บทที่ 4

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสโดยใช้ solid culture นั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมหลายประการ ที่สำคัญคือ ความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรทและอุณหภูมิ ซึ่งรายงานโดย Wijeyaratne และคณะ (1979)[58] จากการศึกษาการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจาก T.viride QM 9414 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นอาหาร สำหรับงานวิจัยนี้ก็ได้ทำการหาเงื่อนไขต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจาก T.viride TISTR 3161 โดยการแปรเปลี่ยนชนิดของอาหาร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เหลือใช้จากการเกษตร (รำข้าว, ฟางข้าว), ทางอุตสาหกรรม (เปลือกเมล็ดถั่วเหลืองจากโรงงานทำซีอิ๊วและขี้เลื่อย) ตลอดจนไมยราบยักษ์ซึ่งเป็นพืชที่มีเป็นจำนวนมากในภาคเหนือและไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ แปรเปลี่ยนปริมาณน้ำที่ใส่ครั้งแรก ระยะเวลาการเลี้ยงรา และสารที่ใช้สกัดเอ็นไซม์ เพื่อให้ได้ปริมาณเอ็นไซม์สูงที่สุด จากผลการทดลองพบว่ารำข้าวและฟางข้าวในอัตราส่วน 9 : 1 เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในระยะเวลา 2 วัน ณ อุณหภูมิ 27 °ซ. อัตราส่วนของอาหาร : ปริมาณน้ำที่ใส่คือ 1 : 1 โดยที่สกัดด้วยสารละลาย 0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เนื่องจากเอ็นไซม์เซลลูเลสที่ราผลิตขึ้นภายในเซลแล้วถูกขับออกนอกเซล บางส่วนจะจับกับเส้นใยเซลลูโลส[44] หรือเส้นใยของรา สารละลายเกลือจะสามารถชะเอาเอ็นไซม์เซลลูเลสส่วนนี้ออกมาได้ดีกว่ากรณีที่ใช้บัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวสกัด ส่วน Tween-80 ก็สามารถสกัดเอ็นไซม์ออกมาได้มากกว่าเช่นกัน ซึ่งจากการทดลองสารทั้งสองให้ activity ของเซลลูเลสใกล้เคียงกันและมากกว่ากรณีที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ประมาณ 1.5 เท่า ผลการทดลองนี้ตรงกับกรณี T.viride QM 6a จากการศึกษาผลของ Tween-80 ต่อการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสโดย Reese และ Maguire (1969)[59] ซึ่งได้เสนอว่า Tween-80 มีผลต่อ cell permeability โดยจะไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กระตุ้นให้เซลเมมเบรนปลดปล่อยเอ็นไซม์ออกมา

เมื่อมีการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสบนรำข้าวและฟางข้าวในเวลา 2 วันได้ activity ของเอ็นไซม์สูงสุดแล้ว พบว่า activity ของเอ็นไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วในวันต่อ ๆ มา (รูปที่ 3.1) การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในระบบมีการผลิต proteolytic enzyme ขึ้น ซึ่ง Wijeyaratne และคณะ[58] พบว่าในการเลี้ยง _T. viride_ QM 9414 บนรำข้าวสาลีเมื่อ activity ของเอ็นไซม์ protease เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ activity ของเซลลูเลสลดลงทันที เอ็นไซม์ protease ที่มีอยู่นี้สามารถกำจัดออกได้โดยการทำ heat treatment (ที่อุณหภูมิ 60-70 °ซ. ระยะเวลาสั้น ๆ) หลังจากสกัดเอ็นไซม์ออกมา เนื่องจากเซลลูเลสค่อนข้างทนต่อความร้อนเมื่อเทียบกับ protease จึงมีการสูญเสีย activity ของเซลลูเลสเพียงเล็กน้อย

การที่ activity ของเซลลูเลสลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 2 ของการเลี้ยงอาจจะเนื่องมาจากว่าในระบบมีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก น้ำตาลกลูโคสนี้จะไปยับยั้งมิให้เชื้อราผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสออกมาในปริมาณเช่นเดิม ซึ่งจากการศึกษา glucose repression ใน _T. viride_ โดย Nisizawa และคณะ[30,45] ก็พบว่ากลูโคสมีผลทำให้รามีการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสลดลง โดยที่กลูโคสไปยับยั้งมิให้เกิดการสร้างเซลลูเลสโปรตีนขึ้น และจากการศึกษาโดย Chimanage P. และคณะ[60] ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสโดย _T. viride_ พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นอาหารจะสังเกตไม่พบ activity ของเซลลูเลสเลย เนื่องจากราสามารถใช้กลูโคสเป็นอาหารโดยตรงไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์เอ็นไซม์เซลลูเลสขึ้นมา

สำหรับฟางข้าว เนื่องจากประกอบด้วย hemicelluloses เช่น xylan เป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง polysaccharides เหล่านี้ทนทานต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ การที่จะนำมาใช้ประโยชน์ได้ก็ต้องมีการทำ pretreatment วิธีการทำ pretreatment นั้น มีทั้งวิธีการทางฟิสิกส์และเคมี เช่น การบด (milling) และอบด้วยความร้อน (heat treatment), การ treat ด้วยสารเคมีต่าง ๆ เช่น การแช่หรือต้มใน NaOH, $Ca(OH)_2$, $NaClO_2$ และสารละลายแอมโมเนีย เป็นต้น[๗] วิธีการทำอาจใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีดังกล่าวทั้งหมดเพื่อให้ได้ฟางข้าวที่มีเฉพาะเส้นใยเซลลูโลสตามต้องการ Kinoshita และคณะ (1981)[62] ได้รายงานว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสลายฟางข้าวที่ผ่านการแช่ในด่าง 1 N NaOH และ autoclaved ที่ 121°ซ. (hot-alkali-treated straw) ให้ reducing sugar ออกมาในปริมาณมากกว่ากรณีฟางข้าวที่ไม่ได้ผ่าน pre-treatment ส่วนลำต้น 13 เท่า และส่วนใบ 9 เท่า ดังนั้นไมยราบยักษ์ก็น่าจะผ่านขบวนการ pretreatment เหล่านี้เพื่อกำจัด hemicelluloses ต่าง ๆ ออกและยังควรกำจัดลิกนินที่มีอยู่โดยการ treat ด้วย 1 % sodium chlorite[62] อีกด้วย

จากการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา Trichoderma viride TISTR 3161 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นในระดับปริมาณมากพบว่า crude enzyme ซึ่งเมื่อนำมาผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column chromatography โดยใช้สภาวะต่างกันคือ ในสภาวะที่เป็นกรด (0.05 M citrate buffer pH 4.8) จะให้เซลลูเลส I และในสภาวะที่เป็นด่าง (25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5) ให้เซลลูเลส II เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดย gel filtration ด้วย Sephadex G-100 และSephadex G-200 พบว่าได้เอ็นไซม์เซลลูเลส I บริสุทธิ์เป็น 23.4 เท่าและเซลลูเลส II บริสุทธิ์เป็น 20.9 เท่า เอ็นไซม์ทั้งสองต่างให้โปรตีน 1 แถบ จากการทำ polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งเมื่อหามวลโมเลกุลโดย molecular-sieve chromatography บน Sepharose 6B พบว่าเซลลูเลส I มีมวลโมเลกุลประมาณ 232,000 และเซลลูเลส II ประมาณ 138,000 และจากการทำ SDS-polyacrylamide-gel-disc electrophoresis ของเอ็นไซม์ทั้งสองต่างให้โปรตีน 2 แถบ ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 63,000 และ 55,000 สำหรับกรณีเซลลูเลส I และ 61,000 และ 56,300 สำหรับเซลลูเลส II ดังนั้นโมเลกุลเซลลูเลส I น่าจะประกอบด้วย 4 subunits (เป็น tetramer) โดยที่มี 2 subunits ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 63,000 และอีก 2 subunits ประมาณ 55,000 ส่วนเซลลูเลส II ประกอบด้วย 2 subunits ที่มีมวลโมเลกุลเท่า ๆ กัน (~ 60,000) เป็น dimer นอกจากนี้ยังพบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เอ็นไซม์ทั้ง 2 form มี activity ต่อ CMC, FP และ p-nitrophenol-β-D-glucoside (pNPG) นั่นคือต่างมี β-glucosidase activity อยู่ในตัวเองโดยที่มี activity ต่อ CMC สูงกว่า activity ต่อ pNPG ซึ่งคล้ายคลึงกับเอ็นไซม์เซลลูเลส C_1 จาก Aspergillus species สายพันธุ์ 26p57 ซึ่งเป็น Thermophilic fungus เลี้ยงบนรำข้าวสาลี[63] เซลลูเลส C_1 มีมวลโมเลกุลเป็น 130,000 มี activity ต่อ CMC สูงกว่า activity ต่อ pNPG สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราอื่น ๆ ก็มีมวลโมเลกุลแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดหรือสายพันธุ์ของราหรือจุลินทรีย์อื่น ๆ ตลอดจนสภาวะและเงื่อนไขของการเลี้ยง เช่น เซลลูเลส III (Less-Random type) จาก T.viride มีมวลโมเลกุล 45000[64] เซลลูเลส T_1 จาก S.pulverulentum มีมวลโมเลกุลประมาณ 32,300[65] นอกจากนี้การหามวลโมเลกุลโดยวิธีต่างกันก็ให้ผลที่แตกต่างกันได้โดยเฉพาะกรณีที่เอ็นไซม์เซลลูเลส form นั้นเป็น glycoprotein เช่น จากการหามวลโมเลกุลเซลลูเลส C_2 จาก Sporotrichum cellulophilum โดยวิธี Sephadex G-200 column chromatography ได้ 50,000 แต่เมื่อใช้วิธี equilibrium centrifugation พบว่ามีค่าเป็น 70,000 การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากส่วนน้ำตาลในโมเลกุลเอ็นไซม์จึงทำให้หาค่ามวลโมเลกุลคลาดเคลื่อนกันไป[66]

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 form พบว่าระยะ incubate ระหว่างเอ็นไซม์กับสับสเตรท (CMC) เป็นเวลา 30 นาที ให้ปริมาณกลูโคสสูงสุดคือ 1.28 μmole สำหรับเซลลูเลส I และ 1.17 μmole สำหรับเซลลูเลส II เมื่อทำการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเอ็นไซม์ ปรากฏว่าได้ความสัมพันธ์ระหว่าง Cm-cellulase activity กับความเข้มข้นของเอ็นไซม์เป็นเส้นตรงจนกระทั่งถึงค่าปริมาณโปรตีนเป็น 0.48 ไมโครกรัม สำหรับเซลลูเลส I และ 6.88 ไมโครกรัม สำหรับเซลลูเลส II การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นเอ็นไซม์สูง ๆ โมเลกุลเอ็นไซม์เกิดการจับกันทำให้ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ดังเดิม ผลการทดลองเช่นนี้ตรงกับที่พบโดย Mandels, Andreotti และ Roche (1976)[49] กรณี T.viride และ Garg และ Neelakantan (1982)[67] กรณี Aspergillus terreus GN 1

เอ็นไซม์เซลลูเลส I มีความว่องไวในการทำงานมากกว่าเซลลูเลส II (พิจารณาจากค่า Km และ Vmax รูปที่ 3.24 และ 3.25) และทำงานได้ดีในช่วง pH ที่กว้าง (4.0-6.0) กว่ากรณีเซลลูเลส II ซึ่งทำงานได้ดี ณ pH 4.0 เท่านั้น (รูปที่ 3.22) แต่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานใกล้เคียงกันคือ 45° ซ. สำหรับเซลลูเลส I และ 50° ซ. สำหรับเซลลูเลส II (ดังรูปที่ 3.20) และคงทนต่อ pH (15 ชั่วโมง 18° ซ.) ในช่วง 2.5-6.0 เช่นเดียวกัน (รูปที่ 3.23) นอกจากนี้เอ็นไซม์ทั้งสองต่างทนต่อความร้อนจนถึง 50° ซ. ณ อุณหภูมิสูงกว่า 50° ซ. เป็นต้นไป activity ของเซลลูเลสจะลดลงจนกระทั่งถูก inactivate โดยสมบูรณ์เมื่อ incubate ที่ 65° ซ. เป็นเวลา 10 นาที (รูปที่ 3.21)

ในการศึกษาผลของโลหะอิออนต่อการทำงานของเอ็นไซม์พบว่า โลหะอิออน ส่วนมากมีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ทั้งสองชนิด เมื่อใช้ CMC เป็นสับสเตรท ได้แก่ Cu^{2+} (10^{-3}M), Fe^{3+} (10^{-4} M), Ag^{+} (10^{-3} M) และ Hg^{2+} (10^{-4} M) โดยเฉพาะโลหะอิออน 2 ตัว หลังมีผลทำให้เอ็นไซม์ตกตะกอน เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในโมเลกุล ผลการทดลองนี้ตรงกับกรณีเอ็นไซม์เซลลูเลสจาก Aspergillus niger GN 1[67] ซึ่ง Cu^{2+} (10^{-2} M), Fe^{3+} (10^{-2} M), Ag^{+} (10^{-2} M) และ Hg^{2+} (10^{-3} M) มีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ นอกจากนี้ยังคล้ายคลึงกับกรณีเซลลูเลส II จาก T.viride ซึ่ง Okada (1976)[64] พบว่าการทำงานของเซลลูเลส III นี้ถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ด้วย Hg^{2+} (10^{-3} M) และถูกยับยั้งบางส่วนด้วย Ag^{+} (10^{-3} M) และ Cu^{2+} (10^{-3} M) เมื่อพิจารณาถึงผลของ β-mercaptoethanol พบว่าไม่มีผลต่อการทำงานของเซลลูเลสทั้งสอง form เลย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิดนั้นยังต้องการโลหะอิออน ดังพิจารณาได้จากการที่เมื่อ incubate เอ็นไซม์กับ Mn^{2+} (10^{-2} M) หรือกับ Co^{2+} (10^{-2} M) 2 นาที พบว่า activity ของเอ็นไซม์แต่ละ form เพิ่มขึ้นจากเดิมถึง 50 % ผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับกรณีของเอ็นไซม์เซลลูเลสจาก Aspergillus terreus GN1 ซึ่ง Garg และ Neelakantan (67) พบว่า Mn^{2+} (10^{-2} M) กระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ต่อ CMC และเมื่อพิจารณาถึงกรณีที่เอ็นไซม์เซลลูเลสแต่ละ form ถูก inactivated โดยสมบูรณ์ เมื่อ incubate กับ EDTA (10^{-3} M) ซึ่งเป็น chelating agent เป็นเวลา 2 นาที แสดงว่าเซลลูเลส I และ II ต่างต้องการโลหะอิออนบางตัวช่วยในการทำงาน ดังนั้นในการวัด activity ของเอ็นไซม์แต่ละ form ควรที่จะเติมโลหะอิออนคือ Mn^{2+} (10^{-2} M) หรือ Co^{2+} (10^{-2} M) ลงไปด้วย จะทำให้สามารถวัดการทำงานของเอ็นไซม์ได้ดีขึ้น

ในการศึกษา Synergistic action ของเอ็นไซม์เซลลูเลสนิยมใช้สับสเตรทที่มี crystallinity สูง ๆ เช่น Avicel กระดาษกรองและสำลีเป็นต้น เนื่องจาก activity ของเซลลูเลสแต่ละ form ต่อสับสเตรทมีค่าเกือบเป็น 0 หรือ = 0 ทำให้สามารถทราบถึงการทำงานของเซลลูเลส 2 form ได้ง่าย(1) ในกรณีที่ใช้ CMC จากการทดลองจะเห็นว่าการทำงานของเซลลูเลส I + II ต่อ CMC ไม่ต่างไปจากกรณีของเซลลูเลสแต่ละ form นัก แต่เมื่อใช้กระดาษกรองเป็นสับสเตรทพบว่าเซลลูเลส I + II สามารถย่อยสลายกระดาษกรองได้ เมื่อ incubate ณ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่ไม่พบ activity ในกรณีเอ็นไซม์แต่ละ form ที่ incubate กับกระดาษกรอง ณ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน สรุปได้ว่าเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II น่าจะสามารถทำงานร่วมกันในการย่อยสลายสับสเตรท

จากการศึกษาสมบัติเอ็นไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นนี้เป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำเอ็นไซม์ไปใช้ประโยชน์ต่อไป และในการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น ย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสที่เหลือใช้จากการเกษตร อุตสาหกรรมและขยะไปเป็นน้ำตาลกลูโคส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอลกอฮอล์และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ นั้นต้องมีการศึกษาสมบัติโดยละเอียดต่าง ๆ ของเอ็นไซม์อีก ได้แก่ ชนิดและลำดับการเรียงตัวของกรดอมิโนในโมเลกุล ความสามารถของเซลลูเลสทั้ง 2 form นี้ในการย่อยสลายสับสเตรทต่าง ๆ นอกเหนือจาก CMC และ FP นั้นคือศึกษา substrate specificity และกลไกการทำงานของเซลลูเลสสับสเตรทต่าง ๆ ที่ใช้กันได้แก่ Cellooligosaccharides ต่างๆ (เช่น cellotriose, C_3, cellohexaose, C_6 เป็นต้น), laminarin, glucan (จากยีสต์, บาร์เลย์) mannan, cellodextrin, CM-pachyman เป็นต้น(68) จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้สามารถจัดประเภทของเซลลูเลสแต่ละองค์ประกอบได้ว่าเป็น exoglucanase หรือ endoglucanase และทราบถึงกลไกการย่อยสลายเซลลูโลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved