

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

นายกฤษฎา เวทีวุฒาจารย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

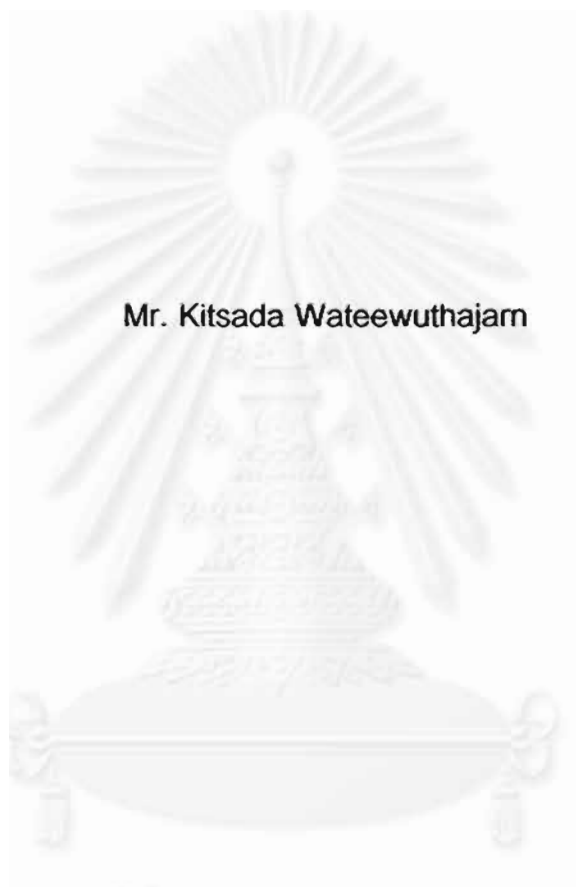
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-631-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASE(S) FROM**  
*Streptomyces* sp.PC22



Mr. Kitsada Wateewuthajarn

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology**

**Department of Microbiology**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**

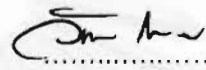
**Academic Year 1999**

**ISBN 974-334-631-7**


หัวข้อวิทยานิพนธ์      การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของไซแลนสจาก *Streptomyces* sp.  
PC22  
โดย                              นายกฤษฎา เวทีวุฒาจารย์  
ภาควิชา                        จุลชีววิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษา            รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

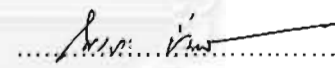
---


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

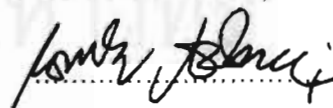
  
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนีย์วัน)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

  
.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวานิชย์)

กฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ : การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASE (S) FROM *Streptomyces* sp. PC22) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ , 85 หน้า. ISBN 974-334-631-7

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 30-70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนดีเอซี ไบโอ-เจล เอ และ ไบโอ-เจล พี-60 ได้ไซแลเนส 2 ชนิดคือไซแลเนส U และไซแลเนส B ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.69 และ 17.49 เท่าตามลำดับ และเหลือแอกติวิตี 1.35 และ 13.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส U จากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 เท่ากับ 5,000 ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส B จากการวิเคราะห์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 และอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลเท่ากับ 30,000 ดาลตัน

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของไซแลเนส U และไซแลเนส B เท่ากันเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของไซแลเนส U และไซแลเนส B เท่ากับ 5.5 และ 5.5-6.0 ตามลำดับ ความเสถียรต่ออุณหภูมิของไซแลเนส U และไซแลเนส B สูงถึง 50 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ ช่วงความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของไซแลเนส U และไซแลเนส B เท่ากับ 5.5-6.0 และ 5.5-9.0 ค่า  $K_m$  ของไซแลเนส U ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชเท่ากับ 5.67 และ 2.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า  $K_m$  ของไซแลเนส B ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชเท่ากับ 1.65 และ 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....  
ปีการศึกษา 2542.....

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 3970039723: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Streptomyce* sp. / XYLANASE

KITSADA WATEEWUTHAJARN: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASE (S) FROM *Streptomyces* sp. PC22. THESIS ADVISOR: ASSOC PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 85 pp. ISBN 974-334-631-7

Two extracellular xylanases from *Streptomyces* sp. PC22 were purified by fractionation with 30-70 % saturation of ammonium sulfate and consecutive chromatography on DEAE Bio-Gel A and Bio-Gel P-60 columns, respectively. Two xylanases namely xylanase U and xylanase B were obtained. The purity of xylanase U and xylanase B were 6.69 and 17.49 folds with the yields of 1.35 and 13.65 %, respectively. The molecular weight of xylanase U estimated via gel filtration was 5,000 daltons. The molecular weight of xylanase B estimated via gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was 30,000 daltons.

The optimal temperatures for xylanase U and xylanase B were similar of 60 °C. Optimal pH for xylanase U and xylanase B were 5.5 and 5.5-6.0, respectively. Xylanase U was stable to heat up to 50 °C and to a broad pH range between 5.5-6.0, and xylanase B was stable to heat up to 55 °C and to a broad pH range between 5.5-9.0. The  $K_m$  values of xylanase U for xylan from oat spelt and birchwood were 5.67 and 2.76 mg/ml, respectively, and the  $K_m$  values of xylanase B for xylan from oat spelt and birchwood were 1.65 and 0.63 mg/ml, respectively.

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....  
ปีการศึกษา 2542.....

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีก็ด้วยความช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ผู้วิจัยขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน , รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ น้องๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ขอขอบคุณคุณเกียรติศักดิ์และคุณยุคลธร เวทีวุฒาจารย์ ขอขอบคุณคุณนารีนารถ จันทะคุณ และขอปใจน้องๆ ทุกคน ที่ได้สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการทดลอง.....	16
3 ผลการทดลอง.....	27
4 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	60
รายการอ้างอิง.....	65
ภาคผนวก.....	73
ประวัติผู้เขียน.....	85

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซแลเนส.....	5
1.2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว.....	10
1.3 ค่า $K_m$ ของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆต่อไซแลเนสจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ช.....	12
1.4 อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ.....	12
1.5 ความเสถียรของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง.....	14
3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนไซแลเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	28
3.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำไซแลเนสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ให้บริสุทธิ์.....	29
3.3 ผลของไซโลสต่อแอกติวิตีของไซแลเนส.....	55
3.4 ผลของอะราบินอสต่อแอกติวิตีของไซแลเนส.....	55
3.5 ผลของชนิดและปริมาณของอิออนโลหะต่อการทำงานของไซแลเนส U....	57
3.6 ผลของชนิดและปริมาณของอิออนโลหะต่อการทำงานของไซแลเนส B....	58
3.7 สรุปสมบัติของไซแลเนส U และไซแลเนส B จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 .....	59
4.1 สมบัติของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ.....	64



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลน.....	2
1.2 กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย <i>Cryptococcus albidus</i> .....	4
3.1 การทำโครมาโทกราฟีของไซแลนเนสบนคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ.....	32
3.2 การทำโครมาโทกราฟีของไซแลนเนส U บนไบโอ-เจล พี-60.....	34
3.3 การทำโครมาโทกราฟีของไซแลนเนส B บนไบโอ-เจล พี-60.....	35
3.4 รูปขั้นตอนการทำไซแลนเนสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ให้บริสุทธิ์.....	36
3.5 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสของโปรตีนที่ผ่านการทำให้ บริสุทธิ์ในขั้นตอนโครมาโทกราฟี.....	37
3.6 การทำโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 ของโปรตีนมาตรฐาน.....	39
3.7 การทำโครมาโทกราฟีของไซแลนเนส U บนไบโอ-เจล พี-60.....	40
3.8 การทำโครมาโทกราฟีของไซแลนเนส B บนไบโอ-เจล พี-60.....	41
3.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรที่ใช้ ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60.....	42
3.10 การทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนไซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลของโปรตีน มาตรฐานและไซแลนเนส B.....	44
3.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะ ทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนไซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส.	45
3.12 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซแลนเนส U และไซแลนเนส B.....	47
3.13 ผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของไซแลนเนส U และไซแลนเนส B.....	48
3.14 ความเสถียรของไซแลนเนส U และไซแลนเนส B ต่ออุณหภูมิ.....	50
3.15 ความเสถียรของไซแลนเนส U และไซแลนเนส B ต่อความเป็นกรดต่าง.....	51
3.16 ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พล็อตในการหาค่า $K_m$ ของไซแลนเนส U เมื่อมีไซแลนจาก เปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชเป็นสับสเตรท.....	53
3.17 ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พล็อตในการหาค่า $K_m$ ของไซแลนเนส B เมื่อมีไซแลนจาก เปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชเป็นสับสเตรท.....	54



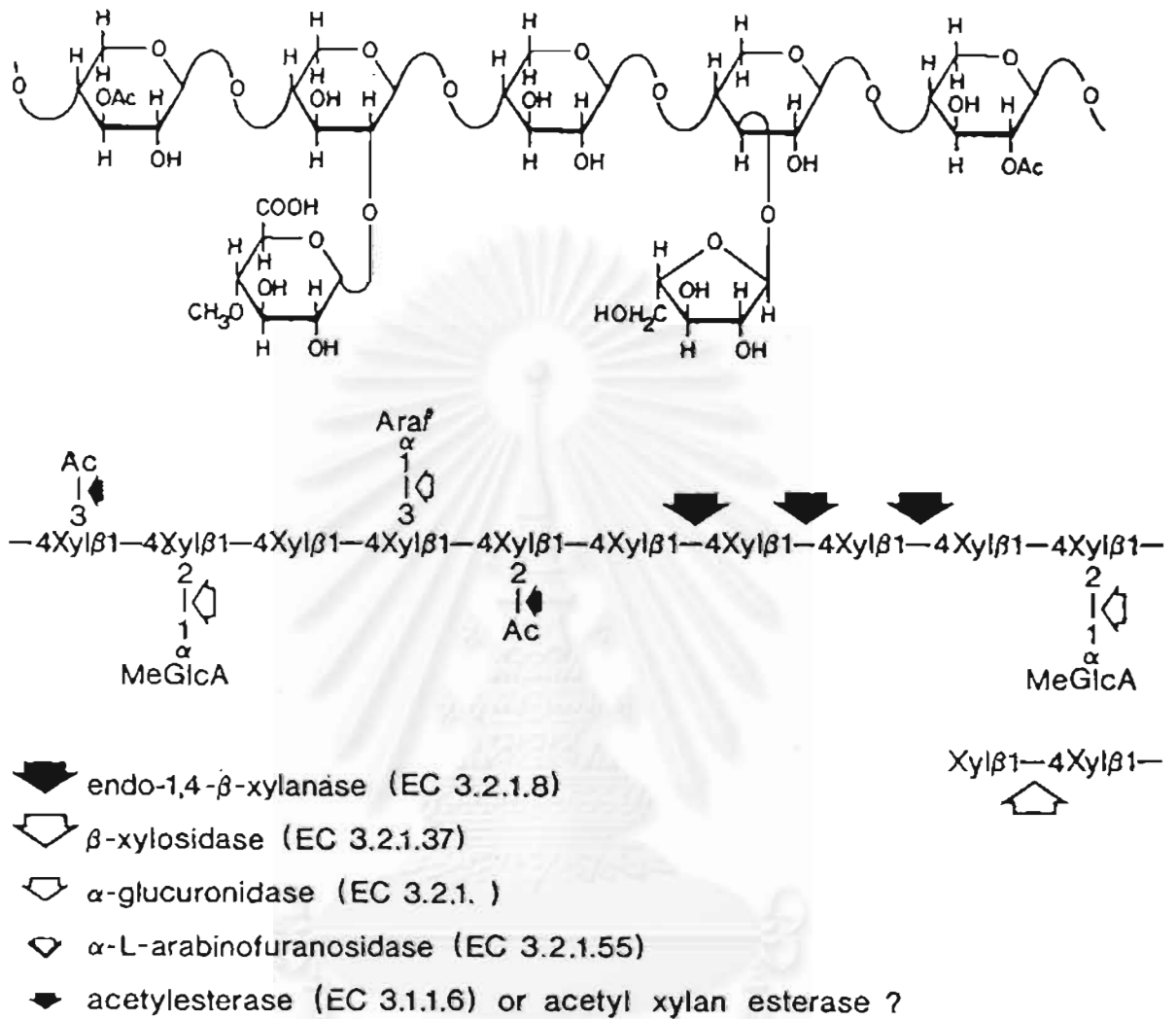
## 1.1 ประวัติความเป็นมา

เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งใหญ่ที่สุดในธรรมชาติ ประกอบด้วยโพลีเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (Cellulose), เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และ ลิกนิน (Lignin) เซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4-glycosidic) มีสูตรทั่วไปคือ  $(C_6H_{10}O_5)_n$  เฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส และ/หรือน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ แกกทูแคน (glucan), แมนแนน (mannan) และ ไชแลน (xylan) โดยมีไชแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีนอลิก (polyphenolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่และห่อหุ้มเอาเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ข้างใน (Wong และคณะ; 1988)

โครงสร้างของไชแลนเป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลไพราโนส ( $\beta$ -1,4-xylopyranose) เป็นสายหลักและมีสารประกอบอื่นๆ มาเกาะเป็นหมู่ข้างเคียงเช่น หมู่อะราบินอซิล (arabinosyl) กลูคูโรนิล (glucuronyl) หรืออะซิetyl (acetyl) โดยเชื่อมต่อกับสายหลักของไซโลสในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยหมู่อะราบินอซิลต่อกับตำแหน่ง O-3 ของไซโลส หมู่กลูคูโรนิลต่อกับตำแหน่ง O-2 ของไซโลส ส่วนหมู่อะซิetylต่อกับตำแหน่ง O-3 และ O-2 ของไซโลสได้ ดังแสดงในรูปที่ 1.1

## 1.2 การย่อยสลายไชแลน

การย่อยสลายไชแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (Chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน (Tsao และ Chiang; 1983)



รูปที่ 1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (Biely; 1985)

Ac	แทน	หมู่อะซิติล
Araf	แทน	แอล-อะราบินอฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	4-โอ-เมทิล-กลูคูโรนิกแอซิด
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

### 1.2.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ซึ่งจะนำขึ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ย และเป็นการกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยใช้สารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่นคลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide), ก๊าซคลอรีน เป็นต้น แต่ก็ทำให้เกิดสารประกอบไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอรีนที่เป็นพิษชนิดอื่นๆด้วย (Visser และคณะ; 1992)

### 1.2.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมี และยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประเภท เช่นกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ (Jurasek และ Paice; 1992) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่นการทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้น และใช้ลดความหนืดของอาหารสัตว์ (Wong และ Saddler; 1992; Gilbert และ Hazlewood; 1993) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่มใหญ่คือ

1. เอนโดไซแลเนส (endo-xylanase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4- $\beta$ -D-xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลซิดิกแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายใน (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert และคณะ; 1993)

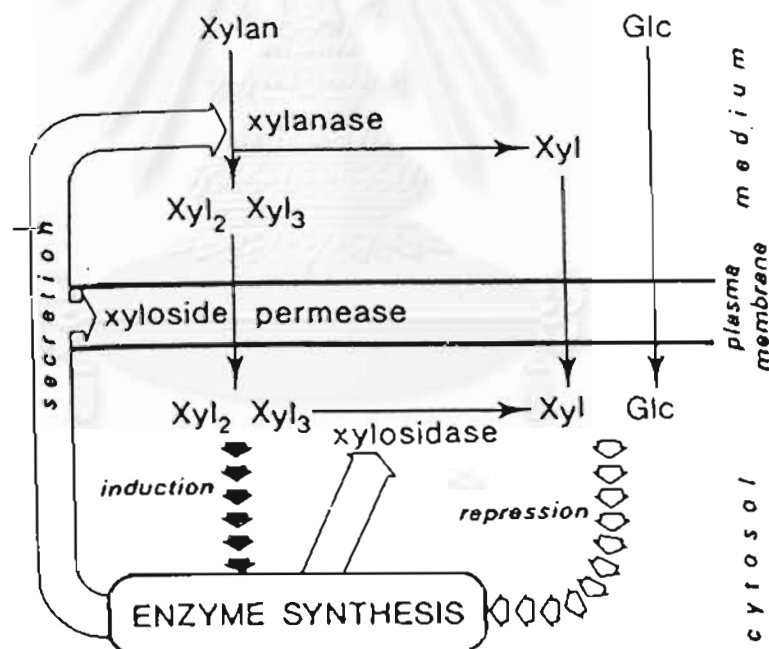
2. บีตาไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidase หรือ 1,4- $\beta$ -D-xylan-xylohydrolase, EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ที่ละ 1 หน่วยจากปลายด้านนอนรีดิวส์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards; 1976)

นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ยังต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ได้แก่

แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนซิเดส ( $\alpha$ -D-glucuronosidase; EC 3.2.1.) เป็นเอนไซม์ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด

แอลฟา-แอล-อะราบิโนส ( $\alpha$ -L-arabinosidase; EC 3.2.1.55) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่บนอนรีดิวิวส์-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิลได้น้ำตาลอะราบิโนส อะซิติลเอสเทอเรส (acetyl esterase; EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และ บีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่อะซิติลกับสายหลักให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก

Biely และ Petrakova (1985) ศึกษาการย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลเนสและบีตา-ไซโลซิเดสในยีสต์ *Cryptococcus albidus* พบว่าเชื้อจะปลดปล่อยไซแลนออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยไซแลนให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ จากนั้นจึงนำไซโลโอลิโกแซคคาไรด์นั้นเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการขนส่งที่ต้องใช้พลังงาน (active transport) แล้วใช้บีตา-ไซโลซิเดสย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *C. albidus* แสดงดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus* (Biely และ Petrakova; 1985)

Glc	แทน	ดี-กลูโคส
Xyl, Xyl2 และ Xyl3	แทน	ดี-ไซโลส, ไซโลไบโอส และ ไซโลไตรโอส ตามลำดับ

### 1.3 แหล่งของไซแลเนส

ไซแลเนส พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยซีท การสร้างไซแลเนสโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นภายในเซลล์ จากนั้นจะปลดปล่อยเอนไซม์ออกมา นอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไซแลนต่อไป ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซแลเนสแสดงดัง ตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซแลเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus kawachii</i>	Ito และคณะ; 1992
<i>Aspergillus nidulans</i>	Fernandez-Espinar และคณะ; 1994
<i>Aspergillus niger</i>	Frederick และคณะ; 1985
<i>Aspergillus sojae</i>	Kimura และคณะ; 1995
<i>Aspergillus sydowii</i> MG49	Ghosh และ Nanda; 1994
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ 41M-1	Nakamura และคณะ; 1993
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ BP-23	Blanco และคณะ; 1995
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-1	Ratanakhanokchai และคณะ; 1999
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Breccia และคณะ; 1998
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	Khasin และคณะ; 1993
<i>Bacillus subtilis</i>	Gokhale และ Deobagkar; 1989
<i>Bacillus subtilis</i> 5H	Khanongnuch และคณะ; 1998
<i>Cellulomonas</i> sp.	Gokhale และ Deobagkar; 1989
<i>Cellulomonas</i> sp. N.C.I.M. 2353	Chaudhary และ Deobagkar; 1997
<i>Cephalosporium</i> sp. สายพันธุ์ RYM-202	Kang และคณะ; 1996
<i>Clostridium thermocellum</i>	Morag และคณะ; 1990
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	Matte และ Forsberg; 1992
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	Christakopoulos และคณะ; 1996
<i>Melanocarpus albomyces</i> IIS 68	Saraswat และ Bisaria; 1997

## ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	Tsujibo และคณะ; 1990
<i>Prevotella ruminicola</i>	Flint และคณะ; 1997
<i>Schizophyllum commune</i>	Paice และคณะ; 1978
<i>Streptomyces</i> sp. CH-M-1035	Flores และคณะ; 1997
<i>Streptomyces</i> sp. S38	Georis และคณะ; 1999
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT 3336	Lopez-Fernandez และคณะ; 1998
<i>Streptomyces halstedii</i> JM8	Ruiz-Aribas และคณะ; 1995
<i>Streptomyces lividans</i>	Dupont และคณะ; 1998
<i>Streptomyces roselscleroticus</i>	Grabski และ Jeffries; 1991
<i>Thermotoga maritima</i>	Bronnenmeier และคณะ; 1995
<i>Trichoderma harzianum</i>	de Paula Silveira และคณะ; 1999
<i>Trichoderma longibrachitum</i>	Royer และ Nakas; 1990
<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7	Xu และคณะ; 1998
<i>Trichoderma viride</i>	Beldman และคณะ; 1988

สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) ได้แยก *Streptomyces* spp. ที่ผลิตไซแลเนสและบีตา-ไซโลซิเดสจากแหล่งดินในประเทศไทย พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างไซแลเนสได้สูงสุด โดยพบว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมและมีไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน *Streptomyces* sp. PC22 สร้างไซแลเนสได้ 14.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือกากเมล็ดฝ้ายมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับไซแลน โดยเมื่อใช้กากเมล็ดฝ้าย 2.5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ ไซแลน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ก็ยังสามารถสร้างไซแลเนสได้สูงถึง 12.66 หน่วยต่อมิลลิลิตร

#### 1.4 การทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์

มีรายงานหลายฉบับศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนต่างๆ กัน เช่น Tsujibo และคณะ(1990) ทำไซแลเนสจาก *Nocardiosis dassonvillei* ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนดีเอซีเซลลูโลสไฟน์ เอ-800 (DEAE-cellulofine A-800) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ และตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบน เซฟาเดกซ์ จี-75 (Sephadex G-75) ได้โปรตีน 3 ชนิดที่มีแอกติวิตีของไซแลเนสคือ X-I, X-II และ X-III ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.01, 7.51 และ 6.02 เท่า ตามลำดับ และเหลือแอกติวิตีอยู่ 3.6, 6.3 และ 3.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ito และคณะ(1992) ทำไซแลเนสจาก *Aspergillus kawachii* ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-60 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการทำ ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) บนดีเอซี-5พีดับเบิลยู (DEAE-5PW) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.5 โมลาร์ แล้วทำโครมาโทกราฟีบนจี3000-เอสดับเบิลยู (G3000-SW) ได้โปรตีนที่มีแอกติวิตีของไซแลเนส 3 ชนิดคือ XylA, XylB และ XylC ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.90, 6.17 และ 2.93 เท่า ตามลำดับและเหลือแอกติวิตีอยู่ 15, 21 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ruiz-Amibas และคณะ(1995) ทำไซแลเนสจาก *Streptomyces halstedii* JM8 ให้บริสุทธิ์โดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน (polysulfone membranes) โดยกักโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 10,000 ดาลตัน แล้วทำฟาสท์เพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (FPLC) โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ (Q-HR 5/5) จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.15 โมลาร์ ได้โปรตีนที่มีแอกติวิตีของไซแลเนส 2 ชนิด คือ Xyl1L ซึ่งไม่จับกับตัวกลางและ Xyl1S ที่ถูกชะออกมาโดยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์

Ishihara และคณะ(1997) ทำไซแลเนสจากเชื้อราที่ชอบร้อน (Thermophilic Fungus) สายพันธุ์ HG-1 ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น



20-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเอซี เซฟาเดกซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) และโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมทิล-เซฟาเดกซ์ ซี-50 (CM-Sephadex C-50) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-2.0 โมลาร์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาเดกซ์จี-150 (Sephadex G-150) ได้ไซแลเนส 1 ชนิด มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.79 เท่า และมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 0.7 เปอร์เซ็นต์

Lopez-Fernandez และคณะ (1998) ทำไซแลเนสจาก *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336 ให้บริสุทธิ์โดย การทำโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมทิล-ไบโอเจล (CM-BioGel) ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีที่ใช้ไซแลนเป็นตัวกลางเพื่อจับกับโปรตีน ได้ไซแลเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 291.8 เท่า และมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 17.7 เปอร์เซ็นต์

Breccia และคณะ(1998) ทำไซแลเนสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ให้บริสุทธิ์โดย การทำให้เข้มข้นด้วยดีอีเอซี เซฟาเดกซ์ เอ-50 (DEAE Sephadex A-50) แล้วตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0-40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาโรส 4บี (Sephrose 4B) ได้ไซแลเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.3 เท่า และเหลือแอกติวิตีอยู่ 53.9 เปอร์เซ็นต์

Xu และคณะ(1998) ทำไซแลเนสจาก *Trichoderma reesei* PC-3-7 ให้บริสุทธิ์โดย การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-100 (Sephacryl S-100) ตามด้วยโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมทิล-เซฟาโรส เอฟเอฟ (CM-Sephrose FF) ได้ไซแลเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.3 เท่า และเหลือแอกติวิตีอยู่ 7.9 เปอร์เซ็นต์

### 1.5 แอกติวิตีของเซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4-glycosidic) ของเซลลูโลส และได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลเนสได้ส่วนใหญ่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งการที่จุลินทรีย์จะผลิตเซลลูเลสหรือไซแลเนสเป็นหลักก็ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ Royer และ Nakas (1990) รายงานว่าในการเลี้ยงเชื้อ

*Trichoderma longibrachiatum* นั้นถ้าต้องการให้สร้างไซแลเนสก็ใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้าต้องการให้สร้างเซลลูเลสก็ต้องใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และปัจจุบันได้มีการสนใจที่จะนำไซแลเนสไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมกระดาษ การเตรียมเยื่อกระดาษและการฟอกสีเยื่อกระดาษให้ขาวขึ้น ซึ่งในกรณีดังกล่าวต้องการไซแลเนสที่ไม่มีการปนเปื้อนของเซลลูเลส (Beily; 1985) ซึ่งมีรายงานตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วและไม่พบแอกติวิตีของเซลลูเลสดังนี้ *Aspergillus nidulans* (Fernandez-Espinar และคณะ; 1994), *Aspergillus sydowii* MG49 (Ghosh และ Nanda; 1994), *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BP-23 (Blanco และคณะ; 1995), *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-1 (Ratanakhanokchai; 1999), *Bacillus amyloliquefaciens* (Breccia และคณะ; 1998), *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 (Kang และคณะ; 1996), *Streptomyces halstedii* JM8 (Ruiz-Aribas; 1995), *Trichoderma reesei* PC-3-7 (Xu และคณะ; 1998),

แต่ก็มีรายงานบางฉบับที่พบว่าเอนไซม์ไซแลเนสบางชนิดแสดงแอกติวิตีของเซลลูเลสด้วย เช่นไซแลเนสจาก *Streptomyces roseicleroticus* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ถึงระดับ homogeneity แล้ว พบว่ามีแอกติวิตีของเซลลูเลส (Grabski และ Jeffries; 1991) หรือรายงานของ Ito และคณะ (1992) พบว่าไซแลเนส 2 ใน 3 ชนิดที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้วคือ XylA และ XylB จาก *Aspergillus kawachii* สามารถแสดงแอกติวิตีของเซลลูเลสด้วย

## 1.6 น้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส

น้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสโดยทั่วไปมีขนาดไม่ใหญ่มากคือ ไม่เกินหนึ่งแสน ดาลตัน และได้มีรายงานการหาน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซแลเนส	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus kawachii</i>	XylA	35,000	Ito และคณะ; 1992
	XylB	26,000	
	XylC	29,000	
<i>Aspergillus nidulans</i>		34,000	Fernandez-Espinar และคณะ; 1994
<i>Aspergillus sojae</i>	X-I	32,700 (32,000)	Kimura และคณะ; 1995
	X-II-A	34,300 (34,000)	
	X-II-B	35,500 (34,500)	
<i>Aspergillus sydowii</i> MG49		30,000	Ghosh และ Nanda; 1994
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ 41M-1	J	36,000	Nakamura และคณะ; 1993
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ BP-23		32,000	Blanco และคณะ; 1995
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-1		23,000	Ratanakhanokchai และคณะ; 1999
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6		43,000 (31,000)	Khasin และคณะ; 1993
<i>Bacillus subtilis</i> 5H		26,000	Khanongnuch และคณะ; 1998
<i>Cellulomonas</i> sp.	I	53,000	Gokhale และ Deobagkar; 1989
	II	33,000	
	III	23,000	
<i>Cephalosporium</i> sp. สายพันธุ์ RYM-202	CX-I	35,000 (33,000)	Kang และคณะ; 1996
	CX-II	24,000 (23,000)	
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	Endoxylanase 1	53,700	Matte และ Forsberg; 1992
	Endoxylanase 2	66,000	
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	I	20,800	Christakopoulos และคณะ; 1996
	II	23,500	
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	X-I	23,000	Tsujibo และคณะ; 1990
	X-II	23,000	
	X-III	37,000	
<i>Schizophyllum commune</i>	A	33,000	Paice และคณะ; 1978
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT 3336		48,000	Lopez-Fernandez และคณะ; 1998

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซแลเนส	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces halstedii</i> JMB	Xys1L	45,000	Ruiz-Arribas และคณะ; 1995
	Xys1S	35,000	
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>		22,600 (5,500)	Grabski และ Jeffries; 1991
<i>Trichoderma harzianum</i>	XYL2	18,000	de Paula Silveira และคณะ; 1999
<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7	XynIII	32,000	Xu และคณะ; 1998

หมายเหตุ น้ำหนักโมเลกุลในตารางได้จากวิธีโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ยกเว้นตัวเลขในวงเล็บคือน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากวิธีเจลฟิลเตรชัน

จากรายงานดังแสดงในตารางที่ 1.2 พบว่าไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีความหลากหลายของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งอยู่ในช่วง 18,000 – 60,000 ดาลตัน

## 1.7 สมบัติของไซแลเนส

### 1.7.1 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

โดยทั่วไปไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีสับสเตรทเป็นไซแลน แต่ไซแลนจากพืชต่างชนิดกันก็มีองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยเฉพาะมีความแปรผันที่หมู่ข้างเคียงดังได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น ดังนั้นไซแลเนสจึงมีความจำเพาะแตกต่างกันต่อไซแลนจากพืชต่างชนิดกัน ยิ่งกว่านั้น แหล่งของไซแลเนสก็อาจมีผลทำให้เกิดความหลากหลายของความจำเพาะต่อชนิดของไซแลนเช่นกัน

ตารางที่ 1.3 แสดงตัวอย่างไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆที่มีความจำเพาะต่อไซแลนที่ผลิตจากพืชต่างชนิดกัน ได้แก่จากเปลือกข้าวโอ๊ตและจากไม้เบิร์ช

ตารางที่ 1.3 ค่า  $K_m$  ของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆต่อไซแลเนสจากเปลือกข้าวโอ๊ตและจากไม้เบิร์ช

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ค่า $K_m$ ของไซแลเนสต่อไซแลเนสจาก		เอกสารอ้างอิง
	เปลือกข้าวโอ๊ต (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไม้เบิร์ช (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
<i>Aspergillus nidulans</i>	4.15	1.78	Fernandez-Espinar และคณะ; 1994
<i>Cephalosporium</i> sp สายพันธุ์ RYM-202	(CX-I) 5.26	(CX-I) 3.18	Kang และคณะ(1996)
	(CX-II) 4.16	(CX-II) 2.02	
<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7	6.25	2.02	Xu และคณะ(1998)
เชื้อราทราเนอราสายพันธุ์ HG-1	20.00	8.30	Ishihara และคณะ(1997)

### 1.7.2 อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส

ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีสมบัติในแง่อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างแตกต่างกัน ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซแลเนส	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดต่าง	
<i>Aspergillus kawachii</i>	XylA	60	5.5	Ito และคณะ; 1992
	XylB	55	4.5	
	XylC	50	2.0	
<i>Aspergillus nidulans</i>		56	5.3-7.5	Fernandez-Espinar และคณะ; 1994
<i>Aspergillus niger</i>	I	45	6.0	Frederick และคณะ; 1985
	II	45	5.5	
<i>Aspergillus sojae</i>	X-I	60	5.5	Kimura และคณะ; 1995
	X-II-A	60	5.0	
	X-II-B	50	5.5	

ตารางที่ 1.4 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซแลเนส	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด ต่าง	
<i>Aspergillus sydowii</i> MG49		60	5.5	Ghosh และ Nanda; 1994
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ 41M-1	J	50	9.0	Nakamura และคณะ; 1993
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-1		60	5.5	Ratanakhanokchai และคณะ; 1999
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		80	6.8-7.0	Breccia และคณะ; 1998
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6		-	6.5	Khasin และคณะ; 1993
<i>Bacillus subtilis</i> 5H		55	7.0	Khanongnuch และคณะ; 1998
<i>Cellulomonas</i> sp.	I	60-65	6.5	Gokhale และ Deobagkar; 1989
	II	60	6.5	
	III	55	5.8	
<i>Cephalosporium</i> sp.	CX-I, CX-II	50	7.5-8.0	Kang และคณะ; 1996
สายพันธุ์ RYM-202				
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	Endoxylanase 1	39	7.0	Matte และ Forsberg; 1992
	Endoxylanase 2	55	6.3	
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	I	60	6.0	Christakopoulos และคณะ; 1996
	II	55	6.0	
<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	X-I	60	7.0	Tsujibo และคณะ; 1990
	X-II	60	7.0	
	X-III	50	7.0	
<i>Schizophyllum commune</i>	A	55	5.0	Paice และคณะ; 1978
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT 3336		50	6.0	Lopez-Fernandez และ คณะ; 1998
<i>Streptomyces halstedii</i> JM8	Xys1L	60	6.3	Ruiz-Arribas และคณะ; 1995
	Xys1S	60	6.3	
<i>Streptomyces roselscleroticus</i>		60	6.5-7.0	Grabski และ Jeffries; 1991
<i>Trichoderma harzianum</i>	XYL2	45	5.0	de Paula Silveira และคณะ; 1999
<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7	XynIII	55	6.0	Xu และคณะ; 1998

- หมายถึงไม่มีรายงานไว้

### 1.7.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิของไซแลเนส

ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิแตกต่างกัน ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.5 ความเสถียรของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซแลเนส	ความเสถียรต่อ		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิสูงถึง (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดต่าง	
<i>Aspergillus kawachii</i>	XylA	-	3.0-10.0	Ito และคณะ; 1992
	XylB	-	3.0-10.0	
	XylC	-	1.0-9.0	
<i>Aspergillus nidulans</i>		60	4.0-6.7	Fernandez-Espinar และคณะ; 1994
<i>Aspergillus sojae</i>	X-I	50	5.0-8.0	Kimura และคณะ; 1995
	X-II-A	50	5.0-9.0	
	X-II-B	35	5.0-8.0	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		50	9.0	Breccia และคณะ; 1998
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6		65	9.0	Khasin และคณะ; 1993
<i>Cephalosporium</i> sp. สายพันธุ์ RYM-202	CX-I, CX-II	50	5.5-12.0	Kang และคณะ; 1996
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	I	45	9.0-10.0	Christakopoulos และคณะ; 1996
	II	45	7.0-9.0	
<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	X-I	40	6.0-10.0	Tsujiibo และคณะ; 1990
	X-II	40	6.0-10.0	
	X-III	40	8.0-12.0	
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT 3336		50	5.0-8.0	Lopez-Fernandez และคณะ; 1998
<i>Streptomyces halstedii</i> JM8	Xys1L	50	4.0-10.0	Ruiz-Arribas และคณะ; 1995
	Xys1S	50	4.0-10.0	
<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7	XynIII	50	4.5-8.5	Xu และคณะ; 1998

- หมายถึงไม่มีรายงานไว้

## 1.8 สารยับยั้งการทำงานของไซแลเนส

อิออนของโลหะหลายชนิดมีผลในการยับยั้งการทำงานของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ แตกต่างกัน โดยความสามารถในการยับยั้งขึ้นกับชนิดและปริมาณของอิออนโลหะนั้นๆ เช่น แมงกานีส ( $Mn^{2+}$ ) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของไซแลเนส X-I, X-II-A และ X-II-B ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจาก *Aspergillus sojae* ขณะที่ปรอท ( $Hg^{2+}$ ) ยับยั้งการทำงานของ X-I และ X-II-B เท่านั้น (Kimura และคณะ; 1995)

ไซแลเนส J จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 41M-1 จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยปรอทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Nakamura และคณะ; 1993)

ไซแลเนสจากเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* T-6 ถูกยับยั้งการทำงานด้วย 1 มิลลิโมลาร์ของสังกะสี ( $Zn^{2+}$ ), แคดเมียม ( $Cd^{2+}$ ) และปรอท (Khasin และคณะ; 1993)

Ishihara และคณะ (1997) รายงานว่าไซแลเนสจากเชื้อราที่ชอบร้อน (Thermophilic Fungus) สายพันธุ์ HG-1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกยับยั้งการทำงานโดย  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  และ  $Ca^{2+}$

สำหรับงานวิจัยนี้จะรายงานการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย โดยสุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) และสุมาลียังได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของไซแลเนสนี้ ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่า มีอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 55-70 องศาเซลเซียส และ 5.5-7.0 ตามลำดับ และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส และเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0



## บทที่ 2

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

#### 2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environmental incubator shaker) ของ New Brunswick Co., U.S.A.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของ Kontron Instruments, Italy.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan.
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) รุ่น cyberscan 2000 ของ Eutech Cybematics, Singapore.
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Novaspec® II ของ Pharmacia, Sweden.
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/visible recording spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของ Shimadzu corporation, Japan.
7. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของ Satorius, U.S.A.
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของ Memmert, Germany.
9. เครื่องโครมาโทกราฟี (Low Pressure Liquid Chromatography) รุ่น Econo ของ BioRad, U.S.A.
10. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแผ่น (Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของ Bio-Rad, U.S.A.

## 2.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ดีอีเอจี ไบโอ-เจล เอ(DAE Bio-Gel A) ของบริษัท Bio-Rad, U.S.A.
2. ไบโอ-เจล พี-60 (Bio-Gel P-60) ของบริษัท Bio-Rad, U.S.A.
3. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (xylan from oat spelts) ของ Sigma, U.S.A.
4. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (xylan from birchwood) ของ Sigma, U.S.A.
5. อะคริลาไมด์ (acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
6. N, N'- เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N, N'-methylene bis acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
7. เทตระเมธิลีนไดอามีน (N, N, N', N', -Tetramethylenediamine, TEMED) ของ Sigma, U.S.A.
8. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของ Sigma, U.S.A.
9. สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) ของ Fluka, Switzerland.
10. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) ของ BDH, England.
11. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) ของ BDH, England.

## 2.3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.3.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมไซแลเนส

#### 2.3.1.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22

1. เตรียมหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 โดยถ่ายสปอร์แขวนลอยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพติกชอยบรอต (Tryptic soy broth, TSB) pH 9 ปริมาตร 9 มิลลิลิตรในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดลาดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

2. ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) pH 9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดลาดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

3. แยกเอาเซลล์และกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสและปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

#### 2.3.1.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส

โดยการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน ในปฏิกิริยาที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (1984) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

0.1 มิลลิลิตรของสารละลายไซแลนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5

0.8 มิลลิลิตรของ 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5

0.1 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson (1951)

### 2.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1951)

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไลด์-คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.2) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

### 2.3.1.4 การวิเคราะห์แอกติวิตีของเซลลูเลส

ทำการวิเคราะห์แอกติวิตีของเซลลูเลสโดยวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ซึ่งในส่วนของประกอบของปฏิกิริยาคือ

0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสความเข้มข้น 10

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5

ป่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีใช้กรดไดโนโตรซาลิไซลิก (Miller, 1959)

### 2.3.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีใช้กรดไดโนโตรซาลิไซลิก (Miller, 1959)

นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายไดโนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.3) 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.2)

### 2.3.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ; 1951)

โดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวันซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)

### 2.3.2 การทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์

#### 2.3.2.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนไซแลเนส

ตกตะกอนส่วนน้ำใสด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดอย่างช้าๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วนคือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ กวนแต่ละลำดับส่วนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาณที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของ ไซแลเนส

### 2.3.2.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

#### 2.3.2.2.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

เทสารแขวนลอยดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ลงในน้ำกลั่น ปล่อยให้เจลดนอนกัน เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียด ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ แขนเจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 กำจัดฟองอากาศออกโดยการดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 2-3 เท่าของเจลลงในคอลัมน์ ที่อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-70 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าเจล ทะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับด้วยเจลออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้น 0-700 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เกรดเคอียอน ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบกิจกรรมของเอนไซม์เข้าด้วยกัน นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของไซแลเนส

#### 2.3.2.2.2 การทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60

แช่ไบโอ-เจล พี-60 ในน้ำกลั่นปริมาตรเกินพอ ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ แขนเจลใน 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 นำเจลไปดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที บรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหล 7.2

มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำไซแลเนสที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ดีอีเอซี ไบโอ-เจล เอ มาผ่านลงคอลัมน์ อะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหล 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และแอกติวิตีของไซแลเนส จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบกิจกรรมของเอนไซม์เข้าด้วยกัน นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วไดอะไลซิสใน 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของไซแลเนส

2.3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส (Native polyacrylamide gel electrophoresis) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)



ประกอบแผ่นแก้วขนาด 8.2 X 10.2 เซนติเมตรและขนาด 7.4 X 10.2 เซนติเมตรเข้าด้วยกันโดยมีแผ่นพลาสติก (Spacer) หนา 1 มิลลิเมตรที่ขอบด้านข้างทั้งสองข้าง ประกอบเข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.8) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 6 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นที่ผิวหน้าเจลประมาณ 1 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้น้ำออกจนหมด เทสารละลายผสมของสแตกิงเจล (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.9) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นกระจก เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง ทิ้งให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งแล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) แล้วเติมน้ำอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาละลายในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.6) จากนั้นหยอดสารละลายโปรตีน 20 ไมโครลิตรในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเล็กโทรโฟริซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนลงมาจนใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นกระจก แยกเจลในสารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.10) เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีด้วยสารละลายล้างสี (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.11) จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

### 2.3.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส

#### 2.3.4.1 โดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60

ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานได้แก่ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA), โอวัลบูมิน (Ovalbumin) และ ไซโตโครม ซี (cytochrome c) น้ำหนักโมเลกุล 66,000, 45,000 และ 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ ผ่านลงในคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60 โดยใช้ภาวะเดียวกับที่ใช้ในการทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์

2.3.4.2 โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีการของ Laemmli (1970)

ประกอบแผ่นแก้วขนาด 8.2 X 10.2 เซนติเมตรและขนาด 7.4 X 10.2 เซนติเมตรเข้าด้วยกันโดยมีแผ่นพลาสติก (Spacer) หนา 1 มิลลิเมตรที่ขอบด้านข้างทั้งสองข้าง ประกอบเข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.10) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วที่มีความสูง 6 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นที่ผิวหน้าเจลประมาณ 1 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ชับน้ำออกจนหมด เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.11) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นกระจก เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง ทิ้งให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งแล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออกล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.1) แล้วเติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐาน 3 ชนิด คือ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin), โอวัลบูมิน (ovalbumin) และไลโซไซม์ (Lysozyme) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66,000, 45,000 และ 14,300 ดาลตัน ตามลำดับ มาละลายในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.8) ต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จากนั้นหยอดสารละลายโปรตีนนี้ 20 ไมโครลิตรในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนลง



มาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นกระจก และแช่ในน้ำยา ย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.12) เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีด้วยสารละลายล้างสี (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.13) จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส โดยวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน มาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่บนเจลของโปรตีน

### 2.3.5 การศึกษาสมบัติของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

#### 2.3.5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส

วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน ปริมาณเท่าๆกัน ตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส

#### 2.3.5.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานของไซแลเนส

วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธี การในข้อ 2.3.1.2 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงความ เป็นกรดต่างต่างๆดังนี้

อะซิเตท บัฟเฟอร์ (Acetate buffer) ในช่วง 4.0-6.0

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ในช่วง 6.0-8.0

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (Tris-hydrochloride buffer) ในช่วง 8.0-9.0

#### 2.3.5.3 ความเสถียรของไซแลเนสต่ออุณหภูมิ

ปมไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอกติวิตี ของไซแลเนสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2 โดยมีไซแลเนสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัว เปรียบเทียบ

#### 2.3.5.4 ความเสถียรของไซแลเนสต่อความเป็นกรดต่าง

ปมไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ระบุในข้อ 2.3.5.2 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาหาแอกติวิตีของไซแลเนสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2 โดยมีไซแลเนสที่ไม่ผ่านการปมเป็นตัวเปรียบเทียบ

#### 2.3.5.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ( $K_m$ ) ของไซแลเนส

นำไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาผสมกับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelts Xylan) หรือไซแลนจากไม้เบิร์ช (Birchwood Xylan) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสับสเตรทขณะทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปหาแอกติวิตีของไซแลเนสตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2

#### 2.3.5.6 ผลของไซโลส (xylose) ต่อการทำงานของไซแลเนส

วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2 โดยเติมไซโลสลงไปด้วยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไซโลสอยู่ในช่วง 0.1-10 มิลลิโมลาร์

#### 2.3.5.7 ผลของอะราบิโนส (arabinose) ในการยับยั้งการทำงานของไซแลเนส

วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2 โดยเติมอะราบิโนสลงไปด้วยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของอะราบิโนสอยู่ในช่วง 0.1-10 มิลลิโมลาร์

### 2.3.5.8 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของไซแลเนส

วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2 โดยเติมอิออนโลหะชนิดต่างๆ ในขณะที่บ่มปฏิกิริยา ที่ความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ คือ

แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

โคบอลตคลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

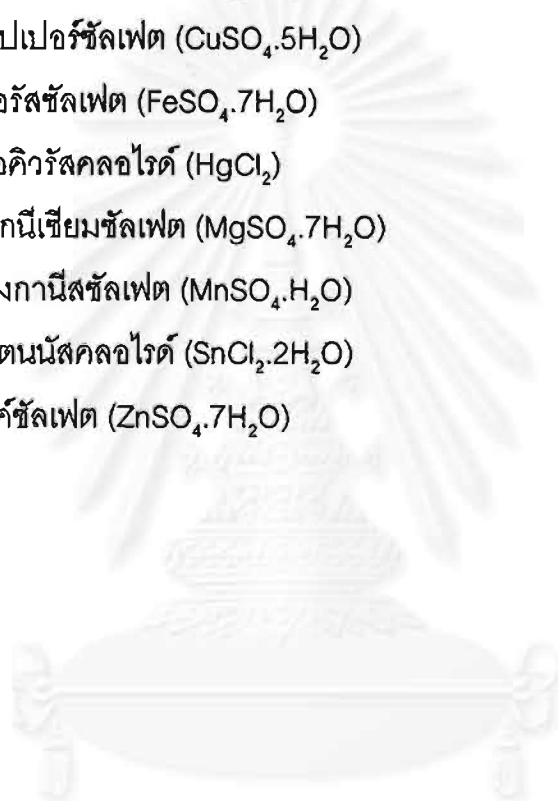
เมอคิวรัสคลอไรด์ ( $\text{HgCl}_2$ )

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

สแตนนัสคลอไรด์ ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )



### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

##### 3.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 เพื่อผลิตไซแลเนส

เลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและราคาถูกตามสูตรอาหารในภาคผนวก ก เพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลเนสซึ่งมี 2.5 เปอร์เซ็นต์กากเมล็ดฝ้าย และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอนโดยดัดแปลงจากสมาธิ อิงใจธรรม (2539) พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตไซแลเนสได้ประมาณ 7-9 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 2-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

##### 3.2 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนไซแลเนส

การศึกษารุ่นแรกได้ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนลำดับส่วนของไซแลเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนรวมทั้งให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยทำการเลี้ยงเชื้อขนาดสเกลเล็กแล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์และกากอาหารออกแล้วมาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของไซแลเนส ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1 พบว่ามีแอกติวิตีของไซแลเนสในทุกลำดับส่วนของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีแอกติวิตีสูงสุดใกล้เคียงกันลำดับส่วนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-50 และ 50-60 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม เพื่อให้สูญเสียบริมาณเอนไซม์ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ดังนั้นในการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของไซแลเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อจึงจะเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในช่วง 30-70 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอน  
ไซแลนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ลำดับส่วนของ แอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีน ทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกติวิตี ทั้งหมด (หน่วย)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอกติวิตี สัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
เอนไซม์จาก น้ำเลี้ยงเชื้อ	70.0	162.4	477.4	2.9	100.0
0-20	1.8	0.8	8.7	10.9	1.8
20-30	1.7	4.5	15.9	3.5	3.3
30-40	2.2	5.7	39.4	6.9	8.3
40-50	2.1	7.1	91.4	12.9	19.1
50-60	2.2	9.1	97.0	10.6	20.3
60-70	2.4	9.2	79.2	8.6	16.6
70-80	2.0	8.9	32.2	3.6	6.7

\* เมื่อกำหนดให้แอกติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

### 3.3 การทำไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ระดับขยายส่วน รวมปริมาตรทั้งหมด 510 มิลลิลิตร มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 3.2 ตามขั้นตอนรายละเอียดดังแสดงต่อไปนี้

#### 3.3.1 การตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-70 เปอร์เซ็นต์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ซึ่งมีแอกติวิตีทั้งหมดของไซแลเนส 4850.10 หน่วย ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการไดอะไลส์ด้วยสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว พบว่ามีค่าแอกติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 1.82 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น โดยยังคงมีแอกติวิตีทั้งหมดเหลืออยู่ 50.32 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนั้นได้วิเคราะห์แอกติวิตีของเซลลูเลส พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตเซลลูเลสได้ โดยมีแอกติวิตีทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 511 หน่วย แต่เมื่อผ่านการตกตะกอนลำดับส่วนด้วย 30-70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว พบว่ามีแอกติวิตีของเซลลูเลสปนเปื้อนเหลืออยู่ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	แอกติวิตีทั้งหมด ของไซแลเนส (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีจำเพาะ ของไซแลเนส (หน่วย/มก.โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์ แอกติวิตี ของไซแลเนส	ความบริสุทธิ์ ของไซแลเนส (เท่า)	แอกติวิตีทั้งหมด ของเซลล์ (หน่วย)	เปอร์เซ็นต์ แอกติวิตี ของเซลล์
1. เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ	510.00	4850.10	2029.80	2.39	100.00	1.00	511.02	100.00
2. ตกตะกอนด้วย 30-70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต	45.00	2440.35	560.25	4.36	50.32	1.82	80.10	15.66
3. ดีอีเออี ไบโอ-เจล								
3.1 Unbound fraction (ไซแลเนส U)	8.00	94.40	21.52	4.39	1.95	1.84	0.00	0.00
3.2 Bound fraction (ไซแลเนส B)	6.00	1010.46	50.16	20.14	20.83	8.42	15.06	2.94
4. ไบโอ-เจล พี-60								
4.1 ไซแลเนส U	16.00	65.44	4.00	16.00	1.35	6.69	0.00	0.00
4.2 ไซแลเนส B	6.00	662.22	15.84	41.81	13.65	17.49	10.50	1.96

### 3.3.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

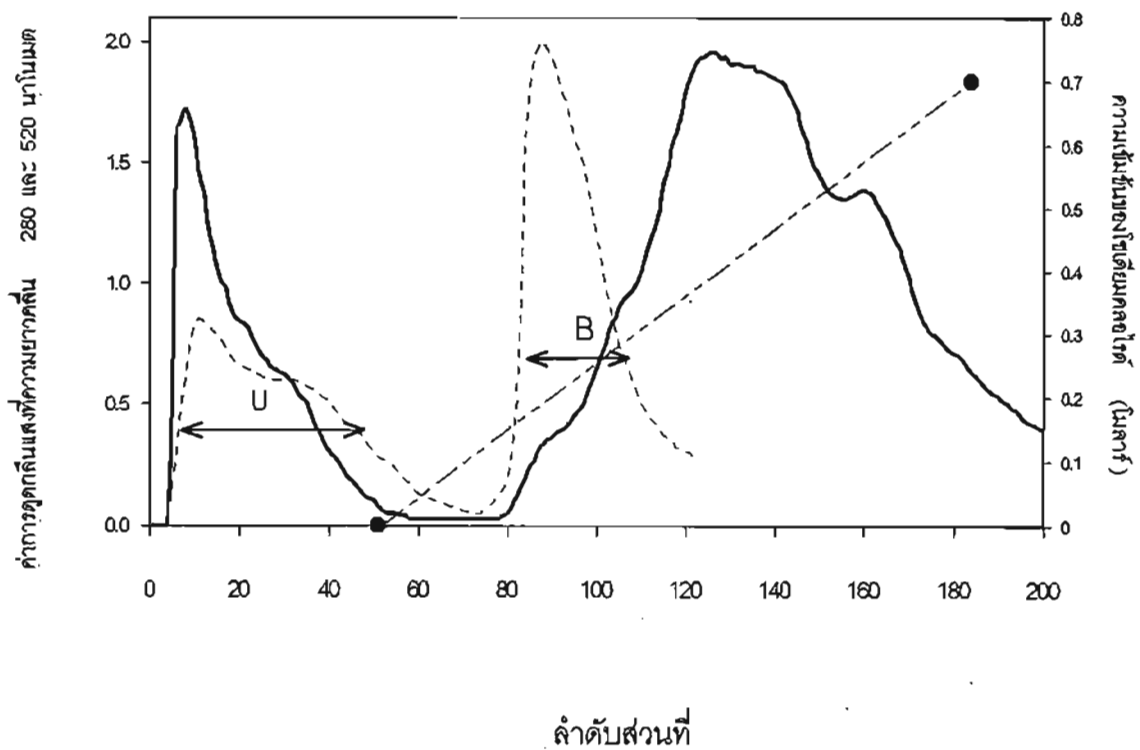
นำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยการทำโครมาโทกราฟีสองขั้นตอน  
ดังนี้

#### 3.3.2.1 โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ ดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ

นำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 30-70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 560.25 มิลลิกรัม ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 8.0 มาผ่านลงบนคอลัมน์ดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคลบ (anion-exchanger) ตามวิธีการในข้อ 2.3.2.2.1 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.1 พบว่า โปรตีนส่วนที่ไม่จับกับตัวกลางโดยถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ตรวจพบว่ามีแอกติวิตีของไซแลเนส ดังนั้นจึงได้รวมลำดับส่วนที่ 8-49 เข้าด้วยกัน และให้ชื่อเอนไซม์ในส่วนนี้ว่าไซแลเนส U (Unbound enzyme) พบว่ามีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.39 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.84 เท่า และเมื่อชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-700 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 150-300 มิลลิโมลาร์ มีโปรตีนที่มีแอกติวิตีของไซแลเนสถูกชะออกมา จึงได้รวมลำดับส่วนที่ 83-110 เข้าด้วยกัน และให้ชื่อเอนไซม์ในส่วนนี้ว่า ไซแลเนส B (Bound enzyme) ซึ่งมีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 20.14 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีนและมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.42 เท่า

นอกจากนั้นได้วิเคราะห์แอกติวิตีของเซลลูเลสจากเอนไซม์ทั้งสองนี้ พบว่าไซแลเนส U ไม่มีการปนเปื้อนด้วยเซลลูเลส ขณะที่ไซแลเนส B มีเซลลูเลสปนเปื้อนอยู่ คิดเป็น 2.94 เปอร์เซ็นต์ของเซลลูเลสทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ





รูปที่ 3.1 การทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเอซี ไบโอ-เจล เอ ซี โปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 8.0 และ เกรเดียนต์เส้นตรงของไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-700 มิลลิโมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

- ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
- - - - ความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์

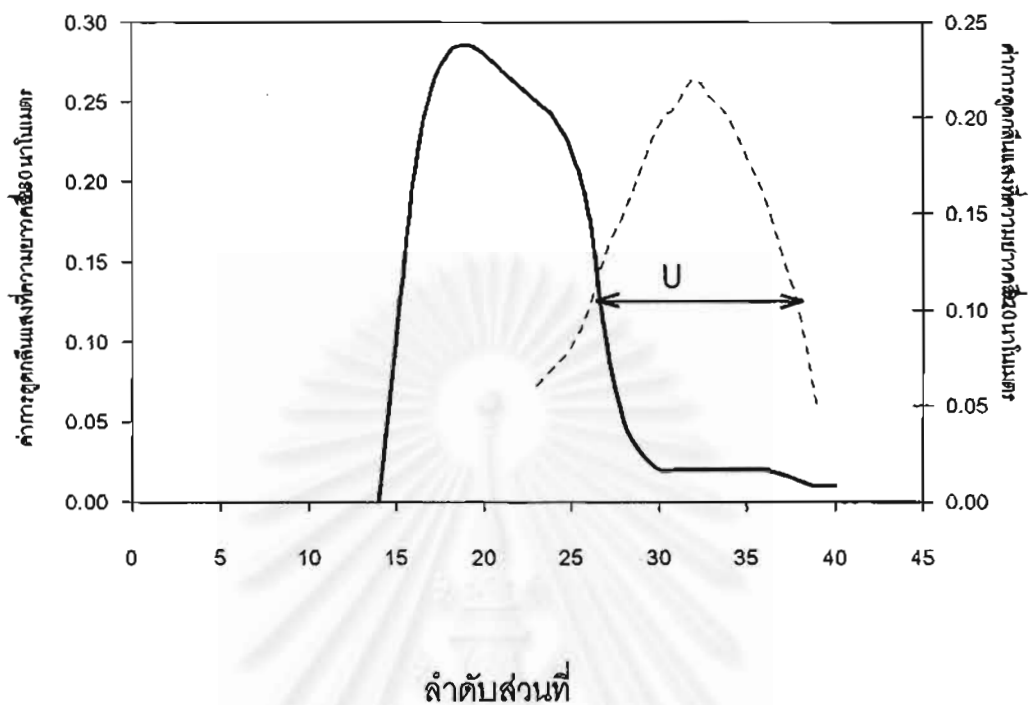
### 3.3.2.2 โครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60

นำไซแลเนส U ปริมาณ 21.52 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ในข้อ 3.3.2.1 มาผ่านคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60 จากรูปที่ 3.2 พบว่าไซแลเนส U ถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 25-38 ซึ่งอยู่หลังพีคโปรตีนส่วนใหญ่ รวมลำดับส่วนที่ 25-38 เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดยตกตะกอนด้วย 80 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าไซแลเนส U ที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้มีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 16.00 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีนและความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.69 เท่า

นำไซแลเนส B ปริมาณ 50.16 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ในข้อ 3.3.2.1 มาผ่านคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60 จากรูปที่ 3.3 พบว่าไซแลเนส B ถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 17-24 ซึ่งใกล้เคียงกับพีคของโปรตีนหลัก จากนั้นรวมลำดับส่วนที่ 17-24 เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดยตกตะกอนด้วย 80 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าไซแลเนส B ที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้มีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 41.81 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นสูงถึง 17.49 เท่า

จากการวิเคราะห์แอกติวิตีของเซลล์ในไซแลเนส B ที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้ พบว่ายังคงมีเซลล์สปนเบื่อนอยู่ 1.96 เปอร์เซ็นต์

ได้สรุปผลการทดลอง และขั้นตอนการทำไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ไว้ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.4



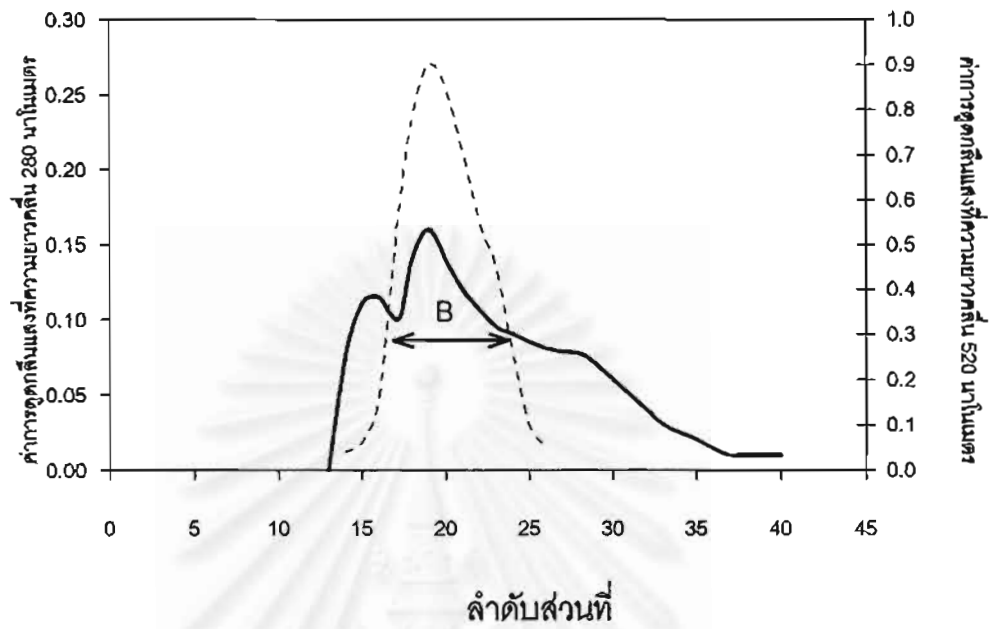
ลำดับส่วนที่

รูปที่ 3.2 การทำไซแลนเนส U ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60 เซโพรติน ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

———— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

- - - - - ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

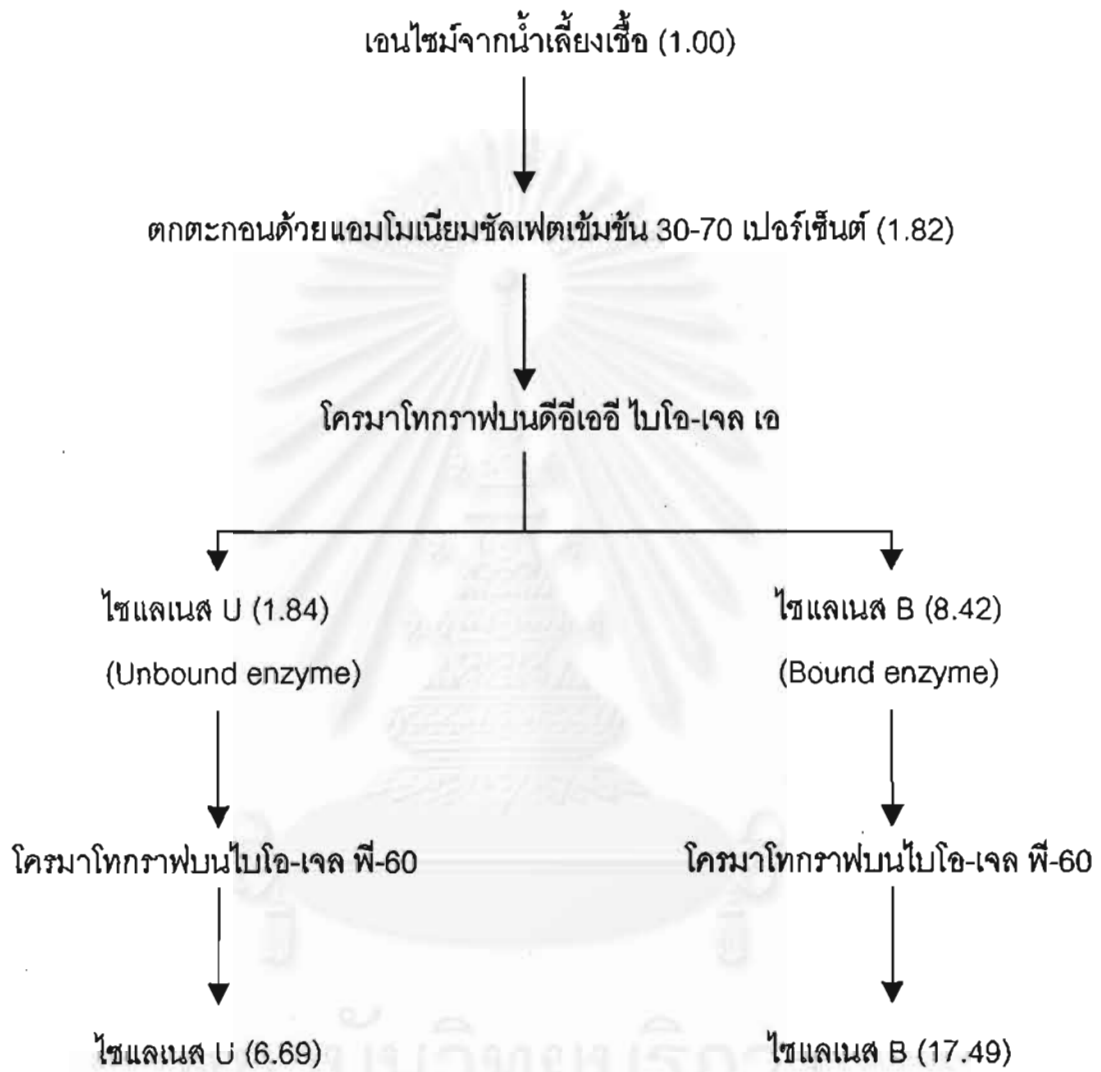
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 การทำไซแลนเนส B ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอเจล พี-60 ซะโปรตีน ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

———— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร  
 - - - - - ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

รูปที่ 3.4 สรุปขั้นตอนการทำไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

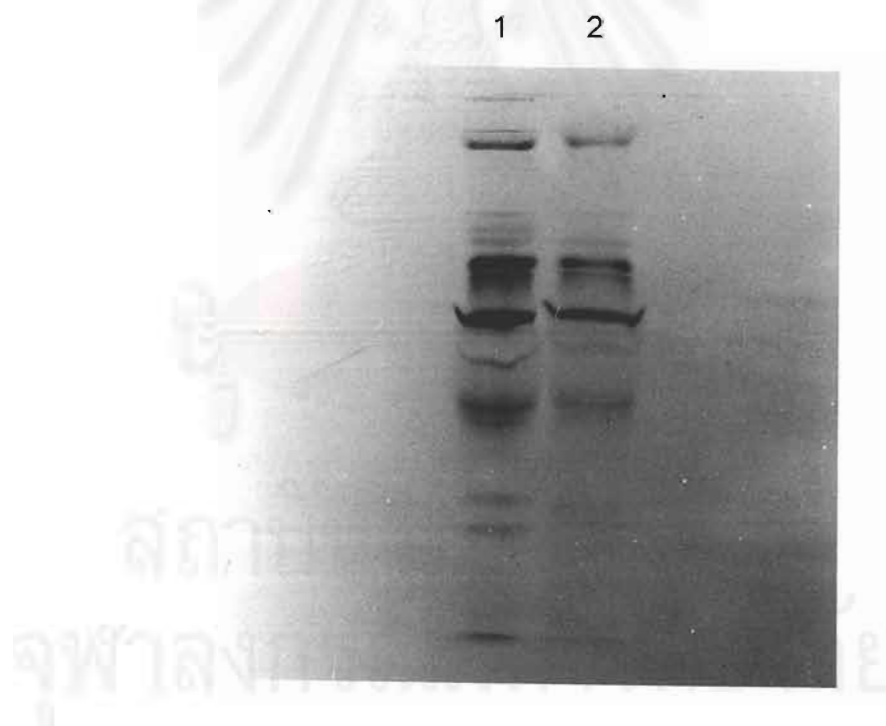


หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์เมื่อเทียบกับ  
เอนไซม์จากน้ำเลียงเข็ง

### 3.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซแลเนส B ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

การทดลองนี้ได้นำไซแลเนส B ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของโครมาโทกราฟีบนดีอีเอซี ไบโอ-เจล เอ และไบโอ-เจล พี-60 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความบริสุทธิ์โดยการทำให้โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแผ่น สำหรับไซแลเนส B ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ได้เนื่องจากมีความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนต่ำเกินไป

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.5 พบว่าจำนวนแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมในส่วนที่ผ่านโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 มีน้อยกว่าในส่วนที่ผ่านโครมาโทกราฟีบนดีอีเอซี ไบโอ-เจล เอ มาก ซึ่งสอดคล้องกับแอกติวิตีจำเพาะที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 3.2 อย่างไรก็ตาม แม้จำนวนแถบโปรตีนในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์จะลดลงมาก แต่ก็ยังปรากฏแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ ดังนั้นไซแลเนส B ที่เตรียมได้ในขั้นนี้ยังไม่จัดว่าบริสุทธิ์ถึงระดับ homogeneity



รูปที่ 3.5 การทำให้โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของไซแลเนส B ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย

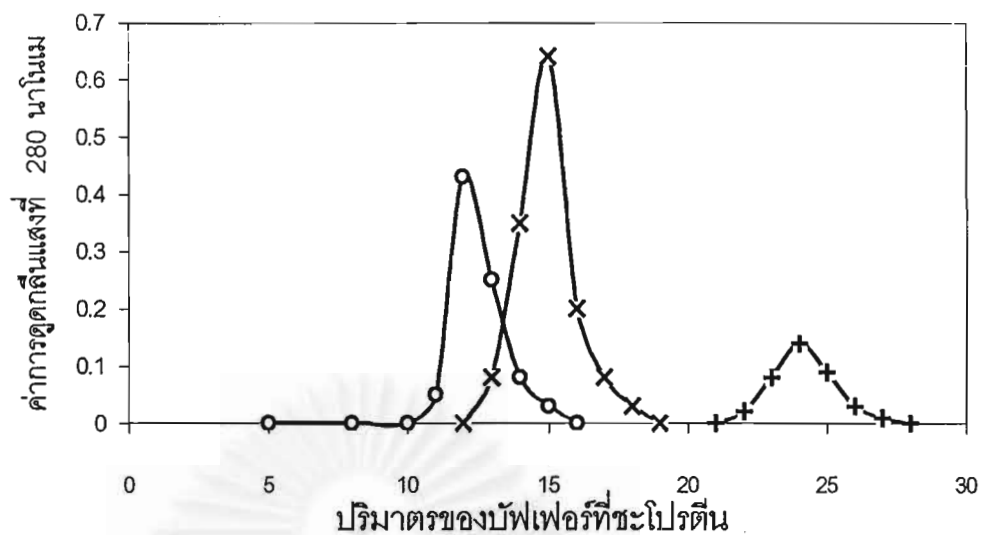
- 1 โครมาโทกราฟีบนดีอีเอซี ไบโอ-เจล เอ (ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม)
- 2 โครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 (ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม)

### 3.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส

#### 3.5.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำให้เจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60

การทดลองนี้ได้หาน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส U และไซแลเนส B โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยใช้โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลได้แก่ โบวีนซีรัม อัลบูมิน, โอวัลบูมิน และไซโทโครม ซี ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66,000, 45,000 และ 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ ผ่านลงคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.6, 3.7 และ 3.8 เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.9 จากกราฟดังกล่าวพบว่าไซแลเนส U และไซแลเนส B มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 และ 30,000 ดาลตัน ตามลำดับ

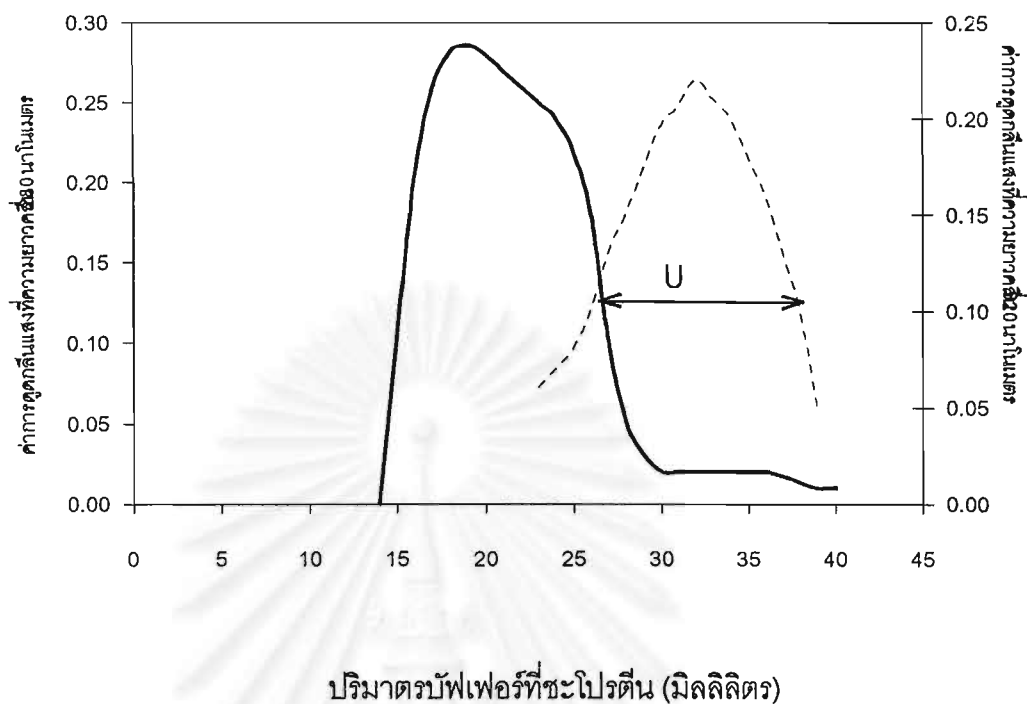




รูปที่ 3.6 การทำโครมาโทกราฟีบนไบโอเจล พี-60 ของโปรตีนมาตรฐาน

○—○	โบวินซีรัม อัลบูมิน	น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน
X—X	โอวัลบูมิน	น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน
+—+	ไซโทโครม ซี	น้ำหนักโมเลกุล 13,237 ดาลตัน

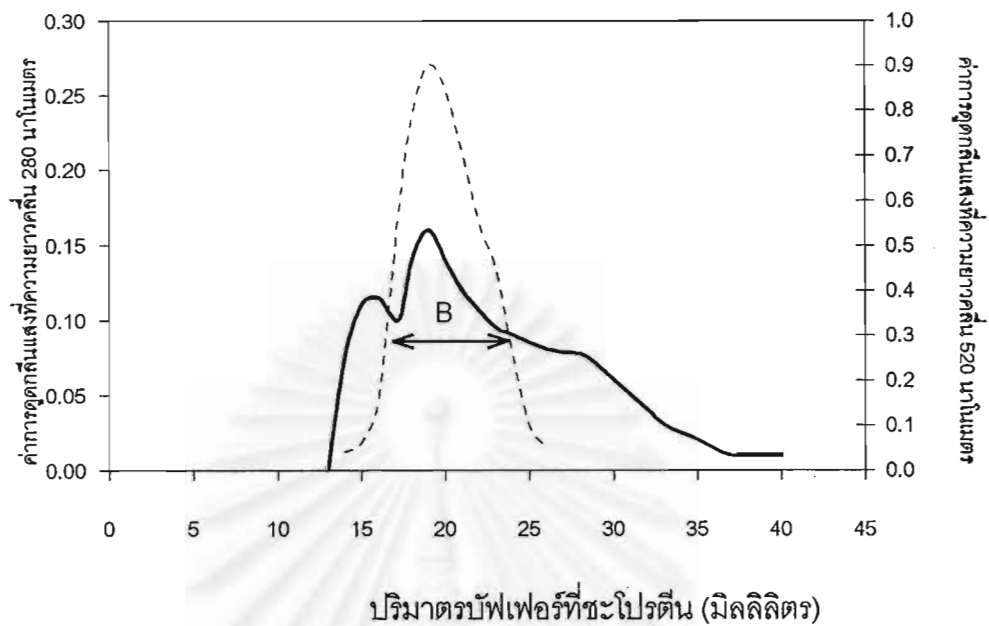




รูปที่ 3.7 การทำไซแลนส U ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60 ชะโปรตีน ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

———— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร  
 - - - - - ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

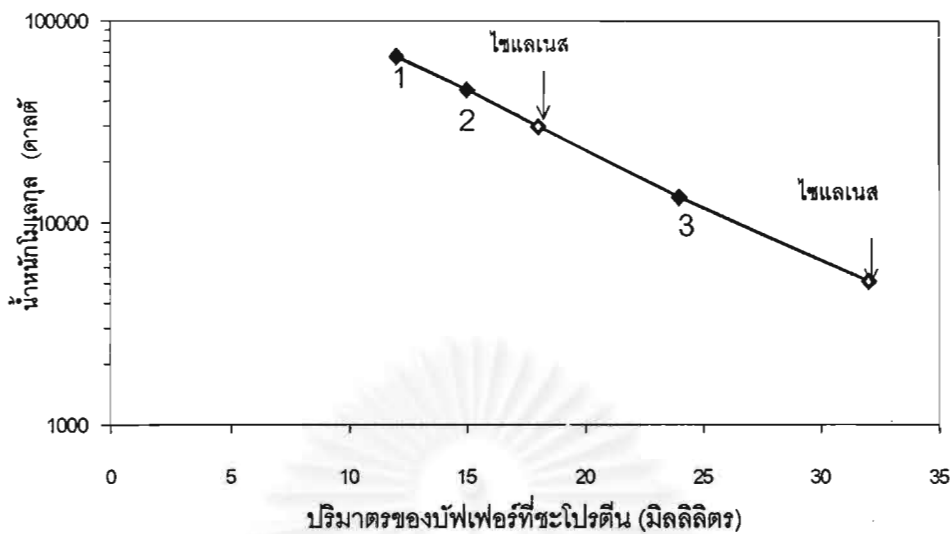
สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.8 การทำไซแลนต B ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอ-เจล พี-60 ชะโปรตีน ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

———— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร  
 - - - - - ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาณที่ใช้โปรตีนมาตรฐาน ไซแลเนส U และไซแลเนส B ออกจากคอลัมน์ไบโอเจล พี-60

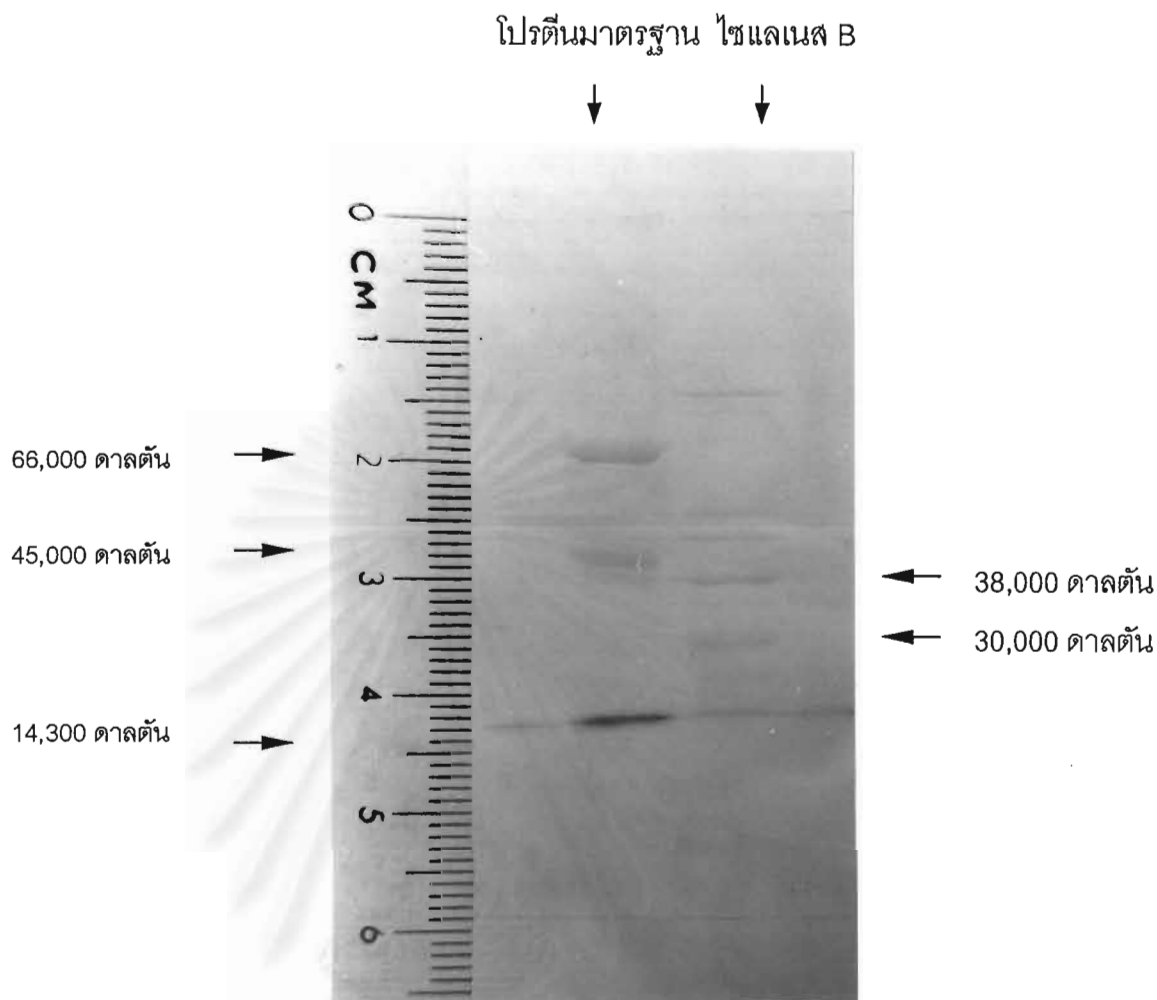
โดยมีโปรตีนมาตรฐานคือ

1. โบวีนซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน
2. โอวัลบูมิน (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน
3. ไซโทโครม ซี (cytochrome c) น้ำหนักโมเลกุล 13,237 ดาลตัน

### 3.5.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโทรฟิสิสบนโซเดียมโอดีเดซิล โพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโทรฟิสิสบนโซเดียมโอดีเดซิล โพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น ทำได้เฉพาะไซแลนเนส B เท่านั้น เนื่องจากไซแลนเนส U มีความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนต่ำเกินไป จนไม่สามารถวิเคราะห์โดยวิธีนี้

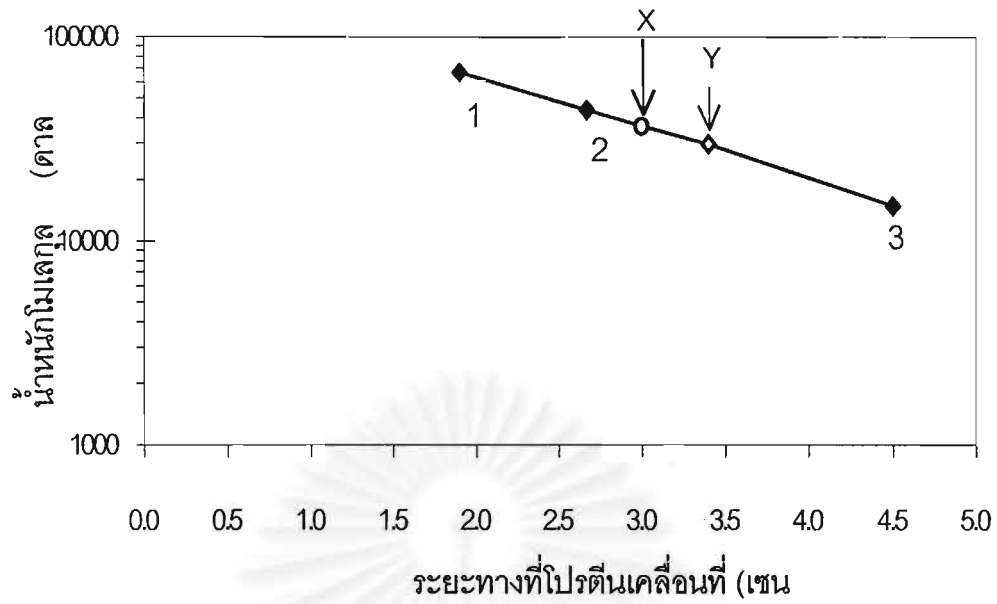
การทดลองนี้ทำโดยนำไซแลนเนส B ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนโครมาโทกราฟีบนโบไอ-เจล พี-60 มาทำอิเล็กโทรฟิสิสบนโซเดียมโอดีเดซิลซัลเฟตชนิดแผ่น โดยมีโบวีนซีรัม อัลบูมิน, โอวัลบูมิน และ ไลโซไซม์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66,000, 45,000, และ 14,300 ดาลตันตามลำดับ เป็นโปรตีนมาตรฐาน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.8 และการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานของค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโอดีเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลดังแสดงในรูปที่ 3.9 พบแถบโปรตีนเด่นชัดสองแถบให้ชื่อว่าโปรตีน X และ Y ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 38,000 และ 30,000 ดาลตันตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของไซแลนเนส B ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีเจลฟิลเทรชันในผลการทดลองที่ 3.5.1 แสดงว่าไซแลนเนส B เป็นเพปไทด์สายเดี่ยวมีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน ซึ่งตรงกับแถบโปรตีน Y ส่วนแถบโปรตีน X ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 38,000 ดาลตันนั้น อาจเป็นโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในไซแลนเนส B ที่เตรียมได้



รูปที่ 3.10 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของไซแลเนส B บนไซเตียมโคเดซิลโพลีอะคริลาไมด์ เจลชนิดแผ่น

เลนที่ 1 โปรตีนมาตรฐานประกอบด้วย โบวีนซีรัม อัลบูมิน, โอวัลบูมิน และ ไลโซไซม์ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66,000, 45,000 และ 14,300 ดาลตันตามลำดับ

เลนที่ 2 ไสแลเนส B ที่ผ่านการทำโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60



รูปที่ 3.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานและไซแลเนส B เคลื่อนที่บนซีเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส

โดยมีโปรตีนมาตรฐานได้แก่

1. โบวีนซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน
2. โอวัลบูมิน (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน
3. ไลโซไซม์ (Lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 14,300 ดาลตัน

X และ Y คือโปรตีนที่ผ่านการทำโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.6 การศึกษาสมบัติของไซแลเนส U และ ไซแลเนส B จาก *Streptomyces* sp. PC22

นำเอนไซม์ไซแลเนส U และ ไซแลเนส B ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายคือโครมาโทกราฟีบนโบไอ-เจล พี-60 มาศึกษาสมบัติต่างๆดังนี้

#### 3.6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

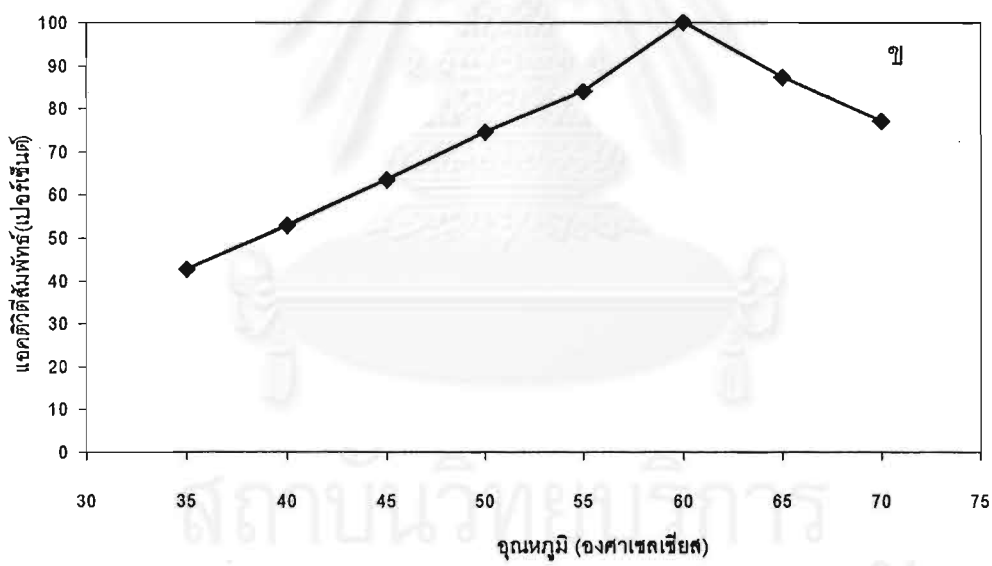
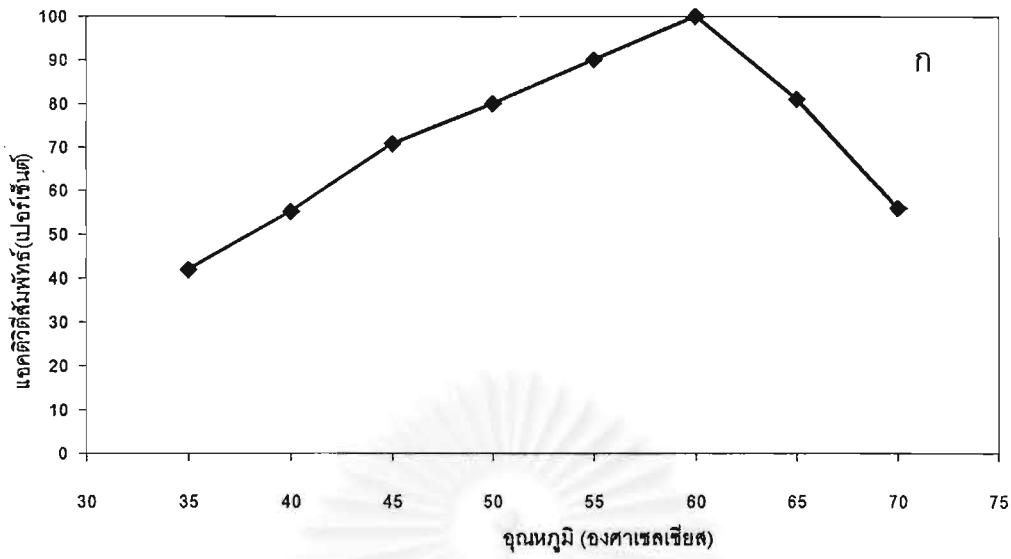
จากการทดลองบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 35-70 องศาเซลเซียส พบว่าไซแลเนส U และ ไซแลเนส B มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากันคือ 60 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 3.12

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองที่ 60 องศาเซลเซียส

#### 3.6.2 ผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่แปรผันความเป็นกรดในช่วง 4-9 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.13 พบว่าไซแลเนส U มีค่าความเป็นกรดที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงแคบคือ 5.0 ขณะที่ไซแลเนส B มีค่าความเป็นกรดที่เหมาะสมอยู่ในช่วงกว้างคือ 5.5-6.0 และยังพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดที่สูงกว่า 6 จนถึง 8 เอนไซม์นี้ยังคงมีแอกติวิตีสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าสูงสุด

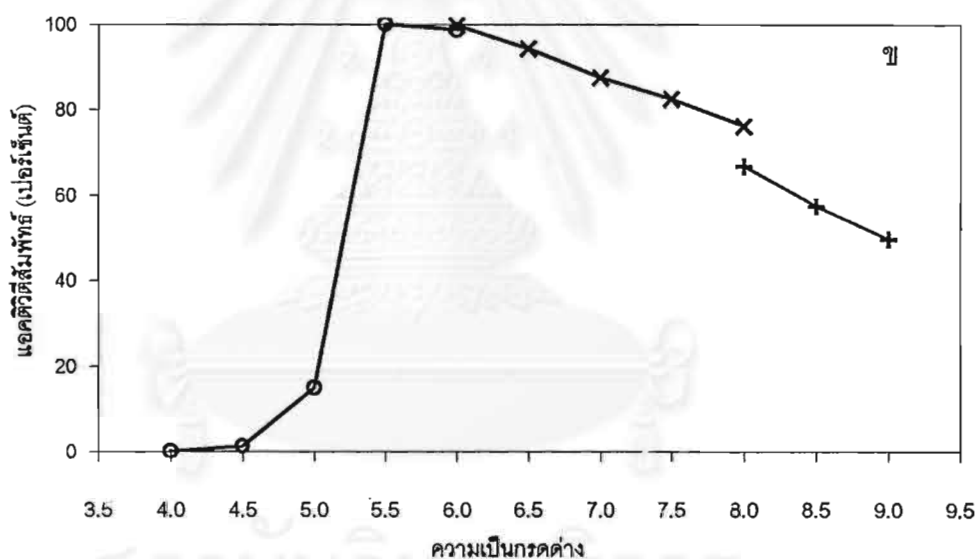
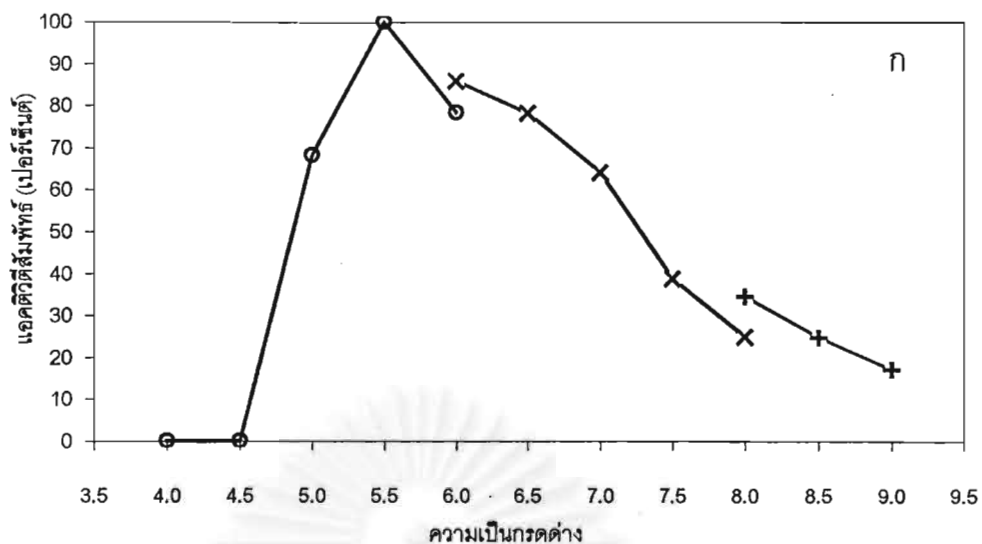
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.12 ผลของจุนหนุมิต่อการทำงานของไซแลนต U (ก) และ ไซแลนต B (ข)

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์





รูปที่ 3.13 ผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของไซแลเนส U (ก) และ ไซแลเนส B

(ข)

- อะซิเตท บัฟเฟอร์  
 X—X ฟอสเฟต บัฟเฟอร์  
 +—+ ทริส บัฟเฟอร์

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

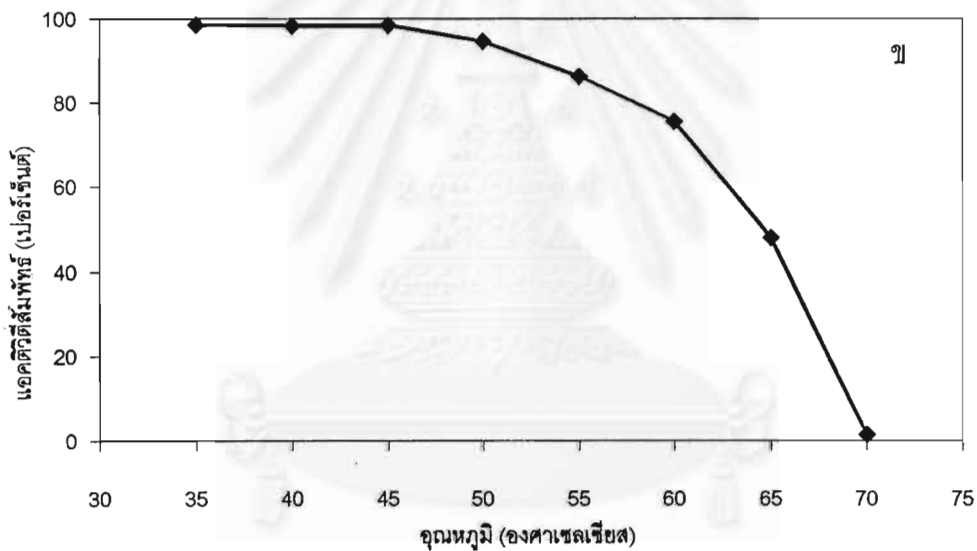
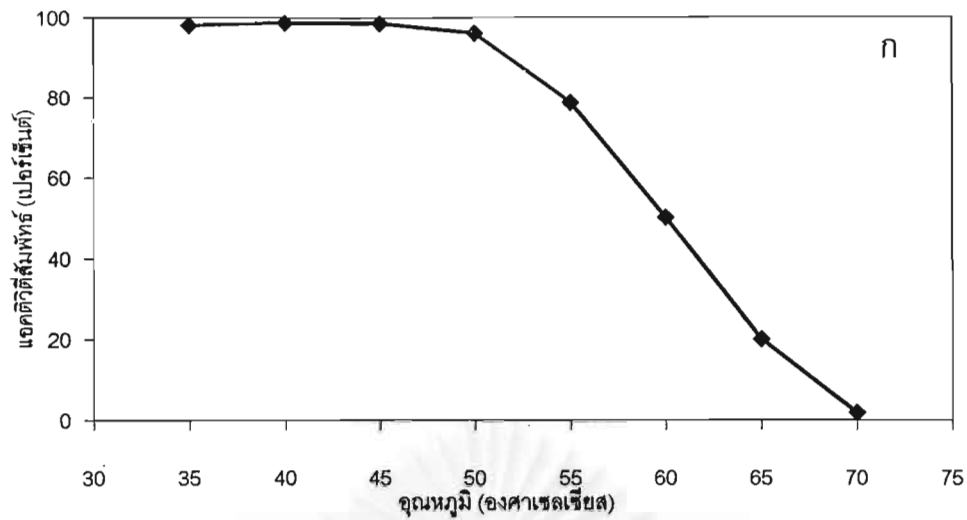
### 3.6.3 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

นำไซแลนเนส U และ ไซแลนเนส B มาบ่มที่อุณหภูมิ 35-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลืออยู่ โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.14 พบว่าทั้งไซแลนเนส U และไซแลนเนส B เสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 50 องศาเซลเซียส โดยมีแอกติวิตีคงเหลืออยู่ประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส ไซแลนเนส U จะสูญเสียแอกติวิตีเร็วกว่า ไซแลนเนส B โดยที่ 65 องศาเซลเซียส ไซแลนเนส U มีแอกติวิตีคงเหลืออยู่เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไซแลนเนส B มีแอกติวิตีเหลืออยู่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ทั้งสองสูญเสียแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์

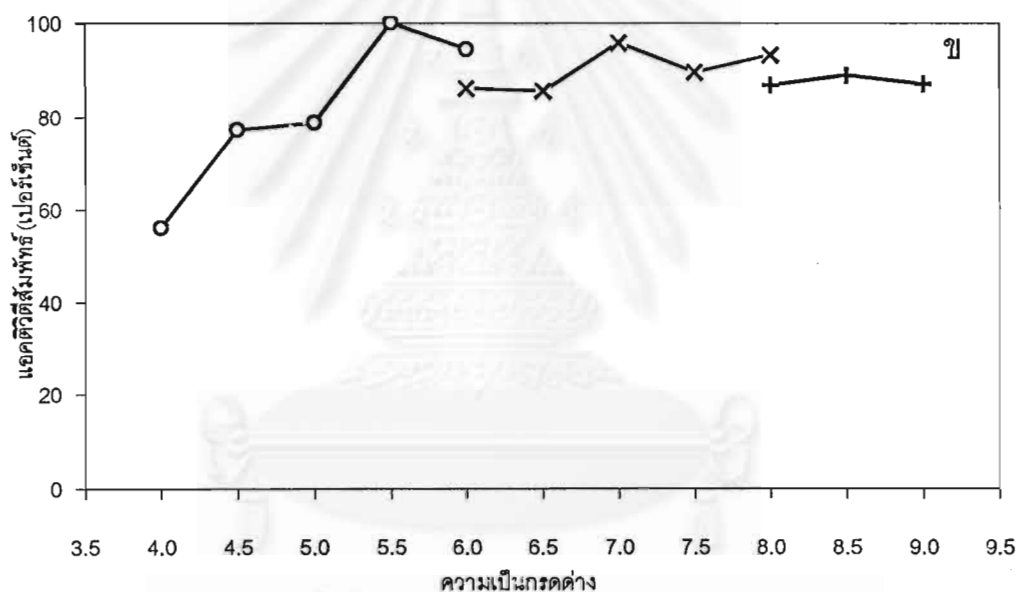
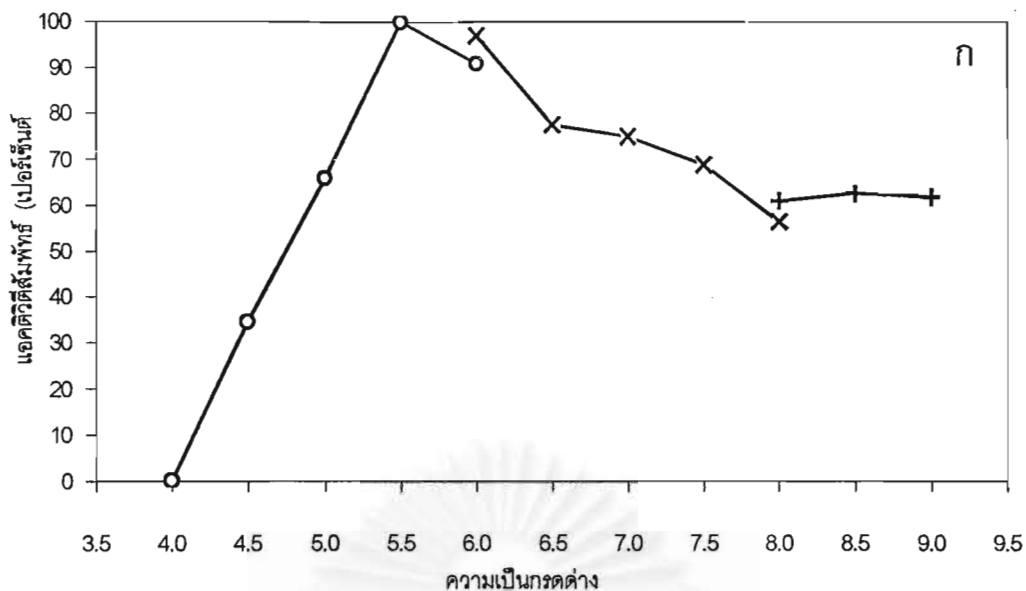
### 3.6.4 ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง

บ่มไซแลนเนส U และ ไซแลนเนส B ในบัฟเฟอร์ที่แปรค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4-9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลือ โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.15 พบว่าไซแลนเนส U เสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงแคบคือตั้งแต่ 5.5-6.0 แต่อย่างไรก็ตามที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 และ 6.5-7.5 ไซแลนเนส U ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และในช่วง 8-9 ก็ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไซแลนเนส B เสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-9.0 โดยที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.5-6.0 มีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ และในช่วง 6.0-9.0 ยังมีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.14 ความเสถียรของไซแลนเนส U (ก) และไซแลนเนส B (ข) ต่ออุณหภูมิโดยบ่ม เอนไซม์ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยกำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3.15 ความเสถียรของไซแลนเนส U (ก) และไซแลนเนส B (ข) ต่อความเป็นกรดต่าง โดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลือภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยกำหนดให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

- อะซิเตทบัฟเฟอร์
- X—X ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- +—+ ทริสบัฟเฟอร์

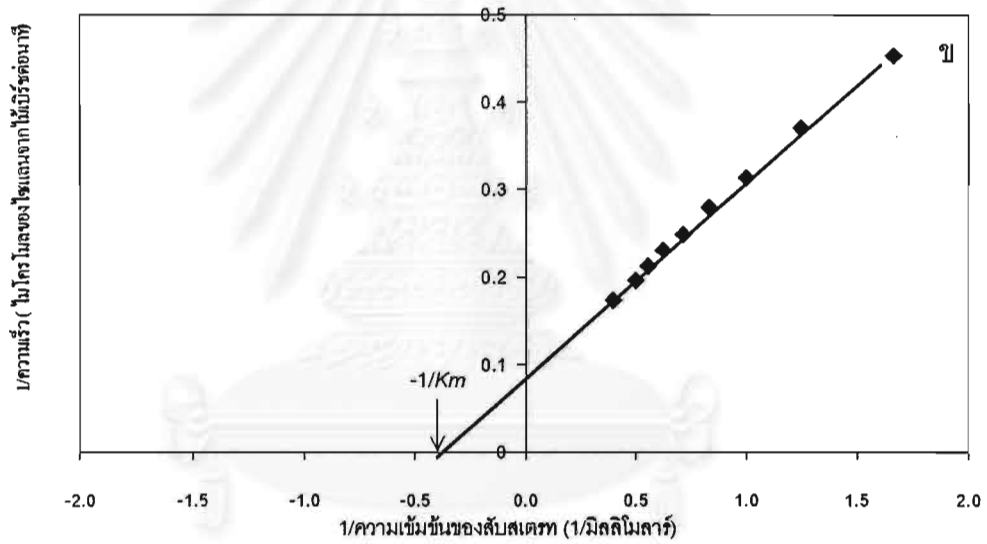
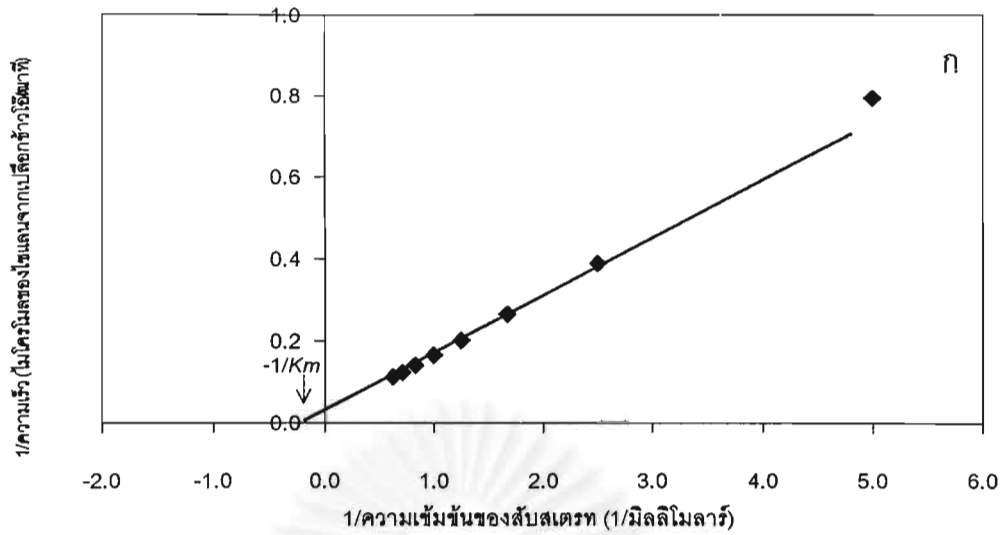
### 3.6.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ( $K_m$ )

เนื่องจากไซแลนจากพืชต่างชนิดกัน จะมีองค์ประกอบย่อยแตกต่างกันดังกล่าวไว้ในบทนำ ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาความจำเพาะของไซแลเนส U และไซแลเนส B ต่อไซแลนที่สกัดได้จากพืชสองชนิดคือจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelts) และจากไม้เบิร์ช (Birchwood) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.16 และ รูปที่ 3.17 พบว่าไซแลเนส U มีค่า  $K_m$  สำหรับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเท่ากับ 5.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ  $K_m$  สำหรับไซแลนจากไม้เบิร์ชเท่ากับ 2.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนไซแลเนส B มีค่า  $K_m$  สำหรับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเท่ากับ 1.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ  $K_m$  สำหรับไซแลนจากไม้เบิร์ชเท่ากับ 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อไซแลนไม้เบิร์ชมากกว่าไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต นอกจากนี้ ไซแลเนส B ยังมีความจำเพาะต่อสับสเตรททั้งสองสูงกว่าไซแลเนส U

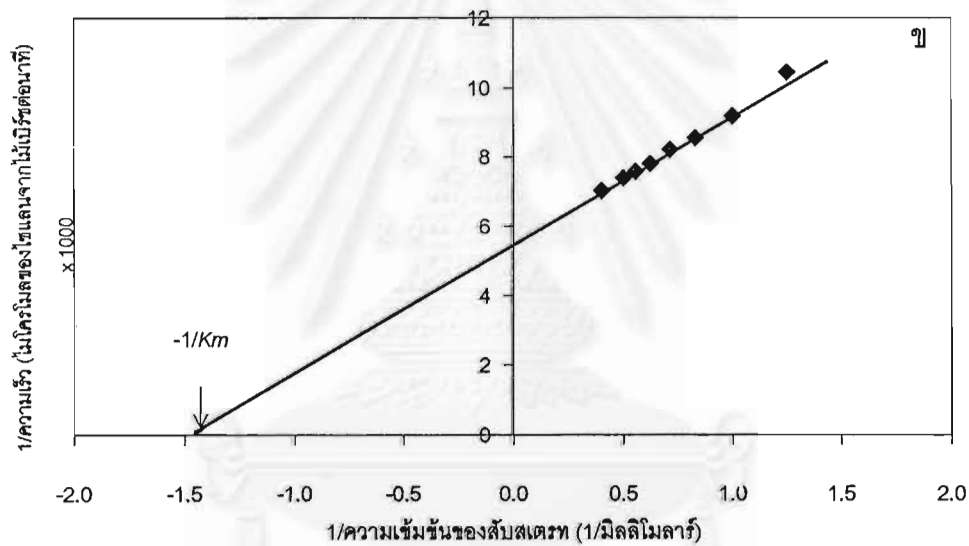
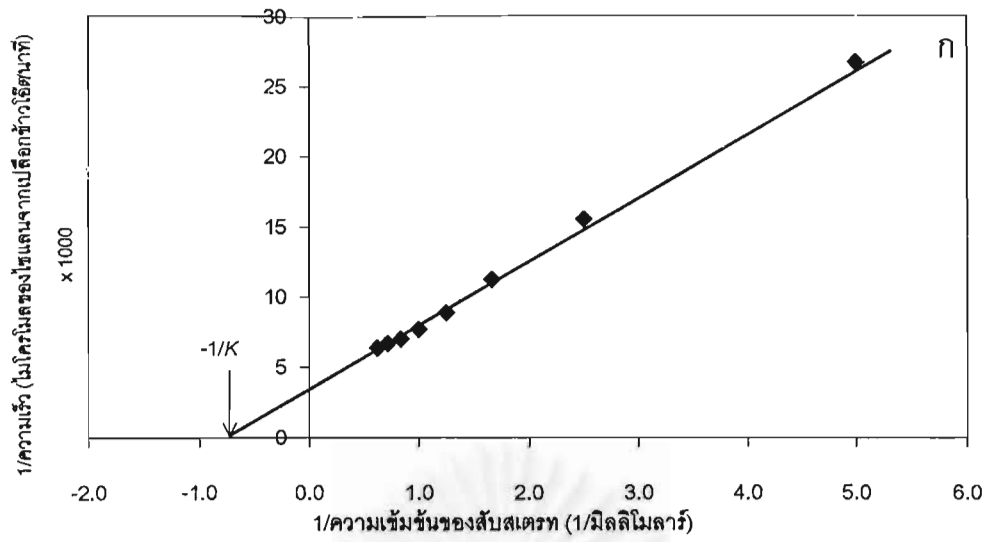
### 3.6.6 ผลของไซโลสและอะราบินอสต่อการทำงานของไซแลเนส

เนื่องจากไซโลสและอะราบินอสเป็นองค์ประกอบหน่วยย่อยของไซแลน การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ต้องใช้อิโนซิโมหลายชนิดร่วมกันดังกล่าวแล้วในบทที่ 1 ซึ่งจะทำให้ได้ไซโลสและอะราบินอสเกิดขึ้นในปฏิกิริยา ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาผลของไซโลสและอะราบินอสต่อการทำงานของไซแลเนส U และไซแลเนส B การทดลองทำโดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้มาย่อยสลายไซแลนในภาวะที่มีไซโลสหรืออะราบินอสที่มีความเข้มข้นสุดท้ายแปรผันตั้งแต่ 0.1 ถึง 10 มิลลิโมลาร์

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.4 พบว่าไซโลสและอะราบินอสไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของทั้งไซแลเนส U และ ไซแลเนส B



รูปที่ 3.16 โลไนวีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า  $K_m$  ของไซแลเนส U เมื่อมีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (ก) และจากไม้เบิร์ช (ข) เป็นสับสเตรท



รูปที่ 3.17 โลนีวีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า  $K_m$  ของไซแลนส B เมื่อมีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (ก) และจากไม้เบิร์ช (ข) เป็นสับสเตรท

ตารางที่ 3.3 ผลของไซโลสต่อแอกติวิตีของไซแลเนส

ความเข้มข้นของไซโลส	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ไซแลเนส U	ไซแลเนส B
0.1 mM	99.42	100.96
1.0 mM	101.28	97.68
10.0 mM	100.79	99.03

\* แอกติวิตีสัมพัทธ์ คำนวณโดยให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่มีไซโลสเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.4 ผลของอะราบิโนสต่อแอกติวิตีของไซแลเนส

ความเข้มข้นของอะราบิโนส	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ไซแลเนส U	ไซแลเนส B
0.1 mM	101.16	99.04
1.0 mM	100.00	101.77
10.0 mM	101.58	101.00

\* แอกติวิตีสัมพัทธ์ คำนวณโดยให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่มีอะราบิโนสเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.6.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์

มีรายงานการยับยั้งการทำงานของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยอิออนโลหะหลายชนิด เช่น ไซแลเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BP-23 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์โดย  $\text{Sn}^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Blanco และคณะ; 1995) ไซแลเนสจาก *Trichoderma reesei* PC-3-7 ถูกยับยั้งการทำงานโดย  $\text{Mn}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (Xu และคณะ; 1998) ส่วน Matte และ Forsberg (1992) รายงานว่า เอนโดไซแลเนส 1 และเอนโดไซแลเนส 2 ที่สร้างจาก *Fibrobacter succinogenes* S85 ต่างก็ถูกยับยั้งการทำงานโดย  $\text{Hg}^{2+}$  และ  $\text{Cu}^{2+}$  เหมือนกัน

การทดลองนี้จึงศึกษาผลของอิออนโลหะชนิดต่างๆ ต่อการทำงานของไซแลเนส U และ ไซแลเนส B โดยการเติมอิออนโลหะชนิดต่างๆ ที่แปรให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.1 ถึง 10 มิลลิโมลาร์ ลงในปฏิกิริยาของการย่อยสลายไซแลน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.5 พบว่า  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  มีผลยับยั้งแอกติวิตีของไซแลเนส U โดย  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  เป็นสารยับยั้งที่รุนแรงที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

สำหรับไซแลเนส B ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.6 พบว่า  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ โดย  $\text{Hg}^{2+}$  มีผลรุนแรงที่สุด โดยที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ  $\text{Cu}^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งแอกติวิตีได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.7 ได้สรุปผลการศึกษาสมบัติของไซแลเนส U และ ไซแลเนส B จาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วระดับหนึ่ง

ตารางที่ 3.5 ผลของชนิดและปริมาณของอิออนโลหะต่อการทำงานของไซแลเนส U

ชนิดของอิออนโลหะ	* แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	ความเข้มข้นของอิออนโลหะ		
	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM
CaCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	98.74	97.54	98.40
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	95.30	78.82	36.20
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	94.13	85.87	37.65
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	95.56	97.72	100.48
HgCl <sub>2</sub>	43.52	38.82	0.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	92.95	85.87	69.40
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	79.13	15.30	0.00
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	89.40	90.60	88.22
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	71.78	48.22	34.13

\* แอคติวิตีสัมพัทธ์ คำนวณโดยให้แอคติวิตีของไซแลเนส U ที่ไม่มีอิออนโลหะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.6 ผลของชนิดและปริมาณของอิออนโลหะต่อการทำงานของไซแลเนส B

ชนิดอิออนของโลหะ	* แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	ความเข้มข้นของอิออนโลหะ		
	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM
CaCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	99.60	100.40	100.40
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	97.22	101.59	82.54
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	89.88	64.29	7.34
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	89.48	70.04	61.11
HgCl <sub>2</sub>	5.36	0.00	0.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	94.25	95.24	98.41
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	91.27	86.51	79.76
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	98.17	98.49	97.33
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	95.63	87.10	71.23

\* แอคติวิตีสัมพัทธ์ คำนวณโดยให้แอคติวิตีของไซแลเนส B ที่ไม่มีอิออนโลหะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.7 สรุปสมบัติของไซแลนเนส U และไซแลนเนส B จาก *Streptomyces* sp.

PC22

	ไซแลนเนส U	ไซแลนเนส B
-น้ำหนักโมเลกุล:(ดาลตัน)		
SDS-PAGE	-	30,000
เจลฟิลเตรชัน	5,000	30,000
-จุดหนุมิที่เหมาะสม	60	60
-ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม	5.5	5.5-6.0
-เสถียรต่อจุดหนุมิสูงถึง	50	55
-เสถียรต่อค่าความเป็นกรดต่าง	5.5-6.0	5.5-9.0
- $K_m$ ต่อไซแลนจาก		
เปลือกข้าวโอ๊ต (มก./มล.)	5.67	1.65
ไม้เบิร์ช (มก./มล.)	2.76	0.63
-อิออนยับยั้งแอกติวิตี	$Co^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ และ $Zn^{2+}$	$Cu^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ และ $Zn^{2+}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

*Streptomyces* sp. PC22 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย โดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) และพบว่าสร้างไซแลเนสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ *Streptomyces* spp. ต่างๆ ที่แยกได้ทั้งหมด และจากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์นี้ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 55-70 องศาเซลเซียส และ 5.5-7.0 ตามลำดับ เอนไซม์นี้เสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส และเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.0-9.0 (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539)

งานวิจัยนี้จึงได้ทำไซแลเนสจากจุลินทรีย์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ โดยในขั้นตอนแรกได้ทดลองตกตะกอนลำดับส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตพบว่าเอนไซม์นี้ตกตะกอนได้ดีในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 40-60 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามได้เลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตใน ช่วง 30-70 เปอร์เซ็นต์ในการตกตะกอนเอนไซม์เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์มากที่สุดเพื่อนำไป ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัว กลางแลกเปลี่ยนประจุภาคลบคือดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ พบว่าได้โปรตีน 2 ชนิดที่มีแอกติวิตี ของไซแลเนส คือ ไซแลเนส U ซึ่งไม่จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุและไซแลเนส B ซึ่งถูก ชะออกจากตัวกลางโดยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 150-300 มิลลิโมลาร์ และขั้นตอนสุดท้ายของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์คือนำไซแลเนสที่ได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไบโอ- เจล พี-60 ซึ่งแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 3,000-60,000 ดาลตัน หลังจากทำ โครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 แล้วไซแลเนส U มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.69 เท่า และมี ปริมาณเอนไซม์เหลืออยู่ 1.35 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไซแลเนส B มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.49 เท่า และมีปริมาณเอนไซม์เหลืออยู่ 13.65 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล โดยการทำโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 เปรียบ เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า ไซแลเนส U และ ไซแลเนส B มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ

5,000 และ 30,000 ดาลตัน ตามลำดับ และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส B ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนไซเดียมเดดิซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลพบว่าไซแลเนส B มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30,000 ดาลตัน จากข้อมูลข้างต้นของการทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์จึงสรุปได้ว่า *Streptomyces* sp. PC22 สร้างไซแลเนสได้ 2 ชนิด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับหลายรายงานที่พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตไซแลเนสได้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่น Ito และคณะ (1992) พบว่า *Aspergillus kawachii* ผลิตไซแลเนสได้ 3 ชนิดคือ XylA, XylB และ XylC ขณะที่ Ruiz-Aribas และคณะ (1995) พบว่า *Streptomyces halstedii* JM8 ผลิตไซแลเนสได้ 2 ชนิด คือ Xyl1L และ Xyl1S แต่ก็มีผู้รายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิดก็ผลิตไซแลเนสได้เพียงชนิดเดียว เช่น Lopez-Fernandez และคณะ (1998) พบว่า *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336 ผลิตไซแลเนสได้หนึ่งชนิด และ Xu และคณะ (1998) พบว่า *Trichoderma reesei* PC-3-7 ผลิตไซแลเนสได้หนึ่งชนิดเช่นเดียวกัน

จากรายงานต่างๆ ดังได้กล่าวในบทที่ 1 จะเห็นได้ว่าไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 21,000 ถึง 60,000 ดาลตัน แต่ก็มีรายงานฉบับหนึ่งโดย Grabski และ Jeffries (1991) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสจาก *Streptomyces roseicleroticus* ที่วิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบน ซูปเปอร์โอส 12 เท่ากับ 5,500 ดาลตัน แต่เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนไซเดียมเดดิซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลกลับได้น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 22,600 ดาลตัน รายงานนี้ยังได้อธิบายถึงสาเหตุที่การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนซูปเปอร์โอส 12 แล้วได้เอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยมากเป็น 2 แนวทางคือ 1). เอนไซม์สามารถจับกับตัวกลางในคอลัมน์ ทำให้ถูกชะออกมาช้ากว่าที่ควรจะเป็น และ 2). เอนไซม์นี้อาจจะเป็นโปรตีนที่มีรูปทรงเป็นเส้นยาวหรือเป็นทรงรี ทำให้แทรกซึมไปในตัวกลางในคอลัมน์ได้จึงทำให้ถูกชะออกมาภายหลัง ดังนั้นไซแลเนส B ซึ่งวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-60 แล้วได้น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5,000 ดาลตันนั้น อาจเกิดจากปัญหาเดียวกันกับรายงานข้างต้น แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่สามารถนำไซแลเนส B มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนไซเดียมเดดิซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลได้เพราะมีปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนน้อยเกินไป จึงทำให้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส B ที่วิเคราะห์ได้เป็นค่าที่แท้จริงหรือไม่

งานวิจัยนี้ยังได้วิเคราะห์แอกติวิตีของเซลลูเลสควบคู่ไปกับไซแลเนส เนื่องจากมีผู้รายงานว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลเนสได้มักผลิตเซลลูเลสได้ด้วยเช่น *Trichoderma longibrachiatum* ผลิตไซแลเนสและเซลลูเลสได้ 20 และ 0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Royer และ Nakas; 1990) และยังมีบางรายงานพบไซแลเนสที่สามารถแสดงแอกติวิตีของเซลลูเลสได้ด้วยเช่นกันเช่น ไซแลเนสจาก *Streptomyces roseicleroticus* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่า มีแอกติวิตีของเซลลูเลส อยู่ 0.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Grabski และ Jeffries; 1991) หรือรายงานของ Ito และคณะ(1992) พบว่าไซแลเนส 2 ใน 3 ชนิดคือ XylA และ XylB จาก *Aspergillus kawachii* แสดงแอกติวิตีของเซลลูเลสด้วย สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าไซแลเนส U ไม่มีแอกติวิตีของเซลลูเลส ขณะที่ ไซแลเนส B ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีบนโบโอ-เจล พี-60 มีแอกติวิตีของเซลลูเลสอยู่ด้วย 1.96 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไซแลเนสทั้งหมด และจากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซแลเนส B ที่เตรียมได้โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้ยังไม่บริสุทธิ์ถึงระดับ homogeneity ดังนั้นแอกติวิตีของเซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จึงน่าจะเกิดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์นี้มากับไซแลเนสในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

การศึกษาความจำเพาะของไซแลเนสต่อสับสเตรทคือไซแลน พบว่าไซแลนที่ได้จากแหล่งต่างๆ มีองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยไซแลนที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้คือไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ซึ่งมีส่วนประกอบของกลูโคสและอะราบินอสประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ และไซแลนจากไม้เบิร์ชมีองค์ประกอบเป็นไซโลสอยู่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Sigma, 1993) ผลการวิเคราะห์ค่า  $K_m$  ของไซแลเนส U ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไซแลนจากไม้เบิร์ช มีค่าเท่ากับ 5.67 และ 2.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ค่า  $K_m$  ของไซแลเนส B ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไซแลนจากไม้เบิร์ช มีค่าเท่ากับ 1.65 และ 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงว่าไซแลเนส B มีความจำเพาะต่อสับสเตรททั้งสองสูงกว่าไซแลเนส U และเมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของไซโลสในไซแลนจากไม้เบิร์ชที่สูงกว่าไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต มีผลทำให้เอนไซม์ทั้งสองจำเพาะต่อไซแลนจากไม้เบิร์ชมากกว่าไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ดังมีรายงานอื่นๆ สนับสนุนดังต่อไปนี้ ไซแลเนสจาก *Trichoderma reesei* PC-3-7 มีค่า  $K_m$  ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไซแลนจากไม้เบิร์ชเท่ากับ 6.25 และ 2.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Xu และคณะ, 1998) ไซแลเนส CX-I และ CX-II จาก *Cephalosporium* sp. สาย

พันธุ์ RYM-202 มีค่า  $K_m$  ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต เท่ากับ 5.26 และ 4.16 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า  $K_m$  ต่อไซแลนจากไม้เบิร์ชเท่ากับ 3.18 และ 2.20 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ (Kang และคณะ, 1996) และไซแลนจาก *Aspergillus nidulans* มีค่า  $K_m$  ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไซแลนจากไม้เบิร์ชเท่ากับ 4.15 และ 1.78 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ (Fernandez-Espinar และคณะ, 1994)

การศึกษาอิออนโลหะที่ยับยั้งการทำงานของไซแลนจาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่า ไซแลน U ถูกยับยั้งด้วย  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$  โดยปรอทและแมงกานีสมีผลในการยับยั้งที่รุนแรงที่สุด ส่วนไซแลน B ถูกยับยั้งด้วย  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$  โดยปรอทมีผลในการยับยั้งที่รุนแรงที่สุด ส่วนไซแลนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ก็ถูกยับยั้งได้ด้วยอิออนโลหะชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกัน เช่น ไซแลนจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BP-23 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์โดย  $Sn^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Blanco และคณะ, 1998) ไซแลนจาก *Trichoderma reesei* PC-3-7 ถูกยับยั้งการทำงานโดย  $Mn^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (Xu และคณะ, 1998) และ Kimura และคณะ (1995) รายงานว่าไซแลน 3 ชนิดจาก *Aspergillus sojae* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วคือ X-I, X-II-A และ X-II-B ถูกยับยั้งโดยอิออนโลหะที่ต่างกันคือ X-I ถูกยับยั้งโดย  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  และ  $Fe^{3+}$  ส่วน X-II-A ถูกยับยั้งโดย  $Mn^{2+}$  อย่างเดียว และ X-II-B ถูกยับยั้งโดย  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$  และ  $Fe^{3+}$

ตารางที่ 4.1 ได้สรุปเปรียบเทียบสมบัติของไซแลน U และไซแลน B กับสมบัติโดยรวมของเอนไซม์ทั้งสองนี้ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (สุมาลี อัจฉริธรรม, 2539) จะเห็นว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานและอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความเสถียรสูงกว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนปนเปื้อนมีส่วนช่วยป้องกันหรือลดการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์จากความร้อน นอกจากนั้นยังได้เปรียบเทียบสมบัติของไซแลนที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้กับไซแลนจากจุลินทรีย์ต่างๆ ที่มีผู้อื่นรายงานไว้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไซแลนต่างชนิดกันมีความหลากหลายทางสมบัติของเอนไซม์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ



ตารางที่ 4.1 สมบัติของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

ไซแลเนสจากจุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด ค่าที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อ อุณหภูมิ	ความเสถียรต่อ ความเป็นกรดต่าง	เอกสารอ้างอิง
ไซแลเนส U จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22	60	5.5	50	5.5-6.0	งานวิจัยนี้
ไซแลเนส B จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22	60	5.5-6.0	55	5.5-9.0	งานวิจัยนี้
ไซแลเนสที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22	55-70	5.5-7.0	60	4.0-9.0	สุมาลี อึ้งใจธรรม; 2539
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT3336	50	6.0	50	5.0-8.0	Lopez-Fernandez และคณะ; 1998
Xys1L จาก <i>Streptomyces halstedii</i> JM8	60	6.3	50	4.0-10.0	Ruiz-Arribas และคณะ; 1995
Xys1S จาก <i>Streptomyces halstedii</i> JM8	60	6.3	50	4.0-10.0	Ruiz-Arribas และคณะ; 1995
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ BP-23	50	5.5	55	สูงถึง 11.0	Blanco และคณะ; 1995
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-1	60	5.5	50	5.0-9.0	Ratanakhonokchai และคณะ; 1999
CX-I จาก <i>Cephalosporium</i> sp. RYM-202	50	7.5	50	5.5-12.0	Kang และคณะ; 1996
CX-II จาก <i>Cephalosporium</i> sp. RYM-202	50	8.0	50	5.5-12.0	Kang และคณะ; 1996
Xylanase I จาก <i>Fusarium oxysporum</i> F3	60	6.0	45	9.0-10.0	Christakopoulos และคณะ; 1996
Xylanase II จาก <i>Fusarium oxysporum</i> F3	55	6.0	45	7.0-9.0	Christakopoulos และคณะ; 1996
X-I จาก <i>Aspergillus sojae</i>	60	5.0	50	5.0-8.0	Kimura และคณะ; 1995
X-II-A จาก <i>Aspergillus sojae</i>	50	5.0	50	5.0-9.0	Kimura และคณะ; 1995
X-II-B จาก <i>Aspergillus sojae</i>	60	5.5	35	5.0-8.0	Kimura และคณะ; 1995

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

สุมาลี อึ้งใจธรรม. 2539. ไซแลเนสและบีตาไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* spp. ที่ชอบร้อนและชอบต่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

Angelo, R., Aquirre, C., Curotto, E., Esposito, E., Fontana, J.D., Baron, M., Milagres, A.M.F., and Duran, N. 1997. Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus* sp. (2MI strain). Biotechnol. Appl. Biochem. 25: 19-27.

Beldman, G., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M., Searle-van Leeuwen, M.F., and Pilnik, W. 1988. Specific and nonspecific glucanases from *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng. 31: 160-167.

Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M., and Kluepfel, D. 1997. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. J. Biotechnol. 57: 151-166.

Blanco, A., Vidal, T., Colom, J.F., and Javier Pastor, F.I. 1995. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. Appl. Environ. Microbiol. 61(12): 4468-4470.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Breccia, J.D., Sineriz, F., Baigori, M.D., Castro, G.R., and Hatti-Kaul, R. 1998. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzym. Microbiol. Technol. 22: 42-49.

- Bronnenmeier, K., Kern, A., Liebl, W., and Staudenbauer, W.L. 1995. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. Appl. Environ. Microbiol. 61(4): 1399-1407.
- Chaudary, P., and Deobagkar, D.N. 1997. Purification and characterization of xylanases from *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353. Biotechnol. Appl. Biochem. 25: 127-133.
- Christakopoulos, P., Nerinchx, W., Kebos, D., Macris, B., and Claeysens, M. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. J. Biotechnol. 51: 181-189.
- DePaula Silveira, F.Q., de Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., Milagres, A.M.F., de Medeiros, C.L., and Filho, E.X.F. 1999. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. J. Industrial. Microbiol. Biotechnol. 23: 682-685.
- Dekker, R.F., and Richards, G.N. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Biochem. 32: 277-352.
- Dupont, C., Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., and Kluefel, D. 1998. Substrate-binding domains of xylanases from *Streptomyces lividans*: characterization of a new family of xylan-binding domains. Biochem J. 330: 41-45.
- Fernandez-Espinar, M.T., Pinaga, F., de Graaff, L., Visser, J., Ramon, D., and Valles, S. 1994. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 555-562.

- Filho, E.X.F., Puls, J., and Coughlam, M.P. 1996. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. Appl. Environ. Microbiol. 62(1): 168-173.
- Flint, H.I., Whitehead, T.R., Martin, J.C., and Gasparic, A. 1997. Interrupted catalytic domain structures in xylanases from two distantly related strains of *Prevotella Ruminicola*. Biochimica et Biophysica. 1337: 161-165.
- Flores, M.E., Perez, R., and Huitron, C. 1997.  $\beta$ -xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Letters Appl. Microbiol. 24: 410-416.
- Frederick, M.M., Kiang, C.H., Frederick, J.R., and Reilly, P.J. 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.
- Georis, J., Giannotta, F., Lamotte-Brasseur, J., Devreese, B., Van Beeumen, J., Granier, B., and Frere, J.M. 1999. Sequence, overproduction and purification of the family 11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase encoded by the *xyl1* gene of *Streptomyces* sp. S38. Gene. 237: 123-133.
- Ghosh, M., and Nanda, G. 1994. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. Appl. Environ. Microbiol. 60(12): 4620-4623.
- Gilbert, M., Yaguchi, M., Watson, D.C., Wong, K.K.Y., Breuil, C., and Saddler, J.N. 1993. A comparison of 2 xylanases from the thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40(4): 508-514.
- Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J.Gen. Microbiol. 139: 187-194.

- Gokhale, D.V., and Deobagkar, D.N. 1989. Differential expression of xylanases and endoglucanases in the hybrid derived from intergeneric protoplast fusion between a *Cellulomonas* sp. And *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 55(10): 2675-2680.
- Grabski, A.C., and Jeffries, T.W. 1991. Production, purification, and characterization of  $\beta$ -(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. Appl. Environ. Microbiol. 57(4): 987-992.
- Green, A.A. , and Hughes, W.L. 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. Methods Enzymol. 1: 75-78.
- Ishihara, M., Tawata, S., and Toyama, S. 1997. Purification and some properties of a thermostable xylanase from thermophilic fungus strain HG-1. J. Ferment. Bioeng. 83(5): 478-480.
- Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., and Ishikawa, T. 1992. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. Biosci. Biotech. Biochem. 56(4): 547-550.
- Jurasek, L., and Paice, M.G. 1992. Saving bleaching chemicals and minimizing pollution with xylanase. In Proceeding of the International Symposium on Pollution Prevention in the Manufacture of Pulp and Paper, Opportunities and Barriers. Pulp and Paper Cluster, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., p 105-107.

- Kang, M.K., Maeng, P.J., and Rhee, Y.H. 1996. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202. Appl. Environ. Microbiol. 62(9): 3480-3482.
- Khanongnuch, C., Asada, K., Tsuruga, H., Ooi, T., Kinoshita, S., and Lumyong, S. 1998. B-mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp. J. Ferment. Bioeng. 86(5): 461-466.
- Khasin, A., Alchanati, I., and Shoham, Y. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus sterothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 59(6): 1725-1730.
- Kimura, I., Sasahara, H., and Tajima, S. 1995. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. J. Ferment. Bioeng. 80(4): 334-339.
- Láemmlí, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lopez-Fernandez, C.L., Rodriguez, J. Ball, A.S., Copa-Patino, J.L., Perez-Leblic, M.I., and Arias, M.E. 1998. Application of the affinity binding of xylanases to oat-spelt xylan in the purification of endoxylanase CM-2 from *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336. Appl. Environ. Microbiol. 50: 284-287.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 163: 265-272.

- Matte, A., and Forsberg, C.W. 1992. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 58(1): 157-168.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428.
- Morag, E., Bayer, E.A., and Lamed, R. 1990. Relationship of cellulosomal and non cellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose-degrading enzymes. J. Bacteriol. 172(10): 6098-6105.
- Nakajima, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Kainuma, K., and Matsuda, K. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 62(3): 269-276.
- Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., and Horikoshi, K. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1. Appl. Environ. Microbiol. 59(7): 2311-2316.
- Paice, M.G., Jurasek, L., Carpenter, M.R., and Smillie, L.B. 1978. Production, characterization, and partial amino acid sequence of xylanase A from *Shizophyllum commune*. Appl. Environ. Microbiol. 36(6): 802-808.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., and Tanticharoen, M. 1999. Purification and some properties of a xylan-binding endoxylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. Strain K-1. Appl. Environ. Microbiol. 65(2): 694-697.

- Royer, J.C., and Nakas, J.P. 1990. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichodarma longibrachiatum*. Appl. Environ. Microbiol. 56(8): 2535-2539.
- Ruiz-Arribas, A., Fernandez-Abalos, J.M., Sanchez, P., Garda, A.N., and Santamaria, R.I. 1995. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (*xy1*) from *Streptomyces halstedii* JM8. Appl. Environ. Microbiol. 61(6): 2414-2419.
- Saraswat, V., and Bisaria, V.S. 1997. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albormyces* IIS68. J. Ferment. Bioeng. 83(4): 352-357.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Timell, T.E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1: 45-70.
- Torronen, A., and Rouvinen, J. 1997. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- $\beta$ -xylanases. J. Biotechnol. 57: 137-149.
- Tsujibo, H., Sakamoto, T., Nishino, N., Hasegawa, T., and Inamori, Y. 1990. Purification and properties of three types of xylanases produced by an alkalophilic actinomycete. J. Appl. Bacteriol. 69: 398-405.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., and Sadler, J.N. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganism: functions and applications. Microbiol. Rev. 52(3): 305-317.



Xu, J., Takakuw, N., Nogawa, M., Okada, H., and Morikawa, Y. 1998. A thrid xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 718-724.

Zhao, Y., Chany II, C.J., Sims, P.F.G., and Sinnott, M.L. 1997. Definition of the substrate specificity of the 'sensing' xylanase of *Streptomyces cyaneus* using xylooligosaccharide and celooligosaccharide glycosides of 3,4-dinitrophenol. J. Biotechnol. 57: 181-190.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตไซแลนเนส (xylan complex medium)

กากเมล็ดฝ้าย	2.5	เปอร์เซ็นต์
ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต	0.2	เปอร์เซ็นต์
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.2	เปอร์เซ็นต์
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.4	เปอร์เซ็นต์
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.1	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.002	เปอร์เซ็นต์
ปรับระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน	9.0	

## ภาคผนวก ข

## สารเคมี

## 1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

## 1.1 สารละลาย อัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper reagent)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71 กรัมและโรเชลล์ ซอลท์ (Rochelle salt) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายของคอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ปริมาณ 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

## 1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วสารละลายของโซเดียมอาซีเนต ( $\text{NaHASO}_4$ ) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

## 1.3 สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid Reagent)

ละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid) 1 กรัม ใน 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมโซเดียมไบตัสเซียมทาร์เทรต 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร

## 2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

### 2.1 Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3000.0	มิลลิลิตร

### 2.2 Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	50.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

### 2.3 Lowry C

ผสม Lowry A	50	ส่วน
กับ Lowry B	1	ส่วน

### 2.4 Lowry D

สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

### 3. สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส

#### 3.1 สารละลายทริสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

(เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.3	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600.0	มิลลิลิตร

#### 3.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ทริส

ทริส	6.0	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

#### 3.3 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2 โมลาร์ทริส

ทริส	24.2	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

#### 3.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	27.23	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	150.0	มิลลิลิตร

## 3.5 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	87.60	กรัม
BIS (N,N,-Methylene bis acrylamide)	2.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	300.00	มิลลิลิตร

## 3.6 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer)

ความเข้มข้น 5 เท่า

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.2	มิลลิลิตร
สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู	7.0	มิลลิลิตร

## 3.7 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

## 3.8 สารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล 12 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	3.45	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.00	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

## 3.9 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.2	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.3	มิลลิลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.0	ไมโครลิตร

## 3.10 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

0.1 เปอร์เซ็นต์ สีคูแมสซี บิลเลียนท์ บลู จี-250
40 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล
10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก

## 3.11 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

40 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล
10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก

สารละลายที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนไซเดียมโดเดซิลไพอส์อะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

## 4.1 สารละลายทริสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

(เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
ไซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.3	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600.0	มิลลิลิตร



## 4.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทริส	6.0	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 4.3 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ทริส	24.2	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 4.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

ทริส	27.23	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	150.00	มิลลิลิตร

## 4.5 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 4.6 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 20 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 4.7 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	87.60	กรัม
BIS (N,N,-Methylene bis acrylamide)	2.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	300.00	มิลลิลิตร

## 4.8 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer)

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์	3.2	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
2-ปีตา-เมอแคปโตเอทานอล	1.6	มิลลิลิตร
สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์บรอมฟินอลบลู	0.2	มิลลิลิตร

## 4.9 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

## 4.10 สารละลายผสมของเซฟาเรติงเจล 12 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.00	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

## 4.11 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.1	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.0	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.3	มิลลิลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.0	ไมโครลิตร

## 4.12 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

0.1 เปอร์เซ็นต์ สีโคแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250  
 40 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล  
 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก

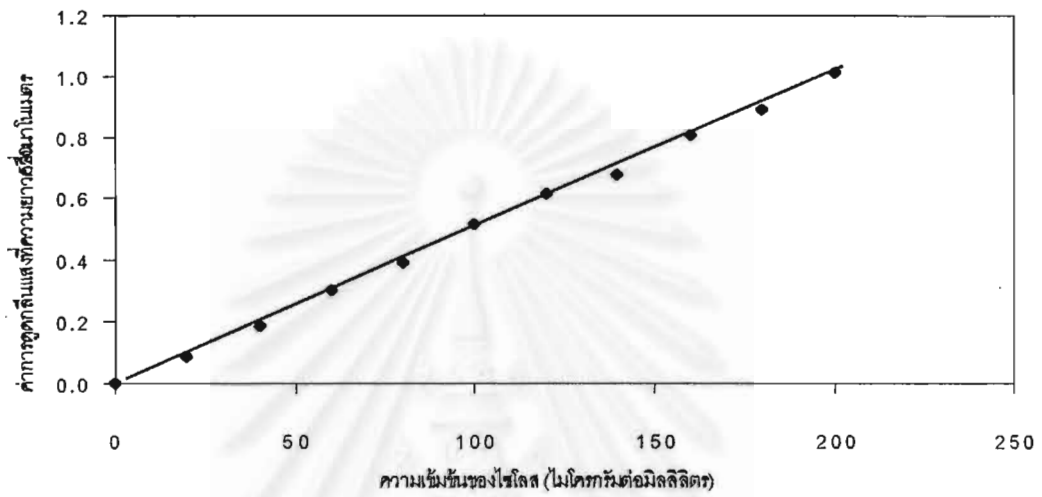
## 4.13 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

40 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล  
 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก

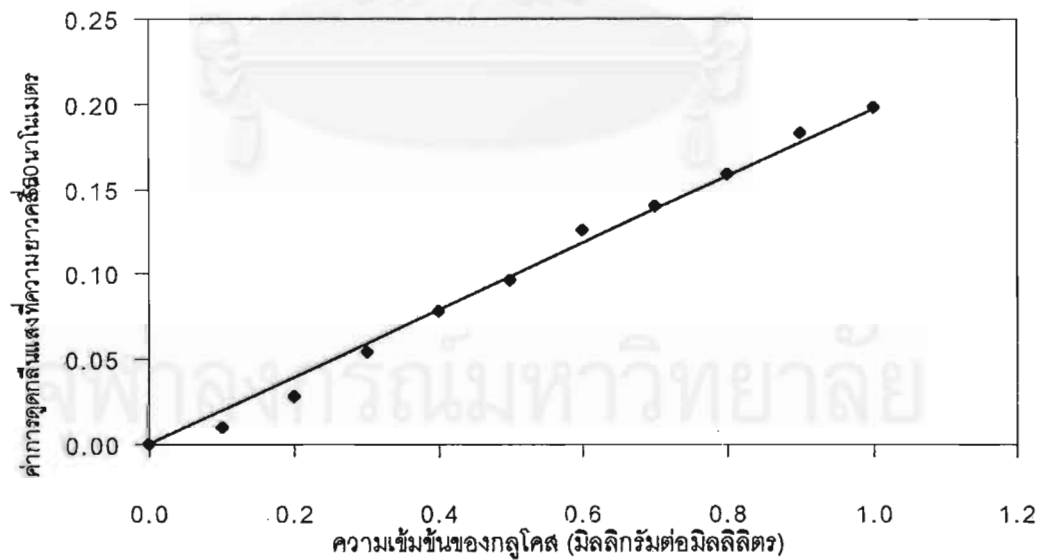
## ภาคผนวก ค

## 1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

## 1.1 กราฟมาตรฐานไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

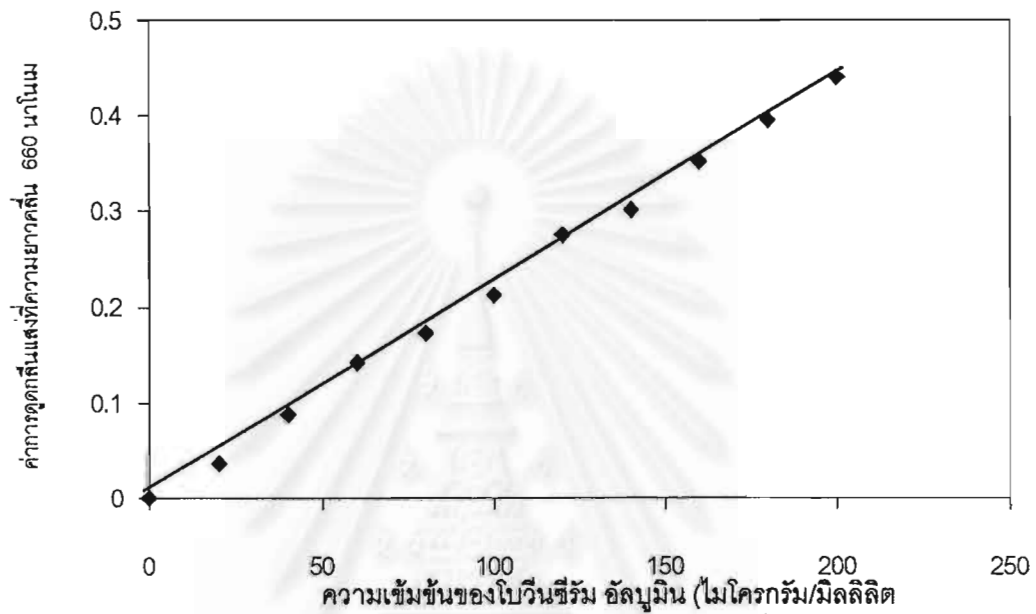


## 1.2 กราฟมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



## 2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียน

นายกฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ เกิดเมื่อวันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดหนองคาย ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2538 และเข้ารับการศึกษต่อในชั้นปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 ที่อยู่ปัจจุบัน 450-450/1 ถนนมีชัย ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย