บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และพบว่าสร้างเอนไซม์นี้ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับ *Streptomyces* spp. ต่างๆที่แยกได้ทั้งหมด (กรรณิการ์ ดวงมาลย์, 2538) ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเอนไซม์ตกตะกอนได้ดีที่ช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 เปอร์เซนต์ ซึ่งต่างจากบีตา-ไซโลซิเดสจาก *B. pumilis* ซึ่งตกตะกอนที่ความเข้มข้น 55-75 เปอร์เซนต์ (Kasumi et al., 1987) และบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Patnopectin* sp. ซึ่งตกตะกอนที่ 50-70 เปอร์เซนต์ (Takagaki et a!., 1990) ขั้นตอนต่อไปในการทำบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ให้บริสุทธิ์ คือนำเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟีโดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคลบ คือดีอีเออีไบโอเจล-อกาโรส แต่จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์เสียสภาพอย่างช้าๆเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส) ดังนั้นในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ จึงต้องทำที่อุณหภูมิต่ำคือใกล้ 0 องศาเซลเซียส และยังมีรายงานว่าโปรตีนเสียสภาพได้ง่ายที่ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสของโปรตีนต่อสิ่งแวดล้อมสูง นอกจากนี้การถูกออกซิไดส์บริเวณหมู่ไธออลของซิสตีอีน การปนเปื้อนของโลหะหนัก และความเป็นขั้วของสารละลาย (polar solution) ล้วนมีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนทั้งสิ้น (Voet and Voet, 1990) ในการทดลองเบื้องต้นของการทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์ ยังประสบปัญหาเกี่ยวกับความไม่เสถียรของเอนไซม์ในระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าวอาจมีหมู่ active site ประกอบด้วยหมู่ไธออล ซึ่งสูญเสียง่ายโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศ จึงทดลองใช้ sulfydryl agent คือเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (Budavari et al., 1989) ในการตรวจสอบ พบว่าเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสได้ โดยที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสได้ 100 เปอร์เซนต์ แสดงให้เห็นว่า หมู่ไธออลอาจเป็นหมู่สำคัญในบริเวณ active site ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Cellulomonas uda* (Rapp and Wagner, 1986) และเพื่อยืนยันว่าบีตา-ไซโลซิเดสมีหมู่ไธออลในบริเวณ active site จริง จึงได้ตรวจสอบความสามารถในการ

กลับคืนแอคติวิตีของหมู่ไธออล โดยเติม ไดไธโอธริอีทอล ในเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ พบว่า ไดไธโอธริอีทอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโลาร์ สามารถกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการบ่มด้วย เอ็น-เอธิลมาลิอิไมด์ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ได้มากที่สุดถึง 103.87 เปอร์เซนต์ แต่หากบีตา-ไซโลซิเดสถูกยับยั้งการทำงาน 100 เปอร์เซนต์ จะสามารถกลับคืนแอคติวิตีได้เพียง 33.50 เปอร์เซนต์เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า ความสามารถของไดไธโอธริอีทอลในการกลับคืนแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อผ่านการบ่มใน เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์นั้น มีขอบเขตจำกัดคือสามารถกลับคืนแอคติวิตีได้ เมื่อเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดยสิ้นเชิง ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Acetivibrio cellulolyticus* , *Acetivibrio cellulosolvens*, *Bacteroides celluloserum* และ *Clostridium thermocellum* ที่ถูกกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมื่อมีการเติมสารป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน (antioxidation agent) เช่น กรดแอสคอบิค หรือ สารรีดิวซิงค์ เช่น ไดไธโอธริอีทอล ในปฏิกิริยา (Khan et al., 1987) บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus niger* และ *Aspergillus fumigatus* ถูกยับยั้งการทำงานโดย พารา-คลอโรเมอคิวริเบนโซเอท ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และสามารถกลับคืนแอคติวิตีบางส่วนโดย 2 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอล (Kitpreechavanich, Hayashi and Nagai, 1986) เช่นเดียวกับ บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Bacillus pumilis* ถูกยับยั้งแอคติวิตีโดย Nb_2 และกลับคืนโดย 2-เมอแคบโตเอธานอล หรือไดไธโอธริอีทอล ความเข้มข้น 3.60 มิลลิโมลาร์ แต่ความสามารถในการกลับคืนไม่เป็นเส้นตรง (Saman et al., 1978)

ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคนั้นต้องใช้สารละลายเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ งานวิจัยนี้จึงต้องคัดเลือกชนิดของเกลือที่เหมาะสม จึงได้ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 พบว่าทั้งโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ ยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้นสามารถยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสได้มากขึ้น ซึ่งคล้ายกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Thermomonospora fusca* ที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยโซเดียมคลอไรด์ (Bachmann and McCarthy, 1989) และจาก *Aspergillus awamori* ถูกยับยั้งการทำงานโดยโพแทสเซียมคลอไรด์ (Kormelink et al., 1993) และบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Petnopecten* sp. ถูกยับยั้งโดยโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ (Takagaki et al., 1990) นอกจากนี้ยังพบว่า บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ถูกยับยั้งโดยโซเดียมคลอไรด์ได้สูงกว่าโพแทสเซียมคลอไรด์ ดังนั้นในการทำบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส จึงเลือกใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เกรเดียนท์ชะโปรตีนที่จับกับเจล

ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ทำโดยนำบีตา-ไซโลซิเดสที่ได้มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัม์ เซฟาเด็กซ์ จี-200 ซึ่งแยกโปรตีนออกจากกันโดยอาศัยหลักการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยสามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักในช่วง 5,000-600,000 ดาลตัน (Harris and Angal,1989) พบว่ายอดโปรตีนที่มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส มีเพียงยอดเดียว

ตารางที่ 8 ได้สรุปขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้น 9.54 เท่า แต่เมื่อพิจารณาในแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จะเห็นว่าสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้มากในแต่ละขั้นตอน แต่การเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไม่ได้สูงมากตามสัดส่วนของโปรตีนที่ถูกกำจัดออก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์นี้มีความเสถียรต่ำแม้ว่าจะเก็บอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีไดไธโอธริอีทอลเป็นองค์ประกอบ

งานวิจัยขั้นต่อมาคือนำบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาศึกษาสมบัติของเอนไซม์ โดยขั้นแรกศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรท ซึ่งซับสเตรทที่ศึกษาคือ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ และออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ซึ่งเป็นไซโลไพราโนไซด์สังเคราะห์ที่เชื่อมกับ พารา-ไนโตรฟีนอลหรือออร์โธ-ไนโตรฟีนอล ตามลำดับ ทำหน้าที่เป็นตัวแทนของไซโลไบโอส ที่มีองค์ประกอบเป็นไซโลส เชื่อมกันด้วยพันธะ บีตา-1,4 ที่ไม่มีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 และมีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์นี้มีค่าความจำเพาะต่อซับสเตรท (Km) พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์และออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพ-ราโนไซด์ เท่ากับ 2.04 และ 4.54 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แสดงว่า บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 มีความจำเพาะต่อไซโลไบโอส ที่มีองค์ประกอบเป็นไซโลส เชื่อมกันด้วยพันธะ บีตา-1,4 ที่ไม่มีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 มากกว่าไซโลไบโอสที่มีกิ่งโซ่ที่ตำแหน่งคาร์บอน-2 ซึ่งค่า Km สำหรับ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ของบีตา-ไซโลซิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ แตกต่างกันในช่วง 0.05-10.00 มิลลิโมลาร์ บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 มีค่า Km ใกล้เคียงกับ Km ของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus fumigatus, Bacillus pumilis* และ *Clostridium stecordium* ซึ่งมีค่า Km 2.00, 2.40 และ 2.50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Kitpreechavanich et al., 1986 ; Kersters-Hildson et al., 1969 ; Sakka et al., 1992)

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และยังคงมีแอคติวิตีประมาณ 80 เปอร์เซนต์ ของแอคติวิตีสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่านี้แอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส จาก *Aspergillus*

niger คือ 42 องศาเซลเซียส (John, Schmidt and Schmidt, 1979), *Cellulomonas uda* ระหว่าง 43-45 องศา-เซลเซียส (Rapp and Wagner, 1986), และ *Chaetomium trilaterale* (Uziie et al., 1985), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Lee and Forsberg, 1987), *Clostridium acetobutylicum* (Bahl et al.,1982),*Streptomyces* sp. (Nakanishi et al., 1987) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 45 องศาเซลเซียส

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือเมื่อบ่มใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ซึ่งความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสที่สร้างจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ส่วนใหญ่จะค่อนข้างเป็นกรดถึงกลางโดยอยู่ในช่วง 3.5-7.0 บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานใกล้เคียงกับบีตาไซโลซิเดสจาก *Aspergillus niger* ที่ pH 6.7-7.0 (John et al., 1979) *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 และ *Clostridium acetobutylicum* ที่ pH 6.0-6.5 (Lee and Forsberg, 1987 ; Bahl et al.,1982), *Streptomyces* sp. และ *Thermomonospora* strain LL ที่ pH 6.5 (Nakanishi et al., 1987 ; Ristroph and Humphreyt, 1985)

เนื่องจากน้ำตาล ดี-ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยบีตา-ไซโลซิเดส และ แอล-อะราบิโนส มีโครงสร้างคล้ายกับไซโลส คือเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน เช่นเดียวกัน และยังพบอะราบิโนสเป็นส่วนหนึ่งของไซแลน โดยเกาะเป็นพันธะกิ่งของโมเลกุลไซแลน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของดี-ไซโลสและแอล-อะราบิโนส ต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 พบว่า แอล-อะราบิโนสที่ความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส แต่ ดี-ไซโลส ยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสในลักษณะแข่งขัน (competitive inhibition) โดยมีค่า Ki เท่ากับ 180 มิลลิโมลาร์ สมบัตินี้คล้ายกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus niger* ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานแบบแข่งขันโดยไซโลส โดยมีค่า Ki เท่ากับ 200 มิลลิโมลาร์ (Ogutimcin and Reilly, 1980) นอกจากนี้ บีตา-ไซโลซิเดส จาก *Streptomyces* sp. 43-4 ยังถูกยับยั้งด้วยอิออนโลหะชนิดต่างๆ คือ อิออนของทองแดง (Cu^{2+}) และอิออนของเงิน (Ag^{2+}) มีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสรุนแรงที่สุด โดยอิออนทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ รองลงมาคืออิออนของสังกะสี (Zn^{2+}), อิออนของนิเกิล (Ni^{+}) และอิออนของดีบุก (Sn^{2+}) ตามลำดับ เช่นเดียวกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus awamori* ซึ่งถูกยับยั้งด้วยทองแดง แต่ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ถึง 100 เท่า (Kormelink

et al., 1993) บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus fumigatus* ถูกยับยั้งด้วยทองแดงและเหล็กที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (Kitpreechavanich et al., 1986) บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Cladocellum saccharolyticum* ถูกยับยั้งด้วยทองแดง สังกะสี และนิเกิล (Hudson et al., 1991) และ บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Petnopectin* sp. ถูกยับยั้งด้วยทองแดงและ เงินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Takagaki et al., 1990) สวนอิออนของเหล็ก, โคบอลท์, แมกนีเซียม, แมงกานีสและแคลเซียม มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ จาก *Streptomyces* sp. 43-4 คล้ายกับ บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus awamori* ไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดยอิออนของแคลเซียมและแมกนีเซียม ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Kormelink, et al., 1993), บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus fumigatus* ไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดยอิออนเหล็ก, ทองแดง, สังกะสี ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (Kitpreechavanich et al., 1986), และจาก *Cladocellum saccharolyticum* ไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดยอิออนทองแดง, สังกะสี, นิเกิล ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (Hudson et al., 1991), บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Petnopectin* sp. ไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดยอิออนของทองแดงและ เงิน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Takagaki et al., 1990)

สำหรับความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 พบว่า บีตา-ไซโลซิเดสเสถียรที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส และความเสถียรลดลงอย่างรวดเร็ว ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จนสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. ที่สูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Nakanishi, Yokotsuka and Yasui, 1987) สำหรับความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของบีตา-ไซโลซิเดสจากแหล่งต่างๆกันจะแตกต่างกันไป คืออาจเสถียรในช่วงความเป็นกรดหรือด่างแต่มีบีตา-ไซโลซิเดสจากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่มีความเสถียรในช่วงกว้าง สำหรับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 เสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง คือตั้งแต่ pH 5.5-8.5 แต่ที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.5 หรือสูงกว่า 8.5 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของบีตา-ไซโลซิเดสนี้ คล้ายกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. เสถียรที่ pH 6.0-9.0 (Nakanishi et al., 1987), บีตา-ไซโลซิเดสจาก *Thermoanaerobacter ethanolyticus* และ *Thermomonospora* strain LL เสถียรที่ pH 5.0-8.0 (Shao and Wiegel, 1992 ; Ristroph and Humphreyt, 1985)

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดส จาก *Streptomyces* sp. 43-4 ก่อนและหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มี

ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากยังมีโปรตีนอื่นๆปนเปื้อนอยู่มาก จึงทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสต่อ สิ่งแวดล้อมต่ำกว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ (Voet and Voet, 1990)

ตารางที่ 10 สมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ก่อนและหลังจากผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์

สมบัติของบีตา-ไซโลซิเดส	ก่อนผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์[1]	หลังผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์
อุณหภูมิที่เหมาะสม	45-50 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	6.5-7.0	6.5
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เสียแอคติวิตีโดยสิ้นเชิงที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส	เสียแอคติวิตีโดยสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	5.5-8.0	5.5-8.5
Km ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์	7.14 มิลลิโมลาร์	2.04 มิลลิโมลาร์

[1] กรรณิการ์ (2538)

เมื่อนำบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่ง พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนนั้นมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นโดยมีจำนวนแถบของโปรตีนลดลงตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามภายหลังจากผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200 แล้วพบว่ายังไม่สามารถแยกบีตา-ไซโลซิเดสออกจากโปรตีนชนิดอื่นได้หมด เนื่องจากบีตา-ไซโลซิเดสที่สร้างจาก *Streptomyces* sp. 43-4 เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งมีโปรตีนอยู่มากมาย จึงอาจมีโปรตีนอื่นๆที่มีสมบัติทางกายภาพที่ใกล้เคียงกับบีตา-ไซโลซิเดสมาก ทำให้ไม่สามารถแยกบีตา-ไซโลซิเดสออกจากโปรตีนเหล่านั้นได้ ประกอบกับความไม่เสถียรของเอนไซม์ จึงทำให้ภายหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นไม่สูงนัก และหากต้องการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น อาจนำเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนโครมาโตกราฟีเพิ่มขึ้นอีกเช่น โดยผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบซ้ำ หรือ การใช้เกรเดียนท์ของ pH ในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ การใช้แอฟฟินีตีโครมาโตกราฟี เป็นต้น

น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสพบว่าแปรผันมากตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 3 และบางชนิดยังประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวนต่างๆกัน สำหรับน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 เมื่อประมาณจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 270,000 ดาลตัน ใกล้เคียงกับบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus niger* 15 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 253,000 ดาลตัน (Rodionova et al., 1983) จาก *Chaetomium trilaterate* และ *Emericella nidulans* มีน้ำหนักโมเลกุล 240,000 ดาลตัน (Uziie, et al., 1985 ; Matsue and Yasui, 1985) และเมื่อวิเคราะห์จากโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 อาจประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวน 4 หน่วยย่อย โดยหน่วยย่อยที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 90,000 ดาลตัน หน่วยย่อยที่ 2 82,000 ดาลตัน หน่วยย่อยที่ 3 และ 4 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 54,000 ดาลตัน ซึ่งแตกต่างจากบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus niger* ที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 122,000 ดาลตัน

จากการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 จะเห็นว่าเอนไซม์นี้มีสมบัติหลายประการเฉพาะตัว ซึ่งแตกต่างจากบีตา-ไซโลซิเดสจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีผู้รายงานไว้