



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส

โดย นายสุชาติ อุดมโสภกิจ และคณะ

31 ตุลาคม 2546



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกพันธุ์ที่สามารถผลิตเอโนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส

โดย นายสุชาติ อุดมโสภกิจ และคณะ

31 ตุลาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นายสุชาติ อุดมโสภกิจ	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2. นางสาวสุภาวดี วชิระเขียรชัย	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ศาสตราจารย์อมเรศ ภูมิรัตน	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Executive summary	3
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	5
ระเบียบวิธีการวิจัย	7
ผลการทดลองและอภิปราย	19
แนวทางการศึกษาวิจัยต่อไป	57
เอกสารอ้างอิง	58
Out put ที่ได้จากโครงการ	62

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนไมซีทิส (actinomycetes) สายพันธุ์ 18G ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส (glutamate oxidase, GLOD) ถูกแยกมาจากตัวอย่างดินที่เก็บจากจังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย จากการจำแนกสายพันธุ์ พบว่าเป็น *Streptomyces* sp. เชื้อ *Streptomyces* sp.18G สามารถสร้างเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 2.0%, โซเดียมคลอไรด์ 0.5% และ โมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5% ในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 37°C เอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดสที่ผลิตได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาศึกษาคุณสมบัติ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านกระบวนการแยกด้วย column chromatography โดย SP-Sepharose Fast Flow cation-exchange chromatography, Q-Sepharose Fast Flow anion-exchange chromatography และ Superdex gel filtration chromatography ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 120,000 ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 61,000 เอนไซม์มีค่า isoelectric point เท่ากับ 8.5 และมีค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์สูงสุดที่ช่วง pH 7.0-7.4 และที่อุณหภูมิ 37°C เอนไซม์สามารถคงค่ากิจกรรมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 55°C และที่ค่า pH 6.5-7.0 ได้นาน 1 ชม. จากการศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ในการดอะมิโนต่าง ๆ 21 ชนิด พบว่าเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อ L-glutamate มากที่สุดเป็น 100 % และสามารถออกซิไดซ์ D-glutamate และ L-aspartate ได้เพียง 0.79 % และ 0.53 % ตามลำดับ

Abstract

L-glutamate oxidase (GLOD) producing-actinomycetes strain 18G was isolated from soil sample from Pathum Thanee 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 sulfate 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 120,000 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-glutamate was almost exclusively oxidized. D-glutamate and L-aspartate were oxidized but only 0.79 % and 0.53 %, respectively.

Executive summary

กลูตาเมตเป็นสารที่ได้รับความนิยมใช้เป็นตัวชูรสในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เนื่องจากโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) หรือผงชูรสให้รสชาติหวานปนเค็มคล้ายเนื้อ ซึ่งเป็นรสชาติที่มีลักษณะเฉพาะตัวเรียกว่า “อูมามิ” (umami) ในภาษาญี่ปุ่น และเป็นรสชาติพื้นฐานในบรรดา 5 รส นอกเหนือไปจาก รสเค็ม หวาน เปรี้ยว และขม กลูตาเมตอาจมีอยู่แล้วในวัตถุดิบตามธรรมชาติ หรืออาจได้จากการเติมลงไป ในผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างการผลิต อย่างไรก็ตามผู้บริโภคบางรายที่ได้รับกลูตาเมตในปริมาณที่มากเกินไป อาจเกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า “Chinese restaurant syndrome” ซึ่งมีอาการเวียนศีรษะ ปวดท้อง และชาตามข้อ ในผลิตภัณฑ์อาจมีการเติมผงชูรสมากกว่าที่ราชการกำหนด โดยในประเทศไทยองค์การอาหารและยากำหนดให้ระบุปริมาณผงชูรสที่ใช้ลงบนบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์อาหารทั้งสำเร็จรูปและผลิตภัณฑ์ชูรส เช่น ซีอิ๊ว เป็นต้น ในประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้บริโภคผงชูรสได้ไม่เกินวันละ 1 กรัม นอกจากนี้ผู้ผลิตน้ำปลาบางรายอาจทำการปลอมปนโดยเติมสารที่เรียกว่า “Bx” ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตผงชูรสลงในผลิตภัณฑ์น้ำปลา เพื่อให้มีรสชาติกลมกล่อม ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบปริมาณกลูตาเมตในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างง่ายและรวดเร็วจึงเป็นความจำเป็นเพื่อปกป้องผู้บริโภค

ในอุตสาหกรรมการผลิตผงชูรสนั้น ผงชูรสได้จากระบวนการหมักโดยใช้สารอาหารที่เหมาะสม เช่น กากน้ำตาล และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นผลึกสีขาวใสและละลายน้ำได้ดี การเฝ้าติดตามปริมาณผงชูรสที่ผลิตได้ตลอดระยะเวลาการหมักนั้นเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้การผลิตมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาเมตสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หากรดอะมิโน โดยใช้เครื่อง amino acid analyzer, gas chromatography mass spectrometry หรือ fluorometric method ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ใช้เครื่องมือราคาแพง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญเป็นอย่างมาก ส่วนการวิเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาเอนไซม์ เช่น L-glutamate dehydrogenase, L-glutamate decarboxylase หรือ L-glutamate oxidase นั้น ใช้เอนไซม์ที่มีราคาแพง และไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้ อีกผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หากลูตาเมตโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ร่วมกับระบบ Flow injection analysis โดยการตรึงเอนไซม์ L-glutamate oxidase (GLOD) แล้วพบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลดี เนื่องจากสามารถนำมาใช้ซ้ำได้ ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีข้างต้นแล้วให้ผลไม่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม การสร้างระบบสำหรับตรวจวัดกลูตาเมตโดยใช้เอนไซม์ GLOD นั้นมีข้อจำกัดคือ ต้องสั่งซื้อเอนไซม์ดังกล่าวจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น และเป็นการอาศัยเทคโนโลยีจากต่างประเทศ ซึ่งไม่เป็นผลดีในระยะยาว จากการศึกษารายงานการวิจัยพบว่า ได้มีผู้ทำการศึกษาเพื่อหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ GLOD เอนไซม์ดังกล่าวพบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Azotobacter vinelandii*, *Streptomyces endus*, *Streptomyces* sp. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว จะเป็นการลดต้นทุนในการสร้างระบบตรวจวัดกลูตาเมต รวมทั้งเป็นการพึ่งพาตนเองด้วย

ในการวิจัยนี้สามารถแยกจุลินทรีย์ เชื้อ *Streptomyces* sp.18G จากตัวอย่างดินในประเทศไทยได้ โดยเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ GLOD 1 ซึ่งมีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์กลูตาเมตตามที่ต้องการ ได้พัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยมีรำข้าวสาลีเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นวัตถุดิบท้องถิ่นที่หาได้ในประเทศไทย และมีราคาถูก ภายหลังจากการนำเอนไซม์ GLOD ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการต่าง ๆ คือ การทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate การทำ cation-exchange chromatography, anion-exchange chromatography และ gel filtration chromatography แล้ว ได้ศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าเอนไซม์ GLOD มีน้ำหนักโมเลกุล 120,000 daltons ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 61,000 daltons มีค่า isoelectric point เท่ากับ 8.5 และมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ช่วง pH 7.0-7.4 และที่อุณหภูมิ 37°C เอนไซม์ดังกล่าวสามารถคงค่ากิจกรรมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 55°C และที่ค่า pH 6.5-7.0 ได้นาน 1 ชม. จากการศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ในกรดอะมิโนต่าง ๆ 21 ชนิด พบว่าเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อ L-glutamate มากที่สุดเป็น 100 % และสามารถออกซิไดซ์ D-glutamate และ L-aspartate ได้เพียง 0.79 % และ 0.53 % ตามลำดับ

จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น ร่วมกับการทบทวนรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ สรุปได้ว่า เอนไซม์ GLOD จาก *Streptomyces* sp.18G ที่พบในการวิจัยครั้งนี้เป็นเอนไซม์ที่พบใหม่

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

กลูตาเมตเป็นสารที่ได้รับความนิยมใช้เป็นตัวชูรสในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด (Belitz and Grosch, 1987) เนื่องจากโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) หรือผงชูรสให้รสชาติหวานปนเค็มคล้ายเนื้อ ซึ่งเป็นรสชาติที่มีลักษณะเฉพาะตัว เรียกว่า “อูมามิ” (umami) ในภาษาญี่ปุ่น และเป็นรสชาติพื้นฐานในบรรดา 5 รสนอกเหนือไปจาก รสเค็ม หวาน เปรี้ยว และขม (Kenney and Tidball, 1972) กลูตาเมตอาจมีอยู่แล้วในวัตถุดิบตามธรรมชาติ หรืออาจได้จากการเติมลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างการผลิต อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคบางรายที่ได้รับกลูตาเมตในปริมาณที่มากเกินไป อาจเกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า “Chinese restaurant syndrome” (Schaumburg *et al.*, 1969) ซึ่งมีอาการเวียนศีรษะ ปวดท้อง และชาตามข้อ ในผลิตภัณฑ์อาจมีการเติมผงชูรสมากกว่าที่ราชการกำหนด โดยในประเทศไทยองค์การอาหารและยา กำหนดให้ระบุปริมาณผงชูรสที่ใช้ลงบนบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์อาหารทั้งสำเร็จรูปและผลิตภัณฑ์ชูรส เช่น ซีอิ๊ว เป็นต้น ในประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้บริโภคผงชูรสได้ไม่เกินวันละ 1 กรัม นอกจากนี้ผู้ผลิตน้ำปลาบางรายอาจทำการปลอมปนโดยเติมสารที่เรียกว่า “Bx” ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตผงชูรสลงในผลิตภัณฑ์น้ำปลา เพื่อให้มีรสชาติกลมกล่อม ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบปริมาณกลูตาเมตในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างง่ายและรวดเร็วจึงเป็นความจำเป็นเพื่อปกป้องผู้บริโภค

ในอุตสาหกรรมการผลิตผงชูรสนั้น ผงชูรสได้จากระบวนการหมักโดยใช้สารอาหารที่เหมาะสม เช่น กากน้ำตาล และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นผลึกสีขาวใสและละลายน้ำได้ดี การเฝ้าติดตามปริมาณผงชูรสที่ผลิตได้ตลอดระยะเวลาการหมักนั้นเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้การผลิตมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาเมตสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หากรดอะมิโน โดยใช้เครื่อง amino acid analyzer, gas chromatography mass spectrometry หรือ fluorometric method (Anderson *et al.*, 1987; Chapman and Zhou, 1999; Coppola *et al.*, 1975; Fortier *et al.*, 1986; White *et al.*, 1992) ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ใช้เครื่องมือราคาแพง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญเป็นอย่างมาก ส่วนการวิเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาเอนไซม์ เช่น L-glutamate dehydrogenase, L-glutamate decarboxylase หรือ L-glutamate oxidase นั้น (Beutler, 1985; Botré *et al.*, 1993; Kiba *et al.*, 1992; Kiba *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 1973; Kusakabe *et al.*, 1984; Luong *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1998; Mayer *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2001; Wollenberger *et al.*, 1989 Yao *et*

al., 1998, Yao *et al.*, 2001) ใช้เอนไซม์ที่มีราคาแพง และไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์กลูตาเมตโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ร่วมกับระบบ Flow injection analysis โดยการตรึงเอนไซม์ L-glutamate oxidase (GLOD) แล้ว (Udomsopagit *et al.*, 1998) พบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลดี เนื่องจากสามารถนำมาใช้ซ้ำได้ ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีข้างต้นแล้วให้ผลไม่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม การสร้างระบบสำหรับตรวจวัดกลูตาเมตโดยใช้เอนไซม์ GLOD นั้นมีข้อจำกัดคือ ต้องสั่งซื้อเอนไซม์ดังกล่าวจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น และเป็นการอาศัยเทคโนโลยีจากต่างประเทศ ซึ่งไม่เป็นผลดีในระยะยาว จากการศึกษารายงานการวิจัยพบว่า ได้มีผู้ทำการศึกษาเพื่อหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ GLOD เอนไซม์ดังกล่าวพบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Azotobacter vinelandii*, *Streptomyces endus*, *Streptomyces* sp. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว จะเป็นการลดต้นทุนในการสร้างระบบตรวจวัดกลูตาเมต รวมทั้งเป็นการพึ่งพาตนเองด้วย

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Nutrient agar (NA), potato dextrose agar (PDA), actinomycete isolation agar, yeast extract and agar were purchased from Difco Laboratory (สหรัฐอเมริกา) รวมทั้ง humic acid and magnesium sulphate heptahydrate (Fluka Biochemika, สวิสเซอร์แลนด์) Sodium chloride, dextrose, D-mannitol, di-sodiumhydrogen phosphate, potassium chloride, ferrous sulphate heptahydrate และ calcium carbonate (E.Merck, เยอรมนี), ยาปฏิชีวนะ วิตามิน จาก Sigma Chemicals Co. สหรัฐอเมริกา

1.2 อุปกรณ์และสารเคมี chromatography

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำการทดลอง chromatography ได้แก่

- SP-Sepharose Fast Flow ซึ่งเป็น cross-linked 6% beads agarose และมี sulphopropyl ทำหน้าที่เป็น active groups
- Q-Sepharose Fast Flow ซึ่งเป็น highly cross-linked 6 % beads agarose และมี quaternary ammonium เป็น functional groups
- Superdex 200 HR 10/30 เป็นคอลัมน์แก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 mm ยาว 30 ซม.cm ภายในบรรจุสารผสมจำพวก cross-linked agarose and dextran มีรูปร่างเป็นเม็ดกลม ขนาด 13 μm และมี bed volume เท่ากับ 24 ml จาก Amersham Biosciences Ltd. สวีเดน

1.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับ gel electrophoresis

สารเคมีที่ใช้สำหรับ gel electrophoresis ได้แก่ acrylamide และ N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา), protein markers สำหรับ SDS-PAGE (Fermentas, สหรัฐอเมริกา), ammoniumpersulphate, N,N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), standard pI markers อุปกรณ์ที่ใช้คือ Mini-PROTEAN® III Dual vertical slab gel (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา)

สำหรับ isoelectric focusing (IEF) ใช้ PhastGel® IEF 3-9 จาก Amersham Biosciences Ltd. (สวีเดน), sodium dodecyl sulphate จาก Fluka Biochemika (สวิสเซอร์แลนด์) และ glycine จาก E.Merck (เยอรมนี)

1.4 สารเคมีและอุปกรณ์อื่น ๆ

Ethanol, glacial acetic acid, hydrochloric acid, phenol, formaldehyde, pyridine, glycine, glycerol, tris(hydroxymethyl)aminomethane, β -mercaptoethanol, silver nitrate, glutaraldehyde, sodium thiosulphate, sodium acetate, sodium carbonate, sodium hydroxide, ammonium sulphate, potassium di-hydrogen phosphate and di-potassium hydrogen phosphate จาก E.Merck, Darmstadt (เยอรมนี)

4-aminoantipyrine จาก Fluka Biochemika (สวิสเซอร์แลนด์), Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) และ bromphenol blue จาก Sigma-Aldrich Co. (สหรัฐอเมริกา), กรดอะมิโนทุกชนิดที่ใช้รวมทั้ง protein markers สำหรับ gel filtration จาก Sigma-Aldrich Co. (สหรัฐอเมริกา)

เครื่อง spectrophotometer Spectronic® Genesys™ 2, Spectronic Instrument สหรัฐอเมริกา, shaker water bath (SBS30, STUART SCIENTIFIC, สหราชอาณาจักร), Vivaspin20 MW ซึ่งมีค่า cut off เท่ากับ 10,000 ๖ VIVASCIENCE, Sartorius group, เยอรมนี)

2. การเก็บตัวอย่าง

2.1 ตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำเก็บจากบ่อน้ำบาดาลในโรงงานผลิตผงชูรส (monosodium glutamate, MSG) ในจังหวัดราชบุรี ประเทศไทย และโรงงานผลิตอาหารที่เกี่ยวข้องกับการใช้ผงชูรสในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย โดยทำการเก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 50–100 ml สำหรับแต่ละตัวอย่าง

2.2 ตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินเก็บจากจังหวัดปทุมธานี พังงา และพิษณุโลก ประเทศไทย โดยเก็บจากโรงงานผลิตอาหารที่เกี่ยวข้องกับการใช้ผงชูรส ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวน 30–100 g ที่ความลึกประมาณ 7–10 cm จากผิวดิน

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส (GLOD)

3.1 การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดิน

ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำในสารละลายเกลือ (normal saline solution, NSS) และผสมตัวอย่างดินกับ NSS เพื่อให้ได้สารแขวนลอย (suspension) เขย่าให้เข้ากันดี และทิ้งให้ส่วนที่เป็นของแข็งตกตะกอน

นำตัวอย่างน้ำที่ถูกเจือจางและส่วนใส (supernate) จากสารแขวนลอยของตัวอย่างดินไปทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ โดยวิธี spread plate อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ NA, PDA ซึ่งเติม chloramphenicol (20 µg/ml) และ actinomycete isolation agar ซึ่งมี cycloheximide (50 µg/ml) โดยอาหารเหล่านี้ใช้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรีย เชื้อรา และ actinomycete ตามลำดับ นอกจากนี้ยังใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ humic acid-vitamin agar (Hayakawa and Nonomura, 1987) (ภาคผนวก ก. 1) เพื่อช่วยในการคัดเลือก actinomycetes ด้วย

3.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GLOD จากโคโลนีของจุลินทรีย์

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GLOD จากโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่าง ทำโดยอาศัยวิธี H_2O_2 -dependent peroxidase catalyzed chromogenic reaction ซึ่งรายงานโดย Qingshan และคณะ (1996) วิธีการมีดังนี้

เตรียมสารละลาย reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย 2 U/ml horseradish peroxidase (HRP), 10 µmole monosodium glutamate (MSG), 10 µmole 4-aminoantipyrine (AAP) และ 17.5 µmole phenol ใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 แล้วจุ่มกระดาษกรองลงในสารละลายดังกล่าว ซับกระดาษกรองให้หมาด จากนั้นนำกระดาษกรองซึ่งชุบ reaction mixture แล้วนี้ไปวางทาบลงบนโคโลนีของจุลินทรีย์ในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 15-30 นาที จุดสีแดงเข้มที่ปรากฏบนแผ่นกระดาษกรอง แสดงว่าโคโลนี ณ ตำแหน่งที่ตรงกับจุดนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ GLOD จากนั้นทำการเก็บโคโลนีที่ให้ผลบวกเพื่อศึกษาต่อไป

3.3 การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ GLOD

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp.18G ในอาหารเลี้ยงเชื้อ wheat bran precultivation medium ซึ่งปรับปรุงจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่รายงานโดย Böhrer และคณะ ในปี 1989 อาหารดังกล่าว

ประกอบด้วย 2.0% wheat bran, 0.5% sodium chloride และ 0.5% monosodium glutamate
ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm

3.4 การเก็บรักษาเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G

การเก็บรักษาเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G ในระยะยาว ทำโดยเตรียม spore suspension ใน 20% glycerol ซึ่งผ่านการอบฆ่าเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol mung bean agar (ภาคผนวก ก.2) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ loop เชี่ยให้สปอร์หลุดจากเส้นใย (hyphae) แล้วเติม sterile 20% glycerol เพื่อเตรียม spore suspension นำไปกรองผ่าน steril cotton wool เพื่อกำจัดเส้นใย

แบ่ง spore suspension ออกเป็นส่วนย่อย ๆ (aliquots) ส่วนละ 1 ml บรรจุใน sterile cryogenic vial และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 °C

การเก็บรักษาเชื้อ ในระยะสั้น ทำโดยทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol mung bean agar ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

4. การศึกษารูปร่างลักษณะของ *Streptomyces* sp. 18G

การศึกษารูปร่างลักษณะของ *Streptomyces* sp. 18G ทำตามวิธีที่อธิบายโดย Williams และคณะ (1983, 1989)

4.1 การศึกษาลักษณะของโคโลนี

ทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ inorganic salt starch agar (ISS) (ภาคผนวก ก.3) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตรูปร่างของโคโลนี รวมทั้งสีของเส้นใย (mycelium) และสปอร์

4.2 การศึกษาลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำการศึกษาโดยวิธี slide culture technique โดยตัดอาหาร ISS เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 cm ด้วยใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้ววางบนแผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึง inoculate เชื้อ และปิดทับด้วย sterile coverslip และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C ในที่ที่มีความชื้น เมื่อเชื้อเจริญเติบโตดี นำ slide culture ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กำลังขยาย 1000X

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ GLOD

ทำการปรับปรุง precultivation medium (ภาคผนวก ก.4) โดยแทนที่ soy bean meal ด้วย wheat bran อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบประกอบด้วย wheat bran, glucose, calcium carbonate (CaCO_3) และ sodium chloride (NaCl) โดยทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณขององค์ประกอบเหล่านี้ และนำไปเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G เพื่อหาสัดส่วนขององค์ประกอบเหล่านี้ที่ช่วยให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ GLOD ได้สูงสุด นอกจากนี้ ได้เติม MSG ในปริมาณต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย เพื่อทดสอบผลกระทบที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ

ทำการเติมสปอร์ของเชื้อที่ได้จากการเพาะใน mannitol mung bean (ข้อ 3.4) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อเจริญเติบโตดีแล้ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ทำการดูดเฉพาะ supernate เพื่อนำไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ต่อไป

6. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ในสารละลาย

เอนไซม์ GLOD เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของ L-glutamate และได้ α -ketoglutarate เป็นผลิตภัณฑ์ (รูปที่ 1) อนึ่ง ในปฏิกิริยาดังกล่าว มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ด้วย ในการศึกษาวิจัยนี้ ใช้ปฏิกิริยา oxidation ที่เกิดต่อเนื่องระหว่าง H_2O_2 กับ 4-aminoantipyrine และ phenol ซึ่งถูกเร่งโดยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ทำให้ได้สารประกอบ quinoneimine ซึ่งมีสีแดง (Allain *et al.*, 1974) ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยความยาวคลื่น 500 nm โดยเทคนิค spectrophotometry

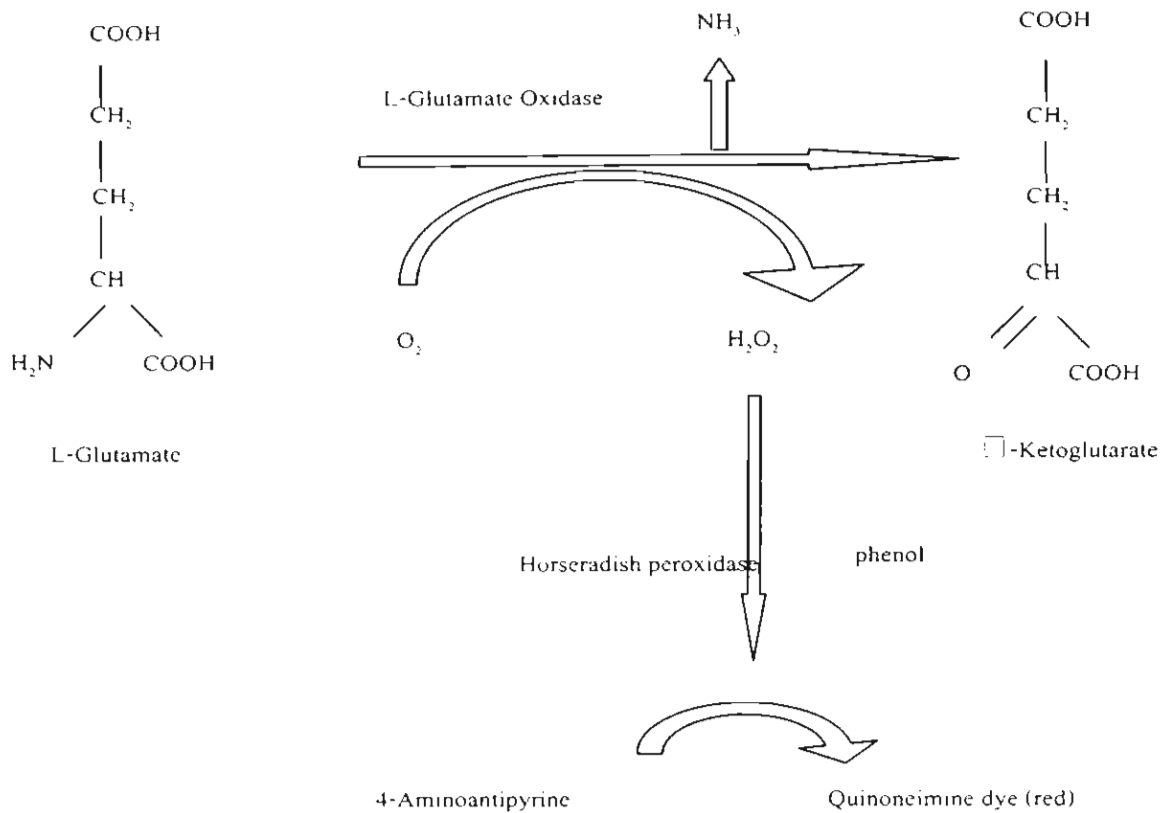
Reaction mixture ที่ใช้ประกอบด้วย 1.0 μmole 4-aminoantipyrine, 17.5 μmole phenol, 2.5 U horseradish peroxidase และ เอนไซม์ GLOD ในปริมาณพอเพียงจาก *Streptomyces* sp. 18G ซึ่งละลายใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 โดยมีปริมาตรรวม 1.30 ml

ทำการทดลองโดย pre-incubate สารละลายดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 นาที จากนั้นจึงเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 10 μmole MSG ลงไปในสารละลาย แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C โดยเขย่าเบา ๆ ใน shaker water bath แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 500 nm

นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Unit of GLOD} = (\text{Abs}_{500 \text{ nm}} - 0.004)/142.17 \quad (1)$$

เอนไซม์ GLOD จำนวน 1 unit หมายถึง จำนวนเอนไซม์ที่ใช้เพื่อผลิต H_2O_2 ปริมาณ 1 μmole ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ (Kusakabe *et al.*, 1983)



รูปที่ 1 ปฏิกิริยา oxidative deamination ของ L-glutamate ไปเป็น α -ketoglutarate ซึ่งถูกเร่งโดยเอนไซม์ GLOD และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องควบคู่กับปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 4-aminoantipyrine ซึ่งถูกเร่งโดยเอนไซม์ horseradish peroxidase ทำให้ได้ quinoneimine ซึ่งมีสีแดง สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 500 nm

7. การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีที่รายงานโดย Bradford (1976) โดยใช้ชุดตรวจ (Protein Assay Kit) ของ PIERCE Biotechnology (สหรัฐอเมริกา) ดังนี้

เติม Coomassie[®] Plus Protein Assay Reagent Kit ปริมาตร 1,500 μ l ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างปริมาตร 50 μ l เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

8. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

8.1 การทำเอนไซม์ให้เข้มข้น (enzyme concentration)

เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp.18G (crude enzyme) ถูกทำให้เข้มข้นด้วยวิธีตกตะกอนด้วย ammonium sulfate (Harris *et al.*, 1994) ดังนี้

ทำการบด ammonium sulfate ให้เป็นผงละเอียด แล้วค่อย ๆ เติมลงในสารละลายที่มีเอนไซม์อยู่ ซึ่งสารละลายเอนไซม์นี้วางในถาดน้ำแข็งเพื่อให้เย็นตลอดเวลา และทำการกวนสารละลายเบา ๆ ตลอดเวลาที่เติม ammonium sulfate จนกว่าจะได้ 80% saturation แล้วทำการกวนสารละลายต่อไปอีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 0°C จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 45 นาที แล้วเทส่วน supernate ทิ้งไป ละลายตะกอนที่ได้ด้วย potassium phosphate buffer pH 6.0 ซึ่งเย็นจัด โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุด แล้วทำการกำจัดเกลือส่วนเกินออก (desalt) โดยการกรองด้วยการปั่นความเร็วสูง (centrifugal ultrafiltration)

8.2 Cation-exchange chromatography

สารละลายเอนไซม์เข้มข้นถูกนำไปผ่านกระบวนการแยกโดยใช้เทคนิค cation-exchange chromatography ซึ่งใช้ SP-Sepharose FF column ที่มี bed volume เท่ากับ 30 ml ทำการ pre-equilibrated ด้วย 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 ด้วยอัตราเร็ว 1 ml/min แล้วล้าง unbound proteins ด้วย potassium phosphate buffer ปริมาตร 40 ml จากนั้นจึง elute ด้วย linear salt gradient ของ 0–0.3 M sodium chloride ที่อัตราเร็ว 1 ml/min ทำการเก็บสารละลายเอนไซม์แต่ละ fraction ที่ได้โดยใช้ fraction collector ซึ่งตั้งปริมาตรไว้ที่ 3 ml

นำแต่ละ fraction ไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ตามที่ระบุในข้อ 6 นำ fraction ต่าง ๆ ที่มีค่ากิจกรรม (active fractions) มารวมกัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นและกำจัดเกลือส่วนเกินด้วยวิธี centrifugal ultrafiltration ก่อนนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

8.3 Anion-exchange chromatography

นำสารละลายเอนไซม์ GLOD ที่ผ่านกระบวนการ cation-exchange chromatography มาทำการแยกต่อไปด้วยวิธี anion-exchange chromatography โดยใช้ Q-Sepharose Fast Flow column ซึ่งมี bed volume เท่ากับ 30 ml ทำการเติมสารละลายเอนไซม์ลงใน column ดังกล่าวซึ่งผ่าน pre-equilibrate แล้ว จากนั้นทำการล้าง unbound proteins ด้วย 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่อัตราเร็ว 1.0 ml/min แล้วจึง elute ด้วย linear salt gradient ของ 0.0–1.0 M sodium chloride ที่อัตราเร็ว 1.0 ml/min ทำการเก็บสารละลายเอนไซม์แต่ละ fraction ที่ได้โดยใช้ fraction collector ซึ่งตั้งปริมาตรไว้ที่ 3 ml

นำแต่ละ fraction ไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ตามที่ระบุในข้อ 6 นำ fraction ต่าง ๆ ที่มีค่ากิจกรรม (active fractions) มารวมกัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นและกำจัดเกลือส่วนเกินด้วยวิธี centrifugal ultrafiltration ก่อนนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

8.4 Gel filtration chromatography

ขั้นตอนสุดท้ายในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในการศึกษาวิจัยนี้ ใช้เทคนิค gel filtration chromatography โดยใช้ Superdex 200 HR 10/30 column ซึ่งมี bed volume เท่ากับ 24 ml ภายหลังจาก pre-equilibrated ด้วย 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ซึ่งมี 0.15 M sodium chloride ด้วยแล้ว นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอน anion-exchange chromatography เติมลงไป แล้วทำการ elute ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ด้วยอัตราเร็ว 0.5 ml/min ทำการเก็บสารละลายเอนไซม์แต่ละ fraction ที่ได้โดยใช้ fraction collector ซึ่งตั้งปริมาตรไว้ที่ 0.5 ml

นำแต่ละ fraction ไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ตามที่ระบุในข้อ 6 นำ fraction ต่าง ๆ ที่มีค่ากิจกรรม (active fractions) มารวมกันเพื่อทำการทดลองต่อไป

9. การศึกษาขนาดและโครงสร้างของเอนไซม์ GLOD

9.1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

สารละลายเอนไซม์โดยนำมาศึกษาโดยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 12% separating gel และ 4% stacking gel ตัวอย่างถูกผสมเข้ากับ sample buffer (ภาคผนวก ข.1) แล้วนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C จากนั้นจึงเติมตัวอย่างที่ได้ลงในช่องสำหรับเติมใน slab gel แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าตรงที่ความต่างศักย์คงที่ 150 V เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำ gel ที่ได้ไปทำการย้อมด้วยกรรมวิธี silver stain เพื่อทำให้เห็นแถบโปรตีน (protein bands)

ในการทำ SDS-PAGE นี้ ใช้โปรตีนต่าง ๆ ซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เป็นค่าเปรียบเทียบกับ ได้แก่ lysozyme (14,400), β -lactoglobulin (18,400), restriction endonuclease *Bsp*981 (25,000), lactate dehydrogenase (35,000), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,200) และ β -galactosidase (116,000)

9.2 การศึกษาขนาดของเอนไซม์ GLOD ด้วยวิธี gel filtration chromatography

การศึกษาหาขนาดของเอนไซม์ GLOD ที่เป็น native form ทำโดยเทคนิคการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบ (relative molecular weight, M_r) ด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยหลักการเดียวกับที่อธิบายในข้อ 8.4 แต่ควบคุมอัตราเร็วของบัฟเฟอร์ที่ 0.25 ml/min ทั้งนี้ ได้ใช้โปรตีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เป็นค่าเปรียบเทียบกับ ได้แก่ cytochrome C (12,400), carbonic anhydrase (29,000), bovine serum albumin (66,000), alcohol dehydrogenase (150,000) และ β -amylase (200,000) และใช้ blue dextran (2,000,000) และ vitamin B₁₂ (1,355.4) เป็น marker สำหรับ void volume (V_o) และ total volume (V_t) ตามลำดับ

นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า M_r และค่า partition coefficient (K_{AV}) โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o) \quad (2)$$

เมื่อ V_e = elution volume

V_o = void volume

V_t = total volume

9.3 การศึกษา isoelectric point

ทำการศึกษาค่า isoelectric point ของเอนไซม์ GLOD โดยเทคนิค isoelectric focusing (IEF) ซึ่งใช้ PhastGel® IEF 3-9 ในการนี้ใช้ *pI* markers มาตรฐานประกอบด้วย amyloglucosidase (3.5), soybean trypsin inhibitor (4.55), β -lactoglobulin A (5.20), bovine carbonic anhydrase B (5.85), human carbonic anhydrase B (6.55), myoglobin-acidic band (6.85), myoglobin-basic band (7.35), lentil lectin-acidic band (8.15), lentil lectin-middle band (8.45), lentil lectin-base band (8.65) และ trypsinogen (9.30)

นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างค่าระยะทางของโปรตีนที่ห่างจากขั้ว anode กับค่า *pI* ของโปรตีนแต่ละชนิด นำไปคำนวณเพื่อหาค่า *pI* ของเอนไซม์ GLOD โดยใช้สมการถดถอย (regression equation)

10. การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ต่อกิจกรรมและความเสถียร (stability) ของเอนไซม์

ทำการศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD เมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า pH แตกต่างกันไป โดยบัฟเฟอร์ (0.1 M) ที่ใช้ได้แก่ acetate buffer (pH 3.5-6.0), potassium phosphate buffer (pH 6.0-7.5), Tris-HCl buffer (pH 7.5-9.0), และ glycine-NaOH buffer (pH 9.0-10.0) การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD กระทำเช่นเดียวกับที่อธิบายไว้ในข้อ 6

ส่วนการศึกษาค่าผลของค่า pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ GLOD นั้น ทำโดย incubate เอนไซม์ GLOD ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า pH แตกต่างกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจึงนำไปหาค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 6

11. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความเสถียร (stability) ของเอนไซม์

ทำการศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD โดยให้เอนไซม์ดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ L-glutamate เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 25-80°C โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่โดยใช้ shaker water bath และทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีที่อธิบายในข้อ 6 ของระเบียบวิธีการวิจัย

ส่วนการศึกษาคผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ GLOD นั้น ทำโดย incubate เอนไซม์ GLOD ใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากนั้นจึงนำไปหาค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 6

12. ความจำเพาะของเอนไซม์ (substrate specificity)

ได้ทำการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ GLOD ต่อกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 10 mM (ยกเว้น 1 mM L-tyrosine) โดยใช้วิธีตามที่อธิบายในข้อ 6 แล้วคำนวณหาค่ากิจกรรมแบบเปรียบเทียบเป็นร้อยละของกิจกรรมที่ได้จาก L-glutamate (% relative activity)

ผลการทดลองและอภิปราย

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส (GLOD)

การเก็บตัวอย่างทั้งดินและน้ำนั้น เก็บโดยลึกจากผิวดินประมาณ 10 cm เนื่องจากเอนไซม์ GLOD นั้นอาศัยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor, รูปที่ 1) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มี GLOD จึงน่าจะอยู่บริเวณที่ลึกจากผิวดินหรือผิวน้ำไม่มากนัก

ในการศึกษานี้ ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดในการแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้ครอบคลุมจุลินทรีย์หลายชนิด และเพิ่มโอกาสในการได้จุลินทรีย์เป้าหมายตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ให้มากที่สุด

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ NA และ PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ chloramphenicol เพื่อแยกแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์จำพวก actinomyces (actinomyces isolation agar) ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะ cyclohexamide และ humic acid-vitamin agar ร่วมด้วย ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 199 strains เชื้อรา 64 strains และ actinomycetes 110 strains และทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่น่าจะสามารถสร้างเอนไซม์ GLOD โดยอาศัยวิธี H_2O_2 -dependent peroxidase catalyzed chromogenic reaction ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้โคโลนีที่ผลิตเอนไซม์ GLOD เป็นสีแดงบนกระดาษกรองที่ชุบน้ำยาทดสอบ (รายละเอียดระบุในข้อ 3.2 ของระเบียบวิธีการวิจัย)

ผลการทดสอบทำให้ได้เชื้อ actinomycetes 2 strains ได้แก่ actinomycetes 18G และ A10M-18-1 ซึ่งแยกได้จากอำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดข้างต้นไปเพาะเลี้ยงต่อใน precultivation medium ซึ่งดัดแปลงสูตรอาหาร โดยใช้รำข้าวสาลี (wheat bran) แทนกากถั่วเหลือง (soy bean meal) โดยบ่มที่อุณหภูมิ $30^{\circ}C$ เป็นเวลา 3 วัน พบว่า 18G ให้ค่ากิจกรรมของ GLOD เท่ากับ 0.33 units/mg protein ในขณะที่ A10M-18-1 ให้ค่ากิจกรรมของ GLOD เพียง 0.11 units/mg protein นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์ GLOD ของ A10M-18-1 ไม่เสถียร กล่าวคือเมื่อทำการ subculture

ต่อไปอีก 1 ครั้ง ทำให้ค่ากิจกรรมของ GLOD ลดลงประมาณ 10 เท่า ด้วยเหตุนี้จึงเลือกใช้ actinomycetes 18G เพื่อผลิตเอนไซม์ GLOD ตลอดการศึกษาค้างนี้

2. การศึกษารูปร่างลักษณะของ actinomycetes 18G

Williams และคณะรายงานในปี 1983 และ 1989 ว่า สามารถจำแนกเชื้อ actinomycetes เบื้องต้นได้โดยสังเกตรูปร่างลักษณะของโคโลนีและโครงสร้างและลักษณะของสปอร์ จากการสังเกตสีของเส้นใยและสปอร์ของ actinomycetes 18G ซึ่งเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ inorganic salt starch agar ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7-14 วัน พบว่าโคโลนีมีลักษณะหยาบคล้ายหนัง (leathery) และพัฒนาเป็นลักษณะคล้ายกำมะหยี่ (velvet) รวมทั้งมีลักษณะเป็นผงหลังจากที่สร้างสปอร์แล้ว เส้นใยที่พบเป็นสีน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 2) ส่วนสปอร์มีสีเทา (รูปที่ 3) เมื่อศึกษาโครงสร้างของสปอร์และลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ slide culture technique พบว่าลักษณะเส้นใยและสปอร์มีทั้งที่เป็นเส้นตรงยาวและบิดเป็นเกลียว (spiral) ลักษณะดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่า actinomycetes ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ GLOD นี้เป็น *Streptomyces* sp.

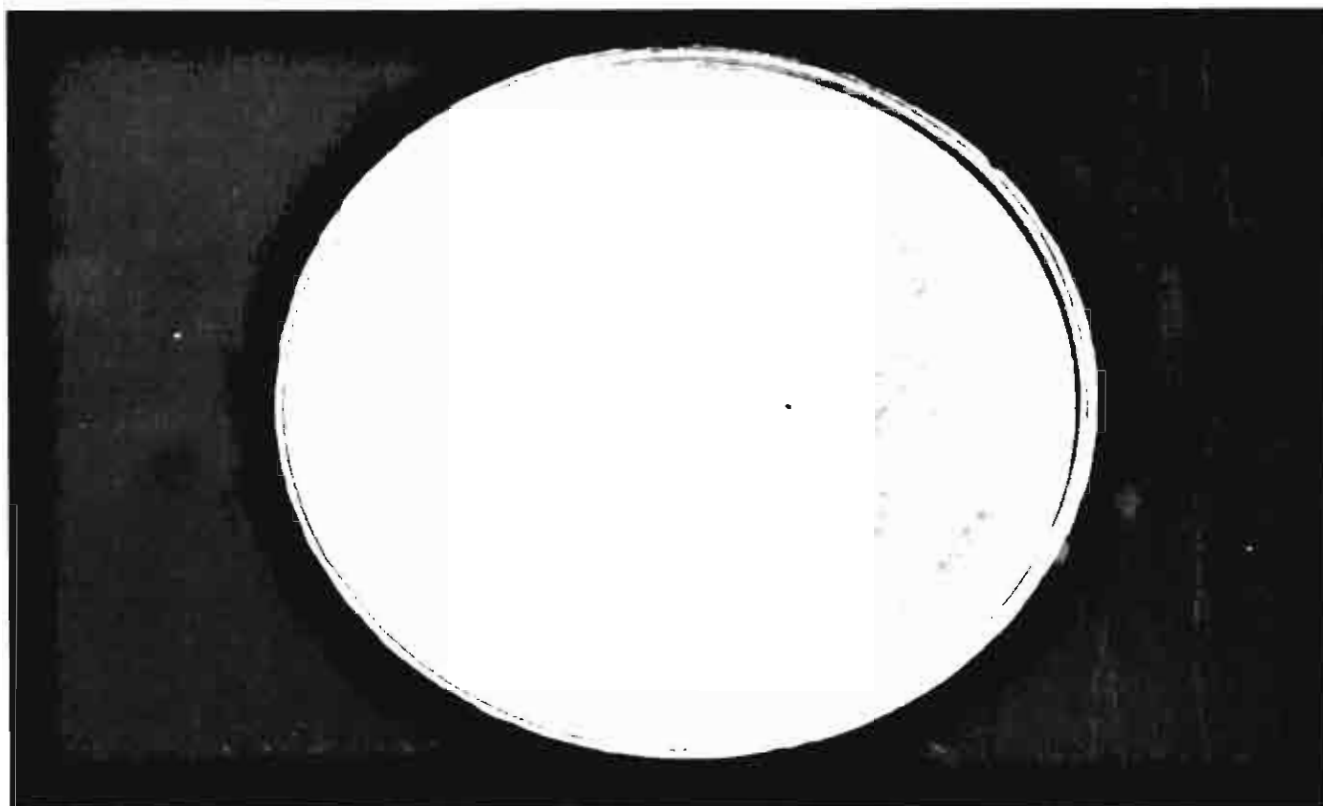
มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกมาจากดิน สามารถสร้างเอนไซม์ GLOD ได้ (Kusakabe *et al.*, 1983; Ye *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Dodzin *et al.*, 1998; Sukhacheva and Netrusov, 2000A; Chen *et al.*, 2001) ดังแสดงในตารางที่ 1

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ GLOD

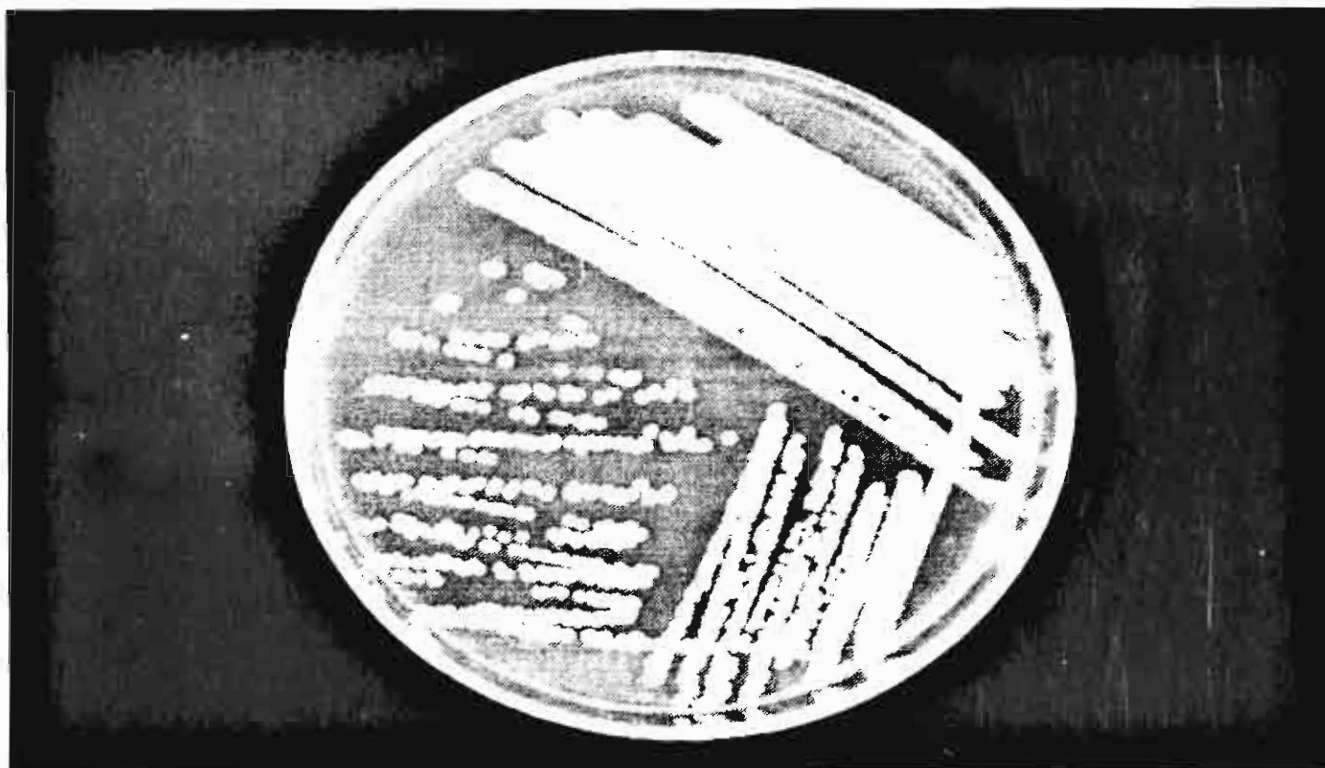
ภายหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้ precultivation medium (Böhmer *et al.*, 1989; ภาคผนวก ก.4), precultivation medium ซึ่งใช้รำข้าวสาลีแทนกากถั่วเหลือง (ภาคผนวก ก.5), screening and production medium (ภาคผนวก ก.6 และ ก.7), *Norcardia histidans* medium (ภาคผนวก ก.8), Streptomycete medium (ภาคผนวก ก.9), Czapek Dox medium (ภาคผนวก ก.10), Czapek medium with peptone (ภาคผนวก ก.11) และ Czapek Dox medium ซึ่งมี 3% glucose (ภาคผนวก.12) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน และเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm แล้วทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ของเชื้อที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด พบว่าการใช้ wheat bran precultivation medium ช่วยให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้สูงสุด คือ 13.79 mU/ml ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 สรุปรายงานการวิจัยโดยคณะนักวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ที่พบว่า *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จาก
ตัวอย่างดิน สามารถสร้างเอนไซม์ GLOD

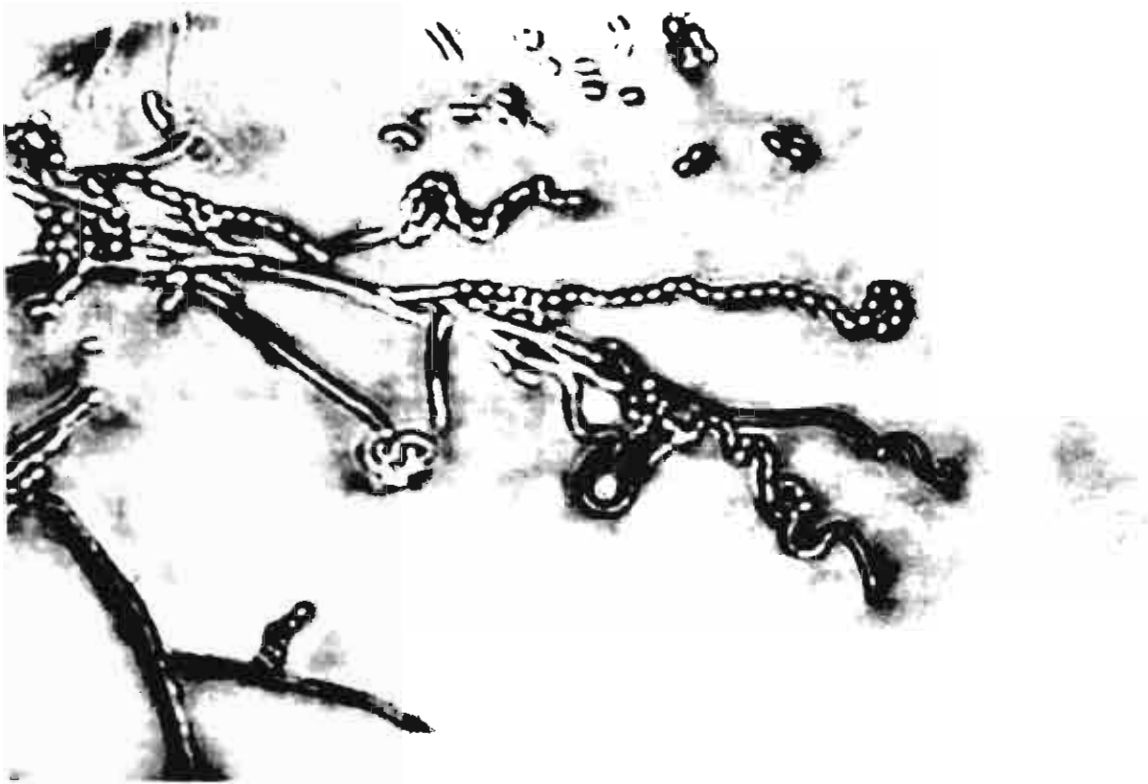
Microorganism	Source	Reference
<i>Azotobacter vinelandii</i>		Jurtshuk and Mcmanus, 1974
<i>Streptomyces violascens</i>		Kamei <i>et al.</i> , 1983
<i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	Soil	Kusakabe <i>et al.</i> , 1983
<i>Streptomyces endus</i>	Culture Collection	Böhmer <i>et al.</i> , 1989
<i>Streptomyces</i> sp. P-106	Soil	Ye <i>et al.</i> , 1995
<i>Streptomyces cremeus</i> 510 <i>Streptomyces litmocidini</i> 447	Soil	Dodzin <i>et al.</i> 1998
<i>Streptomyces</i> sp. N1	Soil	Li <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces noursei</i> SC 6003		Patel <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces</i> sp. Z-11-6	Soil	Sukhacheva and Netrusov, 2000A
<i>Streptomyces platensis</i> NTU3304	Soil	Chen <i>et al.</i> , 2001



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces* sp. 18G ซึ่งเจริญเติบโตใน inorganic salt starch agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces* sp. 18G ซึ่งเจริญเติบโตใน inorganic salt starch agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 4 โครงสร้างและการเรียงตัวของเส้นใยและสปอร์ของ *Streptomyces* sp. 18G ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ตารางที่ 2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ที่วัดได้จาก *Streptomyces* sp. 18G ซึ่งเจริญเติบโตใน

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน และเขย่าด้วย

ความเร็ว 200 rpm

Media	GLOD activity (mU/ml)
Precultivation medium (wheat bran)	13.79
Precultivation medium (soy bean meal)	UD ¹
Fermenter medium	UD ¹
Screening medium	UD ¹
Production medium	UD ¹
Nocardia histidans medium	UD ¹
Streptomycete medium	UD ¹
Czapek Dox medium	UD ¹
Czapek medium with peptone	UD ¹
Czapek Dox medium with 3%glucose	UD ¹

หมายเหตุ UD หมายถึง ไม่สามารถวัดได้ (undetectable) หรือค่า OD₅₀₀ น้อยกว่า 0.1

ในอาหาร precultivation medium ดังกล่าว ประกอบด้วย ข้าวสาลี, น้ำตาลกลูโคส, แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จึงได้ทดลองเปลี่ยนแปลงสัดส่วนขององค์ประกอบเหล่านี้ รวมทั้งทดลองเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ด้วย เพื่อศึกษาผลกระทบที่มีต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ ทั้งนี้ ได้ทำการทดลองใช้ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.0, 0.5, 1.0 และ 1.5 % และใช้ CaCO_3 , ข้าวสาลี, NaCl และ MSG ในปริมาณเท่ากับ 1.0, 1.5, 1.5 and 0.17 % ตามลำดับ พบว่าในช่วงปริมาณของน้ำตาลกลูโคสดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อการสร้างเอนไซม์ ในการทดลองต่อไปจึงไม่เติมน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อทดลองเปลี่ยนแปลงสัดส่วนขององค์ประกอบอื่น ๆ อีก ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วยให้ *Streptomyces* sp. 18G สร้างเอนไซม์ GLOD ได้มากที่สุดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ข้าวสาลี 2.0 %, โซเดียมคลอไรด์ 0.5% และ MSG 0.5% จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างเอนไซม์ GLOD ต่อไป และเรียกอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ว่า wheat bran medium

การใช้ข้าวสาลีเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีข้อดีคือ มีราคาถูก ซึ่งหมายถึงต้นทุนการผลิตเอนไซม์ต่ำ และข้าวสาลีมีผลสนับสนุนการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ (Kusakabe *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1996) Felter และ Lloyd ได้รายงานผลการวิเคราะห์ข้าวสาลีในปี 1898 พบว่า ประกอบด้วย ความชื้น 15.66%, สารประกอบไนโตรเจน 14.61%, ไขมัน 3.9%, แป้ง 53.6%, เส้นใย 6.7% และเถ้า 4.94%

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเติม CaCO_3 ไม่ได้ช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ GLOD ซึ่งขัดแย้งกับรายงานก่อนหน้านี้ (Böhmer *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1999; Sukhacheva and Netrusov, 2000B) อาจเป็นไปได้ที่ในการศึกษานี้ใช้สารประกอบ CaCO_3 ซึ่งทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดมากเกินไป จนไม่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นจึงควรลองเปลี่ยนไปใช้สารประกอบชนิดอื่นที่ให้ Ca^{2+} และไม่มีผลต่อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมากนัก เช่น CaCl_2 เป็นต้น

นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลกระทบของ L-glutamate ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างเอนไซม์ GLOD ด้วย พบว่า 0.5% L-glutamate สามารถส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ได้ ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Vinogradova และคณะ (2002) ที่ระบุว่า L-glutamate ไม่มีผลต่อการเอนไซม์ GLOD ของ *Streptomyces cremeus* 510 MGU อย่างไรก็ตาม การเติม L-glutamate ในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจไม่เหมาะสมนักในทางปฏิบัติ เนื่องจากหากขยายกำลังผลิตแล้ว จะทำให้ต้นทุนสูงขึ้น จึงควรทดลองหาแหล่งวัตถุดิบอื่นที่มีปริมาณ L-glutamate สูง ๆ และมีราคาถูก สำหรับเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเติม 0.5% โซเดียมคลอไรด์ใน wheat bran medium ช่วยส่งเสริมการสร้างเอนไซม์

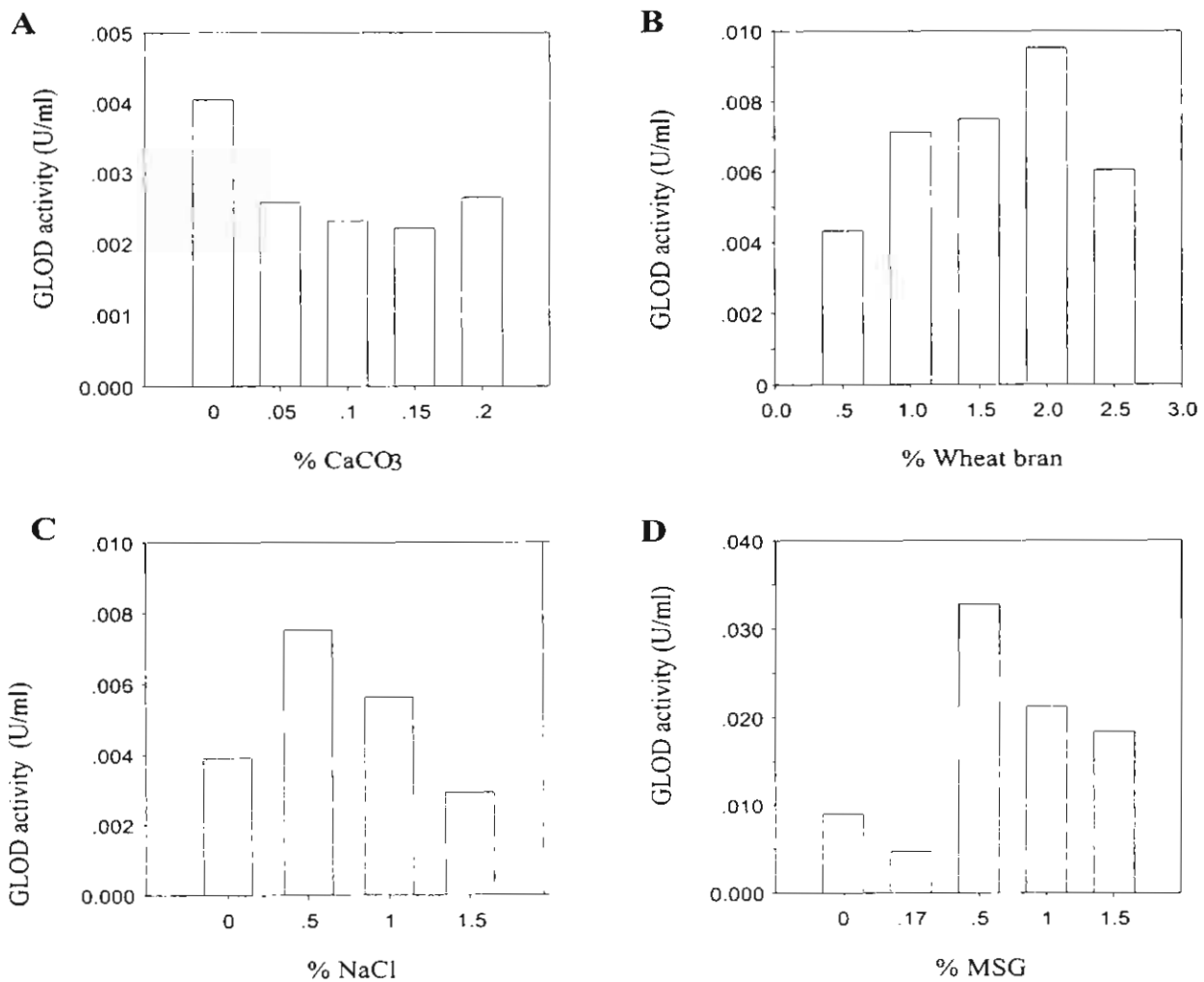
GLOD ของ *Streptomyces* sp 18G ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Böhmer และคณะในปี 1989 ซึ่งเติม โซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบใน fermenter medium สำหรับเลี้ยง *S. endus*

ได้ทำการศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่เชื้อ *Streptomyces* sp. 18G ผลิตเอนไซม์ GLOD ได้สูงสุด เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเชื้อมาสกัดเอนไซม์ โดยทำการเลี้ยงใน ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน และเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm แล้วทำการตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G ซึ่งเจริญเติบโตใน wheat bran medium สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อใช้เวลา 60 ชั่วโมง (รูปที่ 6) โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.147 U/mg protein เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปครบ 72 ชั่วโมง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงไปประมาณ 50%

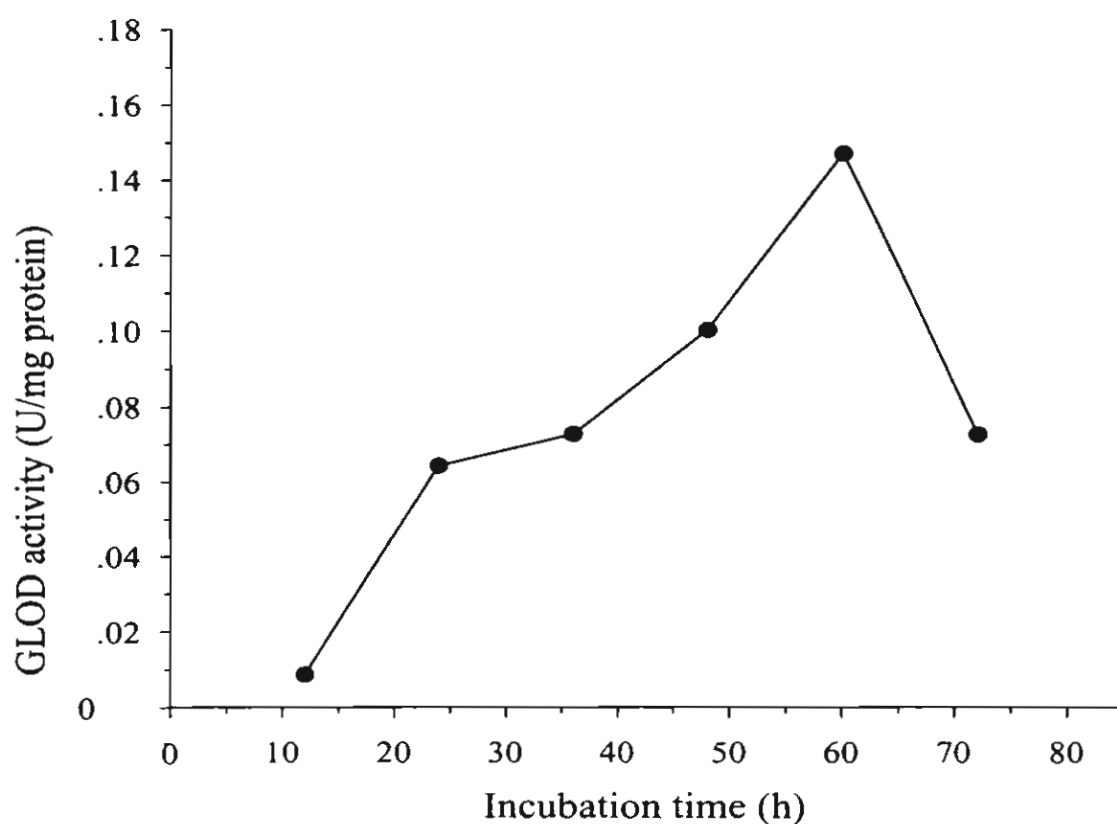
ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G เพื่อผลิตเอนไซม์ GLOD คือ เลี้ยงใน wheat bran medium ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm

Streptomyces sp. 18G ที่เจริญเติบโตใน wheat bran medium สามารถสร้างเอนไซม์ GLOD โดยมี specific activity เท่ากับ 0.15 U/mg รายงานก่อนหน้านี้สามารถเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ชนิดต่าง ๆ ให้สามารถสร้างเอนไซม์ GLOD ที่มี specific activity เท่ากับ 0.0024-0.56 U/mg (Kusakabe *et al.*, 1983 , Böhmer *et al.*, 1989)

การเลี้ยง *Streptomyces* sp.18G ใน wheat bran medium ที่อุณหภูมิ 30°C โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เพื่อให้ออกซิเจนอย่างพอเพียง อันจะช่วยให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (Williams *et al.*, 1989) การที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อได้ 60 ชั่วโมงนั้น สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Böhmer *et al.*, 1989, Li *et al.*, 1999 , Sukhacheva and Netrusov, 2000B) อย่างไรก็ตาม Kamei และคณะ (1983) พบว่า *Streptomyces violascens* สามารถสร้างเอนไซม์ GLOD ได้สูงสุดเมื่อเจริญเติบโตเป็นเวลา 120 ชั่วโมง อนึ่ง Sukhacheva and Netrusov (2000B) พบว่าสามารถลดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เอนไซม์ GLOD สูงสุดได้ โดยการเติม calcium ion ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 5 การศึกษาสัดส่วนขององค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ wheat bran medium ต่อการสร้างเอนไซม์ GLOD ของ *Streptomyces* sp. 18-G โดยทำการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของรำข้าวสาลี CaCO_3 , NaCl และ MSG ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน และเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นนำเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude extract) ไปวัดหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 6 ของระเบียบวิธีการวิจัย



รูปที่ 6 กราฟแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ของเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G ซึ่งเลี้ยงใน wheat bran medium ที่อุณหภูมิ 30°C โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ทุก ๆ 12 ชั่วโมงตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 6 ของระเบียบวิธีการวิจัย

4. การแยกเอนไซม์ GLOD ให้บริสุทธิ์

4.1 การทำเอนไซม์ให้เข้มข้น

เนื่องจาก cell free supernatant ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G มีปริมาณโปรตีนต่ำมาก จึงจำเป็นต้องทำให้เข้มข้นมากขึ้น ในการศึกษาใช้วิธีตกตะกอนด้วย ammonium sulfate (Travor, 1995) โดยทำการทดลองตกตะกอนโปรตีนด้วยความเข้มข้นของ ammonium sulfate แตกต่างกัน คือ 0-20, 0-40, 0-60 และ 0-80% saturations แล้วจึงละลายตะกอนโปรตีนด้วย 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปทดสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD

พบว่าสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 0-20 % และ 0-40 % saturations มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD เท่ากับ 0.003 U หรือคิดเป็น 0.44% ของค่ากิจกรรมที่ตรวจวัดได้ใน cell free supernatant (รูปที่ 7) และพบว่าความเข้มข้นของ ammonium sulfate ดังกล่าวทำให้โปรตีนตกตะกอนเพียงเล็กน้อย

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ammonium sulfate เป็น 60 และ 80% saturations แล้ว พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้ เพิ่มขึ้นเป็น 6.78 และ 70.10 U ของค่ากิจกรรมที่ตรวจวัดได้ใน cell free supernatant ตามลำดับ นอกจากนี้สารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 0-80 % ammonium sulfate saturation พบว่ามีค่า specific activity เท่ากับ 0.55 U/mg ซึ่งสูงกว่าค่า specific activity ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 0-60 % ammonium sulfate saturation (0.08 U/mg)

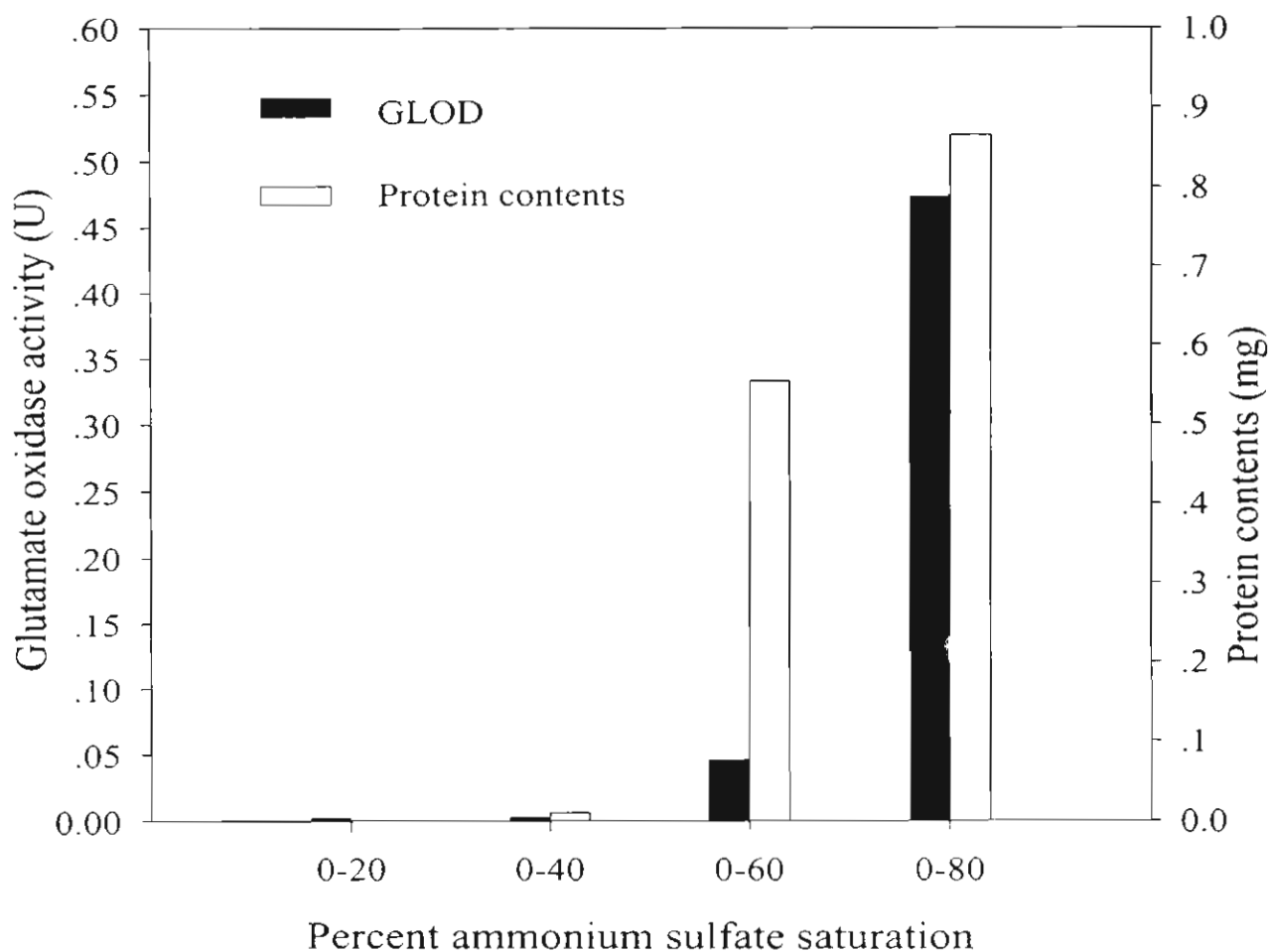
ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้การทำให้เอนไซม์ GLOD เข้มข้น โดยตกตะกอนด้วย 0-80 % ammonium sulfate saturation

อนึ่ง ในการทดลองนี้ ได้เตรียม cell free supernatant ปริมาตร 6.5 ลิตร จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp.18-G ใน wheat bran medium ในสภาวะที่เหมาะสม แล้วตกตะกอนด้วย 0-80 % ammonium sulfate saturation ทำให้ได้ crude extract ที่มีโปรตีนเข้มข้นขึ้น 93% และมี % recovery ของเอนไซม์ GLOD เท่ากับ 81.53%

การตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate จัดเป็นวิธี salting-out ซึ่งขึ้นกับสภาพ hydrophobic บนผิวหน้าของโมเลกุลของเอนไซม์ (Harris *et al.*, 1994) แม้ hydrophobic group ส่วนใหญ่จะอยู่ภายในโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนก็ตาม แต่ก็มีส่วนที่อยู่บริเวณผิวหน้า แม้จะมีตำแหน่ง

การจัดกระจายเป็นกลุ่ม ๆ ก็ตาม ซึ่งเมื่อมีการเติมเกลือลงในสารละลายโปรตีนจนมีความเข้มข้นสูงถึงระดับหนึ่ง น้ำจะถูกใช้ไปเพื่อละลายเกลือและมีการดึงน้ำออกจากบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของโปรตีน ทำให้ส่วนที่มีสภาพเป็น hydrophobic มีอิสระและมีโอกาสใกล้ชิดกันมากขึ้น จนทำให้โปรตีนแต่ละโมเลกุลสามารถเกาะกลุ่มกันและมีขนาดใหญ่ขึ้น จนเกิดเป็นตะกอนแยกออกจากส่วนที่เป็นสารละลาย โดยโปรตีนที่มีกลุ่ม hydrophobic ขนาดใหญ่กว่าจะเกาะกลุ่มและตกตะกอนก่อน จากนั้นโปรตีนที่มีกลุ่ม hydrophobic ขนาดเล็กจึงตกตะกอนตามมา เราจึงสามารถอาศัยการตกตะกอนโปรตีนโดย ammonium sulfate เพื่อแยกโปรตีนหลาย ๆ ชนิดออกจากกันได้

รายงานก่อนหน้านี้นี้ได้ใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของขั้นตอนในการทำเอนไซม์ GLOD ทั้งจาก *S. violascens* (Kamei *et al.*, 1983), *Streptomyces* sp. X-119-6 (Kusakabe *et al.*, 1983) และ *S. endus* (Böhmer *et al.*, 1989) ให้บริสุทธิ์ โดยเอนไซม์ GLOD ที่ได้จาก *Streptomyces* sp. 18G ในการทดลองนี้ตกตะกอนที่ความเข้มข้น 80% ammonium sulfate ในขณะที่เอนไซม์ GLOD จาก *S. violascens* และ *Streptomyces* sp.X-119-6 ในรายงานข้างต้นตกตะกอนได้ที่ความเข้มข้น 40% และ 45% ตามลำดับ ส่วน GLOD จาก *S. endus* ตกตะกอนที่ 80 % อธิบายได้ว่าสภาพความเป็น hydrophobic ของ GLOD ที่ได้จาก *Streptomyces* sp. 18G และ *S. endus* มีความคล้ายคลึงกัน



รูปที่ 7 กราฟแสดงปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ในสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนจาก cell free extract ด้วย ammonium sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเตรียม cell free extrat จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G ใน wheat bran medium ในสภาวะที่เหมาะสม และทำการตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD และความเข้มข้นของโปรตีนตามที่ระบุในหัวข้อ 6 ของระเบียบวิธีการวิจัย และหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford ตามที่ระบุในหัวข้อ 7 ของระเบียบวิธีการวิจัย

4.2 Cation-exchange chromatography

หลังจากทำ cell free extract ให้เข้มข้นด้วยการตกตะกอนโดยใช้ 0-80% ammonium sulfate saturation และได้ crude extract แล้ว ได้นำ crude extract ไปทำให้เอนไซม์ GLOD บริสุทธิ์มากขึ้น โดยเลือกใช้วิธี cation-exchange chromatography ซึ่งใช้ SP-Sepharose Fast Flow ในการศึกษาครั้งนี้

ได้ทดลองเลือกใช้บัฟเฟอร์ 2 ชนิดคือ 20 mM acetate buffer pH 5.5 และ 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 พบว่าเอนไซม์ GLOD สามารถจับกับ cation-exchanger ได้ที่ pH ทั้ง 2 ค่า อย่างไรก็ตามได้เลือกใช้ 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 เนื่องจากเอนไซม์มีความเสถียรมากกว่าในบัฟเฟอร์ดังกล่าว

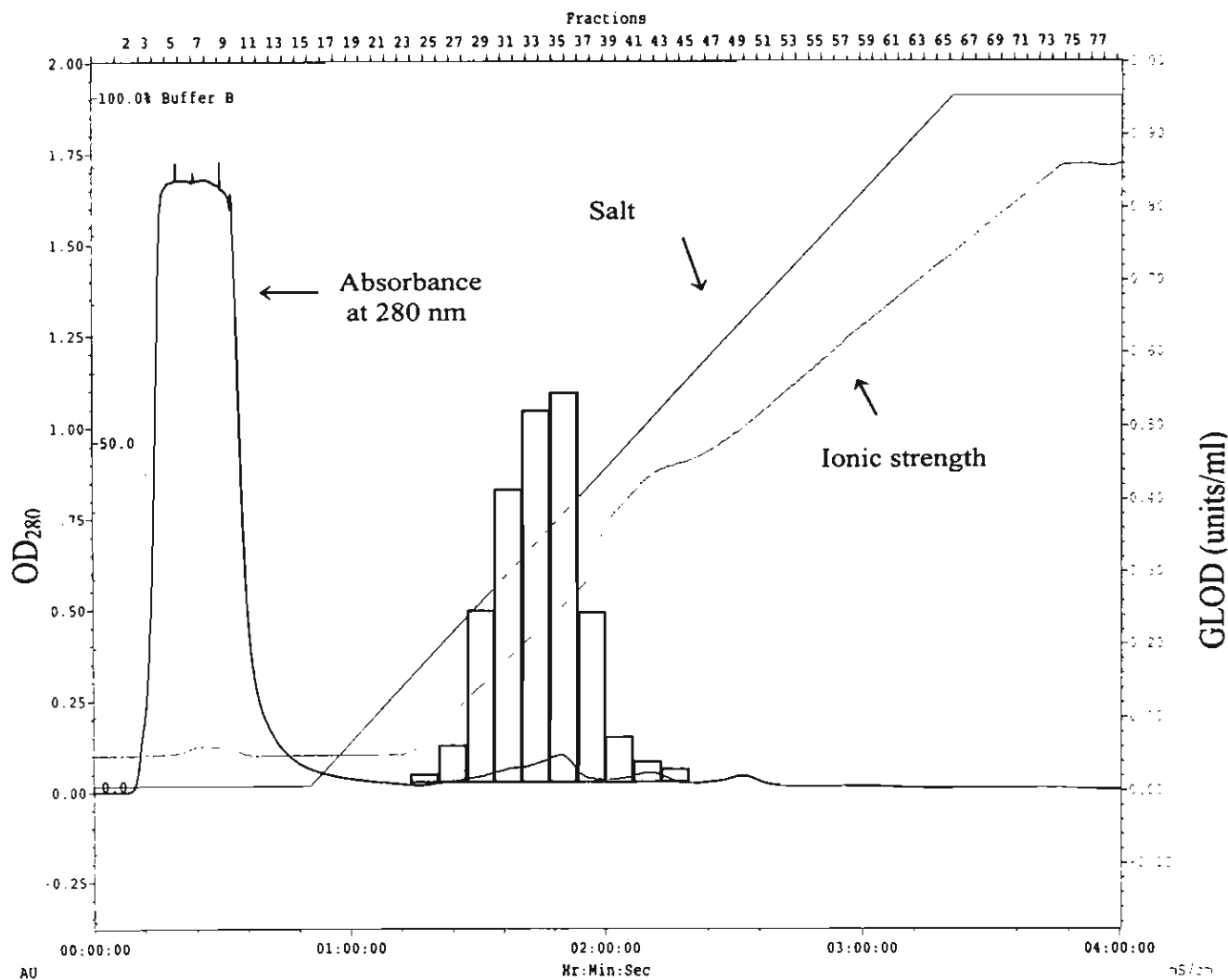
ภายหลังจากทำการล้าง unbound proteins ด้วย potassium phosphate buffer ปริมาตร 40 ml แล้ว จึง elute ด้วย linear salt gradient ของ 0–0.3 M sodium chloride ใน potassium phosphate buffer ที่อัตราเร็ว 1.0 ml/min พบว่าเอนไซม์ GLOD ถูกชะออกมาที่ประมาณ 0.03 M sodium chloride (รูปที่ 8) จากกราฟแสดงให้เห็นว่าการทำ cation-exchange chromatography สามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนออกไปได้เป็นจำนวนมาก ประสิทธิภาพของขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 3

การทำ SP-Sepharose Fast Flow column chromatography ทำให้ได้ % recovery ของเอนไซม์ GLOD เท่ากับ 47% เมื่อเทียบกับขั้นตอนการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate และสามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้ประมาณ 97%

แม้ในบางกรณีอาจใช้วิธี hydrophobic interaction chromatography (HIC) เป็นขั้นตอน หลังจากการตกตะกอนโปรตีนก็ตาม เนื่องจาก non-polar amino acids เช่น alanine, methionine, tryptophan หรือ phenylalanine มี side chain ที่มีกลุ่ม hydrophobic อยู่ (Roe, 1994) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า HIC ไม่สามารถแยกเอนไซม์ GLOD ออกจากโปรตีนอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งอาจเป็นเพราะเอนไซม์ดังกล่าวและโปรตีนอื่น ๆ มีสภาพ hydrophobicity ใกล้เคียงกัน ซึ่งต่างจากรายงานของ Patel และคณะ (2000) ที่สามารถแยกเอนไซม์ GLOD จาก *Streptomyces noursei* SC 6003 ด้วยวิธี HIC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการทดลองนี้จึงใช้วิธี cation exchange chromatography โดยใช้ SP-Sepharose FF column ซึ่งพบว่า 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 ช่วยให้โปรตีนอื่น ๆ ถูกแยกออก

จากเอนไซม์ GLOD เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจาก functional group ของ SP-Sepharose คือ sulfopropyl group ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$) ซึ่งสามารถจับกับหมู่ที่มีประจุบวกบน side chain ของ acidic และ basic amino acids บนโปรตีนได้ (Roe, 1994) กรดอะมิโนที่มีประจุบวกมักได้แก่ histidine, lysine, arginine และรวมถึง N-terminal amines ด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ประจุบวกบนผิวหน้าของเอนไซม์ GLOD จาก *Streptomyces sp.* 18G ที่ pH 6.0 มีความแตกต่างจากโปรตีนอื่น ๆ มากเพียงพอ จึงสามารถจับกับ sulfopropyl group ของ SP-Sepharose ได้ ซึ่งถูก elute ออกมาภายหลังจากที่ได้ชะล้าง unbound proteins อื่น ๆ ออกไปก่อนแล้ว การทดลองนี้ได้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Böhmer และคณะ (1989) ที่พบว่า cation-exchange chromatography สามารถใช้แยกเอนไซม์ GLOD จาก *S. endus* ออกจากโปรตีนอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 8 กราฟแสดง protein elution pattern และ sodium chloride gradient จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอน SP-Sepharose Fast Flow column chromatography โดยใช้ linear salt gradient ของ 0–0.3 M sodium chloride ใน potassium phosphate buffer ที่อัตราเร็ว 1.0 ml/min กราฟแท่งแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ที่พบในสารละลายโปรตีนแต่ละ fraction ที่เก็บได้ (Scale of Absorbance at 280 nm : 0–0.1 AU)

ตารางที่ 3 สรุปผลการทำเอนไซม์ GLOD จากเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G ให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่าง ๆ

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (fold)
1. Culture	6,500	1,203	185.25	0.15	100	-
2. Ammonium sulfate	70	376.6	151.03	0.4	81.53	2.61
3. SP-SepharoseFF	6	10.7	70.23	6.56	37.91	42.65
4. Q -SepharoseFF	0.75	0.72	33.43	46.48	18.05	302.01
5. Gel filtration	11.25	0.2	30.85	152.36	16.65	989.99

4.3 Anion-exchange chromatography

เมื่อนำ active fractions ที่ได้จากการทำ SP-Sepharose Fast Flow chromatography ไปทำ SDS-PAGE แล้วทำการย้อมโปรตีนด้วยเทคนิค silver staining พบว่ายังมีโปรตีนอื่น ๆ ปนเปื้อนอีกมาก (รูปที่ 11 แถวที่ 3) ดังนั้นจึงต้องทำให้เอนไซม์ GLOD บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น โดยเลือกใช้เทคนิค anion-exchange chromatography ซึ่งใช้ Q-Sepharose Fast Flow บรรจุใน XK16/20 column ที่มี bed volume เท่ากับ 30 ml

พบว่าภายหลังจากทำการล้างคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 และ elute ด้วย linear salt gradient ของ 0.0–1.0 M sodium chloride แล้ว พบเอนไซม์ GLOD ใน unbound fractions และสามารถ elute เอาโปรตีนอื่น ๆ ออกจากคอลัมน์เพื่อเตรียมสำหรับใช้ต่อไปได้ (รูปที่ 10)

ตารางที่ 3 แสดงว่า การทำ Q-Sepharose FF column chromatography สามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้ประมาณ 93% จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ และค่ากิจกรรม ของเอนไซม์ GLOD ยังคงเหลืออยู่ประมาณ 50% จึงนับว่าขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนอื่น ๆ ออกไปได้เพิ่มขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ

Q-Sepharose จัดเป็น strong anion exchanger ซึ่งมี quaternary ammonium ($-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$) ที่สามารถจับกับโปรตีนที่มีประจุลบบนผิวหน้า (Roe, 1994) กรดอะมิโนที่ทำให้ผิวหน้าของโปรตีนมีประจุลบที่ pH 8.0 ได้แก่ aspartic and glutamic acids, C-terminal carboxyl groups รวมทั้ง cysteine จากผลการทดลองที่พบว่าโปรตีนอื่น ๆ สามารถจับกับ Q-Sepharose ในขณะที่เอนไซม์ GLOD จาก *Streptomyces* sp. 18G ถูกชะออกมา ก่อนนั้น คาดว่าน่าจะเป็นเพราะ isoelectric point ของโปรตีนอื่น ๆ มีค่าต่ำกว่า GLOD ด้วยเหตุนี้การใช้ Q-Sepharose สำหรับ anion exchange chromatography จึงช่วยแยกเอนไซม์ GLOD ออกมาได้ภายในเวลา 30 นาที

4.4 Gel filtration chromatography

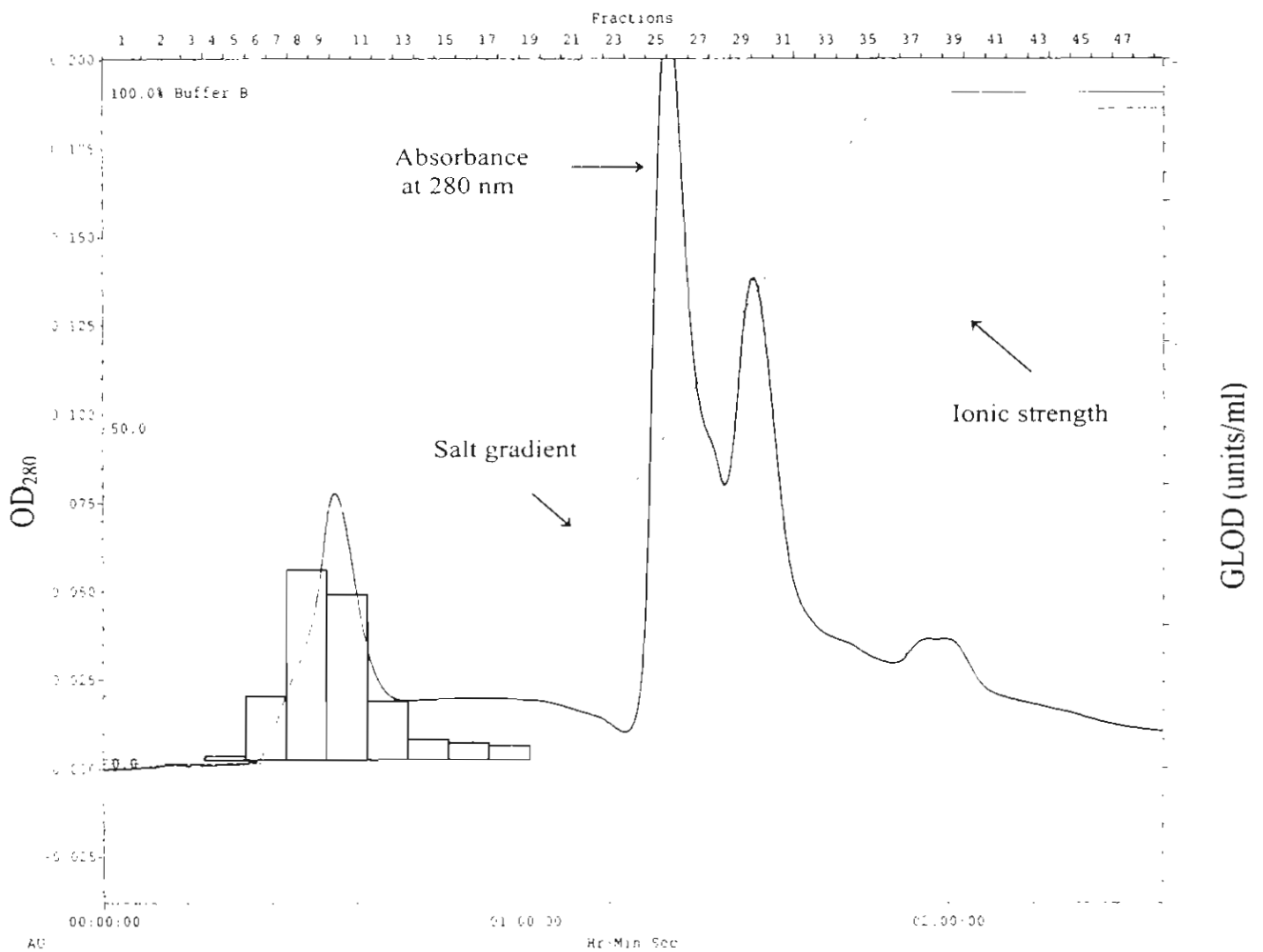
ภายหลังจากการทำ anion-exchange column chromatography และนำผลที่ได้ไปตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ silver staining แล้ว พบว่ายังมีโปรตีนอยู่ 2 bands (รูปที่ 10 แถวที่ 4) จึง

เลือกใช้ high-resolution gel filtration chromatography ในการทำให้เอนไซม์ GLOD บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น โดยเลือกใช้ Superdex 200 HR 10/30

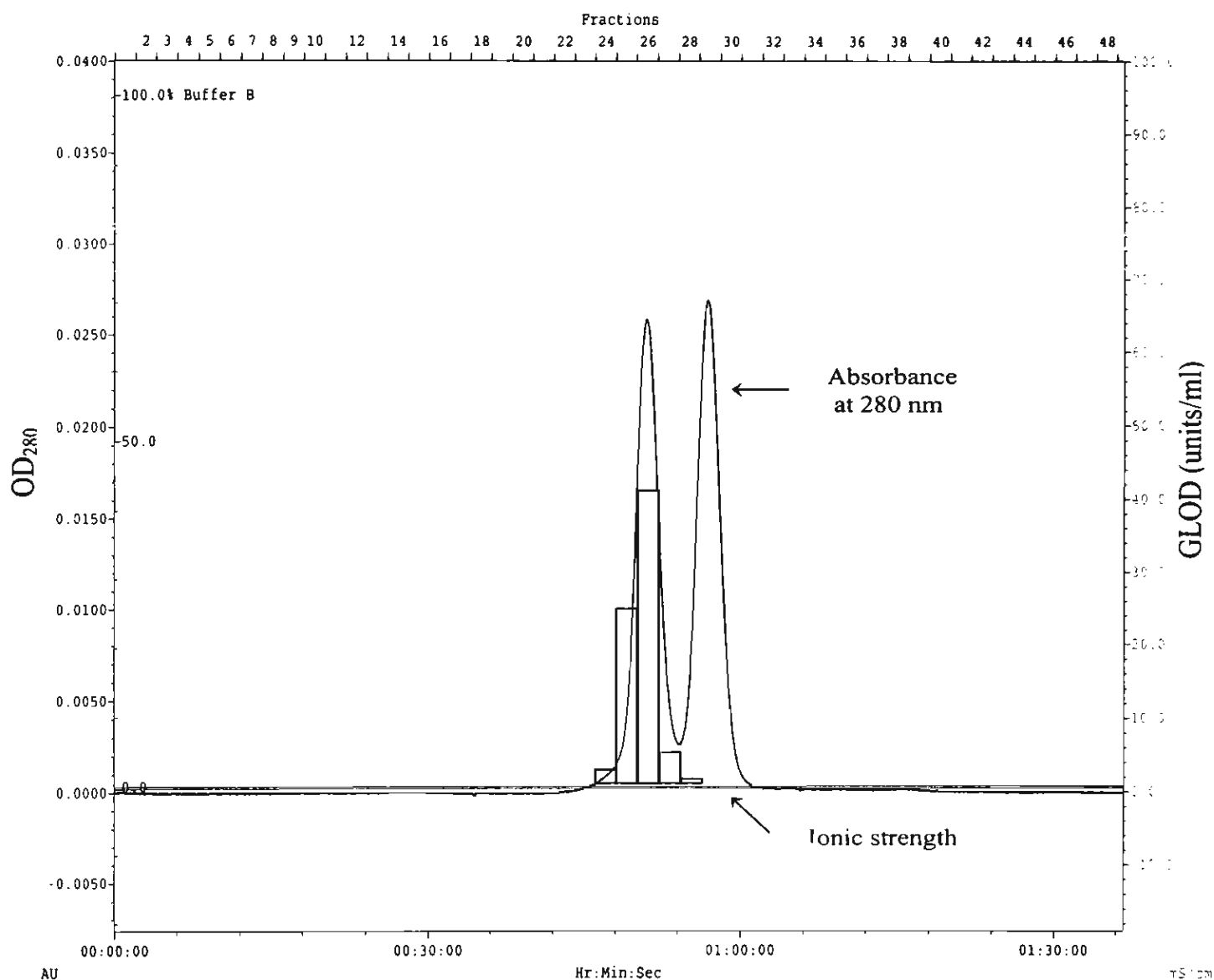
ผลการทำ gel filtration chromatography แสดงในรูปที่ 9 ซึ่งพบค่ากิจกรรมของ GLOD ใน peak แรกของโปรตีน ส่วน peak ถัดไปเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่ปนเปื้อน ซึ่งน่าจะสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากการทำ anion-exchange column chromatography และเมื่อนำผลที่ได้จากการทำ gel filtration chromatography ไปทำ SDS-PAGE และ silver staining แล้ว พบว่าได้โปรตีนเพียง 1 band (รูปที่ 11 แถวที่ 5) จึงน่าจะสรุปได้ว่า ขั้นตอนการทำ gel filtration chromatography นี้ทำให้เอนไซม์ GLOD มีความบริสุทธิ์สูง

ตารางที่ 3 แสดงว่า เมื่อนำเอนไซม์ GLOD ที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. 18G มีผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 989.99 เท่า และมี % recovery เท่ากับ 16.65 %

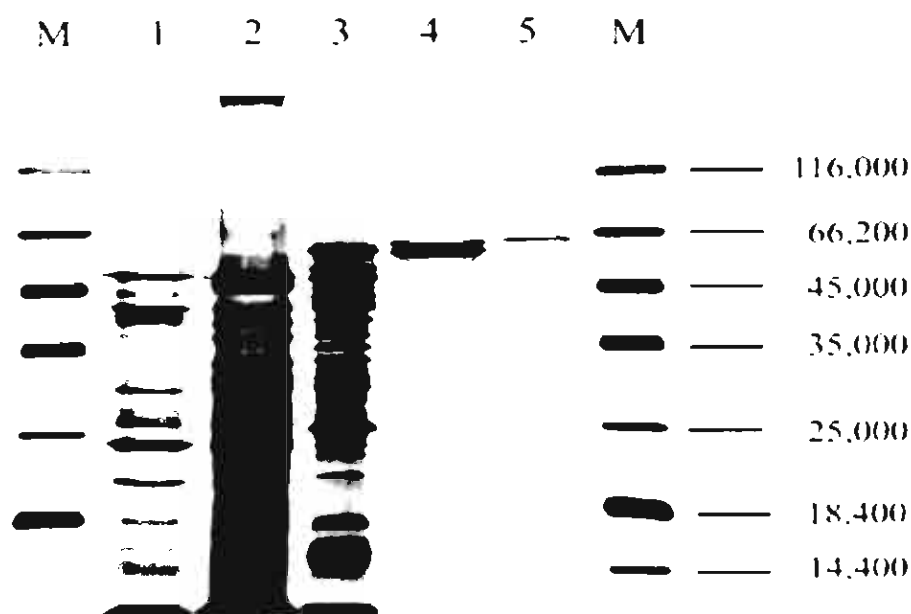
รายงานวิจัยก่อนหน้านี้มักใช้ gel filtration chromatography เป็นขั้นตอนสุดท้ายในการทำเอนไซม์ GLOD ให้บริสุทธิ์ (Kamei *et al.*, 1983; Kusakabe *et al.*, 1983; Böhmer *et al.*, 1989) ในการศึกษาครั้งนี้ก็เช่นเดียวกัน และจาก chromatogram พบว่าวิธีนี้ช่วยให้ได้ peak ของโปรตีนที่มีค่ากิจกรรมของ GLOD เพียง 1 peak และเมื่อพิสูจน์โดยใช้วิธี SDS-PAGE ก็พบโปรตีนเพียง 1 band ซึ่งช่วยยืนยันว่าเอนไซม์ GLOD ที่ผ่านขั้นตอน gel filtration chromatography นี้มีความบริสุทธิ์



รูปที่ 9 กราฟแสดง protein elution pattern และ sodium chloride gradient จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอน Q-Sepharose Fast Flow column chromatography. โดยใช้ linear salt gradient ของ 0–1.0 M sodium chloride ใน 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่อัตราเร็ว 1.0 ml/min กราฟแท่งแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ที่พบในสารละลายโปรตีนแต่ละ fraction ที่เก็บได้ (Scale of Absorbance at 280 nm : 0-0.1 AU)



รูปที่ 10 กราฟแสดง protein elution pattern จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอน Superdex 200 HR 10/30 gel filtration chromatography โดยใช้ 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่อัตราเร็ว 0.5 ml/min กราฟแท่งแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD ที่พบในสารละลายโปรตีนแต่ละ fraction ที่เก็บได้ (Scale of Absorbance at 280 nm : 0-0.1 AU)



รูปที่ 11 แสดงผลการทำ SDS-PAGE และ silver staining เพื่อวิเคราะห์ผลของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ แถวที่ 1: cell free extract, แถวที่ 2: ammonium sulfate precipitation; แถวที่ 3: pooled active fractions จาก SP-Sepharose FF column chromatography; แถวที่ 4: Q-Sepharose FF column chromatography; แถวที่ 5: fraction ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GLOD สูงสุดจากการทำ Superdex 200 HR 10/30 gel filtration chromatography; แถว M: molecular weight protein markers ชนิดต่าง ๆ ตามที่ระบุในหัวข้อ 9.1 ของระเบียบวิธีการศึกษา โดยตัวเลขแสดง molecular weight หน่วยเป็น daltons

5. การศึกษาขนาดและโครงสร้างของเอนไซม์ GLOD

5.1 การศึกษาขนาดของเอนไซม์ GLOD ด้วยวิธี gel filtration chromatography

ได้ศึกษาหา relative molecular weight (M_r) ของเอนไซม์ GLOD ด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยใช้หลักการเดียวกับที่อธิบายในข้อ 8.4 แต่ควบคุมอัตราเร็วของบัฟเฟอร์ที่ 0.25 ml/min รวมทั้งใช้โปรตีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุล ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 9.2 ของระเบียบวิธีการศึกษา จากนั้นนำผลที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่าง molecular weight ของ protein markers และ GLOD กับค่า partition coefficient values (K_{av}) ดังแสดงในรูปที่ 12

จากการหาค่า linear regression จากกราฟ พบว่าเอนไซม์ GLOD มี molecular weight ประมาณ 120,000 daltons

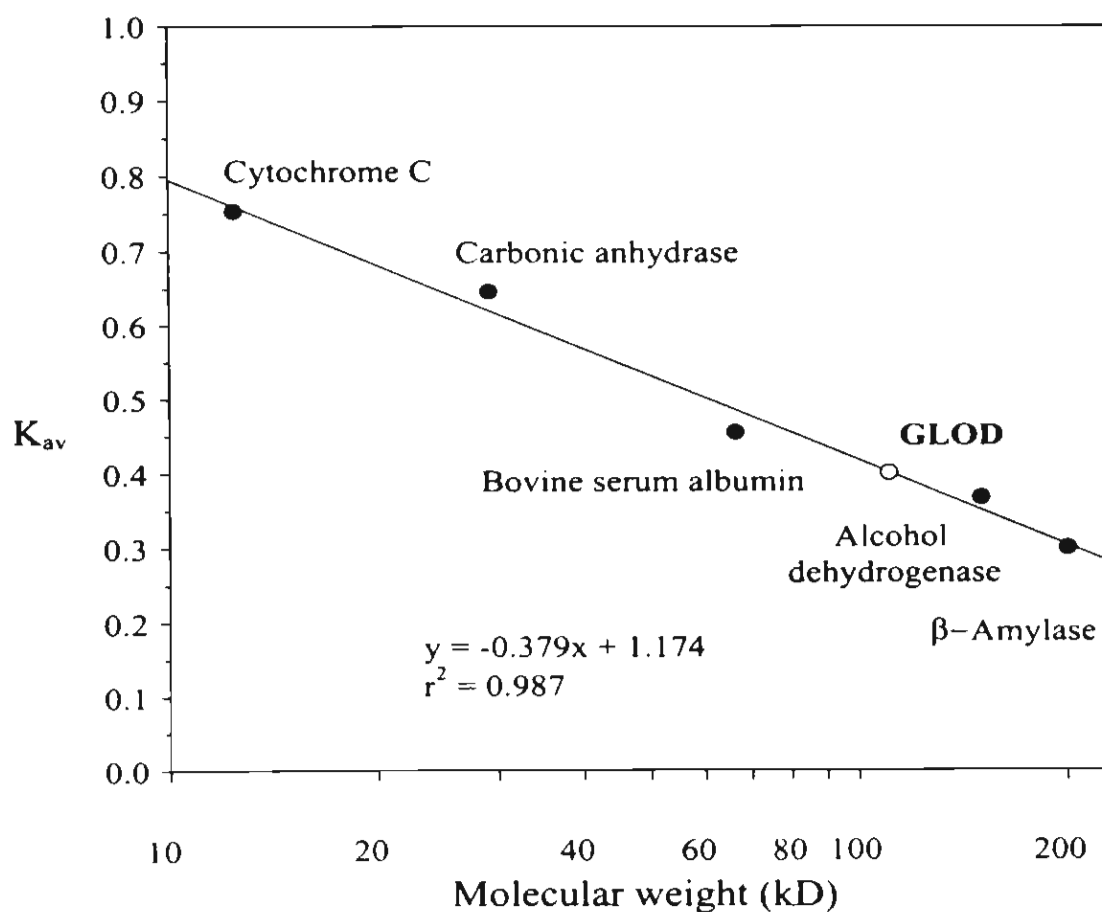
5.2 การศึกษาจำนวนและขนาดของหน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์ GLOD

ได้ทำการศึกษาจำนวนและขนาดของ subunit ของเอนไซม์ GLOD โดยวิธี SDS-PAGE โดยนำเอนไซม์ GLOD ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว รวมทั้ง protein markers มาผ่านสนามไฟฟ้าใน polyacrylamide gel ซึ่งมี separating gel ที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้ 10%, 12% และ 14% และใช้ 4% stacking gel หลังจากนั้นนำ gel ที่ได้ไปทำการย้อมโปรตีนด้วยวิธี silver staining

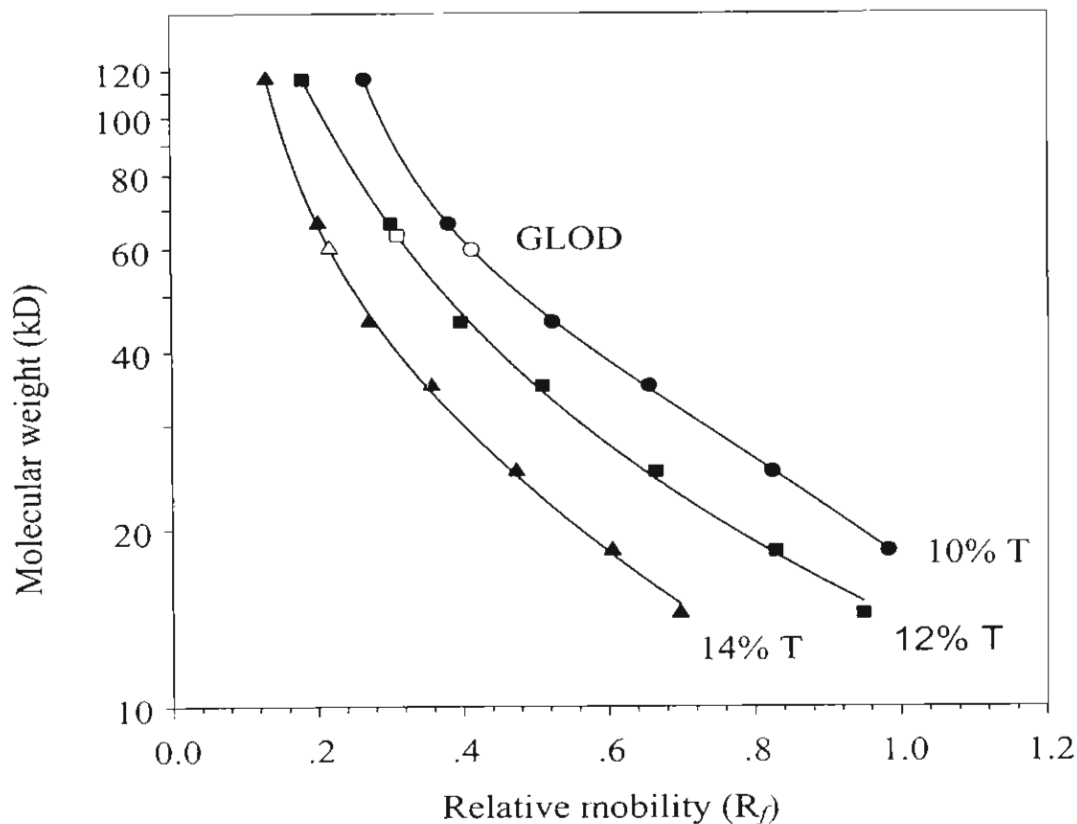
ผลการทดลองพบว่ามีโปรตีนเพียง 1 band จาก gel ทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำผลที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง molecular weight กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ของ GLOD เทียบกับ protein markers พบว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวมีลักษณะเป็น the third order regression (รูปที่ 13) เมื่อทำการคำนวณหา molecular ของ GLOD ใน 10%, 12% และ 14% gel concentrations พบว่ามีค่าเท่ากับ 59,816, 63,252 และ 60,044 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า GLOD ที่สร้างจากเชื้อ *Streptomyces* sp 18G ในการศึกษาวิจัยนี้ ประกอบด้วย 2 subunits ที่มีขนาดเท่ากันกัน โดยแต่ละ subunit มี molecular weight ประมาณ 61,000 daltons เนื่องจากผลการศึกษาขนาดของเอนไซม์ด้วยวิธี gel filtration chromatography พบว่าเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ (native enzyme) มี molecular weight ประมาณ 120,000 daltons

รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้มีความแตกต่างเกี่ยวกับขนาดและจำนวน subunit ของเอนไซม์ GLOD ที่สร้างจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน คือ Böhrer และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ GLOD จาก *S. endus* ประกอบด้วย 2 subunits ที่เหมือนกัน แต่ละ subunit มี molecular weight เท่ากับ 50,000

daltons และ native form ของ GLOD มีขนาด 90,000 daltons ในขณะที่ Patel และคณะ (2000) ก็รายงานว่าเอนไซม์ GLOD จาก *S. noursei* SC 6003 ซึ่งมีขนาด 125,000 daltons ก็มี 2 subunits เช่นเดียวกัน โดยแต่ละ subunit มี molecular weight เท่ากับ 60,000 อย่างไรก็ตาม Kusakabe และคณะรายงานในปี 1983 ว่า เอนไซม์ GLOD จาก *Streptomyces* sp. X-119-6 มีขนาดประมาณ 140,000 daltons ประกอบด้วย 3 subunits คือ , α , β และ γ ซึ่งมีขนาด 44,000, 19,000 และ 9,000 daltons ตามลำดับ และ Chen และคณะ (2001) ก็รายงานว่า GLOD จาก *S. platensis* NTU3304 มีขนาด 78 kD ก็ประกอบด้วย 3 subunits เช่นเดียวกัน แต่มีขนาด 39,000, 19,000 และ 16,000 daltons



รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง molecular weight กับค่า partition coefficient values (K_{av}) ของ protein markers และเอนไซม์ GLOD ซึ่งได้จากการทดลองทำ gel filtration chromatography โดยใช้ Superdex 200 HR 10/30 column และใช้ 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ซึ่งไหลด้วยอัตราเร็ว 0.25 ml/min protein markers ที่ใช้ได้แก่ cytochrome C (12,400), carbonic anhydrase (29,000), bovine serum albumin (66,000), alcohol dehydrogenase (150,000) และ β -amylase (200,000) และใช้ blue dextran (2,000,000) และ vitamin B₁₂ (1,355.4) เป็น marker สำหรับ void volume (V_o) และ total volume (V_t) ตามลำดับ



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง molecular weight กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ของ protein markers และเอนไซม์ GLOD โดยวิธี SDS-PAGE ใน 10%, 12% และ 14% separating gel โดยใช้ 4% stacking gel protein markers ที่ใช้ ได้แก่ lysozyme (14,400), β -lactoglobulin (18,400), restriction endonuclease *Bsp*981 (25,000), lactate dehydrogenase (35,000), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,200) และ β -galactosidase (116,000)

5.3 การศึกษา isoelectric point ของเอนไซม์ GLOD

ได้ทำการศึกษาหา isoelectric point (pI) ของเอนไซม์ GLOD ร่วมกับ pI markers ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี isoelectric focusing (IEF) แล้วทำการย้อมโปรตีนด้วยวิธี silver staining ผลการทำ IEF แสดงในรูปที่ 14 จากนั้นนำผลที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่จากขั้ว anode กับค่า pI ของโปรตีนแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 15

พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่กับค่า pI มีลักษณะเป็นเส้นตรง และค่า pI ของเอนไซม์ GLOD มีค่าเท่ากับ 8.5

รายงานก่อนหน้านี้โดย พบว่าเอนไซม์ GLOD จาก *S. endus* (Böhmer *et al.*, 1989) และ *Streptomyces* sp. X-119-6 (Kusakabe *et al.*, 1983) มี pI เท่ากับ 6.2

จากการศึกษารายงานก่อนหน้านี้ ยังไม่พบเอนไซม์ GLOD ที่มีขนาด 120,000 daltons ประกอบด้วย 2 subunits ที่มีขนาด 61,000 daltons และมี pI เท่ากับ 8.5 ดังนั้นเอนไซม์ GLOD จาก *Streptomyces* sp.18G ที่ได้จากการศึกษานี้ จึงน่าจะเป็นเอนไซม์ GLOD ที่พบใหม่