172680

วัชรี ชุณห์กุล : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACETYL ESTERASE FROM *Streptomyces* sp. PC22) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ 131 หน้า. ISBN : 974-17-5392-6

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำอะซีทิลเอสเทอเรสซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ย่อยสายกิ่งของไซแลนให้บริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้ม 30-90 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน และไฮดรอกซีอะปาไทต์ ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 51 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 7.33 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันพบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 155 กิโลดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสพบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 38 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 50 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0-9.0 ค่า K_m ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท เท่ากับ 0.43 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วยอิออนของปรอท ทองแดง และสังกะสี นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งด้วยฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์แสดงว่ากรดอะมิโนเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากการตรวจสอบแอคติวิตีข้างเคียงของอะซีทิลเอสเทอเรส พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีของไซแลเนสและแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่ำมาก และไม่มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสและเซลลูเลส ผลการใช้งานร่วมกับเอนไซม์อื่นพบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสสามารถทำงานร่วมกับไซแลเนส II จาก *Streptomyces* sp PC22 และบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ชได้ โดยเมื่อบ่มอะซีทิลเอสเทอเรสร่วมกับไซแลนเนส II ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อบ่มปฏิกิริยาร่วมกันทั้งอะซีทิลเอสเทอเรส ไซแลเนส II และบีตา-ไซโลสิเดส พบว่าจะได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุด 46 เปอร์เซ็นต์

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต วัชรี ชุณห์กุล

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2548

172680

4572485123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ACETYL ESTERASE / *Streptomyces* sp. PC22

WATCHAREE CHUNGOOL : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACETYL ESTERASE FROM *Streptomyces* sp. PC22. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 131 pp. ISBN : 974-17-5392-6

Acetyl esterase, one of xylan – debranching enzymes, was purified from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. PC22 grown in liquid medium containing birchwood xylan as a carbon source. The enzyme was purified to approximately 51 folds with a recovery yield of 7.33% by fractionation with 30-90% saturation of ammonium sulfate followed by consecutive column chromatography on Macro-prep DEAE, butyl hydrophobic interaction and hydroxyapatite, respectively. The apparent molecular weight of the purified enzyme was 155 kDa as estimated by gel filtration and revealed four identical subunits of 38 kDa estimated by SDS-PAGE. The enzyme had temperature and pH optima of 50°C and 6.5, respectively. It was stable to temperature up to 55°C for 30 min and to a broad range of pH from 5.0-9.0. The K_m value of the enzyme for *p*-nitrophenyl acetate was 0.43 mM. Metal ions including Hg^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} markedly inhibited the enzyme activity and its activity was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride indicating serine residue involved in catalytic mechanism. The purified enzyme barely showed α-L-arabinofuranosidase and xylanase activities and did not exhibit any β-xylosidase and cellulase acitivities. Its potential application was evaluated and showed cooperative action with xylanase II from *Streptomyces* sp. PC22 and β-xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 on birchwood xylan hydrolysis. When combined with xylanase II, it increased the release of reducing sugar to about 10% of that of xylanase II alone, whereas about 46% increase in reducing sugars liberated was obtained with the combination of xylanase II and β-xylosidase.

Department Microbiology Student's signature Watcharee chungool

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature

Academic year 2005