

การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

จาก *Streptomyces* sp. PC22



นางสาวปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN : 974-14-2524-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -L-ARABINOFURANOSIDASE
FROM *Streptomyces* sp. PC22



Miss Pinpunya Riangrunroj

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN : 974-14-2524-4

Copyright of Chulalongkorn University

ปีนปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดสจาก *Streptomyces* sp. PC22 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -L-ARABINOFURANOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. PC22) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปั่นพานิชการ 130 หน้า. ISBN : 974-14-2524-4

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดสซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ย่อยสายกิ่งของไซแลนให้บริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40-90 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี บิวทิลไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน และไฮดรอกซีอะปาไทด์ ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 111 เท่า เหลือแอกติวิตีอยู่ 13.12 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลเพิเตอร์ชันพบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 317 กิโลดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 79 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดสบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 65 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-9.0 ค่า K_m และ V_{max} ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์ เท่ากับ 0.27 มิลลิโมลาร์ และ 3,926.15 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เอนไซม์ถูกยับยั้งในลักษณะแข่งขันโดยแอล-อะราบินอส มีค่า K_i เท่ากับ 15.08 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยอิออนของปรอท นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งด้วยเฮน-โบรโมซึกซินิไมด์และฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์แสดงว่ากรดอะมิโนทริปโตเฟนและเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และจากการตรวจสอบแอกติวิตีข้างเคียงของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดส พบว่าเอนไซม์ไม่มีแอกติวิตีของไซแลเนส, อะซีทิลเอสเทอเรสและบีตา-ไซโลซิเดสแน่นอน

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....*ปีนปัญญา เรียงรุ่งโรจน์*
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....*[ลายมือ]*
 ปีการศึกษา.....2549.....

4672331223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: α -L-ARABINOFURANOSIDASE / *Streptomyces* sp. PC22

PINPUNYA RIANGRUNGROJ : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
 α -L-ARABINOFURANOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. PC22. THESIS
 ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 130 pp. ISBN :
 974-14-2524-4

α -L-Arabinofuranosidase, one of xylan-debranching enzymes, was purified from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. PC22 grown in liquid medium containing oat spelt xylan as a carbon source. The enzyme was purified to approximately 111 folds with a recovery yield of 13.12% by fractionation with 40-90% saturation of ammonium sulfate followed by consecutive column chromatography on Macro-prep DEAE, butyl hydrophobic interaction and hydroxyapatite, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was 317 kDa as estimated by gel filtration and composed of four identical subunits of 79 kDa estimated by SDS-PAGE. The enzyme had temperature and pH optima of 65°C and 6.0, respectively. It was stable to temperature up to 45°C for 30 min and to a broad range of pH from 5.5-9.0. The K_m and V_{max} values of the enzyme for *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside were 0.27 mM and 3,926.15 μ mol/min/mg protein respectively. It was competitively inhibited by L-arabinose with K_i value of 15.08 mM. The enzyme activity was completely inhibited by Hg^{2+} and also inhibited by N-bromosuccinimide and phenylmethylsulfonyl fluoride indicating tryptophan and serine residue involved in catalytic mechanism. The purified enzyme did not exhibit xylanase, acetyl esterase and β -xylosidase activities.

Department..... Microbiology..... Student's signature..... *Pinpunya Riangrungroj*
 Field of study..... Industrial Microbiology..... Advisor's signature..... *Pai. P.*
 Academic year..... 2006.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีนิยวัน รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานและคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ณิชฐา ทองจุล สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือในการวิเคราะห์น้ำตาลอะราบิโนส

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่าง ๆ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณพี่วิชุดา เหล่าเรืองธนา พี่เวฬุรีย์ ทองคำ และพี่วัชรီ ชุณหกุล ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดมา และขอขอบคุณ คุณปิยะวรรณ เพชรภา คุณโสระจยา แววศักดิ์ คุณวิมลนิน ศิริพัฒนานนท์ คุณไปรมา แก้วสามศรี และคุณปาริฉัตร ราวีศรี ที่ร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมาตลอด รวมทั้งให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยาย และน้องชาย ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฅ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. ปรัชศน์วรรณกรรม.....	7
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง	32
4. ผลการทดลอง	50
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	91
รายการอ้างอิง	104
ภาคผนวก	114
ภาคผนวก ก.....	115
ภาคผนวก ข.....	116
ภาคผนวก ค.....	124
ภาคผนวก ง	128
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	130

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส.	16
2.2 น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ ต่างๆ.....	22
2.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโน ฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ.....	24
2.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดี สจากจุลินทรีย์ต่างๆ.....	26
2.5 ค่าความจำเพาะ (K_m), ความเร็ว (V_{max}) และ ค่า turnover (k_{cat}) ของแอลฟา-แอล- อะราบิโนฟิวราโนสิดีสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ จาก จุลินทรีย์ต่างๆ.....	28
4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนแอลฟา- แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	51
4.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ให้บริสุทธิ์.....	63
4.3 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส.....	87
4.4 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโน สิดีส.....	89
4.5 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส...	90
5.1 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสบริสุทธิ์จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	101
5.2 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสบริสุทธิ์จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ.....	102

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะโครงสร้างของอะราบิโน-(-4-โอเมธิลกลูคูโรโน)ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน.....	2
1.2	โครงสร้างของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน.....	6
2.1	โครงสร้างของอะราบิแนน.....	7
2.2	การเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล.....	11
2.3	การเปลี่ยนไซโลสเป็น furfural.....	12
2.4	การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดยยีสต์.....	13
2.5	การหมักอะราบิโนสเป็นเอทานอลโดยยีสต์.....	14
2.6	การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase)	15
4.1	ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอีไมด์ต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส.....	52
4.2	ผลของไดไทโอทรีอิตอลต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส.....	53
4.3	ผลของไซเตียมโคเดซิลซัลเฟตต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส.....	54
4.4	การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี อะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรง ของไซเตียมคลอไรด์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.....	57
4.5	การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์บิวทิล ไฮโดรโฟ บิค อินเตอร์แอคชัน อะโปรตีนด้วย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ใน 50 มิลลิโม ลาร์ ไซเตียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 และเกรเดียนท์ของเส้นตรงของแอมโม เนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.....	59
4.6	การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปา ไทด์ อะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ไซเตียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียน ท์ของเส้นตรงของไซเตียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 0.02-0.50 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.....	61

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7	ขั้นตอนการทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ให้บริสุทธิ์..... 62
4.8	พอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ..... 65
4.9	พอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์และโปรตีนที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการตัดเจล..... 66
4.10	การทำโครมาโทกราฟีบนซูเปอร์โอส 12 เพรบ เกรด ของโปรตีนมาตรฐาน..... 68
4.11	การทำโครมาโทกราฟีบนซูเปอร์โอส 12 เพรบ เกรด ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส..... 69
4.12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ซูเปอร์โอส 12 เพรบ เกรด..... 70
4.13	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส โดยการใช้อิเลคโทรโฟริซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล..... 72
4.14	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส..... 73
4.15	คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส..... 75
4.16	ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส..... 76
4.17	ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสต่ออุณหภูมิ..... 78
4.18	ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสต่อความเป็นกรดต่าง..... 79
4.19	ไลนวีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์..... 80
4.20	ผลของอะราบิโนสต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส..... 82
4.21	ไลนวีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส โดยอะราบิโนส..... 83
4.22	ผลของไซโลสต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส..... 85

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.23	ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ส โดยไซโตส.....	86
4.24	ผลของอีดี้ทีที่เอตต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ส.....	88



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

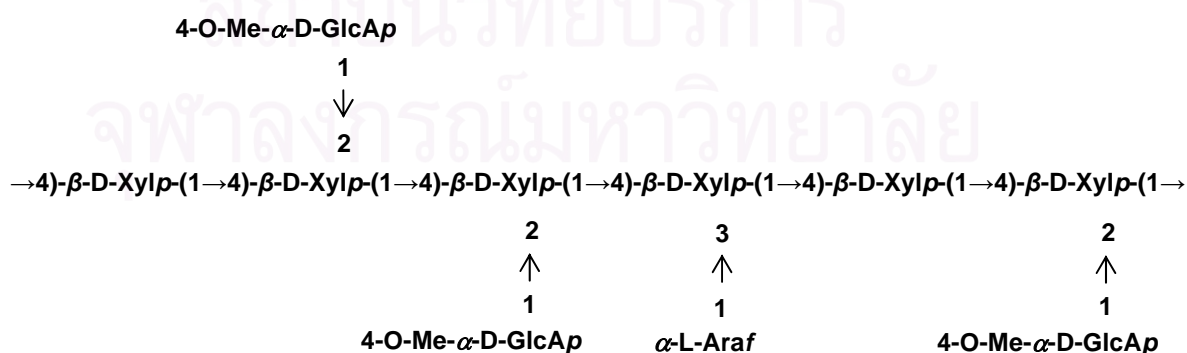
ผนังเซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญที่พบในธรรมชาติ ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์หลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) 35-50 เปอร์เซ็นต์, เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 20-35 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน (lignin) 20-30 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic) มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ ส่วนเฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส และ/หรือ น้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กลูแคน (glucan), แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) โดยไซแลนจัดเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ส่วนลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีนอลิก (polyphenolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ และห่อหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไว้ภายใน (Wong และคณะ, 1988)

ไซแลนเป็นพอลิเมอร์หลักของชั้นเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืช โดยยึดเกาะกับส่วนของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจนและยึดเกาะกับลิกนินด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent) โดยชั้นของไซแลนมีส่วนสำคัญในการช่วยป้องกันชั้นเซลลูโลสจากการย่อยสลายของเซลลูเลส (Uffen, 1997) อย่างไรก็ตาม สามารถพบไซแลนได้ในธรรมชาติทั้งจากไม้เนื้อแข็ง ไม้เนื้ออ่อน พืชล้มลุก ผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด ชานอ้อย เปลือกข้าวโพด รำข้าว ฟางข้าว เปลือกเมล็ดฝ้าย เป็นต้น (Magee และ Kosaric, 1985) และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ (Ericksson และคณะ, 1990) นอกจากนี้ยังพบไซแลนได้จากวัสดุเหลือทิ้งในระหว่างกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (pulping) (Biely, 1985) ไซแลนในพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันออกไป โดยในไม้เนื้อแข็งจะมีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Wood และ McCrae, 1996) ในไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณ 7-12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Haltrich และคณะ, 1996) ส่วนไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีปริมาณไซแลนประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Saddler และคณะ, 1983)

1.2 โครงสร้างของไซแลน

โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิก (β -1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก และมีสารประกอบอื่นๆ มาเชื่อมต่อเป็นหมู่ข้างเคียง เช่น หมู่อะราบิโนส ต่อที่ตำแหน่ง O-3 ของไซโลส, หมู่กลูคูโรนิก ต่อที่ตำแหน่ง O-2 ของไซโลส, หมู่เมธิลกลูคูโรนิก ต่อที่ตำแหน่ง O-4 ของไซโลส และหมู่อะซีทิลต่อที่ตำแหน่ง O-2 และ O-3 ของไซโลส โดยหมู่ข้างเคียงต่างๆ ที่กล่าวมาจะมีปริมาณแตกต่างกันไปในไซแลนของพืชแต่ละชนิด โดยไซแลนในไม้เนื้ออ่อนและพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ฟางข้าว และธัญพืช จำพวก ข้าวสาลี เปลือกข้าวโอ๊ต เป็นต้น จะมีอะราบิโนสเป็นหลัก (Schyns และคณะ, 1994) ส่วนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง จะมีหมู่อะซีทิลเป็นหลัก (Degrassi และคณะ, 2003) ตัวอย่างเช่น ไซแลนจากไม้เบิร์ช ซึ่งจัดเป็นไม้เนื้อแข็ง ประกอบด้วย 89.3 เปอร์เซ็นต์ ไซโลส, 1 เปอร์เซ็นต์ อะราบิโนส, 1.4 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส และ 8.3 เปอร์เซ็นต์ แอนไฮดรูโรนิก แอซิด (Kormerlink และ Voragen, 1993) ส่วนอะราบิโนไซแลนจากข้าวสาลี ประกอบด้วย 65.8 เปอร์เซ็นต์ ไซโลส, 33.5 เปอร์เซ็นต์ อะราบิโนส, 0.1 เปอร์เซ็นต์ กาแลคโทส, 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมนโนส และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส (Gruppen และคณะ, 1992)

โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน คือ อะราบิโน-(4-โอ-เมธิลกลูคูโรน)ไซแลน (arabino-(4-O-methylglucurono)xylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 ไซโลสิดิก (β -1,4-xylosidic) และมีหมู่ 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด (4-O-methyl-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง O-2 และมีหมู่แอล-อะราบิโนส เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง O-3 (Hon และ Shiraishi, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ลักษณะโครงสร้างของอะราบิโน-(4-โอ-เมธิลกลูคูโรน)ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน (Hon และ Shiraishi, 1990)

1.3 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายได้โดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน (Tsao และ Chiang, 1983)

1.3.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี สามารถทำได้ 2 วิธี

1.3.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น ฟอฟูรัล (furfural) ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ (Paturan, 1989)

1.3.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

เป็นวิธีที่มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำกระดาษ ซึ่งจะนำชั้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและเป็นการกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยใช้สารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide), ก๊าซคลอรีน (Cl_2) เป็นต้น ทำให้เกิดสารพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอรีนที่เป็นพิษชนิดอื่นๆ ด้วย (Visser และคณะ, 1992)

1.3.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

เป็นวิธีที่ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูงกว่าการใช้สารเคมี และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง โดยเอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลส (xylose) หรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิดใหญ่ คือ

1. เอนโดไซแลเนส (Endoxylanase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4- β -D-xylan-xylanohydrolase : EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิติกแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Gilbert และคณะ, 1993)

2. บีตา-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4- β -D-xylan-xylohydrolase : EC 3.2.1.37) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะบีตา-ดี-1,4-ไซโลไพราโนไซด์ในโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ที่ละหน่วยจากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่า กลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ซึ่งจะได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards, 1976)

นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ยังต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย ดังแสดงในรูปที่ 1.2 ได้แก่

แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดส (α -L-arabinofuranosidase : EC 3.2.1.55) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่นอนรีดิวซ์ แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์ ได้อะราบินอส

แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส (α -D-glucuronidase : EC 3.2.1.139) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิก แอซิด

อะซีทิลเอสเทอเรส (acetyl esterase : EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และบีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่อะซีทิลกับสายหลัก ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซีติก

ซึ่งในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดสอย่างละเอียด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สนใจจะศึกษาต่อไป

แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายหมู่อะราบินอสจากไซแลน อะราบินโนไซแลน และอะราบินแนน ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส เอนไซม์นี้จึงจัดเป็นเอนไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มย่อยสลายไซแลน โดยมีบทบาทร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ ในกลุ่มนี้ในการย่อยสลายไซแลน อะราบินโนไซแลน หรืออะราบินแนนให้สมบูรณ์จนได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้สารที่มีประโยชน์ชนิดต่างๆ

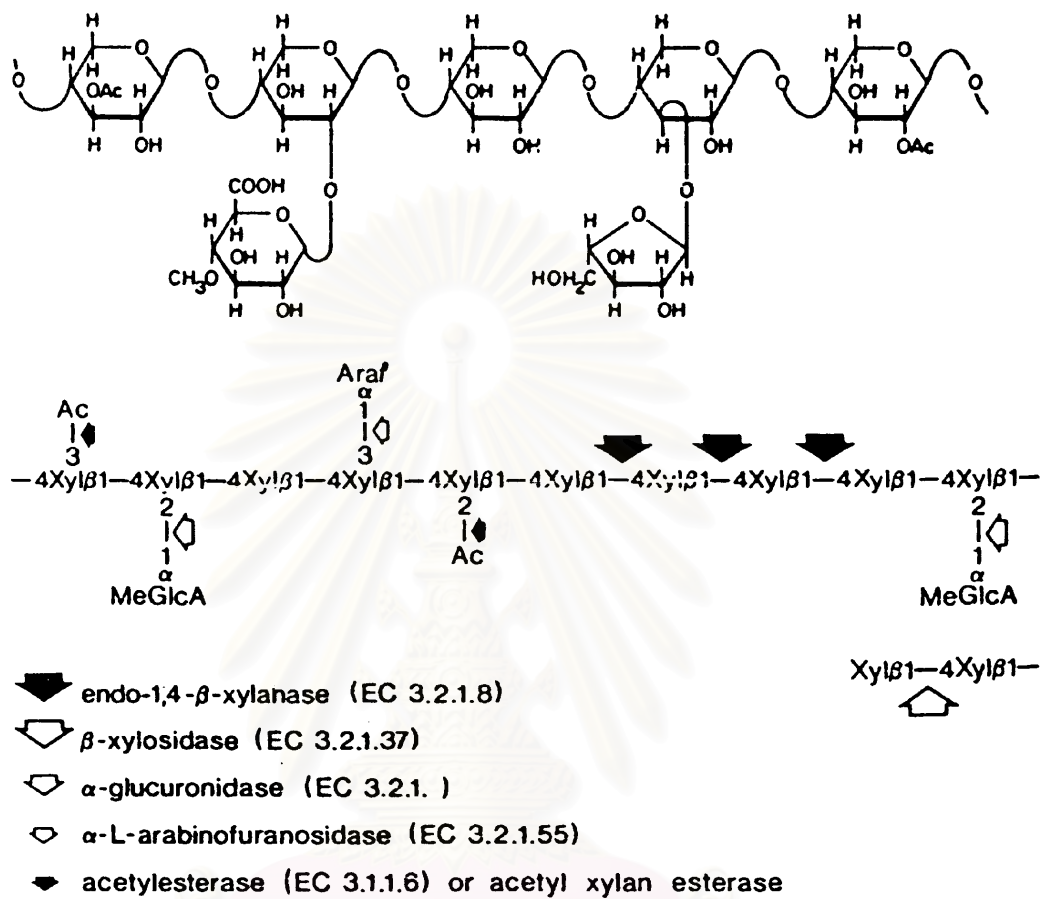
แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดสพบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีทีส รวมถึงมีการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากเชื้อต่างๆ เช่น *Bacillus pumilus* (Degrassi และคณะ, 2003), *Penicillium chrysogenum* (Sakamoto และ

Kawasaki, 2003), *Pichia capsulate* X91 (Yanai และ Sato, 2000) และ *Streptomyces diastaticus* (Tajana และคณะ, 1992)

จากงานวิจัยที่ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สามารถคัดแยก *Streptomyces* sp. PC22 ได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และพบว่าเจริญได้ดีในภาวะค่าความเป็นกรดต่างสูงประมาณ 9 และที่อุณหภูมิสูงประมาณ 40 - 45 องศาเซลเซียส รวมทั้งยังสามารถผลิตไซแลเนสที่ทนต่อค่าความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างปริมาณสูง (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหมู่ซังเคียงได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดเอส (วิชุดา เหล่าเรืองธนา, 2547) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดเอสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ รวมทั้งศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ดังกล่าวเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำมาทำงานร่วมกับไซแลเนสเพื่อทำให้การย่อยสลายไซแลนมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.2 โครงสร้างของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่อะซีทิล
Araf	แทน	แอล-อะราบินโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	กรด 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิก
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

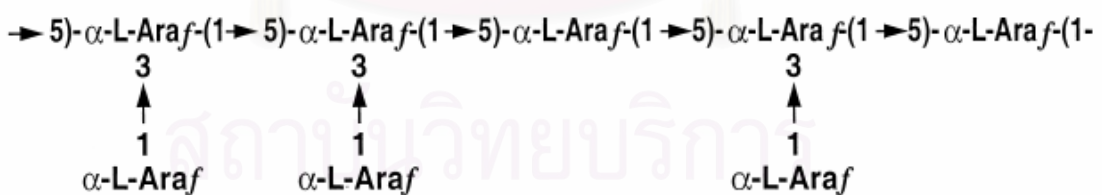
บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์

อะราบินอฟิวราโนไซด์ เป็นเอนไซม์สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสซึ่งตัดหมู่แอล-อะราบินอฟิวราโนส ซึ่งพบได้ทั่วไปในชั้นเฮมิเซลลูโลส เช่น อะราบินแนน อะราบินโนไซแลน อะราบินโนกาแลคแทน และพอลิแซคคาไรด์อื่นๆที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช

อะราบินแนน พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยพันธะแอลฟา-1,5 ของหมู่อะราบินอฟิวราโนส เป็นสายหลัก และมีอะราบินอฟิวราโนสมาต่อเป็นสายกิ่งด้วยพันธะแอลฟา-1,3 ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ส่วนในอะราบินโนกาแลคแทนนั้น สายหลักเป็นกาแลคโตไฟราโนสจะเชื่อมด้วยหมู่ข้างเคียง คือ อะราบินอฟิวราโนส ที่ตำแหน่ง O-3 และ O-6 (Luonteri และคณะ, 1998) ส่วนในอะราบินโนไซแลน มีไซโลสมาต่อเป็นสายหลักด้วยพันธะบีตา-1,4 และมีแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสต่อเป็นโซ่กิ่งที่ตำแหน่ง O-3 หรือในบางกรณีก็จะต่อทั้งตำแหน่ง O-2 และ O-3 เป็นต้น (Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของอะราบินแนน (Saha, 2000)

แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์ (α-L-arabinofuranosidase : EC 3.2.1.55) จัดเป็นเอนไซม์ชนิด exo-type ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 และแอลฟา-1,3 จากปลายสายด้านอนนรีดิวิซ์ของหมู่แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสของไซแลน อะราบินโนไซแลน และอะราบินโนกาแลคแทน โดยได้น้ำตาลอะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Manin และคณะ, 1994) นอกจากนี้

ถ้าใช้แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดีสทำงานร่วมกับเอนโด-1,5-แอลฟา-แอล-อะราบินานเนส (1,5- α -L-arabinanases : EC 3.2.1.99) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ 1,5-แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดิก ภายในสายของแอลฟา-1,5 อะราบินแนน ก็จะสามารถย่อยสลายอะราบินแนนได้อย่างสมบูรณ์ (Margolles และ de los Reyes-Gavilan ,2003)

Beldman และคณะ (1997) ได้จำแนกกลุ่มแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดีสโดยอาศัยหลักความแตกต่างของการทำงานและความจำเพาะต่อสับสเตรทเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อยอะราบินโนสจากไซแลนที่มีหมู่แอล-อะราบินโนฟิวราโนสเกาะอยู่ที่โมเลกุลของไซโลสทั้งแบบเดี่ยวและคู่ และยังสามารถย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside) ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ได้

- กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อยอะราบินโนสจากไซแลนที่มีหมู่แอล-อะราบินโนฟิวราโนสเกาะอยู่ที่โมเลกุลของไซโลสแบบเดี่ยวที่ตำแหน่ง C2 หรือ C3 เท่านั้น แต่ไม่สามารถย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside) ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ได้

- กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อยอะราบินโนสจากไซแลนที่มีหมู่แอล-อะราบินโนฟิวราโนสเกาะอยู่ที่โมเลกุลของไซโลสแบบคู่แต่จะตัดเฉพาะตำแหน่ง C3 เท่านั้น และยังไม่สามารถย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside) ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ได้

เมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการค้นพบกลุ่มแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดีสกลุ่มใหม่เพิ่มอีก 1 กลุ่ม โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหน้าที่ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,5 ซึ่งเป็นสายหลักและพันธะแอลฟา-1,3 ที่เป็นสายกิ่งของอะราบินแนนและอะราบินแนนที่ไม่มีสายกิ่ง (debranched arabinan) และยังสามารถย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside) ได้ แต่อย่างไรก็ตามการแบ่งกลุ่มโดยใช้หลักความจำเพาะต่อสับสเตรทเพียงอย่างเดียวจัดว่ายังไม่มีประสิทธิภาพมากนัก โดยพบว่ายังมีการจัดกลุ่มเอนไซม์นี้โดยอาศัยหลักความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence similarities) ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 แฟมิลีของไกลโคไซด์ ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) อันได้แก่ แฟมิลี 43, 51, 54 และ 62 (Henrissat และ Bairoch, 1996)

อะราบิโนสซึ่งจัดเป็นหมู่ข้างเคียงชนิดหนึ่งของไซแลน ถูกพบเป็นปริมาณมากในรูปของ อะราบิโนไซแลนในรำข้าวสาลี และฟาง ในปฏิกิริยาการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สำคัญใช้ เอนโด-ปีตา-1,4-ไซแลเนส แสดงให้เห็นว่าการที่มีอะราบิโนสเป็นหมู่ข้างเคียงจะเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาของไซแลเนส (Debeche และคณะ, 2000) ดังนั้นจึงได้มีการมีรายงานเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสายหลักเมื่อมีการทำงานร่วมกันกับแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส ดังนี้

Lee และ Forsberg (1987) ศึกษาการทำงานร่วมกันของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส, ไซแลเนส บี และไซโลซิเดส จาก *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการย่อยพันธะแอลฟา-1,3 ของอะราบิโนสที่เกาะกับไซแลนสายหลักช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน

Wood และ McCrae (1996) ศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส กับ เอนโด-1,4-ปีตา-ดี-ไซแลเนส จาก *Aspergillus awamori* พบว่าช่วยเพิ่มการปล่อยอะราบิโนส จากอะราบิโนไซแลนในฟางข้าวโอ๊ต จาก 10.3 เปอร์เซ็นต์ เป็น 42.2 เปอร์เซ็นต์ และช่วยเพิ่มการปล่อยอะราบิโนส จากอะราบิโนไซแลนในฟางข้าวสาลีขึ้นจาก 10.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 69.8 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

Rahman และคณะ (2003) ศึกษาบทบาทของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส, ไซแลเนส และไซโลซิเดส จาก *Penicillium* sp. AHT-1 ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าจะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลไซโลสจาก 25 เปอร์เซ็นต์เป็น 61 เปอร์เซ็นต์ และลำดับในการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายไซแลนจะเริ่มจากแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส ต่อด้วยไซแลเนส และสุดท้ายคือ ปีตา-ไซโลซิเดส

Tuncer และ Ball (2003) ศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายไซแลน จาก *Thermomonospora fusca* BD25 ต่อการย่อยไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าการใช้ปีตา-ไซโลซิเดส และแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส ร่วมกับไซแลเนส จะช่วยเพิ่มการย่อยสลาย

ไซแลนเป็น 2 เท่า คือเพิ่มจาก 28 เปอร์เซนต์เป็น 58 เปอร์เซนต์ของสับสเตรททั้งหมด โดยได้ไซโลสและอะราบิโนสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

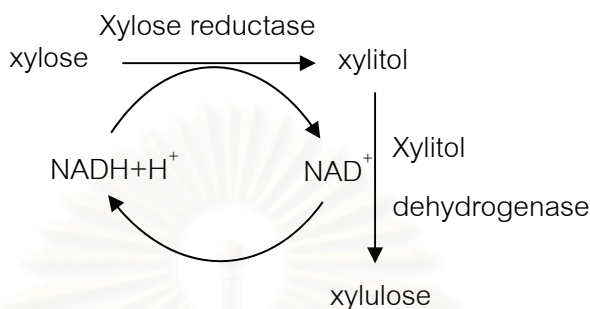
2.2 ประโยชน์ของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน

เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนมีบทบาทสำคัญและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น การแปรรูปวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมี (Screenath และ Jeffries, 2000), อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Gilbert และ Hazlewood, 1993), อุตสาหกรรมทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้น (Beg, 2001), อุตสาหกรรมขนมปัง เพื่อปรับปรุงคุณภาพ (Maat และคณะ, 1992), อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ (Bajpai, 1999) และอุตสาหกรรมการทำไวน์เพื่อเพิ่มกลิ่นรสในไวน์ เป็นต้น (Saha, 2000)

การย่อยสลายอะราบิโนไซแลนอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ ไซโลส และ อะราบิโนส ซึ่งสามารถใช้ในการผลิตสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ และมีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจมากมาย เช่น ใช้ไซโลสเป็นสารชักนำในการสร้างเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (D-xylose isomerase; EC 5.3.1.5) โดยเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส (high fructose syrup) และอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวานและลูกกวาด (Chen, 1980) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซลิทอล เพื่อให้ความหวานในลูกอม ยาสีฟัน หมากฝรั่ง โดยไม่ทำให้ฟันผุ และยังเป็นสารที่ทางการแพทย์ใช้ทดแทนน้ำตาลให้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Parajo และคณะ, 1998) โดยมีกระบวนการเปลี่ยนรูปดังรูปที่ 2.2 นอกจากนี้ไซโลสและอะราบิโนสยังสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานได้เช่นกัน เนื่องจากมีรสหวานและร่างกายไม่ดูดซึม (Seri และคณะ, 1996) และยังสามารถป้องกันการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยโรคเบาหวานหลังการรับประทานซูโครสเข้าไปได้อีกด้วย (Matsuo และคณะ, 2000) นอกจากนี้ไซโลสและอะราบิโนสยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตเอทานอลและบิวทานอลได้ (Neale และคณะ, 1988)

แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสสามารถทำปฏิกิริยาร่วมกันกับไซแลเนสในการย่อยสลายอะราบิโนไซแลน (Greve และคณะ, 1984) โดยการทำงานร่วมกันระหว่างเอนโด-ไซแลเนส

กับแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส สามารถช่วยย่อยสลายอะราบิโนไซแลนในหญ้าได้ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยอาหารของสัตว์ (Graham และ Inbarr, 1992)

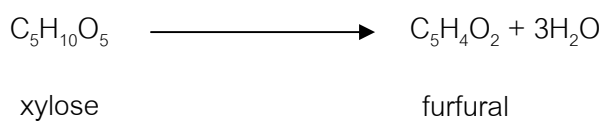


รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิตอล (Walker, 1998)

Yanai และ Sato (2000) ศึกษาผลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Pichia capsulata* X91 ต่อการเพิ่มกลิ่นรสในไวน์องุ่นพันธุ์ muscat พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสสามารถปลดปล่อย monoterpenol จาก monoterpenyl arabinofuranosylglucosides ทำให้ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบของกลิ่นรสในไวน์ได้ เช่น linalool citronellol และ geraniol

Bezalel และคณะ (1993) ได้ทำการปรับปรุงประสิทธิภาพการฟอกเยื่อกระดาษของ T-6 ไซแลเนสที่ผลิตจาก *Bacillus stearothermophilus* T-6 โดยทดลองให้มีการทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสอื่นๆ พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Bacillus stearothermophilus* L1 สามารถทำงานร่วมกับ T-6 ไซแลเนสได้ โดยสามารถปลดปล่อยลิกนินออกจากเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกสีได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

ไซโลสยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต Furfural หรือที่รู้จักกันในชื่อ furfural, furool และ furfuraldehyde เมื่อกลั่นได้ใหม่ๆ จะเป็นของเหลวไม่มีสี จุดติดไฟง่ายระเหยได้ และเมื่อสัมผัสกับอากาศหรือแสงสว่างจะมีกลิ่น ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเคมี เช่น นำมาทำเป็นตัวทำละลายในการทำให้บริสุทธิ์ของน้ำมันหล่อลื่นคุณภาพสูง ยางสน และน้ำมันพืช และยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไนลอน เรซิน น้ำมันเคลือบเงา การเปลี่ยนแปลงไซโลสเป็น furfural แสดงดังรูปที่

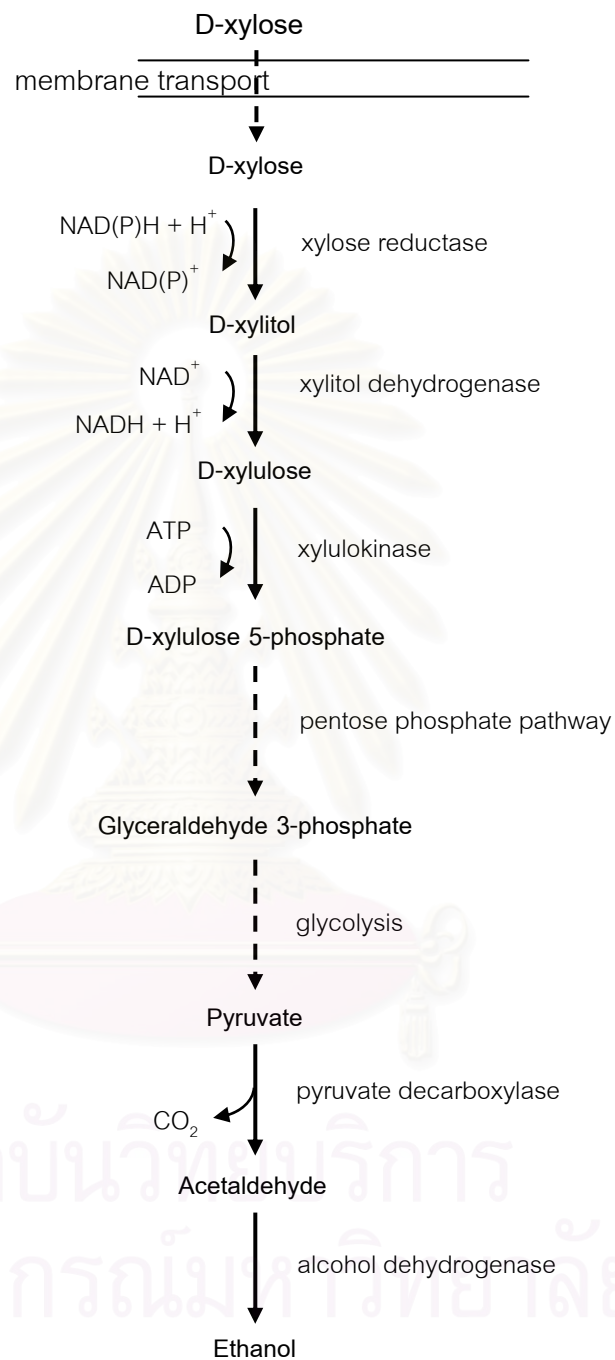


รูปที่ 2.3 การเปลี่ยนไซโลสเป็น furfural

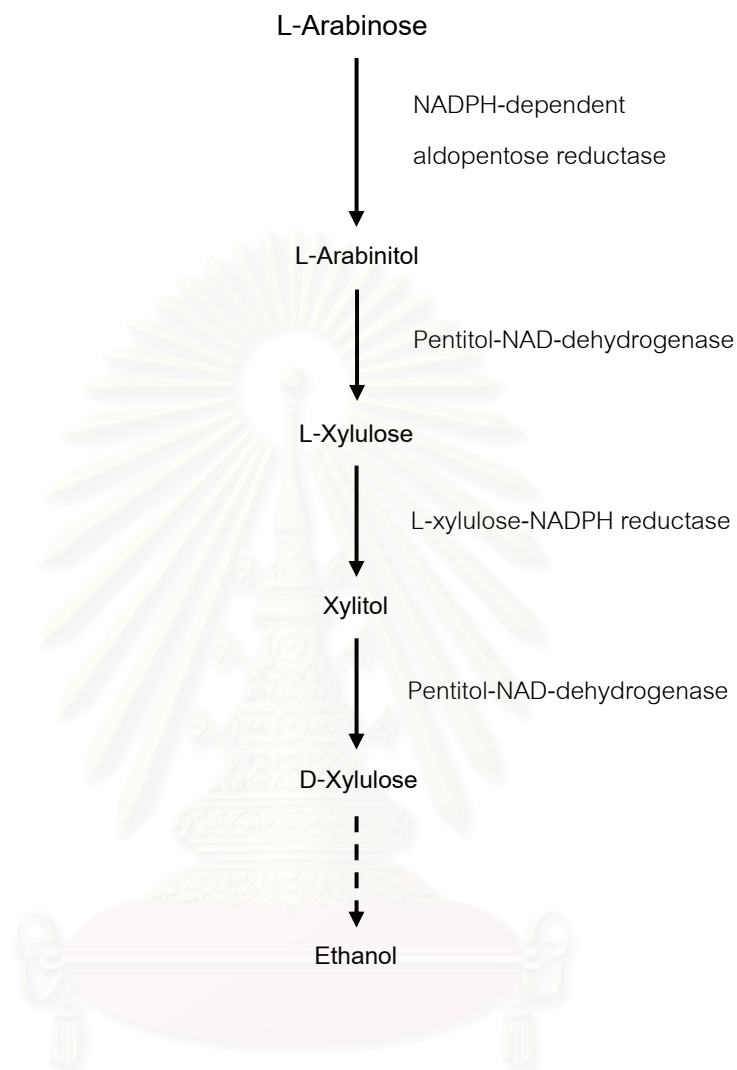
ในปัจจุบันนี้ การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นที่สนใจอย่างมาก เนื่องจากช่วยเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือทิ้งและลดการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) ในปี 2002 เอทานอลกว่า 2 ล้านแกลลอนถูกผลิตขึ้นจากการหมักแป้งเป็นหลัก และแนวโน้มการใช้เอทานอลในอนาคตประเมินกันว่าจะมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นสารที่มีความปลอดภัยกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ methyl tertiary butyl ether (MTBE) ซึ่งเป็นสารผสมในน้ำมันเพื่อการเผาไหม้ที่สะอาด และใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด แต่ MTBE นี้ถูกพบว่ามีสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Saha, 2003)

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ สามารถใช้เป็นวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตเอทานอลได้ การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จะได้น้ำตาลต่างๆ ขึ้นกับแหล่งที่มา เช่น ไซโลส กาแลคโตส แมนโนส ฟรักโทส แรมโนส กลูโคส และอะราบิโนส

มีรายงานว่า *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* และ *Candida shehate* เป็นยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนไซโลสและอะราบิโนสไปเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.4 และ 2.5 แต่ในเชิงพาณิชย์การใช้ยีสต์เหล่านี้ในการหมักเอทานอลมีอยู่ไม่มาก เพราะมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำ กระบวนการหมักเป็นไปอย่างเชื่องช้า และการควบคุมออกซิเจนเพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมทำได้ยาก (Du Preez, 1994) สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* แม้ว่าจะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น ไซโลสและอะราบิโนส ไปเป็นเอทานอลได้ (Saha, 2003) แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส (xylulose) โดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) ยีสต์ต่างๆ ไปสามารถหมักไซลูโลสเป็นเอทานอลได้ (Gong และคณะ, 1981) จึงมีการใช้ recombinant DNA technology โดยการ transform xylose isomerase gene จากแบคทีเรีย เข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้สามารถหมักไซโลสเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.6

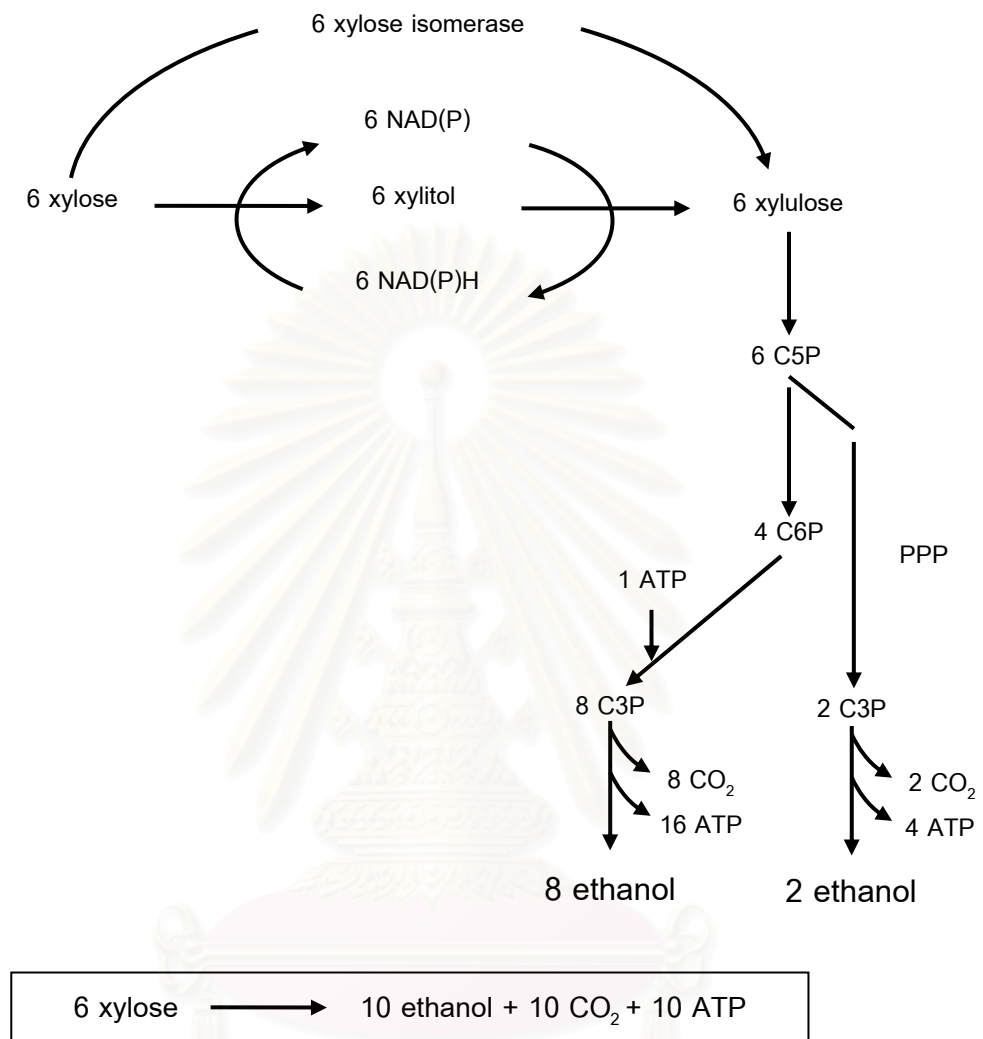


รูปที่ 2.4 การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดยยีสต์ (Walker, 1998)



รูปที่ 2.5 การหมักอะราบินอสเป็นเอทานอลโดยยีสต์ (Walker, 1998)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.6 การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase)

(Kuyper และคณะ, 2004)

C3P คือ triose-3-phosphate

C5P คือ pentose-5-phosphate

C6P คือ hexose-6-phosphate

PPP คือ pentose phosphate pathway

2.3 แหล่งของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอกติโนมัยซีท โดยจุลินทรีย์บางชนิดจะสร้างแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ แล้วเก็บไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) และบางชนิดจะสร้างแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus awamori</i>	Wood และ McCrae, 1996
<i>Aspergillus awamori</i> IFO 4033	Kaneko และคณะ, 1998
<i>Aspergillus niger</i>	Gunata และคณะ, 1990
<i>Aspergillus niger</i> 5-16	Kaneko และคณะ, 1993
<i>Aspergillus sojae</i>	Kimura และคณะ, 1995
<i>Aspergillus terreus</i>	Luonteri และคณะ, 1998
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Saha และ Bothast, 1998a และ 1998b
<i>Bacillus polymyxa</i>	Morales และคณะ, 1995
<i>Bacillus pumilus</i>	Degrassi และคณะ, 2003
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bezalel และคณะ, 1993
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	Gilead และ Shoham, 1995
<i>Bacillus subtilis</i> 3-6	Kaneko และ Kusakabe, 1995
<i>Bacteroides xyloxyticus</i> X5-1	Schyns และคณะ, 1994
<i>Bifidobacterium longum</i> B667	Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> GS113	Hespell และ O'Bryan, 1992

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Lee และ Forsberg, 1987
<i>Cytophaga xylanolytica</i>	Renner และ Breznak, 1998
<i>Fusarium oxysporum</i>	Panagiotou และคณะ, 2003
<i>Penicillium capsulatum</i>	Filho และคณะ, 1996
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sakamoto และ Kawasaki, 2003
<i>Penicillium purpurogenum</i>	De Ioannes และคณะ, 2000
<i>Pichia capsulata</i> X91	Yanai และ Sato, 2000
<i>Rhizomucor pusillus</i> HHT-1	Rahman และคณะ, 2001
<i>Rhodotorula flava</i>	Uesaka และคณะ, 1978
<i>Rhodothermus marinus</i>	Gomes และคณะ, 2000
<i>Ruminococcus albus</i> 8	Greve และคณะ, 1984
<i>Streptomyces</i> sp. No. 17-1	Kaji และคณะ, 1981
<i>Streptomyces chartreusis</i> GS901	Matsuo และคณะ, 2000
<i>Streptomyces diastaticus</i>	Tajana และคณะ, 1992
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> 065	Kaneko และคณะ, 1998
<i>Streptomyces lividans</i>	Vincent และคณะ, 1997
<i>Streptomyces purpurascens</i> IFO 3389	Komae และคณะ, 1982
<i>Thermobacillus xylanilyticus</i>	Debeche และคณะ, 2000
<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	Tuncer และ Ball, 2003
<i>Trichoderma reesei</i>	Kaneko และคณะ, 1998

2.4 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসให้บริสุทธิ์

เนื่องจากแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসจัดเป็นเอนไซม์สำคัญตัวหนึ่งที่มีบทบาทในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายหลัก ดังนั้นจึงมีรายงานหลายฉบับที่ศึกษาการทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসให้บริสุทธิ์ โดยมีขั้นตอนต่างๆ กัน เช่น

Hespell และ O'Bryan (1992) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113 ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 40-65 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน (OM-1000-43 membrane) โดยกักโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 100,000 ดาลตัน ต่อมาทำโครมาโทกราฟีบนฟีนิล-อะกาโรส (Phenyl-agarose) โมโน คิว (Mono Q) และทีเอสเค เจลฟิลเตรชัน (TSK gel filtration) ตามลำดับ พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেস มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 282.2 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลือ 9 เปอร์เซ็นต์

Tajana และคณะ (1992) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসจาก *Streptomyces diastaticus* ให้บริสุทธิ์ โดยการทำโครมาโทกราฟีบนพีดี 10 (PD 10) โมโน คิว (Mono Q) และโมโนเอส (Mono S) ตามลำดับ และสุดท้ายตามด้วยการทำโครมาโทโฟกัสซิง (Chromatofocusing) จะได้โปรตีน 2 ชนิดที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেস คือ C1 และ C2 โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 29.7 และ 37.0 เท่า ตามลำดับ และคงเหลือแอกติวิตีอยู่ 1.25 และ 11.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Schyns และคณะ (1994) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসจาก *Bacteroides xyloolyticus* X5-1 ให้บริสุทธิ์ โดยการทำโครมาโทกราฟีบน คิว-เซฟาโรส (Q-Sepharose) แล้วชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.6 โมลาร์ จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนฟีนิล-เซฟาโรส (Phenyl-Sepharose) ไฮดรอกซีอะปาไทต์ (Hydroxyapatite) โมโน คิว (Mono Q) และซูเปอร์โรส 6 (Superose 6) ตามลำดับ พบว่ามีโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেস โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 41.5 และมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 3.5 เปอร์เซ็นต์

Gilead และ Shoham (1995) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Bacillus stearothermophilus* T-6 ให้บริสุทธิ์ นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำให้เข้มข้นด้วยพอลิเอธิลีน ไกลคอล 20000 (Polyethylene glycol 20000) แล้วนำไปไดอะไลซิสด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.6 จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนโมโน คิว (Mono Q) แล้วชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วย เกรเดียนท์เส้นตรงของโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนฟีนิล-ซูเปอร์โรส เอชอาร์ (Phenyl-Superose HR) พบว่ามีโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่มี แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส โดยมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 749.1 หน่วย ต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.91 เท่า และมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 46 เปอร์เซ็นต์

Filho และคณะ (1996) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Penicillium capsulatum* ให้บริสุทธิ์ โดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่านโดยกักโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตันไว้ แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาโรส 6บี (Sephrose 6B) ตามด้วย ดีอี-52 เซลลูโลส (DE-52 Cellulose) พบว่ามีโปรตีน 2 ชนิดที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส คือ AFase I และ AFase II จากนั้นนำโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยทำโครมาโทกราฟีบนคอนคานาวัลิน เอ-เซฟาโรส ซีแอล 4บี (Concanavalin A-Sepharose CL 4B) ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (Methyl- α -D-glucopyranoside) ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ นำลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของ AFase I มาทำโครมาโทกราฟีบนเอส-เซฟาโรส (S-Sepharose) และลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของ AFase II ทำโครมาโทกราฟีบนดีอี-52 (DE-52) พบว่าทั้ง AFase I และ AFase II มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 180.2 และ 46.1 เท่า ตามลำดับ และมีแอกติวิตีคงเหลืออยู่ เท่ากับ 3.8 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Saha และ Bothast (1998) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Aureobasidium pullulans* ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ อะกาโรส (DEAE Bio-Gel A agarose) แล้วชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล เอ-0.5เอ็ม (Bio-Gel A-0.5m) อะราบิแนน-เซฟาโรส 6บี (Arabinan-Sepharose 6B) และเอสพี-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 (SP-Sephadex C-50) ตามลำดับ พบว่ามีโปรตีน 1 ชนิดที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 215 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลือ 11 เปอร์เซ็นต์

De Ioannes และคณะ (2000) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Penicillium purpurogenum* ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี-100 (Bio-Gel P-100) ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 (CM-Sephadex C-50) ฟีนิล-อะกาโรส (Phenyl-agarose) และไบโอ-เจล พี-100 (Bio-Gel P-100) ตามลำดับ จะได้แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ 1 ชนิด มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 22 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลือ 6 เปอร์เซ็นต์

Matsuo และคณะ (2000) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces chartreusis* GS901 ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0-70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปไดอะไลส์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนซีเอ็ม-เซฟาโรส ซีแอล-6บี (CM-Sephacryl CL-6B) แล้วชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.25 โมลาร์ พบว่ามีโปรตีน 2 ชนิดที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ คือ α -L-AFase I และ α -L-AFase II จากนั้นนำเอนไซม์ทั้งสองชนิดมาผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200) แล้วนำเฉพาะ α -L-AFase I มาทำโครมาโทกราฟีต่อบนโมโน คิว (Mono Q) พบว่าทั้ง α -L-AFase I และ α -L-AFase II มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 182 และ 54.6 เท่า ตามลำดับ และมีแอกติวิตีคงเหลืออยู่ 6.57 และ 1.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Rahman และคณะ (2001) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Rhizomucor pusillus* HHT-1 ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 92 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปไดอะไลส์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนซูเปอร์เด็กซ์ 200 พีจี (Superdex 200 PG) ซีเอ็ม-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม (CM-Toyopearl 650 M) และโพโรส คิวอี/เอ็ม (Poros QE/M) ตามลำดับ พบว่ามีโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.6 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลือ 7.5 เปอร์เซ็นต์

Degrassi และคณะ (2003) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Bacillus pumilus* PS213 ให้บริสุทธิ์ โดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน YM10 แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30-80 เปอร์เซ็นต์ โดยนำโปรตีนไปไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์

บิส-ทริส บัฟเฟอร์ pH 6.5 ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนคิว-เซฟาโรส ฟาสท์ โฟล์ (Q Sepharose fast flow) ฟีนิล เซฟาโรส เฮชพี (Phenyl Sepharose HP) และเซฟาคริล เอชอาร์ 200 (Sephacryl HR 200) ตามลำดับ จะได้แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์เพียง 1 ชนิด ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 52.7 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลือ 26.2 เปอร์เซ็นต์

Panagiotou และคณะ (2003) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์จาก *Fusarium oxysporum* ให้บริสุทธิ์ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน เอสพี-เซฟาโรส (SP-Sepharose) 2 ครั้ง พบว่ามีโปรตีน 2 ชนิดที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ คือ ABF1 และ ABF2 จากนั้นนำโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยทำโครมาโทกราฟีบน ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน (t-butyl hydrophobic interaction) ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส200 (Sephacryl S-200) พบว่า ทั้ง ABF1 และ ABF2 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.9 และ 20.4 เท่า ตามลำดับ และมีแอกติวิตีคงเหลืออยู่เท่ากับ 6.4 และ 11.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Sakamoto และ Kawasaki (2003) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์จาก *Penicillium chrysogenum* ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปไดอะไลส์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.0 จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนรีซอร์ส คิว (Resource Q) แล้วชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.2 โมลาร์ พบว่ามีโปรตีน 2 ชนิดที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ คือ AFQ1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลางในคอลัมน์ และ AFS1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับกับตัวกลางในคอลัมน์ จากนั้นนำ AFQ1 ที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีบนโมโน คิว (Mono Q) ฟีนิล ซุปเปอร์โรส (Phenyl Superose) และซุปเปอร์เด็กซ์ 75 (Superdex 75) ตามลำดับ พบว่า AFQ1 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17 เท่า และแอกติวิตีคงเหลืออยู่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันก็นำ AFS1 ที่ได้มาทำโครมาโทกราฟีบนรีซอร์ส เอส (Resource S) แล้วตามด้วยซุปเปอร์เด็กซ์ 75 (Superdex 75) พบว่า AFS1 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 39.7 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลืออยู่ 24.1 เปอร์เซ็นต์

2.5 น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

ได้มีรายงานการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีขนาดแตกต่างกันและยังประกอบด้วยจำนวนหน่วยย่อยต่างๆกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน) (เจลฟิลเตรชัน)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus awamori</i>	-	64,000	Wood และ McCrae, 1996
<i>Aspergillus awamori</i> IFO4033			
α -L-AFase I	-	81,000	Kaneko และคณะ, 1998
α -L-AFase II	-	62,000	
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	65,000	Ramon และคณะ, 1993
<i>Aspergillus niger</i>	61,000	-	Gunata และคณะ, 1990
<i>Aspergillus niger</i> 5-16	-	67,000	Kaneko และคณะ, 1993
<i>Aspergillus sojae</i>	-	34,300	Kimura และคณะ, 1995
<i>Aureobasidium pullulans</i>	210,000	(2) 105,000	Saha และ Bothast, 1998
<i>Bacillus pumilus</i>	220,000	(4) 60,000	Degrassi และคณะ, 2003
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	256,000	(4) 64,000	Gilead และ Shoham, 1995
<i>Bacteroides xylanolyticus</i> X5-1	364,000	(6) 61,000	Schyns และคณะ, 1994
<i>Bifidobacterium longum</i> B667	260,000	(4) 61,000	Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> GS113	240,000	(8) 31,000	Hespell และ O'Bryan, 1992
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	-	94,000	Lee และ Forsberg, 1987

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน) (เจด ฟิลเตรชัน)	จำนวนหน่วย ย่อยและ น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Cytophaga xylanolytica</i>	210,000	-	Renner และ Breznak, 1998
<i>Fusarium oxysporum</i>			
ABF1	200,000	(3) 65,000	Panagiotou และคณะ, 2003
ABF2	180,000	(3) 56,000	
<i>Penicillium capsulatum</i>			
Ara I	-	64,500	Filho และคณะ, 1996
Ara II	-	62,700	
<i>Penicillium chrysogenum</i>			
AFQ1	-	79,000	Sakamoto และ Kawasaki,
AFS1	-	52,000	2003
<i>Penicillium purpurogenum</i>	-	58,000	De Ioannes และคณะ, 2000
<i>Rhizomucor pusillus</i> HHT-1	-	88,000	Rahman และคณะ, 2001
<i>Ruminococcus albus</i> 8	310,000	(4) 75,000	Greve และคณะ, 1984
<i>Streptomyces chartreusis</i> GS901			
AFase I	-	80,000	Matsuo และคณะ, 2000
AFase II	-	37,000	
<i>Streptomyces diastaticus</i>			
C1	-	38,000	Tajana และคณะ, 1992
C2	-	60,000	
<i>Streptomyces purpurascens</i>	495,000	(8) 62,000	Komae และคณะ, 1982
IFO3389			
<i>Streptomyces</i> sp. No.17-1	-	92,000	Kaji และคณะ, 1981

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงจำนวนหน่วยย่อย

2.6 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

2.6.1 คุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีคุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 คุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
	คุณภูมิ (องศา เซลเซียส)	ความเป็น กรดต่าง	
<i>Aspergillus awamori</i>	50	4.6	Wood และ McCrae, 1996
<i>Aspergillus awamori</i> IFO4033			
α -L-AFase I	60	4.0	Kaneko และคณะ, 1998
α -L-AFase II	60	4.0	
<i>Aspergillus nidulans</i>	65	4.0	Ramon และคณะ, 1993
<i>Aspergillus niger</i>	60	3.9	Gunata และคณะ, 1990
<i>Aspergillus niger</i> 5-16	60	4.0	Kaneko และคณะ, 1993
<i>Aspergillus sojae</i>	50	5.0	Kimura และคณะ, 1995
<i>Aureobasidium pullulans</i>	75	4.0-4.5	Saha และ Bothast, 1998
<i>Bacillus pumilus</i>	55	7.0	Degrassi และคณะ, 2003
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	70	5.5-6.0	Gilead และ Shoham, 1995
<i>Bacteroides xylanolyticus</i> X5-1	50	5.5-6.0	Schyns และคณะ, 1994
<i>Bifidobacterium longum</i> B667	-	6.0	Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> GS113	45	6.0-6.5	Hespell และ O'Bryan, 1992

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ความเป็น กรดต่าง	
<i>Cochliobolus carbonum</i>	50	3.5-4.0	Ransom และ Walton, 1997
<i>Fusarium oxysporum</i>			
ABF1	50-60	6.0	Panagiotou และคณะ, 2003
ABF2	50-60	6.0	
<i>Penicillium capsulatum</i>			
Ara I	60	4.0	Filho และคณะ, 1996
Ara II	55	4.0	
<i>Penicillium chrysogenum</i>			
AFQ1	50	4.0-6.5	Sakamoto และ Kawasaki,
AFS1	50	3.3-5.0	2003
<i>Penicillium purpurogenum</i>	50	4.0	De Ioannes และคณะ, 2000
<i>Rhizomucor pusillus</i> HHT-1	65	4.0	Rahman และคณะ, 2001
<i>Streptomyces chartreusis</i> GS901			
AFase I	55	5.5	Matsuo และคณะ, 2000
AFase II	50	7.0	
<i>Streptomyces diastaticus</i>			
C1	-	4.0-7.0	Tajana และคณะ, 1992
C2	-	4.0-7.0	
<i>Streptomyces purpurascens</i>	-	6.5	Komae และคณะ, 1982
IFO3389			
<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	65	9.0	Tuncer, 2000

หมายเหตุ : เครื่องหมาย - หมายถึงไม่ได้รายงานไว้

2.6.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างๆ	ความเสถียรต่อ		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิสูงถึง (องศา เซลเซียส)	ความเป็น กรดต่าง	
<i>Aspergillus awamori</i>	70 (15 min)	-	Wood และ McCrae, 1996
<i>Aspergillus awamori</i> IFO4033			
α-L-AFase I	60	3.0-7.0	Kaneko และคณะ, 1998
α-L-AFase II	60	3.0-7.0	
<i>Aspergillus niger</i> 5-16	30 (2 hr)	4.0-7.0	Kaneko และคณะ, 1993
<i>Aureobasidium pullulans</i>	75 (8 hr)	4.0-5.0	Saha และ Bothast, 1998
<i>Bacillus pumilus</i>	65 (2 hr)	5.5-8.5	Degrassi และคณะ, 2003
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	70 (1 hr)	7.0	Gilead และ Shoham, 1995
<i>Cytophaga xylanolytica</i>	45	4.0-10.0	Renner และ Breznak, 1998
<i>Penicillium capsulatum</i>			
Ara I	70 (17.5min)	4.0	Filho และคณะ, 1996
Ara II	60 (9 min)	4.0	
<i>Penicillium chrysogenum</i>			
AFQ1	50	4.0-8.0	Sakamoto และ Kawasaki,
AFS1	50	3.0-7.0	2003

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างๆ	ความเสถียรต่อ		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิสูง ถึง (องศา เซลเซียส)	ความเป็น กรดต่าง	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	55 (25 min)	-	De loannes และคณะ, 2000
<i>Rhizomucor pusillus</i> HHT-1	70 (1 hr)	7.0-10.0	Rahman และคณะ, 2001
<i>Streptomyces chartreusis</i> GS901			
AFase I	55	5.5	Matsuo และคณะ, 2000
AFase II	50	7.0	
<i>Streptomyces diastaticus</i>			Tajana และคณะ, 1992
C1	-	4.0-7.0	
C2	-	4.0-7.0	
<i>Streptomyces</i> sp. No.17-1	-	4.0-9.0	Kaji และคณะ, 1981
<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	55 (15 min)	4.5-11.0	Tuncer, 2000

2.6.3 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

โดยทั่วไปแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีสับสเตรทเป็นไซแลน อะราบีโนไซแลนและอะราบีแนนที่มีหมู่แอล-อะราบีโนฟิวราโนสเป็นหมู่ข้างเคียง โดยแต่ละแหล่งของไซแลนจะมีองค์ประกอบของหมู่ข้างเคียงที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีผลทำให้แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ต่างๆมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกันไป เมื่อใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ค่าความจำเพาะ (K_m), ความเร็ว (V_{max}) และ ค่า turnover (k_{cat}) ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสต่อพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ จากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อ นาทีต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)	k_{cat} (ต่อ วินาที)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus awamori</i>	1.39	41	-	Wood และ McCrae, 1996
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0.26	21.48	-	Saha และ Bothast, 1998
<i>Bacillus pumilus</i>	1.70	52.90	-	Degrassi และคณะ, 2003
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	0.42	749	-	Gilead และ Shoham, 1995
<i>Bacteroides xyloxyticus</i> X5-1	0.50	155	-	Schyns และคณะ, 1994
<i>Bifidobacterium breve</i> K-110	0.22	9.30	-	Shin Ho-Young และคณะ, 2003
<i>Bifidobacterium longum</i> B667	0.295	417	-	Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> GS113	0.70	109	-	Hespell และ O'Bryan, 1992
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	4.00	36.40	-	Lee และ Forsberg, 1987

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	k_{cat} (ต่อวินาที)	เอกสารอ้างอิง
<i>Fusarium oxysporum</i>				
ABF1	0.39	1.60	-	Panagiotou และคณะ, 2003
ABF2	0.28	4.60	-	
<i>Penicillium chrysogenum</i>				
AFQ1	0.86	-	14.33	Sakamoto และ Kawasaki, 2003
AFS1	1.32	-	59.33	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	1.23	-	6.22	De Ioannes และคณะ, 2000
<i>Rhizomucor pusillus</i> HHT-1	0.59	387	-	Rahman และคณะ, 2001
<i>Rhodotorula flava</i>	9.10	72.50	-	Uesaka และคณะ, 1978
<i>Ruminococcus albus</i> 8	1.30	-	-	Greve และคณะ, 1984
<i>Streptomyces diastaticus</i>				
C1	10.0	105	-	Tajana และคณะ, 1992
C2	12.5	131	-	
<i>Streptomyces purpurascens</i> IFO3389	0.082	89.30	-	Komae และคณะ, 1982
<i>Streptomyces</i> sp. No.17-1	3.60	-	-	Kaji และคณะ, 1981
<i>Trichoderma reesei</i>	1.20	-	-	Poutanen, 1988
<i>Trichoderma reesei</i>				
AF35	1.10	-	259	Nogawa และคณะ, 1999
AF53	0.90	-	269	
<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	0.18	0.04	-	Tuncer, 2000

2.6.4 สารยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

อิออนของโลหะหลายชนิดมีผลยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ จากจุลินทรีย์ต่างๆ ที่แตกต่างกัน โดยความสามารถในการยับยั้งขึ้นกับชนิดและปริมาณของอิออนโลหะนั้นๆ เช่น แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Rhodotorula flava* ถูกยับยั้งการทำงานด้วยอิออนของทองแดง (Cu^{2+}), แมงกานีส (Mn^{2+}) และปรอท (Hg^{2+}) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Uesaka และคณะ, 1978), แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces purpurascens* IFO3389 ถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์ด้วยอิออนของปรอท (Hg^{2+}) และเงิน (Ag^+) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Komae และคณะ, 1982), จาก *Butyrivibrio fibrisolvens* ถูกยับยั้งการทำงานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ของอิออน ปรอท (Hg^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) (Hespell และ O'Bryan, 1992), จาก *Bacillus stearothermophilus* T-6 สามารถถูกยับยั้งด้วยอิออนของปรอท (Hg^{2+}) และเหล็ก (Fe^{2+}) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Gilead และ Shoham, 1995) และจาก *Bifidobacterium longum* B667 ถูกยับยั้งด้วยอิออนของปรอท (Hg^{2+}), ทองแดง (Cu^{2+}) และสังกะสี (Zn^{2+}) (Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003)

สารดัดแปลงอะมิโนบางชนิดยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ เช่น iodoacetamide ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Ruminococcus albus* 8 ได้อย่างสมบูรณ์ แสดงว่าเอนไซม์น่าจะมีกรดอะมิโนซิสเทอีนเกี่ยวข้องของบริเวณ active site (Greve และคณะ, 1984)

นอกจากนี้ มีรายงานว่าอะราบีโนสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการที่แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ย่อยสลายไซแลน อะราบีโนไซแลน และอะราบีแนน สามารถเป็นสารยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์แบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) เช่น แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Thermomonospora fusca* ถูกยับยั้งการทำงานด้วยอะราบีโนส โดยมีค่าคงที่ในการยับยั้ง (K_i) เท่ากับ 33.20 มิลลิโมลาร์ (Bachmann และ McCarthy, 1991) และแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Penicillium capsulatum* จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยอะราบีโนส โดยมีค่าคงที่ในการยับยั้ง (K_i) เท่ากับ 16.40 มิลลิโมลาร์ (Filho และคณะ, 1996)

Streptomyces sp. PC22 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่ภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไซแลเนส (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) และจากการศึกษาสมบัติของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเชื้อสร้างไซแลเนส 2 ชนิด ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส และทนต่อความเป็นกรดต่างได้ในช่วง 5.0-9.0 (Wateewuthajarn และ Pinpanichakarn, 2000) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหมู่ข้างเคียงคือ อะซีทิลเอสเทอร์ส ซึ่งรายงานโดยเวฟุรีย์ ทองคำ (2547) และแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ส รายงานโดยวิชุดา เหล่าเรืองธนา (2547) พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์สได้สูงถึง 0.21 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์สที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 6.0 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างคือ 5.0-9.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์สที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำมาทำงานร่วมกับไซแลเนสเพื่อทำให้การย่อยสลายไซแลเนสมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environmental incubator shaker) รุ่น GYROMAXIM 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., U.S.A.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti Centrifuge J-301 บริษัท Beckman, Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (Digital pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 รุ่น Cyberscan 200 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore, รุ่น Professional NMeter PP-50 บริษัท Sartorius AG, Göttingen, Germany
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic® 401 ของ Milton Roy, U.S.A. และ รุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัทเพอร์กิน แอลเมอร์ จำกัด
6. เครื่องชั่งรุ่น PG2002-S และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan และ รุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
8. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO, U.S.A.
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W760 บริษัท Memmert, Germany
11. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
12. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502-P บริษัท PMC, U.S.A.
13. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Logic LP บริษัท BioRad, U.S.A.
14. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแผ่น (Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual บริษัท BioRad, U.S.A.
15. เครื่อง HPLC รุ่น SCL-8A บริษัท Shimadzu, Japan

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ไซแลนจากเปลือกข้าวโพด (oat spelt xylan) ของ Sigma, U.S.A.
2. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (xylan from birchwood) ของ Sigma, U.S.A.
3. พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α -L-arabino furanoside) ของ Sigma, U.S.A.
4. พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท (*p*-nitrophenyl acetate) ของ Sigma, U.S.A.
5. พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
6. ออโร-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*o*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
7. ออโร-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (*o*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
8. ออโร-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ (*o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
9. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ของ Sigma, U.S.A.
10. แมคโคร-เพรป ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE) ของ BioRad, U.S.A.
11. บิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน (Butyl hydrophobic interaction) ของ BioRad, U.S.A.
12. ไฮดรอกซีอะปาทิต (Hydroxyapatite) ของ BioRad, U.S.A.
13. ซุปเปอร์โอส 12 เพรป เกรด (Superose 12 prep grade) ของ Amersham pharmacia
14. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของ Merck, Germany
15. อะคริลามิด (Acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
16. N,N,N',N'-เตตระเมทิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine, TEMED) ของ Sigma, U.S.A.
17. N,N'-เมทิลีนบิสอะคริลามิด (N,N'-Methylene bis acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
18. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของ Sigma, U.S.A.
19. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) ของ Sigma, U.S.A.
20. ซุกโรสโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุล ของ BioRad, U.S.A.

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

3.3.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. PC22

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารแข็งเอียงข้าวไรย์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนสายใยเจริญเต็มที่ และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 วัน จนสปอร์แก่เป็นสีเทา จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ขูดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อยๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.1.2 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 เพื่อผลิตเอนไซม์

1. ถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ความเข้มข้น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอຍบรอก (Tryptic soy broth, TSB) pH 9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดลวดสปริงอยู่ใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดลวดสปริงอยู่ใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำเลี้ยง เซ็ลที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์และปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์

การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Manin และคณะ (1994) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

0.2 มิลลิลิตร ของ 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

0.025 มิลลิลิตร ของสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบินโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

0.025 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปวัดปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่ถูกปล่อยออกมาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

1 หน่วยของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ แล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอลปริมาตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.3.3 การวิเคราะห์แอกติวิตีของอะซีทิลเอสเทอร์เอส

การตรวจสอบแอกติวิตีของอะซีทิลเอสเทอร์เอสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kormelink และคณะ (1993) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล อะซีเตท (*p*-nitrophenyl acetate) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน 50 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล

0.1 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5

0.3 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่น

0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที นำไปวัดปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่ถูกปล่อยออกมาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

1 หน่วยของอะซีทิลเอสเทอเรส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนอลอะซีเตท แล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอลปริมาตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.3.4 การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส

การตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลเนสดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (1984) โดยการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน ซึ่งสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5

0.8 มิลลิลิตร ของ 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

นำส่วนผสมนี้ไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson (1952)

1 หน่วยเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi และ Nelson (1952)

นำสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมสารละลายเนลสัน (Nelson's reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.2) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยการนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.3.7 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนลำดับส่วนแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

นำส่วนน้ำไซเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียดอย่างช้าๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วน คือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยกวนแต่ละลำดับส่วนของสารแขวนลอยไซเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนน้ำไซด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วละลายตะกอนด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยใช้ปริมาตร

น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลต์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด

3.3.8 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีสึอิมิด (N-ethylmaleimide) ต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด

ป่มแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 3.3.11.1 ปริมาณเท่าๆกัน ในเอ็น-เอธิลมาลีสึอิมิดให้เพิ่มความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.9 ผลของไดไทโอทรีออล (Dithiothreitol) ต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด

ป่มแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 3.3.11.1 ปริมาณเท่าๆกัน ในไดไทโอทรีออลให้เพิ่มความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.10 ผลของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) ต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด

ป่มแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 3.3.11.1 ปริมาณเท่าๆกัน ในโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตให้เพิ่มความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.11 การทำแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิดেসให้บริสุทธิ์

3.3.11.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัวที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.7 พร้อมทั้งกวนเบาๆด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ใน 0.05 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ครั้งสุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลใน 0.05 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก แล้ววัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิดেস

3.3.11.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.3.11.2.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรป ดีอีเออี (Macro-prep DEAE)

ล้างสารแขวนลอยแมคโคร-เพรป ดีอีเออี ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆแล้ว ปล่อยให้เจเลนอนกัน เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ จากนั้นแช่เจลใน 0.05 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 50 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 40-90 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวเจลแล้วชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับแมคโคร-เพรป ดีอีเออี ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม แล้วติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออก โดยใช้ 0-1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรดเยนทีใน 0.05 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้ว

เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดและไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเข้าด้วยกันแล้วทำตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีด้วย concentrator tube (Vivaspin concentrator, Germany) ซึ่งมีเมมเบรนที่มีค่าการคัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลซิสข้ามคืนใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 สุดท้ายนำไปไดอะไลซิสใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด

3.3.11.2.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟีบนบิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน (Butyl hydrophobic interaction)

ล้างสารแขวนลอยบิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ ปล่อยให้เจลนอนกัน เทส่วนน้ำไลพร้อมทั้งเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้อุณหภูมิประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 5.0 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟตใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำผงแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายกับตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.11.2.1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.7 โมลาร์ แล้วนำมาใส่ลงบนผิวหน้าของเจล ชะโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลางด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับตัวกลางในคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 เก็บลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเข้าด้วยกันลดปริมาตรตัวอย่างโดยวิธี concentrating centrifugation ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีด้วย

concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีค่าการคัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ข้ามคืนใน 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของเอนไซม์

3.3.11.2.3 คอลลิมนโครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทต์ (Hydroxyapatite)

แช่ไฮดรอกซีอะปาไทต์ใน 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชั่วโมง เทส่วนน้ำใส่พร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้อุณหภูมิอากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลลิมนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 5.0 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลลิมนิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน ในข้อ 3.3.11.2.2 มาผ่านลงคอลลิมนชะโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลางด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม แล้วจึงชะโปรตีนที่ถูกจับด้วยไฮดรอกซีอะปาไทต์ออกจากคอลลิมนโดยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่ความเข้มข้น 0.02-0.50 โมลาร์ จากนั้นเก็บสารละลายที่ผ่านคอลลิมนลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเอสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.12 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ โดยวิธี พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Native polyacrylamide gel electrophoresis) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

ประกอบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้าง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล จากนั้นเทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.8) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้เต็มแผ่น ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ชับน้ำออกให้หมด แล้วจึงเทสารละลายผสมสแตคกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.9) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่ใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.6) จากนั้นหยอดสารละลายโปรตีน 20 ไมโครลิตร ในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว แช่เจลในสารละลายย้อมโปรตีน (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.10) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.11) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน สำหรับการย้อมแอกติวิตี (activity staining) ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ทำโดย แช่เจลในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 นาน 15 นาที แล้วนำไปแช่ต่อใน พารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยตรวจหาแถบสีเหลืองของพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น

3.3.13 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

3.3.13.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ โดยการทำให้เจลดึงผ่านคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 เพรบ เกรด (Superose 12 prep grade)

ล้างสารแขวนลอยซูเปอร์โรส 12 เพรบ เกรด (Superose 12 prep grade) ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลดอนกัน เทส่วนน้ำเสียทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 กำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลงลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 49.5 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 40 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจลด้วยอัตราการไหล 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม เก็บลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ในแต่ละลำดับส่วน

จากนั้นใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ คะตะเลส (catalase), กลอบบูลิน (globulin) และโบไวน์ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 250,000, 150,000 และ 66,000 ดาลตัน ตามลำดับ ผ่านลงในคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 เพรบ เกรด โดยใช้ภาวะเดียวกันกับเฮนไซม์ข้างต้น นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สำหรับกะตะเลส ติดตามโดยการหยุด 3 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละลำดับส่วนที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตรเช่นกัน แล้วตรวจหาฟองอากาศที่เกิดขึ้น โดยกำหนดให้การสิ้นสุดของการเกิดฟองอากาศภายในทุก 10 วินาทีเท่ากับ 1 หน่วย (AU; arbitrary unit) หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าออกฤทธิ์ที่มีของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะโปรตีนแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์

3.3.13.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์โดยการใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Laemmli (1970)

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์ที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และติดตามด้วยการย้อมแอดิวิตีและตัดแถบสีเหลืองที่เกิดขึ้นแล้วแยกโปรตีนออกจากเจล นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์และสารละลายโปรตีนมาตรฐานมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกอบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้างประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล จากนั้นเทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.10) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้เต็มแผ่น ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ใช้น้ำออกให้หมด แล้วจึงเทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.11) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.1) เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่ใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.8) ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วหยอดสารละลายโปรตีน 20 ไมโครลิตร และโปรตีนมาตรฐานซึ่งเป็น Prestained SDS-PAGE standard 7.5 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วและย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้คิวแมสซี บลู โดยการนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์โดยพิจารณาจากการเคลื่อนที่ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์เทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.3.14 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจาก *Streptomyces* sp. PC22

3.3.14.1 คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรคุณสมบัติที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35-80 องศาเซลเซียส

3.3.14.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในช่วงต่างๆดังนี้

0.5 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.0
0.5 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

3.3.14.3 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสต่ออุณหภูมิ

บ่มแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.14.4 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสต่อความเป็นกรดต่าง

บ่มแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 ดังที่ระบุไว้ในข้อ 3.3.14.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.14.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาผสมกับสับสเตรท คือ พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายขณะที่ทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.1-1.0 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 แล้วนำมาเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) และคำนวณค่า K_m จากสูตร $V_0 = V_{max}[S_0] / [S_0] + K_m$

3.3.14.6 ผลของสารยับยั้งและการหาค่า K_i

3.3.14.6.1 ผลของอะราบีโนสในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 และเติมอะราบีโนสลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0-200 มิลลิโมลาร์

3.3.14.6.2 ผลของไซโลสในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 และเติมไซโลสลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0-200 มิลลิโมลาร์

โดยนำมาเขียนกราฟไลเนียร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) และคำนวณค่า K_i จากสูตร $\text{slope} = K_m / V_{\text{max}} \{1 + [I_0] / K_i\}$

3.3.14.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยเติมอิออนของโลหะชนิดต่างๆลงในสารผสมปฏิกิริยา ที่ความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

แคลเซียมคลอไรด์	(CaCl ₂ ·5H ₂ O)
โคบอลต์คลอไรด์	(CoCl ₂ ·6H ₂ O)
คอปเปอร์ซัลเฟต	(CuSO ₄ ·5H ₂ O)
เฟอร์รัสซัลเฟต	(FeSO ₄ ·7H ₂ O)
เมอคิวรัสคลอไรด์	(HgCl ₂)
แมกนีเซียมซัลเฟต	(MgSO ₄ ·7H ₂ O)
แมงกานีสซัลเฟต	(MnSO ₄ ·H ₂ O)
ซิงค์ซัลเฟต	(ZnSO ₄ ·7H ₂ O)

3.3.14.8 ผลของอีดีทีเอ (EDTA) ต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยเติมอีดีทีเอลงในสารผสมปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 0.5-10 มิลลิโมลาร์ นำไปหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.14.9 ผลของสารดัดแปลงอะมิโนต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์

นำแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาบ่มกับสารดัดแปลงอะมิโนโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-10 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยสารดัดแปลงกรดอะมิโนที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC)

Iodoacetamide (IAM)

N-bromosuccinimide (NBS)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

3.3.14.10 การตรวจสอบความจำเพาะของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity)

นำแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรท โดยใช้สับสเตรทต่างๆดังต่อไปนี้

p-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside (*p*-NPAF) 1 มิลลิโมลาร์

p-nitrophenyl β -D-xylopyranoside (*p*-NPX) 1 มิลลิโมลาร์

o-nitrophenyl β -D-xylopyranoside (*o*-NPX) 1 มิลลิโมลาร์

o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (*o*-NPGal) 1 มิลลิโมลาร์

o-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*o*-NPGlu) 1 มิลลิโมลาร์

ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ไซแลนจากไม้เบิร์ช (birchwood xylan) 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับ *p*-NPAF, *p*-NPX, *o*-NPX, *o*-NPGal และ *o*-NPGlu วิเคราะห์ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาตามวิธีการในข้อ 3.3.2

สำหรับการวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์ที่ใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท วิเคราะห์โดย HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยการวัดปริมาณอะราบีโนสที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาที่มีส่วนผสม ดังนี้

0.1 โมลาร์ ของ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

สารละลายของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร 20 มิลลิกรัม ของสับสเตรทไซแลน

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.33 โมลาร์ของกรดซัลฟูริกปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมากรองผ่านเซลลูโลสอะซีเตทเมมเบรน ที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีด HPLC เพื่อตรวจหาปริมาณอะราบีโนสที่เกิดขึ้น ซึ่งภาวะ HPLC มีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

คอลัมน์ (Column)	HPX-87H
ตัวชะสาร (Mobile phase)	0.005 โมลาร์ของกรดซัลฟูริก
อัตราการไหล (Flow rate)	0.6 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	45 °ซ
Detector	Refractive index (RI)
ปริมาตรสารที่ฉีด	20 ไมโครลิตร

นำพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณอะราบีโนสโดยเทียบกับโครมาโทแกรมของ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอะราบีโนสมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์โดยมี 1.0 เปอร์เซ็นต์ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการในข้อ 3.3.1 รวมทั้งการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ได้ประมาณ 0.25-0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 1.9-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ ในขั้นตอนต่อไปจึงได้ศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์

4.2. การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนลำดับส่วนแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

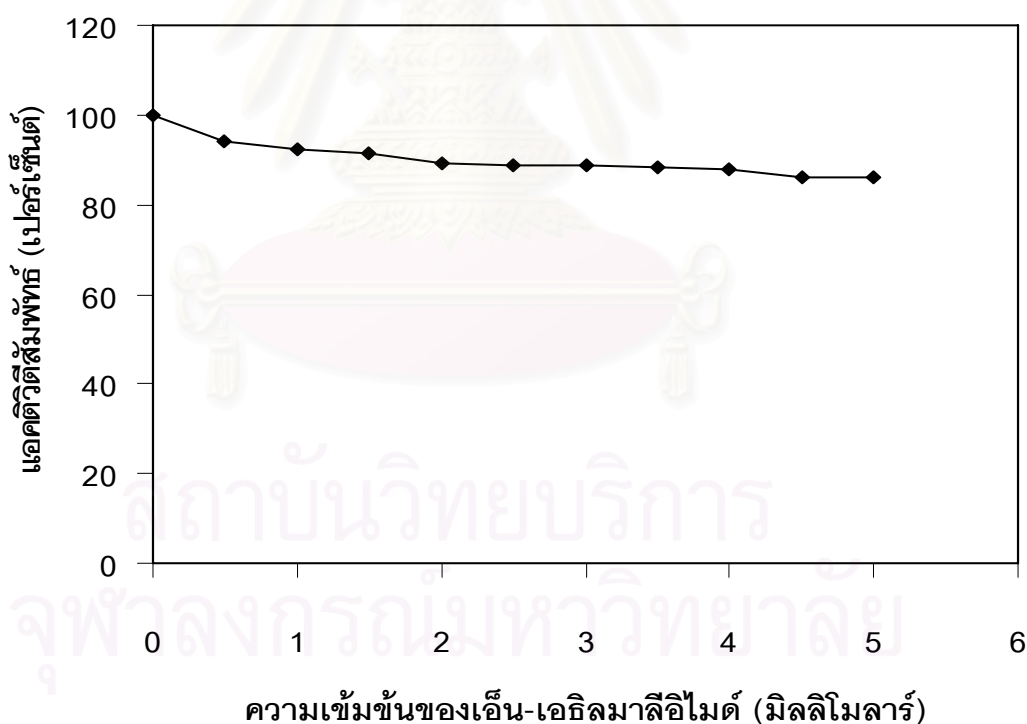
การทดลองนี้เป็นการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนลำดับส่วนของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนรวมทั้งให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์และกากอาหารออกแล้วมาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ คือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ นำโปรตีนที่ได้ในแต่ละลำดับส่วนไปวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ พบว่ามีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ครอบคลุมอยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.1 อย่างไรก็ตาม เพื่อให้สูญเสียปริมาณเอนไซม์ที่จะนำไปทำให้อบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ดังนั้นในการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์จากน้ำเลี้ยงเชื้อจึงจะเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในช่วง 40-90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ลำดับส่วนของ แอมโมเนียม ซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีน ทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกติวิตี ทั้งหมด (หน่วย)	แอกติวิตี จำเพาะ (หน่วย ต่อมก.โปรตีน)	แอกติวิตี สัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
เอนไซม์จากน้ำ เลี้ยงเชื้อ	165.00	354.75	35.80	0.10	100
0-20	1.20	10.80	0.08	0.01	0.22
20-30	0.70	4.49	0.06	0.01	0.17
30-40	0.65	4.62	0.06	0.01	0.17
40-50	0.80	4.07	1.58	0.39	4.41
50-60	0.80	5.30	11.75	2.22	32.82
60-70	2.00	7.40	6.86	0.93	19.16
70-80	1.00	3.43	1.66	0.48	4.64
80-90	1.00	5.50	1.47	0.27	4.11

4.3 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอีไมด์ต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

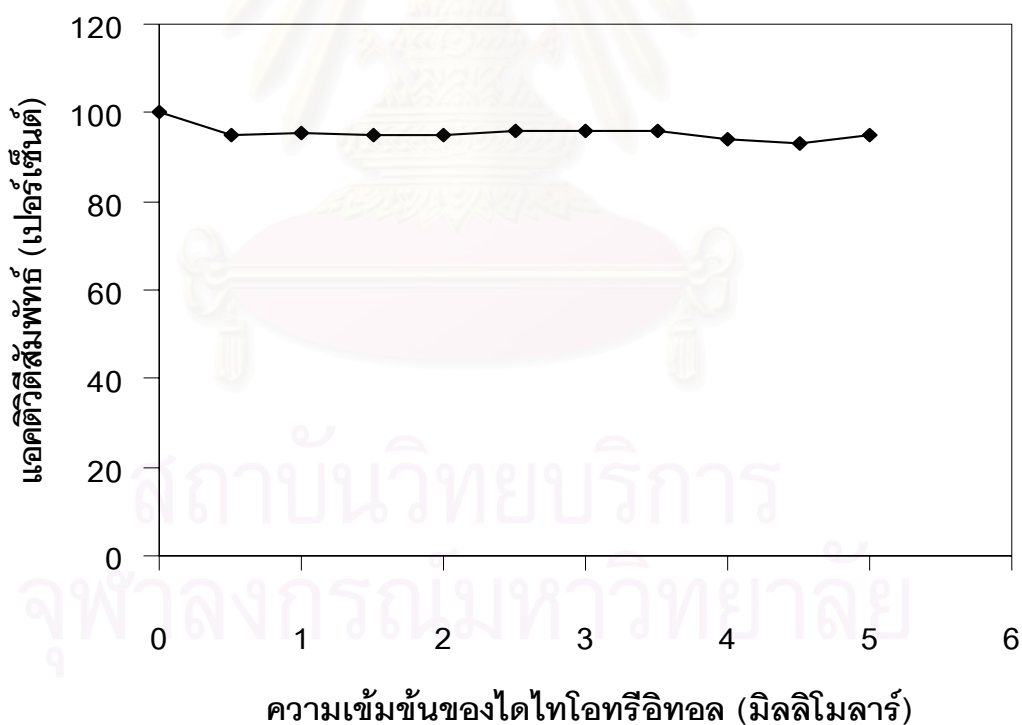
การทดลองนี้เพื่อทดสอบว่าเอ็นไซม์มีหมู่ไรโอดซึ่งไวต่อการถูกออกซิไดส์ด้วยอากาศ เกี่ยวข้องกับ active site หรือไม่ จึงทำการทดลองโดยบ่มเอ็นไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเท่าๆกัน ในเอ็น-เอธิลมาลีอีไมด์ซึ่งทำหน้าที่เอธิลเลท (ethylate) หมู่ไรโอด โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ที่เหลืออยู่ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเอ็น-เอธิลมาลีอีไมด์มีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้เพียงเล็กน้อย โดยที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งได้เพียง 14 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหมู่ไรโอดจึงไม่น่าจะมีบทบาทสำคัญในบริเวณ active site ของเอ็นไซม์



รูปที่ 4.1 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอีไมด์ต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

4.4 ผลของไดไทโอเทรีอิทอลต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์

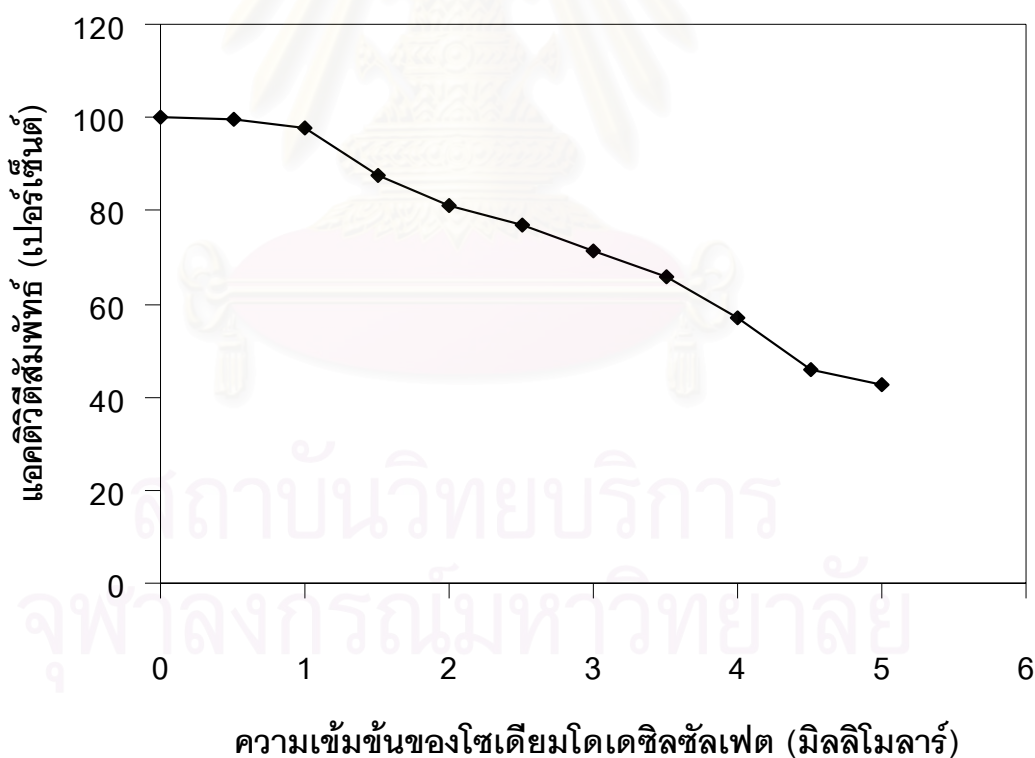
การทดลองนี้เพื่อทดสอบว่าเอนไซม์มีพันธะ disulfide เป็น active site หรือไม่ ซึ่งไดไทโอเทรีอิทอลจะทำหน้าที่รีดิวซ์พันธะ disulfide จึงทำการทดลองโดยบ่มเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเท่าๆกัน โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์ที่เหลืออยู่ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าไดไทโอเทรีอิทอลมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อย โดยที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งได้เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นพันธะ disulfide จึงไม่น่าจะมีบทบาทสำคัญในบริเวณ active site ของเอนไซม์



รูปที่ 4.2 ผลของไดไทโอเทรีอิทอลต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์

4.5 ผลของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

การทดลองนี้เพื่อทดสอบเบื้องต้นว่าเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายๆหน่วยหรือไม่ โดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตซึ่งมีประจุลบสูงจะทำหน้าที่ทำลายการยึดจับกันของหน่วยย่อย จึงทำการทดลองโดยปมเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเท่าๆกัน โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ที่เหลืออยู่ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ยับยั้งได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย



รูปที่ 4.3 ผลของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

4.6 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসให้บริสุทธิ์

4.6.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ที่ปั่นแยกไมซีเลียมาแล้วได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 345 มิลลิลิตร ซึ่งมีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসรวมทั้งหมด 97.98 หน่วย ดังแสดงในตารางที่ 4.2 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-90 เปอร์เซ็นต์ โดยหลังจากการไดอะไลซิสในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว พบว่ามีแอกติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 6.67 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น โดยยังมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 76.84 เปอร์เซ็นต์

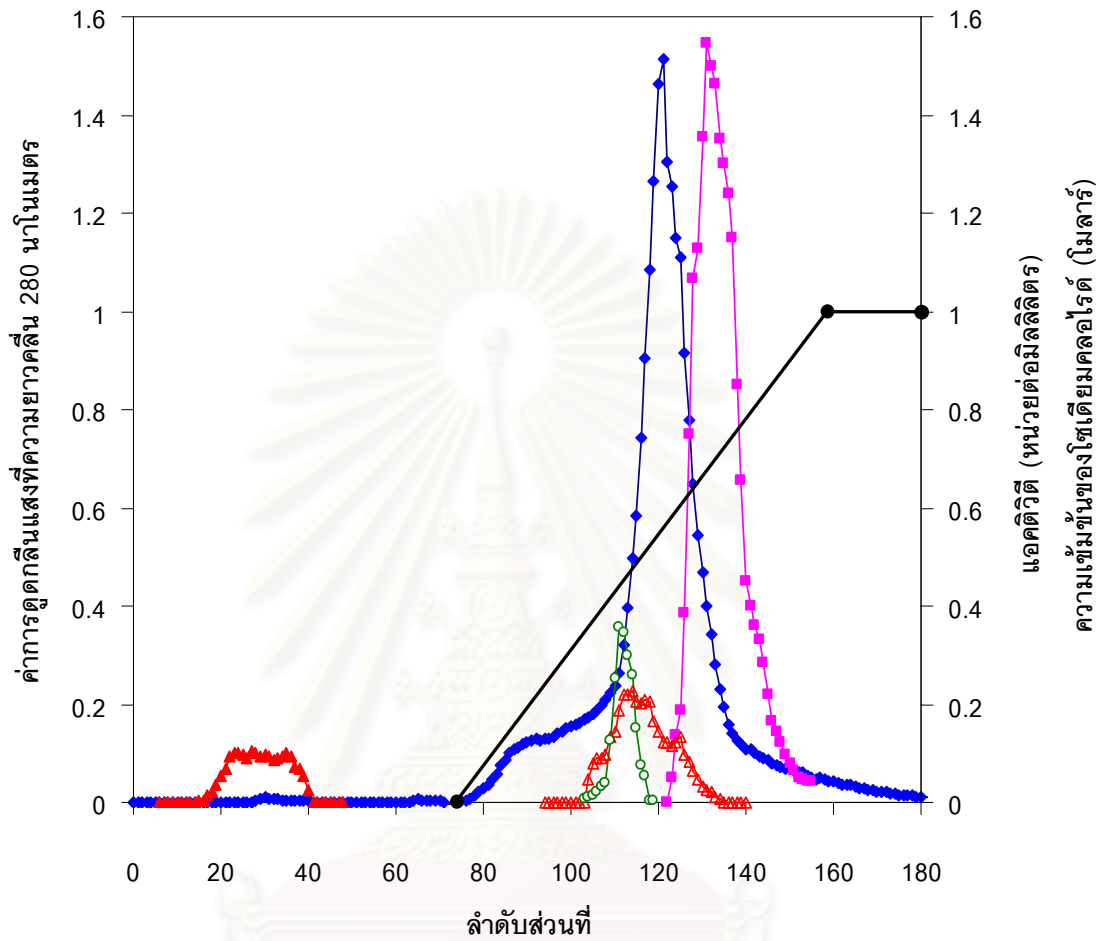
นอกจากนั้นได้วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสและอะซีทิลเอสเทอเรสในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ โดยมีแอกติวิตีของไซแลเนสและอะซีทิลเอสเทอเรสทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 712.42 และ 51.75 หน่วย ตามลำดับ แต่เมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในลำดับส่วน 40-90 เปอร์เซ็นต์แล้ว พบว่ามีแอกติวิตีของไซแลเนสและอะซีทิลเอสเทอเรสปนเปื้อนเหลืออยู่ 26.92 และ 4.83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

4.6.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.6.2.1 โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี

นำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-90 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นปริมาณโปรตีน 75.20 มิลลิกรัม ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการ reverse dialyze ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพרב ดีอีเออี ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) ตามวิธีการในข้อ 3.3.11.2.1 และชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ ดังนั้นจึงสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆ ที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไป รวมทั้งไซแลเนส I (Wateewuthajarn และ Pinpanichakarn, 2000) โดยแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.60-0.84 โมลาร์ จึงได้รวมลำดับส่วนของ 123-152 เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งมีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 39.17 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 3.07 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะ 12.76 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 85.07 เท่า

อย่างไรก็ตามการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ พบว่าไซแลเนส II ซึ่งจับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบเช่นกัน (Wateewuthajarn และ Pinpanichakarn, 2000) ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.38-0.65 โมลาร์ ดังนั้นจึงปนเปื้อนอยู่ในลำดับส่วนของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสด้วย แต่ในปริมาณต่ำคิดเป็น 0.11 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีเริ่มต้นทั้งหมดของไซแลเนส สำหรับการวิเคราะห์แอกติวิตีของอะซีทิลเอสเทอร์สในแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสที่เตรียมได้ ไม่พบว่ามี การปนเปื้อนของอะซีทิลเอสเทอร์ส เนื่องจากอะซีทิลเอสเทอร์สถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.36-0.48 โมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2



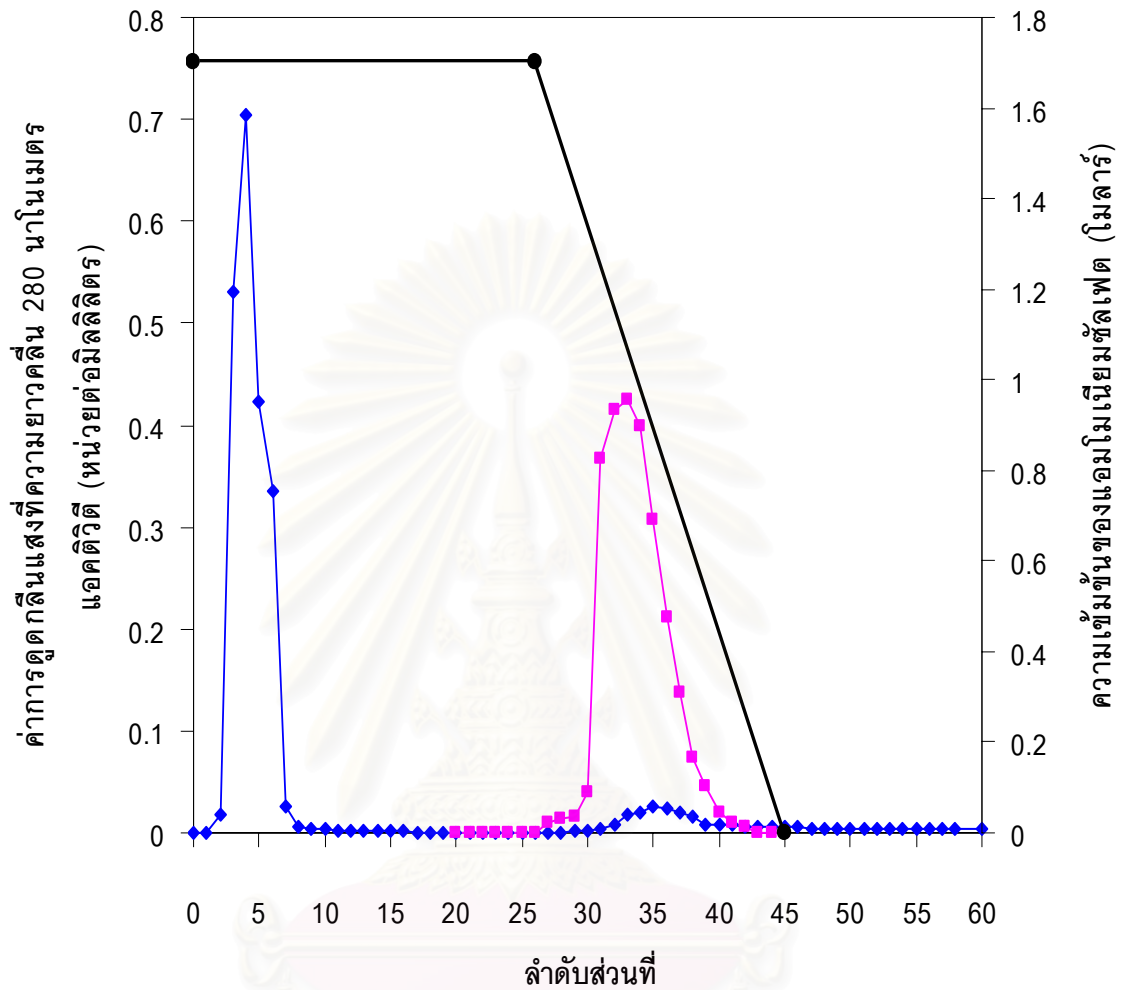
รูปที่ 4.4 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเอช ไซโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของไฮเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

- ◆— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดเอส
- ▲— แอกติวิตีของไซแลเนส I
- △— แอกติวิตีของไซแลเนส II
- แอกติวิตีของอะซีทิลเอสเทอร์
- ความเข้มข้นของไฮเดียมคลอไรด์

4.6.2.2 โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์บิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ในข้อ 4.6.2.1 คิดเป็นปริมาณโปรตีน 3.07 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ของบิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน และชะโปรตีนที่มีสมบัติที่ชอบน้ำออกจากโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำด้วย เกรเดียนต์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 4.5 พบว่าเอนไซม์มีสมบัติค่อนข้างไฮโดรโฟบิกจะจับกับตัวกลางในคอลัมน์ชนิดนี้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้ จึงสามารถกำจัดโปรตีนที่มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกซึ่งมีปริมาณมากออกไปได้ ส่วนแอลฟา-แอล-อะลาบินในพิวราโนลิเคสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 30-39 ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 1.4-0.6 โมลาร์ จึงรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นนำไปไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เพื่อกำจัดเกลือออก สุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 วัดปริมาตรรวมได้ 13.50 มิลลิลิตร มีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 23.77 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 1.59 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะ 14.95 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 99.67 เท่า และยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 24.26 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสในตัวอย่างเอนไซม์เข้มข้นที่เตรียมได้จากขั้นตอนนี้ พบว่ามีปนเปื้อนเล็กน้อยเพียง 0.08 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีเริ่มต้นทั้งหมดของไซแลเนส



รูปที่ 4.5 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ บิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน ซะโปรตีนด้วย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 และเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง

- ◆— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต

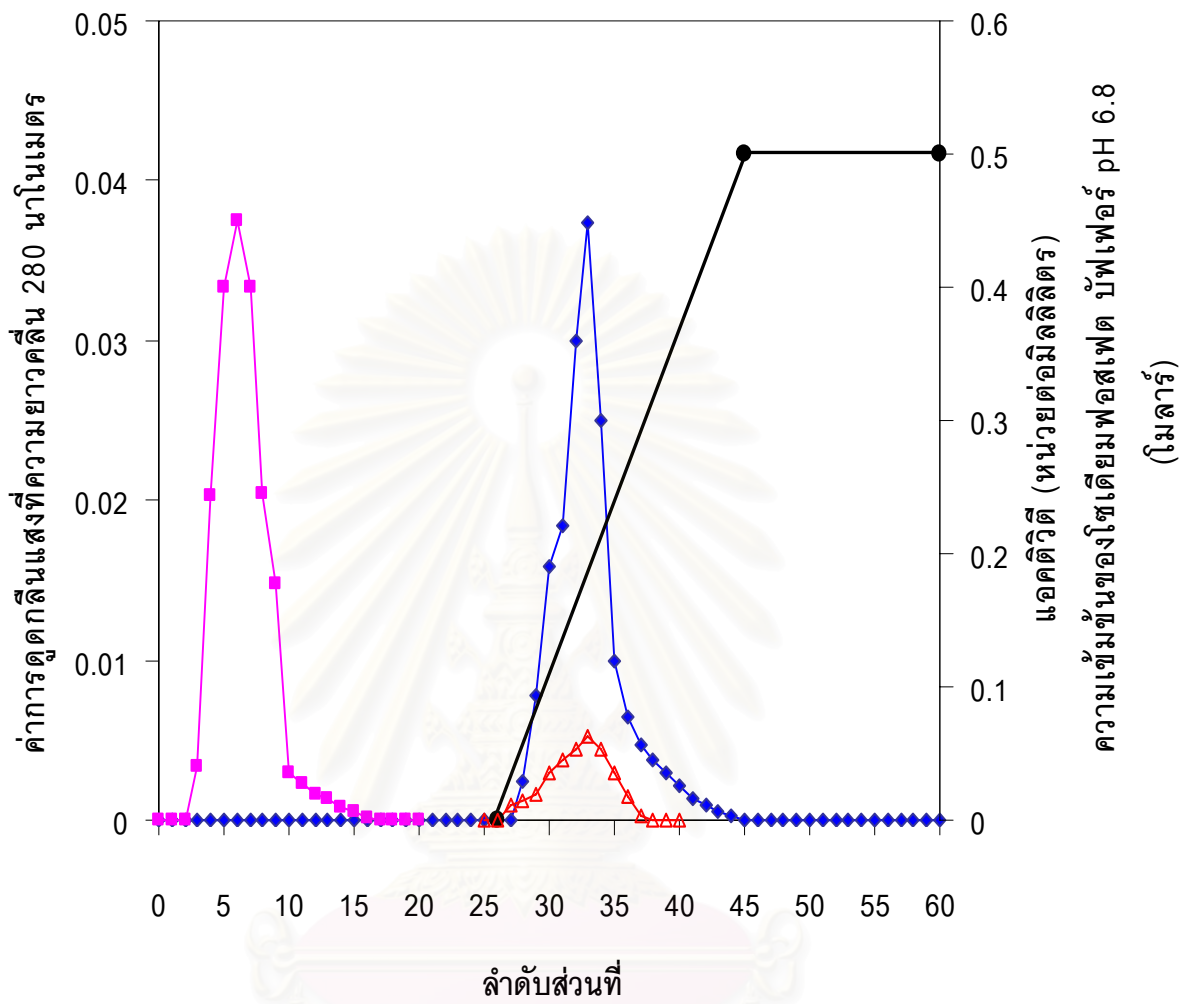
4.6.2.3 โครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทด์

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนบิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน ในข้อ 4.6.2.2 คิดเป็นปริมาณโปรตีนรวม 1.59 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์ อะโปรตีนที่จับกับตัวกลางด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ 20-500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ผลการทดลองดังในรูปที่ 4.6 พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ไม่จับกับตัวกลางในคอลัมน์ โดยถูกชะออกจากคอลัมน์ในลำดับส่วนที่ 3-10 เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นแล้ว วัดปริมาตรรวมได้ 11.88 มิลลิลิตร มีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 12.85 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.77 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะ 16.69 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 111.27 เท่า และยังคงเหลือแอกติวิตีอยู่ 13.12 เปอร์เซ็นต์

จากการติดตามแอกติวิตีของไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน พบว่าไซแลเนสจับกับตัวกลางในคอลัมน์โดยถูกชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่ความเข้มข้น 50-300 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงสามารถแยกไซแลเนสออกจากแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ได้ ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

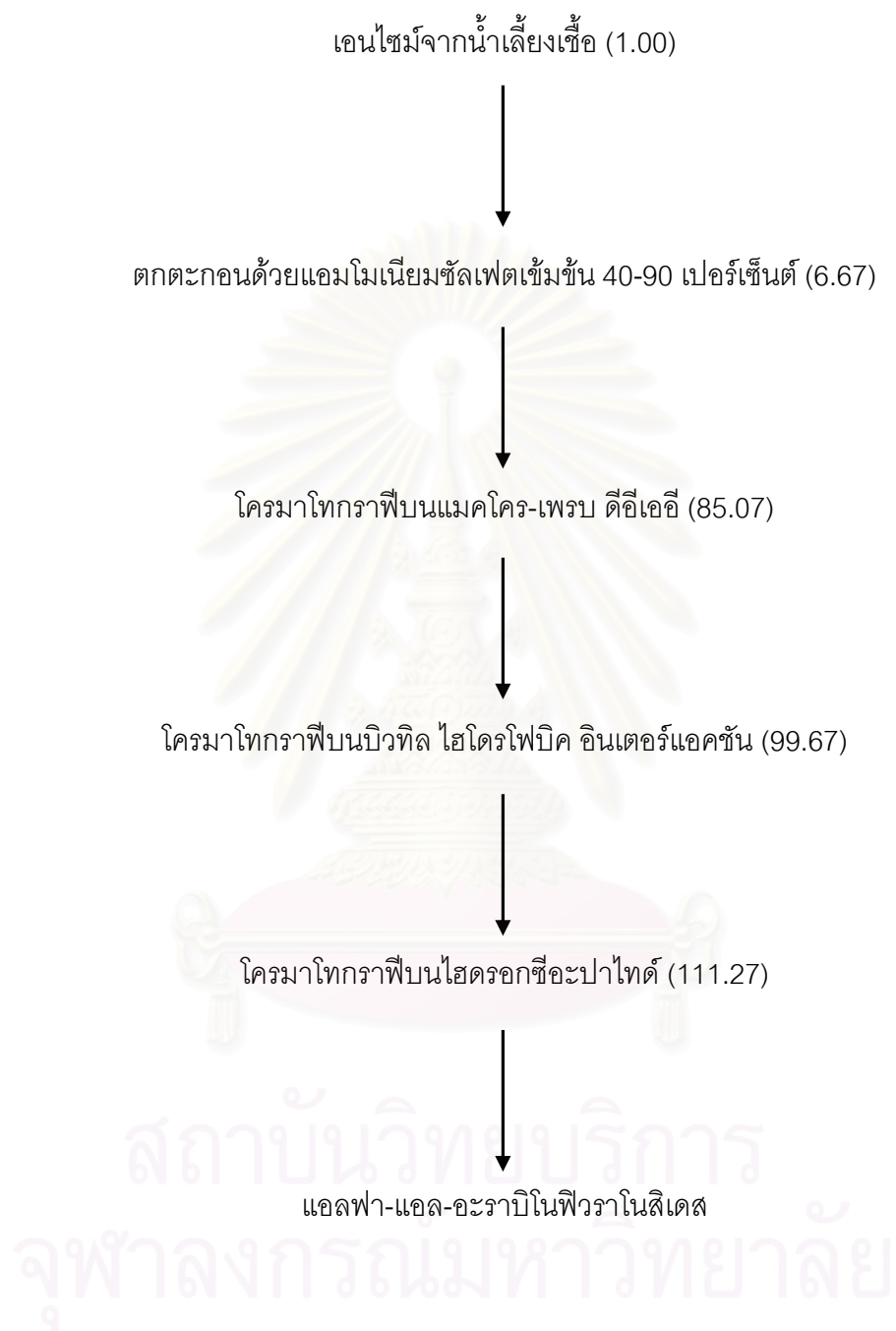
ขั้นตอนและผลการทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์สจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.6 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์ อะปาร์ตด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียนท์ของเส้นตรงของ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 0.02-0.50 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์ เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

- ◆— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิด
- △— แอกติวิตีของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8
- ความเข้มข้นของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8



รูปที่ 4.7 ขั้นตอนการทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์เมื่อเทียบกับเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนพิวราโนไซด์สจาก *Streptomyces* sp. PC22 . ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอน การทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอกติวิตี ทั้งหมดของ แอลฟา-แอล- อะราบิโนพิว ราโนไซด์ส (หน่วย)	โปรตีน ทั้งหมด (มก.)	แอกติวิตี จำเพาะของ แอลฟา-แอล- อะราบิโนพิว ราโนไซด์ส (หน่วยต่อมก. โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์ แอกติวิตี ของ แอลฟา-แอล- อะราบิโนพิว ราโนไซด์ส	ความบริสุทธิ์ ของ แอลฟา-แอล- อะราบิโนพิว ราโนไซด์ส (เท่า)	แอกติวิตี ทั้งหมดของ ไซแลเนส (หน่วย)	เปอร์เซ็นต์ แอกติวิตี ของ ไซแลเนส	แอกติวิตี ทั้งหมด ของอะซีทิล เอสเทอร์เอส (หน่วย)	เปอร์เซ็นต์ แอกติวิตี ของอะซีทิล เอสเทอร์เอส
1. เอนไซม์น้ำเลี้ยงเชื้อ	345.00	97.98	658.26	0.15	100	1.00	712.42	100.00	51.75	100.00
2. ตกตะกอนด้วย 40-90 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต	9.60	75.29	75.20	1.00	76.84	6.67	191.81	26.92	2.50	4.83
3. แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี	7.20	39.17	3.07	12.76	39.98	85.07	0.80	0.11	0.00	0.00
4. บิวทิล ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอกชัน	13.50	23.77	1.59	14.95	24.26	99.67	0.54	0.08	0.00	0.00
5. ไฮดรอกซีอะปาไทด์	11.88	12.85	0.77	16.69	13.12	111.27	0.00	0.00	0.00	0.00

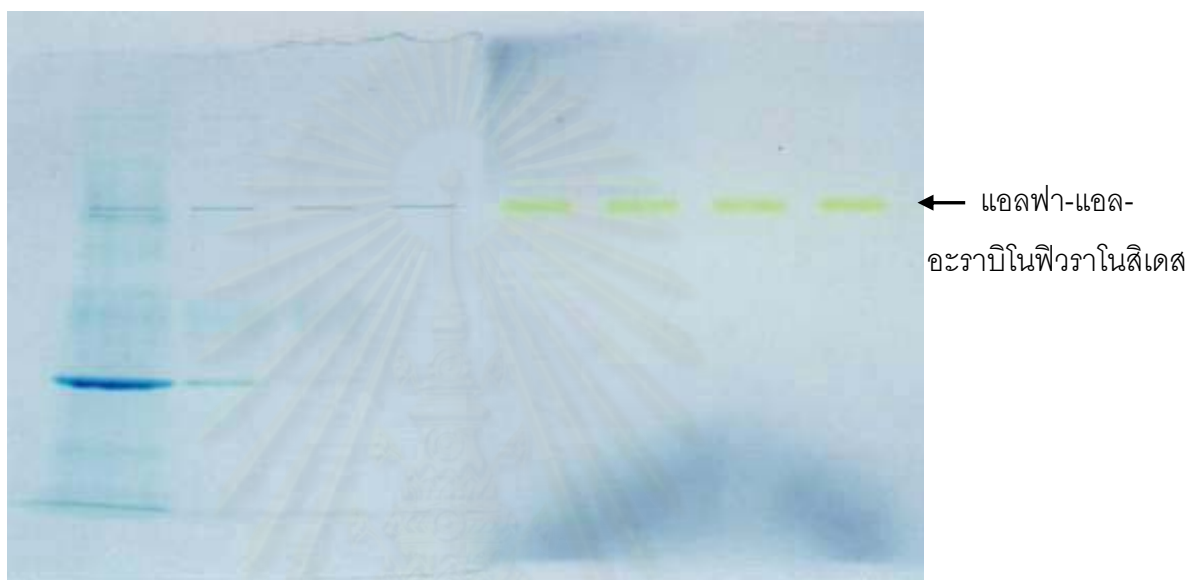
4.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেসที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำให้พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดแผ่นแล้วย้อมโปรตีนด้วยสีคูแมสซี บลู พบว่าจำนวนแถบโปรตีนในส่วนที่ผ่านการทำให้โครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทด์มีน้อยกว่าในส่วนที่ผ่านการโครมาโทกราฟีบนบิวทิล ไฮโดรโอฟิด อินเตอร์แอคชัน และแมคโคร-เพรบ ดีอีเออีมาก ซึ่งสอดคล้องกับแอกติวิตีจำเพาะที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.2

อย่างไรก็ตาม แม้จำนวนแถบโปรตีนในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์จะลดลงมาก แต่ก็ยังปรากฏแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนใดที่เป็นแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেস จึงได้ตัดแผ่นเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู อีกส่วนหนึ่งนำไปย้อมแอกติวิตี (activity staining) โดยใช้ 5 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์เป็นสับสเตรท จากนั้นนำเจลส่วนที่ย้อมแอกติวิตีมาเปรียบเทียบกับแถบสีเหลืองจะแสดงแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেস ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 ผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนที่แสดงแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেসไม่ใช่แถบโปรตีนหลัก (major protein) ซึ่งเป็นแถบสีน้ำเงินเข้ม

จากนั้นได้พยายามทำเอนไซม์นี้ให้บริสุทธิ์เพื่อให้ถึงระดับโปรตีนเดี่ยว (homogeneity) โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะนำตัวอย่างไปใช้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ต่อไป จึงได้นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนไฮดรอกซีอะปาไทด์ มาทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วตัดแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู อีกส่วนหนึ่งนำไปแช่ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาณน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแผ่นเจลที่ย้อมโปรตีนมาเทียบกับแผ่นเจลส่วนที่สองเพื่อตัดเจลเฉพาะแถบที่เป็นโปรตีนของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেস นำไปชะออกโดยโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 และนำส่วนน้ำใสมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการปั่นเหวี่ยงใน concentrator tube ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากโดยแสดงแถบหนาของเอนไซม์ 1 แถบ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

1 2 3 4 5 6 7 8



รูปที่ 4.8 พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ

แถวที่ 1-4 ย้อมสีโปรตีนด้วยสียคูแมสซี บลู

แถวที่ 5-8 ย้อมแอกติวิตีด้วยพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

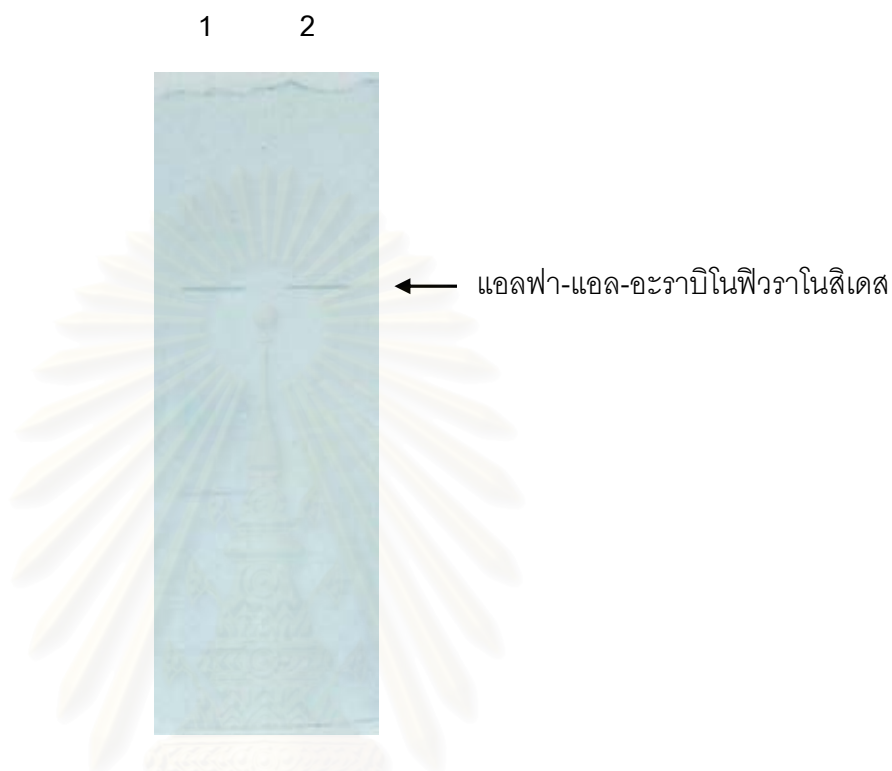
(ทุกตัวอย่างใช้ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม)

แถวที่ 1,5 เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 40-90 เปอร์เซ็นต์

แถวที่ 2,6 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์แมคโคร-เพรบบ ดีอีเออี

แถวที่ 3,7 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์บิวทิล ไฮโดรโอฟิบค อินเตอร์แอกชัน

แถวที่ 4,8 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์



รูปที่ 4.9 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรไฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์และโปรตีนที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการตัดเจล

แถวที่ 1 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์

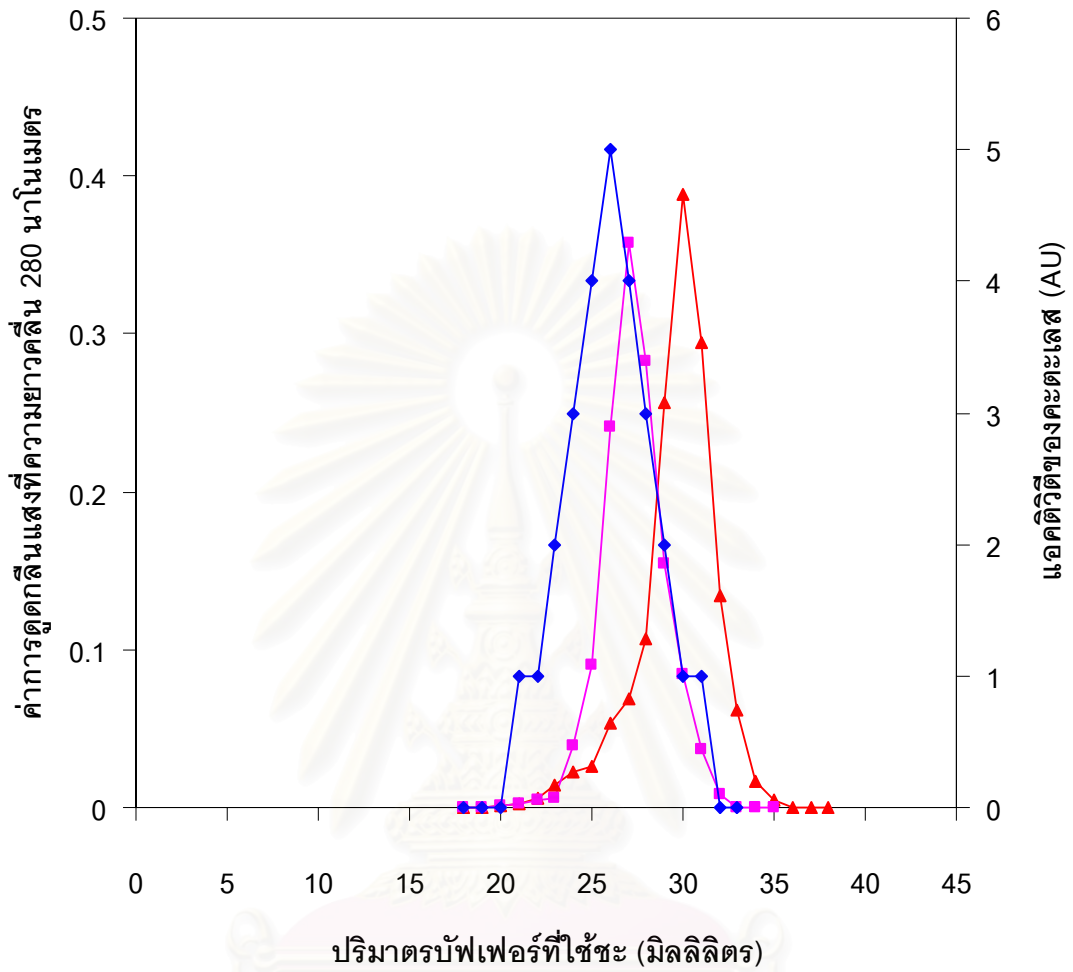
แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจล ย้อมด้วยสีคูเมสซี บลู

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส

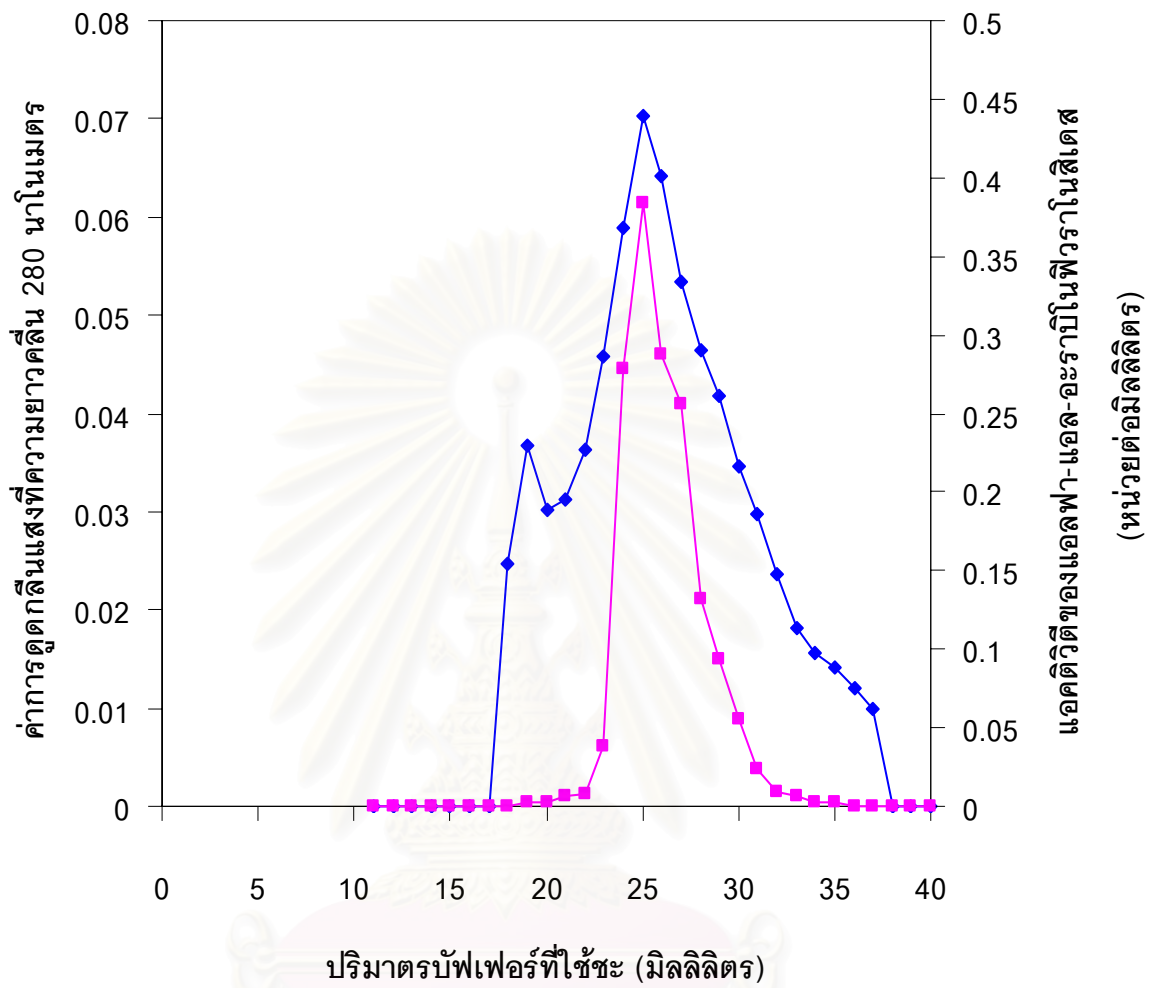
4.8.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสโดยการทำให้เจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 เพอร์ เกรด

การทดลองนี้ได้หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสโดยการทำให้เจลฟิลเตรชัน โดยใช้โปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ได้แก่ คะตะเลส 250,000 ดาลตัน, กลอบบูลิน 150,000 ดาลตัน และโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 66,000 ดาลตัน ตามลำดับ เป็นโปรตีนมาตรฐาน ทำการผ่านโปรตีนเหล่านี้ลงบนคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 เพอร์ เกรด ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกันและอยู่ภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่ใช้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส แล้วติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ส่วนการติดตามกะตะเลส ทำโดยการหยด 3 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในแต่ละลำดับส่วน แล้วตรวจหาฟองอากาศที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11 เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยพบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 317,000 ดาลตัน



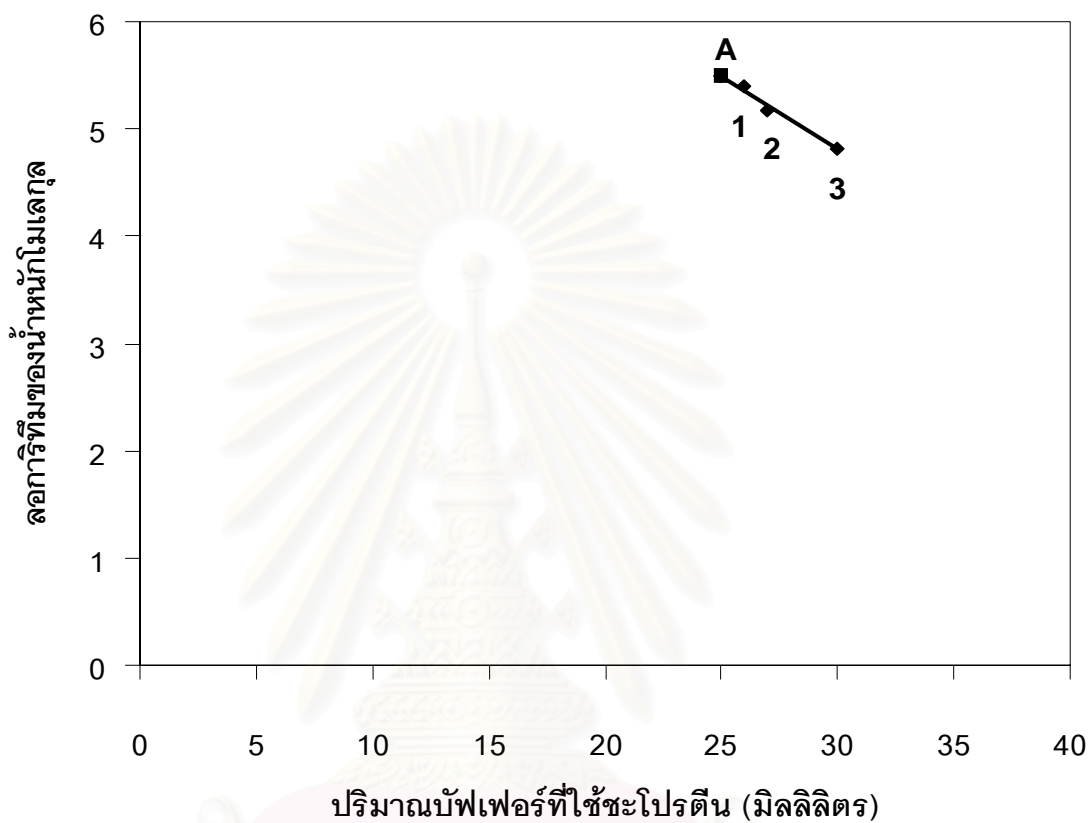
รูปที่ 4.10 การทำโครมาโทกราฟีบนซูเปอร์โรส 12 เพรบ เกรด ของโปรตีนมาตรฐาน

- | | | |
|-----|---------------------|-------------------------------|
| —◆— | กะตะเลส | น้ำหนักโมเลกุล 250,000 ดาลตัน |
| —■— | กลอบูลิน | น้ำหนักโมเลกุล 150,000 ดาลตัน |
| —▲— | โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน | น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน |



รูปที่ 4.11 การทำโครมาโทกราฟีบนซูเปอร์โรส 12 เพรบ เกรด ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

- ◆— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

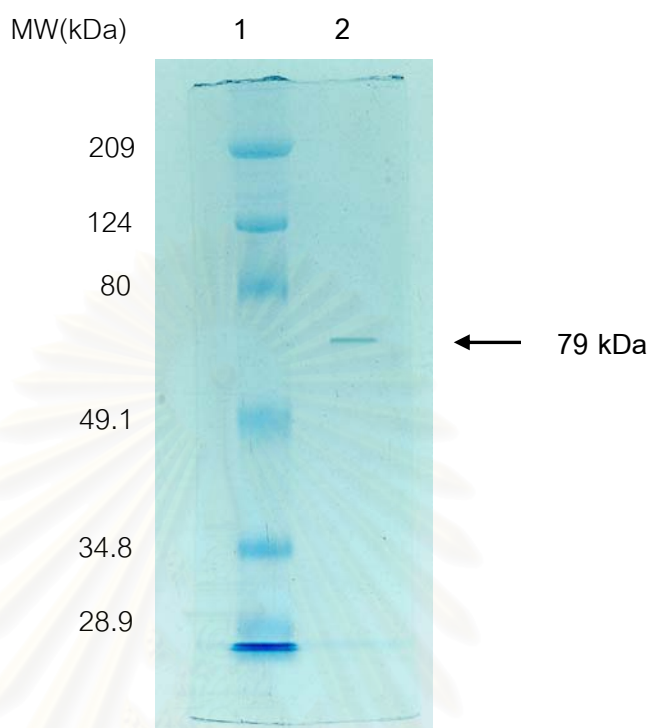


รูปที่ 4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 เพรบ เกรด

1. คะตะเลส	น้ำหนักโมเลกุล	250,000	ดาลตัน
2. กลอบูลิน	น้ำหนักโมเลกุล	150,000	ดาลตัน
3. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	น้ำหนักโมเลกุล	66,000	ดาลตัน
A คือ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์	น้ำหนักโมเลกุล	317,000	ดาลตัน

4.8.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนสิดেসโดยการทำให้เลคโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (SDS-PAGE)

การทดลองนี้ทำโดยนำแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนสิดেসที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำให้เลคโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่นและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนสิดেসให้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียวและจากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ดังที่แสดงในรูปที่ 4.14 พบว่าแถบโปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 79,000 ดาลตัน และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากวิธีเจลฟิลเตรชันซึ่งมีค่าประมาณ 317,000 ดาลตัน จึงคาดได้ว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนสิดেসประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 79,000 ดาลตัน ซึ่งจะให้น้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 316,000 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน



รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะระบิโนฟิวราโนสิดีส โดยการทำอีเลคโตรโพรเทอซิมด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมล์เจล

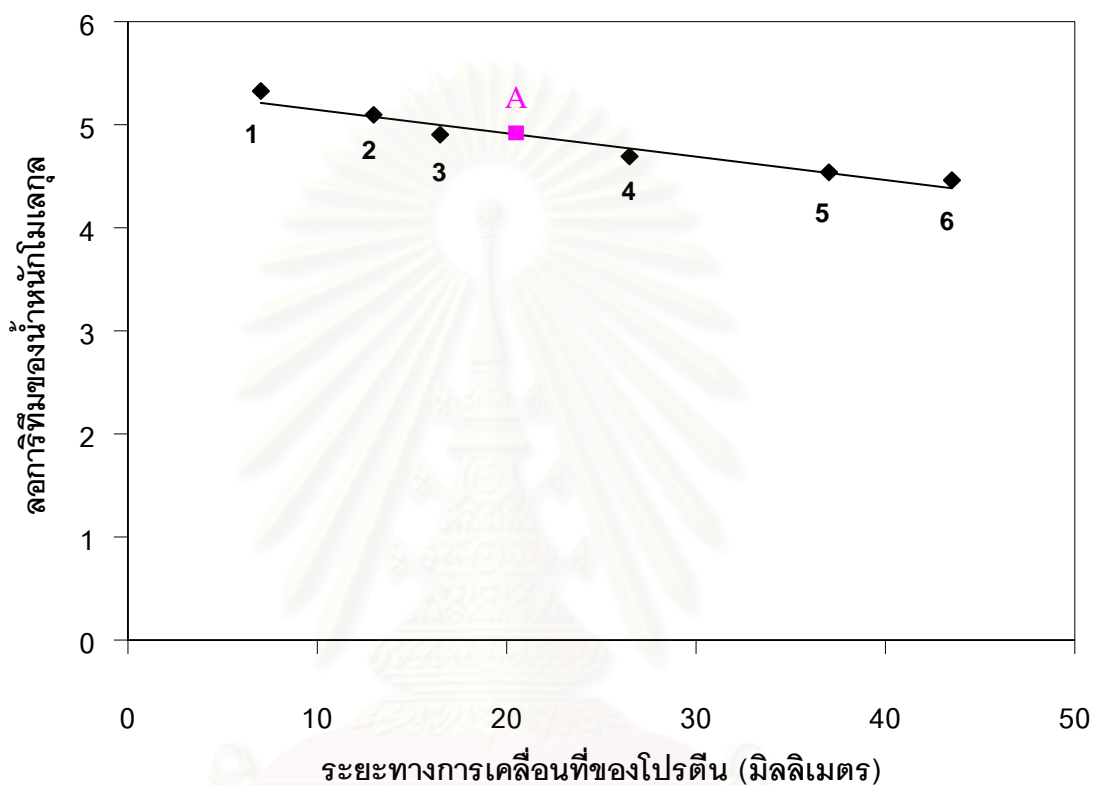
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 แอลฟา-แอล-อะระบิโนฟิวราโนสิดีสที่ผ่านการทำอีเลคโตรโพรเทอซิม

(1.2 ไมโครกรัม)

โปรตีนมาตรฐานได้แก่

1. ไมโอซิน (Myosin)	น้ำหนักโมเลกุล	209	กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลคโตสิดีส (β -galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล	124	กิโลดาลตัน
3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)	น้ำหนักโมเลกุล	80	กิโลดาลตัน
4. โอวัลบูมิน (Ovalbumin)	น้ำหนักโมเลกุล	49.1	กิโลดาลตัน
5. คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล	34.8	กิโลดาลตัน
6. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor)	น้ำหนักโมเลกุล	28.9	กิโลดาลตัน



รูปที่ 4.14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนซีดีเอ็มโตเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

1. ไมโอซิน (Myosin)	น้ำหนักโมเลกุล	209.0	กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลคโตไซด์ (β-galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล	124.0	กิโลดาลตัน
3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)	น้ำหนักโมเลกุล	80.0	กิโลดาลตัน
4. โอวัลบูมิน (Ovalbumin)	น้ำหนักโมเลกุล	49.1	กิโลดาลตัน
5. คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล	34.8	กิโลดาลตัน
6. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor)	น้ำหนักโมเลกุล	28.9	กิโลดาลตัน
A คือ แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์	น้ำหนักโมเลกุล	79.0	กิโลดาลตัน

4.9 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces* sp. PC22

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่างๆดังนี้

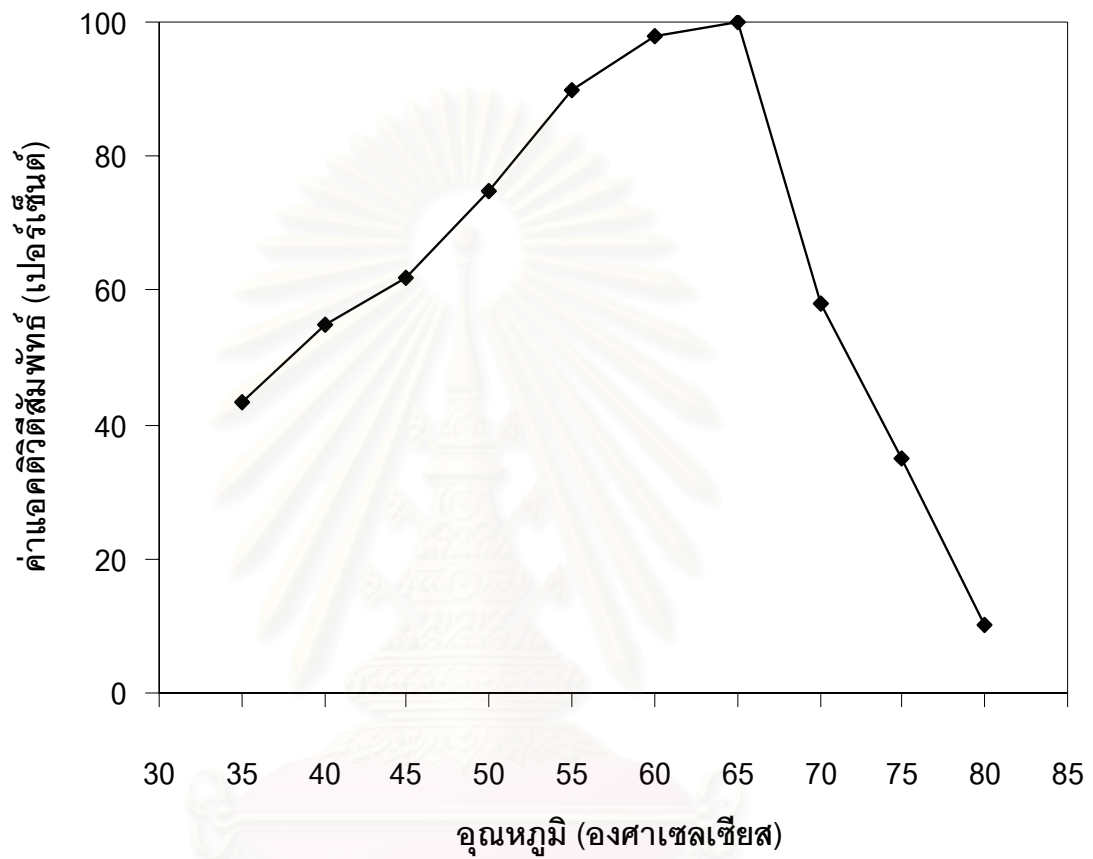
4.9.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณเท่าๆ กัน มาหาแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ โดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังแต่ 35-80 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง 55-65 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ให้แอกติวิตีสูงสุด แต่ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอกติวิตีเหลือเพียง 58 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีทั้งหมด ดังรูปที่ 4.15

4.9.2 ผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

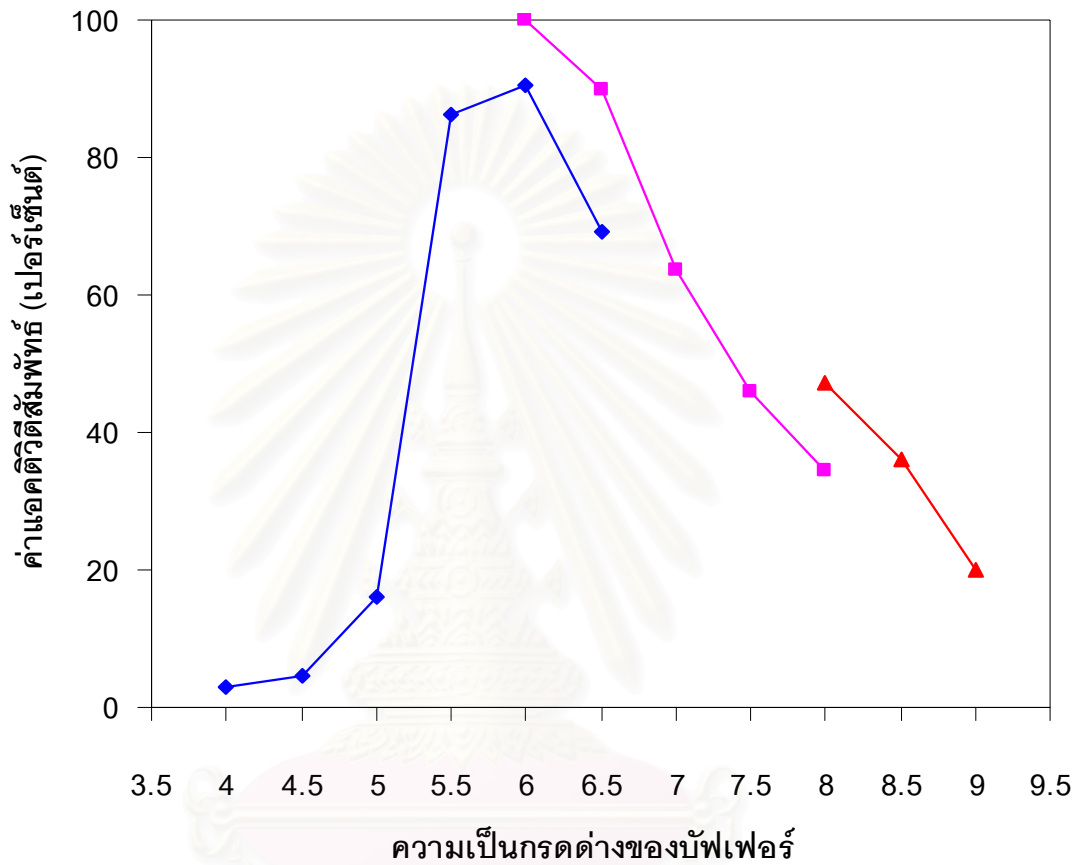
จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ โดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วง 5.5-6.5 โดยที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 เอนไซม์ให้แอกติวิตีสูงสุด ดังผลที่แสดงในรูปที่ 4.16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย






รูปที่ 4.15 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (0.96 หน่วยต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 4.16 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

- | | | |
|---|------------------|------------|
|  | อะซีเตท บัฟเฟอร์ | pH 4.0-6.5 |
|  | ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ | pH 6.0-8.0 |
|  | ทริส บัฟเฟอร์ | pH 8.0-9.0 |

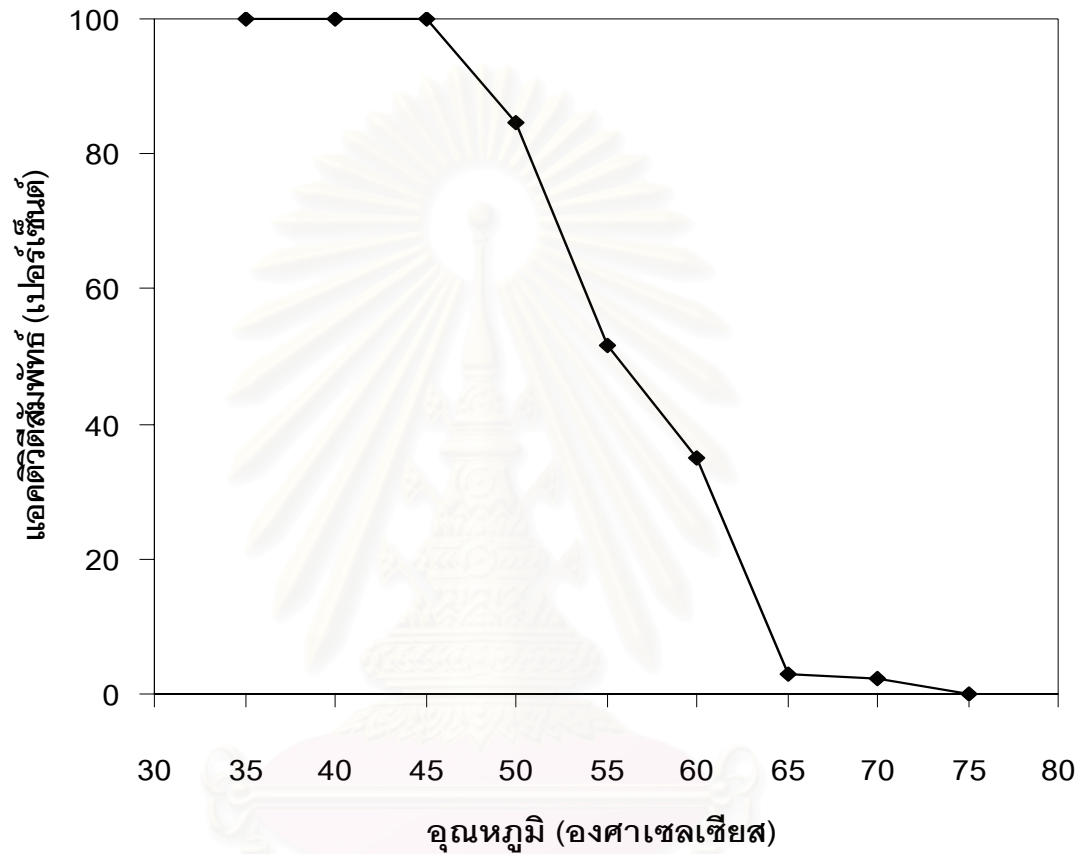
กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (0.96 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.9.3 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสต่ออุณหภูมิ

นำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสมาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 35-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลืออยู่โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีไปครึ่งหนึ่งของแอกติวิตีทั้งหมดและสูญเสียแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ดังผลที่แสดงในรูปที่ 4.17

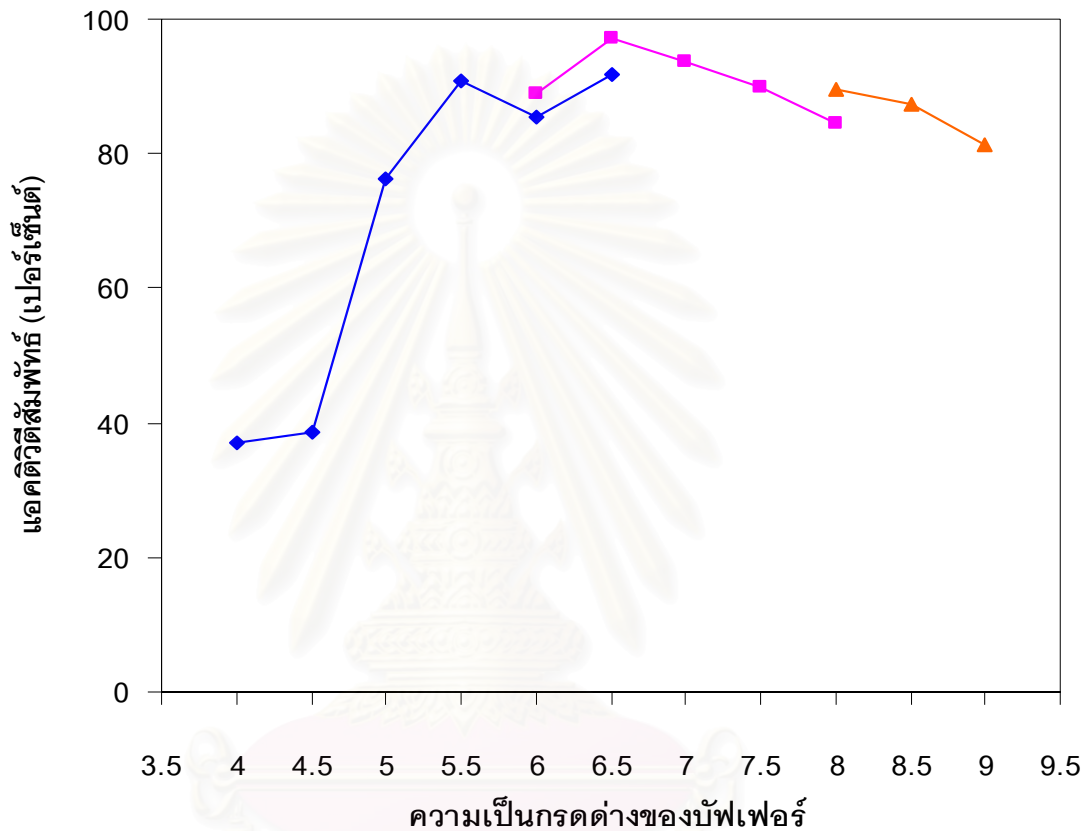
4.9.4 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสต่อความเป็นกรดต่าง

บ่มแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ โดยแปรค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลืออยู่โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-9.0 โดยยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 80-98 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 5.5 ลงมา เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วจนเหลือแอกติวิตีประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0 ดังผลที่แสดงในรูปที่ 4.18






รูปที่ 4.17 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดต่ออุณหภูมิ

กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการป่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (0.94 หน่วยต่อ มิลลิลิตร)



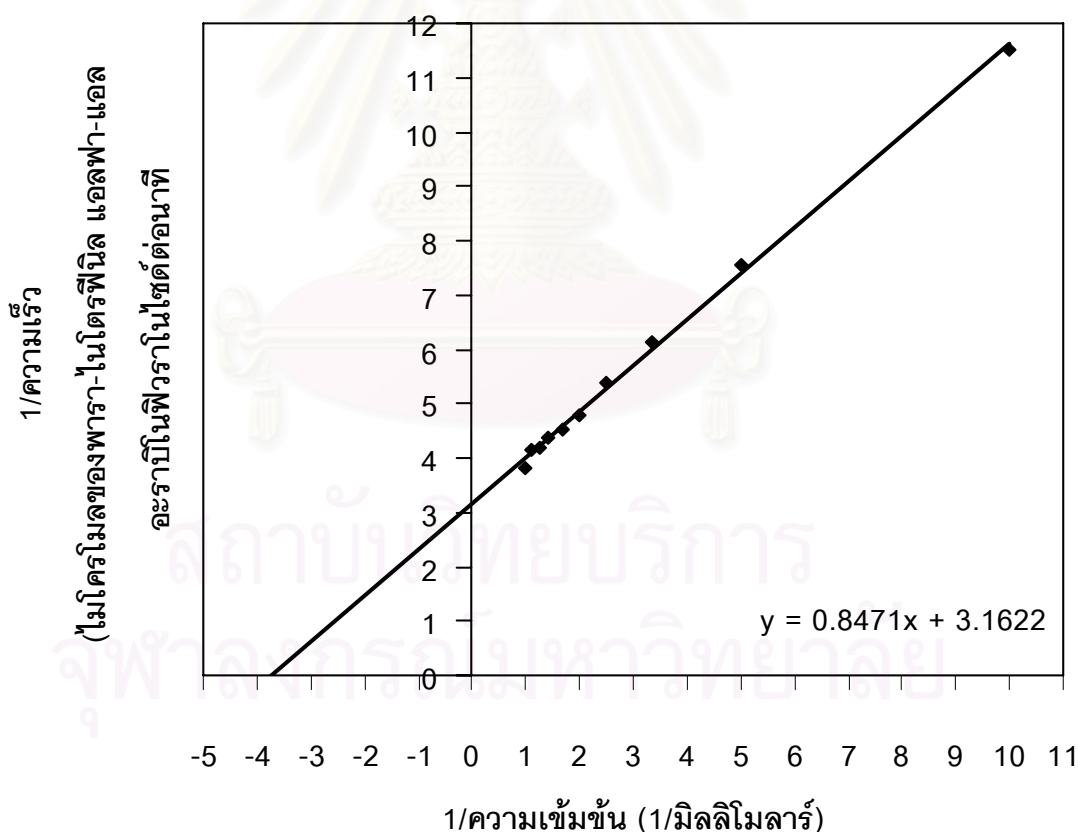
รูปที่ 4.18 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดส์ต่อความเป็นกรดต่าง

- | | | |
|---|------------------|------------|
|  | อะซีเตท บัฟเฟอร์ | pH 4.0-6.5 |
|  | ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ | pH 6.0-8.0 |
|  | ทริส บัฟเฟอร์ | pH 8.0-9.0 |

กำหนดให้แอสติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (0.94 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.9.5 การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรท (K_m) ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

การทดลองนี้ได้ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อ พารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ โดยแปรความเข้มข้นซับสเตรทในช่วง 0.1-1.0 มิลลิโมลาร์ และจากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังที่แสดงในรูปที่ 4.19 พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสมีค่า K_m สำหรับพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ เท่ากับ 0.27 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังมีค่า V_{max} เท่ากับ 3,926.15 ไมโครโมลต่ออนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1) และ k_{cat} เท่ากับ 2.07×10^4 ต่อวินาที (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 2)



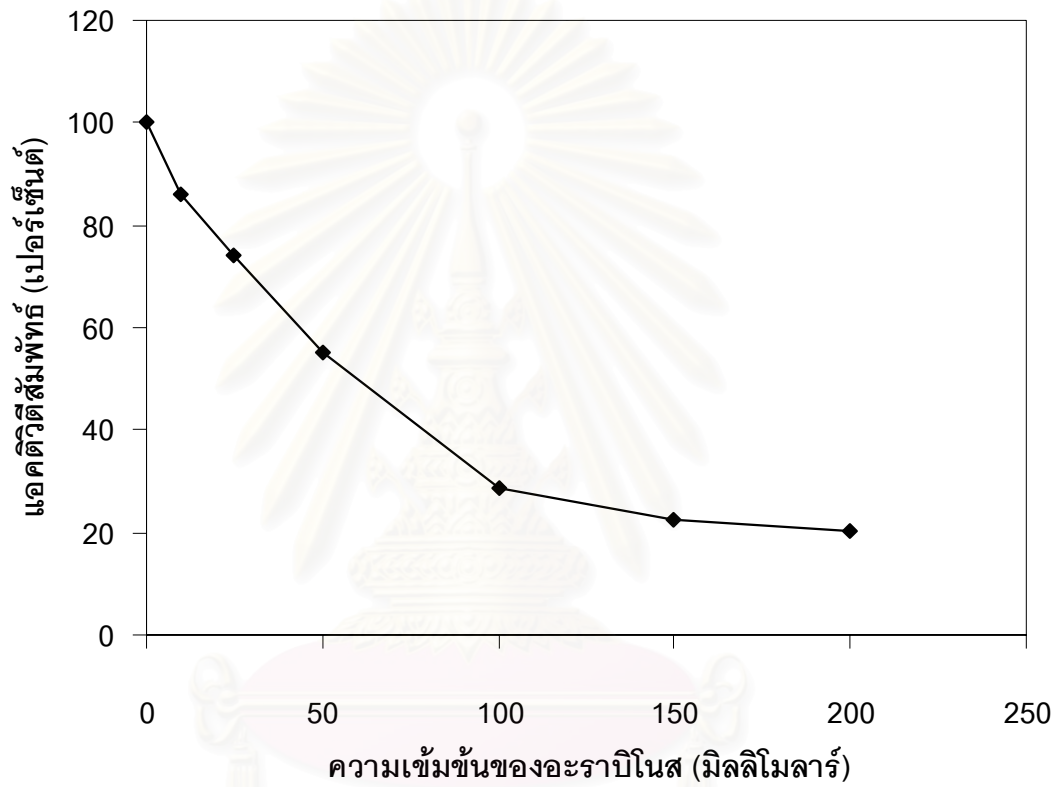
รูปที่ 4.19 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสต่อพารา-ไนโตรฟีนอล -แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

4.9.6 ผลของสารยับยั้งและการหาค่า K_i

4.9.6.1 ผลของอะราบิโนสต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส

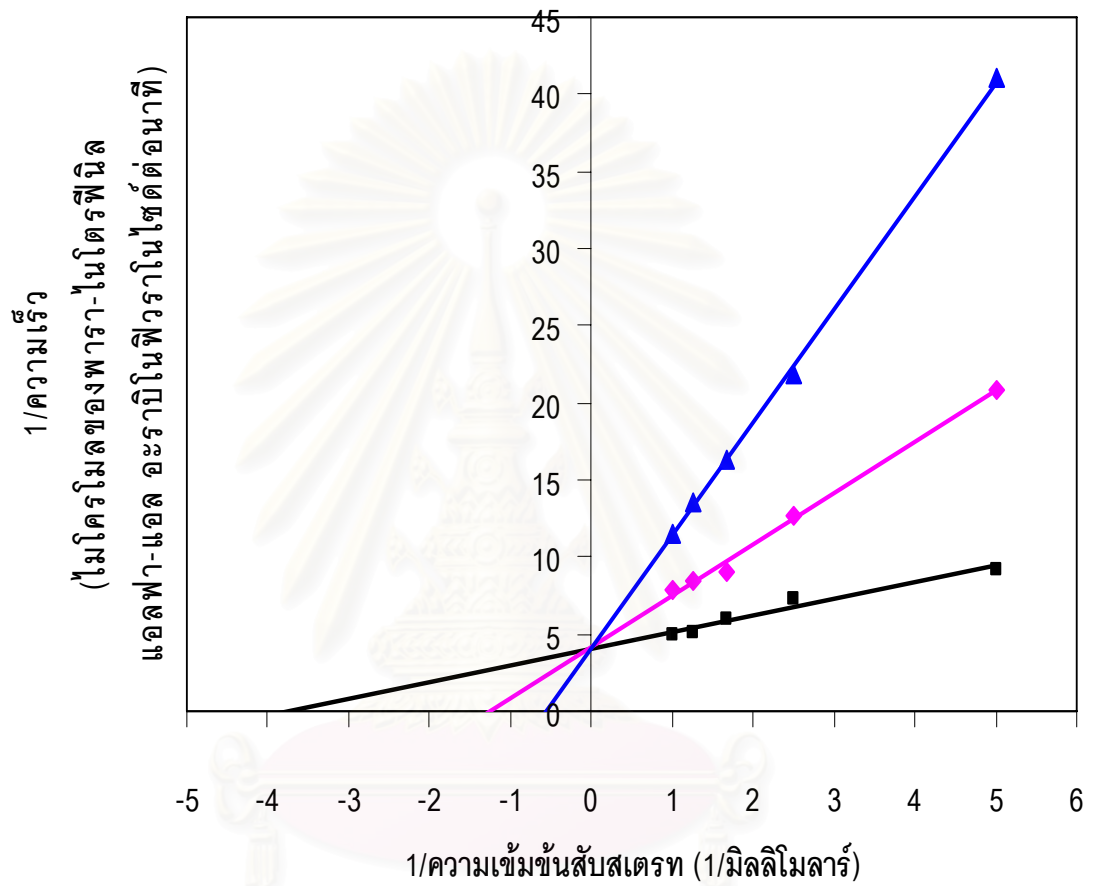
เนื่องจากอะราบิโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายไซแกลน โดยแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส การทดลองนี้จึงศึกษาว่า อะราบิโนสที่เกิดขึ้นมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้หรือไม่ โดยนำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสบริสุทธิ์ มาป่มกับ สับสเตรทโดยเติมอะราบิโนสในปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0-200 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.20 พบว่า อะราบิโนสมีผลยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสได้ โดยที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงประมาณ 45 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทดลองต่อไปจึงศึกษาจลนศาสตร์ของอะราบิโนสในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสเพื่อหาค่าคงที่ในการยับยั้ง (Inhibitor constant, K_i) จากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังแสดงในรูปที่ 4.21 พบว่าอะราบิโนสเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในลักษณะแข่งขัน (Competitive inhibitor) โดยมีค่า K_i เท่ากับ 15.08 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.20 ผลของอะคราไบนอสต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะคราไบนอพิวราโนลิเดส

กำหนดให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่มีอะคราไบนอสในปฏิกิริยาเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (0.96 หน่วยต่อมิลลิลิตร)



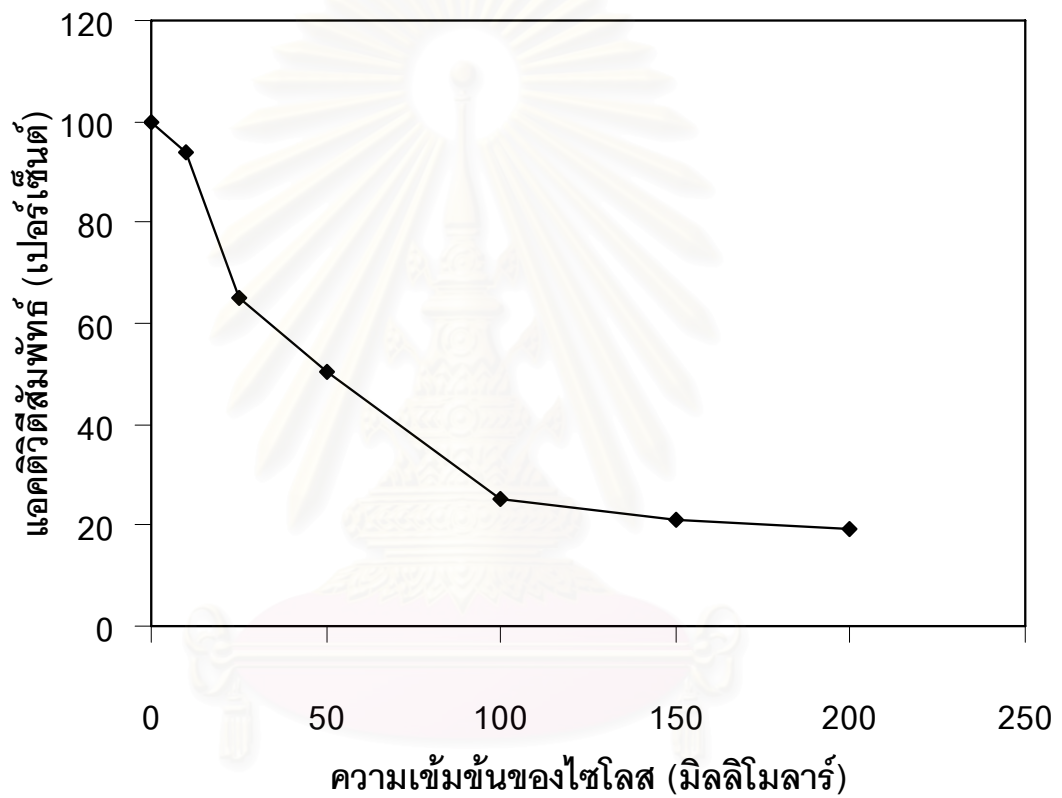
รูปที่ 4.21 ไกลวีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์โดยอะราบีโนส

- ▲— มีอะราบีโนส 100 มิลลิโมลาร์
- ◆— มีอะราบีโนส 50 มิลลิโมลาร์
- ไม่มีอะราบีโนส

4.9.6.2 ผลของไซโลสต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเอส

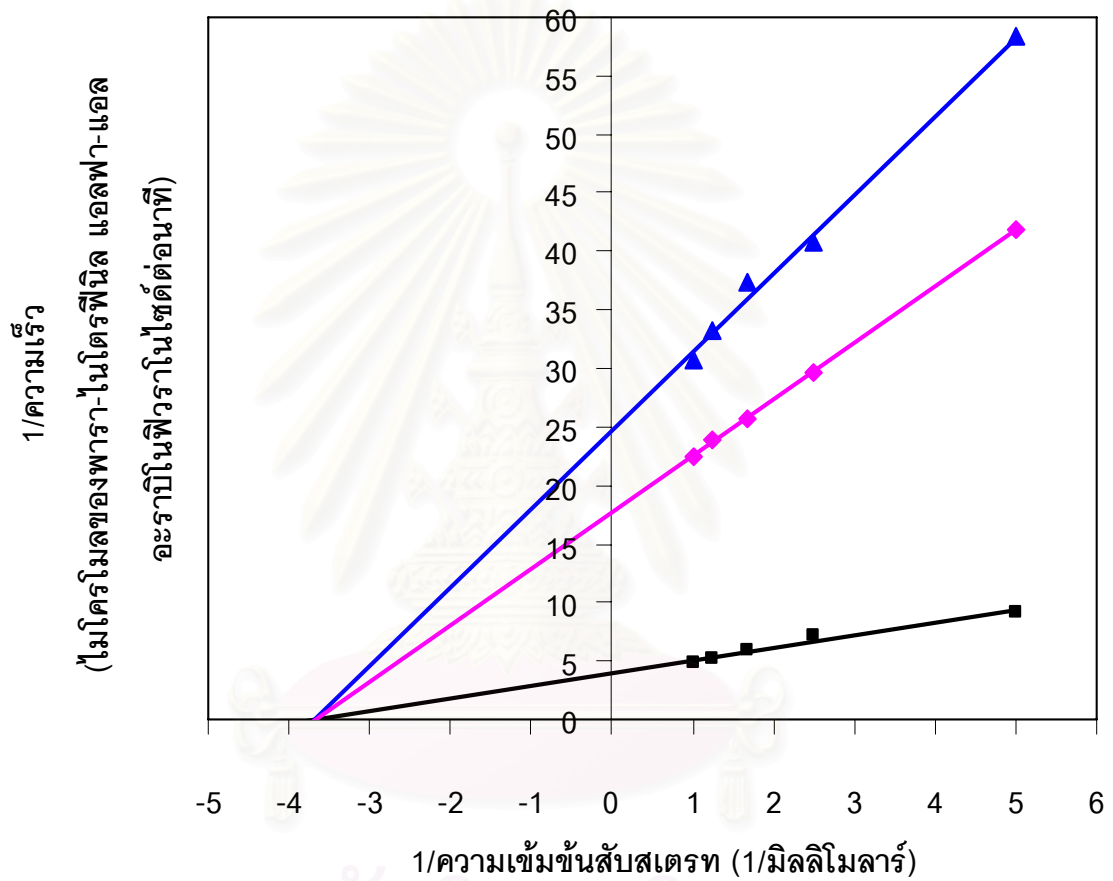
เนื่องจากไซโลสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว เช่นเดียวกับกับอะราบีโนสและยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของไซแลน ในการทดลองนี้ จึงศึกษาว่าไซโลสมีผลต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเอสหรือไม่ โดยนำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเอสบริสุทธิ์มาบ่มกับสับสเตรท โดยเติมไซโลสในปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0-200 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.22 พบว่า ไซโลสมีผลยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเอสได้ โดยที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงประมาณ 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทดลองต่อไปจึงศึกษาจลนศาสตร์ของไซโลสในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดเอสเพื่อหาค่าคงที่ในการยับยั้ง (Inhibitor constant, K_i) จากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่าไซโลสเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในลักษณะไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibitor) โดยมีค่า K_i เท่ากับ 12.55 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.22 ผลของซิลิกาต่อการทำงานของแอลฟา-แอมิเลสในฟิวราโนสิดีส

กำหนดให้แอลฟา-แอมิเลสของเอนไซม์ที่ไม่มีซิลิกาในปฏิกิริยาเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (0.96 หน่วยต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 4.23 โลไนวีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสโดยไซโลส

- ▲— มีไซโลส 100 มิลลิโมลาร์
- ◆— มีไซโลส 50 มิลลิโมลาร์
- ไม่มีไซโลส

4.9.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอิออนโลหะชนิดต่างๆต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจาก *Streptomyces* sp. PC22 โดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มาบ่มกับอิออนโลหะชนิดต่างๆที่แปรให้ให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ โดย Hg^{2+} เป็นสารยับยั้งรุนแรงที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งแอกติวิตีได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ Cu^{2+} สามารถยับยั้งแอกติวิตีได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ตามด้วย Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} และ Co^{2+} ที่ยับยั้งรองลงมาตามลำดับ

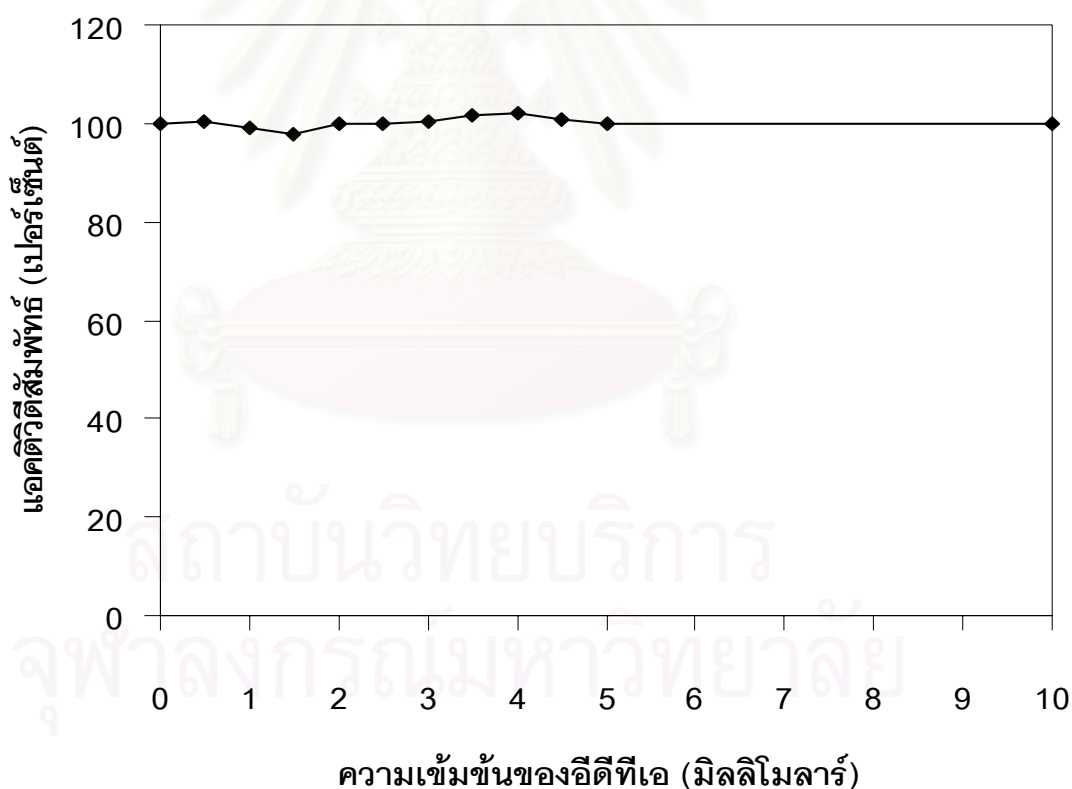
ตารางที่ 4.3 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

ชนิดของอิออนโลหะ	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	ความเข้มข้นของอิออนโลหะ (มิลลิโมลาร์)		
	0.1	1.0	10.0
Control	100.00	100.00	100.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	99.32	98.63	102.74
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	96.12	54.44	8.40
$\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	6.06	5.44	4.58
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28.10	17.98	nd
HgCl_2	0	0	0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99.43	94.84	94.27
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	85.85	54.14	16.96
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	54.94	44.00	14.04

nd คือ ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีสีเหลืองจึงไปรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

4.9.8 ผลของอีดีทีเอต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอีดีทีเอต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเติมอีดีทีเอลงในสารผสมปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 0.5-10 มิลลิโมลาร์ พบว่าอีดีทีเอไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสไม่จำเป็นต้องใช้อิออนของโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 ผลของอีดีทีเอต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส

4.9.9 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด เพื่อทดสอบว่าเอนไซม์มีกรดอะมิโนใด เป็น active site โดยการนำเอนไซม์มาปฏิกิริยากับสารดัดแปลงกรดอะมิโน ดังนี้ Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC) ดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิล (COOH), Iodoacetamide(IAM) ดัดแปลงหมู่ซีสเทอีน (cysteine), N-bromosuccinimide (NBS) ดัดแปลงหมู่ทริปโตเฟน (tryptophan), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ดัดแปลงหมู่เซรีน (serine) โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า NBS มีผลยับยั้งแอกติวิตีเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ส่วน PMSF ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งแอกติวิตีได้ถึง 28 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งแอกติวิตีเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งจากผลการทดลองคาดว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดน่าจะมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนและเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site

ตารางที่ 4.4 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิด

ชนิดของสารดัดแปลงกรดอะมิโน	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ความเข้มข้นของสารดัดแปลงกรดอะมิโน (มิลลิโมลาร์)	
	1.0	10.0
Control	100	100
Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC)	98.82	95.50
Iodoacetamide (IAM)	94.17	83.85
N-bromosuccinimide (NBS)	0	0
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	72.83	0

4.9.10 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity) ของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์

การทดลองนี้ได้นำแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาตรวจสอบแอกติวิตีจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ โดยวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 3.3.14.10 ได้ผล ดังตารางที่ 4.5 พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside สูงสุด โดยมีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 16.34 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีแอกติวิตีจำเพาะต่อ *o*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside และ *o*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside เพียงเล็กน้อย เท่ากับ 0.03 และ 0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่ไม่พบว่ามีแอกติวิตีต่อ *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside และ *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside

นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบความจำเพาะของเอนไซม์นี้ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวไร้ตและจากไม้เบิร์ชซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ตามวิธีการในข้อ 3.3.14.10 โดยวัดปริมาณอะราบินโนสที่เกิดขึ้น ปรากฏว่าไม่พบอะราบินโนสถูกปล่อยออกมา ซึ่งคาดว่าอาจเนื่องมาจากสับสเตรทที่ใช้มีเปอร์เซ็นต์ของอะราบินโนสน้อยเกินไป

ตารางที่ 4.5 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์

สับสเตรท	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
<i>p</i> -nitrophenyl α -L-arabinofuranoside	16.34	100
<i>p</i> -nitrophenyl β -D-xylopyranoside	0	0
<i>o</i> -nitrophenyl β -D-xylopyranoside	0.03	0.18
<i>o</i> -nitrophenyl β -D-galactopyranoside	0	0
<i>o</i> -nitrophenyl β -D-glucopyranoside	0.02	0.12

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจัดเป็นเอนไซม์หนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ย่อยหมู่ข้างเคียงของไซแลนและอะราบิโนไซแลน โดยมีบทบาทช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนของกลุ่มเอนไซม์ย่อยสายหลัก ดังนั้นจึงมีรายงานมากมายที่เกี่ยวกับการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ซึ่ง *Streptomyces* sp. PC22 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยโดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (xylanolytic enzymes) ได้ คือ ไซแลเนส บีตา-ไซโลสิดีส อะซีทิลเอสเทอเรส และแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส โดยในงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสได้สูงประมาณ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน

ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่าเอนไซม์ตกตะกอนได้ดีในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40-90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสที่ได้จาก *Bacillus pumilus* ที่ตกตะกอนที่ความเข้มข้น 30-80 เปอร์เซ็นต์ (Degrassi และคณะ, 2003) ส่วน *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium purpurogenum* และ *Penicillium chrysogenum* สามารถตกตะกอนเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0-80 เปอร์เซ็นต์ (Saha และ Bothast, 1998, De Ioannes และคณะ, 2000 และ Sakamoto และ Kawasaki, 2003)

ในขั้นตอนการทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางในคอลัมน์นี้ได้ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.60-0.84 โมลาร์ และพบแอกติวิตีของไซแลเนส 2 ชนิดคือ ไซแลเนส I ที่ไม่จับกับตัวกลางและไซแลเนส II ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์โดยใช้โซเดียมคลอไรด์

ความเข้มข้น 0.38-0.65 โมลาร์ ซึ่งตรงกับรายงานของ Watewuthajarn และ Pinphanichakarn (2000) นอกจากนี้ยังพบแอกติวิตีของอะซีทิลเอสเทอร์เอส ซึ่งถูกชะออกจากตัวกลางที่ไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.36-0.48 โมลาร์ ซึ่งตรงกับรายงานของวัชรวิ ชุณหกุล (2548) จากการที่แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบได้แน่นซึ่งต้องชะออกด้วยความเข้มข้นเกลือสูง ในขั้นตอนนี้จึงสามารถกำจัดการปนเปื้อนของไซแลเนส I และอะซีทิลเอสเทอร์เอสได้ แต่ก็ยังพบแอกติวิตีของไซแลเนส II ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงปานกลางปนเปื้อนอยู่ มีรายงานถึงความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ชะแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบจากจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Streptomyces diastaticus* ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ (Tajana และคณะ, 1992) ขณะที่จาก *Aspergillus awamori* ถูกชะออกจากตัวกลางที่ความเข้มข้น 0.19 โมลาร์ (Wood และ McCrae, 1996), แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส ชนิด Araf I จาก *Cytophaga xylanolytica* จะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50-200 มิลลิโมลาร์ (Renner และ Breznak, 1998) และจาก *Bacillus pumilus* เอนไซม์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 380 มิลลิโมลาร์ (Degrassi และคณะ, 2003) ส่วนแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส ชนิด AFQ1 จาก *Bifidobacterium breve* K-110 ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 โมลาร์ (Sakamoto และ Kawasaki, 2003)

ขั้นตอนต่อไปของการทำให้บริสุทธิ์ คือการนำเอนไซม์ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนบิวทิล-ไฮโดรโฟบิก อินเตอร์แอคชัน ซึ่งแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส สามารถจับกับตัวกลางนี้ได้ และถูกชะออกมาด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.4-0.6 โมลาร์ ซึ่งมีรายงานหลายฉบับที่พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส สามารถจับกับตัวกลางในคอลัมน์ที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกได้ เช่น แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113 ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 1.10-0.85 โมลาร์ (Hespell และ O'Bryan, 1992) ส่วนแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Bacillus stearothermophilus* T-6 ถูกชะจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 0.45-0.40 โมลาร์ (Gilead และ Shoham, 1995) ขณะที่แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Bacillus pumilus* จะถูกชะออกจากตัวกลางที่แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.06 โมลาร์ (Degrassi และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบได้จาก *Cytophaga xylanolytica*, *Penicillium purpurogenum* และ *Fusarium oxysporum*

(Renner และ Breznak, 1998, De Ioannes และคณะ, 2000 และ Panagiotou และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตามในขั้นตอนนี้พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดที่เตรียมได้ยังถูกปนเปื้อนด้วยไซแลเนส II อยู่เล็กน้อย

ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ คือการนำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดที่ได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทด์ พบว่าเอนไซม์ไม่จับกับตัวกลางซึ่งสอดคล้องกับรายงานแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดจาก *Bifidobacterium breve* K-111 ที่เอนไซม์ไม่จับกับตัวกลางเช่นกัน (Ho-Young Shin และคณะ, 2003) ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถกำจัดไซแลเนส II ซึ่งจับกับตัวกลางในคอลัมน์ออกจากแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดได้ จากการนำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 111.27 เท่า และมีค่าแอกติวิตีคิงเหลือ 13.12 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และเมื่อพิจารณาในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้มากในแต่ละขั้นตอนซึ่งสอดคล้องกับค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่เพิ่มสูงขึ้น แต่จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้ยังไม่บริสุทธิ์ถึงระดับ homogeneity ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์ถึงระดับ homogeneity จำเป็นต้องอาศัยการทำซ้ำบางขั้นตอนและอาจต้องสูญเสียปริมาณเอนไซม์ในระหว่างกระบวนการสูงมากและเนื่องจากเอนไซม์นี้ถูกสร้างขึ้นในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายสายหลัก งานวิจัยนี้จึงไม่ได้มีการทำซ้ำในบางขั้นตอน

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดบริสุทธิ์ที่ได้ โดยการนำโครมาโทกราฟีบนซูเปอร์โอส 12 เพอร์เกรด เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 317,000 ดาลตัน และจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 79,000 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดจาก *Ruminococcus albus* 8 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 310,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 75,000 ดาลตัน (Greve และคณะ, 1984) อย่างไรก็ตามพบว่า แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดจากจุลินทรีย์ต่างๆมีความหลากหลายทั้งน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อย ตัวอย่างเช่น

แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์จาก *Aspergillus awamori* จัดเป็นโปรตีนเดี่ยวที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 64,000 ดาลตัน (Wood และ McCrae, 1996) และเอนไซม์จาก *Aureobasidium pullulans* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 210,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 105,000 ดาลตัน (Saha และ Bothast, 1998) ส่วนแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์จาก *Fusarium oxysporum* ชนิด ABF1 และ ABF2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 และ 180,000 ดาลตัน ตามลำดับ โดยทั้งคู่ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 65,000 และ 56,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Panagoitou และคณะ, 2003) ขณะที่แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์จาก *Bacillus pumilus* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 220,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 60,000 ดาลตัน (Degrassi และคณะ, 2003) ส่วนเอนไซม์จาก *Bacteroides xylanolyticus* X5-1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 364,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 61,000 ดาลตัน (Schyns และคณะ, 1994) และแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces purpurascens* IFO3389 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 495,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 8 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 62,000 ดาลตัน (Komae และคณะ, 1982)

การศึกษาสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์บริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ในขั้นแรกศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง 55-65 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์จาก *Thermomonospora fusca* BD25 (Tuncer, 2000) และ *Rhizomucor pusillus* HHT-1 (Rahman และคณะ, 2001) แต่พบว่าสูงกว่าแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces chartreusis* GS901 ชนิด AFase I (Matsuo และคณะ, 2000) และจาก *Bacillus pumilus* (Degrassi และคณะ, 2003) ซึ่งมีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส ขณะที่แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์ จาก *Aspergillus niger* (Gunata และคณะ, 1990) และ *Aspergillus niger* 5-16 (Kaneko และคณะ, 1993) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส

ผลของความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนไซด์บริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดต่างในช่วง

5.5-6.5 โดยที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นี้ ซึ่งเท่ากันกับความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ จาก *Streptomyces* sp. No.17-1 (Kaji และคณะ, 1981) และ *Bifidobacterium longum* B667 (Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003) นอกจากนี้ยังพบแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จากจุลินทรีย์อื่นๆที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงใกล้เคียง เช่น แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces purpurascens* IFO3389 ที่มีความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 (Komae และคณะ, 1982), จาก *Ruminococcus albus* 8 ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 6.9 (Greve และคณะ, 1984) ขณะที่แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113 มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 6.0-6.5 (Hespell และ O'Bryan, 1992) ส่วนเอนไซม์จาก *Bacteroides xyloxyticus* X5-1 (Schyns และคณะ, 1994) และ *Bacillus stearothermophilus* T-6 (Gilead และ Shoham, 1995) มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5.5-6.0

ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ต่ออุณหภูมิ พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์บริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 45 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Bacteroides xyloxyticus* X5-1 ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส โดยยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (Schyns และคณะ, 1994) แต่พบว่ามีความเสถียรสูงกว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Aspergillus niger* 5-16 ซึ่งมีค่าความเสถียรต่ออุณหภูมิอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียสและสูญเสียแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 60 องศาเซลเซียส เมื่อป้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kaneko และคณะ, 1993) อย่างไรก็ตาม ยังพบว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จากจุลินทรีย์อื่นๆที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *Streptomyces* sp. PC22 เช่น *Rhizomucor pusillus* HHT-1 มีแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส (Rahman และคณะ, 2001)

แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces* sp. PC22 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-9.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับค่าความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง

ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Bacteroides xyloxyticus* X5-1 (Schyns และคณะ, 1994) นอกจากนี้ยังมีค่าใกล้เคียงกับแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 ที่มีค่าความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วง 5.5-8.0 (Lee และ Forsberg, 1987), จาก *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113 ที่มีค่าความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-8.0 (Hespell และ O'Bryan, 1992) และจาก *Bacillus pumilus* ที่มีค่าความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วง 5.5-8.5 (Degrassi และคณะ, 2003)

ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทสังเคราะห์ *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Streptomyces* sp. PC22 พบว่าเอนไซม์มีค่า K_m ต่อ *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside เท่ากับ 0.27 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า K_m ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Aureobasidium pullulans* ที่มีค่าเท่ากับ 0.26 มิลลิโมลาร์ (Saha และ Bothast, 1998), จาก *Bifidobacterium longum* B667 ที่มีค่า K_m เท่ากับ 0.295 มิลลิโมลาร์ (Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003) และจาก *Fusarium oxysporum* ชนิด ABF2 ที่มีค่า K_m เท่ากับ 0.28 มิลลิโมลาร์ (Panagiotou และคณะ, 2003) และ มีค่าน้อยกว่าค่า K_m ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น *Streptomyces* sp. No.17-1, *Bacteroides xyloxyticus* X5-1, *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizomucor pusillus* HHT-1 และ *Bacillus pumilus* ซึ่งมีค่า K_m เท่ากับ 3.60, 0.50, 1.39, 1.23, 0.59 และ 1.70 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Kaji และคณะ, 1981; Schyns และคณะ, 1994; Wood และ McCrae, 1996; De Ioannes และคณะ, 2000; Rahman และคณะ, 2001 และ Degrassi และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีค่า V_{max} และ k_{cat} เท่ากับ 3,926.15 ไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีนและ 2.07×10^4 ต่อวินาทีตามลำดับ ซึ่งนับว่าเป็นค่าที่สูงเมื่อเทียบกับค่า V_{max} และ k_{cat} ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Streptomyces diastaticus* ชนิด C1 และ C2, จาก *Bacillus stearothermophilus* T-6 และจาก *Rhizomucor pusillus* HHT-1 ที่มีค่า V_{max} เท่ากับ 105, 131, 749 และ 387 ไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (Tajana และคณะ, 1992, Gilead และ Shoham, 1995 และ Rahman และคณะ, 2001) ขณะที่แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Trichoderma reesei* ชนิด AF35 และ AF53 มีค่า k_{cat} เท่ากับ 259 และ 269 ต่อวินาที ตามลำดับ (Nogawa และคณะ, 1999) และจาก *Penicillium chrysogenum* ชนิด AFQ1 และ AFS1 มีค่า k_{cat} เท่ากับ 14.33 และ 59.33 ต่อวินาที

ตามลำดับ (Sakamoto และ Kawasaki, 2003) ดังนั้นจึงจัดได้ว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์หลายชนิด

จากการศึกษาเกี่ยวกับสารยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส ซึ่งได้ศึกษาผลของแอล-อะราบีโนส และดี-ไซโลส พบว่า แอล-อะราบีโนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายไซแลน โดยเอนไซม์นี้มีผลยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสได้ในลักษณะแข่งขัน (competitive inhibitor) โดยมีค่าคงที่ในการยับยั้ง (inhibitor constant, K_i) เท่ากับ 15.08 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจาก *Thermomonospora fusca* ที่มีค่า K_i ของอะราบีโนสเท่ากับ 33.20 มิลลิโมลาร์ (Bachmann และ McCarthy, 1991) และจาก *Penicillium capsulatum* ที่มีค่า K_i เท่ากับ 16.40 มิลลิโมลาร์ (Filho และคณะ, 1996) ขณะที่ดี-ไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว เช่นเดียวกับอะราบีโนสและยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของไซแลน มีผลยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสได้ในลักษณะไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibitor) โดยมีค่าคงที่ในการยับยั้ง (inhibitor constant, K_i) เท่ากับ 12.55 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของไซโลสต่อการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น รายงานนี้จึงเป็นฉบับแรกที่ศึกษาผลของไซโลสต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า K_i ระหว่างอะราบีโนสและไซโลส พบว่าไซโลสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ดีกว่าอะราบีโนส เนื่องจากไซโลสเป็นสารยับยั้งในลักษณะไม่แข่งขันจึงสามารถจับกับเอนไซม์ได้หลายตำแหน่ง ขณะที่อะราบีโนสซึ่งเป็นสารยับยั้งในลักษณะแข่งขันจะจับกับเอนไซม์เฉพาะตำแหน่ง substrate binding site เท่านั้น

การศึกษาคืออนโลหะชนิดต่างๆที่มีผลยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส พบว่า Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์รุนแรงที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์ ขณะที่ Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} และ Co^{2+} จะมีผลยับยั้งแอกติวิตีเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วย Ca^{2+} และ Mg^{2+} สำหรับแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์อื่นๆ ก็มีรายงานว่าถูกยับยั้งด้วยอิออนชนิดต่างๆได้เช่นกัน เช่น แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสจาก *Rhodotorula flava* สามารถถูกยับยั้งการทำงานด้วย Hg^{2+} , Cu^{2+} และ Mn^{2+} (Uesaka และคณะ, 1978), จาก *Streptomyces*

purpurascens IFO3389 ถูกยับยั้งแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์โดย Hg^{2+} และ Ag^{2+} (Komae และคณะ, 1982) ส่วนแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* ถูกยับยั้งแอกติวิตีด้วย Hg^{2+} และ Cu^{2+} (Schyns และคณะ, 1994) ขณะที่เอนไซม์จาก *Bacillus stearothermophilus* T-6 จะถูกยับยั้งด้วย Hg^{2+} และ Fe^{2+} (Gilead และ Shoham, 1995), แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Thermomonospora fusca* BD25 จะถูกยับยั้งแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์ด้วย Hg^{2+} (Tuncer, 2000) ส่วน *Bifidobacterium longum* B667 เอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานด้วย Hg^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} (Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003) อย่างไรก็ตามจากรายงานต่างๆ พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจากจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่ มักจะถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วย Hg^{2+} ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จาก *Streptomyces* sp. PC22 เช่นกัน

จากการศึกษาผลของอิตีที่เอตต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส พบว่าการเติมอิตีที่เอตในปฏิกิริยา ไม่มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ แสดงว่า แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสไม่ต้องการอิออนโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งสอดคล้องกับผลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Aspergillus niger* 5-16 (Kaneko และคณะ, 1993), จาก *Bacteroides xylanolyticus* X5-1 (Schyns และคณะ, 1994) และจาก *Bacillus stearothermophilus* T-6 (Gilead และ Shoham, 1995)

จากการศึกษาผลของสารดัดแปลงหมู่กรดอะมิโนต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส พบว่า N-bromosuccinimide ซึ่งดัดแปลงกรดอะมิโนทริปโตเฟนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ phenylmethylsulfonyl fluoride ซึ่งดัดแปลงกรดอะมิโนเซรีน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งแอกติวิตีได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Streptomyces* sp. PC22 น่าจะมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนและเซรีนอยู่ที่บริเวณ active site ซึ่งแตกต่างกับรายงานของ Greve และคณะ (1984) ที่พบว่าความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ของ iodoacetamide สามารถยับยั้งการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสจาก *Ruminococcus albus* 8 ได้อย่างสมบูรณ์ แสดงว่าเอนไซมน่าจะมีกรดอะมิโนซิสเทอีนเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site

จากการตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity) ของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสบริสุทรีจาก *Streptomyces* sp. PC22 พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside สูงสุด และไม่พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside และ *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside แต่พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะต่อ *o*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside และ *o*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside เพียงเล็กน้อย เท่ากับ 0.03 และ 0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ขณะที่รายงานว่าแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113 มีแอคติวิตีจำเพาะกับ *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside และ *o*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside ประมาณ 0.12 และ 0.07 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Hespell และ O'Bryan, 1992) และจาก *Penicillium purpurogenum* พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside และ *o*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside ไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีทั้งหมดของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสต่อ *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside (De Ioannes และคณะ, 2000) แสดงว่าเอนไซม์ดังกล่าวอาจมีการปนเปื้อนของบีตา-ไซโลสิดเอสซึ่งต่างกับแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสจาก *Thermoanaerobacter ethanolicus* ซึ่งพบว่าเป็น bifunctional โดยแสดงทั้งแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสและบีตา-ไซโลสิดเอสค่อนข้างสูงคือ 15.5 และ 8.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (Utt และคณะ, 1991) งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาความจำเพาะของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสบริสุทรีที่ได้จาก *Streptomyces* sp. PC22 ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวไร้ตและไม้เบิร์ช แต่เนื่องมาจากสับสเตรทที่ใช้มีปริมาณของอะราบินโนสค่อนข้างต่ำ โดยไซแลนจากเปลือกข้าวไร้ตมีปริมาณอะราบินโนสเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (Sigma, U.S.A.) และไซแลนจากไม้เบิร์ชมีปริมาณอะราบินโนสเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (Saha, 2000) เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC จึงไม่สามารถตรวจพบอะราบินโนส นอกจากนี้ยังพบว่า แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสบริสุทรีที่ได้จาก *Streptomyces* sp. PC22 ไม่มีแอคติวิตีของไซแลเนส, บีตา-ไซโลสิดเอส และอะซีทิลเอสเทอร์สเปนเปื้อน

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์บริสุทรีนี้กับที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทรีซึ่งรายงานโดย วิชิตา เหล่าเรืองธนา (2547) พบว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทรีทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 ซึ่งเท่ากันกับเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทรี แต่มีค่าความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่า คือ 60 องศาเซลเซียส และเสถียรต่อความเป็นกรดต่างใน

ช่วงกว้างกว่าคือ 5.0-9.0 ทั้งนี้เนื่องมาจากโปรตีนอื่นๆที่ปนเปื้อนอยู่นั้นมีส่วนช่วยป้องกันหรือลดการสูญเสียแอสคอร์บิกของเอนไซม์จากความร้อนและความเป็นกรดต่าง

ก่อนหน้านี้มีรายงานการทำให้บริสุทธิ์ของไซแลเนส, อะซีทิลเอสเทอร์เอสจาก *Streptomyces* sp. PC22 และปีตา-ไซโลลิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยไซแลเนสบริสุทธิ์ มีคุณสมบัติและความเป็นกรดต่างเหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 60 องศาเซลเซียสและ 5.5 ตามลำดับ สำหรับไซแลเนส I และ 60 องศาเซลเซียสและ 5.5-6.0 ตามลำดับ สำหรับไซแลเนส II (Wateewuthajarn และ Pinpanichakarn, 2000) ส่วนปีตา-ไซโลลิดีสบริสุทธิ์ มีคุณสมบัติและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 55 องศาเซลเซียสและ 6.5 ตามลำดับ (ทรรศนีย์ ตั้งสกุล, 2544) ขณะที่อะซีทิลเอสเทอร์เอสบริสุทธิ์ มีคุณสมบัติและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ (วัชรวิ ชูณหกุล, 2548) และจากข้อมูลทั้งหมดที่ได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิราโนลิดีสบริสุทธิ์ที่ได้จากรายงานนี้ ซึ่งทำงานได้ดีในช่วง 55-65 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 5.5-6.5 แสดงว่าเอนไซม์เหล่านี้จะสามารถทำงานร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพภายใต้ภาวะเดียวกันได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษเพื่อลดการใช้สารเคมี, อุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้, อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ รวมทั้งการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งในธรรมชาติให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อนำไปผลิตสารอื่นๆที่มีมูลค่าสูงขึ้นด้วยกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

ผลการศึกษาลักษณะสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেসบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. PC 22 ได้สรุปดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেসบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. PC22

สมบัติของเอนไซม์	แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดেস จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22
1. น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน	317,000 ดาลตัน
2. น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE	79,000 ดาลตัน (4 หน่วยย่อย)
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	65 องศาเซลเซียส
4. ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน	6.0
5. ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
6. ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง	5.5-9.0
7. อีออนยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ และ Co ²⁺
8. ค่า K_m ต่อพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์	0.27 มิลลิโมลาร์
9. ค่า V_{max} ต่อพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์	3,926.15 ไมโครโมลต่ออนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน
10. ค่า k_{cat} ต่อพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์	2.07×10^4 ต่อวินาที

ตารางที่ 5.2 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสิดเอสบริสุทรีจาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจากจุลินทรีย์อื่นๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. PC22	65	6.0	50 °C, 30 min	5.5-9.0	งานวิจัยนี้
<i>Aspergillus awamori</i>	50	4.6	70 °C, 15 min	-	Wood และ McCrae, 1996
<i>Aspergillus awamori</i> IFO4033					
α-L-AFase I	60	4.0	60 °C	3.0-7.0	Kaneko และคณะ, 1998
α-L-AFase II	60	4.0	60 °C	3.0-7.0	
<i>Aspergillus niger</i> 5-16	60	4.0	30 °C, 2 hr	4.0-7.0	Kaneko และคณะ, 1993
<i>Aureobasidium pullulans</i>	75	4.0-4.5	75 °C, 8 hr	4.0-5.0	Saha และ Bothast, 1998
<i>Bacillus pumilus</i>	55	7.0	65 °C, 2 hr	5.5-8.5	Degrassi และคณะ, 2003
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	70	5.5-6.0	70 °C, 1 hr	7.0	Gilead และ Shoham, 1995
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> GS113	45	6.0-6.5	-	-	Hespell และ O'Bryan, 1992
<i>Penicillium capsulatum</i>					
Ara I	60	4.0	70 °C, 17.5 min	4.0	Filho และคณะ, 1996
Ara II	55	4.0	60 °C, 9 min	4.0	

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง	เอกสารอ้างอิง
<i>Penicillium chrysogenum</i>					
AFQ1	50	4.0-6.5	50 °C	4.0-8.0	Sakamoto และ Kawasaki, 2003
AFS1	50	3.3-5.0	50 °C	3.0-7.0	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	50	4.0	55 °C, 25 min	-	De Ioannes และคณะ, 2000
<i>Rhizomucor pusillus</i> HHT-1	65	4.0	70 °C, 1 hr	7.0-10.0	Rahman และคณะ, 2001
<i>Streptomyces chartreusis</i> GS901					
AFase I	55	5.5	55 °C	5.5	Matsuo และคณะ, 2000
AFase II	50	7.0	50 °C	7.0	
<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	65	9.0	55 °C, 15 min	4.5-11.0	Tuncer, 2000

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ทรรศนีย์ ตั่งสกุล. 2544. การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของบีตา-ไซโลลิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิชุดา เหล่าเรืองธนา. 2547. การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดย *Streptomyces* sp. PC22. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เวฬุรีย์ ทองคำ. 2547. การผลิตอะซีทิลเอสเทอร์โดย *Streptomyces* sp. PC22. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วัชรวิ ชุณหกุล. 2548. การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอะซีทิลเอสเทอร์โดย *Streptomyces* sp. PC22. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุมาลี อึ้งใจธรรม. 2539. ไซแลเนสและบีตา-ไซโลลิเดสจาก *Streptomyces* spp. ที่ชอบร้อนและชอบด่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Bachmann, S. L., and McCarthy, A. J. 1991. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. Appl. Environ. Microbiol. 57(8): 2121-2130.
- Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol. Prog. 15: 147-157.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Environ. Microbiol. 56: 326-338.

- Beldman, G., Schols, H. A., Pitston, S. M., Searl-van Leeuwen, W. J. F., and Voragen, A. G. J. 1997. Arabinans and arabinan degrading enzymes. Adv. Macromol. Carbohydr. Res. 1: 1-64.
- Bezalel, L., Shoham, Y., and Rosenberg, E. 1993. Characterization and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 57-62.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol. 3(11): 286-290.
- Chen, W. P. 1980. Glucose isomerase (a review); part one. Process Biochem. 6(7): 30-35.
- Debeche, T., Cummings, N., Connerton, I., Debeire, P., and O'Donohue, M. J. 2000. Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. Appl. Environ. Microbiol. 66(4): 1734-1736.
- Degrassi, G., Vindigni, A., and Venturi, V. 2003. A thermostable α -L-arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*: purification and characterisation. J. Biotechnol. 101: 69-79.
- Dekker, R. F. H., and Richards, G. N. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Biochem. 32: 277-352.
- De Ioannes, P., Peirano, A., Steiner, J., and Eyzaguirre, J. 2000. An α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. J. Biotechnol. 76: 253-258.
- Du Preez, J. C. 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. Enzyme. Microb. Technol. 16: 944-956.
- Ericksson, K. E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Germany: Ozach GmbH and Co. p. 181-222.

- Filho, E. X. F., Puls, J., and Coughlan, M. P. 1996. Purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidase from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. Appl. Environ. Microbiol. 62(1): 168-173.
- Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. 139: 187-194.
- 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.
- Gilead, S., and Shoham, Y. 1995. Purification and characterization of α -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 61: 170-174.
- Gomes, J., Gomes, I., Terler, K., Gubala, N., Ditzelmuller, G., and Steiner, W. 2000. Optimisation of culture medium and conditions for α -L-arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Enzyme. Microb. Technol. 27: 414-422.
- Gong, C. S., Chen, L. F., Flickinger, M. C., Chiang, L. C., and Tsao, G. T. 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 41: 430-436.
- Graham, H., and Inborr, J. 1992. Application of xylanase-based enzymes in commercial pig and poultry production. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. pp. 535-538.
- Greve, L. C., Labavitch, J. M., and Hungate, R. E. 1984. α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible roles in hydrolysis of alfalfa cell wall. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1135-1140.
- Gruppen, H., Hamer, R. J., and Voragen, A. G. J. 1992. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. J. Cereal. Sci. 2; 16: 53-67.

- Gunata, Z., Brillouet, J-M., Voirin, S., Baumes, R., and Cordonnier, R. 1990. Purification and some properties of an α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. J. Agric. Food Chem. 38: 772-776.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., and Zupancic, S. 1996. Production of fungal xylanases. Bioresour. Technol. 58: 137-161.
- Henrissat, B., and Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem J. 316: 695-696.
- Hespell, R. B., and O'Bryan, P. J. 1992. Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113. Appl. Environ. Microbiol. 58(4): 1082-1088.
- Hon, D. N. S., and Shiraishi, N. 1990. Wood and Cellulosic Chemistry. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 197.
- Kaji, A., Sato, M., and Tsutsui, Y. 1981. An α -L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces* sp. No. 17-1. Agric. Biol. Chem. 45(4): 925-931.
- Kaneko, S., Arimoto, M., Ohba, M., Kobayashi, H., Ishii, T., and Kusakabe, I. 1998. Purification and substrate specificities of two α -L-arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033. Appl. Environ. Microbiol. 64(10): 4021-4027.
- Kaneko, S., Higashi, K., Yasui, T., and Kusakabe, I. 1998. Substrate specificity of α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces diastatochromogenes* 065 toward arabinose-containing oligosaccharides. J. Ferment. and Bioeng. 85(5): 518-520.
- Kaneko, S., Kuno, A., Matsuo, N., Ishii, T., Kobayashi, H., Hayashi, K., and Kusakabe, I. 1998. Substrate specificity of the α -L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(11): 2205-2210.
- Kaneko, S., and Kusakabe, I. 1995. Substrate specificity of α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* 3-6 toward arabinofurano-oligosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(11): 2132-2133.

- Kaneko, S., Shimasaki, T., and Kusakabe, I. 1993. Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57(7): 1161-1165.
- Kimura, I., Sasahara, H., and Tajima, S. 1995. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. J. Ferment. and Bioeng. 80(4): 334-339.
- Komae, K., Kaji, A., and Sato, M. 1982. An α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. Agric. Biol. Chem. 46(7): 1899-1905.
- Kormelink, F. J. M., Lefebvre, B., Strozyk, F., and Voragen, A. G. J. 1993. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. J. Biotechnol. 27: 267-282.
- Kuyper, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. 2004. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. FEMS. Yeast. Res. 4: 655-664.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lee, S. F., and Forsberg, C. W. 1987. Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Can. J. Microbiol. 33: 1011-1016.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 267-275.
- Luonteri, E., Beldman, G., and Tenkanen, M. 1998. Substrate specificities of *Aspergillus terreus* α -arabinofuranosidases. Carbohydr. Polym. 37: 131-141.
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., daSilva M. J. S., Egmond, M. R., Hagemans, M. L. D., vanGarcom, R. F. M., Hessing, J. G. M., vanDerhondel, C. A. M. J. J., and van Rotterdam, C. 1992. Xylanases and their application in bakery. Elsevier, Amsterdam, pp: 349-360.
- Magee, R. J. and Kosaric, N. 1985. Bioconversion of hemicellulosic. Adv. Biochem. Bioeng. 32: 64-93.

- Manin, C., Shareek, F., Morosoli, R., and Kluepfel, D. 1994. Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). Biochem. J. 302: 443-449.
- Margolles, A., and de los Reyes-Gavilan, C. G. 2003. Purification and functional characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. Appl. Environ. Microbiol. 69(9): 5096-5103.
- Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., and Kusakabe, I. 2000. Purification, characterization and gene cloning of two α -L-Arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS 901. Biochem. J. 346: 9-15.
- Morales, P., Madarro, A., Flors, A., Sendra, J. M., and Perez-Gonzalez, J. A. 1995. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. Enzyme and Microbial Technology. 17: 424-429.
- Nakajima, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Kainuma, K., and Matsuda, K. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4- β -D-xylanase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 62(3): 269-276.
- Neale, A. D., Scopes, R. K., and Kelly, J. M. 1988. Alcohol production from glucose and xylose using *Escherichia coli* containing *Zymomonas mobilis* genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 162-167.
- Nogawa, M., Yatsui, K., Tomioka, A., Okada, H., and Morikawa, Y. 1999. An α -L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* containing a noncatalytic xylan-binding domain. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3964-3968.
- Parajo, J. C., Domingues, H., and Domingues, J. M. 1998. Biotechnological production of xylitol. Part I, interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. Bioresour. Technol. 65: 191-201.
- Panagiotou, G., Topakas, E., Economou, L., Kekos, D., Macris, B.J., and Christakopoulos, P. 2003. Induction, purification, and characterization of two extracellular α -L-Arabinofuranosidase from *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol. 49(10): 639-644.

- Paturan, J.M. 1989. "Bagass' By-Products of the cane sugar industry. New York: Elsevier Science. Vol 11.
- Poutanen, K. 1988. An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 7: 271-282.
- Rahman, A. K. M. S., Kawamura, S., Hatsu, M., Hoq, M. M., and Takamizawa, K. 2001. Physicochemical properties of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1. Can. J. Microbiol. 47: 767-772.
- Rahman, A. K. M. S., Sugitani, N., Hatsu, M., and Takamizawa, K. 2003. A role of xylanase, α -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. Can. J. Microbiol. 49: 58-64.
- Ramon, D., Veen, Pvd., and Visser, J. 1993. Arabinan degrading enzymes from *Aspergillus nidulans*: induction and purification. J. Biotechnol. 113: 15-22.
- Ransom, R. F., and Walton, J. D. 1997. Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and α -arabinosidase from plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. Carbohydr. Res. 297: 357-364.
- Renner, M. J., and Breznak, J. A. 1998. Purification and properties of Arfl, an α -L-arabinofuranosidase from *Cytophaga xylanolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 64(1): 43-52.
- Saddler, J. N., Yu, E. K. C., Mesh-Hartree, M., Levitin, N., and Brownell, H. H. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicellulose by microorganisms for production of liquid fuels. Appl. Environ. Microbiol. 45(1): 153-160.
- Saha, B. C. 2000. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18: 403-423.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 279-291.
- Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1998a. Effect of carbon source on production of α -L-arabinofuranosidase by *Aureobasidium pullulans*. Current Microbiology. 37: 337-340.

- Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1998b. Purification and characterization of a novel thermostable α -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. Appl. Environ. Microbiol. 64(1): 216-220.
- Sakamoto, T., and Kawasaki, H. 2003. Purification and properties of two type-B α -L-arabinofuranosidases produced by *Penicillium chrysogenum*. Biochim. Biophys. Acta. 1621: 204-210.
- Schyns, P. J. Y. M. J., de Frankrijker, J., Zehnder, A. J. B., and Stams, A. J. M. 1994. Production, purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Bacteroides xylanolyticus* X5-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 548-554.
- Screenath, H. K., and Jeffries, T. W. 2000. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. Bioresour. Technol. 72: 253-260.
- Seri, K., Sanai, K., Matsuo, N., Kawakubo, K., Xue, C. Y., and Inoue, S. 1996. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. Metab. Clin. Exp. 45: 1368-1374.
- Shin, H-Y., Park, S-Y., Sung, J. H. and Kim, D-H. 2003. Purification and characterization of α -L-arabinopyranosidase and α -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a Human Intestinal Anaerobic Bacterium Metabolizing Ginsenoside Rb2 and Rc. Appl. Environ. Microbiol. 69(12): 7116-7123.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Tajana, E., Fiechter, A., and Zimmermann, W. 1992. Purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces diastaticus*. Appl. Environ. Microbiol. 58(5): 1447-1450.
- Tsao, G. T., and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology in Berry, S. D. R., and Kristiansen, B. (eds.). The Filamentous Fungi : Fungal Technology. New York: John Wiley and Sons Inc. p. 296-362.
- Tuncer, M. 2000. Characterization of β -Xylosidase and α -L-Arabinofuranosidase Activities From *Thermomonospora fusca* BD25. Turk. J. Biol. 24: 753-767.

- Tuncer, M., and Ball, A. S. 2003. Co-operative actions and degradation analysis of purified xylan-degrading enzymes from *Thermomonospora fusca* BD25 on oat-spelt xylan. J. Appl. Microbiol. 94: 1030-1035.
- Uesaka, E., Sato, M., Raiju, M., and Kaji, A. 1978. α -L-Arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*. J. Bacteriology. 133(3): 1073-1077.
- Uffen, R. L. 1997. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19: 1-6.
- Ungchaithum, S., and Pinphanichakarn, P. 1998. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. PC22 growing on agricultural residues. J. Sci. Res. Chula. Univ. 23(1): 45-50.
- Utt, E. A., Eddy, C. K., Keshav, K. F., and Ingram, L. O. 1991. Sequencing and Expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* *xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities. Appl. Environ. Microbiol. 57(4): 1227-1234.
- Vincent, P., Shareck, F., Dupont, C., Morosoli, R., and Kluepfel, D. 1997. New α -L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme. Biochem. J. 322: 845-852.
- Visser, J., Beldman, G., Someren, M. A. K. V., and Voragen, A. G. J. 1992. Xylan and xylanase. Publishers. Netherlands: Elsevier Science.
- Walker, G. M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. New York: John Wiley and Sons. p. 228-231.
- Wateewuthajarn, K., and Pinphanichakarn, P. 2000. Purification and characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. PC22. J. Sci. Res. Chula. Univ. 25(2): 245-256.
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol. Rev. 52(3): 305-317.
- Wood, T. M., and McCrae, S. I. 1996. Arabinoxylan-degrading enzyme system of the fungus *Aspergillus awamori*: purification and properties of an α -L-arabinofuranosidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 538-545.

Yanai, T., and Sato, M. 2000. Purification and characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(6): 1181-1188.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งข้าวไรย์ (Rye Agar Medium)

เมล็ดข้าวไรย์บด (rye)	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)	30.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	20.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	10.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	18.0	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 เท่ากับ 9.0

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. ไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส

ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan)	1.0	เปอร์เซ็นต์
พอลิเพปไทด์ (polypeptone)	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.4	เปอร์เซ็นต์
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.002	เปอร์เซ็นต์

ปรับระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9.0

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1.1 สารละลาย อัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper reagent)

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71 กรัม และโรเชลล์ซอลท์ (Rochelle salt) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ปริมาณ 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson' 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 กรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาซีนท (NaHASO_4) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

2.1 Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโปแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3000.0	มิลลิลิตร

2.2 Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2.3 Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

2.4 Lowry D

สารละลายฟอลินเฟโนลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

3. สารละลายสำหรับการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1 สารละลายทริส-ไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (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 2.0 โมลาร์ทริส

ทริส	24.2	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

3.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	18.15	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

3.5 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
Bis (N,N,-Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.00	มิลลิลิตร

3.6 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.2	มิลลิลิตร
สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู	7.0	มิลลิลิตร

3.7 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

3.8 สารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล 10 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	4.20	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	3.33	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

3.9 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.20	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

3.10 สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

0.1 เปอร์เซ็นต์ สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี 250
40 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล
10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติก

3.11 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

40 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล
10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติก

4. สารละลายที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

4.1 สารละลายทริสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	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 2.0 โมลาร์ทริส

ทริส	24.2	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

4.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	18.15	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

4.5 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

4.6 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 20 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

4.7 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
Bis (N,N,-Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.00	มิลลิลิตร

4.8 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

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

4.9 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

4.10 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล 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	6.10	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

4.12 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

0.1 เปอร์เซ็นต์ สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี 250

40 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล

10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติก

4.13 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

40 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล

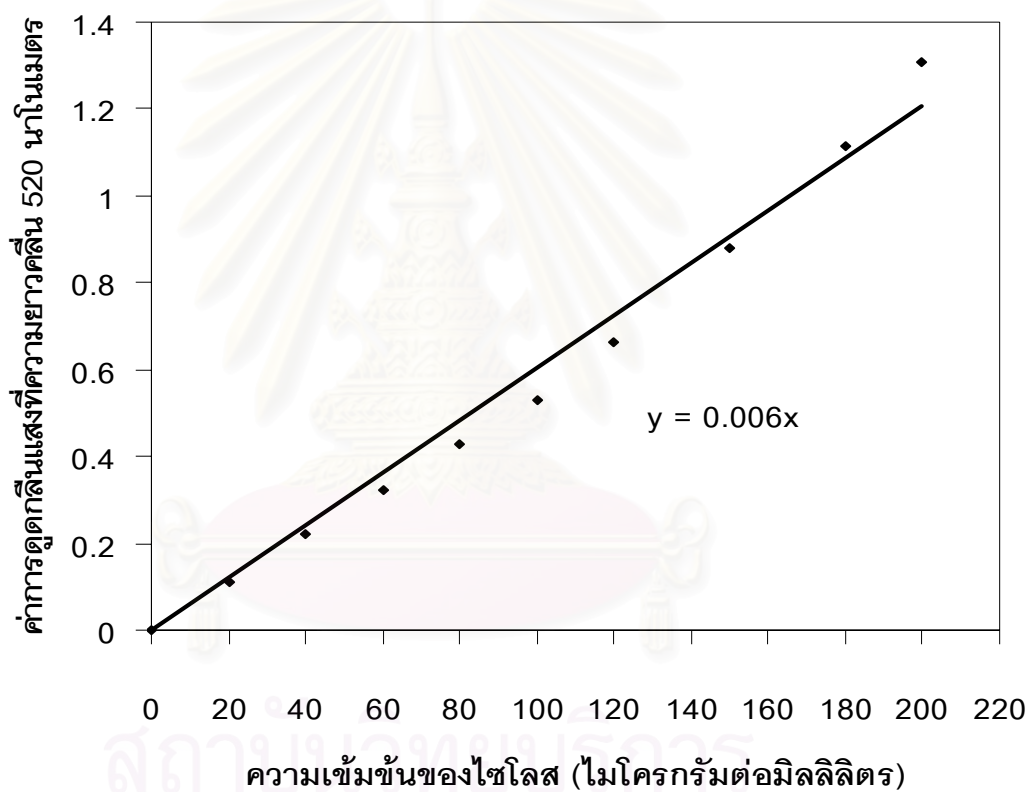
10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติก

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

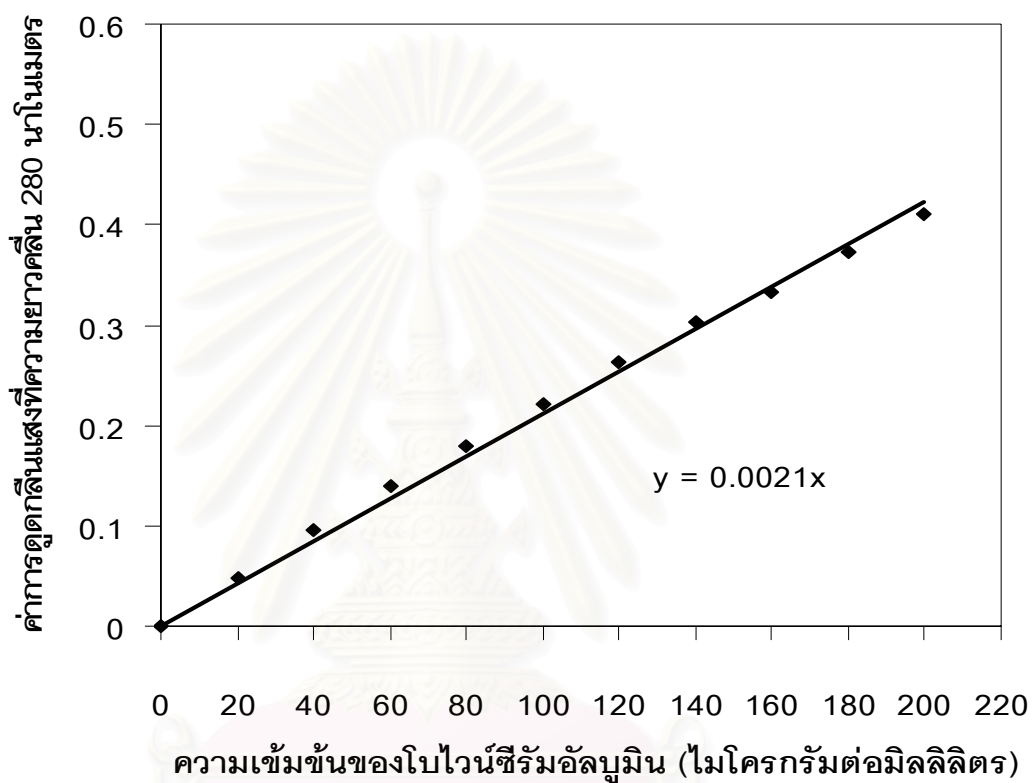
กราฟมาตรฐานไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

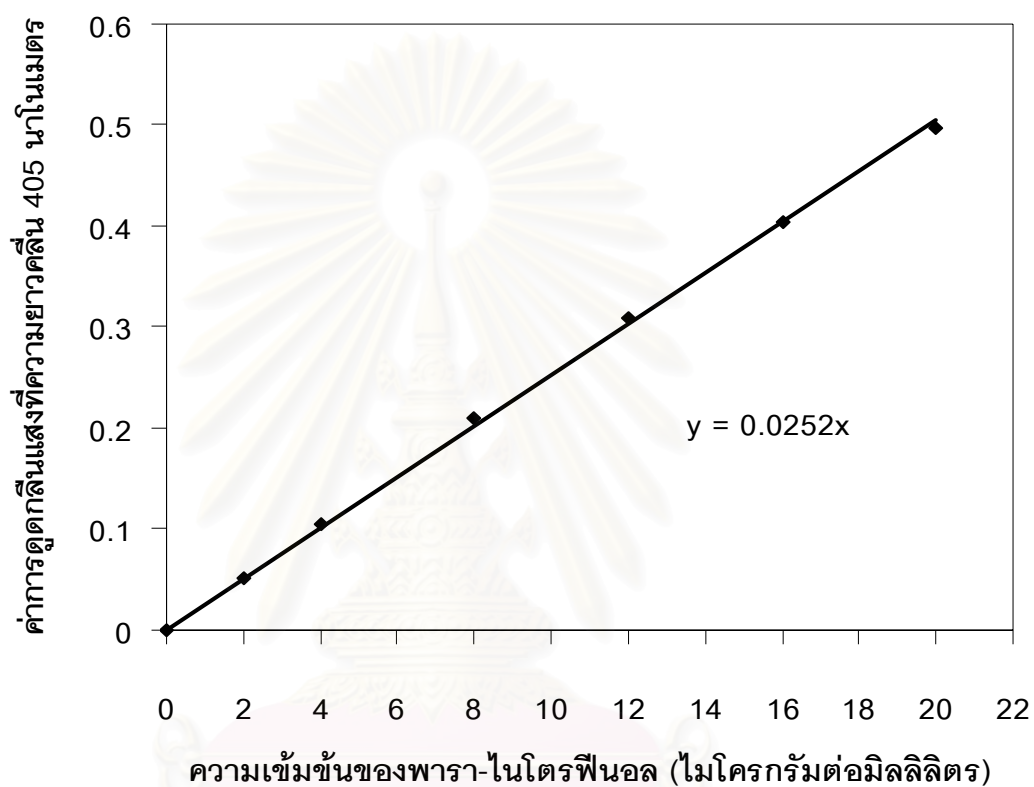
กราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

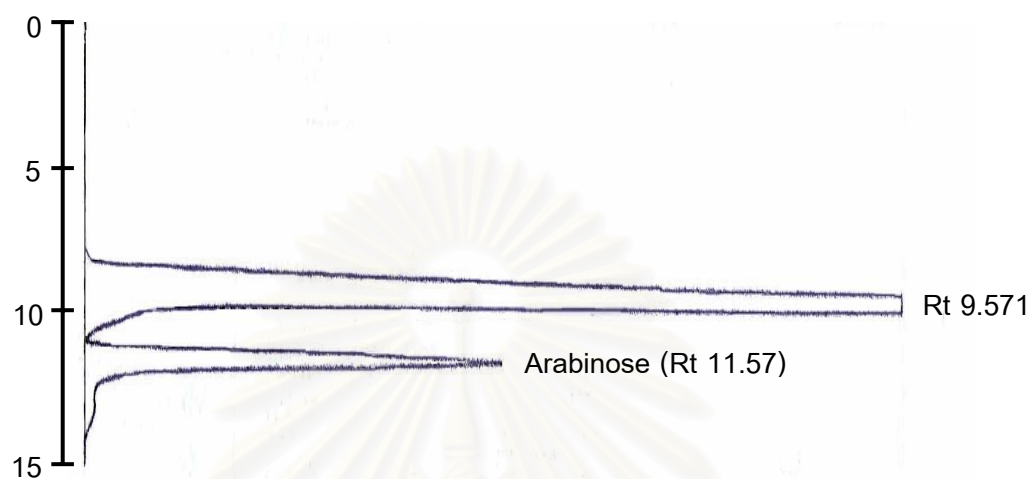
3. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์แควติตี้ของแอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์

กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. โคโรมาโทแกรมแสดงการวิเคราะห์อะราบินโนสโดยวิธี HPLC



อะราบินโนสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้พื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 15,832

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

วิธีคำนวณ

1. วิธีการคำนวณค่า V_{\max}

จากรูปที่ 4.19 พบว่ามีค่า K_m สำหรับพารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ เท่ากับ 0.27 มิลลิโมลาร์ เพราะฉะนั้นค่า V_{\max} จากกราฟ เท่ากับ 0.319 ไมโครโมลต่อนาที

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry ดังแสดงในข้อ 3.3.6 พบว่าเอนไซม์มีปริมาณโปรตีน 0.065 มก.โปรตีนต่อมล.

ในปฏิกิริยาใช้เอนไซม์เจือจาง 20 เท่า เพราะฉะนั้น จะมีโปรตีนเท่ากับ 0.00325 มก.โปรตีนต่อมล.

แต่ในปฏิกิริยาจะใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.025 มล. เพราะฉะนั้น จะมีโปรตีนเหลือ 0.00008125 มก.โปรตีน

ดังนั้นสรุปได้ว่า

ในปฏิกิริยามีโปรตีน 0.00008125 มก. จะมีค่า V_{\max} เท่ากับ 0.319 ไมโครโมลต่อนาที เพราะฉะนั้น โปรตีน 1 มก. จะมีค่า V_{\max} เท่ากับ 3,926.15 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมก.โปรตีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วิธีการคำนวณค่า k_{cat} (Turnover number)

$$\text{สูตรคำนวณ ; } k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [E_0]$$

เอนไซม์ที่ได้จากการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 เพรบ เกรด (Superose 12 prep grade) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 317,000 ดาลตัน (ผลจากรูปที่ 4.12)

ค่า $[E_0]$;

1 โมลของเอนไซม์ เท่ากับ 317,000 กรัมของเอนไซม์

เพราะฉะนั้น 1 ไมโครโมลของเอนไซม์ เท่ากับ 317,000 ไมโครกรัมของเอนไซม์ เช่นกัน

แทนค่าในสูตร

$$\begin{aligned} k_{\text{cat}} &= V_{\text{max}} / [E_0] \\ &= \frac{3926.15 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}}{\frac{1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{pr}}{317,000}} \end{aligned}$$

เปลี่ยน $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg pr}$ ด้วยการหาร 1000

$$\begin{aligned} &= \frac{3926.15 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}}{\frac{1000 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}}{317,000}} \\ &= 1,244,590 \text{ min}^{-1} \end{aligned}$$

เพราะฉะนั้นมีค่า k_{cat} เท่ากับ 2.07×10^4 ต่อวินาที

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ เกิดเมื่อวันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และได้เข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 308 ถนนหน้าเมือง ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84000



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย