# บทที่ 4

# ผลการวิจัย

## 4.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมอะซีทิลเอสเทอเรส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสซึ่งมี 0.75 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการในข้อ 3.3.1 รวมทั้งการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้ประมาณ 0.2-0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 1.5-2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ ในขั้นตอนต่อไปจึงได้ศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ สมบัติของเอนไซม์ รวมทั้งการทดสอบความสามารถในการทำงานร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน

## 4.2 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์

### 4.2.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนอะซีทิลเอสเทอเรส

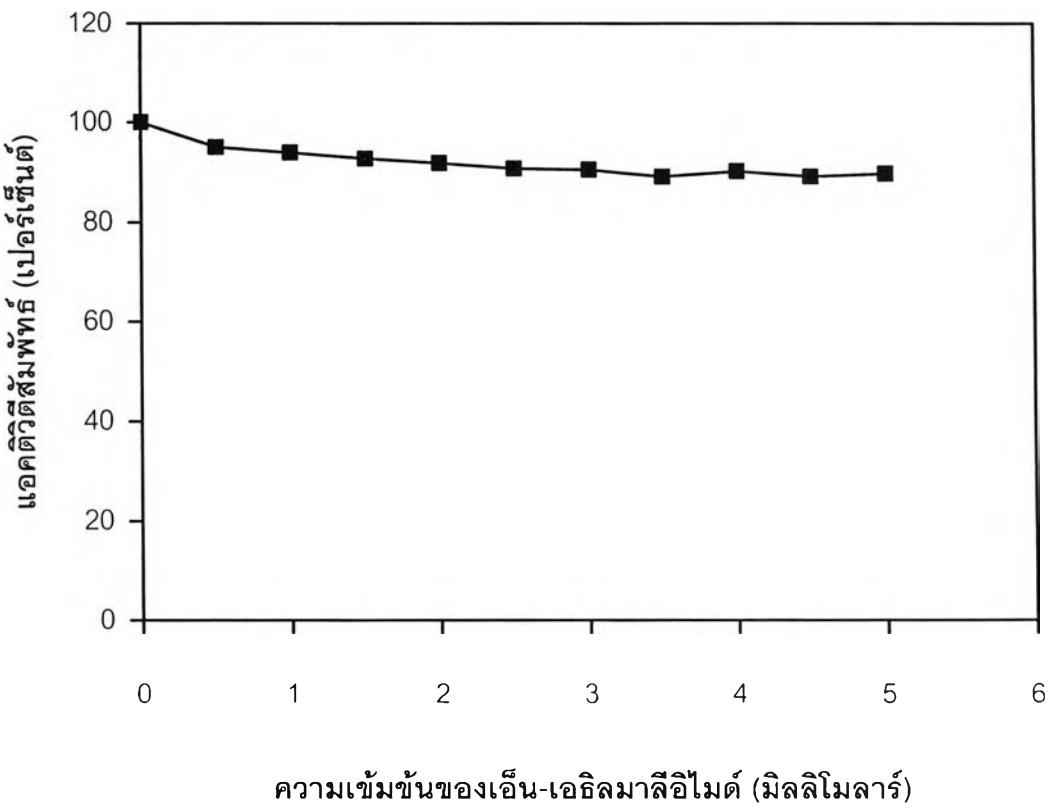
การศึกษาขั้นแรกได้ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนลำดับส่วนของอะซีทิลเอสเทอเรสในน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนรวมทั้งให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์และกากอาหารออกแล้วมาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตตามลำดับ คือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ นำโปรตีนที่ได้ในแต่ละลำดับส่วนไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส พบว่ามีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสครอบคลุมอยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.1 อย่างไรก็ตาม เพื่อไม่ให้สูญเสียปริมาณเอนไซม์ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ดังนั้นในการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของอะซีทิลเอสเทอเรสจากน้ำเลี้ยงเชื้อจึงจะเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในช่วง 30-90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนอะซีทิลเอสเทอเรสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

| ลำดับส่วนของแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์) | ปริมาตร (มิลลิลิตร) | โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย) | แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน) | แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|---|
| เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ | 85.00 | 163.93 | 8.87 | 0.05 | 100 |
| 0-20 | 2.20 | 0.35 | 0.03 | 0.09 | 0.34 |
| 20-30 | 1.00 | 0.58 | 0.03 | 0.05 | 0.34 |
| 30-40 | 1.20 | 0.29 | 0.09 | 0.07 | 1.01 |
| 40-50 | 1.20 | 0.99 | 0.56 | 0.57 | 6.31 |
| 50-60 | 1.00 | 1.33 | 0.91 | 0.68 | 10.26 |
| 60-70 | 1.50 | 1.81 | 1.18 | 0.65 | 13.30 |
| 70-80 | 1.80 | 2.23 | 0.58 | 0.26 | 6.54 |
| 80-90 | 1.80 | 1.80 | 0.27 | 0.15 | 3.04 |

4.2.2 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ในการยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

การทดลองนี้เพื่อทดสอบว่าเอนไซม์มีหมู่ไธออลซึ่งไวต่อการถูกออกซิไดส์ด้วยอากาศเป็น active site หรือไม่ จึงทำการทดลองโดยบ่มเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเท่า ๆ กัน ในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ซึ่งทำหน้าที่เอธิลเลท (ethylate) หมู่ไธออล โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสที่เหลืออยู่ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อย โดยที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหมู่ไธออลจึงไม่น่าจะมีบทบาทสำคัญในบริเวณ active site ของเอนไซม์

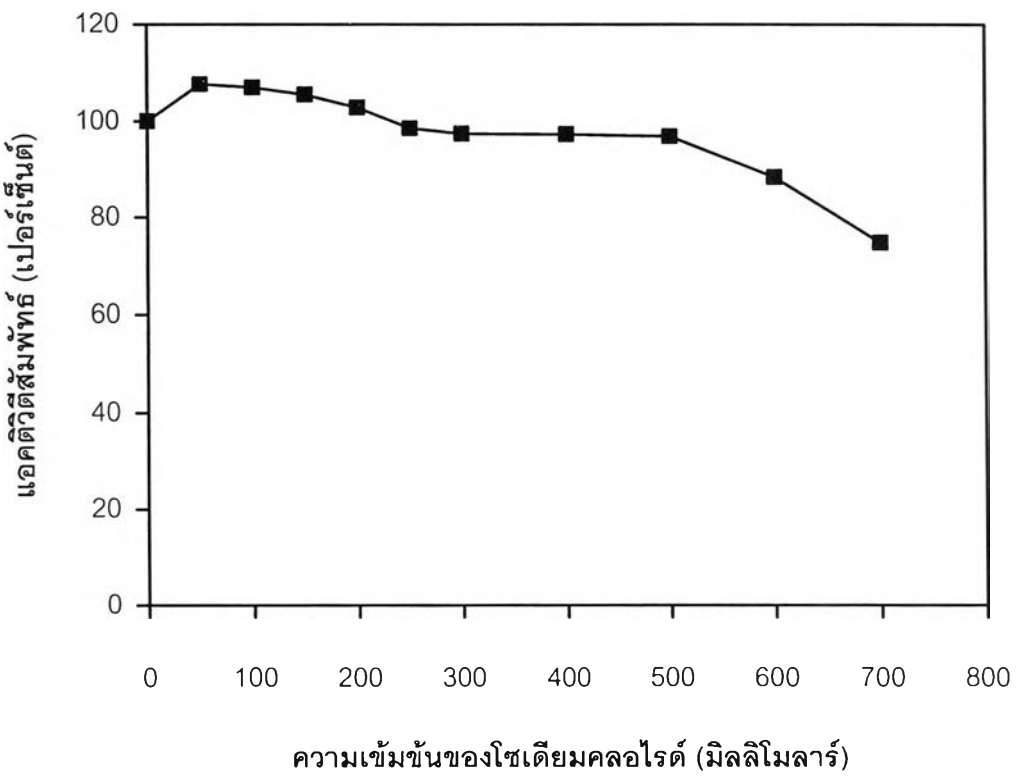



รูปที่ 4.1 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ในการยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

4.2.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีนั้นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchanger) เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง การทดลองนี้จึงศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส เพื่อเลือกนำมาให้เป็นสารละลายในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ จากการนำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเท่า ๆ กัน บ่มกับสับสเตรทและโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-700 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าโซเดียมคลอไรด์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย โดยที่ความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งแอคติวิตีได้ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในการทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนจึงสามารถใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นสารละลายในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์




รูปที่ 4.2 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

4.2.4 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 โดยขยายขนาด ปั่นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากไมซีเลียม ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 380 มิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าได้แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสรวมทั้งหมด 105.38 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 568.48 มิลลิกรัม และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.19 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้นี้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-90 เปอร์เซ็นต์ โดยหลังจากการไดอะไลส์ในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว พบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 6.11 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น โดยยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 61.85 เปอร์เซ็นต์

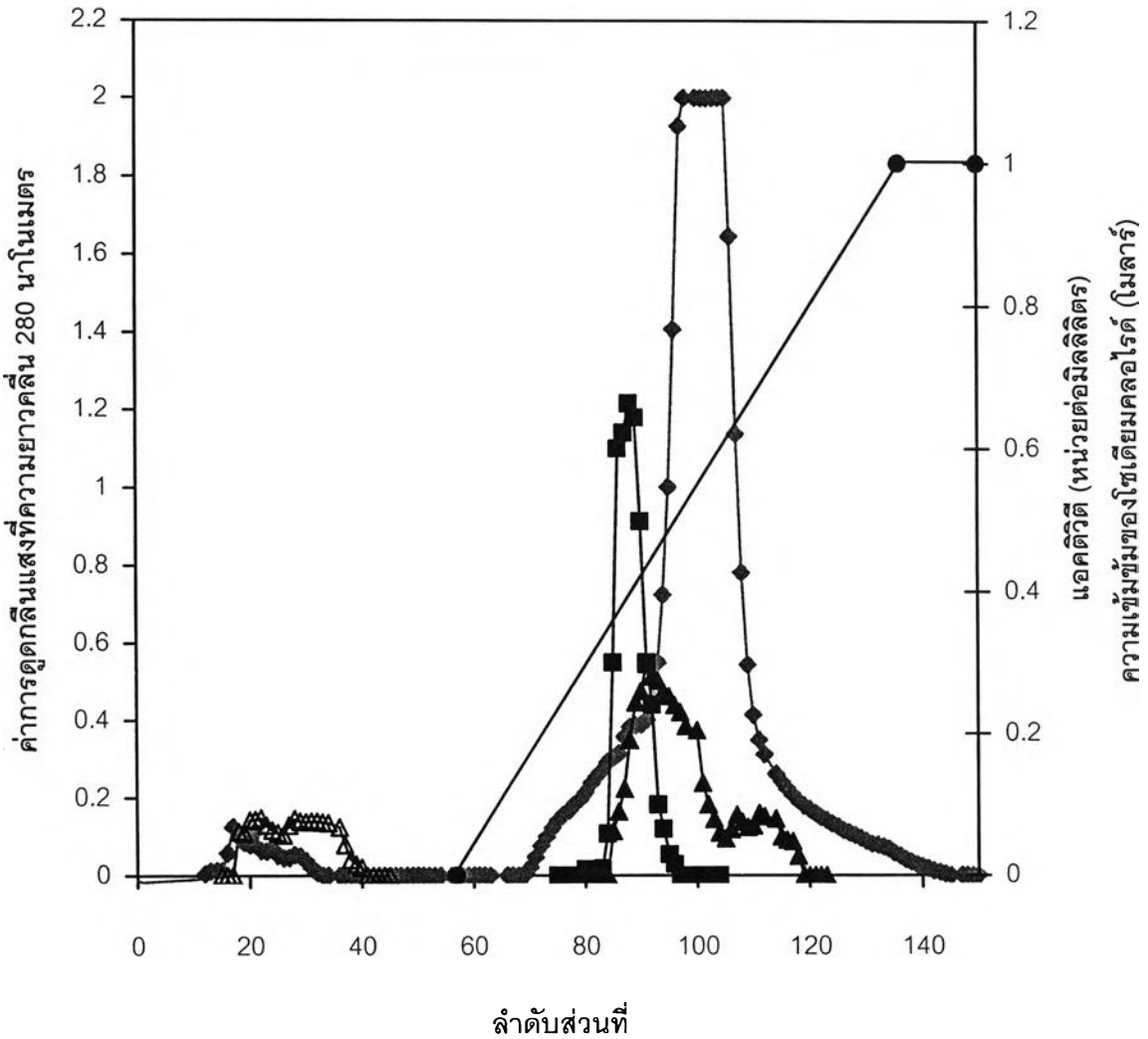
นอกจากนั้นได้วิเคราะห์แอคติวิตีของไซแลเนสและเซลลูเลสในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ โดยมีแอคติวิตีของไซแลเนสและเซลลูเลสทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 276.25 และ 10.26 หน่วย ตามลำดับ แต่เมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในลำดับส่วน 30-90 เปอร์เซ็นต์แล้ว พบว่ามีแอคติวิตีของไซแลเนสและเซลลูเลสปนเปื้อนเหลืออยู่ 12.96 และ 22.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.2.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

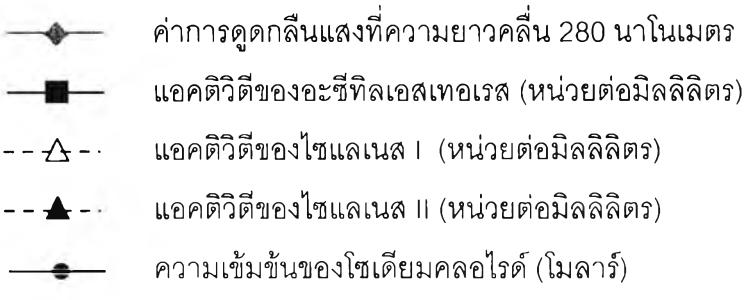
4.2.5.1 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี

นำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-90 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นปริมาณโปรตีน 56.01 มิลลิกรัม ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการ reverse dialyze ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออีซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ (anion exchanger) ตามวิธีการในข้อ 3.3.7.5.1 และชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ ดังนั้นจึงสามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไป รวมทั้งไซแลเนส I ด้วย โดยอะซีทิลเอสเทอเรสถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.36-0.48 โมลาร์ จึงได้รวมลำดับส่วนที่ 82-95 เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งมีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 34.60 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 7.72 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 4.48 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23.58 เท่า

อย่างไรก็ตามการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ พบว่าไซแลเนส II ซึ่งจับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบเช่นกัน ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.38-0.65 โมลาร์ ดังนั้นจึงปนเปื้อนอยู่ในลำดับส่วนของอะซีทิลเอสเทอเรสด้วยแต่ในปริมาณต่ำคิดเป็น 1.29 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีเริ่มต้นทั้งหมดของไซแลเนส สำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตีของเซลลูเลสที่พบในอะซีทิลเอสเทอเรสที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้ยังคงมีปนเปื้อนอยู่ 1.56 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2



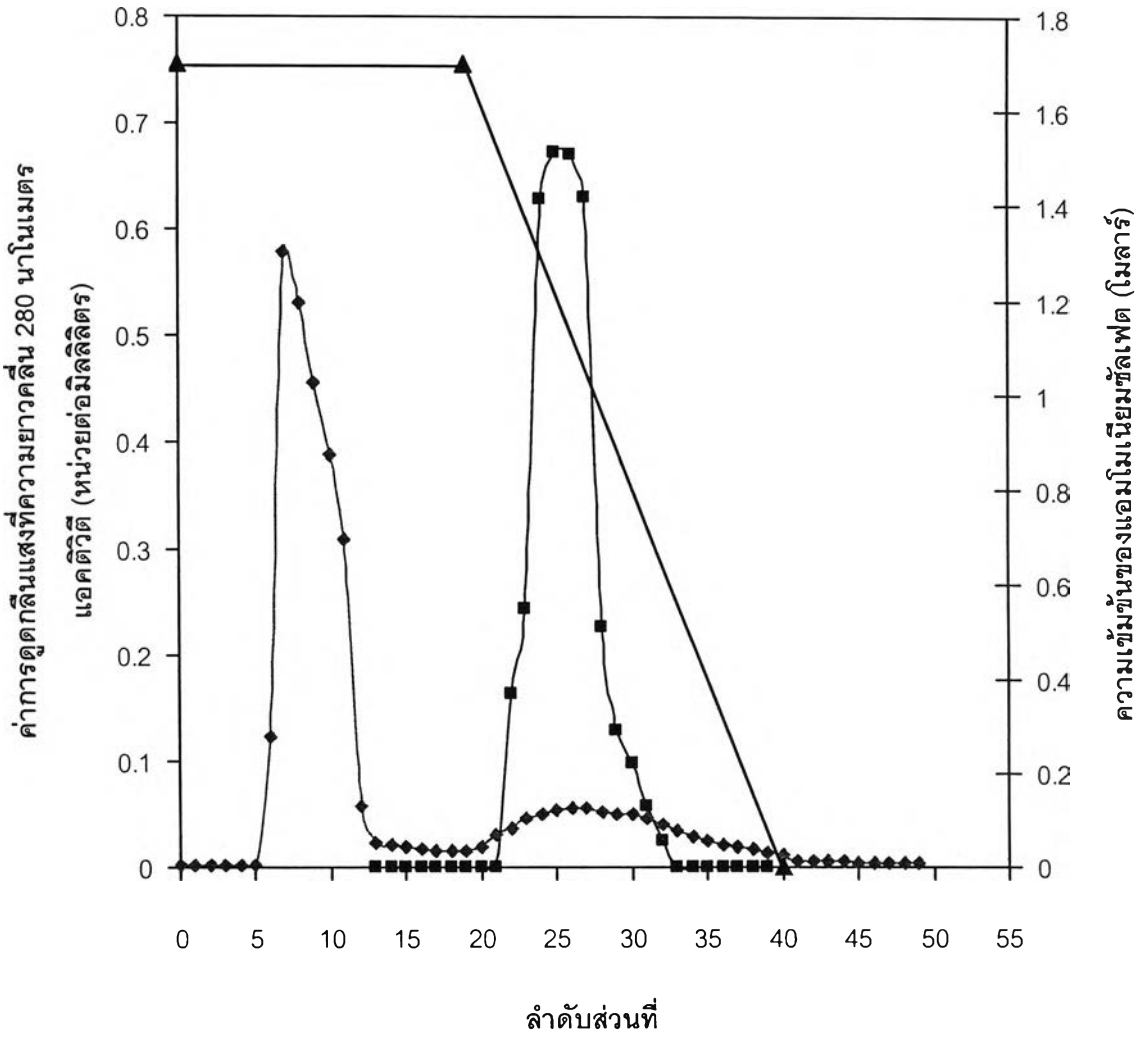

รูปที่ 4.3 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ซะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง



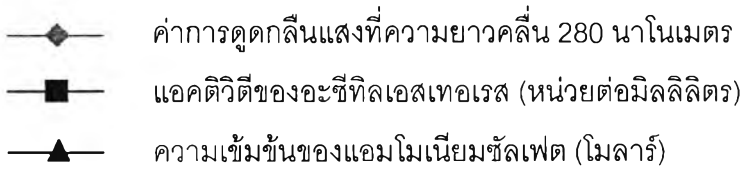
4.2.5.2 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ในข้อ 4.2.5.1 คิดเป็นปริมาณโปรตีน 7.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ของบิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน และชะโปรตีนที่มีสมบัติที่ชอบน้ำออกจากโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 4.4 พบว่าเอนไซม์มีสมบัติค่อนข้างไฮโดรโฟบิคโดยจับกับตัวกลางในคอลัมน์ชนิดนี้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงสามารถกำจัดโปรตีนที่มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลลิคโดยไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งมีปริมาณมากออกไปได้ ส่วนอะซีทิลเอสเทอเรสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 22-35 ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 1.4-0.4 โมลาร์ จึงรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นนำไปไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เพื่อกำจัดเกลือออก สุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 วัดปริมาตรรวมได้ 4.1 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 23.73 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 3.23 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 7.35 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 38.68 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 22.19 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์แอคติวิตีของไซแลเนสและเซลลูเลสจากเอนไซม์นี้ พบว่ามีไซแลเนสและเซลลูเลสปนเปื้อนอยู่คิดเป็น 0.90 และ 0.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ




รูปที่ 4.4 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน ชะโปรตีนด้วย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

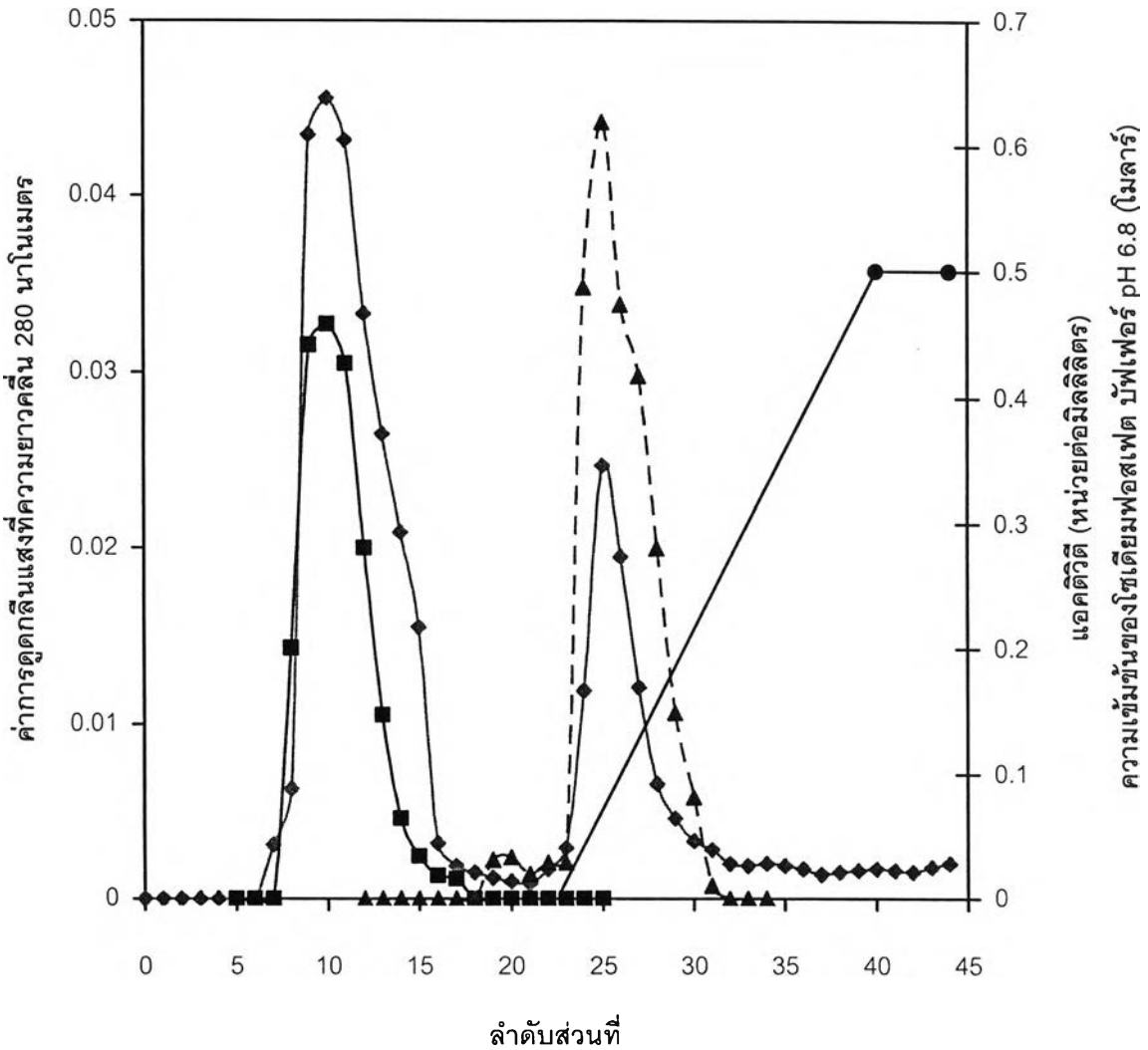


4.2.5.3 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์

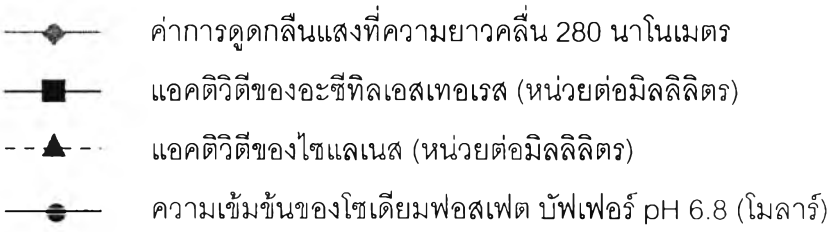
นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนบิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน ในข้อ 4.2.5.2 คิดเป็นปริมาณโปรตีนรวม 3.23 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ ชะโปรตีนที่จับกับตัวกลางด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ 20-500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ผลการทดลองดังในรูปที่ 4.5 พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสไม่จับกับตัวกลางในคอลัมน์ โดยถูกชะออกจากคอลัมน์ในลำดับส่วนที่ 8-15 เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้นแล้ว วัดปริมาตรรวมได้ 2.13 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 7.72 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.79 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 9.77 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 51.41 เท่า และยังคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 7.33 เปอร์เซ็นต์

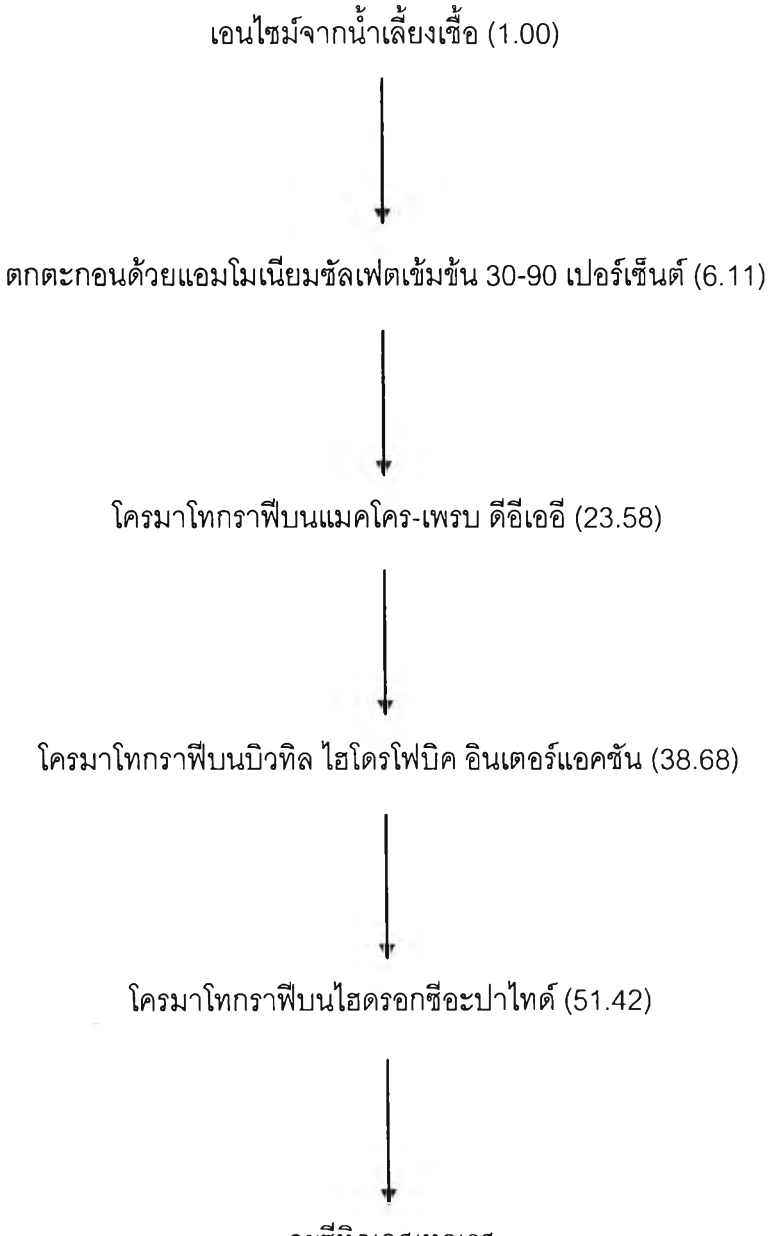
จากการติดตามแอคติวิตีของไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน พบว่าไซแลเนสจับกับตัวกลางในคอลัมน์โดยถูกชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่ความเข้มข้น 50-400 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงสามารถแยกไซแลเนสออกจากอะซีทิลเอสเทอเรสได้ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และจากการวิเคราะห์แอคติวิตีของเซลลูเลสในเอนไซม์ที่เตรียมได้ในขั้นตอนนี้ พบว่าไม่มีการปนเปื้อนด้วยเซลลูเลส

ขั้นตอนและผลการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.6




รูปที่ 4.5 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ไฮดรอกซีอะปาไทต์ ชะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 20-500 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง






หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์เมื่อเทียบกับเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 4.6 สรุปขั้นตอนการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

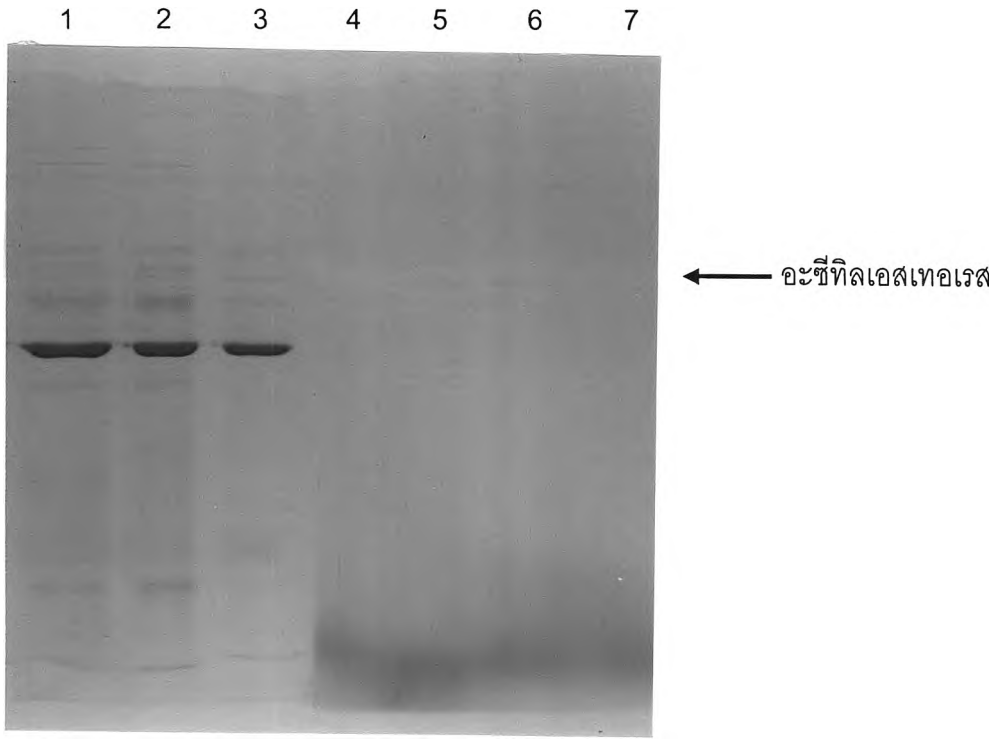
| ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ | ปริมาตร (มล.) | แอคติวิตีทั้งหมดของอะซีทิลเอสเทอเรส (หน่วย) | โปรตีนทั้งหมด (มก.) | แอคติวิตีจำเพาะของอะซีทิลเอสเทอเรส (หน่วยต่อมก.โปรตีน) | เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส | ความบริสุทธิ์ของอะซีทิลเอสเทอเรส (เท่า) | แอคติวิตีทั้งหมดของไซแลเนส (หน่วย) | เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีของไซแลเนส | แอคติวิตีทั้งหมดของเซลลูเลส (หน่วย) | เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีของเซลลูเลส |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ | 380.00 | 105.38 | 568.48 | 0.19 | 100.00 | 1.00 | 276.25 | 100.00 | 10.26 | 100.00 |
| 2. ตกตะกอนด้วย 30-90 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต | 11.50 | 65.18 | 56.01 | 1.16 | 61.85 | 6.11 | 35.79 | 12.96 | 2.33 | 22.71 |
| 3. แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี | 2.40 | 34.60 | 7.72 | 4.48 | 32.83 | 23.58 | 3.55 | 1.29 | 0.16 | 1.56 |
| 4. บิวทิล ไฮโดรโฟบิคอินเตอร์แอคชัน | 4.10 | 23.73 | 3.23 | 7.35 | 22.19 | 38.68 | 2.50 | 0.90 | 0.07 | 0.68 |
| 5. ไฮดรอกซีอะปาไทต์ | 2.13 | 7.72 | 0.79 | 9.77 | 7.33 | 51.42 | 0.08 | 0.03 | 0.00 | 0.00 |

**4.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส**

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสชนิดแผ่น ย้อมโปรตีนด้วยสีคูแมสซี บลู พบว่าจำนวนแถบโปรตีนในส่วนที่ผ่านโครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทต์มีน้อยกว่าในส่วนที่ผ่านโครมาโทกราฟีบนบิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน และแมคโคร-เพรบ ดีอีเออีมาก ซึ่งสอดคล้องกับแอคติวิตีจำเพาะที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.2

อย่างไรก็ตาม แม้จำนวนแถบโปรตีนในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์จะลดลงมาก แต่ก็ยังปรากฏแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนใดเป็นอะซีทิลเอสเทอเรส จึงได้ตัดแผ่นเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู อีกส่วนหนึ่งนำไปย้อมแอคติวิตี (activity staining) โดยใช้ 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตทเป็นสับสเตรท จากนั้นนำเจลส่วนที่ย้อมแอคติวิตีมาเปรียบเทียบโดยแถบสีเหลืองจะแสดงแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.7 ผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนที่แสดงแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสไม่ใช่แถบโปรตีนหลัก (major protein) ซึ่งเป็นแถบสีน้ำเงินเข้ม

จากนั้นได้พยายามทำเอนไซม์นี้ให้บริสุทธิ์เพื่อให้ถึงระดับโปรตีนเดี่ยว (homogeneity) โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะนำตัวอย่างไปใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส (SDS-PAGE) และลำดับกรดอะมิโนตรงปลายเอ็น ($NH_2$ terminal) จึงได้นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนไฮดรอกซีอะปาไทต์มาทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสแล้วย้อมแอคติวิตี ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ตัดเจลเฉพาะแถบสีเหลืองซะโปรตีนออกจากเจล และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการปั่นเหวี่ยงใน concentrator tube ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยแสดงแถบหนาของเอนไซม์ 1 แถบ แต่ก็ยังมีแถบของโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่เล็กน้อย




รูปที่ 4.7 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ

แถวที่ 1-3 ย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูแมสซี บลู

แถวที่ 4-7 ย้อมแอคติวิตีด้วยพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท

(ทุกตัวอย่างใช้ปริมาณโปรตีน 7 ไมโครกรัม)

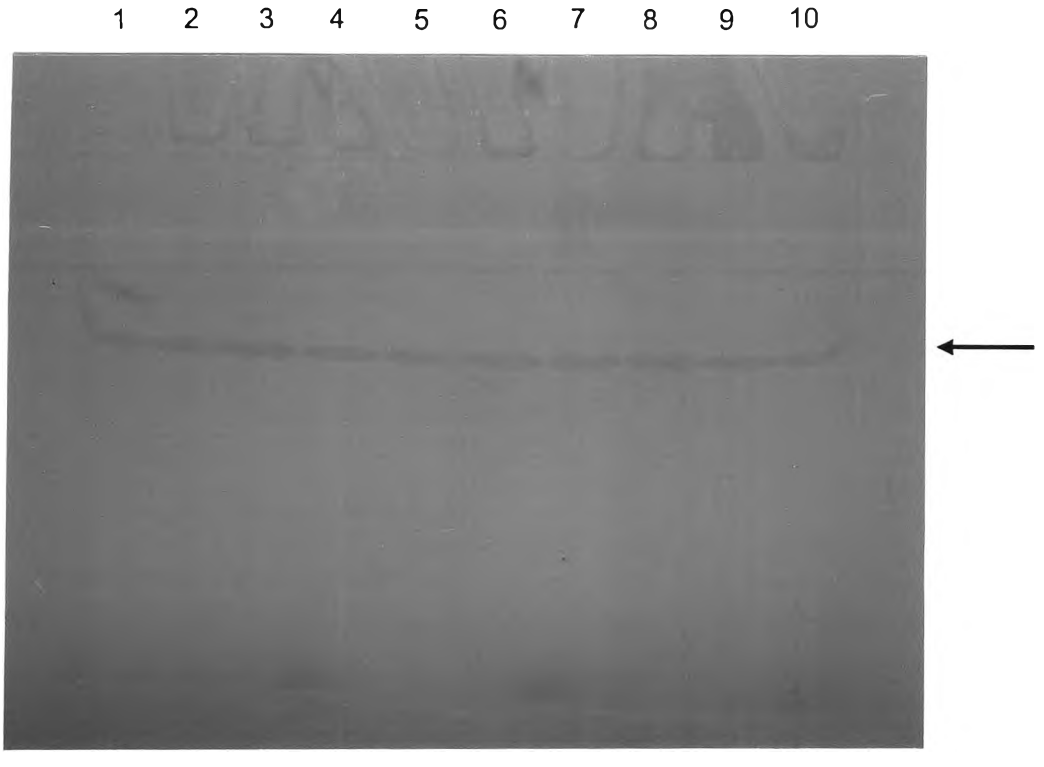
แถวที่ 1,5 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี

แถวที่ 2,6 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน

แถวที่ 3,7 เอนไซม์ที่ผ่านไฮดรอกซีอะปาไทต์

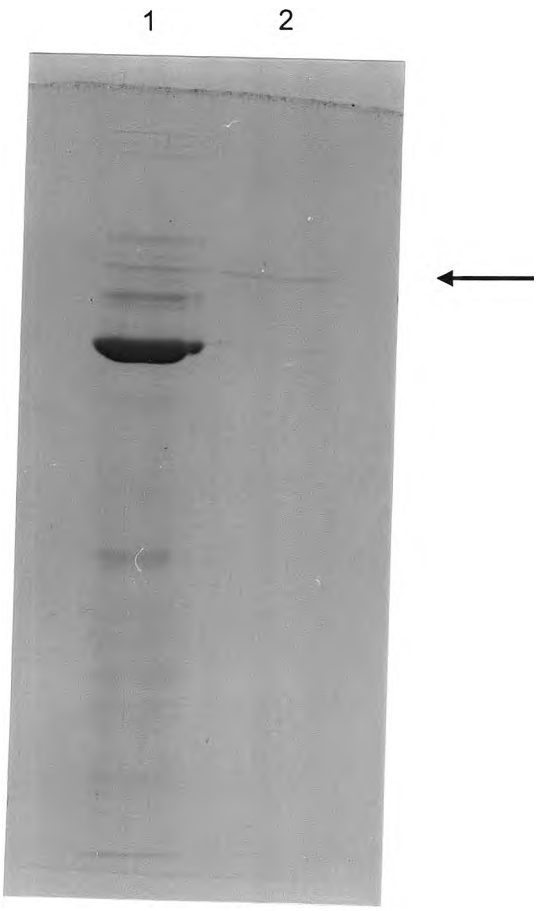
แถวที่ 4 เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 30-90 เปอร์เซ็นต์

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 4.8 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์

แถวที่ 1-8 ย้อมแอคติวิตีอะซีทิลเอสเทอเรสด้วยพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท (ทุกตัวอย่างใช้ปริมาณโปรตีน 14 ไมโครกรัม)



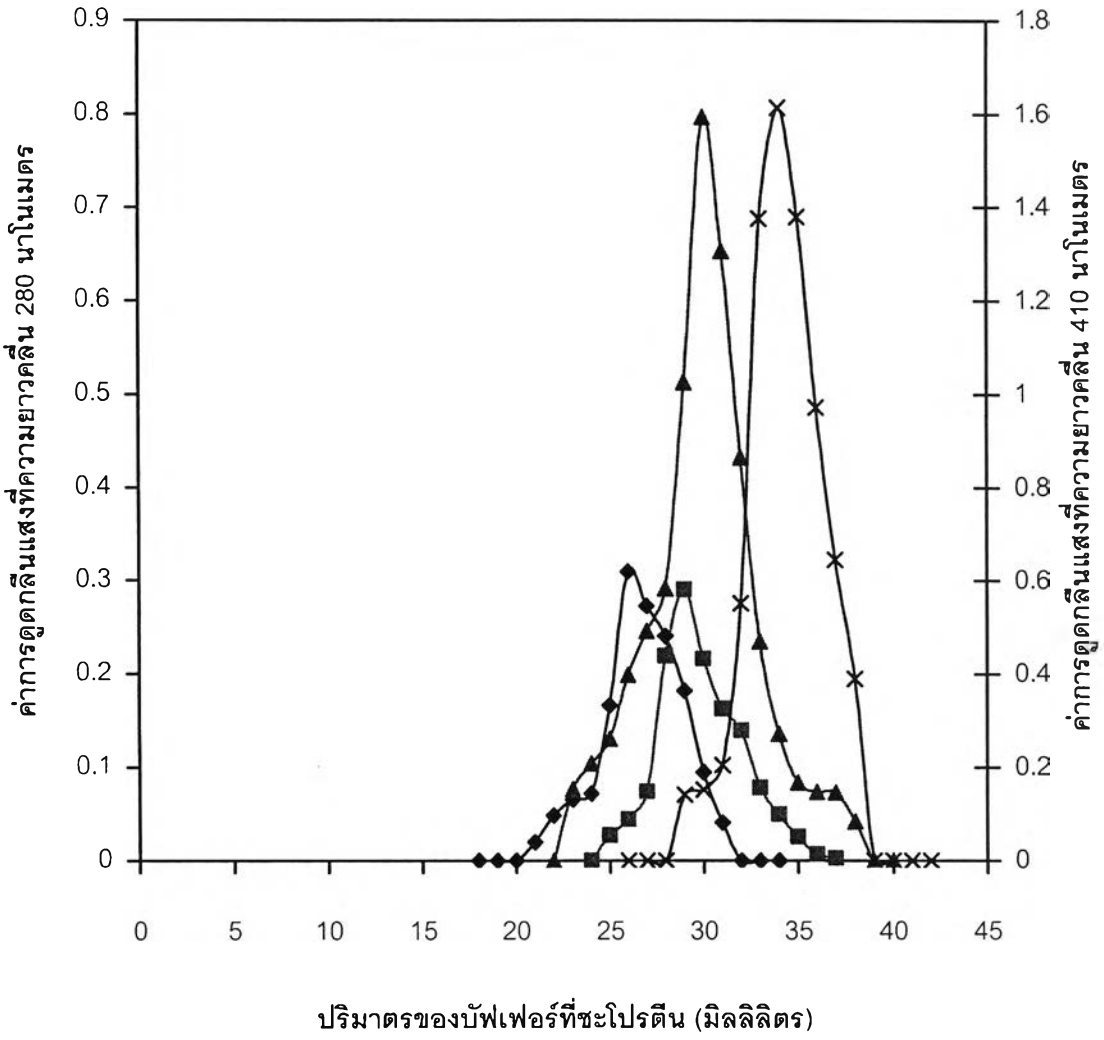

รูปที่ 4.9 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์และที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการย้อมแอคติวิตี

แถวที่ 1 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์ (ปริมาณโปรตีน 13.6 ไมโครกรัม)
แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจล (ปริมาณโปรตีน 2.7 ไมโครกรัม)
ย้อมสีด้วยสีคูแมสซี บลู

## 4.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส

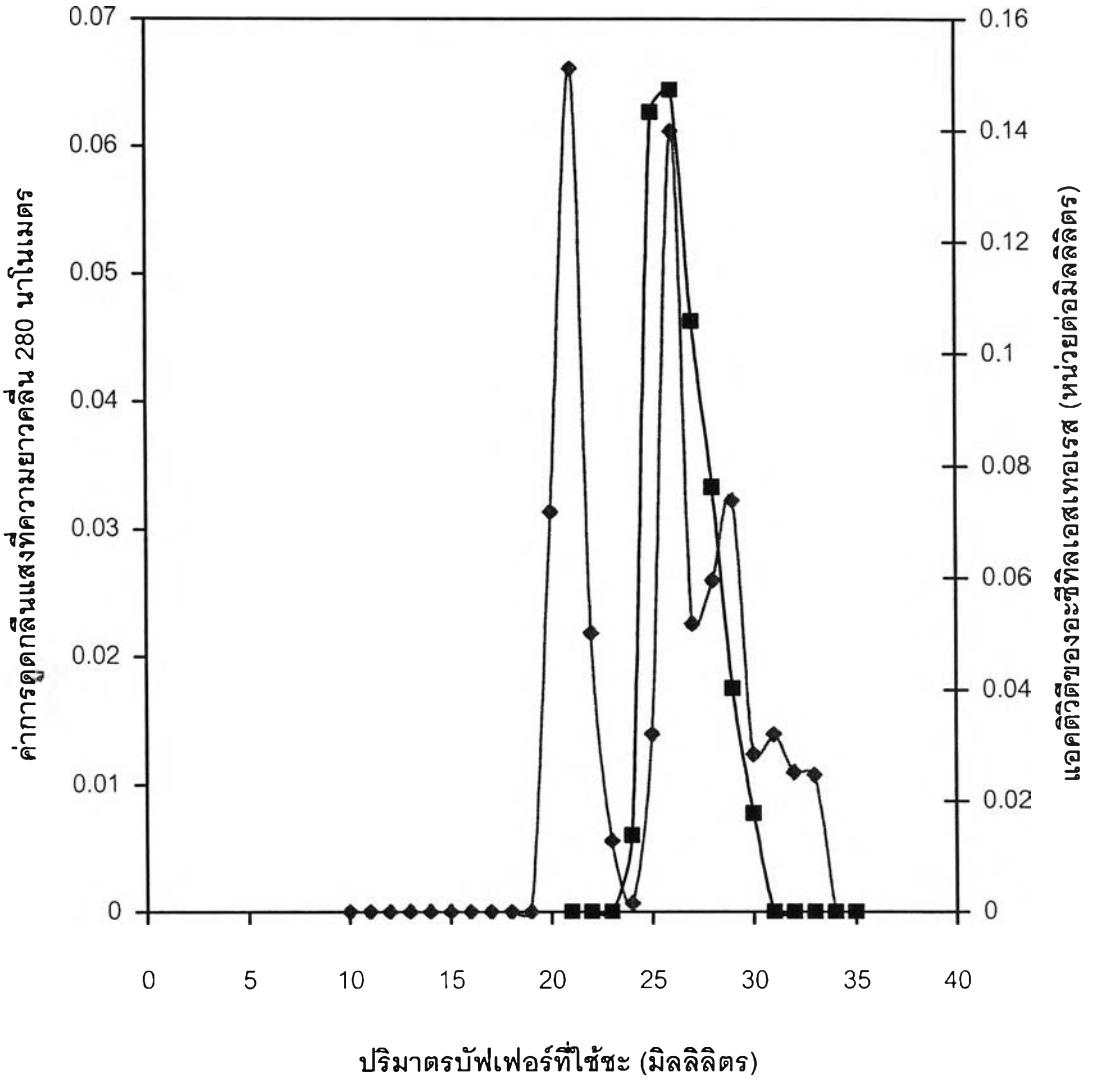
### 4.4.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสโดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์

การทดลองนี้ได้หาน้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสโดยการทำเจลฟิลเตรชัน โดยใช้โปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ได้แก่ โกลบูลิน 150,000 ดาลตัน โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 66,000 ดาลตัน โอวัลบูมิน 45,000 ดาลตัน และ ไซโตโครม ซี 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ เป็นโปรตีนมาตรฐาน ผ่านโปรตีนเหล่านี้ลงบนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกัน และภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส ติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และติดตามไซโตโครม ซี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11 เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ ได้ผลดังรูปที่ 4.12 จากกราฟดังกล่าวพบว่า อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 155,000 ดาลตัน

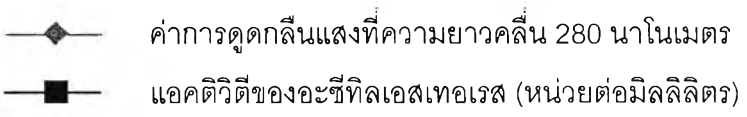


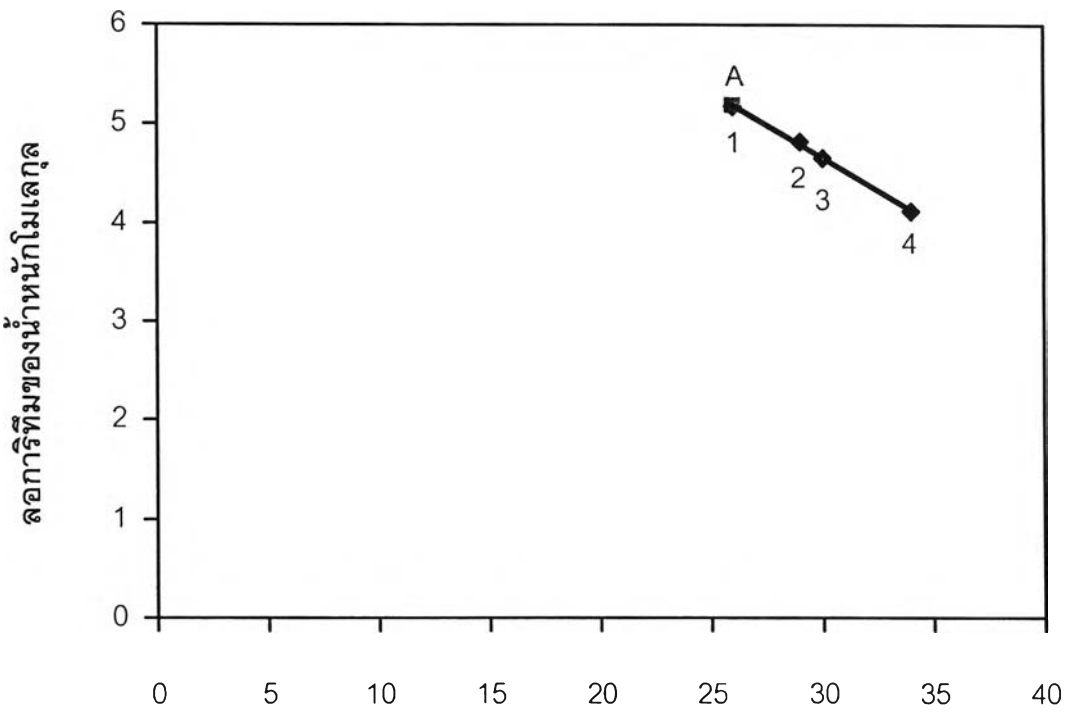

รูปที่ 4.10 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ของโปรตีนมาตรฐาน

| | | |
|---|---|---|
| โกลบูลิน | น้ำหนักโมเลกุล | 150,000 ดาลตัน |
| โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน | น้ำหนักโมเลกุล | 66,000 ดาลตัน |
| โอวัลบูมิน | น้ำหนักโมเลกุล | 45,000 ดาลตัน |
| ไซโตโครม ซี | น้ำหนักโมเลกุล | 13,237 ดาลตัน |




รูปที่ 4.11 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ของอะซีทิลเอสเทอเรส



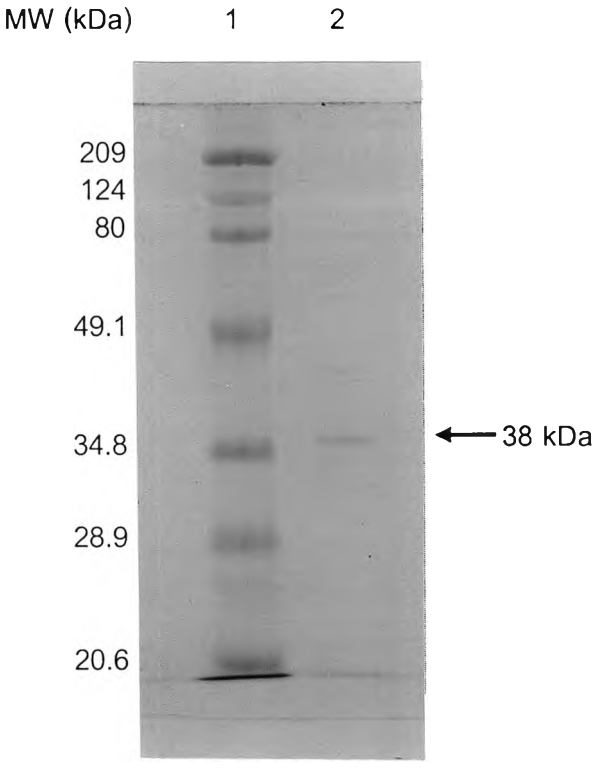



รูปที่ 4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์

| | |
|---|---|
| 1. โกลบูลิน | น้ำหนักโมเลกุล 150,000 ดาลตัน |
| 2. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน | น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน |
| 3. โอวัลบูมิน | น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน |
| 4. ไซโตโครม ซี | น้ำหนักโมเลกุล 13,237 ดาลตัน |
| A คือ อะซีทิลเอสเทอเรส | น้ำหนักโมเลกุล 155,000 ดาลตัน |

4.4.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (SDS-PAGE)

การทดลองนี้ทำโดยนำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสและติดตามการย้อมแอคติวิตี แล้วแยกออกจากเจลมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสให้แถบโปรตีนเด่นชัดเพียงแถบเดียว และจากการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่าแถบโปรตีนเด่นชัดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 ดาลตัน และเมื่อประเมินร่วมกับผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลวิธีเจลฟิลเตรชันซึ่งมีค่าประมาณ 155,000 ดาลตัน จึงคาดว่า อะซีทิลเอสเทอเรสประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 38,000 ดาลตัน ซึ่งจะให้น้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 152,000 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน



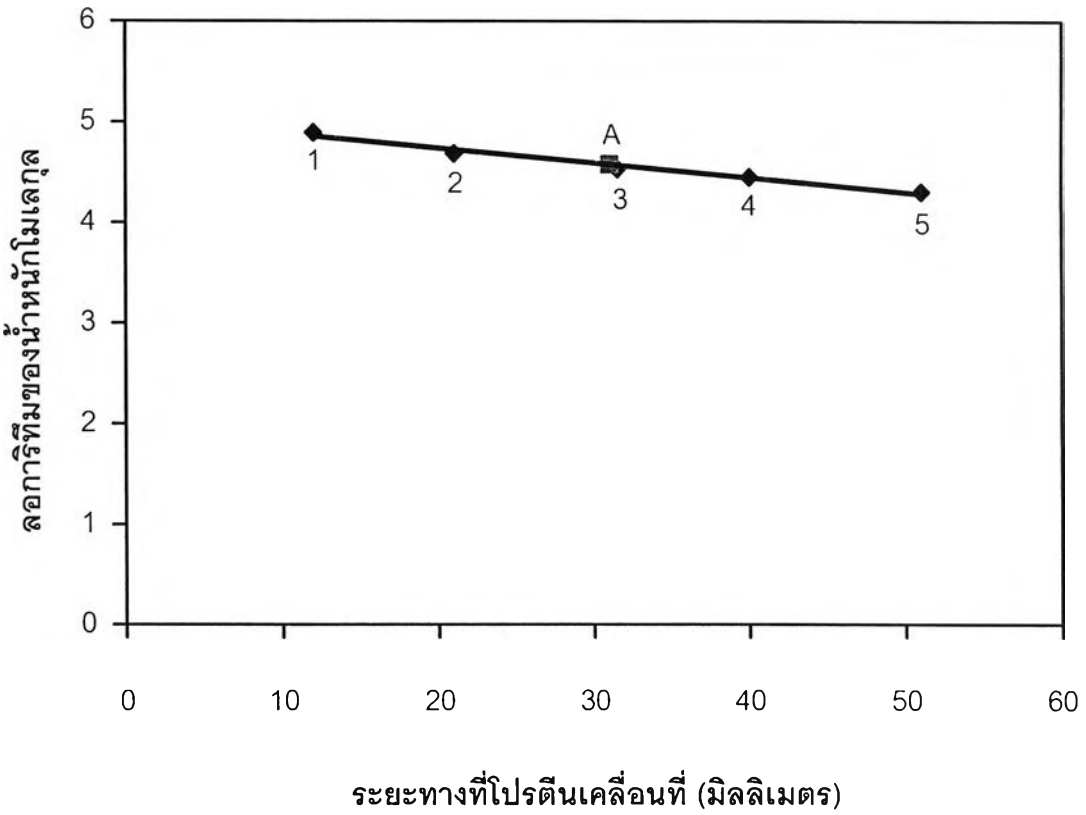

รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมล์เจล

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 อะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำอีเลคโทรโฟริซิส (2.8 ไมโครกรัม)

โปรตีนมาตรฐานได้แก่

1. ไมโอซิน (Myosin) น้ำหนักโมเลกุล 209 กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลคโตสิเดส ($\beta$-galactosidase) น้ำหนักโมเลกุล 124 กิโลดาลตัน
3. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน
4. โอวัลบูมิน (Ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 49.1 กิโลดาลตัน
5. คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 34.8 กิโลดาลตัน
6. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 28.9 กิโลดาลตัน
7. ไลโซไซม์ (Lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 20.6 กิโลดาลตัน




รูปที่ 4.14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) | น้ำหนักโมเลกุล | 80 | กิโลดาลตัน |
| 2. โอวัลบูมิน (Ovalbumin) | น้ำหนักโมเลกุล | 49.1 | กิโลดาลตัน |
| 3. คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) | น้ำหนักโมเลกุล | 34.8 | กิโลดาลตัน |
| 4. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) | น้ำหนักโมเลกุล | 28.9 | กิโลดาลตัน |
| 5. ไลโซไซม์ (Lysozyme) | น้ำหนักโมเลกุล | 20.6 | กิโลดาลตัน |
| A คือ อะซีทิลเอสเทอเรส | น้ำหนักโมเลกุล | 38.0 | กิโลดาลตัน |

## 4.5 สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

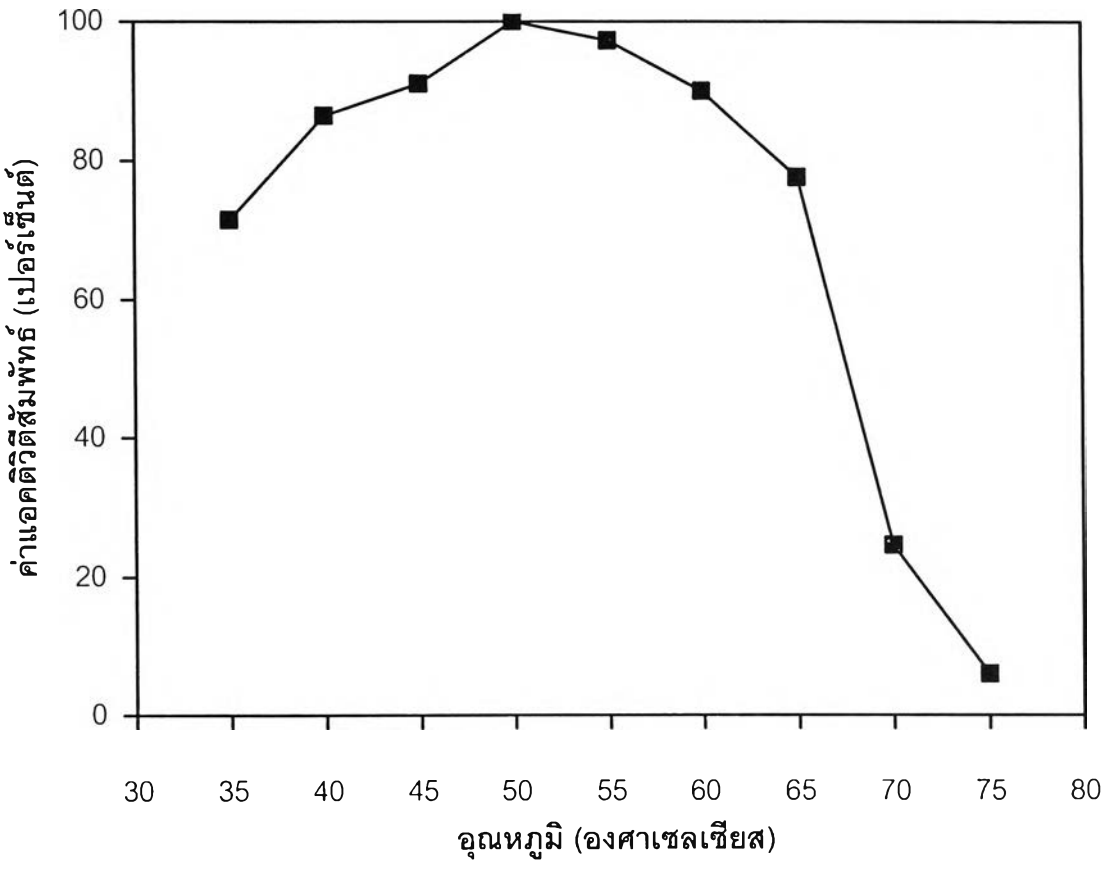
นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

### 4.5.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณเท่าๆ กัน มาหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส โดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35-75 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง 45-60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ให้แอคติวิตีสูงสุด อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงถึง 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็ยังสามารถทำงานได้เกือบ 80 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีทั้งหมด ดังรูปที่ 4.15

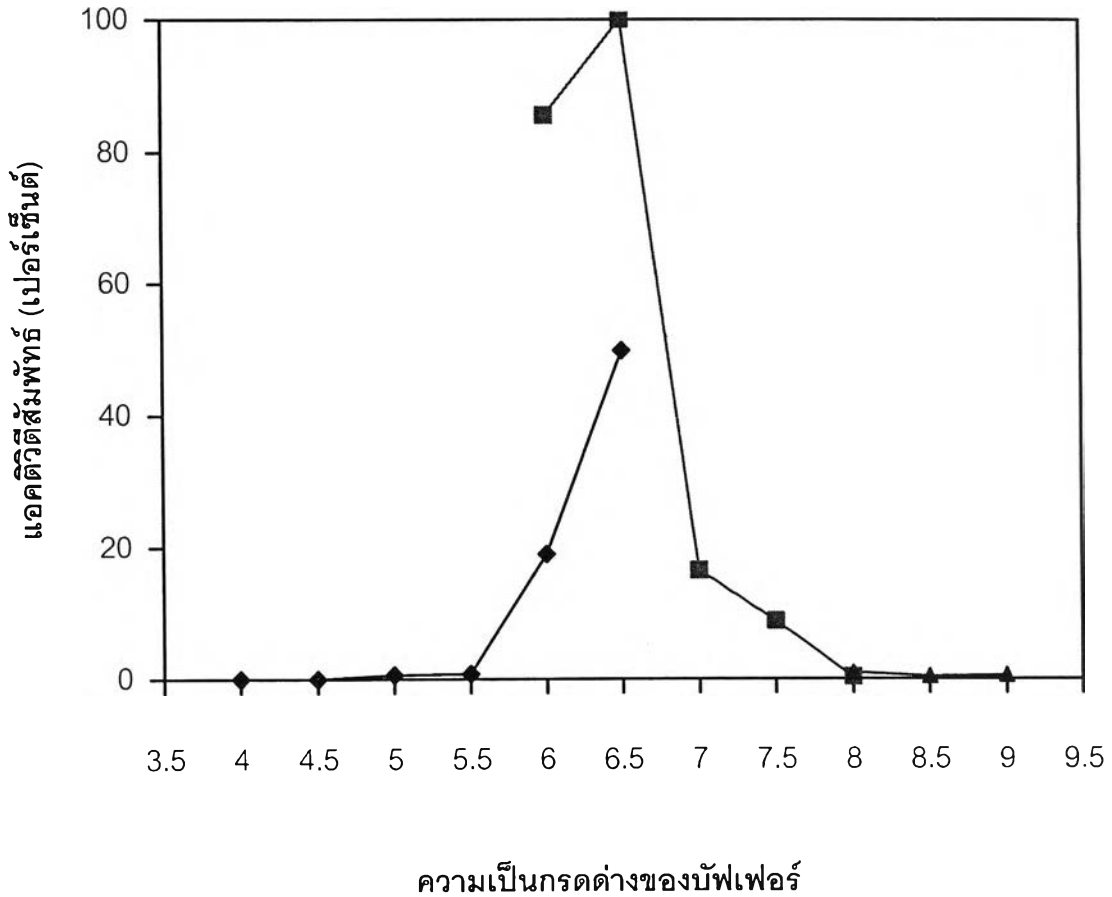
### 4.5.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.16 พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงแคบ คือ 6.0-6.5 โดยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นี้




รูปที่ 4.15 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์




รูปที่ 4.16 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

| | |
|---|---|
| อะซีเตท บัฟเฟอร์ | pH 4.0-6.5 |
| ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ | pH 6.0-8.0 |
| ทริส บัฟเฟอร์ | pH 8.0-9.0 |

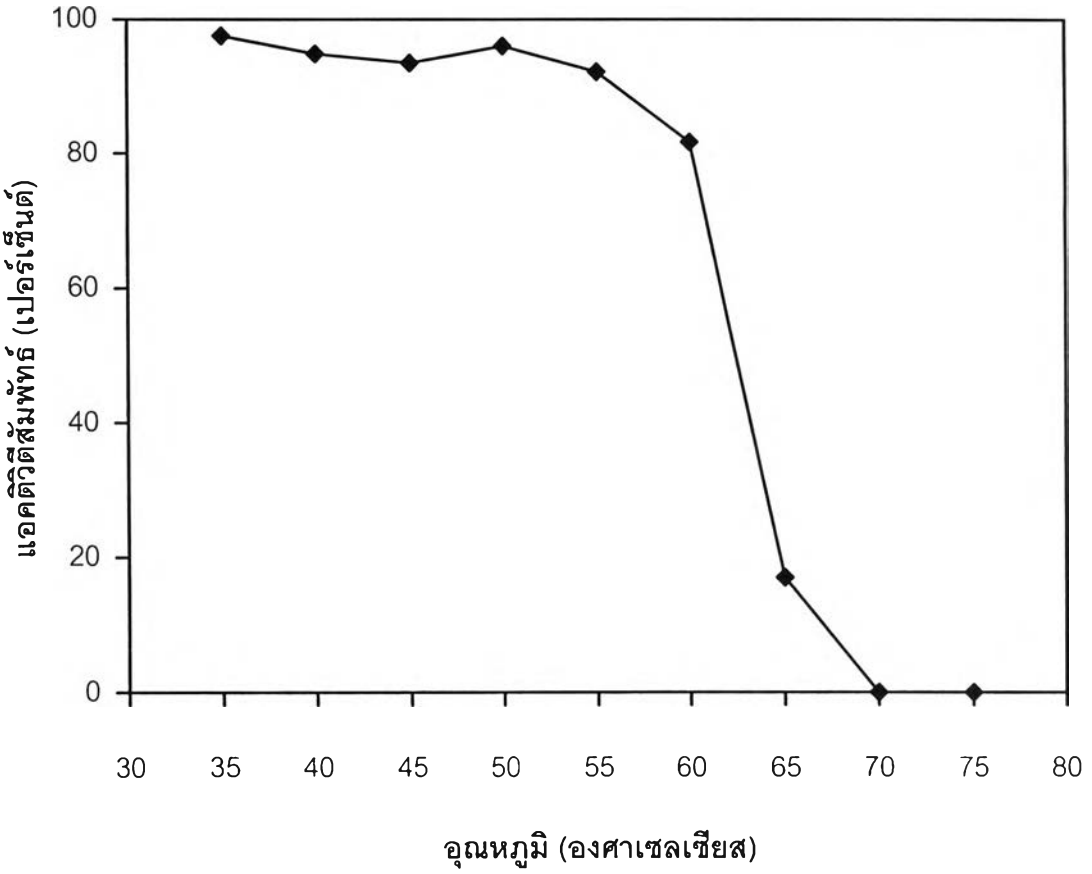
กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.5.3 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ

นำอะซีทิลเอสเทอเรสมาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 35-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

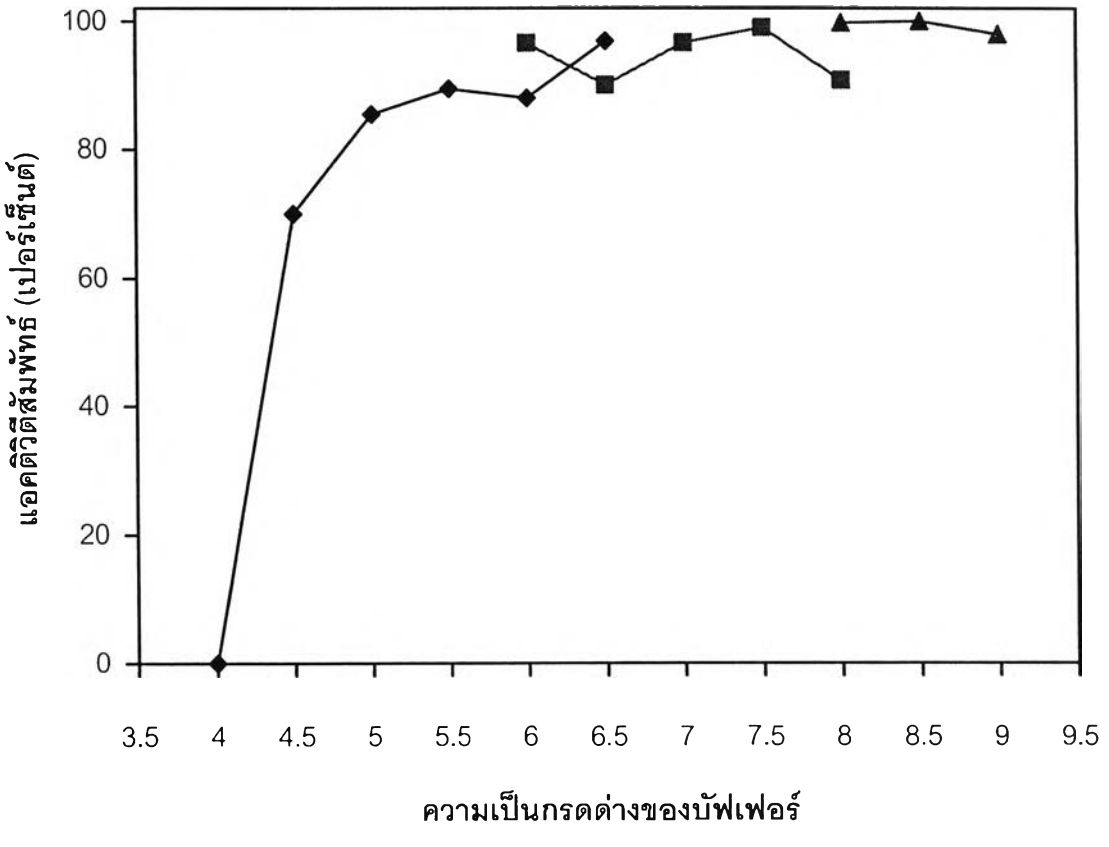
4.5.4 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มอะซีทิลเอสเทอเรสในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่แปรค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังในรูปที่ 4.18 พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0-9.0 โดยยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.5 ลงมาเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0

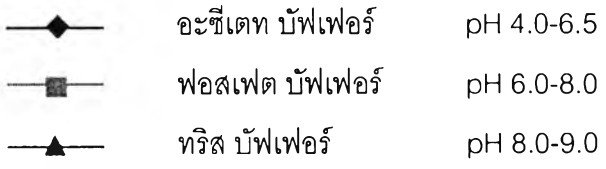



รูปที่ 4.17 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ

กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



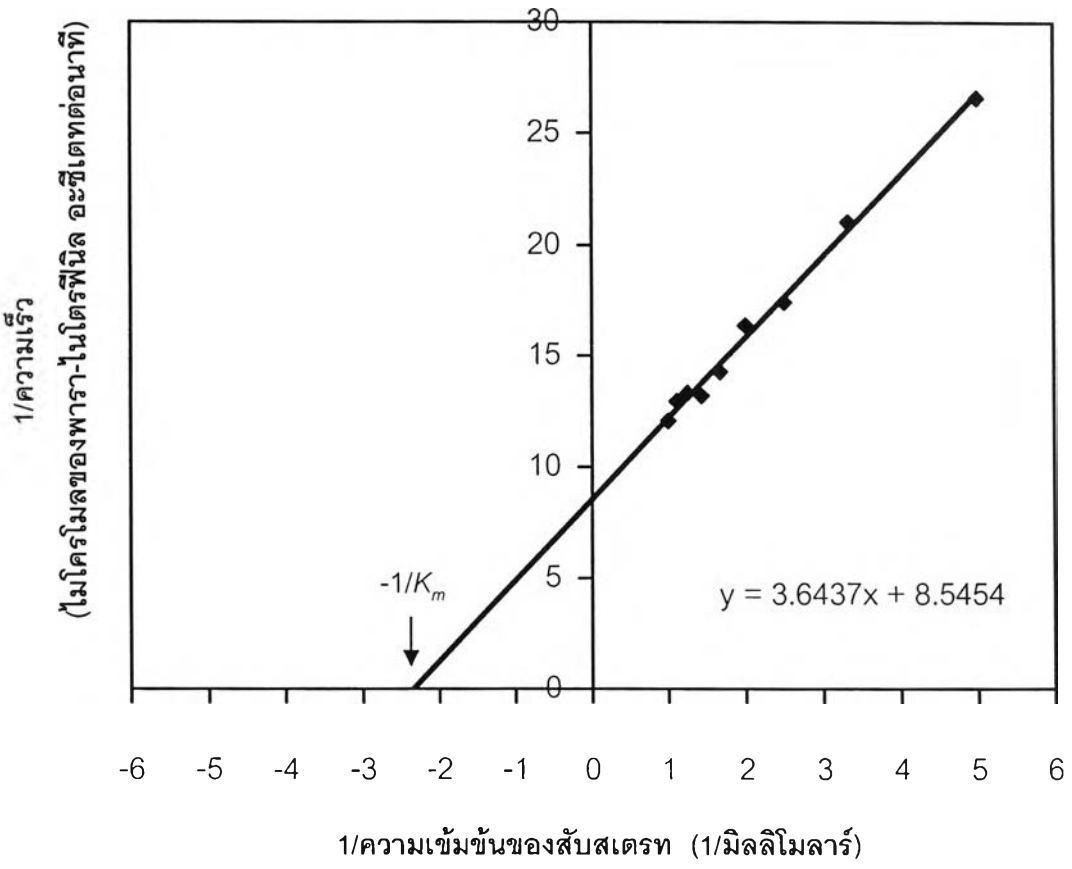

รูปที่ 4.18 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง




กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.5.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) ของอะซีทิลเอสเทอเรส

การทดลองนี้ได้ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท โดยแปรความเข้มข้นของสับสเตรทในช่วง 0.2-1.0 มิลลิโมลาร์ และจากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสมีค่า $K_m$ สำหรับพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท เท่ากับ 0.43 มิลลิโมลาร์




รูปที่ 4.19 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า $K_m$ ของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท

4.5.6 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอิออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 โดยการนำเอนไซม์มาบ่มกับอิออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ที่แปรให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า $Co^{2+}$,$Cu^{2+}$, $Hg^{2+}$ และ $Zn^{2+}$ มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ โดย $Hg^{2+}$ เป็นสารยับยั้งที่รุนแรงที่สุด โดยที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้อย่างสมบูรณ์ ส่วน $Cu^{2+}$ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ $Zn^{2+}$ มีผลยับยั้งแอคติวิตีรองลงมา

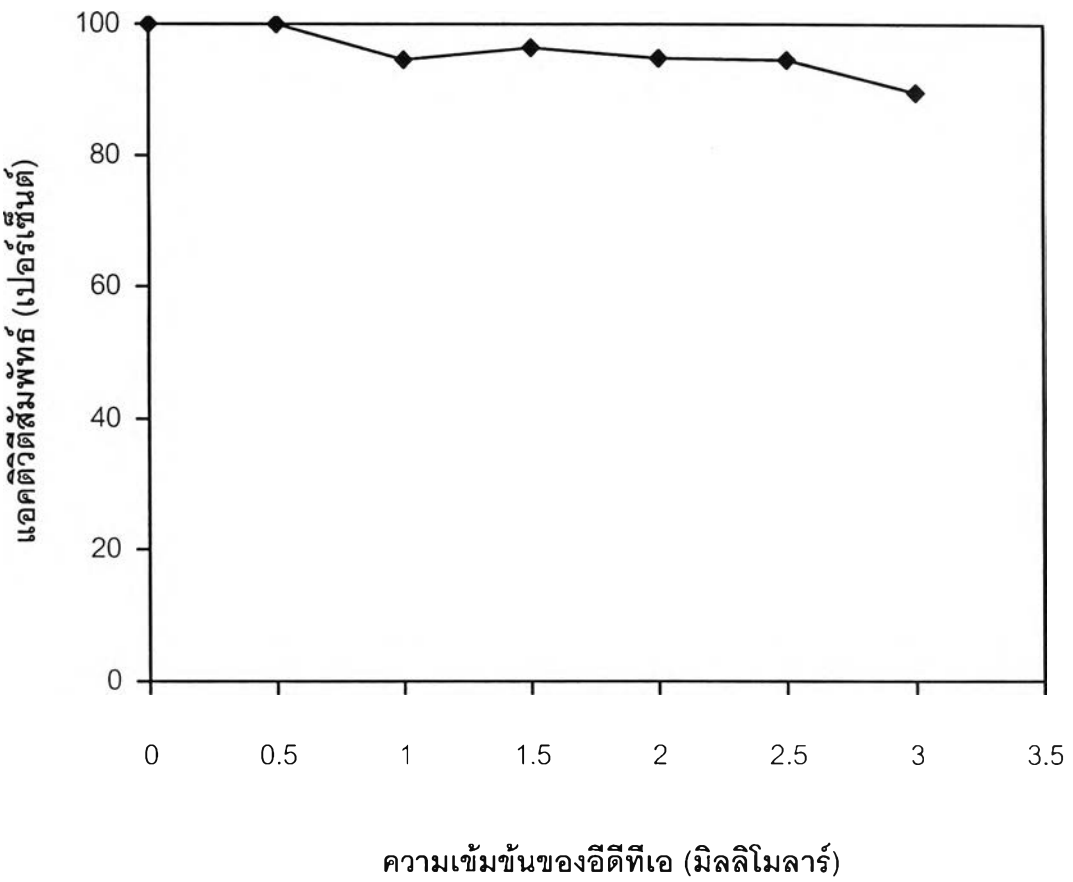
ตารางที่ 4.3 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

| ชนิดของอิออนโลหะ | แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) | | |
|---|---|---|---|
| | ความเข้มข้นของอิออนโลหะ (มิลลิโมลาร์) | | |
| | 0.1 | 1.0 | 10.0 |
| Control | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| $CaCl_2 \cdot 5H_2O$ | 97.56 | 90.94 | 91.36 |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 101.30 | 97.58 | 78.35 |
| $CuSO_4 \cdot 4H_2O$ | 10.05 | 6.31 | 0 |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 93.01 | nd | nd |
| $HgCl_2$ | 0 | 0 | 0 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 99.72 | 92.22 | 93.20 |
| $MnSO_4 \cdot H_2O$ | 97.14 | 95.14 | 85.50 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 35.55 | 17.30 | 6.71 |

nd คือ ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีสีเหลืองจึงไปรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

4.5.7 ผลของอีดีทีเอต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

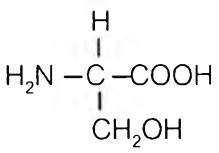
การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอีดีทีเอต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเติมอีดีทีเอลงในสารผสมปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 0.1-3.0 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.20 พบว่าอีดีทีเอมีผลยับยั้งเพียงเล็กน้อยโดยที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์นี้ไม่จำเป็นต้องใช้อิออนของโลหะเป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor)




รูปที่ 4.20 ผลของอีดีทีเอต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

4.5.8 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส เพื่อทดสอบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีกรดอะมิโนใดเป็น active site โดยการนำเอนไซม์มาบ่มกับสารดัดแปลงกรดอะมิโน ดังนี้ Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC) ดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิล (COOH), Iodoacetamide (IAM) ดัดแปลงหมู่ซีสเทอีน (cysteine) และ Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ดัดแปลงหมู่เซรีน (serine) ที่แปรความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า PMSF มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างรุนแรง โดยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองคาดว่ากรดอะมิโนเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site ของเอนไซม์ โดยรูปที่ 4.21 แสดงสูตรโครงสร้างของกรดอะมิโนเซรีน



รูปที่ 4.21 สูตรโครงสร้างของกรดอะมิโนเซรีน (Serine)

ตารางที่ 4.4 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

| ชนิดของสารดัดแปลงกรดอะมิโน | แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) | |
|---|---|---|
| | ความเข้มข้นของสารดัดแปลงกรดอะมิโน (มิลลิโมลาร์) | |
| | 1.0 | 10.0 |
| Control | 100 | 100 |
| Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC) | 101.08 | 82.04 |
| Iodoacetamide (IAM) | 93.23 | 98.96 |
| Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) | 109.02 | 59.32 |

4.5.9 การตรวจสอบแอคติวิตีข้างเคียง (side activity) ต่อสับสเตรทต่าง ๆ ของอะซีทิลเอสเทอเรส

การทดลองนี้ได้นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบแอคติวิตีข้างเคียงต่าง ๆ โดยแสดงเป็นแอคติวิตีจำเพาะต่อสับสเตรทต่าง ๆ ตามวิธีการในข้อ 3.3.10.9 ได้ผลดังตารางที่ 4.5 พบว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl acetate สูงสุด โดยมีแอคติวิติจำเพาะเท่ากับ 9.81 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนั้นยังพบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl $\alpha$-L-arabinofuranoside และไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่ำมาก คือ 0.02 และ 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และค่าแอคติวิตีต่อ *p*-nitrophenyl $\beta$-D-xylopyranoside sodiumcarboxymethyl cellulose และไซแลนจากไม้เบิร์ช เท่ากับ 0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งจัดได้ว่าอะซีทิลเอสเทอเรสที่เตรียมได้นี้มีความบริสุทธิ์มากโดยมีแอคติวิตีของไซแลเนสและแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสน้อยมาก และไม่พบแอคติวิตีของเซลลูเลสและบีตา-ไซโลสิเดสในเอนไซม์เลย

ตารางที่ 4.5 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ของอะซีทิลเอสเทอเรส

| สับสเตรท | แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน) | แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|
| *p*-nitrophenyl acetate | 9.81 | 100 |
| *p*-nitrophenyl $\alpha$-L-arabinofuranoside | 0.02 | 0.20 |
| *p*-nitrophenyl $\beta$-D-xylopyranoside | 0 | 0 |
| sodiumcarboxymethyl cellulose | 0 | 0 |
| ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต | 0.01 | 0.10 |
| ไซแลนจากไม้เบิร์ช | 0 | 0 |

4.5.9 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนปลายสายเอ็น ($NH_2$-terminal)

จากการนำเอนไซม์ที่เตรียมโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซีส ซึ่งได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มาก ดังแสดงในรูปที่ 4.9 มีปริมาณโปรตีน 0.101 มิลลิกรัม ไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนปลายสายเอ็น สามารถวิเคราะห์ได้กรดอะมิโนบางส่วน ดังแสดงในรูปที่ 4.22

M – A – S – x – N – x – N

รูปที่ 4.22 แสดงลำดับกรดอะมิโนตรงปลายสายเอ็น

M คือ methionine (Met)

A คือ alanine (Ala)

S คือ serine (Ser)

N คือ asparagine (Asn)

x คือ ไม่ทราบ

## 4.6 การทำงานร่วมกันของอะซีทิลเอสเทอเรส บีตา-ไซโลสิเดส และไซแลเนส

มีรายงานเกี่ยวกับอะซีทิลเอสเทอเรสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ย่อยสลายสายหลักของไซแลนทำให้การย่อยสลายไซแลนเกิดได้ดีขึ้น (Biely และคณะ, 1986) การทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ร่วมกับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

### 4.6.1 การเตรียมบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

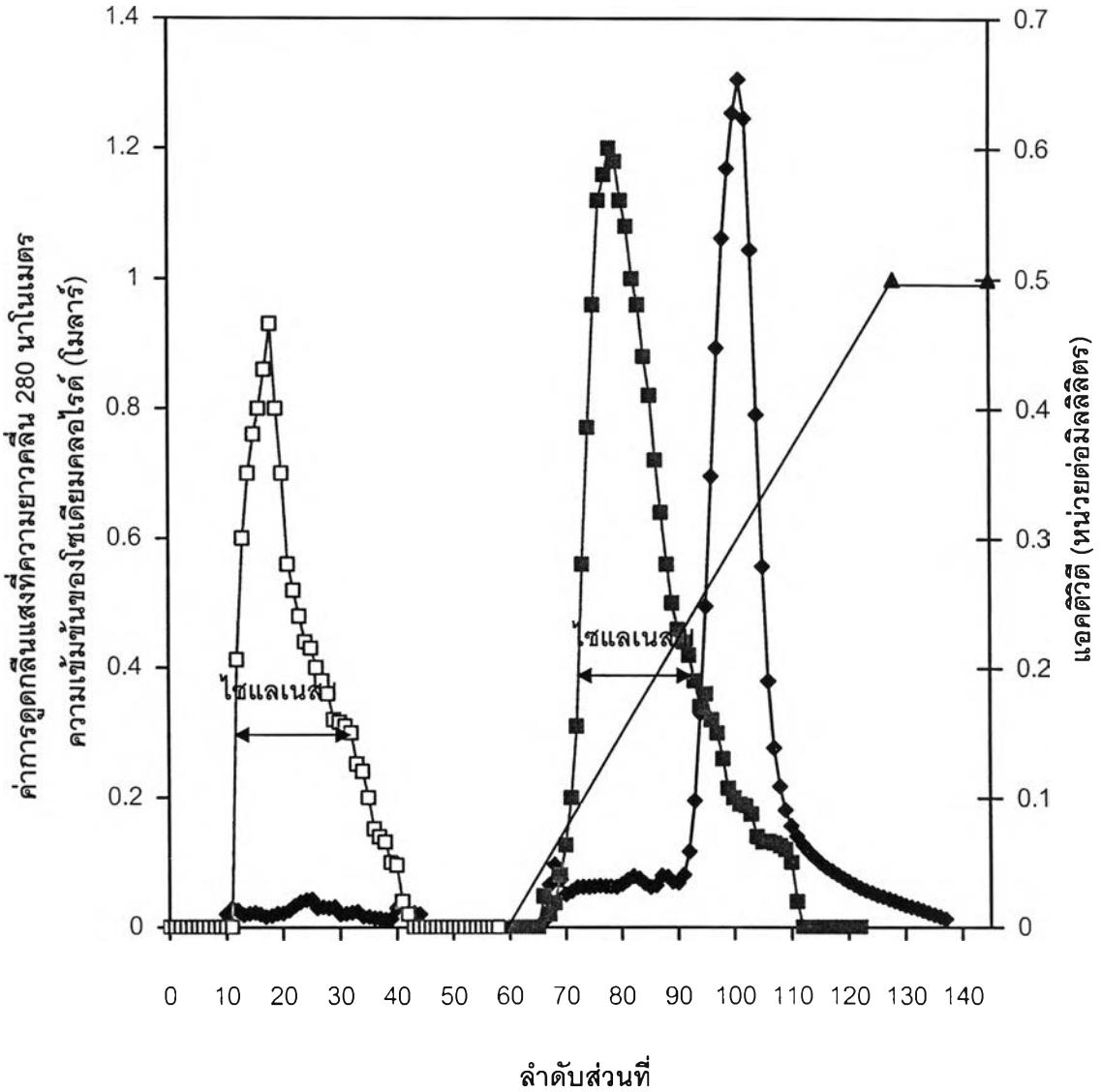
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม ซึ่งมี 0.75 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตบีตา-ไซโลสิเดส ดังวิธีการในข้อ 3.3.11.1.2 ตามรายงานของทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544) รวมทั้งการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 3.3.11.1.3 พบว่า *Streptomyces* sp. CH 7 สามารถผลิตบีตา-ไซโลสิเดสได้ 3.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.88 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน บีตา-ไซโลสิเดสที่เตรียมได้นี้จะนำไปทดลองในขั้นตอนการทำงานร่วมกันกับไซแลเนส และอะซีทิลเอสเทอเรส

### 4.6.2 การเตรียมไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

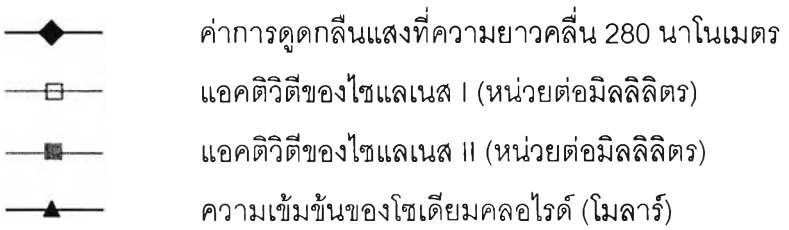
เลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม ที่มี 0.75 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้ภาวะเหมาะสม เพื่อผลิตไซแลเนสตามรายงานของ Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn (2000) ตามวิธีการในข้อ 3.3.11.2.1 พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตไซแลเนสได้ 2.13 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ เนื่องจาก *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตได้ทั้งไซแลเนสและอะซีทิลเอสเทอเรสและปล่อยออกมานอกเซลล์ แม้การใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอนจะชักนำการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสได้เพียงเล็กน้อย (เวฬุรีย์ ทองคำ, 2547) ในการศึกษาผลของการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองนี้ จึงจำเป็นต้องเตรียมไซแลเนสกึ่งบริสุทธิ์ที่ปลอดการปนเปื้อนของอะซีทิลเอสเทอเรส ซึ่งทำได้โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 80

เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ซึ่งแยกได้ไซแลเนส I และไซแลเนส II ดังแสดงในรูปที่ 4.23 และได้สรุปผลการเตรียมไซแลเนสทั้ง 2 ชนิด ในตารางที่ 4.6

ไซแลเนส II มีแอคติวิตีรวมทั้งหมดเท่ากับ 37.15 หน่วย และตรวจไม่พบแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ดังนั้นจึงเลือกไปศึกษาการทำงานร่วมกันกับเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดส และอะซีทิลเอสเทอเรสในขั้นตอนต่อไป ส่วนไซแลเนส I มีแอคติวิตีรวมทั้งหมด 1.08 หน่วย ซึ่งปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอที่จะนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป




รูปที่ 4.23 การทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ซะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง




สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 ขั้นตอนการเตรียมไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

| ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ | ปริมาตร (มล.) | แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย) | โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อ มก.โปรตีน) | เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีของไซแลเนส | ความบริสุทธิ์ของไซแลเนส (เท่า) | แอคติวิตีทั้งหมดของอะซีทิลเอสเทอเรส (หน่วย) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สารสกัดเอนไซม์ | 250.00 | 532.50 | 482.50 | 1.10 | 100 | 1.00 | 22.50 |
| ตกตะกอนด้วย 80 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต | 13.00 | 188.63 | 78.91 | 2.39 | 35.42 | 2.17 | 3.97 |
| แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี | | | | | | | |
| - ไซแลเนส I | 4.00 | 1.08 | 1.84 | 0.59 | 0.20 | 0.54 | 0 |
| - ไซแลเนส II | 5.00 | 37.15 | 13.00 | 2.86 | 6.98 | 2.60 | 0 |

4.6.3 ผลของอะซีทิลเอสเทอเรสในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไซแลนจากไม้เบิร์ชของไซแลเนส II ร่วมกับบีตา-ไซโลสิเดส

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าการเติมอะซีทิลเอสเทอเรสมีผลทำให้ไซแลเนส II มีประสิทธิภาพในการทำงานเพิ่มขึ้นประมาณ 10.42 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่บีตา-ไซโลสิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสายหลักของไซแลนจากปลายนอนรีดิวซ์มีผลเสริมการทำงานของไซแลเนส II โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นประมาณ 35.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้อะซีทิลเอสเทอเรสทำงานร่วมกับไซแลเนส II และบีตา-ไซโลสิเดส พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนได้ดียิ่งขึ้น โดยให้ประมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 70.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นสูงสุดประมาณ 46.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการใช้ไซแลเนส II เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.7 ผลของการทำงานร่วมกันของแอคติวิตีอะซีทิลเอสเทอเรส บีตา-ไซโลสิเดส และไซแลเนส II ในการย่อยไซแลนจากไม้เบิร์ช

| ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร): เทียบเท่ากับน้ำตาลไซโลส |
|---|---|
| อะซีทิลเอสเทอเรส (0.3) | 2.50 |
| บีตา-ไซโลสิเดส (0.2) | 16.88 |
| ไซแลเนส II (0.01) | 47.90 |
| ไซแลเนส II (0.01) + อะซีทิลเอสเทอเรส (0.3 ) | 52.89 |
| ไซแลเนส II (0.01) + บีตา-ไซโลสิเดส (0.2) | 64.69 |
| ไซแลเนส II (0.01) + บีตา-ไซโลสิเดส (0.2) + อะซีทิลเอสเทอเรส (0.3) | 70.08 |

ผลการศึกษาสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. PC 22 ได้สรุปดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. PC22

| สมบัติของเอนไซม์ | อะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. PC22 |
|---|---|
| 1. น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน | 155,000 ดาลตัน |
| 2. น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE | 38,000 ดาลตัน (4 หน่วยย่อย) |
| 3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน | 50 องศาเซลเซียส |
| 4. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน | 6.5 |
| 5. ความเสถียรต่ออุณหภูมิ | 55 องศาเซลเซียส |
| 6. ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง | 5.0-9.0 |
| 7. ค่า $K_m$ ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท | 0.43 มิลลิโมลาร์ |
| 8. อิออนยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ | $Hg^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Zn^{2}$, และ $Co^{2+}$ |