PRODUCTION OF OXIDASE ENZYMES FOR CLINICAL ASSAYS

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

SUMALAI PHONGYING

17 มี.ค. 2532

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(BIOCHEMISTRY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1988

Copyright by Mahidol University

12070

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอ็นไซม์จำพวกออกซิเดสเพื่อใช้ในโรงพยาบาล

ผู้วิจัย น.ส. สุมาลัย ผ่องยิ่ง

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

นาย พิชิต โตสุโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา

นาย ภิญโญ พานิชพันธ์

นาย ขจร เจริญศิริ

วันที่สำเร็จการศึกษา 29 เมษายน 2531

บทคัดย่อ

ออกซิเดสเป็นเอ็นไซม์ที่มีประโยชน์มากทางเทคโนโลยีชีวภาพ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์จำพวกออกซิเดสโดยใช้วิธี Nutrient selective medium technique และเอ็นไซม์ที่จะใช้สำหรับทดสอบวิธีนี้คือ โคลีนออกซิเดส กลูโคสออกซิเดส แอล-แอลฟ่า-กลีเซอโรฟอสเฟตออกซิเดส ซาโคซีนออกซิเดส และ ยูเรทออกซิเดส

จากการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 2 ชนิดจากตัวอย่างดินจำนวน 50 ตัวอย่าง คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอ็นไซม์ซาโคซีนออกซิเดส และ เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอ็นไซม์ยูเรทออกซิเดส เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้จัดอยู่ใน genus Arthrobacter โดยตั้งชื่อว่า Arthrobacter sp S-1 สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตซาโคซีนออกซิเดส และ Arthrobacter sp U-1 สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตยูเรทออกซิเดส

จากการศึกษาคุณสมบัติทางด้านฟิสิกส์และชีวเคมีของเอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิดหลังจากที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และวิธีโครมาโตกราฟฟี่โดยใช้ DEAE-cellulose column และ Sephadex G-200 พบว่าซาโคซีนออกซิเดสมีคุณสมบัติดังนี้ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 190,000 ดาลตัน ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 45°C pH 7.7 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ประมาณ 30°C และมีค่า Km = 7.0 mM

Copyright by Mahidol University

สำหรับยูเรทออกซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120,000 ดาลตัน pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ pH 9.0 เอ็นไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 35°C และสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ประมาณ 35°C ค่า Km = 7.0×10^{-5} M นอกจากนี้ยังพบว่าโซเดียมบอเรทช่วยให้เอ็นไซม์สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 45°C และยังมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอ็นไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 50°C

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Nutrient selective medium technique เป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอ็นไซม์จำพวกออกซิเดส และเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดที่คัดเลือกได้มีศักยภาพสูงต่อการที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตเอ็นไซม์เพราะคุณสมบัติของเอ็นไซม์ซาโคซีนออกซิเดสและยูเรทออกซิเดสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้คล้ายคลึงกับคุณสมบัติของซาโคซีนออกซิเดสและยูเรทออกซิเดสที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: Production of oxidase enzymes for clinical assays

Name: Sumalai Phongying

Degree: Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Dr. Pichit Tosukhowong, Ph.D. Major advisor

Dr. Bhinyo Panijpan, Ph.D.

Dr. Kachorn Charoensiri, Ph.D.

Date of Graduation: April 29, 1988

ABSTRACT

The oxidase enzymes have a high potential in biotechnological applications. Screen for a good source of a particular oxidase has been actively carried out in various laboratories by using plating technique and liquid culture technique.

In this investigation, nutrient selective medium technique was used to screen for microorganisms which produced choline oxidase, glucose oxidase, L-α-glycerophosphate oxidase, sarcosine oxidase and urate oxidase. Sarcosine oxidase and urate oxidase producing microorganims were successfully screened from 50 soil samples whereas microorganism producing choline oxidase, glucose oxidase and L-α -glycerophosphate oxidae were not found. Sarcosine oxidase and urate oxidase producing microorganisms were identified as a genus Arthrobacter based on Bergey's manual and arbitarily name *Arthrobacter sp S-1* and *Arthrobacter sp U-1*, respectively. *Arthrobacter sp S-1* produced only intracellular sarcosine oxidase with specific activity about 0.06 unit/mg protein. Crude sarcosine oxidase was purified 20 folds, 72%

Copyright by Mahidol University

recovery with a specific activity of 1.2 unit/mg protein. Molecular weight of this sarcosine oxidase was about 190,000 daltons estimated by gel filtration. Optimal pH and optimal temperature were about 7.7 and 45°C, respectively. This enzyme was stable upto 30°C in phosphate buffer pH 7.5 and it was stable at 4°C in the presence of NaN_3. K_m was about 7.0 mM and it was specific to sarcosine. Effects of various activators and inhibitors were studied.

Arthrobacter sp U-1 produced both intracellular and extracellular urate oxidase in the ratio of 20:1 and about 0.34 unit/mg protein of crude intracellular urate oxidase was obtained. This crude enzyme was purified 15 folds, 70% recovery with a specific activity of 5 unit/mg protein. The molecular weight of this urate oxidase was about 120,000 daltons estimated by gel filtration. Optimal pH was about 9.0. Optimal temperature was about 35°C in phosphate buffer pH 7.5 and about 50°C in the presence of sodium borate. This enzyme was stable upto 35°C in phosphate buffer pH 7.5 and 45°C in the presence of sodium borate. It was stable at 4°C in the presence of NaN_3. K_m was about 7.0×10^{-5} M and it was specific to uric acid. Effects of various activators and inhibitors were studied.

It was concluded that both enzymes from the two microorganisms are similar to the commercially available enzymes.

Copyright by Mahidol University