Thesis Title Purification, Characterization and Application of α-Galactosidase from Ling-Zhi Mushroom (*Ganoderma lucidum*)

Author Ms. Thida Sripuan

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Dararat Tongkao	Chairman
Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek	Member
Prof. Dr. Hidehiko Kumagai	Member

ABSTRACT

Ling-Zhi mushroom (*Ganoderma lucidum*), a famous medicinal mushroom, was found to produce α-galactosidase (EC 3.2.1.22). The second week fruiting bodies of *G. lucidum* strain L_6 were extracted with phosphate-buffered saline in the ratio of 1:5 g/ml then the crude extract was assayed and investigated for some characteristics of α-galactosidase. The result showed that the second week fruiting bodies produced the α-galactosidase in amount of 0.40 U/ml and the enzyme showed optimum activity at pH 6.0 and was stable between pH 3.5-10.0. The optimum temperature of the enzyme was 70°C and half of the enzyme activity remained at 78° C for 1 hour. The Michaelis-constant (K_m) of the enzyme for *p*-nitrophenyl-α-D-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

galactopyranoside was 0.34 mM. The crude α-galactosidase activity was strongly inhibited by Ag^+, Hg^{2+}, Fe^{3+}, *p*-chloromercuribenzoate and galactose. When *p*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside was incubated with the enzyme, two oligosaccharides were detected by HPLC. This indicated that the enzyme catalyzed a transgalactosylation reaction.

The α-galactosidase was purified from the crude extract of mushroom fruiting bodies by ammonium sulphate precipitation and column chromatographies of DEAE-Sepharose and Con A-Sepharose . The final enzyme preparation exhibited one major band in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis corresponding to a molecular mass of 56 kDa. A native mass of about 249 kDa was estimated by gel filtration of FPLC, suggesting four identical subunits of the enzyme molecule. Its N-terminal amino acid sequence was similar to that of *Mortierella vinacea*. The purified enzyme exhibited the optimum pH and temperature at 6.0 and 70 °C, respectively. The enzyme was fully stable to heating at 70°C for 1 hour and stable in the pH range of 3.5-10.0. It hydrolyzed *p*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside (K_m=0.26 mM) but scarcely hydrolyzed *o*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside. It also hydrolyzed melibiose, raffinose and stachyose. The purified enzyme activity was strongly inhibited by Ag^+, Hg^{2+}, Fe^{3+}, *p*-chloromercuribenzoate and galactose. The enzyme also catalyzed the transgalactosylation reaction which synthesized melibiose as a main product.

Mycelia of the *G. lucidum* strain L_6 were cultured in liquid medium containing 1.0% soybean meal, 0.6% peptone, 0.15%$(NH_4)_2SO_4$, 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ and 1.0% KH_2PO_4, initial pH 5.6, at ambient temperature (28±2°C) on rotary shaker of 150 rpm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

for 28 days. The result showed that the mycelia produced highest activity of an extracellular α-galactosidase at 21st day of the cultivation period with the amount of 0.16 U/ml or 0.70 U/mg protein. The induction experiments were performed for higher production of the α-galactosidase. Initial pH of the media (4.0-10.0), essential composition of the medium as a component of carbon source (soybean meal, rice meal, cassava meal, wheat bran, chitin, raffinose, melibiose, glucose and galactose), the carbon source concentration (0-5.0%) and nitrogen source (peptone, $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ and urea) were examined. The α-galactosidase activity is dependent on the composition of the growth media, and amount of the enzyme was approximately increased to 2.8 folds in the medium containing 5.0% soybean meal and 0.6% peptone at initial pH 6.0, cultivation for 21 days at the ambient temperature.

Crude α-galactosidase in the culture medium was determined for some properties. The enzyme had optimum activity at pH 5.0 and temperature of 50°C. It was stable between the pH range 3.5-10.0 and temperature of 25-40°C. The K_m value for *p*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside was 0.59 mM. The enzyme activity was also inhibited by Ag^+, Hg^{2+}, *p*-chloromercuribenzoate, iodoacetate and galactose.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์ การหาลักษณะเฉพาะและการประยุกต์แอลฟากาแลคโตซิเดสจากเห็ดหลินจือ

ผู้เขียน นางชิดา ศรีปวน

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. ดารารัตน์ ทองขาว	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ศิริรัตน์ สาระเวก	กรรมการ
ศ. ดร. ฮิเดอิโกะ คูมาไก	กรรมการ

บทคัดย่อ

เห็ดหลินจือเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟากาแลคโตซิเดสได้ เมื่อนำดอกเห็ดหลินจือสดสายพันธุ์ L_6 อายุ 2 สัปดาห์มาสกัดด้วยสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:5 กรัม/มล. แล้วนำสิ่งที่สกัดได้ไปสอบวิเคราะห์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าดอกเห็ดหลินจืออายุ 2 สัปดาห์ผลิตเอนไซม์แอลฟากาแลคโตซิเดสในปริมาณ 0.40 หน่วยต่อมิลลิลิตรและพบว่าเอนไซม์ในสิ่งสกัดหยาบนี้ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 และมีความเสถียรที่พีเอชระหว่าง 3.5-10.0 เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และทำงานลดลงครึ่งหนึ่งที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่าคงที่ไมเคลิส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับพาราไนโตรเฟนิลแอลฟาดีกาแลคโตไพราโนไซด์เท่ากับ 0.34 มิลลิโมลาร์ การทำงานของเอนไซม์ในสิ่งสกัดหยาบถูกยับยั้งอย่างชัดเจนโดยไอออนของเงิน ปรอท เหล็ก พาราคลอโรเมอคิวไรเบนโซเอทและกาแลคโตส เมื่อบ่มเอนไซม์กับพาราไนโตรเฟนิลแอลฟาดีกาแลคโตไพราโนไซด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นออลิโกแซคคาไรด์อีก 2 ชนิดซึ่งตรวจพบโดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลนี้แสดงว่าแอลฟากาแลคโตซิเสจากเห็ดสามารถเร่งปฏิกิริยาการถ่ายโอนหมู่กาแลคโตซิลด้วย

การทำแอลฟากาแลคโตซิเดสในสิ่งสกัดหยาบจากดอกเห็ดให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์บรรจุ DEAE-Sephadex A-50 และ Con A-Sepharose แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิสพบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งมีมวลโมเลกุล 56 กิโลดาลตัน แต่เมื่อวิเคราะห์โดยเจลฟิลเตรชันพบเอนไซม์มีมวลโมเลกุล 249 กิโลดาลตัน แสดงว่าโมเลกุลของเอนไซม์ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน เอนไซม์บริสุทธิ์นี้มีลำดับกรดอะมิโนทางปลายเอ็นเหมือนแอลฟากาแลคโตซิเดสจากเห็ด *Mortierella vinacea* เอนไซม์บริสุทธิ์ทำงานได้มากที่สุดที่พีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และต่อพีเอชช่วง 3.5-10.0 เอนไซม์สลายพาราไนโตรเฟนิลแอลฟาดีกาแลคโตไพราโนไซด์ได้ดีและมีค่า K_m เท่ากับ 0.26 มิลลิโมลาร์ แต่สลายออโธไนโตรเฟนิลแอลฟาดีกาแลคโตไพราโนไซด์ได้เล็กน้อย นอกจากนี้ยังสลายเมลิไบโอส แรฟฟิโนส และสตาคิโอสได้ด้วย การทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ถูกยับยั้งอย่างชัดเจนโดยไอออนของเงิน ปรอท เหล็ก พาราคลอโรเมอคิวไรเบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โซเอท และกาแลคโตส เอนไซม์บริสุทธิ์สามารถเร่งปฏิกิริยาถ่ายโอนหมู่กาแลคโตซิล และได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเมลิไบโอส

เส้นใยของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ L_6 สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งถั่วเหลือง 1.0% เปปโตน 0.6% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.15% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0% ที่พีเอชตั้งต้น 5.6 ในอุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 28 วัน ผลการทดลองพบว่าเส้นใยเห็ดหลินจือผลิตเอนไซม์แอลฟากาแลคโตซิเดสและส่งออกมานอกเซลล์มากสุดที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 21 วันโดยมีปริมาณเอนไซม์ 0.16 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือ 0.70 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

จากการทดลองกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ให้มากขึ้นโดยเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลว (4.0-10.0) ส่วนประกอบสำคัญของอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนเช่น แป้งถั่วเหลือง แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง รำข้าว ไคติน เมลิไบโอส แรฟฟิโนส กลูโคส หรือกาแลคโตส แหล่งไนโตรเจนเช่น เปปโตน แอมโมเนียมฟอสเฟส แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรต หรือยูเรีย แล้วพบว่าแอคติวิตีของแอลฟากาแลคโตซิเดสขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดและปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 2.8 เท่าในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งถั่วเหลือง 5.0% เปปโตน 0.6% พีเอชเริ่มต้น 6.0 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน

จากการศึกษาสมบัติของแอลฟากาแลคโตซิเดสในอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส และพีเอช 3.5-10.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์มีค่าคงที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมเคลิสต่อพาราไนโตรเฟนิลแอลฟาดีกาแลคโตไพราโนไซด์เท่ากับ 0.59 มิลลิโมลาร์ การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างชัดเจนโดยไอออนของเงิน ปรอท พาราคลอโรเมอคิวไรเบนโซเอท ไอโอโดอะซีเตต และกาแลคโตส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved