

การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย ที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว

Purification and Characterization of Bacterial Cellulase from Cow's Rumen

รัชรา กาละวงศ์ (Ratchara Kalawong)^{1*} กันตา แสงวิจิตร (Kanta Sangwijit)**

มาโมรุ วากายามา (Mamoru Wagayama)*** สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย (Somboon Anantalabhochai)****

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว พบแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลต โดยไอโซเลต B4 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เมื่อแบ่งบอกสายพันธุ์จุลินทรีย์นี้ โดยวิธี 16s rDNA sequencing พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากที่สุด (>99%) เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยไอโซเลต B4 ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ DEAD Toyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M และ SuperQ-650 ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 4.70 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 67.2 เท่า น้ำหนักของโมเลกุลเอนไซม์มีค่าประมาณ 35 KDa และทำงานได้ที่อุณหภูมิ 60 °C และพีเอช 6.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 °C พีเอช 5.0 โดย Mn^{2+} และ Fe^{3+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนี้ด้านความจำเพาะต่อสารตั้งต้น เอนไซม์บริสุทธิ์มีความสามารถในการย่อย CMC และของเหลือใช้ทางการเกษตรได้

ABSTRACT

Cellulase producing bacteria were isolated from cow's rumen fluid. Among twenty isolates, strain B4 showed the highest cellulolytic activity. Analysis of a 16S rDNA sequence showed the highest homology with *Bacillus subtilis* (>99%). The cellulase which produced by isolated B4 was purified by ammonium sulfate precipitation, DEADToyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M and SuperQ-650 column, respectively. The purified enzyme had a specific activity of 4.70 U/mg protein, with a purification fold of 67.2. The enzyme presented a single band with apparent molecular weight of 35 KDa and exhibited its optimum activity at 60 °C and pH 6.0. It was stable at 50 °C and pH 5.0. The purified cellulase was activated

¹ Correspondent author: smilekalawong@gmail.com

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** นักวิทยาศาสตร์ หน่วยเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยพะเยา

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะชีววิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรัตนโกสินทร์

**** รองศาสตราจารย์ ผู้เชี่ยวชาญพิเศษ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

by Mn^{2+} and Fe^{3+} . Therefore substrate specificity indicated that the purified enzyme was able to hydrolyzed CMC and agricultural waste.

คำสำคัญ : เซลลูเลส การทำให้บริสุทธิ์ แบคทีเรียกระเพาะหมักของวัว

Key Words : Cellulase, Enzyme purification, Cow's rumen bacteria

บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุด ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ในที่ผนังเซลล์ของพืช ในด้านโครงสร้างทางเคมีเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1000 – 10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า 1-4 กลโคซิดิก (β (1-4) glycosidic linkages) [1] ในธรรมชาติ โครงสร้างของเซลลูโลสนั้นสามารถถูกย่อยได้ด้วย เอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลส (cellulase) ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด เช่น ฟังไจ แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท แต่มีการนำแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์มากที่สุด เนื่องจากเจริญง่าย, มีเวลาในการแบ่งตัวที่สั้น, อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาไม่แพง และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี [2] เอนไซม์เซลลูเลสจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะทางด้านการค้า ไม่ว่าจะเป็น การผลิตกระดาษ, เส้นใย, ซักล้าง, อาหารสัตว์ รวมไปถึงการผลิตไบโอเอทานอล [3] ปัจจุบันของเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ชังข้าว ตันข้าวโพด หญ้า ฯลฯ ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้โดยอาศัยหลักการย่อยสลายองค์ประกอบเหล่านี้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อเกิดปฏิกิริการย่อยแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว [4] น้ำตาลที่ได้นั้นสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์ ถ้าหากแบคทีเรียมีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มาก ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

ในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องอาหารที่สัตว์กินจะถูกเคี้ยวอย่างหยาบๆ และกลืนลงไปกับน้ำลายผ่านหลอดอาหารเข้าไปในกระเพาะหมัก (rumen) ซึ่งเป็นกระเพาะหมักขนาดใหญ่และเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ช่วยย่อยอาหาร [5] โดยกลุ่มของแบคทีเรียจะทำหน้าที่หลักในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายเส้นใยของพืชอาหาร เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเพกติน (pectin) เป็นต้น [6] การนำแบคทีเรียในกระเพาะหมักของวัวมาศึกษาลักษณะจำเพาะของเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ รวมไปถึงการผลิตไบโอเอทานอลจึงเป็นที่น่าสนใจ

การศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยเซลลูโลสนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้เทคนิคในการแยก (isolation) ทำบริสุทธิ์ (purification) และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ (characterization) งานวิจัยเกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลส นั้น มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ซึ่งเทคนิคส่วนใหญ่ที่ถูกนำมาใช้ จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารแต่ละตัวที่ต้องการแยก เช่น ขนาดของโปรตีน, ประจุ, ความสามารถในการเกาะกับสารชีวโมเลกุล เป็นต้น การศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* YJ1 สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) และเจลฟิวเทชัน (gel filtration) [7] เช่นเดียวกับการทดลองของ Arifin และคณะที่ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 [8] นอกจากนี้ยังมีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ เซลลูเลสที่ผลิต

จากเชื้อ *Bacillus strain* CH43 และ HR68 โดย
ใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, เจลฟิว
เทชั่น, โครมาโตกราฟีแบบไอโซอิเล็กโตร (iso-electric focusing chromatography)
และ SDS PAGE [2]

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการคัดแยกแบคทีเรีย
จากกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีประสิทธิภาพ
ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลัก
ที่สำคัญในการย่อยเซลลูโลส รวมไปถึงการทำบริสุทธิ์
และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลส
เพื่อนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระเพาะหมักของวัว
2. เพื่อทำบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะสมบัติและสภาวะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกระเพาะหมักของวัว

วิธีการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากของ เหลวในกระเพาะหมักของวัว

นำของเหลวจากกระเพาะหมักของวัว ที่ได้รับจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเจือจางโดยวิธี 10 fold dilution จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC (carboxymethyl cellulose) แบบแข็ง [9] บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะพื้นฐานวิทยาที่แตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate เลือกเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมา spot plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี congo red plate assay [10] แล้ววัดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิด

การย่อยสลายซึบสเตรทโดยเอนไซม์เซลลูเลส

การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีหาลำดับเบสของ 16S rDNA

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่แยกได้ [11] เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้วยวิธี dideoxynucleotide chain termination method [12] โดยบริษัท First BASE, Malaysia แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

การเก็บเกี่ยวเอนไซม์

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว ที่ประกอบไปด้วย 0.1% CMC, 0.1% K_2HPO_4 , 0.5% polypepton, 0.5% yeast extract และ 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ crude enzyme โดยปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 6,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนหรือ crude enzyme เก็บไว้

การวัดประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์

วัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยบ่มเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรกับ 1% CMC ใน 50 mM citrate buffer (pH 4.8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติม dinitro-salicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 40% sodium-potassium tartate ปริมาตร 200 ไมโครลิตรนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร [13]

การหาปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry [14] และเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin (BSA)

การทำเอนไซม์บริสุทธิ์

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตกตะกอนโปรตีนจาก crude enzyme โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 70, 80 และ 90 % ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวโปรตีนโดยปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 50 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วไดอะไลซิส (dialysis) สารละลายที่ได้ใน 50mM Tris-HCl pH 9.0

การแยกเอนไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) โดยผ่าน DEAD Toyopearl 650M column

นำเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสผ่าน DEAD Toyopearl 650M column ขนาด 2x3 เซนติเมตร ที่ผ่านการปรับสมดุล (equilibrium) ด้วย 50mM Tris-HCl pH 9.0 ด้วยอัตราการไหล 2 มิลลิลิตร/นาที หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม และล้าง (elute) โปรตีนที่เกาะกับคอลัมน์ด้วย 50mM NaCl ใน Tris-HCl pH 9.0 นำสารที่ได้ในแต่ละ fraction ไปหากิจกรรมเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Miller และทำไดอะไลซิสเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วย Butyl-Toyopearl 650M column

เตรียมเอนไซม์ที่จะผ่านคอลัมน์โดยเติม 30% แอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นผ่านเอนไซม์ลงไปใน Butyl-Toyopearl 650M column ขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตรที่ปรับสมดุล ด้วย 30% แอมโมเนียมซัลเฟต ใน 50 mM Tris-HCl pH 9.0 อัตราการไหล 2 มิลลิลิตร/นาที แยกโปรตีนด้วย 50 mM Tris-HCl pH 9.0 ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 30, 25, 20, 15, 10, 5 และ 0 % ตามลำดับ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย CMC ของแต่ละ fraction แล้วทำการไดอะไลซิสต่อไป

การแยกเอนไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) โดยผ่าน SuperQ-650column

SuperQ-650column ขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตรที่ผ่านการปรับสมดุล ด้วย 50mM Tris-HCl pH 9.0 นำมาใช้ทำเอนไซม์เซลล์ูเลสให้บริสุทธิ์ โดยนำเอนไซม์ที่ไดอะไลซิสแล้ว ผ่านคอลัมน์นี้ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม และแยกโปรตีนด้วย 50 mM NaCl ใน Tris-HCl pH 9.0 ตรวจสอบ และเก็บ fraction ที่มีความสามารถในการย่อย CMC ทำการไดอะไลซิสต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์บริสุทธิ์

การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

ตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วย 12% sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [15] โดยเทียบกับ Protein Markers (Broad Range) (Nacalai Tesque, japan)

การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลล์ูเลสบริสุทธิ์ (pH optimum)

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 100 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับ 1 % CMC ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่ pH 3.0 – 11.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

การศึกษาค่าพีเอชที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลล์ูเลสบริสุทธิ์ (pH stability)

บ่มเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 3.0 – 11.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มร่วมกับ 1 % CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

การศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ (temperature optimum)

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 100 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับ 1 % CMC ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ (temperature stability)

บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 20-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มร่วมกับ 1 % CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

การศึกษาผลของโลหะหนักต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บ่มใน 50 mM citric acid buffer (pH 4.8) ที่มีโลหะหนักชนิดต่างๆ คือ Na⁺, K⁺, Li⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ และ Zn⁺ เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มร่วมกับ 1% CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

การศึกษาผลของชนิดของซับสเตรตต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 100 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับ ซับสเตรตชนิดต่างๆ คือ CMC, ฟางข้าว, ช้างข้าวโพด, หญ้าหวาน, หญ้าเนเปียร์, ลำไย, กระจ่าง และ xylan ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การคัดแยกและบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส ที่แยกได้จากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว จำนวน 10 ตัว และทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยวิธี congo red plate assay พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท โดย ไอโซเลท B4 มีความสามารถในการสร้างวงใสบนอาหารที่มี CMC สูงที่สุด (ภาพ 1) จากนั้นทำการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรีย B4 โดยการใช้ลำดับเบสของ 16S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ Genebank พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis* strain DSM 11031 และ *Bacillus mojavensis* strain IFO15718 เท่ากับ 99%, 97% และ 97% ตามลำดับ จึงได้ทำการตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Bacillus subtilis* B4

การทำเอนไซม์บริสุทธิ์

ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจาก *B. subtilis* B4 โดยตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ DEAD Toyopearl 650M, Butyl-Toyo pearl 650M และ SuperQ-650 ตามลำดับ ผลการทำเอนไซม์บริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าเมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นและปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเทียบกับ crude extract ค่า purification fold มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 67.2 แต่มีค่าผลผลิต (Yield) เพียง 9.5 % หลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์ มีค่าแอนติวิตีจำเพาะ (specific activity) 4.70 ซึ่งมากกว่าก่อนทำบริสุทธิ์ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ว่ามีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีนในคอลัมน์ได้ดี ค่าแอนติวิตีจำเพาะที่ได้จึงมีค่าสูงขึ้นและปริมาณโปรตีนมีค่าลดลง

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลส โดย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 KDa ดังแสดงในภาพ 2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษา น้ำหนักโมเลกุลเอนไซม์เซลลูเลส

บริสุทธิ์จาก *Bacillus* spp. และ *Aspergillus niger* พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับ เอนไซม์ endo-glucanases ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 KDa [2, 16] และยังมีการ ศึกษาเอนไซม์นี้ใน *Chalara paradoxa* [17] พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 35 KDa

การศึกษาค่าพีเอชที่มีผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่พีเอชต่างๆ พบว่า พีเอชที่ต่างกันมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยค่าพีเอชที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์มากกว่า 80 % อยู่ในช่วง 4.5– 7.5 และมีค่าสูงสุดที่พีเอช 6.0 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* strain ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 5.0–6.5 [2] และการศึกษาในเชื้อ *Aspergillus niger* พบว่าเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6.0–7.0 [16] นอกจากนั้นในช่วงพีเอช 5.0–7.0 เป็นช่วงที่เอนไซม์บริสุทธิ์จากเชื้อ *Lysobacter* sp.ทำงานได้ดีที่สุด [18] การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* B4 ที่แยกได้จากกระเพาะหมักของวัว พบว่ามีความคงตัวที่พีเอช 4.5–6.0 ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *B.Circulans* และ *Mucor circinelloides* ที่มีความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอช 4.5–6.5 [18] และ 4.0–7.0 [19] ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าในช่วงพีเอชที่สูงหรือต่ำมากกิจกรรมเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงอาจเป็นผลมาจากการที่โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพ โดยเฉพาะบริเวณตัวเร่งหรืออาจมีประจุบนโปรตีนเปลี่ยนแปลงจนไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ [10]

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20 – 70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าสัมพันธ์มากกว่า 80 % อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 65

องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสนี้มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่าเอนไซม์จากเชื้อ *Mucor circinelloides* (55 องศาเซลเซียส) [19] แต่มีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus strains* RH68 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส [2] การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรในช่วง 25 – 60 องศาเซลเซียส และกิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้กับการศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้จากเชื้อ *B. subtilis* TD6 ที่มีความเสถียรในช่วง 0 – 50 องศาเซลเซียส พบว่ามีช่วงอุณหภูมิสูงกว่า [20] ทั้งนี้การที่เอนไซม์มีความเสถียรลดลงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงนั้น อาจเกิดจาก เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้โครงสร้างของโปรตีนถูกทำลาย

การศึกษามลของโลหะหนักต่อกิจกรรมของเอนไซม์

การศึกษามลของไอออนโลหะทั้งหมด 11 ชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงผลดังตารางที่ 2 พบว่าไอออน Na^+ , K^+ , Li^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ ส่วน Cu^{2+} มีผลเป็นตัวขัดขวางกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ Mn^{2+} และ Fe^{3+} ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีผลเป็นตัวส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วน Fe^{2+} มีผลส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิโมลาร์ โดยผลการทดลองนี้ให้แนวโน้มไปทางเดียวกับการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Catharan thusreseus* [21] และเชื้อ *Rhizopus oryzae* [22] ซึ่งพบว่า Na^+ , K^+ , Li^+ และ NH_4^+ ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ นอกจากนั้นยังสอดคล้องกับงานวิจัยเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Mucor circinelloides* [19] และ *Chalara paradoxa* [17] ที่พบว่า Mn^{2+} มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การศึกษาผลของชนิดสารตั้งต้นต่อกิจกรรมเอนไซม์

การศึกษาผลของชนิดซับสเตรตต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์มีความสามารถในการย่อย CMC ได้สูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนั้นเอนไซม์บริสุทธิ์ยังมีความสามารถในการย่อยของเหลือใช้ทางการเกษตรได้ โดยย่อยซังข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ฟางข้าว หญ้าเนเปีย และหญ้าขนตามลำดับ เอนไซม์มีความสามารถในการย่อย xylan ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับซับสเตรตที่เป็น CMC

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากของเหลือในกระเพาะหมักของวัว พบแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท โดยไอโซเลท B4 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด และมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากที่สุด คือ 99 % เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค 16s rDNA sequencing เอนไซม์เซลลูเลสที่ บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ DEAD Toyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M และ SuperQ-650 พบว่าคุณสมบัติของเอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 4.70 U/mg protein น้ำหนักของโมเลกุลเอนไซม์มีค่าประมาณ 35 KDa และทำงานได้ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความเสถียรที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดย Mn^{2+} และ Fe^{3+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ Cu^{2+} มีผลเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์บริสุทธิ์มีความสามารถในการย่อย CMC และของเหลือใช้ทางการเกษตรได้ดี เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการใช้ในกระบวนการย่อยของเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตเป็นไบโอเอทานอลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ห้างปฏิบัติการ Molecular Unit (SCB 2903) ภาควิชาชีววิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ห้างปฏิบัติการ Enzyme technology, Department of Biotechnology, Faculty of Life Science, Ritsumeikan University และขอขอบพระคุณทุนพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Prade RA. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. 1995; 13: 100 – 131.vv
2. Mawadza C, Rahni H, Zvauya R, Bo M. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*. 2000.;83 :177-187.
3. Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000; 18 (5): 355-383.
4. White AR. Visualization of cellulase and cellulose degradation. In cellulose and other natural polymer systems biogenesis, structure and degradation. Plenum Press, New York. 1993: 489-506.
5. Hungate RE. The rumen and its microbes. New York: Academic Press; 1966.
6. Ogimoto K, Imai S. Atlas of rumen microbiology. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.1981;

7. Li JY, Hsin HL, Zheng RX. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology*. 2010; 18 (3): 466-471.
8. Ariffin HN, Abdullah MS, Umi-Kalsom Y, Shirai Hassan MA. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2006; 3: 47-53.
9. Hankin L, Anagnostakis S. Solid media containing Carboxy methyl cellulose to detect CM cellulase activity of Microorganisms. *Journal of general microbiology*. 1977; 98: 109 -115.
10. Li W, Zhang M, Yang Y, Chen M . Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*. 2008; 40: 195-201.
11. Ifaku S. Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites. *Biomacromolecules*. 2005; 8 (6): 1973-1978.
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 1997; 74: 5463-5467.
13. Miller GC. Use of dinitrosalicylic acid reagent for etermination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959; 31: 426-428.
14. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 1951; 193: 265-275.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685.
16. Akiba S, Kimura Y, Yamamoto K, Kumagai H. Purification and characterization of a rotease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bio-engineering*. 1995; 79(2): 125-130.
17. Lucas R, Robles A, Garcia MT, Alvarez De Cienfuegos G, and Galvez A. Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(1):79-85.
18. Kim CH. Characterization and substrate specificity of an endo-beta-1, 4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61: 959-965.
19. Saha BC. 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*. 2004; 39 (12): 1871-1876.

20. Dian A, Don H. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus subtilis* TD6 isolated from *Takifugu rubripes* fish. Proceeding of the 2nd International seminar on chemistry. 2011: 281-287.
21. Smriti G, Sanwal G. Purification and characterization of a cellulase from *Catharanthus roseus* stems. Phytochemistry. 1999; 52(1): 7-13.
22. Murashima K, Nishimura T, Nakamura Y, Koga J, Moriya T, Sumida N, Yaguchi T, Kono T. Purification and characterization of new endo-1, 4-beta-D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology. 2002; 30 (3): 319-326.

ตารางที่ 1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *B. subtilis* B4

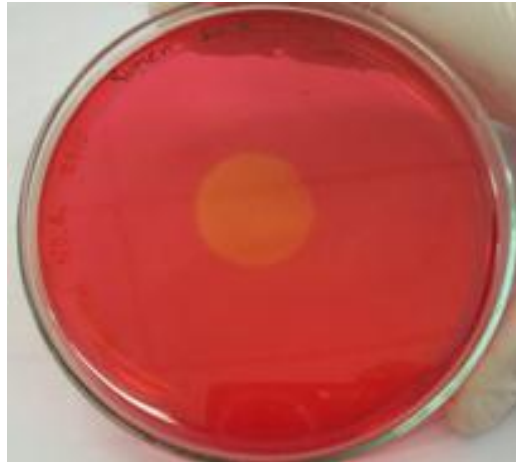
Procedure	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (Fold)	Yield (%)
Crude enzyme	141.3	1994	0.07	1.0	100.0
Ammonium sulfate precipitation (90%)	48.2	214.8	0.22	3.2	34.2
DEAE-650M	17.2	32.6	0.53	7.5	12.2
Butyl-650M	14.0	15.4	0.90	12.9	9.9
SuperQ-650	13.6	2.89	4.70	67.2	9.5

ตารางที่ 2 ผลของโลหะหนักต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์

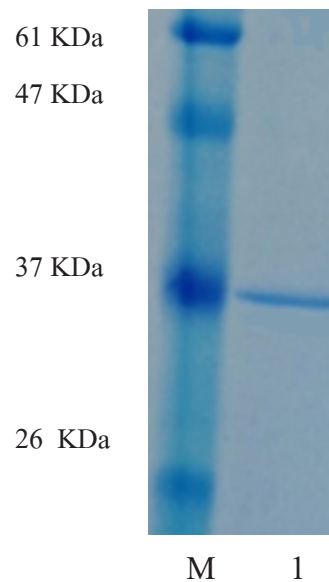
Metal ions	Relative activity	
	Concentration (mM)	
	5	10
none	100.0	100.0
Na ⁺	93.6	88.5
K ⁺	99.3	102.8
Li ⁺	97.6	96.6
NH ⁴⁺	97.9	95.2
Ca ²⁺	103.2	105.7
Mn ²⁺	108.3	131.4
Mg ²⁺	97.2	99.2
Cu ²⁺	54.5	7.1
Fe ²⁺	121.9	100.3
Fe ³⁺	136.8	129.5
Zn ⁺	102.5	91.4

ตารางที่ 3 ผลของชนิดของซับสเตรตต่อกิจกรรมของเอนไซม์

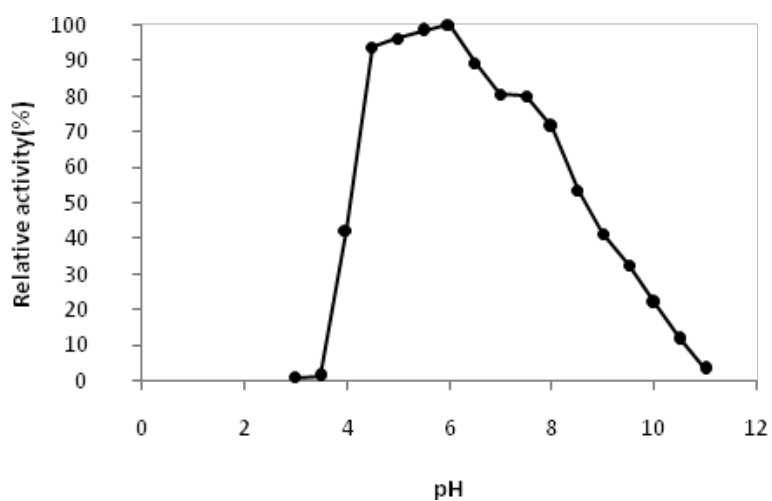
Substrates	Activity (%)
CMC	100
ฟางข้าว	17
ซังข้าวโพด	23
หญ้าเนเปีย	12
หญ้าน	11
ลำสาลี	3
กระดาศกรอง	4
xylan	20



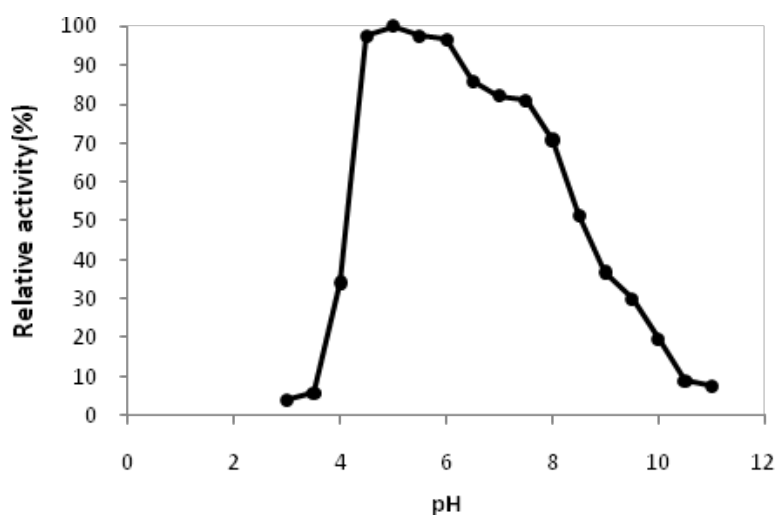
ภาพที่ 1 ลักษณะวงใสที่เกิดจากการย่อยซบสเตรทด้วยเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* B4



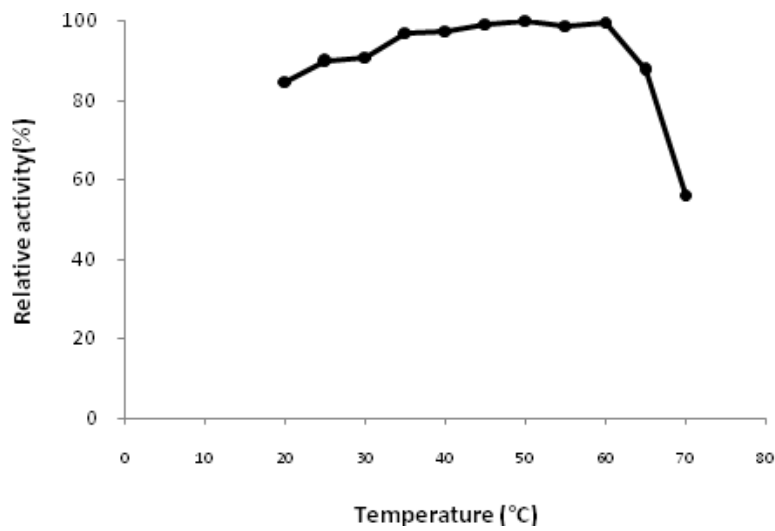
ภาพที่ 2 SDS PAGE ของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* B4: Lane 1, M: โปรตีนบอกขนาด (Broad Range) (Nacalai Tesque, Japan)



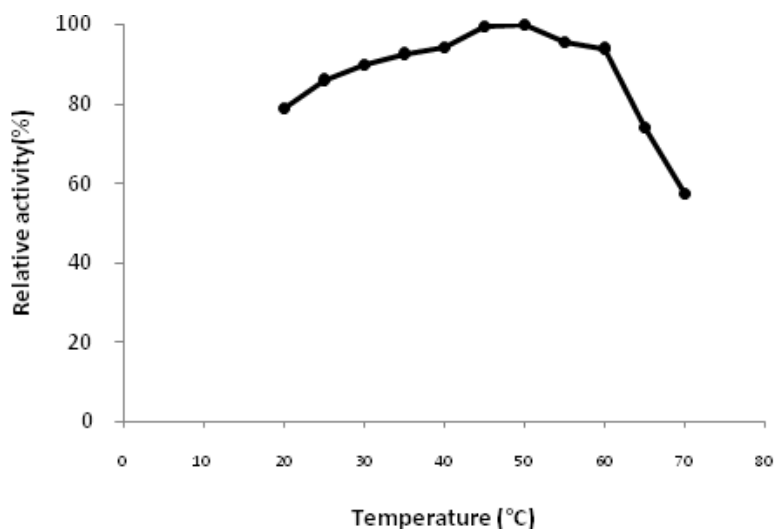
ภาพที่ 3 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์



ภาพที่ 4 ผลของค่าพีเอชที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์



ภาพที่ 5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์



ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์