

## การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว

### Purification and Characterization of Bacterial Cellulase from Cow's Rumen

รัชรา กาละวงศ์ (Ratchara Kalawong)\* สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย (Somboon Anantalabhochai)\*\*

มาโมรุ วากายามา (Mamoru Wagayama)\*\*\*

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว พบแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลต โดยไอโซเลต B4 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เมื่อบ่งบอกสายพันธุ์จุลินทรีย์นี้ 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, DEAD Toyopearl 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 showed 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 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

\*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\*รองศาสตราจารย์ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\*\*ศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะชีววิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัย

## บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุด ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ในที่ผนังเซลล์ของพืช ในด้านโครงสร้างทางเคมีเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1000 - 10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลิเมอร์ (polymer) เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก ( $\beta$  (1-4) glycosidic linkages) (Prade, 1995) ในธรรมชาติโครงสร้างของเซลลูโลสนั้นสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลส (cellulase) ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด เช่น ฟังไจ แบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท แต่มีการนำแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์มากที่สุด เนื่องจากเจริญง่าย, มีเวลาในการแบ่งตัวที่สั้น, อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาไม่แพง และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี (Mawadza *et al.*, 2000) เอนไซม์เซลลูเลสจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะทางด้านการค้า ไม่ว่าจะเป็น การผลิตกระดาษ, เส้นใย, ชักล้าง, อาหารสัตว์ รวมไปถึงการผลิตไบโอเอทานอล (Bhat, 2000) ปัจจุบันของเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ชังข้าว ต้นข้าวโพด หนุ่ย ฯลฯ ซึ่งมีเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้ โดยอาศัยหลักการย่อยสลายขององค์ประกอบเหล่านี้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อเกิดปฏิกิริยาการย่อยแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (White, 1993) น้ำตาลที่ได้นั้นสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์ ถ้าหากแบคทีเรียมีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มาก ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

ในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องอาหารที่สัตว์กินจะถูกเคี้ยวอย่างหยาบๆ และกลืนลงไปกับน้ำลายผ่านหลอดอาหารเข้าไปในกระเพาะหมัก (rumen) ซึ่งเป็นกระเพาะหมักขนาดใหญ่และเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ช่วยย่อยอาหาร (Hungate, 1966) โดยกลุ่มของแบคทีเรียจะทำหน้าที่หลักในการ

ผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายเส้นใยของพืชอาหาร เช่นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเพกติน (pectin) เป็นต้น (Ogimoto and Imai, 1981) การนำแบคทีเรียในกระเพาะหมักของวัวมาศึกษาลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ รวมไปถึงการผลิตไบโอเอทานอลจึงเป็นที่น่าสนใจ

การศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยเซลลูโลสนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้เทคนิคในการแยก (isolation) ทำบริสุทธิ์ (purification) และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ (characterization) งานวิจัยเกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลส นั้นมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ซึ่งเทคนิคส่วนใหญ่ที่ถูกนำมาใช้ จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารแต่ละตัวที่ต้องการแยก เช่น ขนาดของโปรตีน, ประจุ, ความสามารถในการเกาะกับสารชีวโมเลกุล เป็นต้น การศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* YJ1 สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) และเจลฟิวเทชัน (gel filtration) (Li *et al.*, 2010) เช่นเดียวกับการทดลองของ Arifin และคณะที่ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 (Arifin *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* strain CH43 และ HR68 โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, เจลฟิวเทชัน, โครมาโทกราฟีแบบไอโซอิเล็กโตร ฟอกัสซิง (iso-electric focusing chromatography) และ SDS PAGE (Mawadza *et al.*, 2000)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการคัดแยกแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในการย่อยเซลลูโลส รวมไปถึงการทำบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระเพาะหมักของวัว
2. เพื่อทำบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะสมบัติและสภาวะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกระเพาะหมักของวัว

### วิธีการวิจัย

**การคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว**

นำของเหลวจากกระเพาะหมักของวัว ที่ได้รับจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเจือจางโดยวิธี 10 fold dilution จากนั้นนำสารละลายที่ได้มา เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC (carboxymethyl cellulose) แบบแข็ง (Hankin & Anagnostakis, 1977) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะพื้นฐานวิทยาที่แตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate เลือกเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว มา spot plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี congo red plate assay (Li *et al.*, 2008) แล้ววัดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการย่อยสลายยับยั้งโดยเอนไซม์เซลลูเลส

**การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีหาลำดับเบสของ 16S rDNA**

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อแต่ละไอโซเลต ที่แยกได้ (Ifaku, 2005) เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้วยวิธี dideoxynucleotide chain termination method (Sanger *et al.*, 1997) โดยบริษัท First BASE, Malaysia แล้วเปรียบเทียบกับ

ลำดับเบสในฐานข้อมูล 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 dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 40% sodium-potassium tartate ปริมาตร 200 ไมโครลิตรนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร (Miller, 1959)

### การหาปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry *et al.*, 1951) และเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย 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 มิลลิตร แล้วไดอะไลซิส (dialysis) สารละลายที่ได้ใน 50mM Tris-HCl pH 9.0

**การแยกเอนไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) โดยผ่าน DEAD Toyopearl650M column**

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

**การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วย Butyl-Toyopearl 650M column**

เตรียมเอนไซม์ที่จะผ่านคอลัมน์บัฟเฟอร์เดิม 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/นาที่ แยกโปรตีนด้วย 50 mM Tris-HCl pH 9.0 ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 30, 25, 20, 15, 10, 5 และ 0 %ตามลำดับ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย CMC ของแต่ละ fraction แล้วทำการโคะไลซิสต่อไป

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

SuperQ-650column ขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการปรับสมดุล ด้วย 50mM Tris-HCl pH 9.0 นำมาใช้ทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ โดยนำเอนไซม์ที่โคะไลซิสแล้ว ผ่านคอลัมน์นี้ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที่ หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม และแยกโปรตีนด้วย 50 mM NaCl ใน Tris-HCl pH 9.0 ตรวจสอบ และเก็บ fraction ที่มีความสามารถในการ

การย่อย CMC ทำการโคะไลซิส ต่อไป

**การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์บริสุทธิ์**

**การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน**

ตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วย 12% sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) โดยเทียบกับ Protein Markers (Broad Range) (Nacalai Tesque, Japan)

**การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ (pH optimum)**

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

**การศึกษาค่าพีเอชที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ (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

**การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ (temperature optimum)**

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 100 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับ 1 % CMC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 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

## การศึกษาผลของโลหะหนักต่อกิจกรรมของ เอนไซม์

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บ่มใน 50 mM citric acid buffer (pH 4.8) ที่มีโลหะหนักชนิดต่างๆ คือ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มร่วมกับ 1 % CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

### การศึกษาผลของชนิดของซับสเตรตต่อ

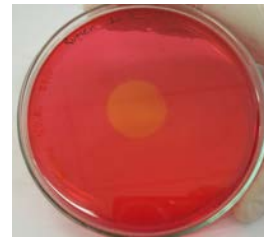
#### กิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 100 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับ ซับสเตรตชนิดต่างๆ คือ CMC, ฟางข้าว, ชั่งข้าวโพด, หนุ่ยหวาน, หนุ่ยเนเปี่ย, ลำไย, กระดาษกรอง และ xylan ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### การคัดแยกและบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียที่ สร้างเอนไซม์เซลลูเลส ที่แยกได้จากของเหลวในกระเพาะ หมักของวัว

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



ภาพที่ 1 ลักษณะวงใสที่เกิดจากการย่อยซับสเตรตด้วย  
เอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* B4

### การทำเอนไซม์บริสุทธิ์

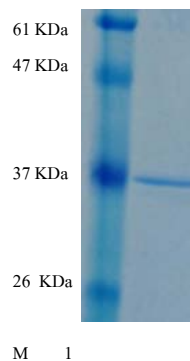
ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสจาก *B. subtilis* B4 โดยตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วผ่านคอลัมน์ DEAE Toyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M และ SuperQ-650 ตามลำดับ ผลการทำเอนไซม์บริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าเมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นและปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเทียบกับ crude extract ค่า purification fold มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 67.2 แต่มีค่า ผลผลิต (Yield) เพียง 9.5 % หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มีค่าเอนติวิตีจำเพาะ (specific activity) 4.70 ซึ่งมากกว่าก่อน ทำบริสุทธิ์ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ว่ามีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีนในคอลัมน์ได้ดี ค่าเอนติวิตีจำเพาะที่ได้จึงมีค่าสูงขึ้นและปริมาณโปรตีนมีค่าลดลง

### การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสโดย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 KDa ดังแสดงในภาพ 2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* spp. และ *Aspergillus niger* พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับ เอนไซม์ endo-glucanases ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 KDa (Mawadza et. al, 2000) (Akiba et. al., 1995) และยังมีการ ศึกษาเอนไซม์นี้ใน *Chalara paradoxa* (Lucas et. al., 2001) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 35 KDa

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       |

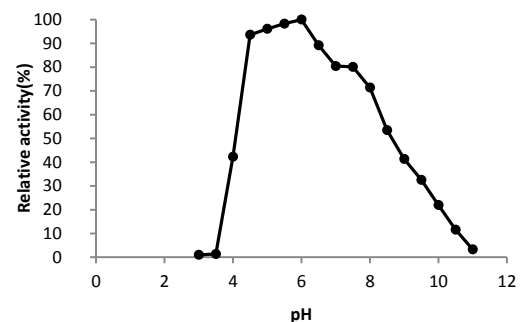


ภาพที่ 2 SDS PAGE ของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* B4 : Lane 1 , M : โปรตีนบอกขนาด (Broad Range) (Nacalai Tesque, Japan)

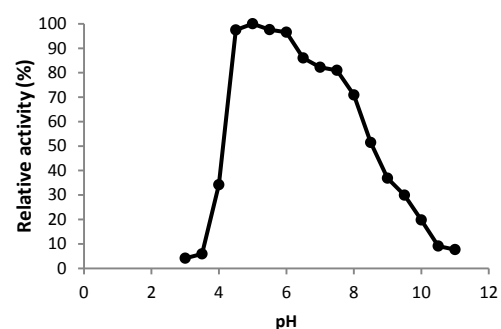
การศึกษาค่าพีเอชที่มีผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่พีเอชต่างๆ พบว่า พีเอชที่ต่างกันมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยค่าพีเอชที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่า 80 % อยู่ในช่วง 4.5- 7.5 และมีค่าสูงสุดที่พีเอช 6.0 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* strain ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 5.0-6.5 (Mawadza *et al.*, 2000) และการศึกษาในเชื้อ *Aspergillus niger* พบว่าเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6.0-7.0 (Akiba

*et al.*, 1995) นอกจากนั้นในช่วงพีเอช 5.0-7.0 เป็นช่วงที่เอนไซม์บริสุทธิ์จากเชื้อ *Lysobacter* sp. ทำงานได้ดีที่สุด (Ogura *et al.*, 2006) การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* B4 ที่แยกได้จากกระเพาะหมักของวุ้น พบว่ามีความคงตัวที่พีเอช 4.5-6.0 ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *B. Circulans* และ *Mucor circinelloides* ที่มีความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอช 4.5-6.5 (Kim, 1995) และ 4.0-7.0 (Saha, 2004) ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าในช่วงพีเอชที่สูงหรือต่ำมากกิจกรรมเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงอาจเป็นผลมาจากการที่โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพโดยเฉพาะบริเวณตัวเร่งหรืออาจมีประจุบนโปรตีนเปลี่ยนแปลงจนไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ (Li *et al.*, 2008)



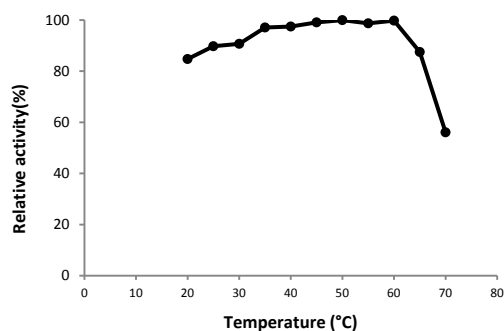
ภาพที่ 3 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์



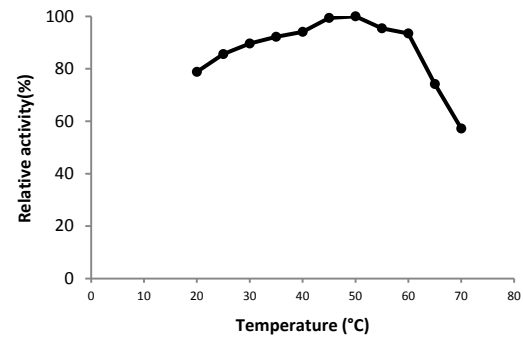
ภาพที่ 4 ผลของค่าพีเอชที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์

### การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20 - 70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าสัมพัทธ์มากกว่า 80 % อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30 - 65 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสนี้มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่าเอนไซม์จากเชื้อ *Mucor circinelloides* (55 องศาเซลเซียส) (Saha, 2004) แต่มีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* strains RH68 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส (Mawadza *et al.*, 2000) การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรในช่วง 25 -60 องศาเซลเซียส และกิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้จากเชื้อ *B. subtilis* TD6 ที่มีความเสถียรในช่วง 0-50 องศาเซลเซียส พบว่ามีช่วงอุณหภูมิสูงกว่า (Dian and Don, 2011) ทั้งนี้การที่เอนไซม์มีความเสถียรลดลงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงนั้น อาจเกิดจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ทำให้โครงสร้างของโปรตีนถูกทำลาย



ภาพที่ 5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ



ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ

### การศึกษาผลของโลหะหนักต่อกิจกรรมของเอนไซม์

การศึกษาผลของไอออนโลหะทั้งหมด 11 ชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงผลดังตารางที่ 2 พบว่าไอออน  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ ส่วน  $\text{Cu}^{2+}$  มีผลเป็นตัวขัดขวางกิจกรรมของเอนไซม์ แต่  $\text{Mn}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{3+}$  ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีผลเป็นตัวส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วน  $\text{Fe}^{2+}$  มีผลส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิโมลาร์ โดยผลการทดลองนี้ให้แนวโน้มไปทางเดียวกับการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Catharanthus roseus* (Smriti *et al.*, 1999) และเชื้อ *Rhizopus oryzae* (Marashima *et al.*, 2002) ซึ่งพบว่า  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  และ  $\text{NH}_4^+$  ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ นอกจากนั้นยังสอดคล้องกับงานวิจัยเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Mucor circinelloides* (Saha, 2004) และ *Chalara paradoxa* (Lucas *et al.*, 2001) ที่พบว่า  $\text{Mn}^{2+}$  มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

### การศึกษาผลของชนิดสารตั้งต้นต่อกิจกรรมเอนไซม์

การศึกษาผลของชนิดซับสเตรตต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเอนไซม์บริสุทธิมีความสามารถในการย่อย CMC ได้สูงที่สุด ดังแสดงใน

ตารางที่ 3 นอกจากนั้นเอนไซม์บริสุทธิ์ยังมีความสามารถในการย่อยของเหลือใช้ทางการเกษตรได้ โดยย่อยซังข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ฟางข้าว หญ้าเนเปีย และหญ้าขนตามลำดับ เอนไซม์มีความสามารถในการย่อย xylan ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับซับสเตรทที่เป็น CMC

ตารางที่ 2 ผลของโลหะหนักต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์

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

ตารางที่ 3 ผลของชนิดของซับสเตรทต่อกิจกรรมของเอนไซม์

| Substrates | Activity (%) |
|------------|--------------|
| CMC        | 100          |
| ฟางข้าว    | 17           |
| ซังข้าวโพด | 23           |
| หญ้าเนเปีย | 12           |
| หญ้าขน     | 11           |
| สำลี       | 3            |
| กระดาษกรอง | 4            |
| xylan      | 20           |

## สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากของเหลือในกระเพาะหมักของวัว พบแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท โดยไอโซเลท B4 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด และมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากที่สุด คือ 99 % เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค 16s rDNA sequencing เอนไซม์เซลลูเลสที่บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 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 องศาเซลเซียสมีความเสถียรที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดย Mn<sup>2+</sup> และ Fe<sup>3+</sup> สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ Cu<sup>2+</sup> มีผลเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์บริสุทธิ์มีความสามารถในการย่อย CMC และของเหลือใช้ทางการเกษตรได้ดี เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการใช้ในกระบวนการย่อยของเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตเป็นไบโอเอทานอลต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ Molecular Unit (SCB 2903) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ห้องปฏิบัติการ Enzyme technology, Department of Biotechnology, Faculty of Life Science, Ritsumeikan University

ขอขอบพระคุณทุนพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษา

## เอกสารอ้างอิง

- Akiba, S., Kimura, Y., Yamamoto, K., Kumagai, H. 1995. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. Journal of Fermentation and Bio-engineering. 79. (2): 125-130.
- Ariffin, H. N., Abdullah, M.S., Umi-Kalsom, Y., Shirai Hassan, M.A. 2006. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. International Journal of Engineering Science and Technology. 3: 47-53.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances. 18 (5): 355-383.
- Dian, A., Don, H. 2011. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus subtilis* TD6 isolated from *Takifugu rubripes* fish. Proceeding of the 2<sup>nd</sup> International seminar on chemistry: 281-287.
- Hankin, L., Anagnostakis, S. 1977. Solid media containing Carboxy methyl cellulose to detect CM cellulase activity of Microorganisms. Journal of general microbiology. 98: 109 -115.
- Hungate, R.E. 1966. The rumen and its microbes. New York: Academic Press.
- Ifaku, S. 2005. Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites. Biomacromolecules. 8 (6): 1973-1978.
- Kim, C.H. 1995. 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. 61: 959-965.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259): 680-685.
- Li, J. Y., Hsin, H., L., Zheng, R. X. 2010. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. Journal of Marine Science and Technology. 18 (3): 466-471.
- 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., Garcia, M. T., Alvarez De Cienfuegos, G., Galvez, 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.
- Mawadza, C., Rahni, H., Zvauya, R., Bo, M. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology. 83 :177-187.
- Miller, G. C. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426-428.

- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T., Kono, T. 2002. Purification and characterization of new endo-1, 4-beta-D-glucanases from *Rhizopus oryzae*,” Enzyme and Microbial Technology. 30 (3); 319-326.
- Ogimoto, K., Imai, S. 1981. Atlas of rumen microbiology. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Ogura, J., Toyoda, A., Kurosawa, T., Chong, A. L., Chohnan, S., Masaki, T. 2006. Purification, characterization, and gene analysis of cellulase (Cel8A) from *Lysobacter* sp. IB-9374. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 70(10): 2420-2428.
- Prade, R.A. 1995. Xylanases: from biology to biotechnology. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews. 13: 100 – 131.
- Saha, B. C. 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. Process Biochemistry. 39 (12): 1871-1876.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. 1997. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.. 74: 5463-5467.
- Smriti, G., Sanwal, G. 1999. Purification and characterization of a cellulase from *Catharanthus roseus* stems. Phytochemistry. 52(1): 7-13.
- 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.