



วิทยานิพนธ์

การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจาก
เห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* DOA 10

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
XYLANOLYTIC ENZYME FROM *Pleurotus ostreatus* DOA 10

นางสาวสุชัญญา อรุณสันติโรจน์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา ภาควิชา

เรื่อง การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจากเห็ดนางรม

Pleurotus ostreatus DOA 10

Purification and Characterization of Xylanolytic Enzyme from

Pleurotus ostreatus DOA 10

นามผู้วิจัย นางสาวสุชัญญา อรุณสันติโรจน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรุณี อิงคากุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจากเห็ดนางรม

Pleurotus ostreatus DOA 10

Purification and Characterization of Xylanolytic Enzyme from *Pleurotus ostreatus* DOA 10

โดย

นางสาวสุชัญญา อรุณสันติโรจน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2551

สุ��ญญา อรุณสันติโรจนี 2551: การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลาย
ไซแลนจากเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* DOA 10 ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ปรธาน
กรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 103 หน้า

เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *Pleurotus ostreatus* DOA 10 มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 5.0-5.5 และเมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและที่ pH 4.0-5.5 ในสภาวะอาหารเหลว *P. ostreatus* DOA 10 ผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน โดยแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 1.248 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ *P. ostreatus* DOA 10 ที่เจริญบนขี้เฝอยในสภาวะอาหารแข็ง จะผลิตเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง 50 วัน โดยแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 0.055 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส พบว่าน้ำตาลซอร์บอสเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสได้ดีที่สุด ในการทำเอนไซม์ไซลานเอสจาก *P. ostreatus* DOA 10 ให้บริสุทธิ์โดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน เจลฟิลเตรชัน และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ พบว่าเอนไซม์ไซลานเอส Xyn1 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 243 เท่า มีผลได้เท่ากับ 1.92 เปอร์เซ็นต์ และมีมวลโมเลกุลประมาณ 54 กิโลดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ Xyn1 คืออุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและ pH 3.5-4.5 มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่ pH 3.0-8.0 เมื่อทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์ไซลานเอส Xyn1 ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ พบว่าเอนไซม์แสดงกิจกรรมต่อไซแลนจาก birchwood ไซแลนจาก oat spelt และไซแลนจาก larchwood แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เอวิเซล โลคัสปีนัม และ *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลานเอส Xyn1 ต่อไซแลนจาก birchwood และไซแลนจาก oat spelt พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 0.6101 และ 0.4139 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ มีค่า V_{max} เท่ากับ 0.5843 และ 0.5693 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

Suchanya Aroonsantiroj 2008: Purification and Characterization of Xylanolytic Enzyme from *Pleurotus ostreatus* DOA 10. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 103 pages.

The optimum temperature of β -xylosidase from *Pleurotus ostreatus* DOA 10 was 60 °C and optimum pH was 5.0-5.5. The enzyme was stable at 40 °C for 60 minutes and pH 4.0-5.5. The maximum specific activity of β -xylosidase in liquid culture of *P. ostreatus* DOA 10, for a period of 15 days, reached 1.248 U/mg protein on day 7th. When the *P. ostreatus* DOA 10 was grown on sawdust for 50 days, it showed the maximum specific activity of β -xylosidase on day 20th with specific activity of 0.055 U/mg protein, during mycelium growth phase. Induction ability of various carbon sources was determined. The result revealed that sorbose was the best inducer for β -xylosidase. The purified xylanase Xyn1 of *P. ostreatus* DOA 10 was obtained from ultrafiltration (10 kDa cutoff), gel filtration (Sephacryl S200) and anion exchange chromatography (Q source). It was purified 243-fold at 1.92% recovery with an estimated molecular weight of 54 kDa. The Xyn1 had optimum temperature at 45 °C and optimum pH at 3.5-4.5. It was stable at pH 3.0-8.0 and temperature at 40 °C for 60 minutes. Substrate specificity test revealed that Xyn1 was highly specific to xylan from birchwood, oat spelt and larchwood but no activities were detected against CMC, avicel, locust bean gum and *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside. The Michaelis-Menten constant (K_m) and Maximum velocity (V_{max}) of Xyn1 against xylan from birchwood and oat spelt were 0.6101 and 0.4139 mg/ml and 0.5843 and 0.5693 μ g/ml/min, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำในทุกๆเรื่อง และตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณี อิงคากุล กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ดร. พัทธราภรณ์ ศิวายพราหมณ์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ และขอขอบพระคุณอาจารย์อัจฉรา พยัพพานนท์ ศูนย์รวบรวมพันธุ์เชื้อเห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์เชื้อพันธุ์เห็ดที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ CAB (Center for Agricultural Biotechnology) ที่กรุณาอนุเคราะห์เครื่อง Akta explorer ให้เป็นเครื่องมือในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และสมาชิกร่วมห้องปฏิบัติการทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งด้านกำลังกาย กำลังใจ คำแนะนำต่างๆ และบรรยากาศในการทำงานที่ดีและเป็นกันเองตลอดการทำวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่นปริญญาโทรหัส 47 และพี่ๆ น้องๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชายและญาติพี่น้องที่คอยเป็นกำลังใจ ให้ความสะดวกสบาย และสนับสนุนทุนในการศึกษา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณกำลังใจและความอดทน ที่ช่วยให้ทำงานวิจัยครั้งนี้ได้สำเร็จ

สุชญญา อรุณสันติโรจน์

มีนาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	38
สรุป	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	81
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์	83
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบจากการทดลอง	93
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	103

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	19
2	เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในเชิงพาณิชย์และการนำไปใช้	22
3	หลักการแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	27
4	เปรียบเทียบการใช้ Q Sepharose และ Q Source เป็นเมทริกซ์ในการทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์	49
5	การทำเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>P. ostreatus</i> DOA 10 ให้บริสุทธิ์	52
6	ความจำเพาะของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 จาก <i>P. ostreatus</i> DOA 10 ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ	59
7	ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1	60
ตารางผนวกที่		
ข1	การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ	84
ข2	การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ	85
ข3	การเตรียม sample buffer	91
ข4	การเตรียมเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส	91
ค1	กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ	94
ค2	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ	95
ค3	ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ pH ต่างๆ	96
ค4	ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่ pH ต่างๆ	96
ค5	ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	97

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค6	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>P. ostreatus</i> DOA 10 ในอาหารเหลวที่มีเอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอน	98
ค7	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>P. ostreatus</i> DOA 10 บนอาหารแข็ง	99
ค8	ผลการทดสอบผลของสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก <i>P. ostreatus</i> DOA 10 ในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	100
ค9	ปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>P. ostreatus</i> DOA 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน	101
ค10	ระดับการเหนี่ยวนำของสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของ <i>P. ostreatus</i> DOA 10 ในวันที่ 1 2 และ 3 หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารเหนี่ยวนำเป็นแหล่งคาร์บอน	102

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เห็ดนางรม <i>Pleurotus ostreatus</i>	5
2	วงจรชีวิตของเห็ดนางรม	7
3	ลักษณะโครงสร้างของไชเลน	11
4	รูปแบบการย่อยสลายของเอนไซม์ไชลานเนส	13
5	รูปแบบการย่อยสลายของเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดส	14
6	ตำแหน่งการตัดพันธะของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโซ่ด้านข้างของไชเลน	16
7	กลไกการควบคุมการผลิตเอนไซม์ไชลานเนสและเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดส	23
8	ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดสที่อุณหภูมิต่างๆ	39
9	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดส	41
10	ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	41
11	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดส และปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในสภาวะอาหารเหลว	42
12	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดส และปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในสภาวะอาหารแข็ง	44
13	ระดับการเหนี่ยวนำของสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไชโลซิเดสของ <i>P. ostreatus</i> DOA 10 ในวันที่ 1 วันที่ 2 และวันที่ 3 หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน	47
14	บลูเดกซ์แทรนเมื่อผ่านคอลัมน์เจลฟิเตรชัน โดยมี Sephacryl S200 เป็นตัวกลาง	50
15	รูปแบบของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ไชลานเนส เมื่อผ่านคอลัมน์เจลฟิเตรชัน โดยมี Sephacryl S200 เป็นตัวกลาง	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	รูปแบบของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เมื่อผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ โดยมี Q Source เป็นตัวกลาง	52
17	การทำ SDS-PAGE และ Zymogram จากเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1	54
18	ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	56
19	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1	57
20	ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	58
21	กราฟ Lineweaver-Burk plots ของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ต่อสับสเตรท	60
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลไซโลส โดยวิธี Somogyi-Nelson	88
ข2	กราฟมาตรฐานการหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry	90
ข3	กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE	92

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CMC	=	carboxymethyl cellulose
K_m	=	Michaelis-Menten constant
kDa	=	kilo Dalton
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
U/ml	=	unit of enzyme per millilitre
U/mg protein	=	unit of enzyme per milligram protein
V_{max}	=	maximum velocity
w/v	=	weight per volume

การทำปรีบริสุทธิ์และลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจากเห็ดนางรม

Pleurotus ostreatus DOA 10

Purification and Characterization of Xylanolytic Enzyme from

Pleurotus ostreatus DOA 10

คำนำ

เห็ดนางรมเป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่นำมาเพาะในประเทศไทยเป็นชนิดแรกมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus ostreatus* เป็นเห็ดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในแถบที่มีอากาศอบอุ่นของประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรป มักพบตามต้นไม้ที่เน่าเปื่อยผุพัง เช่น ไม้โอ๊ค ไม้เอลม์ ไม้เมเปิล ไม้บาส ไม้ป๊อปล่า ไม้ฮอลลี และ ไม้ลาเบอร์นัน เป็นต้น (Chang และ Miles, 2004) เห็ดนางรมนอกจากจะใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์แล้วยังมีความสำคัญต่อธรรมชาติในฐานะที่เป็นผู้ย่อยสลายอีกด้วยเนื่องจากเห็ดนางรมมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลที่ซับซ้อน เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนเหล่านั้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลากหลายประเภท ที่สำคัญได้แก่อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ที่ผสมเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนในอาหารสัตว์เพื่อช่วยให้ระบบย่อยอาหารของสัตว์สามารถทำงานได้ดียิ่งขึ้นและดูดซับสารอาหารได้มากขึ้น (Beg *et al.*, 2001) ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษใช้เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษแทนการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย เช่น สารคลอรีนและคลอรีนไดออกไซด์ ในอุตสาหกรรมอาหารและขนมอบพบว่าการเติมเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนลงในแป้งสำหรับทำขนมอบจะช่วยเพิ่มความฟูของเนื้อแป้ง ทำให้คุณสมบัติของเนื้อขนมปังดีขึ้นและอายุการเก็บรักษานานขึ้น (Camacho และ Aguilar, 2003) นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีประโยชน์ในการผลิตเป็นน้ำตาลไซลิทอลที่ให้ความหวานแต่ไม่ทำให้ฟันผุ (Saddler *et al.*, 1983) ซึ่งการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจะทำให้เข้าใจถึงสถานะการทำงานและการผลิตเอนไซม์มากขึ้น และสามารถนำเอนไซม์ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

จารุวรรณ (2548) ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส แลคเคส และไซลานเนส ซึ่งอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจาก *P. ostreatus* DOA 10 ทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตเอนไซม์ของเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 และเนื่องจากในระบบของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนนั้นประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยสลายไซหลักของไซแลน 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไซลานเนสและบีต้า-ไซโลซิเดส ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเห็ดนางรมกับการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนมากขึ้น งานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์และสมบัติของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10 เพิ่มเติม และจากการที่เอนไซม์ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะการทำงานแบบสุ่มและสามารถย่อยโครงสร้างไซแลนขนาดใหญ่ได้ดีกว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส จึงได้ทำบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซลานเนสบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซลานเนสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ ของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากหีदनางรม *P. ostreatus* DOA 10
2. เพื่อศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในระหว่างการเจริญเติบโตของหีदनางรม *P. ostreatus* DOA10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็ง
3. เพื่อทดสอบการเหนี่ยวนำของสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากหีदनางรม *P. ostreatus* DOA10 ในสภาวะอาหารเหลว
4. ทำเอนไซม์ไซลันเนสให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์

1.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมประกอบด้วยหมวกดอก (cap) ก้านดอก (stalk) และครีบอก (gills) (ปัญญา และ กิตติพงษ์, 2538) หมวกดอกมีลักษณะสีขาวนํมเมื่ออากาศร้อน และขาวอมเทาเมื่ออากาศเย็น ก้านดอกเป็นเนื้อเดียวกับหมวก บางครั้งก็แยกเป็นกึ่งซึ่งทำให้เกิดดอกเป็นกระจุก ลักษณะหมวกของดอกเห็ดที่เกิดตามธรรมชาติจะเว้าตรงกลางแต่ถ้าเกิดในบริเวณที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงดอกเห็ดจะมีลักษณะเป็นรูปกรวยปากกว้าง ด้านหลังมีลักษณะเป็นครีบอก ขาวตลอดสลับกัน มีทั้งขาวมาก ขาวปานกลาง สันและสันมากตั้งแต่ขอบหมวก (ภาพที่ 1)

ลักษณะของสปอร์เป็นรูปไข่ ไม่มีสี มีขนาดวัดได้โดยเฉลี่ยประมาณ 5x12.5 ไมครอน เห็ดนางรมมีเส้นใยสีขาว เมื่อเลี้ยงในขวดเส้นใยจะเจริญตามไปตามบริเวณขวดที่ไม่มีอาหารร่วนด้วย (อานนท์, 2523)



ภาพที่ 1 เห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus*

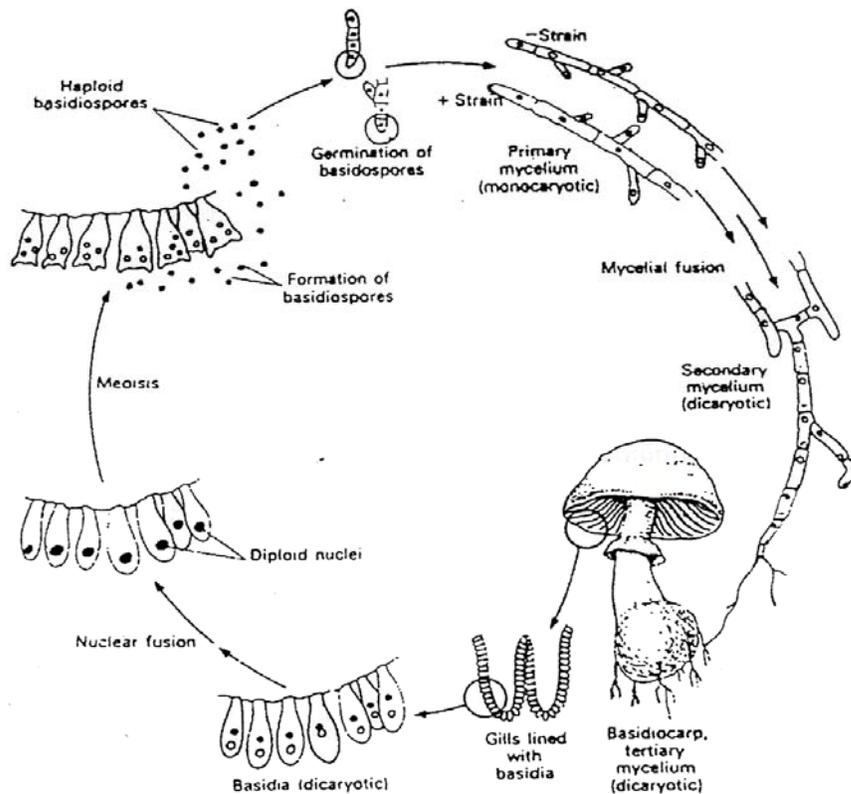
ที่มา: Volk (2003)

1.2 การดำรงชีวิตของเห็ดนางรมในธรรมชาติ

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีการดำรงชีวิตแบบ saprophytic fungi หรือผู้ย่อยสลาย เนื่องจากเห็ดเป็นเชื้อราที่ไม่มีคลอโรฟิลล์จึงทำให้การดำรงชีวิตของเห็ดนางรมต้องอาศัยแหล่งอาหารและพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติโดยการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านั้นให้อยู่ในรูปที่สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งโดยทั่วไปสารประกอบอินทรีย์ที่เห็ดนางรมสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ สารประกอบลิพิด โนเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อไม้ ขี้เลื่อย และฟางข้าว เป็นต้น ดังนั้นเรามักจะพบว่าเมื่อเห็ดเจริญบนขอนไม้หรือบนกองฟาง นอกจากนี้เห็ดนางรมยังสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ได้อีกด้วย (Chang, 1993)

1.3 วงจรชีวิตของเห็ดนางรม

วงจรชีวิตของเห็ดนางรมมีลักษณะเป็นแบบต่างเพศต่างพัลลัส (heterothallic) โดยเริ่มจากดอกเห็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) ซึ่งเมื่อปลิวไปตกยังบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญก็จะมีการงอกของเส้นใยโดยที่เส้นใยที่เจริญขึ้นมาเรียกว่า เส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) ซึ่งเส้นใยในขั้นนี้มีโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ (haploid) คือในแต่ละเซลล์มี 1 นิวเคลียสและไม่สามารถเจริญพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้ ต่อมาเส้นใยปฐมภูมิจะรวมตัวกันจนได้เป็นเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) ซึ่งเส้นใยในขั้นนี้มีลักษณะพันธุกรรมที่ต่างจากเส้นใยปฐมภูมิคือมีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (diploid) ในแต่ละเซลล์จะมี 2 นิวเคลียส เส้นใยในขั้นนี้สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดได้ (อาานนท์, 2523) วงจรชีวิตของเห็ดนางรมแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเห็ดนางรม
ที่มา: ปัญญา และ กิตติพงษ์ (2538)

1.4 สภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการเกิดดอกของเห็ดนางรม

1.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใย

อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ กล่าวคือ อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 25-28 องศาเซลเซียสและ pH 5.5-5.6 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย ได้แก่ แป้ง (starch) น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลซูโครส เปคติน เซลลูโลส ลิกนิน และน้ำตาลแอลกอฮอล์ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเห็ดนางรม ได้แก่ เปปโตน (peptone) น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) แป้งถั่วเหลือง แอมโมเนียมซัลเฟต กรดอะมิโนแอสพาราจिन เซอริน อลานีน และ ไกลซีน (Chang และ Miles, 2004)

ได้มีการศึกษาพบว่าเส้นใยของเห็ดนางรมมีความต้านทานต่อความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง โดยพบว่าเส้นใยของเห็ดนางรมสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 15-28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นข้อดีเนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อราอื่นๆ (วสันต์, 2537) ในช่วง 10 วันแรกของการเพาะเลี้ยง เส้นใยของเห็ดนางรมไม่ต้องการอากาศมากนักแต่เมื่อผ่านไป 20-25 วันของการเพาะเลี้ยง เส้นใยเห็ดจะต้องการอากาศมากขึ้นพร้อมทั้งความชื้นแสงเล็กน้อย ซึ่งในระยะนี้เส้นใยเห็ดจะเริ่มสะสมอาหารและรวมตัวกันเพื่อสร้างดอกเห็ดแต่หากให้แสงมากเกินไปจะทำให้เส้นใยเห็ดเจริญเติบโตช้าลง นอกจากนี้ น้ำก็เป็นปัจจัยสำคัญที่เห็ดต้องการมาก น้ำที่ดีต้องมีฤทธิ์เป็นกลาง และปริมาณน้ำที่ไม่ควรมากหรือน้อยเกินไป หากมากเกินไปจะทำให้เกิดน้ำขังในถุงเชื้อและเกิดการเน่าเสียได้ แต่หากน้อยเกินไปเห็ดก็จะเจริญเติบโตได้ช้า (อานนท์, 2523)

1.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดดอกของเห็ดนางรม

ถึงแม้ว่าเส้นใยของเห็ดนางรมจะเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง แต่การเจริญของดอกเห็ดนางรมไม่สามารถทนต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่า 0.06 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของหมวกดอกจะถูกยับยั้ง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการพัฒนาของดอกเห็ดจะอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียสซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของเห็ดนางรม

ในขณะที่กำลังเกิดดอกเห็ดนางรมจะต้องการออกซิเจนสูงมากหากอากาศไม่เพียงพอจะทำให้ลักษณะของดอกเห็ดแตกต่างออกไปโดยเห็ดนางรมจะมีก้านใหญ่ผิดปกติและหมวกดอกเล็กเป็นกรวยคล้ายปากแตร นอกจากนี้แสงสว่างก็มีความจำเป็นต่อการเจริญของดอกเห็ด โดยพบว่าแสงกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของเส้นใยเพื่อเกิดดอกเห็ดเร็วขึ้น และในขณะที่ดอกเห็ดกำลังเจริญเติบโตหากมีแสงไม่เพียงพอ ก้านดอกเห็ดจะยาว หมวกดอกจะเล็ก และให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ (อานนท์, 2523)

1.5 เห็ดรากับการผลิตเอนไซม์

เห็ดนอกจากใช้เป็นอาหารแล้ว ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ เนื่องจากเห็ดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโครงสร้างที่ซับซ้อน เช่น เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ไซลานเนส (xylanase) แลคเคส (laccase) เปอร็อกซิเดส

(peroxidase) และลิกนินเนส (ligninase) (Peberdy *et al.*, 1993) เห็ดบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 1 หรือ 2 ชนิดแต่บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ที่กล่าวถึงข้างต้นได้ทั้งหมด (Elisashvili *et al.*, 2008)

เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเอวิเซล (avicel) ขี้เลื่อย (saw-dust) และจมูกข้าวสาลี (wheat bran) เป็นสับสเตรทพบว่าเห็ดหอม *Lentinus edodes* และเห็ดนางฟ้า *Pleurotus sajor-caju* มีอัตราการเจริญเติบโตมาก และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไซทานเนสในระดับที่ค่อนข้างสูง ในขณะที่เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในระดับที่ค่อนข้างสูง ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้ไซแลนจาก birchwood เป็นสับสเตรทพบว่า *L. edodes* และ *P. sajor-caju* มีการเจริญเติบโตดีพร้อมทั้งแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซทานเนสในระดับที่สูงแต่ไม่พบเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่กลับพบในเส้นใยของเห็ดแสดงว่าไม่มีการปลดปล่อยเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสออกนอกเซลล์ ในขณะที่ *V. volvacea* มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำในอาหารที่มีไซแลนเป็นสับสเตรทและไม่พบว่ามีกิจกรรมผลิตเอนไซม์ไซทานเนส (Buswell *et al.*, 1993) ซึ่งตรงกับรายงานของ Rai และ Saxena (1990) และ Burla *et al.* (1990) ที่พบว่าเห็ดในตระกูล *Pleurotus* sp. สามารถเจริญในสับสเตรทที่เป็นลิกโนเซลลูโลสได้หลากหลายชนิด แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในระดับต่ำ ในขณะที่ผลิตเอนไซม์ไซทานเนสและเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสได้ในระดับที่สูง จึงอาจกล่าวได้ว่า *Pleurotus* sp. ใช้สับสเตรทที่เป็นเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าเซลลูโลส

นอกจากนี้ *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ยังสามารถผลิตเอนไซม์แลกเคสและฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายสารประกอบลิกนิน (Sannia *et al.*, 1986) ในขณะที่ *V. volvacea* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกนินได้ (Buswell *et al.*, 1993)

ส่วนรูปแบบการผลิตเอนไซม์ในเห็ดหูหนู *Auricularia* sp. พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ลิกนินเนสสูงในช่วงแรกของการเจริญของเส้นใย จากนั้นจะลดต่ำลงในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้นทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ ซึ่งจะกลายเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญของเส้นใยและเป็นการเพิ่มอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยโดยจะเกิดการรวมตัวกันเป็นดอกเห็ด (Luo, 1993)

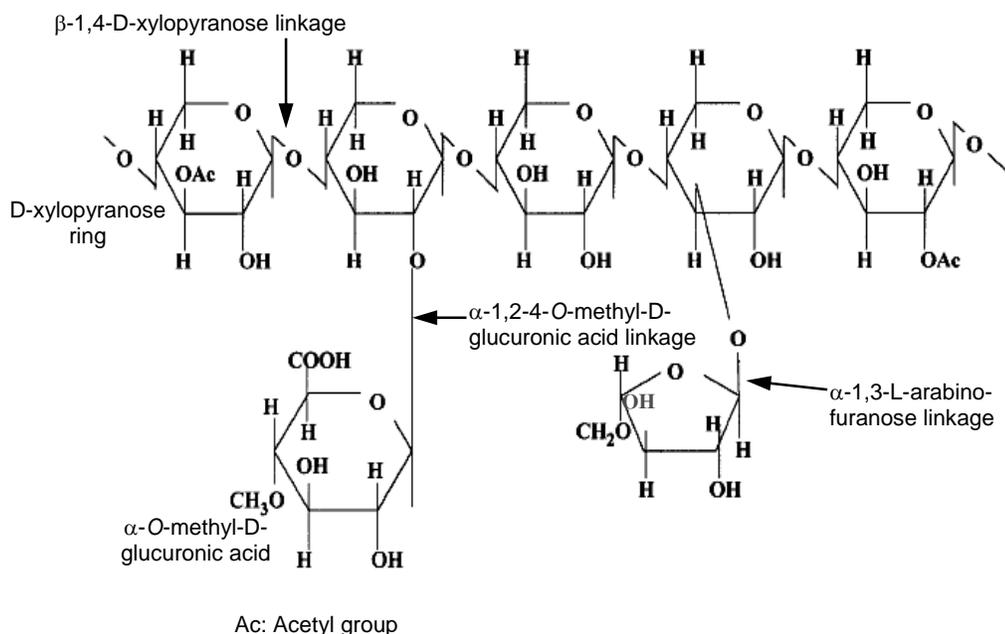
Ghosh *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ของ *Pleurotus* sp. 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีหยวกกล้วยเป็นสับสเตรท พบว่า *Pleurotus* sp. ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าเซลลูโลสและลิกนินโดยจะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสในช่วงแรกของการเจริญและย่อยสลายลิกนินเป็นลำดับถัดมา

จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้เข้าใจถึงรูปแบบการผลิตเอนไซม์ของเห็ดในสับสเตรทต่างๆ ซึ่งเป็นพื้นฐานความรู้ที่สำคัญในการนำไปพัฒนา ปรับปรุง และประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่ต้องการเอนไซม์ที่มีราคาถูก โดยการผลิตเอนไซม์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือจากอุตสาหกรรมป่าไม้ (Elisashvili *et al.*, 2001) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวดอกเห็ดแล้ว วัสดุที่เหลือจากการเพาะเห็ดจะเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่มีราคาถูกและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไป (Semple *et al.*, 2001; Elisashvili *et al.*, 2003)

2. ไซแลน

2.1 ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็นเฮมิเซลลูโลสชนิดหนึ่งซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักในพืชโดยแทรกอยู่ระหว่างสารประกอบลิกนินและเซลลูโลสและยึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์และพันธะไฮโดรเจนตามลำดับ (Beg *et al.*, 2001) โครงสร้างของไซแลนประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic เป็นสายโซ่หลักและมีโซ่ด้านข้างที่เป็นโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น อะราบินโนฟิวรานอส (arabinofuranose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) หรือ 4-O-เมทิล-กลูคูโรนิก (methyl glucuronic acid) ซึ่งจะเข้าแทนที่คาร์บอนตำแหน่งต่างๆ ของน้ำตาลไซโลสในสายโซ่ไซแลนและจะมีจำนวนแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของไซแลน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Beg *et al.* (2001)

2.2 ชนิดของไซแลนและแหล่งที่พบ

ไซแลนพบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ โดยในพืชใบเลี้ยงคู่จะพบไซแลนในส่วนผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) ส่วนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะพบไซแลนทั้งในผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) และผนังเซลล์ทุติยภูมิ (Collins *et al.*, 2005)

ไซแลนที่พบในไม้เนื้อแข็ง (hardwood) เป็นไซแลนชนิดกลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) หรือ O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan (Polizeli *et al.*, 2005) โดยจะมีสายโซ่หลักคือน้ำตาลไซโลสแต่จะมีโมเลกุลของกรด 4-O-methylglucuronic เข้าแทนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และหมู่อะซิทิล (acetyl) เข้าแทนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลไซโลสในสายโซ่หลัก การมีหมู่อะซิทิลอยู่ในโมเลกุลของไซแลนมีผลทำให้ไซแลนบางส่วนสามารถละลายน้ำได้ ส่วนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (softwood) จะพบว่าเป็นไซแลนประเภทกลูคูโรโนอะราบินโนไซแลน (glucuronoarabinoxylan) หรือ arabino-4-O-methylglucuronoxylan (Polizeli *et al.*, 2005) ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสเป็นสายโซ่หลักเช่นเดียวกับไซแลนในไม้เนื้อแข็งและมีการแทนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ด้วยกรด 4-O-methylglucuronic เช่นกันแต่จะพบในสัดส่วนที่สูงกว่านอกจากนี้ยังไม่พบว่ามี

การเติมหมู่อะซิทิลแต่พบว่ามี การเติมอะราบินอฟิวราโนส (arabinofuranose) เข้าที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลไซโลส (Puls และ Schuseil, 1993) และพบว่าไซแลนในไม้เนื้ออ่อนจะมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าไซแลนในไม้เนื้อแข็ง ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวโอ๊ต จะพบไซแลนชนิดอะราบินอไซแลน (arabinoxylan) โดยมีการแทนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ด้วยอะราบินอฟิวราโนส

3. เอนไซม์ย่อยสลายไซแลน

โมเลกุลไซแลนเป็นโครงสร้างที่มีความหลากหลายและซับซ้อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดในการย่อยสลายโมเลกุล โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสายโซ่หลักของไซแลนมี 2 ชนิด คือ เอนไซม์เอนโดไซแลเนส (endoxylanase) และเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) ส่วนเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสายโซ่ด้านข้าง ได้แก่ เอนไซม์อะซิทิลไซแลนเอสเทอเรส (acetylxyylan esterase) เอนไซม์อะราบินอฟิวราโนซิเดส (arabinofuranosidase) เอนไซม์กลูคูโรนิเดส (glucuronidase) และเอนไซม์เฟอร์ูลิกแอซิดเอสเทอเรส (ferulic acid esterase)

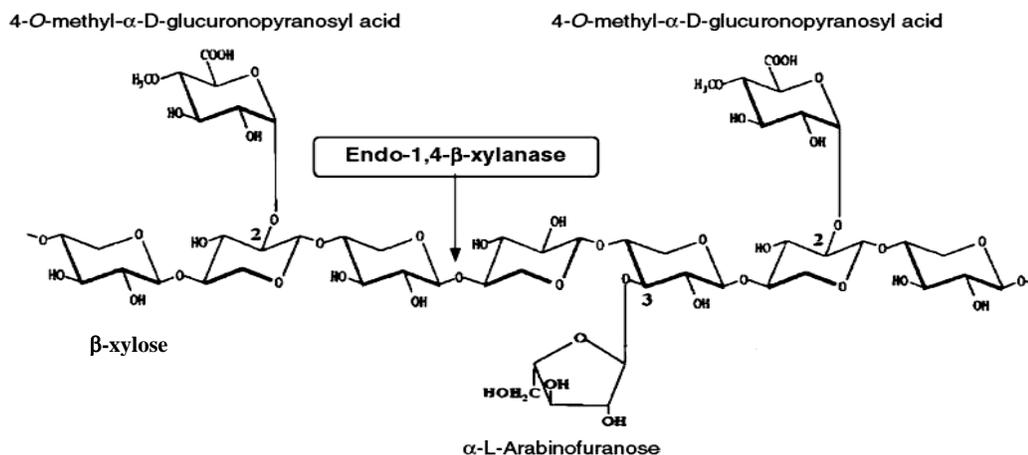
3.1 เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสายโซ่หลักของไซแลน

3.1.1 เอนไซม์เอนโดไซแลเนส หรือ 1,4- β -D-xylan-xylohydrolase (EC. 3.2.1.8)

เอนไซม์ไซแลเนสทำหน้าที่ตัดพันธะไกลโคซิดิกของไซโลไพราโนไซด์ (xylopyranoside) หรือน้ำตาลไซโลสในสายโซ่ไซแลนแบบส้อม (ภาพที่ 4) เมื่อแบ่งเอนไซม์ไซแลเนสตามความสามารถในการย่อยไซแลนตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับอะราบินอไซแลนสามารถแบ่งเอนไซม์ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ในกลุ่ม debranching เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยอะราบินอไซแลนและอะราบินอกลูคูโรโนไซแลนตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับระหว่างโมเลกุลของไซโลสและอะราบินอหรือกรดกลูคูโรนิกได้ ส่วนเอนไซม์ในกลุ่ม non debranching เป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยโครงสร้างดังกล่าวได้ (Polizeli *et al.*, 2005) เอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีความจำเพาะต่อโครงสร้างของไซแลนต่างกัน

จากการศึกษาเอนไซม์ไซแลเนสบริสุทธิ์ (Xyn A) จากจุลินทรีย์ *Erwinia chrysanthemi* พบว่าเอนไซม์จะย่อยโครงสร้างไซแลนที่มีโมเลกุลของกรดกลูคูโรนิกเป็นสายโซ่ด้านข้างโดยตัดพันธะไกลโคซิดิกของสายโซ่ไซแลนทางปลายรีดิวซิงพันธะที่ 2 เมื่อนับจาก

โมเลกุลของกรดกลูคูโรนิก แต่ไม่สามารถย่อยไซแลนหรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงได้ (Vrsanska *et al.*, 2007)



ภาพที่ 4 รูปแบบการย่อยสลายของเอนไซม์ไซแลเนส

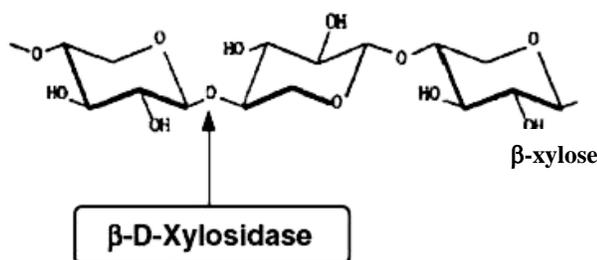
ที่มา: คัดแปลงจาก Polizeli *et al.* (2005)

เอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ *Lentinula edodes* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งไม่สามารถย่อยกลูคูโรโนไซแลนตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของกรดกลูคูโรนิกและอะราบิโนไซแลนตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับอะราบิโนสได้ จะย่อยได้เฉพาะไซแลนที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงเท่านั้น ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์คือ ไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสตั้งแต่ 4 โมเลกุลขึ้นไป (Mishra *et al.*, 1990)

ในขณะที่เอนไซม์ไซแลเนสที่บริสุทธิ์ (XYNIV) จากจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* สามารถย่อยโครงสร้างไซแลนทั้งที่เป็นสายโซ่ตรงและโครงสร้างที่มีสายโซ่ด้านข้างและจะตัดพันธะไกลโคซิดิกพันธะแรกจากปลายรีดิวซิงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลสและไซโลไบโอส ส่วนไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ พบในปริมาณค่อนข้างต่ำ (Collins *et al.*, 2005)

3.1.2 เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) หรือ 1,4- β -D-xylan xylohydrolase (EC. 3.2.1.37)

เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ และไซโลไบโอสจากปลายด้าน non-reducing end ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 รูปแบบการย่อยสลายของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส
ที่มา: ดัดแปลงจาก Polizeli *et al.* (2005)

เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมีกิจกรรมต่อสายไซโซแลนน้อยมาก (Puls และ Poutanen, 1989) และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อความยาวของสายไซโซมากขึ้น สับสเตรทที่จำเพาะสำหรับเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมากที่สุดคือไซโลไบโอส นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ เช่น พาราไนโตรฟีนิล-บีต้า-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside) ได้ (Polizeli *et al.*, 2005)

จากการศึกษาโดยใช้เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Lee และ Forsberg, 1987) ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดต่างๆ พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสับสเตรทที่เป็นไซโลไบโอส (xylobiose) ได้ 95 เปอร์เซ็นต์ ย่อยไซโลไตรโอส (xylotriose) และไซโลเพนตาโอส (xylopentaose) ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และย่อยไซโลเตตราโอส (xylotetraose) กับไซโลเฮกซาโอส (xylohexalose) ได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Trichoderma viride* พบว่ามีความจำเพาะต่อไซโลไบโอสมมากที่สุด รองลงมาคือไซโลไตรโอส ไซโลเตตราโอสและไซโลเพนตาโอส (Matsuo และ Yasui, 1984)

จากรายงานที่ผ่านมามีส่วนใหญ่มองเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจะมีความจำเพาะกับสับสเตรทที่เป็นไซโลไบโอสมมากที่สุด แต่ในเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus niger* จะพบว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจำเพาะกับไซโลไตรโอสมมากที่สุด (John *et al.*, 1979)

เมื่อเอนไซม์ไซลานเนสย่อยสลายไซแลนจนได้ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ จำนวนมาก ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านั้นจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสลดลง ดังนั้นเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจะทำหน้าที่ในการช่วยย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลส ทำให้เอนไซม์ไซลานเนสมีประสิทธิภาพในการทำงานเพิ่มขึ้น (Andrade *et al.*, 2004; Zanoelo *et al.*, 2004)

3.2 เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยไซโด้นข้างของไซแลน

นอกจากเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ทำหน้าที่ย่อยสายไซหลักของโมเลกุลไซแลนแล้วยังมีเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่แม้จะไม่ได้มีหน้าที่ย่อยไซแลนโดยตรงแต่ก็มีความสำคัญในการย่อยไซโด้นข้างของโมเลกุลไซแลนทำให้การย่อยโมเลกุลของไซแลนสมบูรณ์ขึ้นเอนไซม์เหล่านี้ ได้แก่

3.2.1 เอนไซม์อะซิetylไซแลนเอสเทอเรส (acetyl xylan esterase) (EC.3.1.1.6)

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย้ายหมู่อะซิetyl (acetyl) ออกจากสายไซไซแลน เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เอนไซม์ไซลานเนสทำงานได้ดีขึ้น โดยการกำจัดไซโด้นข้างที่ไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนส (Polizeli *et al.*, 2005)

3.2.2 เอนไซม์อะราบินอฟิวราโนซิเดส (α -arabinofuranosidase) (EC.3.2.1.55)

ทำหน้าที่ในการสลายพันธะของแอลฟาอะราบินออส (α -arabinofuranose) ในโครงสร้างของอะราบินอไซแลนหรืออะราบินอกาแลคแทน (Thomson, 1993)

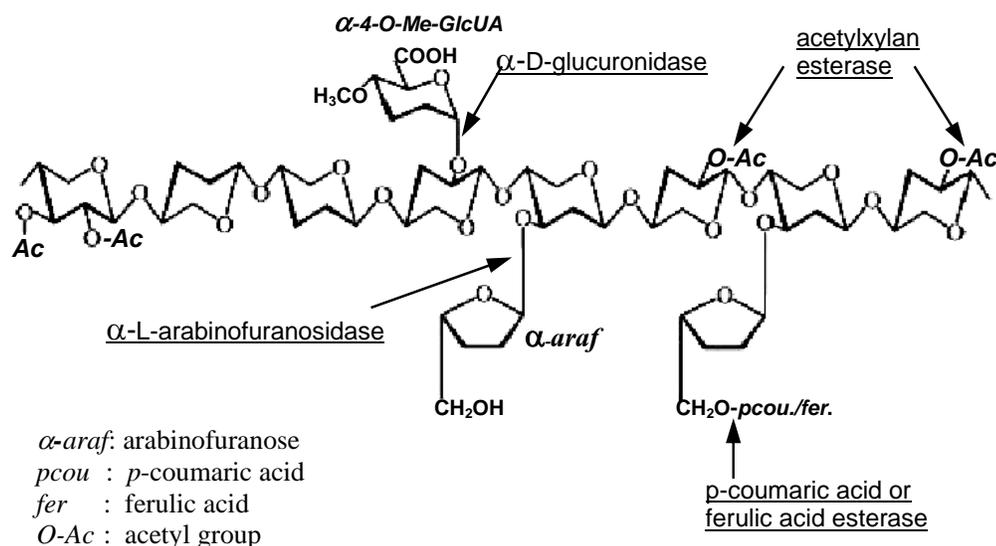
3.2.3 เอนไซม์กลูคูโรนิเดส (glucuronidase) (EC.3.2.1.-)

เป็นเอนไซม์ที่ช่วยพันธะระหว่างกรดกลูคูโรนิกกับน้ำตาลไซโลสในโครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลน เอนไซม์กลูคูโรนิเดสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงโดยจะตัดพันธะที่เชื่อมระหว่างกรด 4-O-methylglucuronic และน้ำตาลไซโลสทางปลายด้าน non-reducing end เท่านั้น (Biely และ Tenkanen, 1998) และพบว่าการที่มีหมู่อะซิทธิลอยู่ใกล้กับหมู่กลูคูโรนิกจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์กลูคูโรนิเดสด้วย (Polizeli *et al.*, 2005)

3.2.4 เอนไซม์เฟอร์ูลิกแอซิดเอสเทอร์เอส (ferulic acid esterase) และคูมาริกแอซิดเอสเทอร์เอส (*p*-coumaric acid esterase) (EC.3.1.1.-)

เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะตัดพันธะเอสเทอร์บนไซแลน โดยเอนไซม์เฟอร์ูลิกแอซิดเอสเทอร์เอสจะตัดพันธะระหว่างอะราบิโนสและกรดเฟอร์ูลิก ส่วนเอนไซม์คูมาริกแอซิดเอสเทอร์เอสจะตัดพันธะระหว่างอะราบิโนสกับกรดคูมาริก (Christov และ Prior, 1993; Williamson *et al.*, 1998; Crepin *et al.*, 2004)

ตำแหน่งการตัดพันธะของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ตำแหน่งการตัดพันธะของเอนไซม์ที่ช่วยสลายไซโดด้านข้างของไซแลน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Collins *et al.* (2005)

4. คุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนส (Characteristics of xylanase)

เอนไซม์ไซลานเนสที่พบโดยทั่วไปสามารถทำงานได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 80 องศาเซลเซียสและที่ pH 4.0 ถึง pH 6.5 เชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากกว่า 1 รูปแบบ (Rizzatti *et al.*, 2004) เนื่องจากหลายปัจจัย เช่น การเกิดกระบวนการโพสทรานสเลชัน ซึ่งของเอ็มอาร์เอ็นเอ (processing of mRNA) และการเกิดการดัดแปรแบบโพสทรานสเลชัน (post-translation modification) (Sung *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1998; Chavez *et al.*, 2002) ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ที่ได้มีสมบัติบางประการ เช่น น้ำหนักโมเลกุล หรือค่า pI (Isoelectric point) ที่แตกต่างกัน แต่ยังคงมีลักษณะการทำงานคล้ายกัน ซึ่งเรียกว่า isozyme

Li *et al.* (2006) ศึกษาเอนไซม์ไซลานเนสที่บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Paecilomyces thomophila* ซึ่งผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เจลฟิลเตรชัน และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25.8 กิโลดาลตัน (kDa) และมีสภาวะการทำงานที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสและ pH 7.0 และเมื่อหาค่าทางจลนพลศาสตร์ (kinetic parameter) ของเอนไซม์ไซลานเนสต่อโครงสร้างไซแลนจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ไม้เบิร์ช (birchwood) ไม้บีช (beechwood) และต้นโอ๊ต (oat spelts) ส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ พบว่ามีค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) เท่ากับ 1.6, 2.4, 2.0 และ 11.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าอัตราเร็วสูงสุดในการทำปฏิกิริยา (V_{max}) เท่ากับ 1424.7, 1290.3, 1935.5 และ 2344.1 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

เอนไซม์ไซลานเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus circulans* BL53 (Heck *et al.*, 2006) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก และเจลฟิลเตรชัน จากนั้นหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38 กิโลดาลตันและ pI ประมาณ 8.8 มีค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ได้แก่ K_m และ V_{max} เท่ากับ 9.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 25.25 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Aspergillus sojae* (Kimura *et al.*, 1995) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ และเจลฟิลเตรชัน พบว่ามีรูปแบบของเอนไซม์ทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ X-I, X-II-A และ X-II-B มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32.7, 34.3 และ 35.5 กิโลดาลตัน มีค่า pI ประมาณ

3.5, 3.9 และ 3.75 ตามลำดับ และเอนไซม์ทั้ง 3 รูปแบบนี้มีสภาวะการทำงานที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60, 50 และ 60 องศาเซลเซียส และที่ pH 5.0, 5.0 และ 5.5 ตามลำดับ

Anthony *et al.* (2003) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* AR1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียสและ pH 6.0-6.5 เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียสและ pH ในช่วง 4.0-9.0 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลานเนสจากการประมาณค่าโดยวิธี electrophoresis และการทำ Zymogram พบแถบโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด 4 แถบและมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 212 ถึง 253 กิโลดาลตัน

จากรายงานของ Silva *et al.* (1999) ซึ่งได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซลานเนส II ที่บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* Fresenius เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีจมูกข้าวสาลี (wheat bran) เป็นสับสเตรท เอนไซม์ไซลานเนส II ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 กิโลดาลตันจากการประมาณด้วยวิธี SDS-PAGE สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อวัดค่าทางจลนพลศาสตร์และความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นโครงสร้างไซแลนเท่านั้น ส่วนค่า K_m ต่อสับสเตรทที่เป็นไซแลนจาก oat spelt และไซแลนจาก birchwood เท่ากับ 5.72 และ 2.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ V_{max} เท่ากับ 2.34 และ 1.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอนไซม์ไซลานเนสจากเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* 10 ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีสภาวะการทำงานดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียสและ pH 5.0-5.5 มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH ในช่วง 3.0-8.0 (จารุวรรณ, 2548)

นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ไซลานเนสในจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	อุณหภูมิที่ เหมาะสม (°C)	pH ที่ เหมาะสม	แหล่งอ้างอิง
<i>Aspergillus aculeatus</i>	18, 26, 52	50, 50, 70	4.0, 4.0, 5.0	Fujimoto <i>et al.</i> (1995)
<i>Aspergillus awamori</i>	39, 23, 26	45-55	4.0-5.5	Kormelink <i>et al.</i> (1993)
<i>Aspergillus fischeri</i>	31	60	6.0	Raj and Chandra (1996)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19, 8.5	55	5.5	Silva <i>et al.</i> (1999)
<i>Aspergillus kawachii</i>	35, 26, 29	60, 55, 50	5.5, 4.5, 2.0	Ito <i>et al.</i> (1992)
<i>Aspergillus nidulans</i>	22, 34	62, 56	5.5, 6.0	Espinari <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus nidulans</i> KK	ND	55	8.0	Taneja <i>et al.</i> (2002)
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	60	5.0	Kitamoto <i>et al.</i> (1999)
<i>Aspergillus sojae</i>	33, 36	60, 50	5.0, 5.5	Kimura <i>et al.</i> (1995)
<i>Aspergillus</i> sp.	26	50	5.0	Khanna <i>et al.</i> (1995)
<i>Aspergillus sydowii</i>	33	50	4.0	Ghosh and Nanda (1994)
<i>Aspergillus terreus</i>	ND	50	7.0	Ghanen <i>et al.</i> (2000)
	ND	45	4.5	Ghareib and Dein (1992)
<i>Aspergillus versicolor</i>	19	55	6.0	Carmona <i>et al.</i> (1998)
<i>Acrophialophora nainiana</i>	22	55	7.0	Salles <i>et al.</i> (2000)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25	54	4.4	Li <i>et al.</i> (1993)
<i>Bacillus</i> sp.	99	75	6.0	Baitaillon <i>et al.</i> (2000)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	25, 47, 57	50	5.0-7.0	Baraznenok <i>et al.</i> (1999)
<i>Cryptococcus</i> sp.	22	40	2.0	Iefuji <i>et al.</i> (1996)
<i>Fusarium oxysporum</i>	20.8, 23.5	60, 55	6.0	Christakopoulos <i>et al.</i> (1996)
<i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	23	70	5.5	Monti <i>et al.</i> (1991)
<i>Myceliophthora</i> sp.	53	75	6.0	Chadha <i>et al.</i> (2004)
<i>Penicillium brasilianum</i>	31	ND	ND	Jorgensen <i>et al.</i> (2003)
<i>Penicillium capsulatum</i>	22	48	3.8	Ryan <i>et al.</i> (2003)
<i>Penicillium</i> sp.	25	50	2.0	Kimura <i>et al.</i> (2000)
<i>Streptomyces</i> sp.	24.5, 37.5, 38	55-60	6.0-8.0	Georis <i>et al.</i> (2000)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	ND	70-75	4.0-5.0	Kalogeris <i>et al.</i> (1998)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	อุณหภูมิที่ เหมาะสม (°C)	pH ที่ เหมาะสม	แหล่งอ้างอิง
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	24.7	70	6.0-6.5	Singh <i>et al.</i> (2000)
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	50	5.0	Tan <i>et al.</i> (1985)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Polizeli *et al.* (2005)

5. คุณลักษณะของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส (Characteristics of β -xylosidase)

เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสผลิตได้ทั้งจากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยทั่วไปจะพบเป็น โปรตีน ที่มี 1 หน่วยย่อย (subunit) แต่ในบางรายงานพบว่า มีถึง 2 หรือ 3 หน่วยย่อย (Sunna และ Antranikian, 1997) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 60 กิโลดาลตันถึง 360 กิโลดาลตัน มีสภาวะการทำงาน ที่ค่อนข้างกว้างแต่ส่วนใหญ่ที่พบจะทำงานได้ดีที่ pH 4.0-5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วน ความเสถียรของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับแหล่งผลิต (Polizeli *et al.*, 2005)

เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่บริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *Bacillus thermantarcticus* ที่เพาะเลี้ยงใน อาหารเหลวโดยมีไซแลนเป็นสับสเตรท แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศา เซลเซียสและ pH 6.0 ความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 5.5 ถึง 10.0 และทนอุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 150 กิโลดาลตันเมื่อประมาณค่าด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน และ 75 กิโลดาลตันเมื่อประมาณค่าด้วยวิธี SDS-PAGE มีค่า pI เท่ากับ 4.2 (Lama *et al.*, 2004)

จากการศึกษาของ Kiss และ Kiss (2000) พบว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่บริสุทธิ์จากเชื้อ รา *Aspergillus carbonarius* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 4.0 เอนไซม์มีความ เสถียรที่ pH 3.5 ถึง 6.5 และเมื่อป้อนเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่ามีความเสถียร สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมไป 25 เปอร์เซ็นต์และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสจะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด เอนไซม์มี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100 กิโลดาลตันเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และมีค่า pI ประมาณ 4.4

Lee และ Forsberg (1987) ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวที่มีไซแลนจาก oat spelt เป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและ pH 6.0 ถึง 6.5 มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและที่ pH ในช่วง 6.0 ถึง 8.0 เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มี 2 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 63 และ 85 กิโลดาลตันมีค่า pI ประมาณ 5.85

เชื้อรา *Termitomyces clypeatus* ผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 94 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 5.0 มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Bhattacharyya *et al.*, 1997)

Li *et al.* (2000) ศึกษาการเหนี่ยวนำและสมบัติของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเชื้อรา *Trichoderma koningii* G-39 พบว่าในอาหารที่มีไซโลสผสมกับไซแลนมีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมากกว่าในอาหารที่มีไซแลนเพียงอย่างเดียว เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 และ 100 กิโลดาลตันเมื่อประมาณค่าด้วยวิธีเจลฟิเตรชันและ SDS-PAGE ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ pH 3.5 ถึง 4.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรในช่วง pH 2.5 ถึง 7.4 และอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมด

6. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน

เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสามารถผลิตได้ทั้งในอาหารเหลว (submerged liquid culture) และอาหารแข็ง (solid state culture) ขึ้นกับลักษณะการนำไปใช้ ตารางที่ 2 แสดงการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนเพื่อใช้ในทางการค้าซึ่งมีการผลิตในอาหารทั้ง 2 ชนิด แต่พบว่า 80-90 เปอร์เซ็นต์เป็นการผลิตในอาหารเหลว โดยปกติเซลล์จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนาสได้โดยไม่ต้องมีการเหนี่ยวนำซึ่งเรียกว่า constitutive enzyme แต่เอนไซม์ที่ผลิตออกมาจะมีปริมาณน้อยและ กิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ constitutive enzyme จะเริ่มต้นทำงานโดยการย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นไซแลนทำให้ได้ไซโลโกลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เช่น ไซโลไบโอสและไซโลไตรโอส ซึ่งสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ และจะไปเหนี่ยวนำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ไซแลนาสเกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ไซแลนาสเพิ่มขึ้น ส่วนการยับยั้งการผลิตเอนไซม์เกิดจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลไซโลสซึ่งได้จากการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส

และน้ำตาลกลูโคส (Haltrich *et al*, 1996) กลไกการควบคุมการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสและเอนไซม์
บีต้า-ไซโลซิเดสแสดงในภาพที่ 7

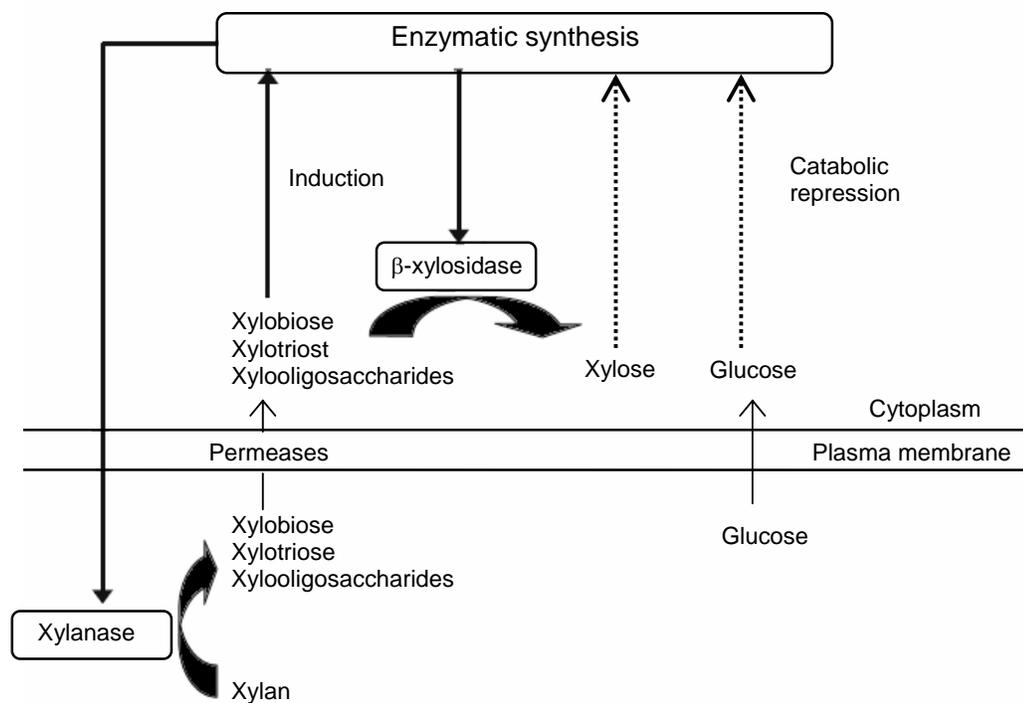
ตารางที่ 2 เอนไซม์ย่อยสลายไซลาลเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในเชิงพาณิชย์และการนำไปใช้

ชื่อทางการค้า	ผู้จำหน่าย	จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต	การผลิต	การนำไปใช้งาน
Allzym PT	Alltech, US	<i>Aspergillus niger</i>	SbmF	Animal feed improvement
Amano 90	Amano Pharmaceutical, Japan	-	SSF wheat raw	Pharmaceutical analysis, food industry
Bio-Feed Plus	Novo Nordisk, Denmark	<i>Humicola insolens</i>	SbmF	Animal feed
Resinase	A/S	n.c.	n.c.	Cellulose and paper industry
Bleachzyme	Biocon, India	n.c.	n.c.	-
Cartazyme	Clariant, UK	<i>Termomonospora fusca</i>	n.c.	-
EcopulpX-200	Primalco, Argentina	<i>Trichoderma reesei</i>	SbmF	Cellulose pulp bleaching
Ecosane	Biotec, US		SbmF	Animal feed
Ecozyme	Thomas Swan, UK	n.c.	n.c.	Cellulose and paper industry
Grindazym	Danisco Ingredients, Denmark	<i>A. niger</i>	SbmF	Bird and pig feed
Irgazyme 40	Nalco-Genencor, US Ciba,-Geigy, Switz.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	SbmF	Paper industry and animal feed
Multifect XL	Genencor, US	<i>T. longibrachiatum</i>	SbmF	Food industry
Pulpzyme	Novozymes, Denmark	<i>Bacillus</i> sp.	-	Cellulose and paper industry
Solvay pentonase	Solvay Enzymes, US	<i>T. reesei</i>	SbmF	Starch and bread-making industries
Sternzym HC 46	Stern-Enzym, German	-	SSF	Bread-making
Sumizyme X	Shin Nihon, Japan	<i>Trichoderma koningii</i>	SSF wheat raw	Manufacture of mushrooms and vegetables extracts, bread- making,
Xylanase	Seikagaku, Japan	<i>Trichoderma</i> sp.	SbmF	Carbohydrate structural studies

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อทางการค้า	ผู้จำหน่าย	จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต	การผลิต	การนำไปใช้งาน
Xylanase	Granotec do Brazil, Brazil	n.c.	n.c.	Weight decreasing in Cream-Crackers, better texture and taste, Wafer's uniformity improvement
Xylanase GS35	Iogen, Canada.	<i>T. reesei</i>	SbmF	Cellulose pulp bleaching, animal feed
Biobrite		n.c.	n.c.	Cellulose and paper industry

หมายเหตุ SbmF= Submerged fermentation, SSF= solid substrate fermentation, n.c.= not cited
ที่มา: ดัดแปลงจาก Polizeli *et al.* (2005)



ภาพที่ 7 กลไกการควบคุมการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส

ที่มา: Polizeli *et al.* (2005)

น้ำตาลไซโลสไม่ได้ให้ผลในการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนสเสมอไปบางครั้งก็สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ได้ (Haltrich *et al.*, 1996) เช่นจากการศึกษาของ Pou-Llinas และ Driguez (1987) พบว่าไซโลสสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในจุลินทรีย์ *Pullularia pullulans* และสารบางชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ทั้งเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสได้พร้อมกัน เช่นในเชื้อรา *Aspergillus terreus* ซึ่งจะผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเพียงอย่างเดียวเมื่อมีสับสเตรทเป็นไซแลน ไซโลไบโอส และน้ำตาลไซโลส แต่เมื่อใช้เซลลูโลส หรือเซลโลไบโอส เป็นสับสเตรทพบว่าจุลินทรีย์จะผลิตทั้งเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสควบคู่กันไป (Hrmova *et al.*, 1989) เช่นเดียวกับในเชื้อรา *Trichoderma reesei* ที่พบว่าไซแลนและไซโลไบโอสเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนส ในขณะที่ซอโฟโรส (sophorose) สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลส (Hrmova *et al.*, 1986) แตกต่างจากการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนสใน *Schizophyllum commune* ซึ่งเกิดจากการใช้เซลโลไบโอสหรือซอโฟโรสเป็นสารเหนี่ยวนำ และพบว่าเมื่อมีไซแลนและไซโลไบโอสจะทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนสลดลง (Haltrich *et al.*, 1996) ส่วนการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส พบว่าไซโลไบโอส เป็นสารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ดีที่สุด (Polizeli *et al.*, 2005)

เอนไซม์ไซลานเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งจากเชื้อรา แบคทีเรียและแอกติโนมัยซีท โดยลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสจะแตกต่างกันตามแหล่งที่ผลิตเอนไซม์ โดยจุลินทรีย์ที่นิยมศึกษาและใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อรา เนื่องจากมีข้อดี คือ เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งง่ายต่อการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ไปใช้งาน และเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ที่มีความซับซ้อนคือใน 1 ระบบเอนไซม์จะมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโครงสร้างที่เป็นโซ่หลักและโซ่ด้านข้างซึ่งทำให้สามารถย่อยสลายโครงสร้างที่ซับซ้อนได้อย่างสมบูรณ์ (Haltrich *et al.*, 1996)

เชื้อรากลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไซลานเนสแต่มีการศึกษาน้อยมาก คือ เชื้อราในกลุ่ม Basidiomycetes หรือที่รู้จักกันทั่วไปว่าเห็ดรา โดยเฉพาะเห็ดราที่รับประทานได้ (edible mushroom) ซึ่งนอกจากจะผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างที่ซับซ้อนได้อย่างสมบูรณ์แล้ว เอนไซม์ที่ผลิตน่าจะมีความปลอดภัยสามารถรับประทานได้ (Qinnghe *et al.*, 2004)

จากรายงานของจาร์วอร์น (2548) ซึ่งได้ศึกษาเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจากเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* 10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารเหนียวต่างๆ พบว่า มีการผลิตเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อใช้เอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือเซลโลไบโอส น้ำตาลแลคโตส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน ส่วนน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสไม่แสดงการเหนียวในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

7. เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนในอุตสาหกรรม

ปัจจุบันมีหลายประเทศที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงพาณิชย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ญี่ปุ่น ฟินแลนด์ เยอรมัน ไอร์แลนด์ เดนมาร์ก แคนาดา และสหรัฐอเมริกา การนำเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนมาใช้ในอุตสาหกรรมมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 โดยในระยะแรกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ต่อมาจึงได้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องคั้น และอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ปัจจุบันเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลสและเปคตินเอสมีส่วนแบ่งในตลาดเอนไซม์ของโลกอยู่ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ทั้งหมด (Polizeli *et al.*, 2005)

7.1 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

อาหารสัตว์ส่วนใหญ่เป็นของเหลือทิ้งจากพืชจำพวกธัญพืชหรือพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งมีอะราบิโนไซแลนเป็นส่วนประกอบหลัก ในกระเพาะของสัตว์อะราบิโนไซแลนจะอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้และเกิดความหนืด ซึ่งขัดขวางการดูดซึมสารอาหารและการย่อยอาหารของสัตว์ ทำให้สัตว์เจริญเติบโตช้าและสุขภาพไม่ดี โดยเฉพาะในสัตว์ที่มีอายุน้อยหรือแรกเกิดซึ่งมีการผลิตเอนไซม์ที่ใช้สำหรับย่อยอาหารในปริมาณน้อยกว่าในสัตว์ที่โตแล้ว ดังนั้นการเติมเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนในอาหารสัตว์จะช่วยให้ระบบย่อยอาหารของสัตว์ทำงานได้ดีขึ้นและดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตและมีสุขภาพที่ดี (Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังพบว่าของเสียที่ขับออกจากร่างกายของสัตว์ที่กินอาหารที่มีเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนเป็นส่วนประกอบ จะมีปริมาณของสารฟอสฟอรัส ในโตรเจน ทองแดงและสังกะสีลดลง ซึ่งเป็นการลดการปนเปื้อนของสารเหล่านี้สู่สภาพแวดล้อมอีกทางหนึ่ง (Polizeli *et al.*, 2005)

7.2 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ในการทำงานมอบพบว่าหากมีการเติมเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนลงในแป้งขนมปังจะทำให้ได้โด (dough) ที่มีความนุ่ม นวดง่าย เนื้อสัมผัสของขนมปังเพิ่มขึ้น การดูดซึมน้ำดีขึ้นและทนต่อการหมักได้ดีขึ้นด้วย (Harbak และ Thygesen, 2002; Camacho และ Aguilar, 2003)

ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและไวน์ ต้องการให้มีความคงตัวของผลิตภัณฑ์เนื่องจากในผลไม้มิมีสารจำพวกเปคติน และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมักจะเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอน พบว่าการใช้เอนไซม์ไซลานเนส เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เปคตินเนสจะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ เช่นเดียวกับปัญหาที่พบในการผลิตเบียร์ ที่มักพบว่าในขั้นตอนการหมักจะเกิดความหนืดและเบียร์จะมีลักษณะคล้ายกับโคลน ซึ่งเกิดจากอะราบีโนไซแลนจากข้าวบาร์เลย์ เมื่อใส่เอนไซม์ไซลานเนสลงไปช่วยย่อยอะราบีโนไซแลนให้เป็น โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ก็จะทำให้ปัญหานี้หมดไป (Debyser *et al.*, 1997; Dervilly *et al.*, 2002)

7.3 อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ

อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษเป็นอุตสาหกรรมหลักที่มีการนำเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนมาใช้ งาน โดยใช้ในขั้นตอนของการฟอกเยื่อเพื่อกำจัดสารประกอบลิกนินออกจากเซลลูโลส โดยในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษที่ผ่านมาจะใช้สารเคมีจำพวกคลอรีนไดออกไซด์ โอโซน และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารฟอก ซึ่งเมื่อสารเหล่านี้รวมตัวกับสารประกอบลิกนินจะเกิดเป็นสารที่มีพิษโดยเฉพาะคลอรีนไดออกไซด์ ต่อมาประเทศในแถบทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือจึงได้ลดปริมาณของคลอรีนไดออกไซด์ลงและเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนเข้าไปแทน พบว่าให้ประสิทธิภาพในการฟอกเยื่อที่ไม่ต่างกันและยังลดการเกิดมลภาวะที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Polizeli *et al.*, 2005)

จากการที่เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสามารถกำจัดสารประกอบลิกนินได้ จึงมีการตั้งสมมติฐานการทำงานของเอนไซม์ไว้ 2 แบบ คือ สมมติฐานแรกคาดว่าเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจะย่อยสลายไซแลนที่เกาะอยู่กับลิกนินทำให้ลิกนินสัมผัสกับสารเคมีได้ง่ายขึ้น ดังนั้นแม้จะใช้สารเคมีปริมาณน้อยลงก็สามารถกำจัดลิกนินได้ (Viikari *et al.*, 1994) สมมติฐานที่ 2 คือ ไซแลนซึ่งสร้างพันธะเชื่อมอยู่ระหว่างเซลลูโลสและลิกนิน เมื่อถูกกำจัดโดยเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจึงทำให้เซลลูโลสเป็นอิสระจากลิกนินด้วย (Paice *et al.*, 1992)

8. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เป็นกระบวนการหลังการผลิต (down stream process) ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเก็บเกี่ยวผลผลิต เป็นการแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของสารที่ต้องการแยก เช่น ขนาดโมเลกุล มวล ประจุไฟฟ้าบนโมเลกุล ความสามารถในการละลาย และความจำเพาะกับสารบางชนิด เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 หลักการแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

สมบัติ	วิธีการ
ขนาด หรือ มวล	Centrifugation Gel filtration Dialysis, Ultrafiltration
ประจุ	Ion-exchange chromatography Electrophoresis Isoelectric focusing
ความสามารถในการละลาย	Change in pH Change in ionic strength Decrease in dielectric constant
ความจำเพาะกับสารบางชนิด	Affinity chromatography Affinity elution

ที่มา: คัดแปลงจาก Price และ Stevens (1984)

ส่วนวิธีการที่มักจะใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ที่รู้จักกันทั่วไป ได้แก่ วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) วิธีเจลฟิเตรชัน (gel filtration) วิธีอัลตราฟิเตรชัน (ultrafiltration) วิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) และการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นต้น

8.1 โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลว กับเฟสคงที่ (stationary phase) โดยที่เฟสคงที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย เรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) เป็นโพลิเมอร์ (polymer) ที่เหนียวทำให้ประกอบด้วยส่วนที่มีประจุรวม เรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) เช่น carboxymethyl cellulose เป็นเซลลูโลสที่มีกลุ่มประจุของหมู่ carboxymethyl (CH_2COO^-) หรือ dextran ที่มีหมู่ aminoethyl (CH_2NH_3^+) ล้อมรอบอยู่ เมื่อตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกทำให้อยู่ในสมดุลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หรือสารละลายเกลือใดๆ พบว่ามีส่วนของสารที่มีประจุที่เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือเข้ามาล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาสภาพสมดุลทางไฟฟ้า เรียกประจุเหล่านี้ว่า counter ion ซึ่งเป็นไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับเมทริกซ์ โพรตีนแต่ละชนิดมีประจุที่ต่างกันทำให้สามารถเกิดแรงกระทำทางไฟฟ้ากับประจุในส่วน counter ion ได้ต่างกัน โพรตีนที่มีประจุตรงข้ามกับตัวแลกเปลี่ยนประจุและมีความแรงประจุสูงก็จะไปแทนที่ counter ion แล้วเข้าไปยึดจับกับเมทริกซ์ได้ ส่วนโพรตีนที่มีประจุชนิดเดียวกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็จะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อน โดยแรงผลักทางไฟฟ้า ทำให้สามารถแยก โพรตีนที่ผสมกันอยู่ออกจากกันได้ และเมื่อต้องการไล่โพรตีนที่ถูกยึดจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุให้หลุดออกมาสามารถทำได้โดยการผ่านบัฟเฟอร์ที่มีประจุแรงกว่าเข้าไป ซึ่งจะไปแทนที่ทำให้โพรตีนหลุดจากการจับกับเมทริกซ์ ส่วนมากสารที่ใช้เพื่อชะโพรตีนจากเมทริกซ์มักเป็นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยโพรตีนที่ถูกชะออกมาก็จะเรียงจากโพรตีนที่ความแรงของประจุต่ำสุดไปจนกระทั่งโพรตีนที่มีความแรงของประจุสูงสุด นอกจากนี้การทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุสามารถเลือกได้ว่าต้องการให้โพรตีนที่ต้องการแยกจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือให้อยู่ในส่วนที่ถูกชะออกมาก็ได้ (Scopes, 1987)

8.2 เจลฟิльтраชัน (gel filtration chromatography)

เป็นเทคนิคการแยก โพรตีน โดยอาศัยสมบัติความแตกต่างกันของขนาด มวล และรูปร่างของโพรตีน (Voet และ Voet, 1990) โดยอาศัยตัวกลางคือเม็ดเจลที่มีช่องว่างภายในที่เกิดจากการเชื่อมไขว้ (cross-link) ของโพลิเมอร์ที่ใช้ในการสร้างโครงข่ายเจล (gel matrix) โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้โพรตีนที่มีขนาดโมเลกุลจำกัดผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนโพรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าและไม่สามารถผ่านเข้าไปได้จะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อน ดังนั้นโพรตีนที่มีขนาดเล็กที่สุดจะถูกชะออกมาหลังสุด

8.3 อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration)

เป็นการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล โดยใช้แรงดันโปรตีนให้ผ่านแผ่นกรอง ซึ่งมีขนาดต่างๆ โดยโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดแผ่นกรองจะสามารถผ่านแผ่นกรองออกมาได้ เรียกว่าเป็น filtrate ส่วนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านได้เรียกว่า retentate ส่วนใหญ่มักใช้เป็นขั้นตอนในการทำโปรตีนให้เข้มข้นขึ้น โดยโปรตีนที่ต้องการต้องมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของแผ่นกรองและอยู่ในส่วนที่เป็น retentate แต่วิธีอัลตราฟิลเตรชันไม่เหมาะสมในการทำโปรตีนให้เข้มข้นหากโปรตีนที่ต้องการอยู่ในส่วนที่เป็น filtrate ดังนั้นสิ่งสำคัญในการทำอัลตราฟิลเตรชัน คือ การเลือกใช้แผ่นกรองที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากขนาดของโปรตีนที่ต้องการแยก (Scopes, 1987)

8.4 โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography)

เป็นการแยกโดยอาศัยความจำเพาะของโปรตีนที่ต้องการแยก โดยโปรตีนจะยึดเกาะกับสารที่มีความจำเพาะ หรือที่เรียกว่า ลิแกนด์ (biospecific ligand) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้ติดอยู่บนเฟสคงที่ (stationary phase) หรือ เมทริกซ์ ด้วยพันธะโควาเลนต์ เมื่อผ่านสารละลายผสมลงไป ในคอลัมน์ โปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะกับลิแกนด์จะถูกชะออกไป จากนั้นจึงปรับสภาพเพื่อให้โปรตีนที่สนใจหลุดออกจากการยึดจับของลิแกนด์ นอกจากนี้อาจมีการเพิ่มส่วนที่เรียกว่า spacer arm ซึ่งจะช่วยให้การยึดจับระหว่างเมทริกซ์กับลิแกนด์ดีขึ้น และเป็นการเพิ่มพื้นที่และโอกาสในการจับของโปรตีนกับลิแกนด์อีกด้วย

8.5 อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

ใช้เป็นวิธีตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่แยกได้และเป็นการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้หลักการแยกตามขนาดโมเลกุล ซึ่งอาศัยสนามไฟฟ้าในการเคลื่อนที่ เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสายโซ่โพลีเปปไทด์เรียกว่า SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) โดยมีหลักการคือ ใช้สาร SDS ซึ่งเป็นสารไอออนิกที่มีประจุลบไปจับสายโซ่โปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพและคลายตัวเป็นเส้นตรงพร้อมกับมีประจุรวมเป็นลบ ดังนั้น โปรตีนจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่จะขึ้นกับขนาดของโมเลกุล โดยที่โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แหล่งจุลินทรีย์

เห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* DOA 10 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยเก็บรักษาบนอาหาร potato dextrose agar (PDA, Merck, Germany)

2. อุปกรณ์และสื่อที่ใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

2.1 เครื่องอัลตราฟิลเตรชัน (MinimateTFF system, PALL, USA)

2.2 คอลัมน์ขนาด 1×100 เซนติเมตร (Bio-Rad, USA)

2.3 คอลัมน์ XK 16 (GE healthcare Bioscience, Sweden)

2.4 Sephacryl S200 (GE healthcare Bioscience, Sweden)

2.5 Q Source (GE healthcare Bioscience, Sweden)

2.6 Akta explorer (GE healthcare Bioscience, Sweden)

วิธีการ

1. การผลิตเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* DOA 10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MCM (mushroom complete medium) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อจากจานอาหาร MCM โดยการตัดชิ้นวุ้นที่ปลายเส้นใยของเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 ด้วย cork borer เบอร์ 3 จำนวน 5 ชิ้นแล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM medium (mushroom minimal medium) (Niederpruem, 1963) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีเอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอนที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกเซลล์และส่วนใสออกจากกัน ส่วนใสที่ได้จะเก็บรักษาโดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

บ่มสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรร่วมกับสารละลาย Oat spelt xylan 1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ละลายในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Wood และ Bhat, 1988)

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส แสดงเป็นยูนิตของเอนไซม์ โดยที่หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทได้น้ำตาลรีดิวซ์หนึ่งไมโครโมลในเวลาหนึ่งนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส

บ่มสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ร่วมกับสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 405 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (John และ Schmidt, 1988)

กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส แสดงเป็นยูนิตของเอนไซม์ โดยที่หนึ่งยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย *p*-nitrophenol หนึ่งไมโครโมลในเวลาหนึ่งนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ละลายอยู่ในส่วนใส โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน

3. การศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ศึกษาสภาวะที่เอนไซม์แสดงกิจกรรมการทำงานสูงสุดโดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เมื่อแปรค่าอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส และ pH 3.0-8.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุม pH 3.0-5.5 และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุม pH 6.0-8.0

4. การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ

4.1 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ที่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากหัวข้อที่ 3

4.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ

บ่มสารละลายเอนไซม์ร่วมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ pH 3.0-5.0 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 6.0-8.0 สารละลายทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ (Tris-HCl) ที่ pH 9.0-10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากหัวข้อที่ 3

5. การศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ผลิตเอนไซม์ตามวิธีในหัวข้อที่ 1 และเก็บตัวอย่างทุกวันวันละ 1 ขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 15 วัน ตัวอย่างที่เก็บได้นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ส่วนใสที่กรองได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน

6. การศึกษาการสร้างเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 ในระหว่างการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง

เลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในขวดที่มีเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้เข็มเย็บเชื้อตัดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเส้นใยติดมาด้วย ให้ได้ชิ้นขนาด 1 ตารางเซนติเมตร วางชิ้นวัน

ลงตรงกลางขวดเมล็ดข้าวฟ่าง โดยเอียงขวดให้เมล็ดข้าวฟ่างกระจายแบนราบลง แล้วตั้งขวดขึ้น ปิดจุกสำลี ใช้กระดาษปิดทับและรัดยาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้เส้นใยเจริญเต็มขวดประมาณ 8-12 วัน หลังจากนั้นถ่ายเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยของเชื้อ ประมาณ 20 เมล็ดลงในอาหารแข็ง ที่ประกอบด้วย ซีลีเยอ 1 กิโลกรัม รำละเอียด 50 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 10 กรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 2 กรัม ยิปซัม 20 กรัม และน้ำกลั่น 50-60 เปอร์เซ็นต์ (ชมรมนักเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, 2543) ผสมให้เข้ากัน ซึ่งอาหารแข็ง 50 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกทึบร้อน อัดให้แน่น รวบปากถุงแล้วสวมคอขวดพลาสติก แล้วรวบปากถุงออกมาด้านนอก ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากลงเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 5 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ในแต่ละชุดการทดลองเก็บตัวอย่างก้อนเชื้อทุกๆ 5 วันเป็นเวลา 50 วัน ตัวอย่างที่เก็บได้นำมาสกัดเอนไซม์ โดยการถ่ายก้อนเชื้อจากถุงพลาสติกลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาเฉพาะส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บรักษาส่วนใสที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสและปริมาณโปรตีน

7. การศึกษาผลของสารเหนี่ยวนำ (inducer) ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเห็ดนางรม

P. ostreatus DOA 10 ในสถานะอาหารเหลว

ศึกษาผลของสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของ *P. ostreatus* DOA 10 ในระหว่างการเจริญในอาหารเหลว ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MCM จนเส้นใยเชื้อกระจายเต็มจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM medium ที่ใช้กลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรองแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ถ่ายเซลล์ที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM medium ที่มีสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการทดลองสารเหนี่ยวนำแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ซึ่งแต่ละชุดการทดลองจะเก็บตัวอย่างวันละ 1 ขวดรูปชมพู่ เป็นเวลา 3 วัน ตัวอย่างที่เก็บได้นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บส่วน

ไตที่ได้จากการกรองที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส

สารเหนียวนำที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ D(+)-กลูโคส (Carlo Erba, Germany) D(+)-แมนโนส (Fluka, Switzerland) D(+)-กาแลคโตส (Fluka, Switzerland) D(-)-ฟรุคโตส (Univar, Australia) D(+)-ไซโลส (Fluka, Switzerland) L(-)-ซอร์โบส (Fluka, Switzerland) D(+)-เซลโลไบโอส (Fluka, Switzerland) แลคโตส (Univar, Australia) เอวิเซล (Merck, Germany) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (BDH, England) และไซแกน (oat spelt xylan) (Sigma, Germany)

8. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

8.1 อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตตามวิธีในหัวข้อที่ 1 มาทำให้เข้มข้นขึ้น 20 เท่าโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ด้วยแผ่นกรองกักแยกโปรตีนขนาด 10,000 ดาลตัน ด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน (Minimate TFF System, PALL, USA) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ทั้งสารละลายที่ผ่านแผ่นกรอง (filtrate) และสารละลายที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง (retentate) เก็บสารละลายในส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

8.2 เจลฟิลเตรชัน (gel filtration chromatography)

บรรจุ Sephacryl S-200 ลงในคอลัมน์ขนาด 1.0×80 เซนติเมตรและทำให้อยู่ในสภาพสมดุลด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ที่อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง วัดปริมาตรของช่องว่างระหว่างเม็ดเจล (void volume) ด้วย blue dextran (GE healthcare Bioscience, Sweden) จากนั้นใส่สารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากข้อ 8.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ เก็บตัวอย่างหลอดละ 3.75 มิลลิลิตรเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสตามวิธีในหัวข้อที่ 2.1 และหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เก็บสารละลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

8.3 โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography)

ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 8.2 ลงในคอลัมน์ขนาด 1.6×10 เซนติเมตรที่มีตัวกลาง คือ Q Source บรรจุอยู่และทำให้อยู่ในสภาพสมดุลด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 (บัฟเฟอร์ A) ด้วยอัตราการไหล 180 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากใส่สารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์แล้วเริ่มชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A เพื่อล้างเอาโปรตีนที่ไม่เกาะกับตัวกลางออกจนกระทั่งไม่พบว่ามีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จากนั้นจึงชะโปรตีนที่เกาะกับตัวกลางด้วยวิธีการเพิ่มความเข้มข้นแบบเส้นตรง (linear gradient) ของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1 โมลาร์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (บัฟเฟอร์ B) เก็บตัวอย่างสารละลายหลอดละ 4.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสตามวิธีในข้อ 2.1 จากนั้นเก็บรวบรวมสารละลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

9. การทำ SDS-PAGE และการทำ Zymogram เพื่อหาโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 8.3 ไปทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเตรชัน จากนั้นนำมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาคผนวก ข) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ acrylamide 10 เปอร์เซ็นต์ และไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพอย่างถาวรโดยไม่ใช้ความร้อนและไม่มีการเติม 2-mercaptoethanol จากนั้นย้อมเจลด้วย silver stain plus kit (Bio-Rad, USA) โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เทียบน้ำหนักโมเลกุล คือ pre-stained marker (Bio-Rad, USA) ประกอบด้วย ไมโอซิน (myosin, 195,755) บีต้า-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase, 107,181) โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, 59,299) โอวัลบูมิน (ovalbumin, 41,220) คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, 27,578) ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor, 20,514) ไลโซไซม์ (lysozyme, 15,189) และอะโปรตีนิน (aprotinin, 6,458)

ในการทำ Zymogram เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จ ล้างเจลด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 เพื่อกำจัด SDS และทำให้โปรตีนคืนสภาพ (renature) (Rawashdeh *et al.*, 2005) จากนั้นนำไปวางประกบบนแผ่นเจลที่มีไซแลน (oat spelt xylan) 1 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไซลานเนสผสมอยู่และบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

จากนั้นข้อมเจลที่มีสับสเตรทด้วยสารละลาย Congo red เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง และล้างสีส่วนเกินออกด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ลงไป จะปรากฏโซนใสซึ่งแสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (Tseng *et al.*, 2002)

10. ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสต่อสับสเตรท ได้แก่ ไซเลนจาก oat spelt (Sigma, Germany) ไซเลนจาก birchwood (Sigma, Germany) ไซเลนจาก larchwood (Sigma, Germany) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) (BDH, England) เอวิเซล (Merck, Germany) และ โลคัสปีนกัม (LBG) (Sigma, Germany) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในหัวข้อ 2.1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และต่อสับสเตรท *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (Sigma, Germany) โดยวิธีในหัวข้อ 2.2 ที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

11. ศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

ทดลองเพื่อศึกษาค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) และค่าอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ไซลานเนสต่อสับสเตรท 2 ชนิด คือ ไซเลนจาก oat spelt และ ไซเลนจาก birchwood โดยแปรค่าความเข้มข้นของสับสเตรทตั้งแต่ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ 5 นาทีตั้งแต่เวลาที่ 0 ถึง นาทีที่ 40 ค่า K_m และ V_{max} คำนวณจากสมการของ Lineweaver-Burk plots

12. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2549 และสิ้นสุดเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2551

ผลและวิจารณ์

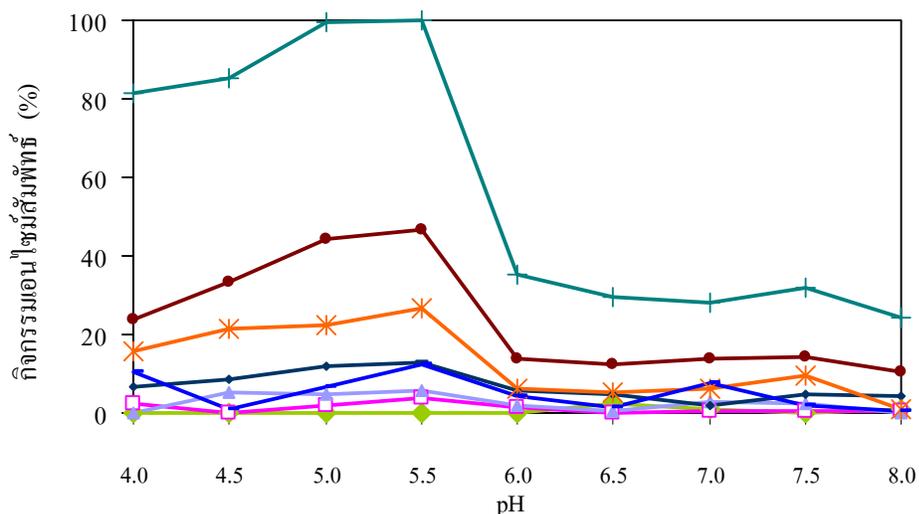
1. อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA

10

ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ pH ต่างๆ ในสารสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 พบว่า เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH ในช่วง 5.0-5.5 โดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์ 99.4-100 เปอร์เซ็นต์ (แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.501 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 8 เมื่อพิจารณาเส้นกราฟที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่ามีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือในทุกๆ อุณหภูมิ เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจะแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 5.0-5.5 แต่มีระดับของกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกัน กล่าวคือที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่ในระดับต่ำ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 50 และ 55 องศาเซลเซียสเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นและสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นในช่วง pH 4.0-5.5 และลดลงอย่างรวดเร็วที่ pH 6.0 และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียสพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว

ผลการทดลองสอดคล้องกับอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเชื้อราชนิดอื่น โดยที่เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและ pH 5.0 (Lemos *et al.*, 2000) ในขณะที่เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเชื้อรา *Trichoderma koningii* ทำงานดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 3.5-4.0 (Li *et al.*, 2000) ซึ่งต่ำกว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10 ที่ได้จากการทดลองเล็กน้อย เช่นเดียวกับเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของเชื้อรา *A. carbonarius* ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 4.0 (Kiss และ Kiss, 2000) และเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของเชื้อรา *A. fumigatus* ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.4 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Lenartovicz *et al.*, 2003) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากแหล่งของจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากการทดลองนี้ คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 5.0-5.5 กับสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไบลานจากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 คือ อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียสและ pH 5.0-5.5 (จาวรธรรม, 2548) จะเห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีความ

แตกต่างกัน โดยเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงกว่าเอนไซม์ไซลานเนสเล็กน้อย แต่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงที่เป็นกรดเหมือนกัน จากนั้นนำสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ได้จากการทดลองมาใช้ในการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ ศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในระหว่างการเจริญเติบโตของ *P. ostreatus* DOA 10 เมื่อเพาะเลี้ยงในสถานะอาหารเหลว และอาหารแข็ง และศึกษาผลของสารเหนียวนาชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส



ภาพที่ 8 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่อุณหภูมิ 30(◆) 35(◻) 40 (▲) 45(◀) 50(✱) 55(◆) 60(◀) 65(◀) องศาเซลเซียส

2. ผลของอุณหภูมิและ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10

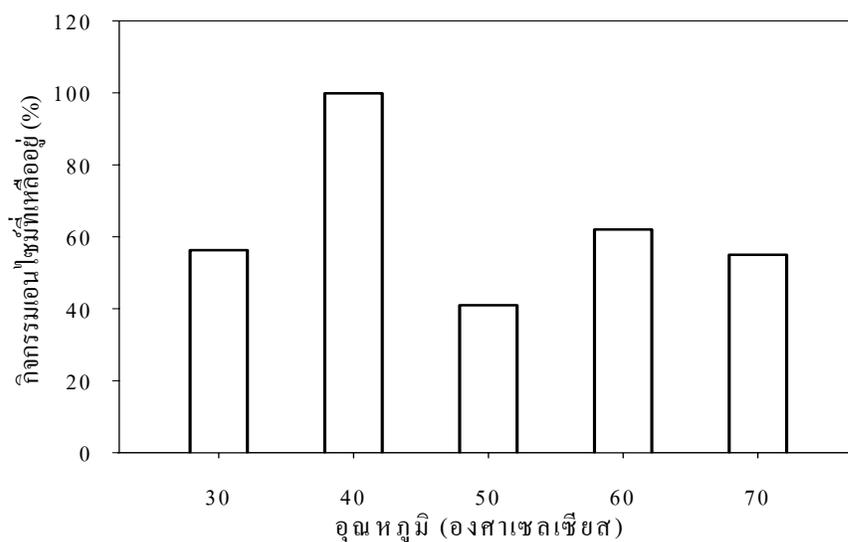
จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส และ pH 4.0-8.0 เมื่อบ่มสารสกัดเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมีกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือน้อยต่ำกว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เพียง 40 เปอร์เซ็นต์และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเอนไซม์กลับมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นและลดลงอีกครั้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 9 ซึ่งอธิบายได้ว่า เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ทดลองอยู่ในรูปของสารสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) และประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิดในลักษณะที่เป็น multi enzymes ดังนั้นการที่กิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส อาจจะไม่ได้อาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสเพียงชนิดเดียวแต่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นที่สามารถย่อยสลายชนิดเดียวกันนี้ได้ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงซึ่งเป็นไปได้ตามทฤษฎีที่ว่าเอนไซม์จะมีความเสถียรลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์กลับเพิ่มสูงขึ้น อาจเป็นเพราะมีเอนไซม์ชนิดอื่นที่ทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้และสามารถใช้สับสเตรตเดียวกันกับเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสได้ และเอนไซม์ที่แสดงกิจกรรมร่วมกับเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนี้ น่าจะเป็นเอนไซม์คนละกลุ่มกับเอนไซม์ที่แสดงกิจกรรมที่ 40 องศาเซลเซียส หรืออาจจะเป็นกลุ่มเดียวกันแต่มีความเสถียรลดลง ซึ่งเห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำกว่า หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอีกครั้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แสดงว่าอุณหภูมิเริ่มมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์

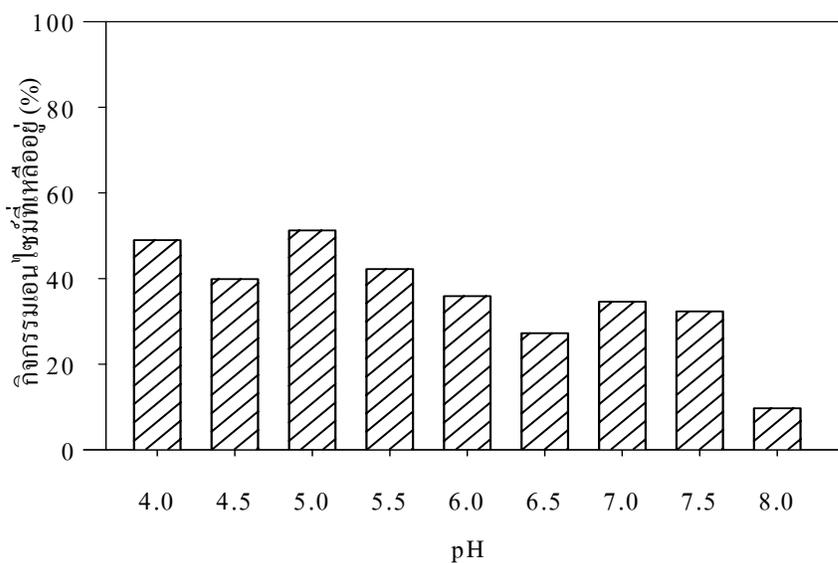
ผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างจากการทดลองส่วนใหญ่ที่พบว่าเอนไซม์จะเสถียรที่อุณหภูมิต่ำและความเสถียรจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่น เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากแบคทีเรีย *Aureobasidium* sp. ที่มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 35-45 องศาเซลเซียส โดยแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง (Lembo *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากแบคทีเรีย *Thermomonospora fusca* BD25 ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสและกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส (Tuncer, 2000) เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจากเชื้อรา *Aspergillus carbonarius* ซึ่งมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสกิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Kiss และ Kiss, 2000)

เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4.0-5.5 โดยแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ pH 6.0-7.5 เอนไซม์มีกิจกรรมที่เหลืออยู่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์และลดลงอย่างรวดเร็วที่ pH 8.0 โดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ 17 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10 นี้มีความเสถียรในช่วง pH ที่เป็นกรดเช่นเดียวกับเอนไซม์จากเชื้อรา *Penicillium wortmanni* ที่พบว่ามีความเสถียรในช่วง pH ที่เป็นกรดเช่นเดียวกับเอนไซม์จากเชื้อรา *Termitomyces clypeatus* ที่พบว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมีความเสถียรที่ pH ในช่วงกว้างคือ pH 3.0-8.0 ซึ่งแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Bhattacharyya *et al.*,

1997) และเมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ได้จากการทดลองกับเอนไซม์ไซลานเนสจาก *P. ostreatus* DOA 10 พบว่าแตกต่างกัน คือเอนไซม์ไซลานเนสมีความเสถียรที่ pH ในช่วงกว้าง คือ pH 4.0-8.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (จารูวรรณ, 2548)



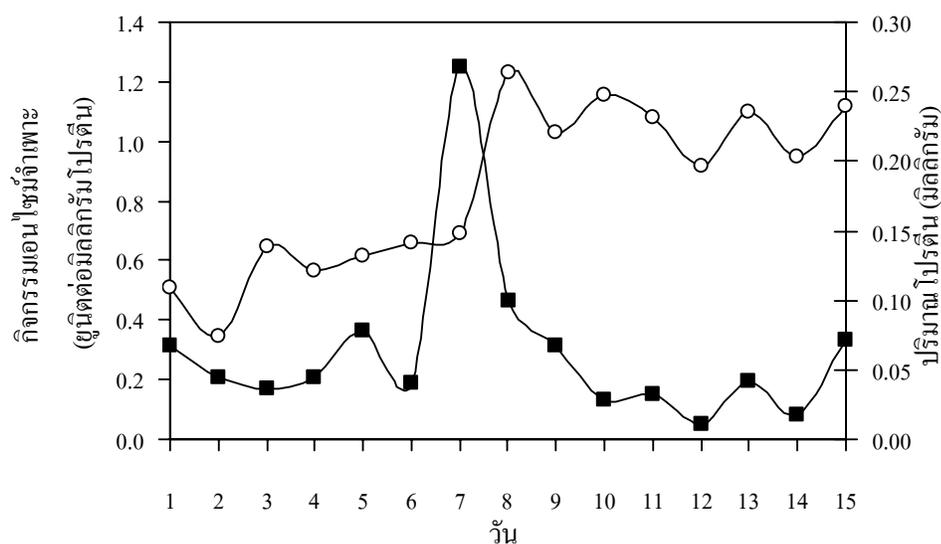
ภาพที่ 9 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส



ภาพที่ 10 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3. การผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีเอมิเชลเป็นแหล่งคาร์บอนของ *P. ostreatus* DOA 10 พบว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงมีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสค่อนข้างต่ำ จนกระทั่งในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 1.248 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าการผลิตเอนไซม์เริ่มมีความคงที่ (ภาพที่ 11) ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่มีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสคงที่ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (Kang *et al.*, 2004) และเชื้อรา *A. fumigatus* ที่มีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในวันที่ 1-2 ของการเพาะเลี้ยงค่อนข้างคงที่จนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 5-6 เช่นกัน (Lenartovicz *et al.*, 2003) และเมื่อพิจารณาปริมาณ โปรตีนที่ผลิตออกนอกเซลล์พบว่ามีความโน้มไปในทางเดียวกันกับการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงคือมีปริมาณค่อนข้างคงที่ แต่หลังจากวันที่ 7 พบว่าปริมาณ โปรตีนแปรผกผันกับปริมาณเอนไซม์ คือปริมาณ โปรตีนมีแนวโน้มสูงขึ้นในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลง ดังภาพที่ 11



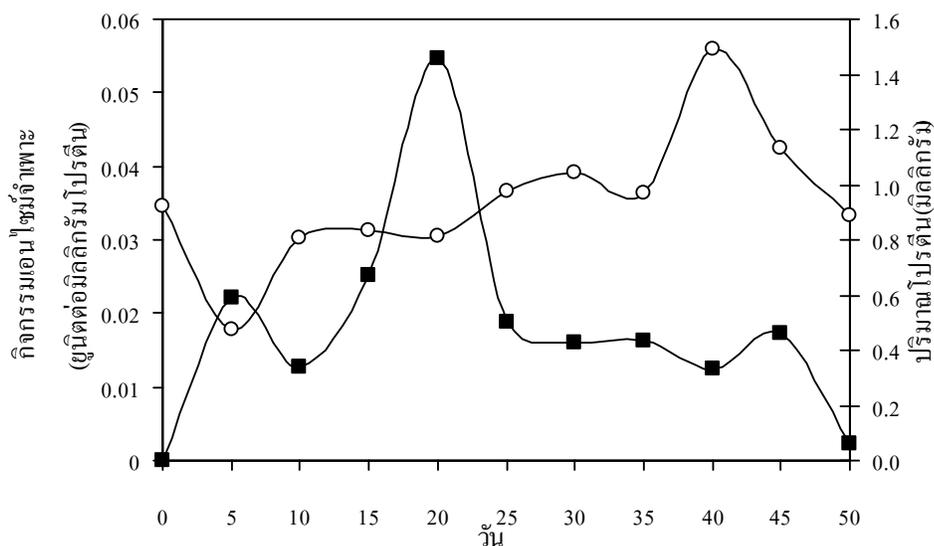
ภาพที่ 11 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และปริมาณ โปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในสถานะอาหารเหลว (—■— เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส —○— ปริมาณโปรตีน)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสมีการผลิตออกมาในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส (จารุวรรณ, 2548) ซึ่งถูกผลิตออกมาในวันที่ 9 ของการเจริญ และจากการวัดปริมาณโปรตีนพบว่ามีความโน้มสูงคงที่อย่างต่อเนื่องแม้ว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะมีกิจกรรมลดลง แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซเลนของ *P. ostreatus* DOA 10 มีลักษณะเป็น non-growth associated enzyme production คือการผลิตเอนไซม์ไม่ขึ้นกับการเจริญของเซลล์

4. การผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) เป็นเวลา 50 วัน พบว่าในระหว่างการเพาะเลี้ยงเห็ดนางรมมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ (morphogenesis) ในแต่ละช่วงระยะของการเจริญเติบโต ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ช่วง คือ ระหว่างวันที่ 0-20 เป็นช่วงของการเจริญของเส้นใย (spawn running) วันที่ 20-35 เกิดกลุ่มของเส้นใยรวมตัวกัน (pin head) และวันที่ 35-40 เป็นช่วงการเกิดดอกเห็ด (fruiting body formation) เส้นใยเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 มีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในปริมาณต่ำและคงที่ในช่วงแรกของการเจริญและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 15 จนมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง โดยแสดงค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 0.055 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็วและคงที่ไปจนกระทั่งวันที่ 45 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณโปรตีนมีความโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และสูงสุดในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 12 ในขณะที่เอนไซม์ไซลานเนสจาก *P. ostreatus* DOA 10 ซึ่งศึกษาโดยจารุวรรณ (2548) มีการผลิตในระดับต่ำและคงที่ในช่วงแรกของการเจริญเช่นเดียวกับเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 35 และสูงสุดในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสถูกผลิตออกมาสูงสุดในช่วงการเจริญของเส้นใย คือ ในช่วงวันที่ 0-20 ของการเจริญ และต่อเนื่องไปจนถึงช่วงที่มีการรวมตัวของเส้นใยในระยะแรก คือ ช่วงวันที่ 20-25 ของการเจริญ จากนั้นจะลดลงและคงที่ ซึ่งอยู่ในระดับต่ำตลอดการเพาะเลี้ยง 50 วัน เมื่อพิจารณาการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ในสภาวะอาหารแข็งพบว่ามีความสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะลดลงและมีปริมาณคงที่ (Hashimoto และ Nakata, 2003) และเชื้อรา *A. ochraceus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีขานอ้อยเป็นสับสเตรทพบว่ามีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง (Biswas *et al.*, 1988)



ภาพที่ 12 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในสภาวะอาหารแข็ง (—■— เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส —○— ปริมาณโปรตีน)

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็ง พบว่ามีความแตกต่างกัน คือ ในสภาวะอาหารเหลวกิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งและใช้ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์น้อยกว่า โดยในสภาวะอาหารเหลวมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง (1.248 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง (0.055 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนพบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเป็นสภาวะที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับสภาวะในธรรมชาติซึ่งส่วนใหญ่เห็ดนางรมจะเจริญตามขอนไม้ที่ผุพังหรือตามวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่างๆ ทำให้เห็ดนางรมเจริญในอาหารแข็งได้ดีกว่าในอาหารเหลวที่มีการควบคุมปริมาณสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเลือกที่จะเพาะเลี้ยงเห็ดนางรมด้วยวิธีใดควรคำนึงถึงจุดประสงค์ในการใช้งานและข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธี ซึ่งการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวนั้น มีข้อดีคือ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณมากและใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเพียงช่วงสั้นๆ ซึ่งประหยัดเวลาในการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมสภาวะได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ แต่ข้อเสียคือ สับสเตรทที่ใช้มีราคาแพงและต้องการอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงที่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง ส่วนการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งมีข้อดีคือ ใช้สับสเตรทที่เป็นของเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีราคาถูก เพาะเลี้ยงได้ง่ายและอุปกรณ์ที่ใช้ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูงเหมาะสม

กับการเพาะเลี้ยงเมื่อต้องการใช้เส้นใยของเห็ดหรือต้องการใช้ดอกเห็ด แต่ข้อเสีย คือ ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานและควบคุมสภาวะในการเจริญต่างๆ ได้ค่อนข้างยาก

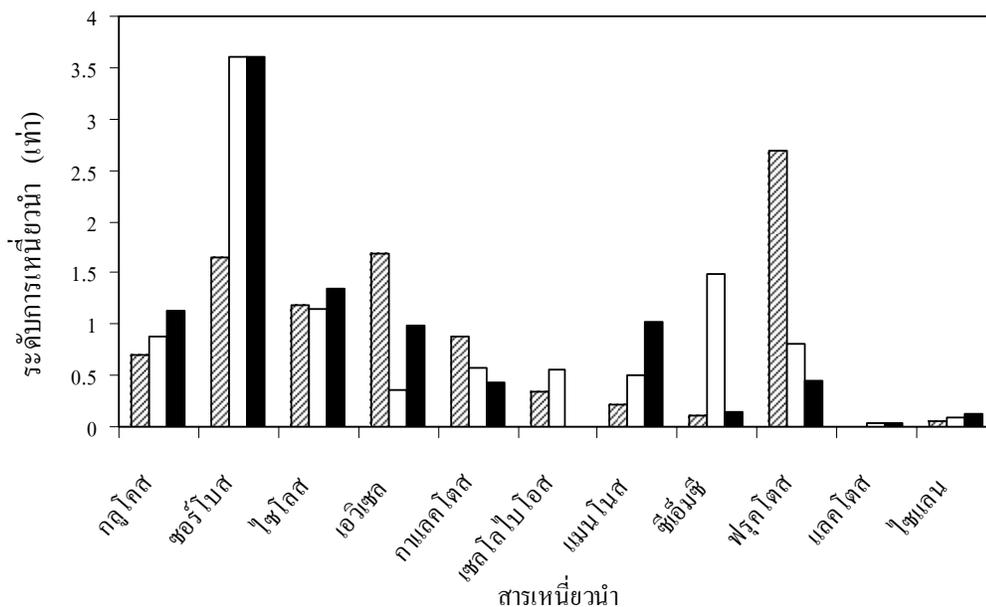
5. การศึกษาผลของสารเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสจาก *P. ostreatus* DOA 10 ในสถานะอาหารเหลว

ทดสอบการเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของสารเหนียวชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลซอร์โบส น้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลไซโลส น้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส น้ำตาลแลคโตส และสารโพลีแซคคาไรด์ คือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เอวิเซล และไซแลนจาก oat spelt ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยผลของสารเหนียวชนิดต่างๆ แสดงเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเปรียบเทียบระหว่างการใช้สารเหนียวชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยกำหนดให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดนางรมในน้ำตาลกลูโคสก่อนที่จะถ่ายลงอาหารที่มีสารเหนียว (ตารางผนวกที่ 8) มีค่าเท่ากับหนึ่ง

ผลการเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส พบว่าซอร์โบสมีการเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 และ 3 มีระดับการเหนียว 3.59 เท่า น้ำตาลไซโลสมีการเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับต่ำแต่คงที่ทั้งวันที่ 1, 2 และ 3 โดยมีระดับการเหนียวอยู่ที่ 1.33 เท่า ในขณะที่ฟรุคโตสและเอวิเซลมีการเหนียวสูงสุดในวันที่ 1 โดยมีระดับการเหนียว 2.68 และ 1.67 เท่า ตามลำดับและไม่มีการเหนียวต่อการผลิตในวันที่ 2 และ 3 แตกต่างจากกลูโคสและแมนโนสที่ไม่มีการเหนียวต่อการผลิตในวันที่ 1 และ 2 แต่มีการเหนียวในวันที่ 3 ระดับการเหนียวค่อนข้างต่ำคือ 1.13 และ 1.01 เท่า ตามลำดับ ซีเอ็มซีมีการเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์สูงสุด 1.48 เท่าในวันที่ 2 และไม่มีการเหนียวในวันที่ 1 และ 3 และไม่พบว่ามีการเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในอาหารที่มีกาแลคโตส เซลโลไบโอส แลคโตส และไซแลน เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในภาพที่ 13 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ดีที่สุดคือน้ำตาลซอร์โบส ซึ่งมีระดับการเหนียวสูงสุดทั้งในวันที่ 1, 2 และ 3 ของการเหนียว รองลงมาคือ ฟรุคโตสและเอวิเซลที่มีการเหนียวสูงสุดในวันที่ 1 การที่สารบางชนิดเช่น กลูโคส ไซโลส แมนโนส และแลคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในระดับที่ต่ำอาจเป็นเพราะเซลล์สามารถที่จะดูดซึมสารเหล่านี้ไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่ายโดยไม่จำเป็นต้องมีการย่อยสลายเซลล์จึงมีการผลิตเอนไซม์ออกมาในระดับที่ต่ำ หรืออีกทางหนึ่งคือ สารเหล่านี้สามารถเหนียว

การผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นได้ดีกว่าเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส ในขณะที่น้ำตาลฟรุกโตสและเอวิเซลซึ่งมีระดับการเหนี่ยวนำสูงสุดในวันที่ 1 และลดลงในวันที่ 2 และ 3 อาจเกิดจากการที่มีเอนไซม์ชนิดอื่นที่ถูกผลิตออกมาและมีผลทำให้โครงสร้างบางอย่างของฟรุกโตสและเอวิเซลถูกตัดแปรไป (modified) (Royer และ Nakas, 1990) ซึ่งโครงสร้างที่ถูกตัดแปรไปนั้นมีผลต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhattacharyya *et al.* (1997) และ Tuncer (2000) ที่พบว่าน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสมีระดับการเหนี่ยวนำเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในระดับที่ต่ำ ในขณะที่รายงานของ Lama *et al.* (2004) พบว่าตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมที่สุด คือ ไซแลน รองลงมาคือ น้ำตาลไซโลส ส่วนน้ำตาลซอร์โบสมีการศึกษาถึงการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma reesei* พบว่าการเติมน้ำตาลซอร์โบสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มปริมาณโปรตีนได้สูงสุด 38 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Chen และ Wayman, 1992) แต่จากผลการทดลองใน *P. ostreatus* DOA 10 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลซอร์โบสให้ผลการเหนี่ยวนำในระดับสูงที่สุด อาจเป็นเพราะน้ำตาลซอร์โบสมีผลต่อการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucan synthetase ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์เชื้อราทำให้มีการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมามากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ด้วย (Kubicek *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าหากมีการใช้น้ำตาลไซโลสร่วมกับไซแลนหรือเมทิลบีต้า-ไซโลไซด์ (methyl β -xyloside) จะให้การเหนี่ยวนำในระดับที่สูงกว่าการใช้สารเหล่านี้เพียงชนิดเดียว (Li *et al.*, 2000) และเมื่อเปรียบเทียบผลการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างจากการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนจากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 (จารุวรรณ, 2548) คือน้ำตาลซอร์โบสสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสได้ดีที่สุด รองลงมาคือฟรุกโตสและเอวิเซล ในขณะที่เอนไซม์ไซแลนจะถูกผลิตออกมาสูงที่สุดในอาหารที่มีเอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และไม่พบว่ามีกรเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนในอาหารที่มีซอร์โบสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นเมื่อพิจารณาในภาพรวมของการเหนี่ยวนำเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดคือเอนไซม์ไซแลนและเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส จึงกล่าวได้ว่าเอวิเซลเป็นสารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด ถึงแม้ว่าน้ำตาลซอร์โบสจะสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสได้สูงกว่าเอวิเซล แต่เมื่อดูในภาพรวมน้ำตาลซอร์โบสไม่เหมาะสมจะใช้เหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน เนื่องจากน้ำตาลซอร์โบสเหนี่ยวนำเฉพาะการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสแต่ไม่เหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซแลน ซึ่งแตกต่างจากเอวิเซลที่สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 2 ชนิด



ภาพที่ 13 ระดับการเหนียวนำของสารเหนียวนำชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของ *P. ostreatus* DOA 10 ในวันที่ 1 (▨) วันที่ 2 (□) และวันที่ 3 (■) หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารเหนียวนำชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

จากสมบัติของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และเอนไซม์ไซลานเนส (จารูวรรณ, 2548) ที่ได้ศึกษาในรูปแบบสารสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ความเสถียรของเอนไซม์ รูปแบบการผลิตเอนไซม์และการเหนียวนำการผลิตเอนไซม์ ซึ่งทำให้สามารถนำเอนไซม์ไปใช้งานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่การศึกษาในลักษณะที่เป็น crude enzyme อาจมีข้อเสีย คือ สมบัติบางอย่างที่ได้ อาจไม่ได้เป็นผลจากเอนไซม์เพียงชนิดเดียว แต่มีการเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดอื่นด้วย ซึ่งอาจเป็นการส่งเสริมหรือยับยั้งก็ได้ ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานที่แท้จริง จึงได้ศึกษาในรูปแบบเอนไซม์บริสุทธิ์และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะกลไกการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง จะพบว่าเอนไซม์ไซลานเนส เป็นเอนไซม์หลักที่ใช้ในการย่อยสลายโครงสร้างไซแลน เนื่องจากมีลักษณะการทำงานแบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย ดังนั้นจึงได้ทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซลานเนสบริสุทธิ์ที่ได้

6. การทำเอนไซม์ไซลานเนสจาก *P. ostreatus* DOA 10 ให้บริสุทธิ์

6.1 การศึกษาเบื้องต้นในการทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์

ในการศึกษาเบื้องต้นได้ทำการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยเลือกใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุซึ่งเป็นการแยกโปรตีนตามความแรงของประจุโดยใช้เมทริกซ์ 2 ชนิดคือ Q Sepharose และ Q Source เพื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์และผลได้ โดยใช้คอลัมน์ขนาด 1.0×10 เซนติเมตรและทำให้สมดุลด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ชะโปรตีนที่เกาะกับเมทริกซ์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ใส่ตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากการทำอัลตราฟิลเตรชันปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ และทำการเก็บตัวอย่างหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4 เมื่อใช้ Q Source เป็นเมทริกซ์เอนไซม์ไซลานเนสมีกิจกรรมจำเพาะและผลได้ในระดับที่สูงกว่าการใช้ Q Sepharose เป็นเมทริกซ์ ดังนั้นจึงเลือกใช้ Q Source ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยอาศัยสมบัติความแตกต่างของประจุแล้วต่อมานำเอนไซม์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยอาศัยสมบัติความแตกต่างของขนาดโปรตีนด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันโดยใช้ Sephacryl S200 ซึ่งสามารถแยกขนาดโปรตีนได้ในช่วงกว้างคือ 5-250 กิโลดาลตัน ในคอลัมน์ขนาด 1.0×80 เซนติเมตร ทำให้อยู่ในสมดุลด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 แต่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากความเข้มข้นของโปรตีนที่ออกจากคอลัมน์ Q Source นั้นมีความเข้มข้นต่ำมากคือ 2.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงต้องทำให้เข้มข้นขึ้นถึง 100 เท่า ซึ่งในการแยกโปรตีนด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันควรจะใช้ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 10-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Scopes, 1987) และจากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้นโปรตีนต่ำสุด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรก็สามารถใช้คอลัมน์เจลฟิลเตรชันในการแยกขนาดโปรตีนได้ ดังนั้นหลังจากทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันแล้วจึงทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันและโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ตามลำดับ

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการใช้ Q Sepharose และ Q Source เป็นเมทริกซ์ในการทำเอนไซม์
ไซลานเนสให้บริสุทธิ์

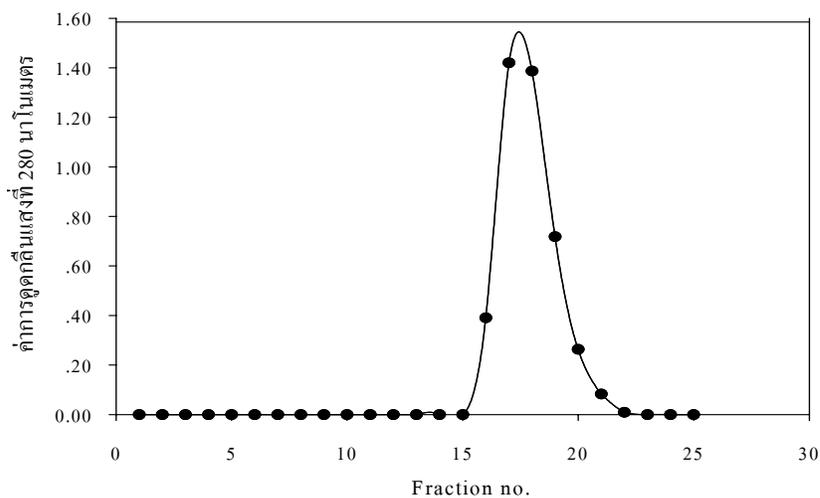
ขั้นตอนการทำ ให้เอนไซม์ บริสุทธิ์	ปริมาตร ทั้งหมด (มล.)	กิจกรรม เอนไซม์ ทั้งหมด (ยูนิต)	ปริมาณ โปรตีน ทั้งหมด (มก.)	กิจกรรมเอนไซม์ จำเพาะ (ยูนิตต่อ มก. โปรตีน)	ความ บริสุทธิ์ (เท่า)	ผลได้ (%)
Crude	600	73.8	71.4	1.033	1	100
Ultrafiltration	200	47.6	44.8	1.063	1.029	64.49
Anion exchange (Q sepharose)	500	3	0.7	4.2	4.0	4.1
Anion exchange (Q Source)	500	6	1.02	6	6	8.1

6.2 การใช้อัลตราฟิลเตรชันในการทำเอนไซม์ให้เข้มข้นและบริสุทธิ์

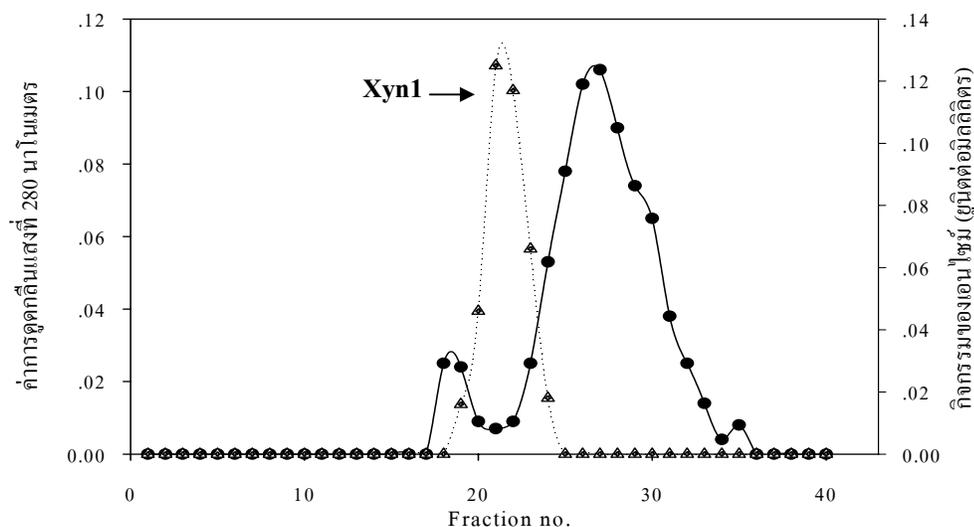
คัดแยกกำจัด โปรตีนบางส่วนจากสารละลายเอนไซม์ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้แผ่นกรองที่มีค่า molecular weight cutoff เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน เนื่องจากเมื่อสืบค้นเอกสารแล้วพบว่าเอนไซม์ไซลานเนสในซีรัมมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20 กิโลดาลตัน (ตารางที่ 1) ไปจนถึง 253 กิโลดาลตัน (Anthony *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงได้เลือกใช้แผ่นกรองขนาด 10 กิโลดาลตันเพื่อกำจัดโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าเอนไซม์ไซลานเนสออกไป จากนั้นวิเคราะห์ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสในส่วนที่เป็น retentate และ filtrate พบว่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ไซลานเนสในส่วนที่เป็น retentate มีค่าเท่ากับ 82.15 ยูนิต โดยมีค่าผลได้เท่ากับ 30.09 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ไป 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิดจากการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์บางส่วนไปอยู่ในส่วนที่เป็น filtrate โดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 18.05 ยูนิตและผลได้เท่ากับ 6.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 54 เปอร์เซ็นต์เกิดจากการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ในระหว่างการทำอัลตราฟิลเตรชัน เนื่องจากใช้เวลาในการทำอัลตราฟิลเตรชันประมาณ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้เอนไซม์บางส่วนที่ติดอยู่กับแผ่นกรองและไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ดังนั้นจึงสูญเสียไปขณะทำความสะอาดแผ่นกรอง

6.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เจลฟิเตรชัน (gel filtration)

แยกขนาดโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ด้วยวิธีเจลฟิเตรชัน โดยใช้ตัวกลางในการแยกเป็น Sephacryl S200 ในคอลัมน์ขนาด 1×80 เซนติเมตร วัดปริมาตรของช่องว่างระหว่างเม็ดเจล (void volume) ด้วย blue dextran มีปริมาตรเท่ากับ 69 มิลลิลิตร ดังภาพที่ 14 จากนั้นใส่สารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้น 20 เท่าจากการทำอัลตราฟิเตรชัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์เจลฟิเตรชัน เก็บตัวอย่างสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 3.75 มิลลิลิตร พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในหลอดที่ 19-24 ให้ชื่อว่า Xyn1 ดังภาพที่ 15 โดยแสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลานเอส 13.71 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน มีผลได้ 7.38 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 39.17 เท่า ดังตารางที่ 5



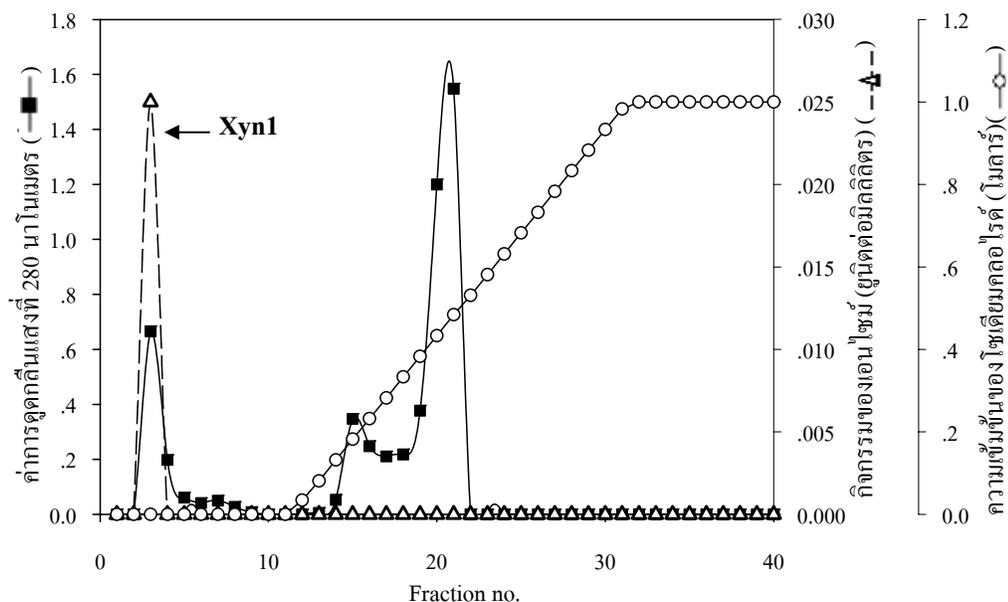
ภาพที่ 14 บลูเดกซ์แทรนเมื่อผ่านคอลัมน์เจลฟิเตรชัน โดยมี Sephacryl S200 เป็นตัวกลางในคอลัมน์ขนาด 1×80 เซนติเมตร ทำให้สมดุลด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ที่อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเก็บตัวอย่างหลอดละ 3.75 มิลลิลิตร



ภาพที่ 15 รูปแบบของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เมื่อผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน โดยมี Sephacryl S200 เป็นตัวกลาง ในคอลัมน์ขนาด 1×80 เซนติเมตร ทำให้สมดุลด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ที่อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อ ชั่วโมงเก็บตัวอย่างหลอละ 4.5 มิลลิลิตร (—●— ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ...▲... กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส)

6.4 การทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ (anionexchange)

นำเอนไซม์ Xyn1 ที่ได้จากเจลฟิลเตรชันปริมาตร 2 มิลลิลิตรไปทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบที่มี Q source เป็นตัวกลาง พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในหลอดที่ 3 และเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่เกาะกับตัวกลาง ดังภาพที่ 16 โดยแสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 85.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และผลได้ 1.92 เปอร์เซ็นต์ ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 16 รูปแบบของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนส เมื่อผ่านคอลัมน์

แลกเปลี่ยนประจุลบ โดยมี Q Source เป็นตัวกลาง ในคอลัมน์ขนาด 1.6×10 เซนติเมตร ทำให้สมดุลด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ที่อัตราการไหล 180 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ที่เพิ่มขึ้นแบบเส้นตรงในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน)

ตารางที่ 5 การทำเอนไซม์ไซลันเนสจาก *P. ostreatus* DOA 10 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำ ให้เอนไซม์ บริสุทธิ์	ปริมาตร ทั้งหมด (มล.)	กิจกรรม เอนไซม์ ทั้งหมด (ยูนิต)	ปริมาณโปรตีน ทั้งหมด (มก.)	กิจกรรมเอนไซม์ จำเพาะ (ยูนิตต่อ มก. โปรตีน)	ความ บริสุทธิ์ (เท่า)	ผลได้ (%)
Crude	1000	273	759	0.35	1	100
Ultrafiltration	50	82.15	50	1.643	4.69	30.09
Gel filtration	210	20.16	1.47	13.71	39.17	7.38
Anion exchange	200	8	0.094	85.10	243	1.92

จากตารางที่ 5 เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน เจลฟิลเตรชัน และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ พบว่าเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 243 เท่าเมื่อเทียบกับสารละลายเอนไซม์โดยแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 85.10 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน และมีค่าผลได้เท่ากับ 1.92 เปอร์เซ็นต์ อาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่ได้จากการทดลองมีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปศึกษาต่อไป เนื่องจากมีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะและค่าความบริสุทธิ์อยู่ในระดับที่สูง ซึ่งแสดงว่าโปรตีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเป็นหลัก

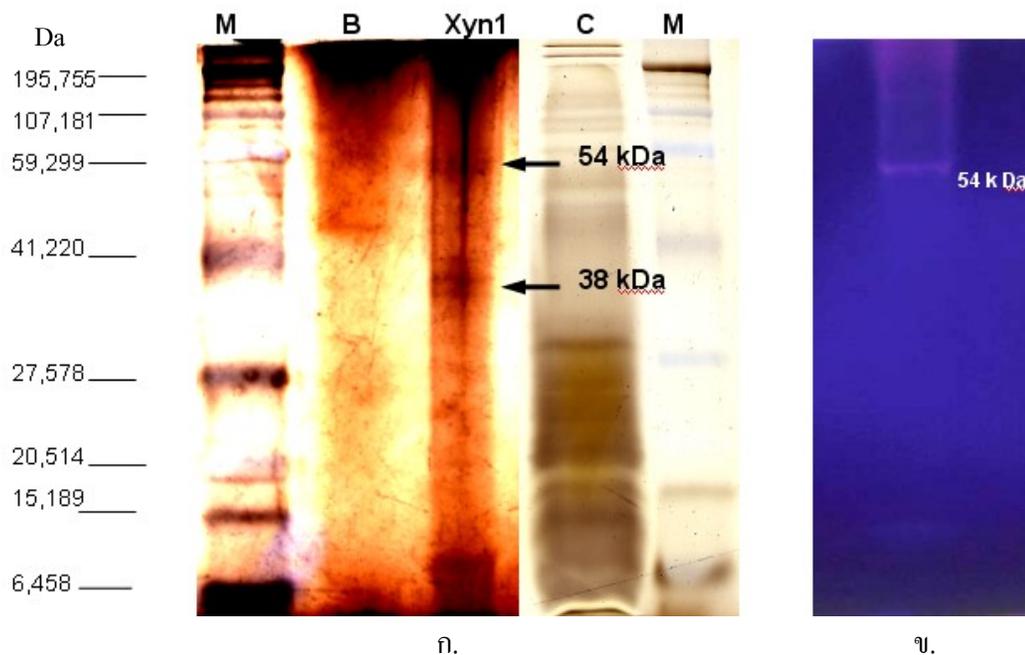
จากการทดลองของ Kimura *et al.* (1995) ซึ่งทำเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Aspergillus sojae* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันและการแลกเปลี่ยนประจุลบ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 69.5 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน และค่าผลได้ 5 เปอร์เซ็นต์ การทดลองของ Cardoso และ Filho (2003) ซึ่งศึกษาเอนไซม์ไซลานเนสที่บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Acrophialophora nainiana* โดยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุลบและการทำเจลฟิลเตรชัน พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 31.25 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 22.12 เท่า และผลได้ 19.178 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์ไซลานเนสที่บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Penicillium capsulatum* หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ คอลัมน์ไฮโดรโไฟบิก และการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมจำเพาะสูงถึง 761.06 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.03 เท่าและผลได้ 17.96 เปอร์เซ็นต์ (Ryan *et al.*, 2003) ในรายงานของ Silva *et al.* (1999) ซึ่งได้ศึกษาเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* Fresenius ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันและการแลกเปลี่ยนประจุลบ พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะ 7.10 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.32 เท่าและผลได้ 0.26 เปอร์เซ็นต์

7. สมบัติของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1

7.1 ทดสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE และ Zymogram

ทดสอบน้ำหนักโมเลกุลเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการคัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) ในภาคผนวก ข ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17 พบว่ามีแถบโปรตีน 2 แถบที่อยู่ในส่วนของเอนไซม์ Xyn1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 54 กิโลดาลตันและ 38 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 17ก) เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพผนวก ข3) ดังนั้นเพื่อต้องการทราบว่าโปรตีนใดที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส จึงได้ทดสอบด้วยวิธี Zymogram โดยการนำแผ่นเจลที่

ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จแล้ววางลงบนเจลอีกแผ่นหนึ่งที่มีไซแลนผสมอยู่ แล้วสังเกตโซนในสซึ่งแสดงว่ามีการย่อยสับสเตรท คือ ไซแลน



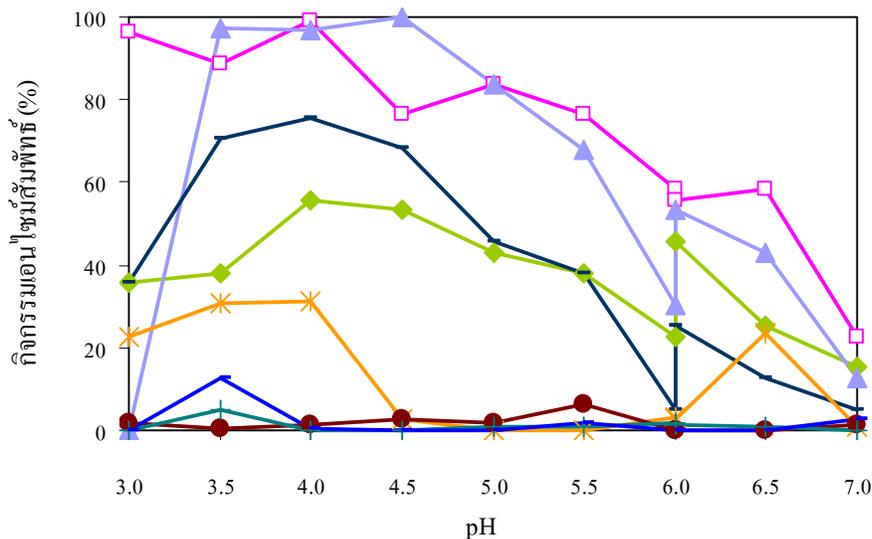
ภาพที่ 17 การทำ SDS-PAGE (ก) และ Zymogram (ข) ของเอนไซม์ไซแลเนส Xyn1 โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน, B คือ บัฟเฟอร์, Xyn1 คือ เอนไซม์ไซแลเนสบริสุทธิ์ และ C คือ สารสกัดเอนไซม์

จากการทำ Zymogram พบว่ามีแถบของโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เพียง 1 แถบ คือ แถบโปรตีนที่มีขนาด 54 กิโลดาลตัน ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 38 กิโลดาลตันไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนส จึงสามารถสรุปได้ว่า เอนไซม์ไซแลเนสจากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 17 ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซแลเนสจาก *P. ostreatus* DOA 10 มีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซแลเนสที่พบในเชื้อราอื่นๆ เช่น เอนไซม์ไซแลเนสจากเชื้อรา *Chaetomium cellulolyticum* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57 กิโลดาลตัน (Baraznenok *et al.*, 1999) จากเชื้อรา *Acrophialophora nainiana* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 กิโลดาลตัน (Cardoso และ Filho, 2003) ส่วนเอนไซม์ไซแลเนสจากเชื้อรา *Humicola insolens* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน (Maheshwari *et al.*, 2000) แต่พบว่ามีขนาดแตกต่างจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* AR1 ที่มีการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้หลายรูปแบบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง คือ อยู่ในช่วง 212-253 กิโลดาลตัน (Anthony *et al.*, 2003) และในแบคทีเรีย

เช่น เอนไซม์ไซลานเนส จากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 22-45 กิโลดาลตัน (Yang *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1995; Archana และ Satynarayana, 2003; Lama *et al.*, 2004)

7.2 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1

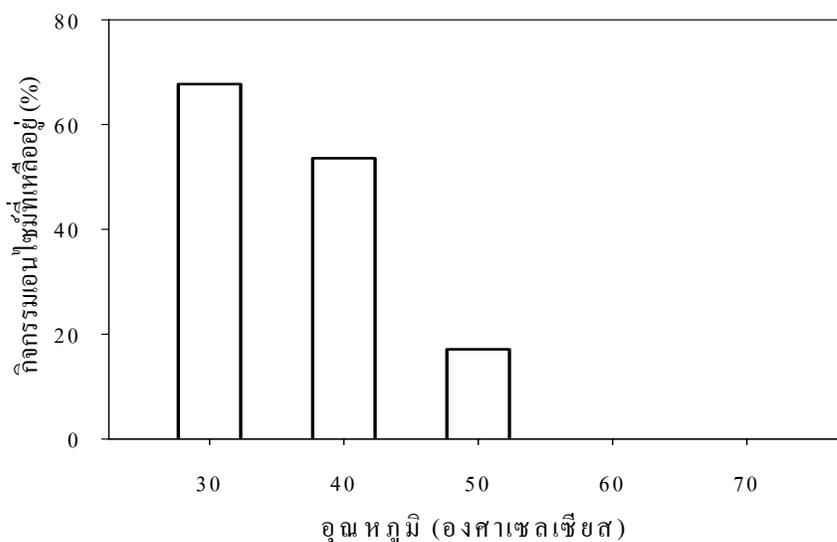
ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่ pH ต่างๆ พบว่าที่ทุกๆ อุณหภูมิเส้นกราฟเป็นรูปประฆังคว่ำและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ pH ในช่วง 3.5-4.5 แต่แตกต่างกันที่ระดับของกิจกรรมเอนไซม์ กล่าวคือที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 แสดงกิจกรรมสูงสุดโดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 96.95-100 เปอร์เซ็นต์ (แสดงกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.039 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคืออุณหภูมิ 40, 50 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนั้นเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 4.0 และลดลงอย่างรวดเร็วที่ pH 4.5 และเอนไซม์แสดงกิจกรรมในระดับต่ำมากที่อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 18 เมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 เมื่ออยู่ในรูปของสารสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) และเอนไซม์ไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานไม่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ไซลานเนสที่เป็นสารสกัดเอนไซม์แสดงกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส แต่มีความแตกต่างกันตรง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ อยู่ในช่วง pH 5.0-5.5 (จรรูวรรณ, 2548) ผลการทดลองที่ได้แตกต่างกันเล็กน้อยกับการทดลองของ Neto และ Filho (2004) ซึ่งศึกษาเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Humicola grisea* var. *Thermoidea* และพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ในช่วงกว้างคือ 4.5-6.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Saha (2002) พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Fusarium proliferatum* แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและ pH 5.0-5.5 เช่นเดียวกับเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* Fresenius ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและ pH 5.5 (Silva *et al.*, 1999) และมีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับเอนไซม์จากเชื้อรา *Humicola insolens* ที่มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่สุดที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียสและ pH 6.0-6.5 (Dusterhoft *et al.*, 1997) นอกจากนี้ในเชื้อราบางชนิด เช่น *A. fumigatus* MKU1 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 90 องศาเซลเซียสและ pH 5.0 (Thiagarajan *et al.*, 2006)



ภาพที่ 18 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่อุณหภูมิ 35(◆) 40(□) 45(▲) 50(●) 55(*) 60(●) 65(●) 70(●) องศาเซลเซียส

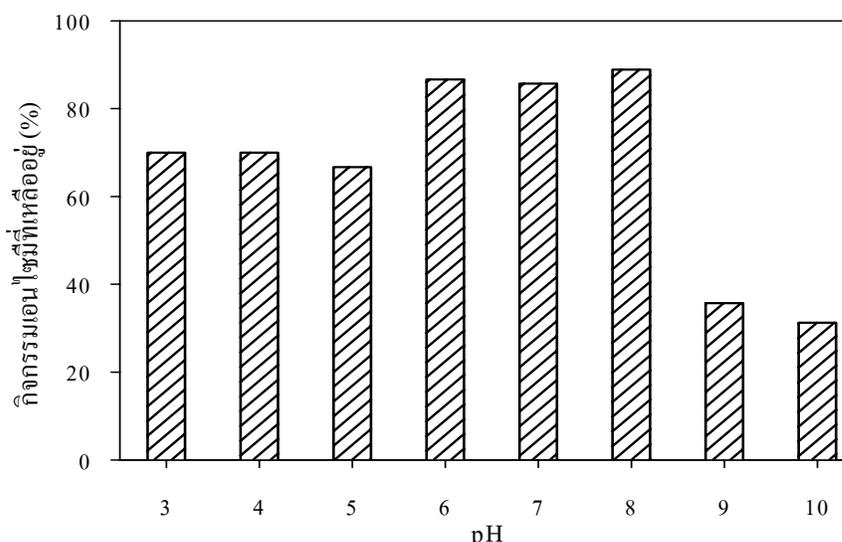
7.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่อุณหภูมิในช่วง 30-70 องศาเซลเซียส และ pH 3.0-10.0 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่เทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม พบว่าเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส โดยแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ 54-68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือเพียง 17 เปอร์เซ็นต์และที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียสเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 สูญเสียกิจกรรมทั้งหมด ดังภาพที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่บริสุทธิ์กับ crude enzyme จากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 (จารูวรรณ, 2548) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน คือ มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 จากผลการทดลองที่ได้กับเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *A. pullulans* Y-2311-1 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส และกิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (Li *et al.*, 1993) ในขณะที่เอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Humicola grisea* var. *Thermoidea* มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียสโดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มนาน 5 ชั่วโมง (Neto และ Filho, 2004)



ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซลาลเนส Xyn1

เมื่อพิจารณาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซลาลเนส Xyn1 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่สารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ไซลาลเนส Xyn1 มีความเสถียรอยู่ในช่วง pH 3.0-8.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่มากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์และที่ pH 9.0 และ pH 10.0 มีกิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่ 30 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 20 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไซลาลเนส Xyn1 มีความเสถียรในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง เมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ไซลาลเนสที่เป็น crude enzyme กับไซลาลเนส Xyn1 ที่บริสุทธิ์ที่ pH ต่างๆ พบว่าไม่แตกต่างกัน คือมีความเสถียรในช่วง pH 4.0-8.0 (จารูวรรณ, 2548) และมีความสอดคล้องกับเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* AR1 ที่มีความเสถียรอยู่ในช่วง pH ที่กว้าง คือ 4.0-9.0 โดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ 95 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที (Anthony *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไซลาลเนสจาก *Paecilomyces thermophila* ที่มีความเสถียรในช่วง pH 4.5-11.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Li *et al.*, 2006) แต่ในเชื้อราบางชนิดพบว่าเอนไซม์ไซลาลเนสที่ผลิตออกมามีความเสถียรในช่วง pH ที่แคบ เช่น *A. niger* ซึ่งพบว่าผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสที่มีความเสถียรในช่วง pH 5.0-6.0 (Frederick *et al.*, 1985)



ภาพที่ 20 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

7.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ต่อสับสเตรท

ผลการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ ไซแลนจาก oat spelt ไซแลนจาก birchwood ไซแลนจาก larchwood คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เอวิเซล โลคัส บีนกัม และ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside แสดงในตารางที่ 6 พบว่าเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 มีความจำเพาะกับสับสเตรทที่เป็นไซแลน โดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์ต่อไซแลนจาก birchwood ไซแลนจาก oat spelt และไซแลนจาก larchwood เท่ากับ 100, 92 และ 78 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่ามีความจำเพาะต่อเซลลูโลสที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและเอวิเซลในระดับต่ำ คือ 5 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่แสดงกิจกรรมต่อโลคัสบีนกัม ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์แมนนานเนส และ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเคส ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับเอนไซม์ไซลานเนสจากแบคทีเรีย *Clostridium absonum* CFR-702 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ xylanase-I มีความจำเพาะกับสับสเตรทที่เป็นไซแลน โดยแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไซแลนจาก birchwood สูงที่สุด รองลงมาคือ ไซแลนจาก larchwood และไซแลนจาก oat spelt และไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่เป็นเซลลูโลส และ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (Rani และ Nand, 2001) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Aspergillus caespitosus* ที่พบกิจกรรมเอนไซม์กับสับสเตรทที่เป็นไซแลนจาก birchwood และไซแลนจาก oat spelt แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่เป็นเซลลูโลสและ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (Sandrim *et al.*,

2005) และคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไซลานเนสบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *Bacillus halodurans* S7 ที่มีกิจกรรมต่อไซเลนจาก birchwood สูงที่สุดและไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่เป็นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและเอวิเซล (Mamo *et al.*, 2006)

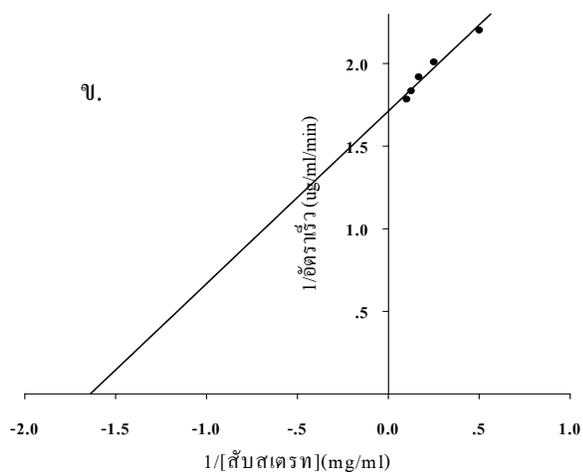
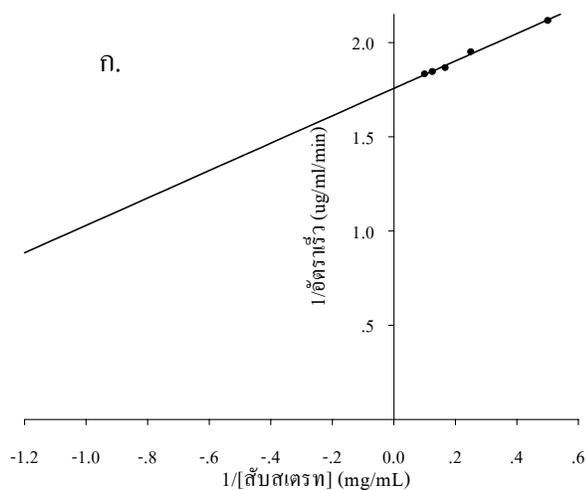
การที่เอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไซเลนจาก birchwood สูงกว่าไซเลนจาก oat spelt อาจเป็นเพราะโครงสร้างของไซเลนจาก birchwood เป็นโครงสร้างที่ละลายน้ำได้เนื่องจากมีหมู่อะซิetylจำนวนมาก ทำให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้รวดเร็วกว่าไซเลนจาก oat spelt ที่โครงสร้างมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำได้และไม่ละลายน้ำ และจากการที่เอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ไม่แสดงกิจกรรมต่อสับสเตรทที่เป็นเซลลูโลส โลกัสบีนกัมซึ่งมีโครงสร้างเป็นแมนแนน และ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside แสดงว่าเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แมนแนนส และเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส

ตารางที่ 6 ความจำเพาะของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 จาก *P. ostreatus* DOA 10 ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ

สับสเตรท	กิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์ (%)
ไซเลนจาก birchwood (กลูคูโรโนไซเลน)	100
ไซเลนจาก oat spelt (อะราบีโนไซเลน)	92
ไซเลนจาก larchwood (กลูคูโรโนอะราบีโนไซเลน)	78
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	5
เอวิเซลเซลลูโลส	0.2
โลกัสบีนกัม (กาแลคโตแมนแนน)	0
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	0

7.5 สมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1

หาค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) และค่าอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับสับสเตรท 2 ชนิด คือ ไซเลนจาก oat spelt (อะราบีโนไซเลน) และไซเลนจาก birchwood (กลูคูโรโนไซเลน) จากการคำนวณและเขียนกราฟด้วยสมการของ Lineweaver-Burk plots ทำให้ทราบค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ต่อสับสเตรท ดังภาพที่ 21 และตารางที่ 7



ภาพที่ 21 แสดงกราฟ Lineweaver-Burk plots ของเอนไซม์ไซลันเนส Xyn1 ต่อซับสเตรท โดย ก. คือ ไซเลนจาก oat spelt และ ข. คือ ไซเลนจาก birchwood

ตารางที่ 7 ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลันเนส Xyn1

ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์	ซับสเตรท	
	ไซเลนจาก oat spelt	ไซเลนจาก birchwood
Michaelis-Menten constant (K_m) (mg/ml)	0.4139	0.6101
Maximum velocity (V_{max}) ($\mu\text{g/ml/min}$)	0.5693	0.5843

จากผลการทดลองพบว่าค่า K_m ของเอนไซม์ไซลาลเนส Xyn1 ต่อสับสเตรทที่เป็นไซแลนจาก oat spelt และไซแลนจาก birchwood มีค่าเท่ากับ 0.4139 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.6101 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า V_{max} เท่ากับ 0.5693 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที และ 0.5843 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ แสดงว่า V_{max} หรืออัตราเร็วสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาลเนส Xyn1 ต่อสับสเตรททั้ง 2 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ค่า K_m ซึ่งแสดงถึงความเข้มข้นของสับสเตรทที่จะทำให้เอนไซม์เกิดการดำเนินงานนั้นต่างกัน โดยพบว่าค่า K_m ของเอนไซม์ต่อไซแลนจาก oat spelt มีค่าต่ำกว่าไซแลนจาก birchwood ซึ่งหมายความว่าเอนไซม์ไซลาลเนส Xyn1 มีความสามารถในการจับ (affinity) กับไซแลนจาก oat spelt ได้ดีกว่าไซแลนจาก birchwood ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากการที่โครงสร้างของไซแลนจาก oat spelt มีความซับซ้อนและแน่นน้อยกว่าโครงสร้างของไซแลนจาก birchwood ทำให้การเข้าจับกับเอนไซม์เป็นไปได้ง่ายกว่า ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับ เอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อรา *Penicillium capsulatum* ที่พบว่ามีค่า K_m ต่อไซแลนจาก oat spelt และไซแลนจาก birchwood เท่ากับ 7.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 25.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า V_{max} เท่ากับ 15.89 และ 19.23 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ (Ryan *et al.*, 2003) แต่มีความแตกต่างกับเอนไซม์ไซลาลเนสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. SG 13 ที่พบว่ามีค่า K_m ต่อไซแลนจาก oat spelt และไซแลนจาก birchwood เท่ากับ 7.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า V_{max} เท่ากับ 55 และ 90 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ (Gupta *et al.*, 2000)

จากการทำเอนไซม์ไซลาลเนสให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซลาลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ รวมถึงความจำเพาะต่อสับสเตรทและค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อการที่จะนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ โดยในการเลือกที่จะใช้เอนไซม์ในรูปแบบที่เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์หรือสารสกัดเอนไซม์นั้น ควรพิจารณาถึงการนำไปใช้งานว่าต้องการความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด เพื่อให้เหมาะสมกับงาน คุ่มค่าและได้ประโยชน์สูงสุด

สรุป

เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* DOA 10 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH ที่เป็นกรดอ่อน คือ 5.0-5.5 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและ pH ในช่วง 4.0-5.5 เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง การผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสของ *P. ostreatus* DOA 10 ในระหว่างการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้เอมิเชลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดในวันที่ 7 โดยแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 1.248 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนการเจริญเติบโตของเห็ดนางรมเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีขี้เลื่อย พบว่าในช่วงที่มีการเจริญของเส้นใย (วันที่ 0-20) และระยะแรกของช่วงที่มีการรวมตัวของเส้นใย (วันที่ 20-25) จะมีการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสสูงที่สุด โดยแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 0.055 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน การศึกษาผลของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสในสภาวะอาหารเหลวที่มีสารเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าน้ำตาลซอร์โบสเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำตาลฟรุคโตส และเอมิเชล

การทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันโดยใช้ Sephacryl S200 และการแลกเปลี่ยนประจุลบโดยใช้ Q Source เป็นตัวกลาง เอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่ได้จากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 243 เท่าและผลได้ 1.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Zymogram พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเห็ดนางรม *P. ostreatus* DOA 10 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 กิโลดาลตัน โดยที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ไซเลน (oat spelt) เป็นสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส และ pH 3.0-7.0 พบว่าเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและ pH 3.5-4.5 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและ pH ในช่วงกว้าง คือ pH 3.0-8.0 เอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 มีความจำเพาะกับสับสเตรทที่เป็นไซเลน โดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์ต่อสับสเตรท ได้แก่ ไซเลนจาก birchwood ไซเลนจาก oat spelt และไซเลนจาก larchwood แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสต่อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เอมิเชล โลคัสบีนกัมและ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) และอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ต่อสับสเตรท ได้แก่ ไซเลนจาก oat spelt และไซเลนจาก birchwood พบว่าค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 จาก *P. ostreatus* DOA 10 ต่อไซเลนจาก oat spelt มีค่าเท่ากับ 0.4139 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5693 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่ออนาที ตามลำดับ ในขณะที่

ที่ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลันเนส Xyn1 จาก *P. ostreatus* DOA 10 ต่อไซเลนจาก birchwood มีค่าเท่ากับ 0.6101 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5843 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จารุวรรณ สนมวัฒนะวงศ์. 2548. เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในเห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus* 10. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชมรมนักเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย. 2543. คู่มือการเพาะเห็ดนางฟ้า. ครั้งที่ 3. เกษตรบุ๊ค, กรุงเทพฯ.

ปัญญา โพธิ์รัฐรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ไร่เขียว, กรุงเทพฯ.

วสันต์ เพชรรัตน์. 2537. การผลิตเห็ด. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

อานนท์ เอื้อตระกูล. 2523. การเพาะเห็ดนางรม. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Andrade, S.V., M.L.T.M. Polizeli, H.F. Terenzi and J.A. Jorge. 2004. Effect of carbon source on the biochemical properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochem.** 39: 1931-1938.

Anthony, T., K.C. Raj, A. Rajendran and P. Gunasekaran. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 647-654.

Archana, A. and T. Satynarayana. 2003. Purification and characterization of a cellulase-free xylanase of moderate thermophile *Bacillus licheniformis* A99. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 19: 53-57.

- Baitaillon, M., A.P.N. Cardinali, N. Castillon and F. Duchiron. 2000. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 187-192.
- Baraznenok, V.A., E.G. Becker, N.V. Ankudimova and N.N. Okunev. 1999. Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. **Enzyme Microb. Technol.** 25: 651-659.
- Beg, Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan and G.S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial application: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 326-338.
- Bhattacharyya, S., S. Khowala, A. Kumar and S. Sengupta. 1997. Purification and Characterization of an extracellular β -xylosidase of *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnol. Progr.** 13: 822-827.
- Biely, P. and M. Tenkanen. 1998. Enzymology of hemicellulose degradation, pp. 25-48. In G.F. Harman and C.P. Kubicek, eds. **Trichoderma and Gliocladium Enzymes, Biological Control and Commercial Application.** Vol. 2. Tolyor and Francis, London.
- Biswas, S.R., A.K. Mishra and G. Nanda. 1988. Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. **Biotechnol. Bioeng.** 31: 613-616.
- Burla, G., A.M. Garzillo, M. Luna, L.E. Cardelli and A. Schiesser. 1990. Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresour. Technol.** 42: 89-94.

- Buswell, J.A., Y.J. Cai and S.T. Chang. 1993. Fungal- and substrate-associated factors affecting the ability of individual mushroom species to utilize different lignocellulosic growth substrates, pp. 114-150. *In* S.T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu, eds. **Mushroom Biology and Mushroom Products**. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Camacho, N.A. and O.G. Aguilar. 2003. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 104: 159-172.
- Cardoso, O.A.V. and E.X.F. Filho. 2003. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiol. Lett.** 223: 309-314.
- Carmona, E.C., M.R. Brochetto-Braga, A.A. Pizzirani-Kleiner and J.A. Jorge. 1998. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiol. Lett.** 166: 311-315.
- Chadha, B.S., B.K. Ajay, F. Mellon and M.K. Bhat. 2004. Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **J. Biotechnol.** 109: 227-237.
- Chang, S.T. 1993. Mushroom Biology: The impact on mushroom production and mushroom products, pp. 3-20. *In* S.T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu, eds. **Mushroom Biology and Mushroom Products**. The Chinese University Press, Hong Kong.
- _____. and P.G. Miles. 2004. **Mushroom Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact**. CRC Press, Florida.
- Chavez, R., K. Schachter, C. Navarro, A. Peirano, C. Aguirre, P. Bull and J. Eyzaguirre. 2002. Differences in expression of two endoxylanase genes (xynA and xynB) from *Penicillium purpurogenum*. **Gene** 293 (1-2): 161-168.

- Chen, S. and M. Wayman. 1992. Novel inducers derived from starch for cellulase production *Trichoderma reesei*. **Process Biochem.** 27: 327-334.
- Christakopoulos, P., W. Nerinckx, D. Kekos, B. Macris and M. Claeysens. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. **J. Biotechnol.** 51: 181-189.
- Christov, L.P. and B.A. Prior. 1993. Esterases of xylan-degrading microorganisms, production, properties and significance. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 460-475.
- Collins, T., C. Gerday and G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 3-23.
- Crepin, V.F., C.B. Fauld and I.F. Connerton. 2004. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 63 (6): 647-652.
- Debyser, W., G. Derdelinckx and J.A. Delcour. 1997. Arabinoxylan solubilization and inhibition of the barley malt system by wheat during mashing with wheat whole meal adjunct, evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** 55: 153-157.
- Deleyn, F., M. Claeysens, J. Van Beeumen and C.K. De Bruyne. 1978. Purification and properties of β -xylosidase from *Penicillium wortmanni*. **Can. J. Biochem.** 56: 43-50.
- Dervilly, G., C. Leclercq, D. Zimmerman, C. Roue, J.F. Thibault and L. Sauliner. 2002. Isolation and characterization of high molecular mass water-soluble arabinoxylans from barley malt. **Carbohydr. Polym.** 47: 143-149.
- Dusterhoft, E.-M., V.A.J.M. Linssen, A.G.J. Voragen and G. Beldman. 1997. Purification, characterization, and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. **Enzyme Microb. Technol.** 20: 437-445.

- Elisashvili, V., D. Chichua, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri and T. Khardziani. 2003. Lignocellulolytic enzyme activity during growth and fruiting of the edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq:Fr.) Kumm (Agaricomycetidae). **Int. J. Med. Mushr.** 4: 159-166.
- _____, H. Parlar, E. Kachlishvili, D. Chichua and G. Kvesitadze. 2001. Ligninolytic activity of basidiomycetes grown under submerged and solid-state fermentation on plant raw material (sawdust of grapevine cuttings). **Adv. Food Sci.** 23: 117-123.
- _____, M. Penninckx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli, T. Kharziani and G. Kvesitadze. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresour. Technol.** 99: 457-462.
- Espinar, M.F., F. Pinaga, L. Graaff, J. Visser, D. Ramon and S. Valles. 1994. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42: 555-562.
- Frederick, M.M., C. Kiang, J.R. Frederick and P.J. Reilly. 1985. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. **Biotechnol. Bioeng.** 27: 525-532.
- Fujimoto, H., T. Ooi, S.L. Wang, T. Takizawa, H. Hidaka, S. Murao and M. Arai. 1995. Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 59: 538-540.
- Georis, J., F. Giannotta, E. Buyl, B. Granier and J.M. Frere. 2000. Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulp. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 178-186.

- Ghanen, N.B., H.H. Yusef and H.K. Mahrouse. 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresour. Technol.** 73: 113-121.
- Ghareib, M. and M.M.N.E. Dein. 1992. Purification and general properties of xylanase from *Aspergillus terreus*. **Zentralbl. Mikrobiol.** 147: 569-576.
- Ghosh, M., R. Mukherjee and B. Nandi. 1998. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. **Acta Biotechnol.** 18 (3): 243-254.
- _____. and G. Nanda. 1994. Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49. **FEBS Microbiol. Lett.** 117: 151-156.
- Gupta, S., B. Bhushan and G.S. Hoondal. 2000. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **J. Appl. Microbiol.** 88: 325-334.
- Haltrich, D., B. Nidetzky, K.D. Kulbe, W. Steiner and S. Zupancic. 1996. Production of fungal xylanases. **Bioresour. Technol.** 58: 137-161.
- Harbak, L. and H.V. Thygesen. 2002. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food Chem. Toxicol.** 40: 1-8.
- Hashimoto, T. and Y. Nakata. 2003. Synergistic degradation of arabinoxylan with α -L-arabinofuranosidase, xylanase and β -xylosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition. **J. Biosci. Bioeng.** 95 (2): 164-169.
- Heck, J.X., L.H.B. Soares, P.F. Hertz and M.A.Z. Ayub. 2006. Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. **Biochem. Eng. J.** 32: 179-184.

- Hrmova, M., P. Biely and M. Vrsanska. 1986. Specificity of cellulase and b-xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. **Arch. Microbiol.** 144: 307-311.
- _____. 1989. Cellulose and xylan-degrading enzyme of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 11: 610-616.
- Iefuji, H., M. Chino, M. Kato and Y. Imura. 1996. Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning, ad sequencing. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60: 1331-1338.
- Ito, K., K. Iwashita and K. Iwano. 1992. Cloning and sequencing of the xyn C gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 56: 1338-1340.
- John, M., B. Schmidt and J. Schmidt. 1979. Purification and some properties of five endo-1,4- β -D-xylanases and a β -D-xylosidase produced by strain of *Aspergillus niger*. **Can. J. Biochem.** 57: 125-134.
- _____. and J. Schmidt. 1988. Xylanase and β -xylosidase of *Trichoderma lignorum*, pp. 662-671. In W.A. Wood and S.T. Kellogg, eds. **Methods in Enzymology**. Academic Press Inc., London.
- Jorgensen, H., T. Eriksson, J. Borjesson, F. Tjerneld and L. Olsson. 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 851-861.
- Kalogeris, E., P. Christakopoulos, D. Kekos and B.J. Macris. 1998. Studies on solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*. Characterization of two isozymes. **J. Biotechnol.** 60: 155-163.

- Kang, S.W., Y.S. Park, J.S. Lee, S.I. Hong and S.W. Kim. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 91: 153-156.
- Khanna, P., S.S. Sundari and N.J. Kumar. 1995. Production, isolation and partial purification of xylanase from an *Aspergillus* sp.. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 242-243.
- Kimura, I., H. Sasahara and S. Tajima. 1995. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **J. Ferment. Bioeng.** 80 (4): 334-339.
- Kimura, T., J. Ito, A. Kawano, T. Makino, H. Kondo, S. Karita, K. Sakka and K. Ohmiya. 2000. Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64: 1230-1237.
- Kiss, T. and L. Kiss. 2000. Purification and characterization of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 16: 465-470.
- Kitamoto, N., S. Yoshino, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi. 1999. Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, XynF1. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63(10): 1791-1794.
- Kormelink, F.J.M., M.G.F.S.L. Leeuwen, T.M. Wood and A.G.J. Voragen. 1993. Purification and characterization of three endo (1,4)- β -D-xylanase and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*. **J. Biotechnol.** 27: 249-253.
- Kubicek-Pranz, E.M., F. Gruber and C.P. Kubicek. 1991. Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase II gene as a means for obtaining strains with improved cellulose productivity and specific activity. **J. Biotechnol.** 20: 83-94.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Lama, L., V. Calandrelli, A. Gambacorta and B. Nicolaus. 2004. Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. **Res. Microbiol.** 155: 283-289.
- Lee, S.F. and C.W. Forsberg. 1987. Isolation and some properties of a β -D-xylosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Appl. Environ. Microbiol.** 53 (4): 651-654.
- Lembo, T, R.D. Silva, F.C. Pagnocca and E. Gomes. 2002. Production, characterization, and properties of B-glucosidase and B-xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. **Appl. Biochem. Microbiol.** 38 (6): 639-643.
- Lemos, J.L.S., E.P.S. Bon, M.F.E. Santana and N. Pereira Junior. 2000. Thermal stability of xylanase produced by *Aspergillus awamori*. **Braz. J. Microbiol.** 31: 206-211.
- Lenartovicz, V., C.G.M. Souza, F.G. Moreira and R.M. Peralta. 2003. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.** 38: 1775-1780.
- Li, L., H. Tian, Y. Cheng, Z. Jiang and S. Yang. 2006. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 780-787.
- Li, X.L., Z. Zhang, I.F.D. Dean, K.L. Eriksson and L.G. Ljungdahl. 1993. Purification and characterization of a new xylanase APX-II from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 3212-3218.

- Li, Y.K., H.J. Yao and Y.t. Cho. 2000. Effective induction, purification and characterization of *Trichoderma koningii* G-39 β -xylosidase with high transferase activity. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 31: 119-125.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Determination of protein with the Folin-Ciocalteu reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 256-270.
- Luo, X.C. 1993. Biology of artificial log cultivation of *Auricularia* mushrooms, pp. 129-132. In S.T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu, eds. **Mushroom Biology and Mushroom Products**. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj and M.K. Bhat. 2000. Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 461-488.
- Mamo, G., R.H. Kaul and B. Mattiasson. 2006. A thermostable alkaline active endo- β -1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: purification and characterization. **Enzyme Microb. Technol.** 39: 1492-1498.
- Matsuo, M. and T. Yasui. 1984. Purification and some properties of β -xylosidase from *Trichoderma viride*. **Agric. Biol. Chem.** 48: 1853-1860.
- Mishra, C., I.T. Forrester, B.D. Kelley, R.R. Burgess and G.F. Leatham. 1990. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33: 226-232.
- Monti, R., H.F. Terenzi and J.A. Jorge. 1991. Purification and properties of an extracellular xylanase from thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. **Can. J. Microbiol.** 37: 675-681.

- Nakamura, S., Y. Ishiguro, R. Nakai, K. Wakabayashi, R. Aono and K. Horikoshi. 1995. Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 1: 7-15.
- Neto, S.A.L. and E.X.F. Filho. 2004. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Braz. J. Microbiol** 35: 86-90.
- Niederpruem, D.J. 1963. Role of the carbon dioxide in the control of fruiting of *Schizophyllum commune*. **J. Bacteriol** 85: 1301-1308.
- Paice, M.G., N. Gurnagul, D.H. Page and L. Jurasek. 1992. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. **Enzyme Microb. Technol.** 14: 272-276.
- Peberdy, J.F., A.M. Hanifah and J.H. Jia. 1993. New perspectives on the genetics of *Pleurotus*, pp. 55-69. In S.T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu, eds. **Mushroom Biology and Mushroom Products**. The Chinese Univercity Press, Hong Kong.
- Polizeli, M.L.T.M., A.C.S. Rizzatti, R. Monti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge and D.S. Amorim. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67: 577-591.
- Pou-Llinas, J. and H. Driguez. 1987. D-xylose as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 27: 134-138.
- Price, N.C. and L. Stevens. 1984. **Fundamentals of Enzymology**. Oxford University Press, London.
- Puls, J. and J. Schuseil. 1993. Chemistry of hemicelluloses, relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis, pp. 1-27. In M.P. Coughland and G.P. Hazlewood, eds. **Hemicelluloses and Hemicellulases**. Portland Press, London.

- Puls, J. and K. Poutanen. 1989. Mechanism of enzymic hydrolysis of hemicelluloses xylans and procedures for determination of enzyme activity involved, pp. 151-153. *In* M.P. Conghla, ed. **Enzyme System for Lignocellulose Degradation**. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Qinnghe, C., Y. Xiaoyu, N. Tiangui, J. Cheng and M. Qiugang. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochem.** 39: 1561-1566.
- Rai, R.D. and S. Saxena. 1990. Extracellular enzymes non-structural components during growth of *Pleurotus sajor-caju* on rice straw. **Mushr. J. for the Tropics** 10: 69-73.
- Raj, K.C. and T.S. Chandra. 1996. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **FEMS Microbiol. Lett.** 1453: 457-461.
- Rani, S., D. and K. Nand. 2001. Purification and characterization of xylanolytic enzymes of a cellulase-free Thermophilic strain of *Clostridium absonum* CFR-702. **Anaerobe** 7: 45-53.
- Rawashdeh, R., I. Saadoun and A. Mahasneh. 2005. Effect of culture conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain lb 24D) and its potential to utilize tomato pomace. **Afr. J. Biotechnol.** 4 (3): 251-255.
- Rizzatti, A.C.S., V.C. Sandrim, J.A. Jorge, H.F. Terenzi and M.L.T.M. Polizeli. 2004. Influence of temperature on the properties of xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **J. Indian Microbiol. Biotech.** 31: 88-93.
- Royer, J.C. and J.P. Nakas. 1990. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56 (8): 2535-2539.

- Ryan, S.E., K. Nolan, R. Thompson, G.M. Gubitz, A.V. Savage and M.G. Tuohy. 2003. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsularium*. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 775-785.
- Saddler, J.N., E.K.C. Yu, M. Mes-Hartree, N. Levitin and H.H. Brownell. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicellulose by microorganism for production of liquid fuels. **Appl. Environ. Microbiol.** 45: 153-160.
- Saha, B.C. 2002. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochem.** 37: 1279-1284.
- Salles, B.C., R.B. Cunha, W. Fontes, M.V. Sousa and E.X.F. Filho. 2000. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **J. Biotechnol.** 81: 199-204.
- Sandrim, V.C., A.C.S. Rizzatti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge, A.M.F. Milagres and M.L.T.M. Polizeli. 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochem.** 40: 1823-1828.
- Sannia, G., A.P. Giardina, M. Luna, M. Rossi and V. Buonocore. 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnol. Lett.** 8: 797-800.
- Scopes, R.K. 1987. **Protein Purification Principles and Practice.** 2nd ed. Springer Verlag, New York.
- Segura, B.G., R. Durand and M. Fevre. 1998. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 164 (1): 47-53.
- Semple, K.T., B.J. Reid and T.R. Fermor. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environ. Pollut.** 112: 269-283.

- Silva, C.H.C., J. Puls, M.V. Sousa and E.X.F. Filho. 1999. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Rev. Microbiol.** 30: 114-119.
- Singh, S., P. Reddy, J. Haarhoff, P. Biely, B. Janse, B. Pillay, D. Pillay and B.A. Prior. 2000. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **J. Biotechnol.** 81: 119-128.
- Sung, W.L., C.K. Luk, B. Chan, W. Wakarchuk, M. Yaguchi, R. Campbell, G. Willick, K. Ishikawa and D.M. Zahab. 1995. Expression of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma viride* xylanases in *Escherichia coli*. **Biochem. Cell Biol.** 73 (5-6): 253-259.
- Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** 17 (1): 39-67.
- Tan, LUK, K Ku Wong, EKC Yu and JN Saddler. 1985. Purification and characterization of two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microb. Technol.** 7: 425-430.
- Taneja, K., S. Gupta and R.C. Kuhad. 2002. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. **Bioresour. Technol.** 85 (1): 39-42.
- Thiagarajan, S., M. Jeya and P. Gunasekaran. 2006. Purification and characterization of a high molecular weight endoxylanase from the solid-state culture of an alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* MKU1. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 487-492.
- Thomson, J.A. 1993. Molecular biology of xylan degradation. **FEMS Microbiol. Rev.** 104: 65-82.

- Tseng, M.J., M.N. Yap, K. Ratanakhanokchai, K.L. Kyu and S-T. Chen. 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 590-595.
- Tuncer, M. 2000. Characterization of β -xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities from *Thermomonospora fusca* BD25. **Turk. J. Biol.** 24: 753-767.
- Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sundquist and M. Linko. 1994. Xylanases in bleaching, from an idea to the industry. **FEMS Microbiol. Rev.** 13: 335-350.
- Voet, D. and J.G. Voet. 1990. **Biochemistry.** John Wilays and Sons, USA.
- Volk, T.J. 2003. *Pleurotus ostreatus*. Tom Volk's fungus of the month for october 1998.
Available Source: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/oct98.html, March 31, 2008.
- Vrsanska, M., K. Kolenova, V. Puchart and P. Biely. 2007. Mode of action of glycoside hydrolase family 5 glucuronoxylan xylanohydrolase from *Erwinia chrysanthemi*. **FEBS J. Lett.** 274: 1666-1677.
- Williamson, G., C.B. Faulds and P.A. Kroon. 1998. Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. **Biochem. Soc. Trans.** 26 (2): 205-209.
- Wood, T.M. and K.M. Bhat. 1988. Method for measuring cellulase activity, pp. 87-91. In W.A. Wood and S.T. Kellogg, eds. **Methods in Enzymology.** Vol. 160. Academic Press Inc., London.
- Yang, R.C.A., C.R. MacKenzie, D. Billows and A.S. Nearing. 1989. Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 568-574.

Zanoelo, F.F., M.L.T.M. Polizeli, H.F. Terenzi and J.A. Jorge. 2004. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J. Indian Microbiol. Biotech.** 31: 170-176.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mushroom Complete Medium (MCM)

Glucose	20	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Gelatin peptone	2	กรัม
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.46	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม

ปรับ pH 5.5 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mushroom Minimal Medium (MM medium)

Carbon source	10	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
Asparagine	0.68	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1	กรัม
MnSO ₄ 4H ₂ O	0.008	กรัม
Zn(CH ₃ COO) ₂	0.003	กรัม
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.006	กรัม
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.003	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH 5.5 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

1.1.1 สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย x)

ละลายกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) 5.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.2 สารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย y)

ชั่ง โซเดียมอะซิเตท 13.608 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ

ผสมสารละลาย x และสารละลาย y (ข้อ 1.1.1 และ 1.1.2) ให้มีปริมาตรตามที่แสดงในตารางผนวกที่ ข1 แล้วนำไปปรับ pH ตามที่ต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ

pH	สารละลาย x (มิลลิลิตร)	สารละลาย y (มิลลิลิตร)
3.0	46.5	3.5
4.0	41.0	9.0
5.0	14.8	35.2

1.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

1.2.1 สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย x)

ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.799 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2.2 สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย y)

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 14.196 กรัม ละลายน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ

ผสมสารละลาย x และสารละลาย y (ข้อ 1.2.1 และ 1.2.2) ให้มีปริมาตรตามที่แสดงในตารางที่ ข2 แล้วนำไปปรับ pH ตามต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข2 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ

pH	สารละลาย x (มิลลิลิตร)	สารละลาย y (มิลลิลิตร)
6.0	87.7	12.3
7.0	39.0	61.0
8.0	5.3	94.7

1.3 การเตรียมสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 1.0 โมลาร์

ละลาย Tris base 121.4 กรัมในน้ำ 800 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 9.0 และ 10.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.4 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 2 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 105.99 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

1.5 การเตรียมสารละลายสับสเตรท

ชั่งไซแลนจาก oat spelt (Sigma, German) 1 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ส่วน *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใช้เป็นสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส เตรียมโดยชั่ง *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (Sigma, Germany) 6.78 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Wood และ Bhat, 1988)

2.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

2.1.1 Somogyi reagent I

ละลายโซเดียมซัลเฟต (ปราศจากน้ำ) (anhydrous Na_2SO_4) 288 กรัม ในน้ำอุ่น เดิมโซเดียม-โปแตสเซียมคาร์เตรท (Rochelle salt) 24 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต 48 กรัม โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) 32 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1600 มิลลิลิตร ด้วยน้ำร้อน เก็บที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

2.1.2 Somogyi reagent II

ละลายโซเดียมซัลเฟต (ปราศจากน้ำ) 288 กรัม ในน้ำอุ่น 300 มิลลิลิตร แล้วเติมคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 8 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 400 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

2.1.3 Nelson reagent

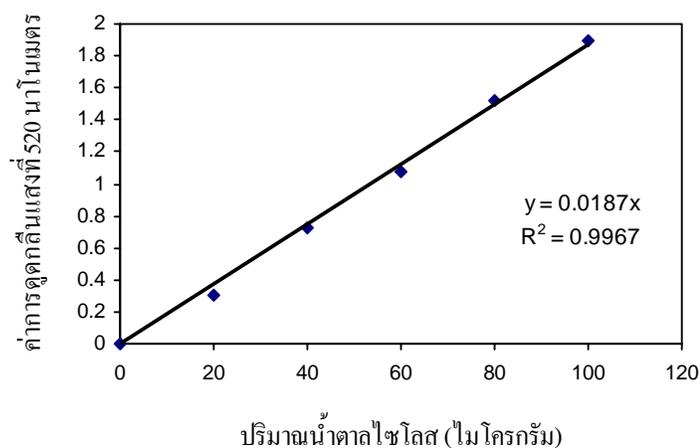
ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 100 กรัมในน้ำ 1800 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 84 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาร์เซเนต 12 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-48 ชั่วโมง ในขวดแก้วสีชา หลังจากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

2.2 วิธีทดสอบ

ผสมสารละลาย Somogyi reagent I และ Somogyi reagent II ในอัตราส่วน 4:1 แล้วเติมสารผสมนี้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Nelson reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลไซโลส

2.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลส

เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายผสมระหว่างสารละลาย Somogyi reagent I และ Somogyi reagent II ในอัตราส่วน 4:1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็น หลังจากนั้นเติมสารละลาย Nelson reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงเขียนกราฟปริมาณน้ำตาลมาตรฐาน ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข1



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี Somogyi-Nelson

3. การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

3.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

3.1.1 สารละลาย A

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3.1.2 สารละลาย B

ก. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 2 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลายโซเดียม-โปแตสเซียมคาร์เตรท 3.5 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายโซเดียม-โปแตสเซียมคาร์เตรท 3.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

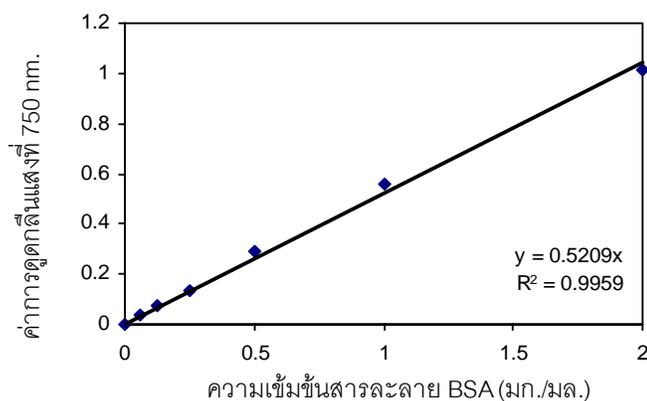
ในการนำมาทดสอบ ผสมสารละลายในข้อ ก. และ ข้อ ข. เข้าด้วยกัน โดยให้สารละลาย คอปเปอร์ซัลเฟตและสารละลายโซเดียม-โปแตสเซียมคาร์เตรท มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.2 วิธีทดสอบ

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 50:1 แล้วเติมสารผสมนี้ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่มีปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาทีที่ อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

3.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA, Sigma, Germany) มาตรฐาน ความเข้มข้น 2 1 0.5 0.25 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปิดสารละลาย BSA มาตรฐาน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายผสมระหว่างสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 50:1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร และนำค่า การดูดกลืนแสงที่ได้เขียนกราฟความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน ดังแสดงในภาพผนวก ที่ ข2



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry

4. อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

4.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

4.1.1 Acrylamide/Bis (30%T, 2.67%C): ชั่ง acrylamide 14.6 กรัม และ N'N'-bis-methylene-acrylamide 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

4.1.2 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8: ละลาย Tris-base 18.15 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 6N แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

4.1.3 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8: ละลาย Tris-base 6 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6N แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

4.1.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS): ชั่ง SDS 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

4.1.5 5X Running buffer, pH 8.3: ชั่ง Tris-base 6 กรัม ไกลซีน 43.2 กรัม และ SDS 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

4.1.6 Sample buffer: (เก็บที่อุณหภูมิห้อง) โดยวิธีเตรียมดังตารางผนวกที่ ข3

ตารางผนวกที่ ข3 การเตรียม sample buffer

สารเคมี	SDS-PAGE (มิลลิลิตร)	Native-PAGE (มิลลิลิตร)
Deionized water	9.5	14.5
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5	2.5
Glycerol	2.0	2.0
10% SDS	4.0	-
2-Mercaptoethanol	1.0	-
1%(w/v) bromophenol blue	1.0	1.0
Total	20	20

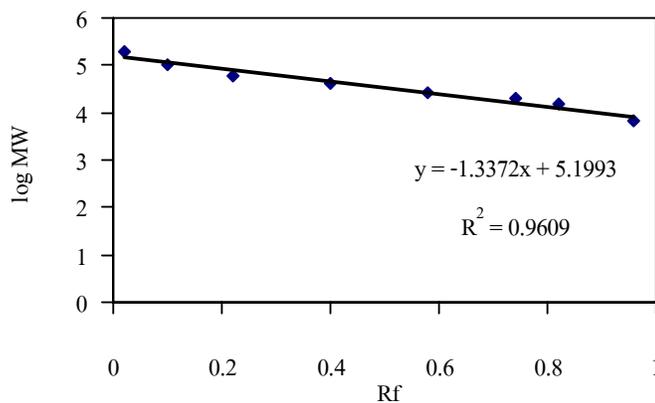
4.2 การเตรียม separating gel และ stacking gel โดยใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 10 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิธีเตรียมแสดงในตารางผนวกที่ ข4

ตารางผนวกที่ ข4 การเตรียมเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

สารเคมี	SDS-PAGE		Native-PAGE	
	10% (มล.)	4% (มล.)	10% (มล.)	4% (มล.)
Deionized water	3.52	12.2	3.72	12.4
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	5.0	-	5.0	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	5.0	-	5.0
10% SDS	0.2	0.2	-	-
Acrylamide/bis	4.9	2.66	4.9	2.66
TEMED	0.01	0.02	0.01	0.02
10% ammonium persulfate	0.05	0.20	0.05	0.2

4.3 การทำ SDS-PAGE

เตรียมเจลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางผนวกที่ ข4 โดยใช้ ammonium persulfate 10% (เตรียมก่อนใช้) และ TEMED เป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นเทเจลที่เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น separating gel ลงไประหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่น แล้วเทน้ำกลั่นปิดทับที่ผิวหน้า ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแข็งตัว แล้วจึงเทเจลเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น stacking gel ทับบนผิวหน้าของ separating gel ใส่หัวลงใน stacking gel และรอจนกระทั่งแข็งตัว นำหัวออก จะเกิดช่องสำหรับใส่สารตัวอย่าง โดยเตรียมตัวอย่างผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 ต้มเป็นเวลา 2-4 นาที เติมนลงในช่องใส่ตัวอย่างปริมาตร 10-15 ไมโครลิตร และใช้ความต่างศักย์ขนาด 100 โวลต์ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จ ย้อมเจลโดยใช้ silver stain plus kit (Bio-Rad, USA)



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

4.4 การทำ zymogram

เตรียมเจลเช่นเดียวกับการทำ SDS-PAGE ในหัวข้อ 4.2 แต่จะไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพอย่างถาวร โดยไม่มีการเติม 2-mercaptoethanol และไม่ผ่านการต้มในน้ำเดือด และเมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จ ล้าง SDS ออกและทำให้โปรตีนคืนสภาพ (renature) โดยการล้างเจลด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 นำเจลไปวางลงบนแผ่นเจลอีกแผ่นหนึ่งที่มีสับสเตรทผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์จนกระทั่งสีส่วนเกินถูกล้างออกไป แล้วเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ลงไป จะปรากฏบริเวณใสขึ้น

ภาคผนวก ก
ข้อมูลสืบจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ

pH	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)							
	30	35	40	45	50	55	60	70
4	0.0000	0.0124	0.00046	0.0345	0.0782	0.12006	0.4085	0.05152
	(0)	(2.4)	(0.1)	(6.9)	(15.6)	(23.9)	(81.4)	(10.4)
4.5	0.0000	0.0000	0.02576	0.04278	0.10626	0.16744	0.4278	0.00487
	(0)	(0)	(5.1)	(8.5)	(21.2)	(33.3)	(85.4)	(0.9)
5	0.0000	0.00966	0.023	0.0586	0.1127	0.22172	0.4977	0.03496
	(0)	(1.8)	(4.6)	(11.7)	(22.6)	(44.3)	(99.4)	(6.9)
5.5	0.0014	0.00828	0.02944	0.06486	0.13386	0.2346	0.5014	0.0626
	(0.2)	(3.6)	(5.8)	(12.9)	(26.7)	(46.8)	(100.0)	(12.6)
6	0.0000	0.00828	0.00982	0.02852	0.03128	0.06869	0.1771	0.02208
	(0)	(1.6)	(1.9)	(5.6)	(6.2)	(13.6)	(35.3)	(4.4)
6.5	0.01104	0.0000	0.00184	0.02576	0.0276	0.06136	0.1497	0.00552
	(2.2)	(0)	(0.4)	(4.9)	(5.4)	(12.2)	(29.7)	(1.2)
7	0.00506	0.0023	0.0138	0.0092	0.03082	0.06808	0.14214	0.03864
	(0.9)	(0.4)	(2.8)	(1.8)	(6.2)	(13.6)	(28.3)	(7.8)
7.5	0.0000	0.00138	0.01074	0.02254	0.0483	0.072036	0.1601	0.0092
	(0)	(0.3)	(2.2)	(4.6)	(9.6)	(14.4)	(31.9)	(1.8)
8	0.0046	0.0023	0.0000	0.0207	0.0046	0.0519	0.1219	0.00184
	(0.9)	(0.5)	(0)	(4.2)	(0.9)	(10.4)	(24.4)	(0.4)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์

ตารางผนวกที่ ค2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนส Xyn1 ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ

pH	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)							
	35	40	45	50	55	60	65	70
3	0.014	0.038	0	0.014	0.009	0.0008	0	0
	(35.53)	(96.44)	(0)	(35.53)	(22.84)	(2.03)	(0)	(0)
3.5	0.015	0.035	0.0384	0.0279	0.0122	0.0001	0.002	0.005
	(38.07)	(88.83)	(97.46)	(70.81)	(30.96)	(0.253)	(5.076)	(12.69)
4	0.022	0.0391	0.0382	0.0298	0.0123	0.0006	0	0.0001
	(55.83)	(99.24)	(96.95)	(75.63)	(31.22)	(1.52)	(0)	(0.25)
4.5	0.021	0.0302	0.0394	0.027	0.001	0.001	0	0
	(53.29)	(76.65)	(100)	(68.52)	(2.53)	(2.53)	(0)	(0)
5	0.017	0.033	0.0329	0.018	0	0.0008	0.0004	0
	(43.15)	(83.76)	(83.50)	(45.68)	(0)	(2.03)	(1.02)	(0)
5.5	0.015	0.0301	0.0267	0.015	0	0.0025	0.0004	0.0007
	(38.07)	(76.39)	(67.77)	(38.07)	(0)	(6.35)	(1.01)	(1.78)
6	0.009	0.023	0.012	0.002	0.00125	0	0.0007	0
	(22.84)	(58.37)	(30.46)	(5.08)	(3.17)	(0)	(1.77)	(0)
6.5	0.018	0.022	0.021	0.01	0.001	0	0.0006	0
	(45.68)	(55.84)	(53.29)	(25.38)	(2.54)	(0)	(1.52)	(0)
7	0.01	0.023	0.017	0.005	0.0093	0	0.0003	0
	(25.38)	(58.38)	(43.15)	(12.70)	(23.60)	(0)	(0.76)	(0)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์

ตารางผนวกที่ ค3 ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสที่ pH ต่างๆ

pH	กิจกรรมของเอนไซม์ ก่อนผ่านการบ่ม (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์หลัง บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 1 ชม. (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ที่ เหลืออยู่ (เปอร์เซ็นต์)
4	0.195	0.106	54.71
4.5	0.187	0.086	46.29
5	0.200	0.111	55.79
5.5	0.218	0.092	42.20
6	0.174	0.078	44.73
6.5	0.167	0.059	35.50
7	0.151	0.075	49.67
7.5	0.133	0.070	52.77
8	0.123	0.021	17.16

ตารางผนวกที่ ค4 ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่ pH ต่างๆ

pH	กิจกรรมของเอนไซม์ ก่อนผ่านการบ่ม (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์หลัง บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 1 ชม. (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ที่ เหลืออยู่ (เปอร์เซ็นต์)
3	0.010	0.007	70.00
4	0.010	0.007	70.00
5	0.012	0.008	66.67
6	0.015	0.013	86.67
7	0.014	0.012	85.71
8	0.009	0.008	88.89
9	0.014	0.005	35.71
10	0.016	0.005	31.25

ตารางผนวกที่ ค5 ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเนส และเอนไซม์ไซลานเนส Xyn1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

เอนไซม์	กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) หลังการบ่มที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) 1 ชม.					
	เริ่มต้น	30	40	50	60	70
บีต้า-ไซโลซิเนส	0.065 (100)	0.037 (56.3)	0.065 (99.9)	0.027 (41)	0.037 (56.3)	0.033 (50)
ไซลานเนส	0.032 (100)	0.021 (67.71)	0.017 (53.57)	0.005 (17.11)	0 (0)	0 (0)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่

ตารางผนวกที่ ๑๖ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และปริมาณโปรตีน ที่ขับออกนอกเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *P. ostreatus* DOA 10 ในอาหารเหลวที่มีเอมิเชลเป็นแหล่งคาร์บอน

วัน	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.312 ± 0.269	0.109 ± 0.049
2	0.209 ± 0.204	0.074 ± 0.046
3	0.171 ± 0.041	0.138 ± 0.052
4	0.205 ± 0.147	0.121 ± 0.056
5	0.363 ± 0.379	0.131 ± 0.055
6	0.189 ± 0.239	0.141 ± 0.057
7	1.248 ± 1.638	0.148 ± 0.128
8	0.467 ± 0.674	0.264 ± 0.057
9	0.316 ± 0.222	0.22 ± 0.033
10	0.130 ± 0.080	0.247 ± 0.072
11	0.152 ± 0.094	0.232 ± 0.108
12	0.051 ± 0.073	0.196 ± 0.133
13	0.193 ± 0.201	0.236 ± 0.107
14	0.082 ± 0.028	0.203 ± 0.144
15	0.331 ± 0.020	0.239 ± 0.109

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ๗ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส และปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *P. ostreatus* DOA 10 บนอาหารแข็ง

วัน	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
0	0.000 ± 0.000	0.925 ± 0.139
5	0.022 ± 0.015	0.474 ± 0.052
10	0.013 ± 0.015	0.804 ± 0.094
15	0.025 ± 0.027	0.837 ± 0.074
20	0.055 ± 0.035	0.812 ± 0.068
25	0.019 ± 0.003	0.979 ± 0.107
30	0.016 ± 0.006	1.044 ± 0.184
35	0.016 ± 0.007	0.967 ± 0.074
40	0.013 ± 0.006	1.490 ± 0.321
45	0.017 ± 0.006	1.131 ± 0.118
50	0.002 ± 0.004	0.889 ± 0.159

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ๘ ผลการทดสอบผลของสารเหนียวนำชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเนสจาก *P. ostreatus* DOA 10 ในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ชนิดสาร เหนียวนำ	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในวันที่					
	1	2	3	4	5	6
กลูโคส	0.2495±0.175	0.2694±0.140	0.3245±0.351	0.2299±0.030	0.2828±0.224	0.3694±0.031
ซอร์โบส	-	-	-	0.5341±0.208	1.1671±0.648	1.1671±0.221
ไซโลส	-	-	-	0.3822±0.143	0.3697±0.333	0.4346±0.117
เอวิเซล	-	-	-	0.5451±0.023	0.1161±0.086	0.3179±0.368
กาแลคโทส	-	-	-	0.2857±0.205	0.1887±0.074	0.1385±0.081
เซลโลไบโอส	-	-	-	0.1097±0.086	0.1814±0.217	0.000±0.000
แมนโนส	-	-	-	0.0708±0.123	0.1628±0.144	0.3289±0.201
ซีเอ็มซี	-	-	-	0.0376±0.065	0.4829±0.710	0.0469±0.081
ฟรุคโทส	-	-	-	0.8723±0.731	0.2624±0.282	0.1478±0.170
แลคโทส	-	-	-	0.000±0.000	0.0112±0.006	0.0096±0.006
ไซแลน	-	-	-	0.0155±0.008	0.0303±0.022	0.0398±0.037

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ๑๑ ปริมาณโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *P. ostreatus* DOA 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารเหนียวชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดสารเหนียว	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม) ในวันที่					
	1	2	3	4	5	6
กลูโคส	0.2204±0.080	0.2604±0.029	0.1439±0.038	0.2508±0.030	0.1452±0.038	0.0748±0.068
ซอร์บิต	-	-	-	0.371±0.080	0.176±0.071	0.201±0.060
ไซโลส	-	-	-	0.2403±0.034	0.1794±0.068	0.1708±0.039
เอวิเซล	-	-	-	0.0467±0.042	0.1036±0.009	0.0985±0.056
กาแลคโทส	-	-	-	0.2361±0.039	0.2789±0.047	0.2572±0.008
เซลโลไบโอส	-	-	-	0.1478±0.031	0.1112±0.011	0.1619±0.043
แมนโนส	-	-	-	0.0825±0.018	0.0646±0.028	0.1478±0.030
ซีเอ็มซี	-	-	-	0.1433±0.048	0.159±0.013	0.1567±0.057
ฟรุคโทส	-	-	-	0.1533±0.066	0.1136±0.043	0.0985±0.023
แลคโทส	-	-	-	0.2454±0.277	0.082±0.142	0.0633±0.109
ไซแลน	-	-	-	0.1644±0.016	0.1612±0.036	0.1689±0.051

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค10 ระดับการเหี่ยวนำของสารเหี่ยวนำชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไฮโดลิตีเอสของ *P. ostreatus* DOA 10 ในวันที่ 1 2 และ 3 หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารเหี่ยวนำเป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดสารเหี่ยวนำ	ระดับการเหี่ยวนำ (เท่า) ในวันที่		
	1	2	3
กลูโคส	0.708	0.871	1.138
ซอร์บิต	1.645	3.596	3.596
ไซโลส	1.177	1.139	1.339
เอวิเซล	1.679	0.357	0.979
กาแลคโทส	0.880	0.581	0.426
เซลโลไบโอส	0.338	0.559	0.000
แมนโนส	0.218	0.501	1.013
ซีเอ็มซี	0.115	1.488	0.144
ฟรุคโทส	2.688	0.808	0.455
แลคโทส	0.000	0.034	0.029
ไซแลน	0.047	0.093	0.122

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวสุชญญา อรุณสันติโรจน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 ธันวาคม 2524
สถานที่เกิด	อำเภอวิหารแดง จังหวัดสระบุรี
ประวัติการศึกษา	วท. บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ ปี 2549