

ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดสจาก *Streptomyces* sp. PC22 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -L-ARABINOFURANOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. PC22) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ 130 หน้า. ISBN : 974-14-2524-4

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดสซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ย่อยสายกิ่งของไซแลนให้บริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40-90 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี บิวทิลไฮโดรไฟบิก อินเตอร์แอคชัน และไฮดรอกซีอะปาไทด์ ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 111 เท่า เหลือแอกติวิตีอยู่ 13.12 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลเพิลเดเทรชันพบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 317 กิโลดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีไซเดียมเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลามิเดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 79 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดสบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 65 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-9.0 ค่า K_m และ V_{max} ต่อพารา-ไนโตรฟีนอล แอลฟา-แอล-อะราบินโนไซด์ เท่ากับ 0.27 มิลลิโมลาร์ และ 3,926.15 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เอนไซม์ถูกยับยั้งในลักษณะแข่งขันโดยแอล-อะราบินโนส มีค่า K_i เท่ากับ 15.08 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยอิออนของปรอท นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งด้วยเอ็น-โบรโมซึกซินไมด์และฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์แสดงว่ากรดอะมิโนทริปโตเฟนและเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และจากการตรวจสอบแอกติวิตีข้างเคียงของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดส พบว่าเอนไซม์ไม่มีแอกติวิตีของไซแลเนส, อะซีทิลเอสเทอร์เอสและบีตา-ไซโลซิเดสแน่นอน

4672331223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: α -L-ARABINOFURANOSIDASE / *Streptomyces* sp. PC22

PINPUNYA RIANGRUNGROJ : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -L-ARABINOFURANOSIDASE FROM *Streptomyces* sp. PC22. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 130 pp. ISBN : 974-14-2524-4

α -L-Arabinofuranosidase, one of xylan-debranching enzymes, was purified from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. PC22 grown in liquid medium containing oat spelt xylan as a carbon source. The enzyme was purified to approximately 111 folds with a recovery yield of 13.12% by fractionation with 40-90% saturation of ammonium sulfate followed by consecutive column chromatography on Macro-prep DEAE, butyl hydrophobic interaction and hydroxyapatite, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was 317 kDa as estimated by gel filtration and composed of four identical subunits of 79 kDa estimated by SDS-PAGE. The enzyme had temperature and pH optima of 65°C and 6.0, respectively. It was stable to temperature up to 45°C for 30 min and to a broad range of pH from 5.5-9.0. The K_m and V_{max} values of the enzyme for *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside were 0.27 mM and 3,926.15 μ mol/min/mg protein respectively. It was competitively inhibited by L-arabinose with K_i value of 15.08 mM. The enzyme activity was completely inhibited by Hg^{2+} and also inhibited by N-bromosuccinimide and phenylmethylsulfonyl fluoride indicating tryptophan and serine residue involved in catalytic mechanism. The purified enzyme did not exhibit xylanase, acetyl esterase and β -xylosidase activities.