การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

นางสาวทรรศนีย์ ตั้งสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0405-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20606822

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β-XYLOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. CH7

Miss Tadsanee Tangsakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0405-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7
โดย	นางสาวทรรศนีย์ ตั้งสกุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ทรรศนีย์ ตั้งสกุล : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β-XYLOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. CH7) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 101 หน้า. ISBN 974-03-0405-2.

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40-70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล อะกาโรส และเซฟาเด็กซ์ จี-200 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.23 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 29.99 เปอร์เซ็นต์ การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ และสามารถคืนแอคติวิตีโดย 2-เมอร์แคบโตเอธานอล จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 183,000 ดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 93,000 ดาลตัน

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์พบว่า อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 6.0-9.0 เอนไซม์มีค่า K_m ต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ และออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 0.56 และ 0.94 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์ถูกยับยั้งในลักษณะแข่งขันโดย ดี-ไซโลส มีค่า K_i เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วยอิออนของเหล็ก ปรอท ทองแดง และสังกะสี ส่วนอิออนของแมกนีเซียมช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ จากการตรวจสอบการมีแอคติวิตีอื่นของบีตา-ไซโลสิเดส พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีของอะราบิโนฟิวราโนสิเดส และไซแลเนสต่ำมาก และไม่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสและกลูโคสไอโซเมอเรส

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต ทรรศนีย์ ตั้งสกุล
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4172297123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : *Streptomyces* sp. / β-XYLOSIDASE / PURIFICATION

TADSANEE TANGSAKUL : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β-XYLOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. CH7. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 101 pp. ISBN 974-03-0405-2.

β-Xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 was purified by fractionation with 40-70% saturation of ammonium sulfate and consecutive chromatography on DEAE Bio-Gel A and Sephadex G-200, respectively. The purified enzyme was about 9.23 folds in specific activity with 29.99% recovery. This enzyme was inhibited by N-ethylmaleimide and 2-mercaptoethanol could reverse the inhibition. The apparent molecular weight of the purified enzyme was 93,000 daltons estimated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and 183,000 daltons estimated by gel filtration indicating the native enzyme behaved as a dimer of identical subunits.

The optimal temperature and pH for the enzyme activity were 55°C and 6.5, respectively. The enzyme was stable to temperature up to 50°C and to a broad pH range of 6.0-9.0. The K_m values of the enzyme for *p*-NPX and *o*-NPX were 0.56 and 0.94 mM, respectively. It was competitively inhibited by D-xylose with K_I value of 40 mM. Metal ions such as Fe^{2+}, Hg^{+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} strongly inhibited the enzyme activity, whereas Mg^{2+} acted as an activator. The enzyme barely hydrolyzed *p*-NPAF and xylan substrates and did not exhibit cellulase and glucose-isomerase activities.

Department Microbiology	Student's signature ทาดสนีย์ ตั้งสกุล
Field of study Industrial Microbiology	Advisor's signature
Academic year 2001	Co-advisor's signature

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ขอบคุณคุณก่อพงศ์ ดวงแจ่มกาญจน์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีทดลอง..... 22

3. ผลการทดลอง..... 37

4. วิจารณ์ผลการทดลอง..... 75

รายการอ้างอิง..... 83

ภาคผนวก..... 92

ประวัติผู้เขียน..... 101

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ตัวอย่างสายพันธ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบีตา-ไซโลสิเดส..... 6

1.2 น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์สายพันธ์ต่างๆ..... 13

1.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 15

1.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 17

1.5 ค่าความจำเพาะ (K_m) และความเร็ว (V_{max}) ของบีตา-ไซโลสิเดสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ จากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 18

1.6 ค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส (K_i) ต่อไซโลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 20

3.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลสิเดส..... 38

3.2 ขั้นตอนการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์..... 51

3.3 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส..... 72

3.4 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity) ของบีตา-ไซโลสิเดส..... 73

4.1 สมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CH7..... 81

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายไซแลน..... 2

1.2 กระบวนการย่อยลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*..... 5

3.1 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส..... 40

3.2 ผลของเอ็นเอธิลมาลีอิไมด์ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส..... 42

3.3 ผลของ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์..... 44

3.4 ผลของ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลต่อแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส..... 46

3.5 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 1..... 47

3.6 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ครั้งที่ 2..... 49

3.7 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200..... 50

3.8 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ..... 53

3.9 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 และที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการย้อมแอคติวิตี..... 54

3.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200..... 56

3.11 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล..... 58

3.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส..... 59

3.13 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส..... 61

3.14 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส..... 62

3.15 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่ออุณหภูมิ..... 64

3.16 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง..... 65

3.17 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของบีตา-ไซโลสิเดสต่อพารา-ไนโตรฟีนิลบีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์..... 67

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.18 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของบีตา-ไซโลสิเดสต่อออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์..... 67

3.19 ผลของไซโลสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส..... 68

3.20 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส โดยไซโลส..... 69

3.21 ผลของอะราบิโนสต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส..... 71