

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการแยก endophytic fungi จากพืชสมุนไพรตัวอย่าง

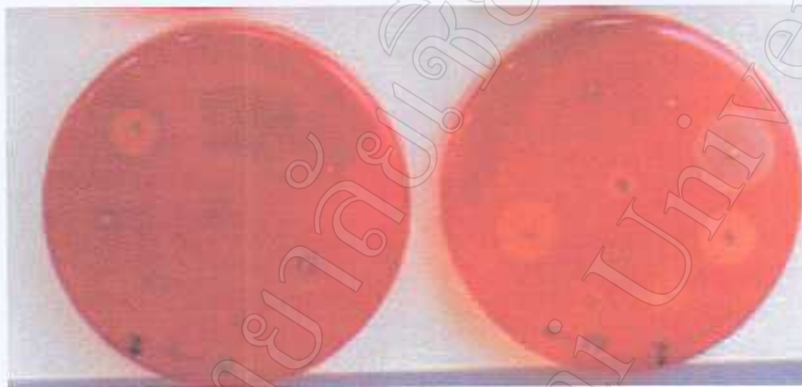
จากการทดลองแยกเชื้อรา endophytes จากตัวอย่าง กิ่ง และ ใบ ของพืชสมุนไพร 7 ชนิด ในอาหาร rose bengal malt extract agar ที่มีสารปฏิชีวนะ (chloramphenical 25 ppm.) ผสมอยู่ ทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน จะสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อราออกจากชิ้นตัวอย่าง (ภาพ 8) และทำการแยกเชื้อที่ปรากฏลงในอาหาร malt extract agar พบว่าสามารถแยกเชื้อราที่เป็น endophytes จากพืชตัวอย่างได้ทั้งหมด 189 ไอโซเลต คือ กระเจียนแดง 13 ไอโซเลต เสลดพังพอน 13 ไอโซเลต ทองพันชั่ง 56 ไอโซเลต คนทีสอ 25 ไอโซเลต ควินิน 17 ไอโซเลต สدابเสือ 46 ไอโซเลต น้ำนมราชสีห์ 19 ไอโซเลต



รูป 8 เชื้อราที่เจริญบนตัวอย่างพืชสมุนไพร บนอาหาร rose bengal malt extract agar

2. ผลการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ xylanase โดย Gel diffusion assay

เชื้อราที่แยกได้จากพืชตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 189 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ xylanase โดยวิธี gel diffusion assay (ภาพ 9) พบว่ามีเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลต สามารถสร้าง xylanase ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี xylan เป็นสับสเตรท เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน โดยเชื้อที่ได้จาก ทองพันชั่ง 2 ไอโซเลต คนทีสอ 1 ไอโซเลต สาบเสือ 1 ไอโซเลต (Code name : C11, C01, D01, F34 ตามลำดับ) จากการทดสอบให้วงใสขนาด 1.2, 1.0, 1.2 และ 1.7 เซนติเมตร ตามลำดับ



(ก)



(ข)

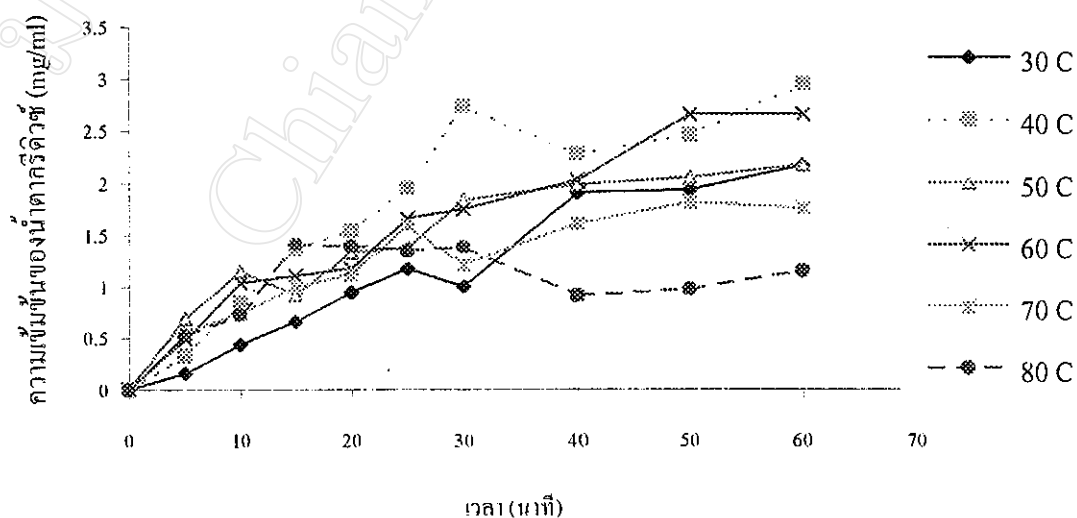
รูป 9 (ก) วงใสจากการทดสอบการสร้างไซลานเนส (ข) เชื้อ sterile mycelium D01

3. ผลการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนส

นำเชื้อที่ให้ขนาดของวงใสที่ทำการศึกษาแล้วนำมาทดสอบหาปริมาณของเอนไซม์ที่สร้างขึ้น โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่มีไขมันเป็นสับสเตรท เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ด้วย DNS method พบว่าเชื้อราไอโซเลต C11, C01, D01 และ F34 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.8, 2.1, 3.1 และ 0.08 U/ml ตามลำดับ โดยจากผลการทดลองเห็นได้ว่าเชื้อไอโซเลต D01 สามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุด และนำไปศึกษาต่อไป

4. ผลการหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 °C และพีเอช เท่ากับ 5.0 มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทโดยทำการศึกษาหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นทุกอุณหภูมิของการทดลอง และมีแนวโน้มที่จะคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที และที่ทุกอุณหภูมิจะมีบางช่วงเวลาที่ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (รูป 10) โดยที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จะดีที่สุด โดยความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.70 mg/ml. (ภาคผนวก ข)



รูป 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท

5. ผลการหาเวลาและสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

5.1. การหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

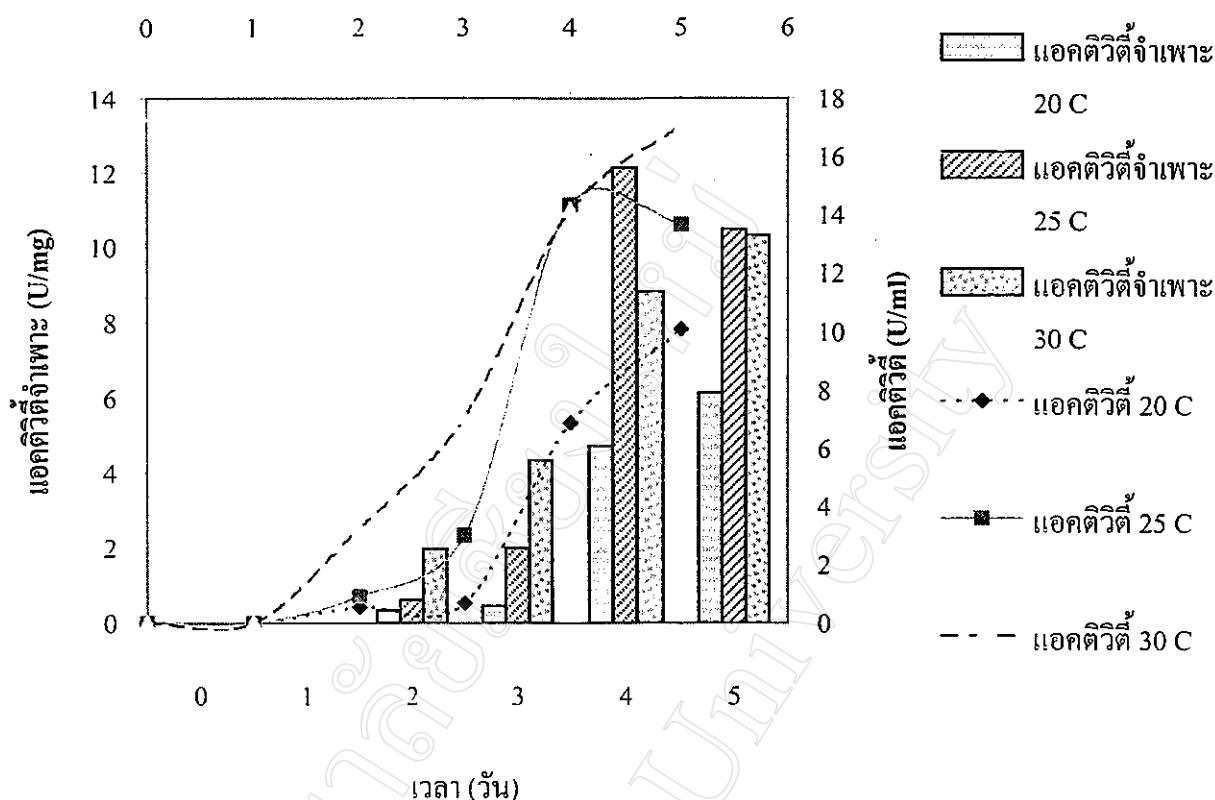
นำเชื้อไอโซเลต D01 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี ไซเลน เป็นสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 °C ค่า พีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 °C เชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์หลังจากการเลี้ยง 1 วัน โดยจะสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดในวันที่ 5 (17.1 U/ml.) (รูป 12) สำหรับที่อุณหภูมิ 20°C เชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์หลังจากวันที่ 3 โดยจะสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดในวันที่ 5 (10.1 U/ml.) ที่อุณหภูมิ 25 °C เชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์หลังจากวันที่ 2 โดยจะสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดในวันที่ 4 (14.3 U/ml.)

5.2 การหาสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

จากการทดลองนำเชื้อไอโซเลต D01 มาทำการเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ พบว่าขานอ้อย (bagasses) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด คือเท่ากับ 15.4 U/ml และค่า แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 10.8 U/mg. นอกจากนี้การใช้ CMC และ lactose สามารถชักนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ได้โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 9.4 U/ml และ 6.7 U/ml. และ แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 24.1 และ 15.7 U/ml. ตามลำดับ สำหรับการใส่ ไซโลส, wheat bran และ rice straw เชื้อจะผลิตเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (ตาราง 3)

ตาราง 3 การผลิตเอนไซม์จากการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตี (U/ml)	แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg)
Xylose	5.3	9.3
Lactose	6.7	15.7
Wheat bran	5.2	3.6
Bagass	15.4	10.8
CMcellulose	9.4	24.1
Glucose	0	0
Cellobiose	0	0
Rice straw	2.7	2.4



รูป 11 การผลิตเอนไซม์ของเชื้อไอโซเลต D01 ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

6. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

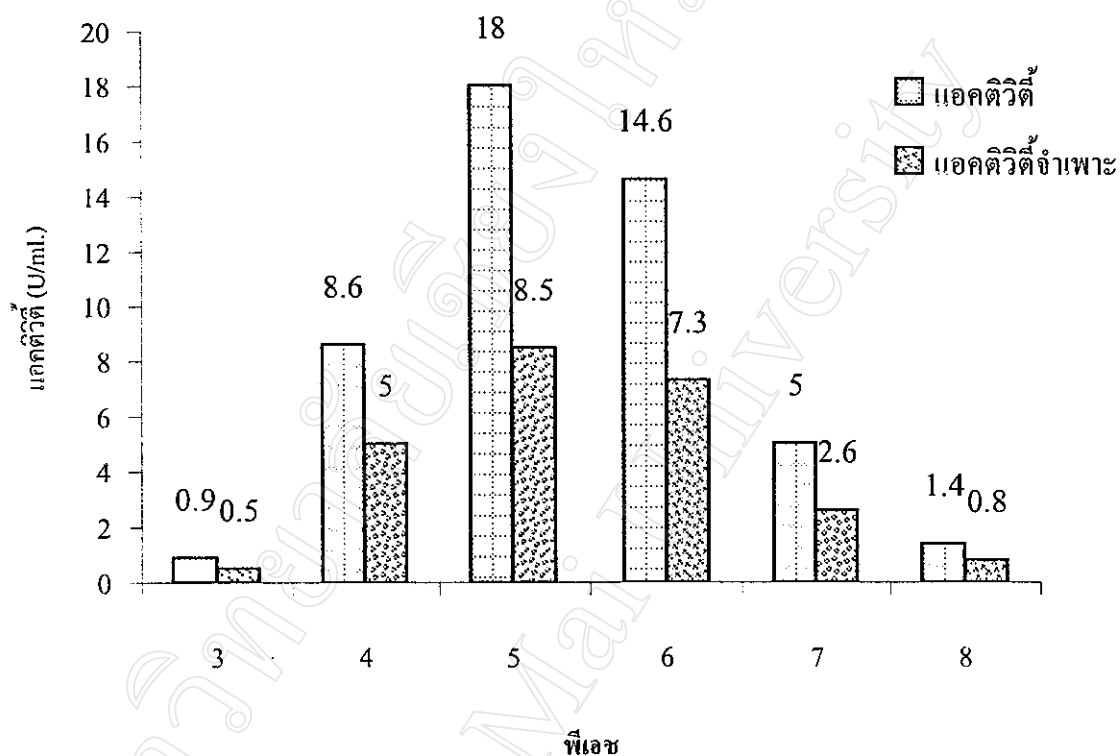
6.1 ผลการศึกษาหา พีเอช ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต D01 ในอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก ก) ทำการปรับค่า พีเอช ของอาหารให้เท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 โดยใช้ 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 0.1 M ไฮโดรคลอริก เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อราผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช เท่ากับ 5.0 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 18.0 U/ml. และค่า แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 8.5 U/mg.protein เมื่อค่าพีเอช เริ่มต้นเพิ่มขึ้นหรือลดลงจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ แสดงดัง รูป 12

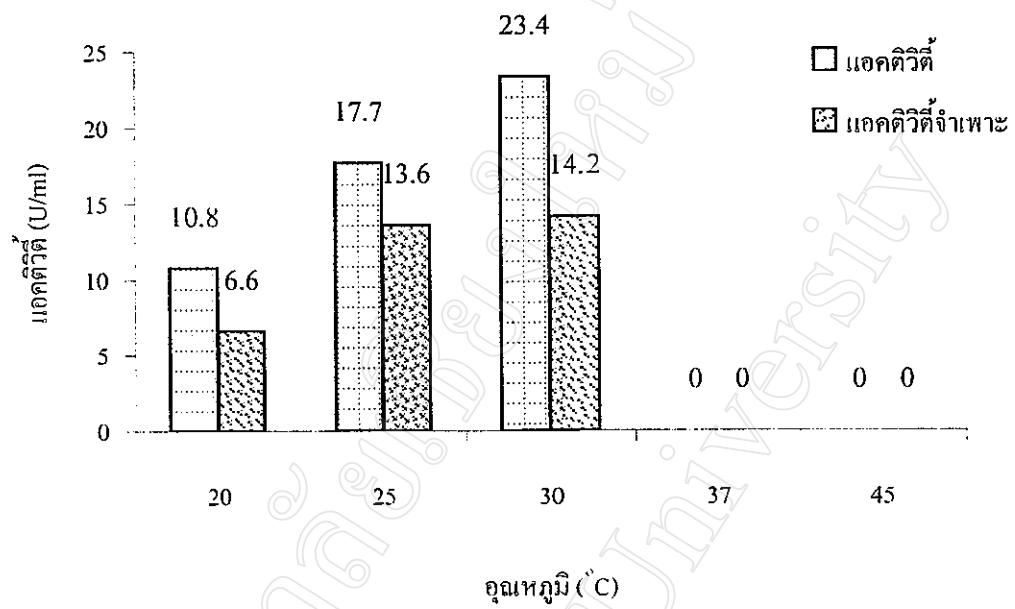
6.2 ผลการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไซลานเนส

จากการเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต D01 ในอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก ก) ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35 และ 45 °Cเป็นเวลา 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 °C. เชื้อจะสามารถที่จะผลิต ไซลานเนส ได้ในปริมาณที่สูงที่สุด โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 23.4 U/ml. ค่าแอคติวิตีจำเพาะ เท่า

กับ 14.2 U/mg.protein และที่อุณหภูมิ 25 °C และ 20 °C ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 17.7 U/ml. และ 10.9 U/ml. ตามลำดับ สำหรับที่อุณหภูมิ 35 °C และ 40 °C เชื่อไม่สามารถที่จะเจริญได้ จึงไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ ดังรูป 13



รูป 12 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อไฮโซเลต D01

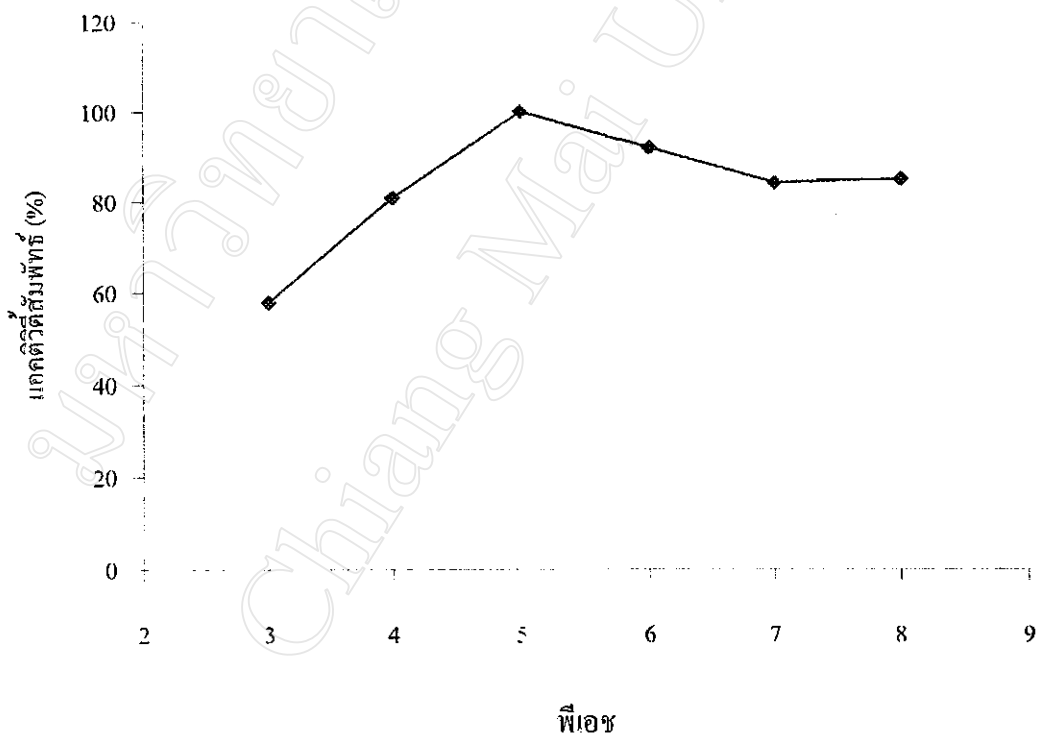


รูป 13 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อไอโซเลต D01

7. ผลการศึกษาคุณลักษณะของ crude ไชลานเนส

7.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

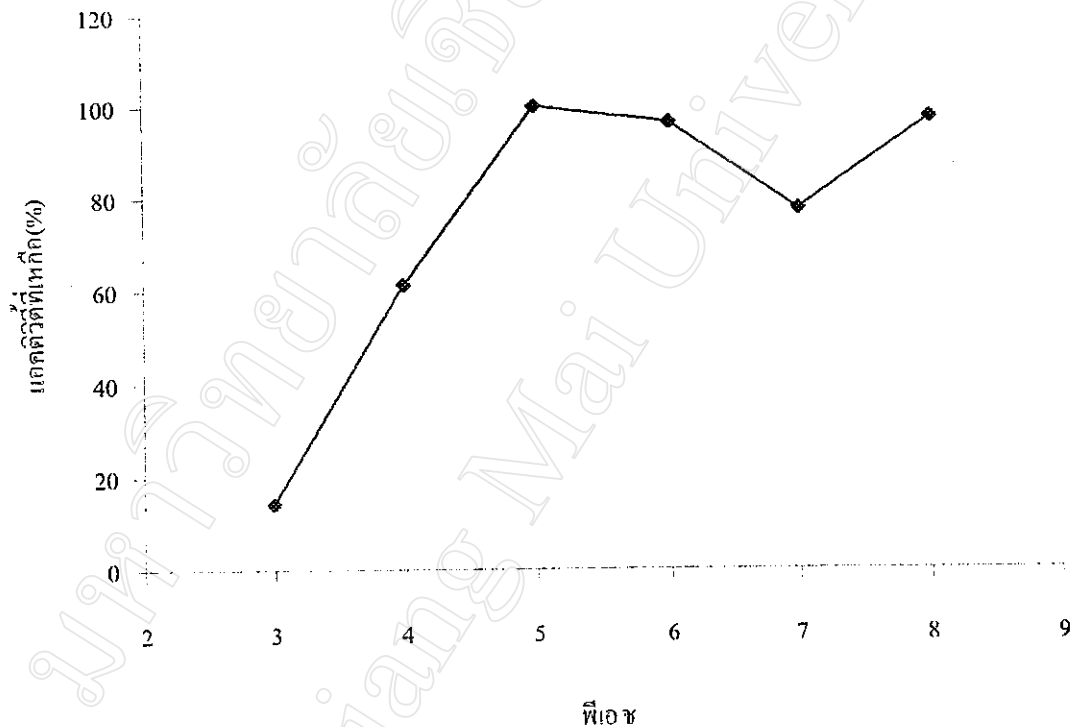
นำเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทำการศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการบ่มเอนไซม์กับ 0.1 M ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0, 7.0, 8.0 ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช เท่ากับ 5.0 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 15.5 U/ml (รูป 14) ค่า พีเอชที่น้อยกว่า 5.0 การทำงานของเอนไซม์จะลดลงโดยที่ค่าพีเอช 3.0 มี แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 57.9% และสำหรับค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 การทำงานของเอนไซม์จะลดลงเล็กน้อยมี แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 84.8%



รูป 14 ผลของพีเอชต่อการทำงานของ crude ไชลานเนส

7.2 ผลความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอช

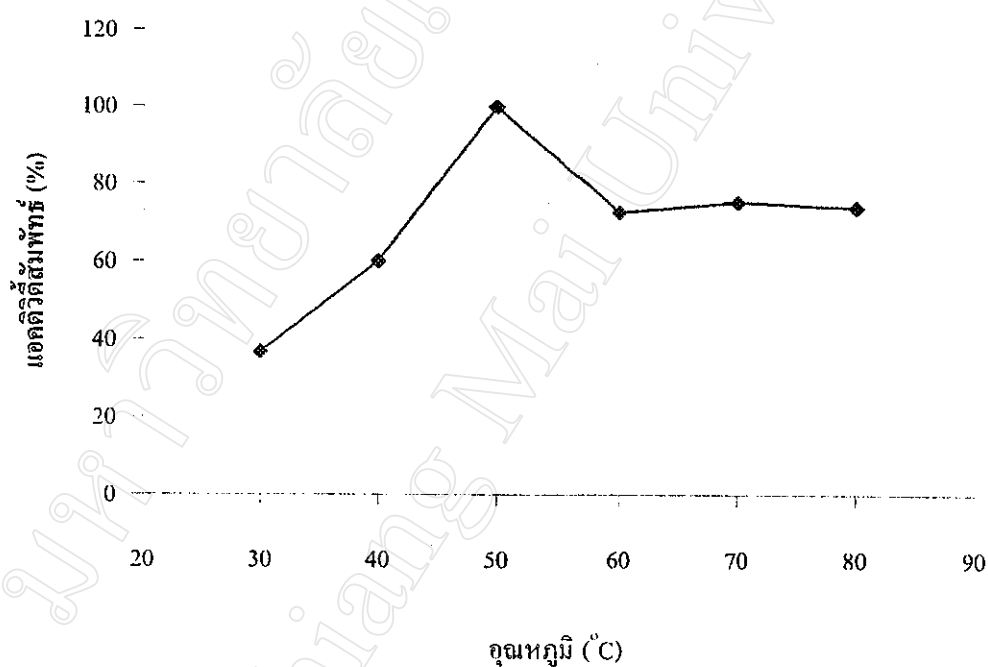
จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่อค่าพีเอช ในช่วง 3.0-8.0 โดยใช้ 0.1 M ซิเตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.0-6.0 และ 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0-8.0 พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0-8.0 หลังจากที่ทำกรบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง ค่า พีเอช 5.0 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.02 U/ml. โดยที่ค่าพีเอชที่ต่ำกว่า 5.0 ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วที่ค่าพีเอชเท่ากับ 4.0 และ 3.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือ 61.3% และ 14.3% (รูป 15)



รูป 15 ความเสถียรของ crude ไซตานีสต่อค่าพีเอช

7.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

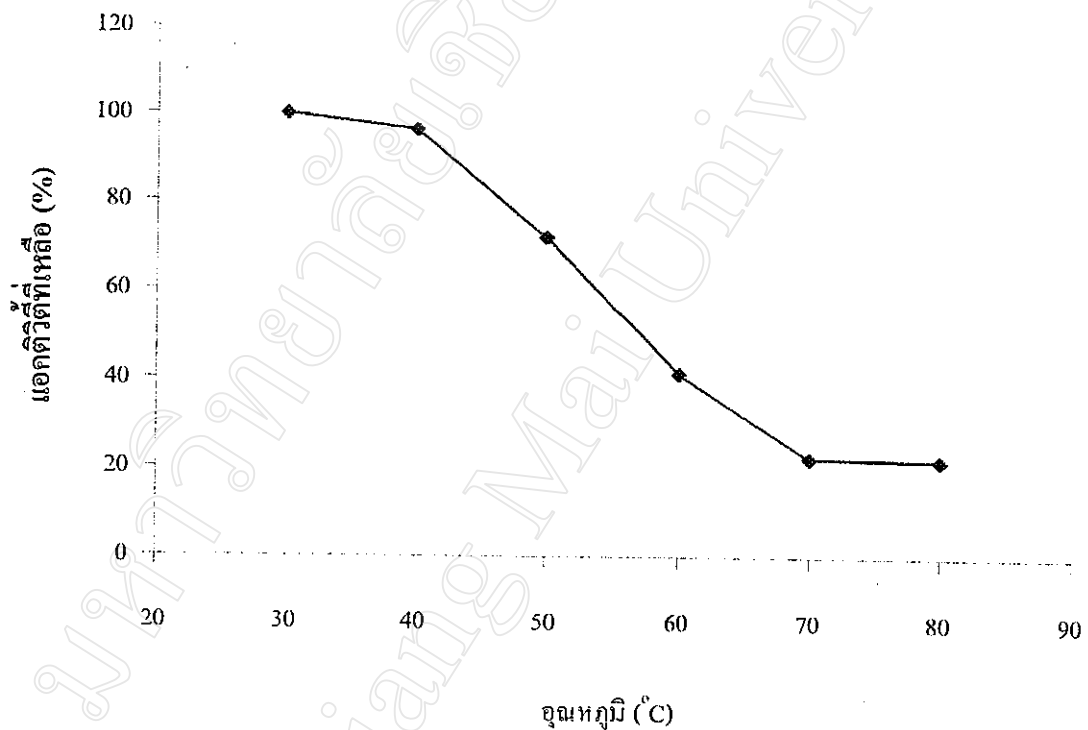
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30-80 °C โดยทำการบ่มเอนไซม์กับ 0.1 M ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 พบว่าที่อุณหภูมิ 30-40 °C จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อย และจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °C ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 21.98 U/ml. โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 °C กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเล็กน้อย โดยมี แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 72.8% และคงที่จนถึงอุณหภูมิ 80 °C (รูป 16)



รูป 16 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของ crude ไซลานเนส

7.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิหลังจากการบ่มเอนไซม์กับ 0.1 M ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 30-80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 17.20 U/ml. เมื่ออุณหภูมิเพิ่มมากกว่า 50 °C ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงมากและที่อุณหภูมิ 70°C และ 80 °C มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือเท่ากับ 22.4% และ 21.9% ตามลำดับ (รูป 17)



รูป 17 ความคงตัวของ crude ไซลเนส ต่ออุณหภูมิ

7.5 ผลความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท

จากการทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์ต่อการย่อยสลายสับสเตรท คือ ไซแลน (oat spelt xylan และ birchwood xylan), CMC, locus bean gum, arabic gum บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 50 °C เวลา 5 นาที พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลายไซแลน ทั้งสองชนิดคือ oat spelt xylan และ birchwood xylan โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.0 และ 13.0 U/ml. และค่าแอกติวิตี้จำเพาะ เท่ากับ 12.5 และ 13.5 U/mg ตามลำดับ พบว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์จากการย่อยสลายสับสเตรทชนิดอื่นๆ

7.6 ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนของเอนไซม์

จากการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลน (birchwood xylan) โดยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 °C ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการใช้ Thin-layer chromatography ทดสอบพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายจะมีน้ำตาลกลุ่มของไซโลส และ xylooligosaccharide และ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน (รูป 25)

8. ผลการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

8.1 ผลของการตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต((NH₄)₂SO₄)

ผลจากการตกตะกอนเกลือเป็นลำดับขั้นคือ 0-30, 30-50, 50-60, 60-70 และ 80-90 % พบว่าที่ทุกความเข้มข้นของการตกตะกอนด้วยเกลือสามารถที่จะตกตะกอนเอนไซม์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้น 0-30 % จะตกตะกอนได้มากที่สุด ค่อมาคือ 30-50 % โดยที่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงขึ้นยังคงมีการตกตะกอนของเอนไซม์ อยู่ในปริมาณที่สูง (ตาราง 4)

ตาราง 4 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตตามลำดับความเข้มข้น

ความเข้มข้นของเกลือ	แอกติวิตี้ (Unit)	ปริมาณโปรตีน (mg)	แอกติวิตี้จำเพาะ (U/mg)
0-30	31.8	0.9	35.3
30-50	18.2	1.3	14.0
50-60	19.4	2.0	9.7
60-70	13.5	3.2	4.2
70-80	44.0	4.9	8.97
80-90	8.7	2.1	4.1

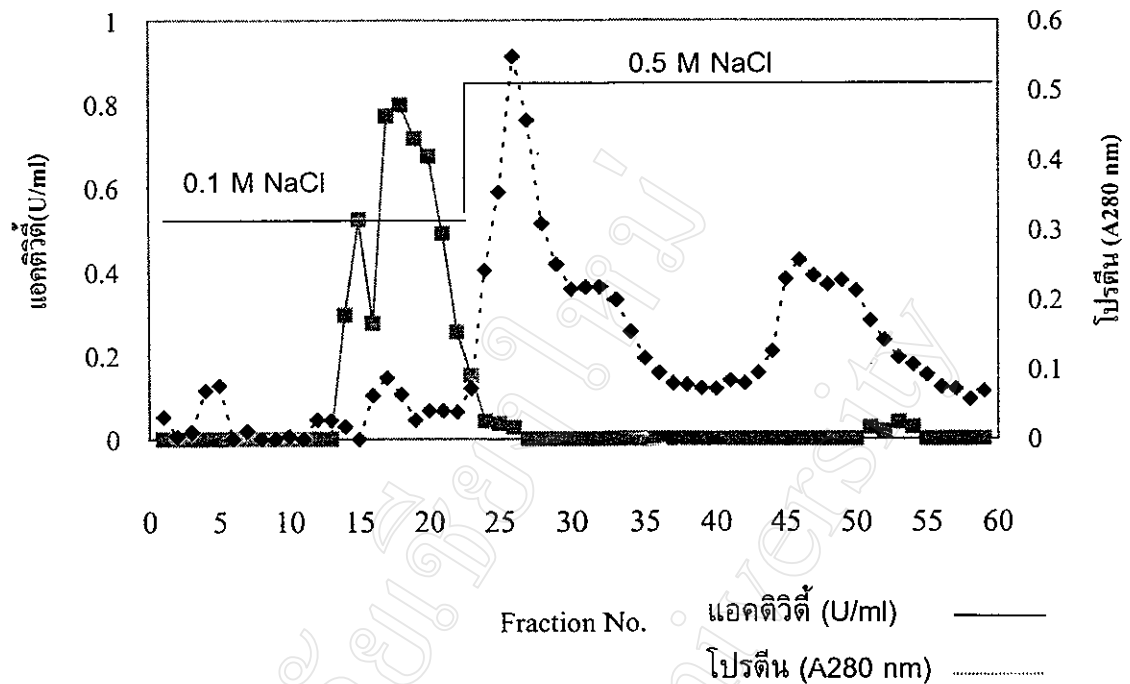
เมื่อนำเอนไซม์ปริมาตร 500 ml. มาทำการเพิ่มความเข้มข้นจนอิ่มตัวที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0-70 % พบว่าสามารถตกตะกอนโปรตีนได้ 71.4% นำโปรตีนที่ได้มาทำการละลายใน 30 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 และทำการแยกเกลือออก โดยการทำให้ละลายในน้ำ ส่วนของเอนไซม์ที่ผ่านการแยกเกลือแล้วมาทำการหากิจกรรมของเอนไซม์พบว่ากิจกรรมรวมเท่ากับ 3,062 Unit มีโปรตีนรวมเท่ากับ 312.5 mg. โดยมี แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 9.8

8.2 ผลของการแยกเอนไซม์ โดย ion exchange chromatography

สารละลายโปรตีนที่ผ่านการแยกเกลือออกโดย dialysis จะนำมาผ่าน anion exchange chromatography column ที่มีตัวแลกเปลี่ยนประจุคือ DEAE-cellulose โดยทำการทดสอบหาค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่จะทำให้เอนไซม์จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 12.0 U/ml. และค่า แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 10.0 U/mg พบว่าค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 เอนไซม์สามารถจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ดีที่สุด โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนที่เหลืออยู่ในส่วนใสเท่ากับ 4.5 U/ml. และ 0.90 mg/ml. ค่า แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 5.0 และ อัตราส่วนการจับของเอนไซม์ เท่ากับ 62.5 % (ตาราง 5)

ตาราง 5 ผลการทดสอบค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่จะทำให้เอนไซม์จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ

พีเอช	แอคติวิตี (U/ml.) (สารละลาย)	โปรตีน (mg/ml.)	แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg.)	อัตราส่วนการจับ(%)
5.0	11.7	0.93	12.6	2.5
6.0	11.3	1.1	10.6	5.8
7.0	4.9	0.86	5.7	59.1
8.0	4.5	0.90	5.0	62.5

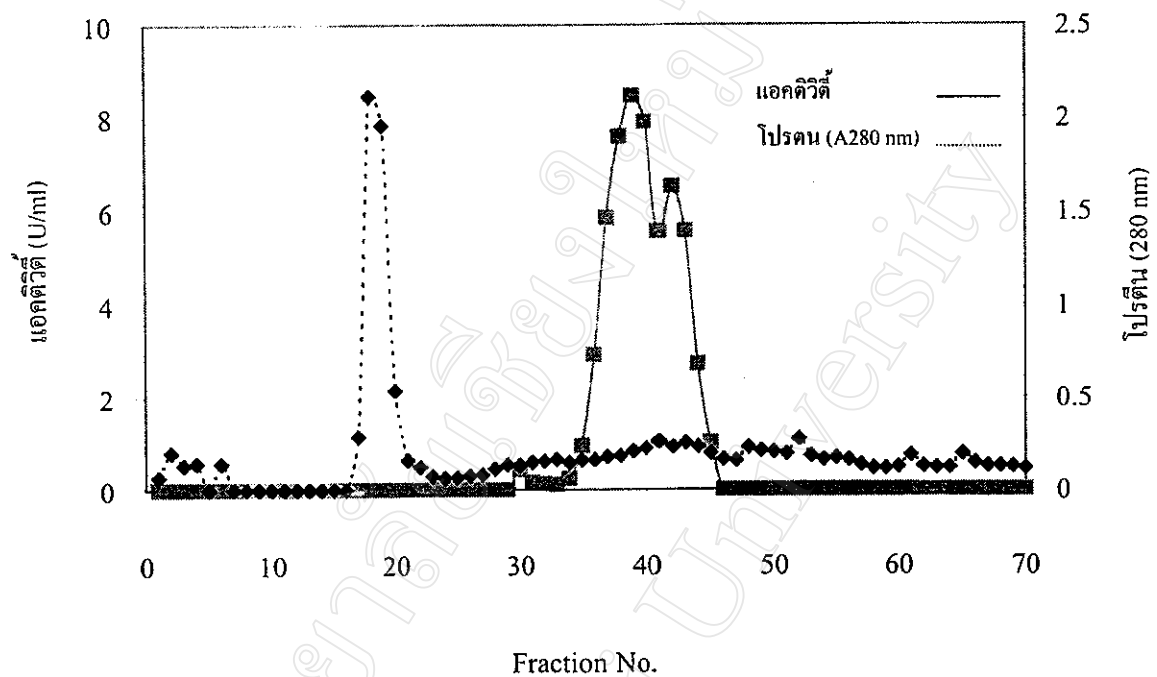


รูป 18 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยDEAE-cellulose DE-50(anion exchange chromatography)

สารละลายโปรตีนที่ผ่าน anion exchange chromatography column หลังจากการชะแบบเป็นลำดับขั้น (stepwise) ด้วย 0.1 M และ 0.5 M โซเดียมคลอไรด์ ในสารละลาย 30 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ในแต่ละ fractions ทำการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน พบว่าสามารถแยกโปรตีนตัวอย่างได้จากสารละลายโปรตีน ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเลี้ยง โดยเมื่อทำการเก็บ fraction ลำดับที่ 14-23 และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนรวม พบว่าเท่ากับ 1524.20 Unit และ 60.58 mg. ตามลำดับ มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 25.16 U/mg. โดย chromatogram (รูป 18) จากกราฟจะเห็นได้ว่าพีกที่แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมี 2 พีก ยังแยกกันได้อย่างไม่ชัดเจน และจากพีกของโปรตีนก็ยังแยกจากกันได้ไม่ชัดเจนเช่นเดียวกัน

8.3 ผลของการแยกเอนไซม์ โดย Gel filtration chromatography

นำตัวอย่างเอนไซม์ในขั้นตอนการทำ anion exchange chromatography มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำ ultrafiltration และนำมาทำการแยกเอนไซม์ออกจากโปรตีนชนิดอื่น โดย Gel filtration chromatography พบว่าสามารถแยกโปรตีนตัวอย่างได้จากสารละลายโปรตีน ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเลี้ยง โดยเมื่อทำการรวม fraction ลำดับที่ 35-46 และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนรวมจาก fraction ที่คัดเลือก พบว่าเท่ากับ 289.5 unit แล 7.13 mg. ตามลำดับ มีค่าแอกติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 54.1 U/mg โดยจาก chromatogram (รูป 15) พีกที่แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์พบว่า มี 2 พีก ซึ่งแยกจากกันได้อย่างไม่ชัดเจน และพีกของโปรตีนก็ไม่ชัดเจนเช่นเดียวกัน



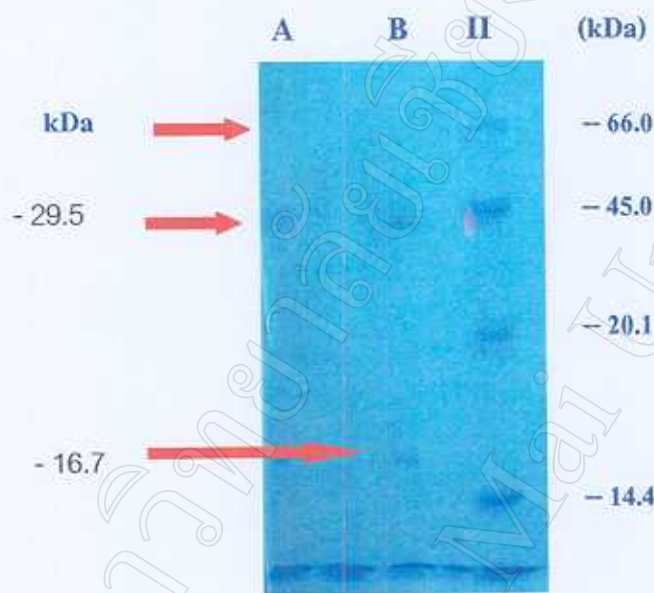
รูป 19 การชะเอนไซม์จาก Gel filtration chromatography column

ตาราง 6 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร รวม(ml.)	แอกติวิตี (U/ml.)	แอกติวิตี รวม (Unit)	ความเข้มข้น โปรตีน (mg/ml.)	ปริมาณ โปรตีน รวม(mg)	แอกติวิตี จำเพาะ (Unit/mg)	ความบริสุทธิ์ (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	500	8.58	4290.5	3.30	1650.21	2.6	1	100
Salting out	130	23.55	3062.1	2.40	312.50	9.8	3.8	71.4
Ion exchange	280	5.44	1524.2	0.22	60.58	25.2	9.7	35.5
Gel filtration	40	7.24	289.5	0.13	5.35	54.1	20.8	9.0

7.4 ผลการทำ SDS-PAGE

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่าน Gel filtration chromatography มาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และประมาณมวลโมเลกุล โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าจากการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, anion exchange chromatography, Gel filtration chromatography สามารถที่จะแยกเอนไซม์ไซลเนสที่ได้จากเชื้อไอโซเลต D01 จากโปรตีนชนิดอื่นที่เชื้อสร้างขึ้นได้ โดยจากการทำ SDS-PAGE จะเห็นแถบของโปรตีน 2 แถบสี (รูป 16)



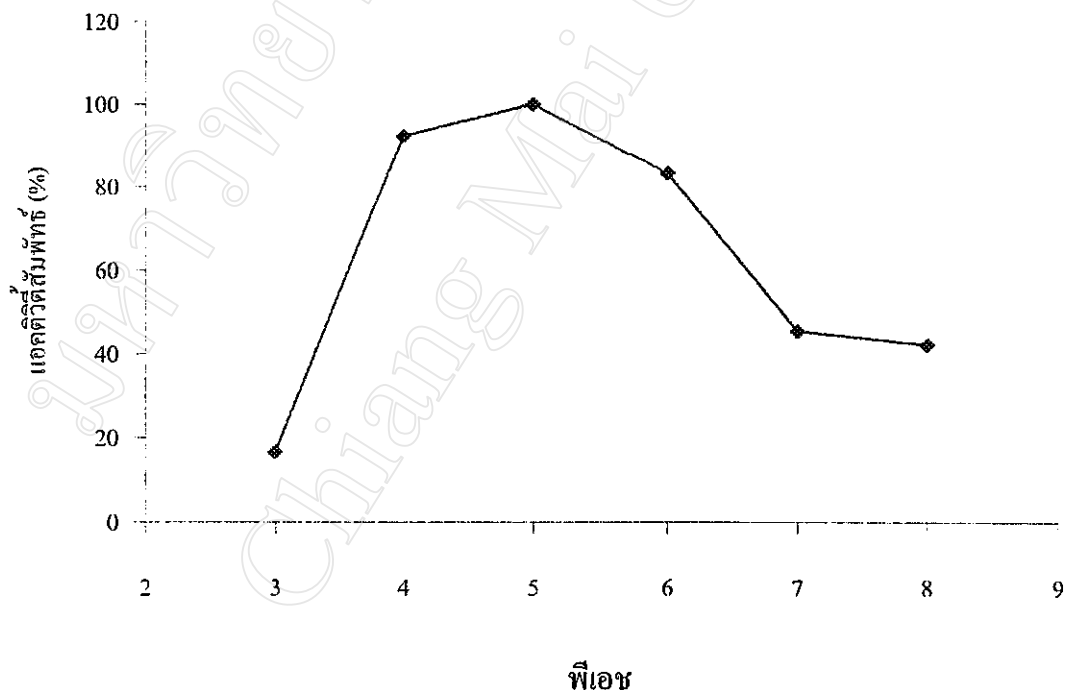
A และ B : เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

รูป 16 ผลการทำ SDS-PAGE

9. ผลการศึกษาคุณลักษณะของ ไชลานธ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

9.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

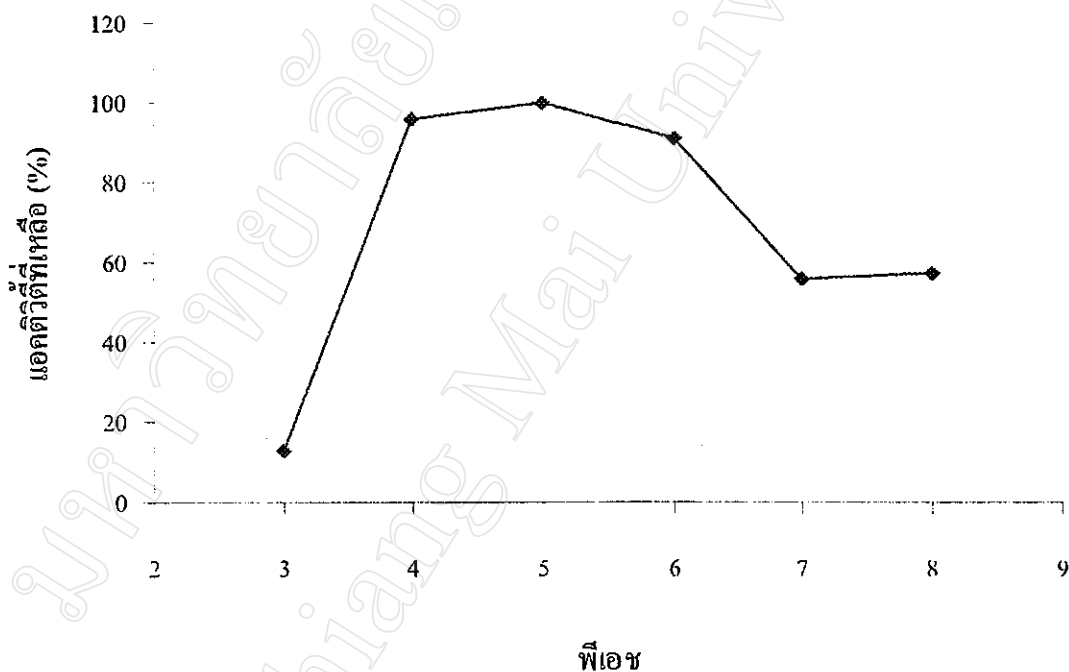
นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการบ่มเอนไซม์กับ 0.1 M ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0, 7.0, 8.0 ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช เท่ากับ 5.0 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 12.5 U/ml. (รูป 21) เมื่อค่าพีเอชน้อยกว่า 4.0 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมี แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 16.6% และที่ค่าพีเอช เท่ากับ 7.0 และ 8.0 กิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน โดยมี แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 45.5% และ 42.2% ตามลำดับ



รูป 21 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของ ไชลานธ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

9.2 ผลความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอช

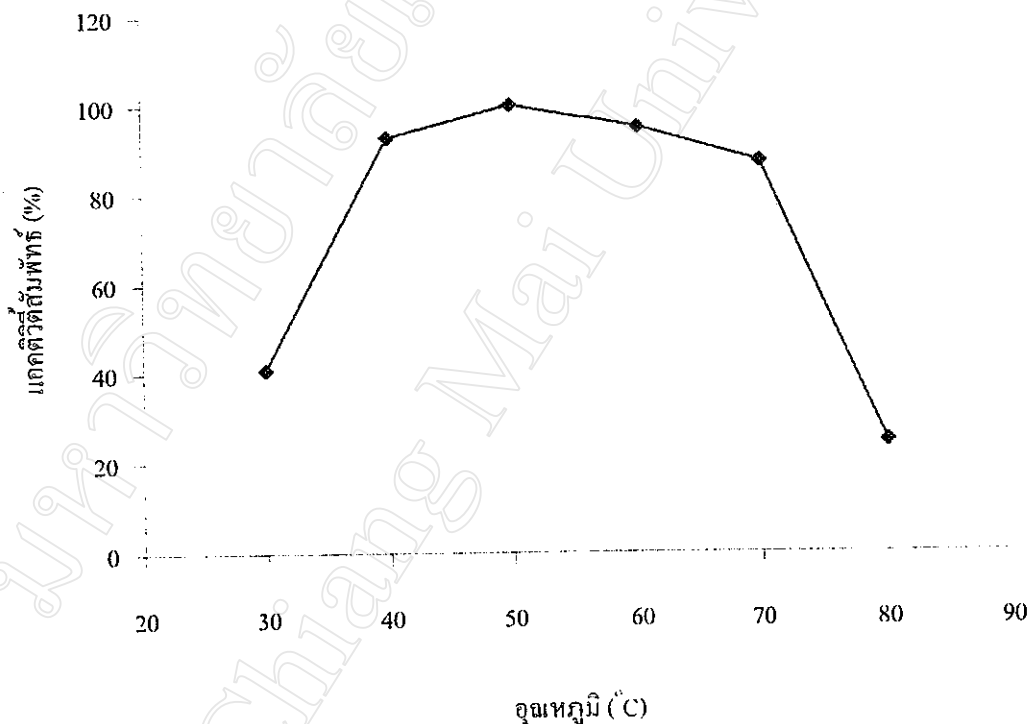
จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่อค่าพีเอช ในช่วง 3.0-8.0 พบว่าหลังจากที่ทำการบ่มเอนไซม์กับ 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0, 7.0, 8.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง และทำการหาคิจกรรมของเอนไซม์โดยทำการบ่มที่ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที เอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุดในบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0-6.0 เมื่อค่า พีเอช เท่ากับ 3.0 ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงมากโดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 12.9 % และเอนไซม์จะมีความคงตัวลดลงเล็กน้อยเมื่อค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และ 8.0 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลือเท่ากับ 55.8 และ 57.2 % (รูป 22)



รูป 22 ผลความเสถียรของไซตานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ต่อพีเอช

9.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

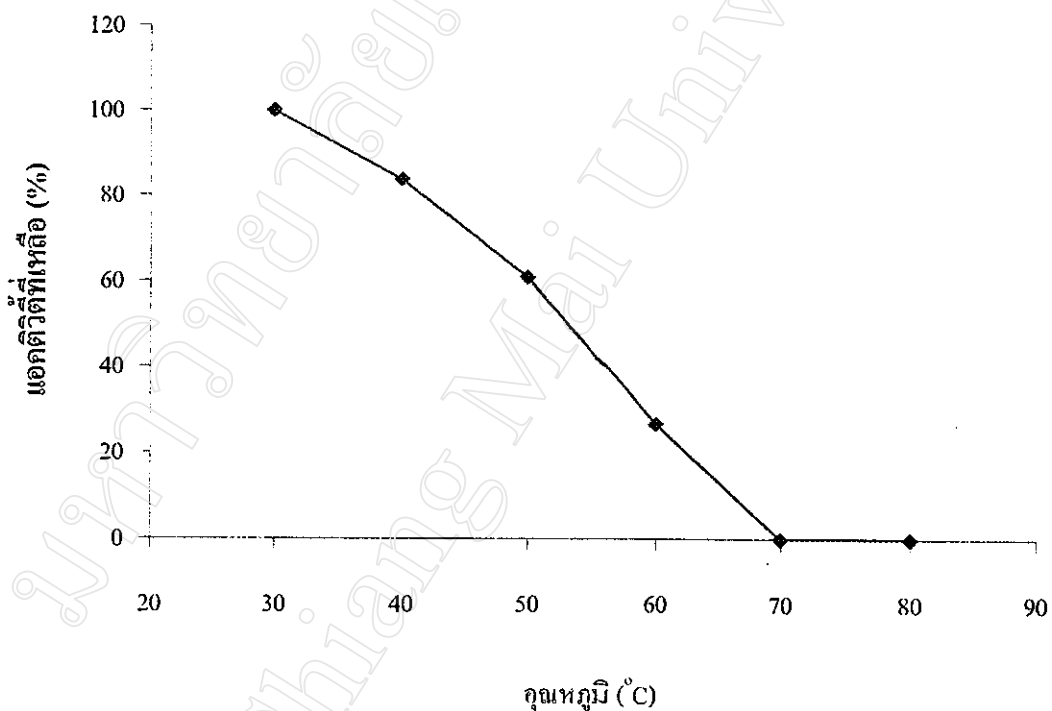
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โคขบ่มเอนไซม์กับ กับ 0.1 M ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 30-80 °C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าเอนไซม์ ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °C ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 9.21 U/ml. และเอนไซม์ สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 40-70 °C โดยเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 40 °C จะพบกิจกรรมของ เอนไซม์น้อย และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 °C กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีแอคติ วิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 24.6% ที่ 80 °C (รูป 23)



รูป 23 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

9.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ โดยหลังจากการบ่มเอนไซม์กับ 0.1 M ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 30-80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเอนไซม์มาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่ 50 °C ค่า พีเอช เท่ากับ 5.0 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.69 U/ml ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นและไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 °C และ 80 °C (รูป 24)



รูป 24 ความเสถียรของไซแลนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ต่ออุณหภูมิ

9.5 ผลความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท

จากการทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์ต่อการย่อยสลายสับสเตรท คือไซแลน (oat spelt xylan และ birchwood xylan), CMC, locus bean gum, arabic gum บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 50 °C เวลา 5 นาที พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลายไซแลน ทั้งสองชนิดคือ oat spelt

xylan และ birchwood xylan โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5.56 และ 5.27 U/ml. ตามลำดับ และพบว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์จากการย่อยสลายสับสเตรทชนิดอื่นๆ

9.6 ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซเลน ของเอนไซม์

จากการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซเลน (birchwood xylan) โดยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 °C ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการใช้ Thin-layer chromatography ทดสอบ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายจะมีน้ำตาลกลุ่มของ xylooligosaccharide โดยที่ไม่พบ ไซโลส เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน (รูป 25)



A : xylose B : xylooligosaccharide C : crude enzyme D : purified enzyme

รูป 25 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากการทำ Thin-layer chromatography