บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อในระหว่างการสุกของผลกล้วย

การศึกษาในขั้นแรกได้ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อในระหว่างการสุกของผลกล้วยในวันที่ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 (ภาคผนวกที่ 10) พบว่าในวันแรกผลกล้วยตัวอย่างจะมีความแน่นเนื้อ 920 cN ในวันที่ 2 ความแน่นเนื้อจะลดลงเหลือ 650 cN และเหลือ 210 cN ในวันที่ 3 ส่วนวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ความแน่นเนื้อจะคงที่ที่ 100 cN ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 3.1

3.2 ผลการสกัดแยกเอนไซม์อย่างหยาบ

นำตัวอย่างกล้วยที่ผ่านการวัดความแน่นเนื้อแล้วมาสกัดเอนไซม์อย่างหยาบและทำการวัดแอคติวิตีของไซลาเนสในแต่ระยะของการสุกของผลกล้วย ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 3.2 พบว่าที่ระยะความแน่นเนื้อ 210 cN จะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของไซลาเนส 0.66 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ระยะความแน่นเนื้ออื่น ๆ จึงได้ทำการสกัดแยกเอนไซม์อย่างหยาบจากผลกล้วยที่ความแน่นเนื้อ 210 cN ให้ได้ปริมาตรมากเพียงพอตลอดการทดลอง

3.3 ผลการหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนไซลาเนส

การศึกษาขั้นแรกได้ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนลำดับส่วนของไซลาเนสจากเอนไซม์อย่างหยาบ เพื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนโดยการทำการทดลองสเกลเล็ก พบว่าการเริ่มตกตะกอนที่ความเข้มข้น 0 - 20 เปอร์เซ็นต์ และ 0 - 30 เปอร์เซ็นต์ของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนได้จึงเริ่มตกตะกอนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0 - 40 เปอร์เซ็นต์ และตามด้วยการตกตะกอนที่ความเข้มข้น 40 - 60 เปอร์เซ็นต์และที่ 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าการตกตะกอนโปรตีนแบบลำดับส่วนจะตกตะกอนโปรตีนได้ในปริมาณที่น้อย ส่วนการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนไซลาเนสจากเอนไซม์อย่างหยาบแบบความเข้มข้นอิ่มตัว (saturated) แสดงดังในตารางที่ 3. 1 ซึ่งพบว่ามีแอคติวิตีของไซลาเนสในทุกลำดับส่วนของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมี

แอคติวิตีสูงสุดใกล้เคียงกันในการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0 – 60 % , 0 – 70 % และ 0 – 80 % และเพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์มากที่สุดเพื่อที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ดังนั้นในการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของไซลาเนสจากเอนไซม์อย่างหยาบจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 80 % saturation

3.4 ผลการทำไซลาเนสให้บริสุทธิ์

นำเอนไซม์อย่างหยาบที่สกัดได้จากผลกล้วยที่ระยะความแน่นเนื้อ 210 cN ระดับขยายส่วนปริมาตรรวมทั้งหมด 450 มิลลิลิตร และมีแอคติวิตีทั้งหมด 522 ยูนิต มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 3.2 ตามขั้นตอนรายละเอียดดังแสดงต่อไปนี้

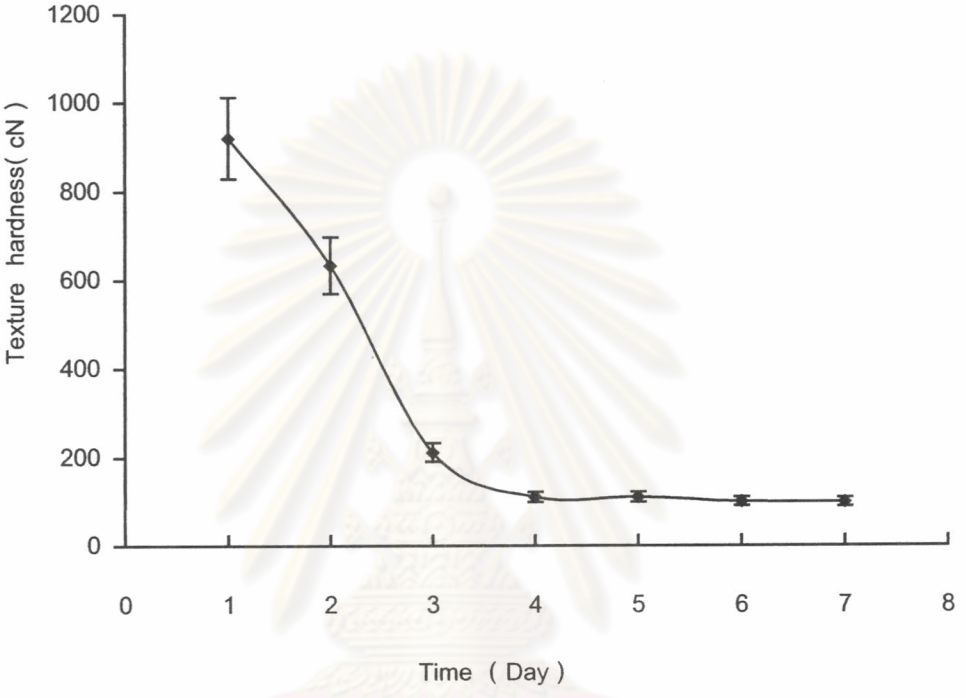
3.4.1 การตกตะกอนไซลาเนสด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 %

นำเอนไซม์อย่างหยาบที่เตรียมได้ 450 มิลลิลิตร ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 % หลังจากการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนและไดอะไลส์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วพบว่ายังคงมีแอคติวิตีทั้งหมดเหลืออยู่ 45.10 เปอร์เซ็นต์

3.4.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

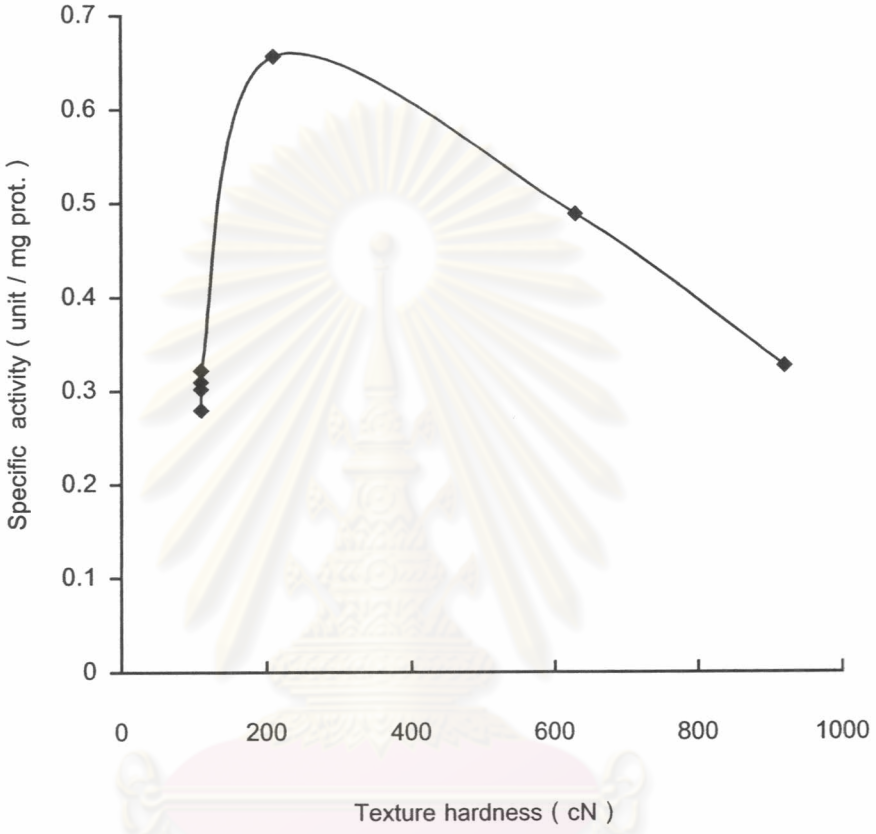
นำตะกอนเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยการทำโครมาโทกราฟีดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อในระหว่างการสุกของผลกล้วยน้ำว้า
(ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์กับความแน่นเนื้อในระยะต่างๆ (ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนแบบอิ่มตัวจากเอนไซม์อย่างหยาบ

% Ammonium sulfate	Volume (ml)	Total activity of xylanase (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity of xylanase (Unit/mg prot.)	Recovery of xylanase (%)
Crude enzyme	50.0	57	90	0.63	100
0 – 40 %	1.5	9.60	12.97	0.74	16.84
0 – 60 %	1.0	6.80	8.50	0.80	11.93
0 – 70 %	1.5	10.80	12.56	0.86	18.95
0 – 80 %	3.0	21.90	27.02	0.81	38.42

* เมื่อกำหนดให้แอคติวิตีของไซลาเนสจากเอนไซม์อย่างหยาบเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

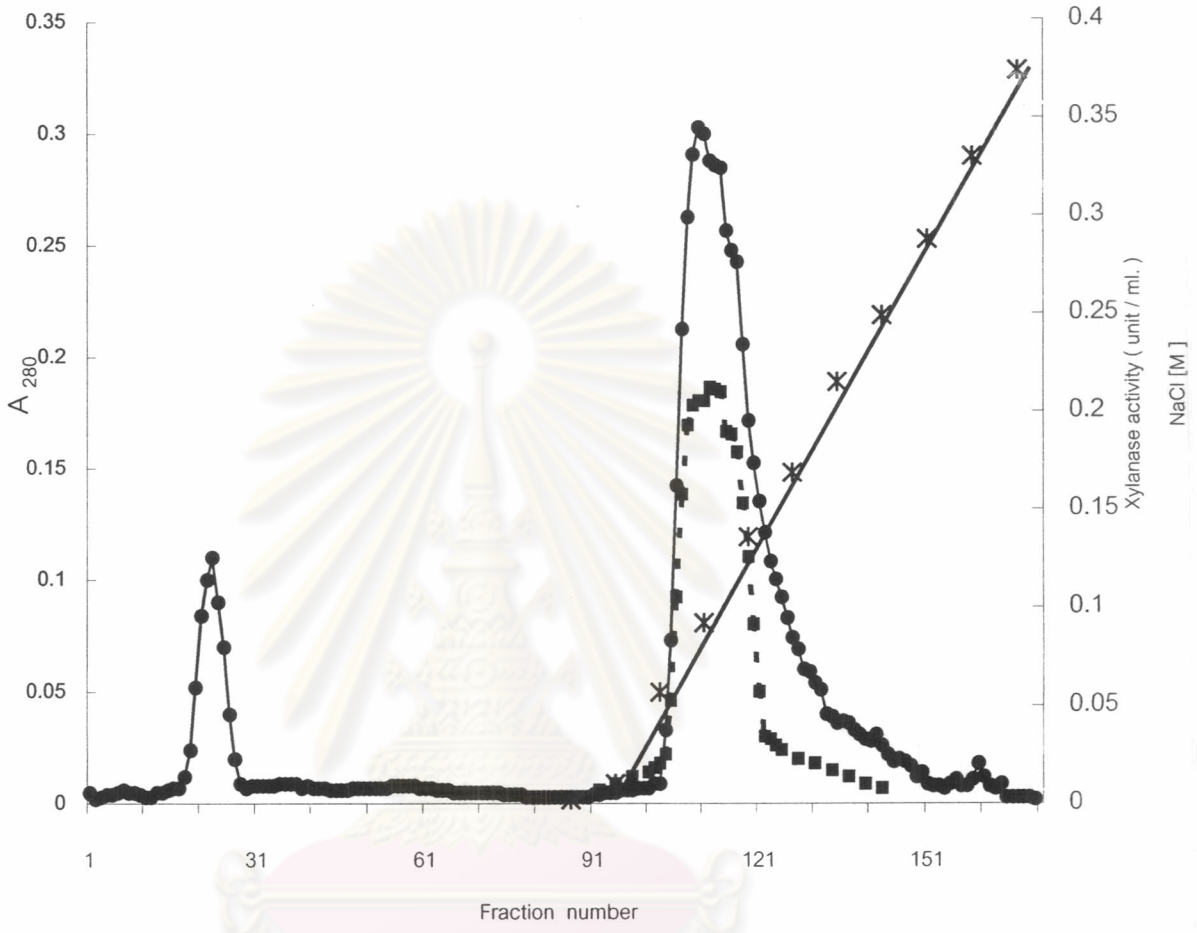
3.4.2.1 โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส

นำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 80 % แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวคิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 274.12 มิลลิกรัม ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 มาผ่านลงในคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchange) ตามวิธีการในข้อ 2.6.3 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.3 พบว่าโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับตัวกลางจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ในลำดับส่วนที่ 18-24 แต่ตรวจไม่พบแอคติวิติของไซลาเนส และเมื่อชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 – 500 มิลลิโมลาร์ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 50 – 135 มิลลิโมลาร์มีโปรตีนที่มีแอคติวิตีของไซลาเนสถูกชะออกมา จึงทำการรวมลำดับส่วนที่ 104 – 121 เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการกลบด้วย aquasorb แล้วนำไปไดอะไลส์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 เพื่อกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ปนเปื้อนอยู่ ในขั้นตอนนี้จะได้ไซลาเนสที่มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 6.97 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.6 เท่า

3.4.2.2 โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี - 50

เมื่อผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี – 50 และชะคอลัมน์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ตามวิธีข้อ 2.6.4 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.4 พบว่าไซลาเนสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 97 – 183 ทำการรวมลำดับส่วนดังกล่าวแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการกลบด้วย aquasorb ได้ไซลาเนสที่มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 9.65 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 14.70 เท่า

ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ซีเอ็ม–เซลลูโลส และเซฟาเด็กซ์ จี – 50 ได้มีการนำเอนไซม์ที่ได้มาตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลส ปรากฏว่าไม่พบแอคติวิตีของเซลลูเลส

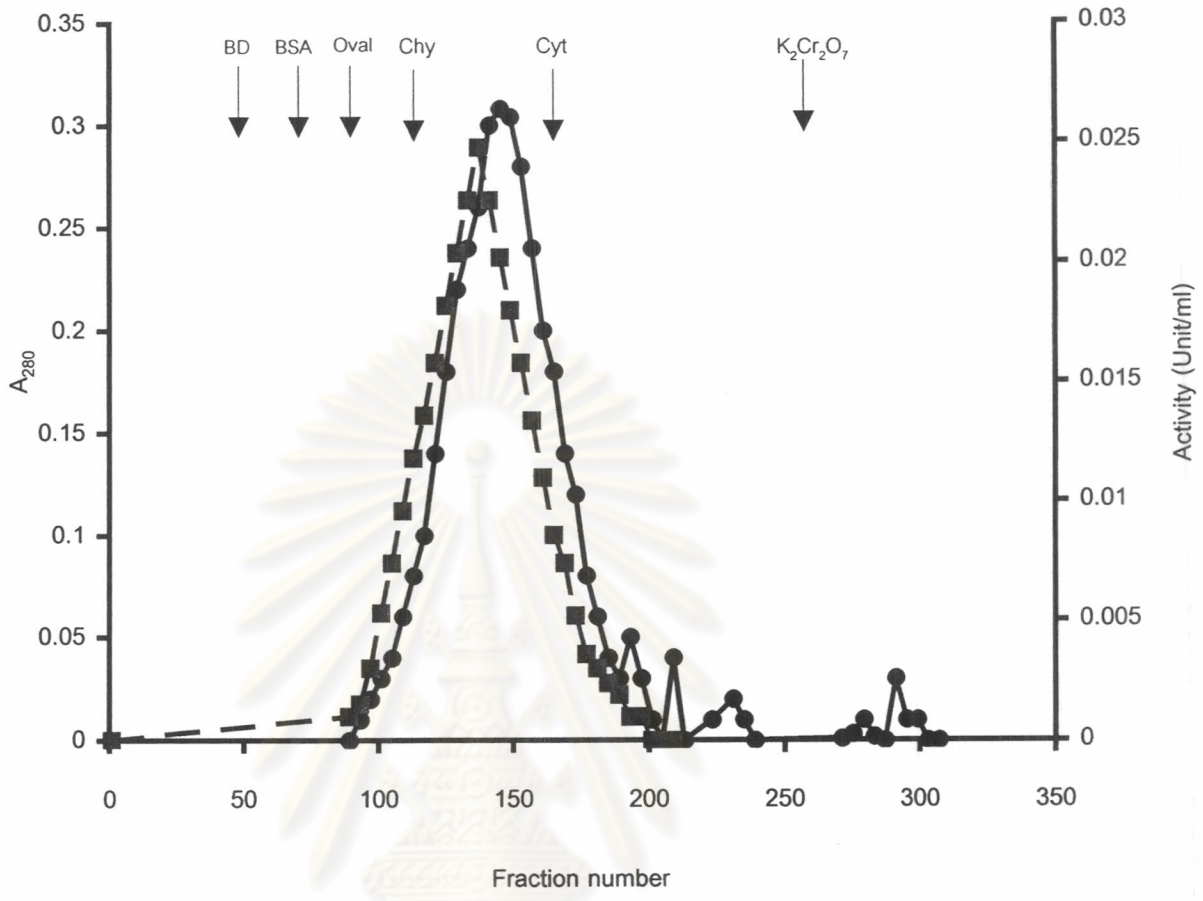


รูปที่ 3.3 ผลการแยกเอนไซม์โดยผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม – เซลลูโลส (ขนาด1.5x20 เซนติเมตร) ชะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 – 0.5 โมลาร์ ใน 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแยกแฟรกชันละ 3 มิลลิลิตรตามวิธีในข้อ 2.6.3

●——● ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

■·····■ แอคติวิตีของไซลาเนส

✳—✳ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 3.4 ผลการทำเซฟาเด็กซ์ จี - 50 (ขนาด1.5x90 เซนติเมตร) ชะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแยกแฟรกชันละ 1 มิลลิลิตรตามวิธีในข้อ 2.6.4

—●— A_{280} — ■ — Xylanase activity (Unit/ml)

BD = Blue dextran

BSA = Bovine serum albumin

Oval = Ovalbumin

Chy = Chymotrypsinogen

Cyt = Cytochrome C

$K_2Cr_2O_7$ = Potassiumdichromate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

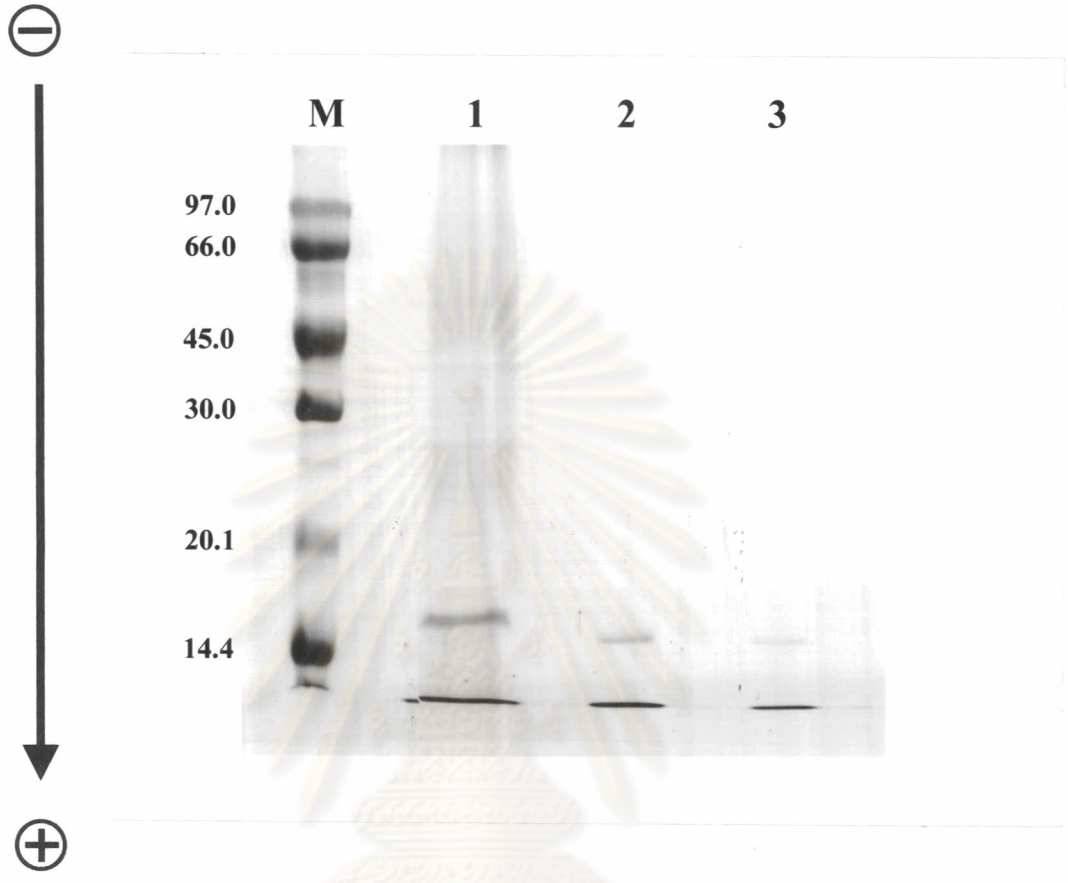
ตารางที่ 3.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำไซลาเนสให้บริสุทธิ์

Purification step	Volume (ml)	Total activity of xylanase (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity of xylanase (Unit / mg Prot.)	Recovery of xylanase (%)	Purification of xylanase (fold)	Total activity of cellulase (Unit)	Recovery of cellulase (%)
Crude enzyme	450	522.00	795.73	0.66	100.00	1.00	44.00	100.00
$(NH_4)_2SO_4$ (0-80%)	30	235.20	274.12	0.86	45.10	1.30	7.84	17.82
CM-Cellulose	18	38.40	5.51	6.97	7.40	10.60	0.00	0.00
SephadexG-50	10	21.24	2.20	9.65	4.10	14.70	0.00	0.00

3.5 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไซลาเนสโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

การทดลองนี้ได้นำเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ เอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เอนไซม์ที่ได้จากการผ่านซีเอ็มเซลลูโลสคอลัมน์ เอนไซม์ที่ได้จากเซฟาเด็กซ์ จี–50 คอลัมน์ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความบริสุทธิ์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซีสชนิดแผ่น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.5 พบว่าจะปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ และสามารถคำนวณค่า Relative mobility ได้เท่ากับ 0.88 เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.7) จะได้ขนาดโมเลกุลของไซลาเนส เท่ากับ 19 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นสารละลายผสมของแอลฟา-แลคตาบูมิน (α-Lactabumin) ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) อัลบูมิน (Albumin) และฟอสฟอริเลส บี (Phosphorylase b) ซึ่งมีมวลโมเลกุล 14.4 , 20.1 , 35 , 45 66 และ 97 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



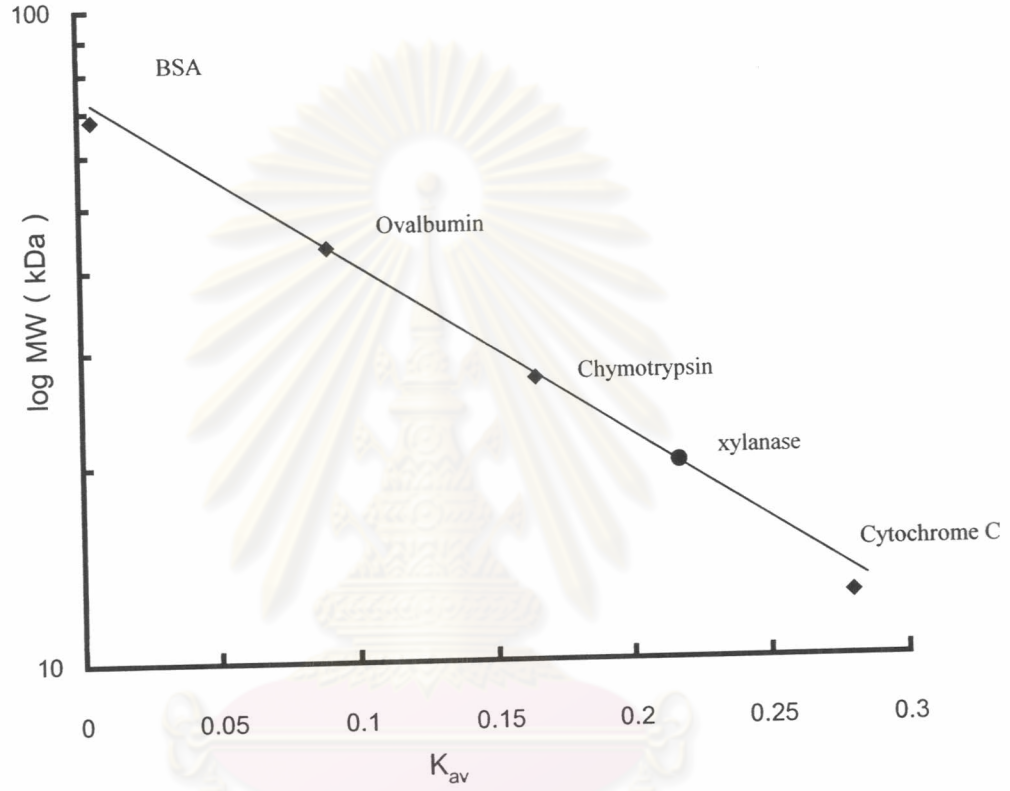
รูปที่ 3.5 ผลการทำอิเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์ชนิดแผ่น (SDS –Polyacrylamide gel Electrophoresis) ตามวิธีในข้อ 2.6.5

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 % (17.68 µg)

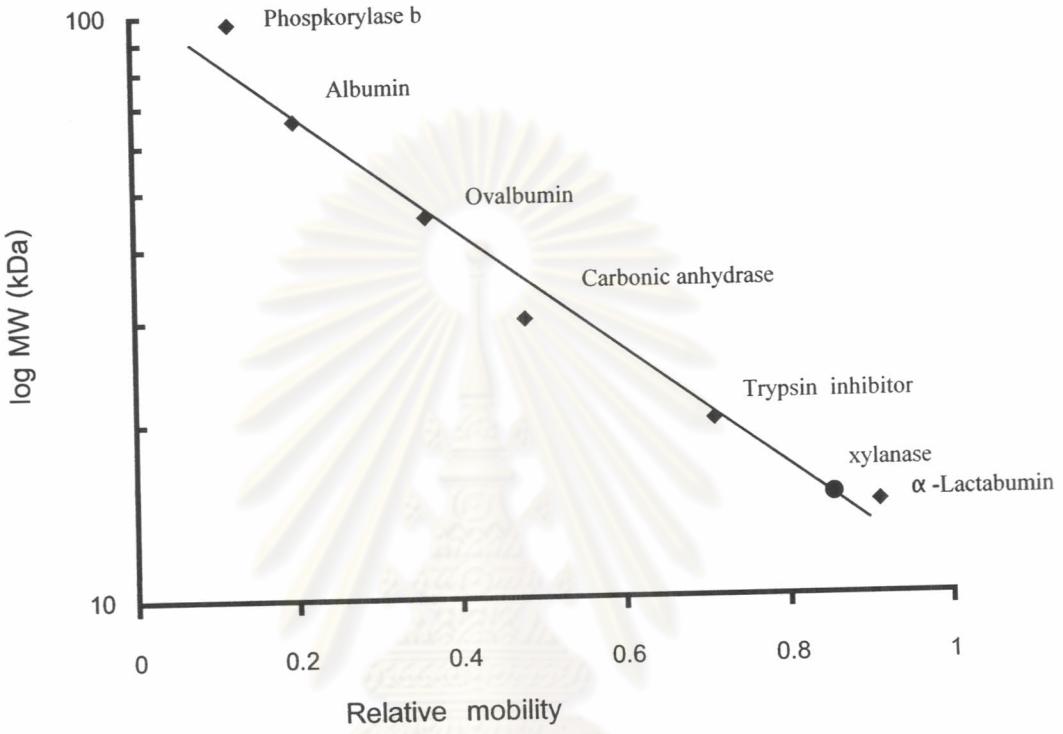
แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ซีเอ็มเซลลูโลส (6 µg)

แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมเซฟาเด็กซ์จี – 50 (2.2 µg)



รูปที่ 3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน และค่า K_{av} โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี – 50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน และค่า Reative mobility โดยการทำเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไซลาเนสโดยการทำคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน

จากการทำเจลฟิลเตรชันซึ่งใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี - 50 ผลแสดงดังรูปที่ 3.4 พบว่าพีคแอคติวิตีของไซลาเนส มีค่า K_{av} เท่ากับ 0.218 สามารถนำมาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของพีคโปรตีนดังกล่าวจากโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.6) ได้เท่ากับ 21 กิโลดาลตัน

3.7 ผลการศึกษาสมบัติของไซลาเนส

นำไซลาเนสที่ผ่านโครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี – 50 มาศึกษาสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

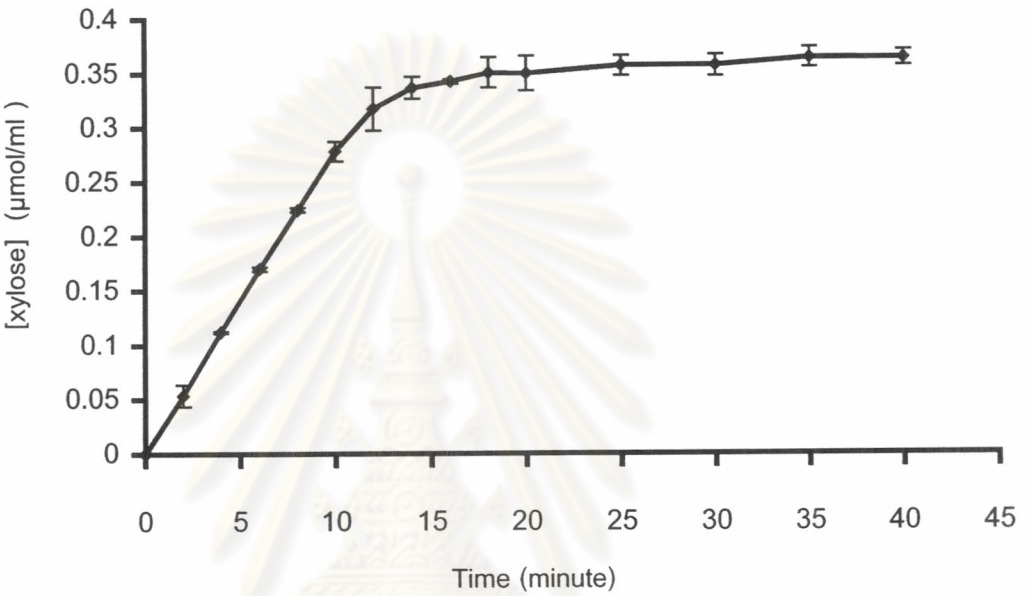
3.7.1 ผลการหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

จากการศึกษาความเร็วเริ่มต้นโดยบ่มปฏิกิริยาเป็นช่วงเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.10.2 วัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้กราฟมาตรฐาน ดี-ไซโลส และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับเวลา จะได้กราฟดังรูปที่ 3.8 พบว่าผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 15 นาทีแรกหลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ ดังนั้นจะใช้เวลา 10 นาทีในการบ่มปฏิกิริยาในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป

3.7.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของปฏิกิริยา

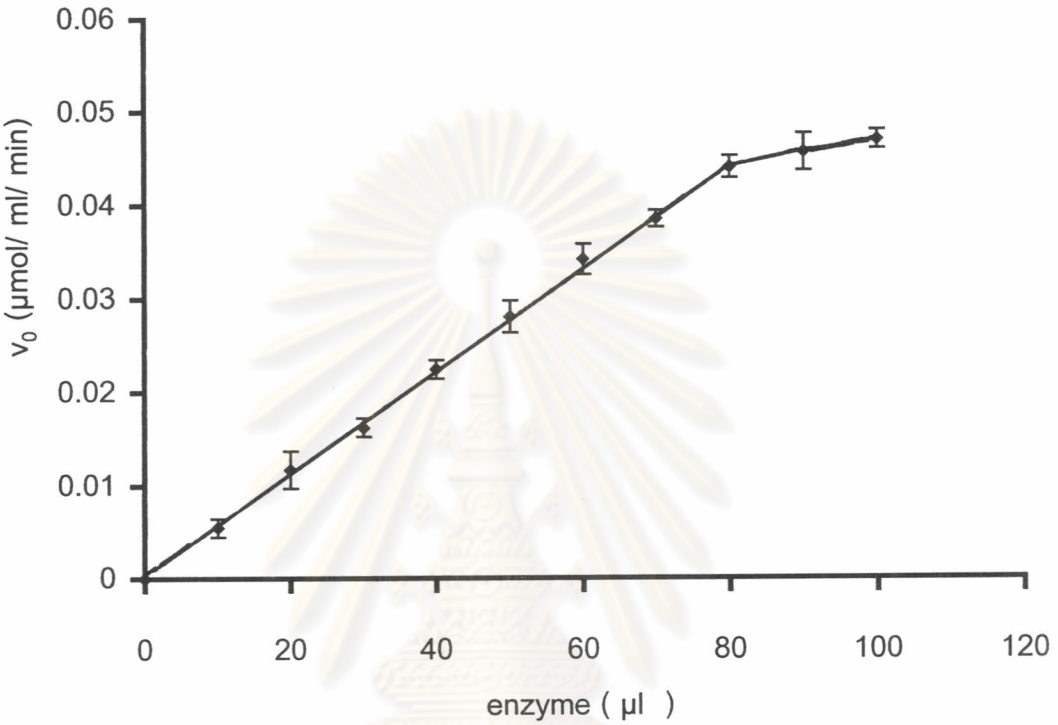
เมื่อให้ปริมาณสับสเตรทมากเกินพอ (1 mg) และทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ กัน ตามวิธีในข้อ 2.10.3 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.8 ผลของการศึกษาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา ตามวิธีในข้อ 2.10.2
(ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.9 ผลของการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาตามวิธีในข้อ 2.10.3 (ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.3 ผลการศึกษาความเป็นกรด–ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์

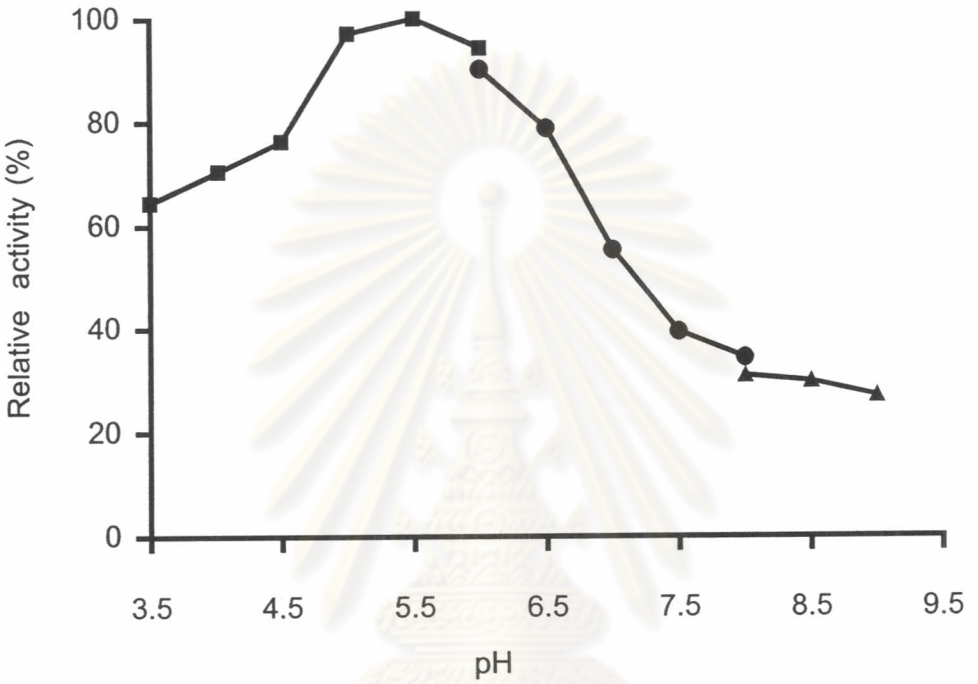
จากการบ่มปฏิกิริยาโดยแปรผันค่าความเป็นกรด–ด่างในช่วง pH 3.5 – 9.0 ตามวิธีในข้อ 2.10.4 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.7 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.10 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0 – 6.0 โดยเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5.5 (กำหนดให้แอคติวิตีเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) ที่ pH 3.5 เอนไซม์จะยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 64 เปอร์เซนต์ ส่วนที่ pH 9.0 เอนไซม์จะเหลือแอคติวิตีอยู่เพียง 27 เปอร์เซ็นต์

3.7.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์

จากการบ่มปฏิกิริยาโดยแปรผันอุณหภูมิให้ให้อยู่ในช่วง 30 – 80 องศาเซลเซียสและกำหนดค่าความเป็นกรดด่างคงที่ ที่ pH 5.5 ตามวิธีในข้อ 2.10.5 ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.7 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.11 พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (กำหนดให้แอคติวิตีเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) และที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียสขึ้นไปแนวโน้มแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเหลือแอคติวิตีเพียง 3 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีสูงสุด และเอนไซม์จะเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

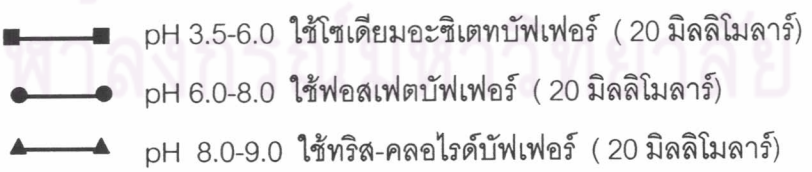
ส่วนความเสถียรของเอนไซม์ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.11 พบว่าเอนไซม์จะมีเสถียรภาพในช่วงอุณหภูมิ 35 - 45 องศาเซลเซียส และตั้งแต่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสขึ้นไปแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

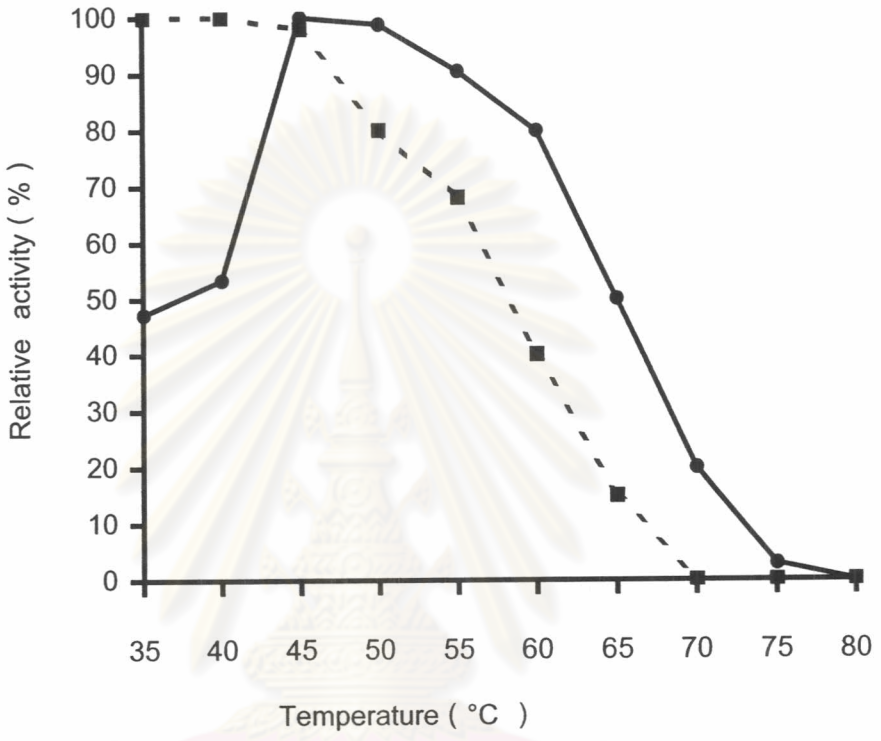
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.10 แสดงผลของความเป็นกรด–ด่างต่อแอคติวิตีและต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยทำตามวิธีทำในข้อ 2.10.4 กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 3.11 แสดงผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีและต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยทำตามวิธีทำในข้อ 2.10.5 กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

■·····■ ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

■——■ ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

3.7.5 ผลการศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m)

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาความจำเพาะของไซลาเนสจากไซแลนที่สกัดได้จากพืชสองชนิด คือไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelts xylan) และไซแลนจากเปลือกไม้เบิร์ช (Birchwood xylan) ตามวิธีในข้อ 2.7 นำผลการทดลองที่ได้มาพลอตกราฟ หาค่า K_m และ V_{max} โดยวิธี Lineweaver Burk แสดงดังรูปที่ 3.12 และ รูปที่ 3.13 พบว่าค่า K_m ของ Oat spelts มีค่าเท่ากับ 1.28 mg/ml และมีค่าความเร็วสูงสุดในการเร่งปฏิกิริยา (V_{max}) เท่ากับ 7.04 µmol/ ml / min ส่วน K_m ของ Birchwood มีค่าเท่ากับ 0.50 mg/ml และมีค่า V_{max} เท่ากับ 8.33 µmol/ ml / min

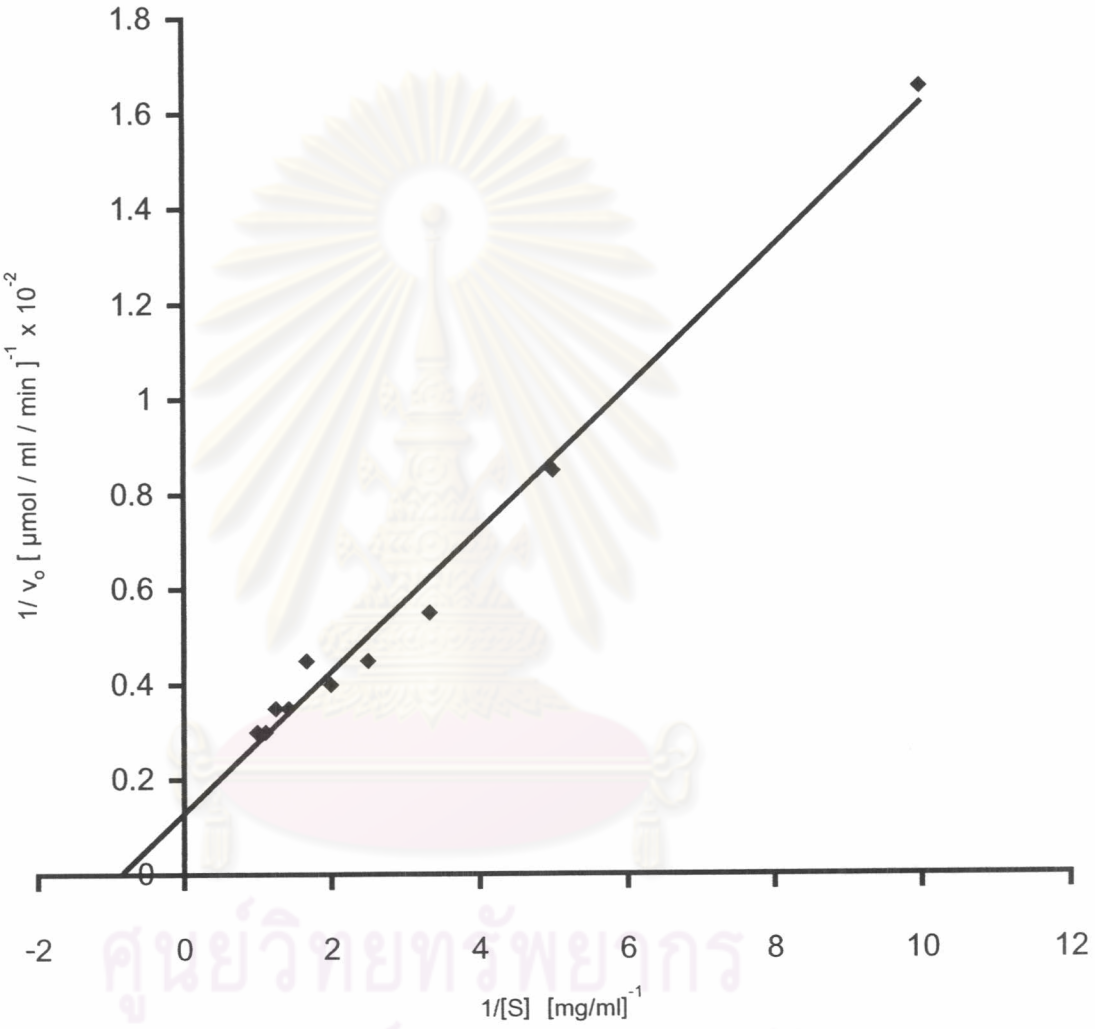
ตารางที่ 3.3 สรุปค่า K_m และ V_{max} ของไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไซแลนจากเปลือกไม้เบิร์ช เป็นสับสเตรท

Substrate	Enzyme Kinetics	
	K_m	V_{max}
Oat spelts xylan	1.28	7.04
Birchwood xylan	0.50	8.33

K_m มีหน่วยเป็น mg/ml

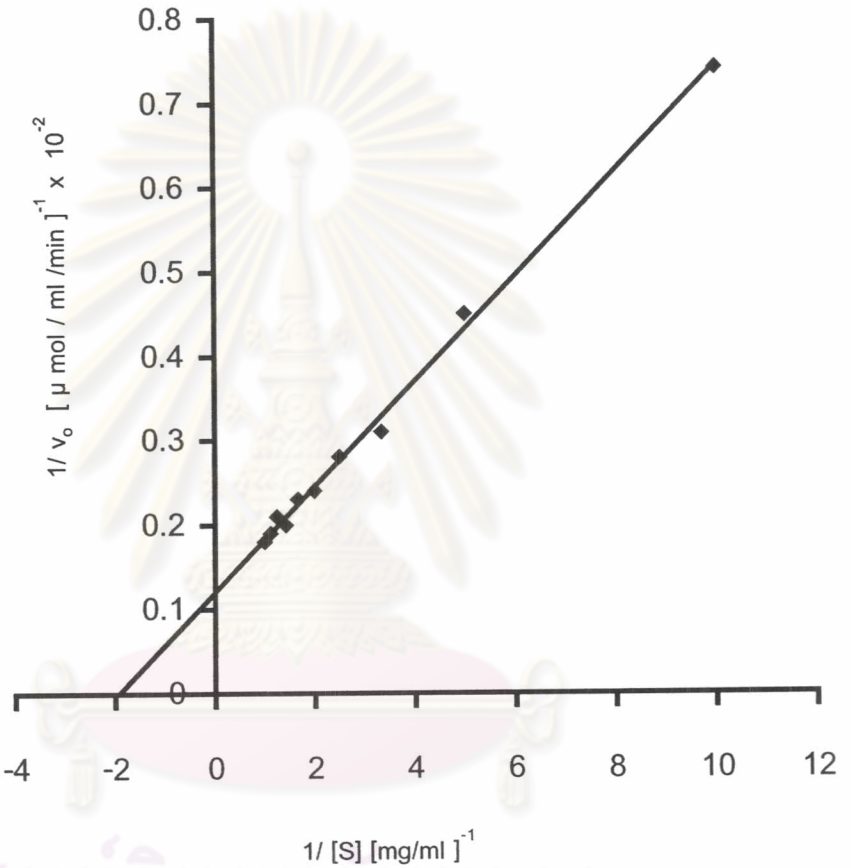
V_{max} มีหน่วยเป็น µmol/ ml / min

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.12 Lineweaver - Burk plot ของไซลาเนสเมื่อใช้ Oat spelts xylan เป็นสับสเตรท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.13 Lineweaver - Burk plot ของไซลาเนสเมื่อใช้ Birchwood xylan เป็นสับสเตรท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.6 ผลการศึกษาอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการศึกษาถึงผลของอิออนโลหะชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการบ่มอิออนและเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 2.10.7 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.4 พบว่า Hg^{2+} และ Zn^{2+} จะมีผลยับยั้งแอคติวิตีของไซลาเนสอย่างรุนแรง ส่วน Cu^{2+} , Mg^{2+} และ Sn^{2+} จะมีผลยับยั้งแอคติวิตีของไซลาเนสปานกลาง Ca^{2+} และ Fe^{2+} มีผลต่อแอคติวิตีของไซลาเนสเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 3.4 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์

Compounds	* Relative activity (%)		
	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM
$CaCl_2.5H_2O$	100.00	98.26	97.40
$CuSO_4.5H_2O$	84.64	75.80	40.48
$FeSO_4.7H_2O$	99.08	97.48	94.44
$HgCl_2$	38.80	14.52	0.00
$MgSO_4.7H_2O$	88.84	82.36	66.42
$SnCl_2\ 2H_2O$	82.75	80.87	77.54
$ZnSO_4.7H_2O$	62.20	15.34	0.00

* กำหนดให้แอคติวิตีของไซลาเนสที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยอิออนโลหะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.7 ผลการศึกษาการดัดแปลงกรดอะมิโนด้วยสารเคมีที่มีความจำเพาะ

จากการศึกษาถึงกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อแอคติวิตีของไซลาเนส โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาบ่มกับสารดัดแปลงกรดอะมิโนตามวิธีในข้อ 2.10.8 โดยมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มกับสารดัดแปลงกรดอะมิโนเป็นตัวเปรียบเทียบ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.5 พบว่า DEPC และ NBS จะยับยั้งแอคติวิตีของไซลาเนสได้เกือบสมบูรณ์ ดังนั้นฮีสติดีน และ ทริปโตฟาน น่าจะมีความสำคัญในการทำงานของไซลาเนส ส่วน TNBS , IAM , PMSF , NAI และ EDAC จะไม่มีผลต่อการทำงานของไซลาเนส

ตารางที่ 3.5 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของเอนไซม์

Modifying Reagent (1.0 mM)	* Relative activity (%)
TNBS	100.00
IAM	100.00
DEPC	18.00
NBS	3.60
PMSF	84.60
NAI	100.00
EDAC	96.70

* กำหนดให้แอคติวิตีของไซลาเนสที่ไม่ผ่านการบ่มกับสารดัดแปลงกรดอะมิโนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย