การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

นางสาววัชรี ชุณห์กุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN : 974-17-5392-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17770546

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACETYL ESTERASE FROM *Streptomyces* sp. PC22

Miss Watcharee Chungool

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN : 974-17-5392-6

481858

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22
โดย	นางสาววัชรี ชุณห์กุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

วัชรี ชุณห์กุล : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACETYL ESTERASE FROM *Streptomyces* sp. PC22) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ 131 หน้า. ISBN : 974-17-5392-6

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำอะซีทิลเอสเทอเรสซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ย่อยสายกิ่งของไซแลนให้บริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้ม 30-90 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชันและไฮดรอกซีอะปาไทต์ ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 51 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 7.33 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันพบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 155 กิโลดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสพบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 38 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 50 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0-9.0 ค่า K_m ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท เท่ากับ 0.43 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วยอิออนของปรอท ทองแดง และสังกะสี นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งด้วยฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์แสดงว่ากรดอะมิโนเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากการตรวจสอบแอคติวิตีข้างเคียงของอะซีทิลเอสเทอเรส พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีของไซแลเนสและแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่ำมาก และไม่มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสและเซลลูเลส ผลการใช้งานร่วมกับเอนไซม์อื่นพบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสสามารถทำงานร่วมกับไซแลเนส II จาก *Streptomyces* sp PC22 และบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ชได้ โดยเมื่อบ่มอะซีทิลเอสเทอเรสร่วมกับไซแลนเนส II ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อบ่มปฏิกิริยาร่วมกันทั้งอะซีทิลเอสเทอเรส ไซแลเนส II และบีตา-ไซโลสิเดส พบว่าจะได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุด 46 เปอร์เซ็นต์

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต วัชรี ชุณห์กุล

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2548

4572485123 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ACETYL ESTERASE / *Streptomyces* sp. PC22

WATCHAREE CHUNGOOL : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACETYL ESTERASE FROM *Streptomyces* sp. PC22. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 131 pp. ISBN : 974-17-5392-6

Acetyl esterase, one of xylan – debranching enzymes, was purified from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. PC22 grown in liquid medium containing birchwood xylan as a carbon source. The enzyme was purified to approximately 51 folds with a recovery yield of 7.33% by fractionation with 30-90% saturation of ammonium sulfate followed by consecutive column chromatography on Macro-prep DEAE, butyl hydrophobic interaction and hydroxyapatite, respectively. The apparent molecular weight of the purified enzyme was 155 kDa as estimated by gel filtration and revealed four identical subunits of 38 kDa estimated by SDS-PAGE. The enzyme had temperature and pH optima of 50^{o}C and 6.5, respectively. It was stable to temperature up to 55^{o}C for 30 min and to a broad range of pH from 5.0-9.0. The K_m value of the enzyme for *p*-nitrophenyl acetate was 0.43 mM. Metal ions including Hg^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} markedly inhibited the enzyme activity and its activity was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride indicating serine residue involved in catalytic mechanism. The purified enzyme barely showed α-L-arabinofuranosidase and xylanase activities and did not exhibit any β-xylosidase and cellulase acitivities. Its potential application was evaluated and showed cooperative action with xylanase II from *Streptomyces* sp. PC22 and β-xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 on birchwood xylan hydrolysis. When combined with xylanase II, it increased the release of reducing sugar to about 10% of that of xylanase II alone, whereas about 46% increase in reducing sugars liberated was obtained with the combination of xylanase II and β-xylosidase.

Department Microbiology Student's signature Watcharee Chungool

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature Pairoh Pinphanichakarn

Academic year 2005

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธาน และคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. จันทรกานต์ พิภพมงคล สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่าง ๆ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณพี่ทรรศนีย์ ตั้งสกุล พี่โตมร ทองน้ำวน ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดมา และขอขอบคุณ คุณวิชุตา เหล่าเรืองธนา คุณเวฬุรีย์ ทองคำ คุณปวีณา รัตนมาศ คุณสิริภัทร พฤกษ์ไพบูลย์ คุณจันทรนาถ พลชำนิ และคุณปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ ที่ร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมาตลอด รวมทั้งความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้องและญาติ ๆ ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่
1. บทนำ 1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม 6
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง 29
4. ผลการทดลอง 51
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 93
รายการอ้างอิง 104
ภาคผนวก 116
ภาคผนวก ก 117
ภาคผนวก ข 119
ภาคผนวก ค 127
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 131

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส.....	13
2.2	น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ	19
2.3	อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ	21
2.4	ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง.....	23
2.5	แอคติวิตีจำเพาะของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อสับสเตรทต่าง ๆ	25
2.6	ค่า K_m และ V_{max} ของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อ *p*-nitrophenyl acetate (NPA) และ α-naphthyl acetate (NA).....	26
4.1	การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนอะซีทิลเอสเทอเรสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ.....	52
4.2	สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์.....	63
4.3	ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส.....	82
4.4	ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส	84
4.5	การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทของอะซีทิลเอสเทอเรส.....	85
4.6	ขั้นตอนการเตรียมไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22.....	90
4.7	ผลของการทำงานร่วมกันของแอคติวิตีเอสเทอเรส บีตา-ไซโลสิเดสและไซแลเนส II ในการย่อยไซแลนจากไม้เบิร์ช.....	91
4.8	สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. PC22.....	92
5.1	ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ.....	99
5.2	ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ.....	100
5.3	ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ.....	100
5.4	สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจากจุลินทรีย์อื่น ๆ	102

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะโครงสร้างของโอ-อะซีทิล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซแลน จากไม้เนื้อแข็ง.....	2
1.2	ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน.	5
2.1	การทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส.....	6
2.2	การเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล.....	9
2.3	การเปลี่ยนไซโลสเป็น furfural.....	9
2.4	การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดย *Candida shehate*.....	11
2.5	การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase).....	12
4.1	ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ในการยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส.....	53
4.2	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส.....	54
4.3	การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ซะโปรตีน ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.....	57
4.4	การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน ซะโปรตีนด้วย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์ เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.....	59
4.5	การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ไฮดรอกซีอะปาไทต์ ซะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 20-500 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.....	61
4.6	สรุปขั้นตอนการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์.....	62
4.7	การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ	65

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์และย้อมแอคติวิตีด้วยพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท	66
4.9	การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์และที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการย้อมแอคติวิตี	67
4.10	การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ของโปรตีนมาตรฐาน	69
4.11	การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ของอะซีทิลเอสเทอเรส	70
4.12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์	71
4.13	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมล์เจล	73
4.14	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส	74
4.15	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส	76
4.16	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส	77
4.17	ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ	79
4.18	ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง	80
4.19	ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อพารา-ไนโตรฟีนิลอะซีเตท	81
4.20	ผลของอีดีทีเอต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส	83
4.21	สูตรโครงสร้างของกรดอะมิโนเซรีน (serine)	84
4.22	แสดงลำดับกรดอะมิโนตรงปลายสายเอ็น	86
4.23	การทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ แมคโคร-เพรบ ดีอีเออีซะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง	89