บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการสุกของพืชหลายชนิดโดย Bhagyalakshmi และ Prabha (1998) ได้ศึกษาถึงเอนไซม์หลายชนิดที่มีผลต่อการสุกของผลกล้วยน้ำว้า พบว่าในระหว่างการสุกจะตรวจพบแอคติวิตีของไซลาเนสในปริมาณที่สูงกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดอื่นที่มีผลต่อการสุกของผลกล้วย แต่เป็นการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์จึงยังไม่ได้มีการศึกษาถึงการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการสกัดแยกเอนไซม์ไซลาเนสจากผลกล้วยน้ำว้าและทำให้บริสุทธิ์ โดยในขั้นตอนแรกได้ติดตามตรวจวัดแอคติวิตีของไซลาเนส ในระหว่างการสุกของผลกล้วยตั้งแต่ผลดิบจนกระทั่งถึงผลสุกเต็มที่และทำการวัดความแน่นเนื้อเพื่อใช้เป็นดัชนีวัดการสุกในแต่ละระยะ พบว่าที่ระยะความแน่นเนื้อ 210 cN ไซลาเนสอย่างหยาบที่สกัดได้จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.66 ยูนิต / มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์อย่างหยาบที่สกัดได้ที่ระดับความแน่นเนื้ออื่น ๆ ดังนั้นจึงนำกล้วยที่ความแน่นเนื้อ 210 cN มาสกัดหาเอนไซม์ไซลาเนส

จากการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอนไซม์ โดยในขั้นตอนแรกได้ทำการตกตะกอนแบบลำดับส่วนที่ความเข้มข้น 0 – 20 , 20 – 40 , 40 – 60 และ 60 – 80 % พบว่าจะเกิดการตกตะกอนโปรตีนได้น้อยมาก จึงทำการตกตะกอนแบบอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 40 , 60 , 70 และ 80 % พบว่าตะกอนไซลาเนสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 % จะได้ปริมาณของไซลาเนสมากที่สุด ดังนั้นในขั้นตอนการตกตะกอนไซลาเนสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจากเอนไซม์อย่างหยาบจึงเลือกใช้การตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 %

จากการศึกษาวิจัยในการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยซีเอ็ม – เซลลูโลส ซึ่งเป็นโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก และใช้โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 พบว่าไซลาเนสถูกชะออกจากคอลัมน์โดยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 – 135 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ที่ได้จากการแยกด้วยโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวกนี้ อาจมีค่า pI ของเอนไซม์ มากกว่า 5.5 ซึ่งจะทำให้เอนไซม์มีประจุสุทธิเป็นบวก และในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์คือนำไซลาเนสที่แยกได้จากซีเอ็ม – เซลลูโลส มาผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี–50 ซึ่งมีความสามารถในการแยกโปรตีนที่มีมวลน้ำหนัก 15 – 30 กิโลดาลตัน พบว่าจะได้ไซลาเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 14.7 เท่า รายงานการวิจัยอื่นๆ ที่มีการศึกษาการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์ ได้แก่ Tsujibo *et al.*, 1990 ได้รายงานการทำให้บริสุทธิ์ไซลาเนสจาก *Nocardiopsis*

dassonvillei โดยตกตะกอนด้วยอะซิโตน ตามด้วยการทำดีอีเออี – เซลลูโลไฟน์ เอ – 800 และคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี–75 พบว่าได้ไซลาเนส 3 ชนิดคือ X-I , X-II และ XIII ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.01 , 7.51 และ 6.02 เท่าตามลำดับ Ishi *et al.*,1997 ได้รายงานการทำให้บริสุทธิ์ไซลาเนสจากเชื้อราที่ชอบร้อน สายพันธุ์ HG-1 โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยการทำดีอีเออีเซฟาเด็กซ์ เอ –50 และ ซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี –50 จากนั้นทำเซฟาเด็กซ์จี–150 พบว่าได้ไซลาเนสเพียง 1 ชนิด ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.79 เท่า Xu *et al.*, 1998 ได้รายงานการทำให้บริสุทธิ์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* PC-3-7 โดยการทำเซฟาคริล เอส–100 โครมาโทกราฟี ตามด้วยการทำ ซีเอ็ม – เซฟาโรส เอฟ เอฟ ได้ไซลาเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.3 เท่า

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซีสแบบเสียสภาพ พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ดังนั้นผลการทดลองที่ได้อาจสรุปได้ว่าไซลาเนสที่ได้มีเพียงชนิดเดียว และมีค่า Relative mobility เท่ากับ 0.88 เมื่อเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน พบว่าขนาดโมเลกุลของไซลาเนสมีค่าเท่ากับ 19 กิโลดาลตัน ส่วนการหาขนาดโมเลกุลโดยการทำเจลฟิลเตรชันพบว่าพีคแอคติวิตีของไซลาเนสมีค่า Kav เท่ากับ 0.218 เมื่อเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 21 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับขนาด19 กิโลดาลตันที่ได้จากการทำพอลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซีสแบบเสียสภาพ เอนไซม์ที่ได้อาจเป็นสายโพลีเปปไทด์สายเดียวและเนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยดังนั้นอาจจัดอยู่ในแฟมิลี 11 (Jeffries,2000)

การศึกษาถึงผลของเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาเพื่อหาความเร็วเริ่มต้น พบว่าเวลาที่ 10 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยา เนื่องจากอยู่ในช่วงเวลาที่อัตราเร็วของการเกิดผลิตภัณฑ์เป็นไปอย่างอย่างสม่ำเสมอ และจากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อความเร็วเริ่มต้น พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และความเร็วเริ่มต้นเป็นเส้นตรง นอกจากนั้นการทำ Lineweaver - Burk plot จะได้กราฟเป็นเส้นตรงดังนั้นจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลาเนสน่าจะเป็นไปตามสมการ Michaelis – Menten

การศึกษาความเป็นกรด – ด่าง ต่อการทำงานพบว่าไซลาเนสทำงานได้ดีในช่วง pH 5 – 6 โดยที่ pH 5.5 เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุด การทำงานของไซลาเนสจะลดลงที่ pH ต่ำกว่า 5.5 หรือที่ pH สูงกว่า 6.0 โดยที่ pH 3.5 เอนไซม์จะเหลือแอคติวิตี 64 % และที่ pH 9.0 เอนไซม์จะเหลือแอคติวิตี 27 %

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและต่อเสถียรภาพของไซลาเนส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด และที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะหมดความสามารถในการทำงาน สำหรับความเสถียรของไซลาเนสที่

อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า ไซลาเนสมีความเสถียรในช่วง 35 – 45 องศาเซลเซียสโดยจะยังคงมีแอคติวิตีอยู่ 100 % และไซลาเนสจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์เมื่อทำการบ่มที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

จากการศึกษาความจำเพาะของไซลาเนสต่อสับสเตรทหรือไซแลน โดยใช้ไซแลนที่สกัดได้จากพืช 2 ชนิด คือไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไซแลนจากไม้เบิร์ช ซึ่งไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตมีส่วนประกอบของกลูโคสและอะราบิโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ที่หมู่ข้างเคียง (side chain) ประมาณ 10 และ 15 % ตามลำดับ และไซแลนจากไม้เบิร์ชซึ่งมีไซโลสเป็นโครงสร้างหลัก (main chain) อยู่มากกว่า 90 % ซึ่งอาจหมายความว่ามีหมู่ข้างเคียงอยู่น้อยกว่า 10 % ผลการวิเคราะห์ค่า K_m ของไซลาเนสต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต และไซแลนจากไม้เบิร์ช มีค่าเท่ากับ 1.28 และ 0.50 mg/ml ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงว่าไซลาเนสมีความสามารถในการจับไซแลนจากไม้เบิร์ชมากว่าไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของไซแลนจากไม้เบิร์ชมีหมู่ข้างเคียงในปริมาณที่น้อยกว่าหมู่ข้างเคียงในไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต และมีปริมาณไซโลสมากกว่าจึงทำให้ไซลาเนสเข้าจับกับไซแลนจากไม้เบิร์ชได้ดีกว่า ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ เช่น Kluepfel *et al.*,1992 ศึกษาถึงไซลาเนสที่ได้จาก *Streptomyces lividans* 66 พบว่ามีไซลาเนส 3 ชนิดคือ Xyl A , Xyl B และ Xyl C โดยไซลาเนสทั้ง 3 ชนิดจะมี ค่า K_m ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเท่ากับ 2.6 , 3.7 และ 4.2 mg/ml ตามลำดับ และมีค่า K_m ต่อไซแลนจากไม้เบิร์ชเท่ากับ 1.1 , 1.8 และ 4.1 mg/ml ตามลำดับ Fernandez-Espinar *et al.*, 1994 ได้ศึกษาไซลาเนสจาก *Aspergillus nidulans* และรายงานค่า K_m ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไซแลนจากไม้เบิร์ชเท่ากับ 4.15 และ 1.78 mg/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของอิออนโลหะที่ยับยั้งการทำงานของไซลาเนส พบว่าที่ความเข้มข้น 10 mM ของ Hg^{2+} และ Zn^{2+} ไซลาเนสถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ 100 % Cu^{2+}, Mg^{2+} และ Sn^{2+} จะยับยั้งการทำงานของไซลาเนส 59.52 % , 33.58 % และ 22.46 % ตามลำดับ ส่วน Fe^{2+} และ Ca^{2+} จะยับยั้งการทำงานของไซลาเนส เพียง 5.56 % และ 2.60 % ตามลำดับ Lin *et al.*, 1999 ได้รายงานว่า Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 6 mM จะยับยั้งการทำงานของไซลาเนสที่แยกได้จาก *Thermomyces lanuginosus* –SSBP ได้อย่างสมบูรณ์

Tsujibo และคณะ (1990) รายงานว่าไซลาเนส 3 ชนิดที่ได้จาก *Nocardiopsis dassonvillei* OPC-18 จะถูกยับยั้งด้วยอิออนโลหะแตกต่างกันดังนี้ ทั้ง X-I และ X-III จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ 100 % ด้วย Fe^{2+} , Fe^{3+} และ Hg^{2+} Mg^{2+} จะยับยั้ง X-I และ X-II 8 % และ 4 % ตามลำดับ แต่ไม่มีผลยับยั้ง X-III จากผลการศึกษาที่กล่าวมาแล้วอาจสรุปได้ว่าความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์จากแหล่งต่าง ๆ และชนิดของอิออนต่าง ๆ

จากการดัดแปลงกรดอะมิโนด้วยสารเคมีที่มีความจำเพาะพบว่า NBS (*N*– bromo succinimide) ที่ใช้ดัดแปลงทริปโตฟานอย่างจำเพาะสามารถยับยั้งแอคติวิตีของไซลาเนสได้ถึง 96.4 % แสดงว่าทริปโตฟานน่าจะเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับเอนไซม์ในการทำงาน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Lin *et al.*, 1999 ที่ระบุว่า ทริปโตฟาน มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของไซลาเนสที่ได้จาก *Thermomyces lanuginosus* – SSBP

จากการใช้ DEPC (diethylpyrocarbonate) ที่ใช้ดัดแปลงฮีสติดีนพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 82 % ดังนั้นฮีสติดีนน่าจะเป็นกรดอะมิโนอีกชนิดหนึ่งนอกเหนือจากทริปโตฟาน ที่จำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Bakalova *et al.*, 2002 ได้รายงานว่า ฮีสติดีน ทริปโตฟาน และ หมู่คาร์บอกไซเลต ของไซลาเนสที่ได้จาก *Thermomyces lanuginosus* เป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม DEPC สามารถทำปฏิกิริยาได้อีกกับ ซีสเตอีน ไลซีน และไทโรซีน นอกเหนือจากฮีสติดีน (Copeland; 2000) แต่จากการทดลองที่ใช้สารเคมีที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดดังต่อไปนี้ IAM (Iodoacetamide) ที่ใช้ดัดแปลงซีสเตอีน TNBS(2,4,6 Trinitrobenzenesulfonic acid) ที่ใช้ดัดแปลงไลซีน และ NAI (N - acetylamidazole) ที่ใช้ดัดแปลงไทโรซีน พบว่าสารดัดแปลงทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่มีผลต่อการทำงานของไซลาเนส แสดงว่า ซีสเตอีน ไลซีน และ ไทโรซีน ไม่น่าจะเป็นกรดอะมิโนที่มีส่วนร่วมในการทำงานของเอนไซม์

นอกจากนั้นการใช้ EDAC (Ethyldimethylaminopropyl carbodiimide) ที่ใช้ดัดแปลงหมู่คาร์บอกไซเลต พบว่าไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งต่างจากงานวิจัยอื่น ๆ ที่มักพบว่าหมู่คาร์บอกไซเลตมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของไซลาเนส ทั้งนี้อาจเนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้สารดัดแปลงที่ความเข้มข้นเดียว ดังนั้นการวิจัยครั้งต่อไปจึงควรเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารดัดแปลงหมู่คาร์บอกไซเลต ส่วนการใช้ PMSF (phenylmethylsulfonyl fiuoride) เพื่อดัดแปลงเซอรีน พบว่าสารดัดแปลงดังกล่าวไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จากการศึกษาการดัดแปลงกรดอะมิโนด้วยสารเคมีจำเพาะที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดอาจสรุปได้ว่า ทริปโตฟาน และ ฮีสติดีน เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของไซลาเนส

จากสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ตามที่กล่าวมาแล้วนั้น ไซลาเนสที่ได้จากกล้วยน้ำว้าอาจมีศักยภาพในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษได้ โดยไม่ทำลายเซลลูโลสของกระดาษ เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ชนิดนี้ไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสเจือปนอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการฟอกย้อมนี้ต้องใช้ pH ในช่วง 5.0 – 6.0 และอุณหภูมิในช่วง 30 – 45 องศาเซลเซียส จึงจะทำให้ไซลาเนสทำงานได้ดีและเหมาะสม และอาจจะนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้เพื่อทำให้น้ำผลไม้ใส เนื่องจากไซลาเนสที่ได้ทำงานได้ดีที่ pH 5.0 คุณสมบัติของไซลาเนสที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้นำมาเปรียบเทียบกับไซลา

เนสที่สกัดได้จากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าไซลาเนสที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ จะมีอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการทำงานแตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 สมบัติของไซลาเนสจากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งของไซลาเนส	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Musa sapientum	45	5.5	30-45	--	งานวิจัยนี้
Streptomyces sp. PC22 (xylanase U)	60	5.5	50	5.5-9.0	Pinphanichakarn ; 2000
Streptomyces sp. PC22 (xylanase B)	60	5.5-6.0	55	4.0-9.0	Pinphanichakarn; 2000
Streptomyces chattanoogensis CECT3336	50	6.0	50	5.0-8.0	Lopez-Fernandez et.,al;1998
Streptomyces halstedii JM 8 (Xys1L)	60	6.3	50	4.0-10.0	Ruiz-Arribas *et.,al*;1995
Streptomyces halstedii JM 8 (Xys1S)	60	6.3	50	4.0-10.0	Ruiz-Arribas *et.,al*;1995
Bacillus sp. BP-23	50	5.5	55	สูงถึง 11.0	Blanco *et.,al*;1995
Bacillus sp. K-1	60	5.5	50	5.0-9.0	Ratanakhonokchai *et.,al*;1995
Cephalosporium sp. RYM-202	50	7.5	50	5.5-12	Kang *et.,al*;1996
Fusarium oxysporum F3 (Xylanase I)	60	6.0	45	9.0-10.0	Christakopoulos *et.,al*;1996
Fusarium oxysporum F3 (Xylanase II)	55	6.0	45	7.0-9.0	Christakopoulos *et.,al*;1996
Aspergillus sojae (X-I)	60	5.0	50	5.0-8.0	Kimura *et.,al*;1995
Aspergillus sojae (X-II-A)	50	5.0	50	5.0-9.0	Kimura *et.,al*;1995
Aspergillus sojae (X-II-B)	60	5.5	35	5.0-8.0	Kimura *et.,al*;1995