

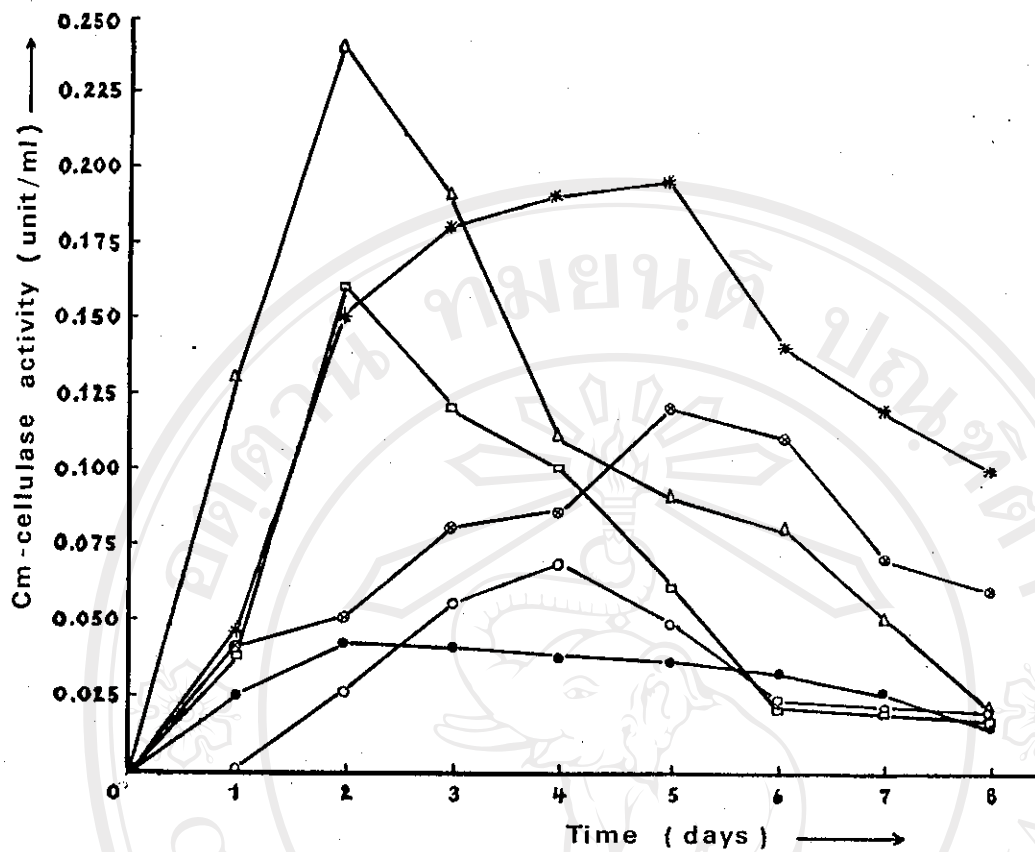
ผลการทดลอง

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไม์เซลลูเลสจากรา Trichoderma viride TISTR 3161

3.1.1 ชนิดของอาหารและเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิดต่างๆ ณ เวลาที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารที่เป็นกระดาษกรอง, ผงเซลลูโลส, Avicel เชื้อราไม่มีการเจริญเลย ส่วนฟางข้าว มีการเจริญเล็กน้อยวัดปริมาณเอ็นไม์ไม่ได้ สำหรับ รำข้าว, รำข้าว+ฟางข้าว, เปลือกเมล็ดถั่วเหลือง, ชี้เลี้ยง และไมยราบยักษ์ส่วนก้านและกิ่งใบ เชื้อราสามารถเจริญได้ดี ซึ่งเมื่อวัดปริมาณเอ็นไม์ในแต่ละ culture medium ให้ผลแสดงดังในรูปที่ 3.1

จากรูปที่ 3.1 จะเห็นได้ว่า culture medium ที่เป็น รำข้าวและฟางข้าว อัตราส่วน 9 : 1 ให้เอ็นไม์เซลลูเลสสูงที่สุดภายในเวลา 2 วัน ในขณะที่ชี้เลี้ยงให้เอ็นไม์เซลลูเลสปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ แสดงว่าเชื้อรานี้มีความสามารถย่อยเนื้อไม้ได้ไม่มากนัก สำหรับไมยราบยักษ์ส่วนก้านและส่วนกิ่งใบ ต้องใช้เวลามากกว่า 2 วัน จึงจะสามารถผลิตเอ็นไม์เซลลูเลส ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารเหล่านี้ นอกจากจะประกอบด้วยเซลลูโลสแล้วยังมีลิกนินและสารพวก hemi-celluloses เป็นองค์ประกอบอยู่มาก ส่วนรำข้าว นั้น อาจจะเนื่องมาจากจับกันเป็นก้อนหนาแน่นเกินไปทำให้อากาศถ่ายเทภายในไม่สะดวก จึงให้เอ็นไม์เซลลูเลสต่ำกว่ากรณีของรำข้าว+ฟางข้าว ซึ่งมีการถ่ายเทอากาศได้ดีกว่า นอกจากนี้รำข้าวและฟางข้าวเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ดีมาก (มีเซลลูโลสอยู่ในปริมาณสูง) เมื่อเทียบกับกรณีเปลือกเมล็ดถั่วเหลือง ซึ่งแม้ว่าเชื้อราจะมีการเจริญ (เป็นเส้นใยสีขาว) ใต้มากที่สุด อันเนื่องมาจากมีแหล่งของไนโตรเจนสูง แต่มีการผลิตเอ็นไม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยกว่ากรณีแรก และต้องใช้เวลานานกว่า (4-5 วัน) จึงจะให้ปริมาณเอ็นไม์เซลลูเลสสูง กล่าวได้ว่าอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อรา คือ รำข้าวและฟางข้าว (9 : 1) , เวลาที่ใช้เลี้ยงคือ 2 วัน

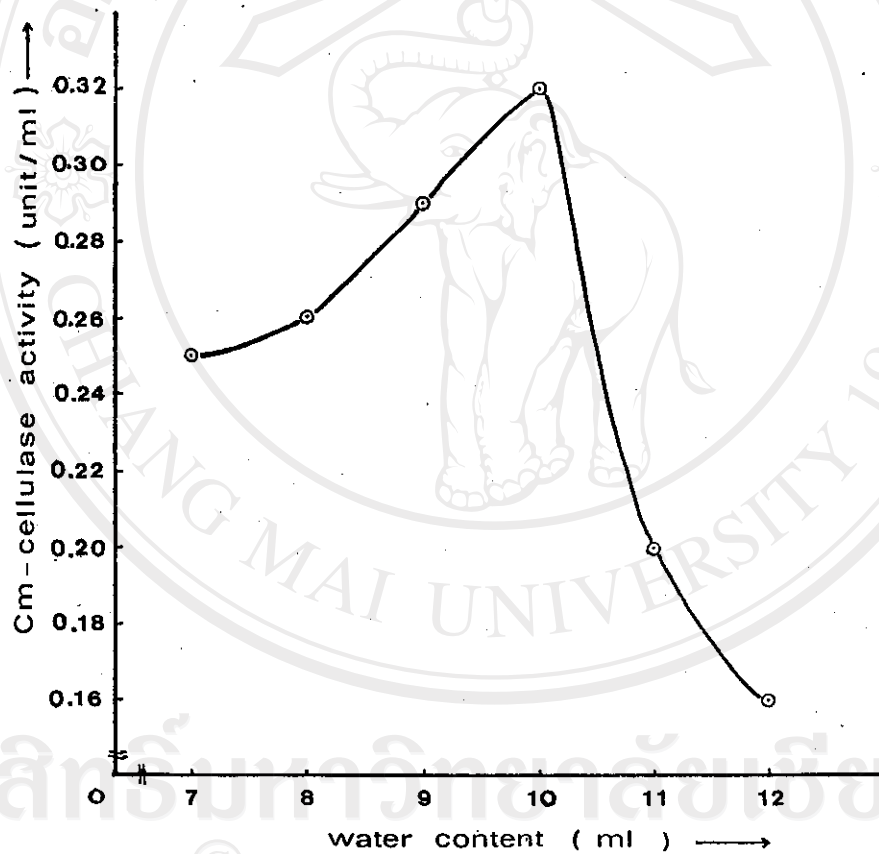


รูปที่ 3.1 แสดงผลของอาหารชนิดต่าง ๆ และเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma viride* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณน้ำที่เติมลงในอาหาร 10 มล.

- Δ = รำข้าว + ฟางข้าวในอัตราส่วน 9 : 1
 □ = รำข้าว
 * = เปลือกกล้วย
 ◇ = ไมยราบกิ่ง + ใบ
 ○ = ไมยราบส่วนก้าน
 ● = ชีเลือก

3.1.2 ปริมาณน้ำที่เหมาะสม

ปริมาณน้ำที่เหมาะสมที่สุดที่เติมลงไปให้อาหาร (รำข้าว+เอนไซม์) เพื่อให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุดคือ 10 มล. ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ผลของปริมาณน้ำในอาหารที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
โดย *Trichoderma viride*

3.1.3 ผลการเปลี่ยนแปลงสารที่สกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองใช้ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 , สารละลาย 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดียวกัน และ 1% Tween 80 สกัดเอ็นไซม์ จาก culture medium ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงผลของการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสด้วยสารชนิดต่าง ๆ

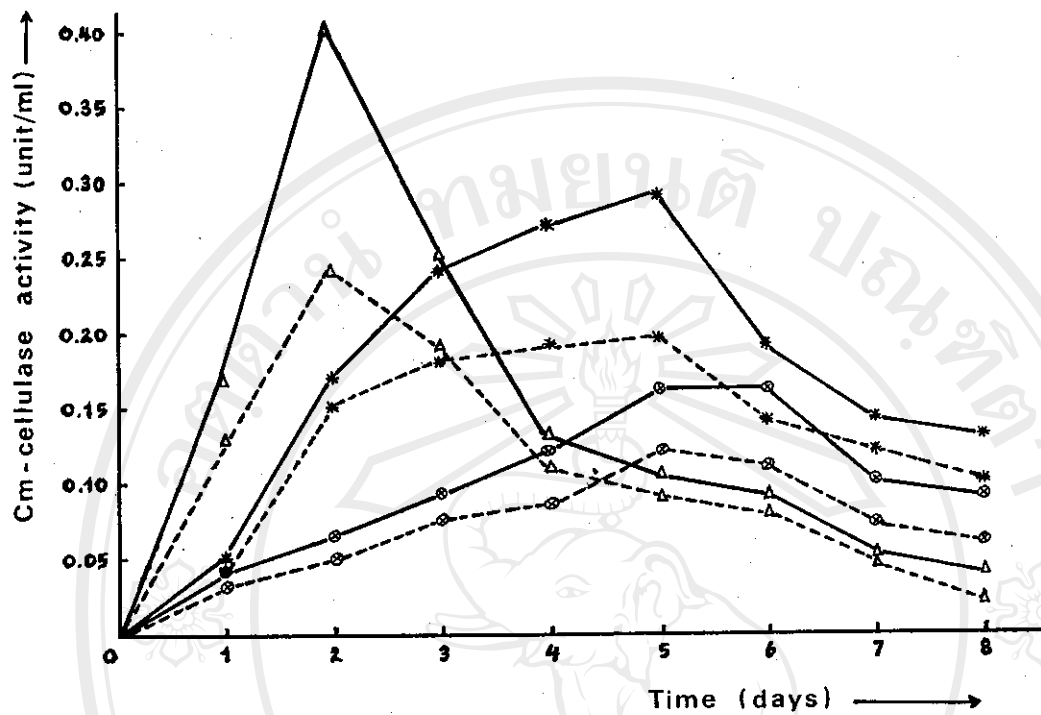
สารละลายที่สกัด	mean OD ₅₅₀	mg glucose	cellulase activity (Unit /ml)
0.05 M citrate buffer pH 4.8	0.17	0.074	0.27
0.5 M NaCl	0.29	0.110	0.41
1% Tween 80	0.30	0.114	0.42

จากตารางที่ 3.1 จะเห็นว่า 0.5 M NaCl สามารถสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสออกจากอาหารได้มากกว่ากรณีที่ใช้บัฟเฟอร์สกัด และปริมาณเอ็นไซม์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับกรณีที่ใช้ 1% Tween 80 สกัด

เมื่อทำการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสจาก culture medium ที่เป็นรำข้าว/ฟางข้าว เปลือกเมล็ดถั่วเหลือง และไมยราบยักษ์ส่วนกิ่งและใบ ที่อุณหภูมิ 27° ซ.

เป็นเวลา 1-8 วัน ด้วย 0.5 M NaCl เปรียบเทียบกับที่สกัดด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 พบว่า 0.5 M NaCl สามารถสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสออกจากอาหารได้มากกว่าทุกกรณี ดังแสดงในรูปที่ 3.3

การที่ได้ activity ของเซลลูเลสสูง เมื่อสกัดด้วย 0.5 M NaCl หรือ 1% Tween 80 อาจเนื่องมาจากสารทั้งสองนี้สามารถชะเอาเอ็นไซม์เซลลูเลสบางส่วนซึ่งจับอยู่บนผิวของเซลลูโลสหรือบนเส้นใยของเชื้อราออกมาได้ดีกว่าที่ใช้บัฟเฟอร์สกัด



รูปที่ 3.3 แสดงผลของการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสจากอาหาร (รำข้าว/ฟางข้าว, เปลือกเมล็ดข้าวเหลือง และไมยราบยักษ์ส่วนกิ่ง/ใบ) ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 และ 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดียวกัน

Δ = รำข้าว/ฟางข้าว (9 : 1)

* = เปลือกเมล็ดข้าวเหลือง

⊗ = ไมยราบกิ่ง/ใบ

----- = สกัดด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8

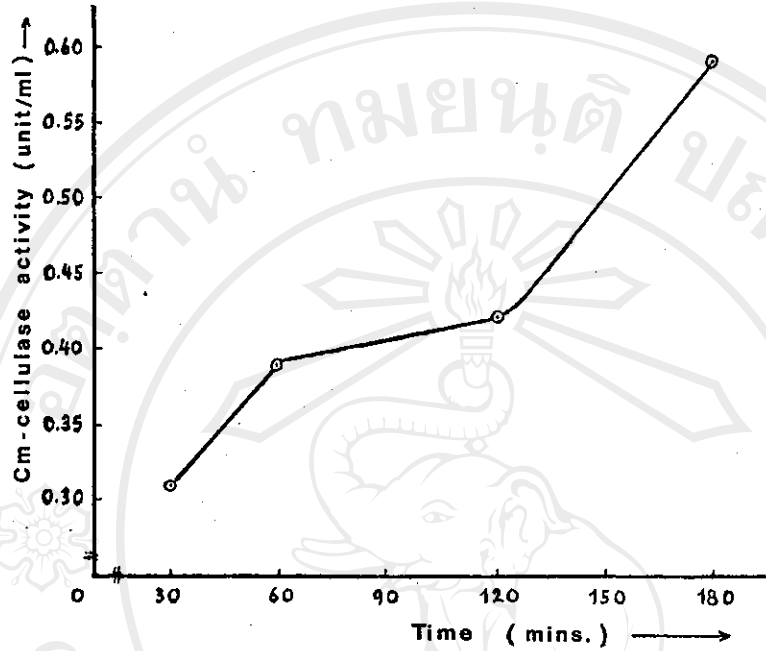
———— = สกัดด้วย 0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8

3.1.4 เวลาที่ใช้ในการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองพบว่า เวลาที่ใช้ในการแช่ culture medium เพื่อสกัดเอ็นไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงให้ปริมาณเอ็นไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด ที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในรูปที่ 3.4



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.4 แสดงปริมาณของเอ็นไซม์เซลลูเลสที่สกัดได้เมื่อแช่ใน
0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer
pH 4.8 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน

จากรูปที่ 3.4 จะเห็นว่า เมื่อแช่ culture medium ในระยะเวลาสั้น ๆ (เช่น 30 หรือ 60 นาที) เอ็นไซม์ที่ได้มีปริมาณน้อย อาจเนื่องมาจาก เอ็นไซม์ที่เชื้อราผลิตแล้วปล่อยออกสู่อาหารภายนอกนั้น บางส่วนจับติดกับโมเลกุลของ เซลลูโลส ซึ่งถ้าแช่ทิ้งไว้เป็นเวลานานขึ้นและมีการคนหรือกวนเป็นระยะ; เอ็นไซม์ เซลลูเลสที่เกาะอยู่นั้นก็จะมีโอกาสหลุดออกสู่สารละลายที่สกัดได้มาก

3.2 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II และการทำให้บริสุทธิ์

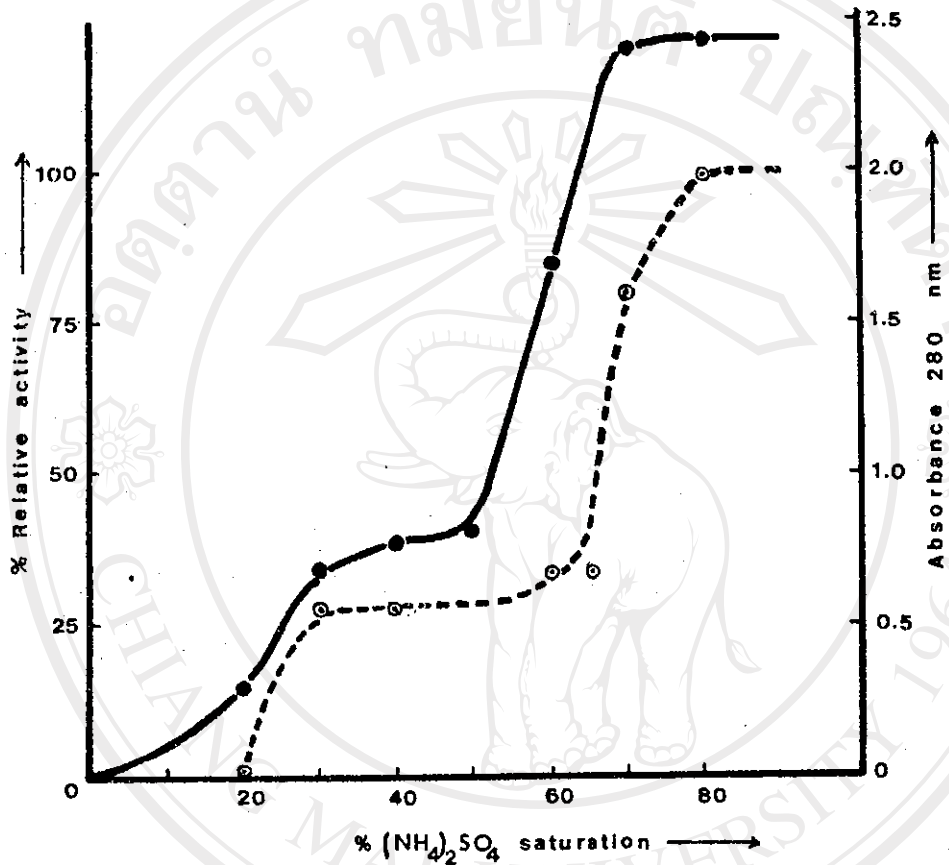
3.2.1 การตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อิมัตว

จากการทดลองหาความเข้มข้นอิมัตวที่เหมาะสมของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พบว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสตกตะกอนลงมาเพียงเล็กน้อยที่ 20 % หรือ 30 % อิมัตว $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และตกตะกอนลงมาหมดที่ 80 % อิมัตว $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ดังนั้นความเข้มข้นอิมัตวที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนหรือเอ็นไซม์ คือ 30-80 % อิมัตว $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



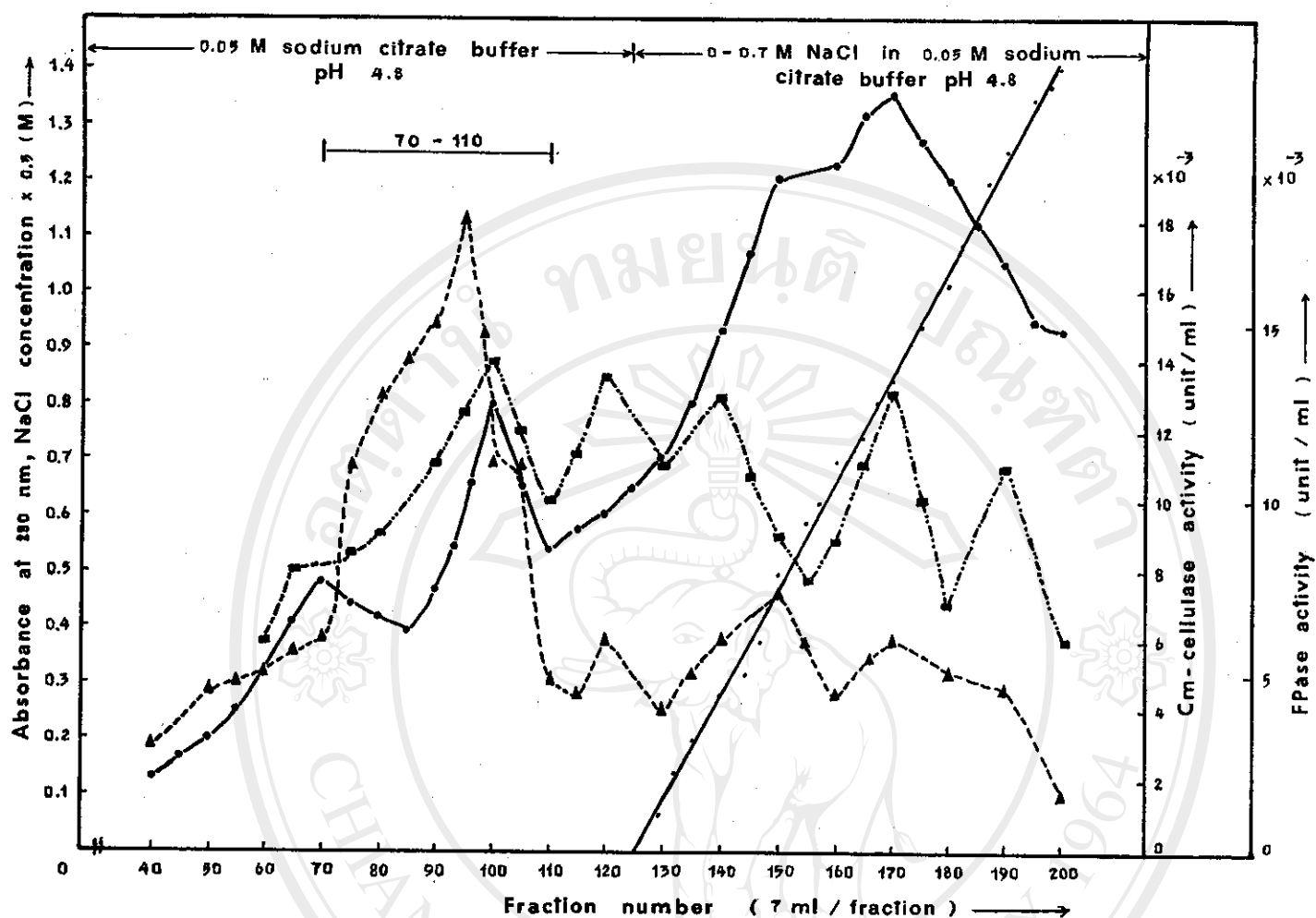
รูปที่ 3.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นอิ่มตัวต่าง ๆ กัน ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3.2.2 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex

A-50 column

จากการนำสารละลายเอ็นไซม์ (800 มล.) ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 30-80 % อิมัว (NH_4)₂ SO₄ และ desalt ด้วย Sephadex G-25 column แล้วมาผ่านลงใน DEAE-Sephadex A-50 column ขนาด 4.5 x 45 ซม. ทำการ elute สารออกจากคอลัมน์ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8-0.7 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดียวกัน (แบบ linear concentration gradient) อัตราเร็วของสารละลายที่ไหลออกเป็น 150 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นหลอดๆละ 7 มล. นำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทำการหา activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสต่อ CMC และ FP ในแต่ละหลอด ได้ผลแสดงดังรูปที่ 3.6

จากรูปที่ 3.6 จะเห็นว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสแทบจะไม่จับกับ DEAE-Sephadex เลย ส่วนใหญ่จะถูก elute ออกจากคอลัมน์โดย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก pH ที่ใช้ในการ bind อาจไม่เหมาะสม เอ็นไซม์เซลลูเลส จึงมีสภาพไม่เหมาะสมที่จะจับกับ DEAE-Sephadex. แต่ก็มีส่วนจับกับ DEAE-Sephadex



3.6 Ion-exchange Chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of crude enzyme after $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.

Sample : 800 ml

Column dimension : 4.5 x 45 cm.

Flow rate : 130 ml./hr.

Elution : Linear concentration gradient (0-0.7 M NaCl in 0.05 M citrate buffer pH 4.8)

●—●, Absorbance at 280 nm; ▲—▲, Cm-cellulase activity;

■—■, FPase activity.

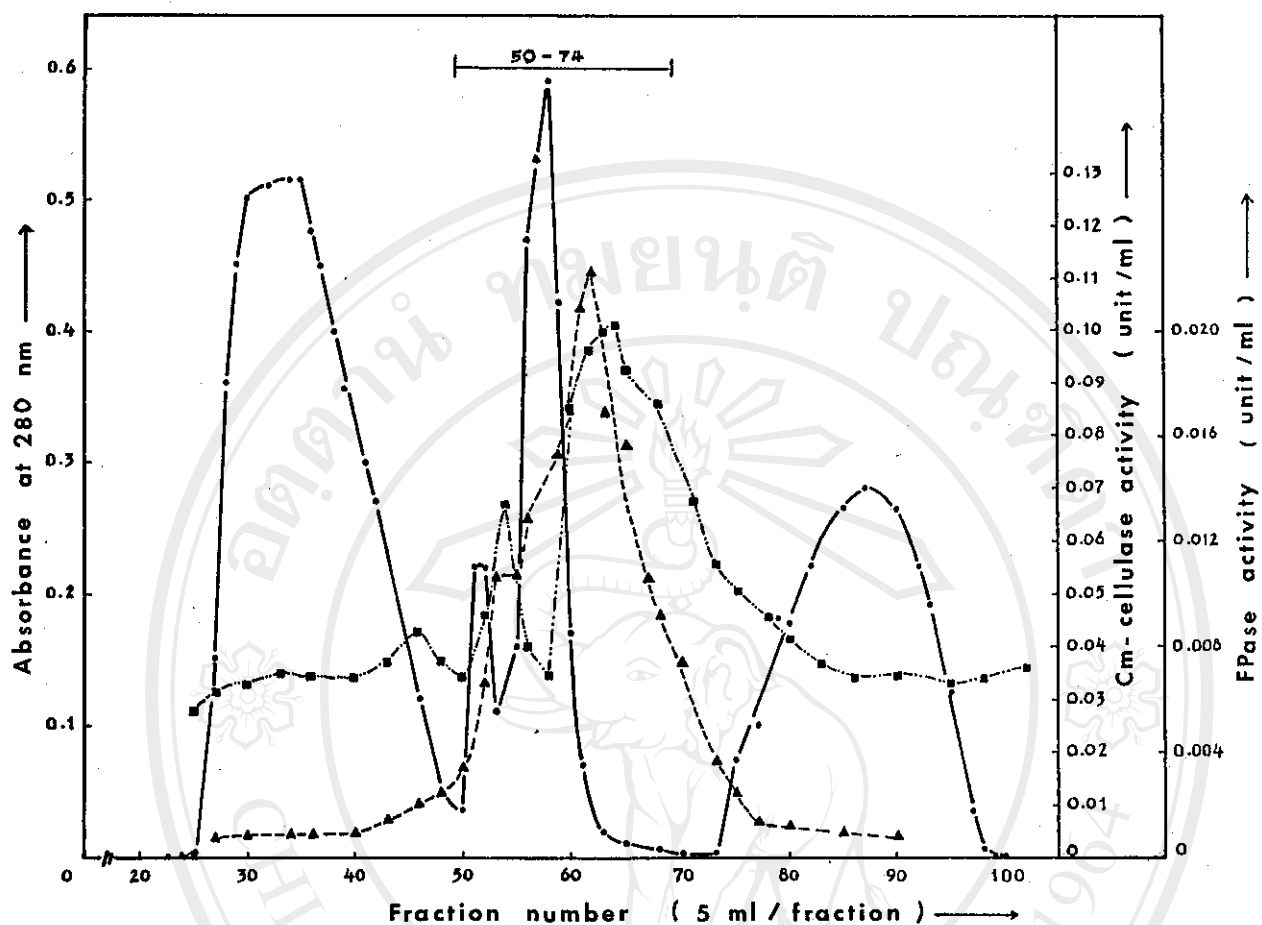
3.2.3 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-100 column

จากการนำสารละลาย (หลอดที่ 70-110) ซึ่งมี activity ต่อ CMC ที่ได้จาก DEAE-Sephadex A-50 column มาผ่าน Sephadex G-100 column ขนาด 3.0 x 65 ซม. ทำการ elute สารออกจากคอลัมน์ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 อัตราเร็วของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ = 75 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ออกมาเป็นหลอด ๆ ละ 5 มล. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.7

3.2.4 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column อีกครั้ง

จากการนำสารละลายส่วนที่มี activity ต่อ CMC (50-74) ที่ได้จาก Sephadex G-100 column จำนวน 213 มล. มาผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column ขนาด 4.5 x 35 ซม. อีกครั้ง ทำการชะเอ็นไซม์ด้วย 0-0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 5.8 อัตราเร็วของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ 35 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 7 มล. นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส ได้ผลดังรูปที่ 3.8

จากรูปที่ 3.8 พบว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสจับกับ DEAE-Sephadex ด้วยแรงที่อ่อนมากซึ่งเมื่อ elute ด้วย NaCl ความเข้มข้นเพียง 0.02 M เอ็นไซม์ก็เริ่มออกมาจากคอลัมน์แล้วแสดงว่า pH ที่เหมาะสมในการจับระหว่างเอ็นไซม์กับ DEAE กับเจด อยู่ในช่วงก่อนไปทางค่าเอ็นไซม์ที่ได้นี้ยังไม่บริสุทธิ์นัก จึงนำไปผ่าน Sephadex G-100 column ต่อไป



รูปที่ 3.7 Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-100 of the fractions from DEAE-Sephadex chromatography.

Sample : 16 ml

Column dimension : 3.0 x 65 cm.

Flow rate : 75 ml./hr.

Eluent : 0.05 M sodium citrate buffer pH 5.0

....., Absorbance at 280 nm; Δ ----- Δ , Cm-cellulase activity;

■-----■, FPase activity.

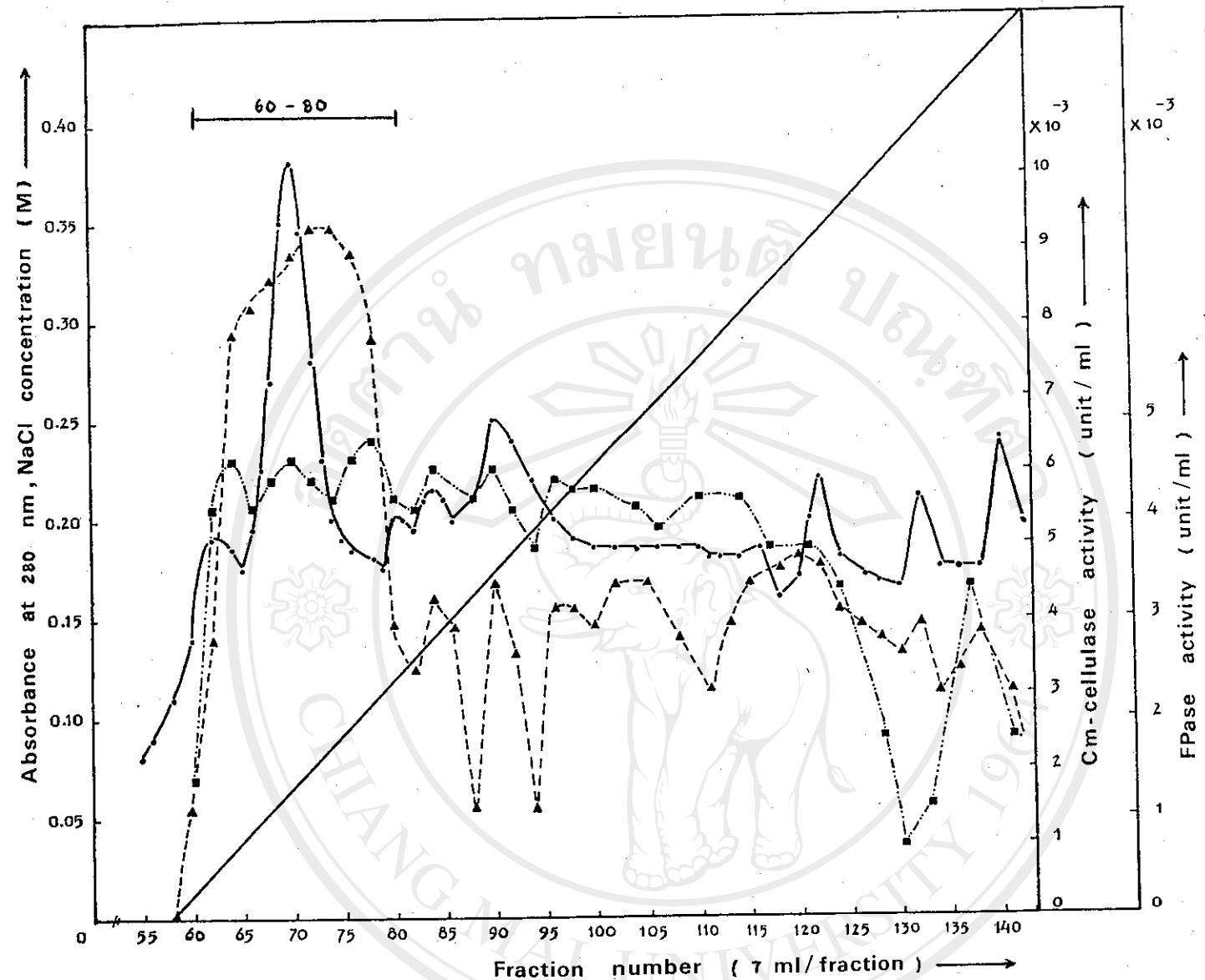


Figure 3.8 Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of the fractions from Sephadex G-100 chromatography.

Sample : 213 ml

Column dimension : 4.5 x 31 cm.

Flow rate : 35 ml./hr.

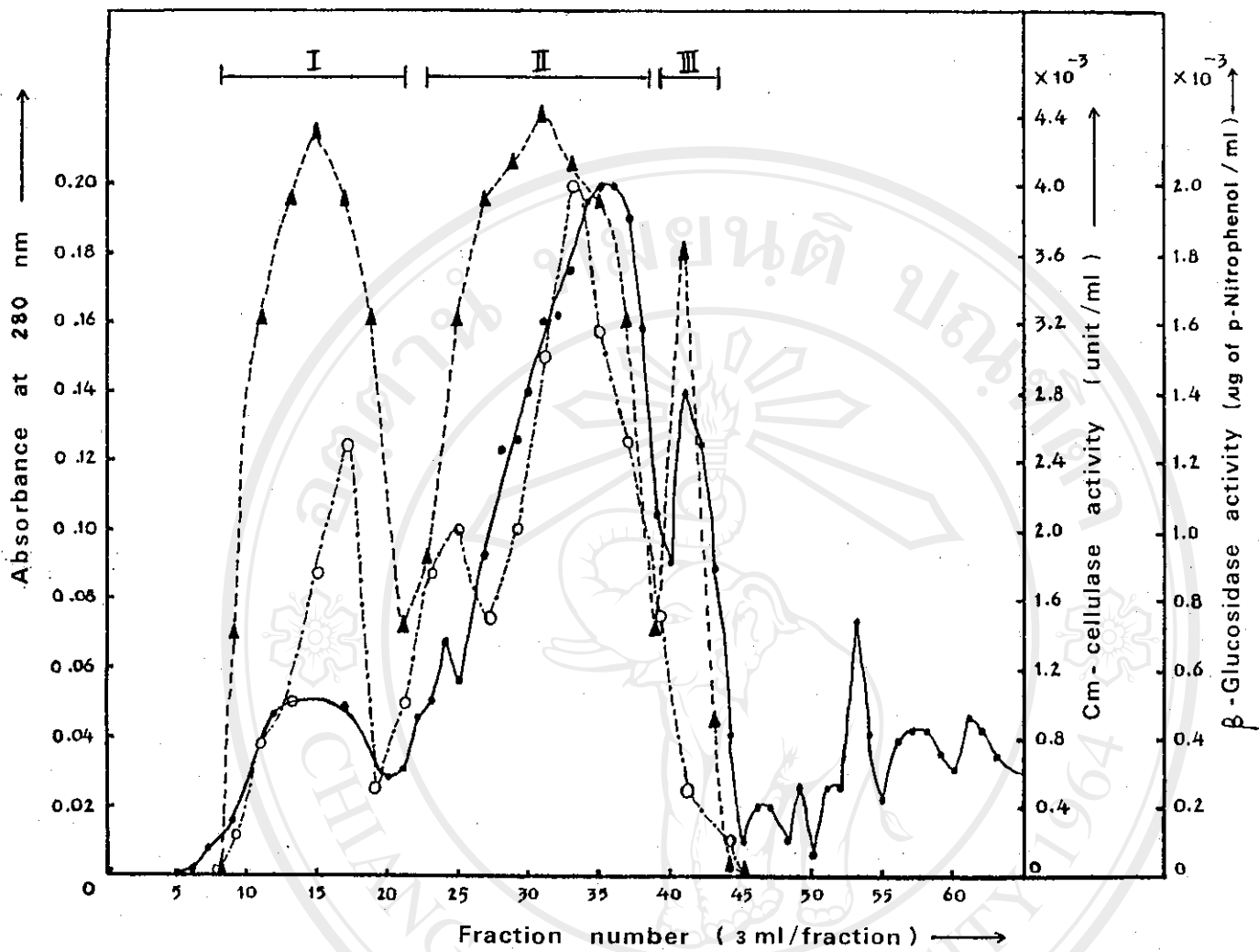
Elution : Linear concentration gradient by increase in NaCl concentration from 0-0.5 M.

—•—, Absorbance at 280 nm; ▲-----▲, Cm-cellulase activity;
 ■-----■, FPase activity.

3.2.5 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-200 column

จากการนำเอ็นไซม์ที่มี activity คือ CMC จาก DEAE- Sephadex A-50 column (หลอดที่ 60-80) ละลายในบัฟเฟอร์ จำนวน 2 มล. มาผ่าน Sephadex G-200 column ขนาด 1.6 x 45 ซม. ทำการ elute เอ็นไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 เก็บสารละลายที่ออกมาหลอดละ 3 มล. อัตราเร็วของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ 5.2 มล./ชม. นำไปวัดปริมาณโปรตีน, activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส และ β -glucosidase ได้ผลดังในรูปที่ 3.9

จากรูปที่ 3.9 , จะเห็นว่า เมื่อผ่านสารละลายเอ็นไซม์ลงไปใน Sephadex G-200 column , เอ็นไซม์เซลลูเลสถูกแยกออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ: ส่วน I, peaks ของ activity ของเซลลูเลสคือ CMC , ของ β -glucosidase และปริมาณโปรตีนซึ่งเป็น peak เดี่ยว ๆ สมัยกันในแนวเดียวกัน ในขณะที่ ส่วน II ประกอบด้วย peak ของโปรตีน ซึ่งมีอย่างน้อย 2 peak ไม่สมัยกันกับ peak ของ activity เซลลูเลส สำหรับส่วน III มี activity ของ เซลลูเลสไม่สูงนัก ดังนั้นจึงเก็บสารละลายส่วน I (fraction 9-20) นำไปทำการศึกษาคณะสมบัติต่าง ๆ ต่อไป และให้ชื่อเอ็นไซม์เซลลูเลสส่วนนี้เป็น "เอ็นไซม์เซลลูเลส I "



รูปที่ 3.9 Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-200 of the fractions from DEAE-Sephadex A-50 chromatography.

Sample : 2 ml

Column dimension : 1.6 x 45 cm.

Flow rate : 5.2 ml./hr.

Eluent : 0.05 M citrate buffer pH 5.0

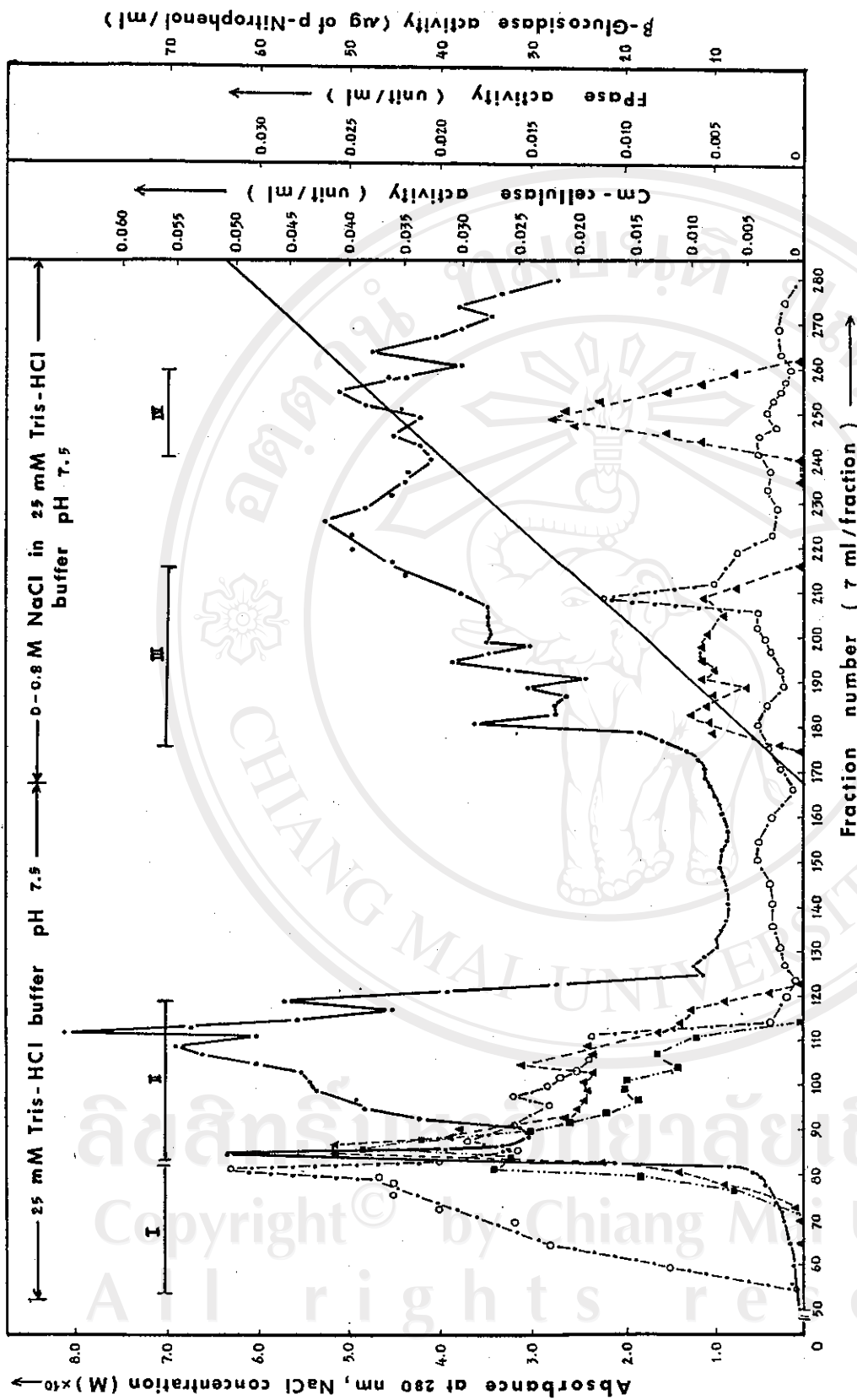
—•—, Absorbance at 280 nm, ▲---▲, Cm-cellulase activity;
 ○---○, β-glucosidase.

3.2.6 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส II ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex

A-50 column

หลังจากตกตะกอนด้วย 30-80 % อิมตัว $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ desalt แล้วได้สารละลายเอ็นไซม์ 200 มล. นำมาผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column ขนาด 4.5 x 35 ซม. ทำการชะพาเอ็นไซม์ให้ออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 45 มล/ชม. โดยใช้ linear gradient ของ 0-0.8 M NaCl ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 เก็บสารละลายเป็นหลอด ๆ ละ 7 มล. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสและ β -glucosidase ให้ผลดังในรูปที่ 3.10

พบว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสบาง form ไม่จับกับ DEAE-Sephadex (ส่วน II) เอ็นไซม์เซลลูเลสบาง form ถูกจับกับเจล ซึ่งต้อง elute ด้วย NaCl ในความเข้มข้นแตกต่างกัน (ส่วน III + IV) (รูปที่ 3.10) เนื่องจากส่วน II ประกอบด้วยเซลลูเลสอย่างน้อย 4 form และ β -glucosidase activity สูงมาก จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ขั้นตอนอีกมากเป็นการสิ้นเปลืองเวลา ส่วน III มี activity ของเซลลูเลสต่ำ จึงเลือกสารละลายเอ็นไซม์ส่วน IV (240-260) ซึ่งประกอบด้วย activity ของเซลลูเลสเป็น peak เดียว มี β -glucosidase activity อยู่เพียงเล็กน้อย นำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.10 Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of crude extract from $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation
 Sample : 200 ml. Column dimension : 4.5 x 35 cm. Flow rate : 45 ml./hr.

Elution : Linear concentration gradient by increase in NaCl concentration from 0-0.8 M

—●—, Absorbance at 280 nm; —▲—, Cm-cellulase activity; —■—, FPase activity;
 —○—, β-glucosidase activity.

3.2.7 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส II ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-100 column

จากการนำสารละลายส่วน IV (หลอดที่ 240-260) ที่ได้จาก DEAE-Sephadex A-50 มาผ่านลงใน Sephadex G-100 column ขนาด 3.0 x 60 ซม. ทำการ elute เอ็นไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 25 มล./ชม. โดยใช้ 0.05 M citrate buffer pH 5.0 เก็บสารละลายหลอดละ 4.5 มล. เป็นจำนวน 130 หลอด นำสารละลายที่เก็บได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร, activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสและเอ็นไซม์ β -glucosidase ให้ผลคล้ายดังแสดงในรูปที่ 3.11

จากรูปที่ 3.11 พบว่า β -glucosidase activity เกือบจะแยกออกจากเอ็นไซม์เซลลูเลสโดยเด็ดขาด แบ่งสารละลายออกเป็นส่วน ๆ ได้ 6 ส่วน เอ็นไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยหลาย form ซึ่งแต่ละ form ประกอบด้วย activity ต่อ CMC ต่อ FP และบาง form มี activity ของ β -glucosidase อยู่ด้วย (IB : B, IV : E) เนื่องจากส่วน IV : E ประกอบด้วยโปรตีนปริมาณสูงที่สุด และ activity ของเซลลูเลสต่อ CMC และ FP ก็สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกเอาส่วน IV : E นี้ไปศึกษาต่อ โดยการทำให้บริสุทธิ์อีกขั้นหนึ่ง เพื่อพิสูจน์ว่า β -glucosidase activity ที่มีอยู่นั้น อยู่ใน cellulase activity จริง ๆ หรือเป็นอีก form หนึ่งของ เอ็นไซม์ β -glucosidase ซึ่งยังไม่แยกออก

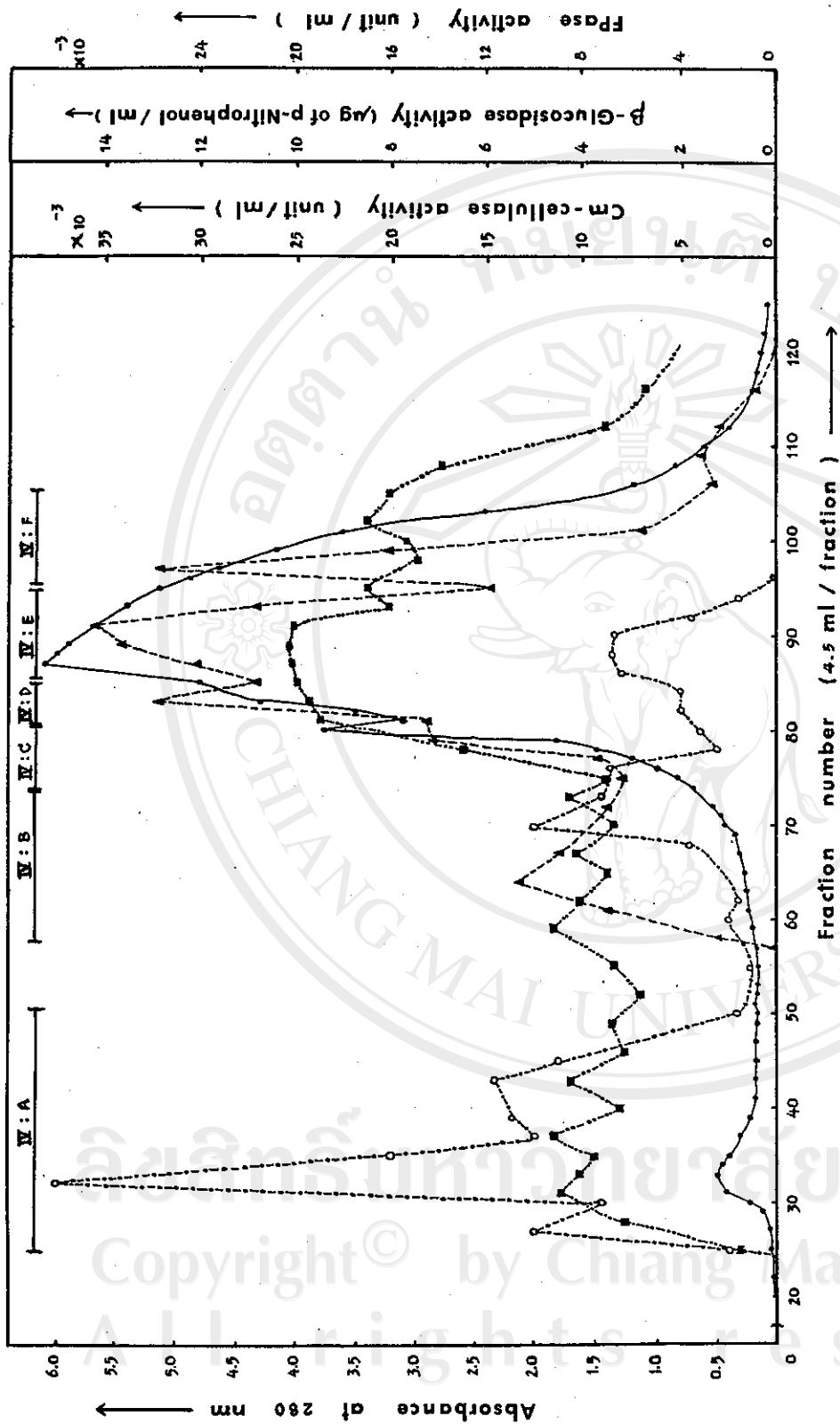


Fig. 3.11 Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-100 of the fraction IV from DEAE-Sephadex A-50 chromatography.

Sample : 20 ml. Column dimension : 3.0 x 60 cm. Flow rate : 25 ml./hr.

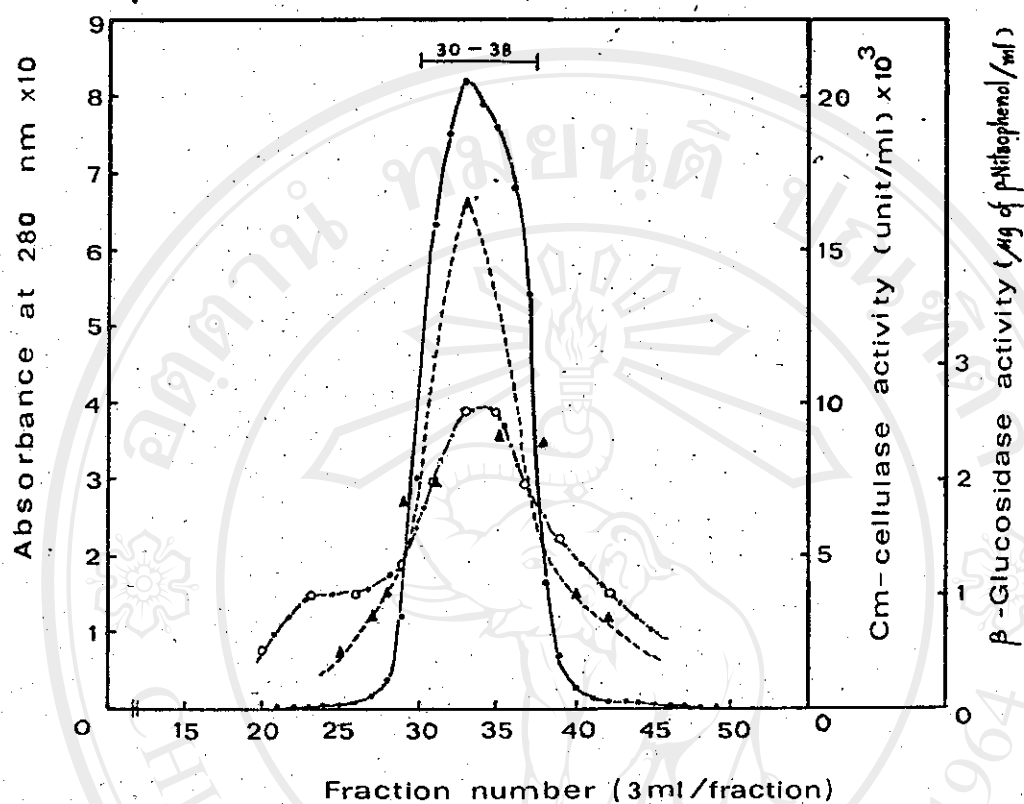
Eluent : 0.05 M citrate buffer pH 5.0

—○—, Absorbance at 280 nm; - - - - -○- - - - - A, Cm-Cellulase activity; ······○·····, Ffase activity; ······○·····, β -glucosidase activity.

3.2.8 การเตรียมเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-200 column

จากการนำสารละลายส่วน IV : E ที่ได้จาก Sephadex G-100 column มาผานลงใน Sephadex G-200 column ขนาด 1.6×45 ซม. ทำการ elute เอ็นไซม์ให้ออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 5.1 มล./ชม. โดยใช้ 0.05 M citrate buffer pH 5.0 เก็บสารละลายที่ออกมาเป็นหลอด ๆ ละ 3.0 มล. เป็นจำนวน 30 หลอด และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร , activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสและ activity ของ เอ็นไซม์ β -glucosidase ให้ผลดังรูปที่ 3.12

จากรูปที่ 3.12 จะเห็นว่า peak ของ activity ของเซลลูเลส สมนัยกับ peak ของการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ β -glucosidase activity ไปในแนวเดียวกัน นั้นแสดงว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสที่เตรียมได้นั้นบริสุทธิ์ และมี β -glucosidase activity อยู่ในตัวมันเอง นอกเหนือจาก activity ต่อ CMC และ FP ให้ชื่อเอ็นไซม์เซลลูเลส form นี้ว่า "เอ็นไซม์เซลลูเลส II"



รูปที่ 3.12 Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-200 of fraction IV : E from Sephadex G-100 chromatography.

Sample : 3 ml

Column dimension : 1.6 x 45 cm.

Flow rate : 5.1 ml./hr.

Eluent : 0.05 M citrate buffer pH 5.0

—•—, Absorbance at 280 nm; ▲—▲, Cm-cellulase activity;

○—○, β-glucosidase activity.

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.9 สรุปผลของการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

ผลการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 3.2 และ 3.3

ตารางที่ 3.2 ผลการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I จากเชื้อรา *Trichoderma viride* สายพันธุ์ TISTR 3161

Fraction	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	specific activity (unit/mg protein)	Purification (fold)
crude extract	6,000	407,760	1,998	4.9×10^{-3}	1
30-80% satd. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	800	184,000	960	5.2×10^{-3}	1.1
DEAE-Sephadex A-50	360	590	16	2.7×10^{-2}	5.5
Sephadex G-100	213	74.6	6.4	8.4×10^{-2}	17
DEAE-Sephadex A-50	100	70	6.0	8.5×10^{-2}	17.3
Sephadex G-200	2	1.3	0.15	11.5×10^{-2}	23.4

ตารางที่ 3.3 ผลการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส II จากเชื้อรา Trichoderma viride
สายพันธุ์ TISTR 3161

Fraction	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)
crude extract	6,000	200,000	222	1.1×10^{-3}	1
30-80% satd. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	200	8,680	27.0	3.1×10^{-3}	2.8
DEAE-Sephadex A-50(IV)	20	340	1.4	4.1×10^{-3}	3.7
Sephadex G-100 (IV :E)	3	28.4	0.55	1.9×10^{-2}	17.3
Sephadex G-200	3	4.8	0.11	2.3×10^{-2}	20.9

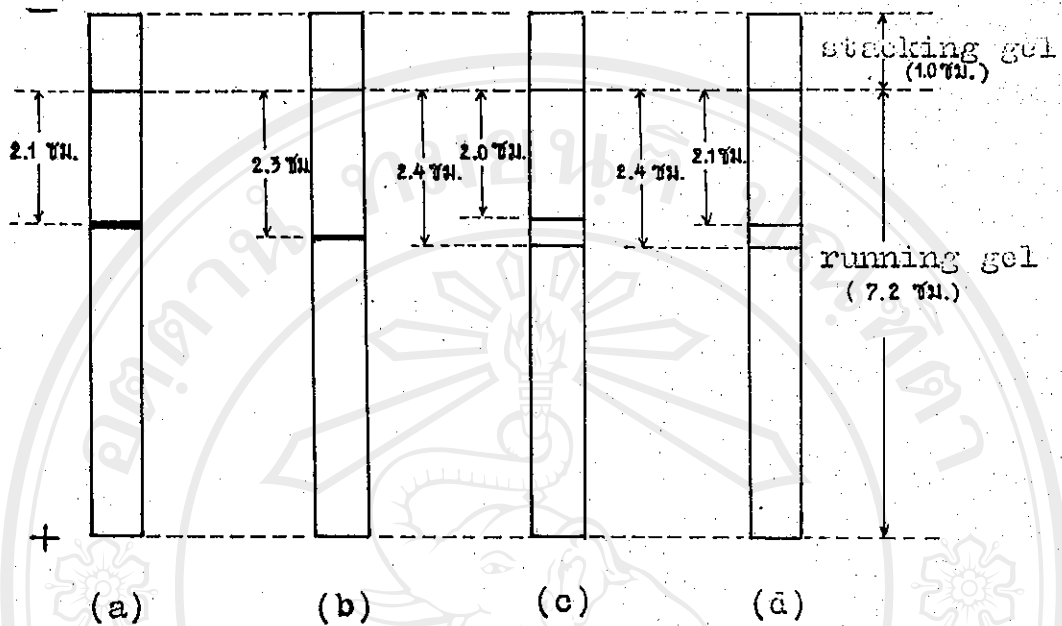
3.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ที่เตรียมได้

3.3.1 Polyacrylamide-disc-gel electrophoresis

จากการนำเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II มาทำ disc-gel electrophoresis ที่ pH 8.6 ใช้กระแสไฟฟ้า 3.5 มิลลิแอมป์ต่อหนึ่งหลอด พบว่าเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ต่างให้โปรตีนแถบเดี่ยว แสดงว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 form บริสุทธิ์ (ดูรูป 3.13(a) และ (b))

3.3.2 SDS-polyacrylamide-disc-gel electrophoresis

หลังจากที่นำเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II มาทำ SDS - polyacrylamide-disc-gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 1.5 มิลลิแอมป์ต่อหนึ่งหลอด พบว่าให้ 2 band ทั้งในกรณีเซลลูเลส I และ II ดังในรูปที่ 3.13 (c) และ (d)



รูปที่ 3.13 แสดงขนาดของ: polyacrylamide gel electrophoresis ของ

(a) cellulase I

(b) cellulase II

:SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของ

(c) cellulase I

(d) cellulase II

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

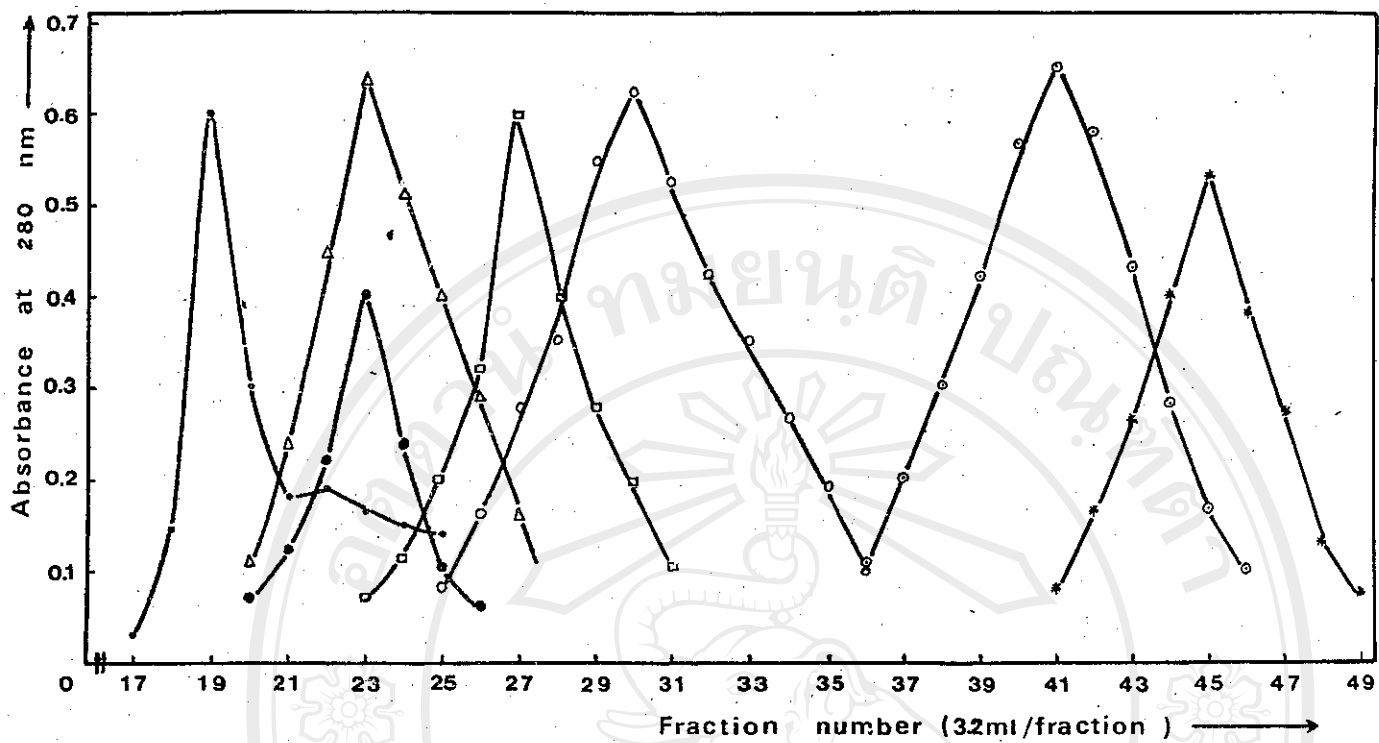
All rights reserved

โมเลกุลเอ็นไซม์เซลูเลส I และ II มาจะประกอบด้วย subunits ที่เป็น dimer หรือ tetramer ก็ได้ เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 3.13 (a) , (b) (c) และ (d) ซึ่งสามารถทดสอบว่าเป็น dimer หรือ tetramer ได้โดยการหามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลูเลสทั้งสองและมวลโมเลกุลของ subunits ของเซลูเลสทั้งสองเปรียบเทียบกัน

3.4 ผลการศึกษาค้นคว้าสมบัติบางประการของเอ็นไซม์เซลูเลสทั้งสองที่เตรียมได้

3.4.1 ผลการหามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลูเลส I และ II

3.4.1.1 จากการผ่าน protein markers คือ catalase (20 มก.) , alddase (20 มก.) , BSA (20 มก.) และ ovalbumin (18 มก.) และผ่าน เซลูเลส I (85 มก.) และเซลูเลส II (80 มก.) ลงใน Sepharose 6B column (2.4 x 40 ซม.) ได้ผลแสดงดังรูปที่ 3.14 และ 3.15 และหาได้ว่า เอ็นไซม์เซลูเลส I มีค่า $V_e/V_o = 1.21$ เซลูเลส II มีค่า $V_e/V_o = 1.58$ ดังนั้นเซลูเลส I และ II จะมีมวลโมเลกุลประมาณ 232,000 และ 138,000 ตามลำดับ ดังผลในตารางที่ 3.4



รูปที่ 3.14 แสดงการหา elution volume (V_e) ที่ผ่าน Sepharose 6B column ของ protein markers, เอ็นไซม์เซลลูโลส I และ II

—•— = Blue dextran (6 มก./มล.)

Δ—Δ = Catalase (20 มก./มล.)

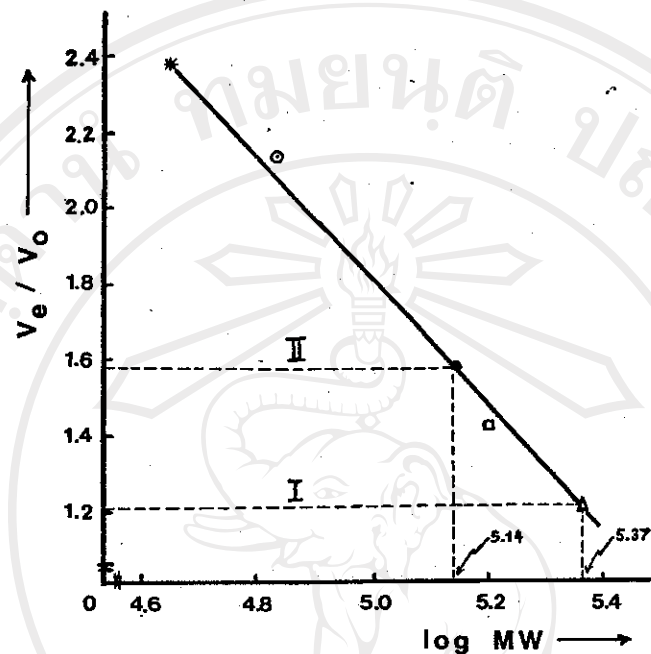
□—□ = Aldolase (20 มก./มล.)

○—○ = BSA (20 มก./มล.)

— = Ovalbumin (18 มก./มล.)

●—● = เซลลูโลส I (85 มก./มล.)

○—○ = เซลลูโลส II (80 มก./มล.)



รูปที่ 3.15 แสดง Standard curve ที่ใช้หามวลโมเลกุลของ
โปรตีนเซลลูโลส I และ II โดยใช้ Sepharose 6B
column chromatography

- Δ , Catalase (20 มก./มล.)

- $\square$, Aldolase (20 มก./มล.)

- $\circ$, BSA (20 มก./มล.)

- $*$, Albumin (18 มก./มล.)

- $\bullet$, เซลลูโลส I (85 มก./มล.)

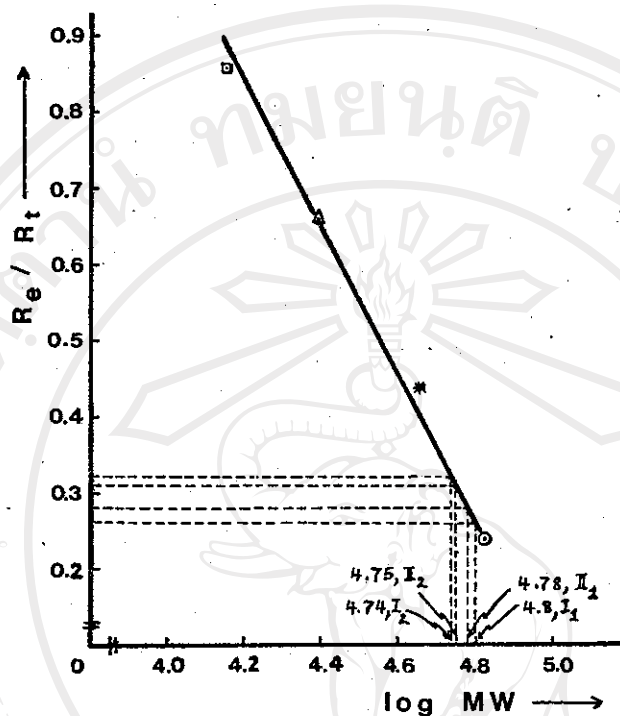
- $\circ$, เซลลูโลส II (80 มก./มล.)

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการหามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซอลูเลสทั้งสองโดยใช้

Sephacrose 6 B column

โปรตีน	MW	log MW	V_e (มล.)	V_e/V_o
Catalase	232,000	5.37	73.6	1.21
Aldolase	158,000	5.20	86.4	1.42
BSA	67,000	4.83	131.2	2.14
Ovalbumin	45,000	4.65	144.0	2.37
เอ็นไซม์เซอลูเลส I	232,000	5.37	73.6	1.21
เอ็นไซม์เซอลูเลส II	138,000	5.14	96.0	1.58

3.4.1.2 จากการทำ SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis ของเอ็นไซม์เซอลูเลส I (4 ไมโครกรัม) และ II (8 ไมโครกรัม) เทียบกับ protein markers คือ albumin (bovine plasma) ovalbumin, chymotrypsinogen และ lysozyme พบว่าเอ็นไซม์เซอลูเลส I และ II ต่างให้ 2 band ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเมื่อหามวลโมเลกุลของแต่ละ band จาก standard curve รูปที่ 3.16 ได้ว่า กรณีเซอลูเลส I; subunits มีมวลโมเลกุลเป็น 63,000 และ 55,000 ส่วนเซอลูเลส II; subunits มีมวลโมเลกุลเป็น 61,000 และ 56,300



รูปที่ 3.16 แสดง standard curve ที่ใช้หาขนาดโมเลกุลของ subunits ของเซอูเลต I และเซอูเลต II โดย SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

○, Bovine plasma albumin

*, Ovalbumin

Δ, Chymotrypsinogen

◻, Lysozyme

ตารางที่ 3.5 แสดงผลการหามวลโมเลกุลของ subunits ของเอ็นไซม์
เซลล์ูเลส I และ II

โปรตีน	MW	log MW	Re (cm.)	* Re/Rt
Albumin (bovine plasma)	66,000	4.82	2.5	0.24
Ovalbumin	43,000	4.65	4.5	0.44
Chymotrypsinogen	25,000	4.4	6.8	0.66
Lysozyme	14,300	4.15	8.9	0.86
เซลล์ูเลส I				
: band 1	63,000	4.8	2.7	0.26
: band 2	55,000	4.74	3.3	0.32
เซลล์ูเลส II				
: band 1	61,000	4.78	2.85	0.28
: band 2	56,300	4.75	3.2	0.31

Re * = ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไปได้บนเจลโดยเริ่มจากขอบบนสุดของ
separating gel

Rt * = ระยะทางที่ tracking dye เคลื่อนที่ไปได้ = 10.3 ซม.

3.4.2 ผลการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลเอ็นไซม์เซลล์เลส I และ II

จากการใช้สารละลายเอ็นไซม์ I (เข้มข้น 0.5 มก./มล.) จำนวน 2 มล. ผสมกับ 80 % phenol 0.1 มล. แล้วเติม H_2SO_4 เข้มข้น จำนวน 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ได้ = 0.25 (ค่าเฉลี่ย) เมื่อเทียบจากรูปที่ 3.17 จะได้ว่า มีน้ำตาลอยู่ = 22.5 ไมโครกรัม หรือเท่ากับ 4.4 %

สารละลายเอ็นไซม์เซลล์เลส II ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกัน

สรุปผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.6

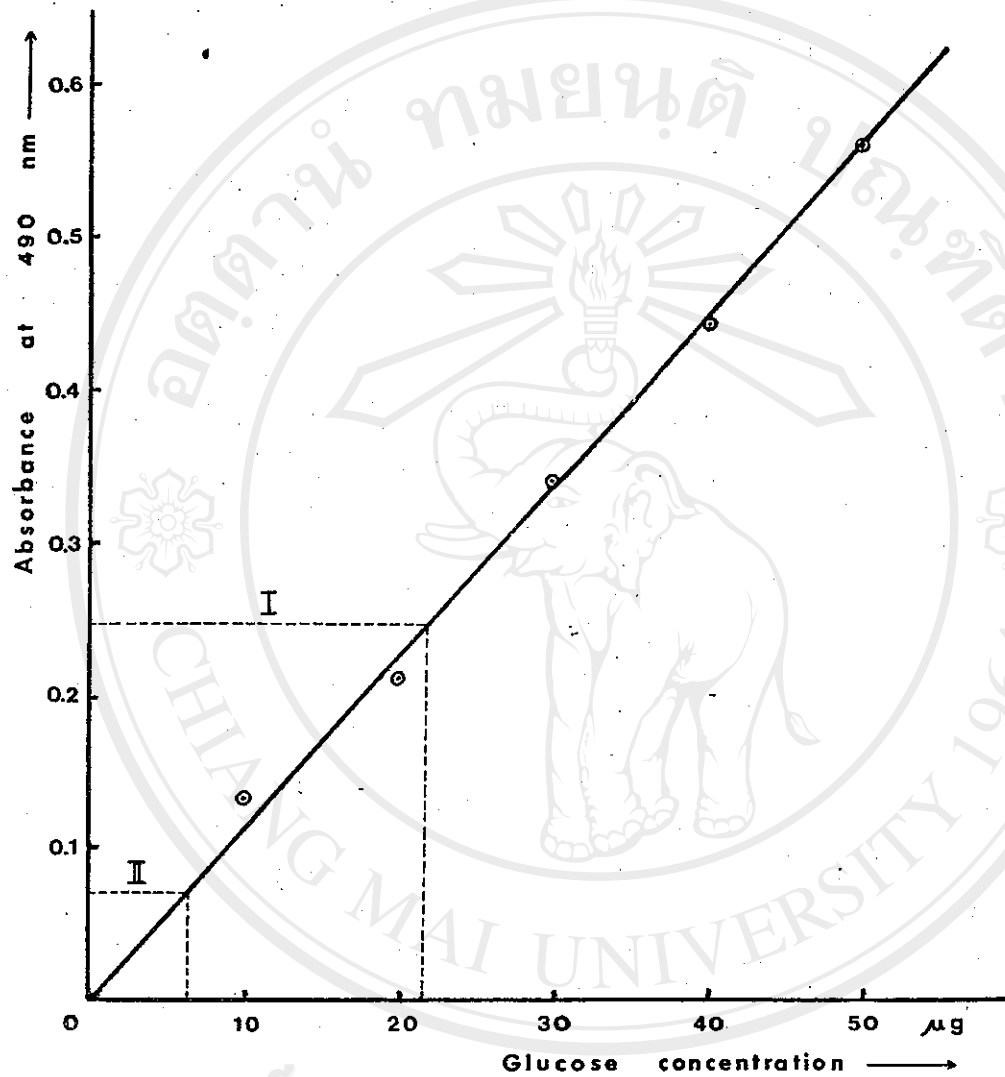
ตารางที่ 3.6 แสดงผลการทดลองหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลเอ็นไซม์เซลล์เลส I และ II ที่เตรียมได้

เอ็นไซม์ เซลล์เลส	OD ₄₉₀			ปริมาณน้ำตาลใน รูปกลูโคส (ไมโครกรัม)	% คาร์โบไฮเดรต
	1	2	เฉลี่ย		
I	0.28	0.23	0.25	22.5	4.4
II	0.07	0.065	0.068	6	1.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © 2018 Chiang Mai University
All rights reserved

จากตารางข้างบน จะเห็นว่า เอ็นไซม์เซลล์เลสทั้ง 2 form เป็น glycoprotein โดยที่เอ็นไซม์เซลล์เลส I มีปริมาณน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่าในเอ็นไซม์เซลล์เลส II



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 รูปที่ 3.17 แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน
 เอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II
 All rights reserved

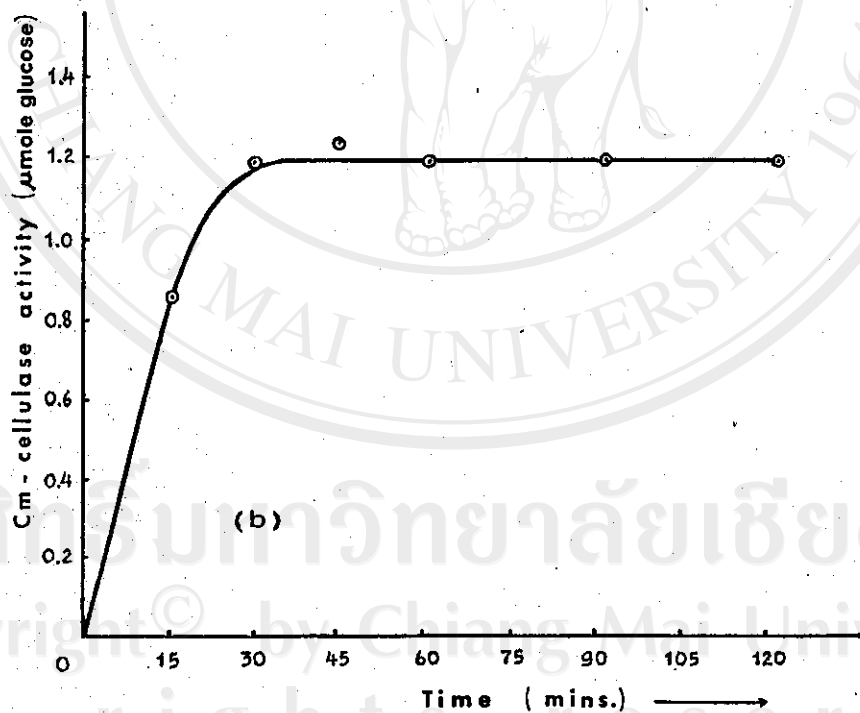
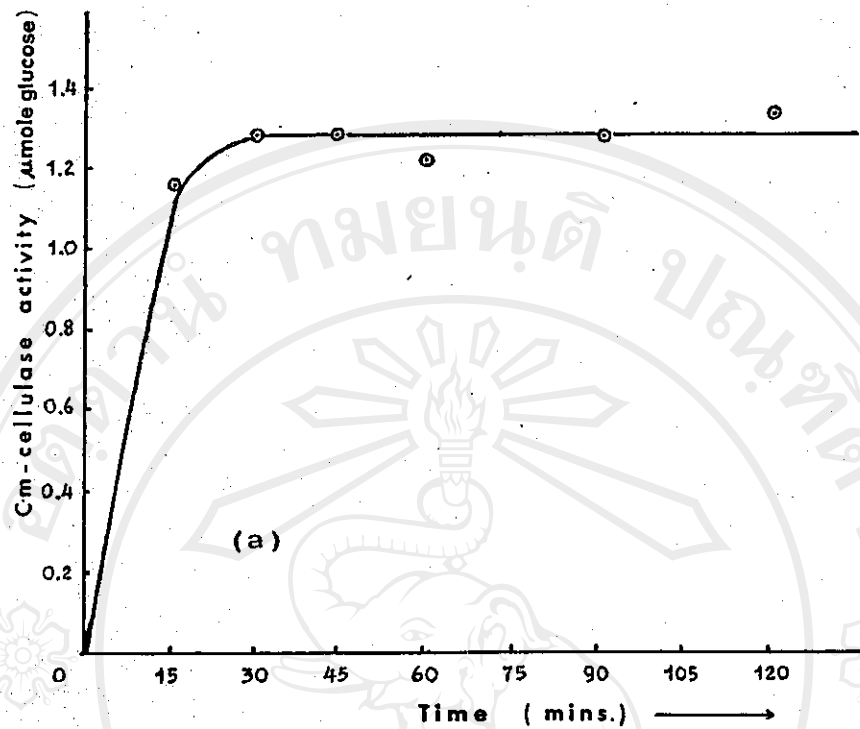
3.4.3 ผลของ incubation time ต่อ activity เอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

เมื่อทำการ incubate เอ็นไซม์เซลลูเลสแต่ละ form กับสับสเตรท CMC ณ เวลาต่าง ๆ กัน คือ 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที แล้ววัด ปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น ผลปรากฏว่า เมื่อ incubation time เพิ่มขึ้นจาก 15 นาที ไปเป็น 30 นาที activity ของเซลลูเลสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้เวลาในการ incubate มากกว่า 30 นาทีขึ้นไปจนถึง 120 นาที activity ของเซลลูเลสยังไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 3.18 (a) + (b))

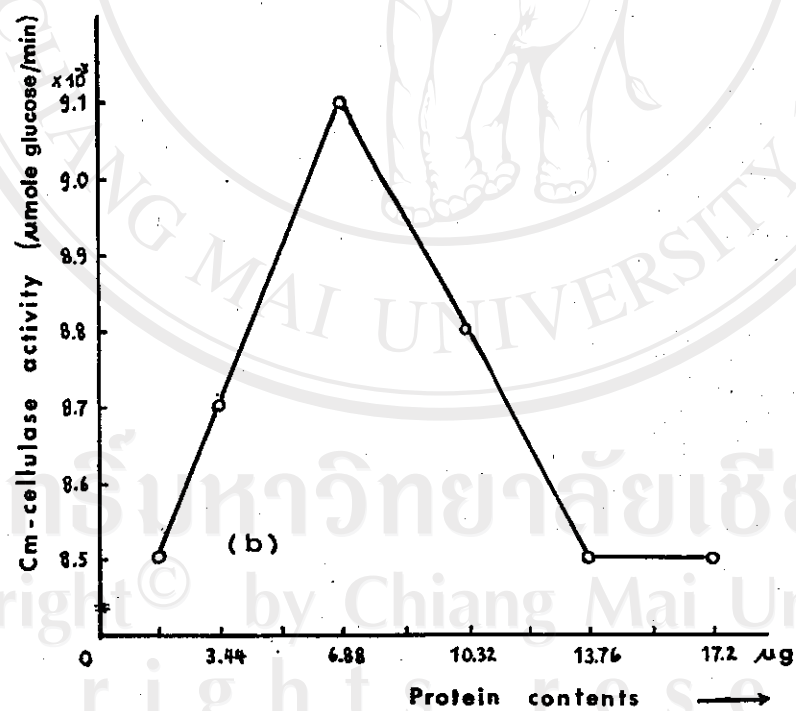
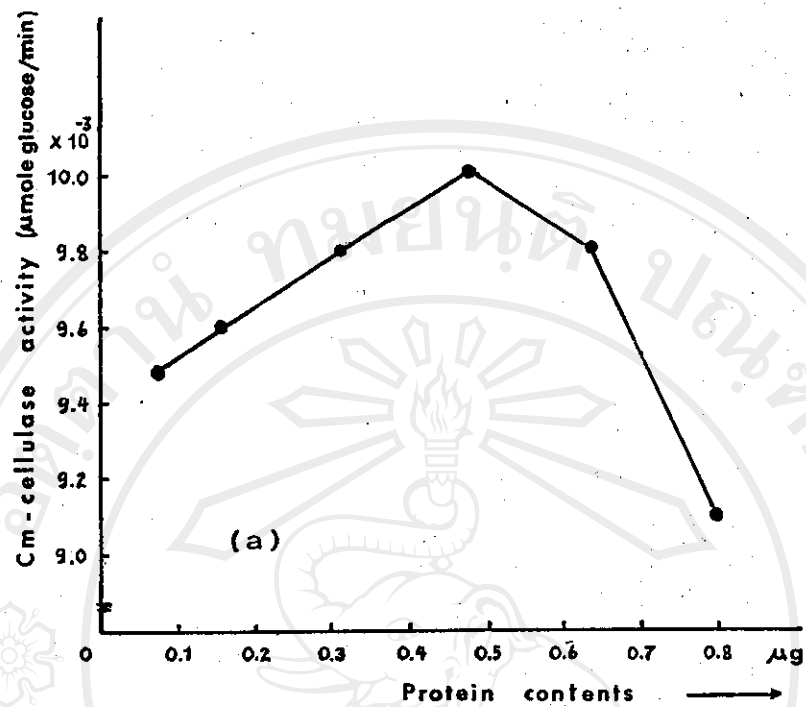
3.4. ผลของความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อ activity ของเซลลูเลส I และ II

เมื่อ incubate เอ็นไซม์เซลลูเลสแต่ละ form กับสับสเตรทในเวลา 30 นาที โดยใช้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์โปรตีนแตกต่างกัน แล้ววัด activity ของเอ็นไซม์ในแต่ละความเข้มข้น ให้ผลแสดงดังรูปที่ 3.19 (a) และ (b)

จากผลการทดลอง (ในรูปที่ 3.19 (a) และ (b) พบว่า activity เอ็นไซม์เซลลูเลส I จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอ็นไซม์โปรตีนเพิ่มขึ้นจนถึง ค่าความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 0.48 ไมโครกรัม จากนั้น activity ของเอ็นไซม์ มีค่าลดลงจากเดิม เช่นเดียวกับกรณีเอ็นไซม์เซลลูเลส II activity ของเอ็นไซม์ จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเอ็นไซม์เพิ่มขึ้นจนถึงค่า 6.88 ไมโครกรัม แล้วมีค่าลดลงอย่างมาก การที่เป็นเช่นนี้ อาจจะเนื่องมาจาก ที่ความเข้มข้นเอ็นไซม์สูง ๆ โมเลกุล ของเอ็นไซม์เกิด associate กันทำให้ไม่สามารถเร่งการย่อยสลายสับสเตรทได้ดังเดิม



รูปที่ 3.18 แสดงผลของ incubation time ต่อ activity ของเอนไซม์ (a) ของเอนไซม์เซลลูเลส I และ (b) ของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อ incubate เอนไซม์กับ CMC ณ เวลาต่าง ๆ กันคือ 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที



รูปที่ 3.19 แสดงผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อ activity ของเอนไซม์
(a) ของเอนไซม์เซลลูเลส I และ (b) ของเอนไซม์เซลลูเลส II

3.4.5 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

3.4.5.1 Optimum temperature

จากรูปที่ 3.20 , เอ็นไซม์เซลลูเลส I ทำงานได้ดีที่สุด ณ อุณหภูมิ 45° ซ ในขณะที่เซลลูเลส II ทำงานได้ดีที่สุด ณ 50° ซ. เมื่อ incubate 30 นาที

ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50° ซ.ขึ้นไป พบว่า activity ของเอ็นไซม์ไม่ว่า form I หรือ II จะลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นที่ 55° ซ. activity ของเซลลูเลส I เป็น 36.5 % ของที่ 45° ซ. และ activity ของเซลลูเลส II จะเป็น 44.5 % ของที่ 50° ซ. เป็นต้น

3.4.5.2 Thermal stability

ผลแสดงคังรูปที่ 3.21 เอ็นไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 form ก่อนข้างทนต่อความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 50° ซ. ณ อุณหภูมิ > 50° ซ. activity ของเอ็นไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วที่ 65° ซ. activity ของเอ็นไซม์แทบจะไม่มีเหลืออยู่เลย จะเห็นได้ว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 form มีความคงทนต่อความร้อนเช่นเดียวกัน

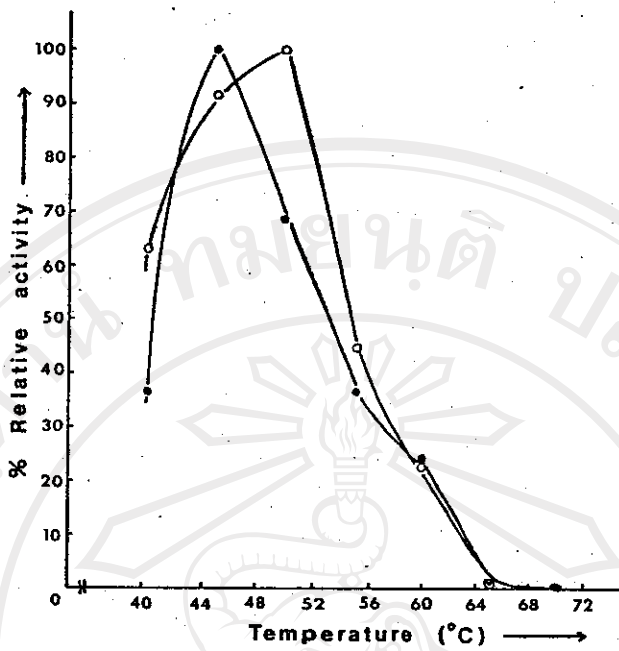
3.4.6 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

3.4.6.1 Optimum pH

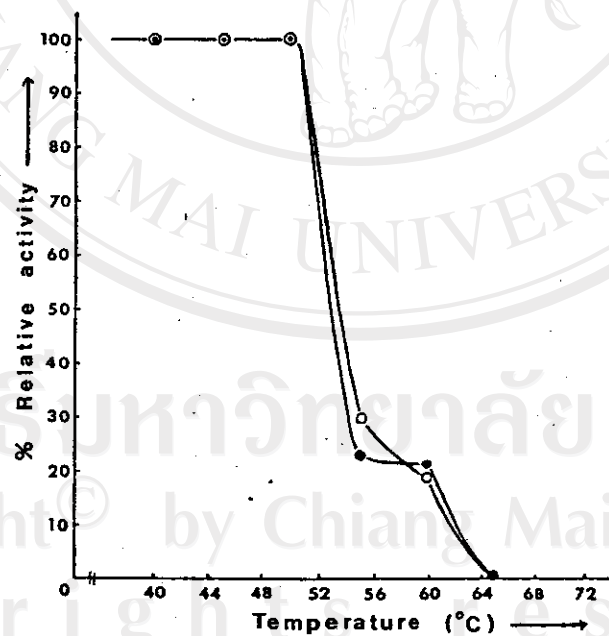
pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II แตกต่างกันโดยที่เซลลูเลส II มีการทำงานดีที่สุดเฉพาะที่ pH 4.0 ในขณะที่เอ็นไซม์เซลลูเลส I สามารถทำงานได้ดี ในช่วง pH 4.0-6.0 (คังในรูปที่ 3.22) นั่นคือ เซลลูเลส I มีช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานกว้างกว่ากรณิของเซลลูเลส II

3.4.6.2 pH stability

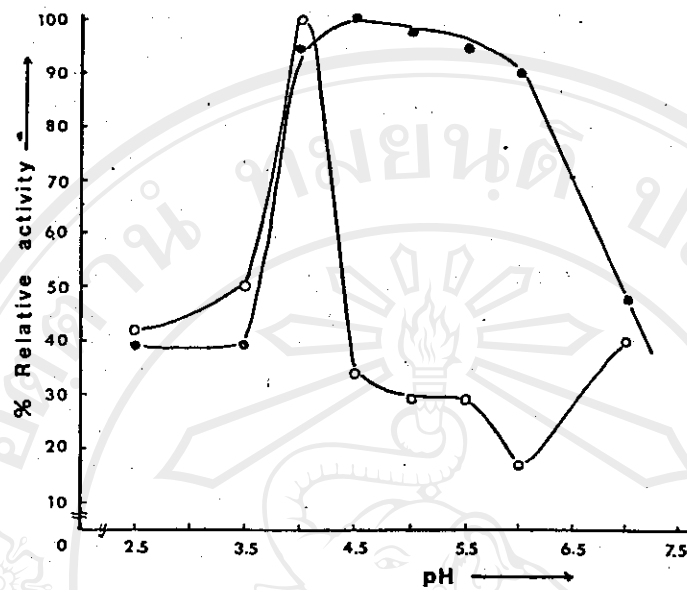
จากรูปที่ 3.23 , เอ็นไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 form นี้ มีเสถียรภาพสูงสุดเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 2.5-6.0 (สภาพเป็นกรด) ซึ่งเป็นช่วงกว้างทีเดียว แต่เมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH สูงกว่า 6.0 ขึ้นไป activity ของเอ็นไซม์จะลดลง เช่น ที่ pH 7.0 , activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I



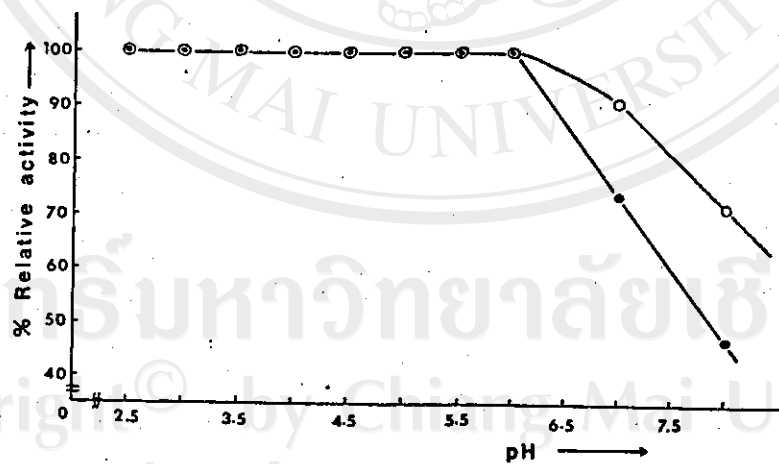
รูปที่ 3.20 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์
เซลลูเลส I (•) และเซลลูเลส II (◦)



รูปที่ 3.21 แสดงความทนทานต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เซลลูเลส I (•)
และเซลลูเลส II (◦)



รูปที่ 3.22 แสดง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส I (●) และเซลลูเลส II (○)



รูปที่ 3.23 แสดงความคงทนต่อ pH ของเอนไซม์เซลลูเลส I (●) และเซลลูเลส II (○) โดยที่ 100 % Relative activity มีค่าเป็น 76 % ของ cellulase activity ทั้งหมด

จะเหลือเพียง 73.3% ของที่ pH 6.0 ส่วน activity ของเซลลูเลส II เหลืออยู่ 90.9% เป็นต้น จะเห็นว่าเซลลูเลส I มีการลดลงของ activity ตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น (สูงกว่า 6.0 ขึ้นไป) ได้มากกว่ากรณีเซลลูเลส II โดยที่ 100 % Relative activity มีค่าเป็น 76 % ของ cellulase activity ทั้งหมด

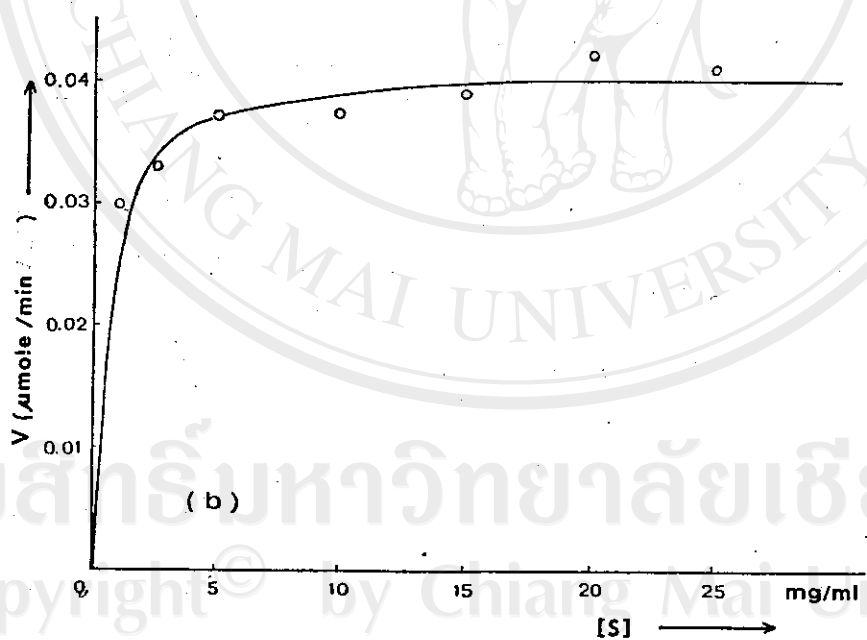
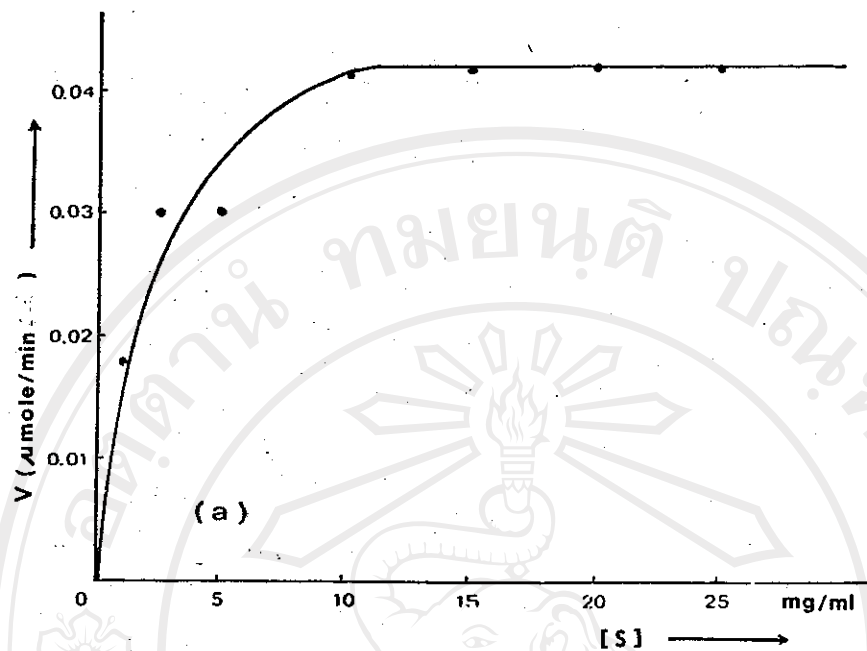
3.4.7 ผลการหาค่า Km และ Vmax ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

จากการ incubate เอ็นไซม์เซลลูเลส (เข้มข้น 4 มก./มล.) แต่ละ form กับ CMC ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัด activity ของเอ็นไซม์ และเมื่อนำไปพลอตกราฟระหว่าง activity, $\mu\text{mole}/\text{min}$ และความเข้มข้นของสับสเตรท, $[S]$ (mg/ml) ให้ผลแสดงดังรูปที่ 3.24 (a) + (b)

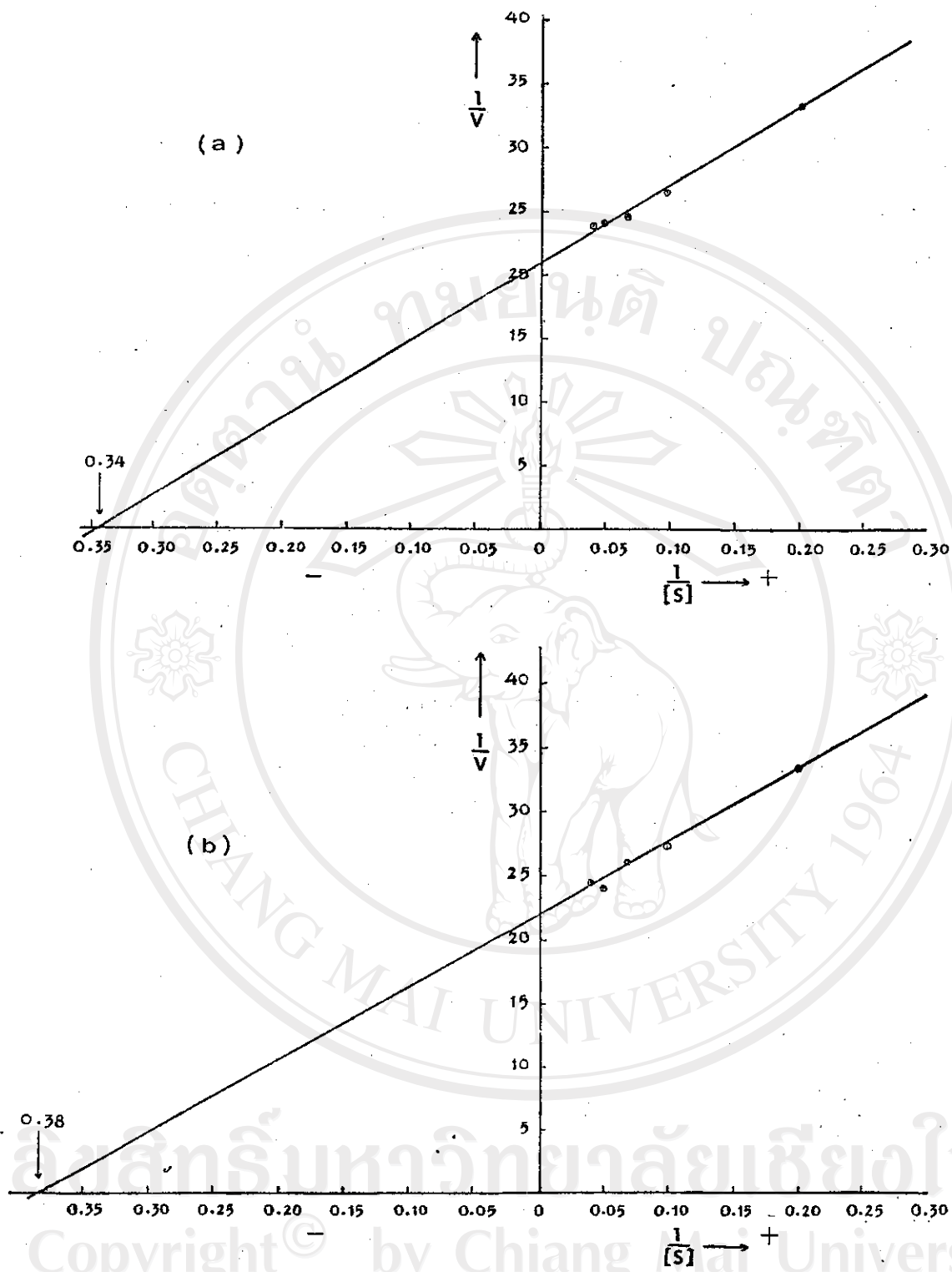
เมื่อทำ Line-weaver-Burk plots ตามตารางที่ 3.7 ให้ผลแสดงในรูปที่ 3.25 (a) และ (b)

ตารางที่ 3.7 แสดงค่า V และ $\frac{1}{V}$ ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ CMC

สับสเตรท	[S], mg/ml	$\frac{1}{[S]}$	เซลลูเลส I		เซลลูเลส II	
			V, $\mu\text{mole}/\text{min}$	$\frac{1}{V}$	V, $\mu\text{mole}/\text{min}$	$\frac{1}{V}$
2.5	25	0.04	0.042	23.8	0.041	24.4
2.0	20	0.05	0.042	23.8	0.042	23.8
1.5	15	0.067	0.041	24.4	0.039	25.6
1.0	10	0.1	0.039	25.6	0.037	27.0
0.5	5	0.2	0.030	33.3	0.031	32.2
0.25	2.5	0.4	0.030	33.3	0.030	33.3
0.1	1	1.0	0.018	55.6	0.030	33.3



รูปที่ 3.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง activity ของเอนไซม์เคลอูลเลส
กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ CMC
(a) ของเอนไซม์เคลอูลเลส I และ (b) ของเอนไซม์เคลอูลเลส II



รูปที่ 3.25 แสดง Line-weaver-Burk plots ระหว่าง $1/v$ กับ $1/[S]$

(a) ของเอ็นไซม์เซลล์ูเลส I และ

(b) ของเอ็นไซม์เซลล์ูเลส II

จากรูปที่ 3.25 (a) และ (b)

เอ็นไซม์เซลลูเลส I : Km มีค่า = 2.94 มก./มล.

$$V_{\max} = 0.048 \text{ } \mu\text{mole/min}$$

เอ็นไซม์เซลลูเลส II : Km มีค่า = 2.63 มก./มล.

$$V_{\max} = 0.046 \text{ } \mu\text{mole/min}$$

3.4.8 ผลของโลหะไอออนและ chelating compound ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ เซลลูเลส I และ II

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.8 ซึ่งผลปรากฏว่า โลหะไอออนส่วนมาก (10^{-3} M) มีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ทั้ง 2 form ยกเว้น Mn^{2+} (10^{-2} M), Co^{2+} (10^{-3} M) ซึ่งมีผลกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ทั้งสองให้เพิ่มขึ้นจากเดิม Ni^{2+} และ Mg^{2+} แทบจะไม่มีผลกระทบต่อ activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

เมื่อเติม EDTA (chelating compound) ความเข้มข้น 10^{-3} M , พบว่า activity ของเอ็นไซม์ลดลง 100% แสดงว่าในโมเลกุลเอ็นไซม์ส่วนที่เร่งปฏิกิริยาต้องมีโลหะไอออนอยู่ด้วย นอกจากนี้โมเลกุลของเอ็นไซม์ยังน่าจะมี SH group อยู่ใน active site เมื่อเติมโลหะหนัก : Ag^{2+} (10^{-2} M), Hg^{2+} (10^{-4} M) ลงไป activity ของเอ็นไซม์ลดลง 100% (สารละลายเอ็นไซม์เกิดตะกอนขาวขึ้น) โลหะหนักไปแทนที่ H ใน SH group เป็น En-S-Ag (หรือ Hg)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ตารางที่ 3.8 ผลของโลหะไอออนต่างๆ และ chelating compound ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

โลหะไอออนหรือ Chelating Compound	ความเข้มข้นของโลหะไอออน (final concentration) (M)	เซลลูเลส I % activity ที่เพิ่มขึ้น หรือ ลดลง	เซลลูเลส II % activity ที่เพิ่มขึ้น หรือ ลดลง
Mn^{2+}	10^{-2}	+50	+50
	10^{-3}	0	0
	10^{-4}	0	0
Mg^{2+}	10^{-2}	0	-50
	10^{-3}	0	0
	10^{-4}	0	0
Fe^{3+}	10^{-2}	-100	-100
	10^{-3}	-100	-52
	10^{-4}	-60	-29
Co^{2+}	10^{-2}	+52	+51
	10^{-3}	+40	+24
	10^{-4}	0	0
Cu^{2+}	10^{-2}	-100	-71.4
	10^{-3}	-50	-50
	10^{-4}	0	0
Ni^{2+}	10^{-2}	0	0
	10^{-3}	0	0
	10^{-4}	0	0
Ag^+	10^{-2}	-100	-100
	10^{-3}	-40	-78
	10^{-4}	0	0

ตารางที่ 3.8 (ต่อ)

โลหะไอออน หรือ Chelating Compound	ความเข้มข้นของโลหะไอออน (final concentration) (M)	เซลล์ทดสอบ I % activity ที่เพิ่มขึ้น หรือ ลดลง	เซลล์ทดสอบ II % activity ที่เพิ่มขึ้น หรือ ลดลง
Hg	10^{-2}	-100	-100
	10^{-3}	-100	-100
	10^{-4}	-100	-100
EDTA	10^{-2}	-100	-100
	10^{-3}	-100	-100
	10^{-4}	0	0
β -mercaptoethanol	10^{-2}	0	0
	10^{-3}	0	0
	10^{-4}	0	0

เครื่องหมาย + : เพิ่มขึ้น
- : ลดลง

3.4.9 ผลการศึกษาการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

3.4.9.1 การทำงานร่วมกันของเซลลูเลส I และ II ต่อ CMC ผลการทดลอง
แสดงดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 แสดงการทำงานร่วมกันของเซลลูเลส I และ II ต่อ CMC

เอ็นไซม์เซลลูเลส		activity (unit/ml)
1. เซลลูเลส I	0.32 ไมโครกรัม	3.0×10^{-3}
	0.64 ไมโครกรัม	6.7×10^{-3}
2. เซลลูเลส II	6.8 ไมโครกรัม	4.8×10^{-3}
	13.6 ไมโครกรัม	8.1×10^{-3}
3. I + II	6.92 ไมโครกรัม	8.1×10^{-3}

จากตารางที่ 3.9 จะเห็นได้ว่าเอ็นไซม์แต่ละ form เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอ็นไซม์เป็น 2 เท่า activity เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าด้วย แต่เมื่อ incubate เอ็นไซม์ผสม (I + II) กับ CMC พบว่า activity ของเอ็นไซม์ผสมมีค่า=activity ของเอ็นไซม์แต่ละ form รวมกัน ซึ่งไม่เป็นแบบ Synergistic action ที่ว่า activity ของเอ็นไซม์ผสมต้องมีค่าสูงกว่า activity ของเอ็นไซม์แต่ละ form รวมกัน

3.4.9.2 การทำงานร่วมกันของเซลลูเลส I และ II ต่อกระดาษกรอง

เมื่อ incubate เอ็นไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดกับกระดาษกรองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันโดยไม่มีการเขย่า พบว่าไม่เกิดการย่อยสลายกระดาษกรองเลย แต่เมื่อใช้สารละลายเอ็นไซม์ผสม (I + II) พบว่ามีเส้นใยอิสระเกิดขึ้น และสังเกตเห็นน้ำตาลในรูปกลูโคสจากการวัดโดย DNS-method แสดงว่าเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II มีแนวโน้มที่จะทำงานร่วมกันในการย่อยสลายกระดาษกรอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

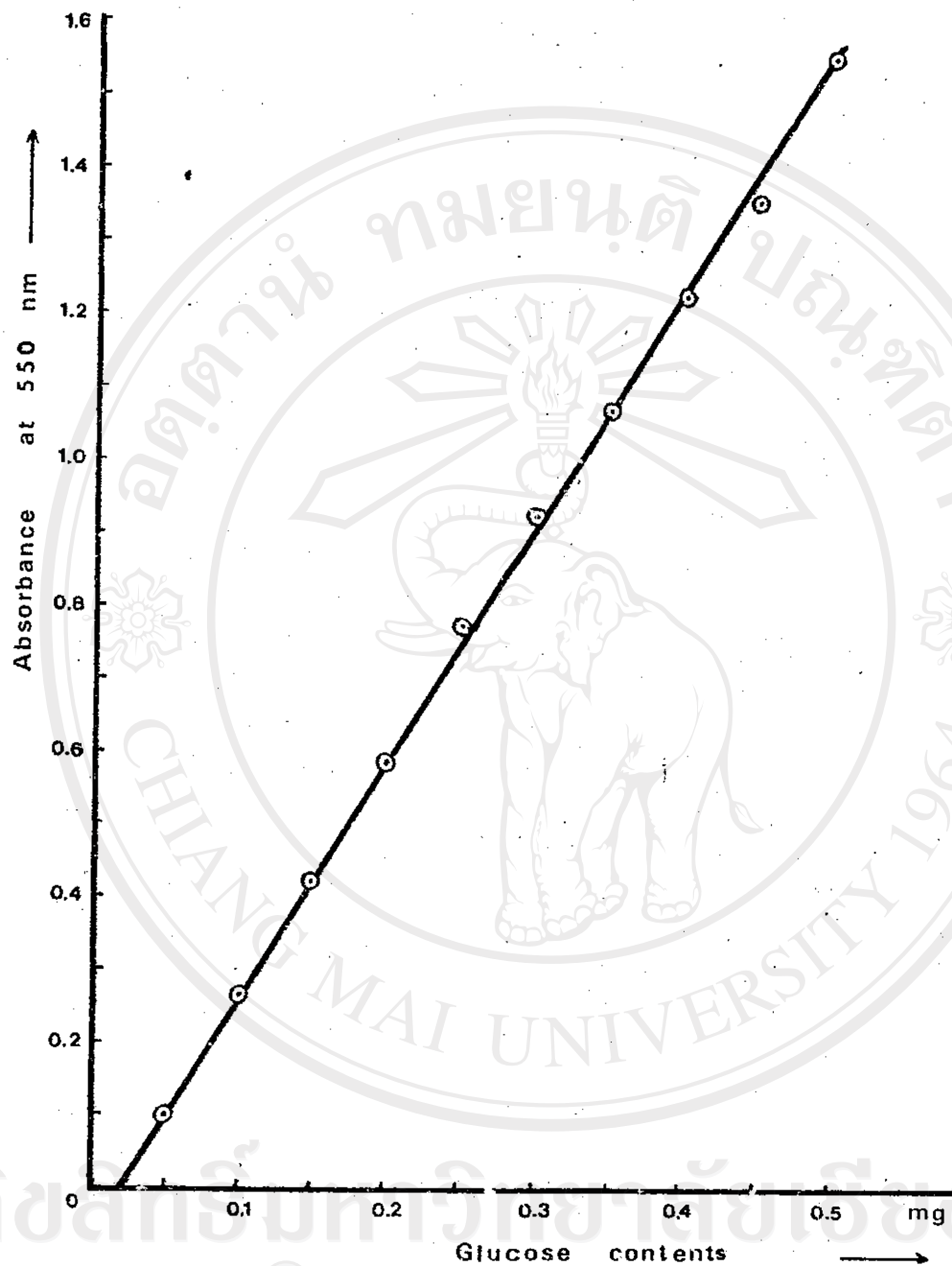
Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

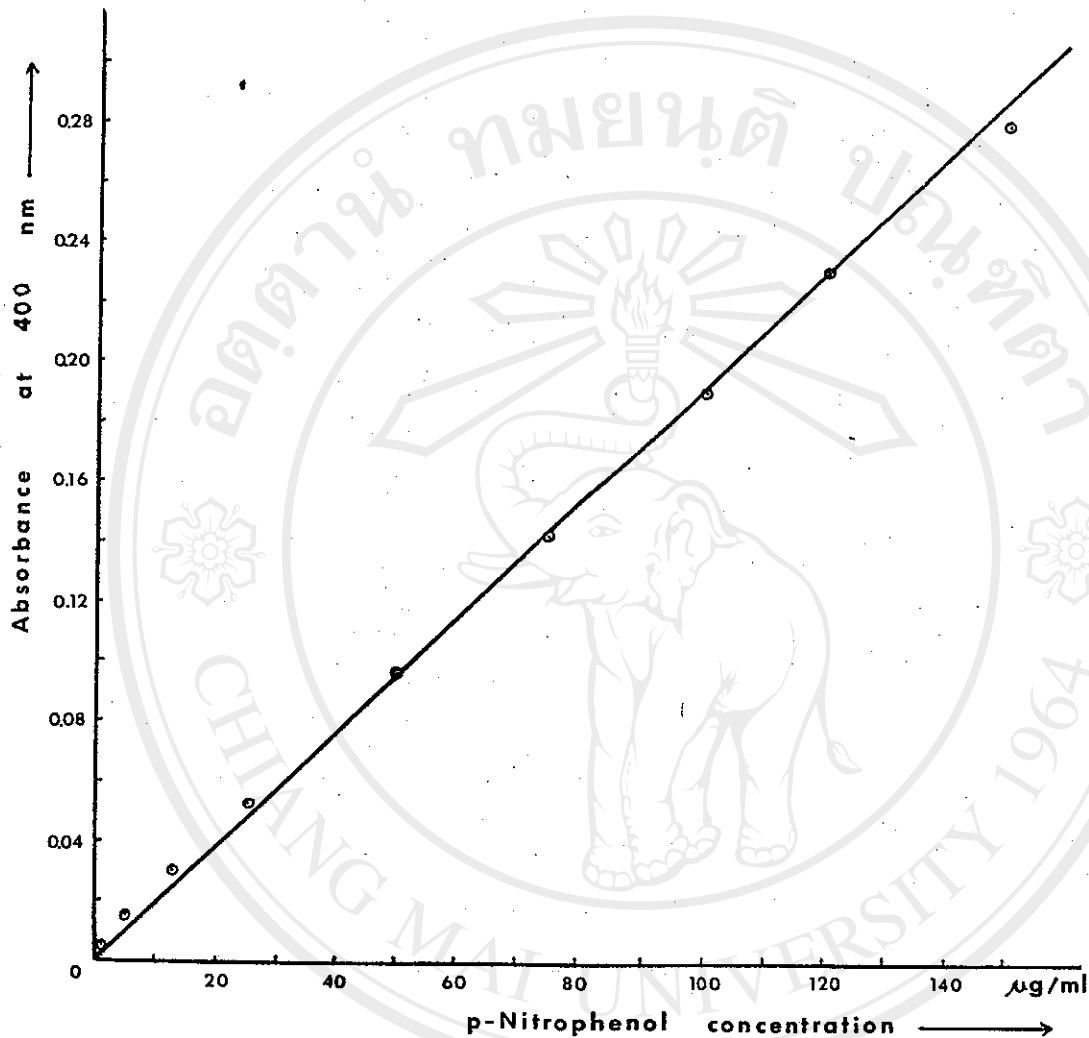
สรุป สมบัติทางประการของเอ็นไซม์เซลดูลีส I และ II ได้ดังตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 แสดงสมบัติทางประการของเซลดูลีส I และ II ที่เตรียมได้

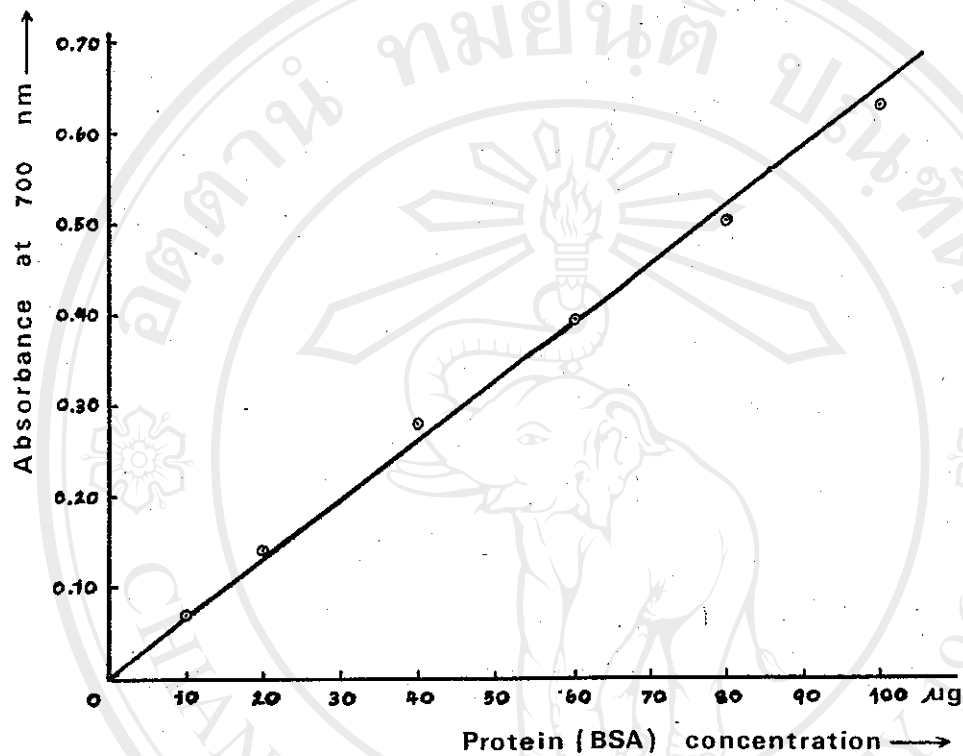
	เซลดูลีส I	เซลดูลีส II
มวลโมเลกุล, subunits	232,000 tetramer	138,000 dimer
pH ที่เหมาะสมที่สุดในการทำงาน	4.0-6.0	4.0
ความคงทนต่อ pH (15 ชม, 18° ซ)	≤ 6.0	≤ 6.0
อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงาน (° ซ.)	45	50
ความทนทานต่ออุณหภูมิ (° ซ.) (10 นาที)	≤ 50, completely inactivated at 65°C	≤ 50, completely inactivated at 65°C
K_m (มก./มล.)	2.9	2.6
V_{max} (μ mole/min)	0.048	0.046
ผลของโลหะไอออน (2 นาที)	ถูกยับยั้งโดย Ag^+ , Hg^{2+} , Fe^{3+} และ Cu^{2+} ถูกกระตุ้นโดย Mn^{2+} และ Co^{2+}	ถูกยับยั้งโดย Ag^+ , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} และ Mg^{2+} ถูกกระตุ้นโดย Mn^{2+} และ Co^{2+}



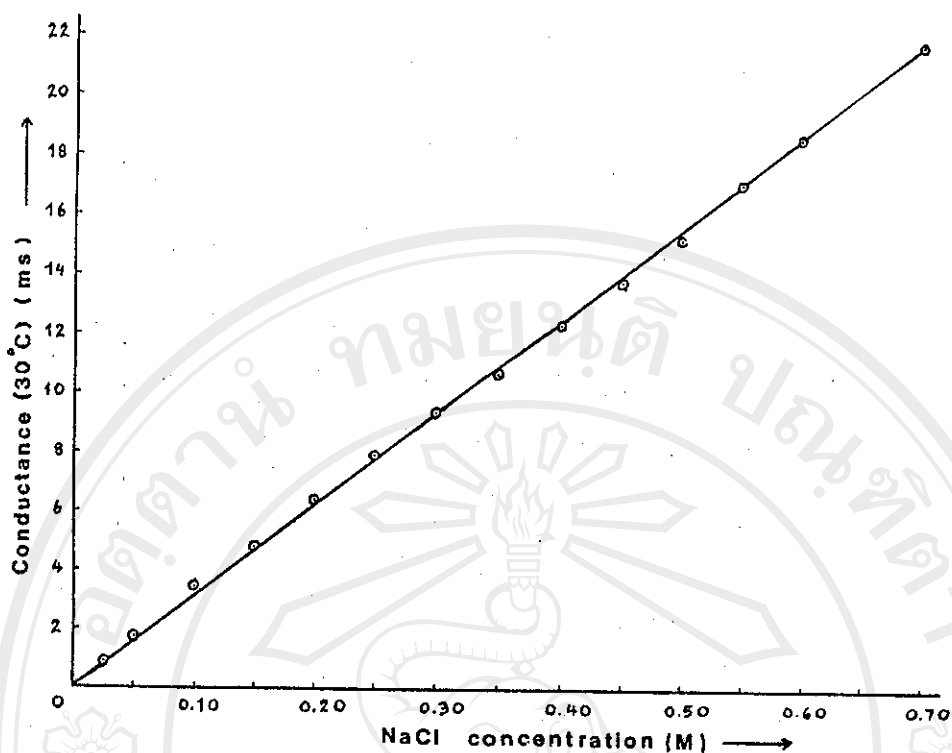
รูปที่ 3.26 แสดง standard curve สำหรับหาปริมาณน้ำตาลในรูปกลูโคส
โดย Dinitrosalicylic acid reagent method(DNS-method)



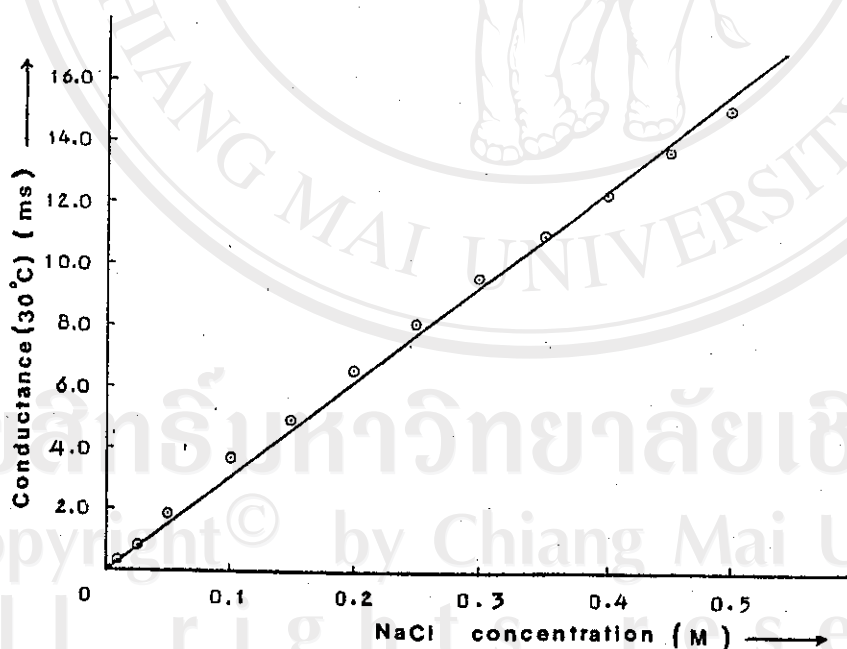
รูปที่ 3.27 แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณ p-nitrophenol
ที่เกิดขึ้น (β-glucosidase activity assay)



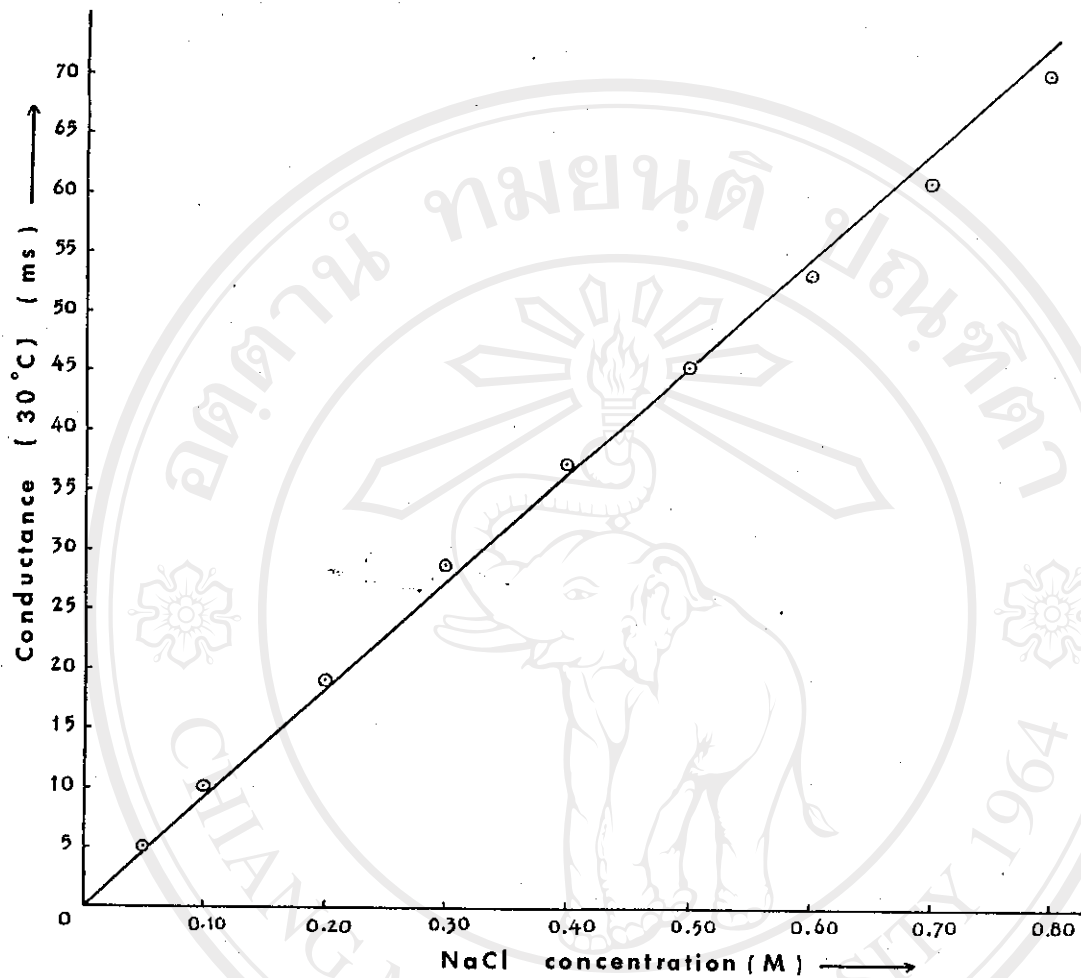
รูปที่ 3.28 แสดง standard curve สำหรับหาปริมาณโปรตีน
โดย Modified-Lowry method



รูปที่ 3.29 แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณ NaCl เมื่อใช้ 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 เป็นตัวทำละลาย



รูปที่ 3.30 แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณ NaCl เมื่อใช้ 0.05 M sodium citrate buffer pH 5.8 เป็นตัวทำละลาย



รูปที่ 3.31 แสดง standard curve สำหรับหาปริมาณ NaCl เมื่อใช้

25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 เป็นตัวทำละลาย