บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์จากจุลินทรีย์ต่างๆหลายชนิด แต่มีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับเอนไซม์นี้จาก *Streptomyces* sp. งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์บริสุทธิ์ ซึ่ง *Streptomyces* sp. CH7 นี้เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยโดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) และพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงถึงประมาณ 0.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พอลิเพปโตน และคอร์นสตีพ ลิเคอร์อย่างละ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ pH 7.0 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเอนไซม์ตกตะกอนได้ดีในช่วงความเข้มข้นแอมโนเนียมซัลเฟต 40-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus* sp. KK-1 ซึ่งตกตะกอนที่ความเข้มข้น 35-75 เปอร์เซ็นต์ (Jung และคณะ, 1998) แต่แตกต่างกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus niger* ที่ตกตะกอนที่ความเข้มข้น 0-60 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0-45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Oguntimein และ Reilly, 1980 และ John และคณะ, 1979)

การศึกษาแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์นี้พบปัญหาเกี่ยวกับความไม่เสถียรของเอนไซม์ในระหว่างการทดลอง จึงคาดว่าหมู่ active site ของเอนไซม์ดังกล่าวอาจประกอบไปด้วยหมู่ไธออล (thoil, -SH group) ซึ่งจะสูญเสียประสิทธิภาพได้ง่ายโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศ จึงทำการทดลองว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีหมู่ไธออลเป็น active site หรือไม่ โดยทดสอบกับ sulfhydryl agent คือ เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide) ซึ่งทำหน้าที่เอธิลเลท (ethylate) หมู่ไธออล (Voet และ Voet, 1990) จากการทดลองพบว่า เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสได้ โดยที่ความเข้มข้นเพียง 1 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แสดงให้เห็นว่า หมู่ไธออลอาจเป็นหมู่สำคัญในบริเวณ active site ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus sydowii* MG49 ที่ถูกยับยั้งการทำงานได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Ghosh และ Nanda, 1993) แต่ต่างจากบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Pennicillium wortmanni* ที่พบว่า sulfhydryl agent หลายชนิด

เช่น N-ethylmaleimide, *p*-chloromercuribenzoate, iodoacetamide และ 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromide ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ (Deleyn และคณะ, 1978) งานวิจัยยังได้ตรวจสอบความสามารถในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ด้วย 2-เมอร์แคบโตเอธานอล พบว่า ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ สามารถกลับคืนแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ 105.80 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าที่ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์นั้นนอกจากจะกลับคืนแอคติวิตีของเอนไซม์แล้วยังเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้มากถึง 125.40 เปอร์เซ็นต์ด้วย ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus sydowii* MG49 ซึ่ง 2-เมอร์แคบโตเอธานอลความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิโดยช่วยเพิ่มค่า half life ของเอนไซม์ได้ ณ อุณหภูมิที่ทำการทดลองคือ 85 องศาเซลเซียส (Ghosh และ Nanda, 1993) แต่แตกต่างกันกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Saccharum officinarum* L. และ *Caldocellum saccharolyticum* ซึ่ง 2-เมอร์แคบโตเอธานอลไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ (Chinen และคณะ, 1982 และ Hudson และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึง reducing agent อื่นๆก็ช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสได้เช่น ไดไธโอธรีอีทอล (Dithiothreitol) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aureobasidium pullulans* (Dobberstein และ Emeis, 1991) สำหรับไดไธโอธรีอีทอล และ cysteine ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus nidulans* ได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ (Kumar และ Ramon, 1996)

ในขั้นตอนการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบนั้นต้องใช้สารละลายเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นสารละลายในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 พบว่า ทั้งโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 มิลลิโมลาร์ มีผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากกว่าโพแทสเซียมคลอไรด์ ดังนั้นในการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล อกาโรส จึงเลือกใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermomonospora fusca* ที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยโซเดียมคลอไรด์ (Bachmann และ McCarthy, 1989) และคล้ายกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus* sp. KK-1 ที่โซเดียมคลอไรด์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากกว่าโพแทสเซียมคลอไรด์ (Jung และคณะ, 1998) ผลการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ พบว่า เอนไซม์ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของ

โพแทสเซียมคลอไรด์ประมาณ 600-800 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7.5 ซึ่งได้มีรายงานถึงความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบจากจุลินทรีย์อื่นๆด้วย เช่นบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus nidulans* ที่ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 180-200 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 3.5 (Kumar และ Ramon, 1996) และบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Neocallimastix patriciarum* ที่เอนไซม์ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 50-150 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.0 (Zhu และคณะ, 1994) ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์คือนำบีตา-ไซโลสิเดสที่ได้มาผ่านเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ซึ่งแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 5,000-600,000 ดาลตัน (Harris และ Angal, 1989) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนดังกล่าวแล้วพบว่า บีตา-ไซโลสิเดสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.23 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 29.99 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งได้สรุปขั้นตอนการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์ เมื่อพิจารณาในแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จะเห็นว่าสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้มากในแต่ละขั้นตอน แต่การเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไม่ได้สูงมากขึ้นตามสัดส่วนของโปรตีนที่ถูกกำจัดออก อาจเนื่องมาจากในการขั้นตอนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีนั้นทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง และเอนไซม์นี้มีความเสถียรต่ำแม้ว่าจะเก็บอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 2-เมอร์แคบโตเอธานอลผสมอยู่แล้วก็ตาม

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 183,000 ดาลตัน และจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่า บีตา-ไซโลสิเดสประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 93,000 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus nidulans* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันเช่นเดียวกันคือ 85,000 ดาลตัน (Kumar และ Ramon, 1996) นอกจากนี้ยังใกล้เคียงกันกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Termitomyces clypeatus* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 190,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 94,000 ดาลตัน (Bhattacharyya และคณะ, 1996) และใกล้เคียงกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Neocallimastix frontalis* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180,000 ดาลตัน (Hebraud และ Fevre, 1990) บีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีความหลากหลายทั้งน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยดังได้กล่าวไว้แล้วในตารางที่ 1.2

การศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7 ในขั้นแรกศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Neurospora crassa* (Deshpande และคณะ, 1985) ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Trichoderma koningii* G-39 คือ 55-60 องศาเซลเซียส (Li และคณะ, 2000), บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aeromonas caviae* ME-1 (Suzuki และคณะ, 2001), และจาก *Bacillus subtilis* (Bennier และคณะ, 1987) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Arxula adeninivirans* (Buttner และ Bode, 1992), จาก *Aspergillus carborius* (Kiss และ Kiss, 2000), จาก *Aspergillus oryzae* KBN616 (Kitamoto และคณะ, 1999), และจาก *Trichoderma reesei* (Herrmann และคณะ, 1997) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0-7.0 โดยที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นี้ ซึ่งใกล้เคียงกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Aspergillus awamori* (Kormelink และคณะ, 1993) และบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus* sp. KK-1 (Jung และคณะ, 1998) คือที่ pH 6.5 นอกจากนั้นยังใกล้เคียงกันกับบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Aspergillus niger* ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 6.7-7.0 (John และคณะ, 1979), บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 6.0-6.5 (Lee และ Forsberg, 1987) จากรายงานเกี่ยวกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดพบว่าจะแตกต่างกันออกไปส่วนใหญ่แล้วจะค่อนข้างเป็นกรดถึงกลางโดยอยู่ในช่วง 3.5-7.5 ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ในด้านความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่ออุณหภูมิ พบว่าบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 45 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus carbonarius* ซึ่งมีความเสถียรต่ออุณหภูมิคือ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที (Kiss และ Kiss, 2000), บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus nidulans* มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที (Kumar และ

Ramon, 1996), จาก *Trichoderma reesei* มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 60 นาที (Herrmann และคณะ, 1997), บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus pumilus* (La Grange และคณะ, 1997) และ จาก *Streptomyces* sp. EC10 (Belfaquih และ Penninckx, 2000) มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงสูงคือตั้งแต่ 6.0-9.0 อาจเนื่องจากเชื้อนี้แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยในภาวะความเป็นกรดด่างสูงโดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) ซึ่งความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างนี้ใกล้เคียงกันกับของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Caldocellum saccharolyticum* (Hudson และคณะ, 1991) ที่มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 7.5-9.0, บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus* sp. KK-1 (Jung และคณะ, 1998) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 6.5-10.0 และ บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermomonospora fusca* (Bachmann และ McCarthy, 1989) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-8.0

ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) ของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งสับสเตรทที่นำมาศึกษาเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ทำหน้าที่แทนไซโลไบโอสที่มีองค์ประกอบเป็นไซโลสเชื่อมกันด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไกลโคซิดิก 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ไม่มีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 คือ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) และชนิดที่มีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 คือ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*o*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) พบว่าเอนไซม์นี้มีค่า K_m ต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ และออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 0.56 และ 0.94 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อไซโลไบโอสที่ไม่มีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 มากกว่า ไซโลไบโอสที่มีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 เช่นเดียวกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Lee และ Zeikus, 1993) และพบว่าค่า K_m ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีค่าใกล้เคียงกับ xylosidase I จาก *Neocallimastix patriciarum* 27 ที่มีค่า K_m เท่ากับ 0.59 มิลลิโมลาร์ (Zhu และคณะ, 1994) และมีค่าน้อยกว่า ค่า K_m ของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus phoenicis*, *Bacillus pumilus* IPO, *Caldocellum saccharolyticum* และ *Streptomyces* sp. EC10 ซึ่งมีค่า K_m เท่ากับ 3.00, 1.10, 2.36, 10.00 และ 13.50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Kormelink และคณะ, 1993; Kumar และ Ramon, 1996; Rizzatti และคณะ, 2001; Xu และคณะ, 1991; Hudson และคณะ, 1991 และ Balfaquih และ

Penninckx, 2000) ดังนั้นจึงจัดว่าบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์หลายชนิด

จากการศึกษาเกี่ยวกับสารยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส ซึ่งได้ศึกษาถึงผลของ ดี-ไซโลส แอล-อะราบิโนส และอิออนของโลหะชนิดต่างๆ พบว่า แอล-อะราบิโนส ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับไซโลสคือเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัวเช่นเดียวกัน ที่ความเข้มข้น0-500 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

แต่ดี-ไซโลสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเอนไซม์นี้มีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสได้ในลักษณะแข่งขัน (competitive inhibition) โดยมีค่าคงที่ในการยับยั้ง (inhibitor constant, K_i) เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกันกับของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Caldocellum saccharolyticum* (Hudson และคณะ, 1991) ซึ่งมีค่า K_i เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกัน

ส่วนผลของอิออนของโลหะชนิดต่างๆ พบว่า อิออนของเหล็ก ปรอท ทองแดง และสังกะสี มีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 อย่างรุนแรง รองลงมาคืออิออนนิเกิลและโคบอลท์ ส่วนอิออนของแมกนีเซียมช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ คล้ายกันกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Petnopecten* sp. ที่ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของเหล็ก ปรอท และทองแดง (Takagaki และคณะ, 1990), บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus nidulans* และ xylosidase I กับ xylosidase II จาก *Neocallimastix patriciarum* ที่ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของปรอทและทองแดง (Kumar และ Ramon, 1996 และ Zhu และคณะ, 1994) และบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Termitomyces clypeatus* ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของเหล็ก และทองแดง (Bhattacharyya และคณะ, 1997) เช่นเดียวกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Caldocellum saccharolyticum* (Hudson และคณะ, 1991) ที่อิออนของนิเกิลและโคบอลท์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ในขณะที่อิออนของแมกนีเซียมช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Neocallimastix frontalis* และ จาก *Aspergillus phoenicis* ได้ (Garcia-Campayo และ Wood, 1993 และ Rizzatti และคณะ, 2001)

จากการตรวจสอบการมีแอคติวิตีของเอนไซม์อื่นพบว่าบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7 มีแอคติวิตีของอะราบิโนฟิวราโนสิเดส และไซแลเนสต่ำมาก คือเท่ากับ 0.03 และ 0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus* sp. KK-1 ที่ไม่พบแอคติวิตีของอะราบิโนฟิวราโนสิเดส แต่พบแอคติวิตีของไซแลเนสซึ่งมีค่าเพียงเล็กน้อยคือเท่ากับ 0.14 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต) และ 0.10 หน่วยต่อมิลลิกรัม

โปรตีน (ไซแลนจากไม้เบิร์ช) (Jung และคณะ; 1998) และคล้ายกับ xylosidase I จาก *Neocallimastix patriciarum 27* ที่มีแอคติวิตีของอะราบิโนฟิวราโนสิเดสเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน คือ 0.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Zhu และคณะ, 1994) แต่ต่างกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacter ethanolicus* ซึ่งเป็น bifunctional โดยแสดงแอคติวิตีของทั้งบีตา-ไซโลสิเดสและอะราบิโนฟิวราโนสิเดสโดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 8.9 และ 15.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (Utt และคณะ, 1991) และบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacter ethanolicus* ที่เป็น bifunctional เช่นกันโดยมีแอคติวิตีของทั้งบีตา-ไซโลสิเดสและอะราบิโนฟิวราโนสิเดสเท่ากับ 122 และ 1,073 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (Shao และ Wiegel, 1992)

บีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7 ไม่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสและกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus phoenicis* (Rizzatti และคณะ, 2001), จาก *Aureobasidium pullulans* (Christov และคณะ, 1999) และจาก *Bacillus* sp. KK-1 (Jung และคณะ, 1998) ซึ่งไม่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสเช่นกัน แต่ต่างจากบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. EC10 ซึ่งเป็น bifunctional โดยแสดงแอคติวิตีของทั้งบีตา-ไซโลสิเดสและไซโลสไอโซเมอเรส มีแอคติวิตีเท่ากับ 308 และ 62.63 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Belfaquih และ Penninckx, 2000)

ตารางที่ 4.1 ได้สรุปสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7

ตารางที่ 4.1 สมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7

สมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์	ผลการวิจัย
น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน	183,000 ดาลตัน
น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE	93,000 ดาลตัน (2หน่วยย่อย)
อุณหภูมิที่เหมาะสม	55 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	6.5
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	50 องศาเซลเซียส 30 นาที
ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	6.0-9.0
ค่า K_m ต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์	0.56 มิลลิโมลาร์
ค่า V_{max} ต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์	4.8 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมก.โปรตีน

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์นี้กับที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งรายงานโดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) พบว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่า คือ ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที และ เสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงที่กว้างกว่าคือ 4.5-9.5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนอื่นๆที่ปนเปื้อนอยู่นั้นมีส่วนช่วยป้องกันหรือลดการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์จากความร้อน และจากการถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศ

จากการค้นคว้ารายงานวิจัยในช่วงประมาณ 15 ปีที่ผ่านมาจนปัจจุบัน มีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. โดยในปี 2000 Balfaquih และ Penninckx ศึกษาบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC 10 และพบสมบัติหลายประการที่แตกต่างจากบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 กล่าวคือบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 183,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 93,000 ดาลตัน ในขณะที่ บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC 10 มีหนักโมเลกุลประมาณ 163,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อยน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 42,000 ดาลตัน พบว่าบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC 10 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเพียง 45 องศาเซลเซียส ในด้านความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างพบว่าบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงสูงกว่าคือ 6.0-9.0 ในขณะที่บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC 10 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 5.0-8.0 และสมบัติที่แตกต่างกันอย่างโดดเด่นคือบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีค่า K_m ต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์เพียง 0.56 มิลลิโมลาร์ ส่วนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC 10 มีค่า K_m ต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์สูงถึง 13.5 มิลลิโมลาร์ นั่นคือบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงกว่าบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC 10 มาก