# การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์ไคโตไบเอสจาก *Aeromonas* sp. CS-34

# Purification and Characterization of Chitobiase from *Aeromonas* sp.CS-34

วรรณา หงษา

Wanna Hongsa

050 ค ว ส
เลขหมู่ QR90 .ว55 2538
เลขทะเบียน.....
9 / ก.พ. / 39

Order Key.....7021.....
BIB Key.....91698.....

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์ไคโตไบเอสจาก *Aeromonas* sp. CS-34

ผู้เขียน นางสาว วรรณา หงษา

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2538

## บทคัดย่อ

ไคโตไบเอส (EC 3.2.1.29) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะβ(1-4) glycosidic ในน้ำตาลไคโตไบโอส ให้ผลผลิตน้ำตาลN-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) สองโมเลกุล แบคทีเรียสายพันธุ์ *Aeromonas* sp. CS-34 ที่แยกได้จากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้งสามารถผลิตเอนไซม์ไคโตไบเอสภายในเซลล์และหลั่งออกภายนอกเซลล์โดยผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไคติน โดยไคตินจากกระดองปลาหมึกสามารถกระตุ้น *Aeromonas* sp. CS-34 ผลิตและหลั่งเอนไซม์ไคโตไบเอสออกนอกเซลล์ได้ดีกว่าไคตินจากกระดองปู และไคตินผงสามารถกระตุ้นได้ดีกว่า colloidal chitin การเลี้ยง *Aeromonas* sp. CS-34 ด้วยอาหารผสมไคตินผงจากกระดองปลาหมึกที่ค่าความเข้มข้นของไคติน 1 เปอร์เซนต์สามารถกระตุ้นให้ *Aeromonas* sp. CS-34 ผลิตเอนไซม์ไคโตไบเอสได้ดีที่สุด อาหารที่มีความเข้มข้นไคตินผงสูงกว่า 1.5 เปอร์เซนต์ขึ้นไปหรือน้อยกว่า 0.5 เปอร์เซนต์ ลงมามีผลทำให้การสังเคราะห์ไคโตไบเอสลดลงอย่างมาก *Aeromonas* sp. CS-34 สามารถผลิตเอนไซม์ไคโตไบเอสออกมาภายนอกเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไคตินผงจากกระดองปลาหมึกเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 ชั่วโมง

เอนไซม์ไคโตไบเอสที่ *Aeromonas* sp. CS-34 หลั่งออกสู่อาหารเลี้ยงถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี DEAE-cellulose และSephadex G-100 ตามลำดับ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลธรรมชาติ 120,000 ดัลตันที่ประกอบด้วยโมเลกุลหน่วยย่อยขนาดน้ำหนักโมเลกุล 75,000 ดัลตัน มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนสามารถทำงานได้สูงสุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50°ซ และมีความทนทานได้ดีที่สภาวะพีเอช 6.5-7.0 อุณหภูมิไม่เกิน 45°ซ โดยมีค่า $K_m$ เท่ากับ 1.82 mM และ $V_{max}$ เท่ากับ 0.0565 U/ml

เอนไซม์ไคโตไบเอสมีคุณสมบัติเป็น acidic protein มีประจุสุทธิเป็นลบที่พีเอช 7.0 สามารถจับกับอิออนบวกได้ดี อิออนโลหะหนัก $K^+$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Cu^{2+}$และ $Zn^{2+}$ ที่ความเข้มข้น 1.0

มิลลิ- โมลาร์สามารถยับยั้งแอคติวิตี้ของไคโตไบเอสโดยเฉพาะ $Zn^{2+}$ เป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงที่สุด เกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 โมลาร์กระตุ้นแอคติวิตี้ของไคโตไบเอสแต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1.0 โมลาร์จะยับยั้งแอคติวิตี้ไคโตไบเอส สารประกอบ 1.0 mM EDTA และ 1.0% SDS กระตุ้นแอคติวิตี้ไคโตไบเอสแต่สารประกอบ ethanol ยับยั้งแอคติวิตี้ไคโตไบเอสอย่างรุนแรง

ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไคโตไบเอสที่ 4°ซ เอนไซม์จะคงสภาพธรรมชาติในช่วง 15 วันแรกได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ จะคงสภาพธรรมชาติได้ดีที่สุด

Thesis Title Purification and Characterization of Chitobiase from *Aeromonas* sp. CS-34

Author Miss. Wanna Hongsa

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1995

## Abstract

Chitobiase (EC 3.2.1.29) is an enzyme capable hydrolyzing β(1→4) glycosidic linkage of chitobiose producing two molecules of N-acetyl-D-glucosamine. *Aeromonas* sp.CS-34 ,a strain of bacteria isolated from prawn pond sediment, produced extracellular and intracellular chitobiase after grew in minimal medium containing chitin as a carbon source. Chitin from squid pen induced chitobiase synthesis better than that from crab shell. Moreover, the induction was greater if chitin was added in powder than in colloidal form. The maximum activity of chitobiase was detected as the final concentration of powder chitin in the medium was 1%. The concentration of greater or lesser than 1% affected the enzyme activity adversely. The highest extracellular chitobiase activity from *Aeromonas* sp. CS-34 was found after it grown in medium containing 1% powder squid pen chitin and shaken at 37 °C for 30 hours.

The cell-free culture chitobiase was purified by DEAE-cellulose and Sephadex G-100. column chromatography respectively. The purified enzyme showed single band on SDS-PAGE and positive staining for glycoprotein. Its molecular weight was 120,000 by Gel filtration technique while it was only 75,000 by SDS-PAGE. The enzyme showed optimum pH and optimum temperature at pH 7.0 and 50 °C respectively. The stability was found at pH 6.5-7.0 and temperature at 45 °C. Its $K_m$ and $V_{max}$ for p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide were 1.82 mM and 0.0565 U/ml respectively.

The purified chitobiase was acidic protein with net negative charge at pH 7.0. Many heavy metal ions, $K^+$, $Ca^{+2}$, $Mg^{+2}$ ,and $Cu^{+2}$ ,at the concentration of 1 mM, was the enzyme

activity inhibitor while $Zn^{+2}$ was the most potent inhibitor. The activity of chitobiase was stimulated by 0.1-0.4 M NaCl. Gradually decreased of the enzyme activity was found after the addition of 0.5 M NaCl with the strong reduction occurred after 1.0 M NaCl. The activity was also stimulated for 8.13 and 23.51% by 1 mM EDTA and 1.0% SDS, respectively. Ethanol, on the other hand, reduced the enzyme activity by 19.35 %.

The activity of purified chitobiase was stable for 15 days at 4 $^{\circ}$C. For the longer periods, it was suggested to keep at -70 $^{\circ}$C.