6

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการศึกษาคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

นางสาวขจีนาฏ จรรยาอุดม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-092-1

009044

Partial Purification and Properties of Glucose Isomerase from *Streptomyces* sp. strain 190-1

Miss Kajenat Janyaudom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1985

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และการศึกษาคุณสมบัติของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากส์เตรพโตมัยซีส์ ส่ายพันธุ์ 190-1

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย นางสาวขจีนาฏ จรรยาอุดม

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต.

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และการศึกษาคุณสมบัติของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1

โดย นางสาวขจีนาฏ จรรยาอุดม

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาส์ตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

ปีการศึกษา 2528

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้กล่าวถึงการส์กัดแยกและทำเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ได้จากส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ให้บริสุทธิ์ การส์กัดแยกเอนไซม์จากเซลทำโดยแช่ส์ในส์ารละลายโซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.1 % ของเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ แล้วนำส์ารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยการทำโครมาโตกราฟฟีอย่างต่อเนื่องบนดีอีเออี-เซลลูโลส์ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ 50 และเซฟาเด็กซ์ จี-200 จากการทำโครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส์ ส์ามารถแยกเก็บเอนไซม์ได้ 2 ส์ำดับส่วน โดยให้ชื่อว่าส์ำดับส่วน A และส์ำดับส่วน B ตามส์ำดับ เอนไซม์ที่ได้ทั้ง 2 ส์ำดับส่วนนี้ เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายโดยการกรองบนเซฟาเด็กซ์ จี-200 ส์ามารถแยกเก็บได้อีกส์ำดับส่วนละ 3 ส์ำดับส่วน แต่ผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของทุกส์ำดับส่วนโดยการทำอีเลคโตรโฟรีซีส์บนโพลีอะไครลาไมด์เจล พบว่าทุกส์ำดับส่วนให้รูปแบบโปรตีนคล้ายคลึงกันและมีแถบโปรตีนเด่นชัด 2 แถบ และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหน่วยย่อยของทุกส์ำดับส่วนที่เตรียมได้โดยการทำอีเลกโตรโฟรีซีส์บนโซเดียมโดเดซิล-ซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจล พบว่าทุกส์ำดับส่วนให้แถบโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46,000 ดาลตัน

จากการตรวจส์อบคุณส์มบัติของเอนไซม์ที่เตรียมได้ พบว่าส์ภาวะที่เหมาะส์มในการทำงานของเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส์ pH 7.0 เมื่อใช้ฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ และที่ pH 9.0 เมื่อใช้ทริส์บัฟเฟอร์ Co^{2+} และ Mg^{2+} ไอออนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยมีความเข้มข้นที่เหมาะส์มคือ 5 และ 0.05 มิลลิโมลาร์ ตามส์ำดับ ไอออนของโลหะหนัก เช่น ตะกั่วและปรอท มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่เตรียมได้นี้ส์ามารถใช้กลูโคส์และไซโลส์เป็นซับส์เตรทได้ โดยมีค่า K_m เท่ากับ 0.22 โมลาร์ และ 0.122

โมลาร์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามน้ำตาลบางชนิดและน้ำตาลแอลกอฮอล์หลายชนิดได้แก่ แอล-อะราบิโนส์, ดี-แมนโนส์, ดี-กาแลคโตส์, ดี-ซอร์บิตอล, ดี-แมนนิตอล และ ดี-ไซลีตอล สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ในลักษณะการยับยั้งแบบแข่งขัน โดยมีค่า K_i เท่ากับ 1.12, 0.96, 0.91, 0.028, 0.38 และ 0.014 โมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์ที่เตรียมได้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 70 °C และเสถียรต่อ pH ที่ค่อนข้างสูงคือ ระหว่าง 8-9.

Thesis Title	Partial Purification and Properties of Glucose Isomerase from Streptomyces sp. Strain 190-1
Name	Miss Kajenat Janyaudom
Thesis Advisor	Associate Professor Piroh Pinphanichakarn Ph.D.
Department	Microbiology
Academic Year	1984

Abstract

Glucose isomerase was isolated from the Streptomyces sp. 190-1 cells by incubating in a sodium phosphate buffer containing 0.1 % cetyltrimethyl ammonium bromide. The enzyme was partially purified by ammonium sulfate fractionation and consecutive chromatography on DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-200 columns, respectively. Two peaks of the enzyme activity were eluted from a DEAE-cellulose column naming Fraction A and Fraction B, respectively. After the final step of purification of both fractions by filtration on Sephadex G-200 column, three fractions with enzyme activity were obtained from each fraction. Polyacrylamide gel electropheresis of these fractions gave similar protein patterns with two major bands. Moreover, analysis of these fractions on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed only single prominent band with a similar molecular weight of 46,000 daltons.

The optimum temperature for the enzyme activity was 75°C and the optimum pHs were 7.0 with phosphate buffer and 9.0 with tris buffer. Addition of Mg^{2+} and Co^{2+} ions significantly increased the enzyme activity while heavy metal ions such as Pb^{2+}, Hg^{2+} and Ag^{+} dramatically inhibited the activity. The enzyme could isomerize both glucose and

xylose with the Km values of 0.22 M and 0.122 M, respectively. However, some sugars and sugar alcohols such as L-arabinose, D-mannose, D-galactose, D- sorbitol, D-manitol and D-xylitol competitively inhibited the enzyme activity with the K_i values of 1.12, 0.96, 0.91, 0.028, 0.38 and 0.014 M, respectively. The enzyme was stable to heat up to 70°C and remarkably stable at high pH

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ โดยได้กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา รวมทั้งแนวความคิดต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดียิ่ง ซึ่งข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ.ที่นี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีที่ได้กรุณาอนุญาตให้ใช้เครื่องมือในการทำอีเลคโตรโฟรีซีส์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยกรุณาแนะนำวิธีการใช้เครื่องมือนี้ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้กรุณาให้กำลังใจในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณพี่, เพื่อนและน้อง ๆ ทุกคน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสำหรับทำการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

คำย่อ ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ 1

2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 18

3 ผลการวิจัย 26

4 การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย 80

เอกสารอ้างอิง 87

ภาคผนวก 96

ประวัติ 103

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์จากจุลินทรีย์แหล่งต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์	6
2	สรุปคุณสมบัติของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	14
3	เปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดแยกกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์จากเซลของสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1	27
4	เปรียบเทียบปริมาณเซลที่ใช้ในการสกัดแยกเอนไซม์	29
5	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-30, 30-60 และ 60-90 เปอร์เซ็นต์	32
6	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 และ 40-80 เปอร์เซ็นต์	33
7	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-30 และ 30-80 เปอร์เซ็นต์	33
8	ขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์จากสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ให้บริสุทธิ์บางส่วน	42
9	แสดงความจำเพาะของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์จากสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ที่มีต่อซับสเตรทต่าง ๆ (Substrate specificity)	63
10	แสดงค่า K_i ที่ได้จากไลน์-วีเวอร์เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซ์-เมอเรส์ที่ได้จากสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 กับน้ำตาลและน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ	73
11	แสดงผลของเกลือแร่ต่าง ๆ ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์	74
12	สรุปคุณสมบัติของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์จากสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1	78

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคส่เป็นฟรุคโตส่โดยส่ารละลายด่างหรือเอนไซม์กลูโคส่ไอโซเมอเรส่	2
2	แส่ดงอุณหภูมิที่เหมาะส่มในการส่กัดแยกเอนไซม์จากเซลของส่เตรพโตมัยซีส่สายพันธุ์ 190-1	28
3	เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการส่กัดแยกกลูโคส่ไอโซเมอเรส่จาก Streptomyces sp. ส่ายพันธุ์ 190-1	30
4	การแยกกลูโคส่ไอโซเมอเรส่ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. ส่ายพันธุ์ 190-1 โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส่	35
5	การทำโครมาโตกราฟฟีของส่ำดับส่่วน A บนคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50	37
6	การทำโครมาโตกราฟฟีของส่ำดับส่่วน A_a บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200	38
7	การทำโครมาโตกราฟฟีของส่ำดับส่่วน B บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200	40
8	ส่รุปขั้นตอนการทำกลูโคส่ไอโซเมอเรส่ให้บริสุทธิ์บางส่่วน	41
9	โพลีอะไครมาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส่ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	43
10	โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส่ของโปรตีนส่ำดับส่่วน A_a ที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200	44
11	โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส่ของโปรตีนส่ำดับส่่วน B ที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200	45
12	โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส่ของโปรตีนที่ได้จากยอดของส่ำดับส่่วน Aa_1	46
13	ก. โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส่ของโปรตีนส่ำดับส่่วน A และแอคติวิตีของกลูโคส่ไอโซเมอเรส่ที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
	ข. โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส์ของโปรตีนลำดับส่วน B และแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200	48
14	การทำโครมาโตกราฟฟีของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ..	50
15	เส้นกราฟแส์ดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุล และค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของลำดับส่วน Aa โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200	51
16	เส้นกราฟแส์ดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุล และค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของลำดับส่วน B โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200	52
17	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส์ของโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อย (subunit) ของทุกลำดับส่วน และโปรตีนมาตรฐาน ...	54
18	เส้นกราฟแส์ดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานโดยการทำโซเดียมโดเดซิล-ซัลเฟตโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตร-โฟรีซีส์	55
19	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1	56
20	ผลของ pH ต่อการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1	58
21	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ต่อการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ..	59
22	ผลของโคบอลท์ไอออนต่อแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
23	ผลของแมกนีเซียมไอออนต่อแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1	62
24	ก. ผลของความเข้มข้นต่อแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1	65
	ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์กับกลูโคส์	65
25	ก. ผลของความเข้มข้นต่อแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1	66
	ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์กับไซโลส์	66
26	ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อมีแอล-อะราบิโนส์	67
27	ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อมีดี-กาแลคโตส์	68
28	ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อมีดี-แมนโนส์	69
29	ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อมีดี-ซอร์บิตอล	70
30	ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อมีดี-แมนนิตอล	71
31	ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อมีดี-ไซลีตอล	72
32	เส์ถียรภาพของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 ต่อความร้อน	76
33	เส์ถียรภาพของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 ต่อระดับความเป็นกรดด่าง	77

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม

ชม. = ชั่วโมง

นน. = น้ำหนัก