บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 และการเตรียมบีตา-ไซโลสิเดส

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อผลิตบีตา-ไซโลสิเดส ตามวิธีการในข้อ 2.3.1 รวมทั้งการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 2.3.2 พบว่า *Streptomyces* sp. CH7 สามารถผลิตบีตา-ไซโลสิเดสได้อยู่ในช่วงประมาณ 1.0-1.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขั้นตอนต่อไปจึงได้ศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์

3.2 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์

3.2.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่เตรียมได้มาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตตามลำดับคือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60 และ 60-70 เปอร์เซ็นต์ นำโปรตีนที่ได้ในแต่ละลำดับส่วนไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส พบว่ามีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสครอบคลุมอยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-50, 50-60 และ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ดังผลการทดลองในตารางที่ 3.1 ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไปจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-70 เปอร์เซ็นต์ ในการตกตะกอนบีตา-ไซโลสิเดส

ตารางที่ 3.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลสิเดส

ลำดับส่วนของแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์แอคติวิตี (เปอร์เซ็นต์)
สารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น	110.00	93.00	1.18	100.00
0-20	0.88	2.31	0.38	0.80
20-30	0.80	2.12	0.38	0.73
30-40	0.69	2.53	0.27	0.63
40-50	8.33	8.67	0.96	7.57
50-60	28.31	20.11	1.41	25.74
60-70	9.45	11.60	0.81	8.59

3.2.2 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 ตามวิธีการในข้อ 2.3.1.1 โดยขยายขนาดให้ได้ปริมาตรรวม 900 มิลลิลิตร ปั่นแยกไมซีเลียมและสกัดแยกบีตา-ไซโลสิเดส ตามวิธีการในข้อ 2.3.1.2 ผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าได้แอคติวิตีรวมทั้งหมด 616.88 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 468.60 มิลลิกรัม และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.32 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-70 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 2.25 เท่า เมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 49.30 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

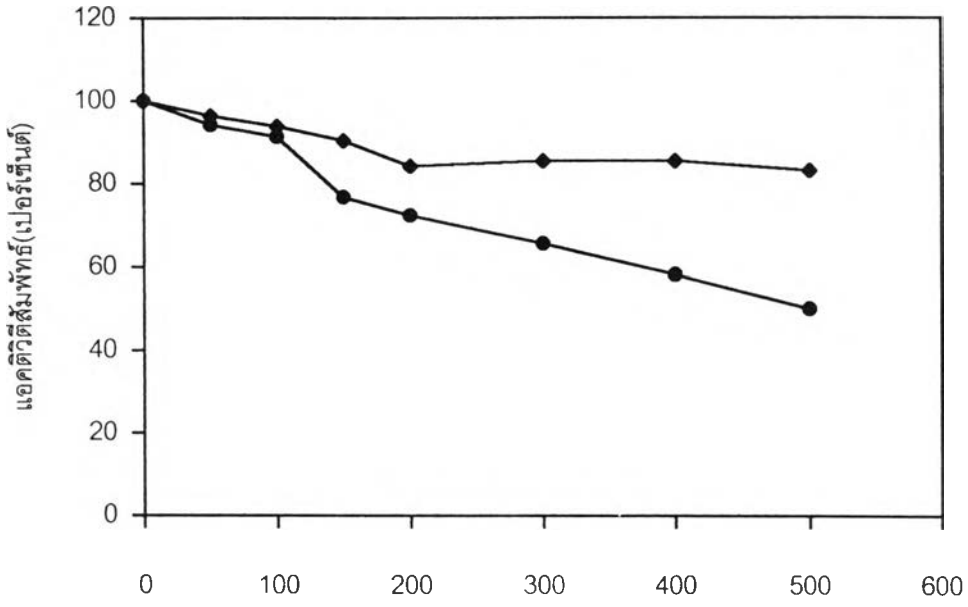
3.2.3 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.2.2.1 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีนั้นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchanger) เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ในขั้นตอนนี้ต้องใช้เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นสารละลายในการชะโปรตีน การทดลองนี้จึงจะศึกษาผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส เพื่อเลือกชนิดของเกลือที่เหมาะสมมาใช้เป็นสารละลายในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์

จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสปริมาณเท่าๆกันบ่มกับสับสเตรทและโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.1 พบว่าทั้งโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 มิลลิโมลาร์ มีผลเพียงเล็กน้อยแต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากขึ้น พบว่าโซเดียมคลอไรด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากกว่าโพแทสเซียมคลอไรด์โดยที่ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ยับยั้งแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสได้เท่ากับ 50 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ดังนั้นในการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนจะเลือกใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์



รูปที่ 3.1 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

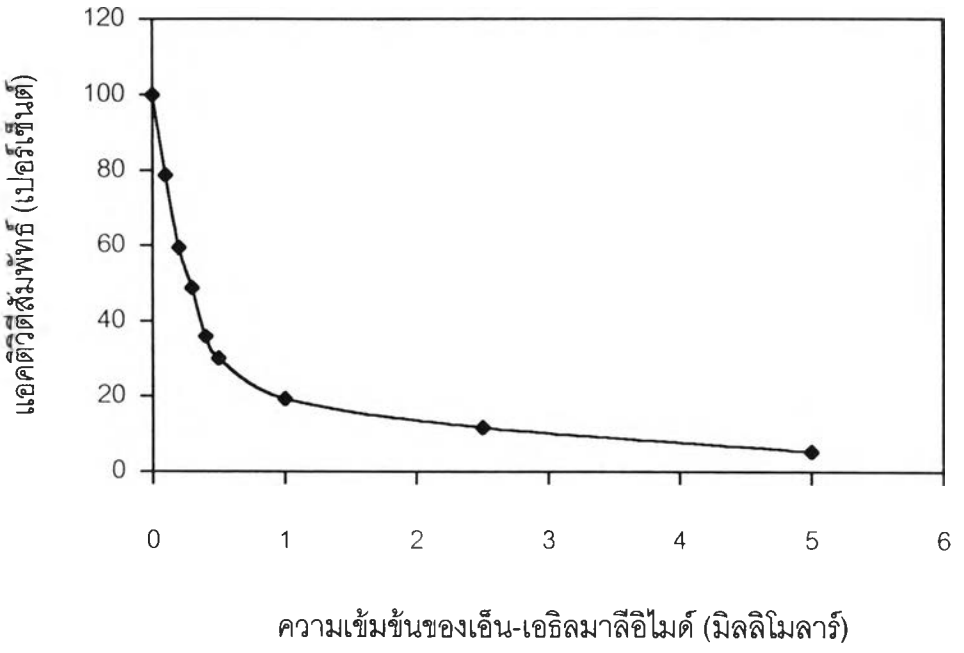
—◆— โพแทสเซียมคลอไรด์

—●— โซเดียมคลอไรด์

3.2.2.2 ผลของ เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

ในการสกัดแยกบีตา-ไซโลสิเดสออกจากเซลล์และในขั้นตอนการศึกษาแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์นี้พบปัญหาเกี่ยวกับความไม่เสถียรของเอนไซม์ในระหว่างการทดลอง ซึ่งคาดว่าหมู่ active site ของเอนไซม์ดังกล่าวอาจประกอบไปด้วยหมู่ไธออล (thiol, -SH group) ซึ่งจะสูญเสียประสิทธิภาพได้ง่ายโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทดสอบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีหมู่ไธออล เป็น active site หรือไม่ จึงได้นำเอนไซม์มาบ่มกับสารประกอบ sulfhydryl agent คือ เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide) ซึ่งทำหน้าที่เอธิลเลท (ethylate) หมู่ไธออล (Voet และ Voet, 1990)

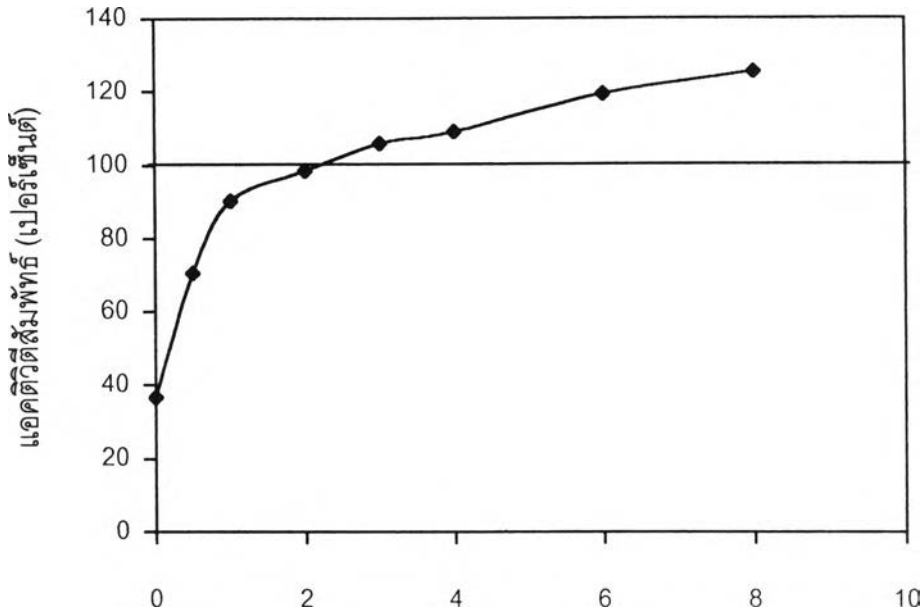
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.2 ซึ่งได้จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสในปริมาณเท่าๆกัน มาบ่มในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่เหลืออยู่ พบว่า เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์มากขึ้น จะสามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสได้มากขึ้นด้วย โดยที่ความเข้มข้นเพียง 1 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3.2 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

3.2.3.3 ผลของ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล ในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์

เพื่อยืนยันว่าบีตา-ไซโลสิเดสมี active site เป็น หมู่ไธออลจริง จึงได้นำเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์มาเติม 2-เมอร์แคบโตเอธานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบความสามารถในการกลับคืนของหมู่ไธออล ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.2 ที่ได้จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสในปริมาณเท่าๆกันมาบ่มกับเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติม 2-เมอร์แคบโตเอธานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-8 มิลลิโมลาร์ พบว่า 2-เมอร์แคบโตเอธานอลสามารถกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ได้ โดยเมื่อใช้ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์สามารถกลับคืนแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ 105.80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ นอกจากจะสามารถกลับคืนแอคติวิตีของเอนไซม์แล้วยังเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้มากถึง 125.40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับบีตา-ไซโลสิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์



กำหนดให้แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส ที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 3.3 ผลของ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์

3.2.3.4 ผลของ 2-เมอร์แคปโตเอธานอลต่อแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส

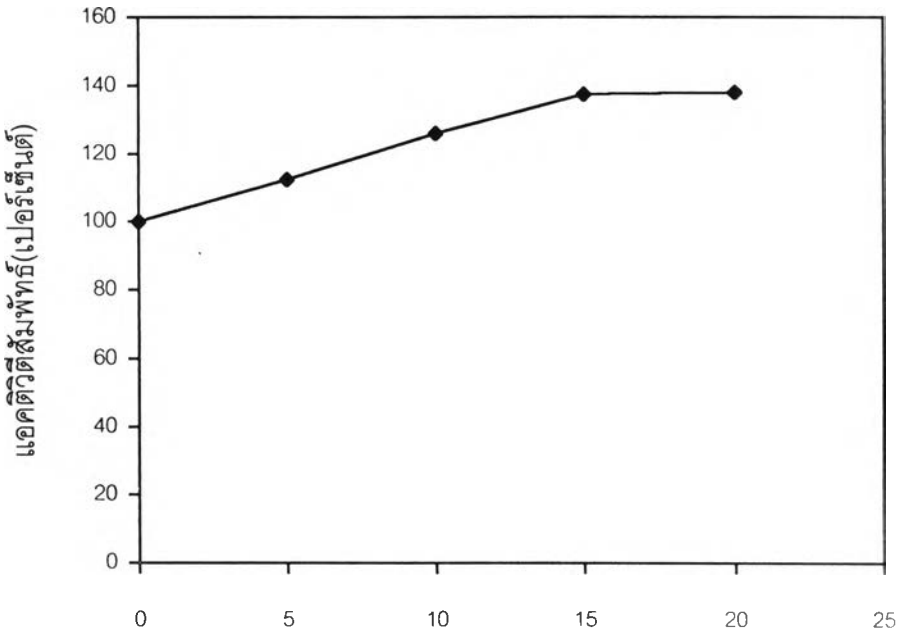
จากผลการทดลองที่ 3.2.3.2 และ 3.2.3.3 พบว่า บีตา-ไซโลสิเดสมีหมู่ไธออลเป็นหมู่ active site ซึ่งหมู่นี้ไวต่ออากาศ ดังนั้นเพื่อป้องกันการถูกออกซิไดส์ด้วยอากาศ จึงจะใช้สารประกอบ 2-เมอร์แคปโตเอธานอลซึ่งเป็นสารรีดิวส์ (reducer) เป็นตัวช่วยรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ การทดลองนี้จึงจะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล ต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์

จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสในปริมาณเท่าๆกันมาบ่มใน 2-เมอร์แคปโตเอธานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-20 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส ผลการทดลองในรูปที่ 3.4 พบว่า 2-เมอร์แคปโตเอธานอล ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อๆไปจะเติม 2-เมอร์แคปโตเอธานอลความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ในบัฟเฟอร์ที่ใช้กับบีตา-ไซโลสิเดส

3.2.3.5 โครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

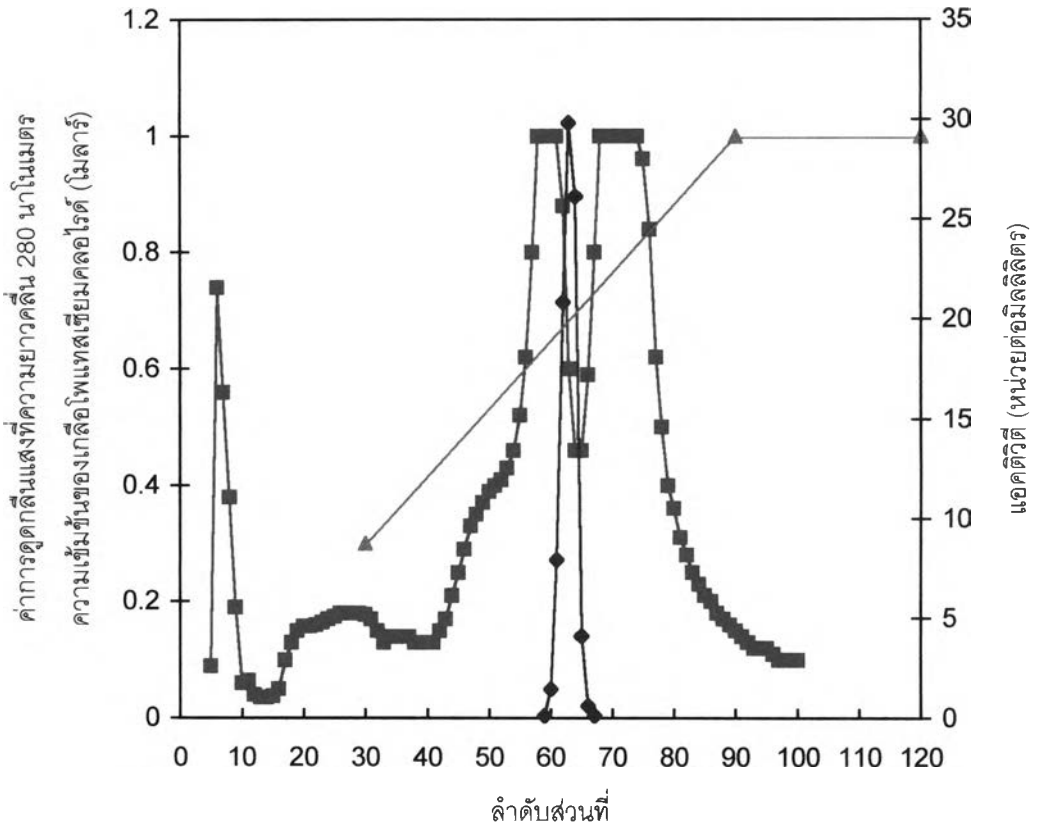
3.2.3.5.1 โครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 1

นำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-70 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นปริมาณโปรตีน 102.78 มิลลิกรัม ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล และผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการ reverse dialyze ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ (Anion exchanger) ดังวิธีการในข้อ 2.3.4.3.5 พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางชนิดนี้ ดังนั้นจึงสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไปได้ และยังสามารถกำจัดโปรตีนที่มีประจุต่างกับเอนไซม์มากๆออกไปโดยการชะด้วยเกรเดียนท์ของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3-1.0 โมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 3.5 พบว่า บีตา-ไซโลสิเดส ถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 60-68 ซึ่งมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.63-0.75 โมลาร์ เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้นแล้ว วัดปริมาตรรวมได้ 7.8 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 276.88 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 31.33 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 8.83 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.71 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 44.88 เปอร์เซ็นต์



กำหนดให้แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ไม่ใส่ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 3.4 ผลของ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลต่อแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส



รูปที่ 3.5 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)

แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

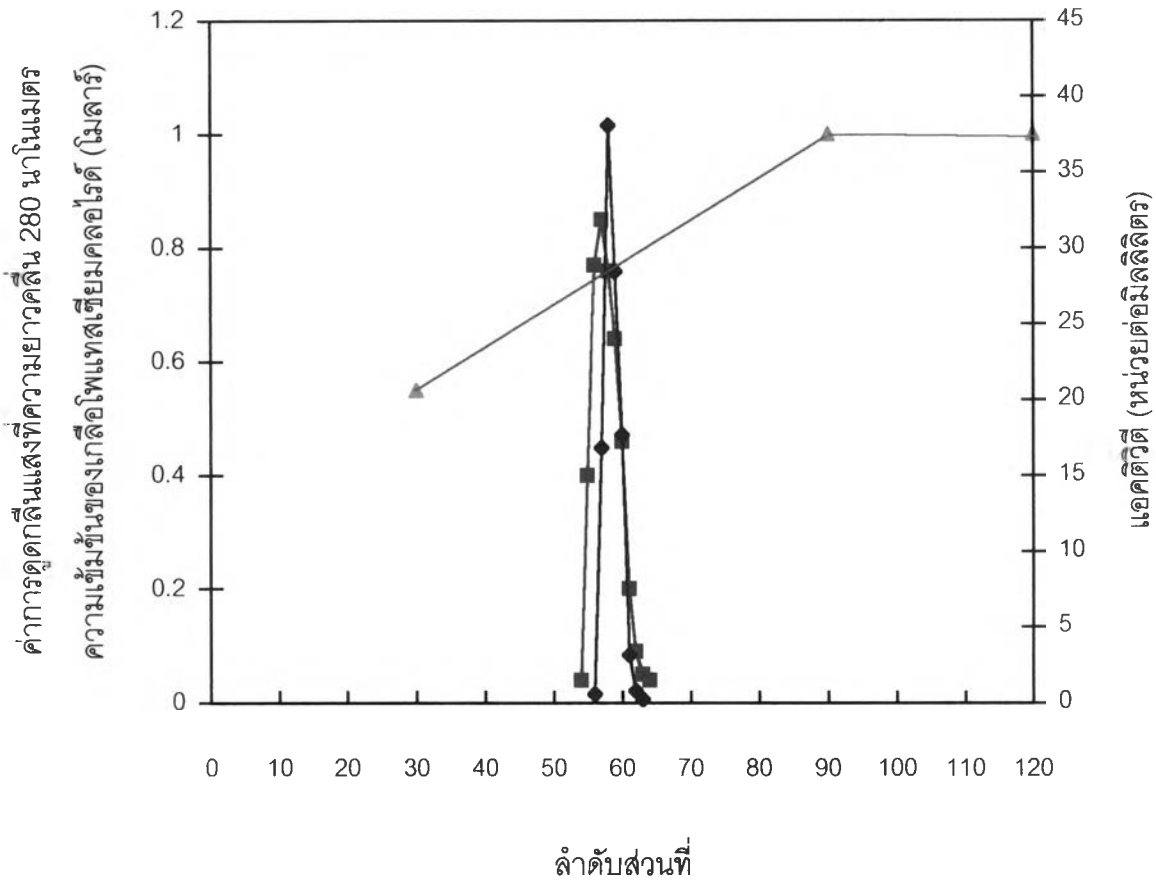
3.2.3.5.2 โครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 2

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 1 คิดเป็นปริมาณโปรตีน 31.33 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านลงในดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 2 กำจัดโปรตีนที่มีประจุใกล้เคียงกับเอนไซม์ออกโดยการชะด้วยเกรเดียนท์ของโพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความชันลดลงโดยใช้ที่ความเข้มข้น 0.55-1.00 โมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 3.6 พบว่าบีตา-ไซโลสิเดส ถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 57-61 ซึ่งมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.74-0.79 โมลาร์ เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้นแล้ว วัดปริมาตรรวมได้ 5.4 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 211.19 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 21.97 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 9.61 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.30 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 34.23 เปอร์เซ็นต์

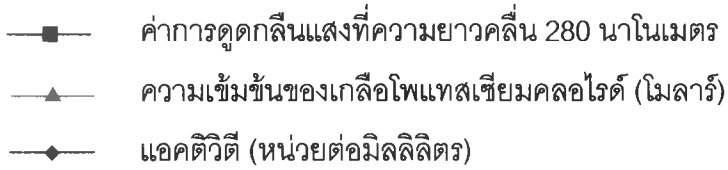
3.2.3.5.3 โครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200

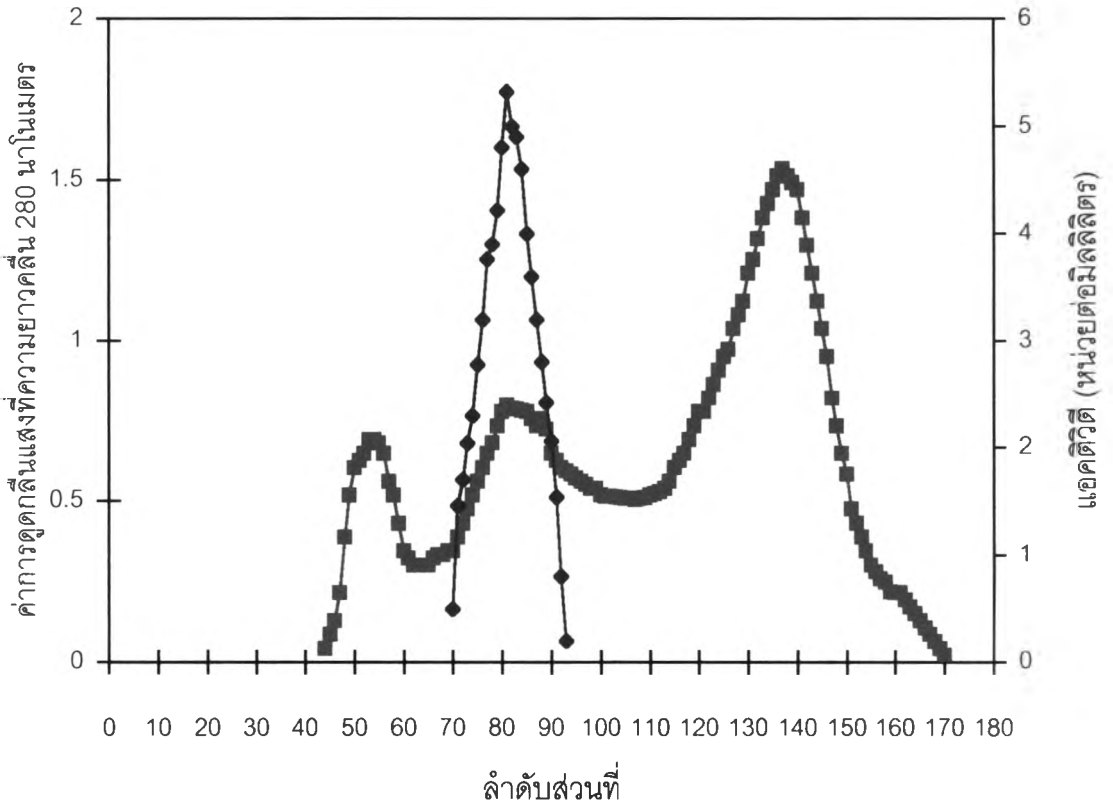
นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล ครั้งที่ 2 คิดเป็นปริมาณโปรตีน 21.97 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ผลการทดลองในรูปที่ 3.7 พบว่าบีตา-ไซโลสิเดสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 71-91 เมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกันวัดแอคติวิตีรวมได้ 185.00 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 15.12 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 12.24 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.23 เท่า และยังคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 29.99 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนและผลการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 3.2



รูปที่ 3.6 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 2





รูปที่ 3.7 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

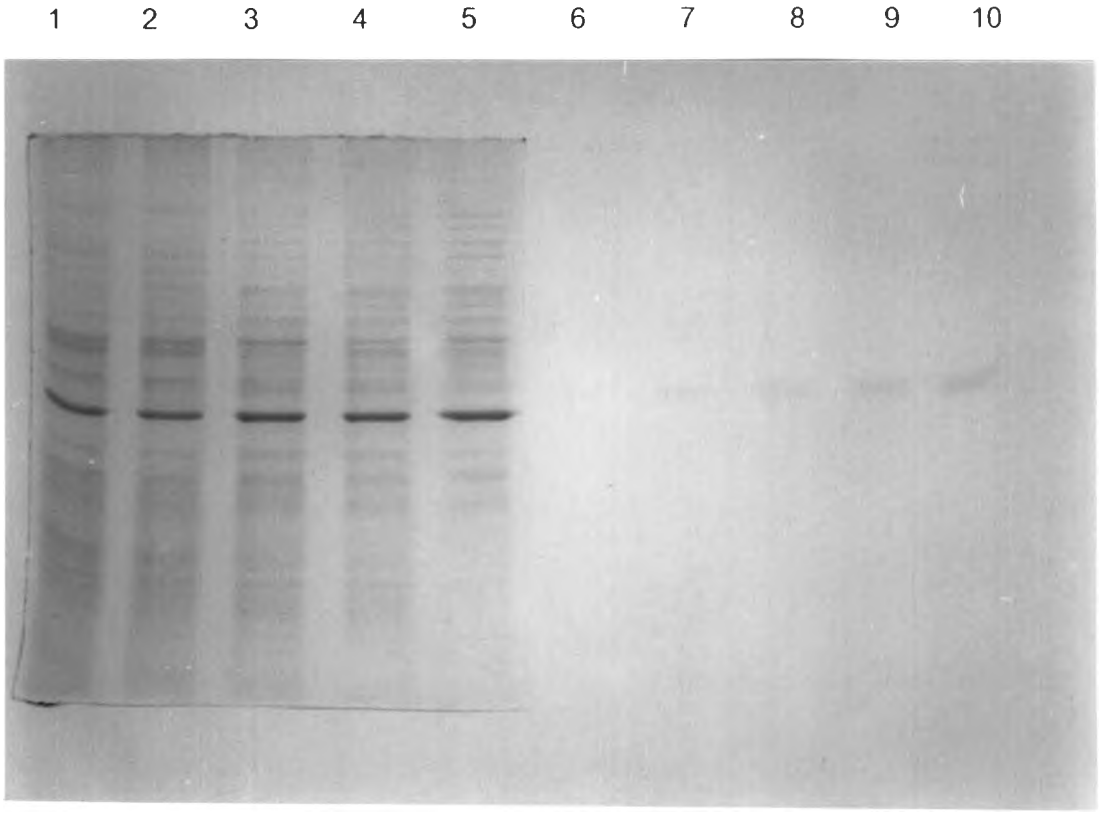
ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก. โปรตีน)	แอคติวิตี (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดเอนไซม์	220.0	616.88	468.60	1.32	100.00	1.00
ตกตะกอนด้วย 40-70 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต	12.0	304.13	102.78	2.96	49.30	2.25
ดีอีเออี ไบโอ-เจล อะกาโรส ครั้งที่1	7.8	276.88	31.33	8.83	44.88	6.71
ดีอีเออี ไบโอ-เจล อะกาโรส ครั้งที่2	5.4	211.19	21.97	9.61	34.23	7.30
เซฟาเด็กซ์ จี 200	3.4	185.00	15.12	12.24	29.99	9.23

3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส จากนั้นตัดแผ่นเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปย้อมสีโปรตีน (Dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู อีกส่วนหนึ่งนำไปย้อมแอคติวิตี (Activity staining) โดยใช้ 2.5 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.8 จากการย้อมด้วยสีคูแมสซี บลู พบว่า บีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนนั้นยังคงมีแถบโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมาก และถึงแม้จะผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาหลายขั้นตอนก็ยังไม่สามารถลดจำนวนแถบโปรตีนลงให้เหลือเพียงแถบเดียว ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนใดเป็นบีตา-ไซโลสิเดส จึงได้นำเจลส่วนที่ย้อมแอคติวิตีมาเปรียบเทียบโดยแถบสีเหลืองจะแสดงแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ แล้วได้พารา-ไนโตรฟีนอล ซึ่งเป็นสารสีเหลือง ผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนที่แสดงแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสไม่ใช่แถบโปรตีนหลัก (major protein) ซึ่งให้แถบสีน้ำเงินเข้ม

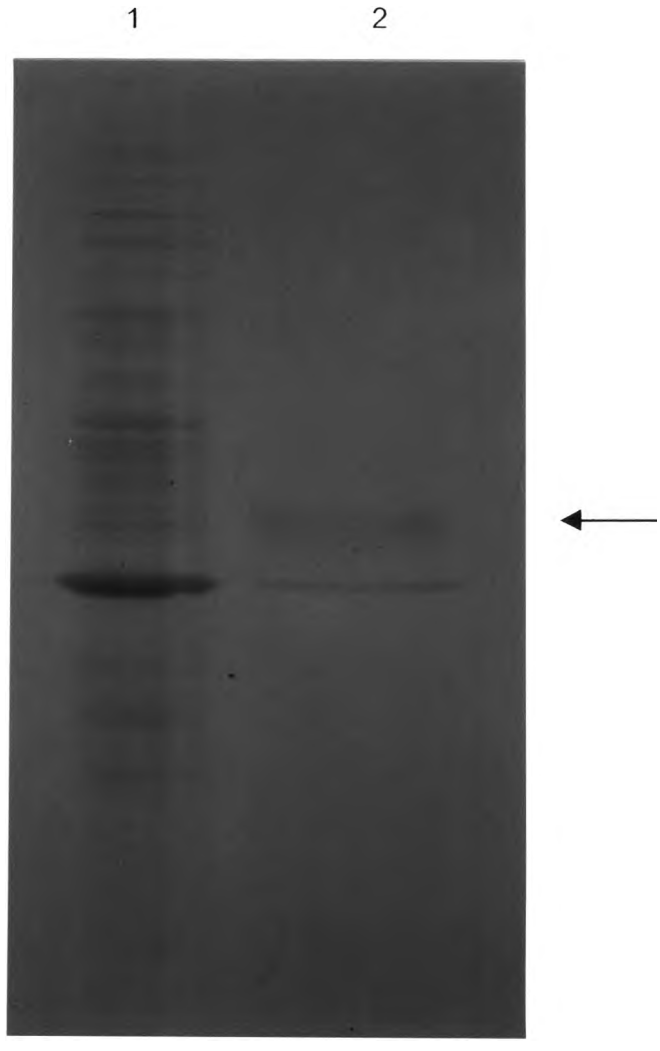
จากนั้นได้พยายามทำเอนไซม์นี้ให้บริสุทธิ์เพื่อให้ถึงระดับโปรตีนเดี่ยว (homogeneity) โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะนำตัวอย่างไปใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส จึงนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเซฟาเด็กซ์ จี-200 มาทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสแล้วย้อมแอคติวิตี ตัดเจลเฉพาะแถบสีเหลือง ชะโปรตีนออกมาและทำให้เข้มข้นโดยการปั่นเหวี่ยงใน concentrator tube ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ดังแสดงในรูปที่ 3.9 พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยแสดงแถบหนาของเอนไซม์ 1 แถบ แต่ก็ยังมีแถบของโปรตีนหลักปนเปื้อนอยู่เล็กน้อย



รูปที่ 3.8 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ

แถวที่ 1-5 ย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูแมสซี บลู
แถวที่ 6-10 ย้อมแอคติวิตีด้วยพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์
(ปริมาณโปรตีนที่ใช้ 6 ไมโครกรัม ทุกตัวอย่าง)

แถวที่ 1,6 สารสกัดเอนไซม์
แถวที่ 2,7 เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 40-70 เปอร์เซ็นต์
แถวที่ 3,8 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 1
แถวที่ 4,9 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 2
แถวที่ 5,10 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200



รูปที่ 3.9 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 และที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการย้อมแอคติวิตี

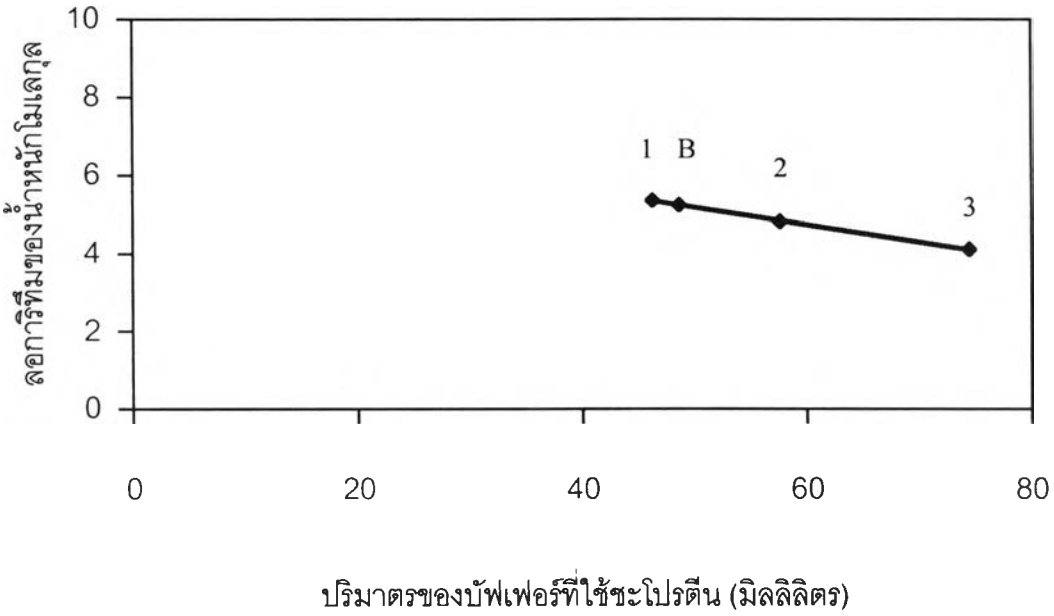
แถวที่ 1 เอนไซม์ที่ผ่าน คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 (ปริมาณโปรตีน 6 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจล (ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม)
ย้อมด้วยสีคูแมสซี บลู

3.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส

3.4.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสโดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

การทดลองนี้ได้หาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยใช้โปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ได้แก่ คะตะเลส โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และ ไซโตโครม ซี ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 232,000, 66,000 และ 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ เป็นโปรตีนมาตรฐาน ผ่านโปรตีนเหล่านี้ลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกันและภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์ ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 2.3.4.3.6 และ 2.3.6.1 ติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ได้ผลดังรูปที่ 3.10 จากกราฟดังกล่าวพบว่า บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 183,000 ดาลตัน



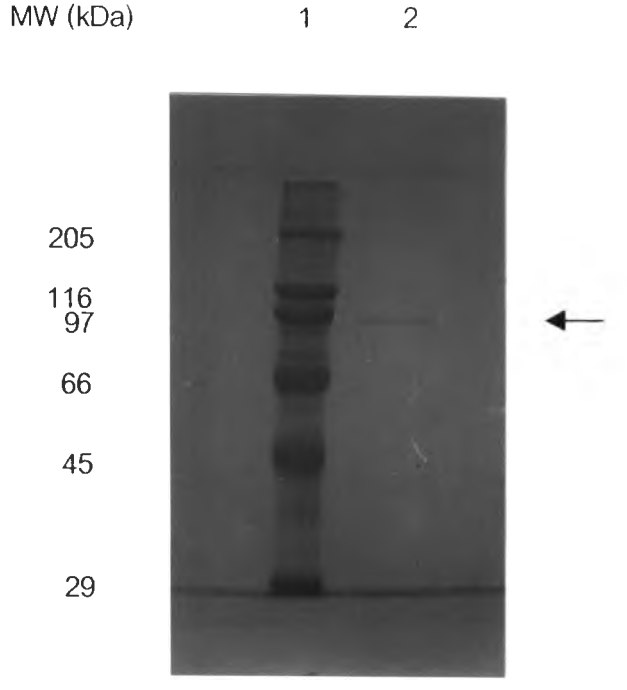
รูปที่ 3.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

1. คะตะเลส	น้ำหนักโมเลกุล	232,000	ดาลตัน
2. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	น้ำหนักโมเลกุล	66,000	ดาลตัน
3. ไซโตโครม ซี	น้ำหนักโมเลกุล	13,237	ดาลตัน

B คือ บีตา-ไซโลสิเดส

3.4.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล

จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสและติดตามด้วยการย้อมแอคติวิตีแล้วแยกออกจากเจล มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.11 พบว่าบีตา-ไซโลสิเดสให้แถบโปรตีนเด่นชัดเพียงแถบเดียว และจากการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล แสดงดังรูปที่ 3.12 พบว่า แถบโปรตีนเด่นชัดนี้ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 93,000 ดาลตัน และเมื่อประเมินร่วมกับผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันซึ่งมีค่าประมาณ 183,000 ดาลตัน จึงคาดว่า บีตา-ไซโลสิเดสประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 93,000 ดาลตัน ซึ่งจะให้น้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 186,000 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน



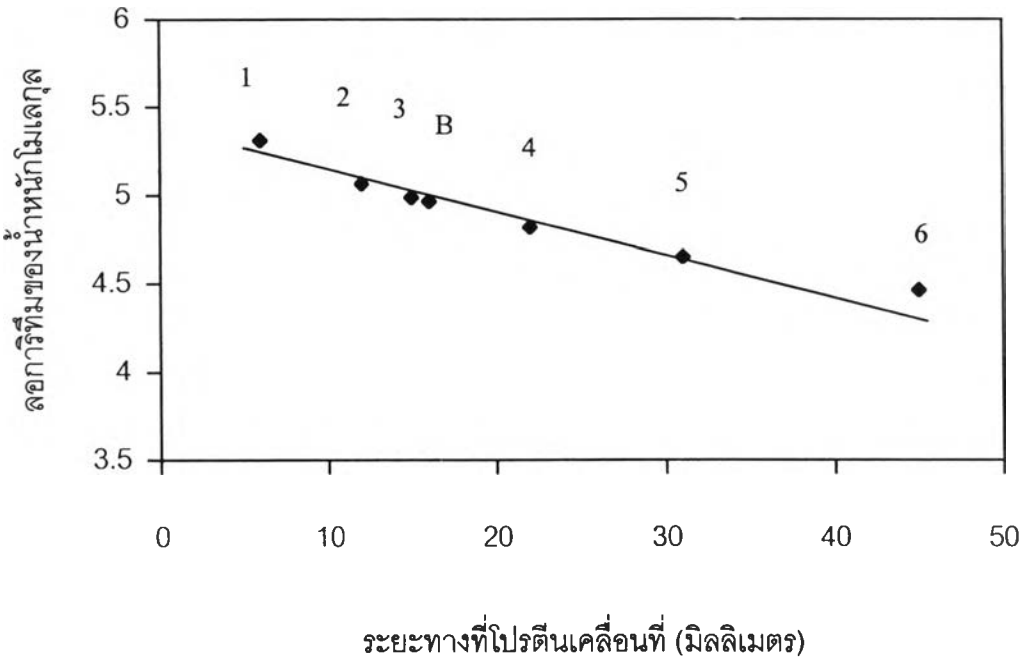
รูปที่ 3.11 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง

แถวที่ 2 บีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำอีเลคโทรโฟริซิส (1 ไมโครกรัม)

โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูงได้แก่

ไมโอซิน (Myosin)	น้ำหนักโมเลกุล	205	กิโลดาลตัน
บีตา-กาแลคโตสิเดส (β-Galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล	116	กิโลดาลตัน
ฟอสฟอริเลสบี (Phosphorylase b)	น้ำหนักโมเลกุล	97	กิโลดาลตัน
อัลบูมินจากไข่ (Albumin, egg)	น้ำหนักโมเลกุล	66	กิโลดาลตัน
อัลบูมินจากโบไวน์ (Albumin, bovine)	น้ำหนักโมเลกุล	45	กิโลดาลตัน
คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล	29	กิโลดาลตัน



รูปที่ 3.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

1. ไมโอซิน (Myosin)	น้ำหนักโมเลกุล	205	กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลคโตสิเดส (β-Galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล	116	กิโลดาลตัน
3. ฟอสฟอริเลสบี (Phosphorylase b)	น้ำหนักโมเลกุล	97	กิโลดาลตัน
4. อัลบูมินจากไข่ (Albumin, egg)	น้ำหนักโมเลกุล	66	กิโลดาลตัน
5. อัลบูมินจากโบไวน์ (Albumin, bovine)	น้ำหนักโมเลกุล	45	กิโลดาลตัน
6. คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล	29	กิโลดาลตัน

B คือ บีตา-ไซโลสิเดส

3.5 **การศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสจาก** *Streptomyces* sp. CH7

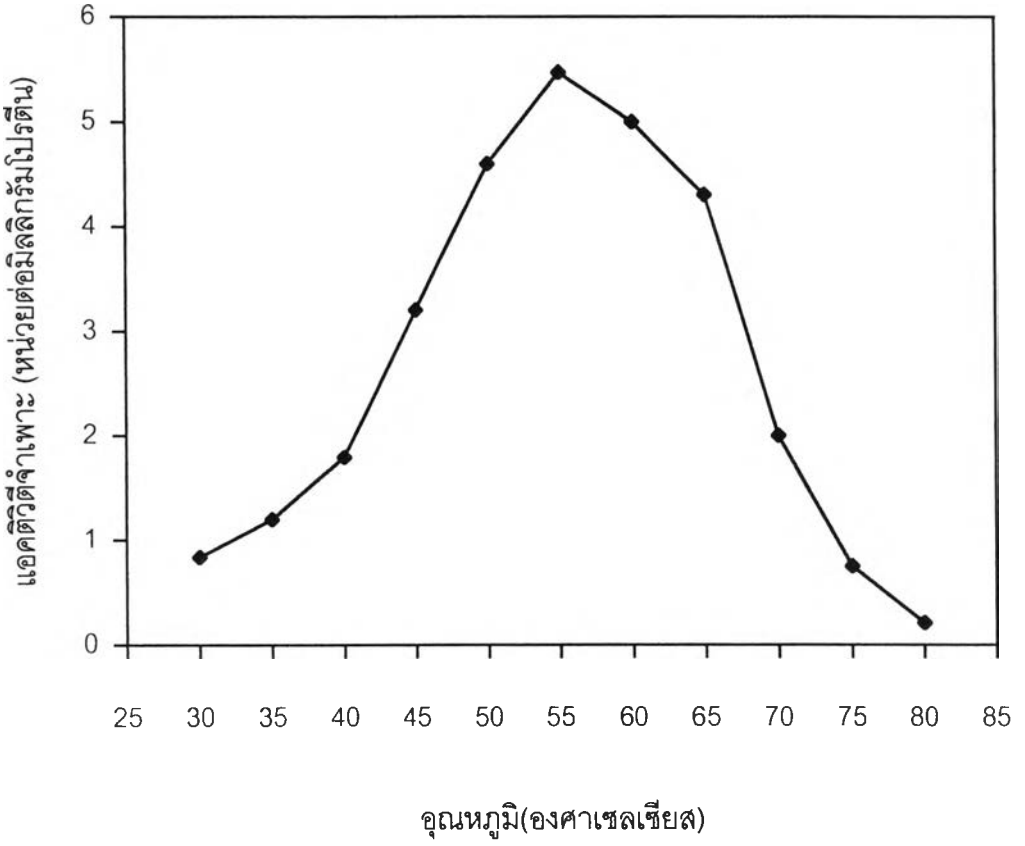
นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่างๆดังต่อไปนี้

3.5.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

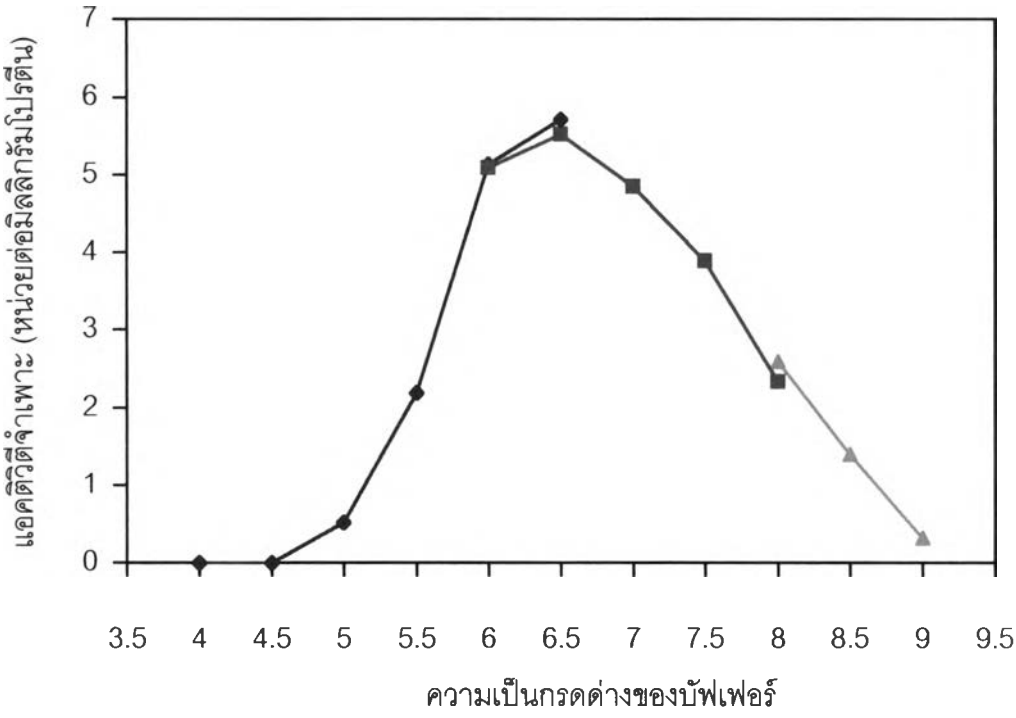
จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณเท่าๆกัน มาหาแอคติวิตีโดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังรูปที่ 3.13

3.5.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

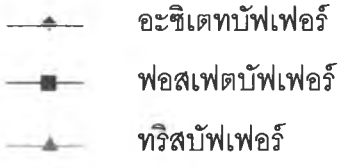
จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส ในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.14 พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 6.0-7.0 โดยที่ pH 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นี้



รูปที่ 3.13 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ บีตา-ไซโลสิเดส



รูปที่ 3.14 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

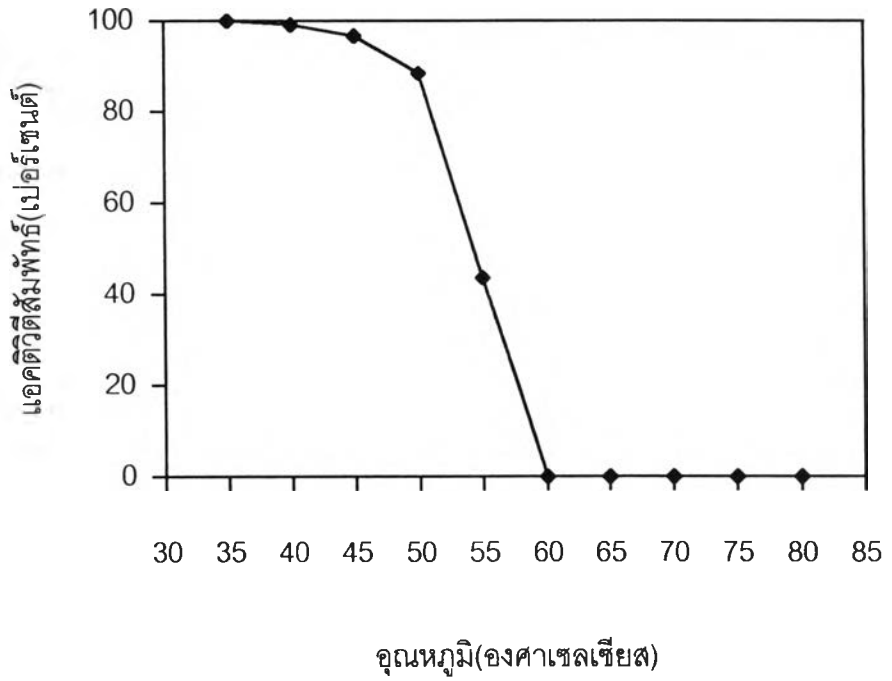


3.5.3 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่ออุณหภูมิ

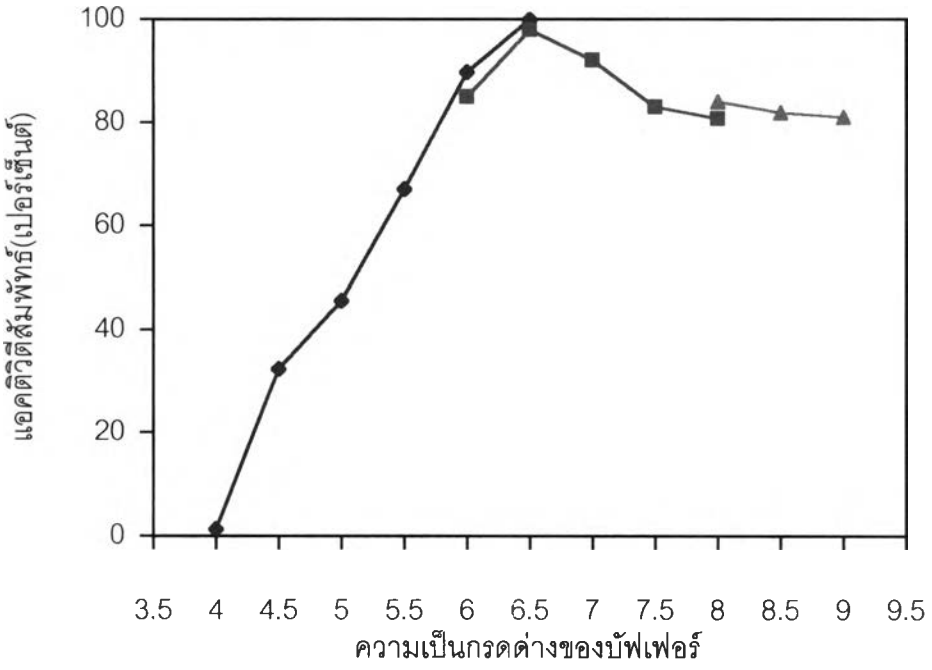
นำบีตา-ไซโลสิเดสมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 35-80 องศาเซลเซียส บ่มนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.15 พบว่าบีตา-ไซโลสิเดสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงที่ 60 องศาเซลเซียส

3.5.4 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

เมื่อนำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงสูงคือตั้งแต่ 6.0-9.0 แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6.0 ลงมาเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 ดังรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.15 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่ออุณหภูมิ



รูปที่ 3.16 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

อะซิเตทบัฟเฟอร์

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ทริสบัฟเฟอร์

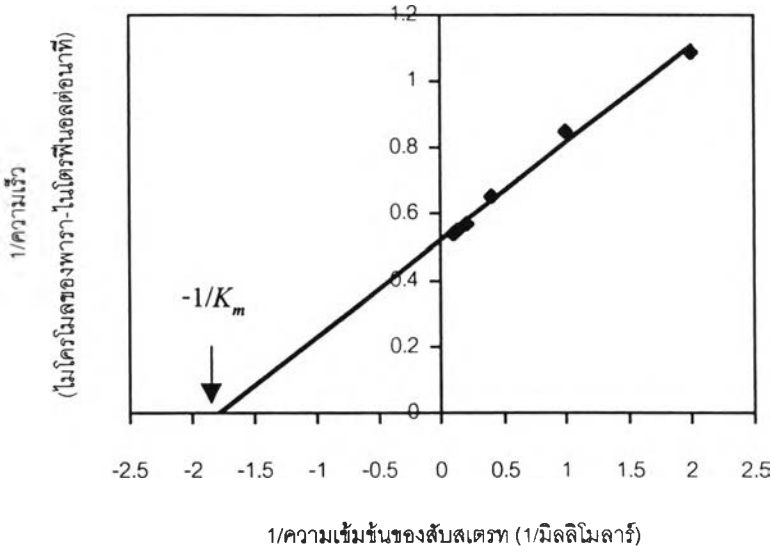
3.5.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) ของบีตา-ไซโลสิเดส

การทดลองนี้ได้ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท 2 ชนิด คือ พารา- และ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ โดยแปรความเข้มข้นของสับสเตรทในช่วง 0.5-10.0 มิลลิโมลาร์ และจากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังแสดงในรูปที่ 3.17 และ รูปที่ 3.18 พบว่า บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีค่า K_m สำหรับพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 0.56 มิลลิโมลาร์ และมีค่า K_m สำหรับ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 0.94 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ สูงกว่า ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์

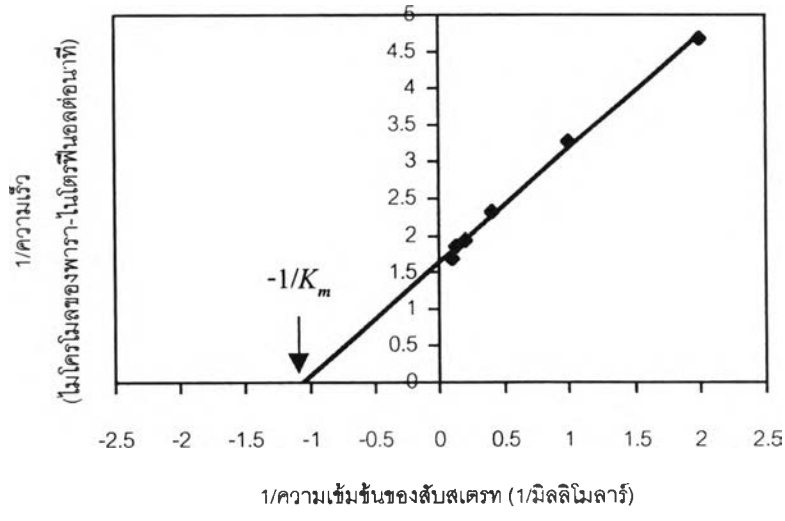
3.5.6 ผลของไซโลสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

เนื่องจากไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายไซโลไบโอสโดยบีตา-ไซโลสิเดส การทดลองนี้จึงศึกษาว่า ไซโลสที่เกิดขึ้นมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้หรือไม่โดยนำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาบ่มกับสับสเตรทโดยเติมไซโลสในปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.19 พบว่า ไซโลสมีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสได้ โดยที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงถึง 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

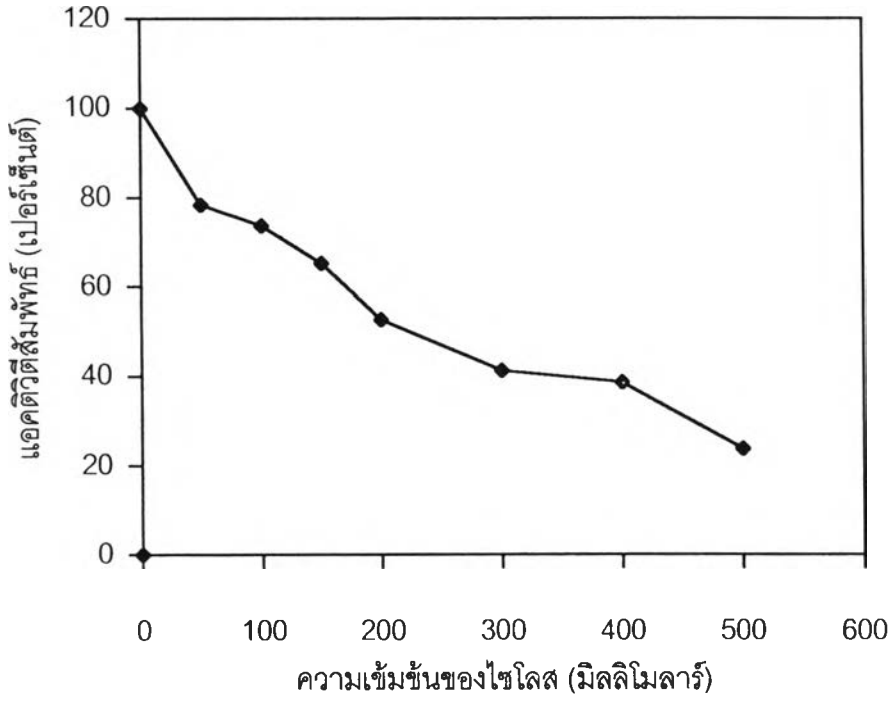
การทดลองต่อไปจึงศึกษาจลน์ศาสตร์ของไซโลสในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสเพื่อหาค่าคงที่ในการยับยั้ง (Inhibitor constant, K_i) จากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก ดังแสดงในรูปที่ 3.20 พบว่าไซโลสเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในลักษณะแข่งขัน (Competitive inhibitor) โดยมีค่า K_i เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 3.17 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของบีตา-ไซโลสิเดสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์

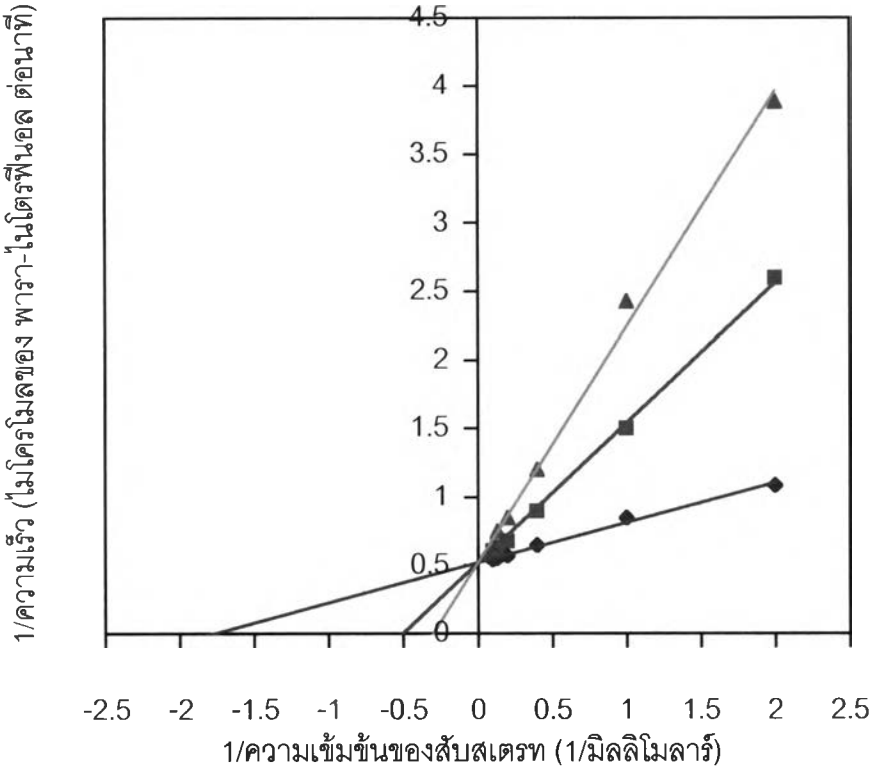


รูปที่ 3.18 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของบีตา-ไซโลสิเดสต่อออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์



กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่มีไซโลสในปฏิกิริยาเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 3.19 ผลของไซโลสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส



รูปที่ 3.20 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสโดยไซโลส

มีไซโลส 100 มิลลิโมลาร์

มีไซโลส 200 มิลลิโมลาร์

ไม่มีไซโลส

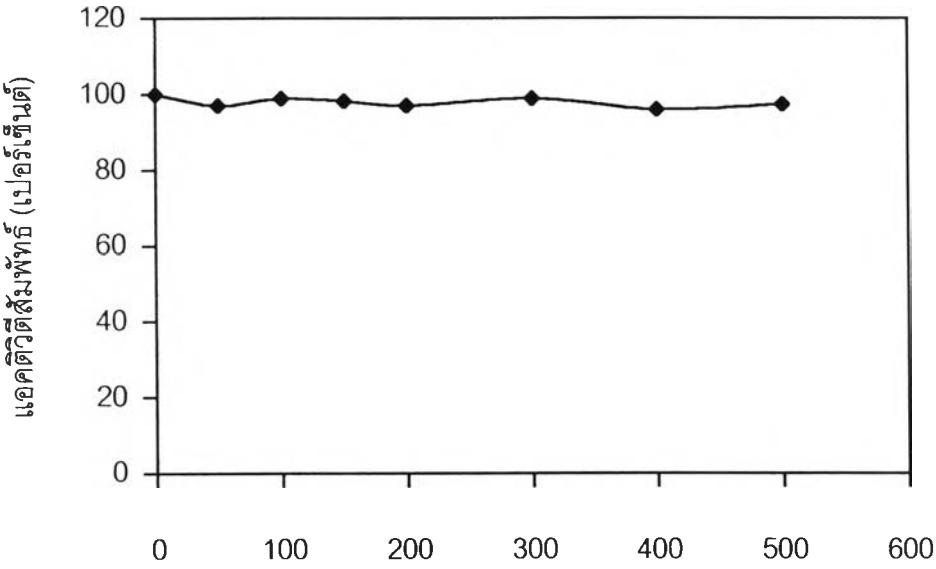
3.5.7 ผลของอะราบิโนสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

เนื่องจากอะราบิโนสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว เช่นเดียวกับไซโลสและยังเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของไซแลน ในการทดลองนี้จึงจะศึกษาว่า อะราบิโนสมีผลต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสหรือไม่

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาบ่มกับสับสเตรทโดยมีอะราบิโนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ด้วย ผลการทดลองในรูปที่ 3.21 พบว่าอะราบิโนสไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

3.5.8 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอิออนของโลหะชนิดต่างๆต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยนำเอนไซม์นี้มาบ่มกับสับสเตรทที่ในปฏิกิริยาเติมอิออนของโลหะชนิดต่างๆได้แก่ อิออนของสังกะสี (Zn^{2+}), เหล็ก (Fe^{2+}), โคบอลท์ (Co^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}), แมงกานีส (Mn^{2+}), แคลเซียม (Ca^{2+}), ทองแดง (Cu^{2+}), ปรอท (Hg^{+}) และ นิเกิล (Ni^{+}) ที่แปรความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในตารางที่ 3.3 พบว่าอิออนของเหล็ก ปรอท ทองแดง และสังกะสี มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างรุนแรงโดยอิออนของเหล็กและปรอท ที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้สมบูรณ์ ส่วนอิออนของทองแดงและสังกะสี ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่อิออนของนิเกิลและโคบอลท์มีผลยับยั้งแอคติวิตีรุนแรงรองลงมา ส่วนอิออนของแมกนีเซียมช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส



กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่มีอะราบิโนสในปฏิกิริยาเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 3.21 ผลของอะราบิโนสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

ตารางที่ 3.3 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

ชนิดของอิออนโลหะ	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของอิออนโลหะ (มิลลิโมลาร์)		
	10	1.0	0.1
control	100	100	100
$CaCl_2.2H_2O$	84	103	105
$CoCl_2.6H_2O$	1	19	45
$CuSO_4.5H_2O$	0	1	1
$FeSO_4.7H_2O$	0	0	0
$HgCl_2$	0	0	0
$MgSO_4.7H_2O$	116	112	114
$MnSO_4.H_2O$	102	101	102
$NiCl_2.6H_2O$	3	5	23
$ZnSO_4.7H_2O$	0	1	3

3.5.9 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทของบีตา-ไซโลสิเดส

การทดลองนี้ได้นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดต่างๆตามวิธีการในข้อ 2.3.7.9 ได้ผลดังตารางที่ 3.4 พบว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside สูงสุด โดยมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 8.78 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และรองลงมาคือ *o*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.57 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนั้นยังพบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside และไซแลน (จากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ช) ต่ำมาก คือ 0.03 และ 0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ซึ่งจัดได้ว่าบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์นี้มีแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส และ ไซแลเนสน้อยมาก

ตารางที่ 3.4 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity) ของบีตา-ไซโลสิเดส

สับสเตรท	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)
p-nitrophenyl β-D-xylopyranoside	8.78
o-nitrophenyl β-D-xylopyranoside	2.57
p-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside	0.03
ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต	0.02
ไซแลนจากไม้เบิร์ช	0.02

3.5.10 การตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสของบีตา-ไซโลสิเดส

จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสตามวิธีการในข้อ 2.3.7.10 พบว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสได้ แสดงว่าบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์นี้ไม่มีแอคติวิตีของเซลลูเลส

3.5.11 การตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส

จากการนำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความสามารถของเอนไซม์นี้ในการไอโซเมอไรซ์กลูโคสไปเป็นฟรุกโตส ตามวิธีการในข้อ 2.3.7.11 พบว่าเอนไซม์นี้ไม่มีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส