EVALUATION THE PERFORMANCE CHARACTERISTIC OF CHOLESTEROL OXIDASE ISOLATED FROM STREPTOMYCES SP., PSEUDOMONAS SP., BREVIBACTERIUM SP. AND CELLULOMONAS SP. FOR THE KINETIC DETERMINATION OF TOTAL SERUM CHOLESTEROL

PORNPEN NITHIPAICHIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(CLINICAL PATHOLOGY)

IN

With compliments
of

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1997

TH
P836eV
1997

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประเมินคุณสมบัติของ cholesterol oxidase จาก *Streptomyces sp.* *Pseudomonas sp.*, *Brevibacterium sp.* และ *Cellulomonas sp.* ที่เหมาะจะใช้กับการตรวจโคเลสเตอรอลในซีรัม

ผู้วิจัย พรเพ็ญ นิธิไพจิตร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

พรทิพย์ โล่ห์เลขา, M.Sc.

พัชรี เจียรนัยกูล, Ph.D

วันที่สำเร็จการศึกษา 24 เมษายน พ.ศ 2540

บทคัดย่อ

การตรวจ cholesterol ในซีรัมโดยใช้เอนไซม์ทำได้ทั้งแบบวัดจุดสุดท้ายของปฏิกิริยา (endpoint method) หรือวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยา (kinetic method) Lolekha และ Jantaveesirirat เสนอว่าการใช้ cholesterol oxidase จาก *Streptomyces sp.* ดีกว่า *Nocardia sp.* และ *Pseudomonas sp.* ในเรื่องของราคาและความคงทนของน้ำยาที่ใช้เพื่อตรวจ cholesterol ในซีรัมโดยวิธี endpoint method

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหา cholesterol oxidase ที่เหมาะกับการตรวจ cholesterol ในซีรัมโดยวิธี kinetic method จากการหาและเปรียบเทียบค่า Michaelis constants (K_m) ของ cholesterol oxidase 4 ชนิดคือ *Streptomyces, Pseudomonas, Brevibacterium* และ *Cellulomonas* ผลการศึกษาพบว่า cholesterol oxidase จาก *Brevibacterium* ให้ค่า K_m สูงสุดคือ 230.3×10^{-4} M ตามด้วยค่า K_m ของ *Streptomyces* (2.17×10^{-4} M) *Cellulomonas* (0.84×10^{-4} M) และ *Pseudomonas* ได้ (0.61×10^{-4} M) ตามลำดับ น้ำยาที่เตรียมโดยใช้ cholesterol oxidase จาก *Brevibacterium* ให้ค่า cholesterol linearity ได้สูงถึง 25.9 mmol/L (1000 mg/dL) สำหรับ cholesterol oxidase จาก *Streptomyces, Pseudomonas* และ *Cellulomonas* ให้ค่า K_mต่ำไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจ cholesterol ในซีรัมของคนปกติที่มีค่า cholesterol ปกติ 5.2 mmol/L หรือ

Copyright by Mahidol University

200 mg/dL โดยวิธี kinetic method ได้เนื่องจากให้ค่า cholesterol linearity เพียง 1.56 mmol/L (60 mg/dL), 1.04 mmol/L (40 mg/dL) และ 1.04 mmol/L ตามลำดับ

อย่างไรก็ดีสามารถทำให้ค่า K_m ของ cholesterol oxidase สูงขึ้นโดยใช้ปฏิกริยาของ competitive inhibitor จาก dichlorophenol isomers ซึ่งพบว่า 3,4 dichlorophenolเป็น competitive inhibitor ต่อ *Streptomyces* cholesterol oxidase จึงช่วยเพิ่มค่า K_m ของ *Streptomyces* cholesterol oxidase ให้สูงขึ้นจาก 2.17×10^{-4} M เป็น 24.89×10^{-4} M ดังนั้นการใช้น้ำยาที่มี cholesterol oxidase จาก *Streptomyces* ร่วมกับมี 3,4 dicholorophenol จำนวน 5 mmol/L จะช่วยให้ตรวจ cholesterol ในซีรัมได้สูงถึง 20.72 mmol/L (800 mg/dL)

สรุปประเภทของ cholesterol oxidase ที่เหมาะในการตรวจ cholesterol โดยวิธีkinetic method คือ *Brevibacterium* หรือ *Streptomyces* ที่มีการเติม 3,4dichlorophenol จำนวน 5 mmol/L สำหรับข้อดีของน้ำยาที่เตรียมจาก *Brevibacterium* cholesterol oxidase คือมีราคาถูก (2.05 บาท/mL) และสามารถตรวจ cholesterol ได้ถูกต้องที่ระดับสูงถึง 25.9 mmol/L (1000 mg/dL) ขณะที่ราคาน้ำยาของ *Streptomyces* แพงกว่าคือ 32.80 บาท/mL และให้ cholesterol linearity วัดได้ 20.72 mmol/L หรือ 800mg/dL ส่วนข้อเสียของการใช้น้ำยาจาก *Brevibacterium* คือการใช้ตัวอย่าง (30 μL) จำนวนมากกว่าการใช้น้ำยาที่มี *Streptomyces* (3μL)

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Evaluation the Performance Characteristic of Cholesterol Oxidase Isolated from *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brevibacterium sp.* and *Cellulomonas sp.* for the Kinetic Determination of Total Serum Cholesterol

Name Pornpen Nithipaichit

Degree Master of Scince (Clinical Pathology)

Thesis Supervision Committee

Porntip Lolekha, M. Sc.

Patcharee Jearanaikoon, Ph.D.

Date of Gradration 24 April B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

The enzymatic method for serum cholesterol determination can be either the endpoint or the kinetic method. Lolekha and Juntaveeserirat suggested that *Streptomyces sp.* cholesterol oxidase was a superior source for the enzymatic endpoint method than the enzyme obtained from *Nocardia sp.* and *Pseudomonas sp.* because of its economical cost and the longest stability.

The objective of this study was to find the suitable sources of cholesterol oxidase for serum cholesterol assay by the kinetic method. The Michaelis constant (K_m) of *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brevibacterium sp.* and *Cellulomonas sp* cholesterol oxidase were determined and compared. The *Brevibacterium* cholesterol oxidase gave the highest K_m value (230.3×10^{-4} M), followed by the K_m values of *Streptomyces sp.* (2.17×10^{-4} M), *Cellulomonas sp.* (0.84×10^{-4} M) and *Pseudomonas sp.* (0.61×10^{-4} M).

Copyright by Mahidol University

mmol/L (1000mg/dL). The K_m values of *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.*, and *Cellulomonas sp* cholesterol oxidase were too low to achieve the first order kinetics over a wide range of serum cholesterol. Cholesterol linearity obtain from *Streptomyces sp* (1.56 mmol/L or 60 mg/dL), *Pseudomonas sp.* (1.04 mmol/L or 40 mg/dL) *and Cellulomonas sp* (1.04 mmol/L) cholesterol reagents was too low; they were not suitable for detection of cholesterol concentration normally present in human serum (upto 5.2 mmol/L or 200 mg/dL). To increase the K_m value of cholesterol oxidase, the inhibitor effect of dichlorophenol isomers was examined. Only 3,4 dichlorophenol could be a competitive inhibitor for *Streptomyces sp.* cholesterol oxidase; its K_m value was raised from 2.17×10^{-4} M to 24.89×10^{-4} M. The *Streptomyces* cholesterol reagent with the addition of 3,4 dichlorophenol, 5 mmol/L raised cholesterol linearity up to 20.72 mmol/L (800 mg/dL).

In conclusion, *Brevibacterium sp.* and *Streptomyces sp.* (with the addition of 3,4 dichlorophenol) cholesterol oxidase are suitable sources for using in cholesterol reagent in the detection of human serum cholesterol by the kinetic method. The reagent containing *Brevibacterium sp* cholesterol oxidase has lower cost (2.05 bath/ mL) and higher linearity (25.9 mmol/L) compared to *Streptomyces sp* cholesterol oxidase (32.80 bath/mL, 20.72 mmol/L). However, the disadvantage of using *Brevibacterium sp.* enzymatic reagent is due to its use of high sample volume (30 μL) compared to *Streptomyces sp* (3μL).

Copyright by Mahidol University