การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เอสเทอเรสในรำข้าว

(A Study of Rice Bran Esterase)

โดย

นางสาว ปรีดา อันประเสริฐ วท.บ.(เกียรตินิยมอันดับสอง) 2510

001690

วิทยานิพนธ์นี้
เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต
ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แผนกวิชาชีวเคมี
พ.ศ. 2513

I16524945

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ .....ประธานกรรมการ

.....กรรมการ

.....กรรมการ

.....กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กำจัด มงคลกุล

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เรื่อง : การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เอสเทอเรสในรำข้าว

ผู้เขียน : บ.ส. ปรีดา อันประเสริฐ

แผนกวิชา : ชีวเคมี

วันที่ : พฤษภาคม 2513

บทคัดย่อ

การศึกษาเกี่ยวกับเอสเทอเรสครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพยายามทำเอสเทอเรสในรำข้าวให้บริสุทธิ์ โดยใช้ salt fractionation และวิธี gel-filtration เพื่อที่จะใช้เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนี้ศึกษาในทาง kinetics ต่อไป และเพื่อจะเปรียบเทียบคุณสมบัติบางอย่างกับ crude enzyme ด้วย การวัด activity ของเอสเทอเรสใช้ pH-stat titration ใช้ β-naphthyl acetate เป็น substrate optimum substrate concentration มีค่าประมาณ 0.65 x 10^{-3} M ค่า Michaelis-Menten constant (Km) ของ crude enzyme ประมาณ 0.22 x 10^{-3} M ส่วนของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G - 100 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 7.8 เท่า มีค่า Km ประมาณ 0.16 x 10^{-3} M, optimum temperature ของ crude enzyme อยู่ระหว่าง 33-35 °ซ ส่วนของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วอยู่ที่ 30 °ซ ค่า activation energy ถือว่าเกือบเท่ากันคือมีค่าประมาณ 5200 cal/mole, optimum pH อยู่ระหว่าง 7.2-8.0 เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความเสถียรมากที่สุดที่ pH 7.0-8.0 ที่อุณหภูมิของห้อง crude enzyme จะมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่ -20 °ซ เป็นเวลานานเท่า ๆ กัน เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกห้ามปฏิกริยาโดย iodoacetamide, sodium arsenite และ mercuric chloride ได้ดี สามารถไฮโดรไลส์ p-nitrophenyl acetate ด้วยอัตราเร็วกว่า β-naphthyl acetate ประมาณ 3 เท่า และมีค่า Km ประมาณ 0.15 x 10^{-3} M เอสเทอเรสนี้ไม่สามารถไฮโดรไลส์ n-propyl gallate และ triacetin

Title : A Study of Rice Bran Esterase

Name : Miss Preeda Anprasert

Department : Biochemistry

Date : May 1970

ABSTRACT

The purpose of this study is to purify rice bran esterase by the methods of salt fractionation and gel-filtration. Rice bran esterase obtained was purified by 8.7 folds. The purified enzyme had been used for kinetic studies and results obtained were compared with the crude enzyme. The esterase activity was measured by a pH-stat method using β-naphthyl acetate as substrate. The optimum substrate concentration was found to be $0.65X10^{-3}$M. The Michaelis-Menten constants(Km) for crude and purified enzyme were $0.22X10^{-3}$M. and $0.16X10^{-3}$M. respectively. The optimum temperature for the purified enzyme was around 30°C, but, for the crude enzyme, it lied between 33-35°C. Their activation energies were almost the same, i.e. about 5200 cal/mole. Both optimum pHs lied between 7.2-8.0. The purified esterase was most stable at pH between 7.0-8.0 at room temperature. The crude esterase was more stable than the purified enzyme when they were stored at -20°C. The purified esterase was strongly inhibited by iodoacetamide, sodium arsenite and mercuric chloride.

p-Nitrophenyl acetate was found to be hydrolysed by the rice bran esterase at a rate higher than for β-naphthyl acetate. This enzyme would not hydrolyse triacetin and n-propyl gallate.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กำจัด มงคลกุล อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ซึ่งได้คอยให้คำปรึกษา แนะนำด้วยความกรุณาตลอดมาทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบพระคุณอาจารย์ในแผนกชีวเคมีทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
คำขอบคุณ	ฉ
สารบาญ	ช
รายการตารางประกอบ	ฌ
รายการรูปประกอบ	ฎ
บทนำ	1
1 วัสดุที่ใช้	4
1.1 รำข้าว	4
1.2 สารเคมี	4
1.3 เครื่องมือ	5
2 การทดลอง	6
2.1 การสกัดเอนไซม์เอสเทอเรส	6
2.2 วิธีสังเคราะห์ β-Naphthyl acetate	6
2.3 การเตรียมสารละลาย substrate	6
2.4 การวัด activity ของเอสเทอเรส	6
2.4.1 unit ของเอสเทอเรส	7
2.5 การวัดปริมาณโปรตีน	8
2.5.1 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)	8
2.5.2 วิธีวัดปริมาณโปรตีนที่ 280 mμ	8
2.6 การทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์	9
2.6.1 Ammonium Sulfate Fractionation	9
2.6.2 Sephadex G-100 Gel-filtration	9

หน้า

3 ผลการทดลอง 12

3.1 การสกัดเอสเทอเรสจากรำ 12

3.1.1 ผลของการแช่รำในน้ำและการ homogenization 12

3.1.2 ผลของการแช่รำใน buffer ที่ pH ต่าง ๆ 14

3.2 การศึกษาเอนไซม์เอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ 15

3.2.1 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอสเทอเรส 15

3.2.2 ผลของ pH ต่อ activity ของเอสเทอเรส 15

3.2.3 ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของเอสเทอเรส 19

3.2.4 การสูญเสีย activity ของเอสเทอเรสเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °ซ 22

3.3 การทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ 23

3.3.1 ผลของ ammonium sulfate fractionation 23

3.3.2 ผลของ gel - filtration 26

3.4 การศึกษาเอนไซม์เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephedex G-100 30

3.4.1 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอสเทอเรส 30

3.4.2 ผลของ pH ต่อ activity ของเอสเทอเรส 30

3.4.3 ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของเอสเทอเรส 31

3.4.4 ความเสถียร (stability) ของเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิสูง ๆ 37

3.4.5 ความเสถียรของเอสเทอเรสที่ pH ต่าง ๆ 37

3.4.6 การสูญเสีย activity ของเอสเทอเรสเมื่อเก็บไว้ที่ - 20 °ซ 40

3.4.7 ผลของตัวห้ามปฏิกริยาต่อเอสเทอเรส 42

3.4.8 ผลของ substrate บางชนิดต่อเอนไซม์เอสเทอเรส 42

หน้า

วิจารณ์ผลการทดลอง 50

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 59

แสดงรูป **Sephadex column** 60

บรรณานุกรม 61

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลของการแช่น้ำและการ homogenization ในการสกัดเอสเทอเรสจากรำ	13
ตารางที่ 2	ผลของการแช่รำในน้ำกับ buffer ที่ pH ต่าง ๆ ในการสกัดเอสเทอเรสออกจากรำ	14
ตารางที่ 3	แสดงการสูญเสียของเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่ - 20 °ซ	22
ตารางที่ 4	ผลของ ammonium sulfate fractionation เมื่อทำ fraction ณ 10 % saturation	24
ตารางที่ 5	ผลของ ammonium sulfate fractionation	25
ตารางที่ 6	ผลของ ammonium sulfate ต่อการวัด activity ของเอสเทอเรส	25
ตารางที่ 7	ผลของการ dialysis ของ fraction ที่ได้จาก ammonium sulfate fractionation	28
ตารางที่ 8	ผลของการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ammonium sulfate fractionation และ gel-filtration	28
ตารางที่ 9	แสดงการสูญเสียของเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่ - 20 °ซ	42
ตารางที่ 10	แสดงผลของตัวห้ำนเอนไซม์ต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100	47
ตารางที่ 11	แสดงผลของ substrate บางชนิดต่อเอสเทอเรส	49

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอสเทอเรส (crude enzyme) 16

รูปที่ 2 แสดงการหา Km ของเอสเทอเรส (crude enzyme) โดยใช้ Lineweaver and Burk's plot 17

รูปที่ 3 ผลของ pH ต่อ activity ของเอสเทอเรส (crude enzyme) 18

รูปที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของเอสเทอเรส (crude enzyme) 20

รูปที่ 5 แสดง Arrhenius plot ของการ hydrolysis of β-naphthyl acetate โดยเอสเทอเรส (crude enzyme) 21

รูปที่ 6 ผลของ gel-filtration เมื่อใช้สารละลายที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟต 29

รูปที่ 7 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 32

รูปที่ 8 แสดงการหา Km ของเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G - 100 โดยใช้ Lineweaver and Burk's plot 33

รูปที่ 9 ผลของ pH ต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G - 100 34

รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G - 100 35

หน้า

รูปที่ 11 แสดง Arrhenius plot ของการ hydrolysis of β-naphthyl acetate โดยเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 36

รูปที่ 12 การสูญเสียสภาพของเอสเทอเรสที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน 38

รูปที่ 13 แสดงการสูญเสีย esterase activity ที่ pH ต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิของห้อง 39

รูปที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบการสูญเสีย esterase activity ที่ pH ต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิของห้อง เมื่อมี substrate กับไม่มี substrate แช่อยู่ด้วย 41

รูปที่ 15 ผลของความเข้มข้นของ p-nitrophenyl acetate ต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 45

รูปที่ 16 แสดงการหา Km ของเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 โดยใช้ Lineweaver and Burk's plot เมื่อใช้ p-nitrophenyl acetate เป็น substrate 46

รูปที่ 17 แสดงรูป Sephadex column 60

บทนำ

เอนไซม์ซึ่งสามารถไฮโดรไลส์ carboxylic หรือ phenolic ester bonds ได้เรียกว่า เอสเทอเรส ซึ่งมักจะพบทั่ว ๆ ไปในเซลของสิ่งที่มีชีวิต เอสเทอเรสบางชนิดยังสามารถไฮโดรไลส์อนุพันธ์ของ amide, acid anhydrides ตลอดจน phosphate triesters ได้ด้วย เช่น diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) (Myers, 1960) substrate บางชนิดเช่น p-nitrophenyl acetate สามารถถูกไฮโดรไลส์โดย aliesterase, A-esterase, cholinesterase (Aldridge, 1953 a,b) และ C-esterase (Bergmann & Rimon, 1958)

เอสเทอเรสที่สามารถไฮโดรไลส์ non-choline carboxylic ester มักจะพบตาม tissue ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในแมลง (Casida, 1955) ในพืช (Singer, 1948) ใน citrus-fruit (Jansen et al, 1947) เป็นต้น เอสเทอเรสมักจะพบในแหล่งกำเนิดเดียวกับไลเปสเสมอเช่นในน้ำนมโค (Frankel & Tarassuk, 1957 ; Downey & Andrews, 1966) ในลำไส้ (Dinella et al, 1960) ในตับอ่อน (Desnuelle, 1961) และใน wheat-germ (Mounter and Mounter, 1962) เป็นต้น การทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ และการศึกษาทาง kinetics ของเอสเทอเรสเป็นที่สนใจและศึกษากันมานานแล้ว พบว่าเอสเทอเรสจากตับของม้าทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายและได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นมากกว่า เอสเทอเรสจากแหล่งกำเนิดอื่น ๆ (Hofstee, 1960) เช่น Connors (1950) ทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 270 เท่า และ Burch (1954) ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 140 เท่า ส่วนการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์จากแหล่งกำเนิดอื่น ๆ ก็มีทำกันบ้าง เช่น จากตับอ่อนของหมู (Gelotte, 1964) จาก epididymal adipose tissue ของหนู (Okuda & Fujii, 1966) จากซีรัมของคน (Wilde & Kekwick, 1964) จากซีรัมของแกะ (Main, 1960) เป็นต้น ส่วนการทำเอสเทอเรสในรำข้าวให้บริสุทธิ์ ยังไม่เคยมีผู้ใดทำมาก่อนเลย แต่มีผู้เคยศึกษาจาก crude enzyme มาบ้างแล้ว (ไพเราะ ทิพยทัศน์, 2510) และพบว่าในรำข้าวมีเอนไซม์อยู่อย่างน้อย 2 ชนิด

ชนิดหนึ่งมีคุณสมบัติของเอสเทอเรส อีกชนิดหนึ่งมีคุณสมบัติของไลเปส ซึ่งในการสกัดเอนไซม์เอสเทอเรสอาจมีไลเปสปนอยู่หรือในการสกัดไลเปสอาจมีเอสเทอเรสปนอยู่ก็ได้ ซึ่งอาจทำให้คุณสมบัติของเอนไซม์ผิดแผกไปจากเอนไซม์จากแหล่งกำเนิดอื่น ๆ ซึ่งเตรียมมาบริสุทธิ์กว่า ดังนั้นการทำเอสเทอเรสในรำข้าวให้บริสุทธิ์จึงเป็นที่น่าสนใจ และจะได้นำเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปศึกษาทาง **kinetics** ต่อไป ซึ่งจะได้ทราบคุณสมบัติอันแท้จริงของเอนไซม์ และในขณะเดียวกันจะได้เปรียบเทียบคุณสมบัติบางอย่างกับเมื่อศึกษาโดยใช้ **crude enzyme** ซึ่งได้ศึกษามาแล้วโดย ไพเราะ หิพยหัสน์ (2510)

ในการศึกษาครั้งนี้มีความประสงค์ที่จะทำเอสเทอเรสในรำข้าวให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี **salt fractionation** และ **gel-filtration** ซึ่งเป็นการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของโมเลกุล ซึ่งโมเลกุลใหญ่จะออกมาใน **effluent** ก่อนโมเลกุลเล็กตามลำดับ วิธีนี้นอกจากจะใช้แยกสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ ออกจากโมเลกุลเล็ก ๆ แล้วยังสามารถบอกน้ำหนักโมเลกุลของสารนั้นได้อย่างเคร่า ๆ ด้วย ทั้งนี้โดยถือว่าขนาดของโมเลกุลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุล (**Andrews, 1964**) วิธี **gel-filtration** นี้ได้มีผู้เคยนำไปใช้ในการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์มาก่อนแล้ว เช่น **Okuda & Fujii** (1965) ใช้ในการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์จาก **epididymal adipose tissue** ของหนู **Downey & Andrews** (1965) ใช้แยกเอสเทอเรสออกจากน้ำนมโค และจากซีรัมของโค และในปีเดียวกันนี้ **Andrews** (1965) ใช้ในการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์จาก **wheat-germ**

การศึกษาทาง **kinetics** ส่วนใหญ่มักจะศึกษาเกี่ยวกับ **substrate pattern** ของเอสเทอเรส ซึ่งมักจะเปลี่ยนแปลงไปได้ตาม **species** (**Aldridge, 1953 a,b**) และศึกษาเกี่ยวกับตัวห้ามปฏิกริยาที่แรง ๆ ของเอสเทอเรส ซึ่งได้แก่สารประเภท **organophosphorus compounds** เช่น **diisopropyl fluorophosphate(DFP)** หรือ **E 600** เป็นต้น เนื่องจากเอสเทอเรสมี **specificity** ต่อ **substrate** ต่ำและไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นในการศึกษาเอสเทอเรสจึงนิยมใช้ **substrate** หลาย ๆ ตัว ซึ่งนอกจากจะดู **pattern** ของการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์แล้ว ยังช่วยในการพิสูจน์ได้

ว่าปฏิกริยาที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากเอนไซม์เพียงตัวเดียวหรือหลายตัว (Mounter & Mounter, 1962 ; Paulson & Aldridge, 1963) นอกจากนี้ตัวห้ามปฏิกริยาประเภท organophosphorus compounds ยังสามารถใช้แยกชนิดของเอสเทอเรสได้ตลอดจนใช้บอกความแตกต่างระหว่างเอนไซม์เอสเทอเรสกับไลเปสได้ด้วย (Aldridge, 1954)