2 1 JUN 1994

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β-GALACTOSIDASE FROM THAI JUTE (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*)

WIPA SUGINTA

A THESIS IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

26745

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากปอแก้ว
ผู้วิจัย	วิภา สุจินต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์ Ph.D. ประหยัด โกมารทัต Ph.D. พิชิต โตสุโขวงศ์ Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	15 มีนาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

จากการตรวจสอบเอนไซม์ไกลโคซิเดสจากพืช ๑๐ ชนิดในตระกูลมัลวาซีอี และ ตระกูลทิลลิซีอี โดยใช้พาราไนโตรฟีนิลไกลโคไซด์เป็นสับเสตรท พบว่า ปอแก้วพันธุ์โนนสูง ๒ มีเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสสูงที่สุด(๑.๑๘ ยูนิตต่อกรัมเมล็ด)และกระเจี๊ยบแดงมีเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสสูงที่สุด (๑.๑๘ ยูนิตต่อกรัมเมล็ด) การศึกษาผลการเพาะต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส ในเมล็ดพืชปอแก้วพันธุ์โนนสูง ๒ พบว่าเอ็นไซม์ทั้ง ๒ ชนิด มีแอคทิวิตี้สูงที่สุดเมื่อเมล็ดถูกแช่น้ำเป็นเวลา ๒ วัน การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการทำให้เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสบริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์เบต้า-กาแลคโต-ซิเดสสามารถทนต่อพีเอช ช่วง ๓.๕ ถึง ๙.๕ และสามารถเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -๑๐ ถึง -๒๐ องศาเซลเซียส ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ ๓๕-๖๕ เปอร์เซนต์อิ่มตัว พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปได้จำนวนมากโดยไม่สูญเสียแอคทีวิตี้ของเอนไซม์ทั้งเบต้า-กาแลคโตซิเดสและอัลฟา-แมนโนซิเดส ผลการผ่านโปรตีนลงในคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส พบว่าสามารถแยกเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสออกจากเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส ส่วนผลการผ่านโปรตีนลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี ๒๐๐ และ เซฟาเดกซ์ จี ๑๐๐ พบว่ารูปแบบของการแยกโปรตีนใกล้เคียงกันและขั้นตอนนี้มีประโยชน์ในการแยกเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสออกจากเอนไซม์อัลฟา-กาแลคโตซิเดส ส่วนการใช้คอลัมน์แลคโตซิล เซฟาโรสพบว่ามีประโยชน์ในการช่วยทำให้เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสบริสุทธิ์บ้าง ในการศึกษาครั้งนี้ การทำเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสให้บริสุทธิ์ต้องอาศัย ๕ ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ ๓๕-๗๐ เปอร์เซนต์ อิ่มตัว การใช้โครมาโตกราฟฟีบน ดีอีเออี เซลลูโลส ครั้งแรก การใช้โครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเดกซ์ จี ๑๐๐ การใช้โครมาโตกราฟฟีบนแลคโตซิล เซฟาโรส และการใช้โครมาโตกราฟฟีบน ดีอีเออี เซลลูโลส เป็นครั้งที่ ๒ โดยผลของ

Copyright© by Mahidol University

การทำให้บริสุทธิ์โดยขั้นตอนดังกล่าวทั้งหมดพบว่าเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ๘๖๘ เท่า และปริมาณแอคทิวิตี้ที่หลงเหลือเป็น ๑๓ เปอร์เซนต์ การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่าเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสมีแอคทิวิตี้ต่อสับเสตรทพาราไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ๑ เปอร์เซนต์ ขณะที่พบแอคทิวิตี้ต่อสับเสตรทพาราไนโตรฟีนิล-อัลฟา-แอล-อราบิโนไพราโนไซด์ ๖ เปอร์เซนต์ การศึกษาผลของสารยับยั้งต่อความสามารถของเอนไซม์ในการย่อย พาราไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดีกาแลคโต-ไพราโนไซด์ พบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วย เฟอริกคลอไรด์ เมอร์คิวริกคลอไรด์ พารา-ไฮดรอกซีเมอร์คิวริเบนโซเอท เมธิล-อัลฟา-กาแลคโตไพราโนไซด์ เมธิล-เบต้า-กาแลคโตไพราโนไซด์ พาราไนโตรฟีนิล-อัลฟา-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ กาแลคโตโน-๑,๔-แลคโตน ดี-กาแลคตัล และ ดี-กาแลคโตส การศึกษาด้านจลศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสบริสุทธิ์ต่อสับเสตรทพาราไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ ออร์โธไน-โตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ และ เบต้า-แลคโตส ได้ค่า K_m เท่ากับ ๐.๘ มิลลิโมลาร์ ๑๒.๘ มิลลิโมลาร์ และ ๘๔.๗ มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และ V_{max} เท่ากับ ๖๓.๕ นาโนโมลต่อนาที ๑๖.๙ นาโนโมลต่อนาที และ ๖.๐ นาโนโมลต่อนาที ตามลำดับ การศึกษาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส บนคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี ๒๐๐ ได้ค่า ๕๕ กิโลดาลตัน และ บน อีเลคโตรโฟเรซีส (SDS-PAGE) ได้ค่า ๖๖ กิโลดาลตัน และ พบว่าเอนไซม์มีค่า pI อยู่ในช่วง ๖ ถึง ๙ นอกจากนี้ยังพบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสบนอีเลคโตรโฟเรซีสภายใต้สภาวะไม่สูญเสียสภาพต่อสับเสตรท ๔-เมธิล-อัมเบอริเฟอริล-เบต้า-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ และ ๔-เมธิล-อัมเบอริเฟอริล-อัลฟา-แอล-อราบิโนไพราโนไซด์ ไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะและตำแหน่งของแถบแอคทิวิตี้ การศึกษาคุณสมบัติการสังเคราะห์ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส และเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ h.p.l.c. พบว่าภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (๓๓ เปอร์เซนต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก) และอุณหภูมิสูง (๕๕ องศาเซลเซียส) ผลิตผลที่ เกิดขึ้นจากการบ่มเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส ในน้ำตาลดี-กาแลคโตส เป็นเวลา ๗ วัน เป็น ๑๔ เปอร์เซนต์ และผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการบ่มเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสในน้ำตาล ดี-แมนโนส เป็นเวลา ๗ วัน เป็น ๓๕ เปอร์เซนต์ จากการวิเคราะห์ผลิตผลที่เกิดขึ้นพบว่าผลิตผลส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสเป็นน้ำตาลไดกาแลคโตไซด์ ส่วนผลิตผลที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสเป็นน้ำตาล อัลฟา-๑,๖-ไดแมนโนไซด์ และ น้ำตาลอัลฟา-๑,๒- หรือ อัลฟา-๑,๓-ไดแมนโนไซด์ การศึกษาผลของพีเอชต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์พบว่าปฏิกิริยาสังเคราะห์ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสเกิดขึ้นได้ดีที่ช่วงพีเอช ๓.๐ ถึง ๔.๕ ขณะที่ผลิตผลของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสเกิดได้ดีที่พีเอช ๔.๐ ส่วนผลของอุณหภูมิพบว่าเอนไซม์เบต้า-

กาแลคโตซิเดสเกิดปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ ๔๐ ถึง ๗๐ องศาเซลเซียส และเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่ ๔๐ ถึง ๖๐ องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้น พบว่าผลิตผลผลของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสเกิดได้ดีที่ความเข้มข้นของน้ำตาล ๒๐ ถึง ๓๐ เปอร์เซนต์ น้ำหนักโดยน้ำหนักขณะที่ผลิตผลของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสเกิดได้ดีที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า ๓๐ เปอร์เซนต์ น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยผลิตผลที่เกิดจากเอนไซม์ทั้งสองเพิ่มขึ้นตามเวลาของการบ่ม การทดลองใช้เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสบริสุทธิ์ทำการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาร์ไรด์ พบว่าผลิตผลเกิดขึ้นมีปริมาณต่ำกว่าผลิตผลที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสที่บริสุทธิ์บางส่วน ส่วนการทดลองทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสบริสุทธิ์กับน้ำตาลดี-กลูโคส และน้ำตาลดี-แมนโนส พบว่าไม่มีผลิตผลเกิดขึ้น

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Purification and Characterization of β-galactosidase from Thai Jute (*Hibiscus sabdariffa* L.var. *altissima*)
Name	Wipa Suginta
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	Jisnuson Svasti, Ph.D. Prayad Komaratat, Ph.D. Pichit Tosukhowong, Ph.D.
Date of Graduation	15 March B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Screening of 9 glycosidases from 10 indigenous plants from the Malvaceae family and Tiliaceae family using pNP-glycosides as substrates showed that Por Kaew Non Soong 2 (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*) had the highest activity of β-galactosidase (1.18 U/g seed), while Krajieb Dang (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) had the highest activity of α-mannosidase (1.18 U/g seed). Seeds of Por Kaew Non Soong 2 were used to study the effect of germination on β-galactosidase and α-mannosidase activity, with the results that maximal activities of the two enzymes were detected after 2 days of imbibing. Preliminary studies on purification of *Hibiscus* β-galactosidase showed that the enzyme was stable at a broad pH range of 3.5 to 9.5 and at -10°C to -20°C during storage. Additionally, ammonium sulfate fractionation at 35-65 % saturation was useful as the first step in purification, since it removed a large amount of proteins and gave quantitative recovery of β-galactosidase and α-mannosidase. DEAE-cellulose chromatography at pH 7.0 could separate unbound β-galactosidase from bound α-mannosidase. Sephadex G-200 and Sephadex G-100 were useful for separation of β-galactosidase and α-galactosidase, and Lactosyl

Copyright by Mahidol University

Sepharose 4B chromatography provided a possible additional step for purifying β-galactosidase. Complete purification of β-galactosidase required 5 steps : 35-70 % ammonium sulfate fractionation , a first DEAE-cellulose chromatography, Sephadex G-100 filtration, Lactosyl Sepharose 4 B chromatography and a second DEAE-cellulose chromatography step. The final products gave a major band on SDS-PAGE and was purified with 868 fold with a yield of 13 %. With pNP-β-D-galactopyranoside as substrate, optimum activity of purified β-galactosidase was observed at pH 4.0 and 55°C . Purified β-galactosidase showed 1 % activity towards pNP-β-D-glucopyranoside and 6 % activity towards pNP-α-L-arabinopyranoside . The enzyme was strongly inhibited by $FeCl_3$, $HgCl_2$, p-hydroxymercuribenzoate, methyl-α-gal, methyl-β-gal, pNP-α-gal, galactono-1,4-lactone, D-galactal and D-galactose. Kinetic studies of β-galactosidase with pNP-β-D-galactopyranoside, oNP-β-D-galactopyranoside and β-lactose gave K_m values of 0.80 mM, 12.8 mM and 84.7 mM respectively and V_{max} values of 63.5 nmol/min, 16.9 nmol/min and 6.0 nmol/min respectively. The molecular weight of the native form of the enzyme was 55 kD and of the denatured enzyme was 66 kD. The enzyme showed charge heterogeneity in isoelectric focusing and chromatofocusing with a pI range 6 to 9. Similar patterns and positions of β-galactosidase under cathodic gel stained with 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside and 4-methylumbelliferyl-α-L-arabinopyranoside were observed, suggesting that both activities were due to the same enzyme. Partially purified β-galactosidase and α-mannosidase were also tested for synthetic capability. Under high sugar concentrations (33 % w/w) and high temperature (55°C) , the yields produced by β-galactosidase and α-mannosidase were 14 % and 35 % respectively after 7 days of incubation. Identification of synthetic products on h.p.l.c. compared to standard sugars showed that a major product produced by β-galactosidase was digalactoside and major products produced by α-mannosidase included α(1,6)-dimannoside and

Copyright© by Mahidol University

α(1,2)-or α (1,3)-dimannoside. Higher synthetic activity of β-galactosidase was shown at the pH range of 3.0-4.5 whereas higher synthetic activity of α-mannosidase was shown at pH 4.0. However, β-galactosidase displayed the synthetic activity over a broader range (40-70°C) than α-mannosidase (40-60°C). For synthetic activity, β-galactosidase preferred lower concentrations of monosaccharide substrates (20-30 % w/w) than α-mannnosidase which preferred concentrations of monosaccharide over 30 % w/w. The synthetic activity of the two enzymes was increased with increasing time of incubation. Highly purified β-galactosidase was also tested for synthesis and showed lower synthetic ability than partially purified enzyme. No cross reactivity of β-galactosidase with D-glucose and D-mannose were detected.

Copyright by Mahidol University