ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma viride สายพันธุ์ TISTR 3161

ชื่อผู้เขียน นางสาวยุพดี ชัยสุขสันต์

วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2527

บทคัดย่อ

ทำการทดลองหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma viride สายพันธุ์ TISTR 3161 โดยใช้ solid culture พบว่า รำข้าวและฟางข้าวในอัตราส่วน 9:1 เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในระยะเวลา 2 วัน ณ อุณหภูมิ 27 °ซ. โดยที่อัตราส่วนของอาหาร: ปริมาณน้ำที่ใส่คือ 1:1 สารละลาย 0.5 M NaCl หรือ Tween 80 ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 สามารถสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสออกมาได้มากกว่าสกัดด้วยบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียว

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา T.viride TISTR 3161 ในระดับปริมาณมากบนรำข้าวและฟางข้าวอัตราส่วน 9:1 ได้ crude enzyme ซึ่งเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography โดยใช้สภาวะที่เป็นกรดและด่างจะให้เอ็นไซม์เซลลูเลส I และเซลลูเลส II ตามลำดับ และทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยใช้ gel filtration เอ็นไซม์ที่เตรียมได้ทั้งสองต่างให้โปรตีนแถบเดียวจากการทำ polyacrylamide gel electrophoresis เซลลูเลส I เป็น tetramer มีมวลโมเลกุลประมาณ 232,000 และเซลลูเลส II เป็น dimer มีมวลโมเลกุลประมาณ 138,000 โดยใช้ gel filtration เอ็นไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิดต่างเป็นไกลโคโปรตีน โดยที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลลูเลส I และเซลลูเลส II ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 4.4 และ 1.2 % ตามลำดับ เอ็นไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิดต่างมี activity ของ β-glucosidase อยู่ในตัวนอกเหนือจาก activity ต่อ CMC และ FP จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิดพบว่า เซลลูเลส I มีค่า K_m = 2.94 มก./มล., V_{max} = 0.048 μmole/min สำหรับเซลลูเลส II มีค่า K_m = 2.63 มก./มล., V_{max} = 0.046 μmole/min เซลลูเลส I ทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง (4.0-6.0) กว่ากรณีเซลลูเลส II ซึ่งทำงานได้ดี ณ pH 4.0 เท่านั้น แต่มีความคงทนต่อ pH ในช่วง pH 2.5-6.0 เช่นกันที่ 18 °ซ. เป็นเวลา 15 ชม. เอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ทำงานได้ดีที่สุด ณ อุณหภูมิ 45 °ซ. และ 50 °ซ. ตามลำดับ และมีความทนทานต่อความร้อนถึง 50 °ซ. ในการทำงานของเอ็นไซม์ที่เตรียมได้ทั้งสองชนิดนี้พบว่าถูกยับยั้งได้โดย 10^{-3} M Fe^{3+}, Cu^{2+} และ Ag^{+} และถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ด้วย Hg^{2+} (10^{-4} M) นอกจากนี้ยังต้องการโลหะอิออนบางตัว เช่น Mn^{2+} และ Co^{2+} ช่วยในการทำงานย่อยสลาย CMC และมีแนวโน้มทำงานร่วมกันในการย่อยสลายกระดาษกรองอีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Cellulase Enzyme from Trichoderma viride TISTR 3161

Name Ms. Yupadee Chaisuksant

Thesis for Master of Science in Chemistry
Chiang Mai University 1984

Abstract

In maximum cellulase production from Trichoderma viride TISTR 3161 by the solid culture method, the effects of environmental factors were investigated. It was found that rice bran and rice straw in a proportion of 9 : 1 was the best medium for cultivation of the fungi in 2 days at 27°C, while the optimum ratio of the medium to the water content was 1 : 1 with the enzyme being better extracted from the solid medium with 0.5 M sodium chloride or tween-80 in 0.05 M citrate buffers pH 4.8 than the buffer alone.

Crude enzymes from the fungus T. viride TISTR 3161 growing on a mixture of rice bran and rice straw medium (9 : 1) were purified by ion-exchange chromatography using different conditions. Cellulase I and cellulase II were obtained when acidic and alkaline conditions were used, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The two enzymes were further purified by gel filtration and were shown to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis. The respective molecular weights of cellulase I, tetramer and cellulase II, dimer were estimated to be about 232,000 and 138,000 by gel filtration. Cellulase I and II were glycoproteins in which the carbohydrate contents of the enzymes were 4.4 and 1.2 % (w/w) respectively. The K_m and V_{max} values for the enzymes were as follow : 2.9 mg/ml and 0.048 Δmole/min for cellulase I on CMC and 2.6 mg/ml and 0.046 Δmole/min for cellulase II on CMC. Both enzymes also showed activities on pNPG in addition to CMC and FP. The optimum pH values and temperatures for the enzymes were pH 4.0-6.0 and 45°C for cellulase I and pH 4.0 and 50°C for cellulase II. Both enzymes were stable at temperature below 50°C. The enzymes were completely inactive by 10^{-4} M Hg^{2+} and partially inhibited by 10^{-3} M Fe^{3+}, Cu^{2+} and Ag^{+}. Both cellulases also required some metal ions such as Mn^{2+} and Co^{2+} in the degradation of CMC and had the tendency of synergism in the degradation of filter paper.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved