บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. การเตรียมและการทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์

1.1 การเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. 42-9

จากการเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลเนส รวมทั้งการตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ ในสภาวะการตรวจสอบเบื้องต้นดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 5 พบว่า Streptomyces sp. 42-9 สามารถผลิตไซแลเนสได้ถึง 2.50 หน่วยต่อมิลลิกรัมของน้ำเลี้ยงเชื้อ และมีโปรตีนเข้มข้น 2.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนการทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์ คือ ตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟต และนำลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของไซแลเนสมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยการทำโครมาโตกราฟี ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

1.2 การแยกไซแลเนสออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการตกตะกอนด้วยเกลือ - แอมโมเนียมซัลเฟต

จากการนำน้ำหมักที่ผ่านการปั่นแยกเซลและกากอาหารออกแล้ว มาตกตะกอนลำดับส่วน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-85 เปอร์เซนต์ ดังผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่ามีปริมาณเอนไซม์สูงสุดในลำดับส่วน 0-30 เปอร์เซนต์ และยังคงมีเอนไซม์ในลำดับส่วนที่ 30-40 เปอร์เซนต์ และ 40-50 เปอร์เซนต์ ดังนั้นเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์และปริมาณสูง จึงได้ทดลองตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-10, 10-20, 20-30, 30-50 เปอร์เซนต์ ดังผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่า ปริมาณเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในลำดับส่วนที่ 20-30 เปอร์เซนต์ และ 30-50 เปอร์เซนต์ ดังนั้น ในการทดลองต่อไป จึงได้ตกตะกอนด้วย-

ตารางที่ 3 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-85 เปอร์เซนต์

แฟรคชันของแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาตร (มล.)	โปรตีน (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	%แอคติวิตี
สารสกัดของเอนไซม์	360.0	1,080.0	900.0	0.88	100
0-30%	9.0	315.0	647.0	2.06	71.94
30-40%	5.0	118.5	98.0	0.83	10.89
40-50%	5.0	150.0	70.0	0.47	7.78
50-60%	2.0	40.2	6.1	0.15	0.68
60-70%	1.0	51.0	5.0	0.10	0.56
70-85%	1.0	32.4	0	0	0

ตารางที่ 4 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-10, 10-20, 20-30 และ 30-50 เปอร์เซนต์

แฟรคชันของแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาตร (มล.)	โปรตีน (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)	% แอคติวิตี
สารสกัดของเอนไซม์	350.0	910.0	875.0	0.96	100
0-10%	2.0	23.1	7.5	0.32	0.86
10-20%	2.0	25.4	9.0	0.35	1.03
20-30%	9.0	312.0	525.3	1.68	60.03
30-50%	6.0	150.2	184.0	1.23	21.03

ตารางที่ 5 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-20 และ 20-50 เปอร์เซนต์

แฟรคชันของแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาตร (มล.)	โปรตีน (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)	% แอคติวิตี
สารสกัดของเอมไซม์	350.0	1,025.0	910.0	0.89	100
0-20%	2.0	20.0	5.1	0.26	0.56
20-50%	20.0	340.0	746.2	2.19	82.00

จากการนำเอนไซม์ที่เข้มข้นไปผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ดัง

แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-20 เปอร์เซนต์ และ 20-50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่า แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 20-50 เปอร์เซนต์ จะให้ปริมาณเอนไซม์และแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 20-50 เปอร์เซนต์ ในการตกตะกอนโปรตีน

1.3 <u>การทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์</u>

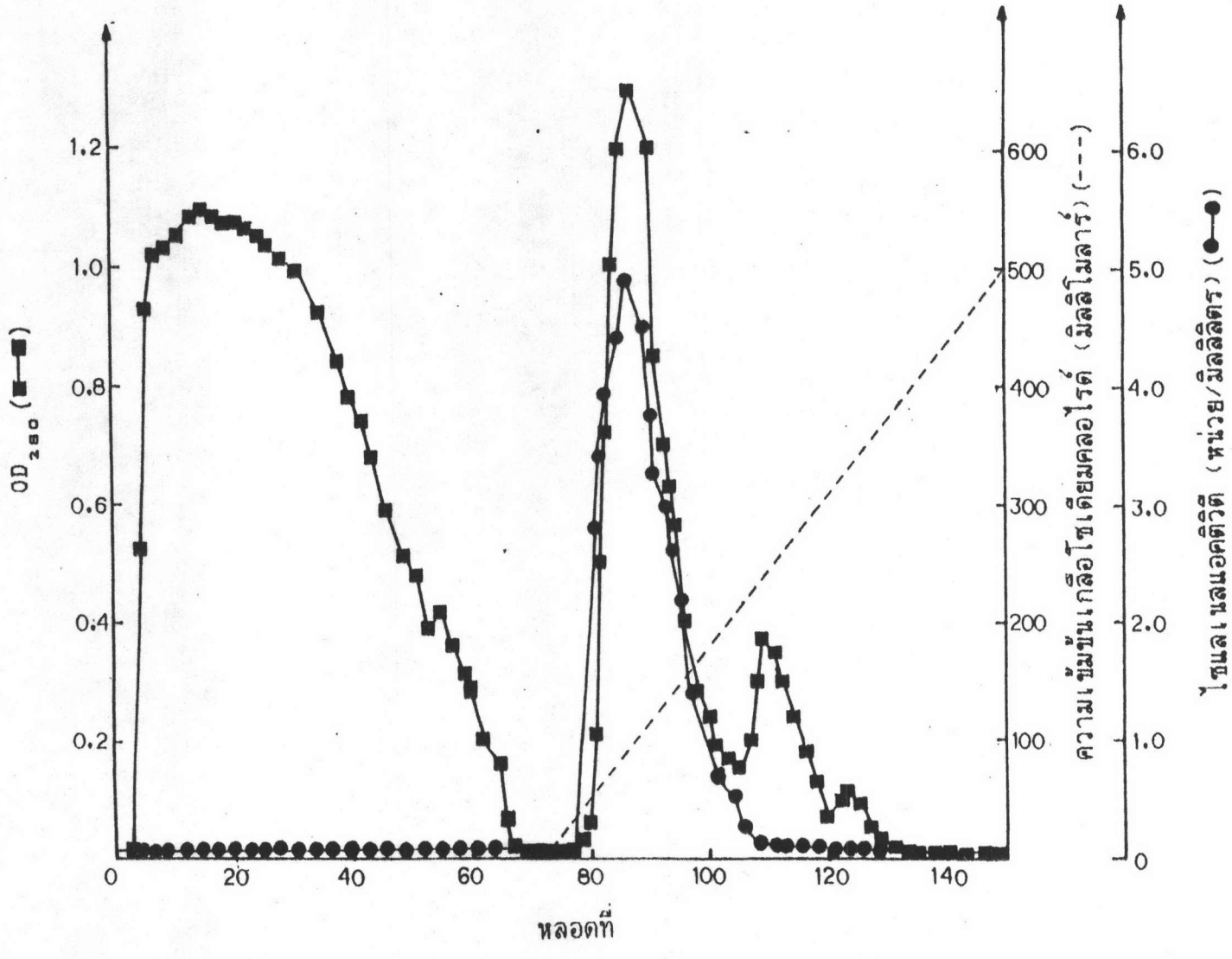
นำสารสกัดเอนไซม์ที่มีโปรตีน 7,308 มิลลิกรัม ซึ่งได้จาก Streptomyces sp. 42-9 มาทำให้ได้ไซแลเนสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ดังมีรายละเอียดผลการทดลองดังนี้

1.3.1 <u>การตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 20-50 เปอร์เซนต์</u>

เมื่อนำสารสกัดของเอนไซม์ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวความเข้มข้น 20-50 เปอร์เซนต์ พบว่า ค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นถึง 11.86 เท่า เมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 70 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 6

1.3.2 <u>โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50</u>

นำโปรตีนปริมาณ 437.5 มิลลิกรัม ซึ่งได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 20-50 เปอร์เซนต์ ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 0.05 โมลาร์ ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเธน บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการกรองแบบอุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟีบน ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคลบ (anion-exchanger) ขั้นตอนนี้เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไป และยังสามารถกำจัดโปรตีนที่มีประจุต่างกับเอนไซม์มาก ๆ ออกด้วยโดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกัน



รูปที่ 2 การแยกเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. 42-9 โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 รายละเอียดการทดลองกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3

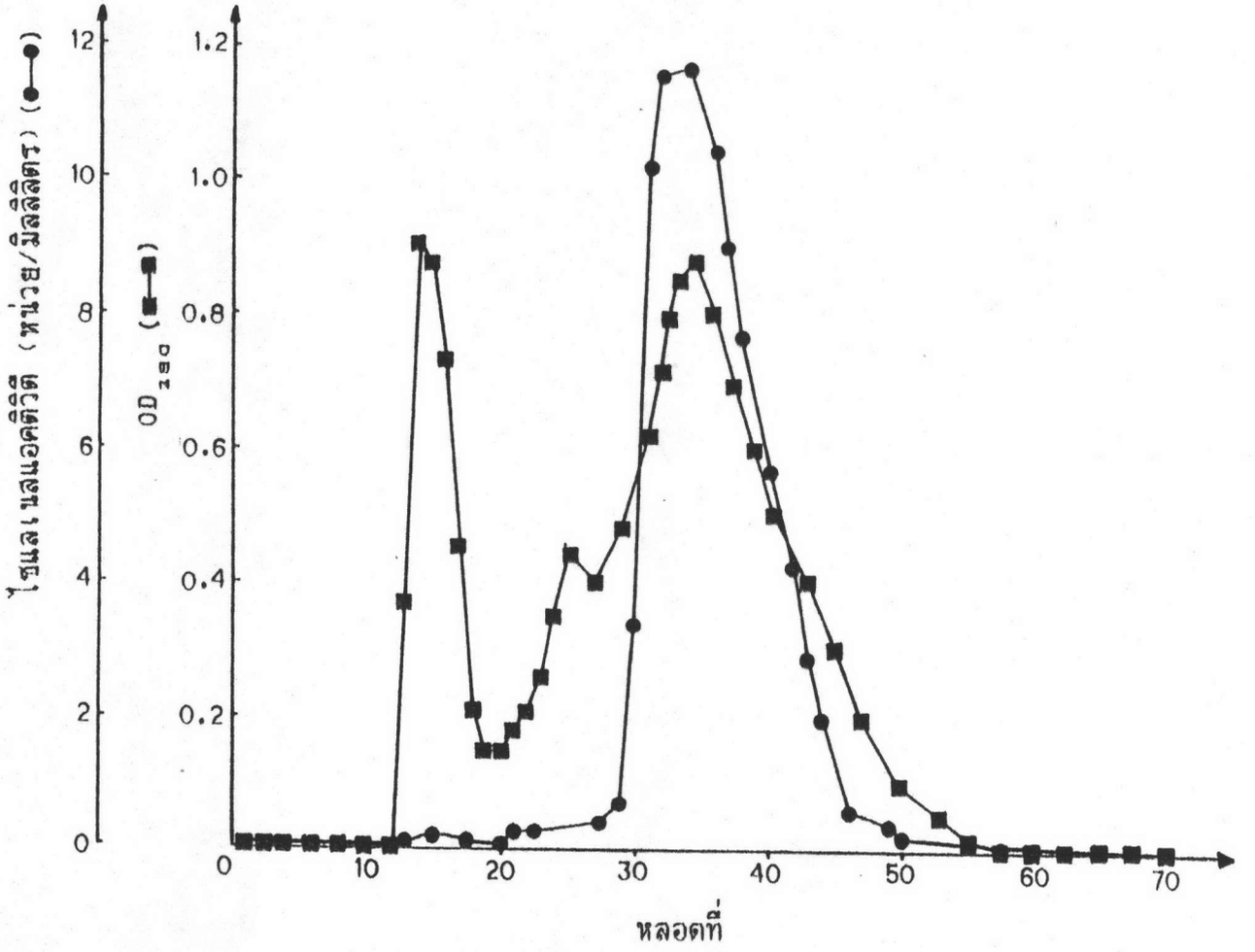
วิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าเอนไซม์ไซแลเนสจะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 78-105 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30-150 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์ไซแลเนสมีประจุเป็นลบ เมื่อรวมลำดับส่วนที่ 78-105 เข้าด้วยกันวัดแอคติวิตีรวมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 1,384 หน่วย แอคติวิตีจำเพาะ 7.32 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 20.33 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 6

1.3.3 โครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-150

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ อาศัยหลักการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างจากเอนไซม์ออกไปโดยนำมาผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-150 ดังวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 4 ได้ผลดังในรูปที่ 3 โดยผ่านโปรตีน 189.2 มิลลิกรัม ซึ่งแขวนลอยใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ลงบนคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร มาวัดโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในลำดับส่วนที่ 29-46 และเมื่อรวมสารลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกัน วัดแอคติวิตีรวมของเอนไซม์ได้ 986.9 หน่วย และพบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะ 12.62 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 35.06 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 6

2. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้

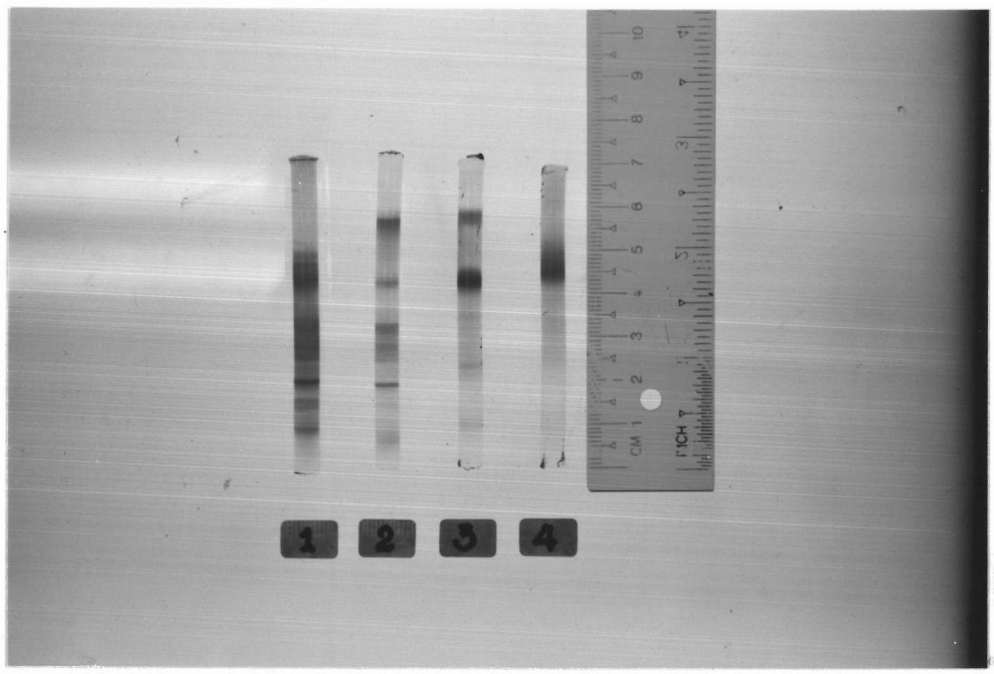
จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซแลเนสโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล ดังรายละเอียดของการทดลอง ในบทที่ 2 ข้อ 8 พบจำนวนแถบโปรตีนบนแท่งเจลลดลงจากสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อผ่านขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์และในขั้นตอนสุดท้าย พบโปรตีนหนึ่งแถบบนแท่งเจล ดังแสดงในรูปที่ 4 และวัดค่า R_f ได้ 0.38 จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ ตรงตำแหน่งที่มีแถบโปรตีน พบว่าแถบโปรตีนบนแท่งเจลมีความสัมพันธ์กับแอคติวิตีของเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 5 ผลการทดลองแสดงว่าไซแลเนสที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง



รูปที่ 3 การทำโครมาโตกราฟีบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 รายละเอียดการทดลองกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4

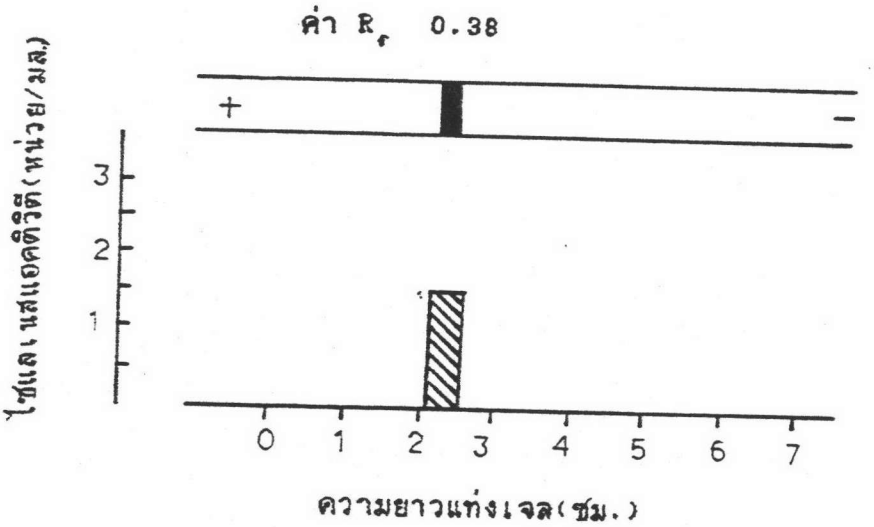
ตารางที่ 6 สรุปขั้นตอนต่างๆ ในการทำไซแลเนสจากสเตรพโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)	ปริมาณเอนไซม์ (เปอร์เซนต์)
สารสกัดของเอนไซม์	2,000	7308.0	2,600.0	0.36	1	100.0
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 20-50 เปอร์เซนต์	75	437.5	1,869.0	4.27	11.86	71.88
โครมาโตกราฟีบน ดีอีเออี - เซฟาเด็กซ์ เอ-50	20	189.2	1,384.0	7.32	20.33	53.23
โครมาโตกราฟีบน เซฟาเด็กซ์ จี-150	5	78.2	986.9	12.62	35.06	37.96



รูปที่ 4 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ รายละเอียดการทดลองกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8

1. สารสกัดของเอนไซม์ (ปริมาณโปรตีน 300 ไมโครกรัม)
2. 20-50 เปอร์เซนต์แอมโมเนียม ซัลเฟต (ปริมาณโปรตีน 102.3 ไมโครกรัม)
3. คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (ปริมาณโปรตีน 100.5 ไมโครกรัม)
4. คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 (ปริมาณโปรตีน 100.5 ไมโครกรัม)



รูปที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส ที่พบในแถบโปรตีนที่ผ่านการทำอิเลคโตรโฟริซิส บนโพลิอะคริลาไมด์เจล

■ แถบโปรตีน

▨ แอคติวิตีของเอนไซม์

3. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

3.1 โดยวิธีโครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-150

การหาน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 ที่เตรียมได้โดยวิธีโครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-150 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ คะตะเลส (240,000 ดาลตัน) , โบวีนซีรัม อัลบูมิน (68,000 ดาลตัน) , โอวัลบูมิน (43,000 ดาลตัน) และไซโตโครม ซี (12,000 ดาลตัน) (รูปที่ 6) จากการนำความสัมพันธ์ของค่า K_{av} (คำนวณได้ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 10.1) ของโปรตีนมาตรฐานกับลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ดังแสดงในรูปที่ 7) มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสที่เตรียมได้ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 36,000 ดาลตัน

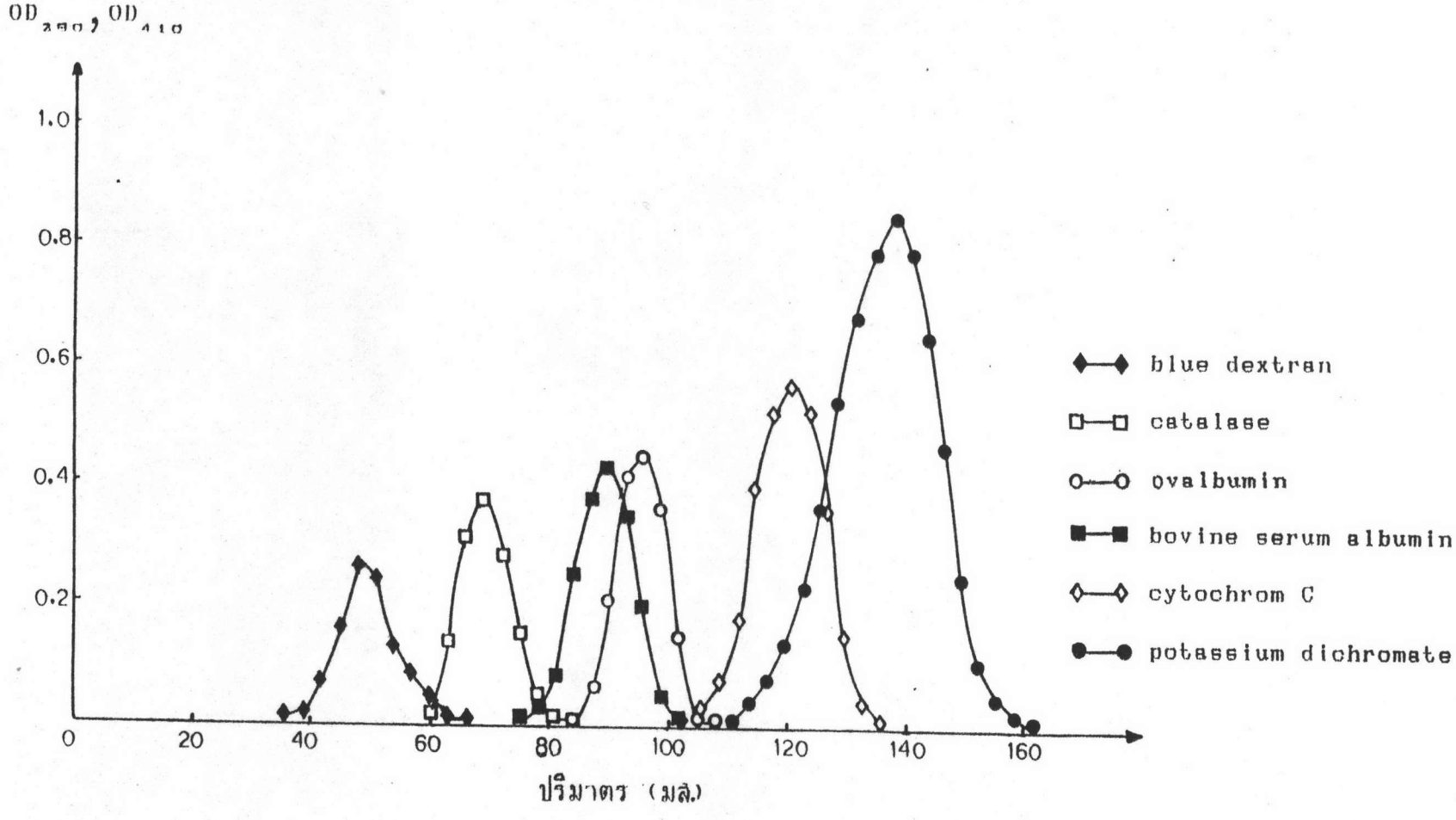
3.2 โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสบน SDS โพลิอะคริลาไมด์เจล

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นสุดท้าย มาศึกษาองค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซิสบน SDS โพลิอะคริลาไมด์เจล ดังการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 9 ได้ผลการทดลองในรูปที่ 8 พบว่าไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 ให้แถบโปรตีนที่ติดสีสองแถบ โดยสีจะเข้มชัดหนึ่งแถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 9) ส่วนอีกแถบหนึ่งซึ่งติดสีค่อนข้างจาง น่าจะเป็นโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนมา เมื่อประเมินจากค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการทดลองนี้ ร่วมกับน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จากการทำโครมาโตกราฟีบน เซฟาเด็กซ์ จี-150 แสดงว่า ไซแลเนสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. 42-9 ประกอบด้วยโพลิเปปไทด์สายเดี่ยวที่ไม่มีหน่วยย่อย

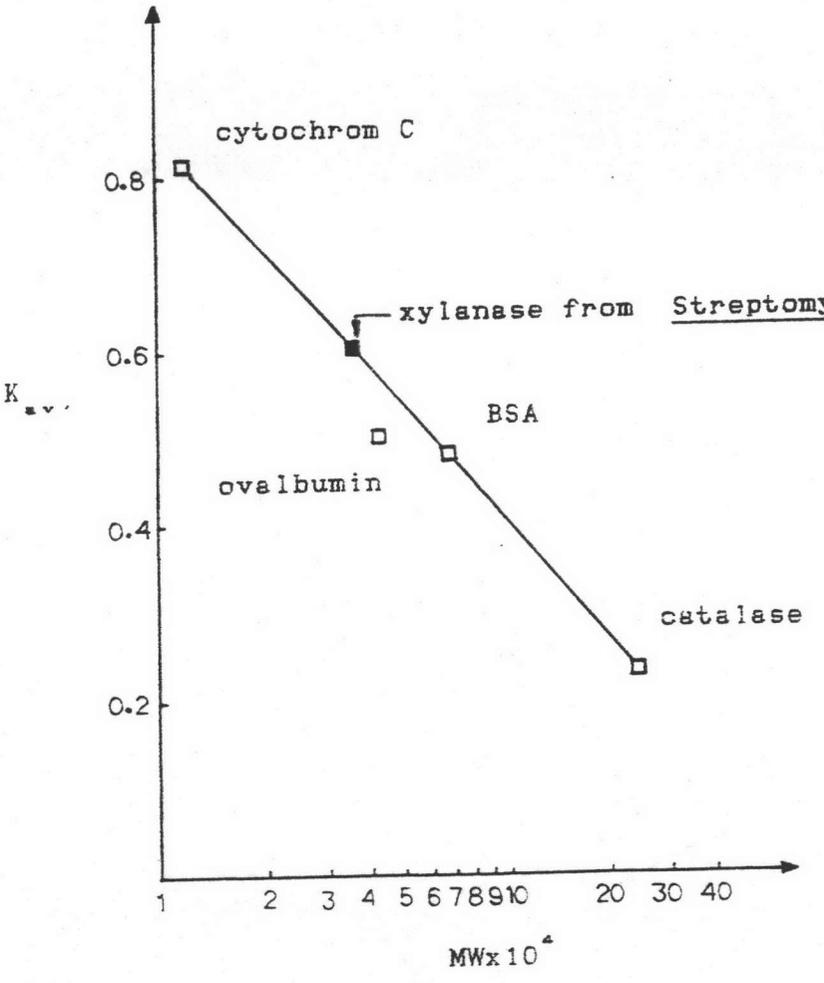
4. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์

นำเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าวมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์และสมบัติของเอนไซม์ดังนี้

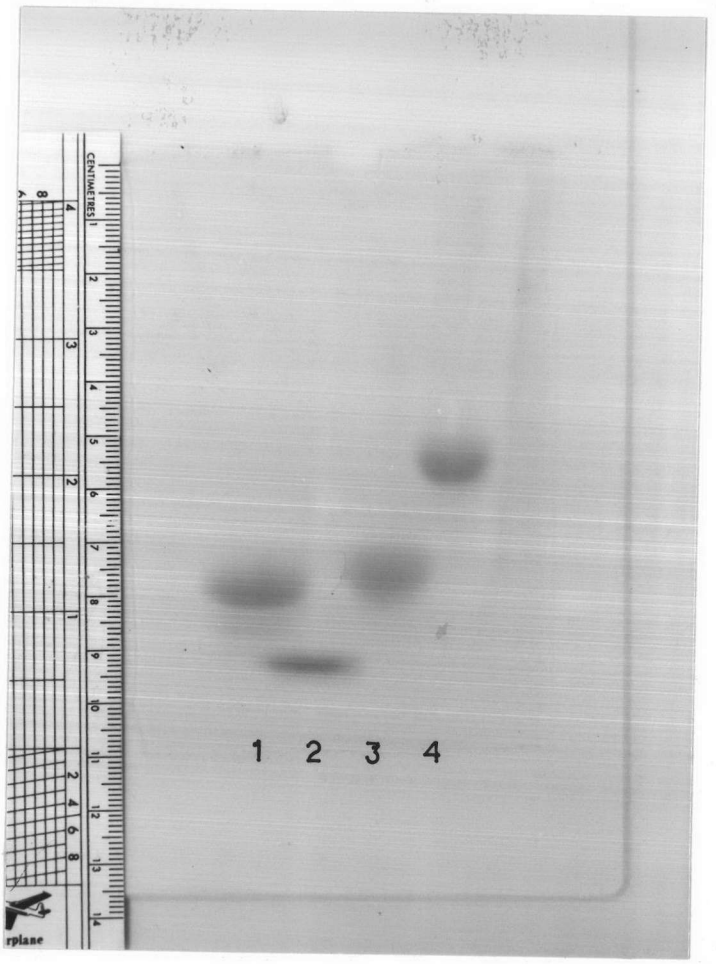
ศูนย์วิทยทรัพยากร



รูปที่ 6 การทำโครมาโตกราฟีของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซแลเนส บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 รายละเอียดการทดลองกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4

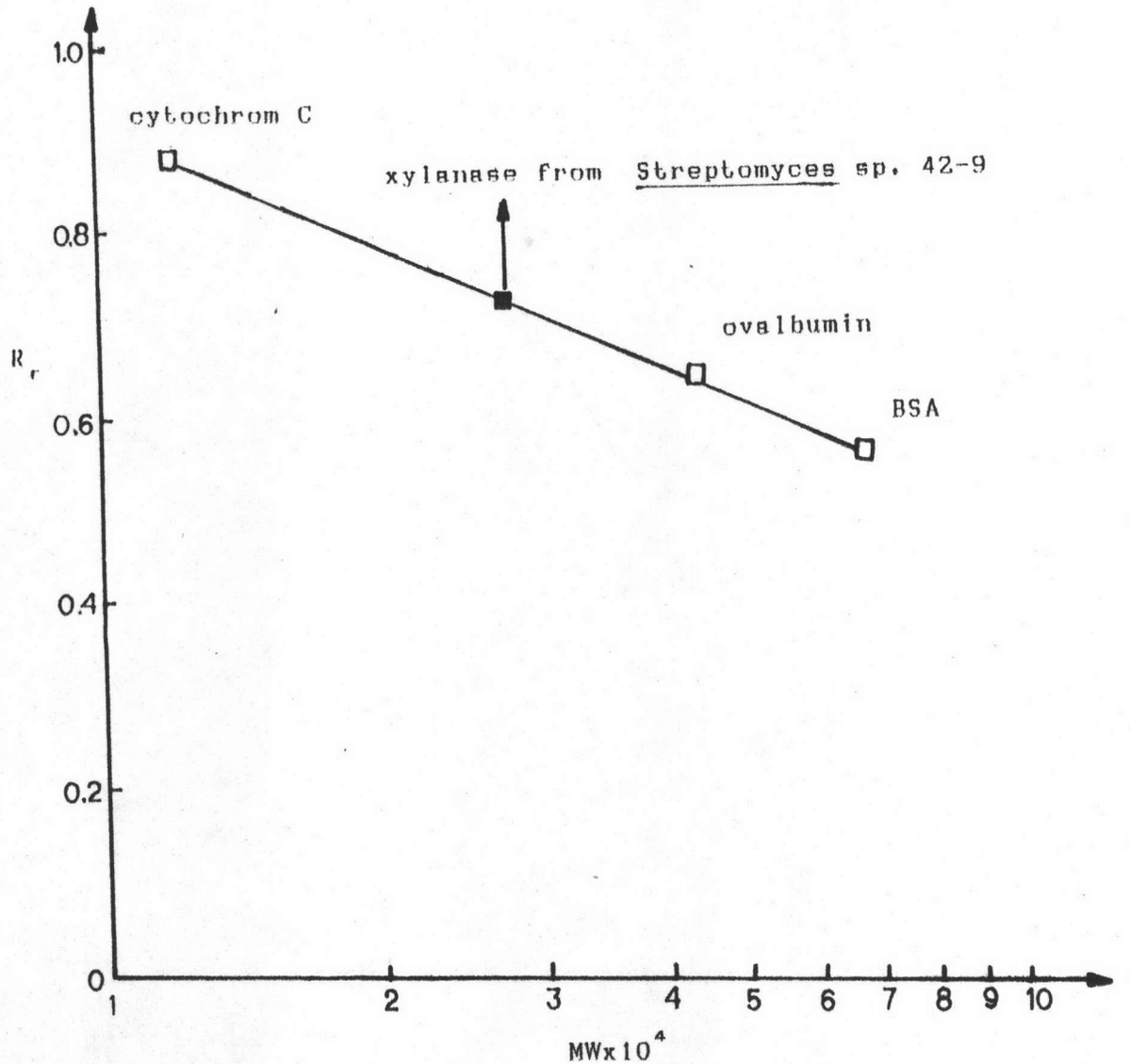


รูปที่ 7 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลและค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซแลเนส โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 รายละเอียดการทดลองกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4



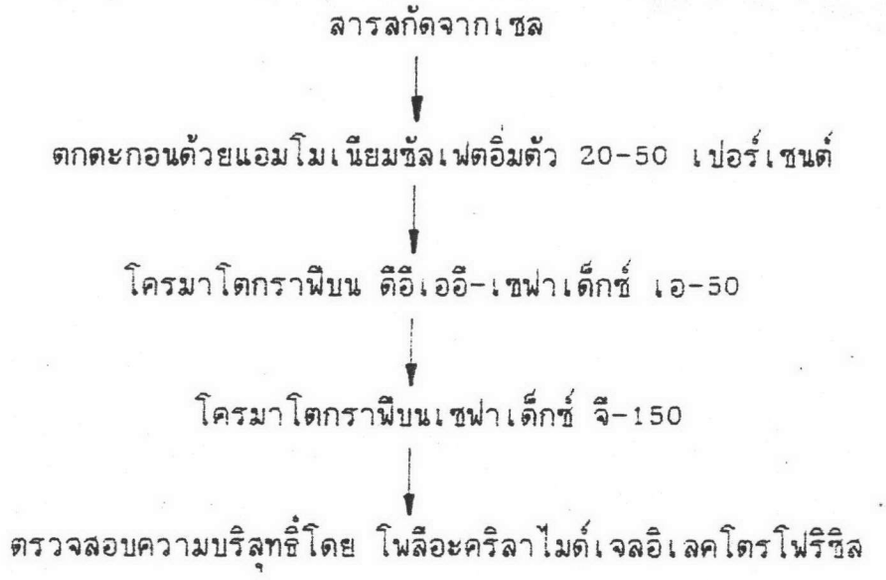
รูปที่ 8 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสของเอนไซม์ไซแลเนส ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 และโปรตีนมาตรฐาน

1. เอนไซม์ไซแลเนสจาก (ปริมาณโปรตีน 17 ไมโครกรัม)
   Streptomyces sp. 42-9
2. ไซโตโครม ซี (M_r = 12,000 ดาลตัน)
3. โอวัลบูมิน (M_r = 43,000 ดาลตัน)
4. โบวินซีรัมอัลบูมิน (M_r = 68,000 ดาลตัน)



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (โดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซีสตามการทดลองที่ 9) และลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล

รูปที่ 10 สรุปขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซแล่เนสให้บริสุทธิ์บางส่วน



4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

4.1.1 อุณหภูมิ

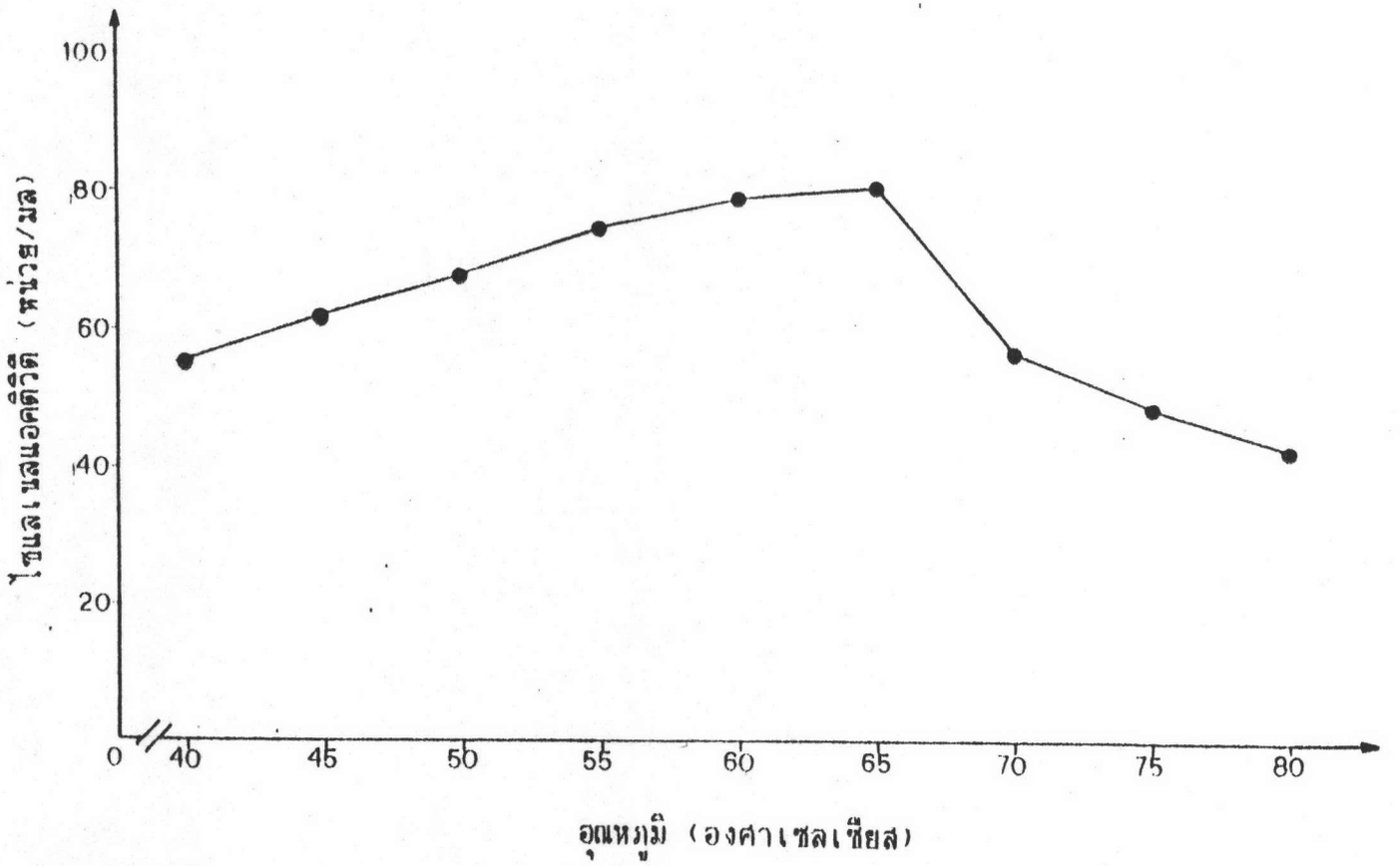
นำสารละลายเอนไซม์ไซแลเนส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5 ยกเว้นบ่มสารผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆคือ 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผลการทดลองดังรูปที่ 11 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงสุดในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในการศึกษา

4.1.2 pH

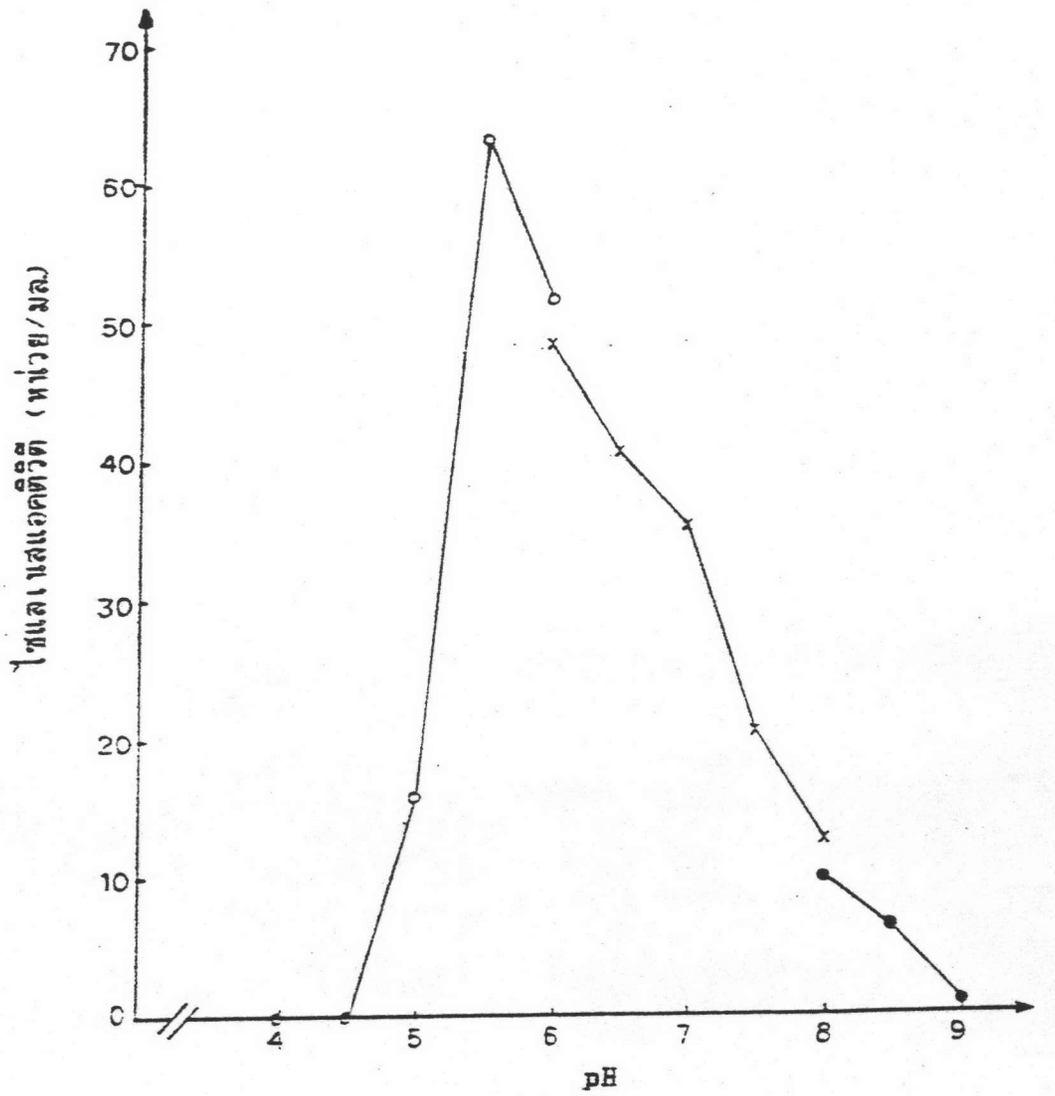
การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำโดยนำเอนไซม์มาบ่มในส่วนผสมของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5 ยกเว้นในบัฟเฟอร์ที่มีช่วง pH ต่างๆกันตั้งแต่ 4.0-9.0 และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังในรูปที่ 12 พบว่าเอนไซม์ สามารถทำงานได้ดีที่ pH 5.5 (ในอะซิเตทบัฟเฟอร์) แต่ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่ค่า pH เท่ากับ 4.0-4.5 และ 9.0 เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีโดยสิ้นเชิง ดังนั้นในการทดลองต่อๆไป การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จะทำที่ pH 5.5

4.1.3 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าว ในบทที่ 2 ข้อ 5 ที่ 65 องศาเซลเซียส และแปรผันความเข้มข้นของอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ระหว่าง 0-500 มิลลิโมลาร์ ได้ผลการทดลองดังในรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าในช่วงความเข้มข้น 50-200 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีค่อนข้างสูง และที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงกว่า 300 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์



รูปที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. 42-9 ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 ยกเว้น อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงไว้ในรูป ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 70 หน่วย

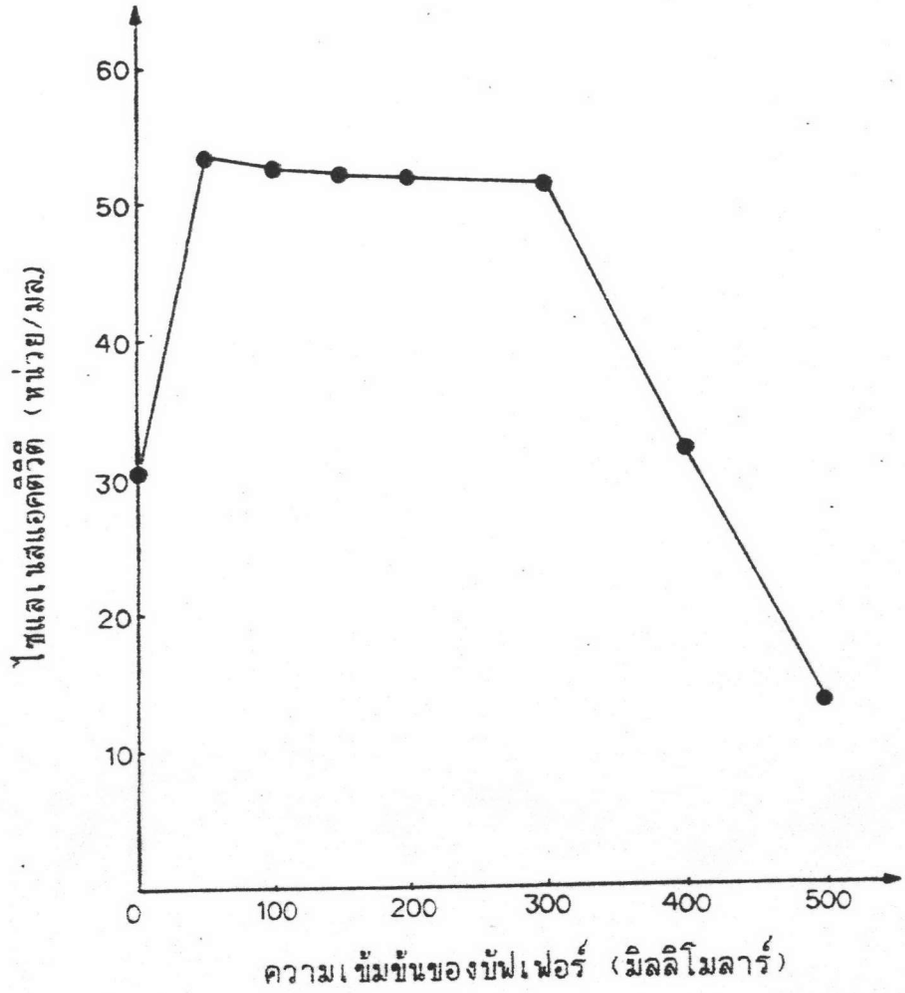


รูปที่ 12 ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. 42-9 ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 ยกเว้น pH ที่ใช้ในการศึกษา ดังแสดงในรูป และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 50 หน่วย

o—o อะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 4.0-6.0)

×—× โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0-8.0)

●—● ทริส-บัฟเฟอร์ (8.0-9.0)



รูปที่ 13 ผลของความเข้มข้นของอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 ยกเว้นในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่ความเข้มข้นต่างๆดังแสดงในรูปและบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 50 หน่วย

4.2 การหาค่า K_m ของเอนไซม์ต่อไซแลน

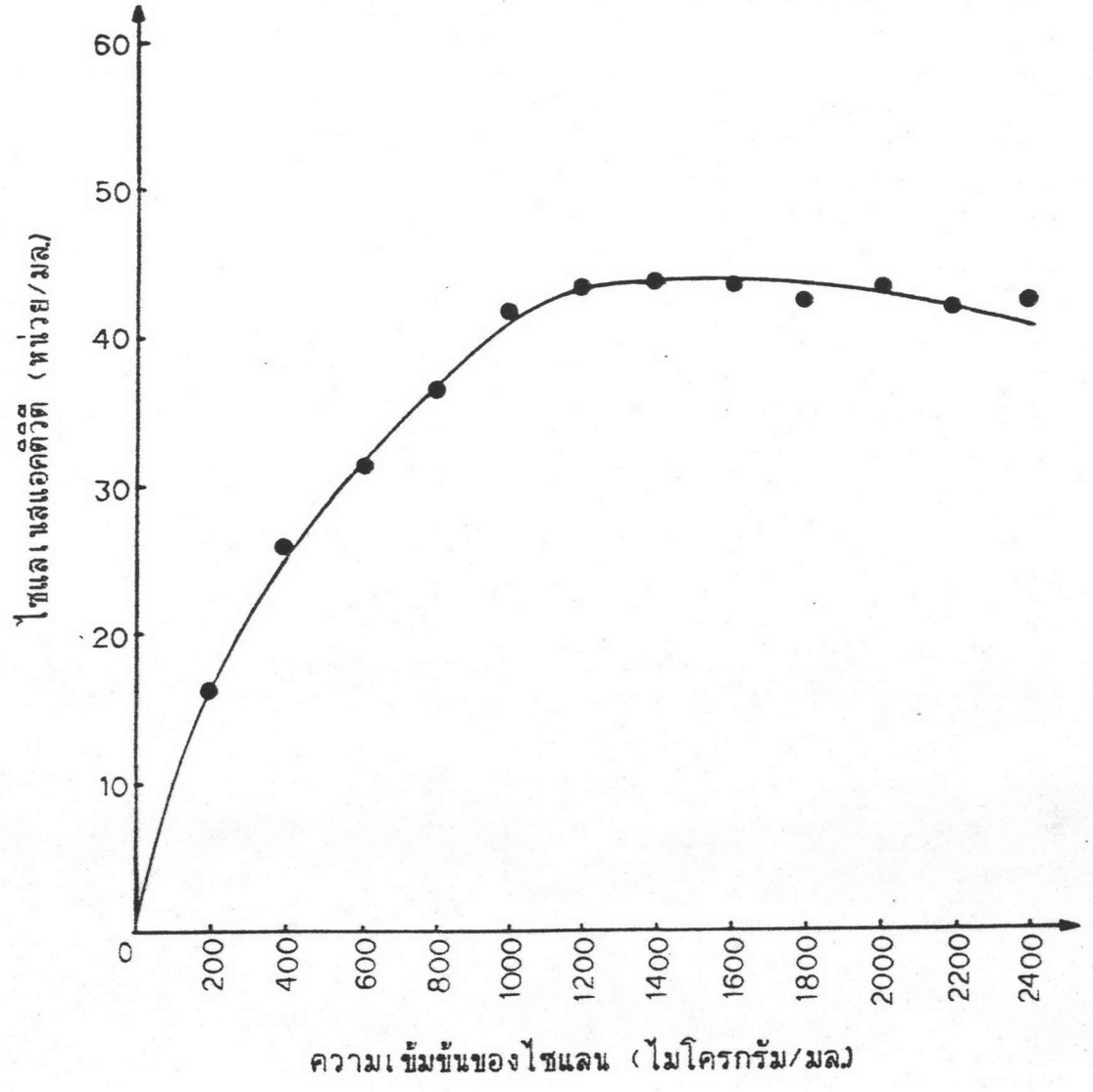
การหาค่า K_m ของไซแลเนสที่เตรียมได้ต่อสับสเตรทคือไซแลน โดยนำไซแลเนสความเข้มข้นพอเหมาะ ทำปฏิกิริยากับไซแลน (oat spelt xylan) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-2.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ดังแสดงใน รูปที่ 14 จากการนำค่าที่ได้นี้ไปเขียนกราฟในรูปของไลน์-วีเวอร์เบิร์ก ระหว่าง 1/V และ 1/[S] พบว่าเอนไซม์ไซแลเนส มีค่า K_m สำหรับไซแลนเท่ากับ 0.57 มิลลิกรัมไซแลน/มิลลิลิตร

4.3 ผลของเกลือแร่ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

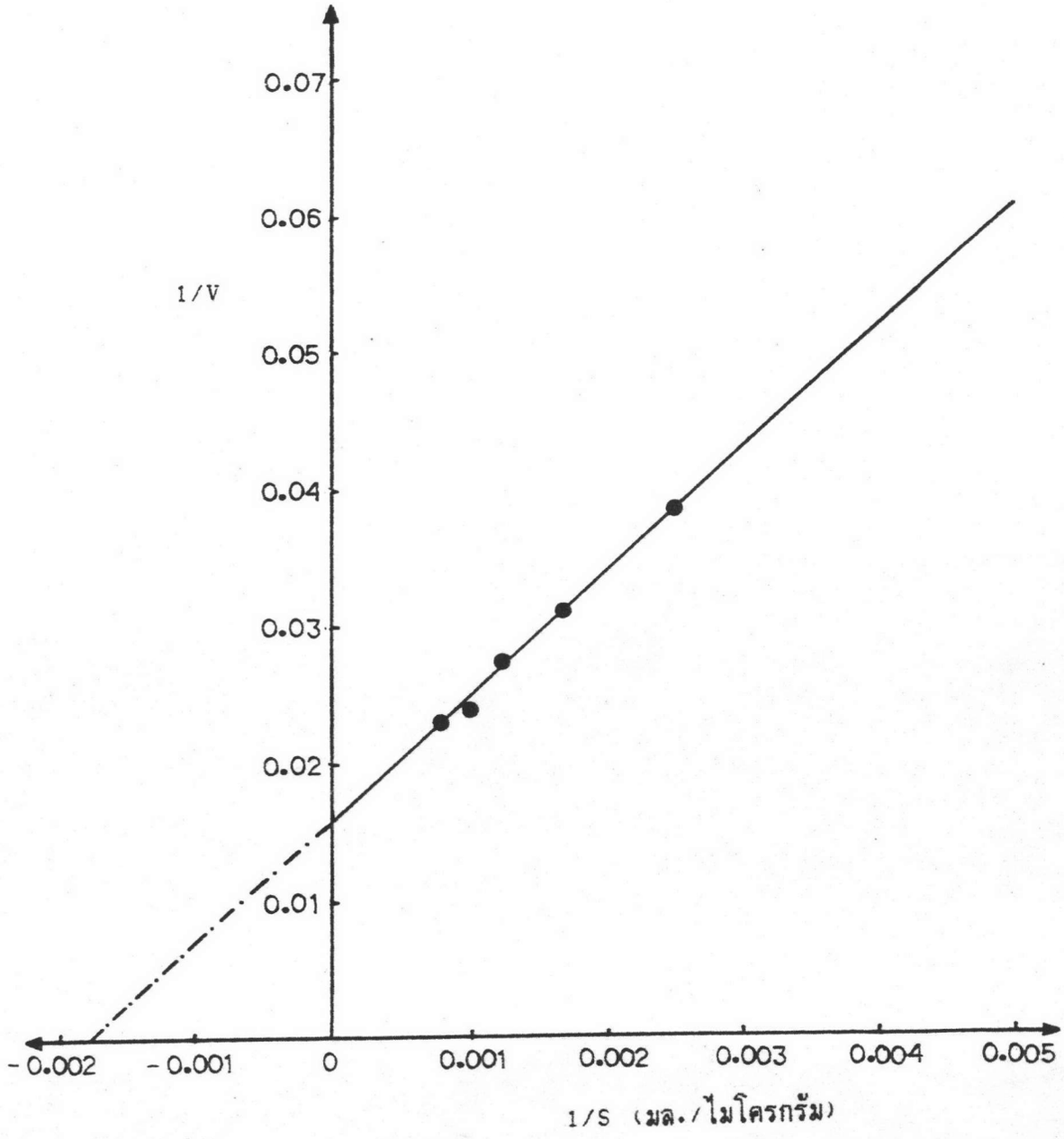
เมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการกำจัดไดเวเลนท์แคทไอออนออกแล้ว โดยการไดอะไลส์ใน 0.01โมลาร์ EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใน 0.1 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ข้ามคืนมาวัดความสามารถในการทำงานภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือสารผสมของปฏิกิริยาที่มีไซแลน 1 เปอร์เซนต์ 0.1 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 มาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสโดยเติมสารละลายเกลือแร่ที่ต้องการทดสอบดังระบุในตารางที่7 พบว่าเกลือแร่ส่วนใหญ่มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เล็กน้อยแต่บางชนิดจะยับยั้งแอคติวิตีสูงมากคือ เมอร์คิวริคคลอไรด์ ($HgCl_2$) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) และ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) โดยเมอร์คิวริคคลอไรด์ เป็นสารที่มีผลรุนแรงที่สุดต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส การทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามความเข้มข้นของเมอร์คิวริคคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นโดยที่ความเข้มข้น 0.01โมลาร์ จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ส่วนเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) และ โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) แทบจะไม่มีผลต่อแอคติวิตี ของเอนไซม์นี้

4.4 ผลของแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) หรือ ดี-ไซโลส (D-xylose) ต่อการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจาก ดี-ไซโลส เป็นผลิตภัณฑ์หนึ่ง ที่ได้จากการสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนส และ แอล-อะราบิโนส ก็มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับน้ำตาลไซโลส ดังนั้นจึงศึกษาผลของน้ำตาลทั้งสองชนิดที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์



รูปที่ 14 ผลของความเข้มข้นของไซแลนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 ยกเว้นความเข้มข้นของไซแลน ดังแสดงในรูป และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส



รูปที่ 15 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_m ของเอนไซม์ไซแลเนสเมื่อมีไซแลนเป็นสับสเตรท

ตารางที่ 7 ผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส

ชนิดของเกลือแร่	ความเข้มข้น (โมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์* (เปอร์เซนต์)
$ZnSO_4.7H_2O$	$1X10^{-4}$	93.09
	$1X10^{-3}$	88.31
	$1X10^{-2}$	64.18
$FeSO_4.7H_2O$	$1X10^{-4}$	94.16
	$1X10^{-3}$	93.89
	$1X10^{-2}$	92.83
$CoCl_2.6H_2O$	$1X10^{-4}$	91.77
	$1X10^{-3}$	91.23
	$1X10^{-2}$	89.91
$MgSO_4.7H_2O$	$1X10^{-4}$	82.15
	$1X10^{-3}$	80.37
	$1X10^{-2}$	79.58
$MnSO_4.4H_2O$	$1X10^{-4}$	65.24
	$1X10^{-3}$	61.27
	$1X10^{-2}$	35.80
$CaCl_2.2H_2O$	$1X10^{-4}$	52.74
	$1X10^{-3}$	44.32
	$1X10^{-2}$	40.37

ตารางที่ 7 (ต่อ) ผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส

ชนิดของเกลือแร่	ความเข้มข้น(โมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์* (เปอร์เซนต์)
$HgCl_2$	$1X10^{-4}$	51.89
	$1X10^{-3}$	47.27
	$1X10^{-2}$	0
$CuSO_4.5H_2O$	$1X10^{-4}$	48.39
	$1X10^{-3}$	45.16
	$1X10^{-2}$	10.10
$SnCl_2.2H_2O$	$1X10^{-4}$	53.01
	$1X10^{-3}$	52.88
	$1X10^{-2}$	51.47

* แอคติวิตีสัมพัทธ์ คำนวณโดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ปราศจากเกลือแร่ที่จะทดสอบเป็น 100 เปอร์เซนต์ การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทำตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 โดยมีหรือไม่มีเกลือแร่ต่างๆ ที่จะทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังระบุในตาราง

จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาวัดความสามารถในการทำงานภายใต้สภาวะเดียวกับข้อ 4.3 ข้างต้น โดยแยกบ่มในสารละลายที่มีน้ำตาล แอล-อะราบิโนส และ ดี-ไซโลส ที่ความเข้มข้นต่างๆดังระบุในตารางที่ 8 พร้อมกับสับสเตรท คือ ไซแลน 1 เปอร์เซนต์ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 โดยมีตัวเปรียบเทียบ คือ แอคติวิตีที่เกิดจากส่วนผสมของไซแลน 1 เปอร์เซนต์ และ 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 พบว่า น้ำตาลทั้งสองชนิดไม่มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส

4.5 ความเสถียรของเอนไซม์

4.5.1 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน

เมื่อนำเอนไซม์ที่เตรียมได้และทราบปริมาณแน่นอนไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 40-80 องศาเซลเซียส ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจหาแอคติวิตีที่เหลือ ตามวิธีการทดลอง ในบทที่ 2 ข้อ 5 พบว่า ในช่วง 40-55 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีการสูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยโดยยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่สูงกว่า 80 เปอร์เซนต์ และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงไปอย่างช้า ๆ แต่ก็ยังไม่สูญเสียแอคติวิตีโดยสิ้นเชิงดังผลการทดลองในรูปที่ 16

4.5.2 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

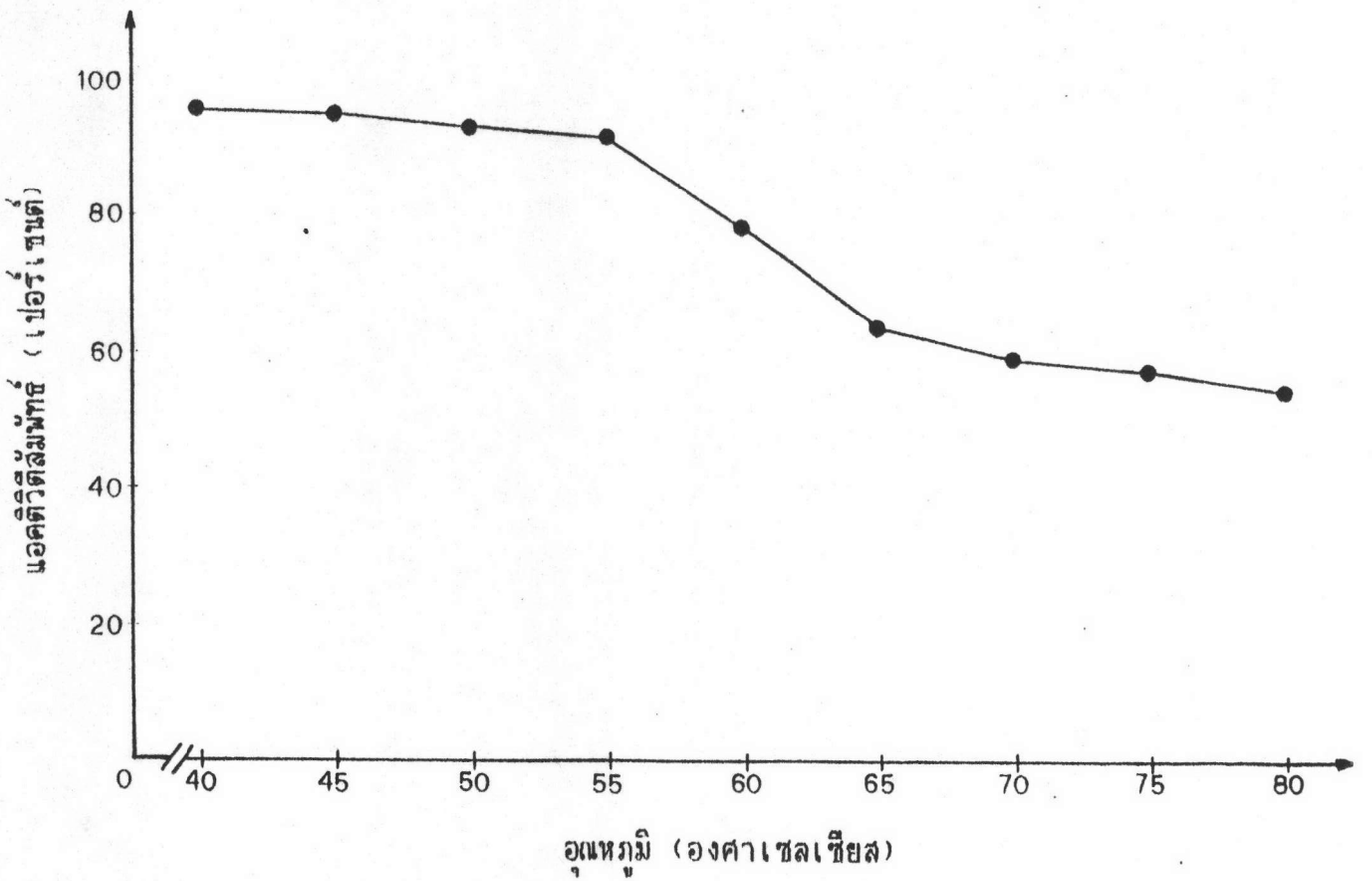
นำเอนไซม์ที่ทราบปริมาณแน่นอนมาบ่มกับบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ช่วง pH ต่างๆ กัน ตั้งแต่ 4.0-9.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจหาแอคติวิตีที่เหลือ ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 ผลการทดลองในรูปที่ 17 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรต่อ pH ในช่วงกว้างคือ ตั้งแต่ 5.0-9.0

ได้สรุปสมบัติของไซแลเนสจาก Streptomyces sp.42-9 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ในตารางที่ 9 โดยพบว่า เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 65 องศาเซลเซียส และเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงค่อนข้างกว้าง

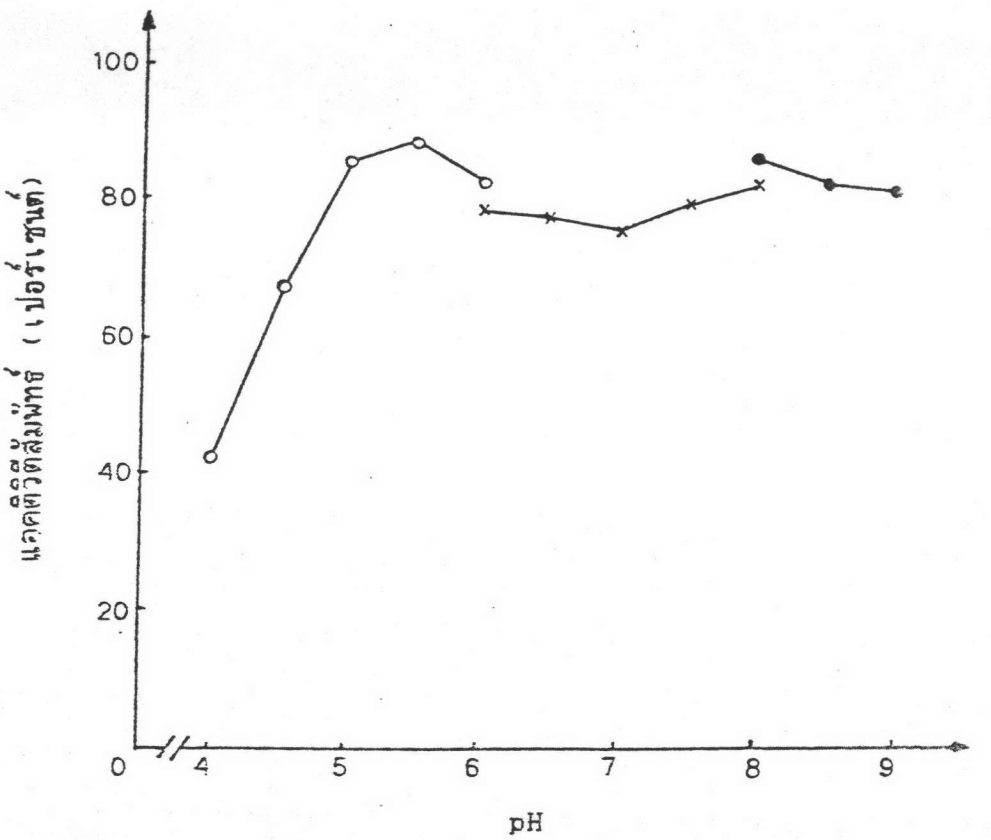
ตารางที่ 8 ผลของแอล-อะราบิโนส หรือ ดี-ไซโลสต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส

ชนิดสารยับยั้ง	ความเข้มข้น (โมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์* (เปอร์เซนต์)
แอล-อะราบิโนส	$1X10^{-4}$	100
	$1X10^{-3}$	99
	$1X10^{-3}$	97
ดี-ไซโลส	$1X10^{-4}$	100
	$1X10^{-3}$	100
	$1X10^{-3}$	98

* แอคติวิตีสัมพัทธ์ คำนวณโดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ปราศจากเกลือแร่ที่จะทดสอบเป็น 100 เปอร์เซนต์ การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5 โดยมีหรือไม่มีน้ำตาลที่จะทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังระบุในตาราง



รูปที่ 16 ความเสถียรของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 ต่อความร้อน บ่มเอนไซม์ (70 หน่วย) ก่อนการทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงในรูป เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลือโดยวิธีการที่กล่าวไว้ใน บทที่ 3 ข้อ 2.3



รูปที่ 17 ความเสถียรของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 ต่อระดับความเป็นกรดต่างโดยบ่มเอนไซม์ 50 หน่วย ที่ pH ต่างๆดังแสดงในรูป ที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือตามวิธีการในบทที่ 3 ข้อ 2.3

o—o อะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 5.0-6.0)

x—x โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0-8.0)

●—● ทริส-บัฟเฟอร์ (pH 8.0-9.0)

ตารางที่ 9 สรุปสมบัติของไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9

น้ำหนักโมเลกุล	36,000 ดาลตัน
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส
pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	5.5 (ในอะซิเตทบัฟเฟอร์)
K_m (M) สำหรับไซแลน	0.57 (มก./มล.)
สารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์	Zn^{++}, Hg^{++}, Mn^{++}, Ca^{++}, Hg^{++}, Cu^{++}, และ Sn^{++}
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	65 องศาเซลเซียส
ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	5.0-9.0