การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของไซลาเนสจากผลกล้วยน้ำว้า *Musa sapientum*

นางสาววนิดา พนายิ่งไพศาล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5453-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF XYLANASE FROM NAMWA BANANA FRUIT *Musa sapientum*

Miss Wanida Phanayingphaisal

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn Universiy
Academic Year 2003

ISBN 974-17-5453-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของไซลาเนส จากผลกล้วยน้ำว้า *Musa sapientum*
โดย	นางสาววนิดา พนายิ่งไพศาล
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. วิชัย สุทธิมูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย สุทธิมูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. มัญชุมาส เพราะสุนทร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วนิดา พนายิ่งไพศาล : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของไซลาเนสจากผลกล้วยน้ำว้า *Musa sapientum* (PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF XYLANASE FROM NAMWA BANANA FRUIT *Musa sapientum*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วิชัย สุทธิมูล อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ 82 หน้า , ISBN 974-17-5453-1

ในการตรวจหาเอนไซม์ไซลาเนส (E.C.3.2.1.8) ในผลกล้วยน้ำว้าในแต่ละระยะของการสุกโดยวิธีการวัดความแน่นเนื้อ ตั้งแต่ในระยะที่เป็นผลดิบจนกระทั่งถึงระยะที่สุกเต็มที่พบว่าที่ความแน่นเนื้อ 210 cN สามารถสกัดไซลาเนสได้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.66 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จึงได้ทำการสกัดแยกไซลาเนสอย่างหยาบจากผลกล้วยน้ำว้าที่ความแน่นเนื้อ 210 cN และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 80 % จากนั้นผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลสโครมาโตกราฟี และ คอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-50 เจลฟิลเตรชันตามลำดับ ผลปรากฏว่าไซลาเนสที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 14.7 เท่าและไม่พบแอคติวิตีของเซลลูเลส เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยการทำเอสดีเอส–พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส จะพบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ มวลโมเลกุลที่หาได้จากการทำเอสดีเอส–พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสมีค่าเท่ากับ 19 กิโลดาลตัน ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลของไซลาเนสที่หาได้จากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 21 กิโลดาลตัน ในการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่า ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 5.5 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 - 45 องศาเซลเซียส ค่า K_m ของไซลาเนสต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชเท่ากับ 1.28 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของ Hg^{2+} และ Zn^{2+} เอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ส่วน Cu^{2+} , Mg^{2+} , Sn^{2+},Fe^{2+} และ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 59.52 , 33.58 , 22.46 , 5.56 และ 2.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลการดัดแปลงกรดอะมิโนของเอนไซม์ด้วยสารเคมีที่มีความจำเพาะพบว่า N-bromosuccinimide และ diethylpyrocarbonate ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 96.4 และ 82.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่าทริปโตฟานและฮีสติดีนอาจจะเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372386523 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: XYLANASE / PURIFICATION / CHARACTERIZATION / *Musa sapientum*

WANIDA PHANAYINGPHAISAL : PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF XYLANASE FROM NAMWA BANANA FRUIT *Musa sapientum* THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WICHAI SUTTIMOOL , Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN , Ph.D. 82 pp. ISBN 974-17-5453-1

Xylanase (E.C.3.2.1.8) activity in Namwa banana pulp was measured at various stages of ripening determined as the texture hardness. The maximum specific activity of crude enzyme was found to be 0.66 unit/mg protein at the texture hardness of 210 cN , xylanase from this stage of ripening was purified. Purification of xylanase was achieved through the procedures of 80 % saturated ammonium sulfate , CM-cellulose and Sephadex G-50 column chromatography. The purification was 14.7 fold and the enzyme showed no cellulase activity. The enzyme separated by SDS electrophoresis showed a single band . The molecular mass was 19 kDa as determined by SDS-PAGE which is close to the molecular mass of 21 kDa as determined by Sephadex G-50. The optimum pH and temperature for the action of the enzyme were at 5.5 and 45 °C respectively. Xylanase was stable at temperature 30-45 °C. The enzyme reactions followed Michaelis-menten kinetics. The Lineweaver – Burk plot showed K_m values of 1.28 mg ml^{-1} and 0.5 mg ml^{-1} for the enzymatic hydrolysis of oat spelts xylan and birchwood xylan respectively. At 10 mM of the metal ion , Hg^{2+} and Zn^{2+} completely inhibited the enzyme activity. Cu^{2+} , Mg^{2+}, Sn^{2+} , Fe^{2+} and Ca^{2+} reduced the activity to 59.52 , 33.58 , 22.46 , 5.56 and 2.60 % respectively. The chemical modifying agents , N – bromosuccinimide (1.0 mM) and diethyl pyrocarbonate (1.0 mM) could reduce the xylanase activity to 96.4 and 82.0 % respectively. The results indicated that tryptophan and histidine residues may play an important role in the catalytical processes of the enzyme reaction.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department .....Biochemistry..... Student' s signature .....

Field of Study.....Biochemistry... Advisor' s signature .....

Academic year.....2003..... Co-Advisor' s signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย สุทธิมูล เป็นอย่างยิ่งที่ท่านได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ท่านให้ความรู้และคอยให้คำแนะนำต่าง ๆ ทั้งในงานวิจัยและด้านอื่น ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ เป็นอย่างยิ่งท่านได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ และอาจารย์ ดร. มัญชุมาส เพราะสุนทร ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ความรู้และคำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี เจ้าหน้าที่และบุคลากรทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความสะดวกและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ซึ่งให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฎ

คำย่อ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง..... 16

    2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 16

    2.2 วัสดุภัณฑ์ 17

    2.3 เคมีภัณฑ์ 17

    2.4 พืชทดลอง 18

    2.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อในระหว่างการสุกของผลกล้วย 18

    2.6 การสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ของไซลาเนส 19

        2.6.1 การสกัดแยกไซลาเนสอย่างหยาบ 19

        2.6.2 การหาความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมใน การตกตะกอนไซลาเนส 19

        2.6.3 การแยกเอนไซม์ด้วยซีเอ็ม-เซลลูโลสโครมาโทกราฟี 20

        2.6.4 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์เจลฟิล เตรชัน จี-50 ... 20

        2.6.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไซลาเนส โดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์ชนิดแผ่น (SDS –Polyacrylamide gel Electrophoresis) 21

    2.7 การวัดแอคติวิตีของไซลาเนส..... 23

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

2.8 การวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส 24
2.9 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry 24
2.10 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของเอนไซม์ที่เตรียมได้..25
2.10.1 การหามวลโมเลกุลด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี 25
บนเจลฟิลเตรชัน จี-50
2.10.2 การศึกษาหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา 26
2.10.3 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อความเร็วเริ่มต้น 26
ของปฏิกิริยา
2.10.4 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์ 26
2.10.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ 27
2.10.6 การวิเคราะห์หาค่า K_m 27
2.10.7 การศึกษาถึงผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ 27
2.10.8 การศึกษากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อแอคติวิตีของไซลาเนส 28
โดยการดัดแปลงเอนไซม์ด้วยสารเคมี
3. ผลการวิจัย 29
3.1 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อในระหว่างการสุกของผลกล้วย 29
3.2 ผลการสกัดแยกเอนไซม์อย่างหยาบ 29
3.3 ผลการหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม 29
ในการตกตะกอนไซลาเนส
3.4 ผลการทำไซลาเนสให้บริสุทธิ์ 30
3.5 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไซลาเนส 38
โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น
3.6 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไซลาเนสโดยการทำคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน ... 42
3.7 ผลการศึกษาสมบัติของไซลาเนส 42
3.7.1 ผลการหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา 42
3.7.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อแอคติวิตี 42
ของปฏิกิริยา

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ **หน้า**

3.7.3 ผลการศึกษาความเป็นกรด–ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์ 45
3.7.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและ ความเสถียรของเอนไซม์ 45
3.7.5 ผลการศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) 48
3.7.6 ผลการศึกษาอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ 51
3.7.7 ผลการศึกษาการดัดแปลงกรดอะมิโนด้วยสารเคมีที่มีความจำเพาะ 52
4. วิจารณ์ผลการทดลอง 53
5. สรุปผลการทดลอง 59
รายการอ้างอิง 61
ภาคผนวก 68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 82

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1.1 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซลาเนส 5
1.2 ตัวอย่างพืชที่สร้างไซลาเนสได้ 6
3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนแบบอิ่มตัว 33
3.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นของการทำไซลาเนสให้บริสุทธิ์ 37
3.3 สรุปค่า K_m และ V_{max} ของไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 48
และไซแลนจากเปลือกไม้เบิร์ชเป็นสับสเตรท
3.4 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ 51
3.5 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของเอนไซม์ 52
4.1 คุณสมบัติของไซลาเนสจากแหล่งต่าง ๆ 58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ **หน้า**

1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน..4
1.2 โครงสร้างสามมิติของไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* 11
3.1 การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อในระหว่างการสุกของผลกล้วยน้ำว้า.....31
3.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์กับความแน่นเนื้อ
ในระยะต่างๆ.....32
3.3 ผลการแยกเอนไซม์โดยผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม – เซลลูโลส.....35
3.4 ผลการทำเซฟาเด็กซ์ จี – 50.....36
3.5 ผลการทำอิเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลพอลิอะคริลาไมด์ชนิดแผ่น (SDS –
Polyacrylamide gel Electrophoresis).....39
3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน
และค่า K_{av} โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 40
3.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและค่า
Relative mobility โดยการทำเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส 43
3.8 ผลของการศึกษาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา.....44
3.9 ผลของการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา.....42
3.10 แสดงผลของความเป็นกรด–ด่างต่อแอคติวิตีของเอนไซม์.....46
3.11 แสดงผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีและต่อความเสถียรของเอนไซม์ 47
3.12 Lineweaver - Burk plot ของไซลาเนสเมื่อใช้ Oat spelts xylan เป็นสับสเตรท 49
3.13 Lineweaver - Burk plot ของไซลาเนสเมื่อใช้ Birchwood xylan เป็นสับสเตรท 50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

A	=	absorbance
Ac	=	acetyl
Araf	=	arabinofuranose
BAS	=	bovine serum albumin
Chy	=	Chymotrypsinogen
cN	=	centrinewton
Cyt	=	Cytochrom C
DEPC	=	diethylpyrocabonate
EDAC	=	ethyldimethylaminopropyl carbodiimide
Glu	=	glucose
IAM	=	iodoacetamide
min	=	minute
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
M	=	molar
MW	=	molecular weight
NAI	=	N-acetylimidazol
NBS	=	N-bromosuccinimide
Oval	=	Ovalbumin
PMSF	=	phenylmethylsulfonyl fluoride
pI	=	isoelectric point
R*f*	=	relative mobility
µmol	=	micromole
µl	=	microlitre
K_{av}	=	partition coefficient
kDa	=	kilodalton
K_m	=	Michaelis constant

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TEMED	=	tetramethylethylenediamine
TNBS	=	N,N,N',N'-trinitrobenzenesulfonic acid
v_o	=	initial velocity
W/V	=	weight by volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย