Thesis Title Production, Purification and Characterization of Myrosinase from *Aspergillus* sp. NR-4201

Author Mr. Prakong Sakorn

Ph. D. Biotechnology

Examining Committee

Asst. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham	Chairman
Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member
Lect. Dr. Pakawan Nongkunsarn	Member
Lect. Dr. Bundit Leelasart	Member
Prof. Dr. Maitree Suttajit	Member
Assoc. Prof. Dr. Kanit Krisnangkura	Member

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ABSTRACT

The capabilities of degrading glucosinolates and producing myrosinase by new fungal isolates, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. and *Aspergillus* sp. were reported. These were carried out by growing the strains in liquid medium using the glucosinolate sinigrin as a substrate. It was shown that the potential of sinigrin degradation by the *Rhizopus* and *Mucor* seemed to be low. In such cases, the degradative process did not involve with myrosinase. In the *Aspergillus* case, sinigrin-degrading capability was closely related to the presence of myrosinase activity within fungal mycelium. Degradation of sinigrin

yielded the product allylcyanide. The fungus *Aspergillus* sp., later assigned as the strain NR-4201, exhibited the potential to degrade glucosinolates in mustard extract medium (*Brassica juncea*) by both two-step and one-step liquid culture.

The production of an intracellular myrosinase by *Aspergillus* sp. NR-4201 was performed by a one-step culture in mustard extract medium. Optimum condition was carried out at 5.5 mM glucosinolates, pH 6.5, 30 °C for 48 h, under reciprocal shaking at 150 rpm. Cell-free extract obtained after fungal cell disruption of a 40-ml culture contained 35 U of myrosinase activity. The *Aspergillus* myrosinase was isolated by fractionating with ammonium sulfate, and chromatography on DEAE Sephadex A-25 columns (twice) and Sephadex G-100 column, stepwisely. The final enzyme preparation (a specific activity of 65 U/mg protein) exhibited one major band on SDS-PAGE corresponding to a molecular weight of 94 kDa. A native mass of 90 kDa was estimated by Sephadex G-200 chromatography, suggested that the enzyme occured as a monomeric protein.

Optimum activity of the purified *Aspergillus* myrosinase was shown at pH of 7.4 and at temperature of 28 °C. The enzyme was stable at pH between 6 and 8 and at temperatures up to 25 °C. The activity was substantially inhibited by Ag^{+}, Al^{3+}, Co^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{+}, Hg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Sn^{2+}, Zn^{2+} and L-cysteine, and no stimulation by metal ions was shown. L-Ascorbic acid showed no activation or inhibition effect on enzyme activity. Hydrolyzing activity of the enzyme was not shown towards a series of glycosides such as p-nitrophenyl-β-D-arabinoside, p-nitrophenyl-β-D-galactoside, p-nitrophenyl-β-D-maltoside, p-nitrophenyl-β-D-xyloside, cellobiose, starch, digitonin, stevioside, amikacin and

gentamicin. However, strong activity was demonstrated towards the glucosinolate sinigrin as well as p-nitrophenyl-β-D-glucoside (pNPG). K_m values with sinigrin and pNPG were calculated to be 0.65 and 2.8 mM, respectively. Sinigrin acted as a competitive inhibitor for pNPG-hydrolyzing activity, and *vice versa*. It was shown that D-glucose acted as a non-competitive inhibitor for the activity of sinigrin hydrolysis.

The *Aspergillus* enzyme being able to catalyze the hydrolysis of sinigrin at pH between 5 and 9, yielded allylisothiocyanate as a major product. Whereas, no liberation of allylcyanide was observed. Furthermore, a minor compound was appeared as the amount 10 % of total hydrolytic products from sinigrin. GC-MS analysis revealed that this minor compound was a possible isomer of allylisothiocyanate. Crude *Aspergillus* myrosinase exhibited the potential to produce allylisothiocyanate from mustard extract, indicating further application of the enzyme.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และ การศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ไมโรซิเนสจากเชื้อแอสเปอร์จิลลัส สายพันธุ์ เอนอาร์ - 4201

ชื่อผู้เขียน นายประคอง สาคร

ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร.นวลศรี รักอริยะธรรม	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ
อ. ดร. ภควรรณ หนองขุ่นสาร	กรรมการ
อ. ดร.บัณฑิต ลีละศาสตร์	กรรมการ
ศ. ดร. ไมตรี สุทธจิตต์	กรรมการ
รศ. ดร. คณิต กฤษณังกูร	กรรมการ

บทคัดย่อ

ความสามารถในการสลายสารกลูโคซิโนเลตและการผลิตเอนไซม์ไมโรซิเนสโดยเชื้อรา 3 สายพันธุ์ใหม่คือ ไรโซปัสเอสพี มิวคอร์เอสพี และแอสเปอร์จิลลัสเอสพี ได้ถูกรายงาน โดยในการทดลองได้ทำการเลี้ยงเชื้อราทั้งสามสายพันธุ์ในอาหารเหลวที่มีสารกลูโคซิโนเลตชนิดซินิกรินเป็นสับสเตรต พบว่าเชื้อไรโซปัส และมิวคอร์มีศักยภาพในการสลายสารซินิกรินต่ำ และกระบวนการสลายไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไมโรซิเนส ในกรณีของเชื้อแอสเปอร์จิลลัส ความสามารถในการสลายสารซินิกรินมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการมีไมโรซิเนสแอกติวิตีในไมซีเลียมเชื้อรา ผลของการสลายสารซินิกรินได้ผลิตภัณฑ์คือ สารอัลลิลไซยาไนด์ เชื้อแอสเปอร์จิลลัสเอสพีนี้ภายหลังได้ตั้งชื่อว่าเป็นสายพันธุ์เอนอาร์-4201 ซึ่งเชื้อราดังกล่าวมีความสามารถในการสลายสารกลูโคซิโนเลตในอาหารเหลวซึ่งเตรียมจากสารสกัดเมล็ดมัสตาร์ดสีน้ำตาลทั้งการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอนและขั้นตอนเดียว

การผลิตเอนไซม์ไมโรซิเนสภายในเซลล์ของเชื้อแอสเปอร์จิลลัสเอสพี เอนอาร์-4201 โดยการเลี้ยงเชื้อแบบขั้นตอนเดียวในอาหารเหลวที่เตรียมจากสารสกัดมัสตาร์ด มีสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของสารกลูโคซิโนเลตเท่ากับ 5.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าแบบไปกลับที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที และพบว่าสารสกัดที่ได้จากการบดเซลล์เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลว 40 มิลลิลิตร มีไมโรซิเนสแอกติวิตีเท่ากับ 35

ยูนิต เอนไซม์ไมโรซิเนสจากเชื้อดังกล่าวได้ถูกนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แยกด้วยโครมาโตกราฟีด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี เซฟาเด็ก เอ-25 (DEAE Sephadex A-25) 2 ครั้ง และ คอลัมน์เซฟาเด็ก จี-100 (Sephadex G-100) อีก 1 ครั้ง ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ไมโรซิเนสที่เตรียมได้มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีเอคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส (SDS- PAGE) ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ เทียบได้กับน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์เซฟาเด็ก จี-200 (Sephadex G-200) เอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 90 กิโลดาลตัน แสดงว่าเอนไซม์ไมโรซิเนสที่แยกได้เป็นโปรตีนชนิดโมเลกุลเดี่ยว

เอนไซม์ไมโรซิเนสบริสุทธิ์จากเชื้อแอสเปอร์จิลลัสมีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.4 มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส และ พีเอชระหว่าง 6-8 แอกติวิตีของเอนไซม์ไมโรซิเนสถูกยับยั้งอย่างชัดเจนด้วย แอล-ซีสเตอีน และอิออนของโลหะ เช่น Ag^{+} Al^{3+} Co^{2+} Fe^{3+} Hg^{+} Hg^{2+} Mn^{2+} Ni^{2+} Sn^{2+} และ Zn^{2+} แต่มีไม่อิออนของโลหะชนิดใดกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ เอนไซม์ดังกล่าวไม่มีแอกติวิตีในการสลายสารประกอบกลัยโคไซด์ที่ทำการทดสอบเช่น พารา-ไนโตรฟีนิล-เบตา-ดี-อะราบิโนไซด์ พารา-ไนโตรฟีนิล-เบตา-ดี-กาแลกโตไซด์ พารา-ไนโตรฟีนิล-เบตา-ดี-มอลโตไซด์ พารา-ไนโตร-ฟีนิล-เบตา-ดี-ไซโลไซด์ เซลโลบิโอส แป้ง ดิจิโทนิน สตีวิโอไซด์ อะมิกาซินและเจนตาไมซิน อย่างไรก็ตามเอนไซม์มีแอกติวิตีอย่างเด่นชัดต่อสารกลูโคซิโนเลตชนิดซินิกรินและพารา-ไนโตรฟีนิล-เบตา-ดี-กลูโคไซด์ (พีเอนพีจี) ค่าเคเอม (K_m) สำหรับสารซินิกริน และ พีเอนพีจี คำนวณได้เท่ากับ 0.65 และ 2.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ สารซินิกรินทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันต่อแอกติวิตีในการสลายสารพีเอนพีจี ในทำนองเดียวกันสารพีเอนพีจีทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันต่อแอกติวีตีในการสลายสารซินิกริน ในขณะที่ดี-กลูโคสทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันต่อแอกติวิตีในการสลายสารซินิกริน

เอนไซม์โมโรซิเนสบริสุทธิ์จากเชื้อแอสเปอร์จิลลัสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายสารซินิกรินที่พีเอชระหว่าง 5 - 9 ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นสารอัลลิลไอโซไธโอไซยาเนต และ ผลิตภัณฑ์ส่วนน้อยคิดเป็น 10 เปอร์เซนต์ของปริมาณสารอัลลิลไอโซไธโอไซยาเนต ในขณะที่ไม่มีสารอัลลิลไซยาไนด์เกิดขึ้นเลย เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ส่วนน้อยด้วย จีซี-เอมเอส (GC-MS) ปรากฏผลว่าผลิตภัณฑ์ส่วนน้อยนี้น่าจะเป็นไอโซเมอร์หนึ่งของสารอัลลิลไอโซไธโอไซยาเนต นอกจากนี้เอนไซม์ไมโรซิเนสจากเชื้อแอสเปอร์จิลลัสที่ยังไม่

ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ มีศักยภาพในการผลิตสารอัลลิลไอโซไธโอไซยาเนตจากสารสกัดมัสตาร์ด ซึ่งจะเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้งานของเอนไซม์นี้ต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University