ผลของโปรตีนและไกลซีนต่อเสถียรภาพของไซลาเนสทนด่างจาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ต่อความร้อน

กณิฏฐา สิรยานุวัฒนกุล[1] คิน เลย์ คู[2] และ กนก รัตนะกนกชัย[3,*]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการเติมโปรตีนและกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไซลาเนสทนด่างจาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 พบว่าไซลาเนสที่ความเข้มข้น 0.148 มก. โปรตีนต่อ มล. ที่อุณหภูมิ 55 °ซ พีเอช 10.0 มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 3 ชั่วโมง เมื่อเติม bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 (w/v) ลงในเอนไซม์ช่วยให้เสถียรภาพของไซลาเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ BSA โดย BSA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (w/v) ให้ค่าครึ่งชีวิตสูงสุดเท่ากับ 9.8 ชั่วโมง เมื่อศึกษาผลของเคซีนในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 (w/v) และไกลซีนในช่วงความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.5 โมลาร์ ต่อเสถียรภาพของไซลาเนส พบว่า แม้ว่าที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้เสถียรภาพของไซลาเนสเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของเคซีนและไกลซีนเพิ่มขึ้น เสถียรภาพต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ลดลง โดยเคซีนและไกลซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) และ 0.5 โมลาร์ ให้ค่าครึ่งชีวิตสูงสุดเท่ากับ 8 และ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ

คำสำคัญ : alkaliphilic *Bacillus firmus* / ไซลาเนสทนด่าง / เสถียรภาพของไซลาเนสต่อความร้อน

**Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

[1] อดีตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

[3] รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Effect of Proteins and Glycine on Thermal Stability of Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1

Kanittha Sirayanuwatthanakul [1] Khin Lay Kyu [2] and Khanok Ratanakhanokchai [3,*]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Takham, Bangkhuntien, Bangkok 10150

Abstract

Effect of the addition of various concentrations of proteins and amino acid on the thermal stability of the alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 was studied. The enzyme at the concentration of 0.148 mg protein/ml gave the half-life of 3 h under the condition of 55 °C, pH 10. It was found that increasing bovine serum albumin (BSA) in the range of 0.5-2.0% (w/v) increased thermal stability of the enzyme. Whereas BSA at the concentration of 2.0% (w/v) gave the highest half-live of 9.8 h. On the other hand, although the addition of casein and glycine in the range of concentrations of 0.5-2.0% (w/v) and 0.5-1.5 M, respectively, increased the stability of xylanase. However, thermal stability of the enzyme decreased when the concentrations of casein and glycine increased. Casein and glycine at the concentrations of 0.5% (w/v) and 0.5 M gave the longest half-life at 8 and 7 h, respectively.

Keywords : Alkaliphilic *Bacillus firmus* / Alkaline Xylanase / Thermal Stability of Xylanase

**Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

[1] Former Graduate Student, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology.

[2] Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

[3] Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

1. บทนำ

ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยไซแลน จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycosyl hydrolase โดยมีแบคทีเรียและเชื้อราเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญ [1] ไซลาเนสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายอย่าง เช่น อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ โดยใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษ [2] การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ [3] อุตสาหกรรมผลิตขนมปัง [4] และอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม [5] การนำไซลาเนสไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมจำเป็นต้องคำนึงถึงความคงทนต่ออุณหภูมิสูงของเอนไซม์ เพื่อก่อให้เกิดประสิทธิภาพและยืดอายุการทำงานของเอนไซม์

Ratanakhanokchai และคณะ [6] รายงานว่า alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 (ชื่อเดิม *Bacillus* sp. K-1) ผลิตไซลาเนสทนด่างที่ปราศจากเซลลูเลส ซึ่งสามารถย่อยสารประกอบไซแลนบริสุทธิ์ที่ไม่ละลายน้ำ ไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อย และไซแลนในเยื่อกระดาษจากชานอ้อย ยูคาลิปตัส และสน [7] โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพด้วยความร้อน ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามไซลาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus firmus* K-1 ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้นาน ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่ควรได้รับการพัฒนาให้มีศักยภาพสูงขึ้น จากการที่วิธีการปรับปรุงเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงของเอนไซม์ด้วยการเติมสารเคมีต่างๆ มีขั้นตอนในการทดลองที่ไม่ซับซ้อน และไม่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านในระดับสูง สามารถประเมินผลเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับที่ยอมรับได้ จึงนำไปสู่แนวความคิดในการศึกษาวิจัยโดยงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกโปรตีนและกรดอะมิโน เพื่อปรับปรุงให้ไซลาเนสมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เหมาะสมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 แหล่งของจุลินทรีย์

Bacillus firmus K-1 แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่มีฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ [6]

2.2 การผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Berg's mineral medium [8] ที่มีสูตรดังนี้ คือ $NaNO_3$ 0.2 กรัม K_2HP0_4 0.05 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 กรัม $MnSO_4.H_2O$ 0.002 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.002 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. โดยมีเปลือกข้าวโพด 1.0 กรัมต่อ 100 มล. เป็นแหล่งคาร์บอน [9] ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที รอให้เย็น ปรับพีเอชให้เป็น 10.5 ด้วย Na_2CO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) จากนั้นถ่ายเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 ร้อยละ 2 (v/v) แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ (supernatant) เป็น crude enzyme เก็บไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการตรวจวัดกิจกรรมของไซลาเนสโดยเติมตัวอย่างเอนไซม์ 0.1 มล. ลงใน oat spelt xylan (Sigma-Aldrich Inc.) ร้อยละ 1 (w/v) ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Miller [10] และใช้ D-xylose (Merck KGaA) เป็นสารมาตรฐาน

หนึ่งยูนิต (U) ของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์คิดเทียบเท่าเป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างตามวิธีของ Lowry และคณะ [11] และใช้สารละลาย bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นสารมาตรฐาน

2.5 การตรวจสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อความร้อน

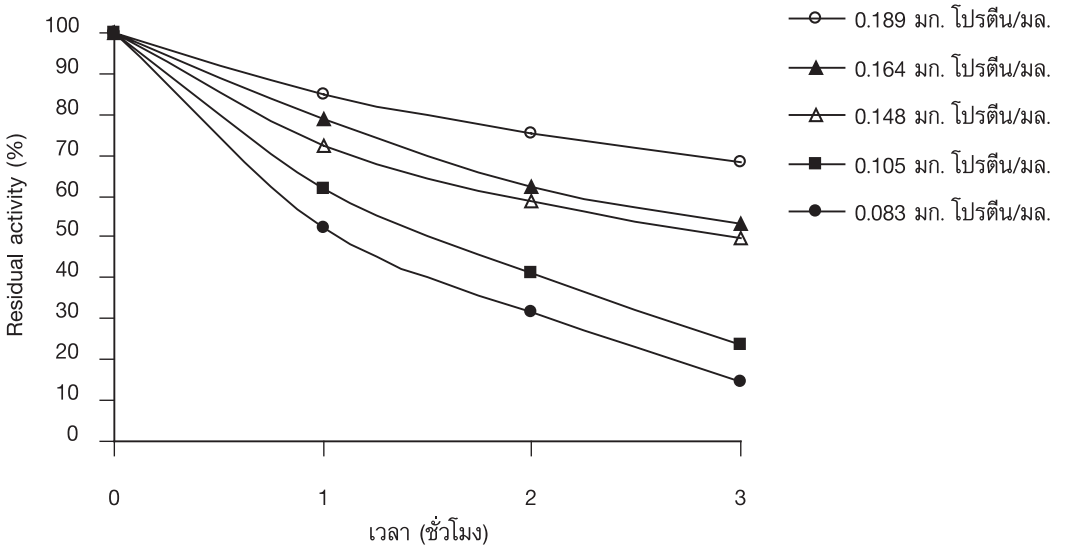
บ่ม crude xylanase ความเข้มข้นต่างๆ หรือ crude xylanase ที่เติมโปรตีนหรือกรดอะมิโน โดยความเข้มข้นที่ใช้เป็นความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายตัวอย่างที่พีเอช 10 (carbonate-bicarbonate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) อุณหภูมิ 50 หรือ 55 °ซ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมไซลาเนสเริ่มต้น โดยกำหนดให้กิจกรรมของไซลาเนส เริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 100

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลของความเข้มข้นของ crude xylanase ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

การปรับปรุงเสถียรภาพของไซลาเนสต่อความร้อนจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ก่อน เพื่อใช้เป็นจุดอ้างอิงในการทดลองอื่น จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ crude xylanase ต่อเสถียรภาพ ณ อุณหภูมิสูง โดยบ่ม crude xylanase ที่ผลิตจาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อแช่ crude xylanase ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.083 ถึง 0.189 มก./มล. ที่พีเอช 10 อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง เสถียรภาพของเอนไซม์ค่อนข้างดีและค่อยๆ ลดลงเล็กน้อย จนเหลือประมาณร้อยละ 71 ถึง 79 ในชั่วโมงที่ 7 (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ซึ่ง crude enzyme ความเข้มข้นต่างๆ ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน แต่มีแนวโน้มว่าเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าจะมีเสถียรภาพที่ดีกว่า

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเป็น 55 °ซ พบว่าเสถียรภาพของเอนไซม์ลดลงค่อนข้างมากเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของ crude xylanase เพิ่มขึ้น เสถียรภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้นค่อนข้างชัดเจน



รูปที่ 1 ผลของความเข้มข้นของ crude xylanase ต่อเสถียรภาพ ณ อุณหภูมิ 55 °ซ พีเอช 10.0

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของ crude xylanase จาก *Bacillus firmus* K-1 ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อความร้อน พบว่า ไซลาเนสมีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาที่เวลา 3 ชั่วโมง การเติมไซลาเนสที่ความเข้มข้น 0.189 มก./มล. มีค่ากิจกรรมไซลาเนสที่เหลืออยู่สูงสุดเท่ากับร้อยละ 68.42 ขณะที่ความเข้มข้น 0.083 มก./มล. มีค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่เพียงร้อยละ 14.5 ผลของแนวโน้มดังกล่าวอาจเกิด

จากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน ทำให้ความหนาแน่นของโปรตีนในระบบเพิ่มขึ้น โอกาสในการสร้างพันธะเคมีระหว่างโปรตีนชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันจึงมีมากขึ้น หากพันธะเคมีที่เกิดขึ้นไม่รบกวนกลไกการทำงานของ catalytic site ของเอนไซม์ จะทำให้ความแข็งแรงของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Estrada-Mondaca และ Fournier [12] ที่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ acethylcholinesterase จาก 1.3 นาโนโมลต่อลิตร เป็น 13 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์จาก 2 วันเป็นมากกว่า 12 วัน ณ อุณหภูมิ 20 °ซ ซึ่งมีสาเหตุจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นช่วยลดการเกิด hydrophobicity ของ side chain ของกรดอะมิโนที่บริเวณผิวของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับผิวของหลอดทดลองและ air-solvent interface

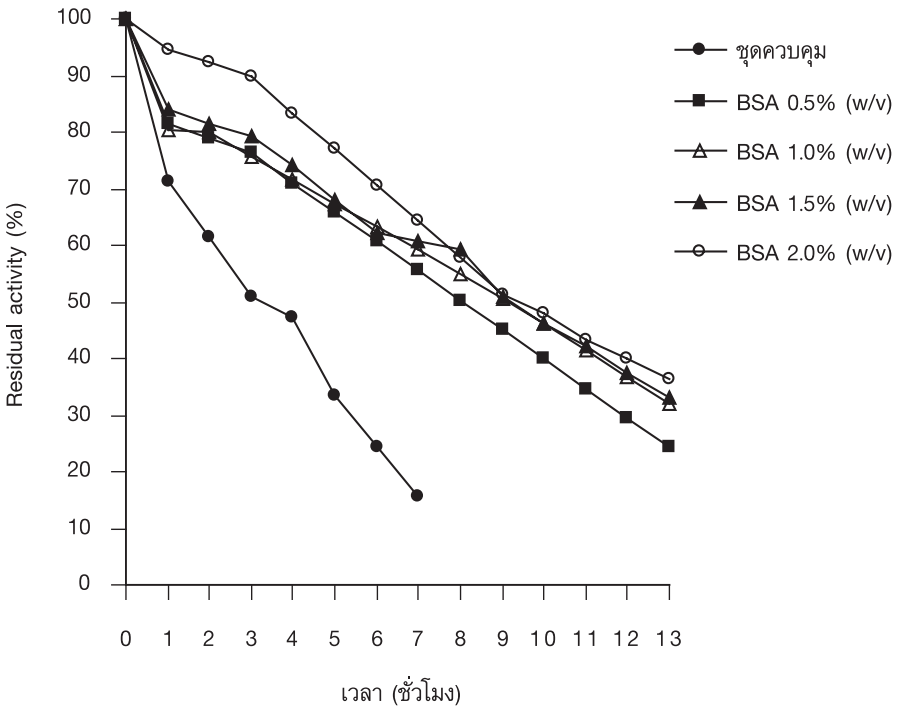
ซึ่งผลการศึกษานี้เป็นการหาสภาวะความเข้มข้นของ crude xylanase จาก *Bacillus firmus* K-1 ที่เหมาะสมเบื้องต้นเพื่อใช้อ้างอิงในการทดลองในลำดับต่อไป เมื่อพิจารณาจากค่าครึ่งชีวิตร่วมกับความเข้มข้นของไซลาเนสที่ระดับต่างๆ และช่วงเวลาที่ต้องใช้ในการเก็บผลการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของไซลาเนสเท่ากับ 0.148 มก./มล. (0.69 ยูนิต/มล.) ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 3 ชั่วโมง เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการนำไปออกแบบการทดลอง เนื่องจากอัตราการลดลงของค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บผลการทดลองและต่อการนำไปประยุกต์ใช้

3.2 ผลของโปรตีนและกรดอะมิโนต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

3.2.1 ผลของ BSA

เมื่อพิจารณาผลของการเติม BSA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 (w/v) ต่อกิจกรรมของ crude xylanase ที่ความเข้มข้น 0.148 มก.โปรตีน/มล. พบว่า ความเข้มข้นของ BSA ที่เพิ่มขึ้นไม่ค่อยมีผลต่อกิจกรรมของไซลาเนส โดยค่ากิจกรรมของไซลาเนส เพิ่มขึ้นเล็กน้อยมีค่าอยู่ในช่วง 0.70 ถึง 0.73 ยูนิต/มล. ขณะที่ชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.69 ยูนิต/มล.

สำหรับผลของ BSA ที่ความเข้มข้นข้นร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 (w/v) ต่อเสถียรภาพของ crude xylanase ณ อุณหภูมิ 55 °ซ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.148 มก. โปรตีน/มล. เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ต่อระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง พบว่า BSA ในทุกความเข้มข้นสามารถ ช่วยรักษาเสถียรภาพของ crude xylanase ได้ดีกว่าชุดควบคุม และมีแนวโน้มในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าครึ่งชีวิตในช่วง 8.0 ถึง 9.8 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 3.6 ชั่วโมง (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Morgavi และ คณะ [13] ที่พบว่าการเติม BSA ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) สามารถเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ β-glucosidase ที่ผลิตจาก *Trichoderma viride* จากน้อยกว่า 0.5 ชั่วโมง เป็น 3 ชั่วโมง การรักษาเสถียรภาพของไซลาเนสต่ออุณหภูมิสูงด้วย BSA อาจเกิดจากโครงสร้างของไซลาเนสถูกห่อหุ้มด้วยโครงสร้างที่แข็งแรงของ BSA ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างแบบ α-helix ที่มีอยู่ประมาณร้อยละ 68 [14, 15] นอกจากนี้โครงสร้างของ BSA ยังประกอบด้วยซิสเตอีนเป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ 17 แห่ง ทำให้โครงสร้างแข็งแรง [16] สำหรับกลไกการเข้าจับระหว่าง BSA กับไซลาเนส อาจเกิดจาก BSA หันปลาย side chain ของกรดอะมิโนอิสระที่มีประจุบวกที่มีค่า pKa มากกว่า 10.0 (การทดลองดำเนินการที่พีเอช 10) ได้แก่ อาร์จินีน และ ไลซีน ซึ่งมีอยู่ภายในโครงสร้างเป็นจำนวนมาก [17] เข้าจับกับ side chain ของกรดอะมิโนอิสระที่มีประจุลบของไซลาเนสในสภาวะเป็นด่าง ทำให้ BSA ทำหน้าที่เป็นเสมือนฉนวนป้องกันความร้อนให้กับไซลาเนส ส่งผลให้ไซลาเนสคงทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น [18]

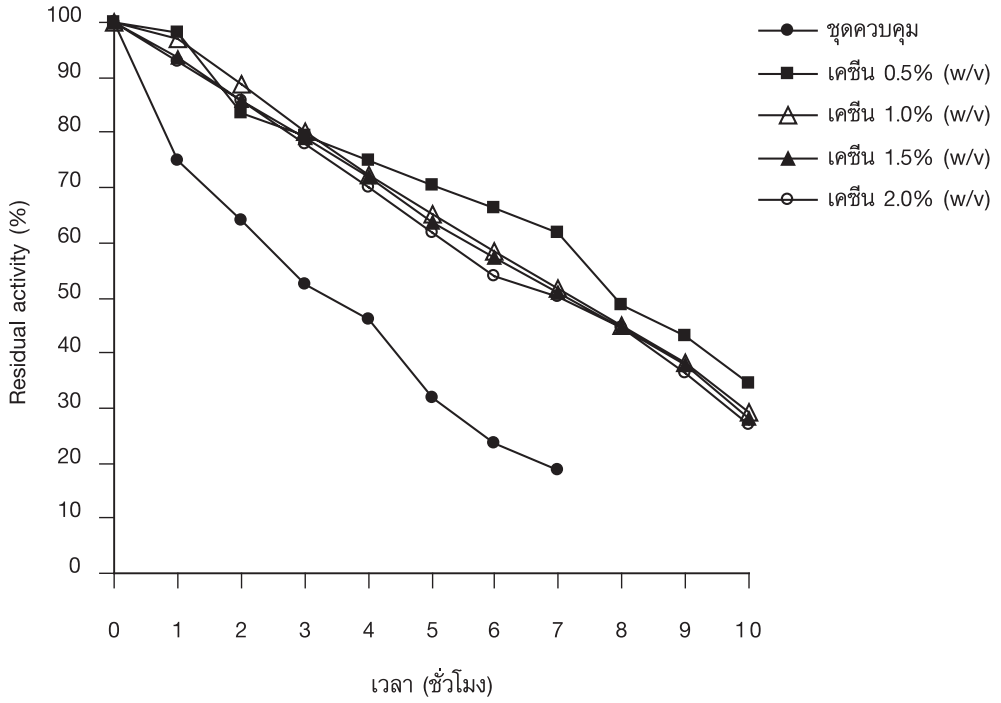


รูปที่ 2 ผลของ BSA ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 (w/v) ต่อเสถียรภาพของ crude xylanase ณ อุณหภูมิ 55 °ซ พีเอช 10.0

3.2.2 ผลของเคซีน

จากการศึกษาผลของเคซีน (Sigma-Aldrich Inc.) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 (w/v) ต่อกิจกรรมของไซลาเนส ที่ความเข้มข้น 0.148 มก. โปรตีน/มล. พบว่าเคซีนไม่ค่อยมีผลต่อกิจกรรมของไซลาเนส โดยมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (0.71 ถึง 0.73 ยูนิต/มล.) เมื่อความเข้มข้นของเคซีนเพิ่มขึ้น ขณะที่ชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.69 ยูนิต/มล. ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการเติม BSA

การศึกษาผลของเคซีนต่อเสถียรภาพของ crude xylanase พบว่าในทุกความเข้มข้นของเคซีนที่เติมช่วยให้เสถียรภาพของไซลาเนสเพิ่มขึ้น โดยมีค่าครึ่งชีวิตอยู่ในช่วง 7.3 ถึง 8.0 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 3.6 ชั่วโมง (รูปที่ 3) โดยที่ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 1.0 ถึง 2.0 (w/v) ให้ค่าเสถียรภาพที่ใกล้เคียงกัน และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) สามารถปรับปรุงให้ไซลาเนสมีเสถียรภาพดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่น โดยมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 8 ชั่วโมง ซึ่งมีค่ามากกว่าชุดควบคุม 2.2 เท่า สำหรับสาเหตุที่เสถียรภาพของไซลาเนสไม่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเคซีนมากกว่าร้อยละ 0.5 (w/v) นั้นน่าจะมีสาเหตุจากเคซีนที่มากเกินไปจะไปรบกวนพันธะเคมีในโครงสร้างของเอนไซม์ โดยเฉพาะส่วนที่เป็น catalytic site ผลของเคซีนต่อเสถียรภาพของไซลาเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhattacharyya และ Das [19] ที่พบว่าเคซีนสามารถรักษาเสถียรภาพของ *r*-crystallin โดยการเติม *r*-crystallin ต่อเคซีน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 (w/w) สามารถยับยั้งการตกตะกอนที่เกิดจากการรวมตัวกันของ *r*-crystallin ได้อย่างสมบูรณ์

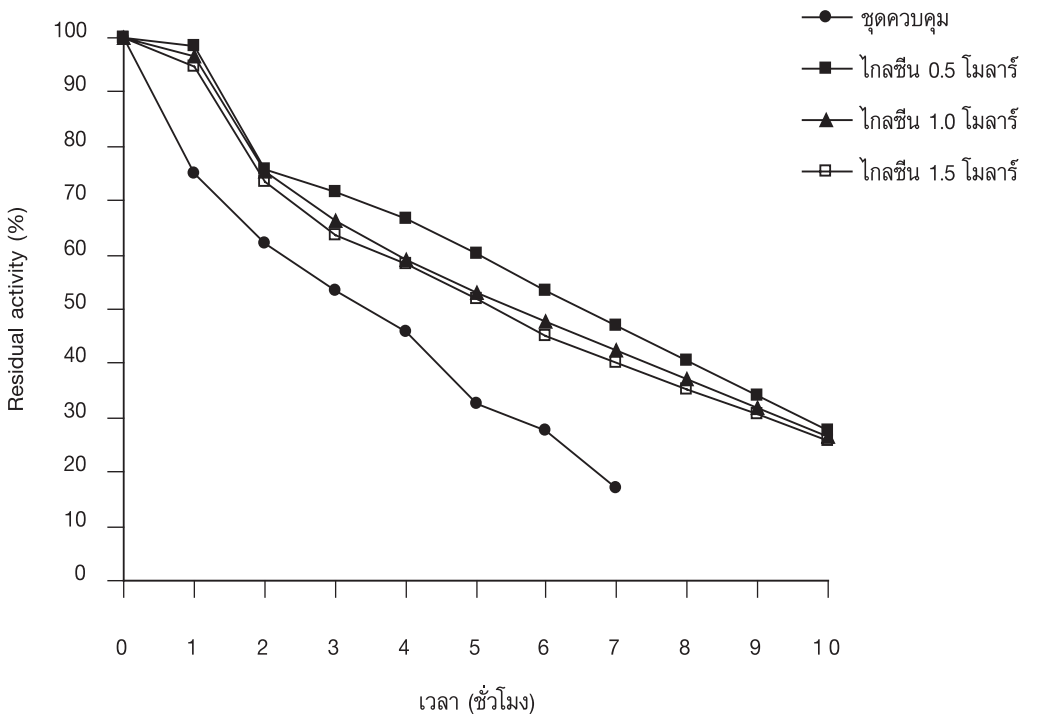


รูปที่ 3 ผลของเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 (w/v) ต่อเสถียรภาพของ crude xylanase ณ อุณหภูมิ 55 °ซ พีเอช 10.0

3.2.3 ผลของไกลซีน

การศึกษาผลของไกลซีน (Sigma-Aldrich Inc.) ในช่วงความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.5 โมลาร์ พบว่าความเข้มข้นของไกลซีนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่ากิจกรรมของไซลาเนสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.70 ถึง 0.72 ยูนิต/มล. ขณะที่กิจกรรมของชุดควบคุมเท่ากับ 0.69 ยูนิต/มล.

การศึกษาผลของไกลซีนในช่วงความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.5 โมลาร์ ต่อเสถียรภาพของไซลาเนส ที่ความเข้มข้น 0.148 มก. โปรตีน/มล. พบว่าทุกความเข้มข้นของไกลซีนช่วยเพิ่มเสถียรภาพของไซลาเนสได้มากกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าครึ่งชีวิตในช่วง 5.5 ถึง 7.0 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 3.6 ชั่วโมง การเติมไกลซีนที่มีความเข้มข้นที่มากเกินไปไม่ได้ช่วยให้เสถียรภาพของ crude xylanase เพิ่มขึ้น โดยไกลซีนที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้เสถียรภาพดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่น โดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่าชุดควบคุม 1.9 เท่า (รูปที่ 4) สำหรับสาเหตุที่เสถียรภาพของไซลาเนสไม่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไกลซีนมากกว่า 0.5 โมลาร์นั้นน่าจะมีสาเหตุจากไกลซีนที่มากเกินไปจะไปรบกวนพันธะเคมีใน catalytic site ของเอนไซม์



รูปที่ 4 ผลของไกลซีนความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.5 โมลาร์ ต่อเสถียรภาพของ crude xylanase ณ อุณหภูมิ 55 °ซ พีเอช 10.0

การรักษาเสถียรภาพของไซลาเนส ด้วยไกลซีนสอดคล้องกับรายงานของ Fukushima และคณะ [20] ที่พบว่า neutral amino acids ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของโปรตีน โดยมีหลักการเดียวกับน้ำตาล sugar alcohols และ carboxylic acids ที่มีขนาดระหว่าง 3-5 คาร์บอน ในการเป็น stabilizer โดยเพิ่มแรงตึงผิวของน้ำในระบบ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา preferential hydration ของโปรตีน กับส่วนที่เป็นตัวทำละลายในระบบ ทำให้โปรตีนมีเสถียรภาพเพิ่มขึ้น

4. สรุปผลการวิจัย

การปรับปรุงเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงของไซลาเนส ที่ผลิตจาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 สามารถทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ crude xylanase โปรตีน เช่น BSA และเคซีน และกรดอะมิโน เช่น ไกลซีน ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมช่วยปรับปรุงให้ crude xylanase มีเสถียรภาพเพิ่มขึ้น โดย BSA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (w/v) ช่วยให้ crude xylanase มีเสถียรภาพสูงสุด โดยค่าครึ่งชีวิตที่พีเอช 10 อุณหภูมิ 55 °ซ เพิ่มขึ้น จาก 3 ชั่วโมง เป็น 9.8 ชั่วโมง เสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้การนำไซลาเนสทนด่างจาก *Bacillus firmus* K-1 ไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายมากขึ้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรม กระดาษและสารซักล้าง ซึ่งเอนไซม์จะต้องสามารถทำงาน และมีเสถียรภาพที่ดีในพีเอชที่เป็นด่าง

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน หมวดเงินอุดหนุนการวิจัย ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ภายใต้โครงการความร่วมมือระหว่างไทยและญี่ปุ่น (NRCT-Osaka University)

6. เอกสารอ้างอิง

1. Henrissat, B., 1991, "A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities," *Biochemical Journal*, Vol. 280, pp. 309-316.

2. Tolan, J.S., 1996, "Pulp and Paper," In: Godfrey, T., and West, S. (eds.), *Industrial Enzymology*, Second edition, Macmillan Press, London, pp. 327-338.

3. Kung, Jr.,L., Cohen, M.A., Rode, L.M., and Treacher, R.J., 2002, "The Effect of Fibrolytic Enzymes Sprayed onto Forages and Fed in a Total Mixed Ratio to Lactating Dairy Cows," *Journal of Dairy Science,* Vol. 85, pp. 2396-2402.

4. Camacho N.A. and Aguilar O.G., 2003, "Production, Purification, and Characterization of a Low-Molecular-Mass Xylanase from *Aspergillus* sp. and Its Application in Baking," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 104, pp. 159-72.

5. Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P., 1993, "β-1,4-D-Xylan-Degrading Enzyme Systems: Biochemistry, Molecular Biology and Applications," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 17, pp. 259-289.

6. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., and Tanticharoen, M., 1999, "Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp. 690-697.

7. Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K., Tanticharoen, M., Ratanarojmongkol, T., and Chen, S.T., 2001, "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials and Kraft Pulps by Xylanolytic Enzymes from Alkaliphilic *Bacillus* sp. K-1," *Journal of the National Research Council of Thailand*, Vol. 33, pp. 39-54.

8. Berg, B., Hofstan, B.V., and Petterson, G., 1972, "Growth and Cellulase Formation by *Celluvibrio fulvus*," *Journal of Applied Bacterio-logy*, Vol. 35, pp. 201-214.

9. Leartslarus, C., Kyu K.L., and Ratanakhanokchai, K., 2004, "Extracellular Cellulase-Free Xylanase Production by Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 in Fermentor Using Corn Hull as a Carbon Source," *KMUTT Research and Development Journal*, Vol. 27, pp. 321-331.

10. Miller, G.L., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," Analytical Chemistry, Vol. 31, pp. 426-428.

11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, pp. 265-275.

12. Estrada-Mondaca, S. and Fournier, D., 1998, "Stabilization of Recombinant Drosophila Acethylcholinesterase," *Protein Expression and Purification*, Vol. 12, pp. 166-172.

13. Morgavi, D.P., Newbold, C.J., Beever, D.E., and Wallace, R.J., 2000, "Stability and Stabilization of Potential Feed Additive Enzymes in Rumen Fluid," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26, pp. 171-177.

14. Sjoholm, I. and Ljungstedt, I., 1973, "Studies on the Tryptophan and Drug-Binding Properties of Human Serum Albumin Fragments by Affinity Chromatography and Circular Dichroism Measurements," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 248, pp. 8434-8441.

15. Reed, R.G., Feldhoff, R.C., Clute, O.L., and Peters, Jr.T., 1975, "Fragments of Bovine Serum Albumin Produced by Limited Proteolysis. Comformation and Ligand Binding," *Biochemistry*, Vol. 13, pp. 4578-4583.

16. He, X.M. and Carter, D.C., 1992, "Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin," *Nature*, Vol. 358, pp. 209-214.

17. Poole, S., West, S.I., and Fry, J.C., 1986,

"Lipid-Tolerant Proteins on the Denaturation and Heat-Gelation of Acidic Proteins," Food Hydrocolloids, Vol. 1, pp. 301-316.

18. Peters, T.J., 1985, "Serum Albumin," *Advances in Protein Chemisty*, Vol. 37, pp. 161-245.

19. Bhattacharyya, J. and Das, K.P., 1999, "Molecular Chaperone-Like Properties of an Unfolded Protein, as-Casein," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, pp. 15505-15509.

20. Fukushima, T. and Matsunaga, T., 1981, "Process for Heat Treatment of Aqueous Solution Containing Human Blood Coagulation Factor XIII," *European Patent*, Patent number EP0037078.