สารบาญ

	หน้า
คำขอบคุณ	ค
บทคัดย่อ	ง
รายการตารางประกอบ	ฑ
รายการภาพประกอบ	ณ
รายการอักษรย่อ	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 เซลลูโลสและวัตถุดิบเซลลูโลส (Cellulose and Cellulosic raw materials)	3
1.2 การย่อยสลายโดยใช้เอ็นไซม์ (Enzymic hydrolysis)	6
1.3 เอ็นไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์	7
1.4 วิธีการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส	9
1.5 การวัดการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส	12
1.6 การทำให้เอ็นไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ (Purification of Cellulase)	13
1.7 กลไกการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส (Mode of action of cellulase)	13
1.8 การสังเคราะห์เอ็นไซม์เซลลูเลสและการปลดปล่อยออกจากเซล	23
1.9 การนำเอ็นไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์	25
1.10 วัตถุประสงค์ของการทดลอง	25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

บทที่ 2 การทดลอง

2.1 เครื่องมือ 28

2.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้ 29

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การ assay activity ของเอ็นไซม์และ 33
การหาปริมาณโปรตีน

2.3.1.1 วิธีการ assay activity 33
เอ็นไซม์เซลลูเลส

2.3.1.2 วิธีการ assay activity 35
เอ็นไซม์ β-glucosidase

2.3.1.3 การหาปริมาณโปรตีน 36

2.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส
จากเชื้อรา Trichoderma vivide สายพันธุ์
TISTR 3161

2.3.2.1 เปลี่ยนแปรชนิดของอาหารและเวลาที่ใช้ 37
เลี้ยงเชื้อรา

2.3.2.2 เปลี่ยนแปรปริมาณน้ำ (ความชื้น) 38

2.3.2.3 เปลี่ยนแปรสารที่ใช้สกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส 38

2.3.2.4 เปลี่ยนแปรเวลาที่ใช้ในการสกัด 39

2.3.3 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสในปริมาณมาก 39

2.3.4 การทำให้เอ็นไซม์เซลลูเลส I บริสุทธิ์

2.3.4.1 การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 40

2.3.4.2 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ 41
โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

2.3.4.3 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-100 column 43

2.3.4.4 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 อีกครั้ง 44

2.3.4.5 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-200 column 45

2.3.5 การเตรียมและการทำให้เอ็นไซม์เซลลูเลส II บริสุทธิ์

2.3.5.1 การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 46

2.3.5.2 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column 46

2.3.5.3 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-100 column 47

2.3.5.4 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-200 column 47

2.3.6 สรุปการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 48

2.3.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลส ทั้ง 2 form

2.3.7.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลส (I และ II) โดย polyacrylamide-disc-gel electrophoresis 50

2.3.7.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II โดย SDS-polyacrylamide-disc-gel electrophoresis 53

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

2.3.8 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอ็นไซม์เซลลูเลสที่เตรียมได้

2.3.8.1 การหามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 56

2.3.8.2 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II โดย Phenol-sulfuric method 58

2.3.8.3 การศึกษาผลของ incubation time ต่อ activity เอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 60

2.3.8.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นเอ็นไซม์ต่อ activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 60

2.3.8.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 61

2.3.8.6 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 62

2.3.8.7 การหาค่า K_m และ V_{max} ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 63

2.3.8.8 การศึกษาผลของโลหะอิออนและ chelating compound ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 64

2.3.8.9 การศึกษาการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 65

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

บทที่ 3 ผลการทดลอง

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส จากรา Trichoderma viride TISTR 3161

3.1.1 ชนิดของอาหารและเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา 66

3.1.2 ปริมาณน้ำที่เหมาะสม 68

3.1.3 ผลการเปลี่ยนแปรสารที่ใช้สกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส 69

3.1.4 เวลาที่ใช้ในการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส 71

3.2 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II และการทำให้บริสุทธิ์

3.2.1 การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 74

3.2.2 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column 75

3.2.3 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-100 column 77

3.2.4 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column อีกครั้ง 77

3.2.5 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-200 column 80

3.2.6 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส II ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column 82

3.2.7 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส II ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-100 column 84

3.2.8 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส II ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Sephadex G-200 column 86

3.2.9 สรุปผลของการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 88

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

3.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 89

3.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

3.4.1 ผลการหามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 91

3.4.2 ผลการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 97

3.4.3 ผลของ incubation time ต่อ activity เอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 99

3.4.4 ผลของความเข้มข้นเอ็นไซม์ต่อ activity เอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 99

3.4.5 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 102

3.4.6 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 102

3.4.7 ผลการหาค่า K_m และ V_{max} ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 105

3.4.8 ผลของโลหะอิออนและchelating compound ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 108

3.4.9 ผลการศึกษาการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II 111

บทที่ 4 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 119

เอกสารอ้างอิง 126

ประวัติการศึกษา 132

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.1	แสดงตัวอย่างของวัสดุเหลือใช้จากเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมทางการเกษตร	1
1.2	ตัวอย่างวัสดุเซลลูโลสเหลือใช้และการใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน	2
1.3	แสดงเปอร์เซนต์ของเซลลูโลสในสารประกอบต่าง ๆ ที่มีในธรรมชาติ และที่ได้จากการเกษตรและอุตสาหกรรม	5
1.4	แสดงตัวอย่างของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส	8
1.5	แสดงชนิดของเอ็นไซม์เซลลูเลส สับสเตรทที่ใช้ ผลผลิตที่ได้ และวิธีการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นไซม์	14
1.6	ตัวอย่างของการนำเอ็นไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์	27
2.1	แสดงปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ใช้เพื่อให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวแตกต่างกัน	40
2.2	วิธีการทดลองหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	59
3.1	แสดงผลของการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสด้วยสารชนิดต่าง ๆ	69
3.2	ผลของการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I จากเชื้อรา *Trichoderma viride* สายพันธุ์ TISTR 3161	88
3.3	ผลของการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส II จากเชื้อรา *Trichoderma viride* สายพันธุ์ TISTR 3161	89
3.4	แสดงผลการหามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้งสองโดยใช้ Sepharose 6B column	94
3.5	แสดงผลการหามวลโมเลกุลของ subunits ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	96

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่		หน้า
3.6	แสดงผลการทดลองหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ที่เตรียมได้	97
3.7	แสดงค่า v และ $\frac{1}{v}$ ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ CMC	105
3.8	ผลของโลหะอิออนต่าง ๆ และ chelating compound ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	109
3.9	แสดงการทำงานร่วมกันของเซลลูเลส I และ II ต่อ CMC	111
3.10	แสดงสมบัติบางประการของเซลลูเลส I และ II ที่เตรียมได้	113

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงสูตรโครงสร้างของเซลลูโลส	4
1.2	Alignment and composition of elementary fibrils of cellulose	4
1.3	Fractionation of Trichoderma viride cellulase	17
1.4	แสดงกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดย endoglucanase และ exoglucanase แบบ synergistic action	20
1.5	Reese's Modified Concept (1977)	21
1.6	Enzyme mechanisms for cellulose degradation and their extracellular regulation in S. pulverulentum	20
2.1	แสดงขั้นตอนทั้งหมดในการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	49
3.1	แสดงผลของอาหารชนิดต่าง ๆ และเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา Trichoderma viride ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส	67
3.2	ผลของปริมาณน้ำในอาหารที่มีต่อการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส โดย Trichoderma viride	68
3.3	แสดงผลของการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสจากอาหาร (รำข้าว+ฟางข้าว, เปลือกเมล็ดถั่วเหลืองและไมยราบยักษ์ส่วนกิ่ง+ใบ) ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 และ 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดียวกัน	70
3.4	แสดงปริมาณของเอ็นไซม์เซลลูเลสที่สกัดได้เมื่อแช่ใน 0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน	72

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่		หน้า
3.5	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและ activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นอิ่มตัวต่าง ๆ กันของ $(NH_4)_2SO_4$	74
3.6	Ion-exchange Chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of crude enzyme after $(NH_4)_2SO_4$ precipitation	76
3.7	Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-100 of the fractions from DEAE-Sephadex chromatography	78
3.8	Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of the fractions from Sephadex G-100 chromatography	79
3.9	Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-200 of the fractions from DEAE-Sephadex A-50 chromatography	81
3.10	Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of crude extract from $(NH_4)_2SO_4$ precipitation	83
3.11	Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-100 of the fraction IV from DEAE-Sephadex A-50 chromatography	85
3.12	Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-200 of the fraction IV : E from Sephadex G-100 chromatography	87
3.13	แสดงผลของ polyacrylamide gel electrophoresis,(a),(b) และผลของ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis,(c),(d)	90
3.14	แสดงการหา elution volume (V_o) ที่ผ่าน Sepharose 6B column ของ protein markers, เอ็นไซม์เซลลูเลส I และII	92

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่		หน้า
3.15	แสดง Standard curve ที่ใช้หามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II โดยใช้ Sepharose 6B column chromatography	93
3.16	แสดง Standard curve ที่ใช้หามวลโมเลกุลของ subunits ของเซลลูเลส I และ II โดย SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	95
3.17	แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	98
3.18	แสดงผลของ incubation time ต่อ activity ของเอ็นไซม์	100
3.19	แสดงผลของความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อ activity ของเอ็นไซม์	101
3.20	แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	103
3.21	แสดงความทนทานต่ออุณหภูมิของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	103
3.22	แสดง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	104
3.24	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสกับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ CMC	106
3.25	แสดง Line-weavber-Burk plots ระหว่าง $\frac{1}{V}$ กับ $\frac{1}{[S]}$ ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II	107
3.26	แสดง standard curve สำหรับหาปริมาณน้ำตาลในรูปกลูโคสโดย Dinitrosalicylic acid reagent method	114
3.27	แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้น (β-glucosidase activity assay)	115

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่		หน้า
3.28	แสดง standard curve สำหรับหาปริมาณโปรตีนโดย Modified Lowry method	116
3.29	แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณ NaCl เมื่อใช้ 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 เป็นตัวทำละลาย	117
3.30	แสดง standard curve สำหรับใช้หาปริมาณ NaCl เมื่อใช้ 0.05 M sodium citrate buffer pH 5.8 เป็นตัวทำละลาย	117
3.31	แสดง standard curve สำหรับหาปริมาณ NaCl เมื่อใช้ 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 เป็นตัวทำละลาย	118

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการอักษรย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	ชั่วโมง
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
mg.	=	milligram
µg.	=	microgram
ml.	=	milliliter
M	=	molar
mM	=	millimolar
MW	=	molecular weight
nm	=	nanometer
A_{280}	=	absorbance at 280 nanometer
O.D.	=	optical density
min.	=	minute
hr.	=	hour
CMC	=	carboxymethyl cellulose
Cm-cellulase	=	carboxymethyl cellulase
FP	=	filter paper
FP_{ase}	=	filter paperase
pNPG	=	p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside
BSA	=	Bovine serum albumin
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved