การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

Purification and Characterization of Xylanase from *Cryptococcus laurentii*

ธัญญา ศรีโพธิ์

Thanya Sripo

เลขหมู่ QP 609.C97 ธ12 2538 ฉ.2
เลขทะเบียน ..../17 ก.ค. 2538
Order Key 4418
BIB Key 77916
77916

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

ผู้เขียน นางธัญญา ศรีโพธิ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

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

.....กรรมการ
(ดร. รัตนา เรืองไรรัตนโรจน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

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

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*
ผู้เขียน	นางธัญญา ศรีโพธิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2537

บทคัดย่อ

ยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus laurentii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (1,4-β-D-Xylan xylanohydrorase, EC 3.2.1.8) 3 ไอโซไซม์ ออกมานอกเซลล์โดยผลิตได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เอนไซม์ (Xln1, Xln2 และ Xln3) ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอน ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัว 80% ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-cellulose และคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300 หลังการเตรียมบริสุทธิ์ได้นำโปรตีนแต่ละพีคมาตรวจสอบด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของ Xln1, Xln2 และ Xln3 เป็น 56,000, 23,500 และ 20,000 ดาลตัน ตามลำดับ

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสที่บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ Xln1 (56,000 ดาลตัน) ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Xln2 (23,500 ดาลตัน) ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองคือ 4.0 จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์พบว่า Xln1 และ Xln2 ทนอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที และที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที Xln1 มีค่า K_m เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 28.31 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วน Xln2 มีค่า K_m เท่ากับ 7.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 603.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน การศึกษาไอออนและสารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า Cu^{2+} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ 1% SDS มีผลยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เมื่อศึกษาผลผลิตจากการย่อยไซแลน (oat spelt xylan) ด้วยเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ พบว่าผลผลิตที่ได้คือ น้ำตาลไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ จึงจัดเป็น endoxylanases

Thesis Title	Purification and Characterization of Xylanase from *Cryptococcus laurentii*
Author	Mrs. Thanya Sripo
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1994

Abstract

Three types of xylanases (1,4-β-D-Xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) were isolated from the culture filtrate of yeast, *Cryptococcus laurentii* . The highest production was detected in 48 hours at 30 °C. The enzymes (Xln1, Xln2 and Xln3) were purified by 80% saturation with ammonium sulfate, anion exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration chromatography on Sephacryl S-300. The purified enzymes showed single bands on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of Xln1, Xln2 and Xln3 were 56,000, 23,500 and 20,000 daltons, respectively.

The purified xylanases from *Cryptococcus laurentii* were characterized. The optimum temperature for the activity of Xln1 (M.W. 56,000) was 50°C and that for the activity of Xln2 (M.W. 23,500) was 50-55°C. The optimum pH for the activities of Xln1 and Xln2 were pH 4.0. Enzymes were stables at 50°C for 30 min. and 60°C for 3 min. The Xln1 had a K_m of 4.0 mg/ml and V_{max} of 28.31 U/mg protein. The Xln2 had a K_m of 7.69 mg/ml and V_{max} of 603.86 U/mg protein. The enzymes were completely inhibited by 10mM Cu^{2+} and 1% SDS. The enzymes degraded oat spelt xylan and produced xylose and xylooligosaccharide, indicating that they were endoxylanases.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา ประธานคณะกรรมการที่ปรึกษา ผู้ซึ่งให้แนวทางและคำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการผู้แทนจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร และดร. รัตนา เรืองไรรัตนโรจน์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ และร้อยเอก จำรัส ศรีโพธิ์ ด้วยความเคารพยิ่งที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย อินทพฤกษ์ และครู-อาจารย์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและอบรมสั่งสอน ขอขอบคุณเพื่อนๆ น้องๆ และทุกๆ คนที่มิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ธัญญา ศรีโพธิ์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(8)
รายการรูป	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(11)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	4
ลิกโนเซลลูโลส	4
ลักษณะโครงสร้างของไซแลน	5
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยไซแลน	9
วิธีการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส	13
แหล่งของเอนไซม์ไซลาเนส	14
การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์	15
การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส	16
ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนส	22
วัตถุประสงค์	24
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	25
วัสดุ	25
อุปกรณ์	26
วิธีการ	27
1. การวิเคราะห์	27

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

2. ความสามารถของ *Cryptococcus laurentii* ในการใช้ไซแลนบนอาหารแข็ง 28

3. ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ในอาหารเหลว 28

4. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จาก *Cryptococcus laurentii* 29

5. การศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส 32

3 ผลและวิจารณ์ 34

4 สรุป 69

ข้อเสนอแนะ 72

เอกสารอ้างอิง 73

ภาคผนวก 80

ก วิธีการวิเคราะห์ 80

ข วิธีการเตรียมสาร 88

ประวัติผู้เขียน 93

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารประกอบคาร์บอนที่ผลิตในหนึ่งปี	2
2	ช่วงเปอร์เซนต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่แยกจากจุลินทรีย์ต่างๆ	18
3	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*	39
4	ผลของช่วงเปอร์เซนต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*	41
5	ผลการเตรียมเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์จาก *Cryptococcus laurentii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	44
6	การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ กับ *Cryptococcus laurentii*	64
7	ผลของไอออนโลหะและสารยับยั้งต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*	66

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	วิถีการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส	1
2	โครงสร้างทางเคมีของลิกนินในพวกพืชชั้นสูง angiosperm	6
3	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	7
4ก	พันธะต่างๆ ในโครงสร้างของไซแลน	10
4ข	หน่วยย่อยต่างๆ ของไซแลน	11
5	การเกิดวงใสรอบโคโลนีของยีสต์ *Cryptococcus laurentii* และ *Pichia stipitis* สายพันธุ์ CBS 5775 และ CBS 5776 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข	35
6	แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*	37
7	การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* โดยใช้คอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-cellulose	43
8	การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไซลาเนส พีค 1ในคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300	46
9	การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไซลาเนส พีค 2ในคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300	47
10ก	แบบแผนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ใน 8% SDS-PAGE ย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250	49
10ข	แบบแผนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ใน 8% SDS-PAGE ย้อมเจลด้วย Silver staining	50
11	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ใน 8% SDS-PAGE	52
12	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*	54

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13ก	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* พีค 1 ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน	56
13ข	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* พีค 2 ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน	57
14	ผลความคงตัวของแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส Xln1 และ Xln2 จาก *Cryptococcus laurentii* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	58
15	ผลของพีเอชต่อแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*	60
16	Lineweaver-Burk plot ของแอคติวิตี้เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* Xln1 ต่อสารละลายไซแลน ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 4.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	62
17	Lineweaver-Burk plot ของแอคติวิตี้เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* Xln2 ต่อสารละลายไซแลน ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 4.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	63
18	ผลของชนิดผลผลิตจาก *Cryptococcus laurentii* Xln2 โดยการทำโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ	68

ตัวย่อและสัญลักษณ์

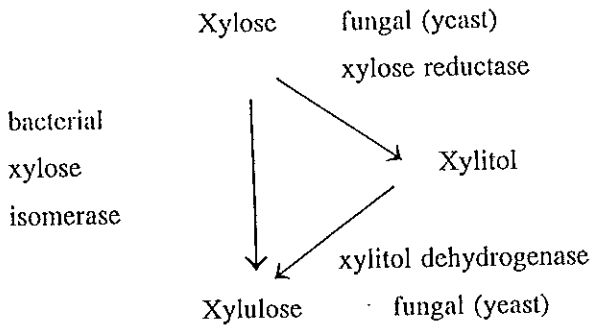
α	=	alpha
β	=	beta
BSA	=	bovine serum albumin
DEAE	=	diethylaminoethyl
DNS	=	3,5-dinitrosalicylic acid
EDTA	=	ethylenediaminetetra acetic acid
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine
YPDA	=	yeast extract, peptone, dextrose agar

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไซแลนหรือเฮมิเซลลูโลสคือสารประกอบคาร์บอนที่มีมาก (คิดเป็น 15%-35%) ในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง และผลิตผลทางการเกษตร หรือที่เรียกรวมๆ ว่าชีวมวลของพืช (plant biomass) จัดเป็นสารประกอบคาร์บอนในธรรมชาติที่นำหมุนเวียนกลับมาใช้ได้อีก โดยอาจใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) หรือสับสเตรตในการผลิตชีวโมเลกุลสำคัญบางชนิดเช่น ยาปฏิชีวนะ หรือผลิตสารเคมีที่มีคุณค่าต่างๆ ในความพยายามที่จะนำไซแลนมาใช้นั้น จุลินทรีย์นับว่ามีบทบาทสำคัญค่อนข้างมาก เนื่องจากมีเอนไซม์ในวิถีการสลายไซแลนให้เป็นหน่วยย่อยคือไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลคาร์บอนห้าตัวที่ถูกหมักได้ (fermentable sugar) และในการหมักไซโลสก็พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา หลายชนิดที่ใช้ไซโลสด้วยวิถี pentose-phosphate และ Embden-Meyerhof ได้ผลิตผลสุดท้ายเป็นแอลกอฮอลล์หรือสารอื่นๆ เช่นกรดอินทรีย์ (organic acid) คีโตน (ketones) หรือสารระเหย ซึ่งขึ้นอยู่กับประเภทของจุลินทรีย์ การใช้ไซโลสของแบคทีเรียในขั้นตอนแรก คือการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลสด้วยเอนไซม์ไซ โลสไอโซเมอร์เลส (xylose isomerase) ในขณะที่ยีสต์และเชื้อราจะเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็น xylulose โดยเอนไซม์ xylose reductase และ xylitol dehydrogenase (รูปที่ 1) (Alexander, 1986)



รูปที่ 1 วิถีการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส
ที่มา : ดัดแปลงจาก Alexander (1986)

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ให้ความสนใจในที่นี้ คือจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตของการหมักเป็นแอลกอฮอลล์ เพราะแอลกอฮอลล์เป็นสารเคมีที่มีประโยชน์นานับประการ โดยเฉพาะการนำมาผสมเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ จุลินทรีย์ที่รู้จักกันดีว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอลล์สูงคือยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถใช้ไซโลสได้ ต้องหมักน้ำตาลกลูโคสหรือไซลูโลสเท่านั้น จากการวิเคราะห์ตัวเลขต้นทุนและผลผลิตแอลกอฮอลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าแม้จะเพิ่มประสิทธิภาพการหมักด้วยน้ำตาลกลูโคสให้สูงสุดเพียงใดก็ตาม ก็ยังไม่สามารถลดต้นทุนได้เกินกว่า 2% ทั้งนี้เพราะ 70% ของค่าใช้จ่ายอยู่ที่สารตั้งต้นหรืออาหารเลี้ยงเชื้อนั่นเอง (Hollenberg and Wilhelm, 1987) นอกจากนี้ในแต่ละปีการผลิตน้ำตาลทั่วโลกมีไม่มากนัก (ตารางที่ 1) จึงทำให้น้ำตาลกลูโคสมีราคาแพง เพื่อที่จะทำให้ *Saccharomyces cerevisiae* หันไปใช้สารตั้งต้นอื่นที่มีมากกว่า ซึ่งในที่นี้ได้แก่ไซโลสได้นั้นจำเป็นต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่ให้มียีนของเอนไซม์ในวิถีการใช้ไซโลส ที่น่าจะทำง่ายที่สุดคือทดลองนำยีนไซโลสไอโซเมอร์เลสจากแบคทีเรียใส่เข้าไปใน *Saccharomyces cerevisiae* แต่ปรากฏว่าไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากยีนไม่มีการแสดงออก ในปีค.ศ. 1990 Kotter *et al.* จึงหันมาใช้ยีนของยีสต์แทน โดยโคลนยีน xylose reductase และ xylitol dehydrogenase จาก *Pichia stipitis* ให้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ยีนทั้งสองแสดงออกได้ดี ในที่สุดได้ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ใหม่ที่เปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นแอลกอฮอลล์ได้

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารประกอบคาร์บอน (ส่วนใหญ่เป็นโพลีแซคคาไรด์) ที่ผลิตในหนึ่งปี

ประเภท	ผลผลิตทั่วโลก (พันล้านตัน)
เซลลูโลส	100
เฮมิเซลลูโลส	40
แป้ง	1
น้ำตาล	0.1

ที่มา : Hollenberg และ Wilhelm (1987)

อย่างไรก็ตามน้ำตาลไซโลสยังไม่ใช่สับสเตรตเริ่มต้นที่นำมาใช้ได้ทันทีอยู่ดี เพราะน้ำตาลไซโลสในธรรมชาติอยู่ในรูปองค์ประกอบของไซแลนของชีวมวลพืช การนำมาใช้ต้อง

ผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์หรือกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยกรดและความร้อน ดังนั้นหาก *Saccharomyces cerevisiae* จะใช้ชีวมวลพืชเป็นวัตถุดิบ ภายใต้วิธีที่ต่อเนื่องก็ควรทำให้ *Saccharomyces cerevisiae* ที่หมักน้ำตาลไซโลสได้มียีนไซลาเนสและไซโลไซเดสด้วย แม้ยีนของไซลาเนสจะได้รับการโคลนและศึกษากันมามาก แต่ส่วนใหญ่เป็นของแบคทีเรีย หากโคลนเข้าไปในยีสต์ก็อาจเกิดปัญหาเช่นเดียวกับยีนไซโลสไอโซเมอร์เลส และข้อมูลที่ได้จากการติดต่อกับคณะวิจัยที่ Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University ประเทศญี่ปุ่น ยืนยันว่ายีนไซลาเนสจากแบคทีเรียไม่แสดงออกในยีสต์ ดังนั้นวิธีการที่ดีที่สุดก็คือโคลนยีนจากยีสต์ด้วยกัน ปัจจุบันพบว่ามียีสต์อยู่ไม่กี่สายพันธุ์ที่ผลิตไซลาเนสได้ ในจำนวนนี้ได้แก่ *Candida ergatensis, Cryptococcus albidus,* และ *Pichia stipitis* CBS5775 (Prior, *et al.* 1989), เมื่อไม่นานนี้ Molosoli, (1985) ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนไซลาเนสจาก *Cryptococcus albidus* เข้าไปและแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* (Biely, et al., 1980b; Molosoli, 1985) แม้ปริมาณเอนไซม์ที่ได้จาก *Saccharomyces cerevisiae* จะยังไม่มากก็ตาม

การมียีสต์อยู่เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่ใช้ไซแลนและเฉพาะ *Cryptococcus albidus* เท่านั้นที่ศึกษาในรายละเอียดจนถึงขั้นโคลนยีน ทำให้ข้อมูลที่เกี่ยวกับไซลาเนสและยีนของเอนไซม์จากยีสต์มีไม่มาก รวมทั้งขาดความหลากหลายของยีนเพื่อการเลือกใช้ ดังนั้นในปีพ.ศ. 2536 อมรรัตน์ พงศ์ดารา จึงได้ทำการทดลองสุ่มหายีสต์จากเปลือกผลไม้ที่มีความสามารถในการผลิตไซลาเนส พบว่า *Cryptococcus laurentii* เป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้ไซแลนได้ดี น่าที่จะนำมาศึกษาต่อในรายละเอียด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของเชื้อ *Cryptococcus laurentii* ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะเป็นประโยชน์ต่อการโคลนยีนในอนาคต นอกจากนั้นหากสามารถทำให้ *Cryptococcus laurentii* ผลิตเอนไซม์ได้ครั้งละมากๆ ก็จะทำให้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในงานเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม

<u>ตรวจเอกสาร</u>

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรและชีวมวลของพืชในปริมาณมากโดยเฉพาะหลังการเก็บเกี่ยวจะมีฟางข้าว ซังข้าวโพด กากชานอ้อย และเศษต้นพืชต่างๆ เป็นต้น วัสดุเศษเหลือใช้ประเภทเยื่อใยเหล่านี้ให้พลังงานต่ำเนื่องจากเป็นสารอินทรีย์ที่มีพันธะ β-(1→4)-glycosidic และมีลิกนิน (lignin) การนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้ประโยชน์จึงมักนำมาใช้ในรูปของการเลี้ยงสัตว์ เชื้อเพลิงเผาไหม้ให้พลังงาน ใช้เป็นปุ๋ยหมัก คลุมโคนต้นของพืชผัก ใช้เพาะเห็ด ทำกระดาษและถมที่ เป็นต้น (Inglett, 1973) เนื่องจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเหล่านี้มีหน่วยย่อยคือน้ำตาล หากย่อยสลายได้ก็สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ เพื่อการผลิตเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ โปรตีนเซลล์เดียว และแอลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งนับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

ลิกโนเซลลูโลสเป็นวัสดุเศษเหลือใช้ประเภทอินทรีย์วัตถุ มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ร่วมกับสารอินทรีย์อื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งถูกย่อยสลายได้ง่าย เช่น แป้ง และเพคติน (pectin) แต่สารอินทรีย์ขนาดเล็กเหล่านี้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (McCarthy, 1987)

ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ส่วนคือ ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส อัตราส่วนขององค์ประกอบแตกต่างกันตามแหล่งวัตถุดิบ ชนิดและอายุของพืช โดยองค์ประกอบเหล่านี้มีรายละเอียดของโครงสร้างต่างกันดังนี้

1. ลิกนิน เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenol) ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เป็นโพลิเมอร์ของ *p*-hydroxyphenylpropane ที่มาจากการเชื่อมโยงขององค์ประกอบ 3 กลุ่มคือ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol (Kirk, *et al.*, 1980) พันธะที่พบภายในโครงสร้างหลักนั้นมีมากกว่า 10 ชนิด และพันธะที่สำคัญคือ พันธะเอสเตอร์ (C-O-C) ซึ่งจะทนต่อการถูกย่อยสลายด้วยกรด นอกจากนี้ยังพบพันธะคาร์บอน (C-C) ซึ่งทนต่อการ

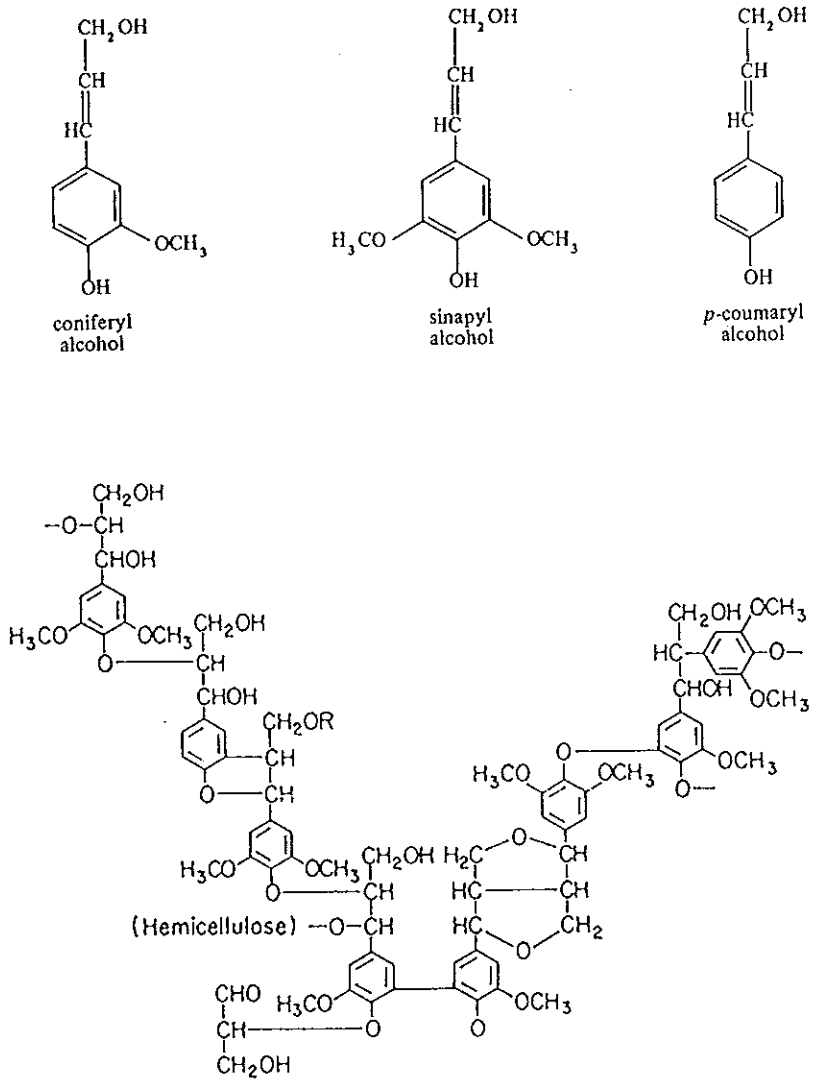
ย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง เป็นเหตุให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของลิกนิน แสดงดังรูปที่ 2 ในเนื้อไม้มีลิกนินเป็นองค์ประกอบร้อยละ 17-33

2. เซลลูโลส เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ [polysaccharides; $(C_6H_{12}O_6)_n$] ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ D-glucose หรือ D-anhydroglucopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1→4) glycosidic (แสดงดังรูปที่ 3) มีจำนวนกลูโคส 15-14,000 หน่วย โครงสร้างเล็กที่สุดของเซลลูโลสเรียกว่าไฟบริล (fibril) แบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนของ crystalline จัดเรียงกันอย่างเป็นระเบียบมีเป็นจำนวนมาก และส่วนของ amorphous จัดเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ ส่วนของ amorphous เป็นส่วนที่ดูดซับน้ำได้ดีสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่าส่วนของ crystalline เซลลูโลสมีปริมาณมากคิดเป็นร้อยละ 30-45 ของลิกโนเซลลูโลส์ (McCarthy, 1987)

3. เฮมิเซลลูโลส เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม และเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช ลิกโนเซลลูโลสมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบร้อยละ 20-40 (Saddler, *et al.*, 1983)การแบ่งเฮมิเซลลูโลสขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-แมนโนส (D-mannose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) และน้ำตาลแอล-อราบิโนส (L-arabinose) เฮมิเซลลูโลสจึงมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามกลุ่มของน้ำตาล เช่น ไซแลน แมนแนน (mannan) กาแลกแทน (galactan) และอราบิแนน (arabinan) ตามลำดับ ไซแลนเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสซึ่งจับกันด้วยพันธะ β-(1→4)-glycosidic เป็นสายหลักโดยมีกิ่งก้าน (side chain) เป็นน้ำตาลอราบิโนส, น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลแมนโนส (Bastawde, 1992)

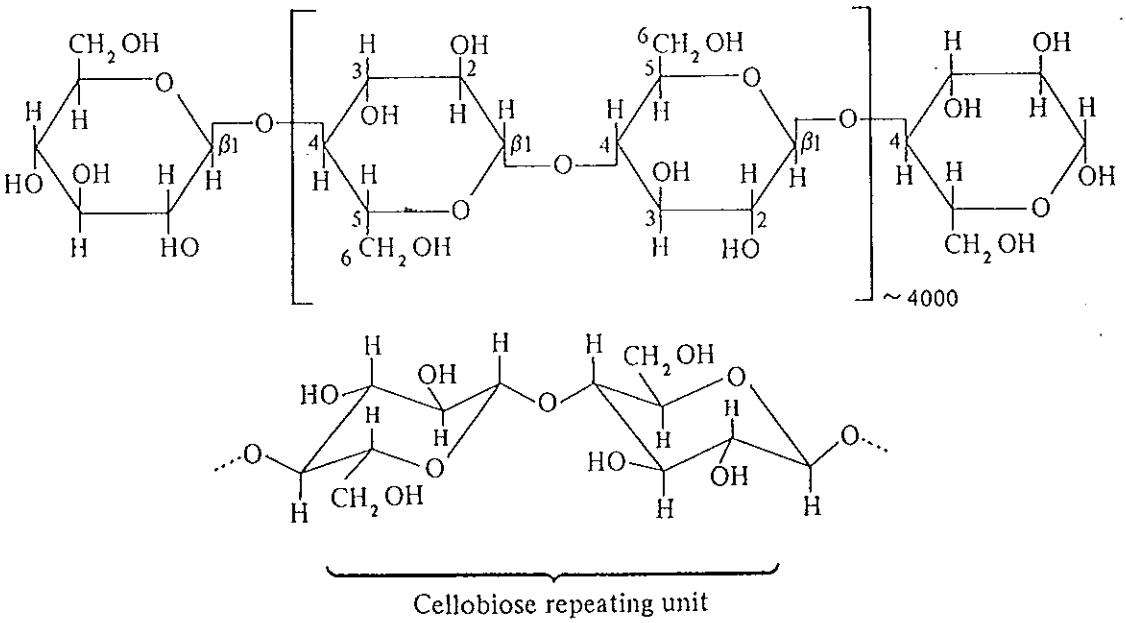
ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็น heterogeneous polysaccharides พบในเซลล์ของพืชบกและพบในทุกส่วนของพืช แม้ว่าไซแลนเป็นองค์ประกอบย่อยในผนังเซลล์ของพืชใบเลี้ยงคู่ แต่ไซแลนก็เป็นเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Wong, *et al.*, 1988) ไซแลนประกอบด้วยน้ำตาลดี-ไซโลสร้อยละ 85-93 ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลแอล-อราบิโนส และ glucuronic acid ไซแลนที่แยกได้จากพืชและหญ้าต่างๆ ล้วนแต่มีสายหลักของไซแลนที่



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของลิกนินในพวกพืชชั้นสูง (angiosperm)

ที่มา : Kirk (1983)



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา : Goodwin และ Mercer (1983)

เหมือนกันคือน้ำตาลดี-ไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β-(1→4)-D-xylopyranose ความแตกต่างขึ้นอยู่กับประเภทและปริมาณของหน่วยย่อยที่มาต่อเป็นกิ่งก้านเช่น glucuronic acid, น้ำตาลแอล-อราบิโนส และ 4-O-methylesters ของ D-glucuronic acid (Aspinall, 1959 อ้างโดย Bastawde, 1992)

ไซแลนจากไม้เนื้ออ่อนมีกิ่งก้านเป็น glucuronic acid ปริมาณน้อยกว่าไม้เนื้อแข็ง โดยทั่วไปไซแลนจากไม้เนื้อแข็งมีกลุ่ม acetyl 1 กลุ่มต่อน้ำตาลดี-ไซโลส 2 กลุ่ม แต่พันธะของหมู่ acetyl อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 แทนที่จะอยู่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (Biely, 1985) ไซแลนจากไม้เนื้ออ่อนมีหมู่ acetyl 1 กลุ่มต่อน้ำตาลดี-ไซโลส 9-12 กลุ่ม ขณะที่ไซแลนจากไม้เนื้อแข็งมีหมู่ glucuronic acid 1 กลุ่มต่อน้ำตาลดี-ไซโลส 5-6 กลุ่ม Bastawde (1992) แสดงให้เห็นว่าไซแลนจากไม้เนื้ออ่อนมีสายหลักที่ประกอบด้วยน้ำตาล 13 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1→4)-D-xylopyranose ต่อพันธะ α-(1→2)-4-O-methyl-α-D-glucuronic acid 3 หน่วย และพันธะ α-(1→3)-L-arabinofuranose 1 หน่วย นอกจากนี้ Roudier (1958 อ้างโดย Bastawde, 1992) พบว่ากิ่งก้านของไซแลนประกอบด้วย 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid ร้อยละ 95

ในการแยกสกัดเฮมิเซลลูโลสออกจากลิกนินทั้งในหญ้าและพืช สามารถทำได้โดยการทำปฏิกิริยากับด่าง เฮมิเซลลูโลสเพียงบางส่วนจากพืชถูกแยกสกัดได้โดยใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นหรือด่างอ่อน โดยทั่วไปใช้ KOH หรือ NaOH 4-10% จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัด (Bastawde, 1992)

Wilkie (1979) พบว่าถ้าต้องการสกัดเฮมิเซลลูโลสให้ได้มากที่สุดควรใช้ KOH 24% แต่พบว่ายังคงมีหมู่ acetyl ในไซแลนระหว่างการย่อย ในการย่อยตอข้าวบาร์เลย์ และข้าวไรย์ ด้วย NaOH 7% จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์เหล่านั้นลดลง 20% (Aspinall, *et al.*, 1969) การสกัดด้วยด่างเจือจางทำให้ได้ไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ขณะที่การสกัดด้วยด่างเข้มข้นจะแยกพวกไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง Angell และ Norris (1936 อ้างโดย Bastawde, 1992) พบว่าการสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดด้วยกรดพีเอช 3.7-4.2 จะให้ผลผลิตสูงสุดก่อนการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์หรือด่าง

คุณสมบัติของไซแลนโดยทั่วไปมีดังนี้คือ

1. ไซแลนที่ไม่มีหมู่ acetyl ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายด่างและสลายด้วยกรดได้ง่าย

2. ไซแลนที่มีหมู่ acetyl สามารถถูกสกัดด้วยน้ำร้อนและละลายน้ำได้มาก

3. ไซแลนที่มีหมู่ acetyl ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์

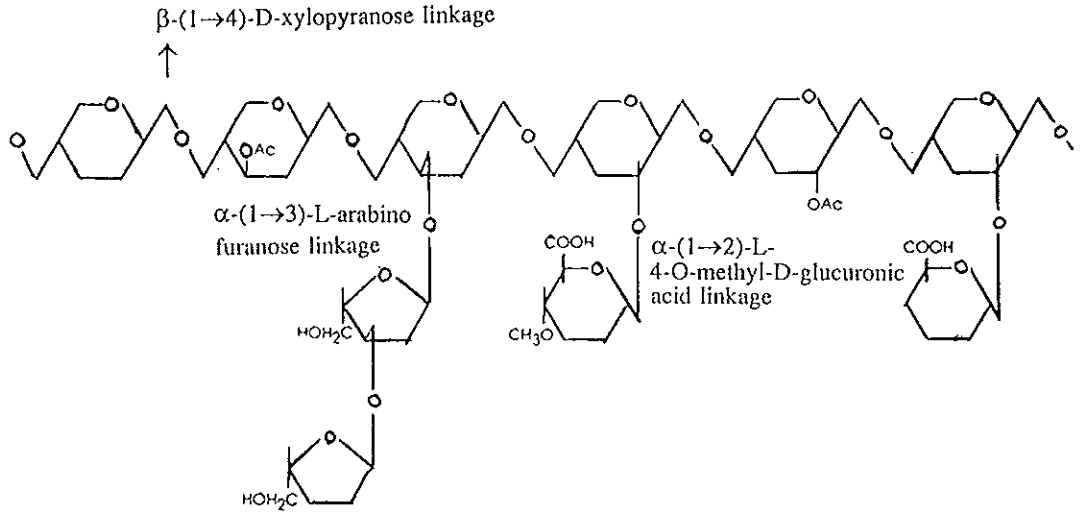
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยไซแลน

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าไซแลนคือส่วนประกอบหนึ่งของเฮมิเซลลูโลส นอกจากไซแลนแล้วยังมีอราบิแนน แมนแนน และกาแลคแตน โดยเรียกชื่อตามประเภทของหน่วยย่อยในสายหลัก ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจึงถูกเรียกรวมๆ ว่า เฮมิเซลลูเลส หรือ glucan hydrolase (EC 3.2.1) ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของสับสเตรตคือ L-arabinase ย่อยสลายเฉพาะพันธะ (1→3) และพันธะ (1→5)-2-L-arabino-furanosyl แล้วให้น้ำตาลแอล-อราบิโนสออกมา เอนไซม์ D-galactanase ย่อยสลายเฉพาะกาแลกแทน และน้ำตาลแอล-อราบิโน-ดี-กาแลกแทน เอนไซม์ D-mannanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะ (1→4)-β-D-mannanopyranosyl ของน้ำตาลดี-แมนแนน และเอนไซม์เบต้าไซลาเนส (β-xylanase) ตัดพันธะ β-(1→4)-D-xylopyranosyl ของไซแลน (Bastawde, 1992)

การย่อยไซแลนให้ได้เป็นหน่วยย่อยเล็กที่สุด พบว่านอกจากการย่อยน้ำตาลสายหลักแล้วยังต้องมีเอนไซม์อื่นอีกหลายประเภทเข้ามาเกี่ยวข้องเพื่อที่จะทำหน้าที่ย่อยกิ่งก้านซึ่งมีความหลากหลาย หรือแม้แต่ย่อยสายหลักที่อาจมีพันธะเป็น β-(1→2), β-(1→3) หรือ β-(1→3), β-(1→4) ได้ (Wong, *et al.*, 1988) แต่ละเอนไซม์ล้วนมีความเฉพาะเจาะจงต่อหน่วยย่อยและพันธะที่เชื่อม ดังแสดงในรูปที่ 4ก และ 4ข ในที่นี้จะแบ่งเอนไซม์ตามลำดับขั้นตอนการทำงานออกเป็น

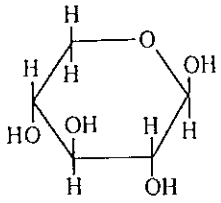
1. เอนไซม์ย่อยกิ่งก้าน

เอนไซม์ย่อยกิ่งก้านได้แก่เอนไซม์ที่มีหน้าที่กำจัดหน่วยย่อยที่เป็นกิ่งก้าน จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่จะทำหน้าที่ย่อยสายหลักไม่สามารถทำงานได้ หากไม่มีการกำจัดกิ่งก้าน

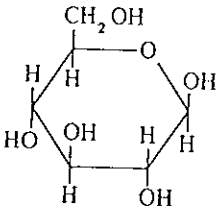


รูปที่ 4ก พันธะต่างๆ ในโครงสร้างของไซแลน

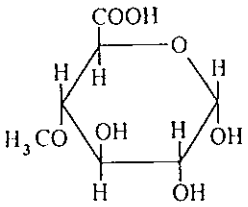
ที่มา : Thomsom (1993)



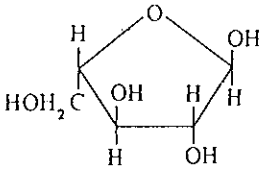
β-D-xylopyranose



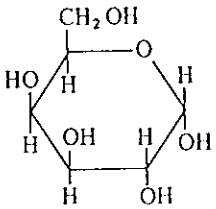
β-D-glucopyranose



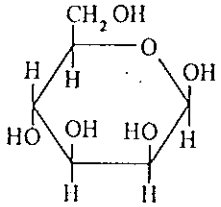
4-*O*-methyl-α-D-glucuronic acid



α-L-arabofuranose



α-D-galactopyranose



β-D-mannopyranose

รูปที่ 4ข หน่วยย่อยต่างๆ ของไซแลน

ที่มา : Goodwin และ Mercer (1983)

ออกไปเสียก่อน (Thomson, 1993) ดังนั้นการย่อยไซแลนในธรรมชาติจึงเริ่มต้นด้วยการตัดหน่วยของกิ่งก้านออกโดยเอนไซม์ต่อไปนี้

1.1 Acetylesterase (EC 3.1.1.6) ย่อยพันธะเอสเตอร์ที่ตรงตำแหน่งของหมู่ acetyl ต่อกับน้ำตาลไซโลส

1.2 α-L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไซโลสกับอราบิโนสได้น้ำตาลอราบิโนส

1.3 α-Glucuronidase (EC 3.2.1) ย่อยพันธะ α-(1→2)-4-O-methyl-α-D-glucuronic acid ผลผลิตที่ได้เป็น methylglucuronic acid

2. เอนไซม์ย่อยสายหลัก

เมื่อกิ่งก้านถูกกำจัดหมดแล้วสายหลักก็จะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดคือ (Bastawde, 1992)

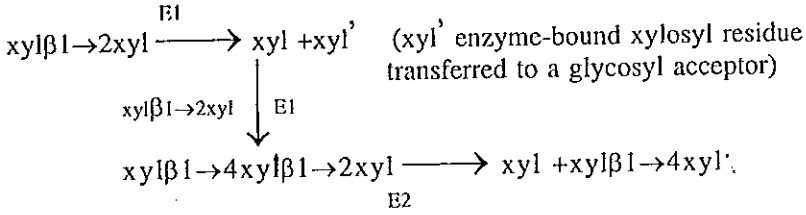
2.1 Endo-β-(1→4)-D-Xylanase [β-(1→4)-D-xylan xylano hydrolase, EC 3.2.1.8] ทำหน้าที่ย่อยพันธะ β-(1→4) ซึ่งอยู่ภายในสายหลักแบบสุ่มจึงได้ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylo-oligosaccharides) มีขนาดต่างกันหลายชนิด และน้ำตาลไซโลส

2.2 Exo-β-(1→4)-D-Xylanase [β-(1→4)-D-xylan xylohydrolase] ย่อยสลายไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ให้เป็นหน่วยย่อยจากด้านที่เป็น non reducing end แล้วให้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตผล

2.3 β-Xylosidase (Xylobiase EC 3.2.1.37) มีหน้าที่ย่อยไดแซคคาไรด์ซึ่งเป็นผลิตผลจากการทำงานของ endoxylanase และ exoxylanase ได้น้ำตาลไซโลส

3. เอนไซม์ที่ย่อยพันธะอื่นนอกเหนือจาก β-(1→4)

จากการศึกษาในยีสต์ *Cryptococcus albidus* Biely และ Petrakova (1984b) พบว่าในการสลายพันธะ β-(1→2) และ β-(1→3) ต้องผ่านกระบวนการ transglycosylation และ hydrolysis โดยเอนไซม์ β-xylosidase และ endo-β-(1→4)-xylanase และเกิดตัวกลางคือ trisaccharides, 4-O-β-D-xylopyranosyl-2-O-β-D-xylopyranosyl-D-xylopyranose (Xyl β 1→4 Xyl β 1→2 Xyl) ซึ่งสรุปเป็น pathway ได้ดังนี้



E1 = exo-β-xylosidase E2 = endo-β-(1→4)-xylanase

Royer และ Nakas (1991) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสที่บริสุทธิ์จากเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* พบว่าเอนไซม์ที่ได้ไม่มีแอคติวิตี้ของ carboxymethyl-cellulase และการย่อยไซแลนหรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ผ่านกระบวนการ transglycosylation ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลไบโอสและไซโลไตรโอส

วิธีการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

ในการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส โดยมากทำได้โดยบ่มเอนไซม์ไซลาเนสกับสารละลายไซแลนแล้วทำการวัดอัตราการเพิ่มขึ้นของผลผลิตจากปฏิกิริยา อาทิเช่น

Wang และ Broda (1992) รายงานวิธีการหาแอคติวิตี้ของ endoxylanase โดยดูความขุ่นของสารละลายไซแลนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูกย่อย ด้วยการบ่มสารละลายไซแลนกับเอนไซม์ไซลาเนส แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ความขุ่นจะลดลงเมื่อมีการย่อยเกิดขึ้น พบว่าวิธีการนี้สามารถวัดเฉพาะแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสโดยที่มีสารรีดิวซ์อื่นๆ และยังตรวจได้แม้ว่ามีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ต่ำ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่เหมาะสมกับการวัดสารละลายเอนไซม์ที่มีความขุ่น เพราะทำให้การวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้

Biely, *et al.* (1985) รายงานวิธีการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้สับสเตรต beechwood 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan ซึ่งมีพันธะเชื่อมกับ Remazol Brilliant Blue เป็นสับสเตรตมีสี และมีคุณสมบัติตกตะกอนในสารละลายแอลกอฮอล์ 96% เมื่อบ่มสับสเตรตนี้กับเอนไซม์ไซลาเนสและมีการย่อยเกิดขึ้น ผลิตผลที่ได้คือโมเลกุลที่มีสีมี

ขนาดเล็กลง และละลายได้ในแอลกอฮอล์ ทำให้สารละลายมีสีน้ำเงินเข้มขึ้นแปรผันตามปริมาณเอนไซม์ สามารถวัดความเข้มของสีได้ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือมีความจำเพาะและความไวสูง แต่สับสเตรตราคาแพงจึงยังไม่เป็นที่นิยมมากนัก

นอกจากนี้ยังมีวิธีการหาผลิตผลจากปฏิกิริยาโดยวิธีการตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) อาศัยปฏิกิริยาระหว่าง reducing end ซึ่งเป็น carboxyl group ของแต่ละโมเลกุลของน้ำตาลนั้นๆ กับสารเคมีซึ่งเป็น oxidizing agent บางตัว เช่น DNS reagent (Miller, 1959) สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัม การวิเคราะห์โดยวิธีนี้จะได้แอคติวิตี้ของทั้งเอนไซม์ไซลาเนสและไซโลซิเดส และวิธีนี้ไม่เหมาะกับการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์กับเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้ต่ำๆ

แหล่งของเอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ไซลาเนสพบได้ทั้งใน โปรคารีโอต (prokaryotes) และยูคารีโอต (eukaryotes) มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับเอนไซม์ไซลาเนสชนิดที่ผลิตภายนอกเซลล์ (extracellular) และผลิตภายในเซลล์ (intracellular) จากแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด เอนไซม์ไซลาเนสชนิดที่ผลิตในเซลล์พบในแบคทีเรีย ในเซลล์กระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง และโปรโตซัว (Dekker and Richards, 1976)

Taiz และ Honigman (1976) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีปริมาณสูงในพวกยูคารีโอตรวมทั้งโปรโตซัว แมลง หอยทากและเมล็ดพืชที่กำลังงอก

Udombunditkul, *et al.* (1990) รายงานว่ามีเอนไซม์ไซลาเนสเกิดขึ้นในขณะที่เมล็ดข้าวเจ้า (*Oryzae sativa japonica*) กำลังงอก

ในจุลินทรีย์เอนไซม์ไซลาเนสพบทั้งในแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ในแบคทีเรียพบเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aeromonas caviae* W-61 (Viet, *et al.*, 1991) *Bacillus polymyxa* (Morales, *et al.*, 1993) *Bacillus pumilus* (Panbangred, *et al.*, 1983) *Bacillus circulans* (Esteban, *et al.*, 1982) ในเชื้อราพบในราพวก *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus oryzae* (Bailey and Viikari, 1993) *Aspergillus ochraceus* NG-13 (Biswas, *et al.*, 1990) *Aspergillus kawachii* (Ito, *et al.*, 1992) *Trichoderma koningii* G-39 (Huang, *et al.*, 1991) และ

Arthrographis sp. F-4 (Okeke and Obi, 1993) เอนไซม์ไซลาเนสพบในยีสต์พวก *Cryptococcus* เช่น *Cryptococcus flavus* (Nakanishi, *et al.*, 1984) *Cryptococcus albidus* var. *aerius* (Notario, *et al.*, 1979) เป็นต้น และยังพบในยีสต์อื่น *Trichosporon beigelii* (Stevens and Payne, 1977) และ *Aureobasidium pullulans* (Leathers, *et al.*, 1984)

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์

Notario, *et al.* (1979) เป็นผู้เริ่มศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสของยีสต์ *Cryptococcus albidus* var. *aerius* ที่เจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเอนไซม์ β-(1→4)-D-xylanase มีอยู่ทั้งในเซลล์ นอกเซลล์ และผนังเซลล์ เมื่อนำเซลล์ใส่ในกรดความเข้มข้นต่ำมี แอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์ และยังพบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่ผนังเซลล์หลังจากทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้เกลือความเข้มข้นสูง เอนไซม์จะถูกปล่อยออกมาอยู่อย่างอิสระแต่เอนไซม์ส่วนนี้ไม่มีความคงตัว การผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อเริ่มเข้า log phase ของการเจริญ แอคติวิตี้ของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 5.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์นี้ย่อยไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ โดยตัดจากภายในของโครงสร้าง (endo-splitting mechanism) ให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นพวกน้ำตาลไซโลไบโอส น้ำตาลไซโลไตรโอส และน้ำตาลไซโลส นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนโลหะหลายชนิดมีผลยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์เช่น Ag^{2+} และ Hg^{2+}

เอนไซม์ไซลาเนสของแบคทีเรียมักถูกชักนำให้มีการสังเคราะห์ด้วยไซแลน แต่เนื่องจากโมเลกุลของไซแลนมีขนาดใหญ่จึงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นเชื้อจะผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณต่ำเพื่อย่อยไซแลนให้มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน เชื้อ *Streptomyces* sp. จะถูกชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสด้วย non-metabolizable methyl-β-D-xylosides ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ใหม่ (Marui, *et al.*, 1985) Tangnu, *et al.* (1981); Srinivasan, *et al.* (1984 อ้างโดย Bastawde, 1992) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Actinomycetes* ใช้ไซแลนกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรรวมทั้งรำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า และกากชานอ้อย McCarthy, (1987) ศึกษาเชื้อแบคทีเรียทนความร้อน *Actinomycetes* 4 ชนิดเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ไซแลนและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นตัวชักนำ และเสนอว่าเอนไซม์ไซลาเนสถูกผลิตออกมาแบบ

constitutive ปริมาณน้อย เอนไซม์ส่วนนี้สามารถย่อยไซแลนให้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งกลายเป็นตัวชักนำ เพื่อส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามโมโนแซคคาไรด์ เช่นน้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลฟรุกโตส เมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

Esteban, *et al.* (1982) พบว่า *Bacillus circulans* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส แต่ถูกชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ได้ด้วยไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งเกิดจากการย่อยไซแลนในอาหารด้วย constitutive enzyme ปริมาณน้อย

การชักนำให้เซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลนนั้น มักพบว่าสารชักนำเหล่านี้จะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน อาทิเช่นเชื้อ *Streptomyces* sp. จะใช้ alkyl-β-D-xylosides หรือ aryl-β-D-xylosides เป็นสารที่ชักนำในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (Nakanishi, *et al.*, 1984) และยีสต์ *Cryptococcus albidus* จะใช้ β-(1→4)-xylooligosaccharides เป็นตัวชักนำ (Biely, *et al.*, 1980a)

Biely และ Petrakova (1984a) ยังพบอีกว่าทั้งอัลฟาไซโลไบโอส (α-xylobioses) และเซลโลไบโอส (cellobiose) ไม่เป็นตัวชักนำในระบบการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนของยีสต์ *Cryptococcus albidus* ประสิทธิภาพของตัวชักนำในการผลิตเอนไซม์นี้จะขึ้นกับความเข้มข้นของตัวชักนำในอาหารและเวลาในการเลี้ยงด้วย ตัวชักนำที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ β-(1→4)-xylobiose ใช้ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.1-0.2 มิลลิโมลาร์ ก็ทำให้ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาเนสได้ในเวลาอันสั้น แต่เมื่อใช้ β-(1→2)-xylobiose เป็นตัวชักนำ พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 2-10 มิลลิโมลาร์ จึงจะสามารถชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้

การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนสำคัญในการศึกษาเอนไซม์ โดยมีลำดับขั้นตอนในการแยกหลายขั้นตอน ส่วนใหญ่ขั้นตอนแรกในการทำให้บริสุทธิ์คือการตกตะกอนเอนไซม์ที่ต้องการออกจากโปรตีนอื่นๆ และสิ่งเจือปนบางส่วน โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลง ionic strength ของสารละลายเอนไซม์ โมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีประจุมักจะละลายได้น้อยในน้ำ

บริสุทธิ์ แต่เมื่อเติมไอออนลงไปจะทำให้การละลายของโปรตีนนั้นดีขึ้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า salting in แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนให้มากขึ้นเกินจุดๆ หนึ่ง โมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีประจุเหล่านี้จะตกตะกอนได้เรียกว่า salting out (ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, 2530) สารที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็น 3 พวกใหญ่ๆ คือ 1. เกลือบางชนิด ได้แก่เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) เกลือโซเดียมฟอสเฟต (disodium phosphate) 2. ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) เช่น เมธานอล (methanol) เอธานอล (ethanol) โพรพานอล (propanol) และอะซิโตน (acetone) 3. สารอื่นๆ ที่ทำให้โปรตีนตกตะกอนเช่น polyethylene glycol (PEG), เคซิน (casein) และ diatomaceous earth เป็นต้น (Scopes, 1978) อาจใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือใช้ร่วมกันในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ชนิดนั้น ซึ่งสารที่นิยมใช้คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีลักษณะที่ดีดังต่อไปนี้

1. มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มการไม่ละลายระหว่างโปรตีนกับโปรตีน
2. มีความสามารถละลายได้สูงถึง 4 โมลาร์
3. ราคาไม่แพง เมื่อมีความบริสุทธิ์ที่เหมาะสม
4. เมื่อละลายจนมีสภาพอิ่มตัวแล้วยังคงมีความหนืดและความหนาแน่นต่ำ

เมื่อโปรตีนตกตะกอนแล้วจะสามารถแยกโปรตีนออกจากสารละลายได้โดยการกรองหรือปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนออก เอนไซม์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์เล็กน้อย จำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการอื่นต่อไป การตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน มีการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซนต์ความอิ่มตัวในช่วงต่างๆ ดังในตารางที่ 2

นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดสามารถใช้ตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสได้ด้วยเช่น เอธานอล Keskar, *et al.* (1989) ทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์โดยเชื้อ *Streptomyces* T7 ชนิดทนความร้อนโดยทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอธานอล ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตี้เพิ่มขึ้นเป็น 41.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4.14 เท่า

Royer และ Nakas (1991) ตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma longibrachiatum* โดยใช้เอธานอลความเข้มข้น ในอัตราส่วนระหว่าง 2.5:1-10:1 ของเอธานอลต่อสารละลายเอนไซม์ในการตกตะกอนเอนไซม์ พบว่าสามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์

ตารางที่ 2 ช่วงเปอร์เซนต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่แยกจากจุลินทรีย์ต่างๆ

แหล่งเอนไซม์	เปอร์เซนต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus kawachii IFO 4308	60	Ito, *et al.* (1992)
Aspergillus ochraceus NG-13	30-60	Biswas, *et al.* (1990)
Aureobasidium pullulans Y-2311-1	30-50	Li, *et al.* (1993)
Bacillus pumilus	20-60	Panbangred, *et al.* (1983)
Streptomyces roseiscleroticus	30-50	Grabski และ Jeffries (1991)

ขึ้น 2.3 เท่า และแอคติวิตี้จำเพาะเพิ่มจาก 100.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนเป็น 231.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

กระบวนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่นิยมคือ การทำโครมาโตกราฟีด้วยตัวกลางชนิดต่างๆ เพื่อแยกโปรตีนออกตามความแตกต่างของคุณสมบัติเช่น ขนาดของโมเลกุล และประจุเป็นต้น หลังจากการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงมีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยส่วนใหญ่ทำการศึกษาเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ อุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อความคงตัวของเอนไซม์ ค่า pI ของเอนไซม์ ค่าทางจลนพลศาสตร์ (kinetics) K_m และ V_{max} ผลของไอออนโลหะและสารยับยั้งต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์รวมทั้งความสามารถในการย่อยสับสเตรตของเอนไซม์

John, *et al.* (1979) ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งแยกได้จากดินในป่าแถบเส้นศูนย์สูตรทวีปแอฟริกา แล้วสามารถแยกเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์ได้ 5 ชนิดโดยใช้เจลฟิวเตรชั่น (gel filtration) และโครมาโตกราฟีชนิด hydroxylapatite และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส 5 ชนิด พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่แยกได้ 3 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล 31,000 ดาลตัน และอีก 2 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 ดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์อยู่ในช่วง 4.0-6.5

Biely, *et al.* (1980b) ศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus albidus* ในอาหารที่มี β-(1→4)-xylan พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตเป็นแบบ extracellular endo-β-(1→4)-xylanase และทำการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีชนิด DEAE-cellulose ตามด้วย CM-Sephadex และ Biogel P-100 หรือ Biogel A ตามลำดับ เอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วสามารถย่อยไซแลนได้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลไซโลไบโอส และน้ำตาลไซโลไตรโอส

Panbangred, *et al.* (1983) ทำการเลี้ยง *Bacillus pumilus* IPO เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิด DEAE-Sephadex A-50 ตามด้วย CM-Sephadex C-10 พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีเพียงชนิดเดียว

Nakanishi, *et al.* (1984) แยกเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตออกนอกเซลล์ของยีสต์ *Cryptococcus flavus* โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด SP-Sephadex C-25 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตันโดย SDS-PAGE และ เมื่อวัดน้ำหนักโมเลกุลด้วยเจลฟิว

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

เตรชั่น ชนิด Bio-gel P-100 พบว่ามีขนาด 23,000 ดาลตัน เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีค่า pI เท่ากับ 10.0 พีเอชที่เหมาะสม 4.5 และเอนไซม์คงตัวในช่วงพีเอช 3.0-8.0 สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส และคงตัวที่อุณหภูมิเพียง 45 องศาเซลเซียส

Tan, *et al.* (1987) ทำการพัฒนาวิธีการแยกเอนไซม์ไซลาเนสออกจากเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* E 58 ขั้นตอนแรกในการแยกเอนไซม์คือ Ultrafiltration โดยใช้แผ่นกรองเมมเบรนที่มีขนาดของรูเล็กมากเพื่อกำจัดโปรตีนขนาด 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้มาทำให้เข้มข้นแล้วผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบ cation exchange ชนิด SP-Zeta Prep 250 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่แยกได้มี 3 ชนิด และมีน้ำหนักโมเลกุล 20,000, 22,000 และ 29,000 ดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE

Keskar, *et al.* (1989) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Streptomyces* T7 ชนิดทนความร้อนสามารถทำให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอธานอล 3 เท่าของปริมาตรเอนไซม์ นำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DEAE-cellulose รวมสารละลายเอนไซม์ที่ได้และทำให้เข้มข้นด้วยแผ่นกรองเมมเบรนชนิด Amicon UM 10 membrane จากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์บนคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephadex G-50 เอนไซม์ที่ผ่านการเตรียมบริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 41.3 เท่า และมีแอคติวิตี้จำเพาะเพิ่มเป็น 412.8 จาก 100 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

Biswas, *et al.* (1990) ศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* NG-13 ทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephadex G-75 ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้พบว่า เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 6.0 และคงตัวในพีเอชช่วง 5.0-10.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวที่ 50 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เป็น 48,000 ดาลตันโดย SDS-PAGE และ 50,000 ดาลตันโดยเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephadex G-75 เมื่อเติม K^+ ไอออนแอคติวิตี้ของเอนไซม์สูงขึ้นและทนอุณหภูมิสูงขึ้น แต่สารจำพวก Thiol เช่น Hg^{2+}, *p*-hydroxymercuribenzoate (PHMB), 3',5'-dithiobis (2'-nitrobenzoic acid) (DTNB) และ N-ethylmaleimide (NEM) มีผลยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

Misha, *et al.* (1990) พบว่าการทำเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Lentinula edodes* ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนด้วย 0.9% polyethylenimine แล้วทำให้เข้มข้น

ด้วย ultrafiltration จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-trisacryl เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์เป็นชนิด non-debranching endo-β-D-xylanase ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 41,000 ดาลตัน ใน SDS-PAGE

Grabski และ Jeffries (1991) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces roseiscleroticus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและนำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยขั้นแรกทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration ชนิด Amicon YM-5 (MW cut off 5,000) ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 30-50 สารละลายเอนไซม์ที่ได้ทำให้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด carboxymethyl Bio-Gel A ตามด้วยเรซินชนิด Mono-S cation-exchange พบว่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มเป็น 45.1 เท่าจากเริ่มต้น และแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์เพิ่มจาก 4.3 เป็น 194.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

Viet, *et al.* (1991) รายงานว่าเอนไซม์ β-(1→4)-xylanase ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* W-61 ที่ทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DEAE-Sephadex A-50 ตามด้วย CM-Sephadex C-50 และ Sephadex G-100 ตามลำดับ เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 22,000 ดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ เอนไซม์คงตัวที่พีเอช 7.0 และทนอุณหภูมิได้ถึง 50 องศาเซลเซียส ค่า pI ของเอนไซม์เท่ากับ 9.2 เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ไม่สามารถย่อยแป้ง เซลลูโลส carboxymethylcellulose หรือ β-(1→3)-xylan เมื่อย่อยไซแลนได้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดเช่น น้ำตาลไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส ไซโลเตตาโอส และไซโลเพนโตส

Huang, *et al.* (1991) รายงานการศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Trichoderma koningii* G-39 เอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนชนิด SP-Trisacryl-M และเจลฟิวเตรชั่นชนิด Fractogel TSK HW-50F เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 21,500 ดาลตันเมื่อหาด้วยวิธี SDS-PAGE และมีค่า pI เท่ากับ 8.9 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์คือ 5.5 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้ไม่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ค่า K_m เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรตและ V_{max} เท่ากับ 1.85×10^6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเอนไซม์ สารเคมีบางชนิดเช่น Hg^+ (1 มิลลิโมลาร์) และ SDS (10 มิลลิโมลาร์) มีผลยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ Ca^{2+} ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์เมื่อใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และมีผลยับยั้งปฏิกิริยาร้อยละ 80 เมื่อความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Ito, *et al.* (1992) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus kawachii* IFO 4308 มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสชนิดที่ผลิตภายนอกเซลล์ 5 ชนิด เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60 กำจัดเกลือด้วย Biogel P 2 ตามด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DEAE-5PW และทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด G3000-SW พบว่ามี 3 ชนิด เป็นเอนไซม์หลักคือ XylA, XylB และ XylC ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 35,000, 26,000 และ 29,000 ดาลตัน ตามลำดับ ค่า pI ของเอนไซม์ XlyA, XylB และ XylC เท่ากับ 6.7, 4.4 และ 3.5 ตามลำดับ และเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0-10.0, 3.0-10.0 และ 1.0-9.0 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวในช่วงพีเอชเป็นกรดโดยเฉพาะ XylC จึงจัดว่าเป็น acidiophilic xylanase (acid xylanase)

Morales, *et al.* (1993) ศึกษาการทำเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus polymyxa* ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DEAE-Biogel A จากนั้นนำเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้มาผ่านคอลัมน์แบบเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephadex G-100 ซึ่งสามารถแยกเอนไซม์ได้หลายชนิด คือ X34C, X34E และ X22 เมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 34,000, 34,000 และ 22,000 ดาลตัน ตามลำดับ

ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนส

1. Bioconversion เป็นกระบวนการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก การใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาล ระบบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดสและเอนไซม์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในการย่อยกิ่งก้านของไซแลน การนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมต้องคำนึงว่าเอนไซม์ที่ผลิตต้องมีราคาถูก แอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าสูง และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยไซแลน อาจใช้เอนไซม์หลายชนิดจากจุลินทรีย์หลายชนิดหรือจากจุลินทรีย์ชนิดเดียวที่เจริญในสภาวะที่ต่างกัน (Wong, *et al.*, 1988)

2. Biopulping เป็นการใช้เอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์ที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลลูเลสในอุตสาหกรรมกระดาษ เนื่องจากวัสดุเริ่มต้นของการทำกระดาษมาจากเยื่อไม้สกัด

ซึ่งมีส่วนประกอบของเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส โดยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสบางส่วนเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้เส้นใยของกระดาษมีความแข็งแรง ในขั้นตอนการทำให้กระดาษขาว โดยผ่านกระบวนการฟอกจะต้องกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสบางส่วนออก ซึ่งมักใช้เอนไซม์เช่นเปอร์ออกซิเดสและคลอไรด์ เพื่อทำลายพันธะระหว่างลิกนิน-เซลลูโลส ลิกนิน-เฮมิเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส-เซลลูโลส คลอไรด์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษปริมาณมากนี้ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีรายงานโดยสื่อมวลชนในสหรัฐอเมริการะบุว่าน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษที่มีปริมาณคลอไรด์สูงเป็นอันตรายต่อสุขภาพ และมีคำสั่งให้ลดปริมาณการใช้ลง ดังนั้นไซลาเนสจึงนับว่าเป็นเอนไซม์สำคัญที่จะนำมาใช้แทนที่คลอไรด์ ซึ่งจากการทดลองโดย Paice และ Jurasek (1984) ที่ใช้ไซลาเนสทำลายพันธะระหว่างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ปรากฏว่าสามารถทำให้ลิกนินหลุดออกจากเยื่อกระดาษได้ดี นอกจากนั้นการเลือกใช้ไซลาเนสที่มีความจำเพาะต่างๆ จะช่วยในการเตรียมกระดาษที่มีคุณภาพแตกต่างกันไป ดังนั้นการศึกษาเพื่อผลิตไซลาเนสประเภทต่างๆ ให้มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณมากจึงมีความสำคัญต่ออนาคตของอุตสาหกรรมกระดาษ

3. การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมอื่นๆ ไซลาเนสถูกนำไปใช้งานลักษณะเช่นเดียวกับเอนไซม์เพคติเนส (pectinases) และเซลลูเลส เช่น การทำให้น้ำผลไม้ใสในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ การเตรียม dextran เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคือ ใช้เป็นพวกสารที่ทำให้ข้น (thickeners) และใช้ในการผลิต fluids และ juices จากวัสดุพวกพืช (Wong, *et al.*, 1988)

ในอนาคตหวังว่าจะมีการนำเอนไซม์ไซลาเนสไปใช้ประโยชน์ที่น่าจะเหมาะสมกว่านี้ เช่นการนำไปย่อยไซแลนเพื่อเป็นอาหารสัตว์ซึ่งช่วยปรับปรุงการย่อยให้ได้เซลลูโลสและเป็นการช่วยปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของอาหารสัตว์ด้วย อย่างไรก็ตามการแยกไซแลนออกจากอาหารสัตว์ทั้งหมดก็ไม่ใช่สิ่งดี เพราะเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญของกากอาหาร และอาจทำให้เป็นโรคเกี่ยวกับระบบการย่อยอาหาร และการขับถ่ายมากขึ้น

นอกจากนี้เอนไซม์ไซลาเนสยังใช้ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์ เช่น การนำเอนไซม์ไซลาเนสมาย่อยผนังเซลล์เพื่อการผลิต protoplast ของพืช การศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสในการผลิต branch/unbranch short/long หรือ labeled xylo-oligosaccharides และยังสามารถนำมาผลิตแอนติบอดี้ เพื่อตรวจหาเอนไซม์ไซลาเนสซึ่ง

สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในลักษณะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส การตรวจผนังเซลล์ของพืช และโรคพืช

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากการเจริญของยีสต์ *Cryptococcus laurentii* ในอาหารเหลว
2. ศึกษาขั้นตอนและวิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*
3. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสที่แยกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณสูงเป็นเชื้อที่แยกได้จากเปลือกผลไม้ เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็นยีสต์ *Cryptococcus laurentii* (แยกและจำแนกสายพันธุ์โดย อมรรัตน์ พงศ์ดารา ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) การเก็บรักษายีสต์บนอาหารวุ้นเอียงสูตร YPDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาทำการถ่ายเชื้อทุก 1 เดือน

ยีสต์ *Pichia stipitis* CBS 5775 และ CBS 5776 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. C.P. Hollenberg, Institut fiir Mikrobiologie Heirich-Heine Universitat Dusseldorf, Germany.

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสูตร SD-glucose ประกอบด้วย yeast nitrogen base 0.67% และน้ำตาลกลูโคส 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นอาหารสำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้น (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก)

อาหารสูตร SD-xylan ประกอบด้วย yeast nitrogen base 0.67% และไซแลน 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นอาหารสำหรับกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข)

อาหารสูตร SD-xylan ประกอบด้วย yeast nitrogen base 0.67% และกลูโคส 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นอาหารสำหรับกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ค)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPDA ประกอบด้วย Yeast extract 1 กรัม Peptone 2 กรัม Dextrose 2 กรัม และ Agar 15 กรัม สำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

3. สารเคมี

3. 1 สารเคมีที่ใช้ในการหาค่าแอคติวิตี้เอนไซม์ไซลาเนส

3. 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ก)

3. 3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ก)

3. 4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี (ภาคผนวก ข)

3. 4. 1 DEAE-cellulose (Pharmacia)

3. 4. 2 Sephacryl S-300 (Pharmacia)

3. 5 สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) แบบ slab gel (ภาคผนวก ก)

<u>อุปกรณ์</u>

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Model Spectronic 21 ของบริษัท Milton Roy

1. 2 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Model Spectrophotometer Ultrospec III ของบริษัท Pharmacia

1. 3 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดปรับอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) Model Z 382 K ของบริษัท TLG

1. 4 เครื่องปั่นเหวี่ยง Model Z230 A ของบริษัท TLG

1. 5 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Model 109 pH/mV meter ของบริษัท Activon

1. 6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Model 2000 C ของบริษัท Precisa

1. 7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งของบริษัท Sartorius

1. 8 เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer) Model G-560E ของบริษัท Scientific Industries Inc.

1. 9 เครื่องกวน (hot plate stirrer)

1. 10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Lab-line Instruments Inc.

1. 11 ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow cabinet) และอุปกรณ์เขี่ยเชื้อ

1. 12 ตู้บ่มเชื้อ

1. 13 หม้อนึ่งความดัน

1. 14 กล้องจุลทรรศน์ Model CH-B145-T-S ของบริษัท Lab-line Instruments Inc.

1. 15 เครื่องเขย่า (incubator shaker) ของบริษัท Lab-line Instruments Inc.

1. 16 เครื่อง fraction collector Model 2110 ของบริษัท BIO-RAD

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ slab gel

2. 1 กระจกขนาด 100x120 มิลลิเมตร

2. 2 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) Model 1,000/500 ของบริษัท Bio-Rad

2. 3 Microsyringe-100 µl ของบริษัท Robbins Scientific

2. 4 Chamber Model AE-6400 ของบริษัท ATTO Corporation

<u>วิธีการ</u>

1. การวิเคราะห์

1. 1 การหาแอคติวิตี้ (activity) ของเอนไซม์ไซลาเนส

การหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Biely, *et al.*, 1980a)

1. 1. 1 สับสเตรต (substrate) สับสเตรตที่ใช้คือ สารละลาย oat spelt xylan ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น ทำการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ไซแลนละลายมากที่สุด แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที (9,000xg) นาน 5 นาที เพื่อแยกไซแลนส่วนที่ไม่ละลายออกไป ส่วนใสที่ได้จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

1. 1. 2 เอนไซม์ เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นเหมาะสมโดยเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พี เอช 7.0

1. 1. 3 วิธีวิเคราะห์ ปริมาตรทั้งหมดของส่วนผสม (reaction mixture) 0.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารละลายไซแลน (จากข้อ 1.1.1) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 0.21 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม 0.04 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Miller (1959) ซึ่งหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที รอให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่

550 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส (ภาคผนวก ก)

ในการวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์มีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่างๆเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วไม่มีการบ่ม แต่จะหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป นำไปต้มและทำตามวิธีการข้างต้น ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมถูกนำไปใช้หักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากชุดปฏิกิริยาได้เป็นค่าที่แท้จริง สำหรับการคำนวณหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารละลาย oat spelt xylan ได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล (μmol) ในเวลา 1 นาที

ค่าแอคติวิตี้จำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ไซลาเนส มีค่าเป็นจำนวนยูนิตของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

1. 2 โปรตีน

ปริมาณโปรตีนวิเคราะห์ตามวิธีการของ Lowry, et al. (1951) (ภาคผนวก ก)

2. ความสามารถของ *Cryptococcus laurentii* ในการใช้ไซแลนบนอาหารแข็ง

เลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus laurentii* หนึ่งโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข ที่มี oat spelt xylan 1% ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใสที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *Pichia stipitis* CBS 5775 และ CBS 5776 เป็นเชื้อเปรียบเทียบ

3. ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ในอาหารเหลว

3. 1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus laurentii* มาหนึ่งโคโลนีลงในหลอดแก้วขนาด 16x125 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. 2 การผลิตเอนไซม์เมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.1 มาปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที (11,000xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนเชื้อออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งครั้ง แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2.5 ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ในการศึกษาทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 4 วัน โดยบันทึกค่าความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง 420 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสตามข้อ 1.1.3

3. 3 การผลิตเอนไซม์เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.1 มาปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที (11,000xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนเชื้อออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งครั้ง แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2.5 ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ค 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ในการศึกษาทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 4 วัน โดยบันทึกค่าความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง 420 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสตามข้อ 1.1.3

4. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จาก *Cryptococcus laurentii*

4. 1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสปริมาณมาก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก บรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อ 1 โคโลนีลงในอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างตะกอนเชื้อหนึ่งครั้งด้วยน้ำกลั่น และละลายตะกอนในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 6 ฟลาสก์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2)

4. 2 การสกัดเอนไซม์

นำสารละลายข้อ 4.1 ปั่นแยกเซลล์ยีสต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที (11,000xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้คือสารละลายเอนไซม์สกัด (crude enzyme) นำมาวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสตามข้อ 1.1.3

4. 3 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายจากข้อ 4.2 มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน แบ่งระดับความอิ่มตัว 0-20%, 20-40%, 40-60% และ 60-80% โดยค่อยๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยอย่างช้าๆ ขณะกวนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตามความเข้มข้นที่ต้องการละลายหมด สังเกตเห็นสารละลายขุ่นเล็กน้อย เนื่องจากโปรตีนตกตะกอน นำมาปั่นแยกเพื่อเก็บตะกอนโปรตีนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที (15,000xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แยกส่วนตะกอนที่ได้ในแต่ละขั้นมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับส่วนใสถูกนำมาเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อจนมีความอิ่มตัวเป็น 40, 60 และ 80% และปั่นแยกตะกอนในแต่ละช่วงตามลำดับ

4. 4 การกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิส (dialysis)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.3 บรรจุลงในถุงไดอะไลซิส (dialysis tubing) ที่มีขนาดของรูสำหรับกำจัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับหรือต่ำกว่า 3,500 (Molecular weight cut off 3,500) ผูกถุงให้แน่นและแช่ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยมีสัดส่วนคือ สารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ส่วน มีการกวนสารละลายบัฟเฟอร์ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายในถุงไดอะไลซิสมาปั่นเหวี่ยง เพื่อกำจัดตะกอนอื่นๆ ที่อาจมีออกไป ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที (15,000xg) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส วัดปริมาณโปรตีน และปริมาตรของสารละลายทั้งหมด

4. 5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange chromatography)

นำสารละลายจากข้อ 4.4 เฉพาะส่วนที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์มาผ่านเรซินแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-cellulose (Diethylaminoethyl-cellulose) ซึ่งเป็น anion exchange โดยใช้คอลัมน์ขนาดปริมาตร 100 มิลลิลิตร (2.6x30 เซนติเมตร) อัตราการไหลของ

ตัวชะ 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายเอนไซม์ในหลอดแก้วปริมาตร 4 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วยเครื่อง fraction collector และทำการปรับสมดุลย์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 4 bed volume แล้วเริ่มชะโปรตีนที่เกาะกับเรซินด้วยการทำ linear gradient elution ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละหลอด ปริมาตร 4 มิลลิลิตร หาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสมารวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นโดยการใช้ถุงไดอะไลซิสที่ยอมให้สารน้ำหนักโมเลกุลขนาดเท่ากับหรือต่ำกว่า 3,500 เท่านั้นที่ผ่านออกได้ และใช้ผงเซลลูโลส (Whatman) ดูดซับน้ำ เพื่อใช้ในการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

4. 6 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชั่น (gel filtration)

นำสารละลายเอนไซม์จากการผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน มาแยกต่อโดยผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300 โดยใช้คอลัมน์ขนาดปริมาตร 65 มิลลิลิตร (2.2x30 เซนติเมตร) แยกเอนไซม์จากโปรตีนอื่นด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้ในหลอดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วยเครื่อง fraction collector นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละหลอดมาหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

จากนั้นนำส่วนที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสมารวมกัน และนำไปศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

4. 7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลาเนสโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์มาศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970 อ้างโดย พิณทิพ รื่นวงษา, 2536) (ภาคผนวก ก) ใช้ stacking gel และ resolving gel เป็น 4.5 % และ 8 % polyacrylaminde gel ตามลำดับ ในสารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ (Tris-glycine buffer) พีเอช 8.3 ทำการย้อมโปรตีนโดย Coomassie Brilliant Blue R-250 และ Silver staining เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิด SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ชุด Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit ของบริษัท Pharmacia

โปรตีนมาตรฐาน ชุด Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit ของบริษัท Pharmacia ซึ่งใช้สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 14,400-94,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิดคือ α-lactalbumin, trypsin inhibitor, carbonic anhydrase, ovalbumin, albumin และ phosphorylase b ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,400; 20,100; 30,000; 43,000; 67,000 และ 94,000 ดาลตันตามลำดับ และหาค่า Rf ซึ่งเป็นค่าระยะทางของโปรตีนต่อระยะทางของสี จากนั้นนำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Rf กับน้ำหนักโมเลกุลในกระดาษกราฟแบบ semilog เปรียบเทียบกับค่า Rf ของเอนไซม์เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

5. การศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

5. 1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วตรวจหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 1.1.3 โดยบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆคือ 0, 20, 30, 35, 40 (อุณหภูมิที่ใช้ทำการทดลองปกติ), 45, 50, 55, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นคำนวณค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

5. 2 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิต่างๆ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มสารละลายเอนไซม์ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 40, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 และ 120 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสารละลายเอนไซม์มาทำให้เย็นโดยแช่ในถาดน้ำแข็ง จากนั้นนำมาตรวจหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ในข้อ 1.1.3

5. 3 พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และตรวจหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ในข้อ 1.1.3 แต่ใช้บัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ คือ โซเดียมอซิเตตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.4-5.0 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 และสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0-9.0 โดยบ่มสารละลายไซแลน และสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชต่างๆ ไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเริ่มหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์

5. 4 ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ K_m และ V_{max}

ผลของความเข้มข้นสับสเตรตต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส ใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้ 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วตรวจหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ในข้อ 1.1.3 แต่ใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 5.1 และ 5.3 ที่เวลาต่างๆ ดังต่อไปนี้ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10 และ 15 นาที นำค่าที่ได้มาวาดกราฟแบบ Lineweaver-Burk และคำนวณหาค่า K_m และ V_{max}

5. 5 ผลของไอออนโลหะและสารยับยั้งต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ผสมกับบัฟเฟอร์ และไอออนโลหะต่างๆ ดังต่อไปนี้ K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} และ Cu^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มสารละลายทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเริ่มหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ และนำมาตรวจหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ในข้อ 1.1.3

สำหรับผลของสารยับยั้ง โดยศึกษาผลของสาร EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ SDS ความเข้มข้น 1% และ Ethanol ความเข้มข้น 5% วิธีการศึกษาเช่นเดียวกันกับการศึกษาผลของไอออนโลหะ

5. 6 การตรวจสอบชนิดของผลผลิตโดยการทำโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมอซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และสารละลายไซแลน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ดังต่อไปนี้ 0, 1, 3, 5, 7, 10 และ 15 นาที เมื่อครบตามเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้ม 10 นาที และนำมาตรวจชนิดของผลผลิตโดยการทำโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (ภาคผนวก ก)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

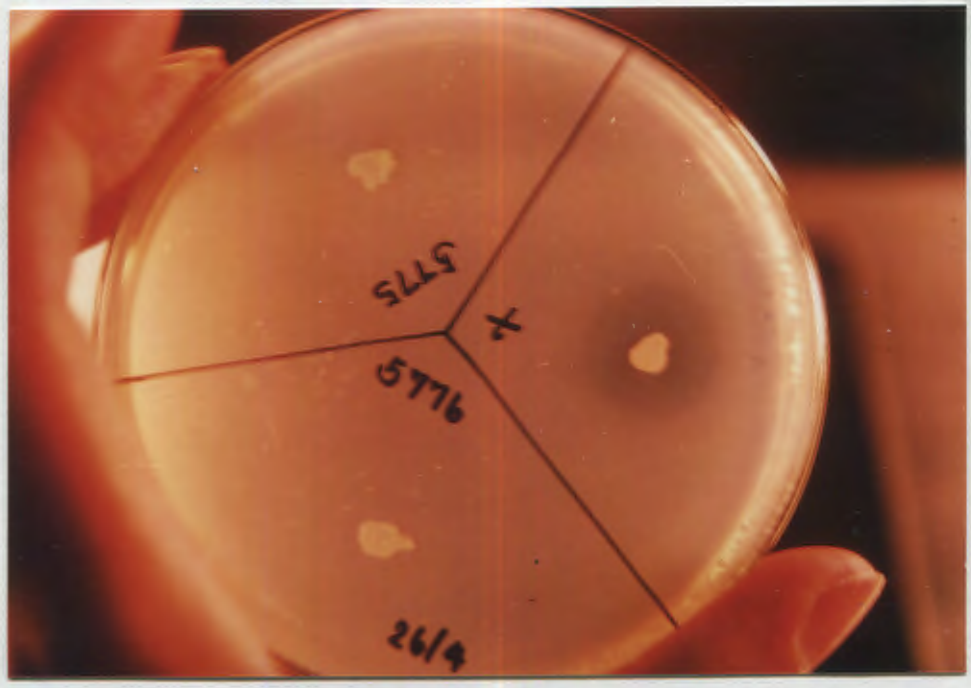
1. ความสามารถของ *Cryptococcus laurentii* ในการใช้ไซแลนบนอาหารแข็ง

ทำการตรวจสอบว่า *Cryptococcus laurentii* มีความสามารถใช้ไซแลนเป็นอาหารและผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายไซแลนหรือไม่ โดยตรวจสอบการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกเหมาะสำหรับเป็นการทดสอบเบื้องต้น โดยเตรียมอาหารแข็งสูตร ข ซึ่งมี oat spelt xylan 1% เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ อาหารที่ได้มีลักษณะขุ่น เนื่องจากไซแลนเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนและละลายน้ำได้ไม่ดี เมื่อเลี้ยง *Cryptococcus laurentii* บนจานอาหารดังกล่าว โดยบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง พบว่าภายใน 24 ชั่วโมง *Cryptococcus laurentii* เจริญบนจานอาหารได้ดี และเริ่มปรากฏวงใสรอบๆ โคโลนี วงใสมีขนาดกว้างและใสขึ้นหากบ่มไว้นาน 48 ชั่วโมง วงใสมีเส้นผ่าศูยน์กลางขนาด 1.8 เซนติเมตร และโคโลนีมีขนาด 0.5 เซนติเมตร แสดงว่าเกิดการใช้ไซแลนบนจานอาหารโดยผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยให้เป็นหน่วยย่อยซึ่งมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น เช่น *Pichia stipitis* CBS 5776 และ *Pichia stipitis* CBS 5775 (รูปที่ 5) ซึ่งมีรายงานว่าใช้ไซแลนได้เช่นกัน (Prior, *et al.*, 1989) ก็ปรากฏว่า *Cryptococcus laurentii* ใช้ oat spelt xylan ได้ดีกว่าโดยมีวงใสกว้างกว่า (บนอาหารแข็ง)

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ในอาหารเหลว

2. 1 การผลิตเอนไซม์เมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

ตรวจสอบการเจริญในอาหารเหลวไซแลนและหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส โดยทำการเลี้ยง *Cryptococcus laurentii* ในอาหารเหลวสูตร ข ซึ่งมีไซแลน 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรากฏว่า *Cryptococcus laurentii* เจริญได้ดี โดยเซลล์เพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่ออย่างรวดเร็ว (ดูจากกล้องจุลทรรศน์) ภายใน 24-48 ชั่วโมง สามารถสังเกตุการเปลี่ยนแปลงของอาหารอันเนื่องจากไซแลนถูกใช้ไป โดยปั่นแยก



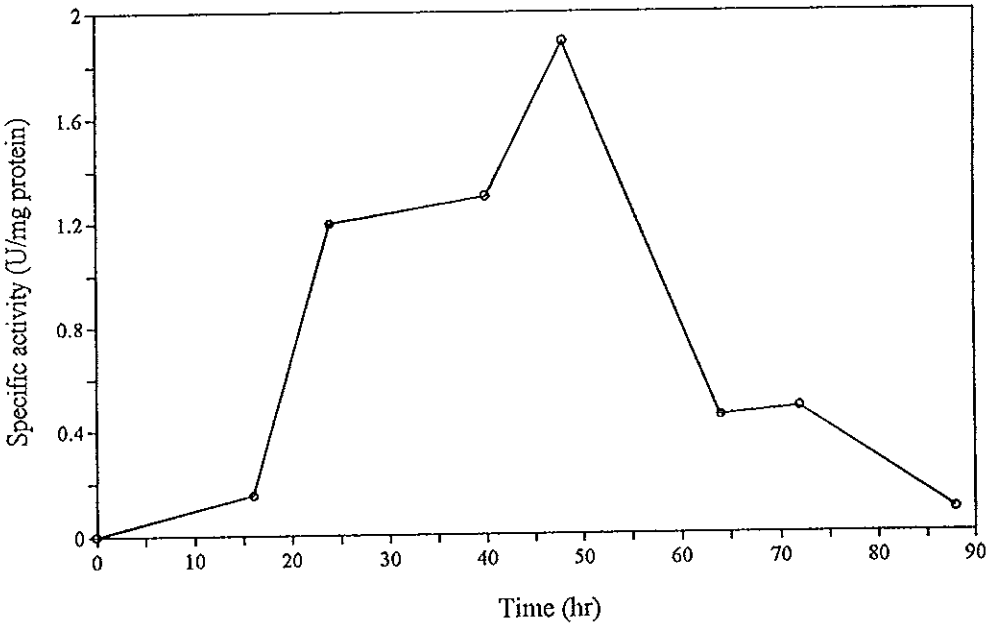
รูปที่ 5 การเกิดวงใสรอบโคโลนีของยีสต์ *Cryptococcus laurentii* และ *Pichia stipitis* สายพันธุ์ CBS 5775 และ CBS 5776 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข

ส่วนที่เป็นเซลล์และสารละลายอาหารออกจากกัน พบว่าอาหารสูตร ข ซึ่งเมื่อเริ่มต้นมีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นจะค่อยๆ ใสเมื่อยีสต์เจริญมากขึ้น และมีความใสที่สุดเมื่อเลี้ยงไว้นาน 48 ชั่วโมง เมื่อนำส่วนใสนี้มาทดสอบหาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่ามีแอคติวิตี้อยู่ในระดับสูง คือ 1.89 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

เมื่อทำการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โดยเลี้ยง *Cryptococcus laurentii* ในอาหารสูตร ข ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองในรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่า หลังจากเลี้ยงไปนาน 16 ชั่วโมง *Cryptococcus laurentii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยมีค่าแอคติวิตี้จำเพาะเท่ากับ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยที่เวลา 20 ชั่วโมง ตรวจพบค่าเท่ากับ 1.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และพบค่าแอคติวิตี้จำเพาะสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง คือ 1.89 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นแอคติวิตี้จะลดลงอย่างรวดเร็ว การทดลองนี้ไม่สามารถสรุปได้ว่า *Cryptococcus laurentii* สังเคราะห์เอนไซม์ได้สูงสุดที่ระยะ (phase) ใดในช่วงการเจริญของเชื้อ เนื่องจากปัญหาความขุ่นของอาหารที่มีไซแลน เมื่อเชื้อเจริญมากขึ้น (ความขุ่นของเชื้อเพิ่มขึ้น) ไซแลนถูกใช้ไปทำให้อาหารมีลักษณะใสขึ้น ความขุ่นที่วัดได้จึงไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นความขุ่นจากจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียว

จากการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ *Cryptococcus laurentii* ผลิตขึ้นส่วนใหญ่น่าจะเป็นเอนไซม์ชนิด extracellular enzyme โดยเซลล์จะผลิตในปริมาณสูงเมื่อเติมไซแลนลงไปเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของนักวิจัยอื่นๆ อาทิเช่น การทดลองของ McCarthy, *et al.* (1985); Esteban, *et al.* (1982); Bicly, *et al.* (1980a); Biely และ Petrakova (1984a) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสปริมาณน้อยๆ แบบ constitutive เมื่อมีไซแลนอยู่ในอาหาร จากนั้นเอนไซม์จะย่อยไซแลนให้เป็นหน่วยย่อยคือ xylo-oligosaccharide หน่วยย่อยนี้สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ไปกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายไซแลนมากขึ้น (ได้แก่ ไซลาเนส และไซโลไซเดส เป็นต้น) ไซแลนและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ถูกย่อยเป็นผลิตผลสุดท้ายคือ น้ำตาลไซโลส แล้วน้ำตาลไซโลสที่มีอยู่มากจะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์อีกทีหนึ่ง

ผลการทดลองซึ่งช่วยสนับสนุนว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *Cryptococcus laurentii* เป็นแบบปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ได้ทำการทดสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์



รูปที่ 6 แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

จากส่วนที่เป็นเซลล์ โดยการนำส่วนเซลล์มาทำให้แตกด้วยการเขย่ารวมกับ glass beads ในสารละลายบัฟเฟอร์โดย vertex ด้วยความแรงสูงจนกว่าเซลล์จะแตกหมด ปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นเศษเซลล์ทิ้งไป นำส่วนใสมาทดสอบแอคติวิตี้ของไซลาเนส ปรากฏว่าไม่พบค่าแอคติวิตี้ แสดงว่า *Cryptococcus laurentii* ผลิตไซลาเนสแบบส่งออกนอกเซลล์ เป็น extracellular enzyme (ผลไม่ได้แสดง)

2. 2 การผลิตเอนไซม์เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนกลับไม่พบค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ (ตารางที่ 3) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *Cryptococcus laurentii* ผลิตเอนไซม์ก็ต่อเมื่อเลี้ยงในอาหารไซแลน หรือมีการยับยั้งการผลิตของเอนไซม์โดยน้ำตาลกลูโคส หรือในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสยีตส์มีการผลิตเอนไซม์ในระดับต่ำจนตรวจสอบไม่ได้ด้วยวิธีการที่ใช้ในการทดลอง ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ McCarthy, *et al.* (1987); Bicly, *et al.* (1980a) ซึ่งพบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโมโนแซคคาไรด์ เช่น น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ไม่สามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

เลี้ยง *Cryptococcus laurentii* ในอาหารเหลวสูตร ข ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูงสุด เมื่อครบเวลา นำสารละลายอาหารที่มีเชื้อมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที (11,000xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ยีสต์ออกและเก็บสารละลายส่วนใสซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 1,200 มิลลิลิตร เรียกสารละลายนี้ว่าสารละลายเอนไซม์สกัด ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตี้ของไซลาเนส พบว่ามีแอคติวิตี้รวม (total activity) ของเอนไซม์เท่ากับ 670.8 ยูนิต ปริมาณโปรตีน 300 มิลลิกรัม และคำนวณค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ได้เท่ากับ 2.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำสารละลายเอนไซม์สกัดทั้งหมดมาใช้ในการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนตามลำดับดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน	
	ไซแลน	กลูโคส
	Specific activity (U/mg)	Specific activity (U/mg)
0	0	0
16	0.15	0
24	1.19	0
40	1.30	0
48	1.89	0
64	0.45	0
72	0.48	0
88	0.09	0

3. 1 การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติตกตะกอนเมื่อมีความอิ่มตัวของเกลือในสารละลายแตกต่างกันไป ดังนั้นในการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์ก่อนอื่นต้องทราบว่าควรใช้เกลือที่ความอิ่มตัวเท่าไรจึงจะเหมาะสมต่อการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสจากสารละลายทั้งหมด ในที่นี้ทำการทดลองโดยค่อยๆ เพิ่มปริมาณเกลือให้มีความอิ่มตัวระหว่าง 20%-80% และนำตะกอนที่ได้ในแต่ละครั้งมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกัน เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วจึงทดสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นว่าไซลาเนสเริ่มตกตะกอนเมื่อมีความอิ่มตัวของเกลือที่ 20% และพบแอคติวิตี้ในตะกอนที่ได้จากทุกช่วงของความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (40%, 60% และ 80%) ดังนั้นเพื่อให้ได้เอนไซม์มากที่สุดแม้จะมีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นบ้าง จึงเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลาย 1,200 มิลลิลิตร ให้มีความอิ่มตัว 80% จะได้ตะกอนสีน้ำตาลซึ่งเมื่อละลายในบัฟเฟอร์ สารละลายมีสีน้ำตาลและมีความหนืดสูง คาดว่าเกิดจากกลุ่มของน้ำตาลที่เป็นผลผลิตจากการย่อยไซแลน ปริมาตรทั้งหมดที่ได้จากการละลายตะกอนและภายหลังผ่านการไดอะไลซ์แล้วคือ 52 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 68.64 มิลลิกรัม วัดค่าแอคติวิตี้จำเพาะได้ 0.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่าค่าแอคติวิตี้จำเพาะในสารละลายเอนไซม์สกัด โดยอาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายประการคือ

1. การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีโปรตีนอื่นๆ นอกจากเอนไซม์ตกตะกอนด้วย ทำให้ปริมาณโปรตีนต่อมิลลิลิตรมีค่าสูง เมื่อนำมาใช้คำนวณเป็นค่าแอคติวิตี้จำเพาะ จะทำให้ค่าต่ำกว่าที่ควรจะเป็น

2. ทำการไดอะไลซ์เกลือและ/หรือน้ำตาลออกไม่หมด ทำให้ปริมาณเกลือหรือน้ำตาลที่มีอยู่มากมีผลยั้บยั้งการทำงานของเอนไซม์

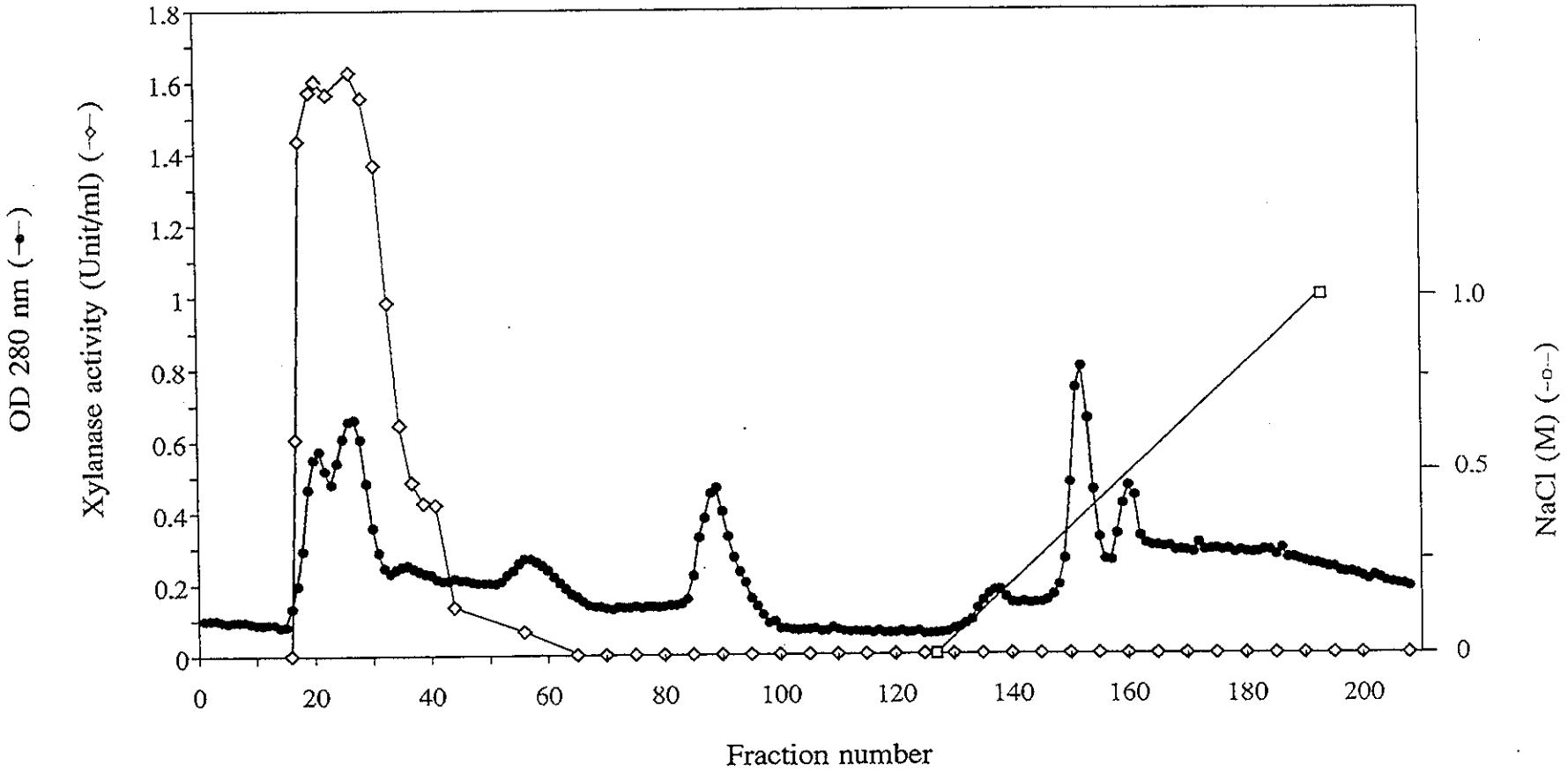
อย่างไรก็ตามคาดว่าการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปจะสามารถขจัดปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้ จึงนำสารละลายทั้งหมดไปทำการทดลองต่อในหัวข้อที่ 3.2

ตารางที่ 4 ผลของช่วงเปอร์เซนต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

เปอร์เซนต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	Xylanase activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)
0-20	3.83×10^{-3}	1.00
20-40	3.83×10^{-3}	0.44
40-60	5.06×10^{-2}	5.75
60-80	4.37×10^{-2}	6.12

3. 2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

นำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาตร 52 มิลลิลิตร มาผ่านเรซินแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-cellulose ที่ได้ปรับสมดุลย์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านเรซินออกมามีลักษณะใสไม่มีสีและไม่หนืด เพราะน้ำตาลและสารสีน้ำตาลติดอยู่กับเรซิน จากการชะสารละลายโปรตีนในคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ในหลอดๆ ละ 4 มิลลิลิตร นำสารละลายในแต่ละหลอดมาหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและแอคติวิตี้ของไซลาเนส จากรูปที่ 7 จะเห็นว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาสี่พีค พีคที่ 1 และ 2 ซึ่งอยู่ติดกันเท่านั้นที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส โดยถูกชะออกมากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปริมาตร 84-100 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วง void volume แสดงว่าไซลาเนสไม่สามารถจับกับเรซินชนิด DEAE-cellulose และเนื่องจาก DEAE-cellulose เป็นเรซินที่มีประจุบวกที่พีเอช 7.0 จึงสรุปได้ว่าไซลาเนสเป็นโปรตีนที่มีประจุเป็นบวกที่พีเอช 7.0 เช่นกัน ภายหลังชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกหมดแล้ว ก็เริ่มชะโปรตีนที่จับกับเรซินในคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จากรูปที่ 7 พบว่ายังมีโปรตีนออกมาอีกสามพีค แต่ไม่พบแอคติวิตี้ของไซลาเนสในพีคใดเลย จึงรวบรวมสารละลายเฉพาะหลอดที่มีแอคติวิตี้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อ โดยแบ่งรวบรวมเป็นสองส่วนได้แก่ สารละลายของพีค 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 34 มิลลิกรัม และสารละลายของพีค 2 ปริมาตร 28 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 51.44 มิลลิกรัม ค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ที่มีในแต่ละพีคมีความใกล้เคียงกันคือ 3.24 และ 3.14 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตี้จากสารละลายสกัดเอนไซม์เพื่อแสดงถึงประสิทธิภาพในการทำบริสุทธิ์ตลอดจนความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้ พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออนออกมากับพีค 1 และพีค 2 มีแอคติวิตี้คงเหลือเท่ากับ 16.43% และ



รูปที่ 7 การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* โดยใช้คอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-cellulose (คอลัมน์ขนาด 2.6x30 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ตามด้วยด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-1 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกัน อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 4 มิลลิลิตรต่อหลอด)

ตารางที่ 5 ผลการเตรียมเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์จาก *Cryptococcus laurentii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Fraction	Total volume (ml)	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	% Yield	Purification factor
culture fluid	1200	300	670.8	2.24	100	1
80% $(NH_4)_2SO_4$	52	68.64	33.38	0.49	4.98	0.22
DEAE-cellulose						
Peak1	20	34	110.22	3.24	16.43	1.45
Peak2	28	51.44	161.42	3.14	24.06	1.40
Sephacryl S-300						
Peak1/2	5	1.75	1.81	1.03	0.27	0.46
Peak1/3	5	1.82	7.33	4.04	1.09	1.81
Peak1/4	5	0.84	1.77	2.10	0.27	0.94
Peak2/2	5	2.01	2.54	1.27	0.38	0.57
Peak2/3	5	2.31	8.45	3.66	1.26	1.64
Peak2/4	5	0.55	0.88	1.60	0.13	0.72

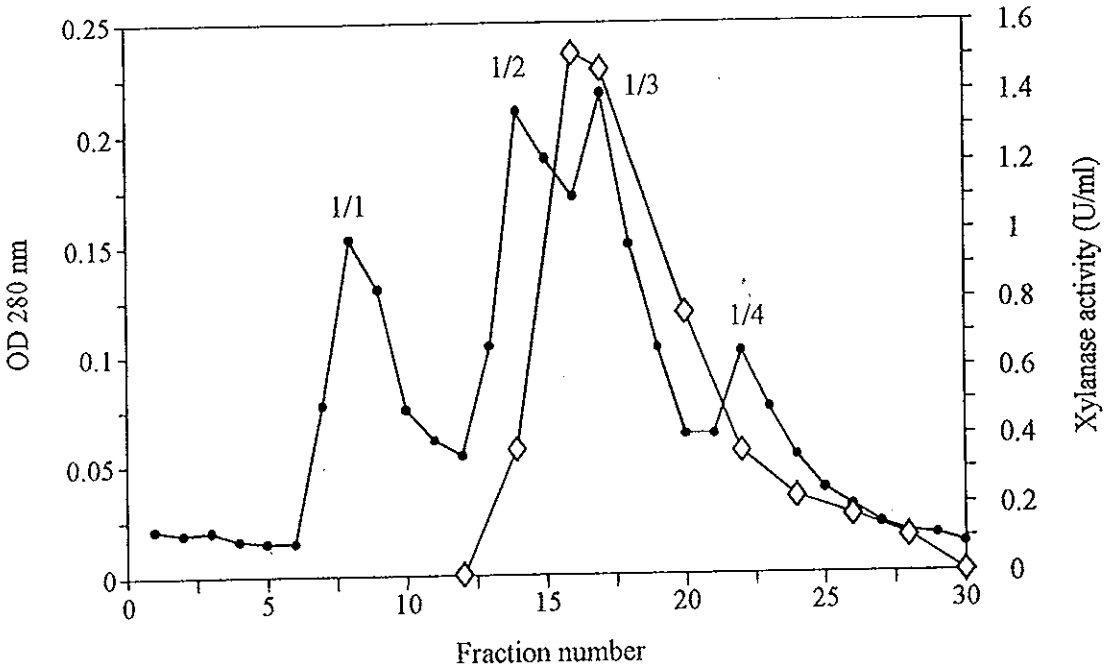
24.06% ตามลำดับ หรือคิดเป็น %yield ทั้งหมดเท่ากับ 40.49% แต่ละพีคมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.45 และ 1.40 ดังตารางที่ 5

3. 3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเตรชั่น

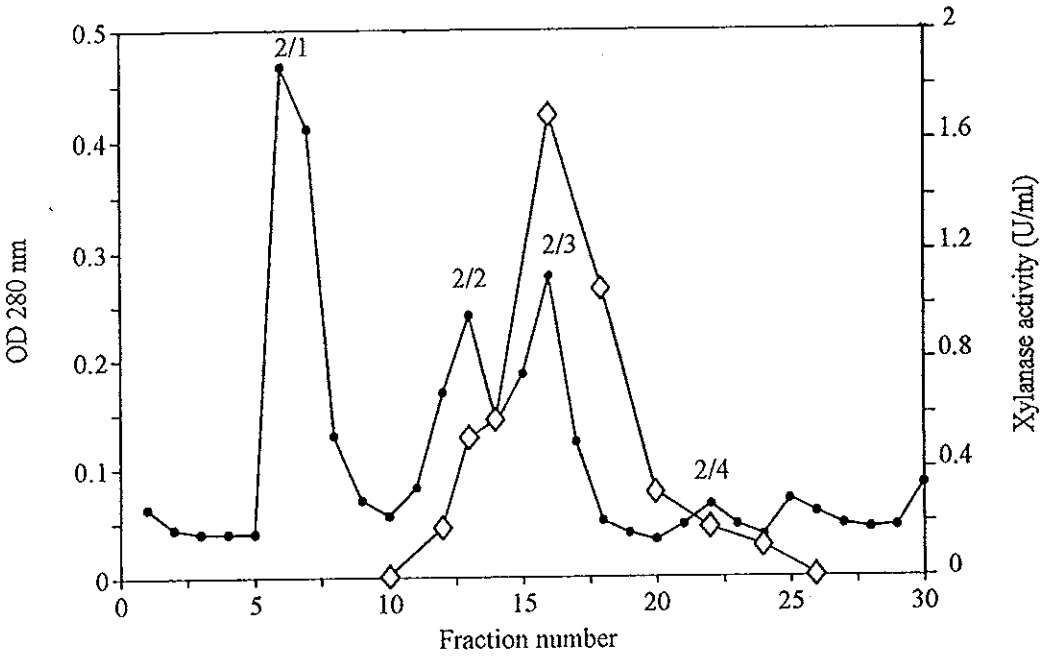
นำสารละลายของพีค 1 และ 2 มาทำให้เข้มข้น เพื่อให้มีปริมาตรของสารละลายโปรตีนลดลงพอเหมาะสำหรับการนำตัวอย่างไปลงเจลฟิวเตรชั่นต่อไป ในที่สุดเหลือสารละลายของทั้งสองพีคอย่างละ 3 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายของแต่ละพีคในคอลัมน์ซึ่งบรรจุเจลชนิด Sephacryl S-300 ชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ในหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำสารละลายในแต่ละหลอด มาหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรของสารละลายที่ถูกชะบนแกน X กับปริมาณโปรตีน และแอคติวิตี้ของเอนไซม์บนแกน Y ดังรูปที่ 8 จะเห็นว่าสามารถแยกโปรตีนออกมาได้ 4 พีค คือ 1/1, 1/2, 1/3 และ 1/4 โดยมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ในสามพีคคือ 1/2, 1/3 และ 1/4 ค่าแอคติวิตี้จำเพาะเป็น 1.03, 4.04 และ 2.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ตารางที่ 5

ส่วนสารละลายจากพีค 2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ก็ถูกนำมาผ่านคอลัมน์แบบเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300 แล้วตรวจสอบสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลการวิเคราะห์ (รูปที่ 9) พบว่าได้แบบแผนของการแยกโปรตีนคล้ายคลึงกับผลการทดลองของพีค 1 คือโปรตีนของพีค 2 ถูกแยกออกเป็น 4 พีคคือ พีค 2/1, 2/2, 2/3 และ 2/4 และมีแอคติวิตี้ของไซลาเนสอยู่ในพีค 2/2, 2/3 และ 2/4 ค่าแอคติวิตี้จำเพาะเป็น 1.27, 3.66 และ 1.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากแบบแผนของการแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่น สรุปได้ว่าโปรตีนที่อยู่ในพีค 1 และ 2 น่าจะเป็นโปรตีนชุดเดียวกัน การที่เห็นแยกออกเป็น 2 พีค เมื่อผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน อาจเนื่องจากปริมาณน้ำตาลซึ่งมีอยู่ค่อนข้างสูงในสารละลายรบกวนการเคลื่อนที่ของโปรตีนในคอลัมน์



รูปที่ 8 การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไซลาเนส พีค 1 ในคอลัมน์แบบเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300 (คอลัมน์ขนาด 2.2x30 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด)



รูปที่ 9 การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไซลาเนส พีค 2 ในคอลัมน์แบบเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300 (คอลัมน์ขนาด 2.2x30 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด)

3.4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์และวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำสารละลายที่ได้แต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มาศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้เจลสองแผ่น แล้วแยกย้อมเจลแต่ละแผ่นด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 และ Silver staining จะเห็นแถบของโปรตีนดังปรากฏในรูปที่ 10ก และ 10ข ตามลำดับ โดยแถบที่ปรากฏภายหลังการย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 และ Silver staining มีความแตกต่างกันบ้าง แม้จะมาจากสารละลายตัวอย่างชุดเดียวกัน ทั้งนี้ Silver staining ย้อมติดแถบโปรตีนที่มีอยู่ในปริมาณน้อย โดยสามารถตรวจสอบโปรตีนที่มีปริมาณความเข้มข้นได้ต่ำถึง 10-100 นาโนกรัม ในขณะที่การย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 ใช้ย้อมโปรตีนที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 ไมโครกรัม ซึ่งการย้อมด้วย Silver staining มีความไวมากกว่าการย้อมด้วย Coommassie Brilliant Blue R-250 ประมาณ 100 เท่า (พิณทิพ รื่นวงษา, 2536) จากแผ่นเจลที่ย้อมด้วย Coommassie Brilliant Blue R-250 สามารถวิเคราะห์ผลเรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวาคือ ช่องที่ 1 เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 2 คือสารละลายเอนไซม์สกัด พบแถบโปรตีนติดสีจางๆหลายแถบ เพราะสารละลายมีปริมาตรมาก มีโปรตีนอยู่เจือจางจึงทำให้เห็นแถบไม่ชัดเจน เมื่อตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ช่องที่ 3) โปรตีนมีความเข้มข้นสูงขึ้น เห็นแถบโปรตีนเด่นชัดเป็น 4 แถบ ช่องที่ 4 และ 5 แสดงโปรตีนของพีค 1 และ 2 ภายหลังผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน ชนิด DEAE-cellulose จะเห็นว่าโปรตีนอื่นถูกแยกออกไปได้บ้างเหลือเพียง 2 แถบ แต่ในช่องที่ 4 และ 5 เช่นเดียวกันนี้ของเจลที่ย้อมด้วย Silver staining จะพบแถบที่ 3 (รูปที่ 10ข) เพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งแถบ เพราะโปรตีนแถบที่ 3 มีอยู่ในปริมาณน้อย ต้องใช้การย้อมที่ว่องไวจึงจะเห็นได้ ทำให้สรุปได้ว่าพีค 1 และ 2 ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด โดยโปรตีนทั้งสามของพีค 1 มิได้แตกต่างจากของพีค 2 เลย ซึ่งสนับสนุนผลการทดลองในข้อ 3.3 ที่ว่าโปรตีนในพีค 1 และ 2 น่าจะเป็นโปรตีนชุดเดียวกัน ช่องที่ 6-11 แสดงโปรตีนของสารละลายพีค 1/2, 1/3, 1/4, 2/2, 2/3, และ 2/4 ตามลำดับ จากคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่น จากรูปจะเห็นว่าสามารถแยกโปรตีนทั้งสามชนิดของพีค 1 และ 2 ที่ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออนออกจากกัน โดยการผ่านคอลัมน์แบบเจลฟิวเตรชั่น ได้โปรตีนชนิดที่ 1 มีขนาดใหญ่ที่สุดอยู่ในพีค 1/2 และ 2/2 ส่วนพีค 1/3 มีโปรตีนชนิดที่ 2 อยู่ในปริมาณมาก และมีการปน

รูปที่ 10ก แบบแผนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ใน 8% SDS-PAGE ย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250

ช่อง 1 โปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด

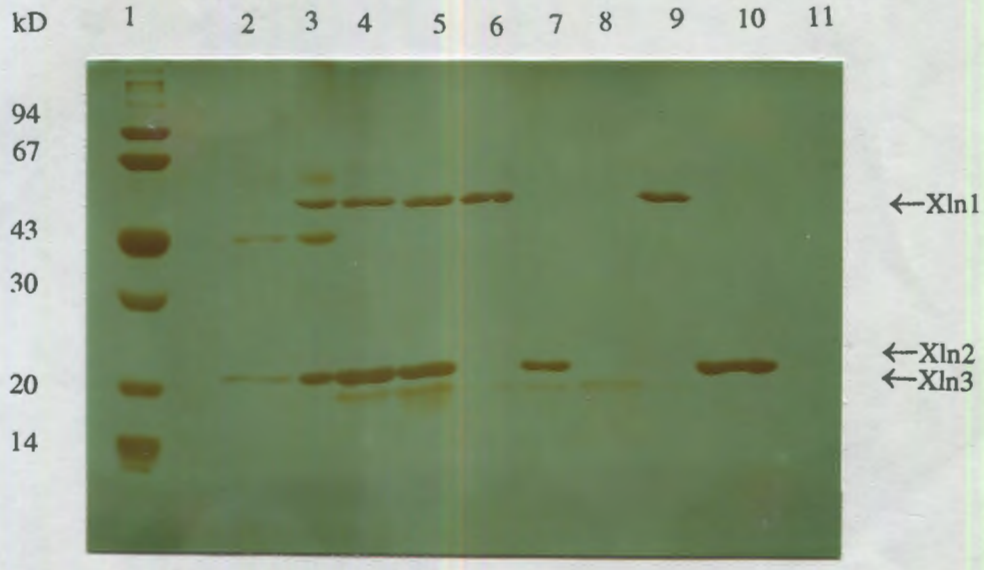
ช่อง 2 สารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

ช่อง 3 สารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ช่อง 4 และ 5 สารละลายเอนไซม์พีค 1 และ 2 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose

ช่อง 6, 7 และ 8 สารละลายเอนไซม์พีค 1/2, 1/3 และ1/4 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-300

ช่อง 9, 10 และ 11 สารละลายเอนไซม์พีค 2/2, 2/3 และ 2/4 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-300



รูปที่ 10ข แบบแผนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ใน 8% SDS-PAGE ย้อมเจลด้วย Silver staining

ช่อง 1 โปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด

ช่อง 2 สารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

ช่อง 3 สารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ช่อง 4 และ 5 สารละลายเอนไซม์พีค 1 และ 2 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose

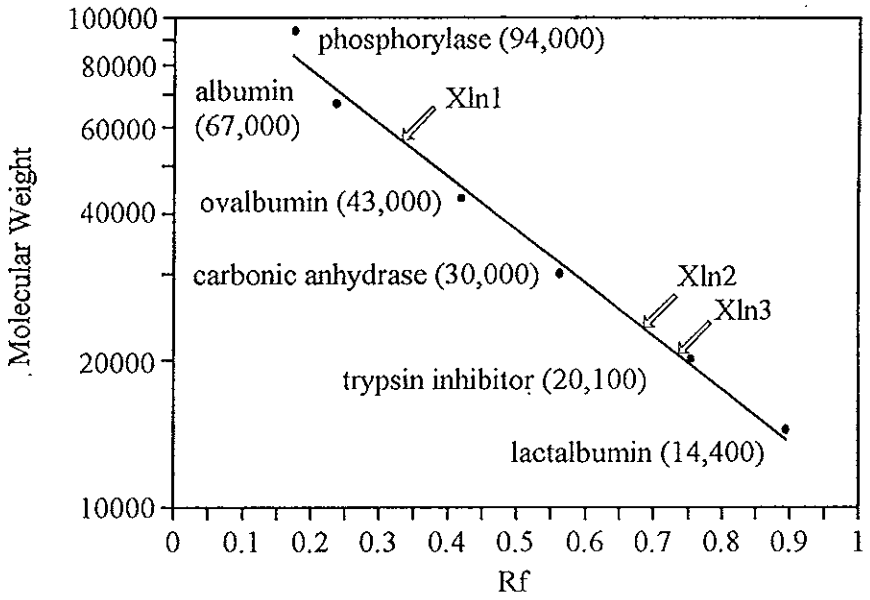
ช่อง 6, 7 และ 8 สารละลายเอนไซม์พีค 1/2, 1/3 และ1/4 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-300

ช่อง 9, 10 และ 11 สารละลายเอนไซม์พีค 2/2, 2/3 และ 2/4 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-300

เปื้อนของโปรตีนชนิดที่ 3 เล็กน้อย สังเกตุได้จากไม่เห็นแถบโปรตีนที่ 3 ในรูปที่ 10ก ซึ่งเป็นการย้อมด้วย Coommassie Brilliant Blue R-250 แต่เมื่อย้อมด้วย Silver staining รูปที่ 10ข ก็จะปรากฏแถบที่ 3 เพียงจางๆ ในขณะที่พีค 1/4 มีโปรตีนชนิดที่ 3 อยู่โดยปราศจากการปนเปื้อนของโปรตีนอื่น สำหรับพีค 2/3 ซึ่งคล้ายคลึงกับพีค 1/3 มีเพียงโปรตีนที่ 2 เท่านั้น และพีค 2/4 ซึ่งคล้ายกับพีค 1/4 ไม่พบแถบของโปรตีนใดๆ เลยอาจเป็นเพราะมีปริมาณโปรตีนต่ำมาก (ดูรูปที่ 10ก ประกอบ) จนตรวจไม่พบบนเจล

จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า *Cryptococcus laurentii* ผลิตไซลาเนสอย่างน้อยสามประเภทซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน เมื่อคำนวนหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด (ช่องที่ 1) คือ phosphorylase (MW 94,000) albumin (MW 67,000) ovalbumin (MW 43,000) carbonic anhydrase (MW 30,000) trypsin inhibitor (MW 20,100) lactalbumin (MW 14,400) โดยเทียบจากค่า Rf (รูปที่ 12) แล้วปรากฏว่าโปรตีนที่ 1, 2 และ 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 56,000; 23,500 และ 20,000 ดาลตัน ตามลำดับ และให้ชื่อไอโซไซม์เหล่านี้เรียงตามขนาดใหญ่ไปเล็กคือ Xln1, Xln2 และ Xln3 โดย *Cryptococcus laurentii* ผลิต Xln1 และ Xln2 ในปริมาณมาก แม้การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในครั้งนี้ พีค 1/3 มีการปนเปื้อนของ Xln3 ในสารละลายบ้าง แต่ก็เป็นปริมาณเพียงเล็กน้อย จึงไม่ทำให้ผลการทดสอบคุณสมบัติของ Xln2 ในหัวข้อต่อๆ ไปผิดพลาด

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และข้อมูลเกี่ยวกับประเภทและน้ำหนักโมเลกุลของไซลาเนสจากจุลินทรีย์อื่น พบว่ามีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่คล้ายคลึงกันคือ ไซลาเนสจากยีสต์เช่น *Pichia stipitis* และ *Cryptococcus* albidus มีประจุบวกและไม่จับกับคอลัมน์ชนิด DEAE-cellulose ทั้ง *Pichia stipitis* และ *Cryptococcus albidus* ต่างมีไซลาเนสเพียงประเภทเดียวคือขนาด 55,000 ดาลตัน (Tumsuwan, 1994) และ 26,000 ดาลตัน (Biely, et al.,1980a) ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีตัวอย่างจากจุลินทรีย์อื่น เช่น ไซลาเนสของ *Aeromonas caviae* W-61 และ *Trichoderma koningii* G-39 มีน้ำหนักโมเลกุล 22,000 ดาลตัน (Viet, *et al.*, 1991) และ 21,500 ดาลตัน (Huang, *et al.*, 1991) เป็นต้น จะเห็นว่าไซลาเนสของ *Cryptococcus laurentii* ซึ่งมีอยู่ 3 ไอโซไซม์มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับไซลาเนสของจุลินทรีย์อื่น



รูปที่ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ใน 8 % SDS-PAGE

4. คุณสมบัติของไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

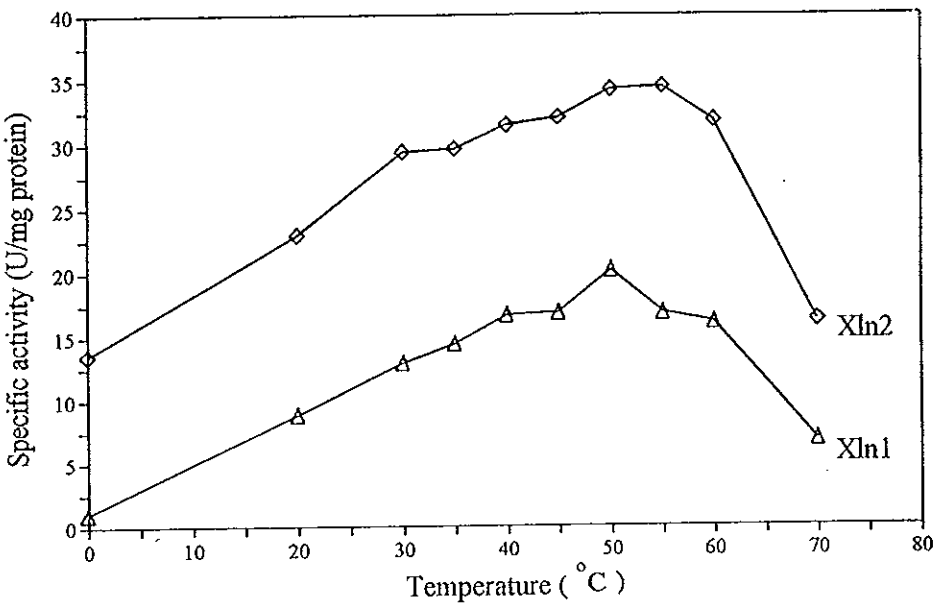
นำสารละลายแต่ละไอโซไซม์ของไซลาเนส (ยกเว้น Xln 3 เนื่องจากเตรียมได้ในปริมาณน้อย) มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์

ทำการตรวจสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิต่างๆ บ่มนาน 20 นาที โดยใช้บัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 จากผลการทดลอง (รูปที่ 12) พบว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดต่อการทำงานของ Xln1 (optimum temperature) คือ 50 องศาเซลเซียส ค่าแอคติวิตี้ค่อยๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ เป็นที่น่าสังเกตุว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงของอุณหภูมิค่อนข้างกว้างแม้ที่ 0 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังมีแอคติวิตี้อยู่โดยมีค่าแอคติวิตี้จำเพาะเป็น 5.03% และ 33.67% ของค่าแอคติวิตี้ที่ 50 องศาเซลเซียส

ส่วนอุณหภูมิที่ดีที่สุดต่อการทำงานของ Xln2 คือ 50-55 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีช่วงอุณหภูมิของการทำงานที่กว้างเช่นเดียวกับ Xln1 แต่ที่ 0 องศาเซลเซียส Xln2 ทำงานได้ดีกว่า Xln1 คือ มีค่าแอคติวิตี้จำเพาะเพียง 39.28% ของค่าแอคติวิตี้ที่ 55 องศาเซลเซียส และที่ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงทำงานได้โดยมีแอคติวิตี้จำเพาะ 47.24% ของค่าแอคติวิตี้ที่ 55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 12)

เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์อื่น พบว่าส่วนใหญ่ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส เช่น endoxylanase ของ *Trichoderma koningii* G-39 มีอุณหภูมิเหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส (Huang, *et al.*, 1991) *Aspergillus ochraceus* NG-13 มีไซลาเนสซึ่งทำงานได้ดีที่ 50 องศาเซลเซียส (Biswas, *et al.*, 1990) ไซลาเนสของ *Aeromonas caviae* W-60 มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่ 55 องศาเซลเซียส (Viet, *et al.*, 1991) *Aspergillus kawachii* IFO 4308 มีเอนไซม์ไซลาเนส 3 ชนิดคือ XylA, XylB และ XylC แต่ละชนิดมีแอคติวิตี้สูงสุดที่อุณหภูมิ 60, 55 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Ito, *et al* ., 1992) ดังนั้นจะเห็นว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของ



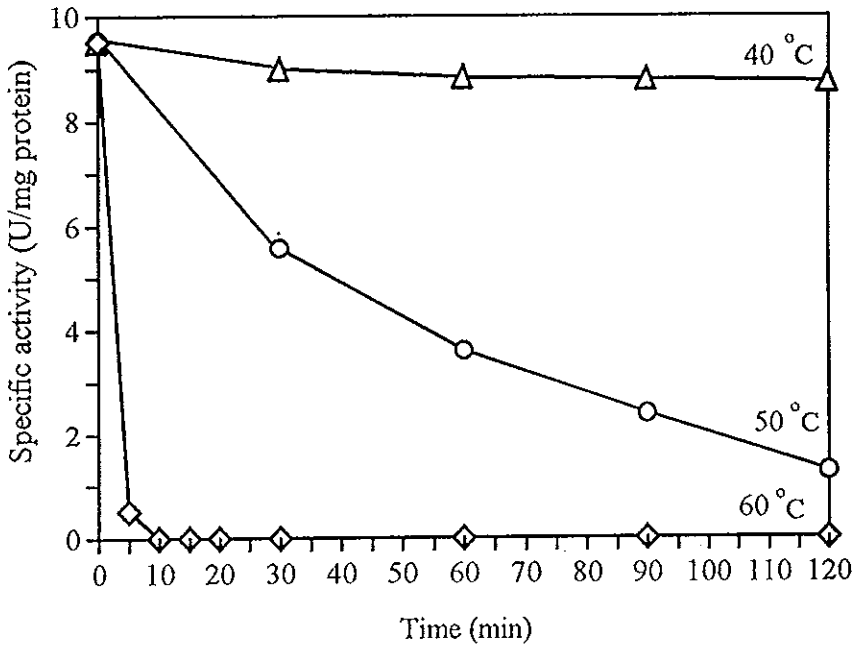
รูปที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

เอนไซม์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานใดแสดงช่วงอุณหภูมิของการทำงานที่กว้างเช่นเดียวกับไซลาเนสของ *Cryptococcus laurentii*

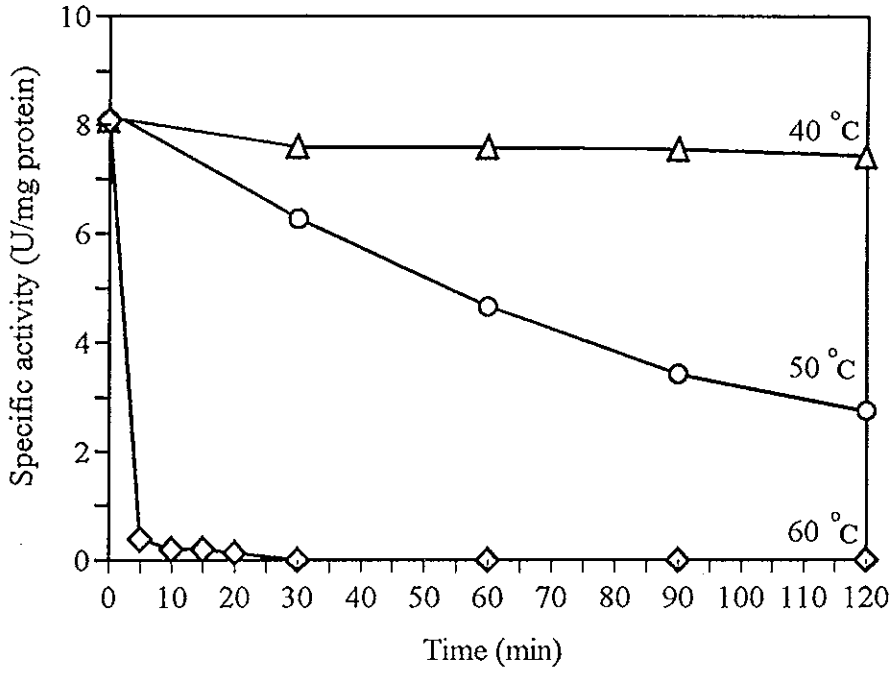
4. 2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแอคติวิตี้เอนไซม์ไซลาเนส

เนื่องจากสารละลายบริสุทธิ์ของแต่ละไอโซไซม์ที่เตรียมได้ในครั้งนี้มีปริมาณไม่มากและอาจไม่เพียงพอต่อการทดลอง ดังนั้นในการทดสอบเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์จึงใช้สารละลายตัวอย่างจากพีค 1 และ พีค 2 จากคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน โดยบ่มเอนไซม์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0-2 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาหาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์เพื่อตรวจสอบว่าเอนไซม์ยังคงสภาพการทำงานได้เช่นเดิมหรือไม่ นำผลการทดลองมาวาดกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้บ่มกับค่าแอคติวิตี้ จากกราฟรูปที่ 13ก และ 13ข พบว่าเอนไซม์ไม่ว่าจากพีค 1 หรือ 2 ต่างทนต่ออุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสได้นาน 2 ชั่วโมง โดยเอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตี้ใกล้เคียงกับแอคติวิตี้เริ่มต้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้บ่มเป็น 50 องศาเซลเซียส แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 30 นาที และแอคติวิตี้จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 5 นาทีหากเก็บไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้นี้เกิดจากปฏิกิริยาของไอโซไซม์ทั้งสามที่อยู่รวมกันในพีค 1 หรือ 2 จากคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน ไม่สามารถระบุคุณสมบัติแยกของแต่ละไอโซไซม์ได้ แต่เนื่องจาก Xln2 เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่มากที่สุดและมากเป็นสองเท่าของ Xln1 ส่วน Xln3 มีอยู่น้อย ผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 13ก และ 13ข จึงเป็นผลของเอนไซม์ Xln1 และ Xln2 เสียส่วนใหญ่ และเมื่อทดสอบความคงทนของสารละลายบริสุทธิ์ของ Xln1 และ Xln2 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 0-5 นาที ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าทั้งสองเอนไซม์ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน คือสูญเสียแอคติวิตี้อย่างรวดเร็วโดยแอคติวิตี้ลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 3 นาทีและไม่แตกต่างจากผลการทดลองในรูปที่ 13ก และ 13ข

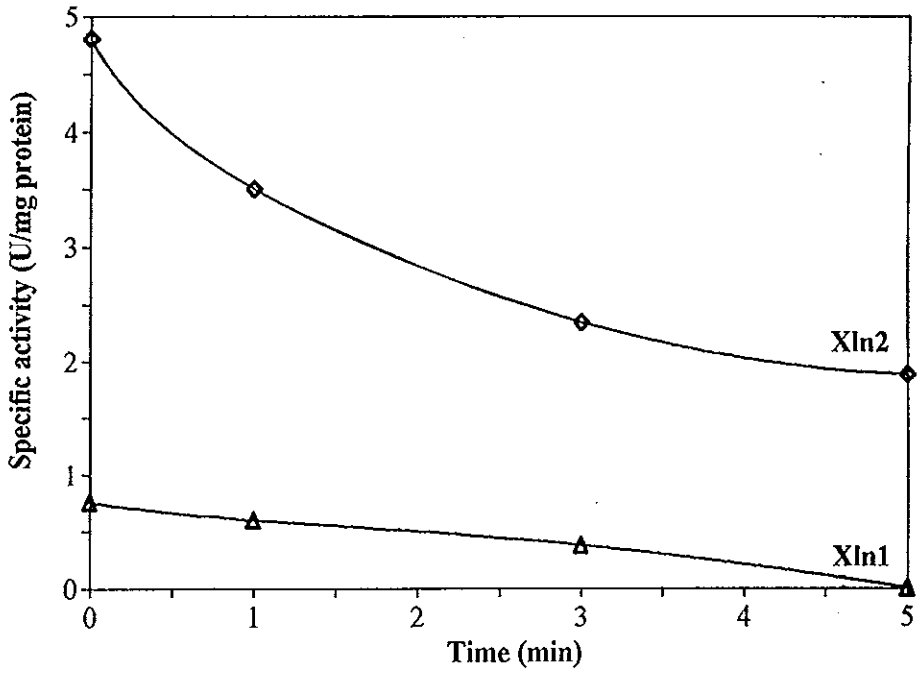
เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งเคยมีการรายงานมาก่อน พบว่า Xln1 ของ *Cryptococcuus laurentii* มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงได้ค่อนข้างดีดังเห็นได้จากตัวอย่างเช่น แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* NG-13 ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Biswas, *et al.*, 1990) เอนไซม์ไซลาเนสจากยีสต์ *Cryptococcuus flavus* มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 13ก ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* พีค I ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน



รูปที่ 13ข ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* พีค 2 ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน



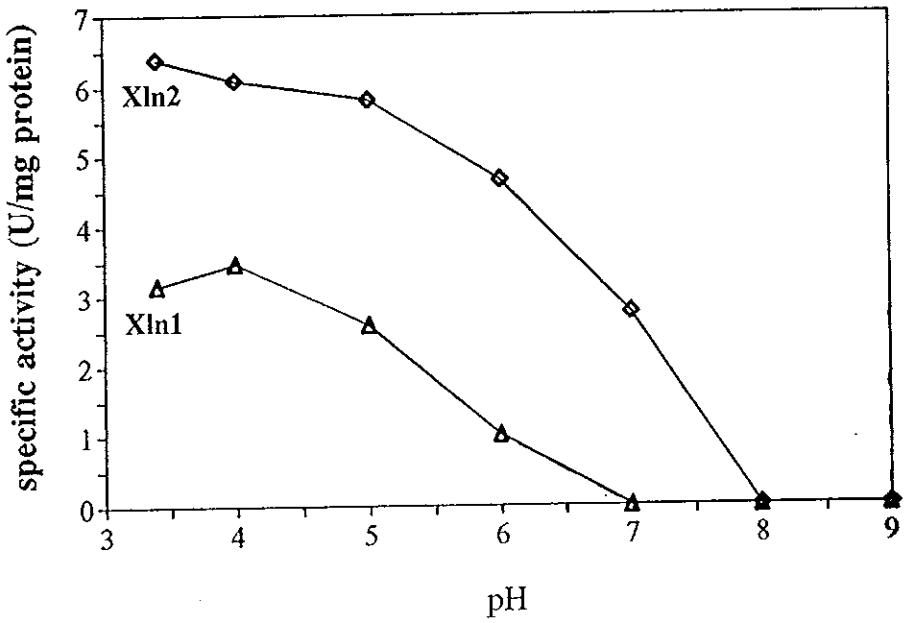
รูปที่ 14 ผลความคงตัวของแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส Xln1 และ Xln2 จาก *Cryptococcus laurentii* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

นาน 30 นาที และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แอคติวิตี้ของเอนไซม์ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ (Nakanishi, *et al.*, 1984) ไซลาเนสทั้ง 3 ไอโซไซม์ของ *Aspergillus kawachii* IFO 4308 มีความคงตัวคือ XylA ทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้ นาน 10 นาที ขณะที่เอนไซม์ XylB มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที และ XylC สูญเสียแอคติวิตี้เล็กน้อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี้อย่างรวดเร็ว (Ito, *et al.*, 1992)

4. 3 พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์

ทำการทดลองหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตที่ความเข้มข้นและที่อุณหภูมิคงเดิม แต่มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างๆ ผลการทดลองในรูปที่ 15 พบว่า Xln1 มีค่าแอคติวิตี้สูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอช 4.0 ส่วน Xln2 ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกรดเช่นกัน ซึ่งในที่นี้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นกรดมากที่สุดคือพีเอช 3.4 ซึ่งเป็นค่าที่ Xln2 มีแอคติวิตี้สูงสุดในช่วงพีเอช 3.4-9.0 แต่เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาในบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่ำกว่า 3.4 จึงอาจเป็นไปได้ว่า Xln2 ยังสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชต่ำกว่านี้ ซึ่งผลการทดลองจะเป็นเช่นไร ควรจะได้มีการศึกษาต่อไปในอนาคต

จากข้อมูลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีรายงานว่า เอนไซม์ไซลาเนสของ *Trichoderma koningii* G-39 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 5.5 (Huang, *et al.*, 1991) ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* NG-13 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์คือ 6.0 (Biswas, *et al.*, 1990) เอนไซม์ไซลาเนส XylA, XylB และ XylC จากเชื้อ *Aspergillus kawachii* IFO 4308 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์คือ 5.5, 4.5 และ 2.0 ตามลำดับ (Ito, *et al.*, 1992) และเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus flavus* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์คือ 4.5 (Nakanishi, *et al.*, 1984) จะเห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรด ดังนั้นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* คือ 3.4-4.0 จึงใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์อื่น



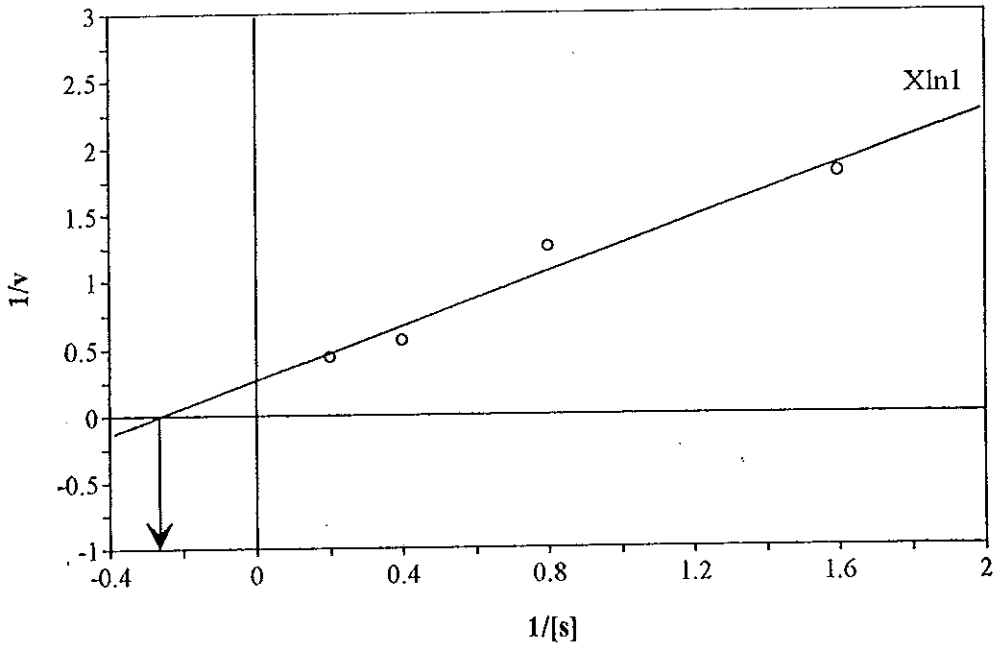
รูปที่ 15 ผลของพีเอชต่อแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

4. 4 ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ K_m และ V_{max}

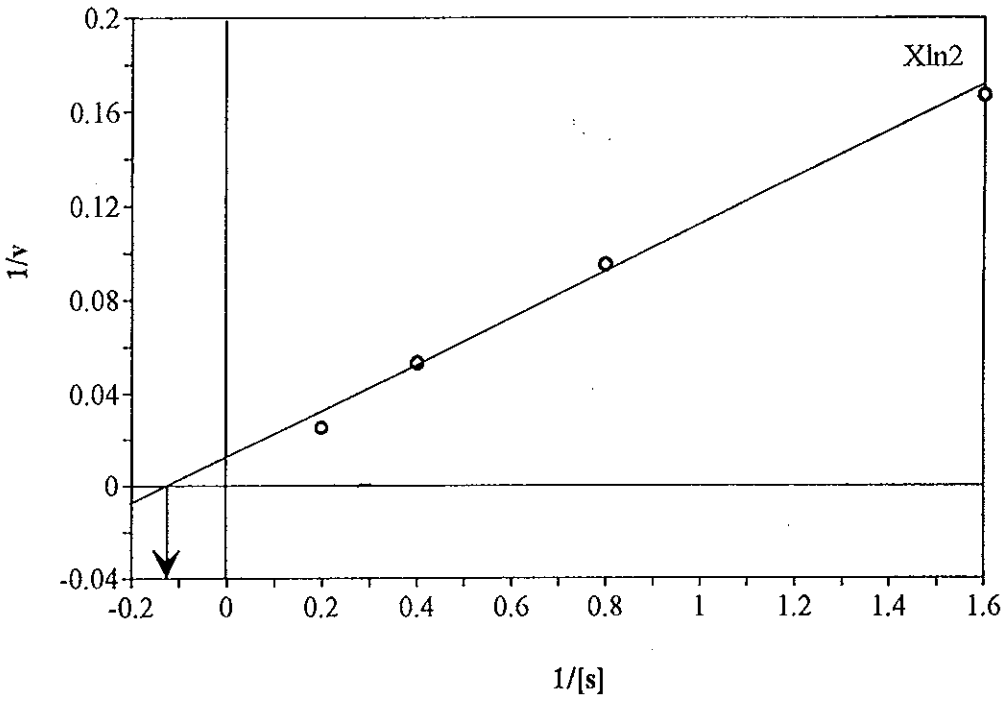
เป็นการทดลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยหาค่า K_m และ V_{max} K_m คือค่าที่แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถจับกับสับสเตรตได้ดีเพียงใด ค่า K_m น้อยเอนไซม์จะจับกับสับสเตรตได้ดี ส่วน V_{max} คืออัตราความเร็วของการสลายตัวของเอนไซม์และสับสเตรตเพื่อให้เกิดผลิตผลของปฏิกิริยา ค่าทั้งสองนี้อาจเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิหรือพีเอชของปฏิกิริยา ในการทดลองจึงทดสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.0 กับสารละลายสับสเตรตที่มีความเข้มข้นของไซแลนต่างๆ กัน [S] คือ 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองจากรูปความสัมพันธ์ระหว่างเวลาบนแกน X กับแอคติวิตี้ของเอนไซม์บนแกน Y ที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างๆ หาค่าความชันของกราฟแต่ละเส้นซึ่งเป็นค่าความเร็วของปฏิกิริยา จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweaver-Burk plot ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/[s] บนแกน X กับ 1/v บนแกน Y ดังรูปที่ 16 และ 17 จุดตัดบนแกน 1/[s] คือ $-1/K_m$ และจุดตัดบนแกน 1/v คือ $1/V_{max}$ แล้วคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ของสารละลายเอนไซม์

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 และ 17 สามารถสรุปได้ว่า Xln1 มี ค่า K_m เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ V_{max} เท่ากับ 28.37 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วน Xln2 มีค่า K_m เท่ากับ 7.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ V_{max} เท่ากับ 603.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ค่า K_m ของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีค่าต่างกันออกไป (ตารางที่ 6) เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma longibrachiatum* มี 2 ชนิด คือเอนไซม์ไซลาเนส A มีค่า K_m เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 510 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์ไซลาเนส B มีค่า K_m เท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 131 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Royer and Nakas, 1991) เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma koningii* G-39 ศึกษาค่า K_m เท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ V_{max} เท่ากับ 1.85×10^6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Huang, *et al.*, 1991) เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* NG-13 มีค่า V_{max} เท่ากับ 19.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Biswas, *et al.*, 1990) เมื่อเทียบค่า K_m และ V_{max} ของ *Cryptococcus laurentii* กับจุลินทรีย์อื่นข้างต้น จะเห็นว่าแม้ Xln2 จะมีค่า K_m สูงกว่าจุลินทรีย์อื่น แต่ก็มีค่า V_{max} ที่สูงด้วย ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้งานได้ไม่ยิ่งหย่อนกว่าไซลาเนสอื่นๆ



รูปที่ 16 Lineweaver-Burk plot ของแอคติวิตี้เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* Xln1 ต่อสารละลายไซแลน ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 4.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 17 Lineweaver-Burk plot ของแอคติวิตี้เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* Xln2 ต่อสารละลายไซแลน ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 4.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆกับ *Cryptococcus laurentii*

จุลินทรีย์	MW	Optimum		Stability		Km	Vmax	Ref.
	(kD)	temp.°C	pH	temp.°C	pH	(mg/ml)	(U/mg)	
Pichia stipitis	55	37	5.0	-	-	-	-	Tumsuwan, 1994
Lentinula edodes	41	60	4.5-5.0	-	-	0.66	310	Misha, *et al.*, 1990
Streptomyces T7	20.4	60	4.5-5.5	50	4.5-5.5	10	$7.6x10^{3}$	Keskar, *et al.*, 1989
S. roseiscleroticus	22.6	60	6.5-7.0	-	8.0	7.9	305	Grabski และ Jeffries,1991
Aspergillus ochraceus	48	50	6.0	-	-	-	19.6	Biswas, *et al.*, 1990
A. kawachii								Ito, *et al.*, 1992
Xyl A	35	60	5.5	60	3-10	-	-	
Xyl B	26	55	4.5	50	3-10	-	-	
Xyl C	29	50	2.0	50	1-9	-	-	
Trichoderma koningii	21.5	60	5.5	45	-	0.7	$1.85x10^{6}$	Huang, *et al.*, 1991
T. longibrachiatum								Roger และ Nakas, 1991
Xyl A	21.5	-	-	-	-	0.15	510	
Xyl B	33	-	-	-	-	0.19	131	
Cryptococcus flavus	25	55	4.5	45	3-8	3.1	-	Nakanishi, *et al.*, 1984
C. laurentii								
Xln 1	56	50	4.0	60	-	4	28.37	
Xln 2	23.5	50-55	4.0	60	-	7.67	603.86	

4. 5 ผลของไอออนโลหะและสารยับยั้งต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

เป็นการตรวจสอบว่าหากเติมสารเคมีต่างๆ ดังต่อไปนี้ 1% SDS, 5% ethanol, NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$ และ EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาการหาแอคติวิตี้ของไซลาเนสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สารเคมีเหล่านี้จะมีผลทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปอย่างไร ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 7 คือ 1% SDS, Cu^{2+} และ EDTA จะไปยับยั้งการทำงานของไซลาเนสโดยเฉพาะ 1% SDS และ Cu^{2+} มีผลให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลงมาก ในขณะที่ K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Zn^{2+} ทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และ 5% ethanol ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตี้แต่เพียงอย่างใด

จากผลการทดลองและข้อมูลที่ได้จากจุลินทรีย์อื่นสามารถสรุปได้ว่าไอออนมักมีผลไปยับยั้งหรือเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์ แต่ประเภทของไอออนที่จะไปยับยั้งหรือกระตุ้นไซลาเนสต่างชนิดกันอาจแตกต่างกันไปบ้างเช่น ในขณะที่ $CaCl_2$, $MgCl_2$ และ $ZnSO_4$ ช่วยเพิ่มแอคติวิตี้ของไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* แต่กลับมีผลยับยั้งการทำงานของไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* NG-13 (Biswas, *et al.*, 1990) เป็นต้น และการที่ SDS ทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลง แสดงว่าโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนที่ถูกทำลายไปทำให้เอนไซม์ทำงานไม่สมบูรณ์

4. 6 การตรวจสอบผลผลิตโดยโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ

เนื่องจาก Xln2 เป็นไอโซไซม์ที่มีอยู่มากและมีแอคติวิตี้สูง จึงนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับผลผลิตที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับสับสเตรตไซแลนที่เวลาต่างๆ ตรวจสอบผลผลิตซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวส์โดยโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ แล้วย้อมด้วย Silver nitrate reagent เทียบกับน้ำตาล 2 ชนิดคือ น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลไซโลไบโอสเป็นสารละลายมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 18 พบว่า Xln2 ย่อยไซแลนอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 1 นาทีก็เริ่มเห็นผลผลิต ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ใช้บ่ม แบ่งผลผลิตออกเป็น 4 ประเภทเรียงตามระยะทางการเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นบนกระดาษโครมาโตกราฟีคือ 1. โอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลไซโลไตรโอสหรือน้ำตาลไซโลเตตราโอสปริมาณเล็กน้อย 2. น้ำตาลไซโลไบโอส 3. น้ำตาลที่มีขนาดอยู่ระหว่างน้ำตาลไซโลสกับน้ำตาล

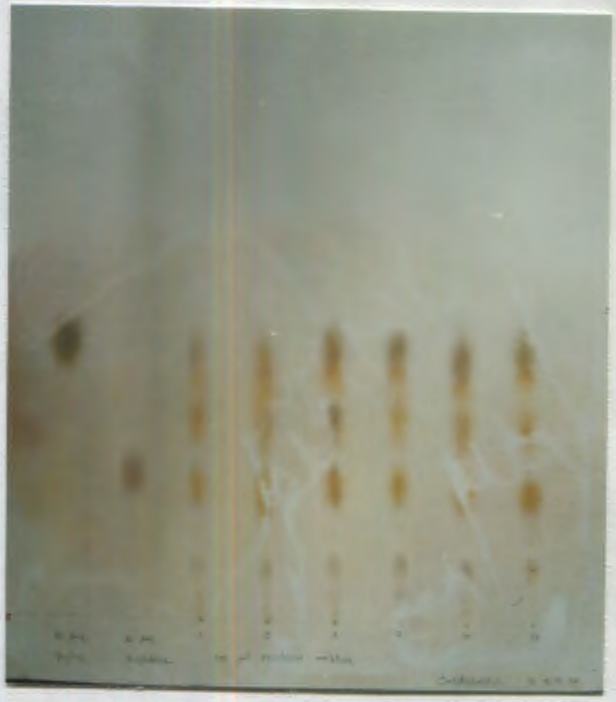
ตารางที่ 7 ผลของไอออนโลหะและสารยับยั้งต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

ไอออนโลหะและสารยับยั้ง	แอคติวิตี้ของเอนไซม์ (%)
ชุดควบคุม	100.0
5% Ethanol	102.0
10mM KCl	110.6
10mM NaCl	111.9
10mM $CaCl_2$	117.4
10mM $MgCl_2$	118.9
10mM $ZnSO_4$	114.8
10mM $CuSO_4$	31.5
10mM EDTA	73.6
1% SDS	2.6

ไซโลไบโอสซึ่งอาจเป็นน้ำตาลอราบิโนสหรือน้ำตาลแมนโนส 4. น้ำตาลไซโลส โดยมีน้ำตาลชนิดที่ 2-4 ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ในการทดลองครั้งนี้แม้บ่มปฏิกิริยาต่อไปให้นานถึง 24 ชั่วโมง ปรากฏว่ายังคงได้ผลผลิตสี่ประเภทในปริมาณเช่นเดิม แสดงว่า Xln2 แต่เพียงชนิดเดียวไม่สามารถย่อยไซแลนให้เป็นหน่วยย่อยที่สมบูรณ์ได้ จะต้องมีเอนไซม์อื่นร่วมด้วย โดย Xln2 ทำหน้าที่เป็น non-debranching endo-β-(1→4)-D-xylanase

Biely, *et al.* (1980b) รายงานว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *Cryptococcus albidus* เมื่อบ่มกับไซแลนต้องใช้เวลานานถึง 60 นาที จึงจะเริ่มมีผลผลิตเป็นน้ำตาลไซโลสจึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่ได้เป็น endo-β-(1→4)-xylanase และ Nakanishi, *et al.* (1984) ทดลองใช้ไซลาเนสจาก *Cryptococcus flavus* ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ผลผลิตที่ได้หลังจากการบ่ม 8 ชั่วโมง ปรากฏว่าส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลสและไซโลไบโอส และมีไซโลไตรโอสเล็กน้อยจึงสรุปว่าไซลาเนสนี้เป็น endo-type xylanase และมีแอคติวิตี้ของ trans-xylosidase

Misha, *et al.* (1990) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่แยกบริสุทธิ์ได้จาก *Lentinula edodes* สามารถย่อยไซแลนให้ได้ผลผลิตพวกไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส เขาจึงสรุปว่าเอนไซม์ที่ได้เป็น non-debranching endo-β-(1→4)-D-xylanase สำหรับการทดลองของ Grabski และ Jeffries (1991) ทำการย่อยไซแลนเป็นเวลา 12 ชั่วโมงด้วยเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จาก *Streptomyces roseiscleroticus* พบว่าผลผลิตที่ได้เป็นน้ำตาลอราบิโนส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส



รูปที่ 18 ผลของชนิดผลผลิตจาก *Cryptococcus laurentii* Xln2 โดยการทำโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ

ช่อง 1 น้ำตาลไซโลส 20 ไมโครกรัม

ช่อง 2 น้ำตาลไซโลไบโอส 40 ไมโครกรัม

ช่อง 3-8 ผลผลิตจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เวลา 1, 3, 5, 7, 10 และ 15 นาที

บทที่ 4

สรุป

1. ความสามารถของ *Cryptococcus laurentii* ในการใช้ไซแลนบนอาหารแข็ง

ยีสต์ *Cryptococcus laurentii* สามารถผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ปรากฏวงใส รอบๆ โคโลนีของเชื้อขนาดกว้าง มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ *Pichia stipitis* CBS 5775 และ CBS 5776

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

ยีสต์ *Cryptococcus laurentii* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3. ขั้นตอนและวิธีการทำเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ให้บริสุทธิ์

การทำเอนไซม์ไซลาเนสจากยีสต์ *Cryptococcus laurentii* ให้บริสุทธิ์ สารละลายเอนไซม์เมื่อเริ่มต้นมีแอคติวิตี้จำเพาะ 2.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขั้นแรกใช้การตกตะกอนสารละลายเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80% saturation ตามด้วยการกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิส การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไปใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-cellulose สามารถแยกเอนไซม์ได้ 2 ส่วนคือ พีค 1 เอนไซม์มีแอคติวิตี้จำเพาะ 3.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 16.43% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มเป็น 1.45 เท่า และ พีค 2 เอนไซม์มีแอคติวิตี้จำเพาะ 3.14 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 24.06% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มเป็น 1.40 เท่า ขั้นสุดท้ายใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300 เพื่อให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น แยกเอนไซม์ได้ 3 ส่วนคือเอนไซม์ 1/2, 1/3 และ 1/4 จากพีค 1 เอนไซม์ 1/2 มีแอคติวิตี้จำเพาะ 1.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 0.27% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 0.46 เท่า เอนไซม์ 1/3 มีแอคติวิตี้จำเพาะ 4.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 1.09% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มเป็น 1.09 เท่า เอนไซม์ 1/4 มีแอคติวิตี้จำเพาะ 2.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 0.27% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 0.94 เท่า ส่วน พีค 2 เมื่อนำมาผ่านเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300

สามารถแยกเอนไซม์ได้ 3 ส่วนคือ เอนไซม์ 2/2, 2/3 และ 2/4 เอนไซม์ 2/2 มีแอคติวิตี้จำเพาะ 1.27 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 0.38% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 0.57 เท่า เอนไซม์ 2/3 มีแอคติวิตี้จำเพาะ 3.66 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 1.26% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มเป็น 1.64 เท่า เอนไซม์ 2/4 มีแอคติวิตี้จำเพาะ 1.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เหลือปริมาณเอนไซม์ 0.13% ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 0.72 เท่า

เอนไซม์ไซลาเนสหลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีเอนไซม์ 3 ชนิด (Xln1, Xln2 และ Xln3 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ 56,000; 23,500 และ 20,000 ดาลตัน ตามลำดับ ใน 8% SDS-PAGE

4. คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ Xln1 และ 50-55 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ Xln2

พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว คือ พีเอช 4.0 โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ทั้งเอนไซม์ Xln1 และ Xln2

เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ที่บริสุทธิ์ สามารถทนความร้อนได้ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่ง ทั้งเอนไซม์ Xln1 และ Xln2

ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ที่ผ่านการเตรียมบริสุทธิ์แล้ว เมื่อใช้ Oat spelt xylan เป็นสับสเตรต เอนไซม์ Xln1 มีค่า K_m เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 28.37 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์ Xln2 มีค่า K_m เท่ากับ 7.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 603.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การศึกษาไอออนโลหะและสารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii* ที่บริสุทธิ์ พบว่า เอธานอล 5% ไม่มีผลต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ไอออน K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์ขึ้นเล็กน้อย ส่วน Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ 70% และ EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ 30% สำหรับ SDS ความเข้มข้น 1% ทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลงเหลือ 2%

การศึกษาผลผลิตจากการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ที่บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ พบว่ามีผลผลิตจากปฏิกิริยา 4 ประเภทคือ 1. น้ำตาลไซโลส 2. น้ำตาลที่อยู่ระหว่างน้ำตาลไซโลสและไซโลไบโอส 3. น้ำตาลไซโลไบโอส และ 4. ไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ จึงจัดเป็น endo-β-(1→4)-D-xylanase

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการเตรียมเอนไซม์ Xln3 ให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เพิ่มเติม ทั้งนี้เพราะจากข้อสังเกตุ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) เมื่อบ่มเอนไซม์จากพีค1 หรือพีค2 ที่ 100 องศาเซลเซียสนาน 0-5 นาที พบว่าสารละลายภายหลังการบ่มยังคงมีแอคติวิตี้ของไซลาเนสอยู่ จึงอาจเป็นไปได้ว่า Xln3 เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้สูงกว่า Xln1 และ Xln2

2. ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์คือทดสอบว่าเอนไซม์สามารถใช้สับสเตรทอื่นเช่น cellulose หรือ carboxymethyl cellulose ได้หรือไม่

3. นำเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ไปใช้ให้เป็นประโยชน์ เช่นการหมักวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือใช้ในกระบวนการทำเยื่อกระดาษเป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์. 2530. กรดอะมิโนและโปรตีน. ใน ชีวเคมี (บรรณาธิการ มนตรี จุฬา วัฒนทล) หน้า 107-146, กรุงเทพ : ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล.

พิณทิพ รื่นวงษา. 2536. การแยกโปรตีนโดยการทำเจลอิเลกโตรโฟรีซิส. ใน คู่มือปฏิบัติการวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพ "เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม" (บรรณาธิการ วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์) เล่ม 1, หน้า 4.1-4.13, นครปฐม : โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของคาร์โบไฮเดรต. ใน คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ "เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม" (บรรณาธิการ วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์) เล่ม 1, หน้า 2.1-2.12, นครปฐม : โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

Alexander, N.J. 1986. Genetic manipulation of yeasts for ethanol production from xylose. Food Technol. 40:99-103.

Aspinall, G.o., Greenwood, C.T. and Sturgeon, R.J. 1969. The degradation of xylan by alkali. J. Chem. Soc. 3667-3674.

Bailey. M.J. and Viikari L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media. World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 80-84.

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

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic system. Trends in Biotechnol. 3:286-290.

Biely, P., Kratky, Z., Vrsanska, M. and Urmanicova, D. 1980a. Induction and inducers of endo-1,4-β-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*. Eur. J. Biochem. 108:323-329.

Biely, P., Mislovicova, D. and Toman, R. 1985. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-β-xylanases and endo-1,4-β-glucanases. Anal. Biochem. 144:142-146.

Biely, P. and Petrakova, E. 1984a. Novel inducers of the xylan degrading enzyme system of *Cryptococus albidus*. Bacteriol. J. 160: 408-412.

Biely, P. and Petrakova, E. 1984b. Glycosidic bond rearrangements in isomeric xylobioses by yeast xylan-degrading enzymes. FEBS. 178:323-326.

Biely, P., Vrsanska, M. and Kratky Z. 1980b. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*: identification and cellular localization. Eur. J. Biochem. 108: 313-321.

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

Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. 1976. Hemicellulases, their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbo. Chem. Biochem. 32:277-352.

Esteban, R., Villanuera, Y.R. and Villa T.G. 1982. D-Xylanases of Bacillus circulans WL-12. Can. J. Microbiol. 28:733-739.

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

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

Hollenberg, C.P. and Wilhelm, M. 1987. New substrates for old organisms. Biotec. 1:21-31.

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

Inglett, G.E. 1973. Symposium: processing agricultural and municipal wastes. The AVI Publishing Company, Inc.

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

John, M., Schmidt, B. and Schmidt, J. 1979. Purification and some properties of five endo-1,4-β-D-xylanases and a β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger.* Can. J. Biochem. 57:125-134.

Keskar, S.S., Srinivasan, M.C. and Deshpande, V.V. 1989. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces* T7. Biochem. J. 261:49-55.

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

Kirk, T.K., Higuchi, T. and Chang, H. 1980. Lignin Biodegradation: Microbiology Chemistry and Potential Applications. Volume II. CRC Press, Inc. Boca Ration Florida.

Kotter, P., Amore, R., Hollenberg, C.P. and Clriacy, M. 1990. Isolation and characterization of *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. Cur. Gen. 18:493-500.

Leathers, T.D., Kurtzman, C.P. and Detroy, R.W. 1984. Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulans* and *Cryptoccus albidus*. Biotechnol. Bioeng. 14:225-250.

Li., X-L., Zhang, Z-Q., Dean, J.F.D., Erikson, K-E.L. and Ljungdahl, L.G. 1993. Purification and characterization of a new xylanase (APX-11) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. Appl. Environ. Microbiol. 59(10):3212-3218.

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

Marui, M., Nakanishi, K. and Yasui, T. 1985. Immunological properties and constituent amino acids of three xylanase produced inductively from *Streptomyces* sp. Agric. Bio. Chem. 49:3409-3413.

McCarthy, A.J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. 46:145-163.

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

Misha, C., Forrester, I.T., Kelley, B.D., Burgess, R.R.and Leatham, G.F. 1990. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate. Appl. Microbiol. Biotech. 33:226-232.

Molosoli, R. 1985. Molecular expression of xylanase gene in *Cryptococcus albidus*. Biochim. Biophys. Acta. 826(4):202-207.

Morales. P., Modarro, A., Perez-gonzales, J.A., Sendra, J.M., Pinoga, F. and Flors, A. 1993. Puricification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa*. Appl. Environ. Microbiol. 59:1376-1382.

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

Notario, V., Villa, T.G. and Villamueva, J.R. 1979. Cell wall-assosiated 1,4-β-D-xylanase in *Cryptococcus albidus* var. *aerius* : in situ characterization of the activity. J. Gen. Microbiol. 114:415-422.

Okeke, B.C. and Obi, S.K.C. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an Arthrographis species. World J. Microbiol. Biotechnol. 9:345-349.

Paice, M.G. and Jurasek, L. 1984. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis. J. Wood Chem. Technol. 4:187-198.

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

Prior, B.A., Kilian, S.G. and Preez, J.C. 1989. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Proc. Biochem. 24:21-32.

Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1991. Purification and characterization of two xylanases from *Trichoderma longibrachiatum*. Eur. J. Biochem. 202:521-529.

Saddler, J.N., Yu, E.K.C., Mes-Hatree, M., Levitin and Brownell, H.H. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels. Appl. Environ. Microbiol. 45:153-160.

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

Stevens, B.J.H. and Payne, J. 1977. Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. J. Gen. Microbiol. 100:381-393.

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

Taiz, L. and Honigman, W.A. 1976. Production of cell wall hydrolysing enzymes by barley aleurone layer in response to gibberellic acid. Plant Physiol. 58:380-386.

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

Thomson, J.A. 1993. Molecular biology of xylan degradation. FEMS Microbiol. Rev. 104:65-82.

Tumsuwan, P. 1994. Purification and Characterization of Xylanase from *Pichia stipitis*. M.Sc. Prince of Songkla University.

Udombunditkul, M., Ono, H., Shinmyo, A. and Takano, M. 1990. Study on xylanase from germinated rice seed. Annual reports of IC Biotech. 13:185-195.

Viet, D.N., Kamio, Y., Abe, N.,Kaneko, J. and Izaki, K. 1991. Purification and properties of β-1,4-xylanase from *Aeromonas caviae* N-61. Appl. Environ. Microbiol. 57:442-449.

Wang, P. and Broda, P. 1992. Stable defined substrate for turbidimetric assay of endoxylanases. Appl. Environ. Microbiol. 58:3433-3436.

Wilkie, K.C.B. 1979. The hemicellulose of grasses and cereals. Adv. Carbo. Chem. Biochem. 36:215-262.

Wong, K.K.V., Tan, L.U.L. and Soddler, J.N. 1988. Multiplicity of β-1,4- xylanase in microorganism : functions and applications. Microbiol. Rev. 52:305-317.

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการใช้ Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ตามวิธีของ Miller (1959)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล 50 มิลลิลิตร

2. DNS solution เตรียมโดยละลาย 3,5 Dinitrosalicylic acid 2.5 กรัม ลงใน 50 มิลลิลิตร ของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล เติม sodium potassium tartrate (Rochelle salt) 75 กรัม และคนจนละลายหมด เติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการวิเคราะห์

1. ปิเปตสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร (สำหรับ blank ใช้ sample buffer 1 มิลลิลิตรแทน)

2. เติม DNS reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร

3. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก

4. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

6. เตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส เตรียมสารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำตามขั้นตอน 1.-5. โดยใช้สารละลายไซโลสแทนสารตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตี้ไซลาเนส

7. นำข้อมูลที่ได้ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณไซโลส ดังแสดงในรูปผนวก ข. 1

การคำนวณ

ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส

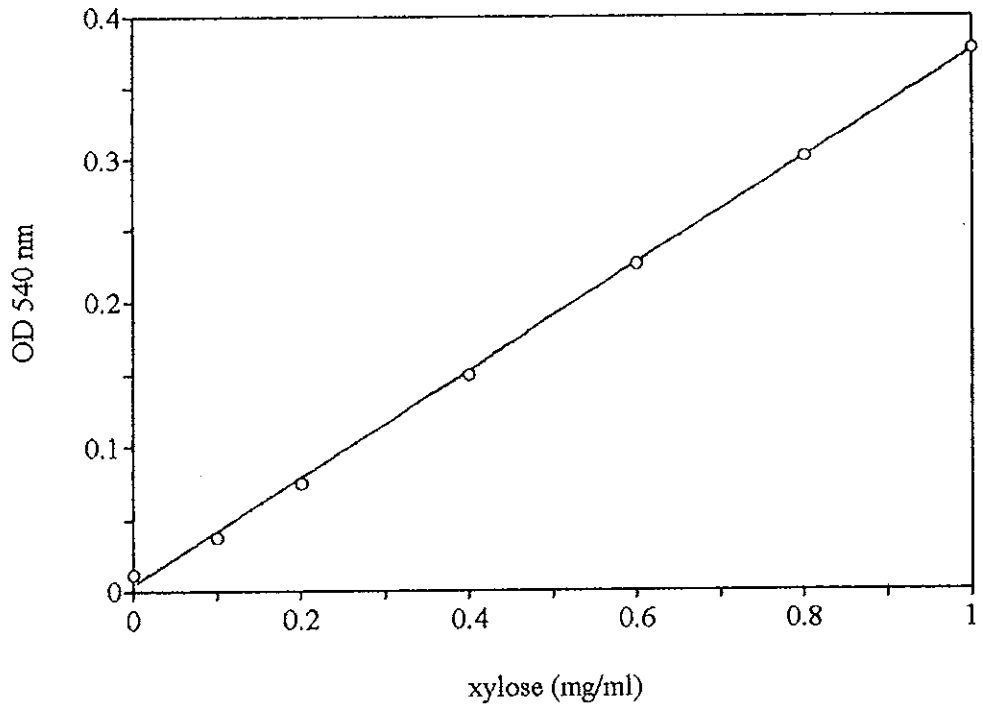
$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไซโลส} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิกรัม} = \frac{\text{ค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส}}{\text{ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

$$\%\text{Yield} = \frac{\text{แอคติวิตี้รวมของเอนไซม์x100}}{\text{แอคติวิตี้รวมของเอนไซม์เริ่มต้น}}$$

$$\text{purification factor} = \frac{\text{ค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์}}{\text{ค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น}}$$



รูปภาคผนวก ก 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยการทำโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, 2536)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Solvent ประกอบด้วย n-butanol/acetic acid/H2O อัตราส่วน 3:1:1 โดยปริมาตร

2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ในเมธานอล (methanol) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ในน้ำปริมาณน้อย (น้อยกว่า 1 มิลลิลิตร) แล้วเติมเมธานอลให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. Saturated silver nitrate solution เตรียมโดยเติม saturated aqueous solution ของซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) 0.1 มิลลิลิตร ลงใน acetone 20 มิลลิลิตร ถ้าหลังการเติมได้สารละลายที่ขาวขุ่นให้เติมน้ำลงไปทีละหยดจนสารละลายใส (จะใช้ซิลเวอร์ไนเตรตประมาณ 0.2 กรัม)

4. สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 นอร์มอล

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่าง โดยการบ่มสารละลายไซแลนกับเอนไซม์ไซลาเนส และสารละลายบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาต่างๆ กัน เมื่อครบตามเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 10 นาที

2. spot ตัวอย่างลงบนกระดาษกรอง 3M Whatman ประมาณ 100 ไมโครลิตร พยายาม spot ให้ได้จุดเล็กๆ ที่สุดเท่าที่จะทำได้ แล้วเป่าให้แห้งด้วยที่เป่าผม

3. นำกระดาษในข้อ 2. ไปตั้งยืนใน chamber ที่ saturated ด้วย solvent ปล่อยให้ solvent เคลื่อนที่ซึมไปตามกระดาษที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งปกติใช้เวลาประมาณ 15-25 ชั่วโมง ขึ้นกับความยาวกระดาษ

4. นำกระดาษออกจาก chamber ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ต่อไปนี้จะเรียกกระดาษนี้ว่า Chromatogram

5. จุ่ม Chromatogram ที่แห้งแล้ว ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ทำให้แห้งใน Fume hood

6. พ่นฝอย Chromatogram ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอลที่ละลายในเมธานอล จนเห็น spot สีดำและน้ำตาลเข้ม ปรากฏบนกระดาษ

7. ทิ้งไว้ให้แห้ง นำ Chromatogram มากำจัดซิลเวอร์ส่วนเกินออก โดยจุ่มลงในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 นอร์มอล แล้วล้างต่อด้วยน้ำไหล 1 ชั่วโมง

8. ทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จะพบจุดสีดำและสีน้ำตาลบนพื้นกระดาษสีขาว

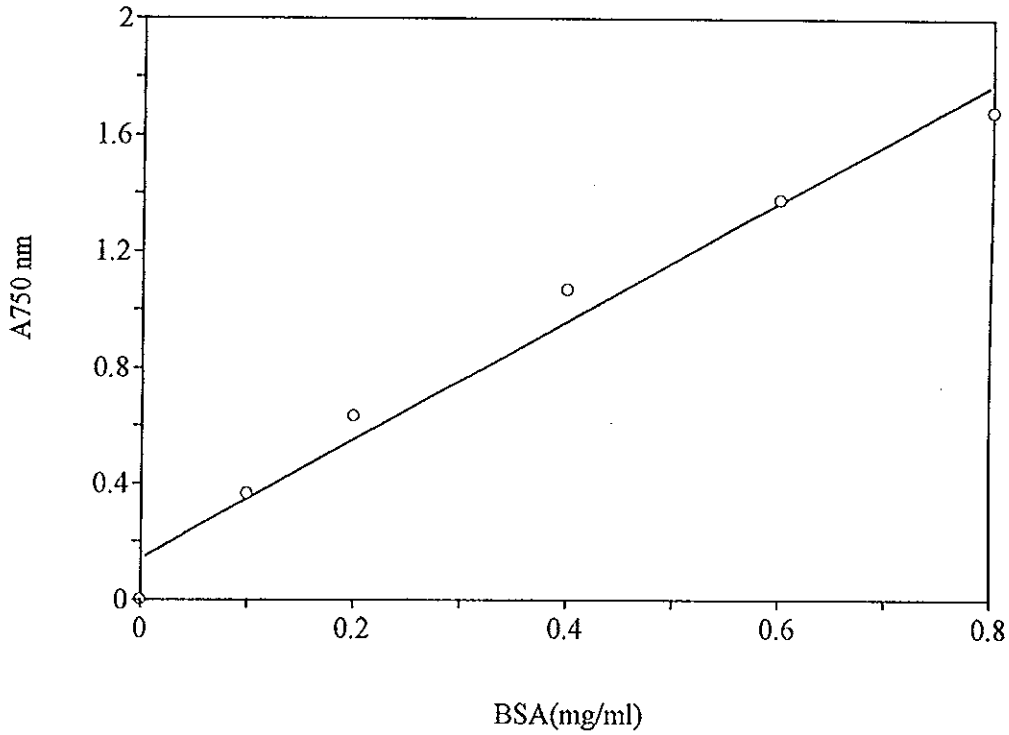
3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry, et al., 1951)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A : 1% (w/v) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.H_2O$)
2. สารละลาย B : 2% (w/v) โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
3. สารละลาย C : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
4. สารละลาย D : 4% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
5. Folin-Ciocalteau reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตรกับสารละลาย D 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง
2. เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่า สารละลาย F
3. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที
4. ใส่สารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดในข้อ 3.
5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรโดยใช้ Sample buffer เป็น blank ทำตามขั้นตอน 3.-6.
7. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0.05-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำตามขั้นตอน 3.-6. โดยใช้สารละลายโปรตีนแทนสารตัวอย่าง สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน
8. นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) ดังแสดงในรูปภาคผนวก ก 2



รูปภาคผนวก ก 2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน (BSA)

4. การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยการทำเจลอิเลกโตรโฟรีซิสตามวิธีของ Laemmli (1970, อ้างโดย พิณทิพ รื่นวงษา, 2536)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Acrylamide/bisacrylamide เตรียมโดยละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ Bisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากเตรียม

2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์พีเอช 8.8 (concentreted resolving gel buffer) ละลาย Tris-base 18.17 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์พีเอช 6.8 (concentreted stacking gel buffer) ละลาย Tris-base 6.06 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. 10% SDS ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

5. Stock sample buffer (0.06M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 0.025% Bromophenol blue) เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในอัตราส่วนดังนี้

น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร
0.5M Tris-HCl pH6.8	1.2	มิลลิลิตร
10% SDS	2.0	มิลลิลิตร
Glycerol	1.0	มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol blue	0.5	มิลลิลิตร

6. SDS reducing buffer เตรียมโดยผสม 50 ไมโครลิตร ของ 2-mercaptoethanol ใน stock smple buffer 0.95 มิลลิลิตร ก่อนจะใช้

7. 5x Resevoir buffer, pH 8.3 (0.025M Tris, 0.192M Glycine, 0.1%(W/V)SDS) ประกอบด้วย

Tris base	0.3	กรัม
Glycine	1.4	กรัม
10%SDS	1.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8. Catalyst ประกอบด้วย

10% Ammonium persulphate (APS) เตรียมก่อนที่จะใช้

TEMED (N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine) ใช้ TEMED ได้โดยตรง โดยไม่ต้องมีการทำให้เจือจาง

9. ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล Low Molecular Weight (LMW) Calibration kit (Pharmacia) ประกอบด้วย phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor และ α-lactalbumin มีน้ำหนักโมเลกุล 94,000, 67,000, 43,000, 30,000, 20,100 และ 14,400 ดาลตันตามลำดับ

วิธีการ

1. การเตรียม slab gel

เตรียมสารละลาย 8% separating gel ซึ่งประกอบด้วย

น้ำกลั่น	9.3	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	5.0	มิลลิลิตร
10% SDS	0.2	มิลลิลิตร
30% Acrylamide/bis	5.3	มิลลิลิตร

จากนั้นเติม 10% APS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ TEMED 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทสารละลายผสมนี้ลงไประหว่างแผ่นกระจกแก้วที่ได้เตรียมไว้แล้ว จนถึงระดับตามที่ต้องการ คอยๆ หยอดน้ำให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว

เมื่อ separating gel แข็งตัวได้ที่แล้ว ให้เตรียม 4% stacking gel ซึ่งประกอบด้วย

น้ำกลั่น	7.1	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
30% Acrylamide/bis	1.3	มิลลิลิตร

จากนั้นเติม 10% APS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับ separating gel ซึ่งได้เทน้ำกลั่นทิ้งไปแล้ว สอด comb ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกแก้วทั้งสอง เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ให้ค่อยๆ ดึง comb ออก

2. การ run gel electrophoresis

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

reducing buffer ในอัตราส่วน 1:4 ต้มสารละลาย เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไป run gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า 25 mA จนสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนเกือบสุดปลายแผ่นกระจก จึงหยุดการ run gel electrophoresis

3. การย้อมสีโปรตีนในเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250

การเตรียม Staining solution เตรียม 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 ใน 40% Metanol และ 10% Acetic acid เมื่อสีละลายแล้ว ให้กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

การเตรียม Destaining solution ประกอบด้วย 40% Methanol และ 10% Acetic acid

วิธีการย้อม

นำแผ่นเจลที่ได้ออกมาย้อมด้วย staining solution นาน 30 นาที แล้วล้างเจลด้วย Destaining solution จนกว่าจะเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน

4. การย้อมสีโปรตีนในเจลด้วย Silver staining

Formaldehyde fixing solution เตรียมโดย 40% (V/V) methanol และ 0.05 มิลลิลิตรของ 37% Formaldehyde ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 1 เดือน

Thiosulfate developing solution เตรียมโดย 3% (W/V) sodium carbonate, 0.0004% (W/V) sodium thiosulfate และ 0.05 มิลลิลิตรของ 37% Formaldehyde เตรียมก่อนการใช้

Drying solution ประกอบด้วย 10% เอธานอล และ 4% กรีเซอรอล

วิธีการย้อม

4. 1. แช่เจลใน formaldehyde fixing solution 50 มิลลิลิตร นาน 10-30 นาที

4. 2. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

4. 3. แช่ใน โซเดียมไทโอซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร 2-3 นาที

4. 4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

4. 5. แช่ใน 0.1% ซิลเวอร์ไนเตรต นาน 20 นาที

4. 6. ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ต่อใน thiosulfate developing solution 20 มิลลิลิตร รอจนเห็นแถบชัดเจน แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป

4. 7. เติม 5 มิลลิลิตรของ กรดซิตริก 2.3 โมลาร์ ต่อ developing solution 100 มิลลิลิตร เขย่าช้าๆ ประมาณ 10 นาที

4. 8. ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที

4. 9. แช่เจลใน drying solution 10 นาที

4. 10. วางเจลระหว่างแผ่น dialysis membrane ที่เปียก 2 แผ่น แล้ว dry overnight

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$ 35.61 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

พีเอช	A(มิลลิลิตร)	B(มิลลิลิตร)
5.8	4.0	46.0
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	24.5	25.5
7.0	30.5	19.5
7.2	36.0	14.0
7.4	40.5	9.5
7.6	43.5	6.5
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

2. การเตรียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) ตามวิธีของ Gottschalk (1959 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย A: 2 M NaOAc

สารละลาย B: 2 M acetic acid

พีเอช	A(มิลลิลิตร)	B(มิลลิลิตร)
3.4	0.50	9.50
3.7	1.00	9.00
3.8	1.25	8.75
3.9	1.55	8.45
4.0	1.85	8.15
4.1	2.20	7.80
4.2	2.60	7.40
4.3	3.05	6.95
4.4	3.60	6.40
4.5	4.15	5.85
4.6	4.70	5.30
4.7	5.30	4.70
4.8	5.85	4.15
4.9	6.40	3.60
5.0	6.95	3.05
5.1	7.40	2.60
5.2	7.80	2.20
5.3	8.15	1.85
5.4	8.45	1.55
5.5	8.75	1.25
5.6	9.00	1.00
5.9	9.50	0.50

3. การเตรียมทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) ตามวิธีของ Bates and Bower (1956 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย A: 0.1 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane (tris) 12.114 กรัมต่อลิตร

สารละลาย B: 0.1 M HCl

พีเอช	B
7.0	46.6
7.1	45.7
7.2	44.7
7.3	43.4
7.4	42.0
7.5	4.03
7.6	38.5
7.7	36.6
7.8	34.5
7.9	32.0
8.0	29.2
8.1	26.2
8.2	22.9
8.3	19.9
8.4	17.2
8.5	14.7
8.6	12.4
8.7	10.3
8.8	8.5
8.9	7.0
9.0	5.7

4. การเตรียมคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography)

4. 1 การใช้เรซิน (Ion-exchange column chromatography)

DEAE-cellulose เตรียมโดยแช่อนุภาคของเรซิน DEAE-cellulose แบบ pre-swollen ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 นาน 30 นาที ก่อนที่จะนำไปบรรจุคอลัมน์

4. 2 การใช้เจล (Gel filtration)

เจลที่ใช้เป็นชนิด Sephacryl S-300 (Pharmacia) เตรียมโดยแช่เจล Sephacryl S-300 ในน้ำกลั่นทิ้งไว้ค้างคืน ดูดอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยในน้ำออก แล้วแช่ต่อในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ทิ้งไว้ค้างคืน ก่อนที่จะนำไปบรรจุคอลัมน์

5. ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและเปอร์เซนต์ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

AMMONIUM SULPHATE, GRAMS TO BE ADDED TO 1 LITRE

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

ที่มา: Scopes (1978)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางธัญญา ศรีโพธิ์

วัน เดือน ปีเกิด 12 กุมภาพันธ์ พศ. 2510

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตร)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2533