Thesis Title	Optimization of Conditions for Xylanase Production and Enzyme Kinetic Studies from *Streptomyces* sp. AB106.3
Author	Mr. Thanakorn Charoenrat
M.S.	Biotechnology
Examining Committee	Assoc. Prof.Dr. Naiyatat Poosaran Chairman Asst. Prof.Dr. Sitisin Bovonsombut Member Dr. Pichet Itkor Member

ABSTRACT

Xylanases were produced by *Streptomyces* sp. Ab106.3 on agricultural waste cane bagasses. The effect of external factors, pH and temperature on the xylanase production were studied. In addition, the optimization by using central composite experimental design and response surface methodology was investigated. The effects of two parameters were found to be significant to the xylanase production. The second order quadratic model and response surface methodology were revealed that the optimum condition for xylanase production was 50 °C and pH 7.2. The maximum yield of xylanases was about 14 IU. To test for the accuracy of the model, It was revealed that the growth and enzyme production on the rotary shaker was 14.1IU/ml. This fitted very well with the quadratic response surface optimization. The enzyme profiles were investigated. The optimum temperature and pH were 60-65°C and 6.0, respectively. More than 70% of the enzyme activity was still found at 65°C in the alkaline condition of pH 9.0. At 65 °C and pH 9.0 , the half life of xylanases was 3 h. The effects of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite on xylanase stability were investigated. At 65°C, it retained 50 per cent of the activity at hydrogen peroxide concentration of 0.1 per cent w/v. For the effect of sodium hypochlorite concentrations, the xylanases lost their activities in the present of sodium hypochlorite. It was revealed that, the use of enzyme in cooperation with bleaching reagents such as hydrogen peroxide and sodium hypochlorite in pulp bleaching process was not suitable. Enzyme kinetics by using

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Lineweaver –Burk plot were investigated at 65 °C , pH 7. The Michaelis constant, K_m, and maximum reaction rate, V_{max},of crude enzyme were 18.66 mg/ml and 12.91 μ mol/mg protein-min, respectively. The inhibition effect of hydrogen peroxide on the xylanases was mixed-inhibition. For mixed-inhibition, the inhibition constants (Ki , Ki') and kinetic constant (K_m and V_{max})were 0.0704 and 0.038 mg 18.74 mg/ml and 13.05 μ mol/mg protein-min, respectively. Crude xylanases from *Streptomyces* sp. Ab106.3 were tested for their abilities to hydrolyse hemicellulose and lignin release from kraft pulps in conjunction with hydrogen peroxide in one-stage or multistage bleaching of pulp. It was found that, the XH treated pulp (xylanase pretreated pulp was further treated with hydrogen peroxide) showed higher reducing sugar concentrations about 3.4, 2.6 and 2.4 fold than HX treated pulp (hydrogen peroxide pretreated pulp was further treated with xylanases), when 5, 10 and 15 IU/g pulp were employed at 55°C, respectively. The release of lignin derived compounds (280nm) and chromophore (465nm) of XH treatment were higher than HX treatment about 2.3 and 4.3 fold, respectively. In addition, the brightness of the XH treatment was a little bit higher than that of the HX treatment about 1.5 per cent, when 5, 10 and 15 IU of enzyme /g pulp were employed at 55°C.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์จากเชื้อ *Streptomyces* sp.AB106.3
ชื่อผู้เขียน	นาย ธนากร เจริญรัตน์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์ ประธานกรรมการ ผศ.ดร. สิทธิสิน บวรสมบัติ กรรมการ ดร. พิเชฐ อิฐกอ กรรมการ

บทคัดย่อ

Streptomyces sp. AB106.3 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไซลาเนสที่อุณหภูมิสูง โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ได้มีการศึกษาปัจจัยภายนอกได้แก่ค่าความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตไซลาเนส ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักได้นำการออกแบบการทดลองและกระบวนการตอบสนองแบบพื้นที่มาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักโดยเลือกใช้แผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) ซึ่งพบว่าปัจจัยทั้งสองที่ใช้ในการศึกษาเป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อการผลิตไซลาเนส ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปสมการแบบหุ่นจำลองกำลังสอง และหลังจากใช้กระบวนการตอบสนองแบบพื้นที่พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลเนส คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.2 ซึ่งจะทำให้ได้ไซลาเนสสูงสุด 14.0 IU จากการทดสอบความเที่ยงตรงของแบบหุ่นจำลองพบว่าที่สภาวะดังกล่าวการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในฟลาก์สบนเครื่องเขย่ามีกิจกรรมของไซลาเนสเท่ากับ 14.1 ยูนิต/มล. ซึ่งสอดคล้องกับการใช้กระบวนการตอบสนองแบบพื้นที่ในการหาจุดที่เหมาะสมในการผลิตไซลาเนส การทดสอบคุณสมบัติของไซลาเนสที่ไม่บริสุทธิ์จากเชื้อ *Streptomyces* sp. AB106.3 พบว่ามีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 – 65 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 6.0 โดยที่สภาวะอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 9.0 เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าครึ่งชีวิต (Half life , t_d) เท่ากับ 3 ชั่วโมง จากการศึกษาผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ต่อความเสถียรของเอนไซม์พบว่า ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสจะทำให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมในทุกค่าความเข้มข้นของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โซเดียมไฮโปคลอไรด์ทุกสภาวะอุณหภูมิ แสดงให้เห็นว่าไม่สมควรใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไฮโปคลอไรด์พร้อมกับเอนไซม์ในการฟอกสีเยื่อกระดาษ การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์นี้ที่ 65 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 7.0 โดยวิธี Lineweaver – Burk plot พบว่ามีค่า K_m และ ค่า V_{max}, เท่ากับ 18.66 มก. / มล. และ 13.91 ไมโครโมล / มก.โปรตีน-นาที ตามลำดับ ผลการยับยั้งกิจกรรมของไซลาเนสโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นการยับยั้งแบบผสมซึ่งมีค่าคงที่การของยับยั้ง (Ki , Ki') เท่ากับ 0.0704 มก. และ0.038 มก. และมีค่า K_m และ ค่า V_{max}, เท่ากับ 18.74 มก. / มล. และ 13.05 ไมโครโมล / มก.โปรตีน-นาที จากการทดสอบประสิทธิภาพของไซลาเนสที่ไม่บริสุทธิในการย่อยเฮมิเซลลูโลสและการปลดปล่อยลิกนินจากเยื่อกระดาษคร๊าฟร่วมกับการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งแบบขั้นตอนเดียวและหลายขั้นตอน พบว่าการฟอกสีโดยใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ยูนิต / ก. เยื่อกระดาษ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 แล้วตามด้วยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฟอกสีเยื่อกระดาษจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมา 3.4 , 2.6 และ 2.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วตามด้วยการใช้เอนไซม์ ในการใช้เอนไซม์ก่อนแล้วตามด้วยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฟอกสีกระดาษคร๊าฟจะได้สารประกอบลิกนินที่ปลดปล่อยออกมาและสารพวก chromophore สูงกว่าการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วตามด้วยการใช้เอนไซม์ในการฟอกสีกระดาษคร๊าฟประมาณ 2.3 และ 4.3 เท่า และพบว่าค่าความสว่างของเยื่อกระดาษที่ได้จากการใช้เอนไซม์แล้วตามด้วยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์อออกไซด์จะสูงกว่าการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วตามด้วยการใช้เอนไซม์ประมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เอนไซม์ 5, 10 และ 15 ยูนิต/ ก. เยื่อกระดาษ ที่สภาวะ 55 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved