ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ไกลคอซิเดสจากดอกเห็ดหลินจือ
ชื่อผู้เขียน	นาย สุขสรรค์ ตันสิริ
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ดร. ดารารัตน์ ทองขาว ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล กรรมการ
	ผศ. ดร. ศิริรัตน์ สาระเวก กรรมการ

บทคัดย่อ

เมื่อนำดอกเห็ดหลินจือสดอายุ 2 สัปดาห์มาสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เกลือ ในอัตราส่วน 1:5 กรัม/มล. แล้วนำสิ่งสกัดที่ได้ไปศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์อัลฟากาแลคโตซิเดสและบีตากลูโคซิเดส พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 70 °C และ 50 °C ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพดีในช่วงพีเอช 3.0-8.0 และ 4.0-6.0 และการทำงานลดลงครึ่งหนึ่งเมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 78 และ 62 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่าคงที่ไมเคลิสของเอนไซม์ทั้งสองเท่ากับ 0.69-0.74 และ 0.27-0.37 มิลลิโมลาร์ ไอออนของปรอท เงิน แคดเมียม เหล็ก และกาแลคโทสยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของอัลฟากาแลคโตซิเดส ในขณะที่ไอออนของปรอท เงิน และกลูโคสยับยั้งบีตากลูโคซิเดส นอกจากนี้เอนไซม์ทั้งสองยังสามารถเร่งปฏิกิริยาถ่ายโอนหมู่ไกลคอซิลทำให้สังเคราะห์ออลิโกแซคคาไรด์ได้ 2 และ 1 ชนิด ตามลำดับ

จากการศึกษากระบวนการทำเอนไซม์บีตา-เอน-อะเซทิลกลูโคซามินิเดสในสิ่งสกัดจากดอกเห็ดหลินจือให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของ DEAE-Sephadex A-50, Sephacryl S-200 HR และ ConA-Sepharose เปรียบเทียบกับเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิสแบบผลิตสาร พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 26 และ529 เท่า ผลผลิต 3 และ 24 % ตามลำดับ SDS-PAGE ของเอนไซม์บริสุทธิ์มีโปรตีนสองแถบซึ่งมีขนาด 72,000 และ 57,000 ดาลตัน พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของบีตา-เอน-อะเซทิลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์เท่ากับ 5.5 และ 70 °C เอนไซม์มีเสถียรภาพดีในช่วงพีเอช 4.5-9.5 และทำงานลดลงครึ่งหนึ่งเมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไอออนของปรอท กลูโคซามีน และเอน-อะเซทิลกลูโคซามีน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ค่าคงที่ไมเคลิสเท่ากับ 0.43 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้พาราไนโตรเฟนิล-เอ็น-อะเซติล-บีตา-ดี-กลูโคซามิไนด์เป็นสับสเตรต ความเร็วสูงสุดในการเร่งปฏิกิริยา 1.43 มิลลิโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาถ่ายโอนหมู่ไกลคอซิลเมื่อใช้สับสเตรตดังกล่าวชนิดเดียว

Thesis Title	Characteristics of Glycosidases from Ling-Zhi Mushroom (*Ganoderma lucidum*)
Author	Mr. Suksun Tansiri
M. S.	Biotechnology
Examining Committee	Dr. Dararat Tongkao — Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul — Member
	Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek — Member

Abstract

Ling-Zhi mushroom fruiting bodies of two weeks were extracted by phosphate buffer saline at 1:5 g/ml and the crude extract were investigated for some characteristics of α-Galactosidase and β-Glucosidase. The enzymes had optimal activities at pH 6.0 and temperatures of 70°C and 50 °C respectively. The enzyme activities were stable at pH 3.0-8.0 and 4.0-6.0 and half of the activities remained at 78 and 62 °C for one hour. The K_m values were 0.69-0.74 and 0.29-0.37 mM. The α-Galactosidase activity was inhibited by Hg^{2+}, Ag^{+}, Fe^{3+}, Cd^{2+} and galactose. The β-Glucosidase activity was inhibited by Hg^{2+}, Ag^{+} and glucose. In addition, the enzymes catalyzed the glycosyl transfer reaction and showed two and one types of oligosaccharide synthesis, respectively.

β - N – acetylglucosaminidase in the mushroom crude extract was purified by chromatography on DEAE-Sephadex A-50, Sephacryl S-200 HR and ConA-Sepharose in comparison with preparative electrophoresis. The enzyme purities were 26 and 529 folds and the yields were 3 and 24 % respectively. SDS-PAGE of the purified enzyme showed two bands of molecular weights 72,000 and 57,000 daltons. The optimal pH and temperature of the enzyme activity were 5.0 and 70 °C respectively. The enzyme was stable at pH 4.5-9.5 and half of the enzyme activity remained at 60 °C for one hour. The enzyme was inhibited by Hg^{2+}, glucosamine and N-acetylglucosamine. K_m and V_{max} of the purified enzyme were 0.65 mM and 1.43 mmol/min/mg protein for p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide. The enzyme seemed not to catalyze a transglycosylation reaction utilized the substrate as both the donor and acceptor.