การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดส จาก *Streptomyces* sp. 43-4

นางสาว กุลนี ชูพึ่งอาตม์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-315-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17[illegible] 4 [illegible]

PURIFICATION AND PROPERTIES OF β-XYLOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. 43-4

Miss Kunlanee Chupungars

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-634-315-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4
โดย	นางสาวกุลนี ชูพึ่งอาตม์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กุลนี ชูพึ่งอาตม์ : การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก Streptomyces sp 43-4 (PURIFICATION AND PROPERTIES OF B-XYLOSIDASE FROM Streptomyces sp.43-4) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ. 103 หน้า. ISBN 974-634-315-7

งานวิจัยนี้ ศึกษาการทำเอนไซม์บีตา-ไซโลซิเดสจาก Streptomyces sp. 43-4 ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 40-80 เปอร์เซนต์ จากนั้นทำคอลัมน์โครมาโตรกราฟีบนดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส และเซฟาเด็กซ์ จี-200 พบว่าได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.54 เท่า และเหลือแอคติวิตี 9.94 เปอร์เซนต์ การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ และสามารถคืนแอคติวิตีโดยไดไธโอธริอีทอล แต่ความสามารถในการกลับคืนมีความสัมพันธ์แบบไม่เป็นเส้นตรงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ จากการตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์นี้มีค่า Km ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ และ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 2.04 และ 4.54 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 45 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ เอนไซม์ถูกยับยั้งในลักษณะแข่งขันโดย ดี ไซโลส โดยมีค่า Ki เท่ากับ 180 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วยอิออนของทองแดง เงิน, สังกะสี, นิเกิล และตีบุก ส่วนอิออนของเหล็ก, โคบอลท์, แมกนีเซียม, แมงกานีส และแคลเซียม มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งแอคติวิตี เอนไซม์นี้เสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียสและเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-8.5

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 270,000 ดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์จากโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยโดย 2 หน่วยแรก มีน้ำหนักโมเลกุล 90,000 และ 82,000 ดาลตันตามลำดับ หน่วยย่อยที่ 3 และ 4 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 54,000 ดาลตัน

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กุลนี ชูพึ่งอาตม์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C626225 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: Streptomyces sp. / B-XYLOSIDASE / PURIFICATION

KUNLANEE CHUPUNGARS : PURIFICATION AND PROPERTIES OF B-XYLOSIDASE FROM Streptomyces sp.43-4. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 103 pp.

ISBN 974-634-315-7

B-Xylosidase from Streptomyces sp.43-4 was purified by fractionation with 40-80% saturation of ammonium sulfate and consecutive column chromatography on DEAE Biogel-Agarose and Sephadex G-200, respectively. The specific activity of the enzyme was increased by 9.54 folds with 9.94% recovery. This enzyme was inhibited by N-ethylmaleimide and the inhibition could be reversed by dithiothreitol. However,this reversion was not in linear relationship with concentration of N-ethylmaleimide. The Km values of the enzyme for p-nitrophenyl B-D-xylopyranoside and o-nitrophenyl B-D-xylopyranoside were 2.04 and 4.54 mM, respectively. The optimun temperature and pH for the enzyme activity were 45 °C and 6.5 with acetate buffer,respectively. The activity was competitively inhibited by xylose with the Ki value of 180 mM. The same activity was dramatically inhibited by Cu^{2+}, Ag^{2+},Zn^{2+} ,Ni^{+} and Sn^{2+} while Fe^{2+},Co^{2+} ,Mg^{2+},Mn^{2+} and Ca^{2+} have slightly effected. The enzyme was stable up to 35 °C and posses broad pH range of 5.5-8.5.

The molecular weight of the purified enzyme estimated via gel filtration was 270,000 daltons. Analysis of the enzyme on sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis revealed that it composed of 4 subunits with molecular weight of 90,000 and 82,000 daltons for the first 2 subunits and 54,000 daltons for the other 2 identical subunits.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กุลนี ชูพิรดาตม์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณยุวดี ตาลาวนิช คุณกรรณิการ์ ดวงมาลย์ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการทำวิจัยตลอดจนคำแนะนำเกี่ยวกับการเขียนวิทยานิพนธ์นี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้ ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน รวมทั้งอาจารย์สมโชค สนธิแก้ว ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย 29

3. ผลการวิจัย 41

4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 76

รายการอ้างอิง 83

ภาคผนวก 93

ประวัติผู้เขียน 103

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบีตา-ไซโลซิเดส 8
2 เปรียบเทียบแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 กับจุลินทรีย์อื่นๆที่สามารถสร้างบีตา-ไซโลซิเดสได้ 11
3. น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสจากแหล่งต่างๆ 17
4. สมบัติของบีตาไซโลซิเดสจากแหล่งต่างๆ 20
5. ความสามารถของไซโลสในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดสจากแหล่งต่างๆ 23
6. ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิของบีตา-ไซโลซิเดสจากแหล่งต่างๆ 26
7. การหาค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลซิเดส 42
8. สรุปขั้นตอนการทำบีตา-ไซโลิเดสให้บริสุทธิ์ 52
9. ผลของอิออนโลหะหนักต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส 64
10. สมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. 43-4 ก่อนและหลังจากการผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ 81

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง	2
2	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน	3
3	การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน	6
4	กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*	7
5.	ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส	44
6.	ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส	46
7.	ความสามารถของไดไธโอธริอีทอลในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์	48
8.	การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส	50
9.	การทำบีตา-ไซโลซิเตสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200	51
10 ก	การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรท (Km) ของบีตา-ไซโลซิเดสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์	54
10 ข	การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรท (Km) ของบีตา-ไซโลซิเดสต่อออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์	54
11.	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส	55
12.	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส	56
13.	ผลของความเข้มข้นของอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส	58
14.	ผลของความเข้มข้นของไซโลสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดล	60
15.	การหาค่าคงที่ในการยับยั้งทำงาน (Ki) ของบีตา-ไซโลซิเดส	61
16.	ผลของความเข้มข้นของอะราบิโนสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส	62
17.	ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่ออุณหภูมิ	66
18.	ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่อความเป็นกรดด่าง	67

สารบัญรูป (ต่อ)

19. การทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่งของโปรตีน
ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ..... 69
20. การทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่งของโปรตีน
ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์..... 70
21. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสโดยการทำอิเลคโตรโฟริซิส
บนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผน..... 71
22. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสโดยการทำ
อิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผน..... 72
23. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดส โดยการทำเจลฟิลเตรชัน
ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200..... 74