หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. 43-4 และการเตรียมบีตา-ไซโลซิเดส

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อผลิตบีตา-ไซโลซิเดส ตามวิธีการในหน้า 31 รวมทั้งการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในหน้า 32 พบว่า *Streptomyces* sp. 43-4 สามารถผลิตบีตา-ไซโลซิเดสได้ 0.84 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การทำบีตาไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์

1. การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลซิเดส

นำบีตา-ไซโลซิเดสที่เตรียมได้มาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตตามลำดับคือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 เปอร์เซนต์ นำแต่ละลำดับส่วนไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส พบว่ามีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสครอบคลุมอยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 เปอร์เซนต์ ดังผลการทดลองในตารางที่ 7 ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไปจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซนต์ ในการตกตะกอนบีตา-ไซโลซิเดส

ตารางที่ 7 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลซิเดส

ลำดับส่วนของแอมโมเนียม-ซัลเฟต	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)	เปอร์เซนต์แอคติวิตี (เปอร์เซนต์)
สารสกัดเอนไซม์	178.37	860.25	0.21	100.00
0-20 %	0.56	2.54	0.22	0.32
20-30 %	0.36	1.89	0.19	0.18
30-40 %	0.90	4.55	0.20	0.50
40-50 %	4.24	10.37	0.41	2.38
50-60 %	55.44	55.00	1.01	31.08
60-70 %	28.95	60.95	0.48	16.23
70-80 %	4.61	29.38	0.16	2.58

2. การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

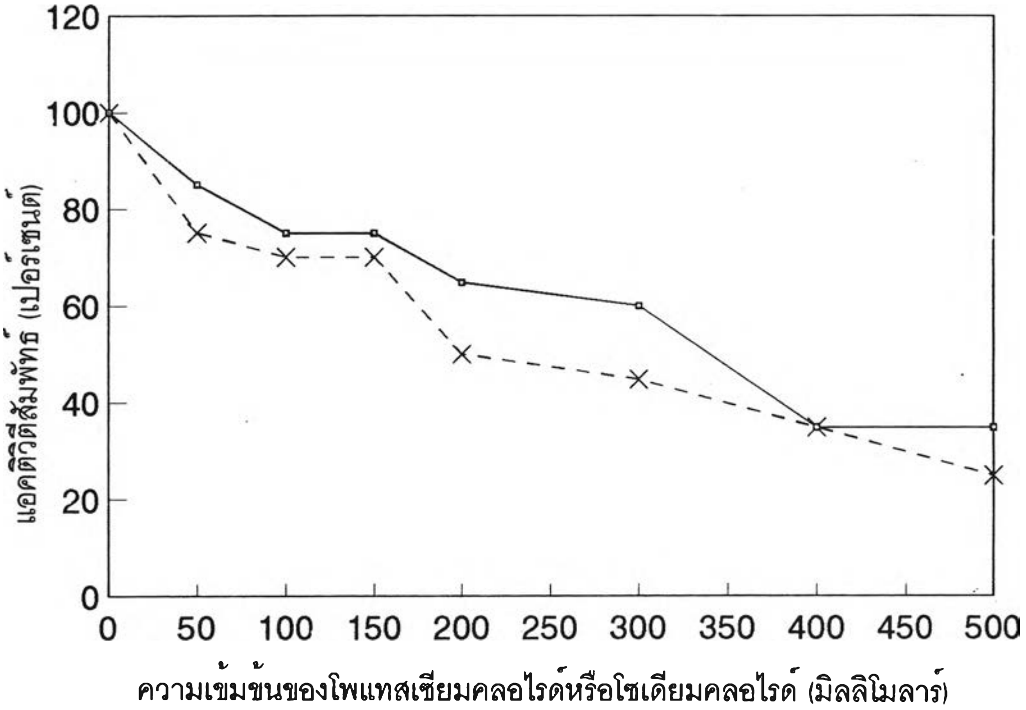
สกัดแยกและเตรียมบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ตามวิธีการในหน้า 31 ได้แอคติวิตีรวมทั้งหมด 1244.00 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1476.00 มิลลิกรัม และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.84 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80 เปอร์เซนต์ พบว่ามีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 1.23 เท่า เมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้นและยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 53.96 เปอร์เซนต์

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.1 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคนั้น การชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ทำโดยใช้สารละลายของเกลือที่มีความเข้มข้น ต่างๆ กัน สารละลายที่นิยมใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือทั้ง 2 ชนิดต่อแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส

จากการใช้บีตา-ไซโลซิเดส ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซนต์ ปริมาณเท่าๆกันคือ 4.80 หน่วย บมกับซับสเตรทและโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ พบว่าโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากขึ้น ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ สามารถยับยั้งแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสได้ประมาณ 75 และ 65 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังพบว่าโซเดียมคลอไรด์สามารถยับยั้งการทำงานของบีตาไซโลซิเดสได้มากกว่าโพแทสเซียมคลอไรด์ ดังผลการทดลองในรูปที่ 5 ดังนั้นในการทำให้บีตา-ไซโลซิเดสบริสุทธิ์ด้วยดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส จึงเลือกใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เกรเดียนชะโปรตีนที่จับกับเจล



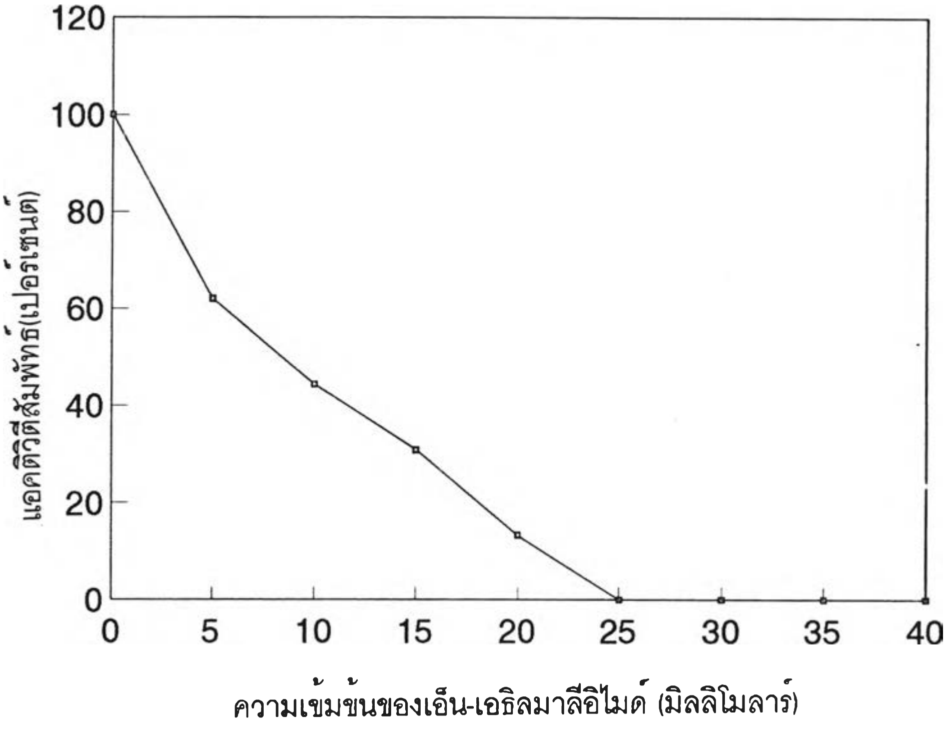
รูปที่ 5 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส ตรวจหาแอคติวิตีโดยบ่มบีตา-ไซโลซิเดสกับซับสเตรทและโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 34

-×- โพแทสเซียมคลอไรด์

-□- โซเดียมคลอไรด์

3.2 ผลของ เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

ในการทดลองเบื้องต้นของการทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์ ประสบปัญหาเกี่ยวกับความไม่เสถียรของเอนไซม์ระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าว อาจมีหมู่ active site ประกอบด้วยหมู่ไธออล (thiol, -SH group) ซึ่งจะสูญเสียประสิทธิภาพได้ง่ายโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศ การทดลองนี้เพื่อทดสอบว่า เอนไซม์ดังกล่าวมีหมู่ไธออล เป็น active site หรือไม่ จึงได้นำเอนไซม์มาบ่มกับสารประกอบ sulfhydryl agent คือ เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide) ซึ่งทำหน้าที่เอธิลเลท (ethylate) หมู่ไธออล (Voet and Voet, 1990) ผลการทดลองโดยการนำบีตา-ไซโลซิเดสในปริมาณเท่าๆกันคือ 3.24 หน่วย บ่มในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-40 มิลลิโมลาร์และนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่เหลืออยู่ ดังวิธีการทดลองในหน้า 33 พบว่า เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิ-เดสได้ โดยความเข้มข้นของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ที่เพิ่มขึ้น สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสได้มากขึ้นด้วย และเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส ได้ 100 เปอร์เซนต์ ดังผลการทดลองในรูปที่ 6

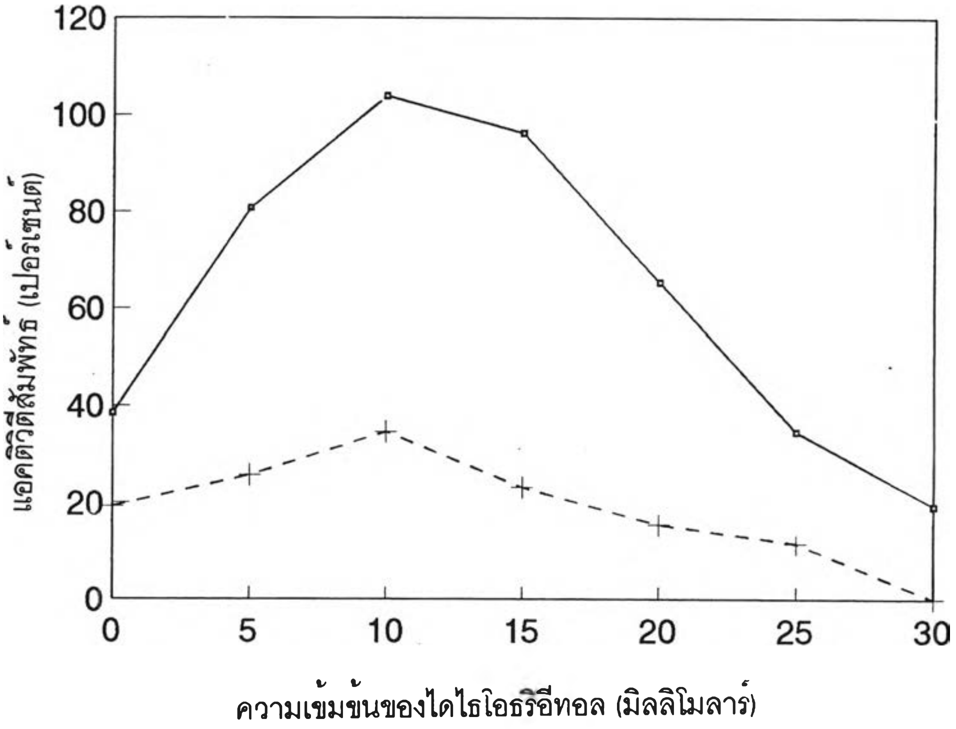


รูปที่ 6 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส โดยบ่มบีตา-ไซโลซิเดสในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ความเข้มข้นต่างๆ ดังระบุใต้รูป นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 34

3.3 <u>ผลของของไดไธโอธรีอีทอลในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์</u>

เพื่อยืนยันว่าบีตา-ไซโลซิเดสมีหมู่ไธออลเป็น active site จริง จึงได้นำเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์มาเติมไดไธโอธรีอีทอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบความสามารถในการกลับคืนของหมู่ไธออล ผลการทดลองโดยการใช้บีตา-ไซโลซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซนต์ ในปริมาณเท่าๆกันคือ 1.25 หน่วย บ่มในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ความเข้มข้น 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติมไดไธโอธรีอีทอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-30 มิลลิโมลาร์ ดังวิธีการทดลองในหน้า 34 พบว่าไดไธโอธรีอีทอล สามารถกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ได้ โดยสามารถกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการบ่มในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ได้มากกว่าเมื่อบ่มที่ 25 มิลลิโมลาร์ และเมื่อใช้ไดไธโอธรีอีทอลความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสได้มากที่สุดถึง 103.87 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับบีตา-ไซโลซิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ดังรูปที่ 7

ดังนั้น จากผลการทดลองข้างต้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงจะเติมไดไธโอธรีอีทอลในบัฟเฟอร์ที่แขวนลอยเอนไซม์ สำหรับการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคจะเลือกใช้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์



รูปที่ 7 ความสามารถของไดไธโอธริอีทอล ในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ โดยบ่มบีตา-ไซโลซิเดสในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ เข้มข้น 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมไดไธโอธริอีทอลความเข้มข้นต่างๆดังระบุใต้รูป บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จึงนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือ ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 34

—○— บ่มใน 15 มิลลิโมลาร์ เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์

—+— บ่มใน 25 มิลลิโมลาร์ เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์

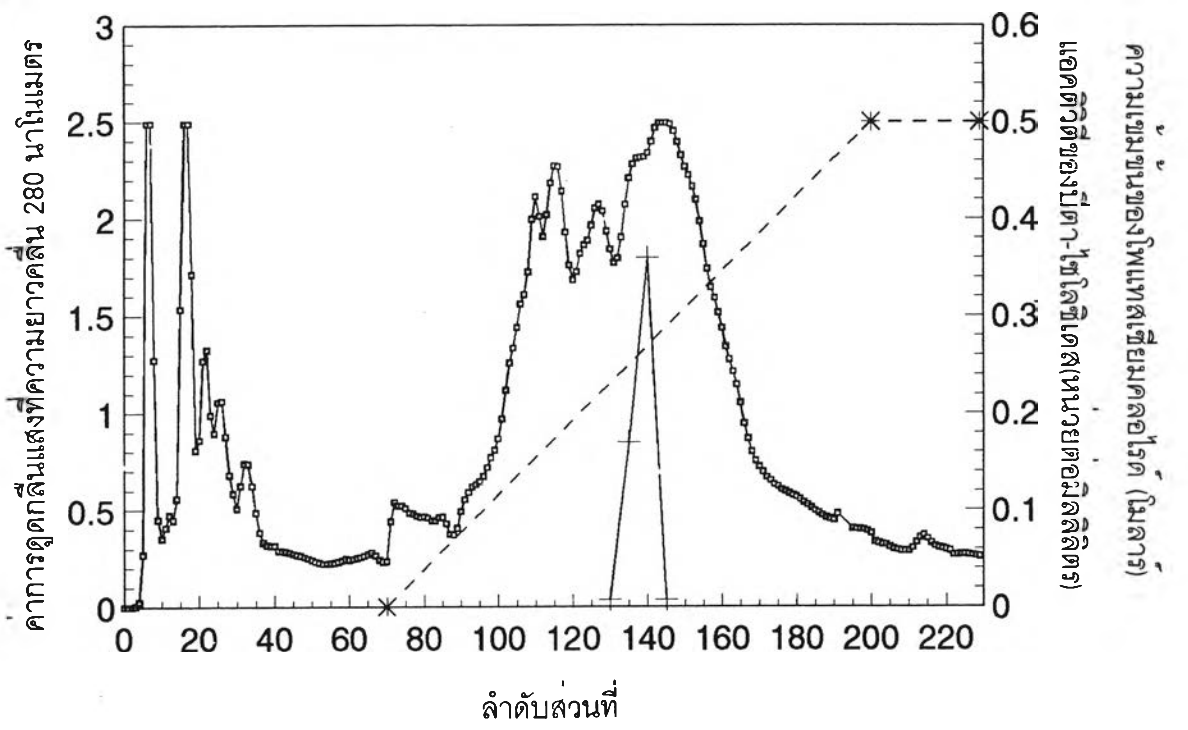
3.4 <u>โครมาโตรกราฟีบนดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส</u>

นำโปรตีนปริมาณ 651.00 มิลลิกรัม ซึ่งได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซนต์ ละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ dithiothreitol และผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตรกราฟีบนดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคลบ (anion exchanger) ดังวิธีการในบทที่ 2 หน้า 35 พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางนี้ ดังนั้นจึงสามารถกำจัดโปรตีนอื่นที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไปและยังสามารถกำจัดโปรตีนที่มีประจุต่างกับเอนไซม์มากๆออกโดยการชะด้วยเกรเดียนท์ของโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 8 พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 130-145 ซึ่งมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์ 240-280 มิลลิโมลาร์ เมื่อรวบรวมลำดับส่วนที่ 130-145 เข้าด้วยกันกำจัดโพแทสเซียมคลอไรด์ออกพร้อมทั้งทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน โดยชะด้วย 5 เท่าของสารละลาย 100 มิลลิ-โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอล และสุดท้ายให้ได้ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร วัดแอคติวิตีรวมของบีตา-ไซโลซิเดสได้เท่ากับ 250.00 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 37.80 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 7.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.46 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 20.82 เปอร์เซนต์

3.5 <u>โครมาโตรกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200</u>

การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ อาศัยหลักการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกันออกโดยนำมาผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200 ดังวิธีการในบทที่ 2 หน้า 34 นำโปรตีนที่ได้จากการทำโครมาโตกราฟีบนดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ได้ผลดังรูปที่ 9 พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 35-60 และเมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกันวัดแอคติวิตีรวมของบีตา-ไซโลซิเดสได้ 123.60 หน่วยปริมาณโปรตีน 14.56 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 8.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.54 เท่าและยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 9.94 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 8 ได้แสดงสรุปขั้นตอนทั้งหมดในการทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์

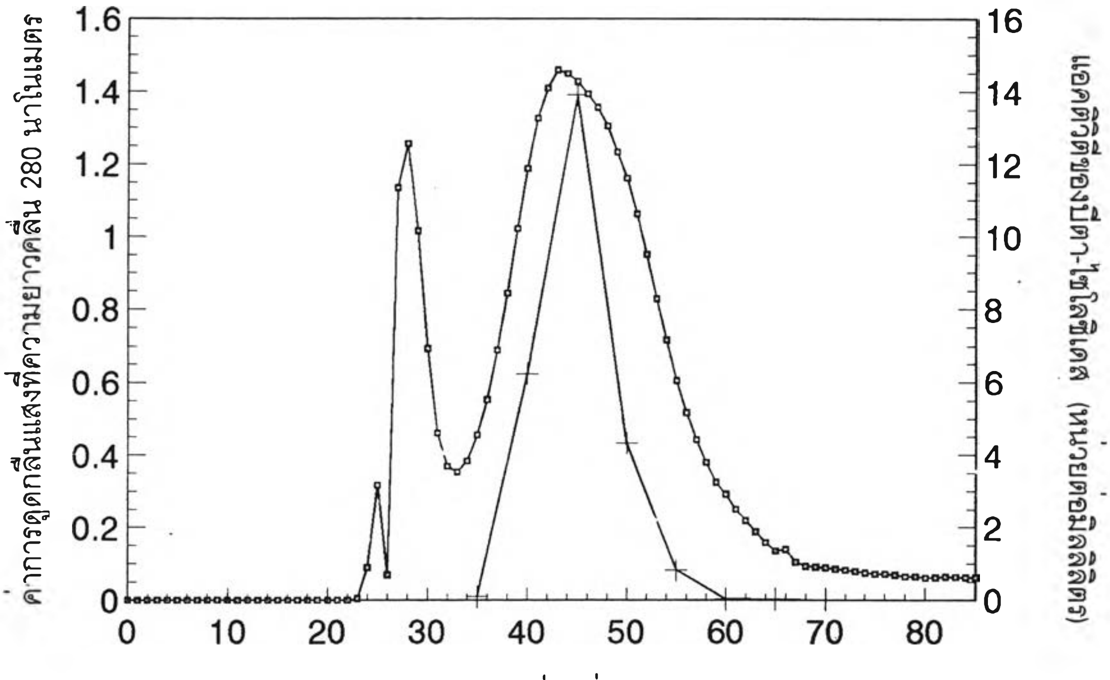


รูปที่ 8 การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเอดี ไบโอเจล-อกาโรส ขนาด 1.6 x 50 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ผสม 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอลและ 0-500 มิลลิโมลาร์โพแทสเซียมคลอไรด์เกรเดียน .น 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ไดไธโอธริอีทอลผสมอยู่ ด้วยอัตราการไหล 48 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 5 มิลลิลิตร ดังบรรยายในบทที่2 หน้า 34

—□— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

—+— แอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส

—✳— ความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์



รูปที่ 9 การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200 โดยใช้โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส ผ่านลงในคอลัมน์ขนาด 1.6 x 50 เซนติเมตร ชะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธรีอีทอล ผสมอยู่ ด้วยอัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 1 มิลลิลิตร ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 34

—○— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

—+— แอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส

ตารางที่ 8 สรุปขั้นตอนการทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)	เปอร์เซนต์แอคติวิตี (เปอร์เซนต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
1. สารสกัดเอนไซม์	200.00	1244.00	1476.00	0.84	100.00	1.00
2. ตกตะกอนด้วย 40-80 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมซัลเฟต	7.00	671.30	651.00	1.03	53.96	1.23
3. ดีอีเออี ไบโอเจล อกาโรส	4.00	259.00	37.80	7.11	20.82	8.46
4. เซฟาเด็กซ์ จี 200	14.00	123.60	14.56	8.01	9.94	9.54

<u>การศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp.43-4</u>

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่างๆ ดังต่อไปนี้

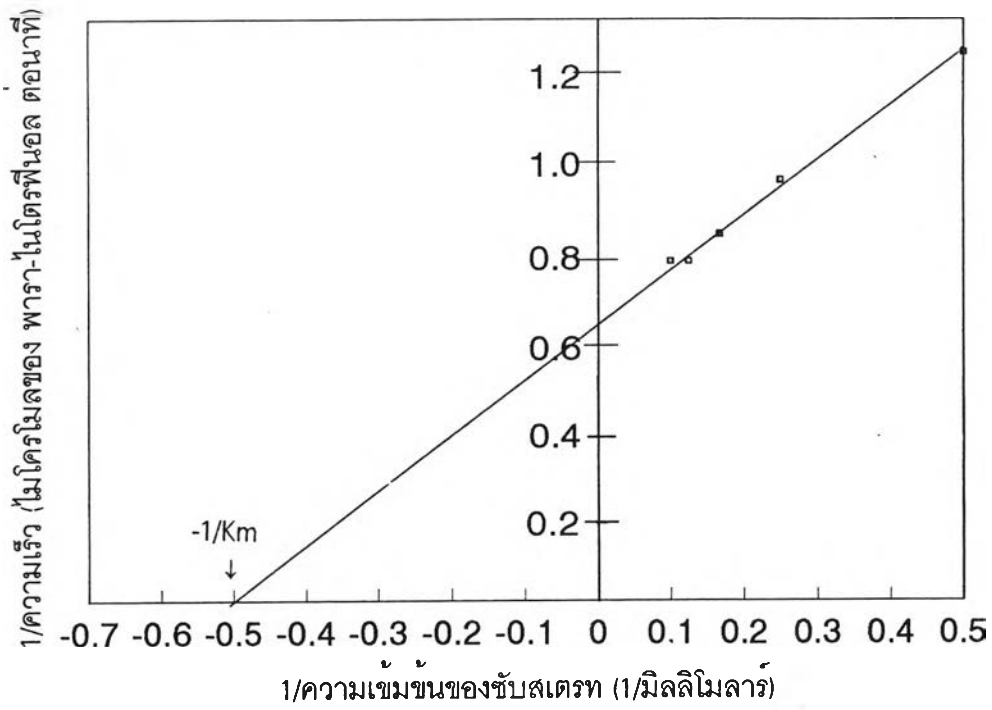
1. <u>ความจำเพาะต่อซับสเตรท</u>

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อตรวจสอบความจำเพาะของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ต่อซับสเตรท ไซโลไพราโนไซด์สังเคราะห์ที่เชื่อมกับพารา-ไนโตรฟีนอล หรือออร์โธ-ไนโตรฟีนอลซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวแทนของไซโลไบโอส ที่มีองค์ประกอบเป็นไซโลสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ บีตา-1,4 ที่ไม่มีโซ่กิ่งที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 และมีโซ่กิ่งที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 ตามลำดับ

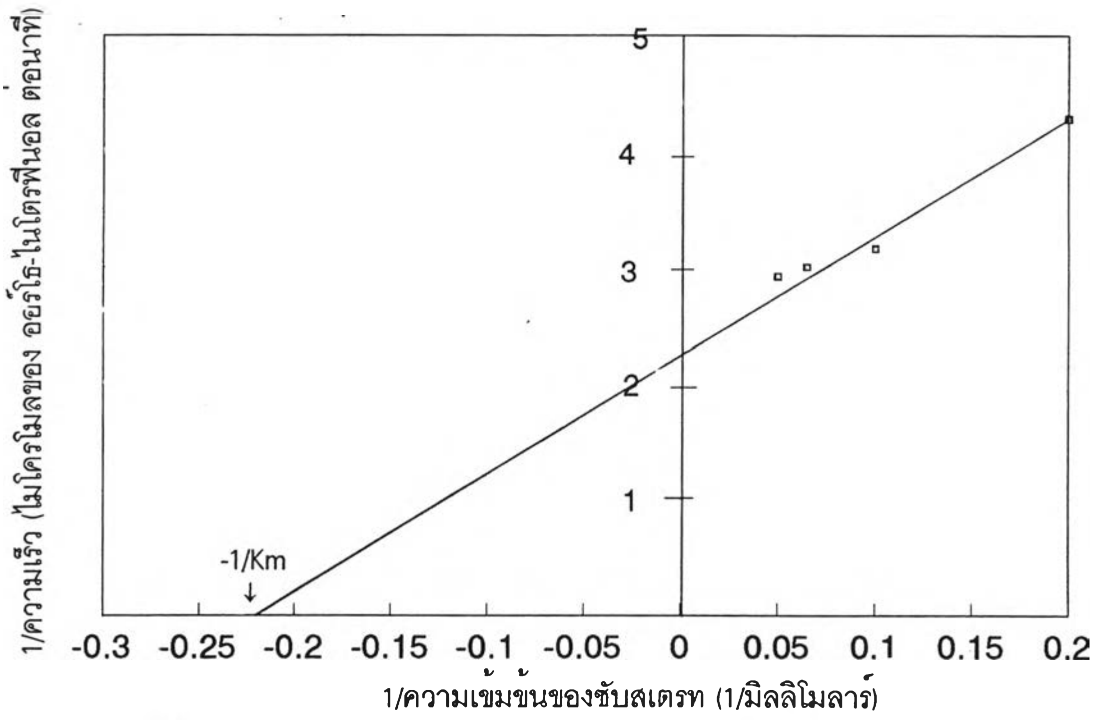
จากการแปรผันความเข้มข้นของซับสเตรทและตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ แล้วนำมาเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังแสดงในรูปที่ 10 ก และรูปที่ 10 ข พบว่า บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 มีค่า Km สำหรับพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 2.04 มิลลิโมลาร์และมีค่า Km สำหรับออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 4.54 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ สูงกว่าออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ดังนั้นในการศึกษาสมบัติอื่นๆ ของเอนไซม์ในการทดลองต่อไปจะใช้พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์เป็นซับสเตรท

2. <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส</u>

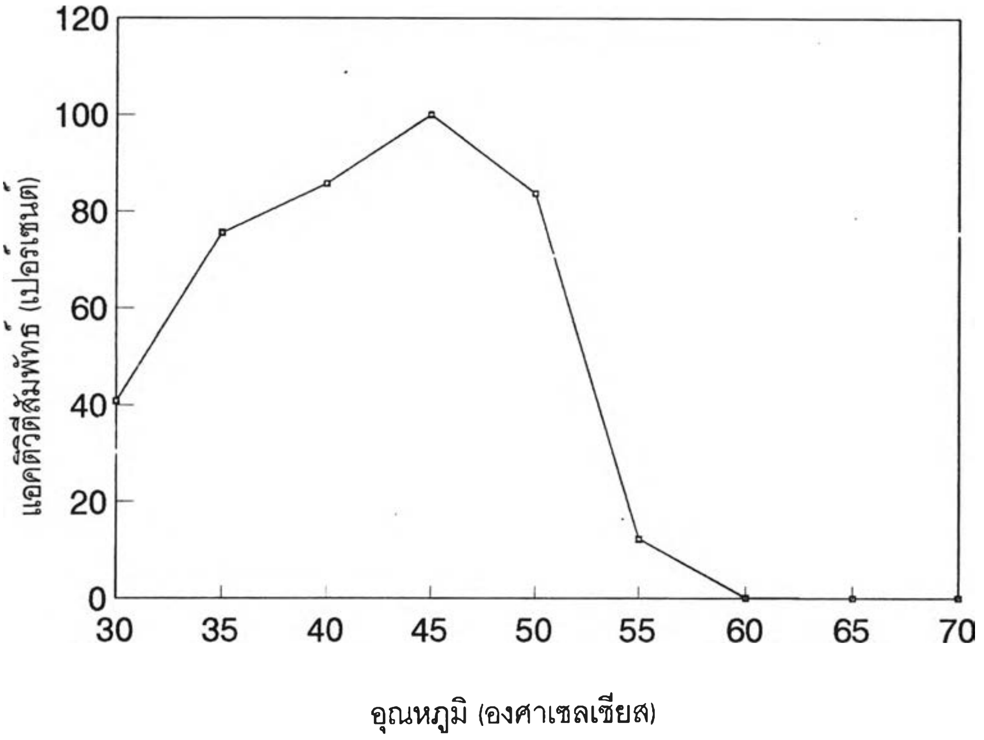
จากการนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันคือ 0.89 หน่วย มาหาแอคติวิตีโดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส ดังวิธีการทดลองในหน้าที่ 36 พบว่าเอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 11 อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงแสดงแอคติวิตีประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในการบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์



รูปที่ 10 ก การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรท (Km) ของบีตา-ไซโลซิเดสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ หาค่า Km โดยเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์-เบิร์ก



รูปที่ 10 ข การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรท (Km) ของบีตา-ไซโลซิเดสต่อออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ หาค่า Km โดยเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์-เบิร์ก



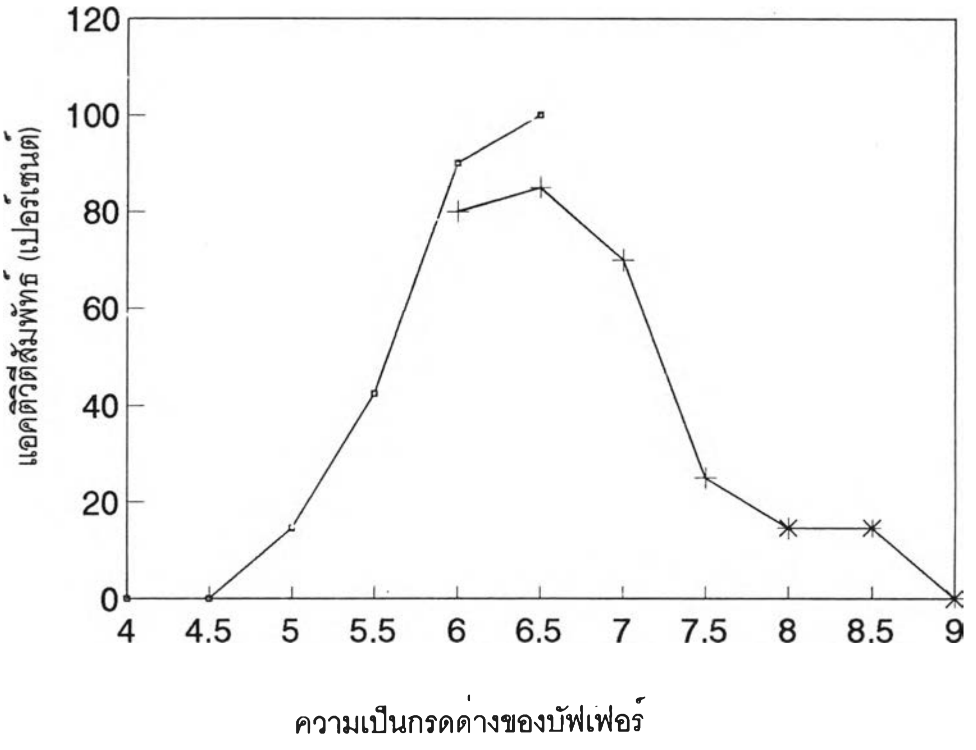
รูปที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสตรวจหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส โดยแปรอุณหภูมิต่างๆที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 36

3. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

จากการนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันคือ 0.48 หน่วย มาหาแอคติวิตีในสภาพความเป็นกรดด่างในช่วงต่างๆ ตั้งแต่ 4.0-9.0 ดังวิธีการทดลองในหน้าที่ 36 ผลการทดลองในรูปที่ 12 พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือเมื่อบ่มใน อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

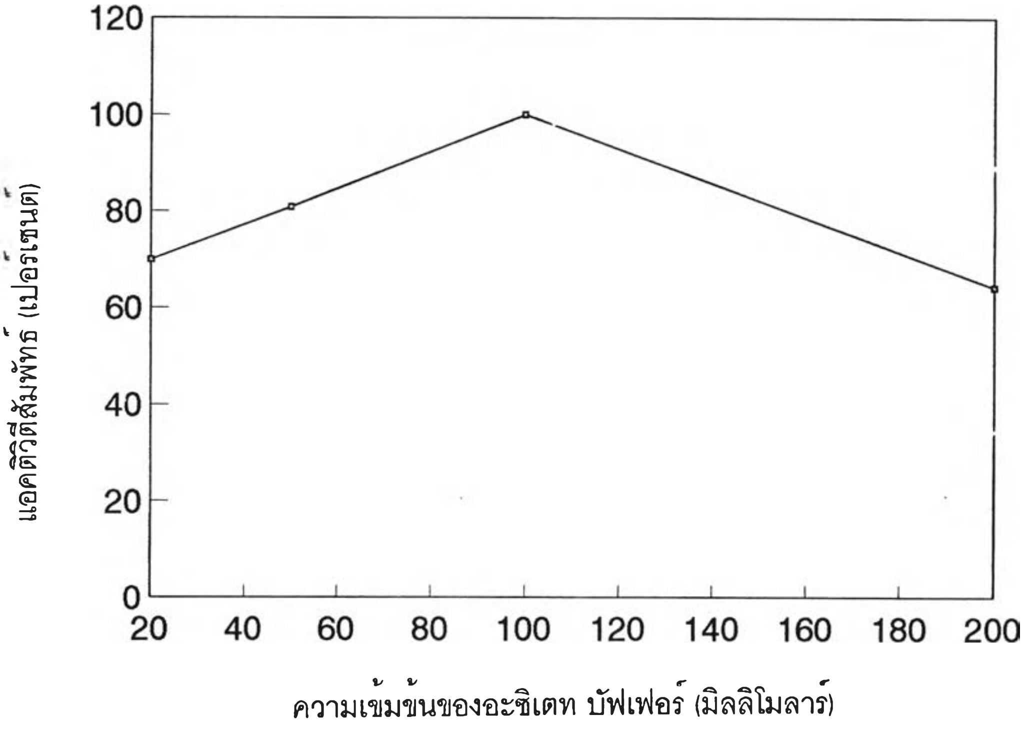
4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอะซิเตท บัฟเฟอร์ (acetate buffre) pH 6.5 ที่เหมาะสมในการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

เมื่อนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันคือ 0.62 หน่วย มาหาแอคติวิตี โดยแปรความเข้มข้นของ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ตั้งแต่ 20-200 มิลลิโมลาร์ ดังวิธีการทดลองในหน้าที่ 37 พบว่าความเข้มข้นของอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่เหมาะสมในการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส คือ 100 มิลลิโมลาร์ ดังรูปที่ 13 ดังนั้นจึงใช้ 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสต่อไป



รูปที่ 12 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส ตรวจหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยแปรผันความเป็นกรดด่างต่างๆ ที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 36

- อะซิเตท บัฟเฟอร์
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
- ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์



รูปที่ 13 ผลของความเข้มข้นของอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส ตรวจหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส ภายใต้ความเข้มข้นของอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 37

5. ผลของไซโลส(xylose) ต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

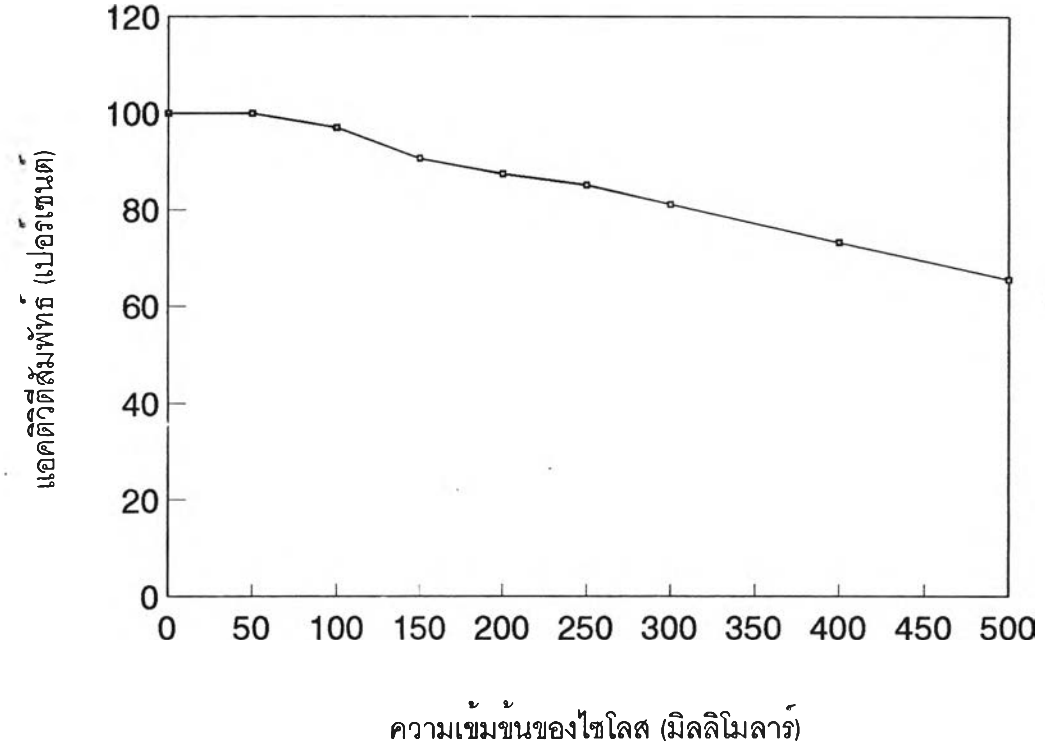
เนื่องจากไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายไซโลไบโอสโดยบีตา-ไซโลซิเดส การทดลองนี้จึงจะศึกษาว่า ไซโลสที่เกิดขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้หรือไม่ โดยนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันคือ 2.05 หน่วย มาบ่มกับซับสเตรทโดยมีไซโลส ที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆกันในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ดังวิธีการทดลองในหน้า 37 พบว่าความเข้มข้นของไซโลสที่สูงกว่า 100 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสได้ โดยที่ความเข้มข้น 350 และ 500 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสได้ 66 และ 80 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 14

การทดลองต่อไปจึงศึกษาจลน์ศาสตร์ของไซโลสในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสเพื่อหาค่าคงที่ในการยับยั้ง (inhibitor constant, Ki) ตามวิธีการในข้อ 5 หน้าที่ 36 จากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก ดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่าไซโลสเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในลักษณะแข่งขัน (competitive inhibitor) โดยมีค่า Ki ซึ่งคำนวณดังรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง เท่ากับ 180 มิลลิโมลาร์

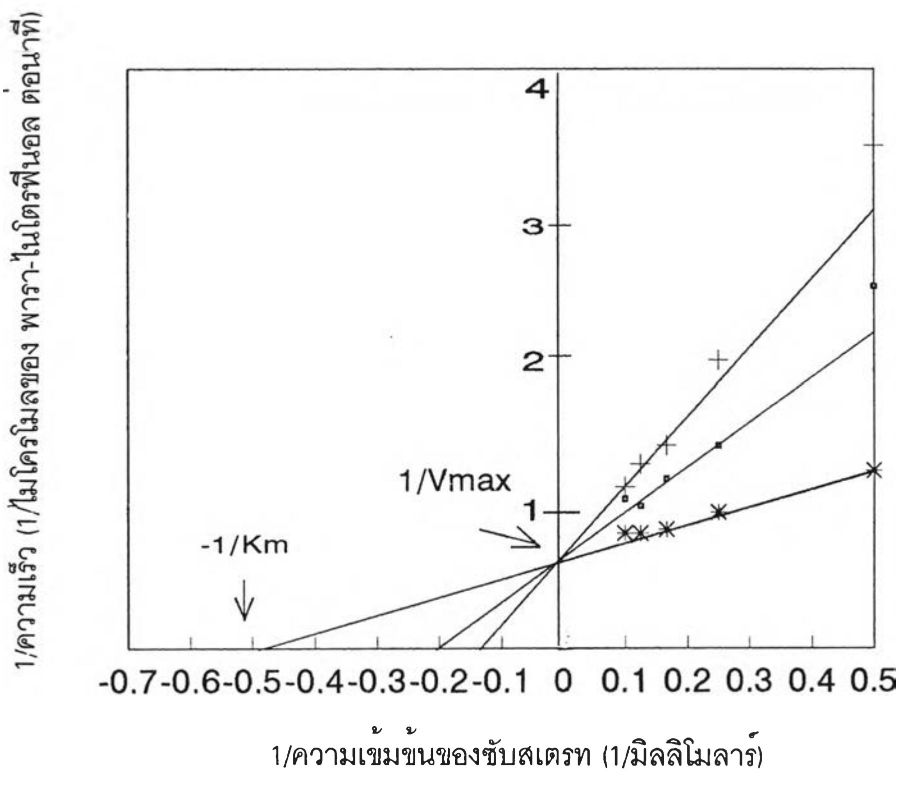
6. ผลของอะราบิโนส (arabinose) ต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

การทดลองนี้จะศึกษาผลของอะราบิโนสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ทั้งนี้เพราะอะราบิโนสเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอนเช่นเดียวกับไซโลสและยังเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของไซแลน โดยเกาะเป็นพันธะกิ่งของโมเลกุลไซแลน

จากการทดลองที่ทำโดยนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณเท่าๆกันคือ 2.33 หน่วย บ่มกับซับสเตรทและมีอะราบิโนส ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของอะราบิโนสในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ผสมอยู่ในปฏิกิริยา ผลการทดลองในรูปที่ 16 พบว่าอะราบิโนสไม่มีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

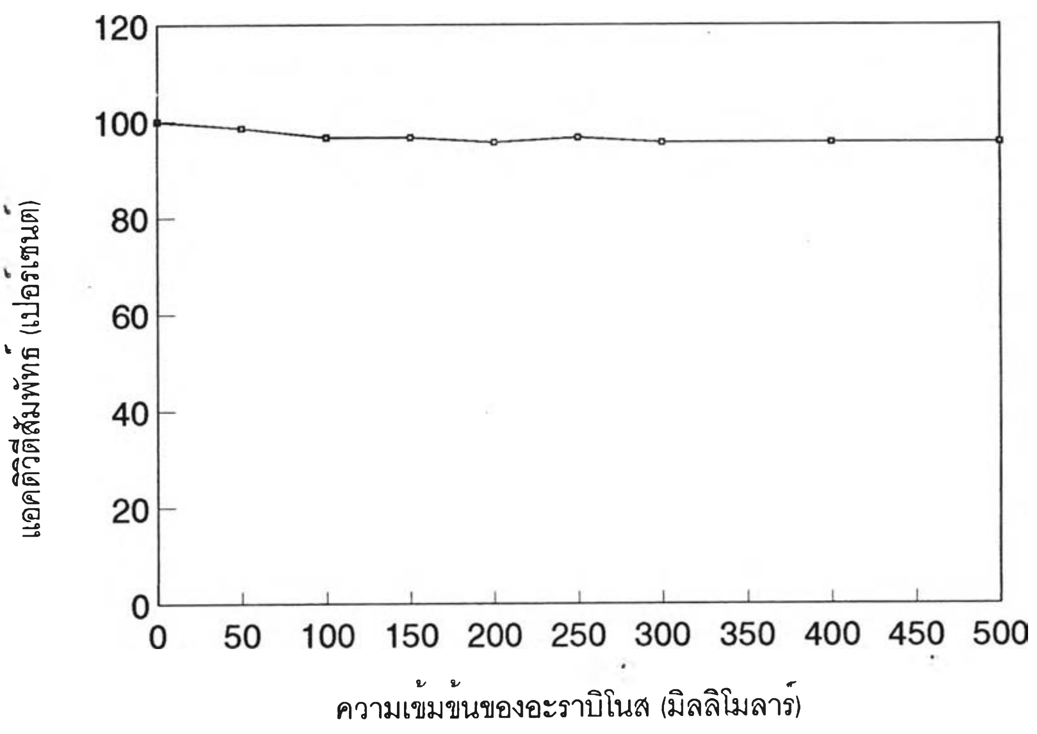


รูปที่ 14 ผลของความเข้มข้นของไซโลสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสตรวจหาแอคติวิตีของ
บีตา-ไซโลซิเดส โดยมีไซโลสความเข้มข้นต่างๆ ดังระบุในรูปเป็นส่วนผสมในหลอด
ปฏิกิริยา ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 37



รูปที่ 15 การหาค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงาน (Ki) ของบีตา-ไซโลซิเดสโดยไซโลส หาค่า Ki โดยเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก

- ✳ มีไซโลส 300 มิลลิโมลาร์
- + มีไซโลส 500 มิลลิโมลาร์
- ▫ ไม่มีไซโลส



รูปที่ 16 ผลของความเข้มข้นของอะราบิโนสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส ตรวจหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส โดยมีอะราบิโนสความเข้มข้นต่างๆ ดังระบุในรูปเป็นส่วนผสมในหลอดปฏิกิริยา ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 37

7. ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอิออนโลหะชนิดต่างๆต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส จาก *Streptomyces* sp. 43-4 โดยนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆ กันคือ 2.75 หน่วย มาบ่มกับซับสเตรทโดยในปฏิกิริยาเติมอิออนโลหะชนิดต่างๆ ได้แก่ อิออนของสังกะสี (Zn^{2+}), เหล็ก (Fe^{2+}), โคบอลท์ (Co^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}), แมงกานีส (Mn^{2+}), แคลเซียม (Ca^{2+}), ทองแดง (Cu^{2+}),ดีบุก (Sn^{2+}), เงิน (Ag^{2+}) และ นิเกิล(Ni^{+}) ที่แปรความเข้มข้นต่างๆกัน ผลการทดลองในตารางที่ พบว่าอิออนของทองแดงและเงิน ที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ยังยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับ Zn^{2+} ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ อิออนของนิเกิลและดีบุก ที่ความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ประมาณ 95 และ 85 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วน อิออนของเหล็ก, โคบอลท์, แมกนีเซียม, แมงกานีส และ แคลเซียม มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

ตารางที่ 9 ผลของอิออนโลหะหนักต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

ชนิดของเกลือแร่	ความสามารถในการยับยั้ง (เปอร์เซนต์)				
	ความเข้มข้นของเกลือแร่ (โมลาร์)				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
$ZnSO_4.7H_2O$	100.0	100.0	83.2	17.4	0
$FeSO_4.7H_2O$	*	*	44.6	0	0
$CoCl_2.6H_2O$	*	31.39	7.4	0	0
$MgSO_4.7H_2O$	30.0	15.0	0	0	0
$MnSO_4.7H_2O$	*	3.43	0	0	0
$CaCl_2.2H_2O$	24.0	11.21	2.25	0	0
$CuSO_4.5H_2O$	*	100.0	100.0	100.0	44.85
$SnCl_2.2H_2O$	84.98	58.18	25.78	5.88	0
$AgNO_3$	100.0	100.0	100.0	100.0	81.28
$NiCl_2.6H_2O$	95.28	78.59	38.34	0	0

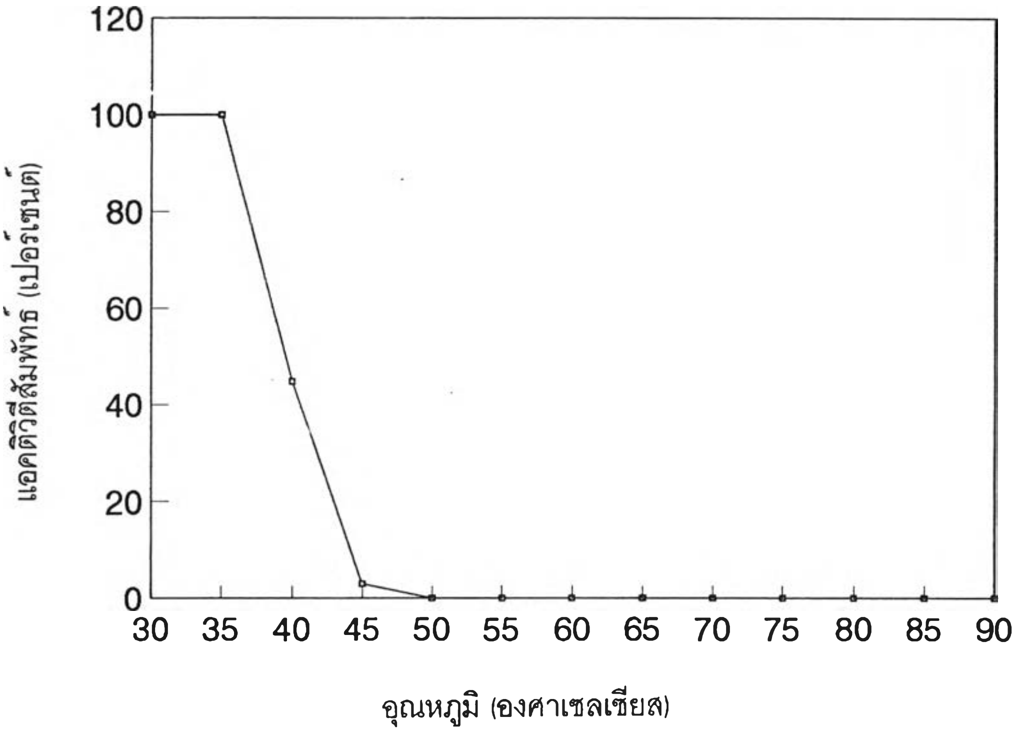
* หมายถึง ไม่สามารถวัดผลได้เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของอิออนเป็นโลหะคาร์บอเนตในขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมคาร์บอเนตและเกิดสีรบกวนเนื่องจากความเข้มข้นสูงของสารทดลอบ

8. <u>ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่ออุณหภูมิ</u>

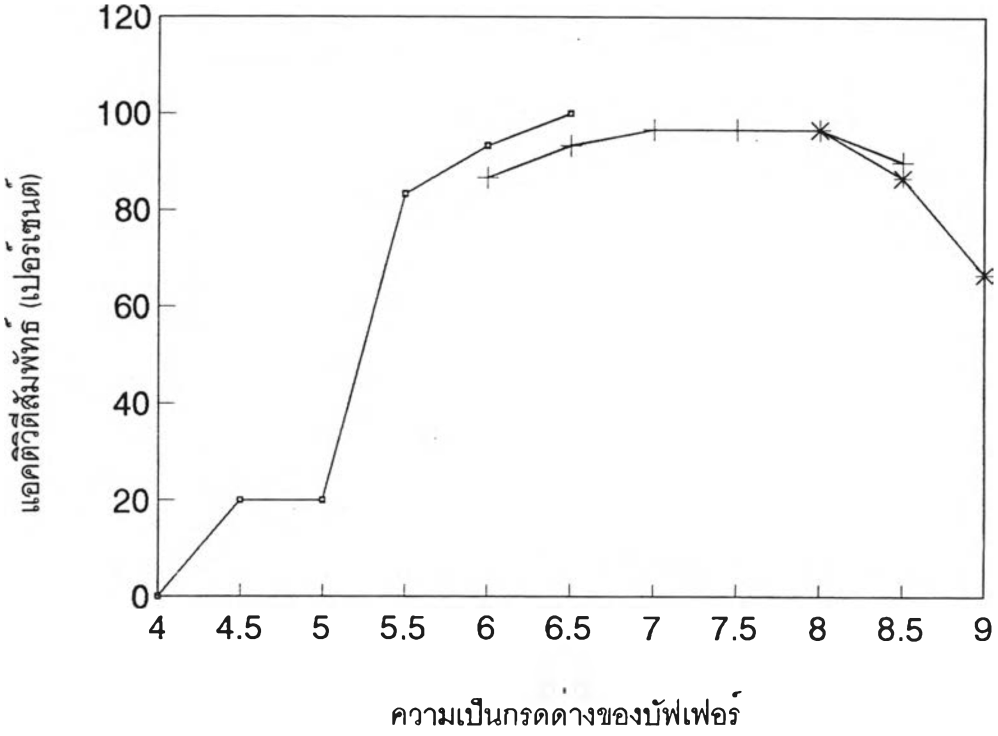
เมื่อนำบีตา-ไซโลซิเดส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน คือ 0.48 หน่วย มาบ่มที่อุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลืออยู่ ดังวิธีการทดลองในหน้าที่ 38 พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสเสถียรที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส และความเสถียรลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จนสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 17

9. <u>ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่อความเป็นกรดด่าง</u>

เมื่อนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันคือ 1.44 หน่วย บ่มในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 นาน 30 นาทีจากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ดังวิธีการทดลองในหน้าที่ 38 พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-8.5 แต่ที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.5 หรือสูงกว่า 8.5 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 18



รูปที่ 17 ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่ออุณหภูมิ โดยบ่มบีตา-ไซโลซิเดสใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 30 นาที จึงนำมาตรวจหาแอคติวิตีที่เหลืออยู่ ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 38



รูปที่ 18 ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่อความเป็นกรดด่าง โดยบ่มบีตา-ไซโลซิเดสในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จึงนำมาตรวจหาแอคติวิตีที่เหลืออยู่ ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 37

- อะซิเตท บัฟเฟอร์
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
- ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์

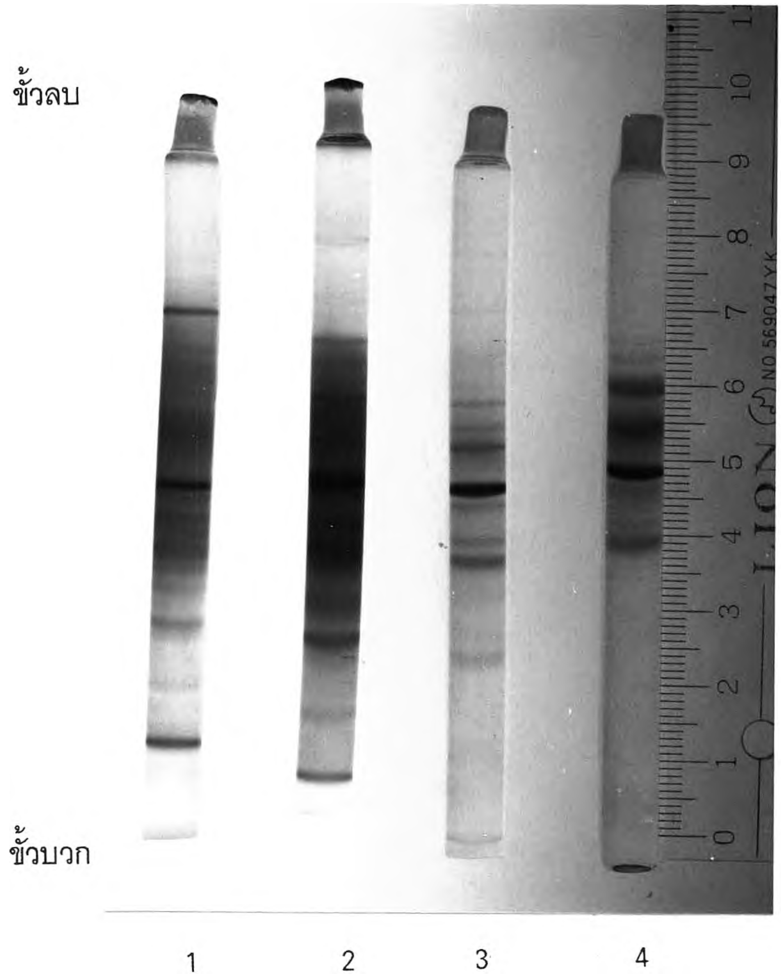
การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

1. การทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่ง

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนเจลชนิดแท่งในบัฟเฟอร์ ทริส-ไกลซีน pH 9.5 โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 5.0 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล ดังวิธีการในหน้า ผลการทดลองในรูปที่ 19 พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน มีจำนวนแถบโปรตีนที่ย้อมด้วยสี โคแมสซี บลู ลดลงเรื่อยๆ แสดงว่าบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนนั้นมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบแถบโปรตีนที่เป็นแถบของบีตา-ไซโลซิเดส โดยการย้อมแอคติวิตีด้วยพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ดังวิธีการในหน้า 38 ผลการทดลองในรูปที่ 20 พบว่าแถบโปรตีนของบีตา-ไซโลซิเดส มีค่า Rf เท่ากับ 0.45 จากนั้นตัดแท่งเจลที่ไม่ได้ผ่านการย้อมด้วยพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ในตำแหน่งเดียวกับที่ปรากฏแถบบีตา-ไซโลซิเดสมาชะโปรตีนออกดังวิธีการในหน้า 38 เพื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปโดยการทำอิเลค–โตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตชนิดแผ่น

2. การทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

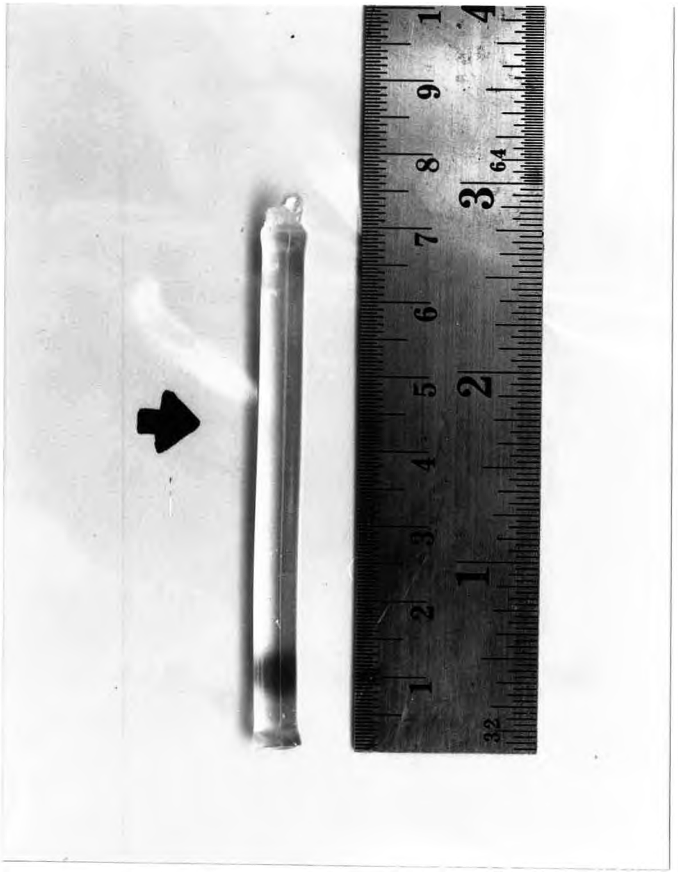
นำแถบโปรตีนที่วิเคราะห์ว่าเป็นบีตา-ไซโลซิเดส โดยวิธีการย้อมแอคติวิตีบนโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสดังกล่าวในหน้า 38 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 21 และ 23 ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 90,000, 82,000 และ 54,000 ดาลตัน ตามลำดับ



รูปที่ 19 การทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิสชนิดแท่งของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 38

1. สารสกัดของเอนไซม์ (ปริมาณโปรตีน 267 ไมโครกรัม)
2. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 40-80 เปอร์เซนต์ (ปริมาณโปรตีน 232 ไมโครกรัม)
3. ผ่านขั้นตอนที่ 2 และคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส (ปริมาณโปรตีน 236 ไมโครกรัม)
4. ผ่านขั้นตอนที่ 2, 3 และผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200 (ปริมาณโปรตีน 215ไมโครกรัม)

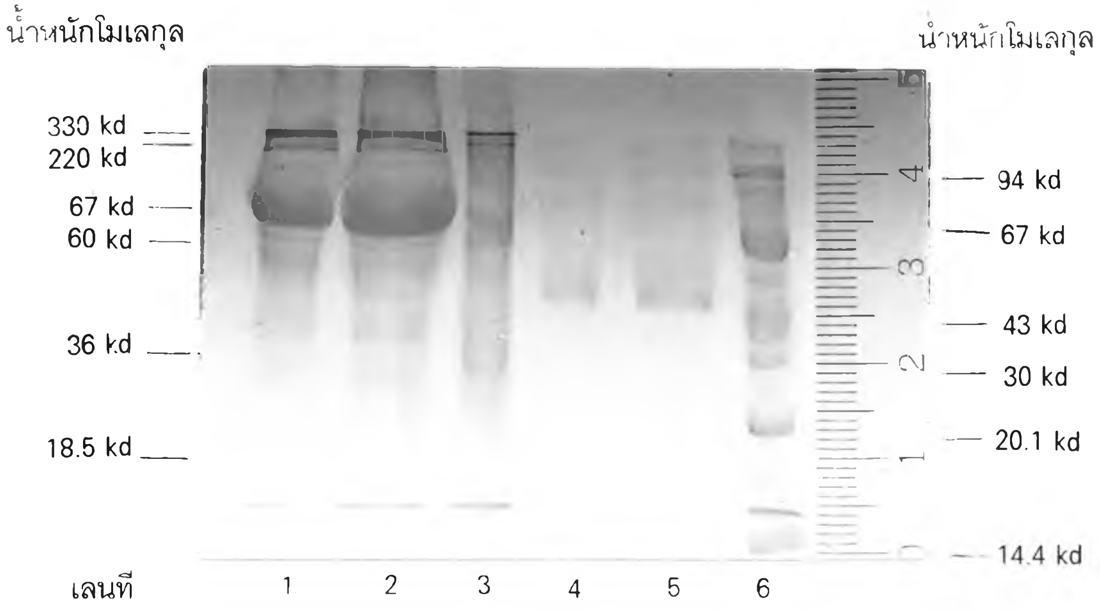
ขั้วลบ



ขั้วบวก

รูปที่ 20 การทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิสชนิดแท่ง ของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาณโปรตีน 330 ไมโครกรัม ย้อมเจลด้วยพาราไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 38

→ ลูกศรแสดงแถบโปรตีนของบีตา-ไซโลซิเดส



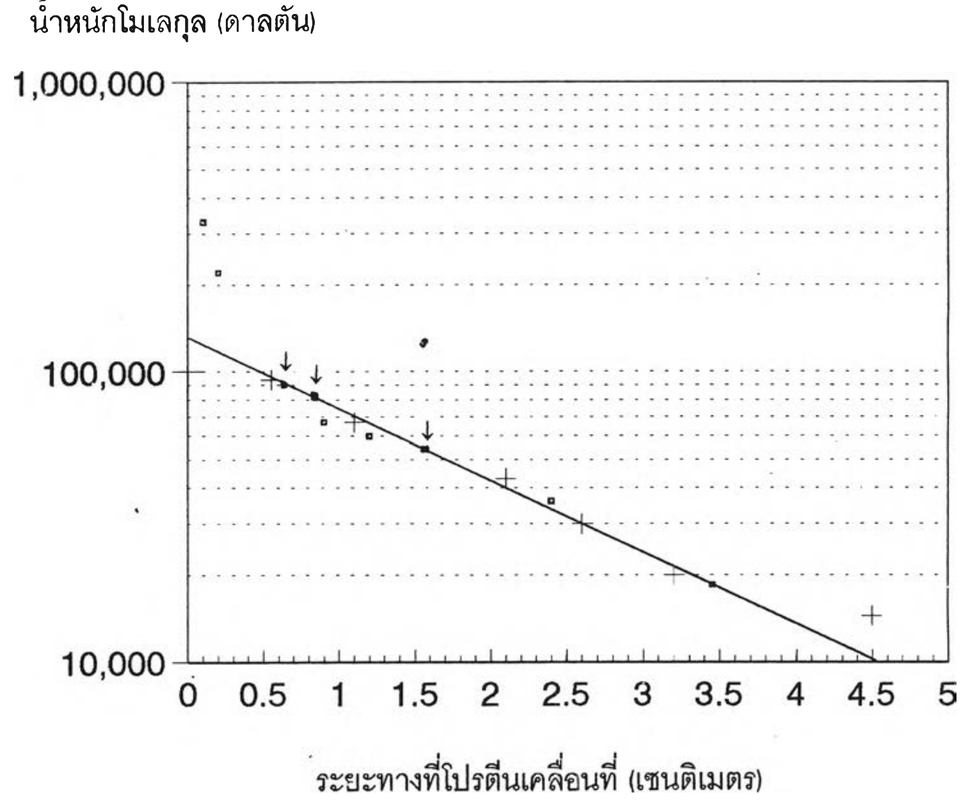
รูปที่ 21 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ บีตา-ไซโลซิเดส โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 38 โดยมี โปรตีนมาตรฐาน ได้แก่

เลนที่ 1-2 โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน

เลนที่ 3 และเลนที่ 6 โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำตามลำดับ ได้แก่

น้ำหนักโมเลกุลสูง		น้ำหนักโมเลกุลต่ำ	
ไธโรโกลบูลิน (Thyroglobulin)	330 kd	ฟอสโฟริเรสบี (phosphorylase b)	94 kd
เฟอริทิน (Ferritin)	220 kd	อัลบูมิน (albumin)	67 kd
อัลบูมิน (Albumin)	67 kd	โอวัลบูมิน (ovalbumin)	43 kd
คะตะเลส (Catalase)	60 kd	คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase)	30 kd
แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase)	36 kd	ทริพซิน อินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor)	20.1 kd
เฟอริทิน (Ferritin)	18.5 kd	แอลฟา-แลคตาลบูมิน (α-lactalbumin)	14.4 kd

เลนที่ 4-5 บีตา-ไซโลซิเดสที่ชะออกจากเจลที่ผ่านการทำอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่ง ปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม



รูปที่ 22 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ บีตา-ไซโลซิเดส โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า39โดยมีโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่

▫ น้ำหนักโมเลกุลสูง		+ น้ำหนักโมเลกุลต่ำ	
ไธโรโกลบูลิน (Thyroglobulin)	330 kd	ฟอสโฟริเรสบี (phosphorylase b)	94 kd
เฟอริทิน (Ferritin)	220 kd	อัลบูมิน (albumin)	67 kd
อัลบูมิน (Albumin)	67 kd	โอวัลบูมิน (ovalbumin)	43 kd
คะตะเลส (Catalase)	60 kd	คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase)	30 kd
แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase)	36 kd	ทริพซิน อินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor)	20.1 kd
เฟอริทิน (Ferritin)	18.5 kd	แอลฟา-แลคตาลบูมิน (α-lactalbumin)	14.4 kd

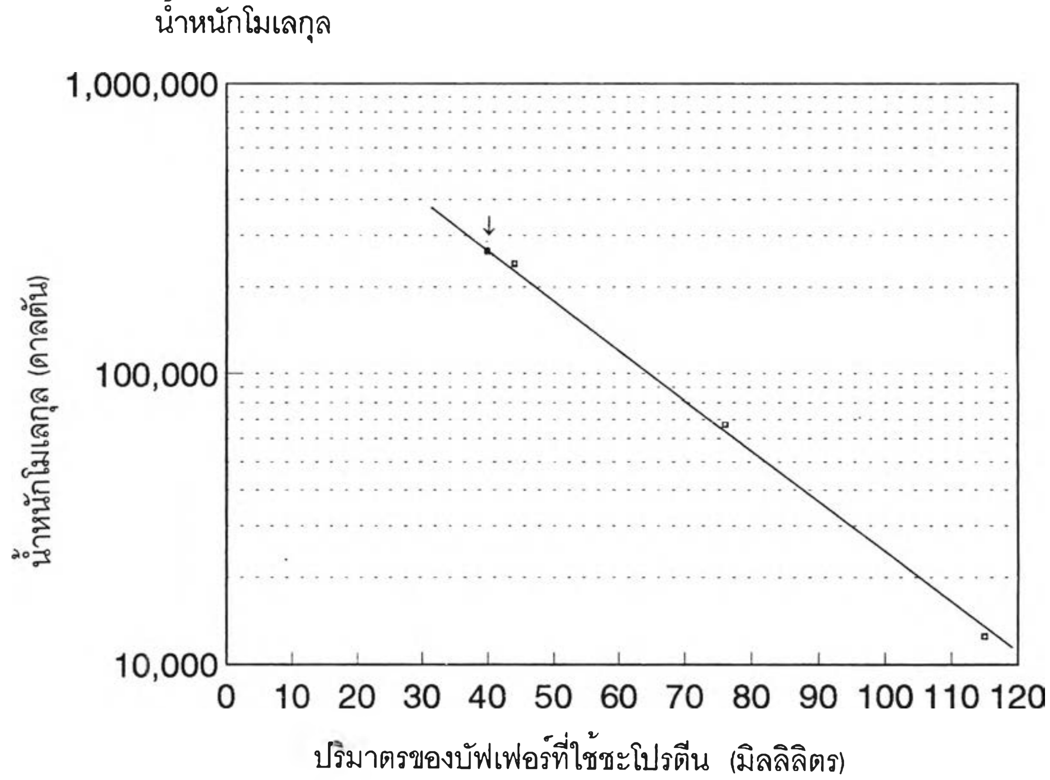
และลูกศรแสดงตำแหน่งโปรตีนของบีตา-ไซโลซิเดส

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดส

การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสทำได้โดย 2 วิธีร่วมกัน คือโดยการหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดส ในรูปโมเลกุลโปรตีนทั้งหมด (native protein) โดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 และการหาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของโปรตีน โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส

1. การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสโดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

การทดลองนี้ได้หาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยผ่านโปรตีนมาตรฐานบริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ได้แก่ คะตะเลส, โบวีน ซีรัม อัลบูมิน และ ไซโตโครม ซี ลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกันและภายใต้ภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในการทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์ ติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 410 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงโปรตีน และค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะของ ไซโตโครม ซี ตามลำดับ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่โปรตีนเหล่านี้ถูกชะออกจากคอลัมน์ กราฟที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 23 พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 270,000 ดาลตัน



รูปที่ 23 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ บีตา-ไซโลซิเดส โดยการทำเจลฟิลเตรชัน ผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200 ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 40 โดยมีโปรตีนมาตรฐานได้แก่

1. คะตะเลส (catalase) น้ำหนักโมเลกุล 240,000 ดาลตัน
2. โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน

และ 3. ไซโตโครม ซี (cytochrome c) น้ำหนักโมเลกุล 12,000 ดาลตัน

ลูกศร แสดงตำแหน่งแถบโปรตีนของบีตา-ไซโลซิเดส

2. <u>การทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u>

จากการนำบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และผ่านการตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยวิธีการโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิสด้วยการย้อมแอคติวิตี มาทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่นเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ผลการทดลองในรูปที่ 21 และ รูปที่ 23 พบว่า บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 มีแถบโปรตีนปรากฏ 3 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 90,000, 82,000 และ 54,000 ดาลตัน ตามลำดับ โดยมีแถบที่ 54,000 ดาลตัน ปรากฏเด่นชัดที่สุด

จากการประเมินข้อมูลที่ได้ร่วมกับวิธีเจลฟิลเตรชัน จึงคาดว่าบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 อาจประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อย โดยหน่วยย่อยที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 90,000 ดาลตัน หน่วยย่อยที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 82,000 ดาลตัน หน่วยย่อยที่ 3 และ 4 มีน้ำหนักโลกุลเท่ากัน 54,000 ดาลตัน ซึ่งจะทำให้น้ำหนักโมเลกุลรวมของเอนไซม์ประมาณ 280,000 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน คือ 270,000 ดาลตัน