การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

Purification and Characterization of Xylanase from *Cryptococcus laurentii*

ธัญญา ศรีโพธิ์

Thanya Sripo

เลขหมู่ QP 609 .C97 ส62 2538 ฉ.2
เลขทะเบียน
17 ก.ค. 2538

Order Key 4418
BIB Key 77916 77916

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii*

ผู้เขียน นางธัญญา ศรีโพธิ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

ยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus laurentii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (1,4-β-D-Xylan xylanohydrorase, EC 3.2.1.8) 3 ไอโซไซม์ ออกมานอกเซลล์โดยผลิตได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เอนไซม์ (Xln1, Xln2 และ Xln3) ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอน ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัว 80% ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-cellulose และคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephacryl S-300 หลังการเตรียมบริสุทธิ์ได้นำโปรตีนแต่ละพีคมาตรวจสอบด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของ Xln1, Xln2 และ Xln3 เป็น 56,000, 23,500 และ 20,000 ดาลตัน ตามลำดับ

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสที่บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ Xln1 (56,000 ดาลตัน) ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Xln2 (23,500 ดาลตัน) ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองคือ 4.0 จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์พบว่า Xln1 และ Xln2 ทนอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที และที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที Xln1 มีค่า K_m เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 28.31 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วน Xln2 มีค่า K_m เท่ากับ 7.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร V_{max} เท่ากับ 603.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน การศึกษาไอออนและสารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า Cu^{2+} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ 1% SDS มีผลยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เมื่อศึกษาผลผลิตจากการย่อยไซแลน (oat spelt xylan) ด้วยเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ พบว่าผลผลิตที่ได้คือ น้ำตาลไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ จึงจัดเป็น endoxylanases

Thesis Title	Purification and Characterization of Xylanase from *Cryptococcus laurentii*
Author	Mrs. Thanya Sripo
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1994

Abstract

Three types of xylanases (1,4-β-D-Xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) were isolated from the culture filtrate of yeast, *Cryptococcus laurentii* . The highest production was detected in 48 hours at 30 °C. The enzymes (Xln1, Xln2 and Xln3) were purified by 80% saturation with ammonium sulfate, anion exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration chromatography on Sephacryl S-300. The purified enzymes showed single bands on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of Xln1, Xln2 and Xln3 were 56,000, 23,500 and 20,000 daltons, respectively.

The purified xylanases from *Cryptococcus laurentii* were characterized. The optimum temperature for the activity of Xln1 (M.W. 56,000) was 50°C and that for the activity of Xln2 (M.W. 23,500) was 50-55°C. The optimum pH for the activities of Xln1 and Xln2 were pH 4.0. Enzymes were stables at 50°C for 30 min. and 60°C for 3 min. The Xln1 had a K_m of 4.0 mg/ml and V_{max} of 28.31 U/mg protein. The Xln2 had a K_m of 7.69 mg/ml and V_{max} of 603.86 U/mg protein. The enzymes were completely inhibited by 10mM Cu^{2+} and 1% SDS. The enzymes degraded oat spelt xylan and produced xylose and xylooligosaccharide, indicating that they were endoxylanases.