เสียสภาพ (denaturation) ไปบางส่วน เนื่องจากเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น protease ซึ่งสามารถย่อยเอนไซม์โปรตีนได้ ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีบางส่วนก็เป็นได้

นอกจากนี้อายุของแบคทีเรียและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอาจไม่เหมาะสม ในช่วงระยะเวลาหลังจากที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มหมดและมีการผลิตสารตัวกลางต่าง ๆ ที่อาจจะไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ ดังนั้นแบคทีเรียจึงเริ่มสร้างสปอร์ (spore) ขึ้น และปริมาณสปอร์จะขึ้นกับระยะเวลาของการเลี้ยง ในระยะที่เป็นสปอร์ - แบคทีเรียจะไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ จึงอาจกล่าวได้ว่าในระยะหลังจาก 66 ชั่วโมงไปแล้ว *C. josui* มีอายุมากขึ้นเกินกว่าที่จะทำการสังเคราะห์เอนไซม์ได้ แอคติวิตีของเอนไซม์จึงลดลง

ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่อาจจะเป็นไปได้คือ ผลผลิตที่ได้หลังจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ จะเป็นสารในกลุ่ม oligosaccharide เช่น เซลโลไบโอส จะเป็นตัวไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ โดยเป็นคาตาบอไลต์ รีเพรสชัน (catabolite repression) (Mandels. 1975 ; Lin and Wilson. 1987)

เมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมได้โดยการเลี้ยง *C. josui* ในถังหมักมาทำให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มต้นจากการทำให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นขั้นตอนแรก ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันแทนการตกตะกอนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์หรือแอมโมเนียมซัลเฟต เช่นเดียวกับการทำเอนไซม์จาก

C. stercorarium ให้บริสุทธิ์ (Bronnenmeier and Staudenbauer. 1988) ซึ่งในการตกตะกอนเอนไซม์นั้นจะมีผลต่อขั้นตอนการทำไดอะลิซิสเพื่อเอาแอมโมเนียมซัลเฟตออก เอนไซม์ที่เข้มข้นจะย่อย cellophane tube ให้ขาด ทำให้เกิดการสูญเสียเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์มีความสามารถในการยึดจับกับเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์จึงนำไปผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ แทนการผ่านในคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส จากความแตกต่างของประจุของโปรตีนทำให้สามารถแยกโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ออกมาได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.04 โมลาร์ ซึ่งต่างจากเอนไซม์ที่แยกจาก *C. thermocellum* ที่มีเซลโลไบโอสเป็นสารตั้งต้น เอนไดกลูคาเนสถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของเกลือ 0.17 โมลาร์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 4 เท่า (Creuzet and Frixon. 1983) หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่แยกได้ มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 แทนเซฟาเดกซ์ เพราะเอนไซม์มีการดูดซับที่แน่นหนากับ matrix ของเจลที่เป็น polysaccharide (Ait and others. 1979) จากนั้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์ โมโนคิว ตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีของ CMCase ได้ 2 ชนิด คือ CMCase I และ CMCase II ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.14 และ 0.18 โมลาร์ ตามลำดับ

จากผลการทดลองทำเอนไซม์ *C. josui* ให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าสามารถทำ crude enzyme ให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นได้ โดยโปรตีนอื่นที่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ถูกกำจัดออกไปมาก และผลการตรวจสอบโปรตีนโดยวิธีอิเลคโตรฟอรีซิส ภายใต้สภาวะที่ยังไม่มีการทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ พอจะบอกให้ทราบว่าเอนไซม์ที่แยกได้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีขนาดใหญ่ หลังจากการผ่านเอนไซม์ในขั้นตอนต่าง ๆ ทำให้เอนไซม์ CMCase I และ II มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 389 และ 700 เท่าตามลำดับ

การประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน บน เซฟาคริล เอส-200 พบว่า CMCase I และ II มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 และ 172,000 ดาลตัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่แยกจาก *C. thermocellum* (Ng and Zeikus. 1981) มีน้ำหนักโมเลกุล 83,000 - 94,000 ดาลตัน แต่ต่างจาก *Trichoderma koningii* (wood and McCrae. 1978) ได้เอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 13000, 31000, 48000 ดาลตัน และ

Erwinia chrysanthemi ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน(Boyer and others. 1984) และจากการทำ SDS PAGE พบว่า CMCase I เป็นเอนไซม์สายเดี่ยวที่มีขนาด 92,000 ดาลตัน ส่วน CMCase II เป็นเอนไซม์ที่มีหน่วยย่อย 2 หน่วยที่ขนาดแตกต่างกันเป็นองค์ประกอบ แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 115,000 และ 73,000 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับ *Bacteroides succinogenes* S85 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 118,000 และ 94,000 ดาลตัน (McGavin and Forsberg. 1988), เอนโดกลูคาเนสอีกชนิดหนึ่งจาก *Cellomonas* sp. มีน้ำหนักโมเลกุล 118,000 ดาลตัน เอนไซม์นี้เป็นไกลโคโปรตีน (Beguin and Eisen. 1978) และเหมือนกับที่รายงานโดย Creuzet and Fritox ในปี 1983 จาก *Clostridium* สายพันธุ์ใหม่ จะมีน้ำหนักโมเลกุล 91,000 ดาลตัน การประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เจลฟิลเตรชันเป็นการประมาณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสภาพธรรมชาติของโปรตีน เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการทำ SDS PAGE ซึ่งเป็นการประมาณน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของโปรตีน จะเห็นว่าน้ำหนักโมเลกุลจากทั้ง 2 วิธีไม่เท่ากัน เป็นไปได้ว่าการประมาณน้ำหนักโมเลกุลโดยเจลฟิลเตรชันนั้น โครงสร้างของโปรตีนในสภาพธรรมชาติอาจมีการขด หรือเรียงตัวซ้อนกัน ทำให้การประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลได้น้อยกว่าความเป็นจริง

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้ผลว่า ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของ CMCase I และ II คือ 5.5 และ 6 ตามลำดับ เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนไปจากนี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งมีลักษณะเดียวกับ *Bacteroides* (Groleau and Forsberg. 1983) และ *C. thermocellum* (Creuzet and Fritox. 1983)

ภาพประกอบ 20 และ 21 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทุกชนิดจะอยู่ในช่วง 4 ขึ้นไป (Spano. 1976) จึงศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ต่าง ๆ จาก 4 ไปจนถึงความเป็นกรด-ด่าง 10 เพื่อดูว่าตลอดช่วงเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้น เอนไซม์ยังไม่สูญเสียสภาพไป CMCase I และ II มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5-7 และ 6-8 ตามลำดับ และการที่แอคติวิตีของเอนไซม์โดยมากจะสูญเสีย

แอคติวิตีเมื่อเก็บไว้ที่ความเป็นด่างสูง ๆ ชี้ให้เห็นว่า อาจจะเป็นเพราะตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา (active site)ของเอนไซม์มีกรดอะมิโนประเภทที่มีประจุบวก (basic amino acid)เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยา สภาวะที่เป็นด่างจะมีผลทำให้ประจุหรือรูปร่างของตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปลี่ยนไป ยังผลให้เอนไซม์ไม่มีโอกาสที่จะจับกับสับสเตรทได้พอดี จึงวัดแอคติวิตีได้น้อยลง

อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ในการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิสูงมักจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานสูงด้วย ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการย่อยเซลลูโลสในที่อุณหภูมิสูง จากการทดลองจะเห็นว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ CMCase I และ II ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับธรรมชาติของแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (ในกองปุ๋ยหมัก)

การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิได้ใช้การบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งเป็นการเพียงพอที่จะตัดสินว่าเอนไซม์ สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ เพราะเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลางไม่สามารถมีแอคติวิตีที่อุณหภูมิสูงได้เลย ผลจากการทดลองบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยไม่มีการเติมสารที่ป้องกันการสูญเสียแอคติวิตี พบว่า CMCase I และ II มีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิถึง 70 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์จาก *Aspergillus nidulans* (Bagga and others. 1990)

เมื่อนำเอนไซม์มาศึกษาผลของสารเคมีบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์ สามารถแบ่งประเภทของสารเคมีได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1. กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด
2. กลุ่มที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด
3. กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัวหนึ่งแต่ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อีกตัวหนึ่ง

การที่สารเคมีในกลุ่ม thiol เช่น DTT, mercaptoethanol สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทั้ง CMCase I และ II แสดงให้เห็นว่าในโมเลกุลของเอนไซม์มีสารเคมีกลุ่ม thiol อยู่ด้วย ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่า สารเคมีกลุ่ม thiol ในเอนไซม์ มีบทบาทที่สำคัญและ

จาเป็นต่อการทางานของเอนไซม์ ดังมีรายงานเอนไซม์จาก *C. thermocellum* (Johnson and others. 1982) ในการทางานของเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยไอออนของโลหะ เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+} นั้น แสดงว่าการทางานของเอนไซม์ต้องการไอออนโลหะเข้าร่วมด้วย เหมือนกับที่มีรายงานว่า Ca^{2+} สามารถกระตุ้นการทางานของเอนโดกลูคาเนสชนิดหนึ่ง แต่ไม่มีผลต่อเอนโดกลูคาเนสอีกชนิดหนึ่ง (Calza and others. 1985) ส่วนสารเคมีที่มีผลในการยับยั้งการทางานของเอนไซม์นั้น จะเข้าไปทาให้บริเวณเร่งของเอนไซม์ไม่สามารถทางานได้โดยที่ประสิทธิภาพในการทาปฏิกิริยาลดน้อยลง ส่วน EDTA พบว่ามีผลยับยั้งการทางานของ CMCase I เช่นเดียวกับที่มีรายงานโดย Halliwell and Griffin (1973) แต่ EDTA สามารถกระตุ้นการทางานของ CMCase II อาจจะเกี่ยวกับการที่มี Na^{+} ใน EDTA ส่วน Hg^{2+} ซึ่งพบในรายงานหลายฉบับ (Calza and others. 1985 ; Ng and Zeikus. 1981)ว่าสามารถยับยั้งการทางานของเอนไซม์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยนี้

เอนไซม์ CMCase I และ II ที่แยกได้จาก *C. josui* โดยไม่มีการเติมสารป้องกันการรวมตัวของโปรตีนในระหว่างการทดลองนี้พบว่า เอนไซม์ที่แยกได้มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ทาให้บริสุทธิ์โดยการเติมสารป้องกันการรวมตัว(ยูเรีย) (Sukhumavasi and others. 1989) ทั้งขนาดและคุณสมบัติ โดย CMCase ที่แยกได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าเอนไซม์ที่แยกได้โดยการเติมยูเรีย (45,000 ดาลตัน) และความเป็นประจุของเอนไซม์ยังแตกต่างกัน เนื่องจากถูกชะออกจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกไอออน ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการเติมยูเรียในระหว่างการทดลอง เป็นการทาลายโครงสร้างของเอนไซม์โปรตีนทาให้เอนไซม์ที่ทาให้บริสุทธิ์มีขนาดและประจุเปลี่ยนไป จากการทดลองสามารถแยกเอนโด - กลูคาเนสได้ 2 ชนิด เช่นเดียวกับที่แยกได้จาก *C. thermocellum*, *C. thermocellum* LQRI (Cruezet and Frixon. 1983), *Bacteriodes succinogenes* S85 (McGavin and Forsberg. 1988) อาจกล่าวได้ว่าเอนโดกลูคาเนสเป็นกลุ่มของเอนไซม์หลายชนิดที่อยู่รวมกัน มีแอคติวิตีต่อ CMC เหมือนกัน การแยกและศึกษาเอนโดกลูคาเนสแต่ละชนิดจึงเป็นเพียงพื้นฐานส่วนหนึ่งของการศึกษาระบบเอนไซม์เซลลูเลสเท่านั้น

เอนโดกลูคาเนสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย ซึ่งมักจะพบว่าประกอบด้วยเอนไซม์ย่อย ๆ อีกหลายชนิด (Boyer and others. 1984) องค์ประกอบย่อยของเอนไซม์เหล่านี้เกิดจากการที่มีสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน หรือเกิดจากการที่มีโครงสร้างของยีนที่ผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน

การย่อยสลายของเอนโดกลูคาเนสให้ผลิตผลคือ สารพวก oligomer และสามารถลดความหนืดของสารละลาย CMC ได้ เอนไซม์นี้จัดเป็นเอนไซม์ชนิด ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ดังเช่นที่มีการศึกษาในแบคทีเรียต่าง ๆ แต่อัตราการรวมกันของคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Calza and others. 1985)

ดังนั้นการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอ เพื่อศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์และคุณสมบัติต่าง ๆ จึงจำเป็น และต้องมีการพัฒนากันต่อไป เพื่อนำมาซึ่งความรู้และเป็นข้อมูลในการที่จะนำไปสู่ความเป็นไปได้ที่จะนำเอนไซม์นี้มาใช้ประโยชน์

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยลักษณะเฉพาะและสมบัติของเอนไซม์ Endo-1,4-β-Glucanases จาก *Clostridium josui* เป็นเพียงการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น เพราะคุณสมบัติและกลไกการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลสนี้ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด จึงต้องการการค้นคว้าวิจัยต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มากขึ้น

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก

2. เนื่องจากมีรายงานว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเซลลูเลส เช่น กลูโคส, เซลโลไบโอส มีสมบัติเป็นคาตาบอไลต์ รีเพรสชัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นว่ามีผลกับการผลิตเอนไซม์อย่างไร

3. เพื่อไม่ให้เป็นการสูญเสียเอนไซม์ไปโดยเปล่าประโยชน์ ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ควรจะมีการศึกษาเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น เอกโซกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส ควบคู่ไปด้วย เพื่อให้ทราบถึงการทำงานร่วมกันของเอนไซม์

4. เมื่อได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้ว ควรจะนำมาทดสอบการย่อยสลายสารตั้งต้นที่เป็นเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งชนิดต่าง ๆ เพื่อความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์นี้มาใช้ในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Ait, N., N. Creuzet and P. Forget. "Partial Purification of Cellulase from *Clostridium thermocellum*," Journal of General Microbiology. 113 : 399-402 ; 1979.

Alexander, M. Introduction to Solid Microbiology. and ed. New Delhi : Wiley Eartern Ltd., 1977.

Beldman, G. and others. "The Cellulase of *Trichoderma viride*," Journal of Biochemistry. 146 : 301-308 ; 1985.

Beldman, G. and others. "Adsorption and Kinetic Behavior of Purified Endoglucanase and Exoglucanases from *Trichoderma viride*," Biotechnology and Bioengineering. 30 : 251-257 ; 1987.

Bhadra, A., J.M. Scharer and M. Moo-Young. "Anaerobic Digestion of Native Cellulosic Wastes," MIRCEN. 2 : 349-358 ; 1986.

Boyer, M.H. and others. "Carboxymethylcellulase from *Erwinia chrysanthemi* II. Purification and Partial Characterization of An Endo-β-1,4-glucanase," Journal of Biotechnology. 1 : 241-252 ; 1984.

Bronnenmeier, K. and W.L. Staudenbauer. "Resolution of *Clostridium stercorarium* Cellulase by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)," Applied Microbiology and Biotechnology. 27 : 432-436 ; 1988.

Calza, R.E., D.C. Irwin and D.B. Wilson. "Purification and Characterization of Two β-1,4-Endoglucanases from *Thermomonospora fusca*," Biochemistry. 24 : 7797-7804 ; 1985.

Creuzet, N. and C. Frixon. "Purification and Characterization of an Endoglucanase from a Newly Isolated Thermophilic Anaerobic Bacterium," Biochimia. 65 : 149-156 ; 1983.

Davidson, E.A. "Polysaccharides," Carbohydrate Chemistry. New York : Holt, Rinchart and Winston. : 347-348 ; 1967.

Davis, B.J. "Disc Electrophoresis II : Method and Application to Human Serum Protein," Annuals of the New York Academy of Science. 121 : 404-427 ; 1964.

Deshpande, V. and others. "Direct Conversion of Cellulose/ Hemicellulose to Ethanol by *Neurospora crassa*," Enzyme of Microbiology and Technology. 8 : 149-152 ; 1986.

Fujino, T. and others. "Purification and Properties of an Endo-1,4-β-glucanase Translated from a *Clostridium josui* Gene in *Escherichia coli*," Applied Environmental Microbiology. 2 : 1175-1178 ; 1990.

Fujino, T. and J. Sukhumavasi. "Purification and Properties of an Endo-1,4-β-Glucanase from *Clostridium josui*," Journal of Bacteriology. 133 : 4076-4079 ; 1989.

Gavin, M. and C.W. Forsberg. "Isolation and Characterization of Endoglucanase 1 and 2 from *Bacteroides succinogenes* S85," Journal of Bacteriology. 170 : 2914-2992 ; 1988.

Ghose, T. "Cellulase Biosynthesis and hydrolysis of Cellulosic Substances," Advances in Biochemical Engineering. 5 : 39-73 ; 1977.

Ghose, T.K. and P. Ghosh. "Bioconversion of Cellosic Substances," Journal of Applied Chemistry and Biotechnology. 28 : 309-320 ; 1978.

Giuliano, C. and A.W. Khan. "Conversion of Cellulose to Sugars by Resting Cells of a Mesophilic Anaerobe *Bacteroides cellulosovens*," Biotechnology and Bioengineering. 27 : 980-983 ; 1985.

Grenlch, V.A. Plant Function and Structure. New York : Mc. Milliam. 48-54 ; 1973.

Hagerdal, B.G.R., J.D. Ferchak and E.K. Pye. "Cellulolytic Enzyme System of *Theroactinomyces sp.* Grow on Microcrystalline Cellulose," Applied Environmental Microbiology. 36 : 606-612 ; 1978.

Hottel, H.C. and J.B. Howard. New Energy Technology. MIT Press Cambridge, MA. 4 : 1971.

Johnson, E.A. and others. "Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from *Clostridium thermocellum*," Applied Environmental Microbiology. 43 : 1125-1132 ; 1982.

Laemmli, U.K. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," Nature. 277 : 680-685 ; 1970.

Levinson, H.S., G.R. Mandels and E.T. Reese. "Products of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Its Derivative," Archieves of Biochemistry and Biophysics. 31 : 351-365 ; 1951.

Lin, E. and D.B. Wilson. "Regulation of β-1,4-Endoglucanase Synthesis in *Thermomonospora fusca*," Applied and Environmental Microbiology. 53 : 1352-1357 ; 1987.

Linko, M. "An Evalution of Enzymation Hydrolysis of Cellulose Materials," Advance in Biochemical Engineering. 5 : 103-111 ; 1979.

Lowry, O.H. and others. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," Journal of Biological Chemistry. 54 : 265-275 ; 1951.

Meada, K. "Purification and properties of Endo-β-1,4-Glucanase from *Ruminococcus albus*," Master's Thesis, Nagoya University, 1986.

Mandels, M. and D. Sternberg. "Recent Advance in Cellulose Technology," Journal of Fermentation Technology. 54 : 267-286 ; 1976.

Ng, T.K. and J.G. Zeikus. "Purification and Characterization of Endoglucanase (1,4-β-D-Glucan glucanohydrolase) from *Clostridium thermocellum*," Journal of Biochemistry. 199 : 341-350 ; 1981.

Nisizawa, K. "Mode of the Action of Cellulose," Journal of Fermentation Technology. 51 : 267-304 ; 1973.

Norman, A.G. and W.H. Fuller. Cellulose Decomposition by Physiology. 2nd ed. Tokyo, Japan : Toppan Company Ltd., 1942.

Ohmiya, K. and others. "Cloning of and Endo-1,4-β-D-Glucanase Gene from *Clostridium josui* and Its Expression in *Escherichia coli*," Applied Environmental Microbiology. 34 : 2399-2402 ; 1989.

Ohmiya, K. and others. "Isolation and Properties of β-Glucosidase from *Ruminococcus albus*," Journal Bacterial. 161 : 432-434 ; 1985.

Ooshima, H., Y. Ishitani and Y. Harano. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose Effect of Ethanol on Enzymatic Saccharification of Cellulose," Biotechnology and Bioengineering. 27 : 389-397 ; 1985.

Pettersson, L.G. "The Mechanism of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose by *Trichoderma viride*," Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. p. 255-261. Aulanko, Finland : 12-14 March, 1975.

Prescott, S.C. and C.G. Dunn. Industrial Microbiology. 3rd ed. Tokyo, Japan : Kogakusha Ltd., 1959.

Reese, E.T., R.G.H. Siu and H.S. Levinson. "The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives," Journal of Bacteriology. 59 : 485-497 ; 1950.

Scilliere, G. "Diastatic Hydrolysis Cotton Cellulose and Other Polysaccharides," Social Biology. 63 : 515-517 ; 1907.

Selby, K. and C.C. Maitland. "The Cellulase of *Trichoderma viride* : Separation of the Components Involved in the Solubilization of Cotton," Biochemical Journal. 104 : 716-724 ; 1967.

Sen, S., T.K. Abraham and S.L. Chakrabarty. "Characteristics of the Cellulose Produced by *Miceliopthora thermophila* D-14," Canadian Journal of Microbiology. 28 : 271-277 ; 1982.

Shinmyo, A., D.V. Martinez and A.L. Deman. "Studies on the Extracellular Cellulolytic Enzyme Complex Produced by *Clostridium thermocellum*," Journal of Applied Biochemistry. 1 : 202-209 ; 1979.

Sharma, S., P.S. Bagga and D.K. Sandhu. "Purification and Characterization of Cellulolytic Enzymes Produced by *Aspergillus nidulans*," Journal of Applied Bacteriology. 68 : 61-68 ; 1990.

Shoemaker, S.P. and R.D. Brown. "Enzymic Activities of Endo-1,4-β-D-Glucanases Purified from *Trichoderma viride*," Biochimica Biophysica Acta. 523 : 133-146 ; 1978.

Siu, R.G.H. and E.T. Reese. "Decomposition of Cellulose by Microorganism," Botanical Review. 19 : 377-416 ; 1953.

Spano, L.A. "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Materials." Microbial Energy Conversion. UNITAR Symposium. Germany : 157-177 ; 1976.

Sternberg, D. "β-Glucosidase of *Trichoderma* : It's Biosynthesis and Role in Saccharification of Cellulase," Applied Environmental Microbiology. 31 : 648-654 ; 1976.

Stutzenberger, F.J., A.J. Kaufman and R.D. Lossin. "Cellulolytic Activity in Multicipal Solid Waste Compositing," Canadian Journal of Microbiology. 16 : 553-560 ; 1970.

Sukhumavasi, J.,and others. "Conversion of Tough Cellulose to Useful Compounds by An Anaerobe Isolated from Compost," Journal of Fermentation Technology. 62 : 545-550 ; 1984.

Sukhumavasi, J. and others. "Conversion of Agriculture Wastes to Ethanol and Acetic Acid by Cellulolytic Anaerobic Bacteria," Journal Science Society of Thailand. 15 : 109-120 ; 1989.

_____. "Bioconversion of Cellulosic Materials to Useful Compounds by Anaerobic Bacteria : I. screening for Cellulolytic Anaerobic Bacteria," Thai Journal Agriculture Science. 22 : 303-312 ; 1989.

Sukhumavasi, J. and others. "*Clostridium josui sp.* nov., A Cellulolytic, Moderate Thermophilic Species from Thai Compost," International Journal of Systematic Bacteriology. 1 : 179-182 ; 1988.

Szczodrak, J. "The Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Wheat Straw to Ethanol," Biotechnology and Bioengineering. 32 : 771-776 ; 1988.

Tabassum, R., M.I. Rajoka and K.A. Malik. "Production of Cellulases and Hemicellulases by An Anaerobic Mixed Culture from Lignocellulosic Biomass," Journal of Microbiology and Biotechnology. 6 : 39-45 ; 1990.

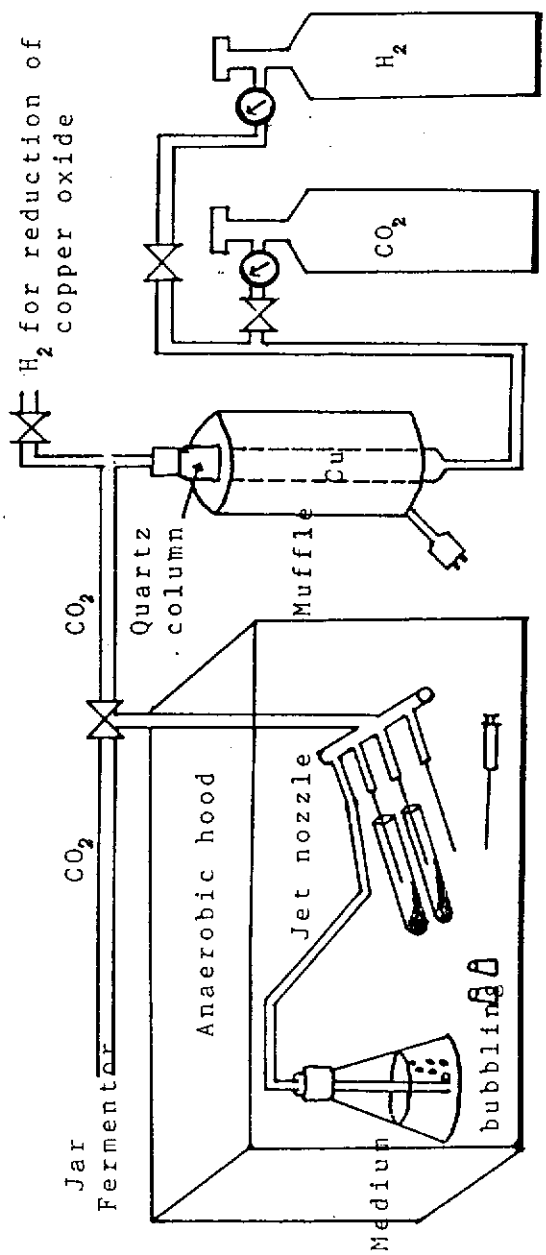
Tangnu, S.K. "Process Development for Ethanol Production Based on Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass," Process Biochemistry. 36-49 ; May/June, 1982

Taya, M., Y. Suzuki and T. Kobayashi. "A Therphilic Anaerobe (*Clostridium* species) Utilization Various Biomass Derived Carbohydrates," Journal of fermentation Technology. 62 : 229-236 ; 1984.

Wood, T.M. "Properties of Cellulolytic Enzyme System," Biochemical Journal. 13 : 407-410 ; 1985.

Wood, T.M. and S.I. McCrae. "The Cellulase of *Trichoderma koningii*," Biochemical Journal. 171 : 61-72 ; 1978.

ภาคผนวก

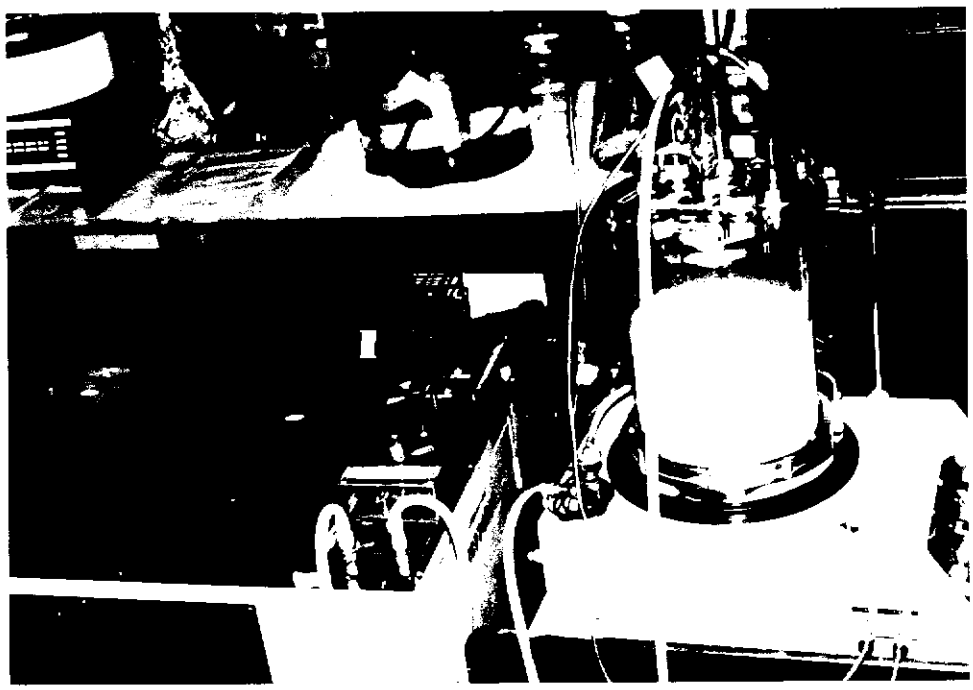


ภาพประกอบ 23 อุปกรณ์และอุปกรณ์ที่ใช้

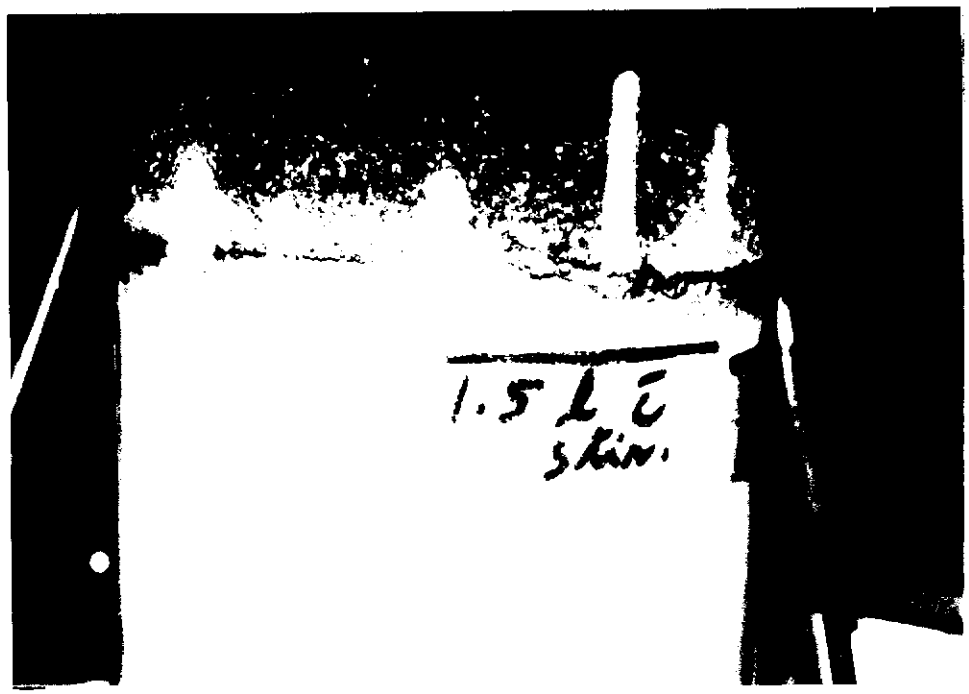
ภาพประกอบ 24 อาหารเลี้ยงเชื้อใน Sakaguchi flask

รูปซ้าย เป็น flask ที่มีการถ่ายเชื้อเรียบร้อยแล้วและสภาพภายในบราศจากออกซิเจน

รูปขวา เป็น flask ที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีออกซิเจนละลายอยู่

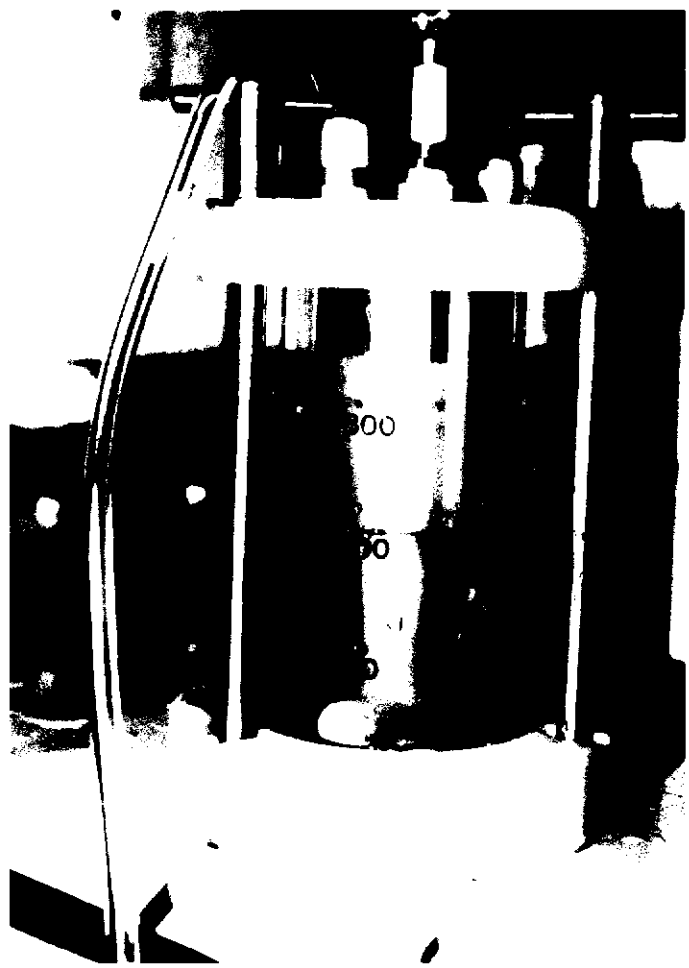


ภาพประกอบ 25 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

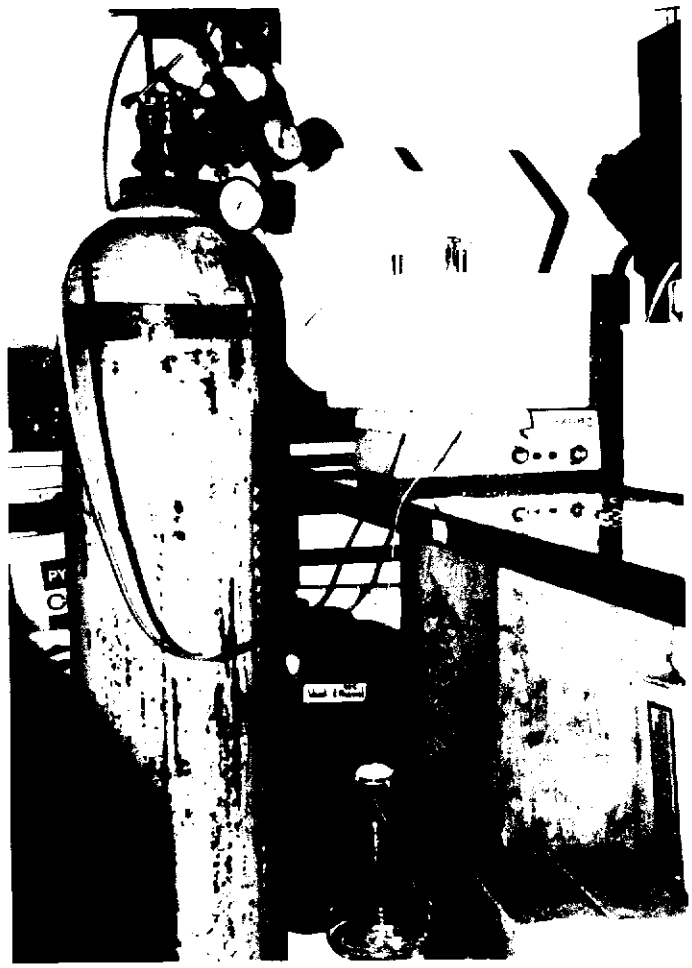


ภาพประกอบ 26 การเจริญเติบโตของเชื้อหลังจากเลี้ยงในถังหมัก เป็นเวลา 50 ชั่วโมง สังเกตได้จากฟองก๊าซที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

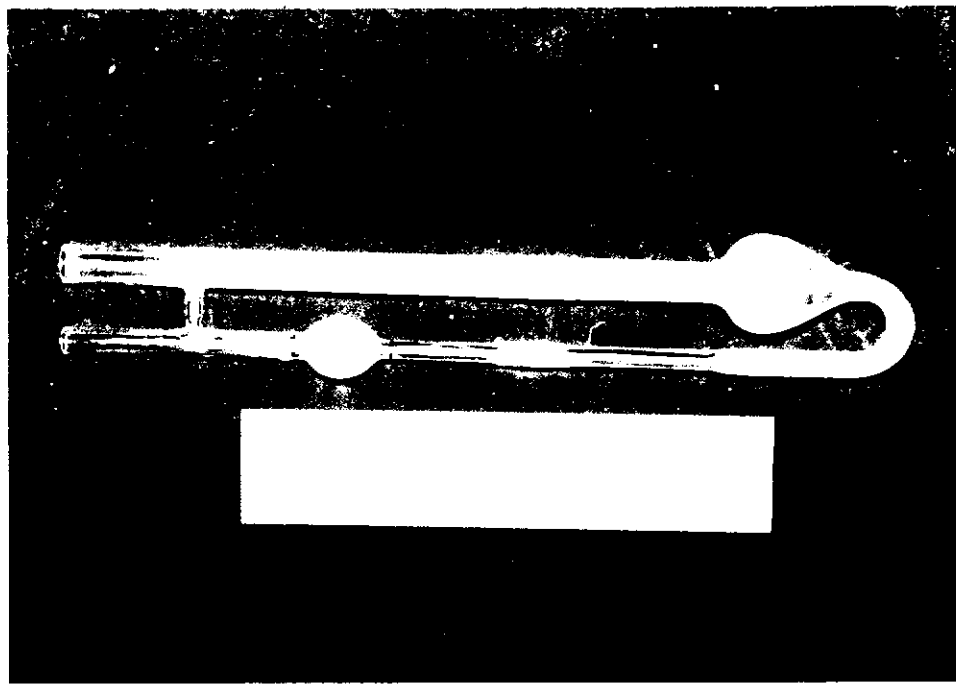
ภาพประกอบ 27 crude enzyme ที่ได้หลังการเก็บเกี่ยวออกจากถังหมัก ซึ่งจะใช้ในการทำให้บริสุทธิ์



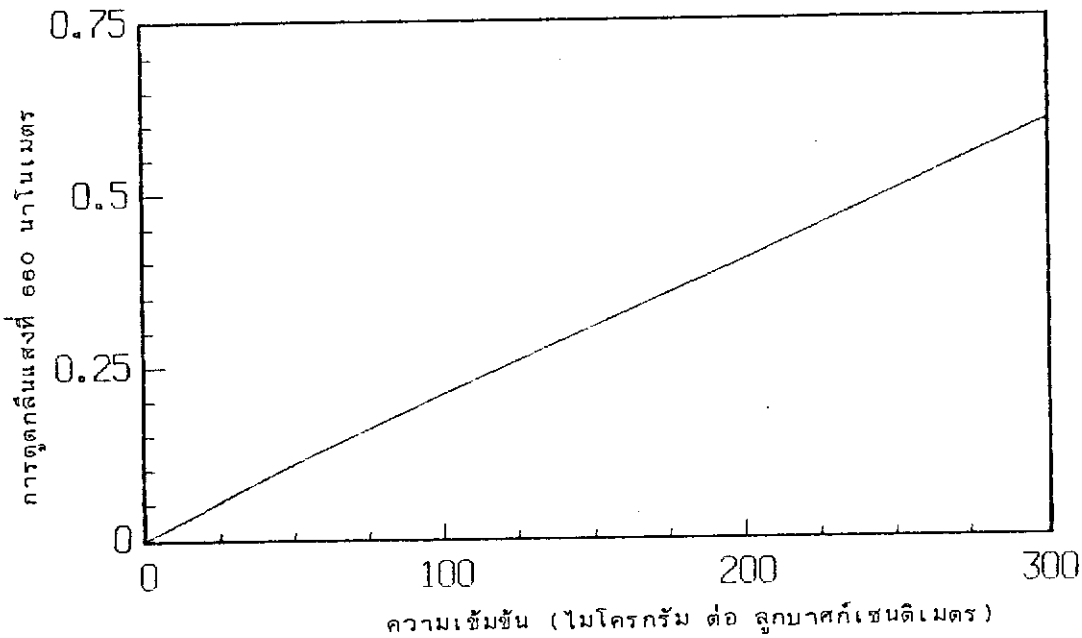
ภาพประกอบ 28 อัลตราฟิลเตอร์ ที่มี crude enzyme บรรจุอยู่



ภาพประกอบ 29 การทำเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยวิธี อัลตราฟิลเตรชัน



ภาพประกอบ 30 อุปกรณ์สำหรับวัดความหนืดของสารละลาย CMC



ภาพประกอบ 31 กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA ตามวิธีทดลองของ ลาวรี

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวอรวรรณ ชื่อสกุล แซ่โค้ว

เกิดวันที่ 4 เดือน มกราคม พุทธศักราช 2509

สถานที่เกิด เขตสัมพันธวงศ์ จังหวัดกรุงเทพฯ

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 72 ซอยเยาวพานิช ถนนเยาวราช แขวงจักรวรรดิ
เขตสัมพันธวงศ์ จังหวัดกรุงเทพฯ 10100

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2525 มัธยมปลาย จากโรงเรียนสายปัญญา

พ.ศ.2531 วท.บ.(ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

พ.ศ.2535 วท.ม.(เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ประวัติการทำงาน

พ.ศ.2534 ลูกจ้างชั่วคราว สาขาวิจัยอุตสาหกรรม
เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การศึกษาลักษณะเฉพาะและสมบัติของเอนไซม์ Endo-1,4-β-Glucanases จาก *Clostridium josui*

บทคัดย่อ

ของ

อรวรรณ แซ่โค้ว

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2535

เบตา-1,4-เอนโดกลูคาเนส (1,4-β-Glucan glucanohydrolase, EC. 3.2.1.4) 2 ชนิด ได้ทำให้บริสุทธิ์จากส่วนของน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium josui* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ในที่มีอุณหภูมิสูง ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยวิธี โครมาโตกราฟีแบบแลกไอออน และการกรองผ่านเจล เอนโดกลูคาเนสที่แยกได้ทั้ง 2 ชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุล และคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีมาก (CMCase II) มีค่า แอคติวิตี จำเพาะ เท่ากับ 21 หน่วยต่อมิลลิกรัม บนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส(CMC) เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.8 เอนไซม์นี้ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 115,000 และ 73,000 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส และ 6 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวเป็นเวลา 10 นาที ที่ 60 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์ถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+}, Mg^{2+}, DTT และ เมอร์แคปโตเอธานอล แต่ถูกยับยั้งด้วย Hg^{2+} เอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง (CMCase I) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 11.67 หน่วยต่อมิลลิกรัมเมื่อทดสอบด้วย CMC การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธี SDS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 92,000 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ได้นี้เป็นชนิด monomeric การทำงานของเอนไซม์ถูกกระตุ้นโดย Ca^{2+}, K^{+}, Mg^{2+} และถูกยับยั้งโดย Cu^{+}, Fe^{+}, PCMB อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 65 องศาเซลเซียส และ 5.5 ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

CHARACTERIZATION AND PROPERTIES OF ENDO-1,4-β-GLUCANASES FROM *Clostridium josui*

AN ABSTRACT

BY

ORAWAN SAEKHOW

Presented in partial fulfillment of the requirements for the Master of Sciences degree in Biological Chemistry

at Srinakharinwirot University

May 1992

Two-β-1,4-endoglucanases (1,4-β-glucan glycanohydrolase, EC 3.2.1.4) were isolated in pure form from the culture supernatant of *Clostridium josui* ; a new cellulolytic thermophilic bacteria. The purification procedures include ion-exchange chromatography and gel filtration. Even though they are both endoglucanases, there two enzyme differ in their molecular weights and physical property. The most active enzyme (CMCase II) has a specific activity 21 U/mg on carboxymethylcellulose (CMC) when assayed at 37 ^{o}C in 0.05 M. potassium phosphate buffer pH 6.8. It was present as two components with molecular weight of 115,000 and 73,000. Its temperature optimum is 55 ^{o}C and the optimum pH was about 6. The enzyme was stable for 10 minute at 60 ^{o}C. It is stimulated by Ca^{2+}, Mg^{2+}, DTT, and mercaptoethanol and inhibited by Hg^{2+}. The other enzyme (CMCase I)has a specific activity of 11.67 U/mg on CMC. Its molecular weight is 92,000 determined by SDS, showing that it is a monomeric enzyme. The hydrolyzation by CMCase I is stimulated by Ca^{2+}, K^{+}, Mg^{2+} and greatly inhibited by Cu^{+}, Fe^{+}, PCMB. The optimum pH was about 5.5 and the optimum temperature was 65 ^{o}C. The enzyme was stable in the temperature 70 ^{o}C for 10 minute.