

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อเอนโคไฟติกฟังไจจากพืชสมุนไพร 8 ชนิด ได้เชื้อจำนวน 189 ไอโซเลต เมื่อนำไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีไซเลนเป็นสับสเตรทเพื่อทดสอบการผลิตไซลานเนส โดยวิธี gel diffusion method พบเชื้อที่ให้วงใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตร จำนวน 4 ไอโซเลต คือ C11, C01, D01 และ F34 (1.2, 1.0, 1.2 และ 1.7 cm.) นำเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ พบว่าไอโซเลตที่สามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุดคือ ไอโซเลต D01 โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.10 U/ml. จะเห็นได้ว่าการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตไซลานเนส โดยวิธี gel diffusion method จะให้ค่าวงใสที่แตกต่างกัน โดยความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ของเอนไซม์ผ่านเจลและความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้ โดยเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทเพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดของวงใสลดลง (Downie และคณะ 1993) ดังนั้นขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นจะไม่แปรผันตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบหาน้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS method ในขณะที่การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างไซลานเนส โดย colour plate method วงใสที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น แต่ถ้ากิจกรรมของเอนไซม์มีน้อยเกินไปจะสังเกตเห็นวงใสรอบๆ โคโลนีได้ยาก (Breccia และคณะ 1995) นอกจากนี้การคัดเลือกเชื้อโดยการย้อมด้วย congo red จะให้วงใสที่กว้างกว่าการใช้ remazol brilliant blue colour

การผลิตไซลานเนสจากเชื้อไอโซเลต D01 จะสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลองเมื่อใช้ไซเลนเป็นสับสเตรทให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 17.08 U/ml. ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่า 5.5 และเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ได้เมื่อใช้ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส, แลคโตส และ ชานอ้อย เป็นสับสเตรท โดยชานอ้อยจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุดแต่ค่าแอสติวิตีจำเพาะยังน้อยกว่าการใช้ CMC เป็นสับสเตรท เมื่อใช้ ไซโลส, wheat bran และ rice straw เชื้อจะผลิตเอนไซม์เล็กน้อย และการสร้างเอนไซม์จะไม่เกิดขึ้นเมื่อใช้ กลูโคส และ เซลโลไบโอส เป็นสับสเตรท แต่มีรายงานว่าเชื้อ *Aureobasidium pullulans* สามารถใช้ กลูโคส และ ไซโลส ในการชักนำให้ผลิตไซลานเนส ได้ (Kami และคณะ 1993) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ โมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) และ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) บางชนิดสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตไซลานเนสได้ โดยการชักนำการสร้างเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับกลไกของเชื้อแต่ละชนิดซึ่งจะ

แตกต่างกันไป โดยมีรายงานว่าการผลิตไซลานเนสจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เซลลูโลสเป็นสับสเตรทแทนการใช้ไซเลน (Okeke และ Peterson, 1992) และยังมีเชื้อราหลายชนิดสามารถผลิตไซลานเนสเจริญบนอาหารที่มีเซลลูโลสมากกว่าที่จะใช้ไซเลนเป็นสับสเตรท นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อ *Sclerotium roffsii* จะผลิตไซลานเนสเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เมื่อเซลลูโลสเป็นสับสเตรท และไม่สามารถสร้างไซลานเนสเมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทในการชักนำให้เชื้อผลิตไซลานเนสได้ (Sachtlehner และคณะ 1998) สำหรับการใช้ wheat bran และ rice straw ในการเลี้ยงเชื้อ sterile mycelium D01 ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำนั้น อาจเนื่องจากการมี xylooligomer ในปริมาณที่ไม่เพียงพอที่จะใช้ชักนำให้เชื้อผลิตไซลานเนส (Christov และคณะ 1999) แต่จากการศึกษาการผลิตไซลานเนสจาก *Trichosporon cutaneum* SL409 พบว่า wheat bran เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตไซลานเนส โดยที่เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสจะสร้างเอนไซม์ออกมาน้อยมาก และไม่พบการสร้างไซลานเนส เมื่อใช้ กลูโคส, กลีเซอรอล (glycerol), มอลโตส (maltose) และ เซลโลไบโอส เป็นสับสเตรทในการชักนำการสร้างเอนไซม์ (Liu และคณะ 1998) ดังนั้นการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อ sterile mycelium D01 การใช้ ชานอ้อยน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการผลิตไซลานเนสเพื่อศึกษาต่อไป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบคือ NH_4NO_3 2 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, K_2HPO_4 0.5 g/l, KCl 0.5 g/l, yeast extract 0.01 g/l และ ไซเลน (birchwood xylan) 10 g/l ค่า พีเอช เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เท่ากับ 5.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 17.96 U/ml. และรองลงมาคือ พีเอช เท่ากับ 6.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 14.55 U/ml. จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Trichosporon cutaneum* D01 จะผลิตไซลานเนสได้ดีที่ค่าพีเอช เป็นกรดเล็กน้อย สำหรับค่าพีเอชที่มากกว่า 7.0 และน้อยกว่า 4.0 การเจริญของเชื้อจะน้อยมากทำให้การผลิตเอนไซม์ของเชื้อจะลดลง โดยในการผลิตไซลานเนสจากเชื้อต่างชนิดกันมักจะมีสภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกันและขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไซลานเนส คืออุณหภูมิ 30 °C (พีเอช 5.0) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 23.43 U/ml. เมื่ออุณหภูมิสูงกว่านี้เชื้อจะไม่มี การเจริญทำให้การผลิตไซลานเนสไม่เกิดขึ้น สำหรับอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30 °C การเจริญของเชื้อจะน้อยลงและการผลิตเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการเจริญของเชื้อ *Aspergillus flavus* ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมและผลิตไซลานเนส คือ 30 °C แต่ที่อุณหภูมิสูงขึ้นในช่วง 30-42 °C จะไม่มีผลต่อการเจริญมากนักแต่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ และที่อุณหภูมิสูงกว่า 42 °C เชื้อจะไม่มี การเจริญ (Souza และคณะ 1999) และจากการผลิตไซลานเนส จากเชื้อ *Trichosporon cutaneum* SL409 พบว่าพีเอชเริ่มต้นของการเจริญเท่ากับ 6.5 ที่อุณหภูมิ 32 °C (Liu และคณะ 1998)

เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมได้นำมาทำการศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท โดยจากการทดลองเมื่อเวลาและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 50 °C การเกิดผลิตภัณฑ์ต่อหน่วยเวลาจะสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น ที่เวลา 5 นาที จะเป็นช่วงเวลาที่เลือกมาใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบลักษณะของเอนไซม์

น้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ sterile mycelium D01 เมื่อนำมาทดสอบการตกตะกอนตามลำดับชั้นจะเห็นได้ว่าที่ทุกความเข้มข้นของการตกตะกอนด้วยเกลือจะสามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน จากการทดลองทำการตกตะกอนเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0-70% ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีเปอร์เซ็นต์ recovery เท่ากับ 71.36 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงอาจเป็นผลจากการเสียสภาพในสภาวะที่ทำการทดลอง และบางส่วนไม่ตกตะกอนออกมาอย่างสมบูรณ์ โดยการตกตะกอนเอนไซม์ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง จะลดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากแต่ก็มีข้อเสียเนื่องจากอาจมีโปรตีนอื่นที่ไม่อยู่ในช่วงการตกตะกอนของเอนไซม์ตกตะกอนออกมาพร้อมกัน แต่อย่างไรก็ตามการตกตะกอนที่ 0-70% เป็นช่วงที่มีความไม่เหมาะสมมากโดยจากการทำ salt fractionation พบว่ามีกิจกรรมของไซลันเนสสองชนิดคือ ชนิดแรกตกตะกอนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0-30% คิดเป็นปริมาณ 26.5% ของเอนไซม์ทั้งหมด ชนิดที่สองตกตะกอนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 70-80% คิดเป็นปริมาณ 36.7% ของเอนไซม์ทั้งหมด โดยไซลันเนส ที่ศึกษาน่าจะมีสองกลุ่มที่ทำงานร่วมกัน แต่ตกตะกอนได้ในความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์ในช่วงกว้างในกรณีที่มีโปรตีนทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกันมาก ทั้งในเรื่องของประจุและขนาดโมเลกุลจะทำให้มีผลต่อการแยกโปรตีนทั้งสองออกจากกันได้ยากขึ้นในขั้นตอนต่อไป ดังนั้นการเลือกตกตะกอนในช่วง 0-30% และ 70-80% แล้วทำการแยกในแต่ละส่วนนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์น่าจะมีความถูกต้องมากกว่าที่ทำการทดลองนี้

เอนไซม์ที่ผ่าน anion exchange chromatography โดยมีตัวแลกเปลี่ยนประจุคือ DEAE-cellulose หลังจากจะแยกเป็นลำดับชั้นด้วย 0.1 M และ 0.5 M NaCl นำแต่ละ fraction ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มารวมกันและทำให้เข้มข้นขึ้นโดย ultrafiltration จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์รวม (Total activity) เท่ากับ 1524.20 Unit และปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) เท่ากับ 60.58 mg. ค่า แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 25.16 โดยมี % recovery เท่ากับ 35.52 แต่จากกราฟจะเห็นได้ว่าที่กิจกรรมของเอนไซม์มี 2 พิก โดยแยกกันอย่างไม่ชัดเจน ผลที่ได้เนื่องจากในขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แสดงให้เห็นว่า มีไซลันเนสอยู่สองส่วนซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไซลันได้เหมือนกันแต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้นการแยกแต่ละส่วน

มาทำการผ่าน anion exchange chromatography จะทำให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์กว่า โดยจากการทดลองทำการชะเอนไซม์ด้วย NaCl แบบตามลำดับขั้น (stepwise) โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 0.1 M NaCl ที่ใช้ในการทดลองอาจจะมีแรงมากพอที่จะทำให้โปรตีนทั้งสองชนิดหลุดออกมาพร้อมกัน ดังนั้นการจะทำให้โปรตีนทั้งสองแยกจากกันได้ดีขึ้นอาจทำการชะเอนไซม์แบบ continuous gradient โดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือไปจนถึง 0.2 M โซเดียมคลอไรด์ จากความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นจะทำให้โปรตีนที่จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุด้วยแรงที่อ่อนกว่าหลุดออกมาก่อนได้ โดยการชะเอนไซม์ด้วย continuous gradient จะมี resolution ที่ดีกว่าการชะเอนไซม์แบบ stepwise ในกรณีที่ยังไม่ทราบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการชะเอนไซม์ออกมาโดยที่ไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่นและเมื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมเอนไซม์ถูกชะออกมาแล้ว ในการทดลองต่อไปการชะเอนไซม์โดยการทำแบบลำดับขั้น จะมีความเหมาะสมเนื่องจากการทดลองได้ง่ายกว่าและมีความเชื่อถือสูง จะเห็นได้ว่าการทำ anion exchange chromatography สามารถแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนออกไปได้ในปริมาณที่มาก แต่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์บางส่วน อาจเนื่องมาจากการเจือจางของเอนไซม์มีมากขณะที่ผ่านคอลัมน์ทำให้เสียดสภาพได้ง่ายขึ้น และอาจมีบางส่วนที่ถูกชะออกไปจากคอลัมน์ในขณะที่ทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ในสภาวะที่ทำการทดลอง ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่เจือจางมากจะตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนได้ยาก และจากการทดลองในขั้นตอนการเตรียมตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นขั้นตอนที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งอาจทำให้ capacity ของตัวกลางในการที่จะจับกับโปรตีนมีต่ำกว่าปกติทำให้โปรตีนที่เป็นเอนไซม์บางส่วนจับกับตัวกลางได้ไม่หมดและถูกชะออกมาก่อนทำให้มีโอกาสนในการสูญเสียเอนไซม์มีมากขึ้น

เอนไซม์ที่นำมาผ่าน gel filtration chromatography โดยมี sephadex G-100 เป็นตัวกลาง เมื่อทำการรวม fraction ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์รวม (Total activity) เท่ากับ 389.5 Unit และปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) เท่ากับ 7.13 mg. ค่า specific แอคติวิตี เท่ากับ 54.1 โดยมี % recovery เท่ากับ 9.0 จากกราฟ (15) จะเห็นได้ว่ามีฟีดของกิจกรรมเอนไซม์แยกกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอย่างชัดเจน แต่จากฟีดแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์พบว่าจะยังไม่มีแยกกันอย่างชัดเจนเช่นเดียวกันกับการทำ anion exchange chromatography ซึ่งปรากฏ 2 ฟีดเหลื่อมล้ำกันอยู่เช่นเดียวกัน เนื่องจากการทดลองในขั้นตอนการทำ anion exchange chromatography ได้ทำการรวม fraction ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด ซึ่งไม่ได้ทำการแยก fraction ของทั้งสองฟีดออกจากกันเพื่อนำไปศึกษา ทำให้ในขั้นตอนการทำ gel filtration chromatography โปรตีนทั้งสองชนิดไม่สามารถแยกกันได้อย่างสมบูรณ์ จากผลการทดลองค่ากิจกรรมของไซลานีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ sterile mycelium D01 จะเป็นผลมาจากการ

ทำงานของ ไชลานีส สองชนิดที่มีคุณสมบัติต่างกันซึ่งแสดงผลว่าพบแถบสี 2 แถบจากการทำ SDS-PAGE โดยการที่จะทำให้โปรตีนที่แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 พืดแยกจากกันโดยสมบูรณ์อาจทำการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ หรือทำการเปลี่ยนชนิดของตัวกลางโดยให้มีขนาด pore size ที่เล็กลง เช่น sephadex G-75 หรือ G-50 เป็นต้น ดังนั้นการทำ gel filtration chromatography สามารถแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนออกไปได้มากแต่เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ลดลงเล็กน้อยจากค่า แอคติวิตีจำเพาะ ที่ลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์ถูกเจือจางในขณะที่ผ่านคอลัมน์ซึ่งจะใช้เวลาในการทำการทดลองที่ยาวนาน นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไม่พบเมื่อเอนไซม์เจือจางมากๆและส่วนหนึ่งจะสามารถถูกจับโดยผิวของภาชนะประมาณ $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Janson และ Ryden, 1989)

เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการทดลองนี้ซึ่งประกอบไปด้วยไชลานีสสองชนิดปนกันอยู่ จะทำงานได้ดีที่ พีเอช เท่ากับ 5.0 (12.50 U/ml.) และมีความคงตัวที่ค่า พีเอช เท่ากับ 5.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 10.47 U/ml. เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C ในขณะที่ crude enzyme ทำงานได้ดีที่ พีเอช เท่ากับ 5.0 (15.46 U/ml.) และมีความคงตัวที่ค่า พีเอช เท่ากับ 5.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.02 U/ml. เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และ crude enzyme ทำงานได้ดีที่ค่าใกล้เคียงกัน และมีความคงตัวที่ค่าพีเอช 5.0 เหมือนกัน แต่เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีความคงตัวสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่เหลือของเอนไซม์ที่เหลือ (remaining activity) โดยค่าพีเอชที่น้อยลงอาจมีผลต่อการเกิด deamidation ของกลุ่ม amino acid ที่สำคัญในโครงสร้างของโปรตีน ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไปและ กิจกรรมของโปรตีนสูญเสียไป (Daniel, 1996)

เอนไซม์จากเชื้อ sterilia mycelia D01 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 50°C (9.21 U/ml.) และมีความคงตัวได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.69 U/ml. เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ในขณะที่ crude enzyme ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50°C (21.98 U/ml.) มีความคงตัวได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 17.20 U/ml เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และ crude ไชลานีส จะทำงานและคงตัวได้ดีที่อุณหภูมิเดียวกัน เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะมีความคงตัวมากกว่าเล็กน้อย เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นมากกว่า 50°C ความคงตัวของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะลดลงมากอย่างรวดเร็วและสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเมื่ออุณหภูมิ 70°C และ 80°C ในขณะที่ crude enzyme ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือ เช่นเดียวกันกับการศึกษาไชลานีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจาก *Trichosporon cutaneum* SL409 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิ 50°C มีความคงตัวที่พีเอช 6.0-8.0 และที่อุณหภูมิ $50-70^{\circ}\text{C}$ โดยความคงตัวจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ

มากกว่า 70 °C (Liu และคณะ 1998) โดยที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้เป็นปกติ มักจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงจากการที่ peptide bond ถูกทำลายได้ง่ายขึ้นทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไปและความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิลดลง นอกจากนี้ความสามารถในการจับกับสับสเตรทของเอนไซม์จะลดลงด้วย (Daniel, 1996)

เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว สามารถย่อยสลาย ไซแลน ทั้งสองชนิดคือ oat spelt) ไซแลน และ birchwood xylan โดย crude enzyme สามารถย่อยสลาย oat spelt xylan และ birchwood xylan ได้เช่นเดียวกัน แต่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้แตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วหลังจากการผ่าน gel filtration chromatography มีความเจือจางมาก จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่างกัน นอกจากนี้อาจมีเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายพันธะของ ไซแลน ถูกกำจัดออกไปในขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์จึงทำให้การย่อยสลาย ไซแลน ไม่สมบูรณ์ เมื่อเทียบกับ crude enzyme

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย ไซแลน (birchwood xylan) ของไซลานีสจากเชื้อ sterile mycelium D01 เมื่อตรวจสอบโดย Thin-layer chromatography เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะพบ xylooligosaccharide แต่ไม่พบไซโลสได้ชัดเจน สำหรับ crude enzyme จะพบไซโลส และ xylooligosaccharide โดยจากผลที่ได้จากการย่อยสลายจากเอนไซม์จะขึ้นกับการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิดที่ร่วมทำให้การย่อยสลาย ไซแลน มีความสมบูรณ์มากขึ้น จากการศึกษาทดสอบการย่อยสลายไซแลนโดย crude ไซลานีสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. strain 41 M-1 จะให้ผลิตภัณฑ์คือ xylobiose, xylotriose และ oligosaccharide (Nakamura และคณะ 1993) และจากการศึกษาผลจากการย่อยสลายไซแลนจากเชื้อ *Bacillus* sp. Strain BP-23 ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ คือ xylootetraose โดยจะพบ xylobiose และ ไซโลสในปริมาณที่น้อยมาก ในขณะที่จะไม่พบ xylotriose เลย และจากการศึกษา ยังไม่สามารถอธิบายรูปแบบที่แน่นอนของการย่อยสลายโดยเอนไซม์ และเมื่อใช้ไซลานีสในการย่อยสลาย oat spelt xylan อาจจะมีผลข้างเคียงจากผลิตภัณฑ์อื่นๆที่เกิดขึ้น เช่น arabinose หรือ glucuronic acid ซึ่งจะประกอบอยู่ใน oligosaccharide ขนาดเล็ก โดยจะทำให้การเคลื่อนที่ของ oligosaccharide ที่มีหมู่แทนที่ดังกล่าว เมื่อทำ TLC จะเคลื่อนที่ คลาดเคลื่อนจากปกติ (Blanco และคณะ 1995) ดังนั้นจากผลการศึกษาผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายของไซลานีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ sterile mycelium D01 ผลการทดลองยังไม่ชัดเจนนักจึงยังไม่สามารถบ่งบอกถึงรูปแบบที่แน่นอนของการย่อยสลายได้ แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโดย purified enzyme อาจมีปริมาณที่ต่ำจนไม่สามารถตรวจสอบได้ชัดเจน ดังนั้นในการทดลองอาจจำเป็นต้องทำการเพิ่มปริมาณเอนไซม์หรือ เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นและสามารถตรวจสอบได้ผลที่ชัดเจน

สรุปผลการทดลอง สามารถคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้จากเอนโดไฟติกฟังไจ คือ sterile mycelium D01 ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 23.4 U/ml เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ค่าพีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เวลาที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude ไซลานเนส คือ อุณหภูมิ 50 °C ค่าพีเอช เท่ากับ 5.0 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และที่ค่าพีเอช เท่ากับ 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 4 °C เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 °C ค่าพีเอช เท่ากับ 5.0 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C โดย crude enzyme มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายไซเลน (oat spelt และ birchwood xylan) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโดย crude enzyme จะพบ ไซโลส และ xylooligosaccharide โดยเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะพบ xylooligosaccharide เท่านั้น

ผลจากการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะเป็นผลร่วมจากการทำงานของไซลานเนสสองชนิด ซึ่งอาจมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ต่างกัน ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปควรจะมีการศึกษาหาคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองชนิด จะทำให้ทราบถึงคุณสมบัติที่แน่นอนของเอนไซม์แต่ละชนิด และสามารถที่จะหลีกเลี่ยงสภาวะที่จะทำให้เสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้ เชื้อ sterile mycelium D01 ควรจะมีการนำมาศึกษาต่อไปในเรื่องของการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสับสเตรทในการผลิตไซลานเนส โดยทำการทดลองเลี้ยงแบบ solid-state fermentation ซึ่งช่วยลดต้นทุนในการผลิตลงมาก เมื่อเทียบกับการใช้ไซเลน เป็นสับสเตรทและหลังจากที่ปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้บริสุทธิ์แล้วควรจะมีการทำการทดลองนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์จริงในทางปฏิบัติโดยจากคุณสมบัติของเอนไซม์น่าจะนำมาใช้ในการ saccharified น้ำผลไม้ร่วมกับการใช้ pectinase ซึ่งจะทำให้น้ำผลไม้มีความใสขึ้น นอกจากนี้อาจนำมาฟอกสีเชื้อกระดาก่อนที่จะใช้สารเคมีในการฟอกสีซึ่งจะช่วยลดปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในระบบลงได้