ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เอ็นไซม์เอสเทอร์เรสจากเชื้อรา Myceliophthora thermophila

ชื่อผู้เขียน น.ส.มณีรัตน์ กันตังกุล

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

ผศ.ดร.ศิริรัตน์	สาระเวก	ประธานกรรมการ
รศ.ดร.พูนศุข	ศรีโยธา	กรรมการ
อ.ดร.ไพโรจน์	กิจจนะพานิช	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อผลิตเอ็นไซม์เอสเทอร์เรสจากการเลี้ยง Myceliophthora thermophila บนอาหารแข็งพบว่าฟางข้าวแห้งและรำข้าวจ้าวในอัตราส่วน 7:3 เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุด มีส่วนผสมของน้ำต่ออาหารแข็งเป็น 1.2:1 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 3 วัน สารละลายที่เหมาะสมในการสกัดเอ็นไซม์คือ 0.9 % NaCl ในน้ำกลั่น และ 0.9 % NaCl ใน 0.01 M acetate buffer pH 5.0 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดคือ 3 ชั่วโมง

เตรียมเอ็นไซม์เอสเทอร์เรสให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวร้อยละ 25-75 ของ $(NH_4)_2SO_4$ และผ่านคอลัมน์ของ DEAE-Sephadex A-50 Sephadex G-100 และ Sephadex G-75 ตามลำดับ พบว่ามีไอโซไซม์ของเอสเทอร์เรส 4 ชนิด คือ เอสเทอร์เรส I, II, III และ IV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 69000, 60000, 66000 และ 36000 หาโดยวิธี gel filtration และ 71000, 62000, 66000 และ 39000 หาโดยวิธี SDS-gel electrophoresis ซึ่งเอสเทอร์เรส I, II, III และ IV เป็น monomeric enzyme เอสเทอร์เรส I, III และ II, IV คงทนต่อความร้อนที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 55 และ 60 °ซ ตามลำดับ เอสเทอร์เรส I, II, III และ IV มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานคือ 8, 7, 5.5 และ 6 ตามลำดับ เอสเทอร์เรส I มีความคงทนต่อ pH ในช่วง 5-8 ส่วนเอ็นไซม์อีก 3 ชนิดคงทนต่อ pH ในช่วง pH 5.57 เอ็นไซม์ที่พบสามารถย่อยสลายสับสเทรตที่เป็นเอสเทอร์ของ Tri-glyceride, aliphatic และ aromatic โดยที่เอสเทอร์ของ Triglyceride เป็นสับสเทรตที่ดีที่สุด สำหรับเอสเทอร์-เรส I, II และ III ในบรรดา aromatic ester ที่นำมาศึกษา MAS เป็นสับสเทรตที่ดีที่สุดของเอสเทอร์เรส I, II, III และ IV มีค่า V_{max} คือ 16.67, 12.5, 8.33 และ 3.57 u mole min^{-1} ตามลำดับ และเอ็นไซม์ทั้ง 4 ชนิดทำงานร่วมกันแบบ Synergistic action เมื่อย่อยสลาย MAS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Esterase from Myceliophthora thermophila

Author Ms.Maneerat Kantangkul

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assist.Prof.Dr.Sirirat	Sarawak	**Chairman**
Assoc.Prof.Dr.Poonsook	Sriyotha	**Member**
Lecturer Dr.Pairoje	Kijjanapanich	**Member**

Abstract

In maximum esterase production from Myceliophotora thermophila by solid culture method, the effects of environment factors were investigated. It was found that rice straw and rice bran in a proportion of 7:3 was the best medium for cultivation of the fungi in 3 days at 45°C, while the optimum ratio of the water content of the medium was 1.2:1. Both 0.9 % NaCl in water and 0.9 % NaCl in 0.01 M acetate buffer pH 5.0 were the suitable extractant, and the optimum extraction time was 3 hours

Esterases were purified using 25-75 % $(NH_4)_2SO_4$ saturation, followed by chromatography on DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100 and Sephadex G-75 respectively. Four esterases were found, namely Esterase I, II, III and IV, the molecular weight was estimated by gel filtration were about 69000, 60000, 66000 and 36000 and by SDS-gel electrophoresis were about 71000, 62000, 66000 and 39000 respectively, all esterases were monomeric enzyme.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

To study enzyme characteristics of MAS esterase activity, the optimum incubation time was 25 minutes and the Esterase I, II and III, IV contents were 0.25 and 0.3 units/min respectively. The optimum temperature for Esterase I and II were 40°C, the other forms were 45°C. The thermal stability of Esterase I, III and II, IV were 55 and 60°C respectively. The optimum pH of Esterase I, II, III and IV were 8, 7, 5.5 and 6 respectively. Esterase I was stable at the pH range of 5-8 while the other forms of esterase were stable at the pH range of 5.5-7. Four esterases could hydrolyse tri-glyceride esters, aliphatic esters and aromatic esters, especialy tri glyceride ester was the best substrate of Esterase I, II and III. Among aromatic esters studied, MAS was the best substrate of the enzymes. The V_{max} value of Esterase I, II, III and IV were 16.67, 12.5, 8.33 and 3.57 u mole/min respectively. Four esterase showed synergistic action with MAS as substrate.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved