



การคัดเลือก การทำบริสุทธิ์บางส่วนและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส
จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

Screening, Partial purification and Characterization of cellulolytic
enzyme from Actinomycetes

จีรารวรรณ ศีลภัย

Jeerawan Seelapai

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Master of Science in microbiology

Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การคัดเลือก การทำบริสุทธิ์บางส่วนและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส
จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

Screening, Partial purification and Characterization of cellulolytic
enzyme from Actinomycetes

จีรารวรรณ ศीलภัย

Jeerawan Seelapai

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Master of Science in microbiology

Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือก การทำบริสุทธิ์บางส่วนและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยไซต์
ผู้เขียน	นางสาวจิราวรรณ ศีลภัย
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)

.....ประธานกรรมการ
(ดร.ศิริพรรณ สุคนธสิงห์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)

.....
(ดร.สมพร มุลมั่งมี)

.....กรรมการ
(ดร.สมพร มุลมั่งมี)

.....กรรมการ
(ดร.อรณิชา รัตนภรณ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(ดร.สมพร มุลมั่งมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....
(นางสาวจิราวรรณ ศीलภัย)
นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวจิราวรรณ ศीलภัย)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือก การทำบริสุทธิ์บางส่วนและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ เซลลูเลสจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท
ผู้เขียน	นางสาวจิราวรรณ ศีลภัย
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

ศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอสคิโนมัยซีทจำนวน 220 ไอโซเลท ในอาหาร Basal mineral salt broth ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมคือปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่า 133 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยเชื้อรหัส SP4 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดคือ 2.54 U/ml การศึกษาเพื่อบ่งชี้สายพันธุ์โดยวิธี 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces misionensis* (98.18 %) การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โดยการเลี้ยงในอาหารและสภาวะการเลี้ยงเหมือนเดิม แล้วนำส่วนใส (supernatant) มาทำบริสุทธิ์โดยวิธี Evaporation, DEAE-Sephacel และ CM-52 column chromatography ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 177.64 U/mg มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.31 เท่า น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 36 kDa เอนไซม์บริสุทธิ์มีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมคืออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 8 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 8.0 ผลของโลหะต่อกิจกรรมเอนไซม์ พบว่า $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 5 mM ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมพบว่าฟางข้าวมีความจำเพาะสูงมากที่สุด รองลงมาคือชานอ้อยและ Carboxymethyl cellulose (CMC) ตามลำดับ

Thesis Title	Screening, Partial purification and Characterization of cellulolytic enzyme from Actinomycetes
Author	Miss Jeerawan Seelapai
Major Program	Microbiology
Academic Year	2016

Abstract

The cellulolytic activity of total 220 isolates of actinomycetes was investigated in Basal mineral salt broth under the optimum condition at pH 6.0, 37 °C with 200 rpm shaking for 7 days of incubation and 133 isolates were positive. The isolate designated as SP4 exhibited the best activity with 2.54 U/ml. The identification by analysis of a 16S rDNA sequence showed the homology with *Streptomyces misionensis* (98.18 %). The cellulolytic enzyme was purified by evaporation, DEAE-Sephacel and CM-52 column chromatography, respectively. The purified enzyme presented a specific activity of 177.64 U/mg, with a purification fold of 3.31. The enzyme showed a single band with apparent molecular weight of 36 kDa. The purified enzyme expressed the optimum condition at 70 °C with pH 8.0. The thermal and pH stability were found at 60 °C and 8.0, respectively. In addition, 5 mM MgSO₄ enhanced the enzyme activity. And rice straw showed the most specific substrates for the enzyme followed by bagasse and carboxymethylcellulose (CMC), respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. วิไลลักษณ์ สุวะโซโน ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือให้คำปรึกษาทั้งในด้านการค้นคว้าข้อมูลในการทำวิทยานิพนธ์รวมถึงชี้แนะแนวทางเมื่อเกิดปัญหา อีกทั้งกรุณาตรวจแก้เล่มวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร. สมพร มุลมั่งมี ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำปรึกษา คอยดูแลตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ คอยให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางเมื่อเกิดปัญหา และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น รวมถึงความเมตตาที่มีให้เสมอมา

ขอขอบคุณ ดร. ศิรพรรณ สุนทรสิงห์ ประธานกรรมการและ ดร.อรณิชา รัตนภรณ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความกรุณาสละเวลาเข้าร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. ดวงทิพย์ มุลมั่งมี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ ดร. สมพร มุลมั่งมี ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ได้เอื้อเฟื้อเชื้อจุลินทรีย์ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ตึกวิจัยและพัฒนา 1 ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ชั้น 3 ที่สนับสนุนและเอื้อเฟื้อสถานที่ รวมทั้งเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณครอบครัวและพี่ๆ น้องๆ ณ ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ชั้น 3 ห้อง 1321 และ 1327 ที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือเสมอมา

จิรารวรรณ ศีลภัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	45
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	46
วัสดุและอุปกรณ์	46
วิธีการทดลอง	50
3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	58
4. สรุปผลการทดลอง	80
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก ก	87
ภาคผนวก ข	90
ภาคผนวก ค	102
ภาคผนวก ง	110
ประวัติผู้เขียน	138

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตอิมิตัว (กรัม) ที่เติมลงไปในการละลายโปรตีน	18
1.2	ชนิดของเมทริกซ์และกลุ่มประจุบนเมทริกซ์ (Counter ion)	21
1.3	กลุ่มสารที่ต้องการแยกและชนิดของลิแกนด์ที่จำเพาะกัน	23
1.4	แสดงวิธีการทดสอบโปรตีน	27
1.5	ปริมาณเซลล์โลสในวัสดุอินทรีย์	34
1.6	ตัวอย่างของวัสดุเซลล์โลสที่นำมาใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน	34
1.7	องค์ประกอบของเซลล์โลส เฮมิเซลล์โลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	35
1.8	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลล์โลสได้	41
3.1	เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 133 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลล์โลสโดยแสดงการเกิดส่วนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	59
3.2	กิจกรรมของเอนไซม์เซลล์โลสของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลทรหัส RB1.83, RB1.113, RB2.69, RB2.79, SR2.75, SR2.79, SR2.152, SP4, SP16, SP20, SP24, SP36, SP42, SP43 และ SP52	65
3.3	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลล์โลสจากเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	71
3.4	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วย DEAE-Sephacel column chromatography	72
3.5	ผลของไอออนโลหะในสารประกอบชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์โลส	79
3.6	ผลของความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท (substrate specificity) ชนิดต่าง	79

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	วัฏจักรชีวิตของแอคติโนมัยซีท	3
1.2	กลไกการทำงานของเอนไซม์ตามทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ	10
1.3	กลไกการทำงานของเอนไซม์ตามทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม	11
1.4	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างชนิดและอัตราเร็วของปฏิกิริยา	11
1.5	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรทและอัตราเร็วของปฏิกิริยา	12
1.6	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์บางชนิด	13
1.7	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและอัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์	13
1.8	แสดงการทำงานของไดอะไลซิส	20
1.9	ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อย β -D-glucopyranose ที่ต่อด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อย β -D-glucopyranose กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป	32
1.10	โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง	32
1.11	รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ทั่วไป	33
1.12	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เซลลูเลส	36
1.13	การย่อยเซลลูโลสโดยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส	38
3.1	ลักษณะบริเวณส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลายสับสเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทรหัส RB1.83, RB1.113, RB2.69, RB2.79, SR2.75, SR2.79, SR2.152, SP4, SP16, SP20, SP24, SP36, SP42, SP43 และ SP52	62
3.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 5000 เท่า	66
3.3	สายวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบบ Neighbour-joining method โดยใช้ลำดับเบส 16S rDNA gene โดยใช้ <i>Corynebacterium glutamicum</i> ^T (Accession number ATCC 13032) เป็น out-group ค่า Bootstrap values แสดง 1000 ซ้ำ Score bar แสดง 1 หน่วย ต่อ 100 นิวคลีโอไทด์	67
3.4	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	68
3.5	ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	69
3.6	ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	69

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.7	กราฟแสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสโดย DEAE-Sephacel column chromatography	72
3.8	กราฟแสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสโดย CM-52 column chromatography	73
3.9	น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	75
3.10	ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	76
3.11	ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	76
3.12	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	77
3.13	อุณหภูมิที่มีความเสถียรต่อเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4	77

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

mg	=	milligram
g	=	gram
ml	=	milliliter
mg/ml	=	milligram per milliliter
$\mu\text{g/ml}$	=	microgram per milliliter
U/ml	=	Unit per milliliter
U/mg	=	Unit per milligram
U/L	=	Unit per Liter
μl	=	microliter
mM	=	millimolar
nm	=	nanometer
mm	=	millimeter
OD	=	Optical Density
pH	=	Potential of Hydrogen ion
%	=	percentage
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree celsius
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
rpm	=	revolutions per minute
μmol	=	micromole
ng	=	nanogram
ml/min	=	milliliter per minute
mbar	=	millibar
psi	=	Pound per Square Inch

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

เซลลูโลส (cellulose) เป็นชีวโมเลกุลที่พบมากที่สุดในโลก (Tomme *et al.*, 1995) จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบประมาณ 45 % ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ในผนังเซลล์ของพืช โดยโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสจำนวน 8,000-12,000 โมเลกุลต่อกันเป็นสายโซ่โพลีเมอร์ (polymer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1-4-glycosidic ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย (Saha *et al.*, 2004) นอกจากนี้ในเซลลูโลสจะมีลิกนิน (lignin) จับอยู่ซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยทั่วไปการย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธีคือ วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริก หรือกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง วิธีนี้มีข้อจำกัดคือให้ปริมาณกลูโคสต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ ส่วนวิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) โดยอาศัยเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ฟังไจ และแอคติโนมัยซีท โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง คือที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก ทำให้ไม่สูญเสียกลูโคสระหว่างเกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ (Fan *et al.*, 1987) โดยระบบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ควบคุมการย่อยสลายเซลลูโลสประกอบด้วย 3 ระบบสำคัญ คือ 1.) 1, 4- β -endoglucanase, 2.) 1, 4- β -exoglucanase, และ 3.) β -glucosidase (Shah, 2013)

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใยเป็นสายยาว พบได้ในดินปัจจุบันแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่กำลังเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากทั้งนักเทคโนโลยีชีวภาพ นักชีวโมเลกุลและนักนิเวศวิทยา เพราะนอกจากจะพบว่ามีการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด มีลักษณะโครงสร้างและมีพันธุกรรมที่หลากหลายแล้วแอคติโนมัยซีทยังสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzymes) ได้อีกหลายชนิด โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* species มีการศึกษาเอนไซม์หลายชนิด เช่น chitosanase, exo-inulinase, alkaline protease, pectinase, cellulase, xylanase และ peroxidase (Saratale *et al.*, 2012) ในธรรมชาตินั้นพบว่าแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายซากพืชซากสัตว์หรือเชื้อราที่ตายแล้วในดินและมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของสารอาหารในธรรมชาติเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่อยู่ตลอดเวลา

เอนไซม์เซลลูเลสถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะทางอุตสาหกรรมไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร การผลิตไวน์ ทางการเกษตร การผลิตกระดาษ เส้นใย สารซักล้าง อาหารสัตว์ รวมไปถึงการผลิตไบโอเอทานอล (Kasana *et al.*, 2008) ปัจจุบันของเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น

ซังข้าว ต้นข้าวโพด หญ้า ฯลฯ ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้ โดยอาศัยหลักการย่อยสลายองค์ประกอบเหล่านี้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเกิดปฏิกิริยาการย่อยแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลที่ได้นั้นสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์ ถ้าแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะการผลิตไบโอเอทานอล (White *et al.*, 1993)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในการย่อยเซลลูโลส รวมทั้งการทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ รวมทั้งสามารถนำเชื้อสายพันธุ์นี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

1.2 บทตรวจเอกสาร

1. เชื้อแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในคลาส (Class) *Actinobacteria* ในซับคลาส (Subclass) *Actinobacteridae* และถูกจัดไว้อยู่ในอันดับ (Order) *Actinomycetales* ปัจจุบันประกอบด้วย 6 classes 27 orders 45 families 342 genera ได้แก่

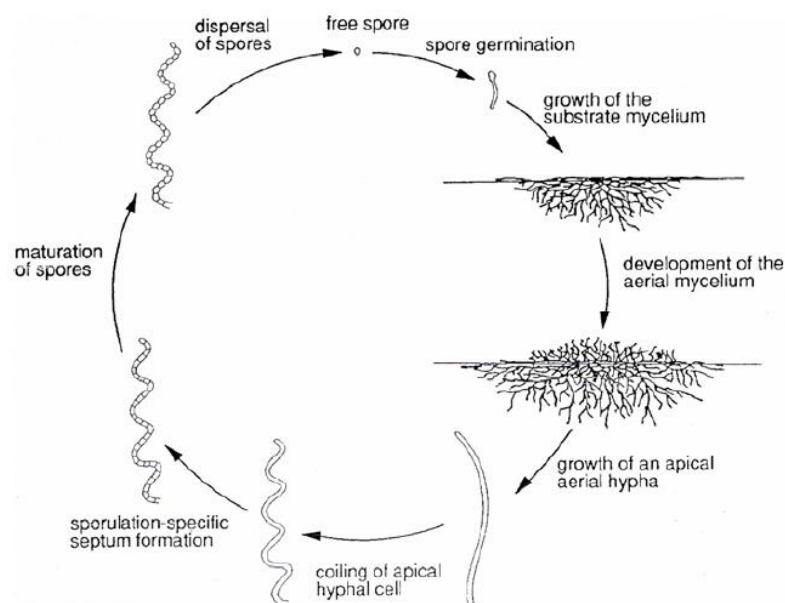
Class I. <i>Actinobacteria</i>	(18 orders	45 families	312 genera)
Class II. <i>Acidimicrobiia</i>	(1 order	2 families	7 genera)
Class III. <i>Coriobacteriia</i>	(2 orders	3 families	15 genera)
Class IV. <i>Nitriliruptoria</i>	(2 orders	2 families	2 genera)
Class V. <i>Rubrobacteria</i>	(2 orders	2 families	2 genera)
และ Class VI. <i>Thermoleophilia</i>	(2 orders	4 families	4 genera)

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) เป็นสายยาวซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณ Mol % G+C สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือประมาณ 55-78 % โคลินีของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะที่แตกต่างจากโคลินีของแบคทีเรียอื่น ๆ คือมีลักษณะทึบแสง เส้นใยเหนือผิวอาหารแห้งและมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่าและสามารถสังเกตได้ชัดเจนหรือผิวโคลินีอาจเรียกคล้ายหนังสัตว์หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้น ๆ สังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี่ สามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลืองส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น และที่สำคัญแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัว รวมทั้งสารที่สามารถต้านเซลล์มะเร็งหรือเซลล์เนื้องอก (Williams *et al.*, 1989) นับว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญทางการแพทย์

และทางเภสัชกรรมเป็นอย่างมาก รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอีกด้วย

สำหรับลักษณะที่บ่งชี้ว่าแอกติโนมัยสีทไม่ใช่เชื้อรา (fungi) คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและไม่มีไมโทคอนเดรีย (Cross and Goodfellow, 1973) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีทเหมือนแบคทีเรียทั่วไปที่เส้นของมิวโคเปปไทด์ (Mucopetide) ซึ่งประกอบด้วย N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid และ diaminopimelic acid; glutamic acid; glycine และ alanine (Davis *et al.*, 1973; Waksman and Henrici, 1974) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีทเองนั้นก็ยังมีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน

วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีทจะเริ่มต้นจากการสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหารเพื่อใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตและภายหลังจะมีการสร้างเส้นใยอากาศเพื่อใช้สืบพันธุ์หรือในกรณีที่มีการขาดอาหาร การขาดน้ำหรือการสะสมสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท (จามจรีและคณะ, 2555)

1.1 บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอกติโนมัยสีทต่อการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุและการผลิตเอนไซม์

1.1.1 การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ

เชื้อแอกติโนมัยสีทในธรรมชาติซึ่งส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในดิน มีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย ในช่วงที่มีอินทรีย์วัตถุในดินมากจะมีพวกแบคทีเรียและเชื้อราเจริญอยู่มาก และแอกติโนมัยสีทจะตามมาในภายหลังเพราะว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทเจริญได้ช้าและเจริญได้ดีก็ต่อเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้วคือในช่วงที่มีสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ทนต่อการ

ย่อยสลายเหลืออยู่มาก แอคติโนมัยสีทที่มีหลายชนิดและหลายสายพันธุ์จะช่วยกันย่อยสลายสารอินทรีย์พวกเซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น (Alexander, 1977)

การย่อยสลายเซลลูโลส เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชที่มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลกลูโคสที่เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β -1, 4-glucosidic linkages ภายในสายประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 8,000 จนถึง 12,000 โมเลกุลแล้วแต่ชนิดของพืช เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสพบว่าเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* sp. มากที่สุด และเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Micromonospora* sp., *Streptosporangium* sp., *Nocardia* sp. และ *Microbispora* sp. (Alexander, 1977) นอกจากนี้ยังมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ *Thermomonospora* sp. และ *Streptomyces* sp. ที่เจริญที่อุณหภูมิสูง (กนกกร, 2548)

การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักอีกชนิดหนึ่งของพืชโดยสามารถแบ่งประเภทได้ตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ Xylans, Arabinans, Mannans และ Galactans เป็นต้น เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสมีด้วยกันหลายชนิดแต่ที่มีบทบาทมากที่สุดคือเชื้อในสกุล *Streptomyces* sp. และเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Micromonospora* sp., *Streptosporangium* sp., *Nocardia* sp. และ *Microbispora* sp. เป็นต้น (Alexander, 1977)

การย่อยสลายลิกนิน ลิกนินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชโดยต่ออยู่กับสายของน้ำตาลทำให้ผนังเซลล์ของพืชแข็งแรงทนทานต่อการย่อยสลาย การย่อยสลายลิกนินในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นกิจกรรมของเชื้อราโดยเฉพาะเห็ดชนิดต่าง ๆ แต่ก็มีเชื้อแอคติโนมัยสีทบางชนิดที่สามารถย่อยสลายได้ ซึ่งได้แก่เชื้อในสกุล *Streptomyces* sp. และ *Micromonospora* sp. (มัลลิกา, 2550)

การย่อยสลายไคติน ไคตินเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไป โครงสร้างของไคตินประกอบด้วย N-acetyl glucosamine ต่อกันเป็นสายยาว ในธรรมชาติพบว่า 90 % ของไคตินจะถูกย่อยสลายโดยเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีบทบาทในการย่อยสลายไคตินมากที่สุดคือเชื้อในสกุล *Streptomyces* sp. และ *Micromonospora* sp. ตามลำดับ (กนกกร, 2548)

การย่อยสลายแป้ง แป้งเป็นองค์ประกอบที่พบได้ทั่วไปในพืช โครงสร้างของแป้งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันเป็นสายยาวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4-glucosidic linkages และ α -1, 6-glucosidic linkages เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบว่าสามารถย่อยแป้งได้ดี ได้แก่ *Streptomyces* sp., *Nocardia* sp. และ *Micromonospora* sp. เป็นต้น (ศรีสกุล, 2552)

การย่อยสลายโปรตีน โปรตีนเป็นโครงสร้างหลักของสัตว์และพืช โครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงต่อกันเป็นสายยาว จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้รวมทั้งเชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยโดยเฉพาะเชื้อ *Streptomyces* sp. (จิรพรรณ, 2550)

การย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ paraffin, phenol, steroid และ pyrimidine พบว่าเป็นกิจกรรมของเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุล *Nocardia* sp. มากกว่าชนิดอื่นๆ ส่วนเชื้อสกุล *Micromonospora* sp. มีบทบาทในการย่อยสลาย chitin, cellulose, glycoside, pentosans และ lignin (Alexander, 1977)

1.1.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์

เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ที่สำคัญมากมายในทางอุตสาหกรรม เช่น xylanase ที่สามารถย่อยสลายเส้นใย (Fibriolytic) สามารถใช้ในการฟอกสีกระดาษหรือผสมในอาหารสัตว์ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ xylanase ได้แก่ *Thermomonospora* sp. โดยที่เชื้อกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 60–75 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการทดสอบพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่มากกว่า 80 % หลังจากการบ่มส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที (McCarthy *et al.*, 1985) และการผลิตเอนไซม์ thermostable glucoamylase จากเชื้อ *Streptosporangium* sp. โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญในการย่อยแป้งในอุตสาหกรรม จากการทดสอบเป็นการผลิตเอนไซม์โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร starch-Czapek เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าเอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ 100 % ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Stamford *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ แอคติโนมัยสีทหลาย ๆ สายพันธุ์ต้องการสารอาหารที่จำเพาะและความคงที่ของปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ มากกว่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่น ๆ เช่น เอนไซม์ glucose isomerase, inulinase, cellulase หรือ hemicellulase (Srinivasan *et al.*, 1991)

เชื้อแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เชื้อที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนส คือ *Streptomyces* sp. และ *Thermomonospora* sp. ส่วนเชื้อที่สามารถย่อยสลายไคติน ได้แก่ *S. griseus*, *S. antibioticus* และ *Amycolatopces orientalis* (นฤมล, 2550)

2. เอนไซม์

2.1 ความหมายของเอนไซม์

เอนไซม์ คือ โปรตีนเชิงซ้อนที่ทำหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยาได้สูง เอนไซม์สามารถตอบสนองต่อปฏิกิริยาชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก พืช สัตว์ และมนุษย์ (พิชิตพล, 2550)

เอนไซม์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญสำหรับกระบวนการเผาผลาญทั้งหมด แม้ว่าจะคล้ายกับโปรตีนอื่น ๆ คือ ประกอบด้วยกรดอะมิโนแต่มีหน้าที่ต่างกันที่เอนไซม์มีความสามารถเฉพาะในการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีได้ง่ายโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงตัวเอง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ (พิชิตพล, 2550)

เอนไซม์ คือ โมเลกุลโปรตีนธรรมชาติที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพสูงในปฏิกิริยาชีวเคมีช่วยให้ปฏิกิริยาเคมีเกิดได้เร็วและมีประสิทธิภาพ เอนไซม์ไม่ใช่แค่ทำงานได้เร็วและมี

ประสิทธิภาพเท่านั้นยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการชีวเคมี มีเช่นนั้นกระบวนการจะดำเนินไปช้ามากหรือบางครั้งไม่เกิดปฏิกิริยาเลย (พิชิตพล, 2550)

เอนไซม์ คือ ตัวเร่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิต (Biocatalyst) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาได้ภายใต้ภาวะไม่รุนแรงซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับภาวะภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั่วไป มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่า สับสเตรท (Substrate) เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนลักษณะกลม ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ขึ้นกับโครงรูป (Conformation) ของโปรตีน ซึ่งมีการขดตัวที่จำเพาะและกำหนดโดยการเรียงลำดับของกรดอะมิโน (มนตรี, 2543) เอนไซม์บางชนิดไม่สามารถทำงานได้หากขาดส่วนประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นนอกเหนือจากโปรตีน เอนไซม์ที่ทำงานเมื่อมีไอออนของโลหะเรียกว่า โคแฟกเตอร์ (Cofactor) เช่น Fe^{2+} Mg^{3+} และ Mn^{2+} หรืออาจเป็นสารประกอบอินทรีย์เรียกว่า โคเอนไซม์ (Coenzyme) ส่วนของเอนไซม์ที่ประกอบไปด้วยโคเอนไซม์หรือไอออนของโลหะจะเรียกว่า โฮโลเอนไซม์ (Holoenzyme) และส่วนที่เป็นโปรตีนจะเรียกว่า อะโพอเอนไซม์ (Apoenzyme) โดยส่วนใหญ่ของโคเอนไซม์เป็นสารอินทรีย์หรืออนุพันธ์ของวิตามิน (Horton *et al.*, 2002)

2.2 ประเภทของเอนไซม์

แบ่งประเภทของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับเกณฑ์ใช้ในการแบ่งดังนี้

2.2.1 แบ่งตามส่วนประกอบทางเคมี

เอนไซม์ที่ส่วนประกอบเป็นโปรตีนอย่างง่าย คือ เอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพได้โดยไม่ต้องมีส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนเข้ามาจับ (พิชิตพล, 2550)

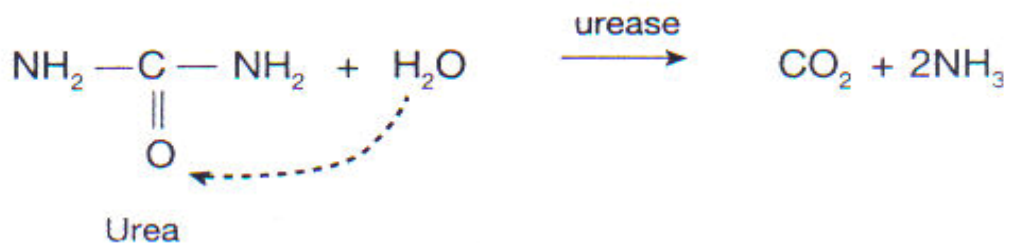
Holoenzyme คือ เอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพได้เมื่อมีส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนเข้ามาจับ โครงสร้างของเอนไซม์มี 2 ส่วน ได้แก่ เอนไซม์ที่ไม่ทำงาน (Apoenzyme) และส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนหรือโคแฟกเตอร์ (Cofactor) (พิชิตพล, 2550)

2.2.2 แบ่งตามโครงสร้างสามมิติ

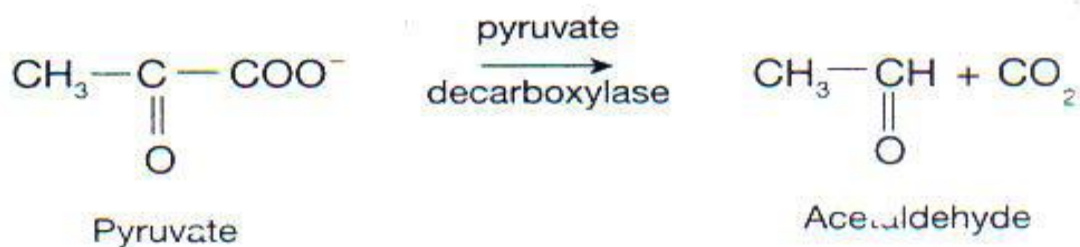
โมนอเมอร์ริกเอนไซม์ (Monomeric enzyme) คือ เอนไซม์ที่ประกอบด้วยสายโซ่พอลิเพปไทด์เพียง 1 สายโซ่เท่านั้นมักเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ เช่น เพปซินหรือทริปซิน เป็นต้น (พิชิตพล, 2550)

เอนไซม์เชิงซ้อนหลายชนิด (Multienzyme complex) คือ กลุ่มของเอนไซม์ที่มาทำงานร่วมกันโดยไม่มีแรงยึดเหนี่ยวแบบโคเวเลนต์ ผลผลิตของเอนไซม์ชนิดแรกจะเป็นสารที่เอนไซม์ชนิดต่อไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยา เช่น Alpha-keto acid dehydrogenase complex ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ Pyruvic dehydrogenase, Dihydrolipoyl transacilase และ Dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่งใช้เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไพรูวิก (Pyruvic) ไปเป็นอะซิติลโคเอ (Acetyl CoA) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) (พิชิตพล, 2550)

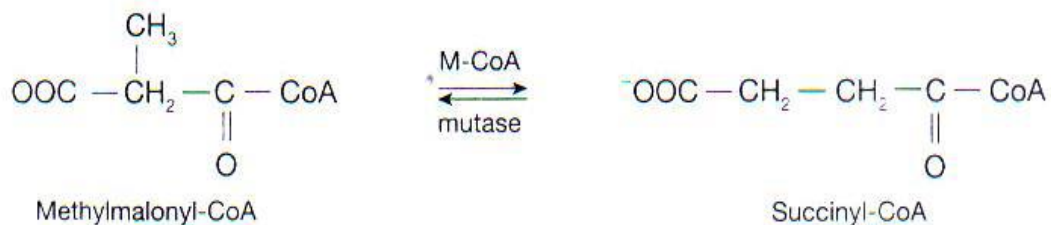
3) Hydrolase เร่งปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำ



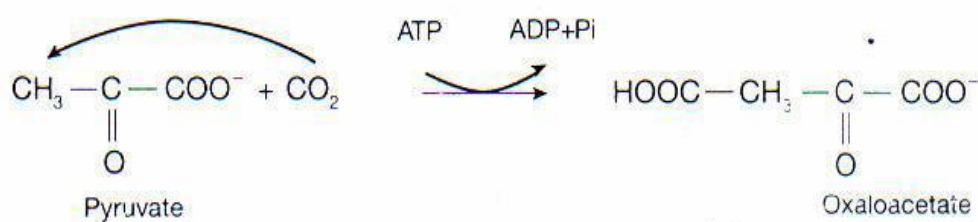
4) Lyase เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่เคมีเข้าไปในพันธะคู่



5) Isomerase เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไอโซเมอร์



6) Ligase เร่งปฏิกิริยาการเชื่อม 2 โมเลกุลเข้าด้วยกัน โดยอาศัยการสลายหมู่ไพโรฟอสเฟตของ ATP หรือไตรฟอสเฟต



การเรียกชื่อเอนไซม์มีการเรียกหลายแบบและเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาและสับสเตรท ดังนั้นจึงอาจเรียกชื่อเอนไซม์ตามชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์เร่ง เช่น เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา Decarboxylation ก็เรียก Decarboxylase หรืออาจเรียกชื่อเอนไซม์ตามสับสเตรทก็ได้ เช่น เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการแตกโมเลกุลของมอลโตสก็เรียก Maltase (พิชิตพล, 2550)

2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์

1. เอนไซม์มีโครงสร้างทางเคมีเป็นโปรตีนซึ่งประกอบไปด้วยโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) เพียงสายเดียวหรือหลายสายที่ม้วนกันเป็นก้อนกลมมีโครงสร้างที่จำเพาะและถูกกำหนดมาโดยลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนและยังมีเอนไซม์อีกจำนวนมากที่มีสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนรวมอยู่ด้วยจึงทำหน้าที่ได้ เอนไซม์เหล่านี้เรียกว่า “โฮโลเอนไซม์” (Holoenzyme) เฉพาะส่วนที่ไม่เป็นโปรตีนจะเรียกว่า “กลุ่มโพรสทีติก” (Prosthetic group) ซึ่งอาจจะเป็นไอออนของโลหะเรียกว่า “โคแฟกเตอร์” (Cofactor) และถ้าเป็นสารประกอบอินทรีย์จะเรียกว่า “โคเอนไซม์” (Coenzyme)

2. มีเอนไซม์จำนวนมากจะไม่ทำงานถ้าไม่มีตัวช่วยอย่างโคเอนไซม์และโคเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเป็นวิตามินชนิดที่ละลายน้ำหรือเกลือแร่จำเป็นบางชนิด ซึ่งเกลือแร่จำเป็นในบางครั้งจะเรียกว่า โคแฟกเตอร์ (Cofactor) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากโปรตีน แต่โคเอนไซม์ไม่ใช่โปรตีนและเอนไซม์จะมีขนาดใหญ่มากกว่าโคเอนไซม์ โดยในระหว่างการทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีอยู่นั้นเอนไซม์จะกลับคืนมาเป็นอิสระอย่างเดิมแต่โคเอนไซม์จะหมดไปเรื่อย ๆ จึงจำเป็นต้องหามาเสริมจากที่ต่างๆ

3. เอนไซม์แต่ละชนิดมีหน้าที่เฉพาะตัวเพราะจะทำปฏิกิริยาเคมีจำเพาะกับสารตั้งต้นหรือสับสเตรท (Substrate) ที่ถูกกำหนดไว้เท่านั้น เช่น เอนไซม์ชนิดย่อยไขมันจะไม่ย่อยแป้งและเอนไซม์ย่อยแป้งจะไม่ย่อยโปรตีน เป็นต้น

4. เอนไซม์จะยังคงสภาพเดิมทั้งคุณสมบัติและปริมาณ ภายหลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้วจึงจะสามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้อีก

5. เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยเป็นตัวลดพลังงานกระตุ้น

6. เอนไซม์มีความไวต่อปฏิกิริยามากแม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ถ้าไม่มีเอนไซม์ปฏิกิริยาเคมีทุกชนิดจะเกิดขึ้นช้ามากจนชีวิตไม่สามารถรอดอยู่ได้

7. การแช่แข็งจะไม่ทำลายความสามารถของเอนไซม์ส่วนใหญ่แต่เอนไซม์จะถูกทำลายได้โดยง่ายที่ความร้อนสูงเกิน 45 องศาเซลเซียส

8. เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรท (Substrate) หรือสารตั้งต้นที่จะเข้าทำปฏิกิริยาแต่ละชนิดจึงสามารถเร่งปฏิกิริยาใดปฏิกิริยาหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น ยกเว้นเอนไซม์บางชนิดที่มีความเฉพาะเจาะจงน้อยจะเร่งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นที่คล้ายกันได้

9. อัตราการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ อุณหภูมิ (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานโดยทั่วไปของเอนไซม์อยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส หากสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพโครงสร้างทำให้เข้าร่วมกับสับสเตรทไม่ได้), ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) (โดยทั่วไปเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6-7 แต่เอนไซม์หลายชนิดจะทำงาน

ได้ดีในสภาพค่าความเป็นกรด-เบส (pH) แตกต่างกันอย่างออกไป เช่น Lipase ทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 7, Pepsin ทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 1.5-2.5, Trypsin ทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 8-11 เป็นต้น), ปริมาณของเอนไซม์และสับสเตรท (อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะแปรผันตามความเข้มข้น ถ้ามากเกินไปอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะคงที่เนื่องจากไม่มีเอนไซม์และสับสเตรทเหลือพอที่จะทำปฏิกิริยา)

10. เอนไซม์แต่ละชนิดที่ร่างกายผลิตขึ้นมาจะมีชีวิตหรืออายุได้เพียง 20 นาที และจะต้องมีเอนไซม์ใหม่เข้ามาทดแทนอยู่เรื่อย ๆ แต่ก็มีเอนไซม์บางชนิดสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์ก่อนที่มันจะหมดสภาพไป

11. เอนไซม์ที่มีระดับต่ำในร่างกายจะมีความสัมพันธ์กับโรคของความเสื่อมต่าง ๆ ถ้าเอนไซม์มีระดับต่ำมากโรคแห่งความเสื่อมก็จะเกิดขึ้นมากตามไปด้วย

12. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ขึ้นมาได้เองด้วยความสามารถในการผลิตที่ต่างกัน

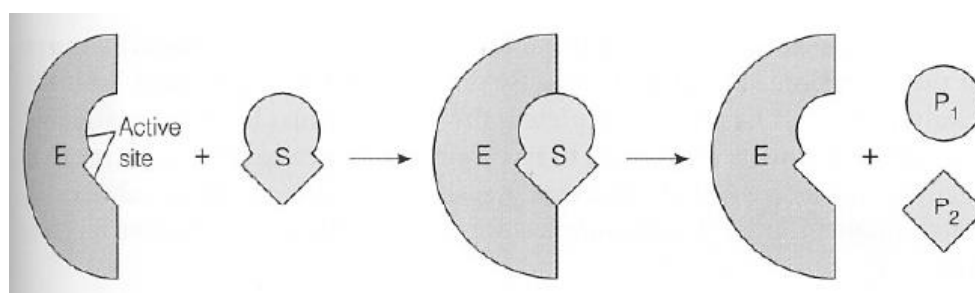
2.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์

กลไกพื้นฐานในการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีของเอนไซม์เริ่มจากการรวมตัวของโมเลกุลสารที่บริเวณเฉพาะของเอนไซม์ (Active site) การรวมตัวของสารกับเอนไซม์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการกระจายอิเล็กตรอนในพันธะเคมีของสาร ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเคมีก่อรูปเป็นผลิตภัณฑ์และผลิตภัณฑ์จะถูกปล่อยออกมาจากผิวของเอนไซม์ เพื่อให้เอนไซม์กลับไปอยู่ในรูปเดิมที่สามารถรวมตัวกับสารโมเลกุลอื่นได้อีก

บริเวณเฉพาะของเอนไซม์จะมีรูปร่างเรขาคณิตเฉพาะสามารถรวมตัวกับโมเลกุลของสารที่มีรูปร่างเรขาคณิตเฉพาะเช่นกันเหมือนการต่อจิ๊กซอ หมายความว่าเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาเฉพาะกับสารประกอบเพียงชนิดเดียวหรือ 2-3 ชนิดที่คล้ายกัน (พิชิตพล, 2550)

ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (Lock and Key Theory)

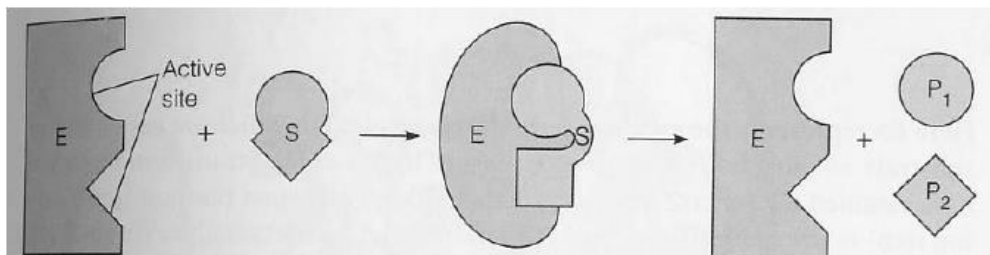
นำเสนอโดย อีมิล ฟิชเชอร์ (Emil Fisher) ในปี 1894 ใช้อธิบายการทำงานเฉพาะของเอนไซม์กับสารโมเลกุลเดี่ยว ๆ โดยกล่าวว่า “เอนไซม์คือแม่กุญแจและโมเลกุลสารคือลูกกุญแจ ลูกกุญแจที่มีขนาดและรูปร่างที่ถูกต้องเท่านั้นจึงจะสอดเข้าไปในร่องของแม่กุญแจได้ ลูกกุญแจที่มีขนาดใหญ่กว่า เล็กกว่า หรือมีร่องฟันไม่ถูกต้องจะไม่สามารถสอดเข้าร่องแม่กุญแจได้อย่างเหมาะสม” (รูปที่ 1.2)



รูปที่ 1.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์ตามทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (พิชิตพล, 2550)

ทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม (Induced Fit Theory)

นำเสนอโดยคอคชแลนด์(Koshland) ใช้อธิบายได้กว้างกว่าทฤษฎีแรก เนื่องจากมีความยืดหยุ่นโดยอธิบายว่า “เมื่อโมเลกุลสารเข้ามาจับที่บริเวณเฉพาะของเอนไซม์จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เปลี่ยนรูปร่างให้เหมาะสม ทำให้การรวมตัวกันระหว่างโมเลกุลสารกับเอนไซม์ดีขึ้น เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น ก่อรูปเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาจากผิวของเอนไซม์ นอกจากนี้สารที่มีโมเลกุลคล้ายกันก็สามารถรวมตัวกับเอนไซม์ได้ แต่ไม่เหนี่ยวนำให้เอนไซม์เปลี่ยนรูปร่างให้เหมาะสม ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีไม่ก่อรูปเป็นผลิตภัณฑ์ออกมา (รูปที่ 1.3)



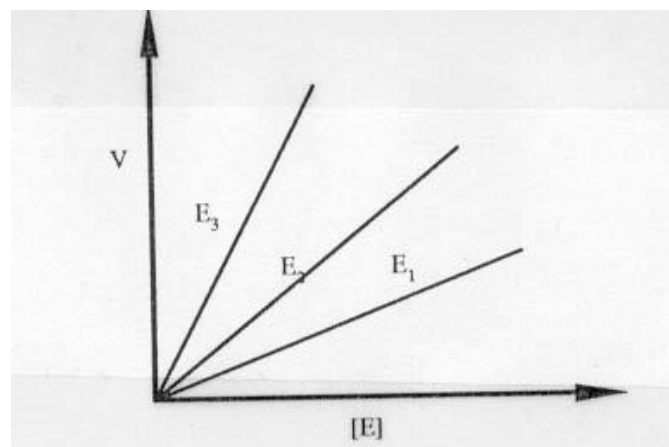
รูปที่ 1.3 กลไกการทำงานของเอนไซม์ตามทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม (พิชิตพล, 2550)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

2.5.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ [E]

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ เมื่อให้ความเข้มข้นของสับเตรทคงที่

ความเข้มข้นของเอนไซม์ E (เมื่อให้ [S] สูงมาก) โดย v จะแปรตาม [E] และ E ต่างชนิดกัน จะให้ค่า v แตกต่างกันด้วย (รูปที่ 1.4) (จิระพันธ์, 2554)

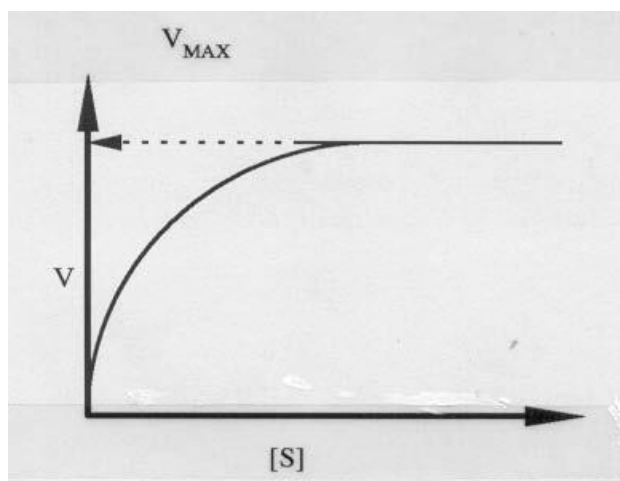


รูปที่ 1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างชนิดและอัตราเร็วของปฏิกิริยา (จิระพันธ์, 2554)

2.5.2 ความเข้มข้นของซับสเตรท [S]

เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเพิ่มของซับสเตรท แต่เมื่อเพิ่มซับสเตรทจนถึงระดับหนึ่งแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทก็ตาม อัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะไม่เพิ่มขึ้นซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของซับสเตรทมีน้อยเอนไซม์ยังมีมากอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดีและเมื่อมีซับสเตรทมากขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเกิดเร็วขึ้น แต่เมื่อซับสเตรทมีมากถึงระดับหนึ่งเอนไซม์จะถูกใช้ไปหมด ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทจึงไม่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

ค่า v สัมพันธ์กับ $[S]$ เป็น hyperbolic graph และที่ $[S]$ สูงๆ ค่า v จะไม่เพิ่มขึ้นอีกต่อไป (Saturation) ค่า v ที่ตำแหน่งนี้จะเรียกว่า maximum velocity เรียกย่อว่า V_{max} ของปฏิกิริยานั้นๆ ค่า v จะเรียกว่า initial velocity (รูปที่ 1.5) (จิระพันธ์, 2554)



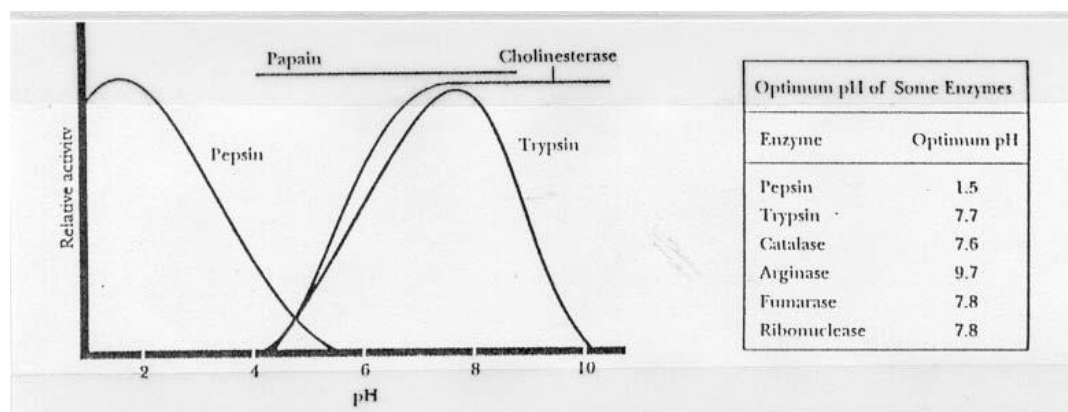
รูปที่ 1.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรทและอัตราเร็วของปฏิกิริยา (จิระพันธ์, 2554)

2.5.3 ความเป็นกรด-เบส (pH)

ความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายจะมีอิทธิพลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มาก ทั้งนี้เพราะเอนไซม์แต่ละชนิดจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ใด ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) หนึ่งเท่านั้นเรียกค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดนี้ว่า Optimum pH เช่น เอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ย่อย Egg albumin จะมี Optimum pH ที่ 1.5, เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ย่อยโปรตีนมี Optimum pH ที่ 7.8 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ไปจาก Optimum pH เพียงเล็กน้อยอาจจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงได้

E ทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) หนึ่ง ๆ ที่เหมาะสม จะเรียกว่า Optimum pH การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ให้สูงมากหรือต่ำไปอาจจะทำให้ E เสีย

สภาพธรรมชาติ (Denaturation) หรือทำให้การจับกันระหว่าง S กับ E เกิดขึ้นไม่ได้ ผลก็คือ E จะทำงานได้น้อยลงหรือไม่ทำงานเลย (รูปที่ 1.6) (จิระพันธ์, 2554)

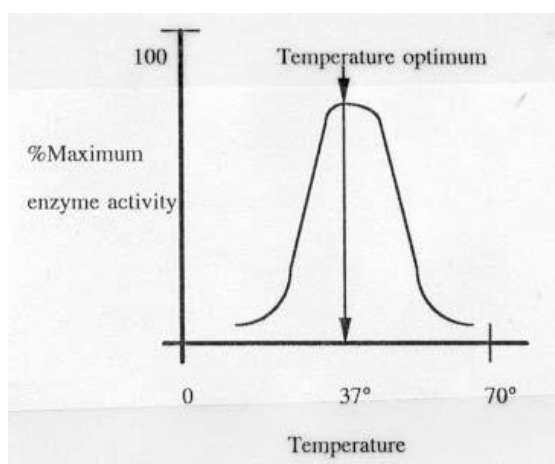


รูปที่ 1.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์บางชนิด (จิระพันธ์, 2554)

2.5.4 อุณหภูมิ

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีอัตราเร็วเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นแต่จะมีที่อุณหภูมิหนึ่งซึ่งเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดเรียกอุณหภูมินี้ว่า Optimum temperature โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมี Optimum temperature ไม่สูงเกินกว่า 50 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้เอนไซม์จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เลย ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ถูกทำลายโครงสร้าง (Denaturation) นั้นเอง

ปกติปฏิกิริยาเคมีจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น ในการเร่งปฏิกิริยาโดย E เมื่ออุณหภูมิมากขึ้นจะทำให้ทำงานดีขึ้น ถ้าเกิน 60 องศาเซลเซียส E จะทำงานลดลงเพราะอาจถูก denature โดยความร้อน ที่อุณหภูมิต่ำการจับกันของ E กับ S เกิดขึ้นไม่ได้ ทำให้ E ทำงานได้น้อยลง (รูปที่ 1.7) (จิระพันธ์, 2554)



รูปที่ 1.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและอัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์ (จิระพันธ์, 2554)

2.5.5 ความดันบรรยากาศ (pressure)

ค่า v ของ E จะแปรตามความดัน ถ้าความดันสูง ๆ จะทำลาย E (Denaturation) ได้ (จิริพันธ์, 2554)

2.5.6 ความเข้มข้นของประจุ (ionic strength)

ค่าความเข้มข้นของสารละลายที่มีประจุที่ใช้ในการศึกษา E นั้น จะมีค่า ionic strength ที่เหมาะสม ประมาณ 0.1-0.2 M ถ้าค่านี้มากหรือน้อยเกินไปทำให้มีผลต่อ activity ของ E ได้ (จิริพันธ์, 2554)

2.6 การเสื่อมสภาพของเอนไซม์

การเสื่อมสภาพของเอนไซม์เป็นการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน (Native conformation) ที่ปกติทำงานได้ดีให้กลายเป็นโปรตีนที่ทำงานได้น้อยลงหรือสูญเสียหน้าที่ไปและยังอาจมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติอื่น ๆ ของโปรตีนด้วยสาเหตุที่ทำให้การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ ดังต่อไปนี้

2.6.1 สารเคมี (chemical agents)

ก. กรดหรือเบสแก่และตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวจะทำลาย H-bond และ Salt bridges reducing agents เช่น β -mercaptoethanol, Dithiothreitol จะทำลาย Disulfide bond ให้กลายเป็นหมู่ Sulfhydryl ส่วน Urea จะทำลาย H-bond และ Hydrophobic interaction

ข. เกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะมีผลทำให้การละลายของโปรตีนดีขึ้นหรือแย่ลงได้ เช่น Fibrous protein ปกติจะละลายน้ำได้ยาก ถ้ามีการเติมเกลือลงไปเล็กน้อยจะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น (Salting in) แต่ถ้าเติมเกลือมากเกินไปจะทำให้โปรตีนนั้นตกตะกอนลงมา (Salting out)

ค. Detergents จะทำลาย Hydrophobic interactions ของโปรตีนทำให้สายโพลีแพปไทด์ยึดออกจากกันเป็นสายยาว

ง. โลหะหนัก (Heavy metals) จะทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป เช่น ทำลาย Salt bridges หรือโลหะหนักจับตัวกับหมู่ Sulfhydryl ของโปรตีน ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนได้ เช่น Ag^+ , Hg^{+2} และ Pb^{+2} ก็สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ (दनัย, 2552)

2.6.2 สภาพแวดล้อม

สภาพแวดล้อมที่ไม่ปกติ เช่น การเขย่าแรง ๆ จนเกิดฟอง (Foaming), การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้อุณหภูมิของโปรตีนสั้นสะเทือนมากขึ้นส่งผลให้ H-bond ซึ่งเป็นพันธะอย่างอ่อนถูกทำลายไปได้ นอกจากนี้ยังมี Physical agents อย่างอื่น ๆ เช่น ความดัน, ความเย็นจัด จนแข็ง, รังสี Ultraviolet, X-ray, Ultrasound ที่สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนให้

สูญเสียไปได้ โปรตีนบางอย่างเมื่อถูกทำให้คลายตัว (Unfolding) และเสียสภาพธรรมชาติไปอาจทำให้กลับคืนสู่สภาพธรรมชาติได้อีก (Renaturation) ถ้าสภาวะเหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของตัวทำละลายกลับคืนสู่สภาพที่เหมาะสม ถ้าโปรตีนนั้นเป็นเอนไซม์เอนไซม์นั้นก็สามารถทำงานได้อีก การทำลายสภาพธรรมชาติบางครั้งก็เกิดขึ้นอย่างถาวร การแข็งเป็นลิ่มด้วยความร้อน (Coagulation) เป็นการทำลายสภาพธรรมชาติอย่างหนึ่งของโปรตีนที่ส่วนมากจะกลับคืนสู่สภาพเดิมไม่ได้ เช่น โปรตีนในไข่ขาว นั่นคือความร้อนจะทำให้โปรตีนถูกทำลายสภาพธรรมชาติก่อนแล้วจึงมีการแข็งตัวเป็นลิ่ม การแข็งเป็นลิ่มบางอย่างอาจเกิดจากปฏิกิริยาเคมีโดยเอนไซม์และปัจจัยต่าง ๆ ร่วมด้วย เช่น การแข็งเป็นลิ่มของเลือด การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ (Denaturation) เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงจนสารตั้งต้นรวมกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งไม่ได้จะทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไปดังนั้นในการสกัดเอนไซม์หรือการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จึงมักต้องทำในที่ ๆ มีอุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์จากความร้อน เมื่อสกัดออกจากเซลล์ความทนทานต่ออุณหภูมิสูงจะลดลง ออกซิเจนและสารที่เป็นสารออกซิไดซ์สามารถทำให้เอนไซม์หลายชนิดเสื่อมสภาพได้ โดยมักจะทำให้เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ (Disulfide Bridges) ในลูกโซ่โพลีเพปไทด์ที่มี -SH ของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cysteine) สารรีดิวซ์สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้จะไปทำลายไดซัลไฟด์บริดจ์เกิดเป็น -SH 2 กลุ่ม (दनัย, 2552)

2.7 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Harris and Angal, 1989)

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งดังนั้นการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Purification) จึงใช้หลักการเดียวกันกับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งอาศัยหลักการพื้นฐานของลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของสารที่ต้องการแยก เช่น ขนาดโมเลกุล มวล ประจุไฟฟ้าบนโมเลกุล ความสามารถในการละลาย และความจำเพาะกับสารบางชนิด

2.7.1 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยคุณสมบัติด้านการละลาย

โปรตีนสามารถละลายอยู่ในน้ำได้ดีมีเหตุผลหลักอยู่ 2 ประการ คือ โมเลกุลของโปรตีนมีส่วนที่ชอบน้ำสามารถเกิดแรงกิริยากับน้ำได้ เรียกส่วนนี้ว่า Hydrophilic patches สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเอาโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนได้ อีกสาเหตุหนึ่ง คือ บนโมเลกุลของโปรตีนมีแรงผลักไฟฟ้าสถิต (Electrostatic repulsion) สูงกว่าแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต ทำให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกันจึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถเพิ่มปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยตัวเอง (Protein-Protein interaction) หรือการลดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (Protein-Water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลงทำให้โปรตีนตกตะกอนในที่สุดสำหรับการตกตะกอนโปรตีนโดยวิธีที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ได้แก่

1. การตกตะกอนที่ค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric precipitation) โปรตีนแต่ละชนิดมีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่ทำให้สมมูลของประจุบนโมเลกุลเป็นศูนย์ เรียกค่านี้ว่า จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point (pI)) เป็นค่าเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อไหร่ก็ตามที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายโปรตีนมีค่าเท่ากับ Isoelectric point (pI) โปรตีนนั้นจะเกิดการ

รวมตัวกันแล้วตกตะกอนลงมา เนื่องจากบนโมเลกุลของโปรตีนนั้นมีประจุสุทธิเป็นศูนย์จึงไม่มีแรงผลักดันไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอง โปรตีนจึงเข้าใกล้กันมากพอที่จะเกิดการรวมตัว (Aggregate) ตกตะกอนลงมาได้ โปรตีนและเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่า Isoelectric point (pI) แตกต่างกัน ดังนั้นในสารละลายโปรตีนผสมจึงสามารถใช้หลักการปรับค่าการละลายมาใช้ในการตกตะกอนหรือแยกโปรตีนที่ต้องการออกมาได้ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติเมื่อโปรตีนหรือเอนไซม์มีค่า Isoelectric point (pI) ใกล้เคียงกัน เช่น Isoelectric point (pI) เท่ากับ 3.9 และ 4.0 การแยกตะกอนของเอนไซม์ทั้งสองจะแยกจากกันได้ไม่สมบูรณ์เป็นข้อเสียของวิธีการนี้จึงนิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่สนใจในกระบวนการแยกหรือกระบวนการทำโปรตีนบริสุทธิ์ในระดับหนึ่งเท่านั้น

2. การตกตะกอนโดยอาศัยหลักการเพิ่มค่าความแรงของไอออนโดยใช้เกลือ การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกว่าวิธีการนี้ว่า Salting out เป็นการเติมเกลือลงไป ในสารละลายโปรตีนผสมเพื่อเพิ่มความแรงไอออน (Ionic strength) ของสารให้สูงขึ้นจนกระทั่งไอออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนออกมอล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง อาจกล่าวได้ว่าเป็นการแข่งขันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโมเลกุลของเกลือในการเกิดแรงทางไฟฟ้ากับโมเลกุลของน้ำนั่นเอง เมื่อไหร่ก็ตามที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าเหลือน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวกันตกตะกอนลงมา เกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เนื่องจากเกลือชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำสูงมากและมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อนข้างต่ำในช่วง 0-30 องศาเซลเซียส (Temperature coefficient of solubility) (ตารางที่ 1.1) ทำให้สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ โดยไม่เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังมีเกลือชนิดอื่นที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีน เช่น โซเดียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟต, โพตัสเซียมซัลเฟต, โซเดียมซัลเฟต เป็นต้น

โดยเกลือที่มีประจุแบบไดวาเลนต์ (Divalent ion) เช่น SO_4^{2-} และไตรวาเลนต์ (Trivalent ion) เช่น PO_4^{3-} จะให้ผลในการตกตะกอนได้ดีกว่าพวกที่มีไอออนเดี่ยว (Univalent ion) เช่น Cl^- ตัวอย่างเช่น เกลือฟอสเฟตสามารถให้ค่า Ionic strength สูงเป็น 3 เท่า ของเกลือคลอไรด์ถ้าใช้ความเข้มข้นเป็นโมลาร์เท่ากัน

ในกรณีที่มีโปรตีนผสมหลาย ๆ ชนิดรวมอยู่ด้วยกันสามารถแยกตกตะกอนโปรตีนออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้โดยทำการ Salting out ที่ความเข้มข้นของเกลือต่าง ๆ กัน เรียกว่าวิธีการนี้ว่า Salting fractionation โดยเลือกตกตะกอนเป็นช่วง ๆ ความเข้มข้นของค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายมีส่วนสำคัญในการตกตะกอนเอนไซม์ โดยมีผลต่อค่าการละลายของเกลือแต่ในการทำเอนไซม์หรือโปรตีนให้บริสุทธิ์มักจะไม่ทำการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-เบส (pH) มากนัก เนื่องจากการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-เบส (pH) มาก ๆ มีผลต่อค่าความคงตัวหรือความเสถียรของโปรตีน

สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์หรือโปรตีนใด ๆ ที่ต้องการโดยที่ยังไม่ทราบช่วงความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมในการตกตะกอนสามารถทำการทดลองขั้นพื้นฐาน (Preliminary test) หรือทำการทดลองสุ่ม (Trial fractionation) ในช่วงความเข้มข้นกว้าง ๆ ก่อนแล้วตรวจวัดค่ากิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ที่ตกลงมา ช่วงความเข้มข้นของเกลือในช่วงนี้ที่ให้เปอร์เซ็นต์ตกตะกอนลงมา

มากและมีค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่สูง (Purification factor) ก็ให้เลือกช่วงดังกล่าวเป็นความเข้มข้นมาตรฐานในการตกตะกอนจริง

3. การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน, เอทานอล จะลดค่ากิจกรรมของน้ำโดยมีผลต่อค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) ของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายลดลงทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตบนโมเลกุลโปรตีนมีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำเกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนก็จะตกตะกอนลงมาได้ วิธีการตกตะกอนโดยตัวทำละลายอินทรีย์สามารถใช้ตกตะกอนเอนไซม์หรือโปรตีนได้เป็นกลุ่มไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนออกมาเดี่ยว ๆ เพียงชนิดเดียวตามที่ต้องการได้เนื่องจากคุณสมบัติของโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. เป็นเนื้อเดียวกับน้ำ
2. ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน หรือเอนไซม์ที่ต้องการที่แยก
3. ให้ผลในการตกตะกอนได้ดี
4. จุดติดไฟยาก
5. ไม่เป็นพิษต่อคน
6. มีจุดเยือกแข็งต่ำ สามารถปฏิบัติงานได้อย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิต่ำได้

ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมาก คือ เอทานอล และ อะซีโตน นอกจากนี้ยังมี เมทานอล, ไอโซโพรพานอล และ 2-เมทิลออกซีเมทานอล เป็นต้น

ข้อควรระวังในการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ มีดังนี้

1. ต้องทำในที่อุณหภูมิต่ำ (-20 ถึง 4 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ต้องการ โดยที่อุณหภูมิต่ำโครงสร้างของโปรตีนมีความเสถียรสูง เนื่องจากการยึดตัวด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) อย่างแข็งแรงภายในโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เองทำให้การแทรกตัวของตัวทำละลายอินทรีย์เข้าสู่ภายในโมเลกุลโปรตีนเป็นไปได้ยาก แต่ที่อุณหภูมิสูงโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนไม่แข็งแรงมากนักทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์สามารถซึมผ่านเข้าไปในโมเลกุลโปรตีนหรือเอนไซม์ไปเกิดแรงดึงดูดกับส่วนไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) ภายในโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนโดยเฉพาะส่วนของกรดอะมิโน Leucine, Tyrosine, Phenylalanine และ Valine ทำให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้างภายในเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนอย่างรวดเร็ว ผลของตัวทำละลายต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโมเลกุลของโปรตีนมักเกิดกับตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์สายยาวมากกว่าแอลกอฮอล์สายสั้น อย่างไรก็ตามถึงแม้จะใช้แอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เอทานอล ในการตกตะกอนโปรตีนก็ยังมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่อยู่ตามพลาสมาโปรตีนอยู่จึงใช้อะซีโตนแทนเพราะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซมน้อยกว่าและยังสามารถระเหยได้ง่ายในการแยกตัวทำละลายอินทรีย์กลับมาใช้ใหม่

ตารางที่ 1.1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (กรัม) ที่เติมลงไปในการละลายโปรตีน

%	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
55												33	67	103	141	179	220	264	307	353
60													34	69	105	143	183	227	269	314
65														34	70	107	147	190	232	275
70															35	72	110	153	194	237
75																36	74	115	155	198
80																	38	77	117	157
85																		39	77	118
90																			38	77
95																				39

Proteins are precipitated from aqueous solution by dissolving ammonium sulfate into the protein solution. The following table shows the weight (g) of ammonium sulfate to be added to one liter of solution to produce a desired change in the concentration (% saturation) of ammonium sulfate. Precipitation of proteins is conventionally carried out at 0°C to avoid possible denaturation of proteins, although the % saturation values shown in the table are based on the values at 25°C described by Green and Hughes in *Methods Enzymol.* 1, 67-90 (1955).

ที่มา Green and Hughes, 1955.

2. ต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายอินทรีย์มากเกินไปจนกลายเป็นตัวทำละลายใหม่ แทนน้ำทำให้มีปัญหาในการแยกตัวทำละลายอินทรีย์ออกมาภายหลังได้

นอกจากนี้ยังมีวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีอื่นอีก เช่น การตกตะกอนด้วยอนุโมล โลหะหนักโดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับหมู่ $-SH$ อิสระ และหมู่ $-COO$ บนโมเลกุลของโปรตีน ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังมีการตกตะกอนด้วย Complex anion โดยทำปฏิกิริยากับ $-NH^{3+}$ ของโมเลกุลโปรตีนทำให้โปรตีนมีสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้าเกิดการรวมตัวกันตกตะกอนลงมาได้

2.7.2 การกำจัดเกลือออกจากสารละลายโปรตีน

การกำจัดเกลือออกและการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในลำดับต่อไป เช่น ion exchange chromatography ซึ่งจำเป็นต้องการแลกเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-เบส (pH) หรือ Ionic strength เพื่อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวกลางที่ใช้

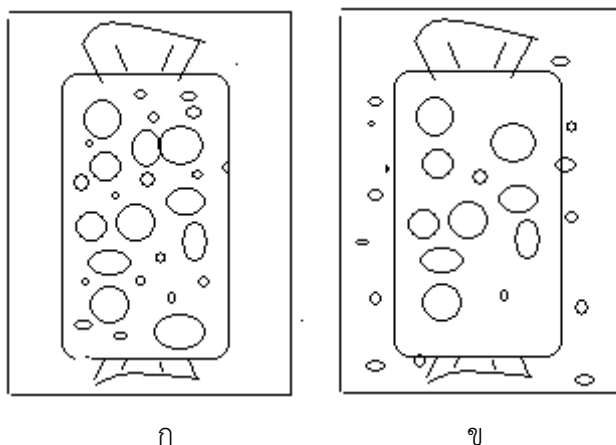
วิธีการแยกเกลือสามารถทำได้ ดังนี้

1. Dialysis (Harris and Angal, 1989)

สารละลายโปรตีนจะถูกนำมาใส่ถุงไดอะไลซิส (Dialysis bag) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (รูปที่ 1.8) และนำถุงไดอะไลซิสที่มีสารละลายโปรตีนอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็ก เช่น เกลือ จะสามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ สารที่มีโมเลกุลเล็กจะผ่านเมมเบรนจนกระทั่งแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) บริเวณด้านในและด้านนอกเมมเบรนเท่ากัน ซึ่งจะไม่มีการเคลื่อนที่ของสารระหว่างเมมเบรนจำเป็นที่ต้องมีการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้ซ้ำใหม่ก็จะมีเคลื่อนที่ของสารผ่านเมมเบรนอีกครั้ง จากการที่มีแรงดันออสโมติกที่ต่างกันในการทำไดอะไลซิสจะทำที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้เกลือแยกออกจากสารละลายโปรตีนมากที่สุด เมมเบรนที่ใช้กันทั่วไปจะทำมาจากเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose acetate) ซึ่งจะมี pore size เท่ากับ 1-20 nm

2. Ultrafiltration

อัลตราฟิลเตรชัน คือ การกรองโดยใช้เยื่อบาง (Membrane filtration) และใช้แรงดันให้ของเหลวเคลื่อนที่ผ่านเยื่อบางที่มีขนาดของรูเปิด (pore size) ระหว่าง 1-100 nm ใช้สำหรับกรองอนุภาคที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 300 ถึง 500,000 ดาลตัน (Dalton) เช่น โปรตีน (Protein) เอนไซม์ (Enzyme) สตาร์ช (Starch) เซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ออกจากน้ำและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ



รูปที่ 1.8 แสดงการทำงานของไดอะไลซิส

- ก. สารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์บรรจุในถุงไดอะไลซิสใส่ไว้ในตัวทำละลาย
- ข. อนุภาคเล็กจะผ่านเข้าออกถุงไดอะไลซิสได้ ส่วนอนุภาคใหญ่ยังคงอยู่ในถุง

3. Diafiltration

การทำไดอะฟิลเตรชันจะใช้ชุดอุปกรณ์เช่นเดียวกับการทำ Ultrafiltration โดยจะทำการเติมสารละลายบัฟเฟอร์หรือน้ำลงไปในการละลายโปรตีนและทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำ Ultrafiltration จะทำซ้ำจนกว่าสารที่ออกมาจะมี Ionic strength เท่ากับบัฟเฟอร์ที่เติมลงไปเริ่มต้น ระยะเวลาของการดำเนินการขึ้นอยู่กับปริมาตรของตัวอย่าง

4. Gel filtration

การนำตัวอย่างสารละลายโปรตีนมาใช้ในขั้นตอนนี้ต้องมีปริมาตรที่น้อย โดยปกติจะไม่เกิน 25-30 % ของปริมาตรคอลัมน์ เพื่อประสิทธิภาพในการแยกเกลือออกจากโปรตีนโดยสมบูรณ์ ตัวกลางที่ใช้จะมีขนาดเล็ก เช่น Sephadex G-25 เป็นต้น

การแยกและทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ (Pharmacia, 1991a)

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchanger chromatography) เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลวกับเฟสคงที่ (stationary phase) โดยที่เฟสคงที่เป็นเจลที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย เรียกว่า เมทริกซ์ (Matrix) เป็นโพลิเมอร์ (Polymer) ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแตกตัวให้ประจุบวกหรือลบได้ เช่น Carboxymethyl cellulose เป็นเซลลูโลสที่มีหมู่ฟังก์ชันของ Carboxymethyl (CH_2COO) เมทริกซ์นี้เรียกเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุหรือเรซิน (Resin) ก็ได้ เมื่อตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือใด ๆ พบว่ามีส่วนของสารที่มีประจุที่เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือเข้ามาล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาสภาพสมดุลทางไฟฟ้า เรียกประจุเหล่านี้ว่า Counter ion เป็นไอออนที่มีประจุตรงข้ามหมู่ฟังก์ชัน สารตัวอย่างแต่ละชนิดย่อมมีประจุต่างกันสามารถเกิดแรงกระทำทางไฟฟ้ากับหมู่ฟังก์ชันได้ต่างกัน สารใดที่มีประจุตรงข้าม

กับเมทริกซ์และมีความแรงประจุสูงก็จะไปแทนที่ Counter ion แล้วเข้าไปยึดกับส่วนเมทริกซ์ได้ ส่วนสารใดที่มีประจุเดียวกันกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็จะหลุดออกมาจากคอลัมน์ก่อนโดยแรงผลักทางไฟฟ้าทำให้สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ เมื่อต้องการไล่สารที่ถูกยึดจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุให้หลุดออกมาสามารถทำได้โดยการผ่านบัฟเฟอร์ที่มีประจุแรงกว่าเข้าไปจะไปแทนที่สารให้หลุดออกมาจากการจับกับส่วนเมทริกซ์ตามความแรงของประจุได้ด้วยอัตราความแรงของประจุที่แตกต่างกัน โดยวิธีนี้เป็นการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ

ตัวแลกเปลี่ยนประจุ

ตัวแลกเปลี่ยนประจุประกอบด้วยสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นโครงสร้างทำจากเจลที่ไม่ละลายในตัวทำละลายเป็นโพลีเมอร์ที่มีกลุ่มประจุเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ เรียกส่วนนี้ว่า เมทริกซ์หรือเรซิน ส่วนที่สองเป็นกลุ่มประจุที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดล้อมรอบส่วนเมทริกซ์ โดยการทำให้ปฏิกิริยาทางเคมีทำให้บริเวณผิวของเมทริกซ์มีกลุ่มของสารที่มีประจุไฟฟ้าอยู่ ส่วนที่สองนี้เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนประจุ ตัวแลกเปลี่ยนประจุมีทั้งชนิดที่แลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ ถ้ากลุ่มประจุในส่วนตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นลบ (Counter ion เป็นประจุบวก) เรียกตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation exchanger) ในทางกลับกันถ้ากลุ่มประจุของตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุบวก (Counter ion เป็นประจุลบ) เรียกตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchanger)

ส่วนเมทริกซ์อาจเป็นสารประกอบอินทรีย์เรซินสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ โดยมีกลุ่มประจุบนโมเลกุลที่แตกต่างกันทั้งชนิดประจุ ความแรงประจุและความสามารถในการมีประจุนาน้อยแตกต่างกันไป ตัวอย่างของสารที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุ แสดงดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ชนิดของเมทริกซ์และกลุ่มประจุบนเมทริกซ์ (Counter ion)

หมู่ฟังก์ชัน	โครงสร้าง
กลุ่ม Anion exchangers	
Aminoethyl (AE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
Diethylaminoethyl (DEAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
Quarternary aminoethyl (QAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
กลุ่ม cation exchangers	
Carboxymethyl (CM-)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
Phospho	$-\text{PO}_4\text{H}_2^-$
Sulphopropyl (SP-)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

สารที่นิยมใช้เป็นตัวกลางหรือโครงสร้างส่วนเมทริกซ์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. เรซิน เช่น polystyrene เชื่อมไขว้ด้วย divinylbenzene
2. เซลลูโลส
3. Cross linked polyacrylamide หรือ polydextran gels

การแยกและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

(Pharmacia, 1991c)

เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography) หรือ Size exclusion หรือ Molecular sieve chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างกันของขนาด มวล และรูปร่างของสารตัวอย่างมาใช้ในการแยกเคลื่อนและสารโมเลกุลเล็กอื่น ๆ ออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่อาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างภายในที่เกิดจากการเชื่อมไขว้ของโพลีเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจล (Gel matrix) โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถแยกสารที่มีขนาดเล็กและใหญ่ออกจากกันได้

Gel filtration chromatography นิยมใช้คู่กับเทคนิคโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ เช่น ในกรณีการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ เช่น ในกรณีใช้โครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุก่อนจะสามารถแยกบริสุทธิ์ได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น สารที่นำมาเป็นตัวกลางในการเชื่อมไขว้เป็นเม็ดเจลแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. เด็กซ์แทรน (Dextran) เป็นโพลีเมอร์ของกลูโคสที่ผลิตขึ้นโดยใช้แบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* จากนั้นนำโพลีเมอร์ดังกล่าวมาเชื่อมไขว้เข้าด้วยกันระหว่างเด็กซ์แทรนกับ Epichlorohydrin มีชื่อทางการค้าว่า Sephadex แบ่งออกเป็นเกรดต่าง ๆ กัน เรียกว่า G-type มีความแตกต่างกันในด้านระดับของการเชื่อมไขว้ (Degree of cross linked) และในช่วงมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เหมาะสมในการแยก

2. Polyacrylamide gels เป็นเม็ดเจลที่ได้จากการเชื่อมไขว้ระหว่าง Acrylamide กับ N,N'-methylene-bis-acrylamide ด้วยพันธะแปปไทด์ได้ลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย ตัวเร่งคือ Ammonium persulfate มีชื่อเรียกทางการค้าว่า Bio-Gel

3. Agarose gel เป็นโพลีเมอร์สายตรงจากสาหร่ายสีแดง ประกอบด้วย D-galactose ต่อเชื่อมกับ 3,6-anhydro-L-galactose เป็นเส้นสายยาว ในการสร้างเจลต้องมีขั้นตอนการกำจัดประจุบนโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ออกก่อน การเกิดเจลที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยโพลีแซคคาไรด์แต่ละเส้นเข้ามารวมตัวกันแล้วพันเป็นเกลียวคู่ (Double helix) จากนั้นจึงเกิดการเชื่อมเป็นร่างแหได้เจลที่มีความคงตัวสูงมีชื่อทางการค้าว่า Sepharose

การแยกและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ

(Pharmacia, 1991f)

เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography) จะมีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนที่ต้องการขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารจำเพาะที่เรียกว่า ลิแกนด์ (Bio-specific ligand ; L) ถูกเหนี่ยวนำให้ติดอยู่บนเฟสคงที่ (Stationary phase) ด้วยพันธะโควาเลนต์ เฟสคงที่นี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เมทริกซ์ (Matrix) กลุ่มลิแกนด์ที่ยึดติดกับเมทริกซ์นี้เรียกว่า ลิแกนด์ตรึง (Immobilized ligand) มีความจำเพาะในการจับกับสารที่สนใจ (S) หลังจากที่จะไล่สารอื่นที่ไม่จำเพาะกับลิแกนด์ออกไปจากคอลัมน์แล้วจึงทำการปรับสภาวะเพื่อให้สารที่สนใจหลุดออกจากการยึดจับโดยลิแกนด์ ตัวอย่างของกลุ่มสารที่ต้องการแยกและชนิดของลิแกนด์ แสดงดังตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 กลุ่มสารที่ต้องการแยกและชนิดของลิแกนด์ที่จำเพาะกัน

สารที่สนใจ	ลิแกนด์
เอนไซม์	Substrate analogue, Inhibitor, Cofactor
แอนติบอดี	Antigen, Virus , Cell
เลคติน	Polysaccharide, Glycoprotein, Cell surface receptor, Cell
กรดนิวคลีอิก	Complementary base sequence, Histone, Nucleic acid, polymerase, Binding protein
ฮอร์โมน, วิตามิน	Receptor, Carrier protein
เซลล์	Cell surface specific protein, Lectin

ที่มา: Pharmacia, 1991f และ Dean *et al.*, 1991

เมทริกซ์ (Matrix)

เมทริกซ์เป็นส่วนโครงสร้างที่ใช้ในการยึดจับของลิแกนด์หรือทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนของเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์ มีคุณสมบัติดังนี้

1. ต้องมีส่วนเปิดและมีโครงสร้างเป็นร่างตาข่ายที่มีความพรุน (loose porous network)
2. มีลักษณะเป็นของแข็ง ทรงกลม
3. เฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยาทั้งทางเคมีและชีวภาพ
4. มีความจำเพาะต่อการจับกับลิแกนด์
5. ส่งเสริมให้ลิแกนด์ตรึงมีความเสถียรสูง

ตัวอย่างของเมทริกซ์ที่นิยมใช้ เช่น Agarose, Cellulose, Dextran และ Polyacrylamide ซึ่ง Agarose gel เป็นตัวที่นิยมใช้กันมากที่สุด มีลักษณะโครงสร้างเป็นโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) สายตรงของหน่วยย่อยกาแลคโตส (Galactose) โครงสร้างของ Agarose

เกิดจากการเชื่อมโยงของ D-galactopyranose เชื่อมเข้ากับ 3, 6-anhydro-L-galactopyranose ที่ตำแหน่ง 2, 4 linked

ลิแกนด์

ลิแกนด์เป็นส่วนสำคัญที่สุดเพราะเป็นส่วนที่จำเพาะกับสารที่ต้องการแยก มีคุณสมบัติที่สำคัญดังต่อไปนี้

1. มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการแยกโดยไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของสารตัวอย่าง ในขณะที่เกิดแรงดึงดูดกัน
2. สามารถเลือกสภาวะในการทำให้สารตัวอย่างหลุดออกจากลิแกนด์ได้ง่าย
3. สามารถนำเอาลิแกนด์ตรึงกลับมาใช้งานใหม่ได้
4. การยึดจับกับเมทริกซ์ต้องกระทำได้ง่ายและไม่มีผลต่อโครงสร้างของเมทริกซ์

Spacer arm

เนื่องจากบริเวณที่ว่องไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยา (Active sites) ของสารชีวภาพมักอยู่ในตำแหน่งที่ไม่ง่ายหรือไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำปฏิกิริยา นอกจากนี้การเกิดแรงกระทำระหว่างเมทริกซ์และลิแกนด์อาจเกิดได้ไม่ดีพอหรือมีความจำเพาะต่ำ เช่น การจับกันระหว่างโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์กับเมทริกซ์ Sepharose 4B มีแรงยึดจับค่อนข้างต่ำจึงหลุดออกจากกันได้ง่าย จากเหตุผลดังกล่าวจึงใช้ตัวเชื่อมที่เรียกว่า Spacer arm มาช่วยในการยึดจับกันระหว่างเมทริกซ์และลิแกนด์ให้ดียิ่งขึ้นและช่วยในการเพิ่มพื้นที่หรือโอกาสในการจับสารตัวอย่างโดยบริเวณที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยาของสารชีวภาพได้มากขึ้น

คุณสมบัติของ spacer arm มีดังนี้

1. ปลายด้านหนึ่งสามารถเกิดแรงกระทำในการยึดจับกับเมทริกซ์ได้ดี ในขณะที่ปลายอีกด้านหนึ่งต้องมีความจำเพาะในการจับกับลิแกนด์
2. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยก
3. ความยาวต้องเหมาะสมเพราะมีผลต่อแรงไฮโดรโฟบิกระหว่างสารที่ต้องการแยกกับลิแกนด์ทำให้ความจำเพาะในการจับกับสารตัวอย่างต่ำลง ถ้า spacer arm ยาวมากเกินไปมีผลทำให้เกิดการหลุดของตัวมันเองจากลิแกนด์และเมทริกซ์ในระหว่างที่มีการชะสารได้

การเชื่อมลิแกนด์เข้ากับเมทริกซ์

ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ในการกระตุ้นบริเวณเมทริกซ์ให้พร้อมที่รับเอาลิแกนด์หรือ spacer arm มาจับโดยอาศัยหมู่ฟังก์ชันบนลิแกนด์ตรึงเป็นหลัก

การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis of Proteins)

(Bollage *et al.*, 1996)

อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุลที่มีประจุ โดยอาศัยหลักว่าชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน โปรตีนมีประจุได้ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันที่แตกตัวได้ใน Side chain มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) หนึ่ง ๆ ของสารละลาย โปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกันออกไปซึ่งอาจเป็นบวก ลบ หรือเป็นกลางก็ได้ การแยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสจะมีตัวกลางให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีคุณสมบัติเฉื่อย ตัวกลางที่ใช้กันสำหรับโปรตีนมักเป็น Polyacrylamide

Polyacrylamide ใช้กันมากสำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีน polyacrylamide เตรียมได้จากการ polymerization ของ Acrylamide monomer โดยมี N,N'-methylenebisacrylamide เป็นตัวเชื่อมให้เป็นโพลีเมอร์ ปฏิกิริยาเกิดเป็นเจลนี้เร่งโดย Ammonium persulfate และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) เจลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นตาข่ายสามมิติที่มีรูพรุน ความพรุนของเจลนี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ Acrylamide monomer และตัวเชื่อม คือ BIS (bis-acrylamide) คือ แสดงเป็น %T และ %C กล่าวคือ %T เป็น % โดยน้ำหนักของ monomer ทั้งหมด (Acrylamide+bisacrylamide) และ %C เป็นปริมาณของ bis-acrylamide จาก monomer ทั้งหมด ขนาดของรูพรุนลดลงเมื่อ %T เพิ่มขึ้น โดยทั่วไป %T จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3-30 % ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนที่ต้องการ

หลักการโดยย่อของการแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ โปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่นี้จะถูกต้านโดยร่างแหของเจลซึ่งทำหน้าที่เป็น Molecular sieve ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับทั้งขนาด รูปร่างและประจุสุทธิของโปรตีน ดังนั้นในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับแยกโปรตีนในสภาพธรรมชาติ (Non-denaturing gel electrophoresis) จะไม่สามารถแยกความแตกต่างทางรูปร่าง ขนาดหรือ ประจุของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน แต่ไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจยืนยันความบริสุทธิ์หรือหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนซึ่งในกรณีนี้ต้องใช้วิธีการหนึ่ง คือ SDS electrophoresis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาและหาน้ำหนักของโปรตีนหรือหน่วยย่อย (Subunit) ของโปรตีน เมื่อใช้ควบคู่กับเทคนิคทาง Gel filtration chromatography ก็จะทำให้ทราบว่าโปรตีนนั้น ๆ ประกอบด้วยหน่วยย่อยกี่หน่วย

หลักการของ SDS-PAGE คือ SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ซึ่งเป็น Detergent ที่มีประจุเป็นลบจะไปเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นมากทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ นอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนเสียสภาพเปลี่ยนสภาพจากรูปทรงกลมไปอยู่ในสภาพที่เหยียดตรง นอกจากนี้ยังมีการแยกหน่วยย่อยออกจากกันฉะนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัวในกรณีนี้จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างในน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกในอัตราส่วนผกผันกับค่า \log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งหมายความว่า จะสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยโปรตีนได้จากการเทียบค่าระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบ

น้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน

2.8 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน (Boyer, 2012)

ในการตรวจสอบโปรตีน (protein detection) จะรวมหมายถึง

1. การวัดปริมาณโปรตีน (protein assay)
2. การบอกคุณลักษณะของโปรตีน (protein characterization)
3. การบอกชนิดของโปรตีน (protein identification)

1. การวัดปริมาณโปรตีน (Boyer, 2012)

1.1 Colorimetric method ได้แก่ Biuret, Lowry, Bradford, BCA (Bicinchoninic Acid)

1.2 Spectrophotometric assay โดยการวัด absorbance ที่ 280 nm โดยตรงเนื่องจากทั้ง 2 วิธีมีความไว (sensitivity) ในการทดสอบที่แตกต่างกัน การเลือกแต่ละวิธีขึ้นอยู่กับปริมาณของโปรตีนในตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 1.4

1.3 Enzyme Activity ในกรณีที่โปรตีนมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ก็จะใช้ปฏิกิริยาเอนไซม์ ในการวิเคราะห์โดยวัดปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นหรือวัดปริมาณ substrate ที่ถูกใช้ไปด้วย เครื่อง spectrophotometer substrate + coenzyme product

1.4 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมากใช้วิเคราะห์หา

- Peptides, proteins, antibodies, hormones
- สามารถ detect protein ในระดับ 100 pg–1 ng/ml proteins

1.5 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เป็นการแยกโดยอาศัยความแตกต่างในเรื่องความสามารถของการละลายในน้ำ (hydrophobicity) ใช้แยก peptides, proteins

- ที่นิยมใช้มากเป็นชนิด Reversed phase HPLC
- Column ที่ใช้เป็นชนิด C18
- โปรตีนจะถูก elute ออกมาโดยการเพิ่มสัดส่วนของ organic solvent (acetonitrile)

ตารางที่ 1.4 แสดงวิธีการทดสอบโปรตีน

วิธีการ ตรวจสอบ	ระดับต่ำสุด ที่วัดได้	เวลาในการ ทดสอบ	หลักการของวิธีการ ตรวจสอบ	ข้อดี/ข้อเสีย/ข้อคิดเห็น
Biuret	1-20 mg	20-30 นาที	Peptide bond ทำ ปฏิกิริยากับ Cu^{+2} เกิด เป็นสีม่วงวัดที่ 540 nm	1. สารที่รบกวน ได้ แก่ บัฟเฟอร์ (buffer) 2. ไม่จำเพาะเจาะจง โปรตีนทุกชนิดให้สี เหมือนกันหมด 3. ทำลายสภาพของ โปรตีน
Lowry	~ 5 μg	40-60 นาที	ปฏิกิริยามี 2 ขั้นตอน 1. เหมือนกับวิธี Biuret 2. มีการเติม phosphomolybdate Phosphotungstate	1. ใช้เวลาในการทดสอบ นาน 2. ความเข้มของสี เปลี่ยนไปตามชนิดของ โปรตีน 3. ทำลายสภาพของ โปรตีน 4. สารที่รบกวนได้แก่ Buffers, Glycine, Ammonium Sulphate, Mercaptans
Bradford	~ 1 μg	15 นาที	เป็นปฏิกิริยาระหว่าง Coomassie dye กับ โปรตีน เกิดสีวัดที่ 595 nm	1. สารเคมีที่ใช้หาง่าย และใช้เวลาทดสอบไม่ นาน 2. สีที่เกิดมีเสถียรภาพถึง 1 ชั่วโมง 3. ทำลายสภาพของ โปรตีน 4. สารที่รบกวนได้ แก่ Buffers, Detergents, Triton X-100, SDS

ตารางที่ 1.4 แสดงวิธีการทดสอบโปรตีน (ต่อ)

วิธีการตรวจสอบ	ระดับต่ำสุดที่วัดได้	เวลาในการทดสอบ	หลักการของวิธีการตรวจสอบ	ข้อดี/ข้อเสีย/ข้อคิดเห็น
BCA 1	1 μg	60 นาที	โปรตีนทำปฏิกิริยากับ Cu^{+2} และ BCA เกิดสีวัดที่ 562 nm	1. สารเคมีที่ใช้หาได้ง่าย 2. ไม่ถูกรบกวนด้วยสารเหล่านี้ ได้แก่ Detergents, Triton X100, SDS 3. ทำลายสภาพของโปรตีน 4. สารที่รบกวน ได้แก่ EDTA, DTT, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
Spectrophotometer (A280)	50–100 μg	5–10 นาที	วัด Aromatic residues ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน	1. ไม่ทำลายสภาพของโปรตีน 2. สามารถวัดได้โดยตรง 3. ใช้บ่งชี้ว่า Fraction ที่ให้ Elute ออกจาก Column มี โปรตีน 4. สารที่รบกวนได้ แก่ Purines, Pyrimidines, Nucleic Acids

2. การบอกคุณลักษณะของโปรตีน (Characterization) โดยใช้เทคนิค Electrophoresis (Boyer, 2012)

เป็นวิธีการที่อาศัยสนามไฟฟ้าในการแยกโปรตีนโดยโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก โดยที่อัตราความเร็วในการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับปริมาณประจุสุทธิ ขนาดและรูปร่างของ Protein electrophoresis ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน ได้แก่

2.1 Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native PAGE) เป็น การแยก protein ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของมวลต่อประจุ (mass/charge ratio)

การแยกโปรตีนโดย Electrophoresis จะต้องมีตัวกลางซึ่งมีคุณสมบัติเฉื่อย โดยส่วนใหญ่นิยมใช้ Polyacrylamide ซึ่งเตรียมได้จาก Polymerization ของ Acrylamide monomer โดยมี N,N'-methylenebisacrylamide เป็นตัวเชื่อมให้เป็นโพลิเมอร์ ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดเป็นเจลเร่งโดยใช้ Ammonium persulfate (APS) และ TEMED (N,N,N',N'-

Tetramethylenediamine) ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นตาข่ายที่มีรูพรุนซึ่งมีขนาดต่างๆขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ Acrylamide และเปอร์เซ็นต์ bisacrylamide โดยที่เปอร์เซ็นต์เจลสูงจะได้ช่องที่มีขนาดเล็กใช้วิเคราะห์หา Biomolecule ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ฉะนั้น Native PAGE ใช้สำหรับแยกโปรตีนในสภาพธรรมชาติ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุล ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับใช้แยกหรือจำแนกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกจากกันแต่ไม่เหมาะสำหรับหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

2.2 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลสามารถใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในตัวอย่าง SDS-PAGE เป็น Denaturing gel sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็นสารพวก detergent โดย SDS เมื่อรวมกับโปรตีนทำให้โครงสร้างของโปรตีนที่มี SDS จับอยู่มีประจุเป็นลบและสายของโปรตีนยืดตัวออกจากสภาพธรรมชาติกลายเป็นแท่งและอัตราส่วนประจุต่อมวลของโมเลกุลของโปรตีนทุกชนิดมีค่าเท่ากัน ฉะนั้นใน SDS-PAGE นี้โปรตีนจึงแยกกันด้วยความแตกต่างของขนาด (มวลโมเลกุล) เท่านั้น เมื่อใส่ SDS และ β -Mercaptoethanol จะทำลาย Disulfide bond ระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีน SDS-PAGE ใช้ ในการหาน้ำหนักโมเลกุลและจำนวน Subunit ของโปรตีน โดยทั่วไปโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย

5% acrylamide gel ใช้แยกโปรตีนขนาด 60 – 200 kDa

10% acrylamide gel ใช้แยกโปรตีนขนาด 16 – 70 kDa

15% acrylamide gel ใช้แยกโปรตีนขนาด 12 – 45 kDa

10 kDa protein = 91 amino acids = 273 nucleotides

การตรวจสอบ Band บนเจลทำได้โดย

การย้อมสี สีที่ใช้ ได้แก่ Coomassie Brilliant Blue

- สีจะจับจำเพาะกับโปรตีน
- สามารถวัดได้ ถึงระดับ 0.3–1 $\mu\text{g}/\text{protein band}$

Silver stain (Silver diamine or Silver- tungsten silicic acid complex)

- Silver จะจับกับ Sulfhydryl group และ Carboxyl group ของโปรตีน
- สามารถวัดได้ถึงระดับ 2–5 ng/protein band

Western blot เป็นเทคนิคที่ใช้บอกได้ทั้งคุณลักษณะและชนิดของโปรตีน (Characterization and identification) เป็นวิธีการแยกโปรตีนในเจลและถ่ายโอนไปยังเมมเบรน โดยโปรตีนจะถูกจับและยึดติดอยู่บนเมมเบรนและสามารถตรวจสอบโปรตีนโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ เมมเบรนที่นิยมใช้ ได้แก่ Nitrocellulose, Polyvinylidene difluoride (PVDF)

2.3 Isoelectric focusing (IEF)

เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของค่า Isoelectric point (pI) ใน IEF protein จะถูกแยกภายใต้ pH gradient gel สารที่ทำให้เกิด pH gradient คือ Ampholytes โดยค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ต่ำอยู่ใกล้ขั้วบวกและค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ค่อย ๆ สูงขึ้นเมื่อเข้าใกล้ขั้วลบ ในการแยกสารตัวอย่างโมเลกุลที่อยู่บริเวณที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) มากกว่า Isoelectric point (pI) จะมีประจุเป็นลบจึงมีการเคลื่อนที่ไปยัง Anode จนกระทั่งถึงบริเวณที่มี ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) = Isoelectric point (pI) จะทำให้โมเลกุลมีประจุเป็นศูนย์จึงหยุดเคลื่อนที่ IEF gel ประกอบด้วย Polyacrylamide หรือ Agarose โดยมี 2-4% Ampholytes

2.4 Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D PAGE)

เป็นการรวมเทคนิค IEF และ SDS-PAGE เข้าด้วยกันโดยโปรตีนจะถูกแยกด้วย IEF เป็น Dimension แรก หลังจากนั้นแยกต่อด้วย SDS-PAGE เป็น Dimension ที่สอง ปัจจุบัน 2D gel นิยมใช้ กันมากในการศึกษา Proteomic

3. การบอชนิดของโปรตีน (Protein identification) (Boyer, 2012)

3.1 Amino acid Analysis: เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ amino acid ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน

- นำโปรตีนมาย่อยด้วย 6 M HCl
- แยกและวิเคราะห์หาปริมาณ amino acid โดยใช้เครื่อง Amino acid Analyzer หรือ HPLC

3.2 Amino acid sequence และ peptide sequence: เป็นการหาลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ที่จำเพาะเพื่อให้ได้ Peptide ที่มีขนาดเล็กลง เอนไซม์ที่นิยมใช้ ได้แก่ Trypsin, Chymotrypsin

แยก Peptide fragments โดยวิธี Electrophoresis หรือ Chromatography หา Sequence ของ Peptides โดยวิธี Edman degradation โดยนำ Peptides มาทำปฏิกิริยากับ Phenyl isothiocyanate ได้อนุพันธ์ Phenyl isothiocarbamyl ของ Peptide หลังจากนั้นเติมกรดลงไปจะทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 1 หลุดออกมาเป็น Phenyl thiohydantoin amino acid ซึ่งสามารถทราบว่าเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนชนิดใดโดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC ส่วน Peptide ที่เหลือจะเข้าสู่วงจรเดิมโดยทำปฏิกิริยากับ Phenyl isothiocyanate เพื่อให้ได้อนุพันธ์ตัวที่ 2 และตัวที่ 3 ต่อไป

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องมือ Protein sequencer ที่สามารถทำ Edman degradation นี้โดยอัตโนมัติ การหาลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีน (Sequence reconstruction) เมื่อทราบลำดับอะมิโนของแต่ละ Peptide แล้วจะต้องนำลำดับเหล่านี้มาต่อกันเพื่อทราบลำดับของ

กรดอะมิโนในโปรตีนทั้งหมด การหาลำดับของกรดอะมิโนจากลำดับของ DNA ในปัจจุบันมาการใช้แนวทางการหาโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีนโดยการแปลรหัสของลำดับ DNA มาเป็นลำดับของโปรตีนโดยอาศัยรหัสพันธุกรรม

3.3 Mass spectrometry: เป็นเครื่องมือที่สามารถบอกได้ทั้งชนิดและปริมาณของโปรตีน

องค์ประกอบที่สำคัญ

1. Ion source: transfers electrical charge to analyses ได้แก่ Electrospray Ionization (ESI), Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

2. Analyzer: separates ions based on mass per unit charge ได้แก่ Quadrupole, Time of Flight (TOF), Magnet, Fourire Transform Ion Cyclotron Resinance (FT-ICR)

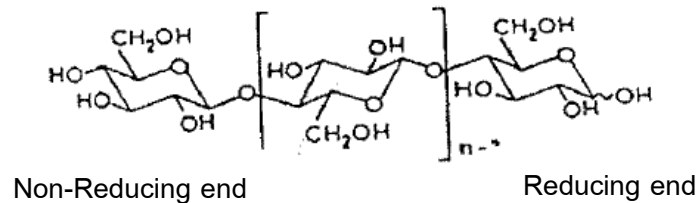
3. Detector: measures and records signal ได้แก่ Photomultiplier, Microchanel plate, Electron multiplier ตัวอย่างเครื่องมือได้แก่ Peptide mass Fingerprinting, MS/MS Peptide Fragmentation

3. เซลลูโลส (cellulose)

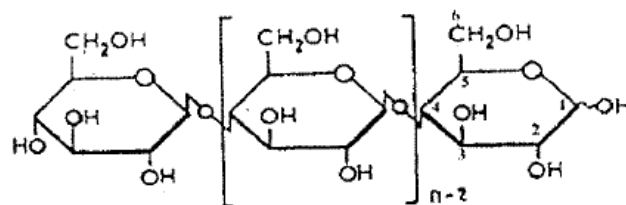
เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กมาก ลักษณะเป็นแท่ง (rod-shaped units) ที่เรียกว่าไมเซลล์ (Micells) บางครั้งประกอบเป็นหน่วยใหญ่จากไมเซลล์ 10 ถึง 20 หน่วย เป็นไมโครไฟบริล (Microfibril) ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นผลึก (Crystalline) จึงถูกย่อยสลายได้ยาก เป็นส่วนประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45 % ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชและสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ เช่น ฝ้าย มีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่า 97-99 % จัดว่าเป็นเซลลูโลสที่บริสุทธิ์ประกอบด้วยสายโพลีเมอร์เรียงขนานและยึดติดกันด้วยแรงกระจายตัว (Dispersion force) และพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่นทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ได้ช้าเพราะสารไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลลูโลสได้ ยังพบในสาหร่ายและเชื้อราหลายชนิดรวมทั้งในสัตว์ทะเลหลายชนิดและเนื่องจากเซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์จึงเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญต่อวัฏจักรคาร์บอน (Zhang, 2008)

ในด้านโครงสร้างสายของเซลลูโลสจะต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage โดยเรียงต่อกันเป็นสายตรงที่ไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา จำนวนหน่วยย่อยที่มาต่อขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืชอาจมี 200-15,000 หน่วยหรือเป็นล้านหน่วย คอนฟิกูเลชัน (Configulation) ของ β -D-glucopyranose ส่วนใหญ่จะเป็นรูปแบบเก้าอี้ (Chair form) (ภาพที่ 1.9) และโมเลกุลของกลูแคนจะมีผิว (surface) เป็นไฮโดรเจนอะตอม โมเลกุลของสายกลูแคนมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) การต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage จึงเกิดแรงที่ทำให้สายกลูแคนหมุนบิดตัวได้ 180 องศา รอบแกนจึงทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนริบบิ้น (Flat

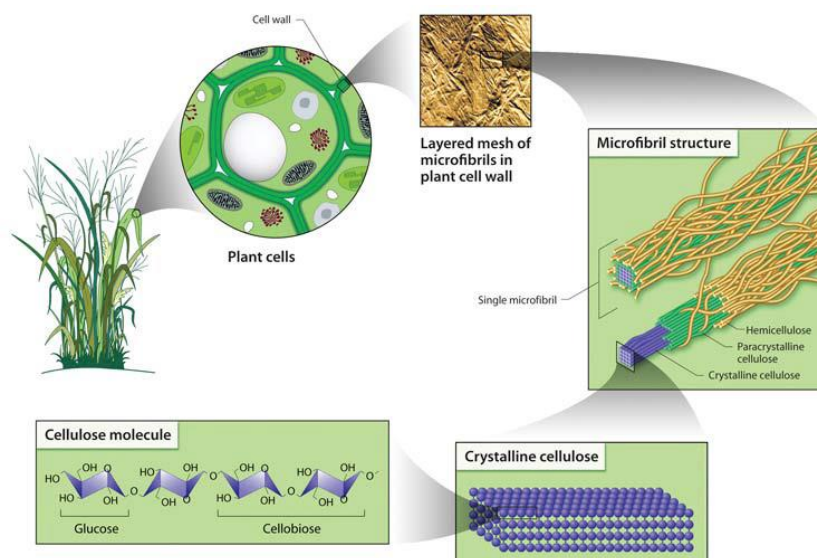
ribbon) สายกลูแคนแต่ละสายจะมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริลซึ่งอาจจะม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลสหรือม้วนทับกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใย จากการเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสดังกล่าวทำให้สามารถแบ่งรูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชได้ 3 แบบ ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 1.10



Sometime show as

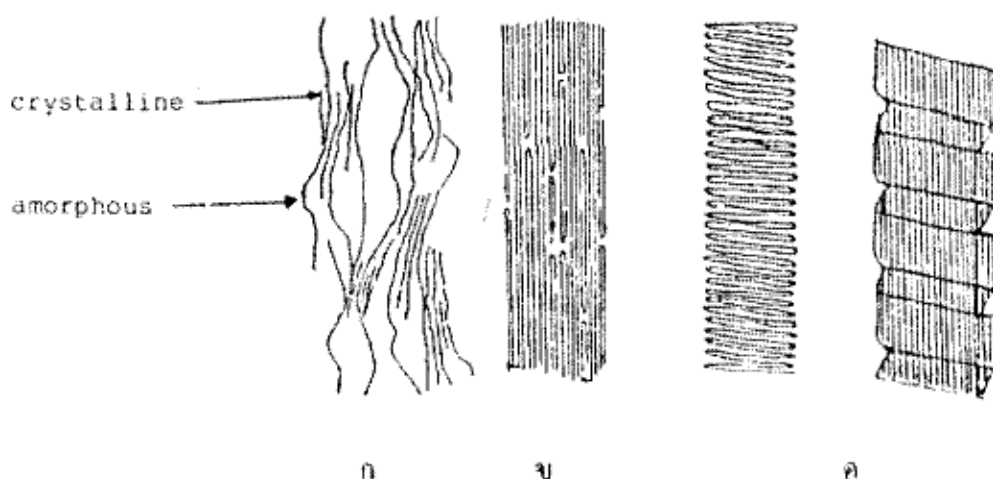


รูปที่ 1.9 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อย β -D-glucopyranose ที่ต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อย β -D-glucopyranose กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป (พิจิตราและคณะ, 2548)



รูปที่ 1.10 โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง (พิทยากร, 2531)

จากการศึกษาโดยใช้เอกซเรย์ดิฟแฟกชัน (x-ray diffraction) พบว่าไมโครไฟบริล บางส่วนจัดตัวอย่างมีระเบียบ (Crystalline) แต่บางส่วนจัดตัวไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) ซึ่งในธรรมชาติจะมีส่วนจัดตัวเป็นระเบียบ 85 % แต่ส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ 15 % ผนังเซลล์ของพืชจะมี เซลลูโลสจัดตัวอยู่เป็นแถบ ๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอดแยกโดยช่องว่าง เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่าง จะเต็มไปด้วยลิกนินซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสถูกห่อหุ้มด้วยลิกนิน (รูปที่ 1.11)



รูปที่ 1.11 รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ทั่วไป (Norkrans, 1967)

- ก. ฟริงเกิลไมเซล (fingle micells) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นระเบียบและที่ไม่เป็นระเบียบ
- ข. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใย
- ค. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนาเกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนริบบิ้นและแถบของริบบิ้นจะม้วนเป็นเกลียว

ประชาชนส่วนใหญ่ในประเทศไทยประกอบอาชีพเกษตรกรรมทำให้มีผลพลอยได้และวัสดุอินทรีย์เหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ใบไม้ เศษวัชพืชจำนวนมากก่อให้เกิดปัญหาตามมา การแก้ปัญหาโดยการนำวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์เป็นการแก้ปัญหาได้เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น ตัวอย่างเศษวัสดุอินทรีย์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แสดงดังตารางที่ 1.5 และตัวอย่างของเซลลูโลสที่นำมาใช้ประโยชน์ในปัจจุบันแสดงดังตารางที่ 1.6

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่พบมากในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยพบในส่วนของผนังเซลล์ของพืชอยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช เช่น เนื้อไม้พบประมาณ 40-50 % และเส้นใยฝ้ายพบประมาณ 98 % (Eriksson *et al.*, 1990; Goshadrou *et al.*, 2011) (ตารางที่ 1.7)

ตารางที่ 1.5 ปริมาณเซลลูโลสในวัสดุอินทรีย์

วัสดุอินทรีย์	ปริมาณเซลลูโลส %
ฝ้าย	91.0
เนื้อไม้	40.0-45.0
กระดาษหนังสือพิมพ์	40.0-48.0
วัสดุเหลือใช้จาก furfural process	40.0
ฟางข้าว	
ข้าวสาลี	30.5
ข้าวเจ้า	32.1
ข้าวบาร์เลย์	40.0
ข้าวโอ๊ต	42.8
ข้าวไรย์	34.0
ชานอ้อย	46.0
เส้นใยชานอ้อย	56.6
ชานอ้อยส่วนแกน	55.4

ที่มา: Goksoyr and Eriksen, 1980

ตารางที่ 1.6 ตัวอย่างของวัสดุเซลลูโลสที่นำมาใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน

วัสดุเซลลูโลส	การใช้ประโยชน์
ชานอ้อย ฟางข้าว พืชไม้เนื้ออ่อน	ทำเยื่อกระดาษ เชื้อเพลิง
ไม้พุ่ม ไม้วงปีสั้น	ทำเยื่อกระดาษ ไม้อัด
เศษไม้จากป่า	ทำเยื่อกระดาษ ไม้อัด
ฟีด	เชื้อเพลิง ใช้ปรับปรุงคุณภาพดิน
เส้นใยที่เหลือจากอุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษ	นำกลับมาใช้ในอุตสาหกรรมแผ่นกระดาษ เชื้อเพลิง
เศษกระดาษ	นำกลับมาใช้ในอุตสาหกรรมแผ่นกระดาษ
เศษเปลือกไม้ต่างๆ	เชื้อเพลิง ใช้ปรับปรุงคุณภาพดิน

ที่มา: Goksoyr and Eriksen, 1980

ตารางที่ 1.7 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ร้อยละของเซลลูโลส	ร้อยละของเฮมิเซลลูโลส	ร้อยละของลิกนิน
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด	45	35	15
หญ้า	25-40	35-50	10-30
ฟางข้าว	30	50	15
ใบไม้	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย	80-95	5-20	0
หญ้าคอสทอล เบอมีวตา	25	35.7	6.4
หญ้าสวิช	45	31.4	12.0

ที่มา : รัชพล, 2558

4. เอนไซม์เซลลูเลส

4.1 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสเกิดโดยอาศัยการย่อยสลายจุลินทรีย์หลายชนิดรวมกันในสภาพที่มีออกซิเจน ผลที่ได้จากการย่อยสลายจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อีเทนส์ ความร้อนและจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะได้อาจมาจากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม มีการระบายอากาศและอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเพิ่มจำนวนเซลล์ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen) เอทานอล (Ethanol) กรดฟอร์มิก (Formic acid) กรดซัคซินิก (Succinic acid) กรดบิวทีริก (Butyric acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) เป็นต้น นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสยังสามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี ซึ่งมีการย่อยสลายด้วยสารเคมี อาทิเช่น การใช้กรด การย่อยสลายวิธีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่นและกรดยังทำปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นที่ติดมากับเซลลูโลสทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็นคริสตัลไลน์ (Crystalline) ก็จำเป็นต้องใช้กรดที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาย่อยจึงเกิดแบบรุนแรง

ภาวะที่ไใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงสูง และกรดที่ถูกทิ้งออกมายังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15-20 นาที หรือโดยวิธีทางชีวภาพ อาทิเช่น การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีนี้เป็นวิธีที่เฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลส โดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมาจึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งค่อนข้างบริสุทธิ์ ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นช้า ๆ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในที่ที่มีอุณหภูมิซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถเจริญได้และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก็ไม่รุนแรง นอกจากนี้ก็อาจไม่จำเป็นต้องใช้ภาวะที่ทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงต่ำกว่าและยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากแต่วิธีนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปสารละลายเจือจาง (พรเทพ, 2538)

4.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนมาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและปฏิกิริยาไม่รุนแรงซึ่งเอนไซม์ที่ถูกย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกรวมว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β -1,4-glycosidic linkage ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสหน่วยเล็กที่สุดหากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส (พิจิตราและคณะ, 2548)



รูปที่ 1.12 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เซลลูเลส (พิจิตราและคณะ, 2548)

จาการศึกษาาระบบเอนไซม์เซลลูเลส (cellulose system) โดยการแยกเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์นั้นทำให้สรุปการจัดระบบของเอนไซม์เซลลูเลสได้ว่าประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (Enzyme Classification (EC)) ดังนี้

1. Endoglucanases or β -1,4-Glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)

ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น carboxymethyl cellulose, phosphoric swollen cellulose, hydroxyethyl cellulose และ Cellooligomers โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่งพันธะ β -1,4-glycosidic linkage แบบสุ่ม (Random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ cellooligosaccharides, cellopentaose, cellotriose, cellobiose และ glucose โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักได้ขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์ (พิจิตรและคณะ, 2548; Shah, 2013)

2. Exoglucanases or β -1,4 Glucan Cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)

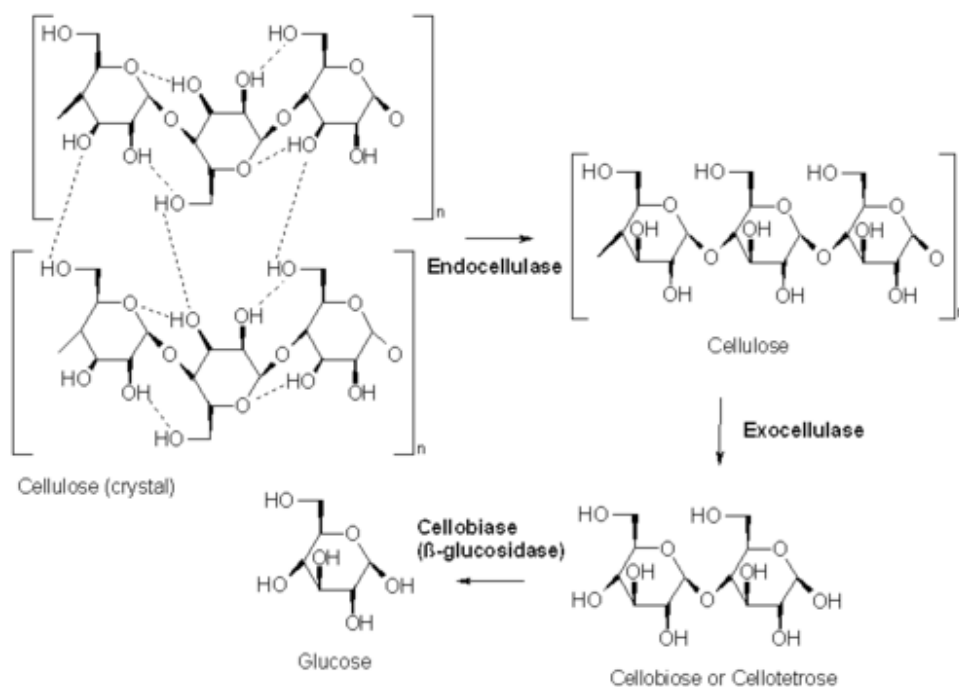
พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ Endoglucanases ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (Non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (Microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับ Endoglucanases (พิจิตรและคณะ, 2548; Shah, 2013)

3. β -Glucosidase (EC 3.2.1.21)

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของ Cellubiose, Cello-oligosaccharides ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง (พิจิตรและคณะ, 2548; Shah, 2013)

กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (Crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 1.13

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (Tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatina fulica) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีทและเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่พบว่า เชื้อรา (Cellulolytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่เป็นเอกซ์ตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (Extracellular enzyme) คือเซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ทำให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลสและสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการศึกษาหรือใช้ในอุตสาหกรรม (พิจิตรและคณะ, 2548)



รูปที่ 1.13 การย่อยเซลลูโลสโดยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

ที่มา : <http://www.thefullwiki.org/Hemicellulase>

4.3 การยับยั้งการสร้างและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสจะมีการยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส 2 แบบ คือการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive) และการยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive) สารที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขันได้ ได้แก่ เซลโลไบโอเอส และกลูโคส สารที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบบแข่งขัน โดยจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ β -1,4-glucosidase ได้แก่ กลูโคส ทั้งนี้พบการยับยั้งได้แม้แต่ในอาหารที่มีการเติมตัวเหนียวน้ำ

Duff *et al.*, 1996 สรุปว่าเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดจะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการย่อยสลาย กล่าวคือกิจกรรมของเอนไซม์ Exoglucanase จะถูกยับยั้งโดย Cellulobiose เช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-glucosidase ที่ถูกยับยั้งโดย Glucose ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไม่รุนแรง ส่วนลักษณะการยับยั้งจะเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบพอลลาเดียม (Palladium) ก็เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์อย่างรุนแรง โดยมีรายงานว่าสารพอลลาเดียมนี้ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Exoglucanase และ Endoglucanase ที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* และลักษณะการยับยั้งจะเป็นแบบที่เรียกว่า irreversible inhibition อย่างไรก็ตามสามารถป้องกันการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์วิธีนี้ได้โดยการเติมกรดอะมิโนชนิด Histidine, Cysteine หรือ Creatine ลงไปในสารละลายผสมได้ (Reaction mixture) (พิจิตราและคณะ, 2548)

4.4 สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าเซลลูเลสเป็น Glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ Co-factor หรือโลหะอื่น ๆ ในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.8 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปีหรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตากตะกอนด้วยอะซิโตนหรือเอทานอลโดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน (พรเทพ, 2538)

5. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

5.1 กระบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์มี 2 แบบ สามารถแบ่งตามลักษณะอาหารในการเลี้ยงเชื้อได้ 2 ลักษณะ คือ

5.1.1 การหมักในสภาพอาหารเหลว (Submerged fermentation)

กระบวนการหมักในอาหารเหลวโดยใช้ถังหมักที่ประกอบด้วยส่วนของการให้อากาศ อาจมีลักษณะเป็นท่อเปิดหรืออาจมีใบพัดเพื่อช่วยในการเพิ่มอากาศและกวนให้อากาศประกอบในถังหมักเข้ากันดีและอุปกรณ์ตรวจวัดปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำและการเกิดฟอง กระบวนการหมักที่นิยมในอุตสาหกรรมเป็นวิธีแบบ batch และแบบ fed-batch

การหมักในสภาพอาหารเหลวมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เป็นระยะ ๆ ได้ หากหมักแบบ fed-batch culture ลดการเกิดการปนเปื้อน (Contamination) ใช้แรงงานน้อย แต่การหมักแบบนี้มีประสิทธิภาพต่ำในการหมักที่ใช้ลิกโนเซลลูโลส ค่าใช้จ่ายสูงและได้เอนไซม์ความเข้มข้นน้อยกว่าการหมักในสภาพอาหารแห้ง

5.1.2 การหมักในสภาพอาหารแห้ง (Solid state fermentation)

กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในวัสดุที่ไม่ละลายน้ำ สับสเตรตที่ใช้ส่วนมากเป็นวัสดุทางการเกษตร เช่น ลิกโนเซลลูโลส เมล็ดธัญพืช รวมทั้งของเหลือจากกระบวนการผลิตอาหารที่มีราคาถูก ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อยและมีความเหมาะสมทั้งขนาดของสับสเตรตเพื่อเปิดช่องว่างระหว่างอนุภาคของสับสเตรตกับอากาศ การหมักในสภาพอาหารแห้งเป็นการหมักที่อาศัยการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งที่มีน้ำอยู่ในระบบในสภาพถูกดูดซับด้วยสับสเตรต การผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายต่ำ มีความสะดวกในการให้อากาศ เพราะมีช่องว่างระหว่างวัสดุ

ไม่จำเป็นต้องกวนต่อเนื่อง เอนไซม์ที่ได้มีความเข้มข้นสูงกว่าการหมักในอาหารเหลวและองค์ประกอบของอาหารแห้งและราคาถูก

การหมักในสภาพอาหารแห้งเหมาะสำหรับเชื้อราที่เจริญได้ในระดับความชื้นต่ำระหว่างการหมัก ไม่สามารถจัดความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ-กายภาพและปัจจัยต่าง ๆ ทำได้ยากเนื่องจากวัสดุในการหมักไม่เป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ

5.2 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาวจุลินทรีย์ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง Extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ (พรเทพ, 2538)

จุลินทรีย์นี้มีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก จุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสมักอยู่ในกลุ่มเชื้อรา แบคทีเรียและแอกติโนมัยสีท ดังตารางที่ 1.8 (พรเทพ, 2538)

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ซึ่งได้แก่ อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศและอัตราการเขย่า (พรเทพ, 2538)

5.3 แอกติโนมัยสีทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การศึกษาแอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยส่วนใหญ่เป็นพวก Thermophilic และ Mesophilic มีรายงานว่าสายพันธุ์ *Thermomonospora* มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสสูง โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างขึ้นจากสายพันธุ์นี้ประกอบด้วย Exoglucanase และ Endoglucanase ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 และอุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส

พวก Mesophilic actinomycetes ที่มีรายงานว่าย่อยเซลลูโลสได้ เช่น *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces flavogriseus*, *Streptomyces viridosporus* และเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5-7 มี activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียสทั้ง Mesophilic และ Thermophilic actinomycetes ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมเซลลูโลสชนิดละลายน้ำได้เนื่องด้วยความหลากหลายของโครงสร้างและการละลายน้ำได้ยากของเซลลูโลสบริสุทธิ์ทำให้มีความนิยมในการใช้เซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ดี คือ Carboxymethyl cellulose agar เป็นสารตั้งต้นมากขึ้นสำหรับการศึกษาการผลิตเอนไซม์ Endoglucanase (ณัฐวรรณ, 2548)

ความสามารถของแอกติโนมัยสีทในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม แอกติโนมัยสีทสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่น เชื้อที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่สำคัญ ได้แก่ *Thermomonospora* ที่สามารถผลิตกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ กลุ่ม Endoglucanase และ Exoglucanase ที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* อีกหลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ (Czoch and Mordarski, 2009)

ตารางที่ 1.8 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอกติโนมัยสีท
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Micromonospora</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Cellulomonas</i> sp.	<i>Nocardia</i> sp.
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>Corprinus</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Streptosporangium</i> sp.
<i>Foames</i> sp.	<i>Cytophaga</i> sp.	
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Polyangium</i> sp.	
<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Sporocytophaga</i> sp.	
<i>Polyporus</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp.	
<i>Rhizoctonia</i> sp.		
<i>Sporotrichum</i> sp.		
<i>Thielavia</i> sp.		
<i>Trametes</i> sp.		
<i>Trichothecium</i> sp.		
<i>Trichoderma</i> sp.		
<i>Verticillium</i> sp.		
<i>Zygorhynchus</i> sp.		

ที่มา : พรเทพ, 2538

6. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสและจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส

เอนไซม์เซลลูเลสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ ผลิตเชื้อเพลิงและอุตสาหกรรมกระดาษ

6.1 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

อาหารสัตว์มีส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละชนิดอีกทั้งยังย่อยสลายได้ยาก จุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้สัตว์บางชนิดไม่มีเอนไซม์เซลลูเลส เช่น สุกรและสัตว์ปีก ซึ่งทำให้สัตว์เกิดอาการแน่นท้อง ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ ดังนั้นเมื่อมีการเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงไปก็จะทำให้เอนไซม์ไปทำงานย่อยสลายเซลลูโลสทำให้สัตว์สามารถใช้โปรตีนไขมันจากอาหารเหล่านั้นและลดอาหารตกค้างในกระเพาะ (Bhat, 1997)

6.2 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

เนื่องจากสิ่งสกปรกในเสื้อผ้าประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิดที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้ บางครั้งสิ่งสกปรกเหล่านี้อาจติดแน่นอยู่กับเส้นใยรวมทั้งโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเหงื่อไคลที่คอยเป็นตัวยึดทำให้สารซักฟอกเพียงชนิดเดียวไม่สามารถขจัดออกได้หมดจึงต้องมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ร่วมกับสารซักฟอกเพื่อให้การซักผ้ามีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดคราบเหลืองติดเสื้อผ้าโดยเฉพาะในผ้าฝ้าย ซึ่งหากซักไปเรื่อย ๆ จะเกิดส่วนของเส้นใยแยกออกจากเนื้อผ้าทำให้ผ้าเป็นขน เมื่อทำการซักด้วยสารซักฟอกที่มีเอนไซม์เซลลูเลสผสมอยู่จะทำให้สามารถขจัดส่วนของเส้นใยที่แยกออกมาทำให้เนื้อผ้าสว่าง ไม่หมอง ทำให้ผ้านุ่ม (Bhat, 1997)

6.3 อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง

การผลิตเอทานอลสามารถผลิตได้หลายทางแต่ในปัจจุบันการนำวัสดุทางการเกษตรมาแปรรูปเป็นทางหนึ่งในทางเลือกที่ช่วยลดการสะสมขยะ เพิ่มปริมาณแหล่งพลังงานทดแทนแหล่งน้ำมันที่กำลังจะหมดไปในอีกไม่ช้า โดยกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุทางการเกษตรมีขั้นตอนหลักๆ 2 ส่วน คือส่วนการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด ต่าง หรือเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และการนำน้ำตาลกลูโคสไปหมักด้วยเชื้อยีสต์หรือแบคทีเรียเพื่อให้ได้เอทานอล (Bhat, 1997 and Sukumaran *et al.*, 2005)

6.4 อุตสาหกรรมกระดาษ

มีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษตั้งแต่ ค.ศ. 1980 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ลดต้นทุนการผลิต รวมทั้งเป็นเทคโนโลยีที่ไม่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ในการเพิ่มความแข็งแรงของกระดาษ เนื่องจากเยื่อกระดาษเองก็ประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เมื่อเอนไซม์ไปเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเยื่อกระดาษก็จะเกิดผลิตภัณฑ์บางส่วนที่ละลายน้ำได้ อนุภาคขนาดเล็ก สามารถจับตัวเป็นก้อนทำให้รีดน้ำออกจากกระดาษได้ง่ายยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังใช้เซลลูเลสในกระบวนการทำให้หมึกหลุดออกจากกระดาษในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ

รีไซเคิล โดยเอนไซม์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสทำให้หมักหลุดออกมาง่ายและกระดาษที่ได้มีความสว่าง เป็นการลดการใช้สารฟอกขาว ลดการส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Bhat, 1997)

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบในขยะและน้ำเสียต่างๆ ได้แก่ Cellulase จัดเป็น Extracellular Hydrolytic Enzyme พบได้ในเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergillus* spp., *Chaetomium* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Cellulomonas* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และในแอคติโนมัยซีท เช่น *Streptomyces* spp., *Thermonospora* spp. เอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วย Endo 1,4- β -glucanases, Exo 1,4- β -glucanases และ 1,4- β -glucosidase ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะรวมกันย่อยเซลลูโลสได้กลูโคส (Bhat, 1997 ; Eriksson *et al.* 1990)

Jeffrey และคณะ (2007) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในคาบสมุทรมาเลเซีย จำนวน 282 ไอโซเลท พบว่าเชื้อจำนวน 106 ไอโซเลท หรือ 37.6 % สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งพบว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* sp.

Ramesh และคณะ (2009) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างตะกอนทะเลจากอ่าวแบงกอร์ จำนวน 208 ไอโซเลท พบว่าเชื้อจำนวน 72 ไอโซเลท หรือ 34.6 % สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

Prasad และคณะ (2014) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในตำบลปัญญา แคว้นมคธ ประเทศอินเดีย จำนวน 35 ไอโซเลท พบว่าเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลท หรือ 28.57 % สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

Mohanta (2014) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินป่าชายเลนในอุทยานแห่งชาติ Bhitarkanika ประเทศอินเดีย จำนวน 50 ไอโซเลท พบว่าเชื้อจำนวน 9 ไอโซเลท หรือ 18 % สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

Prasad และคณะ (2013) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในประเทศอินเดีย จำนวน 42 ไอโซเลท และพบว่าเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลท หรือ 35.71 % สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

De Lima และคณะ (2005) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อ *Streptomyces drozdowiczii* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 ที่เวลา 3 วัน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 595 U/L

Prasad และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces griseorubens* พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 6 วันหลังจากการบ่ม และสามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 % จากการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของ

เอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 7 หลังจากการบ่มเป็นเวลา 6 วัน

Saratale และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. MDS พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสที่ประกอบด้วย CMC, Avicel, Xylan, Cellubiose, กระดาษกรอง ฟางไม้และฟางข้าวได้ และเมื่อมีการเสริม CaCl_2 (5 mM) เป็นสารเติมแต่งโลหะพบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสเหล่านี้ยังมีเสถียรต่อความร้อนสูงโดยรักษากิจกรรมไว้ได้ 60-70 % ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5 และทนต่อสภาวะค่าความเป็นกรด-เบส (pH) มากกว่า 55-60 % ที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 10 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส (สำหรับเอนไซม์เอ็นโดกลูคาเนส) หลังจากการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเอนไซม์ยังรักษากิจกรรมไว้ได้ถึง 50-70 % เมื่อบ่มในสารทำความสะอาดทางการค้าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่อนำเอนไซม์ไปใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7296) และใช้ CMC และฟางข้าวเป็นสับสเตรทพบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 55.8 % และ 57.2 % ตามลำดับ

George และคณะ (2001) ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ Alkalothermophilic Actinomycete เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 วัน โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 23 U/ml เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวไปผ่านการทำบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 259.93 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 18.7 เท่า มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 38 kDa. เอนไซม์มีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 7.0-10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

รัชราและคณะ (2556) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 4.70 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 67.2 เท่า น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa. ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 โดย Mn^{2+} และ Fe^{3+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดี

Saha (2004) ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) จากเชื้อรา *Mucor circinelloides* พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 43.33 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 408 เท่า น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27 kDa. ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 4.0-6.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 4.0-7.0 ซึ่งเมื่อมีการเติม 5 mM ของ MgCl_2 และ CoCl_2 สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดี

Mawadza และคณะ (2000) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* strains จากน้ำพุร้อน ไอโซเลท CH43 และ HR68 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 117 และ 113.5 เท่า ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลทั้ง 2 ไอโซเลท ประมาณ 40 kDa. เอนไซม์ทำงานได้

ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0-6.0 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ของไอโซเลท CH43 และ HR68 ตามลำดับ ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6.0-10.0 และ 6.0-8.0 ของไอโซเลท CH43 และ HR68 ตามลำดับ เมื่อมีการเติม 1 mM ของ Co^{2+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ไอโซเลทได้ และ 1 mM ของ Ag^+ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของไอโซเลท HR68 ได้ แต่ 1 mM ของ Mn^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ไอโซเลท

Murashima และคณะ (2002) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลส (Endo-1,4- β -D-glucanase) จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ไอโซเลท RCE1 และ RCE2 เอนไซม์มีขนาดโมเลกุล 41 kDa. และ 61 kDa. ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 257.8 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 103.1 เท่า เอนไซม์จากเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6.0 สำหรับ RCE1 และ pH 5.0 สำหรับ RCE2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งเมื่อเติม Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , และ Pb^{2+}

Lucas และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตและทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) จากเชื้อ *Chalara paradoxa* CH32 พบว่าเอนไซม์มีขนาดโมเลกุล 35 kDa. มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 462.3 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 201.0 เท่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเติม 10 mM ของ MnCl_2 สามารถส่งเสริมการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดี แต่ FeCl_2 , ZnSO_4 และ AgNO_3 มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้สามารถย่อยสลายซัสเตรทเซลลูโลส เช่น CMC และ Swollen Avicel ได้

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Screening)
2. เพื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์ (Purification)
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ (Characterization)
4. เพื่อบ่งเอกลักษณ์ของเชื้อโดยวิธี 16S rDNA (Identification)

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- เครื่องผสม Vortex mixer ยี่ห้อ SCIENTIFIC INDUSTRIES รุ่น GENIE-2
- เครื่องกวนสาร Magnetic stirrer ยี่ห้อ VELP
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ยี่ห้อ DENVER รุ่น UB-10
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงยิ่งยวด (Ultracentrifugation) ยี่ห้อ TOMY รุ่น SUPREMA-25
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ยี่ห้อ Jouan รุ่น BR-4
- เครื่อง microcentrifuge ยี่ห้อ Denville รุ่น 260D
- เครื่องไมโครเวฟ ยี่ห้อ SHARP
- เครื่องให้ความร้อน (Heating Block) ยี่ห้อ Grant รุ่น QBH-2
- เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น TE 3102S
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น TE 214S
- เครื่อง Fraction Collector ยี่ห้อ BIO-RAD
- เครื่อง Gradient Former ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น MODEL-485
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV 2450
- เครื่อง Centrifugal concentrator ยี่ห้อ TOMY รุ่น CC-105
- เครื่องถ่ายภาพเจล ยี่ห้อ GE รุ่น ImageQuant LAS500
- เครื่อง PCR ยี่ห้อ GeneAmp® รุ่น PCR System9700
- ตู้เขี่ยเชื้อ ยี่ห้อ DWYER
- ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ MEMMERT
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker) รุ่น Innova-42
- ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ MEMMERT
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-25 และ รุ่น HV-85
- ชุดรัน SDS-PAGE, NATIVE-PAGE ยี่ห้อ BIO-RAD
- กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscopes) บริษัท Olympus รุ่น CX21

2. อุปกรณ์

- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250, 500, 1000 และ 2000 ml
- ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 และ 5000 ml
- แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- หยดหยดสาร (Dropper)
- ไมโครปิเปต ขนาด 5, 10, 20, 100, 1000 และ 5000 ml
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Bottle)
- กระจกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 10, 50, 100, 500 และ 1000 ml
- กรวยแก้ว
- ตะเกียงบุนเซน (Bunsen burner)
- คิวเวตต์ (Cuvette)
- หลอดเซนติฟิวส์ ขนาด 15, 50 และ 250 ml
- กระดาษลิตมัส
- Eppendorf
- Tip ขนาด 200 และ 1000 μ l
- กระดาษฟรอยด์, พาราฟิล์ม, ทิชชูและสำลี
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
- ตะกร้าใส่อุปกรณ์
- Magnetic bar
- ถังพลาสติกสำหรับใส่น้ำแข็ง
- คอลัมน์ขนาดต่างๆสำหรับทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์
- หลอดเก็บตัวอย่าง fraction
- ขวดใสสารเคมี (Duran)
- ซ้อนตักสาร
- กระดาษกรอง Whatman No.4
- PES membrane Centicon®
- ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- International Streptomyces Project medium 2 (ISP2)
- Basal mineral salt agar
- Basal mineral salt broth

4. สารเคมี

ชื่อสารเคมี	ยี่ห้อ
3-5, Dinitrosalicylic acid	SIGMA
Absolute Ethanol	MERCK
Acetic acid	Mallinckrodt
Agarose gel	ISC
Ammonium chloride	MERCK
Ammonium persulfate	BIO-RAD
Ammonium sulphate	MERCK
Bromophenol blue	SIGMA
Calcium chloride	Ajax
Carboxymethyl cellulose	SIGMA
Citric acid	Ajax
Congo red	SIGMA
Coomassie brilliant blue R-250	SIGMA
Copper (II) Sulfate Pentahydrate	MERCK
Copper chloride	ALDRICH
Copper sulfate	Merck
Dibasic sodium phosphate	Wako
Ethanol	DUKSAN
Ferrous sulfate	SIGMA
Folin ciocalteus phenol	SIGMA
Glycerol	CARLO ERBA
Glycine	BIO-RAD
Hydrochloric acid	MERCK
Iron (II) Sulfate Heptahydrate	Ajax
Magnesium chloride	VWR
Magnesium Sulfate Heptahydrate	Fluko

ชื่อสารเคมี	ยี่ห้อ
Magnesium sulfate	Ajax
Manganese (II) Chloride Tetrahydrate	VWR
Methyl Alcohol	DUKSAN
Monobasic sodium phosphate	Wako
Potassium chloride	MERCK
Potassium Dihydrogenphosphate Anhydrous	Wako
Potassium Hydrogen Phosphate Trihydrate	Ajax
Potassium sulfate	Ajax
Sodium carbonate	Fluka
Sodium chloride	MERCK
Sodium citrate	Ajax
Sodium dodecyl sulfate	usb
Sodium hydroxide	MERCK
Sodium potassium tartrate	Ajax
Tris-base	usb
Zinc sulfate Heptahydrate	Ajax
β -mercaptoethanol	SIGMA

วิธีการทดลอง

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแอสโคดีโนไมซีทจำนวน 220 ไอโซเลท ได้รับความอนุเคราะห์จากภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยนำเชื้อแอสโคดีโนไมซีทจำนวน ทั้งหมด 220 ไอโซเลท ซึ่งถูกเก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง International Streptomyces Project medium 2 (ISP2) จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 7 วัน ก่อนนำไปศึกษา (Pridham *et al.*, 1957)

2. การคัดเลือกเชื้อแอสโคดีโนไมซีทที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening) (Hankin and Anagnostakis, 1977)

ทำการปลูกถ่ายเชื้อแอสโคดีโนไมซีทลงบนอาหารแข็ง Basal mineral salt ที่เติม CMC ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเททับด้วยสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.1 % ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลาประมาณ 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสโดยเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จะเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคลนนี้เพื่อทดสอบ

2.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิ (ข้อ 2.1) มาเลี้ยงลงในอาหารเหลว Basal mineral salt ที่มี CMC ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการบ่มเชื้อไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเขย่าด้วยอัตราความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็น ระยะเวลา 5 วัน จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000xg เป็นเวลา 15-20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method (Miller, 1959) คัดเลือกเชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเพื่อใช้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2.1 การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

นำส่วนใส (crude enzyme) ปริมาตร 500 μ l บ่มร่วมกับ 500 μ l ของ CMC ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 500 μ l ของ 50 mM Sodium Citrate buffer (pH 4.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม DNS solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1500 μ l และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไป แช่ในน้ำเย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณ

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เมื่อ 1 หน่วยเอนไซม์ (IU) เท่ากับเอนไซม์ 1 ml ที่สามารถย่อยยับเสตรทให้ได้กลูโคสในหน่วยไมโครโมล (μmol) ใน 1 นาที

2.2.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowly method

(Lowly *et al.*, 1951)

นำส่วนใส (crude enzyme) ปริมาตร 400 μl บ่มร่วมกับ 500 μl ของสาร A:B (50:1) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมาเติมสาร C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 μl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน BSA

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทลงบนอาหารแข็ง ISP2 จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ด้วยเลนส์ชนิด SLMPlan N (50x)

4. การระบุเอกลักษณ์ของเชื้อโดย 16S rDNA

4.1 ขั้นตอนการสกัดโครโมโซม (DNA)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการสกัดโครโมโซมตามวิธีที่อธิบายในชุดคิส (GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit, Vivantis) โดยนำหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ที่มีเม็ดบีดเติม Buffer R1 100 μl และชุดเซลล์แบคทีเรียใส่ในหลอดประมาณ 3-5 หลูป จากนั้นเติม Lysozyme ปริมาตร 20 μl และทำการผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทำให้เซลล์แตกโดยการปั่นอย่างรุนแรง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 3 นาที ที่ส่วนใสไป นำหลอดเติมมาเติม Buffer R2 ปริมาตร 180 μl และเติม proteinase K ปริมาตร 20 μl ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 3 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่ (ปริมาตร 200 μl) และนำมาเติม Buffer BG ปริมาตร 400 μl (2x Volume) ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมาเติม Absolute Ethanol ปริมาตร 200 μl ทำการผสมให้เข้ากันทันที จากนั้นทำการโหลดลงคอลัมน์ใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งไป และเติม Wash Buffer ปริมาตร 650 μl จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งไป และนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกรอบ จากนั้นนำมาเติม Elute Buffer ปริมาตร 50 μl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนในที่มี DNA ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจสอบโครโมโซมและทำการเพิ่มจำนวนต่อไป

4.2 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

นำ DNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณในช่วง 16S rDNA โดยใช้ universal primer set 27F : GAGTTTGATGGCTCAG และ 1492R : GTTACCTTGTTACGACTT โดยผสมส่วนผสมของปฏิกิริยาโดยเติม 10X buffer ปริมาตร 2.5 μ l ตามด้วย *Taq* DNA Polymerase ปริมาตร 0.25 μ l ดีเอ็นทีพี (dNTP) ปริมาตร 2.0 μ l 27F primer ปริมาตร 1.0 μ l 1500R primer ปริมาตร 1.0 μ l และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 17.25 μ l ผสมให้เข้ากันเพื่อใช้เป็น master mix จากนั้นเติม ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) ปริมาตร 1.0 μ l ลงไป (ภาคผนวก ข) ผสมทั้งหมดให้เข้ากันอีกครั้ง และนำไปเพิ่มจำนวนโดย PCR reaction โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา คือ Denature 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที Annealing 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 25 รอบ (ภาคผนวก ข) จากนั้นรอจนกว่าจะสิ้นสุดปฏิกิริยาและนำมา รันเจลเพื่อตรวจสอบ

4.3 การทำบริสุทธิ์ PCR product

PCR product ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR Purification Kit (250) (QIAGEN) โดยเติม 5 volumes ของ PB buffer ต่อ 1 volume ของ PCR sample (250:50 μ l) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการโหลดตัวอย่างที่ได้ลงใน QIA column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสทิ้งไปและนำ QIA column กลับไปใน tube เติม ล้าง column โดยการเติม PE buffer ปริมาตร 0.75 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสทิ้งไป และนำ QIA column กลับไปใน tube เติม และนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1 นาที จากนั้นนำ QIA column ไปใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ และเติม EB buffer ปริมาตร 50 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

Purification PCR products ถูกส่งไปยัง First Base Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.5 การแปลผลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับการจัดลำดับจะถูกนำมาวิเคราะห์และแก้ไขโดยใช้ BioEdit software V.7.1.9.0 และเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI GenBank database โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search program, National Center for Biotechnology Information (Altschul *et al.* 1997)

5. การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของเชื้อ 5 ไอโซเลท คือ RB1.83, RB2.69, SP4, SP20 และ SP24 ที่ผ่านการแก้ไขได้ถูกนำมาวิเคราะห์สายวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วย Neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้ MEGA6 software

(<http://www.megasoftware.net>) และใช้ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032^(T) เป็น out-group

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลว Basal mineral salt ที่มี CMC ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ปริมาตร 50 ml ทำการปลูกถ่ายกล้าเชื้อ แอคติโนมัยสีทประมาณ 1-2 หลูป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในสภาวะการเขย่าด้วยอัตราความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 5 วัน ทำการเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,380xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959)

6.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลว Basal mineral salt ที่มี CMC ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ปริมาตร 50 ml จากนั้นทำการปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 4.8, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 6.1 ในสภาวะการเขย่าด้วยอัตราความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 5 วัน ทำการเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,380xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959)

6.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารเหลว Basal mineral salt ที่มี CMC ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ปริมาตร 50 ml และทำการปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของอาหารที่เหมาะสม (จากผลการทดลองข้อ 6.2) ทำการปลูกถ่ายกล้าเชื้อแอคติโนมัยสีทประมาณ 1-2 หลูป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากผลการทดลองข้อ 6.1) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 วัน ตามลำดับ ในสภาวะการเขย่าด้วยอัตราความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ทำการเก็บส่วน (supernatant) ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,380xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959)

7. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme)

เตรียมอาหารเหลว Basal mineral salt ที่มี CMC ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 5,000 ml ปริมาตร 1,000 ml โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของอาหารที่เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 6.2 จากนั้นทำการปลูกถ่ายกล้าเชื้อแอสเพอร์จิลลัสสายพันธุ์คัดเลือก และนำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 6.1 และ 6.3 ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อทำการเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,380xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสไว้ทำไดอะไลซิสและใช้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

7.1 การทำไดอะไลซิสโดยวิธี Ultrafiltration

นำตัวอย่าง 1 ส่วนและบัฟเฟอร์ 1 ส่วน (Sample:Sodium phosphate buffer (pH 6.0)) ใส่รวมกันใน amicon ultrafiltration โดยใช้ Poly Ether Sulfone (PES) membrane ขนาด 5 kDa. เส้นผ่านศูนย์กลาง 76 mm จากนั้นทำการต่อเครื่องเข้ากับแก๊สไนโตรเจน ให้ความดัน 40 psi. ใช้เวลาในการไดอะไลซิสประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บส่วนที่เหลือไปใช้ในขั้นต่อไป

8. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ (Enzyme purification)

8.1 การทำเอนไซม์เข้มข้นโดยวิธี Evaporation

นำเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) ปริมาตร 2000 ml มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่อง evaporator ภายใต้สภาวะสุญญากาศ 0 mbar, อัตราหมุน 32 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชั่วโมง หรือให้ปริมาตรลดลง 10 เท่า (เข้มข้น 10x) ทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี lowly method (Lowly *et al.*, 1951) นำเอนไซม์เข้มข้นที่ได้ไปไดอะไลซิสและนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

8.2 การแยกเอนไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography) โดยผ่าน DEAE-Sephacel column

นำเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากข้อ 8.1 ปริมาตร 100 ml มาผ่าน DEAE-Sephacel Column ที่ผ่านการปรับสมดุลด้วย 20 mM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ด้วยอัตราการไหล 1 ml/min. หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม และล้างโปรตีนที่เกาะกับคอลัมน์ด้วย 0.2 M NaCl ใน 20 mM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) จากนั้นนำสารที่ได้แต่ละ fraction ไปทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี lowly method (Lowly *et al.*, 1951) และนำเอนไซม์ไปไดอะไลซิสสำหรับใช้ในขั้นตอนถัดไป

8.3 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วย CM52-cellulose column

นำเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ข้อ 8.2 ปริมาตร 50 ml มาผ่าน CM-52 Column ที่ผ่านการปรับสมดุลด้วย 20 mM Sodium citrate buffer (pH 5.0) ด้วยอัตราการไหล 1 ml/min. หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม และล้างโปรตีนที่เกาะกับคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaCl, 0.2 M NaCl, 0.3 M NaCl, 0.4 M NaCl และ 0.5 M NaCl จากนั้นนำสารที่ได้แต่ละ fraction ไปทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี lowly method (Lowly *et al.*, 1951) และนำเอนไซม์ไปโอะไลซีสสำหรับการศึกษาต่อไป

9. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ Separating gel ความเข้มข้น 10 % โดยนำตัวอย่างโปรตีนผสมกับ sample buffer (ภาคผนวก ข) จากนั้นทำการต้มในที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที และทำการโหลดลงบนแผ่น SDS-PAGE จากนั้นทำการต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการรันให้นำแผ่นเจลมาย้อมด้วย 0.1 % coomassie blue R250 (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 20 นาที และทำการ Fix แผ่นเจลด้วย Fixation solution (ภาคผนวก ข) จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วย detaining solution จนกว่าแผ่นเจลจะใส จากนั้นทำการตรวจวัดขนาดโมเลกุลโดยเทียบกับ standard marker protein การย้อมหา กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase activity stain) โดยการนำแผ่นเจลที่ผ่านการรัน electrophoresis เสร็จแล้วไปล้างด้วย 20% ของ 2-propanol เป็นเวลา 20 นาที (ซ้ำ 2 ครั้ง) เพื่อกำจัด SDS ออก (Blank *et al.*, 1982) จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 20 mM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ที่มี 1% CMC โดยน้ำหนัก จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที และนำไปย้อมด้วย 0.1% Congo red เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย 1 M NaCl จะเห็นส่วนสีบริเวณที่มีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (Mathew and Rao, 1992)

10. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี NATIVE-PAGE

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี Native-Polyacrylamide gel electrophoresis (NATIVE-PAGE) โดยใช้ Separating gel ความเข้มข้น 10 % โดยนำตัวอย่างโปรตีนผสมกับ sample buffer (ภาคผนวก ข) และทำการโหลดลงบนแผ่น NATIVE-PAGE จากนั้นทำการต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการรันให้นำแผ่นเจลมาย้อมด้วย 0.3 % coomassie blue R250 (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 20 นาที และทำการ Fix แผ่นเจลด้วย Fixation solution (ภาคผนวก ข) จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วย detaining solution จนกว่าแผ่นเจลจะใส จากนั้นทำการตรวจวัดขนาดโมเลกุลโดยเทียบกับ standard marker protein การหา กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase activity) โดยการนำแผ่นเจลที่มีส่วนผสมของ 1 % substrate ที่ผ่านการรัน electrophoresis เสร็จแล้วไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 20 mM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) จากนั้นนำไป

ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที และนำไปย้อมด้วย 0.1 % Congo red เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย 1 M NaCl จะเห็นส่วนใสบริเวณที่มีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์

11. การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์บริสุทธิ์

11.1 การศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสม (Optimum pH) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ปริมาตร 500 μ l บ่มร่วมกับสารละลาย CMC ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 % CMC โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งได้ทำการปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ด้วยบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ไว้เท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ตามลำดับ ปริมาตร 500 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

11.2 การศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่มีผลต่อความเสถียร (pH stability) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ปริมาตร 400 μ l บ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ที่ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ไว้ที่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ตามลำดับ ปริมาตร 100 μ l บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนน้ำแข็ง จากนั้นนำมาเติมสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 500 μ l และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

11.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ปริมาตร 500 μ l บ่มร่วมกับสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมจากข้อ 11.1) ปริมาตร 500 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

11.4 การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียร (Temperature stability) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ปริมาตร 500 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดกิจกรรมของเอนไซม์โดยนำมาแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำมาเติมสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมจากข้อ 11.1) ปริมาตร 500 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 30 นาที ทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

12. การศึกษาผลของไอออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ปริมาณ 500 μl ใส่ในสารละลาย Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 20 mM (pH 8.0) ปริมาตร 500 μl ที่มีไอออนของสารประกอบชนิดต่างๆ โลหะชนิดต่างๆ คือ NH_4Cl , KCl , MgCl_2 , CuSO_4 , NaCl , CuCl , K_2SO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 และ CaCl_2 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 mM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเติมสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 500 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

13. การศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรท (substrate specificity) ของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ 500 μl บ่มร่วมกับสารละลาย 20 mM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ปริมาตร 500 μl ที่มีสารละลายของซับสเตรทชนิดต่างๆ คือ CMC, AVECELL, ฟางข้าว, ขี้เลื่อยไม้ยางพารา ชานอ้อย และกากมะพร้าวตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนัก (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดสอบเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 220 ไอโซเลท โดยวิธี Congo red plate assay ที่มี 0.5 % CMC เป็นสับสเตรทจำพวกเซลลูโลส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ โดยเชื้อจะทำการผลิตเอนไซม์เอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยสลายเพื่อให้ได้กลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโต การย่อยสลายดังกล่าวนี้จะก่อให้เกิดส่วนใสรอบ ๆ โคลนินของเชื้อ เมื่อมีการวิเคราะห์ด้วยสาร indicator คือ Congo red การวิเคราะห์ดังกล่าวพบเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจำนวน 133 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) โดยมี 15 ไอโซเลท คือ รหัส RB1.83, RB1.113, RB2.69, RB2.79, SR2.75, SR2.79, SR2.152, SP4, SP16, SP20, SP24, SP36, SP42, SP43 และ SP52 (รูปที่ 3.1) ที่สามารถผลิตเอนไซม์และเกิดบริเวณส่วนใสรอบโคโลนีได้ดีที่สุด และเมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อทั้ง 15 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.2) ในอาหารเหลวที่มี CMC ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนัก และนำไปตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี DNS method เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ดังนั้นเมื่อเชื้อผลิตเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยสลายสับสเตรทก็จะปล่อยเอนไซม์ออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (Crude enzyme) มาใช้สำหรับการวิเคราะห์ได้ การนำเอนไซม์ที่เก็บเกี่ยวได้มาบ่มกับสับสเตรท คือ CMC เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาโดยการย่อยสลายสายเซลลูโลสของสับสเตรทจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) เป็นน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลเดี่ยว และเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS method โดย 3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) ที่มีหมู่ไนโตร 2 หมู่ ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อหมู่ไนโตร 1 หมู่ ถูกรีดิวซ์ด้วยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาลโดยมีความร้อนและสารละลายต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylate กลายเป็น 3-amino, 5-nitrosalicylic acid ที่มีสีส้ม-แดง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520-540 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท คือ รหัส RB1.83, RB2.69, SP4, SP20 และ SP24 มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่น่าสนใจ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.1 เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 133 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยแสดงการเกิดส่วนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

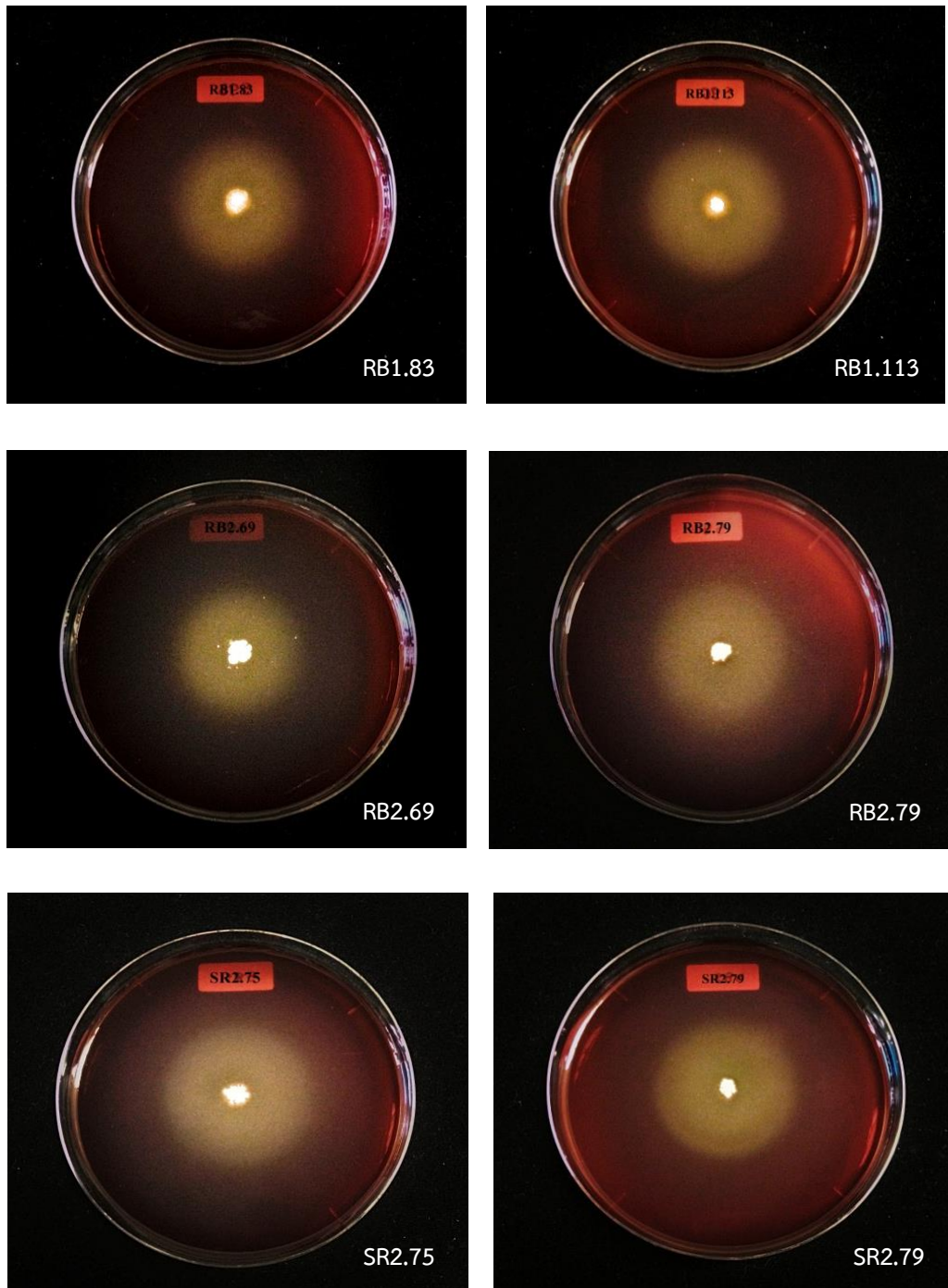
Code	Clear Zone (mm)	Code	Clear Zone (mm)
RB1.2	34.20	RB1.113	41.65
RB1.19	21.37	RB2.2	33.26
RB1.21	26.19	RB2.5	20.70
RB1.29	31.43	RB2.9	24.37
RB1.31	19.30	RB2.13	21.32
RB1.33	26.49	RB2.14	24.22
RB1.35	29.53	RB2.24	20.47
RB1.36	29.45	RB2.31	23.47
RB1.39	28.02	RB2.32	4.67
RB1.40	29.22	RB2.34	20.22
RB1.44	34.30	RB2.37	13.33
RB1.71	19.18	RB2.40	2.45
RB1.74	29.15	RB2.42	21.47
RB1.75	34.47	RB2.45	17.71
RB1.77	27.18	RB2.51	34.27
RB1.83	40.35	RB2.54	19.23
RB1.91	27.27	RB2.57	16.65
RB1.96	23.79	RB2.66	20.22
RB1.99	31.70	RB2.67	21.67
RB1.100	23.90	RB2.69	35.28
RB1.101	16.62	RB2.72	34.69
RB1.103	27.85	RB2.74	17.22
RB1.106	18.59	RB2.78	18.05

ตารางที่ 3.1 เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 133 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยแสดงการเกิดส่วนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

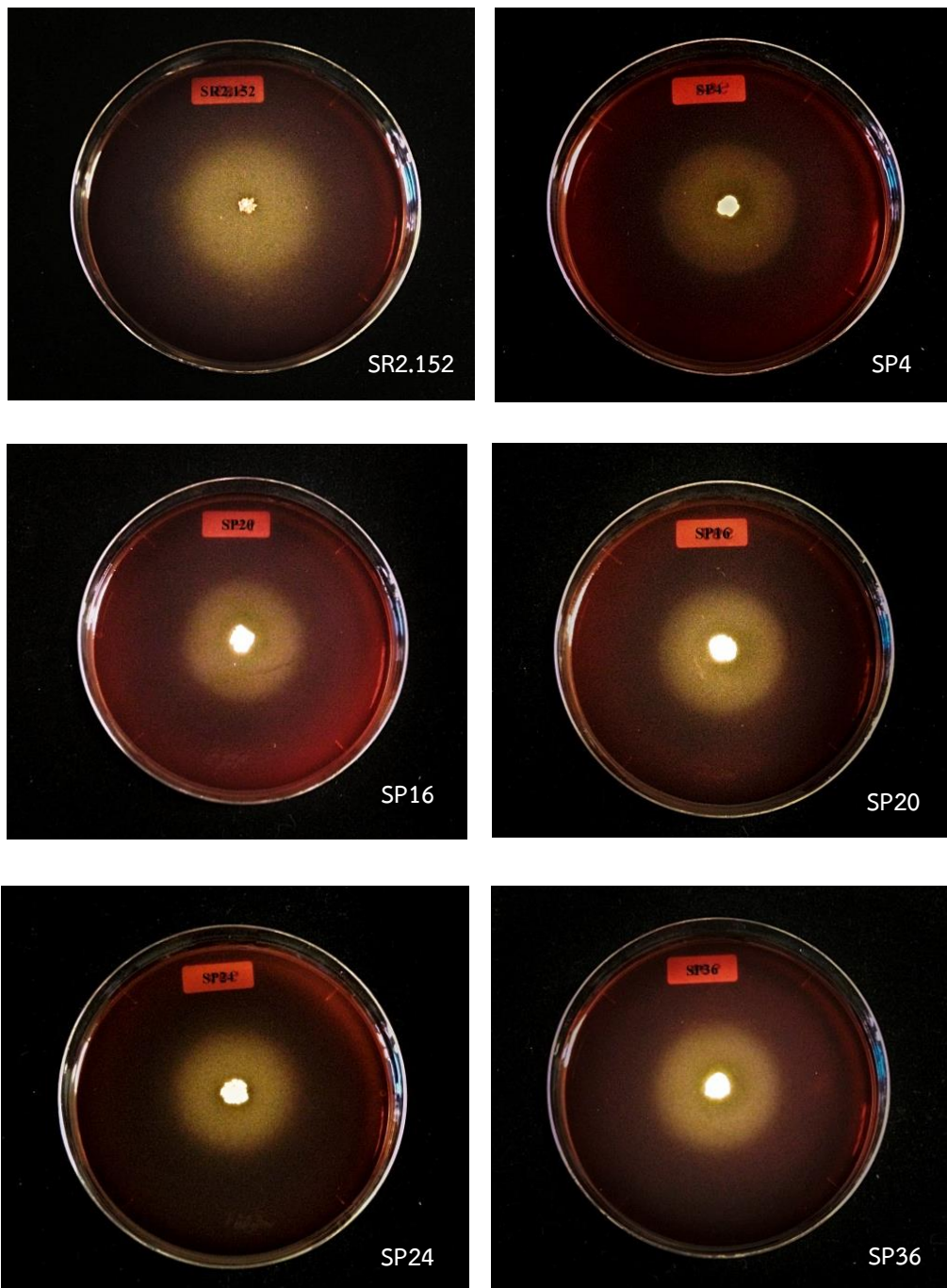
Code	Clear Zone (mm)	Code	Clear Zone (mm)
RB2.79	36.82	SR1.8	29.23
RB2.80	33.47	SR1.9	21.30
RB2.87	24.23	SR1.15	13.35
RB2.88	21.27	SR1.21	30.77
RB2.90	32.73	SR1.22	20.22
RB2.91	31.70	SR1.23	26.41
RB2.94	81.75	SR1.27	16.77
RB2.96	16.15	SR1.46	4.30
RB2.97	20.08	SR1.51	17.45
RB2.98	18.22	SR1.52	20.37
RB2.100	13.27	SR1.55	9.43
RB2.101	13.23	SR1.61	15.73
RB2.112	27.52	SR2.11	23.5
RB2.115	20.52	SR2.75	35.84
RB2.142	13.58	SR2.79	39.25
RB2.145	16.71	SR2.135	23.92
RB2.146	13.12	SR2.152	36.91
RB2.151	20.27	SR2.168	29.62
RB2.192	7.33	SR3.17	26.25
RB2.196	11.13	SR3.61	27.52
SR1.1	21.13	SR3.82	25.22
SR1.3	19.77	SR3.102	23.42
SR1.4	21.15	SR3.103	25.64

ตารางที่ 3.1 เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 133 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยแสดงการเกิดส่วนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

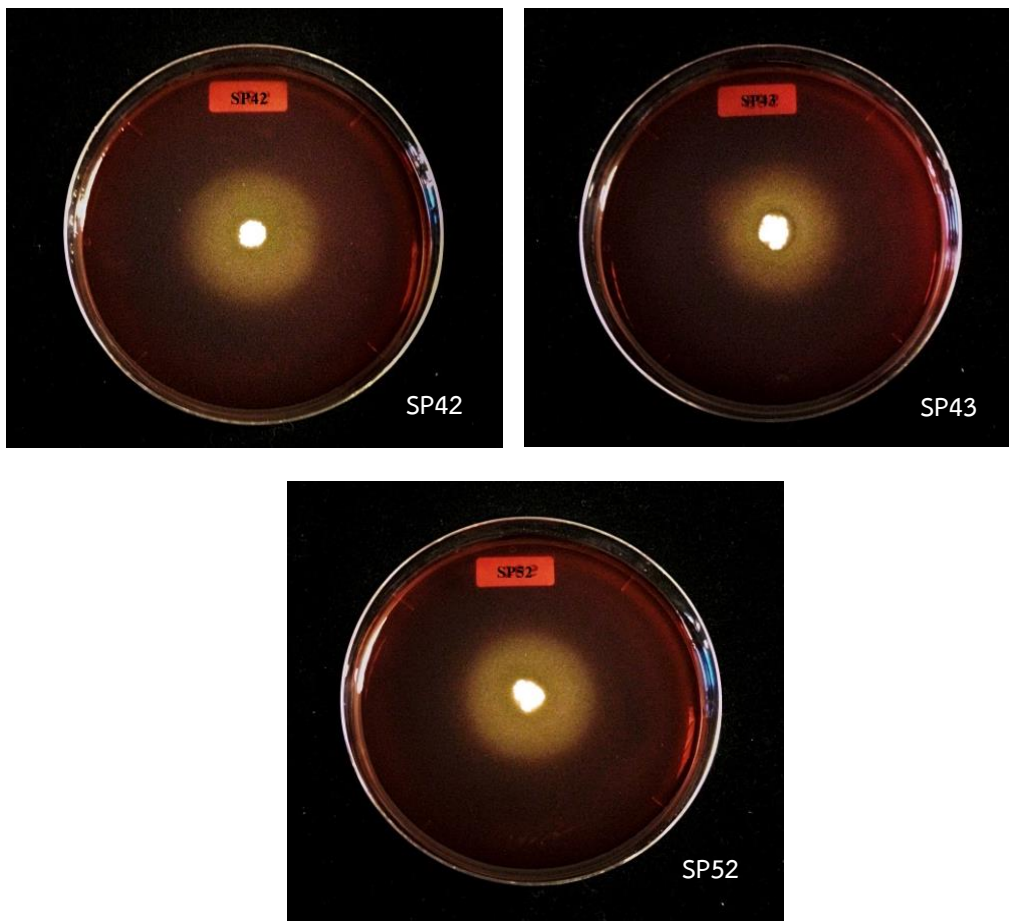
Code	Clear Zone (mm)	Code	Clear Zone (mm)
SR3.123	22.565	SP20	35.36
SR3.129	20.92	SP24	35.06
SR3.137	25.46	SP32	34.94
SR3.138	27.58	SP33	12.12
SR3.140	23.72	SP35	34.74
SR3.142	34.47	SP36	35.74
SR4.1	28.52	SP37	34.90
SR4.4	6.72	SP39	34.86
SR4.9	18.22	SP40	34.35
SR4.16	26.74	SP42	35.42
SR4.27	31.48	SP43	35.19
SR4.35	9.58	SP45	34.24
SR4.38	29.02	SP47	33.26
SR4.63	28.2	SP52	35.08
SR4.64	16.3	SP77	30.72
SR4.72	21.44	SP99	31.45
SR4.101	25.45	SP109	19.42
SP4	37.34	SP139	32.07
SP12	25.74	SP142	21.98
SP16	35.87	SP146	23.70
SP17	25.47		



รูปที่ 3.1 ลักษณะบริเวณส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลายสับสเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทรหัส RB1.83, RB1.113, RB2.69, RB2.79, SR2.75, SR2.79, SR2.152, SP4, SP16, SP20, SP24, SP36, SP42, SP43 และ SP52



รูปที่ 3.1 ลักษณะบริเวณส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลายสับสเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทรหัส RB1.83, RB1.113, RB2.69, RB2.79, SR2.75, SR2.79, SR2.152, SP4, SP16, SP20, SP24, SP36, SP42, SP43 และ SP52 (ต่อ)



รูปที่ 3.1 ลักษณะบริเวณส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลายสับสเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทรหัส RB1.83, RB1.113, RB2.69, RB2.79, SR2.75, SR2.79, SR2.152, SP4, SP16, SP20, SP24, SP36, SP42, SP43 และ SP52

ตารางที่ 3.2 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแอคติโนมัยซีทไฮโซเลทรหัส RB1.83, RB1.113, RB2.69, RB2.79, SR2.75, SR2.79, SR2.152, SP4, SP16, SP20, SP24, SP36, SP42, SP43 และ SP52

Code	Clear zone on the plate (mm)	Enzyme activity (U/ml)
RB1.83	40.35	0.67
RB1.113	41.65	0.49
RB2.69	35.28	0.79
RB2.79	36.82	0.36
SR2.75	35.84	0.27
SR2.79	39.25	0.38
SR2.152	36.91	0.39
SP4	37.34	0.75
SP16	35.87	0.50
SP20	35.36	0.61
SP24	35.06	0.64
SP36	35.73	0.48
SP42	35.42	0.59
SP43	35.2	0.52
SP52	35.08	0.54

จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าเชื้อไฮโซเลทรหัส RB2.69 มีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 0.79 U/ml รองลงมาคือ รหัส SP4, RB1.83, SP24 และ SP20 ตามลำดับ ซึ่งการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไฮโซเลทรหัส SP4 เป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากเชื้อไฮโซเลทรหัส RB2.69 ใช้ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ที่สภาวะการคัดเลือกนานกว่าเชื้อไฮโซเลทรหัส SP4 คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.0 ที่เวลา 9 วัน โดยเชื้อไฮโซเลทรหัส SP4 เกิดส่วนใสรอบโคโลนีขนาด 37.34 mm ที่เวลา 3 วัน และมีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.75 U/ml ที่เวลา 5 วัน จึงใช้เชื้อไฮโซเลทรหัสดังกล่าวในการศึกษาต่อไป

2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

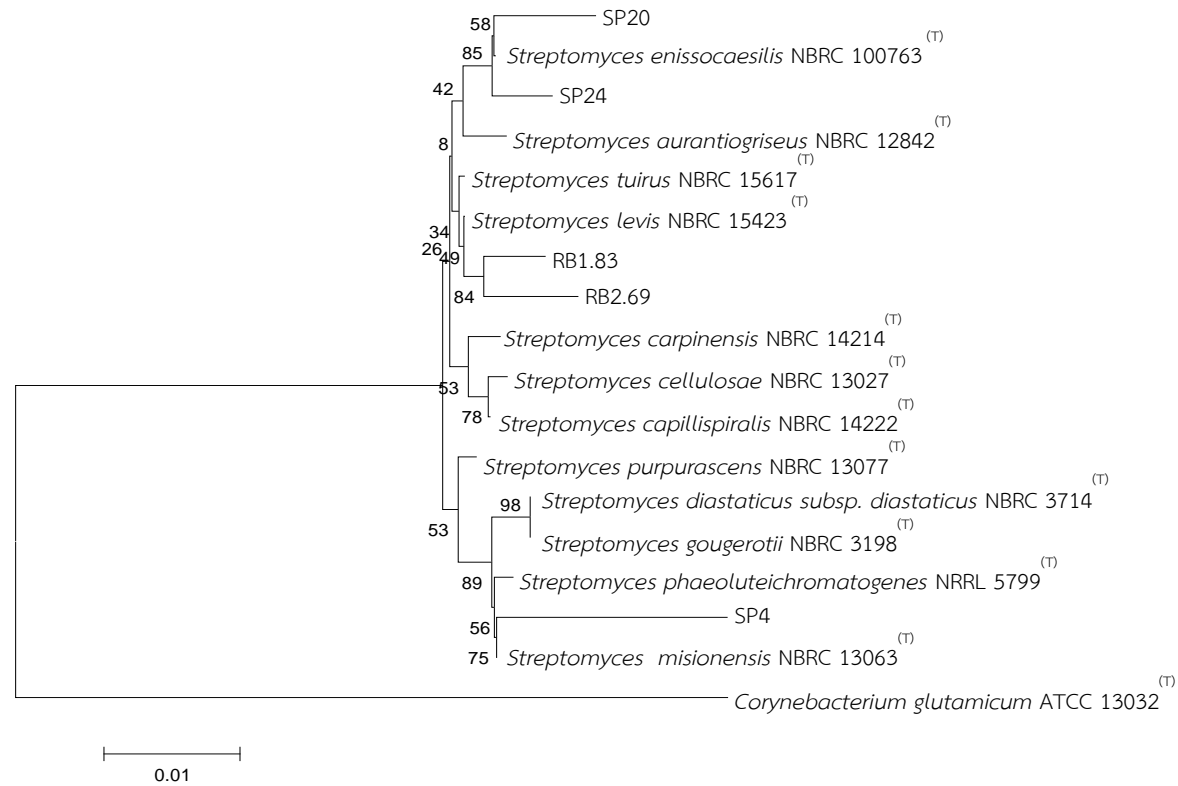
เชื้อแอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหารเพื่อนำอาหารมาใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหารเพื่อสร้างสปอร์สำหรับการสืบพันธุ์ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อไอโซเลทรหัส SP4 มีลักษณะการสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) ให้สี Dark orange yellow และสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหาร (Aerial mycelium) มีการสร้างสปอร์แบบบิดเป็นเกรียว (Spirales) เมื่อสปอร์แก่มีลักษณะเป็นฝุ่นผงสี light grayish olive (รูปที่ 3.2) (Williams *et al.*, 1989)



รูปที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 5000 เท่า

3. การบ่งเอกลักษณ์ของเชื้อโดยวิธี 16S rDNA

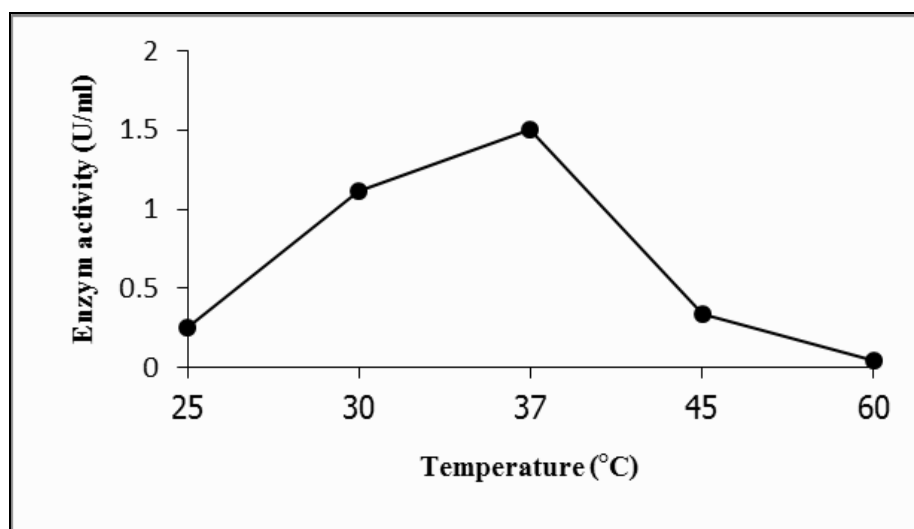
การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของเชื้อแอกติโนมัยสีทรหัส SP4 พบว่าเชื้อดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces misionensis* NBRC 13063^(T) 98.18%, SP20 และ SP24 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces enissocaesilis* NRRL B-16365^(T) 100% และ 99.56% ตามลำดับ RB1.83 และ RB2.69 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces levis* NBRC 15423^(T) 99.42% และ 98.76% ตามลำดับ ความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท แสดงดังรูปที่ 3.3



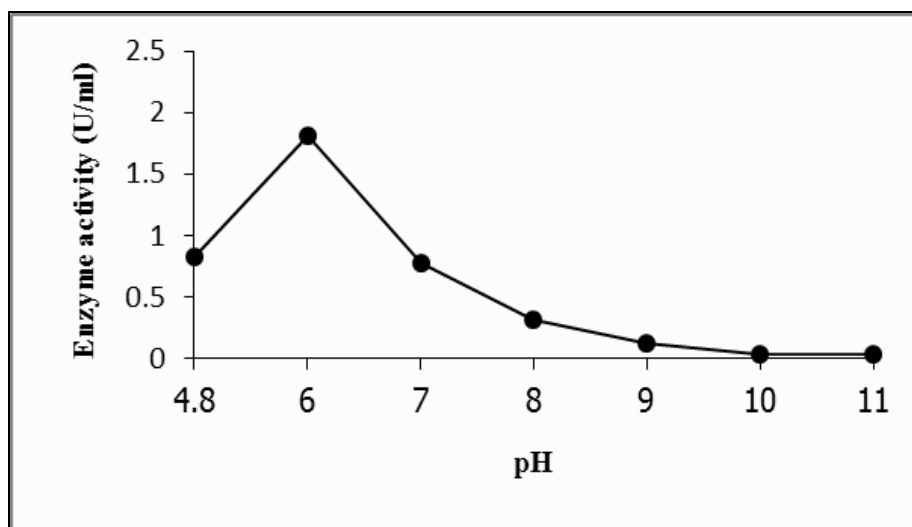
รูปที่ 3.3 สายวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบบ Neighbour-joining method โดยใช้ลำดับเบส 16S rDNA gene โดยใช้ *Corynebacterium glutamicum*^T (Accession number ATCC 13032) เป็น out-group ค่า Bootstrap values แสดง 1000 ซ้ำ Score bar แสดง 1 หน่วย ต่อ 100 นิวคลีโอไทด์

4. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

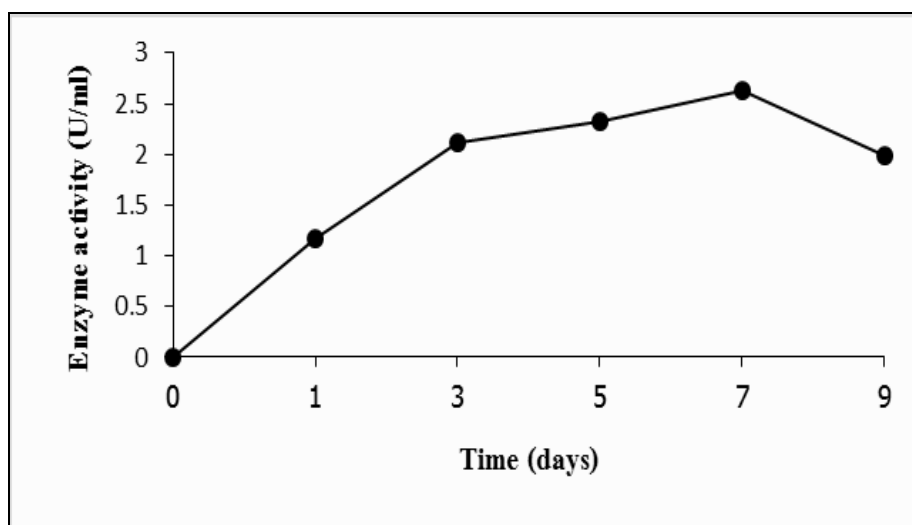
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลทรหัส SP4 พบว่าสภาวะต่าง ๆ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของการผลิตเอนไซม์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 37 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นพบว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดลง (รูปที่ 3.4) ส่วนค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมคือ 6.0 และค่อย ๆ ลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.5) และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ 7 วัน และลดลงหลังวันที่ 8 (รูปที่ 3.6) สภาวะดังกล่าวก่อให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 4.028 U/ml การลดลงดังกล่าวอาจมีผลมาจากเชื้อย่อยสลายสับเสตรทจนหมดและเอนไซม์เกิดการสลายไปจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม จากรายงานพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces griseorubens* พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 6 วันหลังจากการบ่ม (Prasad *et al.*, 2013) การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Streptomyces drozdowiczii* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 ที่เวลา 3 วัน (De Lima *et al.*, 2005) และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ Alkalothermophilic actinomycete สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 วัน (George *et al.*, 2001)



รูปที่ 3.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4



รูปที่ 3.5 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4



รูปที่ 3.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4

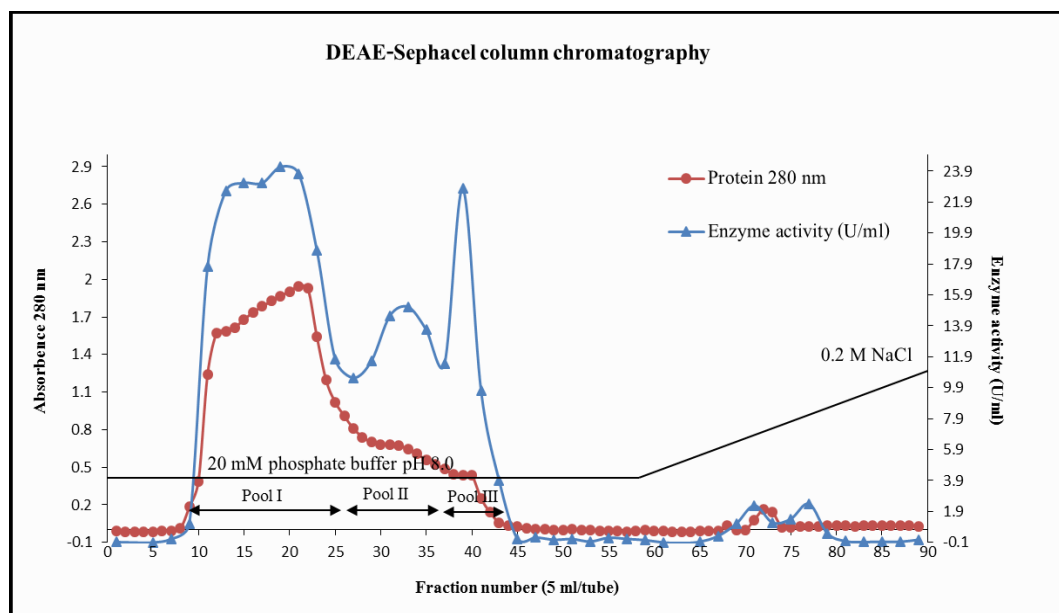
5. ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสสกัดหยาบ (Crude enzyme) ได้จากการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ในสภาวะการคัดเลือกที่เหมาะสมของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4 นั้น เมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณโปรตีนและหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.75 mg/ml และมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 4.028 U/ml เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวมาทำให้เข้มข้นโดยใช้วิธี Evaporation ทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าโดยประมาณ พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.475 mg/ml และมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 63.145 U/ml มีปริมาณผลผลิต (Yield) เหลือ 78.38% เมื่อนำเอนไซม์เข้มข้นมาทำบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 143.89 U/mg

protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 2.68 เท่า และปริมาณผลผลิต (Yield) เหลือ 39.47 % และเมื่อนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์ CM52-cellulose พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 177.64 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.31 เท่า และปริมาณผลผลิต (Yield) เหลือ 22.71 % (ตารางที่ 3.3) จากรายงานพบว่าการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ Alkalothermophilic actinomycete พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 259.93 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 18.7 เท่า (George *et al.*, 2001) การศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 4.70 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 67.2 เท่า (รัชราและคณะ, 2556) การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลส (Endoglucanase) จากเชื้อรา *Mucor circinelloides* พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 43.33 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 408 เท่า (Saha *et al.*, 2004) การศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลส (endo-1,4- β -D-glucanase) จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 257.8 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 103.1 เท่า (Murashima *et al.*, 2002) และการศึกษาการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เซลลูเลส (Endoglucanase) จากเชื้อ *Chalara paradoxa* CH32 พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 462.3 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 201.0 เท่า (Lucas *et al.*, 2001)

ตารางที่ 3.3 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อไฮโซเลทรหัส SP4

purification Step	Total volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Enzyme Activity (U/ml)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Supernatant	2000	0.075	150	4.028	8056	53.7067	100	1
Evaporation (Supernatant)	100	0.475	47.5	63.145	6314.5	132.94	78.38	2.48
DEAE-Sephacel	100	0.221	22.1	31.801	3180.1	143.89	39.47	2.68
CM-52	50	0.206	10.3	36.594	1829.7	177.64	22.71	3.31

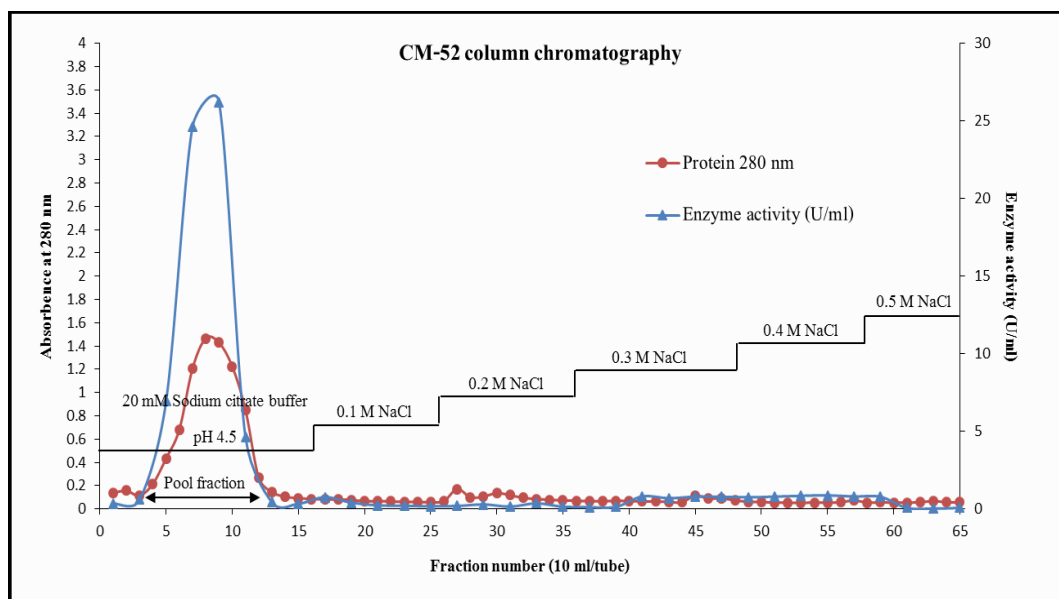


รูปที่ 3.7 กราฟแสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสโดย DEAE-Sephacel column chromatography

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ DEAE-Sephacel column ที่ผ่านการปรับสมดุลและล้าง (wash) คอลัมน์ด้วย 20 mM phosphate buffer (pH 8.0) และชะคอลัมน์ด้วย 0.2 M Sodium chloride ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้น 3 พีก ดังแสดงในรูปที่ 3.7 เมื่อมีการรวม fraction (Pool fraction) เป็น 3 fraction และนำไปทดสอบการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี DNS method และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowly method พบว่า fraction ที่ 1 (Pool I) มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 31.801 U/ml มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.221 mg/ml, fraction ที่ 2 (Pool II) มีกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 10.632 U/ml มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.124 mg/ml และ fraction ที่ 3 (Pool III) มีกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 3.181 U/ml มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.038 mg/ml (ตารางที่ 3.4) จากผลดังกล่าวจึงเลือกใช้ fraction ที่ 1 (Pool I) สำหรับการทำบริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 3.4 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วย DEAE-Sephacel column chromatography

Fraction	Protein (mg/ml)	Enzyme activity (U/ml)
I	0.221	31.801
II	0.124	10.632
III	0.038	3.181



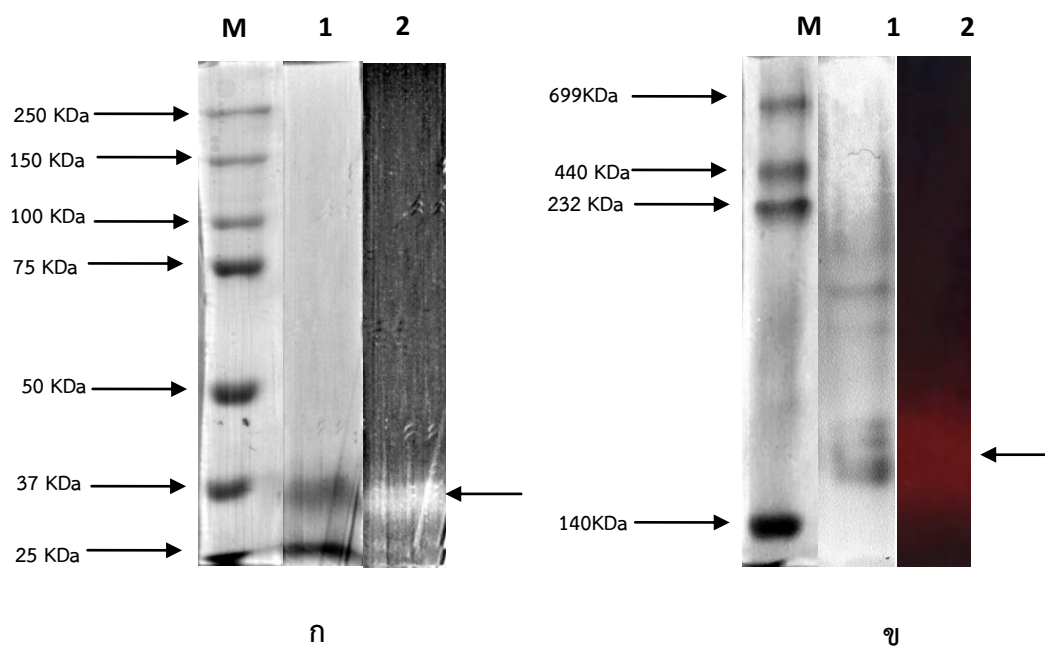
รูปที่ 3.8 กราฟแสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสโดย CM-52 column chromatography

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โดยใช้ CM52-cellulose ผ่านการปรับสมดุลและล้าง (wash) คอลัมน์ด้วย 20 mM Sodium citrate buffer pH 4.5 และชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, และ 0.5 M Sodium chloride ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้น 1 พีค ดังแสดงในรูปที่ 3.8 เมื่อมีการรวม fraction (Pool fraction) และนำไปทดสอบการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี DNS method และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowly method พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 36.594 U/ml มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.206 mg/ml

6. ผลการหาขนาดโปรตีน

การหาขนาดโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PSGE เป็นการแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน Polyacrylamide gel ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ โดยไม่มีส่วนผสมของ β -mercaptoethanol ที่มีส่วนในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (Disulphide bond) ทำให้โปรตีนไม่ถูกทำลายและสามารถนำไปทดสอบการเกิด Activity ได้ การหาขนาดโปรตีนทำการตรวจวัดโดยการย้อมด้วย 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 และการหา Activity ของโปรตีนโดยการบ่มร่วมกับสับสเตรท (Substrate) และย้อมด้วย 0.1 % Congo red พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีขนาดประมาณ 36 kDa (รูปที่ 3.9 ก) จากรายงานพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ Alkalothermophilic actinomycete มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 38 kDa. (George *et al.*, 2001) เอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) จากเชื้อรา *Mucor circinelloides* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27 kDa. (Saha *et al.*, 2004) เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* strains มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 kDa. (Mawadza *et al.*, 2000) เอนไซม์เซลลูเลส (endo-1,4- β -D-glucanase) จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ไอโซเลท RCE1 และ RCE2 เอนไซม์มีขนาดโมเลกุล 41 kDa. และ 61 kDa. ตามลำดับ (Murashima *et al.*, 2002) และเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) จากเชื้อ *Chalara paradoxa* CH32 พบว่าเอนไซม์มีขนาดโมเลกุล 35 kDa (Lucas *et al.*, 2001) เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa. (รัชราและคณะ 2556)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี Native-PAGE พบว่าหลังจากการบ่มเจลสับสเตรทใน 20 mM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการย้อมด้วย 0.1 % Congo red พบว่ามีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โดยแสดงส่วนใสเป็นวงกว้างบนแผ่นเจล ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ยังคงรักษากิจกรรมไว้ได้ (รูปที่ 3.9 ข)



รูปที่ 3.9 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อไอโซเลทรหัส SP4

ก. SDS-PAGE ของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4

Lane M: Protein marker, Lane 1.: CM-52 column, Lane 2.: cellulase activity

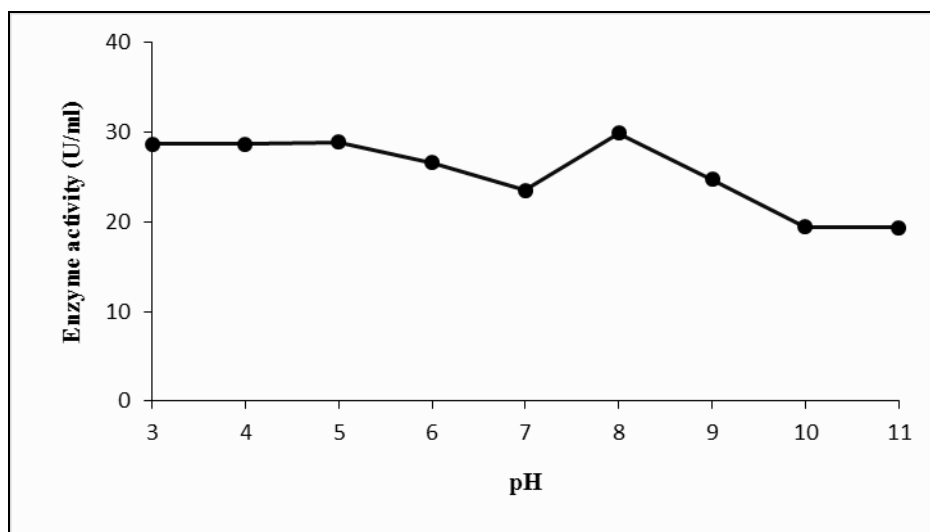
ข. NATIVE-PAGE ของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4

Lane M: Protein marker, Lane 1.: CM-52 column, Lane 2.: cellulase activity

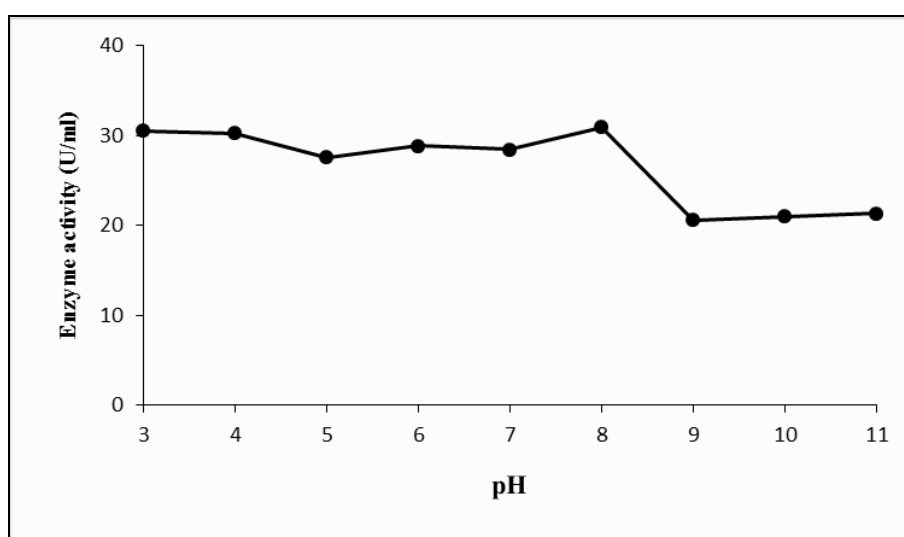
7. ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์

7.1 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมและผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่มีผลต่อความเสถียรต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum pH and pH stability)

จากผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมและผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่มีผลต่อความเสถียรต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อไอโซเลทรหัส SP4 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 3.0-8.0 มีค่ากิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์มากกว่า 90 % โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 8.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 15.33 U/ml (รูปที่ 3.10) ส่วนผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่มีผลต่อความเสถียรต่อกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 3.0-8.0 มีค่ากิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์มากกว่า 90 % โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 8.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 15.83 U/ml (รูปที่ 3.11) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส (pH) สูงหรือต่ำเกินไปมีผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์ซึ่งมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างของเอนไซม์ที่บริเวณเร่งเสถียรภาพไปจึงไม่เหมาะต่อการทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (Li *et al.*, 2008)



รูปที่ 3.10 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลท รหัส SP4

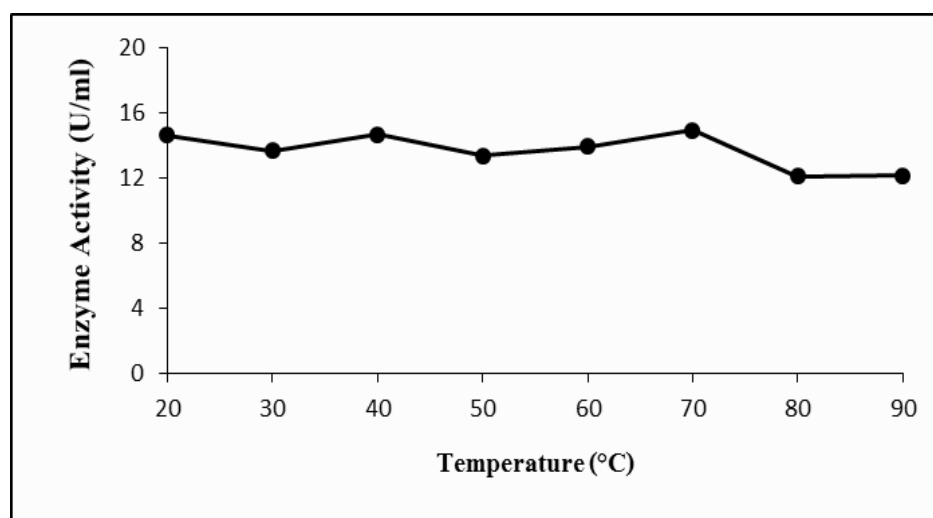


รูปที่ 3.11 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลท รหัส SP4

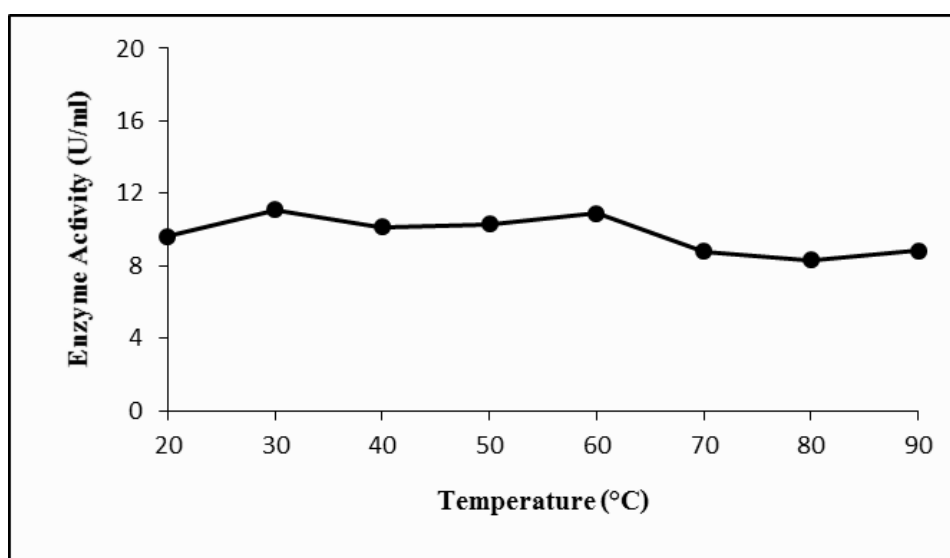
7.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมและผลอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (Optimum temperature and Temperature stability)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วงของอุณหภูมิระหว่าง 20–90 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิช่วง 20-70 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์มากกว่า 90 % โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 14.94 U/ml (รูปที่ 3.12) และผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์พบว่าอุณหภูมิ

ช่วง 40-70 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์มากกว่า 90 % โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 10.92 U/ml (รูปที่ 3.13)



รูปที่ 3.12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเทอร์มัส SP4



รูปที่ 3.13 อุณหภูมิที่มีความเสถียรต่อเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเทอร์มัส SP4

จากการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. MDS มีเสถียรต่อความร้อนสูงโดยรักษากิจกรรมไว้ได้ 60-70 % ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 และทนต่อสภาวะค่าความเป็นกรด-เบส (pH) มากกว่า 55-60 % ที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 10.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส (สำหรับเอนไซม์เอ็นโดกลูคาเนส) (Saratale *et al.*, 2012) เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ Alkalothermophilic actinomycete มีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ

5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 7.0-10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (George *et al.*, 2001) เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 (ริชราและคณะ 2556) เอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) จากเชื้อรา *Mucor circinelloides* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 4.0-6.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 4.0-7.0 (Saha *et al.*, 2004) เอนไซม์เซลลูเลส (endo-1,4- β -D-glucanase) จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ไอโซเลท RCE1 และ RCE2 เอนไซม์จากเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6.0 สำหรับ RCE1 และค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 สำหรับ RCE2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Murashima *et al.*, 2002) และเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase) จากเชื้อ *Chalara paradoxa* CH32 มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Lucas *et al.*, 2001)

8. ผลการศึกษาผลของไอออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ผลการศึกษาผลของไอออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ตารางที่ 3.5) พบว่าไอออนของโลหะสารประกอบ $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 5 mM มีผลส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า $FeSO_4$ มีผลส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ในทางตรงกันข้ามพบว่าไอออนของโลหะสารประกอบ $CaCl_2$, $MgCl_2$, KCl , $CuCl_2$, NH_4Cl , $NaCl_2$, $CuSO_4$ และ K_2SO_4 มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นี้อีกด้วย จากรายงานการศึกษาของ Saha *et al.*, (2004) พบว่าเมื่อมีการเติม 5 mM ของ $MgCl_2$ และ $CoCl_2$ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้ การศึกษาของ Mawadza *et al.*, (2000) เมื่อมีการเติม 1 mM ของ Co^{2+} และ Ag^+ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้ แต่ 1 mM ของ Mn^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การศึกษาของ Murashima *et al.*, (2002) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสถูกยับยั้งเมื่อเติม Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , และ Pb^{2+} และการศึกษาของ Lucas *et al.*, (2001) เมื่อเติม 10 mM ของ $MnCl^{2+}$ สามารถส่งเสริมการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดี แต่ $FeCl_2$, $ZnSO_4$ และ $AgNO_3$ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

9. ผลการศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรท (substrate specificity) ของเอนไซม์

จากการศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรทเซลลูโลส (Substrate specificity) ของเอนไซม์เชื้อไอโซเลทรหัส SP4 พบว่าสามารถย่อยสลาย CMC ได้ดีที่สูตรรองลงมาคือ Avecel ซึ่งเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ได้ โดยสามารถย่อย

สลายฟางข้าวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ขี้เลื่อยไม้ยางพาราและทะเลสาบปาล์ม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.6)

ตารางที่ 3.5 ผลของไอออนโลหะในสารประกอบชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

Metal ion	Concentration 5 mM	
	Enzyme activity(U/ml)	Relative Activity (%)
Control	9.91	100
KCl	6.56	66.22
MgCl	7.45	75.19
CaCl	6.47	65.35
NaCl	7.11	71.77
FeSO ₄	10.74	108.46
MnSO ₄	7.16	72.28
CuSO ₄	8.12	81.98
MgSO ₄	23.99	242.27
Fe ³⁺	8.96	90.44
Fe ²⁺	7.25	73.22

ตารางที่ 3.6 ผลของความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรท (substrate specificity) ชนิดต่าง

Substrates.	Concentration 1% (w/v)	
	Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
CMC	8.32	100
AVECEL	7.85	94.41
Sawdust	6.19	74.38
Rice straw	8.08	97.13
Bagasse	7.45	89.59
Oil cake	3.49	42.03

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อทั้งหมดจำนวน 220 ไอโซเลทที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยใช้วิธี Congo Red plate assay พบเชื้อจำนวน 133 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท เกิดกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด โดยไอโซเลทรหัส SP4 ให้กิจกรรมของเอนไซม์อย่างเป็นที่น่าสนใจที่สภาวะการคัดเลือกที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6.0 ที่ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน เมื่อทำการบ่งเอกลักษณ์ของเชื้อด้วยเทคนิค 16S rDNA sequencing เชื้อดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces misionensis* คือ 98.18 % การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อดังกล่าวโดยการทำให้เอนไซม์สกัดหยาบเข้มข้นโดยใช้วิธี Evaporation และนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ CM52-cellulose เพื่อทำให้เกิดความบริสุทธิ์ ตามลำดับ พบว่าเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นและปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ Crude extract ค่าความบริสุทธิ์ (Purification fold) มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3.31 เท่า แต่มีค่าผลผลิต (Yield) เหลือเพียง 22.71 % ซึ่งเมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์เอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) เพิ่มขึ้นเป็น 177.64 U/mg แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ว่ามีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีนได้ดีค่ากิจกรรมจำเพาะที่ได้จึงสูงขึ้นและปริมาณโปรตีนมีค่าลดลง น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีขนาด 36 kDa ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์ คือ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 8.0 และพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 8.0 เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่สุด ผลของไอออนของโลหะต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 5 mM มีผลต่อการส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ $NaCl_2$ และ $CaCl_2$ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการย่อยสลายสเตรทต่าง ๆ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซีลื้อยไม้่างพาราได้ จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทรหัส SP4 มีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำเชื้อที่มีความสามารถดังกล่าวนี้ไปใช้สำหรับช่วยย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร รวมทั้งสามารถนำเชื้อนี้มาผลิตเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

- กนกกร สีนมา. 2548. การศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากลำไส้ปลวกซึ่งย่อยสลายสารประกอบลิกนินเซลลูโลสและออกซิโดซ์กรดยูริก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- จิระพันธ์ กริ่งไกร. 2554. เซลล์และชีววิทยาโมเลกุลพื้นฐาน. เรื่องเอนไซม์. ภาคชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- จิรพรรณ ใจอินผล. 2550. การแยกและการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินในถ้ำน้ำลอดที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของฟังไจ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- จามจรี เกตุบัวขาว, ณิชภา ชมพู, สุพัฒตรา ชาวสวน. 2555. การตัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากมูลสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี. ปทุมธานี.
- ณัฐวรรณ พัทธ์ศิริพรรณ. 2548. การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขยะมูลฝอยทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- ดนัย บุญเกียรติ. 2552. บทที่ 3 เอนไซม์. ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรนารายณ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- พิจิตรา ตั้งเขื่อนขันธุ์, รสรินทร์ รุจนาพันธ์ และอัญชลี อานาตสมบุญ. 2548. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
- พิชิตพล เจริญทรัพย์านันท์. 2550. เอนไซม์: เทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีเคมีสิ่งทอ คณะอุตสาหกรรมสิ่งทอและออกแบบแฟชั่น มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร. กรุงเทพมหานคร.
- พิทยากร ลิมทอง. 2531. อิทธิพลของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสต่อการผลิตปุ๋ยหมักจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

- นฤมล เกื้อนกุล. 2550. การศึกษาการใช้สารสีจากแอคติโนมัยซีทเพื่อเป็นสีย้อมในห้องปฏิบัติการชีววิทยา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม. พิษณุโลก.
- มัลลิกา หนูแก้ว. 2550. การประเมินความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการควบคุมโรคเน่าคอตินของพริก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- ศรีสกุล ชนะพันธ์. 2552. การแยกและการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปกร. นครปฐม.
- มนตรี วงศ์ติณชาติ. 2543. การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ที่ตรึงบนซีเมนต์ในตู้ทำละลายอินทรีย์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพมหานคร.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2558. กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปกร. นครปฐม.
- รัชรา และคณะ 2556 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว. Graduate Research Conference. BMP6., 702-711.
- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology (No. Ed. 2). New York John Wiley & Sons Inc.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database.
- Bhat, S. 1997. Cellulase degrading enzymes and their potential industrial application. *Biotechnol.Adv.*15 : 538-620.
- Blank, A., Sugiyama, R. H., & Dekker, C. A. 1982. Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Analytical biochemistry*, 120(2), 267-275.
- Bollag, D. M. E., Rozycki, S. J., Bollag, M. D., Rozycki, M. D., & Edelstein, S. J. 1996. *Proteins methods* (No. 547.96 BOL).

- Boyer, R.F. 2012. Biochemistry laboratory : modern theory and techniques / Rodney Boyer. — 2nd ed. p. cm. Upper Saddle River, New Jersey, Printed in the United States of America: Prentice Hall., 166-175.
- Cross, T. and Goodfellow, M. 1973. Taxonomy and Classification of the Actinomycetes in Sykes, Gand F.A. Skinner. Actinomycetales characteristic and Practical Importance. London : Academic press.
- Czoch, W. P. and Mordarski, M. 2009. Actinomycetes Enzymes. In M. Goodfellow, S. T. Williams and Mordarski, M., eds. Actinomycetes in Biotechno0logy. Academic Press, San Diego. 5: 219-442.
- Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Genberg, H. and Wood, W. 1973. Microbiology.3rd ed. Maryland : Harper and Row Publishing.
- De Lima, A. L. G., do Nascimento, R. P., da Silva Bon, E. P., & Coelho, R. R. R. 2005. Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries.*Enzyme and Microbial Technology*, 37(2), 272-277.
- Dean, P.D.G., W.S. Johnson and F.A. Middle. 1991. Affinity Chromatography ; A practical approach. OIRL Press, Oxford.
- Duff, S. J. B. and Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol : a review. *Bioresour. Technol.* 55, 1-33.
- Eriksson, K.E.L., R.A. Blanchette. And P. Ander. 1990. Microbial and Enzymatic Degardation of Wood and Wood Component. Springer Verlag, Berlin. 407.
- Fan, L. T., Gharpuray, M. M., & Lee, Y. H. 1987. Cellulose hydrolysis. Biotechnology monographs. Volume 3.
- Fan, L. T., Gharpuray, M. M., & Lee, Y. H. 1987. Design and economic evaluation of cellulose hydrolysis processes. In *Cellulose hydrolysis*. Springer Berlin Heidelberg., 149-187.
- George, S. P., Ahmad, A., & Rao, M. B. 2001. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource Technology*, 77(2), 171-175.
- Goksoyr. J. & Eriksen. J. 1980. Cellulases: Microbial Enzymes and Bioconversions. *Academic Press, London*, 283-327.
- Gomori, G. 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. 138-146.

- Goshadrou A, Karimi K, Taherzadeh MJ. 2011. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. *Ind Crops Prod* 34:1219–1225.
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. *Microbiology*, 98(1), 109-115.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), 1125-1131.
- Jeffrey, L.S.H., Azrizal, M.R. 2007. Screening of cellulase activity in actinomycetes isolated from different locations of Peninsular Malaysia. *J.Trop.Agric. and Fd. Sc* 35: 153-157.
- Li, W., Zhang, M., Yang, Y., Chen, M. 2008. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*. 40: 195–201.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193: 265-275.
- Lucas, R., Robles, A., García, M. T., Alvarez de Cienfuegos, G., & Gálvez, A. 2001. Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(1), 79-85.
- Mathew, R., & Rao, K. K. 1992. Activity staining of endoglucanases in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 206(1), 50-52.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., & Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of biotechnology*, 83(3), 177-187.
- McCarthy, A. J. and Peace, E. 1985. "Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes." *Applied microbiology and biotechnology* 21(3-4): 238 - 244.
- Miller, G. C. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Mohanta, Y. K. 2014. Isolation of cellulose-degrading actinomycetes and evaluation of their cellulolytic potential. *Bioengineering and Bioscience*, 2(1), 1-5.

- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, & Kono, T. 2002. Purification and characterization of new endo-1, 4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3), 319-326.
- Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. *Adv. Appl. Microbiol.* 9: 91-215
- Pharmacia Fine Chemicals. 1991a. Ion Exchange Chromatography; Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.
- Pharmacia Fine Chemicals. 1991c. Gelfiltration Chromatography; Theory and practices. Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.
- Pharmacia Fine Chemicals. 1991f. Affinity Chromatography. Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.
- Prasad P., Singh T. and Bedi S. 2013. Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. *Journal of King Saud University – Science* 25: 245–250.
- Prasad, P., Singh, T., & Bedi, S. 2014. Enzymatic Screening and Characterization of Cellulolytic Actinomycetes Isolated from Soil samples collected from Patna District in Bihar, India. *International journal of current research and Academic review*, 2(10), 60-71.
- Pridham, T. G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L. A., Hesseltine, C. W., & Benedict, R. G. 1957. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. *Antib. Ann.*, 1956-7., 947-953.
- Saha, B. C. 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, 39(12), 1871-1876.
- Ramesh, S. and Mathivanan, N. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bangal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal Microbial Biotechnology* 25: 2103-2111
- Saratale G. D., Saratale R. G. and Oha S. E. 2012. Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. MDS. *biomass and bioenergy* 47: 302-315.
- Shah, S. R. 2013. Chemistry and applications of cellulase in textile wet processing. *Res J Eng Sci*, 2(7), 1-5.

- Srinivasan, M. and Laxman, R. 1991. "Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7(2): 171 - 184.
- Stamford, T. and Stamford, N. 2002. "Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves". *Bioresource technology* 83(2): 105 - 109.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. 2005. Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(11), 832.
- Tomme, P., Warren, R. A. J., & Gilkes, N. R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in microbial physiology*, 37(1), 1-81.
- Williams, M.E. Sharpe, J.G. and Holt, J. G. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Waksman, S.A. and Henrici. 1974. *Streptomycetaceae* in Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore : The Williams and Wilkins Company.
- White, A. R. 1993. Visualization of cellulase and cellulose degradation. In cellulose and other natural polymer systems biogenesis, structure and degradation. Plenum Press, New York: 489-506.
- Zhang Y-HP. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 : 367 – 375.
- <http://www.thefullwiki.org/Hemicellulase> 20/06/2559
- <http://www.megasoftware.net>

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ISP2 agar

Dextrose	4	g
Yeast extracts	4	g
Malt extracts	10	g
Agar	15	g
Water	1000	ml

ฆ่าเชื้อที่ความดัน 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. Basal mineral salts agar

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.64	g
KH_2PO_4 .anhydrous	2.38	g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.65	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00	g
Pridham and Gottlieb trace salts	1.00	ml
Distilled water	1000	ml
Agar	15	g
pH	6.0	

ฆ่าเชื้อที่ความดัน 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

Pridham and Gottlieb trace salts (1ml/L)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.64	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11	g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.79	g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	g
Distilled water	100	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. Basal mineral salts broth

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.64	g
KH_2PO_4 .anhydrous	2.38	g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.65	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00	g
Pridham and Gottlieb trace salts (B)	1.00	ml
Distilled water	1000	ml
pH	6.0	

ฆ่าเชื้อที่ความดัน 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย 0.1% Congo red

Congo red	0.1	g
Distilled water	100	ml

ละลาย Congo red ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

2. การเตรียม 1 N HCl

Conc.HCl	83.61	ml
Distilled water	916.39	ml

ค่อยๆเติม Conc.HCl ลงในน้ำกลั่น 500 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เก็บใส่ขวด

3. การเตรียม 1 N NaOH

NaOH	40	g
Distilled water	1000	ml

ค่อยๆละลาย NaOH ในน้ำกลั่น 500 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เก็บใส่ขวด

4. การเตรียมสารละลาย DNS สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาล

3, 5- dinitrosalicylic acid	10	g
Potassium sodium tartrate	300	g
NaOH	16	g
Distilled water	1000	ml

ละลาย NaOH ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml ค่อยๆเติม 3, 5- dinitrosalicylic acid คนให้ละลายปรับปริมาตรเป็น 500 ml และเติม sodium potassium tartrate อย่างช้าๆจนให้ละลายและปรับปริมาตรเป็น 1000 ml เก็บใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันก่อนใช้

5. การเตรียม 50 mM Citrate buffer pH 4.8

สารละลาย A: 50 mM Citric acid ชั่ง Citric acid 10.51 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

สารละลาย B: 50 mM Sodium citrate ชั่ง Sodium citrate 14.7 g ละลายในน้ำกลั่น

1000 ml

ใช้สารละลาย A ปริมาตร 23 ml ผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 27 ml เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml

6. การเตรียม 1% CMC

ชั่ง CMC 10 g ละลายในน้ำกลั่น 200 ml ต้มให้ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml ทิ้งให้เย็นและเก็บใส่ขวด

7. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์โปรตีน

a. การเตรียมสารละลาย 2% Sodium carbonate (Na_2CO_3) ใน 1N NaOH [Reagent A]

Na_2CO_3	2	g
1N NaOH	100	ml

ละลาย Na_2CO_3 ใน 1N NaOH และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด ก่อน
นำไปผสมกับสารละลาย B [Reagent B] ในอัตราส่วน A : B เท่ากับ 50 ml : 1 ml

b. การเตรียมสารละลาย 0.5% Copper sulfate (CuSO_4) ใน 1% Sodium potassium tartrate [Reagent B]

Copper sulfate	0.05	g
Sodium Potassium Tartrate	1.0	g
Distilled water	100	ml

ละลาย Sodium Potassium Tartrate ในน้ำกลั่น 50 ml คนให้ละลาย จากนั้น
ค่อยๆเติม Copper sulfate ลงไปคนให้ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

c. การเตรียมสารละลาย C [Reagent C]

1 N Folin reagent	10	ml
Distilled water	10	ml

ผสม 1 N Folin reagent กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

8. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

Glucose	0.1	g
Distilled water	10	ml

ละลายกลูโคสในน้ำกลั่น 10 ml เก็บไว้เป็น Stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml

9. การเตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA)

BSA	0.1	g
Distilled water	10	ml

ละลาย BSA ในน้ำกลั่น 10 ml เก็บไว้เป็น Stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml

10. การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

a. 10% APS (Ammonium persulfate)

APS 10 g

Distilled water 100 ml

ละลายในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

b. 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)

SDS 10 g

Distilled water 100 ml

ละลายในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

c. 40% Glycerol

Glycerol 40 ml

Distilled water 60 ml

ผสม Glycerol และน้ำให้เข้ากันและเก็บใส่ขวด

d. 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris-base 6.06 g

Distilled water 100 ml

ละลาย Tris-base ในน้ำกลั่น 50 ml และปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 6.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

e. 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris-base 18.17 g

Distilled water 100 ml

ละลาย Tris-base ในน้ำกลั่น 50 ml และปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 8.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

f. 30% (w/v) Bis-Acrylamide

Acrylamide 29.7 g

N,N'-methylene-bisacrylamide 0.3 g

Distilled water 100 ml

ละลาย Acrylamide และ N,N'-methylene-bisacrylamide ในน้ำกลั่น 50 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

g. สารละลายบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-192 mM glycine pH 8.3 (Running buffer)

25 mM Tris- HCl	3.028	g
192 mM Glycine	14.41	g
0.1% SDS (w/v)	1	g
Distilled water	1000	ml

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เก็บใส่ขวด

h. การเตรียมสีสังเคราะห์สำหรับผสมโปรตีน (5x gel loading dry)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.125	ml
40% Glycerol	0.2	ml
10% SDS	0.2	ml
1% bromophenol blue	0.05	ml
Distilled water	0.375	ml

ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

i. สารละลายสำหรับสีย้อมโปรตีน (Staining solution)

เตรียมที่ความเข้มข้น 0.1 % Coomassie brilliant blue R250 ใน methanol, 10 % acetic acid

0.1% Coomassie brilliant blue R250	0.1	g
40% Methanol	40	ml
10% Glacial acetic acid (v/v)	10	ml
50% Distilled water	50	ml

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดสีชา

j. สารละลาย Fixation solution

40% Ethanol	40	ml
10% Glacial acetic acid (v/v)	10	ml
50% Distilled water	50	ml

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันและเก็บใส่ขวด

k. สารละลายสำหรับล้างสีย้อม Destaining solution

50% Methanol	50	ml
10% Glacial acetic acid (v/v)	10	ml
40% Distilled water	40	ml

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันและเก็บใส่ขวด

l. การเตรียม Polyacrylamide gel 10% (Separating gel) ปริมาตร 10 ml

Distilled water	4.0	ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5	ml
30% Bis-acrylamide	3.3	ml
10% SDS	0.1	ml
10% APS	0.1	ml
TEMED	0.005	ml

ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

m. การเตรียม Polyacrylamide gel 5% (Stacking gel) ปริมาตร 3 ml

Distilled water	2.1	ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.38	ml
30% Bis-acrylamide	0.5	ml
10% SDS	0.03	ml
10% APS	0.03	ml
TEMED	0.003	ml

ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

11. การเตรียมสารละลายสำหรับ NATIVE-PAGE

a. สารละลายบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-192 mM glycine pH 8.3 (Running buffer)

25 mM Tris- HCl	3.028	g
192 mM Glycine	14.41	g
Distilled water	1000	ml

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml เก็บใส่ขวด

b. การเตรียมสีสังเคราะห์สำหรับผสมโปรตีน (5x gel loading dry)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.125	ml
40% Glycerol	0.2	ml
0.5% Bromophenol blue	0.05	ml
Distilled water	0.625	ml

ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

c. สารละลายสำหรับสีย้อมโปรตีน

เตรียมที่ความเข้มข้น 0.3% Coomassie brilliant blue R250 ใน methanol, 10% acetic acid

0.3% Coomassie brilliant blue R250	0.3	g
40% Methanol	40	ml
10% Glacial acetic acid (v/v)	10	ml
50% Distilled water	50	ml

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดสีชา

d. การเตรียม Polyacrylamide gel 10% (Separating gel) ปริมาตร 10 ml

Distilled water	4.1	ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5	ml
30% Bis-acrylamide	3.3	ml
10% APS	0.1	ml
TEMED	0.005	ml

ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

e. การเตรียม Polyacrylamide gel 10% (Substrate gel) ปริมาตร 10 ml

Distilled water	3.1	ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5	ml
30% Bis-acrylamide	3.3	ml
10% APS	0.1	ml
1% CMC	1.0	ml
TEMED	0.005	ml

ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

f. การเตรียม Polyacrylamide gel 5% (Stacking gel) ปริมาตร 3 ml

Distilled water	2.13	ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.38	ml
30% Bis-acrylamide	0.5	ml
10% APS	0.03	ml
TEMED	0.003	ml

ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

12. การเตรียม 1% ซับสเตรท

Substrate	1	g
Distilled water	100	ml

ละลาย Substrate ในน้ำกลั่น 10 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ก่อนนำไปใช้

13. การเตรียม 5 mM metal ion

- a. Fe^{2+} 0.0279 g
Distilled water 100 ml
ละลาย NH_4Cl ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- b. Fe^{3+} 0.0279 g
Distilled water 100 ml
ละลาย NH_4Cl ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- c. KCl 0.037 g
Distilled water 100 ml
ละลาย KCl ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- d. MgCl_2 0.102 g
Distilled water 100 ml
ละลาย MgCl_2 ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- e. CuSO_4 0.125 g
Distilled water 100 ml
ละลาย CuSO_4 ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- f. NaCl 0.029 g
Distilled water 100 ml
ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- g. CuCl 0.067 g
Distilled water 100 ml
ละลาย CuCl ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- h. FeSO_4 0.139 g
Distilled water 100 ml
ละลาย FeSO_4 ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

- i. MgSO₄ 0.085 g
 Distilled water 100 ml
 ละลาย MgSO₄ ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด
- j. CaCl₂ 0.074 g
 Distilled water 100 ml
 ละลาย CaCl₂ ในน้ำกลั่น 20 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บใส่ขวด

14. การเตรียม 0.8% Agarose gel

Agarose gel 0.8 g
 1x TAE buffer 100 ml

ละลาย agarose gel ใน 1x TAE buffer โดยนำไปอุ่นในโครเวฟให้ agarose gel ละลายทิ้งไว้ให้อุ่นก่อนนำไปใช้

15. การเตรียม 50x TAE buffer

Tris base 242 g
 Glacial acetic acid 57.1 ml
 0.5 M EDTA pH 8 100 ml
 Distilled water 1 L

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันเก็บใส่ขวดใช้เป็น Stock 50x ก่อนนำไปใช้นำ Stock 50x ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำจนครบ 1000 ml จะได้ 1x TAE buffer ปริมาตร 1000 ml

16. การเตรียมสารละลาย 20 mM Sodium citrate buffer ตามวิธีของ Gomori, 1955

สารละลาย A: 20 mM Citric acid ชั่ง Citric acid 4.2 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

สารละลาย B: 20 mM Sodium citrate ชั่ง Sodium citrate 5.88 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
3.0	46.5	3.5
3.2	43.7	6.3
3.4	4.0	10.0
3.6	37.0	13.0
3.8	35.0	15.0
4.0	33.0	17.0
4.2	31.5	18.5
4.4	28.0	22.0
4.6	25.5	24.5
4.8	23.0	27.0
5.0	20.5	29.5
5.2	18.0	32.0
5.4	16.0	34.0
5.6	13.7	36.3
5.8	11.8	38.2
6.0	9.5	40.5
6.2	7.2	42.8

17. การเตรียมสารละลาย 20 mM Sodium phosphate buffer ตามวิธีของ Gomori, 1955

สารละลาย A: 20 mM dibasic sodium phosphate ซึ่ง dibasic sodium phosphate 2.839 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

สารละลาย B: 20 mM monobasic sodium phosphate ซึ่ง monobasic sodium phosphate 2.759 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

18. การเตรียมสารละลาย 20 mM Tris-HCl buffer

สารละลาย A: 20 mM Tris-base ซึ่ง Tris-base 2.428 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

สารละลาย B: Conc.HCl

ผสมสารละลาย A และปรับพีเอชด้วยสารละลาย B (x) ml ตามพีเอชที่ต้องการและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
7.5	50.0	
8.0	50.0	
8.5	50.0	
9.0	50.0	
9.5	50.0	
10.0	50.0	
10.5	50.0	
11.0	50.0	

19. ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์ (primer)	ความเข้มข้น	ปริมาตร
27F primer	10 p/μl	1.0 μl
1492R primer	10 p/ μl	1.0 μl
ดีเอ็นทีพี (dNTP)	2.5 mM	2.0 μl
10X buffer	10 เท่า	2.5 μl
Taq DNA Polymerase	5 U/μl	0.25 μl
น้ำปราศจากไอออน	-	17.25 μl
ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template)	100 – 200 ng/ μl	1.0 μl
รวม		25 μl

20. สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (min)	รอบ
Hot start	94	3	1
Denature	94	1	25
Annealing	50	1	
Extension	72	2	
Final extension	72	3	1

ภาคผนวก ค

การทำ SDS-PAGE

การเตรียม 10% SDS-PAGE

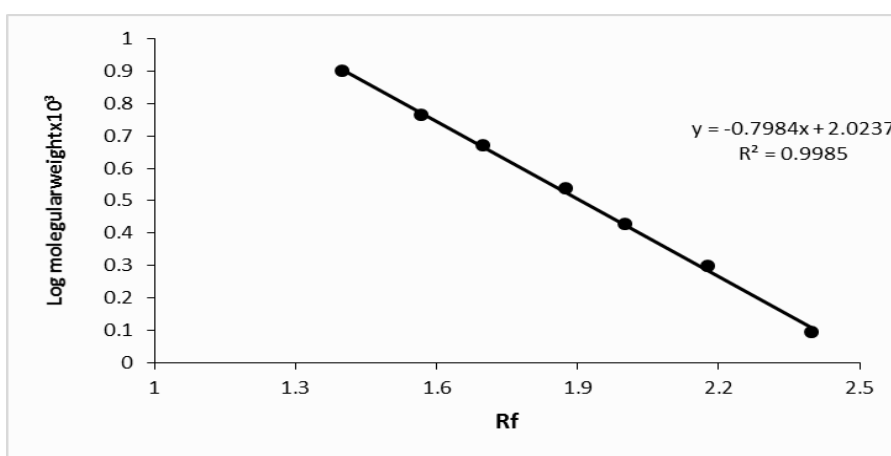
1. ยึดแม่พิมพ์ที่ประกอบด้วยแผ่นกระจกและแผ่นเซรามิกกับแท่นเตรียมเจลให้แน่น โดยมี แผ่นพลาสติกบางขนาดเล็กสอดด้านข้างระหว่างแผ่นกระจกและแผ่นเซรามิก เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับเทเจล
2. ผสม separating gel (ร้อยละ 10) เทลงในแม่พิมพ์ ให้มีพื้นที่ส่วนบนเหลืออยู่ประมาณ 1 นิ้ว ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
3. ผสม stacking gel (ร้อยละ 5) เททับลงบน separating gel ในแม่พิมพ์จนสุดขอบด้านบนของกระจก สอดแผ่นพลาสติกบางที่มีลักษณะเป็นซี่ฟันลงใน stacking gel ที่ยังไม่แข็งตัว เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
4. ถอดแผ่นพลาสติกบางที่มีลักษณะเป็นซี่ฟันออกจากเจล นำเจลรวมทั้งแม่พิมพ์ออกจากแท่นยึด ติดตั้งเข้ากับชุดทดสอบโดยให้ด้านล่างของเจลจุ่มอยู่ใน electrode buffer เติม electrode buffer ลงในช่องว่างระหว่างเจลสองแผ่นจนท่วมผิวด้านบนของเจล

การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน

1. นำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลมาต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาที ปล่อยให้เย็นลงแล้วแบ่งมา 40 μ l ผสมกับสีย้อม bromophenol blue (5x loading sample) ปริมาณ 10 μ l แล้วเติมลงในช่องว่างสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนบริเวณส่วนบนของ stacking gel โดยทำพร้อมกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล
2. ต่อขั้วไฟฟ้าของชุดทดสอบเข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้ากระแสตรง ปรับให้มีความต่างศักย์ 100 โวลต์
3. ปล่อยให้ตัวอย่างโปรตีนเคลื่อนที่ไปภายในเจลจนเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงไปจนสุดขอบล่างของเจล
4. ปิดกระแสไฟฟ้า นำเจลและแม่พิมพ์ออกจากชุดทดสอบ
5. ลอกเนื้อเจลออกจากแม่พิมพ์ จากนั้นย้อมด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250 เป็นเวลา 30 นาที จะติดสีน้ำเงิน
6. จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำแล้วแช่เจลต่อใน Fixation solution ประมาณ 10 นาทีและนำมาแช่ต่อใน Destaining solution จนกระทั่งส่วนที่เป็น background ใส
7. คำนวณหาค่า R_f เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

กราฟมาตรฐานโปรตีนขนาดต่างๆสำหรับ SDS-PAGE

การตรวจสอบขนาดโมเลกุลโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE สามารถคำนวณได้จากค่า R_f (relative migration distance) ซึ่งคำนวณจากการวัดระยะทางจากแถบโปรตีนที่เคลื่อนที่จากหลุมด้านบนลงสู่เจลด้านล่างต่อระยะทางที่ marker dye เคลื่อนที่ จากนั้น plot graph ระหว่าง Log molecular weight กับค่า R_f เพื่อคำนวณหาขนาดโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ปรากฏขึ้น จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง log MW และ R_f จะได้สมการ $y = mx + b$ เมื่อ y คือ log MW, m คือ slope ของกราฟ, x คือ R_f , b คือจุดตัดแกน y



กราฟโปรตีนมาตรฐาน

การทำ NATIVE-PAGE

การเตรียม 10% NATIVE-PAGE

1. ยึดแม่พิมพ์ที่ประกอบด้วยแผ่นกระจกและแผ่นเซรามิกกับแท่นเตรียมเจลให้แน่น โดยมี แผ่นพลาสติกบางขนาดเล็กสอดด้านข้างระหว่างแผ่นกระจกและแผ่นเซรามิก เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับเทเจล
2. ผสม separating gel (ร้อยละ 10) เทลงในแม่พิมพ์ ให้มีพื้นที่ส่วนบนเหลืออยู่ประมาณ 1 นิ้ว ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
3. ผสม stacking gel (ร้อยละ 5) เททับลงบน separating gel ในแม่พิมพ์จนสุดขอบด้านบนของกระจก สอดแผ่นพลาสติกบางที่มีลักษณะเป็นซี่ฟันลงใน stacking gel ที่ยังไม่แข็งตัว เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
4. ถอดแผ่นพลาสติกบางที่มีลักษณะเป็นซี่ฟันออกจากเจล นำเจลรวมทั้งแม่พิมพ์ออกจากแท่นยึด ติดตั้งเข้ากับชุดทดสอบโดยให้ด้านล่างของเจลจุ่มอยู่ใน electrode buffer เติม electrode buffer ลงในช่องว่างระหว่างเจลสองแผ่นจนท่วมผิวด้านบนของเจล

การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน

1. นำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุล ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม bromophenol blue (5x loading sample) ปริมาตร 10 μ l แล้วเติมลงในช่องว่างสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนบริเวณส่วนบนของ stacking gel โดยทำพร้อมกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล
2. ต่อขั้วไฟฟ้าของชุดทดสอบเข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้ากระแสตรง ปรับให้มีความต่างศักย์ 100 โวลต์
3. ปล่อยให้ตัวอย่างโปรตีนเคลื่อนที่ไปภายในเจลจนเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงไปจนสุดขอบล่างของเจล
4. ปิดกระแสไฟฟ้า นำเจลและแม่พิมพ์ออกจากชุดทดสอบ
5. ลอกเนื้อเจลออกจากแม่พิมพ์ จากนั้นย้อมด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250 เป็นเวลา 30 นาที จะติดสีน้ำเงิน
6. จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำแล้วแช่เจลต่อใน Fixation solution ประมาณ 10 นาทีและนำมาแช่ต่อใน Destaining solution จนกระทั่งส่วนที่เป็น background ใส

การวัดประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์

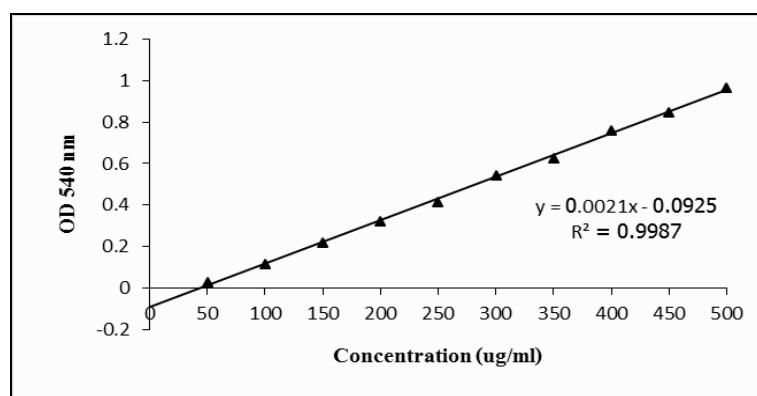
การวัดประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์โดยหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS method (Dinitrosalicylic acid) (Miller *et al*, 1959)

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml ใส่ในหลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลาย 1% CMC ปริมาตร 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติม DNS reagent ปริมาตร 2 ml แล้วต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและแช่ใน
4. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การเตรียมกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายกลูโคสลงในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาดปริมาตร 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 μ l ตามลำดับ จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองดังกล่าวปริมาตร 1000, 990, 980, 970, 960 และ 950 μ l ตามลำดับ ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลองและเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและแช่ในน้ำเย็นทันทีเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา
3. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน



กราฟมาตรฐานกลูโคส (OD 540 nm)

การหาปริมาณโปรตีน

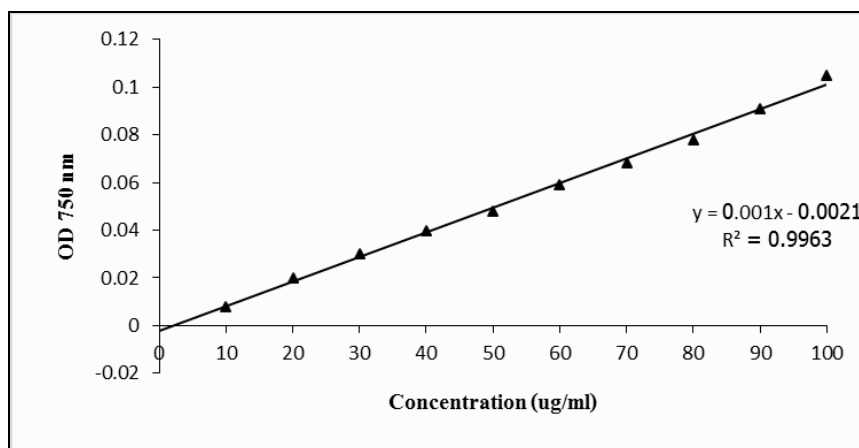
วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry *et. al.*, 1951) และเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin (BSA)

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างปริมาตร 0.4 ml ใส่หลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย A:B (50:1) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. จากนั้นเติมสารละลาย C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.2 ml ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm เปรียบเทียบค่า OD ที่วัดได้กับปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ BSA

การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA

1. ปิเปตสารละลาย BSA ลงในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาดปริมาตร 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 μ l ตามลำดับ จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองดังกล่าวปริมาตร 1000, 990, 980, 970, 960 และ 950 μ l ตามลำดับ ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำไปเติมสารละลาย A:B (50:1) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. เติมสารละลาย C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.2 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน



กราฟมาตรฐาน BSA (OD 750 nm)

การเตรียมคอลัมน์

วิธีเตรียมคอลัมน์ DEAE-Sephacel

1. นำ DEAE-Sephacel ที่แช่ในสารละลาย ethanol มาล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เป็นกลาง โดยกวนให้เจลแขวนลอยแล้วปล่อยให้เจลตกตะกอนที่ก้นภาชนะแล้วค่อยๆเทน้ำออก ทำการล้างซ้ำจนกว่าค่าความเป็นกรด-เบส (pH) จะเป็นกลาง
2. เติมสารละลาย 0.1 N Sodium hydroxide ให้ท่วมเจล กวนให้เจลแขวนลอยแล้วปล่อยให้เจลตกตะกอนที่ก้นภาชนะ แล้วเทสารละลายทิ้ง
3. ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าค่าความเป็นกรด-เบส (pH) จะเป็นกลาง
4. คำนวณปริมาณโปรตีนที่จะใช้ไหลลงคอลัมน์ โดยเจล 1 ml (Bed volume) จะมีประสิทธิภาพในการดูดซับโปรตีน 5 mg
5. จากนั้นเติมน้ำลงในคอลัมน์เท่ากับปริมาตรที่เจลต้องการแล้วเครื่องหมายขีดไว้ ปล่อยให้น้ำออก ใช้แท่งแก้วกวนเจลที่เตรียมไว้ให้แขวนลอยแล้วค่อยๆเทลงไปในคอลัมน์โดยใช้แท่งแก้วเป็นตัวช่วย โดยพยายามทำให้ขอบเจลด้านบนเสมอกัน จากนั้นคลายสายยางด้านล่างเพื่อให้สารละลายไหลลงด้านล่างคอลัมน์
6. ใช้พลาสติกเจอร์ปีเปิดดูจุดเจลลงคอลัมน์จนกว่าจะถึงเส้นที่ขีดไว้และใช้แท่งแก้วกวนให้ขอบเจลด้านบนเสมอกัน ปล่อยให้สารละลายไหลลงด้านล่างโดยให้เหลือไว้ท่วมเจลเพียงเล็กน้อย เพื่อให้เจลแห้ง
7. ปรับสภาพคอลัมน์ให้เหมาะสมต่อการแยกเอนไซม์ โดย DEAE-Sephacel นี้ ทำการปรับสภาพโดยใช้ 20 nM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) เป็นเวลาข้ามคืนก่อนไหลตัวอย่าง

การเตรียมคอลัมน์ CM-52

1. นำ CM-52 ที่แช่ในสารละลาย 0.1 N Hydrochloric acid มาล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เป็นกลาง โดยกวนให้เจลแขวนลอยแล้วปล่อยให้เจลตกตะกอนที่ก้นภาชนะ แล้วค่อยๆ ให้น้ำออก ทำการล้างซ้ำจนกว่าค่าความเป็นกรด-เบส (pH) จะเป็นกลาง
2. เติมสารละลาย 0.1 N Sodium hydroxide ให้ท่วมเจล กวนให้เจลแขวนลอยแล้วปล่อยให้เจลตกตะกอนที่ก้นภาชนะ แล้วเทสารละลายทิ้ง
3. ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าค่าความเป็นกรด-เบส (pH) จะเป็นกลาง
4. เติมสารละลาย 0.1 N Hydrochloric acid แล้วล้างจนกว่าค่าความเป็นกรด-เบส (pH) เป็นกลาง
5. คำนวณปริมาณโปรตีนที่จะใช้ไหลลงคอลัมน์ โดยเจล 1 ml (Bed volume) จะมีประสิทธิภาพในการดูดซับโปรตีน 5 mg
6. จากนั้นเติมน้ำลงในคอลัมน์เท่ากับปริมาตรที่เจลต้องการแล้วเครื่องหมายขีดไว้ ปล่อยให้ น้ำออก ใช้แท่งแก้วกวนเจลที่เตรียมไว้ให้แขวนลอยแล้วค่อยๆ เติมน้ำลงในคอลัมน์โดยใช้แท่งแก้วเป็นตัวช่วย โดยพยายามทำให้ขอบเจลด้านบนเสมอกัน จากนั้นคลายสายยางด้านล่างเพื่อให้สารละลายไหลลงด้านล่างคอลัมน์
7. ใช้พลาสติกเจอร์ปิเปตดูดเจลลงคอลัมน์จนกว่าจะถึงเส้นที่ขีดไว้และใช้แท่งแก้วกวนให้ขอบเจลด้านบนเสมอกัน ปล่อยให้สารละลายไหลลงด้านล่างโดยให้เหลือไว้ท่วมเจลเพียงเล็กน้อย เพื่อให้เจลแห้ง
8. ปรับสภาพคอลัมน์ให้เหมาะสมต่อการแยกเอนไซม์ โดย CM-52 นี้ ทำการปรับสภาพโดยใช้ 20 nM Sodium citrate buffer pH 5.0 เป็นเวลาข้ามคืนก่อนไหลตัวอย่าง

ภาคผนวก ง

ข้อมูลแสดงการคัดเลือกการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ตารางที่ 1. Primary Screening แสดงการเกิดส่วนใสจากการย่อยสลาย CMC ของเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 133 ไอโซเลท บนอาหาร Basal mineral salt agar ที่มี 0.5 % CMC บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

Code	Clear Zone on the plate (mm)			
	I	II	III	Average
RB1.2	34.15	34.25	34.2	34.2
RB1.19	21.8	20.95	21.37	21.37
RB1.21	26.38	26	26.2	26.19
RB1.29	31.35	31.2	31.75	31.43
RB1.31	19.24	19.368	19.3	19.30
RB1.33	26.44	26.55	26.5	26.49
RB1.35	29.45	29.64	29.5	29.53
RB1.36	29.35	29.55	29.45	29.45
RB1.39	28.05	28	28	28.02
RB1.40	29.2	29.25	29.2	29.22
RB1.44	34.3	34.3	34.3	34.3
RB1.71	19.126	19.226	19.2	19.184
RB1.74	29.3	29	29.15	29.15
RB1.75	34.45	34.5	34.47	34.47
RB1.77	27.15	27.2	27.2	27.18
RB1.83	40.9	39.8	40.35	40.35
RB1.91	27.35	27.2	27.25	27.26
RB1.96	23.98	23.9	23.5	23.79
RB1.99	31.8	31.8	31.5	31.7
RB1.100	23.9	23.9	23.9	23.9
RB1.101	16.6	16.67	16.6	16.62
RB1.103	27.9	27.8	27.85	27.85
RB1.106	18.744	18.44	18.6	18.59
RB1.113	42.1	41.2	41.65	41.65
RB2.2	33.32	33.2	33.26	33.26
RB2.5	20.7	20.7	20.7	20.7
RB2.9	24	24.6	24.5	24.36
RB2.13	21.4	21.25	21.32	21.32

ตารางที่ 1. Primary Screening แสดงการเกิดส่วนใสจากการย่อยสลาย CMC ของเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 133 ไอโซเลท บนอาหาร Basal mineral salt agar ที่มี 0.5 % CMC บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ต่อ)

Code	Clear Zone on the plate (mm)			
	I	II	III	Average
RB2.14	24.2	24.25	24.22	24.22
RB2.24	20.5	20.45	20.47	20.47
RB2.31	23.45	23.5	23.47	23.47
RB2.32	4.6	4.75	4.65	4.67
RB2.34	20.2	20.25	20.2	20.22
RB2.37	13.5	13.5	13	13.33
RB2.40	2.45	2.5	2.4	2.45
RB2.42	21.45	21.45	21.5	21.47
RB2.45	17.64	17.88	17.6	17.71
RB2.51	34.3	34.5	34	34.27
RB2.54	19.5	18.98	19.2	19.23
RB2.57	16.56	16.8	16.6	16.65
RB2.66	20.2	20.25	20.22	20.22
RB2.67	21.75	21.6	21.65	21.67
RB2.69	35.4	35.19	35.25	35.28
RB2.72	34.82	34.55	34.7	34.69
RB2.74	17.2	17.25	17.22	17.22
RB2.78	18	18.1	18.05	18.05
RB2.79	36	36.95	37.5	36.82
RB2.80	33.45	33.5	33.47	33.47
RB2.87	24.2	24.2	24.3	24.23
RB2.88	21.3	21.1	21.4	21.27
RB2.90	32.76	32.7	32.73	32.73
RB2.91	31.4	32	31.7	31.7
RB2.94	20	20.25	20.5	20.25
RB2.96	16	16.25	16.2	16.15
RB2.97	20	20.05	20.2	20.08
RB2.98	18.2	18.25	18.22	18.22
RB2.100	13.3	13.3	13.2	13.27
RB2.101	13.25	13.25	13.2	13.23

ตารางที่ 1. Primary Screening แสดงการเกิดส่วนใสจากการย่อยสลาย CMC ของเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 133 ไอโซเลท บนอาหาร Basal mineral salt agar ที่มี 0.5 % CMC บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ต่อ)

Code	Clear Zone on the plate (mm)			
	I	II	III	Average
RB2.112	27.52	27.55	27.5	27.52
RB2.115	20.05	21	20.52	20.52
RB2.142	13.6	13.65	13.5	13.58
RB2.145	16.72	16.7	16.7	16.71
RB2.146	13	13.1	13.25	13.12
RB2.151	20.25	20.25	20.3	20.27
RB2.192	7.25	7.35	7.4	7.33
RB2.196	11	11.2	11.2	11.13
SR1.1	21	21.2	21.2	21.13
SR1.3	19	20.1	20.2	19.76
SR1.4	21	21.3	21.15	21.15
SR1.8	29	29.2	29.5	29.23
SR1.9	21.2	21.2	21.5	21.3
SR1.15	13.5	13.2	13.35	13.35
SR1.21	30.55	31	30.77	30.77
SR1.22	20.2	20.25	20.22	20.22
SR1.23	26.33	26.5	26.4	26.41
SR1.27	16.8	17	16.5	16.77
SR1.46	4	4.4	4.5	4.3
SR1.51	17.45	17.5	17.4	17.45
SR1.52	20.3	20.3	20.5	20.37
SR1.55	9.5	9.6	9.2	9.43
SR1.61	15.6	15.85	15.75	15.73
SR2.11	23.4	23.6	23.5	23.5
SR2.75	38.52	39.825	29.17	35.84
SR2.79	38.2	39.85	39.7	39.25
SR2.135	23.75	24.1	23.9	23.92
SR2.152	35.54	38.3	36.9	36.92
SR2.168	29.45	29.8	29.62	29.62
SR3.17	26.5	26	26.25	26.25

ตารางที่ 1. Primary Screening แสดงการเกิดส่วนใสจากการย่อยสลาย CMC ของเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 133 ไอโซเลท บนอาหาร Basal mineral salt agar ที่มี 0.5 % CMC บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ต่อ)

Code	Clear Zone on the plate (mm)			
	I	II	III	Average
SR3.61	27.55	27.5	27.52	27.52
SR3.82	25	25.45	25.22	25.22
SR3.102	23.45	23.4	23.42	23.42
SR3.103	25.68	25.6	25.64	25.64
SR3.123	22.55	22.58	22.565	22.565
SR3.129	20.95	20.9	20.9	20.92
SR3.137	25.48	25.45	25.46	25.46
SR3.138	27.58	27.58	27.58	27.58
SR3.140	23.75	23.7	23.72	23.72
SR3.142	34.45	34.5	34.47	34.47
SR4.1	28.5	28.55	28.5	28.52
SR4.4	6.7	6.75	6.72	6.72
SR4.9	18.3	18.15	18.22	18.22
SR4.16	26.7	26.78	26.74	26.74
SR4.27	31.5	31.55	31.4	31.48
SR4.35	9.55	9.6	9.58	9.577
SR4.38	29.05	29	29.02	29.02
SR4.63	28.2	28.2	28.2	28.2
SR4.64	16.3	16.3	16.3	16.3
SR4.72	21.48	21.4	21.45	21.44
SR4.101	25.4	25.5	25.45	25.45
SP4	37.48	37.2	37.35	37.34
SP12	25.74	25.75	25.74	25.74
SP16	35.42	36.32	35.87	35.87
SP17	25.4	25.55	25.47	25.47
SP20	36.48	34.25	35.36	35.36
SP24	35.98	34.05	35.15	35.06
SP32	34.98	34.9	34.95	34.94
SP33	12.22	12	12.15	12.12

ตารางที่ 1. Primary Screening แสดงการเกิดส่วนใสจากการย่อยสลาย CMC ของเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 133 ไอโซเลท บนอาหาร Basal mineral salt agar ที่มี 0.5 % CMC บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ต่อ)

Code	Clear Zone on the plate (mm)			
	I	II	III	Average
SP35	34.52	35	34.7	34.74
SP36	36.64	34.825	35.73	35.73
SP37	34.8	35	34.9	34.9
SP39	34.88	34.9	34.8	34.86
SP40	34.2	34.5	34.35	34.35
SP42	36.8	34.05	35.42	35.42
SP43	35.3	35.09	35.2	35.19
SP45	34.48	34	34.24	34.24
SP47	33.28	33.25	33.26	33.26
SP52	35.4	34.777	35.06	35.079
SP77	30.4	31	30.75	30.72
SP99	31.4	31.5	31.45	31.45
SP109	19.45	19.4	19.42	19.42
SP139	32.05	32.1	32.05	32.07
SP142	21.98	22	21.95	21.98
SP146	23.6	23.8	23.7	23.7

หมายเหตุ RB = Ratchaburi
SR = Sagaerat
SP = Samutprakarn

ตารางที่ 2. Primary Screening เชื้อที่ไม่แสดงการเกิดส่วนใสจากการย่อยสลาย CMC ของเชื้อ
 แอคติโนมัยสีท จำนวน 87 ไอโซเลท บนอาหาร Basal mineral salt agar ที่มี
 0.5 % CMC บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

Code	Code	Code	Code
RB2.19	SR2.93	SR3.131	SP2
RB2.23	SR3.17	SR3.134	SP3
RB2.25	SR3.50	SR3.135	SP5
RB2.33	SR3.57	SR4.6	SP9
RB2.42	SR3.58	SR4.15	SP11
RB2.44	SR3.64	SR4.22	SP14
RB2.56	SR3.65	SR4.24	SP15
RB2.77	SR3.84	SR4.41	SP18
RB2.78	SR3.87	SR4.47	SP25
RB2.89	SR3.88	SR4.52	SP26
RB2.92	SR3.97	SR4.53	SP29
RB2.103	SR3.99	SR4.56	SP34
RB3.66	SR3.105	SR4.71	SP38
SR1.5	SR3.106	SR4.73	SP41
SR1.20	SR3.108	SR4.74	SP44
SR1.25	SR3.109	SR4.75	SP50
SR1.31	SR3.111	SR4.92	SP54
SR1.35	SR3.112	SR4.95	SP68
SR1.38	SR3.118	SR4.97	SP81
SR1.43	SR3.120	SR4.98	SP82
SR1.58	SR3.121	SR4.100	SP84
SR2.80	SR3.125	SP1	

ตารางที่ 3. Secondary Screening แสดงการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากเชื้อแอสคิโนมัยสีท จำนวน 15 ไอโซเลท โดยวิธี DNS method

Code	OD 540 nm			Reducing sugar (ug/ml)				Enzyme Activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
RB1.83	0.563	0.677	0.640	225.300	270.940	256.100	250.780	0.697
RB1.113	0.467	0.423	0.443	186.700	169.260	177.100	177.687	0.494
RB2.69	0.622	0.788	0.7247	248.700	314.980	289.840	284.507	0.790
RB2.79	0.282	0.361	0.343	112.740	144.460	136.980	131.394	0.365
SR2.75	0.246	0.247	0.242	98.340	98.580	96.780	97.900	0.272
SR2.79	0.335	0.366	0.333	134.060	146.300	133.180	137.847	0.383
SR2.152	0.378	0.320	0.358	150.980	128.060	143.180	140.740	0.391
SP4	0.652	0.687	0.684	260.660	274.860	273.580	269.700	0.749
SP16	0.503	0.365	0.482	201.020	146.060	192.780	179.954	0.499
SP20	0.544	0.542	0.562	217.500	216.780	224.780	219.687	0.610
SP24	0.677	0.502	0.562	270.780	200.660	224.940	232.127	0.645
SP36	0.374	0.507	0.420	149.460	202.620	168.060	173.380	0.482
SP42	0.529	0.541	0.530	211.620	216.380	212.020	213.340	0.593
SP43	0.503	0.436	0.468	201.260	174.180	187.260	187.567	0.521
SP52	0.481	0.499	0.489	192.180	199.940	195.660	195.927	0.544

ข้อมูลแสดงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
ของเชื้อแอกติโนมัยสีทไฮโซเลทรหัส SP4

ตารางที่ 4. แสดงการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากเชื้อแอกติโนมัยสีทไฮโซเลทรหัส SP4 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน

อุณหภูมิ (°C)	OD 540 nm			Reducing sugar (ug/ml)				Enzyme Activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
25	0.121	0.142	0.123	41.672	49.121	42.362	44.385	0.247
30	0.529	0.562	0.551	182.465	193.983	190.121	188.856	1.049
37	0.859	0.727	0.668	296.397	250.776	230.328	259.166	1.440
45	0.171	0.152	0.163	58.983	52.603	56.121	55.902	0.311
60	0.022	0.017	0.018	7.776	5.776	6.362	6.637	0.037

ตารางที่ 5. แสดงการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากเชื้อแอสคิโนมัยซีทไฮโซเลทรหัส SP4 ที่ pH ต่าง ๆ ที่อัตราความเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน

pH	OD 540 nm			Reducing sugar (ug/ml)				Enzyme Activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
4.8	0.415	0.417	0.408	148.261	149.047	145.833	147.713	0.821
6	0.909	0.913	0.911	324.476	325.904	325.511	325.297	1.807
7	0.386	0.388	0.391	137.940	138.690	139.547	138.726	0.771
8	0.164	0.159	0.161	58.726	56.726	57.618	57.689	0.320
9	0.063	0.065	0.064	22.511	23.118	22.726	22.785	0.126
10	0.022	0.018	0.018	7.7256	6.440	6.440	6.868	0.038
11	0.018	0.016	0.014	6.297	5.583	5.011	5.630	0.031

ตารางที่ 6. แสดงการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากเชื้อแอสคิโนมัสทีทไฮโซเลทรหัส SP4 ที่เวลาต่าง ๆ ที่อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน

วัน	OD 540 nm			Reducing sugar (ug/ml)				Enzyme Activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
0	0.0013	0.0002	0.0007	0.4727	0.0934	0.2658	0.2774	0.002
1	0.591	0.588	0.586	203.990	202.611	201.956	202.852	1.127
3	1.064	1.065	1.062	366.783	367.231	366.093	366.703	2.037
5	1.125	1.179	1.204	387.887	406.507	415.093	403.162	2.239
7	1.284	1.352	1.347	442.818	466.197	464.473	457.829	2.543
9	0.946	0.993	1.062	326.231	342.404	366.093	344.910	1.916

ข้อมูลแสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไนเซอร์ SP4

ตารางที่ 7. Culture supernatant

OD 750 nm			Protein ($\mu\text{g/ml}$)				Protein (mg/ml)
I	II	III	I	II	III	Average	
0.161	0.169	0.165	73.168	76.805	74.986	74.986	0.075
OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme Activity (U/ml)
I	II	III	I	II	III	Average (2x)	
0.51	0.491	0.472	187.064	181.879	174.842	362.524	4.028

ตารางที่ 8. Evaporation of Culture supernatant

OD 750 nm			Protein ($\mu\text{g/ml}$)				Protein (mg/ml)
I	II	III	I	II	III	Average (5x)	
0.096	0.097	0.092	96.002	97.002	92.002	475.011	0.475
OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme Activity (U/ml)
I	II	III	I	II	III	Average (6x)	
0.992	0.996	0.995	472.473	474.378	473.902	2841.507	63.145

ตารางที่ 9. DEAE-Sephacel column chromatography

OD 570 nm			protein ($\mu\text{g/ml}$)				Protein (mg/ml)
I	II	III	I	II	III	Average (3x)	
0.075	0.075	0.071	75.002	75.002	71.002	221.006	0.221
OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme Activity (U/ml)
I	II	III	I	II	III	Average (6x)	
0.512	0.493	0.497	243.90	234.85	236.759	1431.03	31.801

ตารางที่ 10. CM-52 column chromatography

OD 750 nm			protein ($\mu\text{g/ml}$)				Protein (mg/ml)
I	II	III	I	II	III	Average (3x)	
0.07	0.065	0.067	74.002	65.002	67.002	206.006	0.206
OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme Activity (U/ml)
I	II	III	I	II	III	Average (4x)	
0.84	0.879	0.874	400.093	418.664	416.283	1646.71	36.594

ตารางที่ 11. แสดงค่าโปรตีนที่ 280 nm ของ DEAE-Sepacel column chromatography

Tube	OD	Tube	OD
1	-0.008	34	0.606
2	-0.014	35	0.558
3	-0.014	36	0.524
4	-0.015	37	0.485
5	-0.013	38	0.445
6	-0.011	39	0.438
7	-0.005	40	0.434
8	0.01	41	0.252
9	0.182	42	0.14
10	0.389	43	0.057
11	1.242	44	0.037
12	1.574	45	0.028
13	1.586	46	0.011
14	1.617	47	0.007
15	1.68	48	0.003
16	1.738	49	0.001
17	1.784	50	0
18	1.828	51	0.007
19	1.869	52	0
20	1.904	53	-0.002
21	1.946	54	-0.008
22	1.929	55	-0.007
23	1.541	56	-0.007
24	1.198	57	-0.012
25	1.02	58	-0.009
26	0.91	59	-0.004
27	0.81	60	-0.01
28	0.742	61	-0.009
29	0.7	62	-0.013
30	0.684	63	-0.014
31	0.679	64	-0.013
32	0.671	65	-0.009
33	0.648	66	-0.007

ตารางที่ 11. แสดงค่าโปรตีนที่ 280 nm ของ DEAE-Sephacel column chromatography (ต่อ)

Tube	OD	Tube	OD
67	-0.008	79	0.032
68	0.035	80	0.033
69	0	81	0.035
70	0.001	82	0.03
71	0.081	83	0.034
72	0.163	84	0.034
73	0.139	85	0.035
74	0.023	86	0.035
75	0.023	87	0.038
76	0.025	88	0.035
77	0.028	89	0.03
78	0.03		

ตารางที่ 12. แสดงค่าการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 540 nm ของ DEAE-Sephadex column chromatography

Tube	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
1	-0.003	-0.003	-0.003	-1.341	-1.341	-1.341	-1.341	-0.075
3	-0.003	-0.006	-0.004	-1.341	-2.705	-1.796	-1.947	-0.108
5	-0.003	-0.007	-0.002	-1.341	-3.159	-0.887	-1.796	-0.099
7	0.006	0.001	0.008	2.750	0.477	3.65936	2.296	0.128
9	0.049	0.041	0.039	22.295	18.659	17.750	19.568	1.087
11	0.184	0.169	0.174	83.659	76.841	79.113	798.708	17.749
13	0.247	0.218	0.207	112.295	99.113	94.113	1018.41	22.631
15	0.252	0.213	0.222	114.568	96.841	100.931	1041.13	23.136
17	0.229	0.232	0.226	104.1133	105.4769	102.749	1041.133	23.136
19	0.261	0.225	0.232	118.658	102.295	105.477	1088.103	24.180
21	0.228	0.239	0.238	103.659	108.659	108.204	1068.406	23.742
23	0.204	0.18	0.173	92.7497	81.841	78.659	844.163	18.759
25	0.118	0.119	0.112	53.659	54.113	50.931	529.012	11.756
27	0.12	0.092	0.101	54.568	41.841	45.931	474.466	10.547
29	0.126	0.103	0.117	57.295	46.841	53.204	524.466	11.655
31	0.143	0.147	0.142	65.022	66.841	64.568	654.769	14.550
33	0.163	0.135	0.151	74.113	61.386	68.659	680.527	15.123

ตารางที่ 12. แสดงค่าการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 540 nm ของ DEAE-Sephadex column chromatography (ต่อ)

Tube	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
35	0.139	0.128	0.138	63.204	58.204	62.750	613.860	13.641
37	0.094	0.114	0.132	42.750	51.841	60.0224	515.376	11.453
39	0.239	0.217	0.22	108.659	98.659	100.022	1024.466	22.766
41	0.11	0.096	0.083	50.0224	43.659	37.750	438.103	9.736
43	0.22	0.12	0.12	100.0224	54.568	54.568	69.719	3.873
45	0.009	0.004	0.003	4.113	1.841	1.386	2.447	0.136
47	0.024	0	0.002	10.931	0.022	0.931	3.962	0.220
49	0	0.007	0.002	0.0224	3.204	0.931	1.386	0.077
51	0	0.001	0.013	0.0224	0.477	5.931	2.144	0.119
53	0	-0.003	-0.002	0.0224	-1.341	-0.887	-0.735	-0.041
55	0.006	0.014	0.004	2.750	6.386	1.841	3.659	0.203
57	0.006	0.005	0.004	2.750	2.295	1.84	2.295	0.127
59	0.002	0.002	0.002	0.931	0.931	0.931	0.931	0.052
61	-0.006	-0.001	-0.005	-2.705	-0.432	-2.250	-1.796	-0.099
63	-0.009	-0.006	-0.002	-4.069	-2.705	-0.887	-2.553	-0.142
65	-0.001	-0.002	-0.004	-0.432	-0.887	-1.795	-1.038	-0.058
67	0.014	0.017	0.006	6.386	7.750	2.750	5.629	0.313

ตารางที่ 12. แสดงค่าการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 540 nm ของ DEAE-Sephadex column chromatography (ต่อ)

Tube	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
69	0.035	0.047	0.049	15.9315	21.386	22.295	19.871	1.104
71	0.09	0.089	0.093	40.931	40.477	42.295	41.235	2.291
73	0.019	0.029	0.092	8.659	13.204	41.841	21.235	1.180
75	0.042	0.082	0.045	19.113	37.295	20.477	25.628	1.424
77	0.093	0.096	0.096	42.295	43.659	43.659	43.204	2.400
79	0.023	0.017	0.018	10.477	7.750	8.204	8.810	0.489
81	-0.001	-0.001	0	-0.432	-0.432	0.0224	-0.281	-0.0156
83	-0.005	-0.004	0	-2.250	-1.796	0.0224	-1.341	-0.074
85	-0.001	-0.002	-0.003	-0.432	-0.887	-1.341	-0.887	-0.049
87	-0.001	-0.003	-0.003	-0.432	-1.341	-1.341	-1.038	-0.0577
89	0.004	0.003	0.002	1.841	1.386	0.931	1.386	0.077

หมายเหตุ หลอดที่ 11-41 เจือจาง 10 เท่า

ตารางที่ 13. แสดงค่าโปรตีนที่ 280 nm ของ CM-52 column chromatography

Tube	OD	Tube	OD
1	0.138	34	0.078
2	0.156	35	0.073
3	0.114	36	0.07
4	0.215	37	0.066
5	0.434	38	0.065
6	0.682	39	0.07
7	1.208	40	0.068
8	1.465	41	0.065
9	1.428	42	0.063
10	1.224	43	0.06
11	0.849	44	0.058
12	0.269	45	0.114
13	0.145	46	0.089
14	0.105	47	0.09
15	0.092	48	0.074
16	0.085	49	0.061
17	0.081	50	0.059
18	0.081	51	0.055
19	0.078	52	0.053
20	0.065	53	0.052
21	0.067	54	0.055
22	0.064	55	0.055
23	0.061	56	0.057
24	0.059	57	0.073
25	0.059	58	0.054
26	0.066	59	0.056
27	0.171	60	0.055
28	0.1	61	0.055
29	0.106	62	0.057
30	0.136	63	0.068
31	0.118	64	0.057
32	0.095	65	0.056
33	0.085		

ตารางที่ 14. แสดงค่าการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 540 nm ของ CM-52 column chromatography

Tube	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
1	0.016	0.02	0.015	6.986	8.725	6.551	7.42	0.329
3	0.016	0.038	0.039	6.986	16.551	16.986	13.508	0.600
5	0.357	0.358	0.361	155.247	155.682	156.985	155.971	6.932
7	0.62	0.641	0.651	269.595	278.725	283.073	554.262	24.634
9	0.694	0.639	0.702	301.769	277.855	305.247	589.914	26.218
11	0.14	0.11	0.108	60.899	47.855	46.986	103.827	4.615
13	0.021	0.016	0.03	9.1598	6.986	13.073	9.739	0.433
15	0.018	0.016	0.018	7.8555	6.986	7.855	7.566	0.336
17	0.042	0.053	0.022	18.290	23.073	9.595	16.986	0.755
19	0.022	0.023	0.018	9.595	10.0294	7.855	9.159	0.407
21	0.013	0.012	0.01	5.682	5.247	4.377	5.102	0.227
23	0.01	0.011	0.01	4.377	4.8120	4.3772	4.522	0.201
25	0.009	0.008	0.009	3.942	3.508	3.942	3.798	0.1688
27	0.007	0.011	0.011	3.072	4.812	4.812	4.232	0.188
29	0.023	0.011	0.011	10.029	4.812	4.8120	6.551	0.291
31	0.009	0.007	0.007	3.942	3.073	3.073	3.363	0.149
33	0.025	0.028	0.0025	10.899	12.203	1.116	8.073	0.359
35	0.008	0.007	0.007	3.5077	3.0729	3.0729	3.218	0.143

ตารางที่ 14. แสดงค่าการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 540 nm ของ CM-52 column chromatography (ต่อ)

Tube	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)
	I	II	III	I	II	III	Average	
37	0.006	0.005	0.006	2.638	2.2033	2.638	2.493	0.111
39	0.007	0.006	0.007	3.073	2.638	3.073	2.928	0.130
41	0.043	0.044	0.038	18.725	19.160	16.551	18.145	0.806
41	0.033	0.038	0.036	14.377	16.551	15.682	15.537	0.691
43	0.04	0.043	0.04	17.421	18.725	17.421	17.855	0.794
45	0.041	0.039	0.041	17.855	16.986	17.855	17.566	0.781
47	0.039	0.037	0.04	16.986	16.116	17.421	16.841	0.748
49	0.042	0.041	0.04	18.290	17.855	17.420	17.855	0.794
51	0.043	0.041	0.047	18.725	17.855	20.464	19.015	0.845
53	0.042	0.05	0.044	18.290	21.769	19.160	19.740	0.877
55	0.041	0.042	0.041	17.855	18.290	17.855	18.000	0.800
57	0.036	0.046	0.039	15.682	20.0294	16.986	17.566	0.781
59	0.005	0.005	0	2.203	2.203	0.0294	1.479	0.066
61	0	0.003	0	0.0294	1.334	0.0294	0.464	0.021
63	0.004	0.002	0.004	1.769	0.899	1.769	1.479	0.066
65	0.016	0.02	0.015	6.986	8.725	6.551	7.421	0.330

หมายเหตุ หลอดที่ 7-11 เจือจาง 2 เท่า

ข้อมูลแสดงการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

ตารางที่ 15. แสดงค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

pH	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
	I	II	III	I	II	III	Average (4x)		
3	0.683	0.681	0.668	166.661	166.174	163.003	661.117	14.691	95.851
4	0.645	0.626	0.759	157.393	152.759	185.198	660.467	14.677	95.756
5	0.739	0.567	0.742	180.319	138.369	181.052	666.320	14.807	96.605
6	0.662	0.662	0.665	161.539	161.539	162.271	647.133	14.381	93.823
7	0.641	0.689	0.637	156.478	168.125	155.442	639.979	14.222	92.786
8	0.649	0.741	0.73	158.369	180.808	178.125	689.735	15.327	100
9	0.58	0.588	0.583	141.539	143.491	142.271	569.735	12.661	82.602
10	0.456	0.462	0.461	111.296	112.759	112.515	448.759	9.972	65.063
11	0.43	0.458	0.486	104.954	111.783	118.613	447.133	9.936	64.827

ตารางที่ 16. แสดงค่าความเสถียรของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนที่ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ต่างๆ

pH	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
	I	II	III	I	II	III	Average (4x)		
3	0.707	0.718	0.737	172.515	175.198	179.832	703.393	15.631	98.722
4	0.728	0.719	0.694	177.637	175.442	169.344	696.564	15.479	97.764
5	0.685	0.564	0.706	167.149	137.637	172.271	636.076	14.135	89.274
6	0.692	0.705	0.645	168.856	172.027	157.393	664.369	14.764	93.245
7	0.618	0.697	0.699	150.808	170.076	170.564	655.263	14.561	91.967
8	0.711	0.768	0.711	173.491	187.393	173.491	712.499	15.833	100
9	0.478	0.49	0.49	116.661	119.588	119.588	474.450	10.543	66.590
10	0.505	0.486	0.495	123.247	118.613	120.808	483.556	10.746	67.868
11	0.508	0.501	0.503	123.978	122.271	122.759	492.011	10.934	69.054

ตารางที่ 17. แสดงค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

อุณหภูมิ (°C)	OD 540 nm			Reducing sugar (µg/ml)				Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
	I	II	III	I	II	III	Average (4x)		
20	0.758	0.687	0.58	184.954	167.637	141.539	658.841	14.641	98.016
30	0.542	0.81	0.539	132.271	197.637	131.539	615.263	13.673	91.533
40	0.807	0.607	0.615	196.905	148.125	150.076	660.141	14.669	98.210
50	0.63	0.617	0.603	153.735	150.564	147.149	601.930	13.376	89.550
60	0.652	0.696	0.579	159.100	169.832	141.296	626.971	13.933	93.275
70	0.751	0.768	0.547	183.247	187.393	133.491	672.174	14.937	100
80	0.667	0.493	0.515	162.759	120.319	125.686	545.019	12.112	81.083
90	0.545	0.559	0.578	133.003	136.417	141.052	547.296	12.162	81.422

ตารางที่ 18. แสดงค่าความเสถียรของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	OD 540 nm			Reducing sugar (µg/ml)				Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
	I	II	III	I	II	III	Average (4x)		
20	0.579	0.51	0.512	141.296	124.466	124.954	520.954	9.647	88.361
30	0.555	0.556	0.559	135.442	135.686	136.418	543.393	10.063	92.167
40	0.568	0.559	0.559	138.613	136.417	136.417	548.597	10.159	93.050
50	0.588	0.546	0.578	143.491	133.247	141.052	557.052	10.316	94.484
60	0.58	0.588	0.644	141.539	143.491	157.149	589.572	10.918	100
70	0.611	0.43	0.423	149.100	104.954	103.247	476.402	8.822	80.805
80	0.505	0.461	0.417	123.247	112.515	101.783	450.060	8.334	76.337
90	0.53	0.475	0.465	129.344	115.929	113.491	478.353	8.858	81.136

ตารางที่ 19. แสดงค่าการเติมโลหะหนักในเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

Substrate	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
	I	II	III	I	II	III	Average (4x)		
Control	0.432	0.473	0.465	105.442	115.373	113.491	445.741	9.905	100
KCl	0.308	0.289	0.31	75.198	70.495	75.686	295.172	6.559	66.221
MgCl ₂	0.316	0.35	0.364	77.149	85.373	88.856	335.172	7.448	75.194
CaCl ₂	0.296	0.3	0.299	72.271	73.178	73.0028	291.269	6.473	65.345
NaCl ₂	0.329	0.359	0.295	80.319	87.5686	72.027	319.888	7.109	71.765
FeSO ₄	0.495	0.494	0.497	120.808	120.495	121.296	483.465	10.744	108.463
MgSO ₄	0.335	0.303	0.352	81.783	73.910	85.929	322.164	7.159	72.276
CuSO ₄	0.379	0.392	0.352	92.515	95.617	85.929	365.416	8.120	81.979
MnSO ₄	1.111	1.166	1.043	271.051	284.397	254.466	1079.88	23.998	242.268
Fe ³⁺	0.399	0.437	0.403	97.3930	106.593	98.369	403.139	8.959	90.443
Fe ²⁺	0.293	0.355	0.355	71.539	86.593	86.661	326.392	7.253	73.224

ตารางที่ 20. แสดงค่าการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลส

Substrate	OD 540 nm			Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)				Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
	I	II	III	I	II	III	Average (3x)		
CMC	0.808	0.833	0.829	244.893	252.469	251.257	748.619	8.318	100
AVECEL	0.715	0.868	0.749	216.711	263.075	227.014	706.801	7.853	94.414
ซีลื้อย	0.584	0.602	0.651	177.014	182.469	197.317	556.801	60187	74.377
ฟางข้าว	0.752	0.833	0.814	227.974	252.469	246.711	727.104	8.079	97.126
ชานอ้อย	0.732	0.758	0.723	221.863	229.742	219.136	670.740	7.453	89.597
ทะลายปาล์ม	0.326	0.384	0.328	98.833	116.408	99.439	314.680	3.496	42.0347

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	จีรารวรรณ ศีลภัย		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5610220117		
วุฒิการศึกษา			
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา	
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยรังสิต	2555	
(การแพทย์แผนตะวันออก)			

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

จีรารวรรณ ศีลภัย, ดวงทิพย์ มุลมั่งมี, วิไลลักษณ์ สุวะโซโน, สมพร มุลมั่งมี. 2559. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยสีท. งานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 1 “การพัฒนางานวิจัย เพื่อรับใช้สังคม”. มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี, 27 พฤษภาคม 2559. หน้า 607-618.