การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. 42-9

นางสาวกมลวรรณ มั่นภักดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2534

ISBN 974-578-548-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017694

Purification and Characterization of Xylanase from *Streptomyces* sp.42-9

Miss Kamonwan Manpakdee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-578-548-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไขแลเนสจาก *Streptomyces* sp.42-9
โดย	นางสาวกมลวรรณ มั่นภักดี
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
ปีการศึกษา	2533

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์ลิน ลีหนันท์)

..... ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. คิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กมลวรรณ มั่นภักดี : การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASE FROM Streptomyces sp. 42-9) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ , 73 หน้า. ISBN 974-578-548-2

งานวิจัยนี้ กล่าวถึงการทำเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp.42-9 ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 20-50 เปอร์เซนต์ แล้วทำโครมาโตกราฟีอย่างต่อเนื่องบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และ เซฟาเด็กซ์ จี-150 พบว่าได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 35 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์ 38 เปอร์เซนต์ จากการวิเคราะห์โดยเจลฟิลเตรชันไซแลเนสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36,000 ดาลตัน ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำอิเลกโตรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล พบว่า ให้แถบโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียว จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหน่วยย่อยของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการทำอิเลกโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลพบว่าให้แถบโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียวมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28,000 ดาลตัน แสดงว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วยโพลิเปปไทด์สายเดี่ยว

จากการตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์ที่เตรียมได้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 5.5 เมื่อใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ ส่วนไอออนของโลหะหนัก เช่น ปรอท แคลเซียม ดีบุก และทองแดง มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างรุนแรงในขณะที่สังกะสี แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก และโคบอลท์ มีผลเพียงเล็กน้อย เอนไซม์นี้มีค่า K_m ต่อไซแลนเท่ากับ 0.57 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้เอนไซม์ที่เตรียมได้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้ถึง 55 องศาเซลเซียส และต่อ pH ในช่วงกว้าง คือ ระหว่าง 5-9

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

KAMONWAN MANPAKDEE : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASE FROM Streptomyces sp. 42-9. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN , Ph.D. 73 pp.

Extracellular xylanase was purified from Streptomyces sp. 42-9 by fractionating with 20-50% saturation of ammonium sulfate and consecutive chromatography on DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-150 columns,respectively. The specific activity toward xylan was increased by approximately 35 folds with 38% recovery. The molecular weight of the purified enzyme estimated via gel filtration was 36,000 daltons and it showed purity to homogeneity on polyacrylamide gel electrophoresis. Analysis of the purified enzyme on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed a single prominent band with molecular weight of 28,000 daltons, the result suggested that the enzyme consisted of a single polypeptide.

The optimal temperature and pH for the enzyme activity were 65°C and 5.5 with acetate buffer, respectively. It was dramatically inhibited by Hg^{2+}, Cu^{2+}, Sn^{2+} and Cu^{2+} while Zn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+} and Mn^{2+} slightly affected the enzyme activity. However, certain sugars such as D-xylose and L-arabinose had no effect on enzyme activity. The K_m value of the enzyme for xylan was 0.57 mg/ml. The enzyme was stable to heat up to 55°C and to a broad pH range between 5-9.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก รองศาตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ โดยได้กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา รวมทั้งแนวความคิดต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อน และน้องๆ ที่ได้กรุณาให้กำลังใจในการทำวิจัยนี้เป็นอย่างดี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสำหรับการทำวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ น้อง และ ญาติๆ ทุกคน ที่ได้สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

คำย่อ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 16

3 ผลการทดลอง 25

4 สรุปผลการทดลอง 55

เอกสารอ้างอิง 62

ภาคผนวก 67

ประวัติ 73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างการทำไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆให้บริสุทธิ์	4
2	สรุปสมบัติของเอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	12
3	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-30,30-40, 40-50,50-60,60-70 และ 70-85 เปอร์เซนต์	26
4	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-10,10-20, 20-30 และ 30-50 เปอร์เซนต์	27
5	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-20 และ 20-50 เปอร์เซนต์	27
6	สรุปขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9 ให้บริสุทธิ์	32
7	ผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส	48
8	ผลของ แอล-อะราบิโนส หรือ ดี-ไซโลส ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส	50
9	สรุปสมบัติของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp.42-9 ...	54
10	แสดงภาวะและปัจจัยต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส จาก Streptomyces sp.42-9	56

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโมเลกุลของไซแลน	2
2	การแยกไซแลเนสที่ผลิตโดย Streptomyces sp.42-9 โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50	29
3	การทำโครมาโตกราฟีของไซแลเนส บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150	31
4	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	33
5	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส และแอคติวิตีของไซแลเนสที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-150	34
6	การทำโครมาโตกราฟีของโปรตีนมาตรฐาน ที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซแลเนสบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150	35
7	เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล และค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150	36
8	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ของโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อย และโปรตีนมาตรฐาน	38
9	เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า การเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานโดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซิส	39
10	ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซแลเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน	40
11	ผลของอุณหภูมิ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp.42-9	42
12	ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

13 ผลของความเข้มข้นของอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนสจาก Streptomyces sp.42-9 44

14 ผลของความเข้มข้นของไซแลน ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส จาก Streptomyces sp.42-9 46

15 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอต ในการหาค่า K_m ของเอนไซม์ไซแลเนส เมื่อมีไซแลนเป็นสับสเตรท 47

16 ความเสถียรของเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. 42-9 ต่อความร้อน 52

17 ความเสถียรของเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. 42-9 ต่อระดับความเป็นกรดด่าง 53

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม

ซม. = เซ็นติเมตร