



**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF L-GLUTAMATE
OXIDASE FROM NEWLY ISOLATED *STREPTOMYCES* SP. 18G**

SUPAWADEE WACHIRATIANCHAI

**With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2003

ISBN 974-04-3106-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S959p
2003
c.2

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF L-GLUTAMATE OXIDASE FROM NEWLY ISOLATED *STREPTOMYCES* SP. 18G

SUPAWADEE WACHIRATIANCHAI 4236968 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: SUCHAT UDOMSOPAGIT, Ph.D., SAOVANEE DHARMSTHITI, Ph.D., PRAMVADEE Y. WONGSAENGCHANTRA, Ph.D.

ABSTRACT

L-glutamate oxidase (GLOD) producing-actinomycetes strain 18G was isolated from soil sample from Pathum Thane Province, Thailand. It was identified as *Streptomyces* sp. The optimal conditions for GLOD production of *Streptomyces* sp.18G in wheat bran medium, containing 2.0% wheat bran, 0.5% sodium chloride and 0.5% monosodium glutamate, was 37°C with shaking at 200 rpm. The GLOD was concentrated by ammonium sulphate precipitation and was purified to homogeneity from an aqueous crude extract by SP-Sepharose Fast Flow cation-exchange chromatography, Q-Sepharose Fast Flow anion-exchange chromatography and Superdex gel filtration chromatography, respectively. The enzyme had a molecular weight of 110,000 and consisted of two identical subunits, each with a molecular weight of 61,000. The isoelectric point was pH 8.5 and the enzyme had optimal pH between 7.0 – 7.4. GLOD showed the maximum activity at 37°C and the remaining activity was 100 % of the original activity when it was heated at 55°C for 1 h. The GLOD activity was stable in pH range from 6.5 to 7 for 1 h. Among 21 amino acids tested for substrate specificity, L-glutamic acid was almost exclusively oxidized. D-glutamic acid and L-aspartate were oxidized but only 0.79 % and 0.53 %, respectively.

**KEY WORDS : SCREENING / L-GLUTAMATE OXIDASE / GLOD /
PURIFICATION / CHARACTERIZATION**

90 P. ISBN 974-04-3106-2

การทำให้บริสุทธิ์ และ การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูตามาตออกซิเดสจาก สเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 18G ที่แยกได้ใหม่ (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF L-GLUTAMATE OXIDASE FROM NEWLY ISOLATED *STREPTOMYCES* SP. 18G)

สุภาวดี วชิระเรียรชัย 4236968 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุชาติ อุดมโสภกิจ, Ph.D., เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, Ph.D., เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์, Ph.D.

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนไมซีทิส (actinomycetes) สายพันธุ์ 18G ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูตามาตออกซิเดส (glutamate oxidase, GLOD) ได้ถูกแยกมาจากตัวอย่างดินในประเทศไทย จากการจำแนกสายพันธุ์ พบว่าเป็น *Streptomyces* sp. เชื้อ *Streptomyces* sp.18G สามารถสร้างเอนไซม์กลูตามาตออกซิเดสได้ดีใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 2.0%, โซเดียมคลอไรด์ 0.5% และ โมโนโซเดียมกลูตามาต 0.5% ในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 37°C เอนไซม์กลูตามาตออกซิเดสที่ผลิตได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาศึกษาคุณสมบัติ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ ผ่านกระบวนการแยกด้วย column chromatography โดย SP-Sepharose Fast Flow cation-exchange chromatography, Q-Sepharose Fast Flow anion-exchange chromatography และ Superdex gel filtration chromatography ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 110,000 ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 61,000 เอนไซม์มีค่า isoelectric point เท่ากับ 8.5 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่า pH 7.0-7.4 และที่อุณหภูมิ 37°C เอนไซม์สามารถคงค่ากิจกรรมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าเริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 55°C และที่ค่า pH 6.5-7.0 ได้นาน 1 ชม. จากการศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ในกรดอะมิโนต่าง ๆ 21 ชนิด พบว่าเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อ L-glutamic acid มากที่สุดเป็น 100 % และสามารถใช้ D-glutamic acid และ L-aspartate ได้เพียง 0.79 % และ 0.53 % ตามลำดับ

90 หน้า. ISBN 974-04-3106-2