

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E41028



PURIFICATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION  
AND FUNCTIONAL PROPERTY OF MYOGLOBIN  
FROM ASIAN SWAMP EEL (*Monopterus albus*)

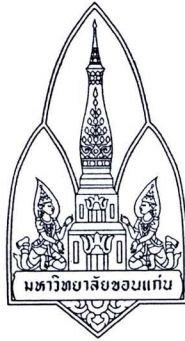
MR. KITTIPHONG WIANGSAMUT

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
KHON KAEN UNIVERSITY

2010



E41028



**PURIFICATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION  
AND FUNCTIONAL PROPERTY OF MYOGLOBIN  
FROM ASIAN SWAMP EEL (*Monopterus albus*)**



**MR. KITTIPHONG WIANGSAMUT**

**A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
KHON KAEN UNIVERSITY**

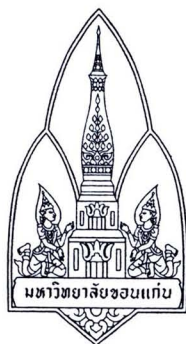
**2010**

**PURIFICATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION  
AND FUNCTIONAL PROPERTY OF MYOGLOBIN  
FROM ASIAN SWAMP EEL (*Monopterus albus*)**

**MR. KITTI PHONG WIANGSAMUT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN ANALYTICAL CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

**2010**



**THESIS APPROVAL**  
**KHON KAEN UNIVERSITY**  
**FOR**  
**MASTER OF SCIENCE**  
**IN ANALYTICAL CHEMISTRY**

**Thesis Title:** Purification, Structural Characterization and Functional Property of Myoglobin from Asian Swamp Eel (*Monopterus albus*)

**Author:** MR. Kittiphong Wiangsamut


**Thesis Examination Committee**

Assoc. Prof. Dr. Chalerm Ruangviriyachai	Chairperson
Dr. Sujint Anguravirutt	Member
Assoc. Prof. Dr. Nison Sattayasai	Member
Assoc. Prof. Dr. Saksit Chanthai	Member

**Thesis Advisors:**

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Saksit Chanthai) Advisor

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Nison Sattayasai) Co-Advisor

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)

Dean, Graduate School

  
.....  
(Asst. Prof. Dr. Kiat Sangaroon)

Dean, Faculty of Science



กิตติพงษ์ เวียงสมุทร. 2010. การทำบริสุทธิ์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ และฟังก์ชันของไมโอโกลบินจาก  
ปลาไหลนา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์ บัณฑิต  
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร. ศักดิ์สิทธิ์ จันทน์ไทย,  
รศ.ดร. นิสันต์ สัตยาชัย

## บทคัดย่อ

**E 41028**

ไมโอโกลบินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เก็บกักออกซิเจน ซึ่งพบมากในเซลล์กล้ามเนื้อของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดนอกจากนั้นยังเป็นแหล่งสำรองออกซิเจนในกระบวนการสร้างพลังงานในเซลล์กล้ามเนื้อ ไมโอโกลบินของสิ่งมีชีวิตที่อยู่สภาพแวดล้อมต่างกันจะแสดงสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ที่แตกต่างกัน จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้คือการศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและสมบัติทางฟังก์ชันของไมโอโกลบินจากปลาไหลนา ซึ่งพบได้ทั่วไปในโคลนใต้แหล่งน้ำที่แห้งขอดสามารถอาศัยอยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำได้ดี ดังนั้นสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของไมโอโกลบินจากปลาชนิดนี้จึงน่าสนใจที่จะศึกษา โดยสกัดไมโอโกลบินจากเนื้อแดงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอริก 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8 แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 55-75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำไมโอโกลบินที่สกัดได้มาผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ 2 วิธีเปรียบเทียบกัน วิธีแรกใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี สองขั้นตอนคือครั้งแรกใช้คอลัมน์ที่บรรจุ คีอีเออี เซลลูโลส ต่อมาใช้คอลัมน์เซฟฟาเด็ค จี-75 เพื่อแยกโปรตีนต่างๆ ออกจากกัน และอีกวิธีหนึ่งเป็นการแยกโปรตีนบนแผ่นเจลแบบเนทีฟเพจ พบว่าทั้งสองวิธีปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15.4 กิโลดาลตันบนแผ่นเอสดีเอส-เพจ ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุล (15.52 กิโลดาลตัน) ที่หาได้จากเครื่อง MALDI-TOF-MS

สเปกตรัมในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิธีเบิลของโปรตีนนี้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 และ 408 นาโนเมตร ซึ่งเป็นเอกลักษณ์บ่งชี้โครงสร้างของไมโอโกลบิน จากฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมที่ความยาวคลื่นสูงสุด 325 นาโนเมตรได้จากการกระตุ้นแสงที่ 280 นาโนเมตร มีลักษณะคล้ายกับฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของไมโอโกลบินจากหัวใจม้า แต่พบว่าไมโอโกลบินบริสุทธิ์ที่แยกด้วยเทคนิคเนทีฟเพจนั้น ให้ความเข้มฟลูออเรสเซนส์ต่ำกว่าไมโอโกลบินบริสุทธิ์ที่เตรียมจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทั้งนี้เพราะโปรตีนดังกล่าวน่าจะเกิดการเสียสภาพทางโครงสร้าง ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากความร้อนในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิส ไมโอโกลบินนี้มีค่า pI เท่ากับ 6.40 และ 7.12 ซึ่งน่าจะเป็น 2 ไอโซฟอร์ม และมีค่าโมลาร์สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง

**E41028**

เท่ากับ  $2.22 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  และ  $4.80 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ที่ 280 และ 408 นาโนเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ ได้วิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนโดยย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริปซินก่อนตรวจวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวร่วมกับแมสสเปกโตรมิเตอร์ พบว่า ไมโอโกลบินของปลาชนิดนี้มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนเหมือนกับไมโอโกลบินของปลาทะเล ในด้านฟังก์ชันที่สำคัญของโปรตีนนี้ จากการศึกษาปฏิกิริยาออกไดออกซิเดชันที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 พบว่าไมโอโกลบินของปลาไหลนา ( $k_{obs} 1.42 \text{ h}^{-1}$ ) มีอัตราการเกิดออกไดออกซิเดชันสูงกว่าไมโอโกลบินของหัวใจม้า ( $k_{obs} 1.08 \text{ h}^{-1}$ ) แสดงว่า โครงสร้างภายในของฮีโมในไมโอโกลบินของปลาชนิดนี้มีโครงรูปที่กระชับต่ำกว่าของไมโอโกลบินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Kittiphong Wiangsamut. 2010. **Purification, Structural Characterization and Functional Property of Myoglobin from Asian Swamp Eel (*Monopterus albus*)**. Master of Science Thesis in Analytical Chemistry, Graduate School, Khon Kaen University.

**Thesis Advisors:** Assoc. Prof. Dr. Saksit Chanthai,  
Assoc. Prof. Dr. Nison Sattayasai

## ABSTRACT

**E41028**

Myoglobin (Mb) is an oxygen storage protein present mostly in muscle cells in a wide variety of living species and plays an important function as proper oxygen supply for the energy generation of muscle. Myoglobins from various animals that living in different surroundings show differences in physico-chemical properties. The aim of this research was to investigate structural characterization and functional property of Mb from Asian swamp eel (*Monopterus albus*). Since this fish can stay in mud underneath a dried up pond with low oxygen environment, therefore physico-chemical properties of the Mb are interesting. In this study, Mb from the red muscle of Asian swamp eel was extracted with cold buffer solution of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) by homogenization. Crude Mb was isolation by salting-out using saturated ammonium sulfate (55-75%w/v). The obtained crude Mb was subjected to purification using two purification methods; column chromatography via DEAE cellulose and then Sephadex G-75, and non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis. From SDS-PAGE, the purified Mb obtained from both purification methods gave only a single band with molecular weight (MW) of about 15.4 kDa, similar to that obtained from mass spectrum data (15.52 kDa) of MALDI-TOF-MS. UV-Visible spectrum of the Mb exhibited the maximum absorption at 280 and 408 nm. Both absorption peak (280 nm) and the Soret peak (408 nm) correspond to those of all Mbs. Tryptophan fluorescence spectra peaked at 325 nm after excitation at 280 nm of both fish and horse heart Mbs were very similar. But the fluorescence intensity of the purified fish Mb obtained from native-PAGE method was lower than that of Mb obtained from column chromatographic method, due to the protein unfolding by joule's heating of electrophoresis. pI value of this protein was 6.40 and 7.12

**E41028**

suggesting two isoforms. Their molar extinction coefficients were found to be  $2.22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and  $4.80 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 280 and 408 nm, respectively. In addition, partial peptide sequence of the purified Mb was determined by in-gel trypsin digestion and LC-MS/MS. From database analysis, the peptide fragments of this fish Mb were found to be homologous with those of marine fish species. Regarding functional property, an autoxidation rate constant of the swamp eel Mb ( $k_{obs} 1.42 \text{ h}^{-1}$ ) at 37°C in 0.2 phosphate buffer pH 6.8 was higher than that of horse heart Mb ( $k_{obs} 1.08 \text{ h}^{-1}$ ), indicating that the structural conformation of the heme pocket of the fish Mb is more labile than that of mammalian myoglobins.



**The good aspects of the present thesis are dedicated to  
my parents and entire teaching staff.**

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to Assoc. Prof. Dr. Saksit Chanthai for kindly providing me a good opportunity to study in this field, supervision, supporting, encouragement, valuable suggestions, forbearance and helpful criticism throughout the course of this research work. I wish to express my sincere appreciation to my co-advisors, Assoc. Prof. Dr. Nison Sattayasai for his continuous invaluable advice, useful guidance in biochemistry techniques and his kindness.

I am grateful to the committee members, Assoc. Prof. Dr. Chalerm Ruangviriyachai, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University and Dr. Sujint Anguravirutt, Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University for their constant guidance and useful advice.

I wish to thank Miss Ampika Chotchayapong for helping me in chemistry and biochemistry laboratory. I would like to express my gratitude to Department of Chemistry and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, for instruments, chemicals and reagents, research location and all supporting facilities. Financial support from the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education is also gratefully acknowledged.

I would like to thank my all friends (younger and older) for their encouragement and friendships.

Finally, I wish to express my appreciation to my dear parents for their immortal love, carefulness, devoting, giving a best power and gladness.

Kittiphong Wiangsamut

## TABLE OF CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1    Rationale and Problem	1
1.2    Objectives	3
1.3    Limitations of the study	4
1.4    The anticipated outcomes	4
CHAPTER II GENERAL PRINCIPLES AND LITERATURE REVIEWS	5
2.1    General and nature of myoglobin	5
2.2    Isolation and purification of myoglobin	9
2.3    Identification and characterization of myoglobin	10
2.4    Asian swamp eel ( <i>Monopterus albus</i> )	11
2.5    Fundamental methods for isolation and purification of myoglobin	12
CHAPTER III EXPERIMENTAL	22
3.1    Chemicals and reagents	22
3.2    Instruments	22
3.3    Fish muscle	23
3.4    Extraction and isolation of fish myoglobin	23
3.5    Purification of fish myoglobin	26
3.6    Purity of fish myoglobin	28
3.7    Protein concentration determination	28

## TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	<b>Page</b>
3.8 Characterization and identification of fish myoglobin	31
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	35
4.1 Extraction and isolation of myoglobin from swamp eel	35
4.2 Purification of myoglobin from swamp eel	37
4.3 Characterization and identification of swamp eel myoglobin	49
CHAPTER V CONCLUSION	63
5.1 Extraction, isolation and purification of swamp eel myoglobin	63
5.2 Characterizations of swamp eel myoglobin	64
REFERENCES	66
APPENDICES	74
APPENDIX A ELECTROPHORETIC METHODS	75
APPENDIX B CHROMATOGRAPHIC MEDIA	79
APPENDIX C METHODS FOR CHARACTERIZATION OF MYOGLOBIN USING LC-MS/MS	82
APPENDIX D AMINO ACID SEQUENCES OF MYOGLOBINS FROM ANIMALS	86
APPENDIX E RESEARCH PUBLICATIONS	96
CURRICULUM VITAE	98



## LIST OF TABLES

		Page
Table 4.1	Yield of the purified myoglobin obtained from column chromatography and native-PAGE	48
Table 4.2	Molecular weight of swamp eel myoglobin determined by SDS-PAGE	50
Table 4.3	Identification of protein bands (15.4 kDa) on SDS-PAGE, obtained from the purified myoglobin using LC-MS/MS and database search	57
Table 4.4	Comparisons of partial amino acid sequences obtained from LC-MS/MS and full amino acid sequence of marine fish Myoglobins from ExPASy Proteomics Server	58
Table 4.5	Observed first-order rate constants ( $k'_{obs}$ ) obtained from Asian swamp eel myoglobin and horse heart myoglobin	62
Table B1	Technical information of Sephadex G-75	80
Table B2	Technical information of DEAE-cellulose	81
Table C1	Standard method for Coomassie stained gel	83
Table C2	LC separation and MS analysis conditions	85
Table D1.1	Amino acid sequences of marine fish myoglobins; North Pacific bluefin tuna, Bluefin tuna, Bigeye tuna and Yellowfin tuna	87
Table D1.2	Amino acid sequences of marine fish myoglobins; Sea Raven, Blue Marlin, Albacore and Chub Mackerel	88
Table D1.3	Amino acid sequences of marine fish myoglobins; Sard, Green puffer, Red sea bream and crystal darter	89
Table D1.3	Amino acid sequences of marine fish myoglobins; Crocodile icefish, Unicorn icefish, Black rockcod and Humped rockcod	90

## LIST OF TABLES (Cont.)

		Page
Table D2	Amino acid sequences of fresh water fish myoglobins; Common carp and Goldfish	91
Table D3.1	Amino acid sequences of mammalian myoglobins; Egyptian fruit bat, <i>Megaleia rufa</i> , Brown-capped capuchin and Australian echidna	92
Table D3.2	Amino acid sequences of mammalian myoglobins; Man langur, Bornean orangutan, Olive baboon and Chimpanzee	93
Table D3.3	Amino acid sequences of mammalian myoglobins; Siamang, Agile gibbon, Human and Mountain gorilla	94

## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1	Three dimensional structure of sperm whale myoglobin consists of single polypeptide chain and heme prosthetic group
	8
Figure 2.2	The heme prosthetic group of myoglobin consists of propylinling and iron(II) atom connecting to oxygen molecule and histidine
	8
Figure 2.3	The separation process of protein mixture on gel filtration chromatography
	14
Figure 2.4	The separation and concentration of protein on ultrafiltration unit
	15
Figure 3.1	Extraction and isolation procedure of myoglobin from swamp eel
	25
Figure 3.2	The schematic methods for purification of myoglobin from swamp eel
	30
Figure 4.1	SDS-PAGE of supernatant and pellet obtained from swamp eel myoglobin after centrifugation and precipitation with 55% and 75% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> compared to protein molecular mass standards, horse heart myoglobin, (b) UV-Visible spectrum of the solution of the precipitate obtained from 75% salt saturation
	36
Figure 4.2	(a) Elution profile of the crude myoglobin obtained from Sephadex G-75 column chromatography, (b) SDS-PAGE of fractions that obtained from Sephadex G-75 column
	38
Figure 4.3	(a) Elution profile of the main fraction containing myoglobin obtained from DEAE cellulose column chromatography (b) SDS-PAGE of fractions that obtained from DEA E cellulose column
	39
Figure 4.4	(a) Elution profile of crude myoglobin obtained from DEAE cellulose column chromatography, (b) SDS-PAGE of fractions obtained from DEAE cellulose column
	41

## LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 4.5	(a) Elution profile of the main fraction containing myoglobin obtained from Sephadex G-75 column, (b) SDS-PAGE of fractions obtained from DEAE cellulose column	42
Figure 4.6	(a) Separation pattern of staining and unstaining native gel electrophoresis of crude myoglobin extract with different acrylamide gel concentrations (b) SDS-PAGE of the brown band extract solution from native-PAGE	44
Figure 4.7	Effect of total gel concentration on separation time on the native gel electrophoresis for myoglobin purification	45
Figure 4.8	(a) Separation pattern of staining and unstaining native gel electrophoresis of crude myoglobin extract under different applied separation voltages, (b) SDS-PAGE of the brown band extract solution from native-PAGE	46
Figure 4.9	Effect of applied voltage on separation time on the native gel electrophoresis for myoglobin purification from crude protein extract	47
Figure 4.10	Effect of applied voltage on separation temperature on the native gel electrophoresis for myoglobin purification from crude protein extract	47
Figure 4.11	Mass spectrum of the swamp eel myoglobin obtained from MALDI-TOF-MS	50
Figure 4.12	SDS-PAGE of the swamp eel myoglobin obtained from column chromatography and native-PAGE	51



## LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 4.13	Slab isoelectric focusing gel of the fish myoglobin obtained from column chromatography and non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis	51
Figure 4.14	Absorption spectra of swamp eel myoglobin obtained from both column chromatography and native-PAGE compared to horse heart myoglobin	53
Figure 4.15	Tryptophan fluorescence spectra of swamp eel myoglobin obtained from both column chromatography and native-PAGE compared to horse heart myoglobin and bovine serum albumin (BSA)	53
Figure 4.16	Beer's law plot of swamp eel myoglobin in 50 mM Tris-HCl pH 6.8. The extinction coefficient of this protein was calculated in unit of $\text{ppm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a) and $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (b)	55
Figure 4.17	Absorption spectra of metmyoglobin (Fe III), deoxymyoglobin (Fe II) and oxymyoglobin (Fe II- $\text{O}_2$ )	60
Figure 4.18	Absorbance changes ( $A_{581}$ ) with time for the autoxidation of the swamp eel $\text{MbO}_2$ and horse heart $\text{MbO}_2$ at $37^\circ\text{C}$ in 0.2 mM phosphate buffer (pH 6.8)	61
Figure 4.19	First-order plots for the autoxidation of $\text{MbO}_2$ prepared from Asian swamp eel myoglobin and horse heart myoglobin at $37^\circ\text{C}$ in 0.2 mM phosphate buffer (pH 6.8)	61
Figure B1	Partial structure of Sephadex	80
Figure B2	Structure of DEAE-cellulose	81

## LIST OF ABBREVIATION

A	absorbance
c	concentration
b	path length
cm	centimeter
Da	Dalton
DEAE	diethylaminoethyl
$\epsilon$	extinction coefficient
g	gravity
HPLC	High performance liquid chromatography
h	Hour
I	isoleucine
I	transmitted light intensity
$I_0$	initial light intensity
i.d.	diameter
IEF	Isoelectric focusing
kDa	Kilo Dalton
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry
M	Molar
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight- mass spectrometry
Mb	myoglobin
MbO <sub>2</sub>	oxymyoglobin
metMb	metmyoglobin
min	minute
mL	milliliter

## LIST OF ABBREVIATION (Cont.)

mM	Millimolar
MS	mass spectrometry
MW	Molecular weight
nm	nanometer
pI	isoelectric point
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
UV-Visible	Ultraviolet-Visible
V	voltage
Xcorr	cross-relation number
μL	microliter