การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275

Purification and Properties of Cellulase and Xylanase from *Aspergillus niger* ATCC 6275

สมรักษ์ พันธ์ผล

Somrak Panphon

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2537

เลขหมู่ QK 898.E58 ส44 2537 ก.2

Bib Key 63583

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275
ผู้เขียน	นางสาวสมรักษ์ พันธ์ผล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275

ผู้เขียน นางสาวสมรักษ์ พันธ์ผล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

เอนไซม์เซลลูเลส (Carboxymethylcellulase, CMCase) และไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งกากปาล์มเป็นเวลา 7 วัน ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การไดแอไลซ์ และการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ Sephadex G-75 และ DEAE-Trisacryl ได้เอนไซม์ CMCase และไซลาเนสมีความบริสุทธิ์ 19.0 เท่า และ 16.5 เท่าตามลำดับ เมื่อตรวจสอบโดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเอนไซม์ CMCase ที่แยกได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ ขณะที่เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้ไม่บริสุทธิ์

เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 3.5 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 3.5-8.0 และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ถูกกระตุ้นเล็กน้อยโดย Cu^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ถูกยับยั้งโดย Hg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดย *p*-chloromercuribenzoate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือ 5'5' dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ความเข้นข้น 1 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ CMCase ที่ได้มีค่า Km เท่ากับ 21.28 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Vmax เท่ากับ 1.43 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 62,000 ดาลตัน

คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน พบว่า มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ พีเอช 4.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0-8.0 และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย Hg^{2+} ความเข้มข้น

1 มิลลิโมลาร์ และถูกยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดย Cu^{2+} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ส่วน *p*-chloromercuribenzoate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือ 5'5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Km และ Vmax มีค่าเท่ากับ 10.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 1.51 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ

Thesis Title	Purification and Properties of Cellulase and Xylanase from *Aspergillus niger* ATCC 6275
Author	Miss Somrak Panphon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1994

Abstract

Carboxymethylcellulase (CMCase) and xylanase from *Aspergillus niger* ATCC 6275 cultivated on palm cake for 7 days were partially purified by ammoniumsulfate precipitation, dialysis, gel filtration with Sephadex G-75 and ion exchange chromatography with DEAE-Trisacryl. The specific activities of the purified CMCase and xylanase were increased approximately 19.0 fold and 16.5 fold, respectively. When these enzymes were run through SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the CMCase was fairly homogeneous while the xylanase was inhomogeneous.

Characterization of the partially purified CMCase revealed that an optimal pH and temperature were 3.5 and 65 ^{o}C, respectively. The enzyme was stable between pH 3.5-8.0 and lost its activity completely at 70 ^{o}C after 30 min incubation. The enzyme activity was slightly activated by 1 mM Cu^{2+} and inhibited by 1 mM Hg^{2+}, whereas 10 mM *p*- chloromercuribenzoate or 1 mM 5'5'-dithobis (2-nitrobenzoic acid) reduced its activity by 50 percent. The kinetic data showed that the Km and Vmax values for the CMCase were 21.28 mg/ml and 1.43 µmol/ml/min, respectively. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 62,000 dalton.

The partially purified xylanase showed an optimal pH of 4.5 and an optimal temperature of 55 ^{o}C for its activity. The enzyme was also stable between pH 3.0-8.0 but lost its activity almost completely at 70 ^{o}C after 30 min incubation. The xylanase activity was completely inhibited by 1 mM Hg^{2+} and reduced more than 50 percent by 10 mM Cu^{2+}.

The enzyme was 50 percent inhibited by 10 mM *p*-chloromercuribenzoate or 1 mM 5'5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). The Km and Vmax for xylanase were 10.00 mg/ml and 1.51 µmol/ml/min, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ประธานคณะกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ขอขอบพระคุณ อาจารย์อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ กรรมการผู้แทนจากโครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณลุง คุณน้า ด้วยความเคารพยิ่ง ที่สนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ น้องๆ และทุกๆ ท่าน ที่มิได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ที่ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สมรักษ์ พันธ์ผล

พฤศจิกายน 2537

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ....(3)
Abstract....(5)
กิตติกรรมประกาศ....(7)
สารบาญ....(8)
รายการตาราง....(10)
รายการรูป....(12)
บทที่
1 บทนำ....1
บทนำต้นเรื่อง....1
การตรวจเอกสาร....2
1 วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม....2
2 ลิกโนเซลลูโลส....4
3 เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส....5
4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์....9
5 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส....19
วัตถุประสงค์....33
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ....34
วัสดุ....34
อุปกรณ์....34
วิธีการ....35
1 การวิเคราะห์....35
2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์....37
2.1 การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา....37
2.2 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์....37

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนส.....39
3 ผลและวิจารณ์.....42
4 สรุป.....82
ข้อเสนอแนะ.....84
เอกสารอ้างอิง.....85
ภาคผนวก.....93
ก การเตรียมสาร.....93
ข วิธีการวิเคราะห์.....98
ประวัติผู้เขียน.....107

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1	การทดลองตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวในช่วงต่างๆ	11
2	ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลส	12
3	ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนส	13
4	functional group ของ ion-exchanger	15
5	พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	20
6	พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	21
7	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	23
8	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	24
9	ผลของสารเคมีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus ochraceus*	28
10	น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	29
11	น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	30
12	ค่า Km ของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	32
13	การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว ในช่วงต่างๆ ของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275	43
14	ผลการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ (CMCase) และเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งกากปาล์มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	51
15	ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน	68

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

16 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส
จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 72

รายการรูป

รูป หน้า

1 แผนภูมิแสดงปริมาณวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม 3

2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส 4

3 โครงสร้างทางเคมีของไซแลน 6

4 โครงสร้างทางเคมีของลิกนินในพวก angiosperm (aspen) 6

5 การทำงานของ anion exchanger 16

6 การแยกเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ด้วย Sephadex G-75 คอลัมน์ ขนาด 1.5x39.5 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 4 มิลลิลิตรต่อหลอด 45

7 การแยกเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ของ fraction F1 ด้วย DEAE-Trisacryl (type M) คอลัมน์ขนาด 1.5X39.5 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 และซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด 47

8 การแยกเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ของ fraction F2 ด้วย DEAE-Trisacryl (type M) คอลัมน์ขนาด 1.5X39.5 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 และซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด 48

9 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 55

10 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 57

รายการรูป (ต่อ)

รูป หน้า

11 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 58

12 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 60

13 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 61

14 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 63

15 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 64

16 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 66

17 แสดงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CMCase ส่วน C2(2), CMCase ส่วน C1(3) และไซลาเนสส่วน X (4) หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-Trisacryl แยกโดย SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brillant Blue R-250 และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (1) 76

18 Lineweaver-Burk plot ของกิจกรรมเอนไซม์ CMCase ต่อสารละลาย CMC ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 3.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 79

19 Lineweaver-Burk plot ของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่อสารละลายไซแลน ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 81

รูปผนวก ข กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย SDS-PAGE 106

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม เป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของภาคใต้ จากการสำรวจของ ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ (2531) พบว่า ในปี พ.ศ. 2529 มีโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบแบบมาตรฐานจำนวน 14 โรงงาน กำลังการผลิตรวมประมาณ 240 ตันทะลายต่อชั่วโมง และโรงงานขนาดเล็กจำนวน 20 โรงงาน มีกำลังผลิตรวมประมาณ 34 ตันทะลายต่อชั่วโมง ในปี พ.ศ. 2535 ข้อมูลจากสำนักงานอุตสาหกรรมจังหวัดชุมพร และศูนย์เศรษฐกิจอุตสาหกรรมภาคใต้ โดยการสำรวจของกองศึกษาภาวะเศรษฐกิจอุตสาหกรรม 2 สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรมพบว่า โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบขนาดใหญ่และขนาดกลาง มีจำนวน 14 โรงงาน กำลังผลิตรวมประมาณ 2.08 ล้านตันผลปาล์มทะลายต่อปี และโรงงานขนาดเล็ก 24 โรงงาน มีกำลังผลิตรวมประมาณ 0.3 ล้านตันผลปาล์มทะลายต่อปี จากแนวโน้มการผลิตที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้นเช่นกัน วัสดุเศษเหลือเหล่านี้ได้แก่ ทะลายเปล่า กะลาผลปาล์ม กากเนื้อผลปาล์ม เส้นใย และน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิต ได้มีการนำวัสดุเศษเหลือเหล่านี้มาใช้ประโยชน์โดยตรง คือ ทะลายเปล่า เส้นใย และเศษกะลา ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อกำเนิดไอน้ำ เถ้าจากการเผา ทะลายปาล์มใช้เป็นปุ๋ย สลัดจ์ใช้เป็นวัสดุคลุมดินและปุ๋ย กากผลปาล์มเป็นอาหารสัตว์ ส่วนน้ำทิ้งใช้รดต้นปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) นอกจากนี้ มีการนำกากปาล์มและน้ำทิ้งมาเป็นสารอาหารสำหรับเชื้อรา เพื่อผลิตเอนไซม์ (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534; อารี กังแฮ, 2536; Prasertsan and Oi, 1992) และพบว่าค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ Carboxymethylcellulase (CMCase) และไซลาเนส (xylanase) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergilus niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งในกากปาล์ม สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวในน้ำทิ้งรวม (อารี กังแฮ, 2536) ซึ่ง Singh, *et al.* (1988b อ้างโดย Singh, *et al.*, 1990) กล่าวว่า *Aspergillus niger* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ลิกโนเซลลูโลสต่างๆ เป็นสับสเตรตได้ดีในสภาพการหมักแบบเหลว (submerged culture) และแบบอาหารแข็ง (solid state culture)

เอนไซม์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ รวมทั้งคุณลักษณะทางด้านจลนพลศาสตร์ ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์หรือการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ที่ต้องการความจำเพาะสูง ต้องใช้เอนไซม์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยหลายกระบวนการ โดยขั้นแรกเป็นการตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์แล้วแยกตะกอนโปรตีนออกโดยการหมุนเหวี่ยง หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการอื่นต่อไป ได้แก่ การทำโครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวกลางชนิดต่างๆ เพื่อแยกโปรตีนออก โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลหรือประจุ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เจริญบนอาหารแข็งกากปาล์ม

การตรวจเอกสาร

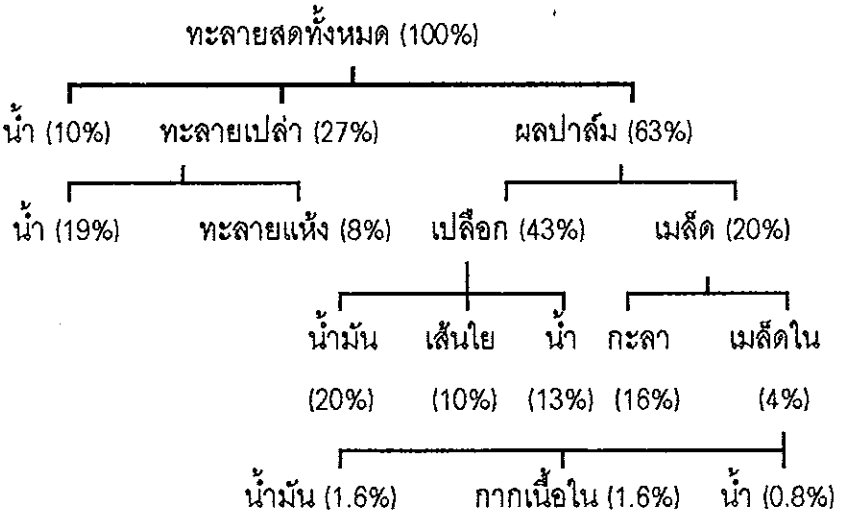
1. วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมันปลูกกันแพร่หลายในจังหวัดทางภาคใต้ โดยจังหวัดกระบี่เป็นจังหวัดที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุด รองลงมาคือจังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2531) นอกจากนี้ยังมีการปลูกทางภาคตะวันออก และภาคตะวันตกอีกด้วย ข้อมูลจากคณะสำรวจที่ประสานงานโดยกรมส่งเสริมการเกษตรพบว่า ในปี พ.ศ. 2534 ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 2,160 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี คิดเป็นผลผลิตปาล์มสดทั้งทะลายประมาณ 1,408,420 ตัน หรือสกัดเป็นน้ำมันปาล์มดิบได้ 255,910 ตัน

นอกจากนี้มีการกำหนดเป้าหมายการผลิตปาล์มน้ำมันในช่วง 6 ปี (2534-2539) โดยข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานว่า เป้าหมายพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันในช่วง 6 ปีจะคงที่ที่ 700,000 ไร่ โดยมีผลผลิตปาล์มน้ำมันต่อไร่เฉลี่ยมากกว่า 2 ตัน และจะเพิ่มขึ้นสูงถึง 2.450 ตัน ในปี พ.ศ. 2538 แต่คาดว่าในปี 2539 ผลผลิตต่อไร่เฉลี่ยของปาล์มน้ำมันจะลดลงเหลือเพียง 2.437 ตัน และมีผลผลิตปาล์มน้ำมันรวมเพียง 1,1671,650 ตัน ทั้งนี้เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีอายุมากขึ้น (เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, 2532)

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533) ได้สำรวจโรงงานน้ำมันปาล์มในจังหวัดสงขลา สตูล และสุราษฎร์ธานี พบว่ากระบวนการผลิตแบ่งได้ 2 ประเภทคือ การผลิตแบบไม่ใช้น้ำ และการผลิตแบบใช้น้ำ ในการผลิตแบบไม่ใช้น้ำ เป็นกระบวนการผลิตแบบง่ายๆ ไม่ซับซ้อน โดยการนำผลปาล์มไปอบด้วยความร้อนที่ได้จากฟืน การผลิตวิธีนี้จะไม่มีน้ำเสียออกมา วัสดุเศษเหลือมีอย่างเดียวคือกากปาล์ม สำหรับการผลิตแบบใช้น้ำจะใช้ไอน้ำในการอบทะลายปาล์ม ซึ่งจะมีทั้งแบบที่มีการใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน (decanter) และแบบที่ไม่ใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการผลิตแบบใช้น้ำทั้งสองประเภทนี้เป็นน้ำมันปาล์มดิบมีผลผลิตเท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์ และมีเมล็ดแห้งเป็นผลพลอยได้ ซึ่งทางโรงงานจะอบแห้งให้มีความชื้นไม่เกิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งจำหน่ายเป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดในปาล์มต่อไป

ในกระบวนการผลิตจะมีวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิต ได้แก่ ทะลายเปล่า (empty bunches) เปลือกผลปาล์ม (pericarp fibre) กะลาผลปาล์ม (palm shell) กากเนื้อผลปาล์ม (palm kernel cake) และน้ำทิ้ง (effluent) โดยมีปริมาณดังแสดงในรูป 1



รูป 1 แผนภูมิแสดงปริมาณวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

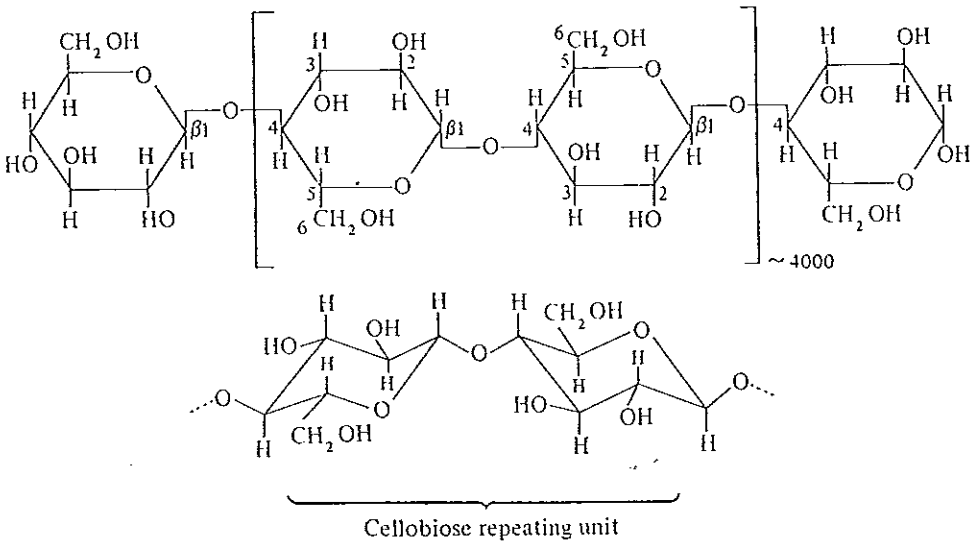
ที่มา: ดัดแปลงจาก Kirdaldy และ Sutanto (1976 อ้างโดยเบญจวรรณ ชิตมณี, 2534)

2. ลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสจัดเป็นแหล่งชีวมวลชนิดทดแทนใหม่ได้ (renewable biomass resource) ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ เซลลูโลสประมาณ 35-45 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส ประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ และลิกนินประมาณ 15-35 เปอร์เซ็นต์ (Kirk, 1983)

2.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ β (1-4) glycosidic โครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้าน จำนวนกลูโคสต่อโมเลกุลโดยเฉลี่ยประมาณ 8,000 หน่วย ต่อกันเป็นโซ่ยาว โดยเป็นการซ้ำหน่วยของเซลโลไบโอสดังแสดงในรูป 2 เซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืชจัดรวมเป็นหน่วยโครงสร้างที่เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibrils) มาเรียงตัวเป็นมัด (bundle) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของเซลลูโลส จัดเรียงตัวตามแนวยาวขนานกับอีกอันหนึ่ง (Goodwin and Mercer, 1983) ซึ่งบางส่วนของมัดเหล่านี้จะมีส่วนที่เรียงตัวกันเป็นระเบียบเรียกว่า crystalline และส่วนที่เรียงตัวอย่างหลวมเรียกว่า amorphous



รูป 2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา: Goodwin และ Mercer (1983)

2.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เมื่อเทียบกับเซลลูโลส การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสแบ่งตามชนิดของน้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) และแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดังนั้นชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงเป็น ไซแลน แมนแนน กาแลคแทน และอะราบิแนน ตามลำดับ

ไซแลนประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β (1-4) glycosidic ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่เหมือนกันในพืชแต่ละชนิด แต่จะแตกต่างกันในส่วนของสายโซ่คือ 4-O-methyl-D-glucuronic acid, L-arabinose หรือ D-glucuronic acid (Bastawde, 1992) สายโซ่เหล่านี้จะเชื่อมกับน้ำตาลไซโลสที่ตำแหน่งต่างๆ กัน เช่น 4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกับไซโลสด้วยพันธะ α (1-2) glycosidic และ L-arabinose เชื่อมกับไซโลสด้วยพันธะ α (1-3) glycosidic (Goodwin and Mercer, 1983) ในด้านคุณสมบัติพบว่า ไซแลนที่มีหมู่อะซีติล (acetylated xylans) ละลายในน้ำได้ ในขณะที่ไซแลนที่ไม่มีหมู่อะซีติล (deacetylated xylans) ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ดีในสารละลายด่าง (Bastawde, 1992) โครงสร้างทางเคมีของไซแลนแสดงในรูป 3

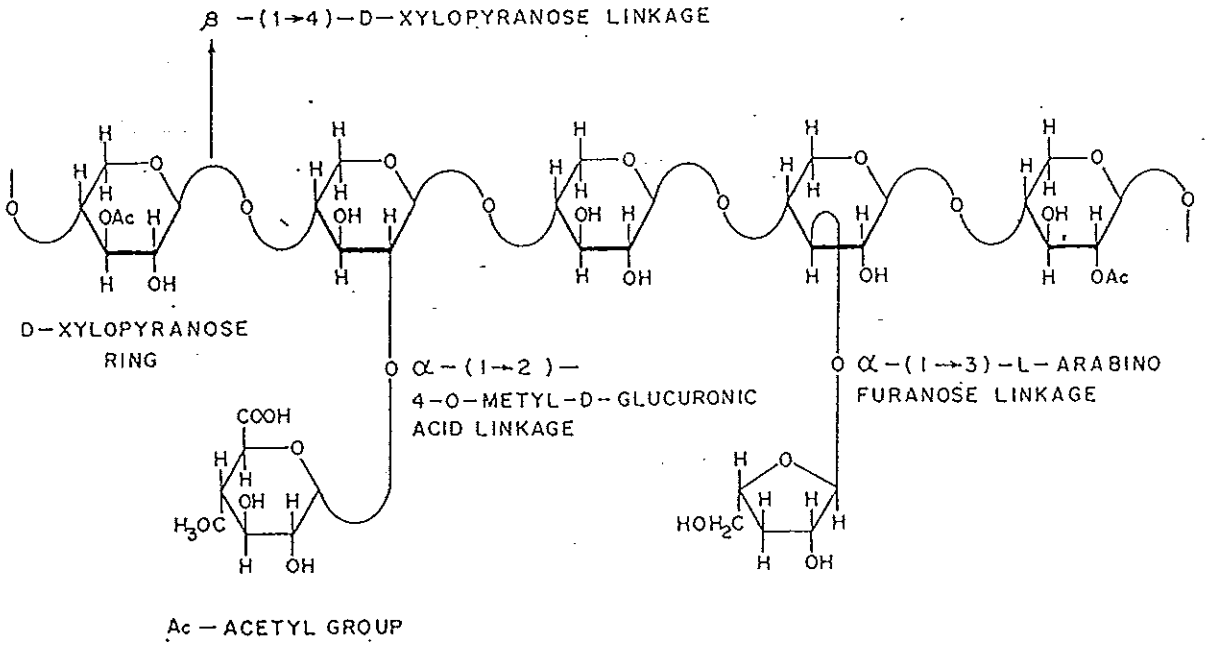
2.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็น polyphenylpropanoid ซึ่งมาจากหน่วยหลัก 3 หน่วย คือ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol (Kirk, 1983) โดยมีพันธะที่สำคัญของโครงสร้างคือ พันธะ C-O-C และพันธะ C-C จึงทนทานต่อการย่อยสลาย ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของลิกนินแสดงดังรูป 4 สำหรับลิกนินในหญ้าหรือพืชอื่นๆ หมู่ R จะเป็นเอสเทอร์ของ *p*-hydroxybenzoic, *p*-hydroxycinnamic หรือกรดอื่นๆ

3. เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส

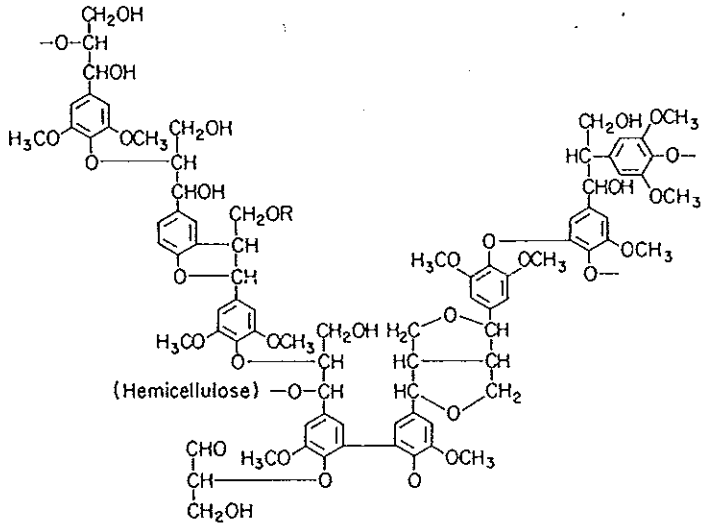
3.1 เอนไซม์เซลลูเลส

ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส ซึ่งถือเป็นการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ต้องอาศัยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (complex enzyme) ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วนคือ endoglucanase, cellobiohydrolase และ β-glucosidase การขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นน้อย และไม่สมบูรณ์ (Araujo and D'Souza, 1986; Wood and McCrae, 1986 ; Woodward, *et al.*, 1988)



รูป 3 โครงสร้างทางเคมีของไซแลน

ที่มา: Beily (1985 อ้างโดย Bastawde, 1992)



รูป 4 โครงสร้างทางเคมีของลิกนินในพวก angiosperm (aspen)

ที่มา: Kirk (1983)

3.1.1 Endoglucanase (1,4-β-D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยสลาย β (1-4) glucosidic linkage แบบสุ่ม ซึ่งเป็น endo-action ได้กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ไม่สามารถย่อยเซลโลไบโอสหรือ *p*-nitrophenyl β-D-glucoside สามารถย่อยเซลโลเดกซ์ตริน (cellodextrins) โดยอัตราการย่อยในเซลโลเดกซ์ตรินสายยาวสูงกว่าเซลโลเดกซ์ตรินสายสั้นๆ (Hurst, *et al.*, 1977) นอกจากนี้สามารถย่อยเซลลูโลสที่ทำให้พองตัวด้วยกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4-swollen cellulose) คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (carboxymethyl-cellulose, CMC) เซลโลเดกซ์ตริน เช่น เซลโลเตตระโอส, เซลโลเพนตระโอส (Wood and McCrae, 1978) หรือย่อยไฮดรอกซีเอธิลเซลลูโลส (hydroxyethylcellulose, HEC) มีรายงานว่า endo glucanase (endo III) จาก *Trichoderma viride* สามารถย่อยเซลลูโลสชนิด crystalline cellulose ได้ดี (Beldman, *et al.*, 1985) แต่อย่างไรก็ตาม โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ส่วนนี้ย่อยเซลลูโลสในรูปนี้ได้น้อยมาก (Araujo and D'Souza, 1986)

Endoglucanase ที่ได้จากแหล่งจุลินทรีย์ต่างๆ บางชนิด จัดเป็นพวกไกลโคโปรตีนคือมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบของโปรตีนเอนไซม์ (Beldman, *et al.*, 1985; Araujo and D'Souza, 1986) และเซลลูเลสบางชนิดก็ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบของโปรตีนเอนไซม์ เช่น endoglucanase จาก *Aspergillus niger* (Hurst, *et al.*, 1977; Okada, 1985) เอนไซม์นี้วิเคราะห์โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรต

3.1.2 Cellobiohydrolase (1, 4-β-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) หรือ exoglucanase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end ของเส้นสาย สามารถย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในรูป crystalline ได้ดี ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือเซลโลไบโอส (Araujo and D'Souza, 1986) exoglucanase ไม่สามารถย่อยเซลโลไบโอส แต่ย่อยเซลโลเดกซ์ตรินได้ การวิเคราะห์เอนไซม์นี้เป็นการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ต่ออวิเซล (avicel) ฝ้าย amorphous cellulose หรือกระดาษกรอง (filter-paper) มีรายงานว่า exoglucanase ที่ได้จาก *Trichoderma viride* จัดเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน (Beldman, *et al.*, 1985)

3.1.3 β-Glucosidase (β-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส ได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ กลูโคส นอกจากนี้ยังสามารถย่อยเซลโลเดกซ์ตริน ซึ่ง Schmid และ Wandrey (1987) รายงานว่า β-glucosidase จาก *Trichoderma reesei* สายพันธุ์ QM 9414 สามารถย่อยเซลโลเดกซ์ตรินตั้งแต่เซลโลไตรโอสจนถึงเซลโลออคตะโอส โดยการตัด

กลูโคสทีละหน่วยจากปลายด้าน non-reducing ของสายโอลิโกเมอร์ ไม่ย่อย microcrystalline cellulose หรือ CMC และเอนไซม์นี้ไม่เป็นพวกไกลโคโปรตีน แต่จากการทดลองของ Araujo และ D'Souza (1986) พบว่า β-glucosidase จาก *Aspergillus niger* ATCC 52430 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ (mutant) มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ประมาณ 3.6 และ 4.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในการวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้เซลโลไบโอส *p*-nitrophenyl-β-glucoside หรือ salicin เป็นสับสเตรต

การทำงานของเอนไซม์ทั้งสามตัวนี้ในการย่อยสลายเซลลูโลส จะทำงานร่วมกันในรูปแบบที่เรียกว่า synergistic action ซึ่งอธิบายได้ว่า endoglucanase จะย่อยสลายแบบสุ่ม ทำให้ได้สายเซลลูโลสเส้นใหม่ที่มีปลายเหมาะที่ exoglucanase จะเข้าทำปฏิกิริยาต่อ รวมทั้งย่อยในส่วนที่เป็น crystalline cellulose ได้เซลโลไบโอส ซึ่ง β-glucosidase จะย่อยต่อได้กลูโคส 2 โมเลกุล และจากการศึกษาของ Woodward, *et al.* (1988) พบว่า ระดับของการเกิด synergism ระหว่าง endoglucanase กับ exoglucanase ซึ่งมีปริมาณ β-glucosidase ที่เกินพอจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละตัว โดยไม่ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเอนไซม์ทั้งสอง

3.2 เอนไซม์ไซลาเนส

จากโครงสร้างของไซแลนที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขาการย่อยสลายไซแลนจึงประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องหลายรูปแบบ แบ่งได้ 3 ชนิดด้วยกัน (Reilly, 1981; Bastawde, 1992)

3.2.1 Endoxylanase (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาวๆ โดยเป็นการย่อยแบบสุ่มที่ตำแหน่งต่างๆ ของสาย จำแนกได้ 4 รูปแบบ ตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ

1) Non-arabinose liberating endoxylanases เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยสายโซ่ของไซแลนได้ มี 2 แบบ คือ

1.1 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถย่อย L-arabinosyl initiated branch ที่ตำแหน่ง β (1-4) linkages ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไซโลไบโอสและไซโลส สามารถย่อยไซโลไตรโอสได้ แต่อัตราการย่อยจะต่ำกว่าไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว

1.2 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถตัดสายโซ่ที่ตำแหน่ง α (1-2) และ α (1-3) ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มากกว่าไซโลไบโอส ไม่สามารถย่อยไซโลเตตระโอสรวมทั้งไซโลไบโอส

2) Arabinose liberating endoxylanases มี 2 แบบ คือ

2.1 เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสายโซ่ของไซแลน ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไซโลไบโอส ไซโลส และอะราบิโนส

2.2 เป็นกลุ่มที่สามารถย่อยสายโซ่ของไซแลน ผลิตภัณฑ์ที่ได้คืออะราบิโนสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดกลาง

Endoxylanase สามารถตรวจสอบโดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรต

3.2.2 Exo-xylanase (1,4-β-D-xylan xylohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนและโอลิโกแซคคาไรด์ทางด้าน non-reducing end ได้ผลิตภัณฑ์คือไซโลส โดยอัตราการเกิดไซโลสจากการย่อยไซแลนสูงกว่าจากการย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น

3.2.3 β-Xylosidase หรือ Xylobiase (EC 3.2.1.37) ทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น เช่น ไซโลไบโอสได้ไซโลส วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้ *p*-nitrophenyl-β-D-xyloside เป็นสับสเตรต

4. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Enzyme Purification)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยหลายกระบวนการ ทั้งนี้เพื่อแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกไปให้หมด วิธีการนั้นทำได้โดย

4.1 การตกตะกอนโปรตีน (Protein Precipitation)

การตกตะกอนเป็นวิธีหนึ่งที่จะแยกโปรตีนออกมาโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายของโปรตีน สารละลายที่ใช้ในการตกตะกอนอาจเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ อีเทอร์ อะซีโตน หรือสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

การเติมเกลือลงไปในปริมาณเล็กน้อย เพื่อทำให้โปรตีนละลายได้ดียิ่งขึ้น เพราะเกลือจะเกาะกับโปรตีนแล้วรวมกับน้ำได้ดี กระบวนการนี้เรียกว่า salting in ในขณะเดียวกันการเติมเกลือในปริมาณที่มากเพื่อให้โปรตีนตกตะกอนเรียกว่า salting out (มุกดา ฐิตะสุต, 2527)

การตกตะกอนโปรตีนส่วนใหญ่มักใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Scopes, 1978) เนื่องจาก

1. เป็นการเพิ่ม hydrophobic protein-protein interaction
2. ละลายได้สูง (ประมาณ 4 โมล สารละลายจะอิ่มตัว 100 เปอร์เซ็นต์)
3. ความร้อนมีผลเล็กน้อยต่อการละลาย

4. สารละลายอิ่มตัวมีความหนืดต่ำและมีความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงออกได้ง่าย

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการตกตะกอนของโปรตีนและเอนไซม์ แสดงดังตาราง 1 เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสตกตะกอนที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ แสดงดังตาราง 2 และ 3 ตามลำดับ

4.2 การกำจัดเกลือ (Desalting)

การกำจัดเกลือหรือแยกสารอนุภาคเล็กๆ ที่ปะปนมาได้โดยวิธีไดแอไลซิส (dialysis) ซึ่งเป็นการแยกสารโมเลกุลเล็กออกจากโมเลกุลใหญ่โดยใช้ semipermeable membrane เช่น cellophan bags (Araujo and D'Souza, 1986) หรือ cellulose-based dialysis tube (Grabski and Jeffries, 1991) นอกจากนี้อาจกำจัดเกลือด้วยการกรองด้วยเจล (gel filtration) โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล อนุภาคสารที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเจล เมื่อถูกชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จะถูกชะออกมาก่อน เนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กจะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเม็ดเจล ทำให้หลุดออกมา ในช่วงหลัง มีรายงานการใช้เม็ดเจลต่อไปนี้ในการกำจัดเกลือ เช่น Sephadex G-25 (Hurst, *et al.*, 1977; Ricardo, *et al.*, 1985) Sephadex G-50 (Matanguihan, *et al.*, 1985) BioGel P-6DG (Huang, *et al.*, 1991) หรือ Biogel-P2 (Ito, *et al.*, 1992)

4.3 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

โครมาโตกราฟีเป็นกระบวนการหนึ่งที่นิยมในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โครมาโตกราฟีมีหลายรูปแบบ เช่น adsorption chromatography, partition chromatography, affinity chromatography, ion exchange chromatography และ gel filtration ซึ่งทั้งหมดนี้ในการแยกจะเกี่ยวข้อง 2 ส่วนด้วยกันคือ ส่วนที่อยู่กับที่ (solid phase) และส่วนที่เคลื่อนที่ (mobile phase) ในการแยกจะอาศัยความแตกต่างในเรื่องของขนาด รูปร่าง ประจุ คุณสมบัติในการละลายและการดูดซับ (Plummer, 1987) เจลฟิลเตรชันเป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างในเรื่องของขนาดโมเลกุล และ ion exchange chromatography เป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของประจุในโมเลกุลของสาร โดยสารจะจับอยู่กับตัวค้ำจุน (matrix) ที่มีรูพรุนและมีประจุ ซึ่งเรียกว่า ion-exchange resin เรซินที่มีประจุบวกก็จะมีประจุลบมาจับด้วยพันธะอิออนิก ประจุลบเหล่านี้เรียกว่า counter ions (anions) เรียกตัวแลกเปลี่ยนนี้ว่า anion exchangers และกรณีที่เรซินเป็นประจุลบและมี counter ions เป็นประจุบวก (cations) ตัวแลกเปลี่ยนนี้เรียกว่า cation exchanger ดังนั้น

ตาราง 1 การทดลองตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวในช่วงต่างๆ

การทดลองครั้งที่	ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต	เปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่ตกตะกอน	เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ตกตะกอน
1	0-40	4	25
	40-60	62	22
	60-80	32	32
	80 Supernatant	2*	21*
2	0-45	6	32
	45-70	90	38
	70 Supernatant	4*	30*
3	0-48	10	35
	48-65	75	25
	65 Supernatant	15*	40*

ที่มา: Scopes (1978)

* เป็นปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนนั้นๆ

ตาราง 2 ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลส

แหล่งเอนไซม์	เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต	เอกสารอ้างอิง
Alternaria alternata (mutant)	20-80	Macris (1984)
Aspergillus niger	80	Hurst, *et al.* (1977)
Aspergillus niger	60-80	Okada (1985)
Aspergillus terreus ATCC 52430	20-80	Araujo และ D'Souza (1986)
Clostridium thermocellum ATCC 27405	80	Romaniec, *et al.* (1992)
Penicillium sp.	60	Matanguihan, *et al.* (1985)
Sporotrichum cellulophilum	75	Kim, *et al.* (1982)
Trichoderma koningii IMI 73022	20-80	Wood และ McCrae (1978)

ตาราง 3 ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนส

แหล่งเอนไซม์	เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus kawachii IFO 4308	60	Ito, *et al.* (1992)
Aspergillus ochraceus (mutant)	30-60	Biswas, *et al.* (1990)
Aurebasidium pullulans Y-2311-1	30-50	Li, *et al.* (1993)
Bacillus pumilus IPO	20-60	Panbangred, *et al.* (1983)
Streptomyces roseiscleroticus	30-50	Grabski และ Jeffries (1991)

anion exchangers จะทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนประจุลบและ cation exchangers จะทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนประจุบวกจากสารละลาย รูปแบบของ functional group ของ ion-exchanger แสดงดังตาราง 4 และการทำงานของ anion exchanger เป็นไปในรูปแบบ ดังแสดงในรูป 5

การทำเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสให้บริสุทธิ์ มีการใช้เจลและเรซินแตกต่างกันออกไป ชนิดของตัวกลางและจำนวนครั้งในการแยกผ่านตัวกลางในคอลัมน์มีผลต่อความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่จะแยกได้ Hurst, *et al.* (1977) ศึกษาการแยกเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เจลและเรซินต่างๆ หลังจากตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ กำจัดเกลือโดยการผ่าน Sephadex G-25 แล้วผ่านคอลัมน์ดังนี้ DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-75 และผ่าน affinity-column ด้วย alkali-swollen cellulose column, Hydroxyapatite และสุดท้ายผ่าน BioGel P-60 ได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 25 เท่า

Wood และ McCrae (1978) แยกเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma koningii* IMI 73022 ได้ endoglucanase, cellobiohydrolase และ β-glucosidase โดยหลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 20-80 เปอร์เซ็นต์ นำส่วนที่แยกนี้ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ซึ่งสามารถแยก endoglucanase (E_1) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่วนองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงนำไปผ่าน DEAE-Sephadex ในขั้นนี้สามารถแยก β-glucosidase+endoglucanase อยู่ในส่วนที่ 1 และในส่วน ที่ 2 มี cellobiohydrolase และบางส่วนของ CM-cellulase (E_2) เล็กน้อย นำส่วนที่ 1 ไปผ่าน SE-Sephadex ได้ β-glucosidase ที่มี CM-cellulase (E_5) เล็กน้อยกับ endoglucanase (E_3, E_4) สำหรับส่วนที่ 2 นำมาผ่าน DEAE-Sephadex และในขั้นนี้สามารถแยก CM-cellulase (E_2) กับ cellobiohydrolase ออกจากกันได้

Macris (1984) แยกเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase) และ β-glucosidase จาก *Alternaria alternata* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ โดยตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 20-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านคอลัมน์คือ Sephadex G-75 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CMCase และ β-glucosidase เป็น 2.2 และ 4.2 เท่าตามลำดับ

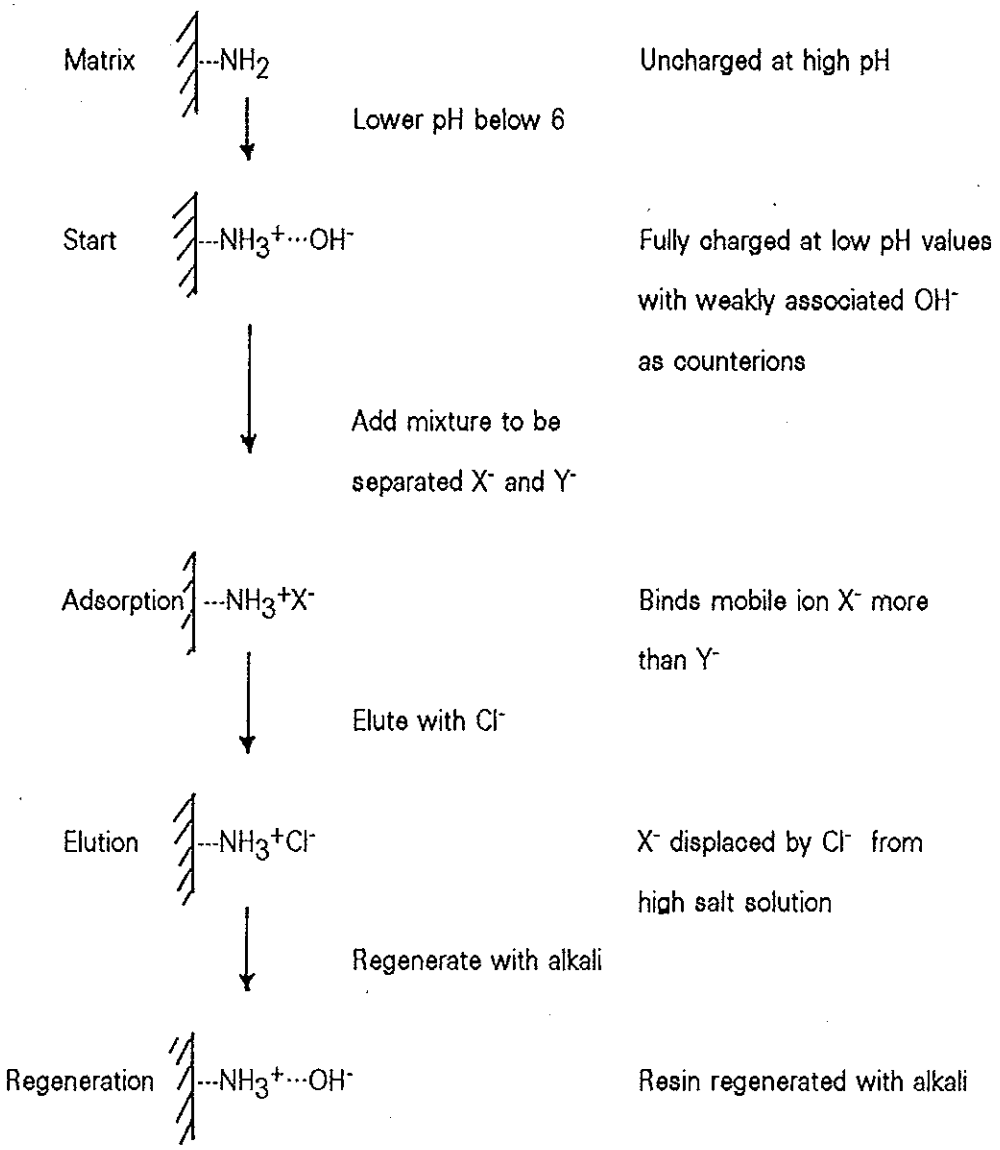
Matanguihan, *et al.* (1985) ศึกษาการแยกเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Penicillium* sp. ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์คือ Sephadex G-50 ในขั้นนี้พบว่าโปรตีนตัวอื่นๆ ถูกกำจัดออกไป แต่เอนไซม์เซลลูเลสต่อ CMC, อาวิเซล และเซลโลไบโอสรวมอยู่ใน peak เดียวกัน คอลัมน์ที่สองที่ผ่านคือ DEAE-Sephadex A-50 และสุดท้ายผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-200 ในขั้นนี้สามารถแยก

ตาราง 4 functional group ของ ion-exchanger

Anion exchangers	Structure	Type
Quaternary aminoethyl QAE	$-CH_2.CH_2-N^+(C_2H_5)(C_2H_5)-CH_2-CH(OH)-CH_3$	Strong
Diethylaminoethyl DEAE	$-CH_2.CH_2-N^+H(C_2H_5)(C_2H_5)$	Weak

Cation exchangers		Structure	Type
Sulphopropyl	SP	$-CH_2.CH_2-CH_2-SO_3^-$	Strong
Phospho	P	$-PO_4H_2^-$	
Carboxymethyl	CM	$-CH_2COO^-$	Weak

ที่มา: Plummer (1987)



รูป 5 การทำงานของ anion exchanger

ที่มา: Plummer (1987)

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อยเซลโลไบโอสได้ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ต่ออวิเซลและ CMC ยังรวมอยู่ใน peak เดียวกัน และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อเซลโลไบโอส โปรตีนของเอนไซม์มีความเป็น homogeneous

Okada (1985) แยกเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ผ่านคอลัมน์ต่างๆ ดังนี้ Amberlite CG-50, Bio-Gel P-150 2 ครั้ง หลังจากนั้นผ่าน Sephadex G-50 2 ครั้ง และครั้งสุดท้ายผ่าน Bio-Gel P-150 เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า โดยค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์หลังจากผ่าน Amberlite CG-50 คือ 28.52 ยูนิต/มิลลิกรัม และหลังจากผ่าน Bio-Gel P-150 ในครั้งสุดท้ายค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เป็น 116.83 ยูนิต/มิลลิกรัม เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ได้แถบโปรตีนหนึ่งแถบชัดเจน แสดงว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีความเป็น homogeneous

Fujino, *et al.* (1990) ศึกษาการทำ endoglucanase ที่ได้จากการโคลนยีนของ *Clostridium josui* ใน *Escherichia coli* ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ดังนี้ DEAE-Bio-Gel A, Sephacryl S-200 HR และ Mono Q ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้าย เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ประมาณ 70 เท่า แยกได้แถบโปรตีนแถบเดียว เมื่อตรวจสอบโดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

สำหรับเอนไซม์ไซลาเนส การทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี มีการใช้เจลและเรซินหลายอย่าง เช่น Ultrogel AcA 54, SP-Sephadex C-25, DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-50 (Shei, *et al.*, 1985) เอนไซม์ endoxylanase จาก *Bacillus pumilus* IPO สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex A-50 ตามด้วย CM-Sephadex C-50 โปรตีนของเอนไซม์ที่แยกได้มีความเป็น homogeneous (Panbangred, *et al.*, 1983)

Kinoshita และ Svarachorn (1983) รายงานว่า เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus* sp. ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ตามด้วย DEAE-Sephadex A-50 และ Sephadex G-200 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จากค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น 112 ยูนิต/A280 เมื่อผ่าน Sephadex G-200 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เป็น 7600 ยูนิต/A280 และเมื่อตรวจความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสพบว่า เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้นี้ไม่เป็น homogeneous คือยังประกอบไปด้วยแถบโปรตีนหลายแถบ

เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ เช่น ใช้ Ultrogel AcA 54, SP-Sephadex C-25 ที่พีเอช 4.5 แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex A-25 ที่พีเอช 5.4 ตามด้วย Sephadex G-50 และ DEAE-Sephadex A-25

ที่พีเอช 5.15 ทำให้เข้มข้นด้วย UM2 ultrafiltration ได้เอนไซม์ไซลาเนสมีความบริสุทธิ์ 3.6 เท่า และโปรตีนของเอนไซม์ที่แยกได้เป็น homogeneous (Ricardo, *et al.*, 1985)

Mitsuishi, *et al.* (1987) ศึกษาการทำเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา (mesophilic fungus strain Y-94) ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl PBE-94 ซึ่งในขั้นนี้แยกไซลาเนสได้ 3 ชนิดคือ Xn-A, Xn-B และ Xn-C ในแต่ละส่วนที่แยกได้ ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยผ่าน Bio-Gel A (0.5 m) column

Huang, *et al.* (1991) รายงานว่า เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma koningii* G-39 เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน SP-Trisacryl-M และ TSK HW-50F เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 11 เท่าและมีความเป็น homogeneous

Ito, *et al.* (1992) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus kawachii* IFO 4308 ประกอบด้วยไซลาเนส 3 ชนิด คือ XylA, XylB และ XylC เมื่อนำส่วนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว 60 เปอร์เซ็นต์ กำจัดเกลือด้วย Biogel P2 แล้วแยกให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-5PW แยกได้ XylA, XylB และ XylC ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ G3000-SW ได้เอนไซม์แต่ละตัวที่เป็น homogeneous

Kormelink, *et al.* (1993) แยกเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 ได้ endoxylanase 3 ชนิด และ β-xylosidase 1 ชนิด โดยผ่านคอลัมน์ Biogel P10 ซึ่งแยกได้ 2 peak นำแต่ละ peak มาผ่าน DEAE-Biogel A พบว่าในส่วนที่ 1 แยกได้ 3 peak คือ Endo I, Endo II และ β-xylosidase นำ peak ที่ 1 มาผ่าน Mono Q ได้ Endo I ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นอีก 2 peak ที่เหลือผ่าน DEAE-Biogel A ตามด้วย Ultrogel AcA 54 ซึ่งแยกได้ β-xylosidase ที่บริสุทธิ์ และใน peak Endo II จะผ่านคอลัมน์สุดท้ายคือ Mono Q ส่วน peak ที่ 2 จากการผ่าน Biogel P10 ครั้งแรก นำมาผ่านคอลัมน์คือ DEAE-Biogel A 2 ครั้ง และ Ultrogel AcA 54 แยกได้ Endo III

เอนไซม์ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่างๆ นั้น สามารถทำให้เข้มข้นโดยการ freeze-dried (Macris, 1984; Huang, *et al.*, 1991) หรือการทำอุลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) โดยใช้เมมเบรนต่างๆ เช่น UM 10 membrane (Okada, 1985) PM 10 membrane (Kluepfel, *et al.*, 1990) เมมเบรนเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน โดยจำกัดขนาดโมเลกุลที่ผ่านออกไป โดยใช้ความดันเป็นตัวช่วย การเลือกชนิดของเมมเบรนจึงแตกต่างกันออกไปในเอนไซม์แต่ละชนิดแต่ละแหล่ง

5. คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

5.1 พีเอชที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

การเปลี่ยนแปลงพีเอชหรือความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน ทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของเอนไซม์และของสับสเตรต ซึ่งมีผลต่อการจัดรูปร่างและสภาวะอิออนของเอนไซม์และสับสเตรต (มุกดา ฐิตะสุต, 2527) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงพีเอชมากๆ อาจทำให้โปรตีนเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนสภาพธรรมชาติ ซึ่งจะมีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชหนึ่งหรือช่วงพีเอชหนึ่ง เรียกว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุด

พีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ นั้นมีความแตกต่างกันออกไปในแหล่งจุลินทรีย์แต่ละชนิด เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเมื่อทำให้บริสุทธิ์ในระดับหนึ่ง แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์หาสภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากเชื้อรามีพีเอชเหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงค่อนข้างเป็นกรด แสดงดังตาราง 5 และ 6 ตามลำดับ

สำหรับความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสต่อพีเอช Hurst, *et al.* (1977) รายงานว่าความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* โดยการบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ตั้งแต่ 1.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์มีความคงตัวดีในช่วงพีเอช 1.0-9.0 และ Okada (1985) รายงานความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* จะอยู่ในช่วงพีเอช 5.0-8.0 จากการบ่มเอนไซม์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพีเอช 5.5-6.5 เมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

Tong, *et al.* (1980) ศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Thermoascus aurantiacus* โดยบ่มที่พีเอชต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่พีเอชช่วง 6.0-8.0

เอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวในช่วงพีเอชกว้าง มีรายงานต่างๆ ดังนี้

Nakanishi, *et al.* (1984) ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus flavus* IFO 0407 ในช่วงพีเอช 2.0-10.0 พบว่า เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0-8.0

Frederick, *et al.* (1985) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส I จาก *Aspergillus niger* มีความคงตัวสูงที่พีเอช 5.0 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 20 นาที ในขณะที่เอนไซม์ไซลาเนส II มีความคงตัวสูงที่พีเอช 6.0 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 75 นาที

ฝ่ายหอสมุด
คุณพญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตาราง 5 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Alternaria alternata (mutant)	5-6	Macris (1984)
Aspergillus niger	3.8-4.0	Hurst, *et al.* (1977)
Aspergillus niger	2.5	Ikeda, *et al.* (1967 อ้างโดย Boyer, *et al.*,1987)
Aspergillus niger	4.0	Okada (1985)
Aspergillus terreus ATCC 52430	6.0 (endoglucanase I) 4.8 (endoglucanase II)	Araujo และ D'Souza (1986)
Aspergillus terreus (mutant UNGI-40)	5.6 (endoglucanase I) 5.2 (endoglucanase II)	Araujo และ D'Souza (1986)
Clostridium thermocellum	6.6 (endoglucanase S_s)	Fauth, *et al.* (1991)
Clostridium thermocellum ATCC 27405	7.0	Romaniec, *et al.* (1992)

ตาราง 6 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori CMI 142717	5.5-6.0 (endo I)	Kormelink, *et al.* (1993)
	5.0 (endo II)	
	4.0 (endo III)	
Aspergillus niger	6.0 (xylanase I)	Frederick, *et al.* (1985)
	5.5 (xylanase II)	
Aspergillus niger	5.0	Ricardo, *et al.* (1985)
Aspergillus niger	4.9	Shei, *et al.* (1985)
Aspergillus kawachii IFO 4308	5.5 (XylA)	Ito, *et al.* (1992)
	4.5 (XylB)	
	2.0 (XylC)	
Aspergillus ochraceus (mutant)	6.0	Biswas, *et al.* (1990)
Aspergillus sp.	4.5	Kinoshita และ Svarachorn (1983)
Aureobasidium pullulans Y-2311-1	4.8	Li, *et al.* (1993)
Bacillus pumilus IPO	6.5	Panbangred, *et al.* (1983)
Cryptococcus flavus IFO 0407	4.5	Nakanishi, *et al.* (1984)
mesophilic fungus strain Y-94	4.9	Mitsuishi, *et al.* (1987)
Streptomyces roseiscleroticus	6.5-7.0	Grabski และ Jeffries (1991)
Trichoderma koningii G-39	5.5	Huang, *et al.* (1991)

ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์มีความคงตัวสูงที่พีเอช 5.6 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลือครึ่งหนึ่งในเวลา 40 ชั่วโมง (Shei, *et al.*, 1985)

Mitsuishi, *et al.* (1987) รายงานว่า ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจาก fungus strain Y-94 จากการเก็บเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ไซลาเนส A และ B เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 2.5-9.0 สำหรับไซลาเนส C ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงที่พีเอชมากกว่า 5.5

Ito, *et al.* (1992) พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus kawachii* IFO 4308 เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แยกเอนไซม์ได้ 3 ชนิด XylA, XylB และ XylC ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอช 1.0-11.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า XylA และ XylB มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 3-10 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และ XylC เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 1.0-9.0 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์

5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ทำให้เพิ่มขึ้นหรือลดลง เพราะอุณหภูมิที่สูงจะช่วยเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา ขณะเดียวกันอุณหภูมิที่สูงมากๆ ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนสภาพ (denaturation) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงลดลง จึงมีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ถ้าสูงกว่าอุณหภูมินี้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส แสดงดังตาราง 7 และ 8 ตามลำดับ

ความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นดังนี้

Hurst, *et al.* (1977) ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าที่พีเอช 4.0 เอนไซม์มีความคงตัวสูงในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์สูญเสียค่ากิจกรรมเกือบทั้งหมด ในขณะที่ Okada (1985) รายงานถึงความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* พบว่าเอนไซม์ยังมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แต่ที่อุณหภูมิ 70 เซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมเพียงครึ่งหนึ่ง และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

ตาราง 7 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	เอกสารอ้างอิง
Alternaria alternata (mutant)	55-60	Macris (1984)
Aspergillus niger	45	Hurst, *et al.* (1977)
Aspergillus niger	45-50	Okada (1985)
Aspergillus terreus ATCC 52430	55 (endoglucanase I,II)	Araujo และ D'Souza (1986)
Aspergillus terreus (mutant UNGI-40)	50 (endoglucanase I)	
	55 (endoglucanase II)	
Clostridium thermocellum ATCC 27405	70	Romaniec, *et al.* (1992)
Thermoascus aurantiacus	65 (cellulase III)	Tong, *et al.* (1980)
Trichoderma viride	60 (endo I,II,III)	Beldman, *et al.* (1985)
	48 (endo IV)	
	50 (endo V,VI)	

ตาราง 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori CMI 142717	55 (endo I) 50 (endo II) 45-50 (endo III)	Kormelink, *et al.* (1993)
Aspergillus niger	45	Frederick, *et al.* (1985)
Aspergillus niger	40-45	Ricardo, *et al.* (1985)
Aspergillus niger	45	Shei, *et al.* (1985)
Aspergillus kawachii IFO 4308	60 (XylA) 55 (XylB) 50 (XylC)	Ito, *et al.* (1992)
Aspergillus ochraceus (mutant)	50	Biswas, *et al.* (1990)
Aspergillus sp.	60	Kinoshita และ Svarachorn (1983)
Aureobasidium pullulans Y-2311-1	54	Li, *et al.* (1993)
Bacillus pumilus IPO	40	Panbangred, *et al.* (1983)
Cryptococcus flavus IFO 0407	55	Nakanishi, *et al.* (1984)
mesophilic fungus strain Y-94	80	Mitsuishi, *et al.* (1987)
Streptomyces roseiscleroticus	60	Grabski และ Jeffries (1991)
Trichoderma koningii G-39	60	Huang, *et al.* (1991)

Tong, *et al.* (1980) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Thermoascus aurantiacus* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิไม่เกิน 65 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่านี้เอนไซม์สูญเสียสภาพรวดเร็วมาก โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

ความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสของ *Clostridium thermocellum* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 50 และถ้ามีการเติม $CaCl_2$ ปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ลงไปด้วย กิจกรรมของเอนไซม์เหลือประมาณครึ่งหนึ่ง (Fauth, *et al.*, 1991) ในขณะที่ Romaniec, *et al.* (1992) พบว่า ความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิต่างๆ นั้น จากการศึกษาของ Kinoshita และ Svarachorn (1983) โดยบ่มเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus* sp. ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีความคงตัวดีและที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่ง และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Panbangred, *et al.* (1983) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus pumilus* IPO ลดลงครึ่งหนึ่งจากการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 15 นาที มีรายงานการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus flavus* IFO 0407 หลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิต่างๆ อุณหภูมิสูงสุดที่เอนไซม์มีความคงตัวดีคือ 45 องศาเซลเซียส และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Nakanishi, *et al.*, 1984)

Mitsuishi, *et al.* (1987) รายงานว่า เอนไซม์ไซลาเนสทั้งสามที่แยกได้จาก mesophilic fungus strain Y-94 คือ Xn-A, Xn-B และ Xn-C หลังจากบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ เอนไซม์ยังมีความคงตัวดี จนถึงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส Xn-C เริ่มสูญเสียความคงตัว

Li, *et al.* (1993) พบว่า ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสหลังจากบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เอนไซม์มีกิจกรรมประมาณ 73 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมของเอนไซม์มีประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จากการบ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสความคงตัวของเอนไซม์น้อยมาก

5.3 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอ่นไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

Mandels และ Reese (1965) รายงานถึงการยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลสโดยอิออนโลหะ, dyes, สารประกอบพวก sulfhydryl, halogens หรือสารประกอบที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งการยับยั้งจะแตกต่างกันออกไปในเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแหล่งจุลินทรีย์ต่างๆ

จากการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* พบว่า EDTA และสารประกอบพวก sulfhydryl ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่ Ag^{+}, Hg^{2+} และ Fe^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 75, 67 และ 55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Okada, 1985)

สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่ได้จากการโคลนยีนของ *Clostridium josui* ใน *Escherichia coli* กลุ่มสาร sulfhydryl มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยพบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์กับ N-ethylmaleimide, iodoacetoamide และ *p*-chloromercuribenzoate ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์หลังจากบ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีประมาณ 62, 42 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Fujino, *et al.*, 1990)

Fauth, *et al* (1991) พบว่า อิออนโลหะและสารยับยั้งมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum* โดย Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ NaCl ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างมาก เช่นเดียวกันกับ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ SDS เป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงมาก โดยไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เลยในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผลของ *p*-chloromercuribenzoate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ มีประมาณ 79 และ 66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ผลของอิออนและสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีรายงานการวิจัยดังนี้

Frederick, *et al.* (1985) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ถูกยับยั้งโดย Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.07 มิลลิโมลาร์ Cu^{+} ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ Al^{3+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Cu^{2+} และ Fe^{3+} ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ และที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ พบว่า Ba^{2+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+} และ Zn^{2+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แต่จากการศึกษาของ Ricardo, *et al.* (1985) พบว่า $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* เพิ่มขึ้น 50

เปอร์เซ็นต์ และ $HgCl_2$ เป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างแรงที่ความเข้มข้น 7 และ 70 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ศึกษา และการใช้ *p*-chloromercuribenzoate ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ บ่มกับเอนไซม์เป็นเวลา 30 และ 120 นาที พบว่า ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

Biswas, *et al.* (1990) รายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* ถูกกระตุ้นด้วย K^+ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แต่ Hg^{2+}, *p*-hydroxymercuri-benzoate (PHMB), 3',5'-dithiobis (2'-nitrobenzoic acid) (DTNB) และ N-ethylmaleimide (NEM) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ตาราง 9)

จากการศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 พบว่า Pb^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างแรง และ EDTA ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส (Kormelink, *et al.*, 1993)

5.4 น้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสามชนิดคือ endoglucanase, cellobiohydrolase และ β-glucosidase นั้น endoglucanase มีน้ำหนักโมเลกุลไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับ β-glucosidase ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง จากการศึกษาของ Wood (1971) พบว่า เอนไซม์ β-glucosidase จาก *Fusarium solani* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 400,000 ดาลตัน β-glucosidase จาก *Aspergillus terreus* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 275,000 ดาลตัน (Workman and Day, 1982) และ Hoh, *et al.* (1992) พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ β-glucosidase จาก *Aspergillus niger* USDB 0827 และ USDB 0828 มีประมาณ 230,000 ดาลตัน

ในส่วนของเอนไซม์ไซลาเนส น้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลลูเลส อย่างไรก็ตาม น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลาเนสก็แตกต่างกันออกไปในจุลินทรีย์แต่ละชนิด Vrsanska, *et al.* (1982 อ้างโดย Bastawde, 1992) รายงานน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลาเนสของ *Fusarium avenaceum* ไว้สูงถึง 250,000 ดาลตัน

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ ถึงแม้สายพันธุ์เดียวกันก็อาจให้น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันได้ ขึ้นอยู่กับโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์นั้นๆ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ แสดงดังตาราง 10 และ 11 ตามลำดับ

ตาราง 9 ผลของสารเคมีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus ochraceus*

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมของเอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์)
None	-	100
NaCl	50	104
KCl	50	119
$FeCl_3$	1	30
$MgCl_2$	5	90
$CaCl_2$	5	50
$MnCl_2$	5	0
$ZnCl_2$	1	76
$FeSO_4$	100	85
$CuSO_4$	100	50
$HgCl_2$	1	0
$CdCl_2$	1	0
$CoCl_2$	1	50
$NiCl_2$	1	95
PHMB	1	0
DTNB	1	0
NEM	1	0
EDTA	1	74
$Pb(CH_3COO)_2$	1	70

ที่มา: Biswas, *et al.* (1990)

ตาราง 10 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger	26,000	Hurst, *et al.* (1977)
Aspergillus niger	46,000	Ikeda, *et al.* (1967 อ้างโดย Boyer, *et al.*, 1987)
Aspergillus niger	31,000	Okada (1985)
Aspergillus terreus ATCC 52430	78,000 (endoglucanase I)	Araujo และ D'Souza (1986)
	16,000 (endoglucanase II)	
Aspergillus terreus UNGI-40	78,000 (endoglucanase I)	
	26,000 (endoglucanase II)	
Clostridium thermocellum	83,000 (endoglucanase S_S)	Fauth, *et al.* (1991)
Clostridium thermocellum ATCC 27405	76,000	Romaniec, *et al.* (1992)
Fusarium solani	37,000	Wood (1971)
Thermoascus aurantiacus	78,000 (cellulase I)	Tong, *et al.* (1980)
	34,000 (cellulase III)	
Trichoderma viride	50,000 (endo I)	Beldman, *et al.* (1985)
	45,000 (endo II)	
	58,000 (endo III)	
	23,500 (endo IV)	
	57,000 (endo V)	
	53,000 (endo VI)	

ตาราง 11 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori CMI 142717	39,000 (endo I)	Kormelink, *et al.* (1993)
	23,000 (endo II)	
	26,000 (endo III)	
Aspergillus niger	13,000	Frederick, *et al.* (1985)
Aspergillus niger	28,000	Ricardo, *et al.* (1985)
Aspergillus niger	14,000	Shei, *et al.* (1985)
Aspergillus kawachii IFO 4308	35,000 (XylA)	Ito, *et al.* (1992)
	26,000 (XylB)	
	29,000 (XylC)	
Aspergillus ochraceus	48,000	Biswas, *et al.* (1990)
Bacillus pumilus IPC	24,000	Panbangred, *et al.* (1983)
Cryptococcus flavus IFO 0407	25,000	Nakanishi, *et al.* (1984)
mesophilic fungus strain Y-94	51,000 (Xn-A)	Mitsuishi, *et al.* (1987)
	48,000 (Xn-B)	
	35,000 (Xn-C)	
Streptomyces roseiscleroticus	22,600	Grabski และ Jeffries (1991)
Trichoderma koningii G-39	21,500	Huang, *et al.* (1991)

5.5 คุณลักษณะทางด้านจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme Kinetics)

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีที่มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงสูง ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะนั้นๆ ค่าคงที่ของไมเคลิส (Michaelis constant, Km) เป็นค่าความเข้มข้นของสับสเตรต ณ อัตราเร็วครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด (Vmax) ที่เอนไซม์สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้

Tong, *et al.* (1980) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Thermoascus aurantiacus* มีค่า Km ของ cellulase I และ cellulase III เท่ากับ 3.9 และ 1.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ค่า Km และ Vmax ของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Alternaria alternata* คือ 16.64 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 15.81 ไมโครโมล/มิลลิกรัม/นาที ตามลำดับ (Macris, 1984)

Okada (1985) รายงานค่า Km ของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* คือ 0.086 เปอร์เซ็นต์ และสรุปเปรียบเทียบค่า Km จากจุลินทรีย์ต่างๆ (ตาราง 12)

เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* ประกอบด้วยเอนไซม์ 6 ชนิด คือ Endo I, Endo II, Endo III, Endo IV, Endo V และ Endo VI มีค่า Km เป็น 46.3, 90.6, 14.4, 130.7, 64.3 และ 122.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ Vmax มีค่าเท่ากับ 0.196, 0.099, 0.085, 0.152, 0.133 และ 0.122 ไมโครโมล/มิลลิกรัม/นาที ตามลำดับ (Beldman, *et al.* 1987)

สำหรับเอนไซม์ไซลาเนส ค่า Km และ Vmax มีค่าแตกต่างกันออกไป จากการศึกษาของ Nakanishi, *et al.* (1984) เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus flavus* IFO 0407 มีค่า Km เท่ากับ 3.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Biswas, *et al.* (1990) รายงานค่า Km และ Vmax ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* (mutant) มีค่าเท่ากับ $1x10^{-3}$ โมล/มิลลิลิตร และ 19.6 ไมโครโมล/มิลลิกรัม/นาที ตามลำดับ ค่า Km และ Vmax ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Streptomyces roseiscleroticus* มีค่าเท่ากับ 7.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 305 ไมโครโมล/มิลลิกรัม/นาที ตามลำดับ (Grabski and Jeffries, 1991) และจาก *Trichoderma koningii* G-39 ค่า Km เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Vmax เท่ากับ $1.85x10^{6}$ ไมโครโมล/มิลลิกรัม/นาที (Huang, *et al.*, 1991)

Kormelink, *et al.* (1993) ศึกษาค่า Km และ Vmax ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 ซึ่งมีเอนไซม์ 3 ชนิดที่แยกได้ คือ Endo I, Endo II และ Endo III ค่า Km มีค่าเท่ากับ 1.00, 0.33 และ 0.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ Vmax มีค่าเท่ากับ 10,000, 3,333 และ 455 ยูนิต/มิลลิกรัมตามลำดับและจาก *Aureobasidium pullulans*

ตาราง 12 ค่า Km ของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์		Km (เปอร์เซ็นต์)
Aspergillus niger		0.086
Trichoderma viride	II-A	0.081
	II-B	0.096
	III	0.054
Hypocrea nigricans	II-C	0.064
	III-B	0.066

ที่มา: Okada (1985)

Y-2311-1 ค่า Km เท่ากับ 7.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Vmax เท่ากับ 2,650 ไมโครโมล/มิลลิกรัม/นาที (Li, *et al.*, 1993)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการแยก และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เจริญในอาหารแข็งกากปาล์ม
2. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสที่แยกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

กากปาล์ม ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานรุ่งเรืองกิจน้ำมันพืช ตำบลพะตง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา บดกากปาล์มด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ (ของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

2. จุลินทรีย์

ใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ซึ่งเก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้สร้างสปอร์เต็มที่ก่อนเก็บในตู้เย็น

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยกากปาล์ม และสารอาหาร ซึ่งมีสารละลายโพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.05 เปอร์เซ็นต์ โปรตีโอสเปปโตน 0.05 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์

4. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ การหาปริมาณโปรตีน การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ดูในภาคผนวก ก, ข

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง model B3100 S และ เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง model A210 P ของบริษัท Sartorius
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Model HM-7E ของบริษัท Tokyo TOA Electronic Ltd.

3. เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer) ของบริษัท Lab-line Instruments

4. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) Model himac SCR 20B ของบริษัท Hitachi Koki Co., Ltd.

5. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ U-2000 ของบริษัท Hitachi Koki Co., Ltd.

6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

7. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

8. กล้องจุลทรรศน์ของบริษัท Olympus

9. ชุด Diaflo Ultrafiltration Model 8050 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อม PM 10 membrane (ยอมให้สารน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยกว่า 10,000 ผ่านได้) ของบริษัท Amicon

10. ชุดคอลัมน์โครมาโตรกราฟีของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals ขนาด 1.5X39.5 เซนติเมตร

11. ชุด Fraction collector (LKB 2212 Helirac) พร้อม Peristaltic pump (LKB 2232 Microperpex S) ของบริษัท LKB

12. ชุดอิเลคโตรโฟรีซิส Mini-Protein II Dual Slab Cell พร้อม Power Supply Model 1000/500 ของบริษัท Bio Rad Laboratories

วิธีการ

1. การวิเคราะห์

1.1 การนับสปอร์ของเชื้อรา เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ หยดลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ นับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า

1.2 ความชื้น ตามวิธีของ A.O.A.C. (1984) ดูในภาคผนวก ข ข้อ 1

1.3 โปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951) ภาคผนวก ข ข้อ 2

1.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลส (CMCase) ตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในซิเตรตบัฟเฟอร์

(citrate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการหาน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Miller (1959) โดยการเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid reagent (DNS) ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เทียบค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข ข้อ 3.1)

ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จะมีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกันแต่ไม่นำไปบ่ม โดยเติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้ม และทำตามวิธีการข้างต้น และสำหรับ blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร ในการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ นำค่าปริมาณกลูโคสที่เทียบจากกราฟมาตรฐานของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าปริมาณกลูโคสของการใช้สารละลายเอนไซม์ แล้วคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ออกมา มีหน่วยเป็นยูนิตโดยที่

1 ยูนิต (U) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้วิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน

1.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีของ Tan, *et al.* (1987)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายไซแลน (Oat Spelts) ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อกเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำชุดควบคุม และ blank เช่นเดียวกันกับการหากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เทียบค่าปริมาณไซโลสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข ข้อ 3.2) คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์มีหน่วยเป็นยูนิต โดยที่

1 ยูนิต (U) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้วิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน

1.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ตามวิธีของ Laemmli (1970 อ้างโดย พิณทิพ รื่นวงษา, 2536; คู่มือการใช้ Mini-Protein II Dual Cell ของบริษัท Bio-Rad Laboratories) ดูในภาคผนวก ข ข้อ 4

2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์

2.1 การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา

✓ 2.1.1 <u>การเตรียมสปอร์เชื้อรา</u> โดยเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในหลอดขนาด 16x150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารวุ้นเอียง PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์ ใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ แยกสปอร์ออกโดยการเติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ให้หลุดจากเส้นใยและเจือจางสปอร์ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

✓ 2.1.2 <u>การเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส</u> ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในสภาพอาหารแข็ง (solid state) ในถุงพลาสติกทนร้อน (ขนาด 10x15 นิ้ว) อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยกากปาล์ม 30 กรัม และสารอาหาร 30 มิลลิลิตร (ดูในวัสดุข้อ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อ) คลุกเคล้าให้ทั่ว ปากถุงสวมด้วยปลอกกระดาษแข็งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมสปอร์เชื้อรา (จากข้อ 2.1.1) ในปริมาณ $1x10^6$ สปอร์ต่อกรัมอาหารกากปาล์ม คลุกสปอร์ให้ทั่ว โดยการขยำถุงพลาสติก แล้วเกลี่ยให้กระจายเป็นแผ่นบางๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ในระหว่างที่บ่มจะกลับถุงอาหาร 2-3 ครั้ง เพื่อให้อากาศในถุงมีการถ่ายเทที่ดีจะทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น

✓ 2.1.3 <u>การสกัดเอนไซม์</u> เติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ลงไปในปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (2,800*xg*) เป็นเวลา 50 นาที นำสารละลายส่วนใสซึ่งใช้เป็น crude enzyme วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนส และปริมาณโปรตีนเริ่มต้น

2.2 การแยกและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

2.2.1 <u>การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u> นำ crude enzyme ที่ได้มาทำ salt fractionation เพื่อหาช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวดังนี้ 60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละระดับจะเติมแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยๆ โดยใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่กำหนดไว้ในภาคผนวก ก ข้อ 5 ขณะเติมจะมีการกวนอย่างช้าๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) แล้วทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส แยกตะกอนโปรตีนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735 *xg*) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้แต่ละขั้นตอนมาละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 โดยใช้บัฟเฟอร์ปริมาณเล็กน้อยในการละลายตะกอนโปรตีน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ไซลาเนส และปริมาณโปรตีนในสารละลายที่ได้

2.2.2 กำจัดเกลือโดยการไดแอไลซิส (dialysis) นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.2.1 มาทำไดแอไลซ์ โดยใช้ถุงไดแอไลซ์ที่ให้น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 8,000 ผ่านได้ ในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ในอัตราส่วนสารละลายเอนไซม์ต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:50 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในระหว่างการไดแอไลซ์จะเปลี่ยนบัฟเฟอร์ในช่วงแรกๆ 3-4 ครั้ง กวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดแอไลซ์มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที (12,735 *xg*) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอนอื่นๆ ออกไป เก็บสารละลายเอนไซม์ส่วนใสไว้ แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ไซลาเนส และปริมาณโปรตีน

2.2.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.2.3.1 การแยกด้วยเจล (Gel filtration column chromatography) เจลที่ใช้คือ Sephadex G-75 เตรียมตามภาคผนวก ก ข้อ 4.1 นำมาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1.5x39.5 เซนติเมตร ปรับสมดุลของเจลในคอลัมน์โดยการชะด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 2 bed volumn นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.2.2 มาหยอดลงในคอลัมน์ ชะด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน อัตราการไหลของตัวชะ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายเอนไซม์ในหลอดทดสอบ หลอดละ 4 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง fraction collector นำเอนไซม์ในแต่ละหลอดมาหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ CMCase และไซลาเนส

รวมสารละลายเอนไซม์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชันที่มี PM 10 membrane เป็นตัวกรอง

2.2.3.2 การแยกด้วยเรซิน (Ion exchange column chromatography) เรซินที่ใช้คือ DEAE-Trisacryl type M เตรียมตามภาคผนวก ก ข้อ 4.2 นำมาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1.5x39.5 เซนติเมตร ปรับสมดุลของเรซินโดยการชะด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 2 bed volume นำสารละลายเอนไซม์ซึ่งทำให้เข้มข้นแล้วจากข้อ 2.2.3.1มาหยอด

ลงบนคอลัมน์อย่างระมัดระวัง จนเป็นชั้นบางๆ ของสารละลายเอนไซม์บนเรซิน ชะเอนไซม์ออกโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงพีเอชและความเข้มข้นของอิออนของบัฟเฟอร์ คือ ใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ชะในอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นปริมาตร 2-3 bed volume แล้วใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8 ชะในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตร 2-3 bed volume เก็บสารละลายเอนไซม์ในหลอดทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วยเครื่อง fraction collector นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละหลอดหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนส รวมสารละลายเอนไซม์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน โดยใช้ PM 10 membrane

เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้าย จะนำมาศึกษาคุณสมบัติในขั้นตอนต่อไป

2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนส

2.3.1 <u>พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์</u> นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้าย (ข้อ 2.2.3.2) ที่มีความเข้มข้นอย่างเหมาะสม วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการวิเคราะห์ที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ใช้สารละลาย CMC ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ คือ ใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0, 7.5 และ 8.0 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ใช้สารละลายไซแลนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ละลายในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ เช่นเดียวกัน คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

2.3.2 <u>ความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ</u> โดยนำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้าย 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ 0.4 มิลลิลิตร คือใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0, 7.5 และ 8.0 เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์พีเอชเหมาะสมที่สุด ก่อนนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรตที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากผลการ

ทดลองข้อ 2.3.1 คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

2.3.3 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์</u> นำเอนไซม์จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายที่เจือจางจนมีความเข้มข้นอย่างเหมาะสม มาหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 2.3.1) โดยบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที และ 10 นาที สำหรับเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสตามลำดับ คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์

2.3.4 <u>ความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ</u> นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายที่มีความเจือจางอย่างเหมาะสม นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ทำเอนไซม์ให้เย็นโดยแช่ในถาดน้ำแข็ง ตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์ที่พีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 2.3.1) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ

2.3.5 <u>ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง</u> นำเอนไซม์จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายที่มีความเจือจางอย่างเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตร ซึ่งมีอิออนโลหะ Ag^{2+}, Hg^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+} และ K^{+} ละลายอยู่ ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โดยผสมกับสับสเตรตที่มีพีเอชเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของอิออนโลหะคือ 0.1, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์

สำหรับผลของสารยับยั้งโดยศึกษาผลของสาร EDTA, 4-chloromercuribenzoic acid, 5,5' dithiobis (2'-nitrobenzoic acid), N-ethylmaleimide N-acethylmaleinimid, *p*-chloro-mercuribenzoate ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ วิธีการศึกษาเช่นเดียวกันกับวิธีการศึกษาผลของอิออนโลหะ

2.3.6 <u>การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์</u> โดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสชนิด SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range ของบริษัท Bio Rad Laboratories จำกัด ซึ่งมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนคือ 6,500 ถึง 200,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 9 ชนิด คือ aprotinin, lysozyme, trypsin inhibitor, carbonic anhydrase, ovalbumin, serum albumin, phosphorylase B, β-galactosidase และ myosin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 6,500, 14,400, 21,500, 31,000, 45,000, 66,200, 97,400,

116,250 และ 200,000 ดาลตัน ตามลำดับ

2.3.7 ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ Km และ Vmax

2.3.7.1 ศึกษาค่า Km และ Vmax ของเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase)

ขั้นแรกเป็นการศึกษาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial velocity) ที่เร่งโดยสารละลายเอนไซม์ ซึ่งมีความเข้มข้นอย่างเหมาะสมที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างๆ คือ ใช้สารละลาย CMC ที่มีความเข้มข้นดังนี้ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ บ่มสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสับสเตรตปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้นของสารละลาย CMC ต่างๆ บนแกน Y กับเวลา (นาที) บนแกน X ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา หาได้จากการอ่านค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาหนึ่งที่ระยะเริ่มต้นที่ให้กราฟเป็นเส้นตรง (อาจใช้ค่าความชันของกราฟในช่วงที่เป็นเส้นตรงมาคำนวณ) นำค่าความเร็วเริ่มต้นที่ได้กับความเข้มข้นต่างๆ ของสับสเตรตมาเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk plots คือแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ และ $1/[S]$ บนแกน Y และ X ตามลำดับ คำนวณหาค่า Km และ Vmax จากจุดตัดบนแกน X คือ $-1/Km$ และจุดตัดบนแกน Y คือ $1/Vmax$ (Robyt and White, 1987)

2.3.7.2 ศึกษาค่า Km และ Vmax ของเอนไซม์ไซลาเนส

ศึกษาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา ที่เร่งโดยสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นอย่างเหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างๆ คือ ใช้สารละลายไซแลนที่มีความเข้มข้นดังนี้ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายในบัฟเฟอร์ พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์บ่มเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับสับสเตรต ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในเวลาต่างๆ คือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

คำนวณความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา เหมือนวิธีการที่กล่าวไว้เบื้องต้น และเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk plots เพื่อคำนวณค่า Km และ Vmax

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา

ผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275 โดยการหมักแบบอาหารแข็งที่มีกากปาล์มเป็นองค์ประกอบตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้เอนไซม์ 1700 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.69 ยูนิต/มิลลิลิตร (4.14 ยูนิต/กรัมกากปาล์ม) ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ของ CMCase 0.28 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ (total activity) ของ CMCase เท่ากับ 1173 ยูนิต และเอนไซม์ที่ได้นี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 2.24 ยูนิต/มิลลิลิตร (13.43 ยูนิต/กรัมกากปาล์ม) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 0.91 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และมีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 3808 ยูนิต

2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

2.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ขั้นแรกนำเอนไซม์ (crude enzyme) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.69 ยูนิต/มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 6.23 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีน 1.59 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ คือ 60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ แยกตะกอนออกโดยการหมุนเหวี่ยง ละลายตะกอนที่ได้โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4. 8 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ไซลาเนสและปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วน (ตาราง 13) จากผลการทดลองจะเห็นว่า เอนไซม์ไซลาเนสจะตกตะกอนได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสอยู่เล็กน้อย ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 60-70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอนไซม์ CMCase ตกตะกอนได้ดีที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตจนถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และในช่วงความเข้มข้นอื่นๆ นั้น จะเห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงกว่า crude enzyme แต่เนื่องจากปริมาณโปรตีนซึ่งส่วนใหญ่เป็นของเอนไซม์ไซลาเนสมีปริมาณที่มากกว่า ทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMase ไม่สูงมากนัก ดังนั้นเอนไซม์ CMCase จึงน่าจะตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวในช่วงกว้าง

ตาราง 13 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวในช่วงต่างๆ ของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนส จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)		Specific activity (U/mg)	
			CMCase	Xylanase	CMCase	Xylanase
Crude enzyme	100	1.59	0.69	6.23	0.43	3.92
60% sat.$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	10	3.78	1.58	26.97	0.42	7.13
60-70%sat.$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	10	3.48	1.54	12.17	0.44	3.49
70-80%sat.$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	10	1.90	0.93	0.034	0.49	0.02
80-90%sat.$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	5	1.70	0.29	-	0.17	-

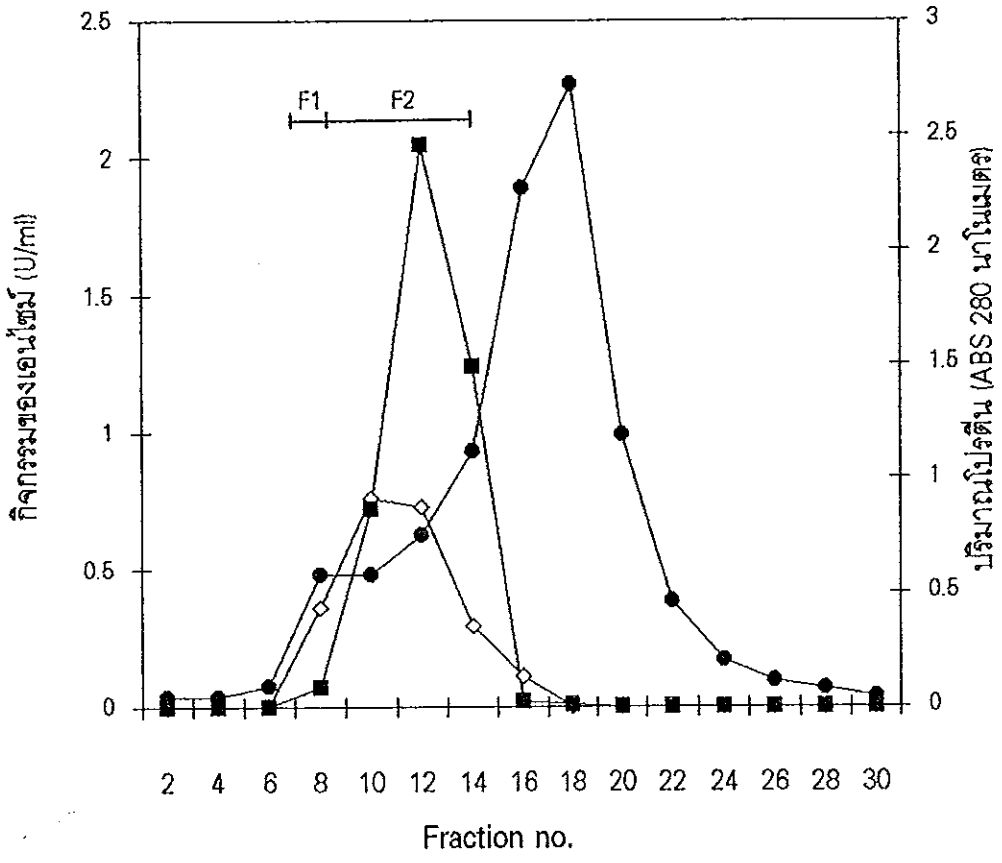
- ไม่ได้วิเคราะห์ผล

ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟตจนถึงความเข้มข้นอิ่มตัวที่ 80 เปอร์เซ็นต์ แยกตะกอนโปรตีนออกโดยการหมุนเหวี่ยง ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ได้ปริมาตร 160 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 5.90 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 17.12 ยูนิต/มิลลิลิตรและปริมาณโปรตีน 10.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อกำจัดเกลือโดยการไดแอไลซิสได้เอนไซม์มีปริมาตร 201 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 4.32 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.66 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 868.32 ยูนิต คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ได้ 74.03 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 2.36 เท่า และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 12.07 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 1.85 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 2426.07 ยูนิต ได้เอนไซม์ 63.71 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เป็น 2.03 เท่า (ตาราง 14)

2.2 การแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด Gel filtration column

นำเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่านไดแอไลซิสมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 แล้วชะโปรตีนออกด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 คอลัมน์ชนิดนี้เป็นคอลัมน์ที่ใช้แยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ดังนั้นความยาวของคอลัมน์จึงมีผลต่อการแยกโปรตีนแต่ละตัว จากลักษณะของกราฟที่ได้ (รูป 6) จะเห็นโปรตีนแยกออกเป็นยอด peak 2 ยอด โดยแยกจากกันไม่ชัดเจน เมื่อเก็บแต่ละส่วนมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ส่วนใหญ่จะอยู่ในโปรตีน peak เล็ก ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ในขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโปรตีนส่วนอื่นๆ ออกไปได้ค่อนข้างมาก ซึ่งโปรตีนที่กำจัดออกไปได้นี้มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าโมเลกุลของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนส สำหรับ peak กิจกรรมของเอนไซม์ประกอบด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase หลุดออกมาในช่วงแรก ก่อนกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเล็กน้อย โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ใน peak เดียวกันกับกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส แสดงว่า ขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ไซลาเนสมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองที่ได้ เก็บเอนไซม์เป็น 2 ส่วน คือ F1 เก็บ จาก fraction ที่ 7-8 และ F2 เก็บจาก fraction ที่ 9-14

ในส่วน F1 หลังจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ได้ปริมาตรรวม 624 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.26 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 1.86 ยูนิต/



รูป 6 การแยกเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ด้วย Sephadex G-75 คอลัมน์ขนาด 1.5 X 39.5 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 4 มิลลิลิตรต่อหลอด

—●— ปริมาณโปรตีน —◇— กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

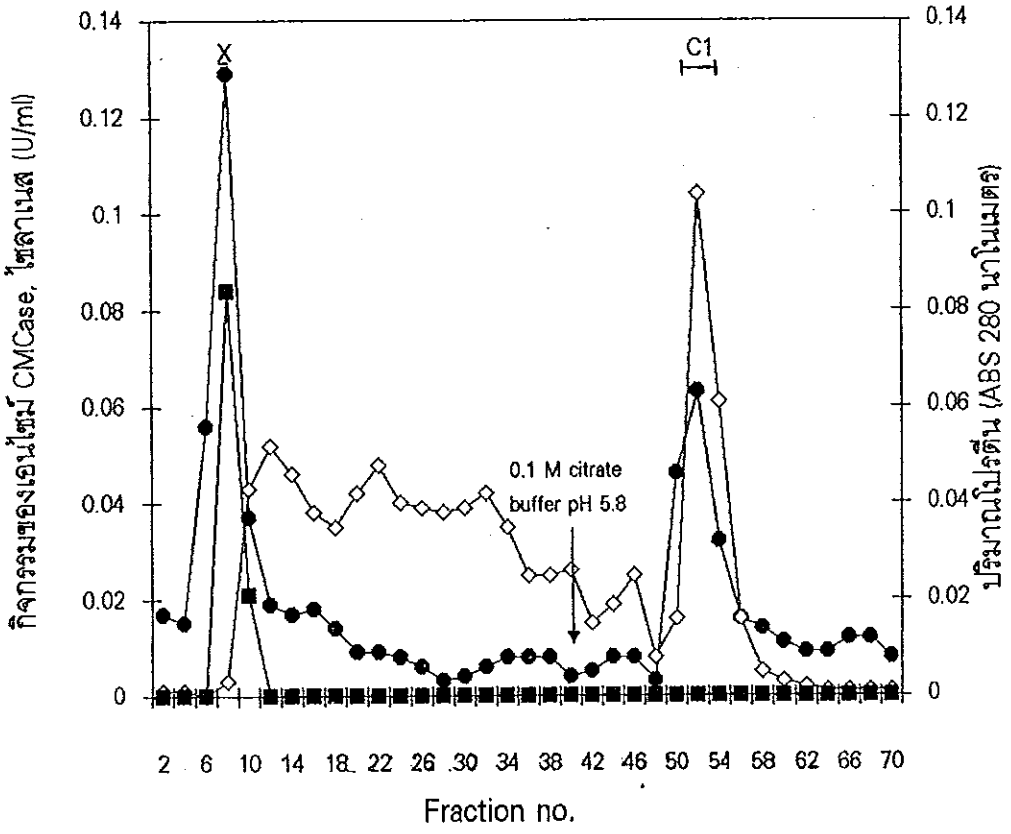
—■— กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 162.24 ยูนิต คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ได้ 13.83 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 6.64 เท่า และในส่วน F1 นี้ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 0.05 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เป็น 0.36 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์เท่ากับ 31.2 ยูนิต ได้เอนไซม์ 0.82 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์ 0.40 เท่า นำเอนไซม์ที่ได้มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน โดยใช้ PM 10 membrane ได้เอนไซม์มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 12.16 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 2.59 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 121.6 ยูนิต ได้เอนไซม์ 10.37 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 9.25 เท่า โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 2.45 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 0.52 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 24.5 ยูนิต คิดเป็นเอนไซม์ที่ได้ 0.64 เปอร์เซ็นต์และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 0.57 เท่า

สำหรับ F2 ซึ่งเก็บตัวอย่างจาก fraction ที่ 9-14 ได้เอนไซม์รวม 1872 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.33 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 1.27 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 617.76 ยูนิต ได้เอนไซม์ทั้งหมด 52.66 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์ 4.54 เท่า และเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 0.88 ยูนิต/ มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 3.38 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 1647.36 ยูนิต ได้เอนไซม์ทั้งหมด 43.26 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 3.71 เท่า หลังจากทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน ได้เอนไซม์มีปริมาตร 15 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 36.43 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 1.92 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 546.45 ยูนิต ได้เอนไซม์ทั้งหมด 46.59 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เป็น 6.86 เท่า และเอนไซม์ที่ได้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 76.99 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 4.06 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 1154.85 ยูนิต ได้เอนไซม์ 30.33 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 4.46 เท่า

2.3. การแยกด้วยโครมาโตกราฟีชนิด DEAE-Trisacryl column

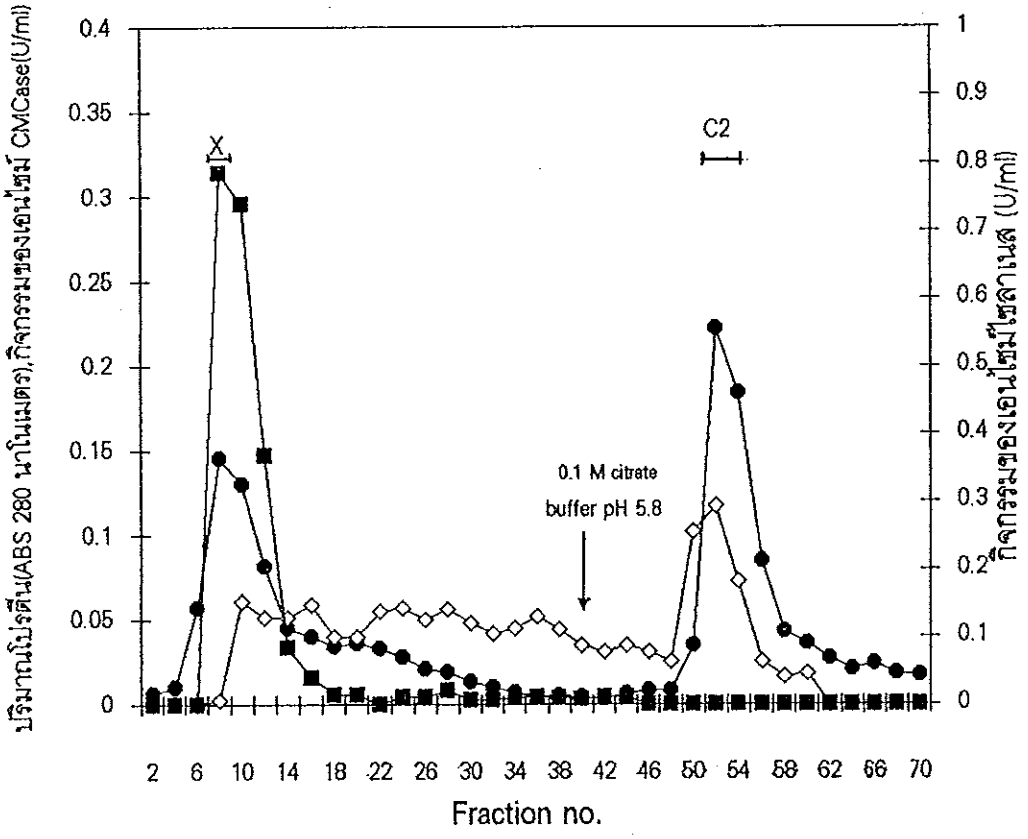
นำเอนไซม์ในส่วน F1 และ F2 ที่ทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชันมาแยกต่อโดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Trisacryl type M ซึ่งเป็น anion exchangers ชะโปรตีนออกด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตรประมาณ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ แล้วชะต่อด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8 แสดงดังรูป 7 และ 8 ตามลำดับ



รูป 7 การแยกเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ของ fraction F1 ด้วย DEAE-Trisacryl (type M) คอลัมน์ขนาด 1.5 X 39.5 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 และซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด

—●— ปริมาณโปรตีน —◇— กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

—■— กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส



รูป 8 การแยกเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ของ fraction F2 ด้วย DEAE-Trisacryl (type M) คอลัมน์ขนาด 1.5 X 39.5 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 และซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด

—●— ปริมาณโปรตีน —◇— กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

—■— กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

ลักษณะของกราฟทั้งสองมีความคล้ายคลึงกัน คือ ประกอบด้วยยอด peak โปรตีน 2 peak และ peak กิจกรรมของเอนไซม์ 2 peak ซึ่ง peak ของโปรตีนตรงกันกับ peak กิจกรรมของเอนไซม์ และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกชะออกมาก่อนในช่วงแรก แสดงว่าโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสไม่เกาะตัวกับเรซิน นอกจากนี้ยังพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase บางส่วนถูกชะออกมาเช่นกัน โดยให้ peak ที่ไม่ชัดเจน เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นและพีเอชของบัฟเฟอร์ จะให้ peak ของเอนไซม์ CMCase ที่ชัดเจน และตรงกันกับ peak ของโปรตีน จึงเก็บ fraction 2 ส่วน คือส่วนที่ให้ peak กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูง และส่วนที่ให้ peak กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูง ใน F1 จะเห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกชะออกมาก่อน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงใน fraction ที่ 8 หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดน้อยลง และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ตั้งแต่ fraction ที่ 12 เป็นต้นไป ใน fraction ของเอนไซม์ไซลาเนสนี้พบว่า ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase บางส่วนปนอยู่เล็กน้อย โดยให้ยอด peak ในช่วงหลัง ดังนั้นจึงเก็บเอนไซม์ไซลาเนสใน fraction ที่ 8 และเอนไซม์ CMCase เก็บจาก fraction ที่ 51-54 (C1)

สำหรับ F2 พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงใน fraction ที่ 8 หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดน้อยลงเรื่อยๆ และใน fraction ของเอนไซม์ไซลาเนสก็มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase บางส่วน โดยให้ยอด peak กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ในช่วงหลังเช่นเดียวกันกับลักษณะกราฟของ F1 โดยใน F2 นี้จะให้ peak กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงกว่า peak ใน F1 ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสจึงเก็บที่ fraction 7-9 และกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เก็บที่ fraction 51-54 (C2) รวม fraction กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก F1 และ F2 เข้าด้วยกัน (X) เพราะน่าจะเป็นเอนไซม์ตัวเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากกราฟที่ได้ ได้เอนไซม์ทั้งหมด 533 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 0.678 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 14.13 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 361.37 ยูนิต ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ 9.49 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เป็น 15.53 เท่า และเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้นี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.017 ยูนิต/มิลลิลิตร มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 0.35 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 9.06 ยูนิต ได้เอนไซม์ 0.77 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 1.25 เท่า นำเอนไซม์ส่วนนี้มาทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน ได้เอนไซม์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 4.822 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 15.02 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 482.2 ยูนิต ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ 12.66 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 16.51 เท่า

โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.093 ยูนิต/มิลลิลิตร มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 0.29 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์รวม 9.3 ยูนิต ได้เอนไซม์ 0.79 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เป็น 1.04 เท่า

ใน fraction ของเอนไซม์ CMCase (C1) ได้เอนไซม์ทั้งหมด 333 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.059 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 4.54 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 19.65 ยูนิต ได้เอนไซม์ 1.68 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 16.21 เท่า และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชันได้เอนไซม์ปริมาตร 123 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.128 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 5.33 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 15.74 ยูนิต ได้เอนไซม์ 1.34 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 19.04 เท่า และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 0.009 ยูนิต/มิลลิลิตร มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 0.38 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 1.11 ยูนิต ได้เอนไซม์ 0.03 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์ 0.42 เท่า ใน fraction ของเอนไซม์ CMCase (C2) ได้ปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด 600 มิลลิลิตร มี กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase 0.097 ยูนิต/มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 3.03 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน มีกรรมรวมของเอนไซม์ 58.20 ยูนิต ได้เอนไซม์ 4.96 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 10.82 เท่า และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชันได้เอนไซม์มีปริมาตร 220 มิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์ CMCase 0.227 ยูนิต/ มิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 2.87 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 49.94 ยูนิต คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ 4.26 เปอร์เซ็นต์ ได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 10.25 เท่า และพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 0.037 ยูนิต/มิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 0.47 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน มีกิจกรรมรวมของเอนไซม์ 8.14 ยูนิต คิดเป็นเอนไซม์ 0.21 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 0.52 เท่า จะเห็นว่าเอนไซม์ CMCase C1 และ C2 เมื่อนำมาทำให้เข้มข้นขึ้น เอนไซม์ทั้งสองส่วนนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากก่อนการทำให้เข้มข้น โปรตีนเอนไซม์ไซลาเนสอาจมีความเจือจางมาก ทำให้ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ที่ได้ในขั้นตอนนี้จะใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 14 ผลการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งกากปาล์ม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Percent yield	Purification factor	Remark
Crude enzyme	1700	2.47	0.69	0.28	1173	100	1.00	CMCase
			2.24	0.91	3808	100	1.00	Xylanase
80% sat. $(NH_4)_2SO_4$								
precipitate	160	10.31	5.90	0.57	944.00	80.48	2.04	CMCase
			17.12	1.66	2739.20	71.93	1.82	Xylanase
Dialysis	201	6.51	4.32	0.66	868.32	74.03	2.36	CMCase
			12.07	1.85	2426.07	63.71	2.03	Xylanase
Sephadex G-75								
F_1	624	0.14	0.26	1.86	162.24	13.83	6.64	CMCase
			0.05	0.36	31.20	0.82	0.40	Xylanase

ตาราง 14 (ต่อ)

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Percent yield	Purification factor	Remark
F_2	1872	0.260	0.33	1.27	617.76	52.66	4.54	CMCase
			0.88	3.38	1647.36	43.26	3.71	Xylanase
Ultrafiltration								
PM 10 membrane								
F_1	10	4.700	12.16	2.59	121.60	10.37	9.25	CMCase
			2.45	0.52	24.50	0.64	0.57	Xylanase
F_2	15	18.960	36.43	1.92	546.45	46.59	6.86	CMCase
			76.99	4.06	1154.85	30.33	4.46	Xylanase
DEAE-Trisacryl								
X	533	0.048	0.017	0.35	9.06	0.77	1.25	CMCase
			0.678	14.13	361.37	9.49	15.53	Xylanase

ตาราง 14 (ต่อ)

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Percent yield	Purification factor	Remark
C_1	333	0.013	0.059	4.54	19.65	1.68	16.21	CMCase
			-	-	-	-	-	Xylanase
C_2	600	0.032	0.097	3.03	58.20	4.96	10.82	CMCase
			-	-	-	-	-	Xylanase
Ultrafiltration								
PM 10 membrane								
X	100	0.321	0.093	0.29	9.30	0.79	1.04	CMCase
			4.822	15.02	482.20	12.66	16.51	Xylanase
C_1	123	0.024	0.128	5.33	15.74	1.34	19.04	CMCase
			0.009	0.38	1.11	0.03	0.42	Xylanase
C_2	220	0.079	0.227	2.87	49.94	4.26	10.25	CMCase
			0.037	0.47	8.14	0.21	0.52	Xylanase

3. คุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275

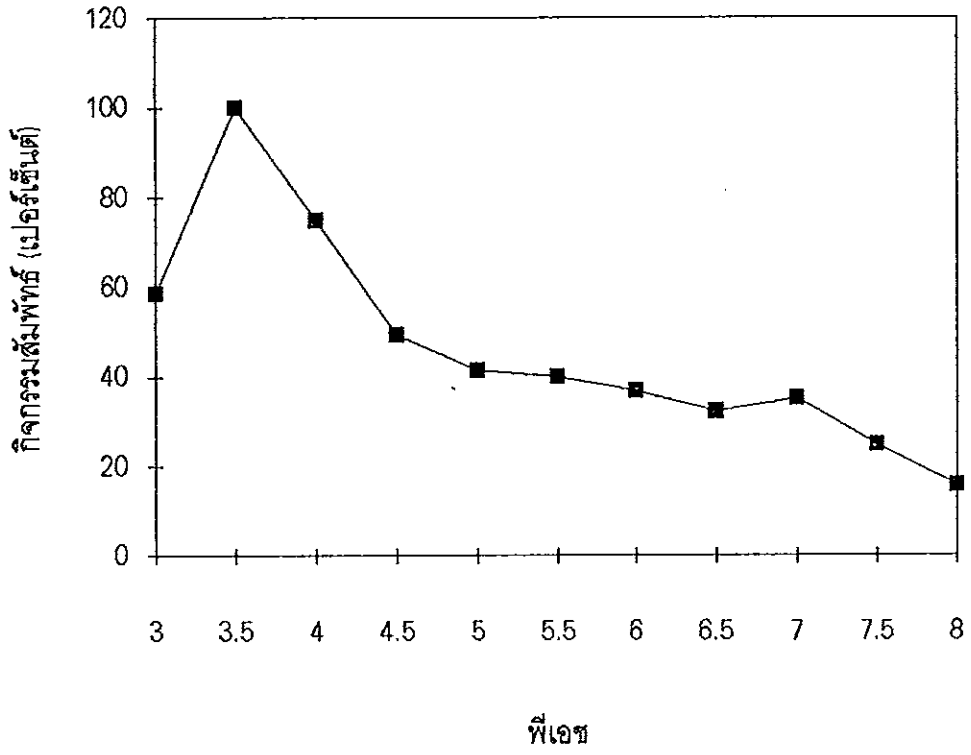
ใช้สารละลายเอนไซม์ CMCase ส่วน C1, C2 และสารละลายเอนไซม์ไซลาเนสส่วน X ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2.3 สำหรับตรวจสอบคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ในด้านต่างๆ ซึ่งพบว่าสารละลายเอนไซม์ CMCase C1 และ C2 มีคุณสมบัติในด้านต่างๆ ที่เหมือนกัน ทั้งนี้เป็นเพราะสารละลายเอนไซม์ CMCase C1 และ C2 คือเอนไซม์ตัวเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากผลของการแยกเอนไซม์หลังจากผ่าน DEAE-Trisacryl column ซึ่งให้ peak กิจกรรมของเอนไซม์ใน fraction เดียวกัน คุณสมบัติในการทำงานของเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนเป็นดังนี้

3.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสของสารละลายเอนไซม์ในช่วงพีเอชต่างๆกันคือ 3.0-8.0 พบว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรรมของเอนไซม์ CMCase (optimum pH) คือ 3.5 โดยที่พีเอช 3.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 58.66 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 4.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์ 74.95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มพีเอชสูงขึ้นเอนไซม์มีกิจกรรมลดลงจนถึงพีเอช 8.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เพียง 15.61 เปอร์เซ็นต์ (รูป 9)

จากรายงานการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า เอนไซม์เซลลูเลส (CMCase) จาก *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 3.8-4.0 (Hurst, *et al.*, 1977) แต่จากการศึกษาของ Ikeda, *et al.* (1967 อ้างโดย Boyer, *et al.*, 1987) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* คือ 2.5 และ Okada (1985) รายงานว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* คือ 4.0 จะเห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วงค่อนข้างเป็นกรด ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ ซึ่งพบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 คือ 3.5 จึงอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์เซลลูเลสจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา

สำหรับเอนไซม์ไซลาเนสพบว่า เมื่อพีเอชต่ำ กว่า 4.0 กิจกรรมของเอนไซม์จะต่ำที่พีเอช 4.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 95.87 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 4.5 เมื่อเพิ่มพีเอชสูงกว่านี้กิจกรรมของเอนไซม์ค่อยๆ ลดลง ที่พีเอช 5.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 96.90 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมที่ใกล้เคียงกันในพีเอชช่วง 4.0-5.0 หลัง



รูป 9 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

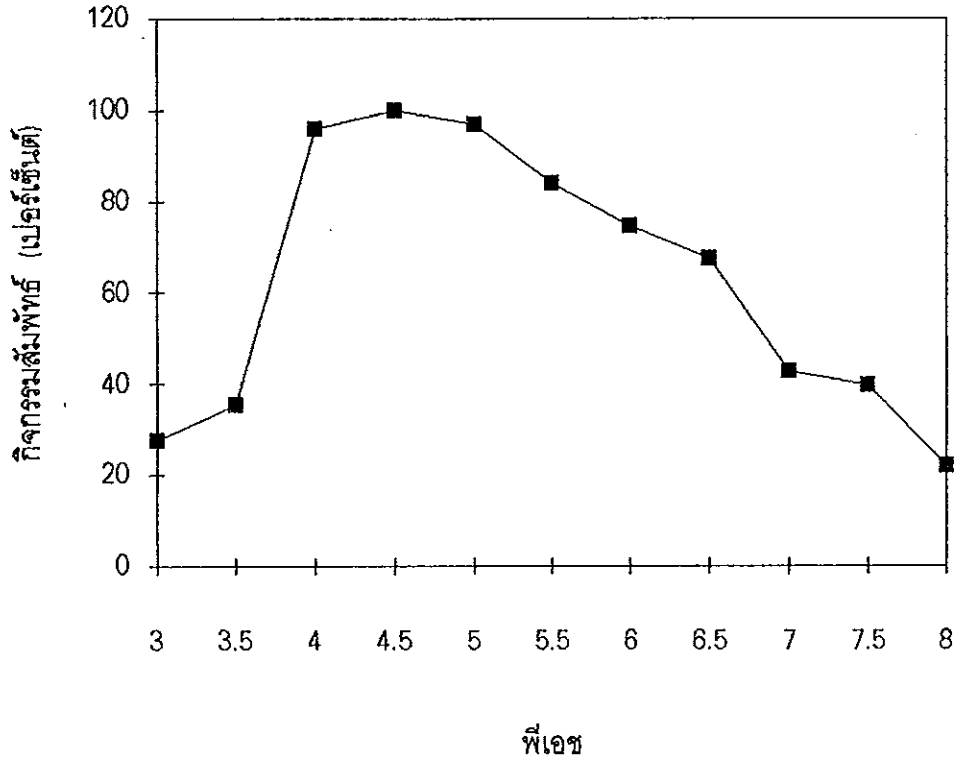
จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และเอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เพียง 21.98 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 8.0 (รูป 10)

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีรายงานว่า เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 4.9-6.0 (Frederick, *et al.*, 1985; Shei, *et al.*, 1985) เอนไซม์ไซลาเนส XylA, XylB และ XylC จากเชื้อ *Aspergillus kawachii* IFO 4308 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 5.5, 4.5 และ 2.0 ตามลำดับ (Ito, *et al.*, 1992) และเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ endo I, endo II และ endo III คือ 5.5-6.0, 5.0 และ 4.0 ตามลำดับ (Kormelink, *et al.*, 1993) จะเห็นว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus* ชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อยเช่นกัน แต่ค่าพีเอชเหมาะสมจะสูงกว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ CMCase จากผลการทดลองที่ได้ ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 คือ 4.5 จึงอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Aspergillus* จากรายงานผลการศึกษาที่ผ่านมา

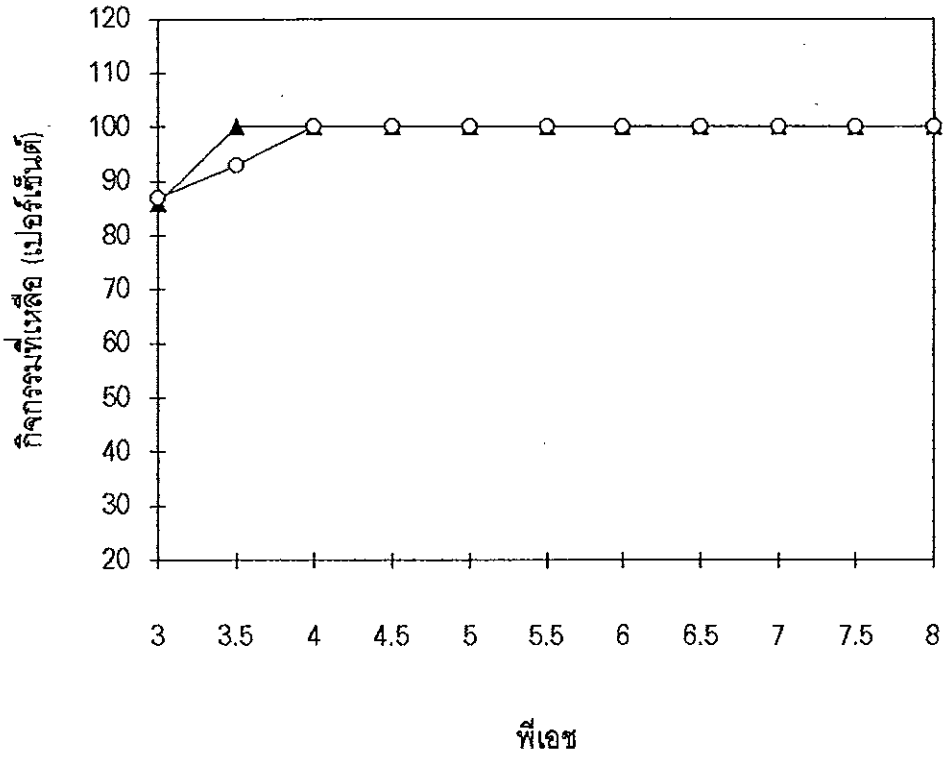
3.2 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์

จากการทดลองเมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์ CMCase หรือสารละลายเอนไซม์ไซลาเนสในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ กัน คือ 3.0-8.0 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า การบ่มเอนไซม์ CMCase ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ในช่วงพีเอช 4.0-8.0 ขณะที่พีเอช 3.0 และ 3.5 เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 87.0 และ 93.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และถ้าบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 3.5-8.0 โดยยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ที่พีเอช 3.0 เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ (รูป 11)

มีรายงานการศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* พบว่า เอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 1.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Hurst, *et al.*, 1977) และถ้าบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 5.0-8.0 และเอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 5.5-6.5 เมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 2



รูป 10 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน



รูป 11 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

—○— บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

—▲— บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Okada, 1985)

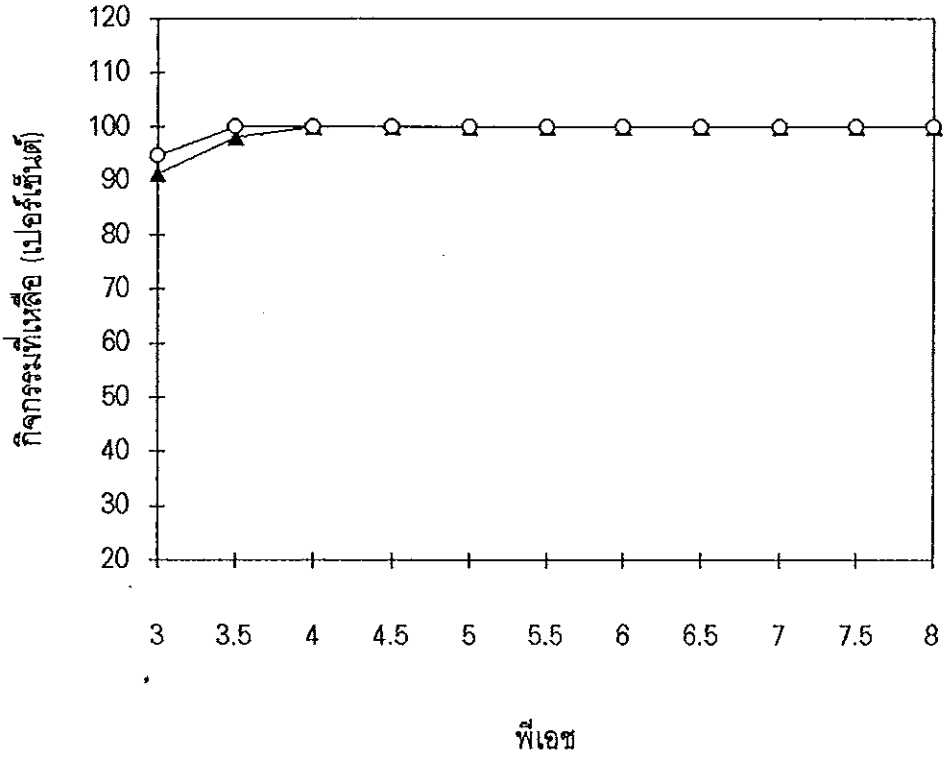
ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส จากผลการทดลอง (รูป 12) พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 3.0-8.0 จากการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขณะที่พีเอช 3.0 เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่พีเอช 8.0 ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์

สำหรับความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อรา strain Y-94 เอนไซม์ A และ B มีความคงตัวในช่วงพีเอชระหว่าง 2.5-9.0 แต่ไซลาเนส C ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงที่พีเอชสูงกว่า 5.5 จากการบ่มเอนไซม์ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Mitsuishi, *et al.*, 1987) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส XylA และ XylB ที่แยกได้จากเชื้อ *Aspergillus kawachii* IFO 4308 มีความคงตัวในช่วงพีเอชระหว่าง 3.0-10.0 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Ito, *et al.*, 1992) ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ซึ่งพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 มีความคงตัวในช่วงพีเอชกว้าง จึงสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้รายงานมา

3.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส บ่มนาน 30 นาที โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอช 3.5 จากผลการทดลอง (รูป 13) จะเห็นได้ว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ก็จะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน และพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ 96.19 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เอนไซม์มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่านี้ กิจกรรมของเอนไซม์ก็จะลดลง ซึ่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 84.52 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรม สัมพัทธ์ลดลงเหลือเพียง 18.43 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

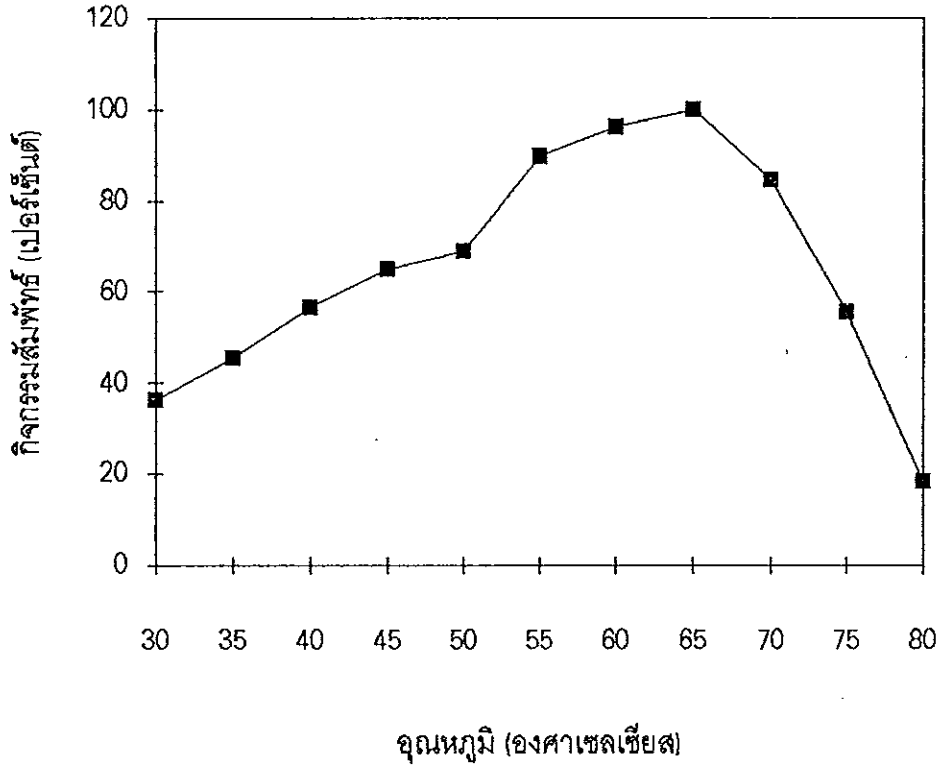
จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีรายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลส III ที่ได้จากเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 65 องศาเซลเซียส (Tong, *et al.*, 1980) ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Alternaria alternata* (mutant) มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55-60 องศาเซลเซียส (Macris, 1984) และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus terreus* ATCC 52430 เอนไซม์จะดำเนินกิจกรรมได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Araujo and D'Souza, 1986) ในขณะที่เอนไซม์



รูป 12 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

—○— บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

—▲— บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



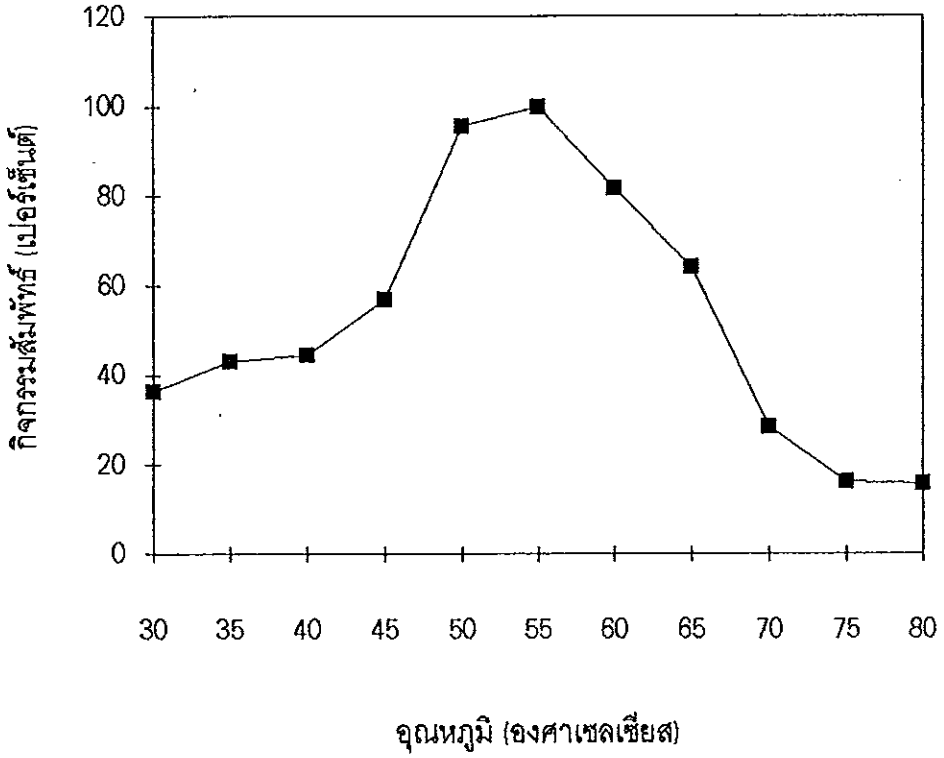
รูป 13 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* เอนไซม์เกิดกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส (Okada, 1985) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์อื่นๆ และมีค่าสูงใกล้เคียงกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อราชนิดอื่น

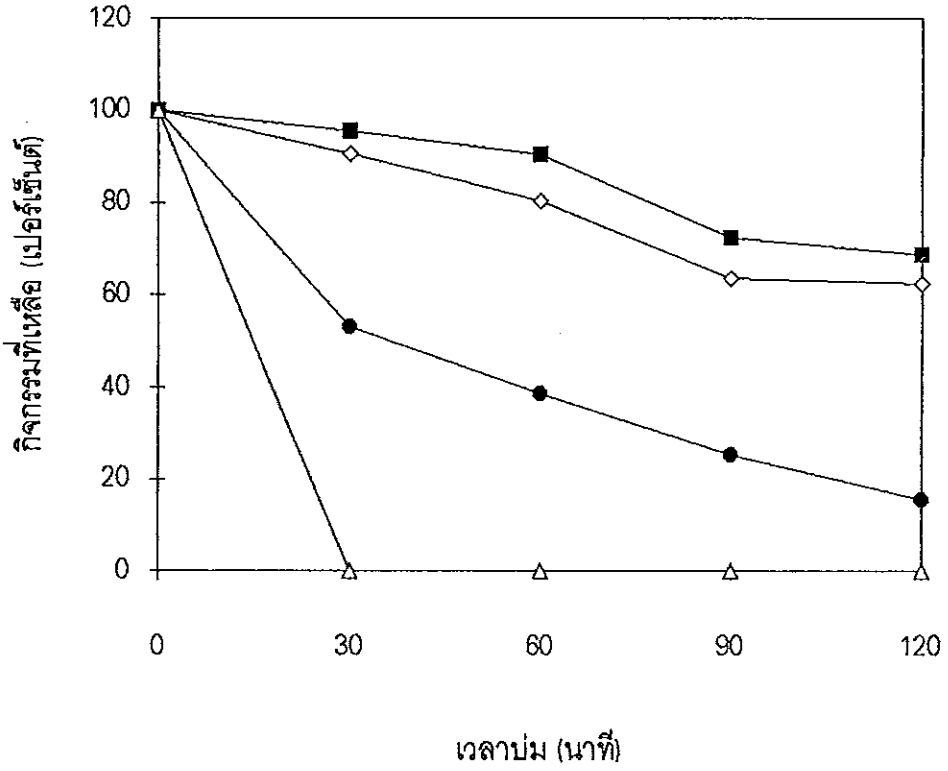
ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากผลการทดลอง เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส บ่มนาน 10 นาที โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอช 4.5 (รูป 14) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ 95.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงจนถึงอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เพียง 15.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 คือ 55 องศาเซลเซียส ถือว่าเป็นอุณหภูมิที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* อื่นๆ ซึ่งมีรายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส (Ricardo, *et al.*, 1985; Shei, *et al.*, 1985) แต่อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus ochraceus* (mutant) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส (Biswas, *et al.*, 1990) หรือเอนไซม์ไซลาเนส XylA, XylB และ XylC ที่แยกได้จาก *Aspergillus kawachii* IFO 4308 เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Ito, *et al.*, 1992) และเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 คือ endo I, endo II และ endo III มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 55, 50 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Kormelink, *et al.*, 1993)

3.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

เมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์ CMCase ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากผลการทดลอง (รูป 15) พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวสูงในเวลา 60 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มนานขึ้นเป็น 120 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือ 74.64 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส บ่มนาน 60 นาที กิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ 78.73 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเหลือ 54.09 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 นาที. ขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที



รูป 14 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน



รูป 15 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

40 องศาเซลเซียส 50 องศาเซลเซียส

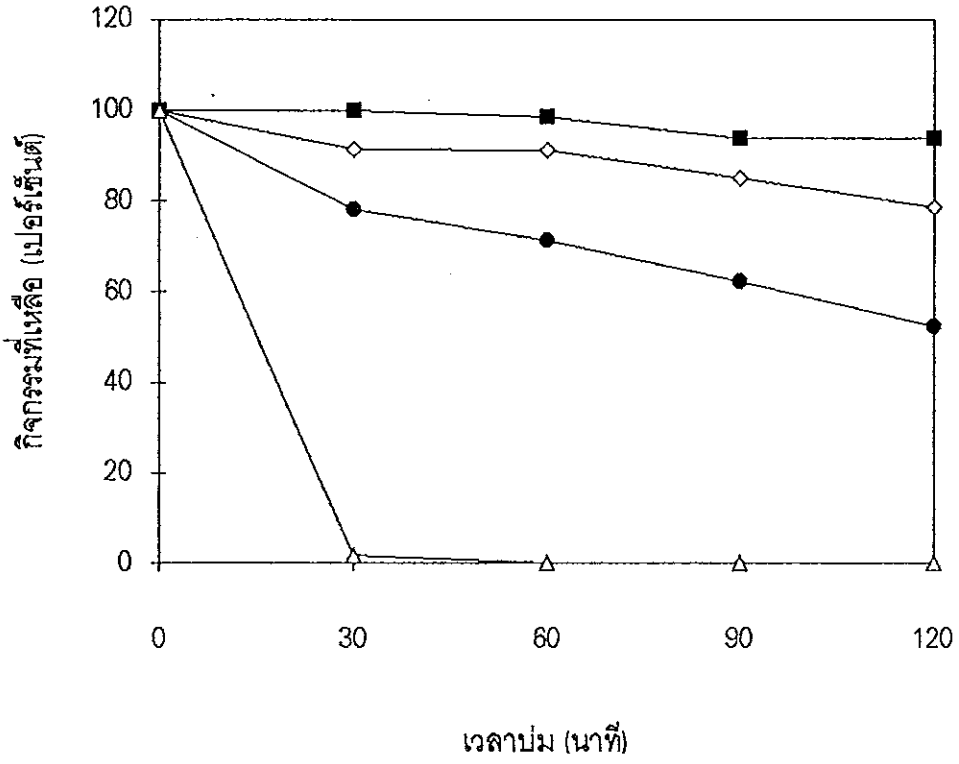
60 องศาเซลเซียส 70 องศาเซลเซียส

เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือ 49.12 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์

มีรายงานการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* พบว่า เอนไซม์มีความคงตัวสูงในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 4.0 บ่มนาน 1 ชั่วโมง และสูญเสียสภาพที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Hurst, *et al.*, 1977) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที เอนไซม์ยังคงมีความคงตัวสูงแต่จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Okada, 1985)

ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที (รูป 16) พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวสูงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงไม่มากนัก ถึงแม้จะบ่มนาน 120 นาที เอนไซม์ยังมีกิจกรรมเหลือถึง 93.9 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือ 91.10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อบ่มนาน 120 นาที กิจกรรมของเอนไซม์เหลือ 78.57 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาทีพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่ 52.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว คือ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะถูกทำลายเหลือเพียง 1.8 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 30 นาที

เมื่อพิจารณาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ซึ่งพบว่าในเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ถูกทำลายเกือบทั้งหมด ผลที่ได้คล้ายคลึงกับเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จาก *Cryptococcus flavus* IFO 0407 ซึ่งอุณหภูมิสูงสุดที่เอนไซม์มีความคงตัวดีในเวลา 30 นาที คือ 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ (Nakanishi, *et al.*, 1984) นอกจากนี้ มีรายงานว่า เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus* sp. เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีความคงตัวดี แต่จะสูญเสียกิจกรรมไป 50 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Kinoshita and Svarachorn, 1983) สำหรับเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus kawachii* IFO 4308 พบว่า เอนไซม์ไซลาเนส XylA มีความคงตัวที่



รูป 16 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

40 องศาเซลเซียส 50 องศาเซลเซียส
60 องศาเซลเซียส 70 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่านี้ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างมาก ขณะที่ XylB เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที สำหรับ XylC เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็ว (Ito, *et al.*, 1992)

3.5 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ศึกษาโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ CMCase ที่เจือจางอย่างเหมาะสมในซิเตรต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.5 ซึ่งมีอิออนโลหะหรือสารยับยั้งละลายอยู่ ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ บ่มนาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ตาราง 15) จะเห็นได้ว่า Ag^{2+} ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Mg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase บางส่วน โดยเอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 83-85 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอิออน Ba^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} และ Fe^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย หรือแทบที่จะไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างมากโดย Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือเพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สามารถถูกกระตุ้นโดย Cu^{2+} ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase เพิ่มขึ้นเป็น 115.6 เปอร์เซ็นต์

ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase พบว่า EDTA, N-ethylmaleimide N-acethylmaleinimid ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อมี 4-chloromercuribenzoic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งบางส่วนเหลือประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ 5'5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างมาก เหลือกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดย *p*-chloromercuribenzoate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลองที่ได้ เอนไซม์ CMCase ถูกยับยั้งมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดย Hg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และถูกกระตุ้นเล็กน้อยเมื่อมี $CuSO_4$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ให้ผลที่แตกต่างกันกับเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* (Okada, 1985) ซึ่งมีรายงานว่า Hg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลการทดลองที่ได้นี้ใกล้เคียงกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการโคลนของยีนของ *Clostridium josui* ใน

ตาราง 15 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

อิออนโลหะ/สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	-	100.0
$AgSO_4$	0.1	83.4
$FeSO_4$	0.1	100.3
	1.0	101.8
$HgCl_2$	0.1	11.7
	1.0	2.5
$MgCl_2$	0.1	100.1
	1.0	85.0
$BaCl_2$	0.1	97.0
	1.0	93.1
$CaCl_2$	0.1	105.5
	1.0	98.7
$CuSO_4$	0.1	114.6
	1.0	115.6
KCl	0.1	99.7
	1.0	99.8
EDTA	1.0	88.4
	10.0	72.8

ตาราง 15 (ต่อ)

อิออนโลหะ/สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
N-Ethylmaleimide N-Acethylmaleinimid	1.0	69.6
	10.0	70.8
p-Chloromercuribenzoate	1.0	77.1
	10.0	44.3
4-Chloromercuribenzoic acid	1.0	85.6
5' 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)	1.0	62.4

Escherichia coli ซึ่งพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเอนไซม์กับ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แต่ผลของ Cu^{2+} แตกต่างกัน ซึ่งพบว่า $CuCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 34 เปอร์เซ็นต์ (Fujino, *et al.*, 1990) ผลของ Mg^{2+} ที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งบางส่วน แตกต่างกันกับผลการศึกษาของ Fauth, *et al.* (1991) ซึ่งพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum* กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดย Mg^{2+} ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ขณะที่ Ca^{2+} กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Fujino, *et al.* (1990) ที่รายงานว่า $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อย แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่า Ca^{2+} ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อยมาก หรือแทบจะไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ สำหรับ Fe^{2+} ซึ่งไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase นั้น แตกต่างจากรายงานของ Okada (1985) ที่พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี Fe^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แต่ผลทดลองที่ได้นี้ใกล้เคียงกันกับการศึกษาของ Fujino, *et al.* (1990) ซึ่งพบว่า $FeCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 92 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้ อาจจะเป็นไปได้ว่า $FeSO_4$ และ $FeCl_2$ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ต่างกัน และขึ้นอยู่กับโปรตีนเอนไซม์นั้นด้วย

สำหรับผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase พบว่า EDTA ความเข้มข้น 1 หรือ 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางส่วน ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันกับ Okada (1985) ซึ่งรายงานว่า EDTA และสารพวก sulfhydryl reagents ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Fujino, *et al.* (1990) พบว่า EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการโคลนยีนของ *Clostridium josui* ใน *Escherichia coli* จากผลการทดลองที่ได้จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า บริเวณศูนย์แอคทีฟ (active center) ของเอนไซม์ CMCase นี้มีโลหะเป็นองค์ประกอบ สำหรับผลของกลุ่มสาร sulfhydryl-reacting reagents หรือ thiol group ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 70-80 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น 5' 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ที่เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จัดว่าเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ยังคงมีกิจกรรมที่เหลือสูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากการโคลนยีนของ *Clostridinm josui* ใน *Escherichia coli* ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย

p-chloromercuribenzoate ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ N-ethylmaleimide ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (Fujino, *et al.*, 1990)

ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเติมสารละลายเอนไซม์ไซลาเนสในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่มีอิออนโลหะหรือสารยับยั้งละลายอยู่ ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ บ่มนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ตาราง 16) จะเห็นได้ว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกยับยั้งประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดย Hg^{2+} ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สำหรับ Ag^{2+} ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกันกับ Ba^{2+} หรือ K^{+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งเล็กน้อยมาก แต่ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางส่วน เอนไซม์ยังมีกิจกรรมเหลือ 87.1 และ 82.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลของ Fe^{2+} ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จะเห็นได้ว่า Fe^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งเหลือ 74.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกยับยั้งค่อนข้างมาก มีกิจกรรมเหลือเพียง 34.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี Cu^{2+} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากผลการทดลองพบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 1 หรือ 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลือประมาณ 85-87 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับ 4-chloromercuribenzoic acid ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สำหรับ N-ethylmaleimide N-acethylmaleinimid มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อย ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกยับยั้งประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดย *p*-chloromercuribenzoate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือ 5' 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

มีรายงานการศึกษาผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างแรงโดย Hg^{2+} และ Cu^{2+} ความเข้มข้น 7.5 มิลลิโมลาร์ (Shei, *et al.*, 1985) นอกจากนี้ Hg^{2+} ยังเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ความเข้มข้น 0.07 มิลลิโมลาร์ หรือ Cu^{2+} ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ (Frederick, *et al.*, 1985) เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* (mutant) กิจกรรมของ

ตาราง 16 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

อิออนโลหะ/สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	-	100.0
$AgSO_4$	0.1	101.6
$FeSO_4$	0.1	97.4
	1.0	74.8
$HgCl_2$	0.1	50.2
	1.0	0.0
$MgCl_2$	0.1	103.2
	1.0	96.3
	10.0	87.1
$BaCl_2$	0.1	100.0
	1.0	105.0
	10.0	98.1
$CaCl_2$	0.1	108.8
	1.0	106.1
	10.0	82.5
$CuSO_4$	0.1	114.1
	1.0	105.3
	10.0	34.6

ตาราง 16 (ต่อ)

อิออนโลหะ/สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
KCl	0.1	110.7
	1.0	98.0
	10.0	93.6
EDTA	1.0	86.7
	10.0	84.6
N-Ethylmaleimide N-Acethylmaleimid	1.0	97.1
	10.0	96.0
p-Chloromercuribenzoate	1.0	89.0
	10.0	50.8
4-Chloromercuribenzoic acid	1.0	87.4
5' 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)	1.0	54.7

เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย Hg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ $CuSO_4$ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (Biswas, *et al.*, 1990)

สำหรับ Ag^{2+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 เช่นเดียวกันกับ Ba^{2+} และ K^+ ซึ่งยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์น้อยมากหรือแทบจะไม่มีผล ให้ผลที่ใกล้เคียงกันกับเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 เมื่อมี Ag^+ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อยในเอนไซม์ Endo I และไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ใน Endo II และ III สำหรับ K^+ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อยเช่นกัน (Kormelink, *et al.*, 1993) แต่เอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus ochraceus* (mutant) พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรม 119 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของ KCl 50 มิลลิโมลาร์ (Biswas, *et al.*,1990) สำหรับ Ba^{2+} ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* อื่นๆ ซึ่งพบว่า $BaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 7.5 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (Shei, *et al.*, 1985) เช่นเดียวกันกับที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ (Frederick, *et al.*, 1985)

จากการทดลองที่ได้ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกยับยั้งบางส่วนโดย $FeSO_4$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และถูกยับยั้งเล็กน้อยโดย Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้ผลที่แตกต่างกันเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Biswas, *et al.* (1990) ที่รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งเล็กน้อยโดย $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ หรือเปรียบเทียบจากเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus niger* อื่นๆ ซึ่งพบว่า Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 7.5 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (Shei, *et al.*, 1985) ผลของ Ca^{2+} ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางส่วนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แตกต่างกับเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* จากการศึกษาของ Ricardo, *et al.*, (1985) ซึ่งพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ แต่ในเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus ochraceus* (mutant) กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ 5 มิลลิโมลาร์ (Biswas, *et al.*, 1990) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกันกับเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 มีรายงานว่าเอนไซม์ Endo I และ Endo II กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งบางส่วนโดยยังมีกิจกรรมเหลือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ Endo III เอนไซม์มีกิจกรรมประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น $CaCl_2$ 1 มิลลิโมลาร์ (Kormelink, *et al.*, 1993)

EDTA ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางส่วน เช่นเดียวกันกับเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จาก

Aspergillus ochraceus (mutant) ซึ่งพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมประมาณ 74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Biswas, *et al.*, 1990) แต่สำหรับเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Endo I, Endo II และกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อยสำหรับเอนไซม์ Endo III (Kormelink*et al.*, 1993) ผลของสารยับยั้งตัวอื่นๆ ให้ผลที่แตกต่างจากการทดลองอื่นที่ใช้เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* (mutant) ที่พบว่า *p*-hydroxymercuribenzoate, 3' 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid และ N-ethylmaleimide ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Biswas, *et al.*, 1990)

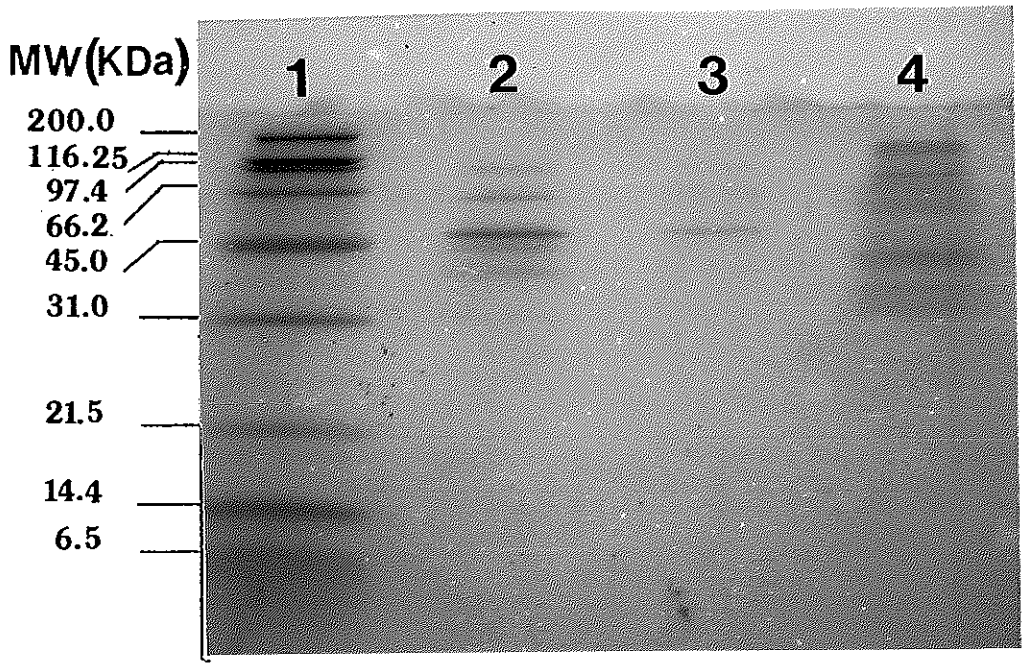
ผลการศึกษาที่แตกต่างกันเช่นนี้อาจจะเนื่องมาจากความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา หรือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ในจุลินทรีย์แต่ละชนิด

3.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์

การทดสอบความบริสุทธิ์และเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนบน SDS-PAGE (รูป 17) โดยใช้สารละลายเอนไซม์หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-Trisacryl แล้วทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน โดยใช้ PM 10 membrane เอนไซม์ที่แยกได้คือเอนไซม์ไซลาเนส (X) เอนไซม์ CMCase ส่วน C1 และ C2

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า เอนไซม์ CMCase C1 ให้แถบโปรตีนเข้ม 1 แถบ และเอนไซม์ CMCase C2 ให้แถบโปรตีนเข้ม 1 แถบ และแถบโปรตีนที่เจือจางอีกหลายแถบ โดยที่แถบโปรตีนเข้มของ C1 และ C2 ปรากฏแถบในตำแหน่งเดียวกัน จึงน่าจะเป็นเอนไซม์ตัวเดียวกัน ส่วนแถบโปรตีนเจือจางคือส่วนของโปรตีนเอนไซม์ตัวอื่นที่แยกออกไม่หมด ใช้แถบโปรตีนเข้มในการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ CMCase C1 และ C2 โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (รูปผนวก ข) พบว่า แถบโปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล ขนาดประมาณ 62,000 ดาลตัน

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสทั้ง C1 และ C2 คือ 62,000 ดาลตัน โดยที่ C2 โปรตีนของเอนไซม์มีความเป็น homogeneous น้อยกว่า C1 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ CMCase นี้จะอยู่ในช่วงค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* อื่นๆ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26,000 ดาลตัน (Hurst, *et al.*, 1977) หรือ 31,000 ดาลตัน (Okada, 1985) แต่อยู่ในช่วงใกล้เคียงกันกับเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* ซึ่งพบว่า endoglucanase III มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดประมาณ 58,000 ดาลตัน (Beldman, *et al.*, 1985) และเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ จากเอนไซม์ endoglucanase I ของ



รูป 17 แสดงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CMCase ส่วน C2 (2), CMCase ส่วน C1 (3) และไซลาเนสส่วน X (4) หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-Trisacryl แยกโดย SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (1)

Aspergillus terreus UNGI-40 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78,000 ดาลตัน (Araujo and D'Souza, 1986) นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสของ *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 ก็มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูงคือประมาณ 76,000 ดาลตัน (Romaniec, *et al.*, 1992)

สำหรับเอนไซม์ไซลาเนสไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 และตามด้วย DEAE-Trisacryl ได้ เพราะยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase บางส่วนปะปนอยู่ ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนจากแถบโปรตีน 6 แถบที่ปรากฏบน SDS-PAGE โดยให้แถบโปรตีนเข้ม 3 แถบ และแถบโปรตีนเจือจาง 3 แถบ เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าแถบโปรตีนเข้มแถบที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 111,000 ดาลตัน แถบโปรตีนเข้มแถบที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 96,000 ดาลตัน แถบโปรตีนเจือจางแถบที่ 3 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 75,000 ดาลตัน แถบโปรตีนเข้มแถบที่ 4 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 53,000 ดาลตัน แถบโปรตีนเจือจางแถบที่ 5 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 42,000 ดาลตัน และแถบโปรตีนแถบที่ 6 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 37,000 ดาลตัน เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนส จะเห็นว่า ไม่มีแถบโปรตีนแถบใดอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับแถบโปรตีนเข้มของเอนไซม์ CMCase C1 และ C2 แสดงว่าโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้ไม่มีเอนไซม์ CMCase C1 และ C2 ดังนั้นเอนไซม์ CMCase ที่ปะปนมาในเอนไซม์ไซลาเนส จึงน่าจะเป็นเอนไซม์ CMCase อีกตัวหนึ่งที่ออกมาในช่วงแรก และมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกันกับเอนไซม์ไซลาเนสคือ ไม่เกาะกับเรซิน DEAE-Trisacryl จึงถูกชะออกก่อน ดังนั้นการแยกและทำให้บริสุทธิ์เพียง 2 คอลัมน์ จึงไม่สามารถแยกออกได้ หรืออาจจะเป็นไปได้เช่นกันว่าเอนไซม์ไซลาเนสประกอบไปด้วยหลายหน่วยย่อย (subunit) เมื่อแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่ง SDS มีคุณสมบัติเป็น detergent (Robyt and White, 1987) จึงทำให้โปรตีนเสียสภาพ และทำให้หน่วยย่อยของโปรตีนที่เกาะกันอยู่แยกออกจากกัน ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลาเนสจึงไม่สามารถระบุได้อย่างแน่นอนว่าคือโปรตีนแถบใด

แถบโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดต่างๆ กัน คือ 111,000, 96,000, 75,000, 53,000, 42,000 ดาลตัน และ 37,000 ดาลตัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus niger* จากการศึกษาของ Frederick (1985) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13,000 ดาลตัน หรือ 28,000 ดาลตัน (Ricardo, *et al.*, 1985) และจาก *Aspergillus kawachii* IFO 4308 พบว่า XylA, XylB และ XylC มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000, 26,000 และ 29,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Ito, *et al.*, 1992) แต่จากการศึกษาน้ำหนัก

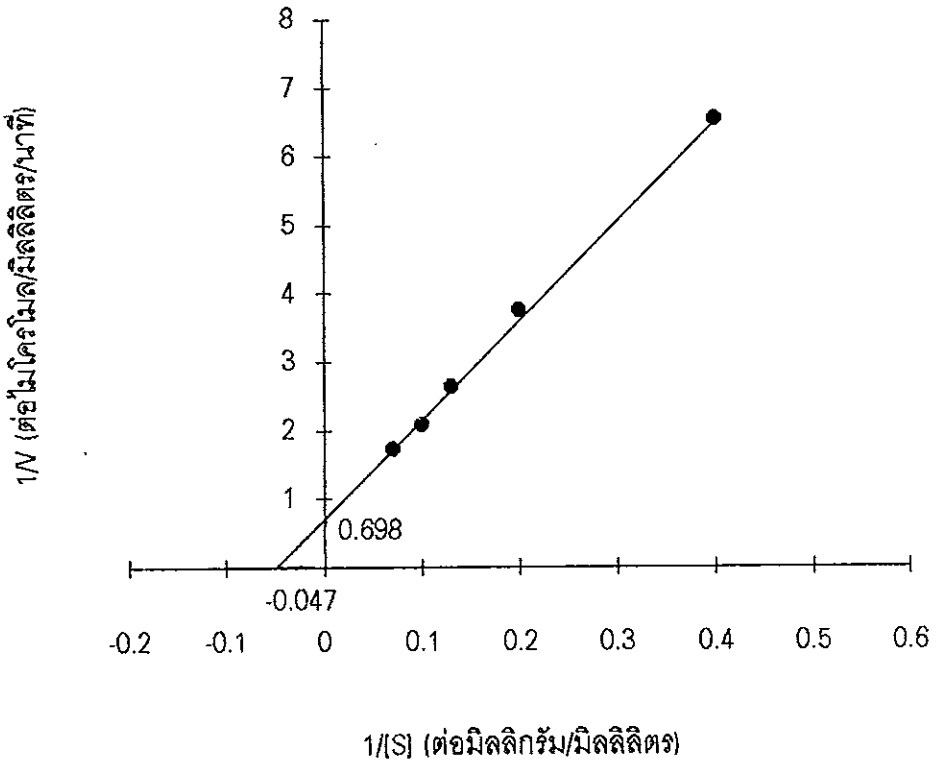
โมเลกุลของ *Aspergillus awamori* CMI 142717 พบว่า endoxylanase I มีน้ำหนักโมเลกุล 39,000 ดาลตัน (Kormelink, *et al.*, 1993) ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ได้จากการทดลอง คือ 42,000 ดาลตัน หรือ 37,000 ดาลตัน และเอนไซม์ไซลาเนส Xn-A, Xn-B ของ mesophilic fungus strain Y-94 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 51,000 และ 48,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Mitsuishi, *et al.*, 1987) ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลขนาด 53,000 ดาลตัน ที่ได้จากการทดลอง สำหรับแถบโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 111,000 ดาลตัน จัดว่าเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซลาเนสโดยทั่วๆ ไป แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium avenaceum* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250,000 ดาลตัน (Vrsanska, *et al.*, 1982 อ้างโดย Bastawde, 1992)

เอนไซม์ไซลาเนสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้ โปรตีนของเอนไซม์ยังไม่เป็น homo geneous เพราะผ่านขั้นตอนในการแยกด้วยการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีน้อยครั้ง นอกจากนี้โปรตีนของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างกัน ซึ่งเจริญในแหล่งคาร์บอนต่างๆ ก็อาจจะมีส่วนประกอบของโปรตีนที่ต่างกันได้ ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus* sp. โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ตามด้วย DEAE-Sephadex A-50 และ Sephadex G-200 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการผ่าน SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ที่ได้ไม่เป็น homogeneous โดยปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบกว้างและแถบแคบ (Kinoshita and Svarachorn, 1983) และมีรายงานการศึกษาการแยกเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* โดยการผ่านคอลัมน์ 5 คอลัมน์ ดังนี้ Ultrogel AcA 54 ตามด้วย SP-Sephadex C-25, DEAE-Sephadex A-25 แล้วผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 และสุดท้ายผ่าน DEAE-Sephadex A-25 ได้เอนไซม์ที่มีความเป็น homogeneous หลังจากผ่านขั้นตอนสุดท้าย (Ricardo, *et al.*, 1985)

3.7 ค่า Km และ Vmax ของเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ไซลาเนส

ผลการหาค่า Km และ Vmax ของสารละลายเอนไซม์ CMCase จากกราฟ Line weaver-Burk plot ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/V กับ 1/[S] (รูป 18) มีจุดตัดบนแกน 1/[S] เท่ากับ -0.047 ต่อมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจุดตัดนี้คือ -1/Km นั่นคือ Km มีค่าเท่ากับ 21.28 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และจุดตัดบนแกน 1/V คือ 0.698 Vmax มีค่าเท่ากับ 1.43 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที

ค่า Km ของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีค่าต่างกันออกไป เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Thermoascus aurantiacus* ค่า Km ของ Cellulase I และ III มีค่าเท่ากับ 3.9 และ 1.9 มิลลิ

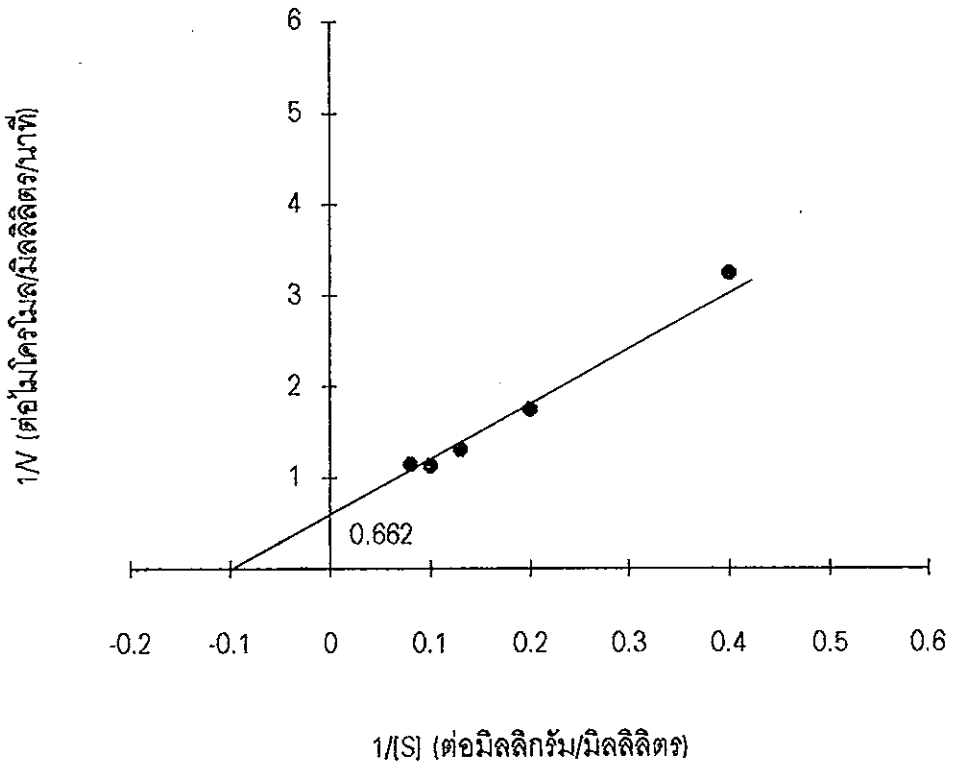


รูป 18 Lineweaver-Burk plot ของกิจกรรมเอนไซม์ CMCase ต่อสารละลาย CMC ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 3.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Tong, *et al.*, 1980) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Alternaria alternata* ค่า Km คือ 16.64 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Macris, 1984) และเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จาก *Trichoderma viride* พบว่า endo I, endo II, endo III, endo IV, endo V และ endo VI Km มีค่าเท่ากับ 46.3, 90.6, 14.4, 130.7, 64.3 และ 122.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Beldman, *et al.*, 1987)

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/V กับ 1/[S] ของสารละลายเอนไซม์ไซลาเนส (รูป 19) พบว่า จุดตัดบนแกน 1/[S] คือ -0.10 นั่นคือ Km มีค่าเท่ากับ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และจุดตัดบนแกน 1/V คือ 0.662 นั่นคือ Vmax มีค่าเท่ากับ 1.51 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที

เมื่อพิจารณาค่า Km ของเอนไซม์ไซลาเนสพบว่า ค่า Km ที่ได้มีค่าสูงกว่าค่า Km ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma koningii* G-39 ซึ่งให้ค่า Km เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Huang, *et al.*, 1991) หรือจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 ซึ่งพบว่าค่า Km ของ endoI, endo II และ endo III มีค่าเท่ากับ 1.00, 0.33 และ 0.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Kormelink, *et al.*, 1993) แต่อย่างไรก็ตาม ค่า Km ที่ได้ก็ใกล้เคียงกันกับค่า Km ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียคือ *Streptomyces roseiscleroticus* ซึ่งมีค่า Km เท่ากับ 7.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Grabski and Jeffries, 1991) หรือจาก *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Km มีค่าเท่ากับ 7.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Li, *et al.*, 1993)



รูป 19 Lineweaver-Burk plot ของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่อสารละลายไซแลน ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

บทที่ 4

สรุป

1. การเตรียมเอนไซม์ และการทำให้บริสุทธิ์

การผลิตเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งกากปาล์มเป็นเวลา 7 วัน พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะของ CMCase เริ่มต้นเท่ากับ 0.28 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสเริ่มต้นเท่ากับ 0.91 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การไดแอไลซิส และการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ Sephadex G-75 สามารถเก็บเอนไซม์ได้ 2 ส่วนคือ F1 และ F2 หลังจากแยกต่อไปโดยใช้ DEAE-Trisacryl เก็บเอนไซม์ไซลาเนสจาก F1 และ F2 รวมกันเรียกว่าส่วน X เก็บเอนไซม์ CMCase จาก F1 เรียกว่า C1 และจาก F2 เรียกว่า C2 นำแต่ละส่วนมาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า เอนไซม์ CMCase ส่วน C1 โปรตีนของเอนไซม์มีความเป็น homogeneous มากกว่าเอนไซม์ CMCase ส่วน C2 ในขณะที่เอนไซม์ไซลาเนสส่วน X โปรตีนของเอนไซม์ไม่เป็น homogeneous เอนไซม์ CMCase ส่วน C1 มีกิจกรรมจำเพาะ 5.33 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เหลือเอนไซม์ 1.34 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้นของเอนไซม์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 19.04 เท่า และมีกิจกรรมจำเพาะของไซลาเนสเท่ากับ 0.38 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน สำหรับเอนไซม์ CMCase ส่วน C2 มีกิจกรรมจำเพาะ 2.87 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 4.26 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 10.25 เท่า โดยมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส 0.47 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์ไซลาเนสส่วน X มีกิจกรรมจำเพาะ 15.02 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เหลือเอนไซม์ 12.66 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 16.51 เท่า โดยมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.29 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน

2. คุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำ ให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

คือพีเอช 3.5 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีความคงตัวที่พีเอช 3.5-8.0 จากการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่งโมง หรือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยยังมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ถูกกระตุ้นเล็กน้อยโดย Cu^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ถูกยับยั้งโดย Hg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ *p*-chloromercuribenzoate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือ 5'5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ CMCase ที่แยกได้มีค่า Km เท่ากับ 21.28 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Vmax เท่ากับ 1.43 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ นาที และมีน้ำหนักโมเลกุล 62,000 ดาลตัน

คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 โดยการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนพบว่า พีเอช 4.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0-8.0 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือ 93.9 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย Hg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ถูกยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดย Cu^{2+} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดย *p*-chloromercuribenzoate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือ 5'5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ไซลาเนสที่แยกได้โปรตีนของเอนไซม์ไม่เป็น homogeneous ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุน้ำหนักโมเลกุลได้ โดยให้แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลขนาด 111,000, 96,000, 75,000, 53,000, 42,000, และ 37,000 ดาลตัน มีค่า Km เท่ากับ 10.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมี Vmax เท่ากับ 1.51 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที

ข้อเสนอแนะ

1. ในการแยกเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์สูง ควรคัดเลือกเจลและเรซิน ทั้งชนิด anion exchanger หรือ cation exchanger ที่สามารถแยกเอนไซม์ออกจากกันได้ดี หรือควรผ่านคอลัมน์หลายๆ ครั้ง โดยใช้เจลและเรซินชนิดต่างๆ นอกจากนี้ในการแยกโดยใช้เรซิน การชะโปรตีนเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์ การทำ NaCl gradient อาจจะทำให้ได้ peak ของโปรตีนเอนไซม์ที่มีความชัดเจนขึ้น

2. เมื่อแยกได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ควรมีการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ในการย่อยสลายสับสเตรตต่างๆ ซึ่งจะช่วยอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ ได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, คณะกรรมการนโยบายถั่วเหลือง และพืชน้ำมันอื่นๆ. 2532. นโยบายการพัฒนาปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ.

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 131 หน้า.

ผาสุข กุลละวณิชย์, สัณห์ชัย กลิ่นพิกุล, สุมณฑา กุลละวนิชย์ และสุรเชษฐ์ ชีระมณี. 2531. โครงการแปรรูปผลิตภัณฑ์และพัฒนาด้านการตลาดของโรงงานหีบน้ำมันปาล์มขนาดเล็กตามพระราชดำริ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 175 หน้า.

พิณทิพ รื่นวงษา. 2536. การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส. ใน คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ "เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม". (บรรณาธิการ. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์) เล่ม 1. หน้า 4.1-4.13, นครปฐม : โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งและคุณลักษณะของน้ำเสียของโรงงานน้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์. 12 (2) : 169-176.

มุกดา ฐิตะสุต. 2527. สารชีวโมเลกุล. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.

อารี กังแฮ. 2536. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 127 หน้า.

A.O.A.C. 1984. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. Arlington : The Association of Official Analytical Chemist, Inc.

Araujo, A. and D'Souza, J. 1986. Characterization of cellulolytic enzyme components from *Aspergillus terreus* and its mutant. J. Ferment. Technol. 64 (5) : 463-467.

Bastawde, K.B. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J. Microbiol. Biotechnol. 8 : 353-368.

Beldman, G., Searle-Van Leeuwen, M.F., Rombouts, F.M. and Voragen, F.G.J. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*, purification, characterization and comparision of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β-glucosidase. Eur. J. Biochem. 146 : 301-308.

Beldman, G., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M., Searle-van Leeuwen, M.F. and Pilnik, W. 1987. Adsorption and kinetic behavior of purified endoglucanases and exoglucanases from *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng. 30 : 251-257.

Biswas, S.R., Jana, S.C., Mishra, A.K. and Nanda, G. 1990. Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. Biotechnol. Bioeng. 35 : 244-251.

Boyer, R.F., Allen, T.L. and Dykema, P.A. 1987. Fractionation of *Aspergillus niger* cellulase by combined ion exchange affinity chromatography. Biotechnol. Bioeng. 29 : 176-179.

Cooper, T.G. 1977. The Tools of Biochemistry. New York : John Wiley & Sons.

Fauth, U., Romaniec, M.P.M., Kobayashi, T. and Demain, A.L. 1991. Purification and characterization of endoglucanase Ss from *Clostridium thermocellum*. Biochem. J. 279 : 67-73.

Frederick, M.M., Kiang, C.-H., Frederick, J.R. and Reilly, P.J. 1985. Purification and characterization of endoxylanase from *Aspergillus niger* I. two isozymes active on xylan backbones near branch points. Biotechnol. Bioeng. 27 : 525-532.

Fujino, T., Sasaki, T., Ohmiya, K . and Shimizu, S. 1990. Purification and properties of an endo-1,4-β glucanase translated from a *Clostridium josui* gene in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 56 (4) : 1175-1178.

Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. 1983. Introduction to Plant Biochemistry. 2nd ed. Oxford : Pergamon Press.

Grabski, A. and Jeffries, T.W. 1991. Production, purification, and characterization of β-(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. Appl. Environ. Microbiol. 57 (4) : 987-992.

Hoh, Y.K., Yeoh, H.-H. and Tan, T.K. 1992. Properties of β-glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB 0827 and USDB 0828. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 590-593.

Huang, L., Hseu, T.-H. and Wey, T.-T. 1991. Purification and characterization of an endoxylanase from *Trichoderma koningii* G-39. Biochem. J. 278 : 329-333.

Hurst, P.L., Nielsen, J., Sullivan, P.A. and Shepherd, M.G. 1977. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. Biochem. J. 165 : 33-41.

Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T. and Ishikawa, T. 1992. Purification and properties of acid stable xylanase from *Aspergillus kawachii*. Biosci. Biotech. Biochem. 56 (4) : 547-550.

Kim, J.H., Nihira, T., Kinoshita, S. and Taguchi, H. 1982. Purification and properties of cellulase and β-glucosidase from *Sporotrichum cellulophilum*. Annual Reports of ICME. 5 : 183-191.

Kinoshita, S. and Svarachorn, A. 1983. Purification of xylanase from *Aspergillus* sp. Annual Reports of ICME. 6 : 293-296.

Kirk, T.K. 1983. Degradation and conversion of lignocellulose. *In* The Filamentous Fungi : Fungal Technology. (eds. Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B.) Vol. IV, pp. 266-295, London : Edward Arnold.

Kluepfel, D., Vats-Mehta, S., Aumont, F., Shareck, F. and Morosoli, R. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. Biochem. J. 267 : 45-50.

Kormelink, F.J.M., Searle-Van Leeuwen, M.J.F., Wood, T.M. and Voragen, A.G.J. 1993. Purification and characterization of three endo-(1,4) β-xylanase and one β- xylosidase from *Aspergillus awamori*. J. Biotechnol. 27 : 249-265.

Li, X.-L., Zhang, Z.-Q., Dean, J.F.D., Eriksson, K.-E.L. and Ljungdahl, L.G. 1993. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. Appl. Environ. Microbiol. 59 (10) : 3212-3218.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Macris, B.J. 1984. Production and characterization of cellulase and β-glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. Appl. Environ. Microbiol. 47 (3) : 560-565.

Mandels, M. and Reese, E.T. 1965. Inhibition of cellulases. Ann. Rev. Phytopathol. 3 : 85-102.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *In* Cellulase and Their Application. (ed. Gould, R.E.) pp. 391-398. Washington, D.C. Adv. Chem. Ser. 95, American Chemistry Society.

Matanguihan, R.M., Mo, K.-G. and Hayashida, S. 1985. Studies on cellulolytic enzymes from a strain of *Penicillium* sp. Annual Reports of ICBiotech. 8 : 171-182.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31 : 426-428.

Mitsuishi, Y., Yamanobe, T., Yagisawa, M. and Takasaki, Y. 1987. Purification and properties of thermostable xylanase from mesophilic fungus strain Y-94. Agric. Biol. Chem. 51 (12) : 3207-3213.

Nakanishi, K., Arai, H. and Yasui, T. 1984. Purification and some properties of xylanase from *Cryptococcus flavus*. J. Ferment. Technol. 62 (4) : 361-369.

Okada, G. 1985. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. Agric. Biol. Chem. 49 (5) : 1257-1265.

Panbangred, W., Shinmyo, A., Kinoshita, S. and Okada, H. 1983. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. Annual Reports of ICME. 6 : 13-21.

Plummer, D.T. 1987. An Introduction to Practical Biochemistry. 3rd ed. London : McGraw Hill Book Co., Ltd.

Prasetsan, P. and Oi, S. 1992. Production of cellulolytic enzyme from fungi and use in the saccharification of plam cake and palm fiber. World J. Microbiol. Biotechnol. 8 : 536-538.

Reilly, P.J. 1981. Xylanase : structure and function. Basic Life Science. 18 : 111-129.

Ricardo, F.A., Frederick, M.M., Frederick, J.R. and Reilly, P.J. 1985. Purification and characterization of endoxylanase from *Aspergillus niger*. III. an enzyme of PI 3.65. Biotechnol. Bioeng. 27 : 539-546.

Robyt, J.F. and White, B.J. 1987. Biochemical Techniques Theory and Practice. California : Brooks/Cole Publishing Company.

Romaniec, M.P.M., Fauth, U., Kobayshi, T., Huskisson, N.S., Barker, P.J. and Demain, A.L. 1992. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. Biochem. J. 283 : 69-73.

Schmid, G. and Wandrey, ch. 1987. Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase (β-glucosidase) from *Trichoderma reesei*. Strain QM 9414. Biotechnol. Bioeng. 30 : 571-585.

Scopes, R.K. 1978. Techniques for protein purification. *In* Techniques in the Life Sciences : Techniques and Enzymes. Biochemistry. (eds . Kornberg, H. L., Metcalfe, J. C., Northcote, D.H., Pogson, C.I. and Tipton, K.F.) pp. 1-42, Amsterdam : Elesevier/ North-Holland Biochemical Press.

Shei, J.C., Fratzke, A.R., Frederick, M.M., Frederick, J.R. and Reilly, P.J. 1985. Purification and characterization of endoxylanase from *Aspergillus niger*. II. an enzyme of pI 4.5. Biotechnol. Bioeng. 27 : 533-538.

Singh, A., Agrawal, A.K., Abidi, A.B. and Darmwal, N.S. 1990. Properties of cellobiase from *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 : 356-358.

Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. Buffer : principles and practice. *In* Method in Enzymology (ed. Deutscher, M.P.) Vol. 182, pp. 24-38, New York : Academic Press.

Tan, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.N. 1987. Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity. Biotechnol. Bioeng. 30 : 96-100.

Tong, C.C., Cole, A.L. and Shepherd, M.G. 1980. Purification and properties of the cellulase from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Biochem. J. 191 : 83-94.

Wood, T.M. 1971. The cellulase of *Fusarium solani*, purification and specificity of the β-(1-4)-glucanase and the β-D-glucosidase components. Biochem. J. 121 : 353-362.

Wood, T.M. and McCrae, S.I. 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*, purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. Biochem. J. 171 : 61-72.

———. 1986. The cellulase of *Penicillium pinophilum*, synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. Biochem. J. 234 : 93-99.

Woodward, J., Lima, M. and Lee, N.E. 1988. The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biochem. J. 255 : 895-899.

Workman, W.E. and Day, D.F. 1982. Purification and properties of β-glucosidase from *Aspergillus terreus*. Appl. Environ. Microbiol. 44 (6) : 1289-1295.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการเตรียม

มันฝรั่งหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปต้มในน้ำเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรสและผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลายปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดขนาด 16x150 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที นำหลอดมาวางเอียงไว้ จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี

2. การเตรียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer) ตามวิธีของ Lillie (1948 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A:0.1 M citric acid (21.01 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B:0.1 M sodium citrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$ 29.41 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
46.5	3.5	3.0
43.7	6.3	3.2
40.0	10.0	3.4
37.0	13.0	3.6
35.0	15.0	3.8
33.0	17.0	4.0
31.5	18.5	4.2
28.0	22.0	4.4
25.5	24.5	4.6
23.0	27.0	4.8
20.5	29.5	5.0
18.0	32.0	5.2
16.0	34.0	5.4
13.7	36.3	5.6
11.8	38.2	5.8
9.5	41.5	6.0
7.2	42.8	6.2

3. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีของ Sorensen (1909 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate (KH_2PO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร	B (มิลลิลิตร)	พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	46.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

4. การเตรียมคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ดัดแปลงจากวิธีของ Cooper. (1977)

4.1 เจล ฟิลเตรชัน (gel filtration)

เจลที่ใช้เป็นชนิด Sephadex G-75 เตรียมโดยแช่ในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 30 นาที ดูดอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยในน้ำออก แล้วแช่ต่อในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 และล้าง 2-3 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์นี้ทิ้งไว้ 1 คืนก่อนจะนำไปบรรจุในคอลัมน์

4.2 การใช้เรซิน (Ion-exchange column chromatography)

DEAE-Trisacryl เตรียมโดยล้างอนุภาค DEAE-Trisacryl ด้วยน้ำกลั่น ทำการ treatment เรซิน โดยแช่ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล เป็นเวลา 30 นาที ล้างเรซินด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วแช่ต่อในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล เป็นเวลา 30 นาที ล้างเรซินด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ดูดอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยในน้ำออก นำเรซินมาแช่ในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ก่อนที่จะนำไปบรรจุในคอลัมน์

5. ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและเปอร์เซ็นต์ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

AMMONIUM SULPHATE, GRAMS TO BE ADDED TO 1 LITRE

From % ↘	To % →	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0		27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
		10		28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
			15		28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
				20		29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
					25		29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
						30		30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
							35		30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
								40		31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
									45		31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
										50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
											55		33	66	101	138	175	215	256	298	343
												60		33	67	103	140	179	219	261	305
													65		34	69	105	143	183	224	266
														70		34	70	107	146	186	228
															75		35	72	110	149	190
																80		36	73	112	152
																	85		37	75	114
																		90		37	76
																			95		38

ที่มา: Scopes (1978)

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การหาความชื้น (A.O.A.C., 1984)

วิธีการ

1. นำภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมฝา
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน(2.0 กรัม) ใส่ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้วเกลี่ยให้เนื้อกระจาย ปิดฝาและชั่งน้ำหนัก
3. นำไปอบในตู้อบโดยให้ฝาปิดไว้บางส่วน อบที่ 105 องศาเซลเซียส (16 ชั่วโมง)
4. นำออกจากตู้อบ และนำไปใส่ในเดซิเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1}$$

W_1 = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2. การหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951)

สารเคมี

1. สารละลาย Na_2CO_3 2 เปอร์เซ็นต์ใน NaOH 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ใน sodium potassium tartrate 1.0 เปอร์เซ็นต์
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยผสมสารละลายในข้อ 1. 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2. 1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมในวันที่ใช้)

4. สารละลาย Folin-ciocateus phenol reagent นำมาเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้

วิธีการ

1. ใส่สารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตรในหลอดทดสอบ
2. เติมสารละลาย alkali copper 3.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมสารละลาย Folin-ciocateus reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมโดยใช้ Bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียมกราฟมาตรฐาน ในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ตามวิธี ของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย

1. dinitrosalicylic (DNS) acid	1.0 เปอร์เซ็นต์
2. phenol	0.2 เปอร์เซ็นต์
3. sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	20 เปอร์เซ็นต์
4. Na_2SO_3	0.05 เปอร์เซ็นต์
5. NaOH	1.0 เปอร์เซ็นต์

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย NaOH ในน้ำตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่นๆ ลงในสารละลาย NaOH

3.1 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

3.1.1 เตรียม stock solution ของกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.2 ดูดสารละลายจากข้อ 3.1.1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน

3.1.3 เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

3.1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็น

3.1.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคส

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

$$\text{ยูนิต/กรัม} = \frac{\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักกากปาล์มเริ่มต้น (กรัม)}}$$

3.2 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับในข้อ 3.1 แต่ใช้สารละลายไซโลสแทนสารละลายกลูโคส นำข้อมูลเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณไซโลส

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

$$\text{ยูนิต/กรัม} = \frac{\text{ยูนิต/มิลลิลิตร.} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักกากปาล์มเริ่มต้น (กรัม)}}$$

3.3 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของเอนไซม์

3.3.1 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

$$\text{ยูนิต/มิลลิกรัม} = \frac{\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

3.3.2 ค่ากิจกรรมรวมของเอนไซม์ (total activity)

$$\text{ยูนิต} = \text{ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)} \times \text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)}$$

3.3.3 % Yield คำนวณจาก $\frac{\text{กิจกรรมรวมของเอนไซม์} \times 100}{\text{กิจกรรมรวมของเอนไซม์เริ่มต้น}}$

3.3.4 Purification factor

คำนวณจาก $\frac{\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์}}{\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น}}$

4. การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส ตามวิธีของ Laemmli (1970 อ้างโดย พิณทิพ รื่นวงษา, 2536; คู่มือการใช้ Mini-Protein II Dual Slab Cell ของบริษัท Bio-Rad)

เตรียมสารละลายเป็น stock solution ดังนี้

4.1 Acrylamide/bis (30 เปอร์เซ็นต์ T, 2.67 เปอร์เซ็นต์ C)

Acrylamide 29.2 กรัม และ N'N'-bis-methylene-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (whatman No.1) เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากเตรียม

4.2 Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8

ละลาย Tris-base 18.17 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4.3 Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8

ละลาย Tris-base 6.06 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4.4 SDS 10 เปอร์เซ็นต์

ละลาย SDS 10 กรัมในน้ำกวนเบา ๆ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

4.5 Stock sample buffer (0.06M Tris-HCl pH 6.8, 2 เปอร์เซ็นต์ SDS, 10 เปอร์เซ็นต์ Glycerol, 0.025 เปอร์เซ็นต์ Bromphenol blue)

เตรียมโดยผสมสารต่าง ๆ ในอัตราส่วนดังนี้

น้ำ	4.8 มิลลิลิตร
Tris-HCl 0.5 โมลาร์พีเอช 6.8	1.2 มิลลิลิตร
SDS 10 เปอร์เซ็นต์	2.0 มิลลิลิตร
Glycerol	1.0 มิลลิลิตร
Bromophenol blue 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)	0.5 มิลลิลิตร

4.6 SDS reducing buffer

เตรียมโดยผสม 50 ไมโครลิตรของ 2-mercaptoethanol ใน Stock sample buffer 0.95 มิลลิลิตร ก่อนที่จะใช้

4.7 5x-electrode (Running) buffer, pH 8.3

ประกอบด้วย

Tris base	9 กรัม
Glycine	43.2 กรัม
SDS	3 กรัม

เจือจางให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.8 Catalyst

- Ammonium persulfate (APS) 10 เปอร์เซ็นต์ เตรียมก่อนที่จะใช้

- TEMED (N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine) ใช้ TEMED โดยตรง โดยไม่ต้องทำให้เจือจางก่อน

4.9 การย้อมสีโปรตีนในเจลโดยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250

เตรียม Staining solution คือ

Coomassie brilliant blue R-250 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน Methanol 40 เปอร์เซ็นต์ และ Acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เมื่อสีละลายกรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

เตรียม Destain โดยประกอบด้วย Methanol 40 เปอร์เซ็นต์, Acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมเจลเป็นชนิด slab gel

ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel เตรียมสารละลายของ separating gel 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย น้ำกลั่น 3.35 มิลลิลิตร Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 2.5 มิลลิลิตร SDS 10 เปอร์เซ็นต์ 0.1 มิลลิลิตร Acrylamide/bis 30 เปอร์เซ็นต์ T 4.0 มิลลิลิตร นำไปดูดอากาศนานประมาณ 20 นาที แล้วนำมาเติม APS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เทสารละลายเจลลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ แล้ว

ค่อยๆ หยอดน้ำให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว และเตรียม stacking gel 4 เปอร์เซ็นต์ โดยประกอบด้วย น้ำกลั่น 6.1 มิลลิลิตร Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 2.5 มิลลิลิตร SDS 10 เปอร์เซ็นต์ 0.1 มิลลิลิตร และ Acrylamide/bis 30 เปอร์เซ็นต์ T 1.3 มิลลิลิตร ดูดอากาศออกจากสารละลาย และก่อนที่จะเติม APS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร ในส่วนของ Separating gel เทน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลออกแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง สอด comb ลงในแผ่นกระจก เท stacking gel ที่เตรียมไว้ให้มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เหนือ separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่อง comb เมื่อเจลแข็งตัวดีนำ comb ออกโดยค่อย ๆ ดึงอย่างระมัดระวัง

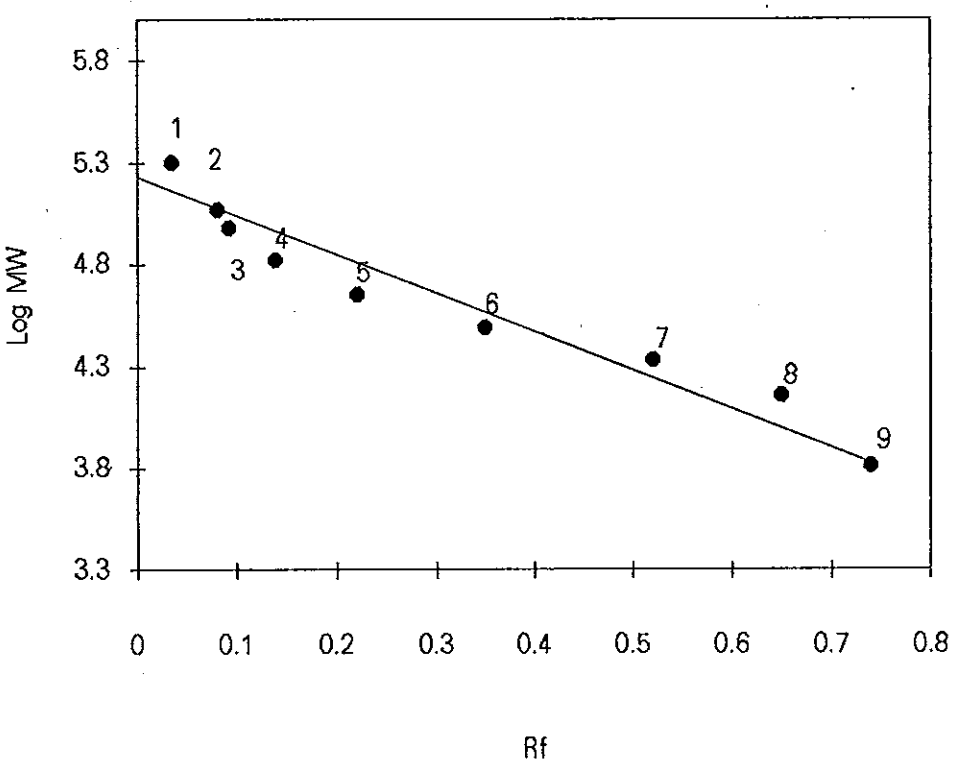
การเตรียมตัวอย่าง

เตรียม SDS-reducing buffer ตามปริมาณที่ต้องการใช้ โดยใช้ 50 ไมโครลิตรของ 2-mercaptoethanol ต่อ stock sample buffer 0.95 มิลลิลิตร

ผสมตัวอย่างกับ SDS-reducing buffer ในอัตราส่วน 1:4 ต้มสารละลายที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำไปใส่ในช่องบนเจล ต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซิส เติมบัฟเฟอร์โดยเจือจาง 5x-electrode buffer 60 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น 240 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ประมาณ 150 มิลลิลิตรลงใน chamber บน ให้คลุมผิวเจล และบัฟเฟอร์ที่เหลือเติมใน chamber ล่าง ใส่สารตัวอย่างหยอดลงในช่องเจลโดยค่อย ๆ หยอดผ่านบัฟเฟอร์ลงไป ต่อกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของ separating gel ปิดกระแสไฟฟ้า นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาใส่ในถาดที่มี Staining solution ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ล้างสีด้วย Destain หลายๆ ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

ในกรณีของการหาน้ำหนักโมเลกุล หาได้โดยเปรียบเทียบ Mobilities ของโปรตีนนั้นๆ กับ Mobilities ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่ทำอิเลคโตรโฟรีซิสไปพร้อมกัน โดยก่อนที่จะย้อมสีให้วัดตำแหน่งของ Tracking dye Bromphenol blue ไว้ (วัดจากขอบ Separating gel ถึงส่วนกลางของ Tracking dye) หลังจาก Destain จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน วัดระยะทาง

(Migration distance) จากขอบ separating gel ถึงส่วนกลางของแต่ละแถบโปรตีน หาร Migration distance ของโปรตีนแต่ละตัวด้วยระยะทางของ Tracking dye ค่าที่ได้เรียกว่า Rf (Relative mobilities ของโปรตีน) ทำ Semilogarithmic plot ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า Rf ซึ่งสามารถอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการจากกราฟได้



1	Myosin	2	β-galactosidase	3	Phosphorylase B
4	Serum albumin	5	Ovalbumin	6	Carbonic anhydrase
7	Trypsin inhibitor	8	Lysozyme	9	Aprotinin

รูปผนวก ข กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดย SDS-PAGE

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวสมรักษ์ พันธ์ผล

วัน เดือน ปีเกิด 9 ธันวาคม พ.ศ. 2509

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์) สาขาวิชาชีววิทยา	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2532