Thesis Title Purification and Evaluation of Bilirubin Oxidase Isolated from *Myrothecium verrucaria* TISTR 3112 and TISTR 3225

Author Mr. Chalee Phromnoi

M.S. Medical Technology

Examining Committee :

Associate Professor Rujapa Nimsung	Chairman
Assistant Professor Dr. Audomsark Haesungcharern	Member
Assistant Professor Dr. Prachya Kongtawelert	Member
Assistant Professor Bongkotwan Sutabhaha	Member

ABSTRACT

Bilirubin oxidase (EC 1.3.3.5 ; BOX) was isolated from a culture medium of cultivated *Myrothecium verrucaria* TISTR 3112 and TISTR 3225 which obtained from the Bangkok MIRCEN, Thailand. The optimal cultivation condition for the maximum bilirubin oxidase production was to culture the strain aerobically at 25°C in a pH 8.0 potato-glucose broth for 48 hrs. After cultivation, the culture filtrates were purified by either ammonium sulfate precipitation, activated charcoal treatment, DEAE-Cellulose or DEAE-Sepharose column chromatography techniques. Highest yield recovery of bilirubin oxidase was obtained from the activated charcoal purification technique. Identification of bilirubin oxidase isolated from both strains was carried out by the minipreparative SDS-PAGE using a crude commercial bilirubin oxidase from Sigma chemical company as an enzyme control. Some properties of the isolated bilirubin oxidase enzyme were studied. The molecular weight determined by Sephadex G-100 gel filtration chromatography was calculated as 49,000 Da. The K_m values (Michaelis-Menten constant) calculated from Lineweaver-Burk plot for bilirubin oxidase using total or conjugated bilirubin substrate was shown to

be 84.2 and 135 μmol/L, respectively. The enzyme activity was inhibited about 75% with 0.91 mmol/L of $ZnSO_4$, $CaCl_2$ or 1.8 g/L of BSA in the final reaction mixture of the enzyme-substrate oxidation reaction as compared with the control reaction (without inhibitors).

Bilirubin oxidase isolated from both strains of *Myrothecium verrucaria* was applied for clinical uses. The enzymatic methods using bilirubin oxidase for determination of total and conjugated bilirubin in serum were developed. The optimal bilirubin oxidase concentration in a 210 μL final reaction mixture of total and conjugated bilirubin substrate observed in a Beckman Synchron CX5 autoanalyzer were ranged from 10-20 U/L and 5-15 U/L for total and conjugated bilirubin method, respectively. The within-run (OCV) and between-run (RCV)precisions (%CV) were between 5.2 ($\bar{x}$ = 2.6 mg/dL) to 11.4% ($\bar{x}$ = 0.7 mg/dL) and 6.8 ($\bar{x}$ = 2.4 mg/dL) to 14.9% ($\bar{x}$ = 0.7 mg/dL), respectively for total bilirubin determination. The within-run and between-run precisions (%CV) for conjugated bilirubin determination in the same autoanalyzer were shown to be 0.72 ($\bar{x}$ = 7.2 mg/dL) to 5.1% , $\bar{x}$ = 0.3 mg/dL) and 1.06 ($\bar{x}$ = 7.2 mg/dL) to 7.7% ($\bar{x}$ = 0.31 mg/dL), respectively. The accuracy by means of % recovery were 96.2 and 98.0% for total and conjugated bilirubin methods determined in this instrument. The investigated linearity was good which ranged from 0-35 mg/dL for total bilirubin and 0-16 mg/dL for conjugated bilirubin determination. These two developed enzymatic methods used in Beckman Synchron CX5 autoanalyzer were correlated significantly with the WHO recommended reference diazo method of Jendrassik and Grof. The correlation coefficient (r) for total and conjugated bilirubin determinations were 0.986 and 0.983 at $p<0.001$, respectively. Hemoglobin concentration of 0.8 g/L started interfering with low level of total and conjugated bilirubin determination by this enzymatic method.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเตรียม Bilirubin Oxidase จากเชื้อ *Myrothecium verrucaria* TISTR 3112 และ TISTR 3225 ให้บริสุทธิ์และประเมินผลการใช้งาน

ชื่อผู้เขียน นายชาลี พรหมน้อย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. รุจาภา	นิ่มสังข์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. อุดมศักดิ์	เห่วซึ่งเจริญ	กรรมการ
ผศ. ดร. ปรัชญา	คงทวีเลิศ	กรรมการ
ผศ. บงกชวรรณ	สุตะพาหะ	กรรมการ

บทคัดย่อ

เอนไซม์บิลิรูบินออกซิเดส (Bilirubin oxidase) (EC 1.3.3.5 ; BOX) แยกได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Myrothecium verrucaria* TISTR 3112 และ TISTR 3225 ซึ่งได้มาจากศูนย์รักษาเชื้อ Bangkok MIRCEN ในประเทศไทย สภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อให้ได้การผลิตเอนไซม์ bilirubin oxidase มากที่สุดคือ เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH 8.0 และมี potato และglucose ประกอบอยู่ การเลี้ยงเชื้อทำในภาวะมีอากาศที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเติบโตตามกำหนดแล้วได้นำน้ำกรองจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีใดวิธีหนึ่งเช่น การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate, treat ด้วย activated charcoal หรือโดยวิธี DEAE-Cellulose หรือ DEAE-Sepharose column chromatography พบว่าวิธีทำให้บริสุทธิ์โดยการ treat ด้วย activated charcoal ให้

ปริมาณเอนไซม์กลับคืนมาสูงสุด การพิสูจน์ชนิดของเอนไซม์ทำโดยวิธี Mini Prep Cell SDS-PAGE เทียบกับ crude bilirubin oxidase control ซึ่งผลิตจากบริษัท Sigma chemical ได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติบางลักษณะของเอนไซม์ bilirubin oxidase ที่แยกได้พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หาโดยวิธี Sephadex G-100 gel filtration chromatography คำนวณได้ว่ามีขนาด 49,000 Da ค่า Km (ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten) คำนวณได้จาก Lineweaver-Burk plot สำหรับ bilirubin oxidase ซึ่งใช้ total หรือ conjugated bilirubin substrate มีค่าเท่ากับ 84.2 μmol/L และ 135 μmol/L ตามลำดับ $ZnSO_4$, $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 0.91 mmol/Lหรือ BSA ที่มีความเข้มข้น 1.8 g/L ในส่วนผสมสุดท้ายของปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งเติมออกซิเจนให้กับ total และ conjugated bilirubin substrate ยับยั้ง activity ของเอนไซม์ประมาณ 75 % ของปฏิกิริยา control ที่ไม่มีตัวยับยั้ง

ได้นำเอนไซม์ bilirubin oxidase ซึ่งแยกจากเชื้อ *Myrothecium verrucaria* ทั้งสองสายพันธุ์มาประยุกต์ใช้ในงานทางคลินิก วิธีเอนไซม์เพื่อใช้ตรวจหา total และ conjugated bilirubinในซีรัมได้รับการพัฒนาพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ในปฏิกิริยาปริมาตร 210 μL สำหรับการตรวจหา total และ conjugated bilirubin ในซีรัมด้วยเครื่องวิเคราะห์สารเคมีอัตโนมัติ Beckman Synchron CX5 มีค่าเท่ากับ 10-20 U/L และ 5-15 U/L ตามลำดับ ความเที่ยงที่ดีที่สุด (OCV) และความเที่ยงระหว่างการวิเคราะห์ (RCV) สำหรับวิธีตรวจหา total bilirubin มีค่า %CV ระหว่าง 5.2 ($\bar{x}$ = 2.6 mg/dL) ถึง 11.4% ($\bar{x}$ = 0.7 mg/dL) และ 6.8 ($\bar{x}$ = 2.4 mg/dL) ถึง 14.9% ($\bar{x}$ = 0.7 mg/dL) ตามลำดับ วิธีการตรวจหา conjugated bilirubin ในซีรัมพบว่ามีความเที่ยงที่ดีที่สุดระหว่าง 0.72 ($\bar{x}$ = 7.2 mg/dL) ถึง 5.1% ($\bar{x}$= 0.3 mg/dL) ส่วนความเที่ยงระหว่างการวิเคราะห์มีค่าระหว่าง 1.06 ($\bar{x}$ = 7.2 mg/dL) ถึง 7.7% ($\bar{x}$ = 0.31 mg/dL) ความถูกต้องของวิธีตรวจดูจากค่าเฉลี่ยของ % recovery มีค่า 96.2 และ 98 % สำหรับวิธีการตรวจหา total และ conjugated bilirubin ตามลำดับ การตรวจหาความเป็นเส้นตรงของวิธีพบว่าได้ผลดีคือ การตรวจหา total bilirubin สามารถตรวจได้ 0-35 mg/dL

ส่วน conjugated bilirubin มีความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0-16 mg/dL วิธีเอนไซม์ซึ่งพัฒนาขึ้นมาตรวจหาบิลิรูบินในซีรัมด้วยเครื่องวิเคราะห์สารเคมีอัตโนมัติ Beckman Synchron CX5 นี้สัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับวิธี diazo method ของ Jendrassik & Grof ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงที่ได้รับการแนะนำจากองค์การอนามัยโลก โดยค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) มีค่าเท่ากับ 0.986 สำหรับ total bilirubin และ 0.983 สำหรับ conjugated bilirubin ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.001$ ในการตรวจหา total bilirubin และ conjugated bilirubin ระดับต่ำ พบว่าฮีโมโกลบินความเข้มข้น 0.8 g/L เริ่มรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University