รัชต โชคชัยชวลิต : การคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตลีแวนเนสและลักษณะสมบัติของเอนไซม์ (SCREENING OF LEVANASE-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต 78 หน้า, ISBN 974-14-1944-9

การคัดกรองลีแวนเนสที่ย่อยลีแวนให้ผลิตภัณฑ์เป็นลีแวนไบโอส หรือ ลีแวนไตรโอส จากแบคทีเรีย ได้ไอโซเลตที่มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าเป็น *Microbacterium* sp. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลีแวนเนสเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียนี้ใน levan minimum medium คือ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นระยะเวลา 12–20 ชั่วโมง หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ติดตามด้วยการแยกโดยโครมาโตกราฟฟีคอลัมน์ดีอีเออีโตโยเพิร์ล และคอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ล เอนไซม์จะมีความบริสุทธิ์ขึ้น 9 เท่า เหลือแถบโปรตีน 2 แถบ ซึ่งติดสีย้อมแอคติวิตีเพียง 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุลของลีแวนเนสเมื่อวิเคราะห์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 มีค่า 43,900 ดาลตัน และวิเคราะห์โดยเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิสมีค่า 43,800 ดาลตัน ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของลีแวนเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน คือ 7.0 ใน cacodylate buffer และมีเสถียรภาพสูงสุดใน glycine-HCl buffer ที่ pH 8.0–9.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของลีแวนเนส คือ 37°C และเอนไซม์มีเสถียรภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ 30°C เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อลีแวนสูงมาก ไม่สามารถย่อยสับสเทรตชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ยังพบว่า serine อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์และควรจะมีโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลีแวนด้วยเอนไซม์นี้คือ ลีแวนไบโอส และลีแวนไตรโอส โดยมีลีแวนไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก การย่อยลีแวนของลีแวนเนสเป็นการย่อยจากด้านปลาย (exo-acting manner)

Levan-assimilating microorganisms were screened for levanbiose or levantriose-generating enzyme production. The isolate which produced the highest enzyme activity was identified using 16S rRNA gene sequences as *Microbacterium* sp. Optimum conditions for producing levanase in levan minimum medium were pH 7.0 at 40°C for 12-20 hours. Levanase was partially purified 9 folds from culture medium of *Microbacterium* sp. by using ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl column and Butyl-Toyopearl column. The two protein bands obtained with only one activity band. The molecular weight of the levanase was estimated to be 43,900 and 43,800 Da by Sephadex G-100 column and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. The optimum pH for levanase activity was 7.0 (cacodylate buffer). The partial purified enzyme was stable at pH range of 8.0-9.0 in glycine-HCl buffer. Optimum temperature for enzyme reaction was 37°C. Enzyme was the most stable at 30°C. Levanase showed an absolute substrate specificity for levan. Serine residues in the enzyme might play an important role in the catalysis. The enzyme may have metal ion as cofactor. The enzyme hydrolyzed levan in an exo-acting manner.