

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

นางสาว กุลณี ชูพึ่งอาตม์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-315-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

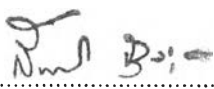
โดย นางสาวกุลณี ชูฟังอาตม์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

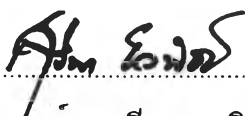
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

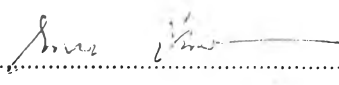


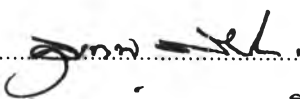
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

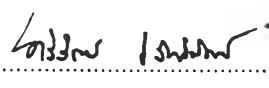

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ อุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

กุลณี ชูพึ่งอาดม : การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก Streptomyces sp
43-4 (PURIFICATION AND PROPERTIES OF B-XYLOSIDASE FROM

Streptomyces sp.43-4) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ไพเราะ บินพานิชการ. 103 หน้า.

ISBN 974-634-315-7



งานวิจัยนี้ ศึกษาการทำเอนไซม์บีตา-ไซโลซิเดสจาก Streptomyces sp. 43-4 ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 40-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีบนดีเอไอ ไฮโอเจล-อกาโรส และเซฟาเดกซ์ จี-200 พบว่าได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.54 เท่า และเหลือแอกติวิตี 9.94 เปอร์เซ็นต์ การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย เอ็น-เอธิลมาลิอิมิด และสามารถคืนแอกติวิตีโดยไดไฮโอริอิทอล แต่ความสามารถในการกลับคืนมีความสัมพันธ์แบบไม่เป็นเส้นตรงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอ็น-เอธิลมาลิอิมิด จากการตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์นี้มีค่า Km ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ และ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 2.04 และ 4.54 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ อุณหภูมิและความเป็นกรดที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 45 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ เอนไซม์ถูกยับยั้งในลักษณะแข่งขันโดย ดี ไฮโลส โดยมีค่า Ki เท่ากับ 180 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วยอ้อนของทองแดงเงิน, สังกะสี, นิกเกิล และดีบุก ส่วนอ้อนของเหล็ก, โคบอลต์, แมกนีเซียม, แมงกานีส และแคลเซียม มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งแอกติวิตี เอนไซม์นี้เสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียสและเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-8.5

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

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต กุลณี ชูพึ่งอาดม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ไพเราะ บินพานิชการ
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 optimum 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 Cu²⁺, Ag²⁺, Zn²⁺, Ni⁺ and Sn²⁺ while Fe²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ and Ca²⁺ 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.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....

ปีการศึกษา.....2538.....

ลายมือชื่อนิสิต.....คุณหญิง สุวิภาดา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



กิตติกรรมประกาศ

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

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

ขอขอบคุณ คุณยุวดี ตาลาวนิช คุณกรรณิการ์ ดวงมาลย์ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการทำวิจัยตลอดจนคำแนะนำเกี่ยวกับการเขียนวิทยานิพนธ์นี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้ ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน รวมทั้งอาจารย์สมโชค สนิธิแก้ว ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ



	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฅ
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. เปรียบเทียบแอกติวิตีของบีตาไซโลซิเดสจาก <i>Streptomyces</i> sp. 43-4 กับจุลินทรีย์อื่นๆที่สามารถสร้างบีตา-ไซโลซิเดสได้.....	11
3. น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสจากแหล่งต่างๆ.....	17
4. สมบัติของบีตาไซโลซิเดสจากแหล่งต่างๆ.....	20
5. ความสามารถของไซโลสในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส จากแหล่งต่างๆ.....	23
6. ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิของบีตา-ไซโลซิเดส จากแหล่งต่างๆ.....	26
7. การหาค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม ในการตกตะกอนบีตา-ไซโลซิเดส.....	42
8. สรุปขั้นตอนการทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์.....	52
9. ผลของอิออนโลหะหนักต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	64
10. สมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก <i>Streptomyces</i> sp. 43-4 ก่อนและ หลังจากการผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์.....	81

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนไนไม้เนื้อแข็ง.....	2
2 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนไนไม้เนื้ออ่อน.....	3
3 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน.....	6
4 กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย <i>Cryptococcus albidus</i>	7
5. ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	44
6. ผลของเอ็น-เอธิลมาลีสีไม่ดีในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	46
7. ความสามารถของไดโรโอริอีทอลในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส ที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีสีไม่ดี.....	48
8. การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส.....	50
9. การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200.....	51
10 ก การหาค่าควาจำเพาะต่อซัสเตรท (Km) ของบีตา-ไซโลซิเดสต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์.....	54
10 ข การหาค่าควาจำเพาะต่อซัสเตรท (Km) ของบีตา-ไซโลซิเดสต่อ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์.....	54
11. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	55
12. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	56
13. ผลของความเข้มข้นของอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	58
14. ผลของความเข้มข้นของไซโลสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	60
15. การหาค่าคงที่ในการยับยั้งทำงาน (Ki) ของบีตา-ไซโลซิเดส.....	61
16. ผลของความเข้มข้นของอะราบีโนสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส.....	62
17. ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่ออุณหภูมิ.....	66
18. ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่อความเป็นกรดด่าง.....	67

สารบัญรูป (ต่อ)

19. การทำโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแท่งของโปรตีน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ.....	69
20. การทำโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแท่งของโปรตีน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	70
21. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไฮโลซิเดสโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส บนไซเดียมโดเดซิลโพลีอะครีลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	71
22. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไฮโลซิเดสโดยการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลโพลีอะครีลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	72
23. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไฮโลซิเดส โดยการทำให้เจลฟิลเตรชัน ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200.....	74