Thesis Title	Screening, Purification and Characterization of Lignin Degradation Enzyme from Endophytic *Xylaria* spp.	
Author	Miss Chonticha Urairuj	
Master of Science	Biotechnology	
Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairman
	Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch	Member
	Asst. Prof. Dr. Sittisin Bovonsombut	Member

ABSTRACT

Five hundred and eighty-one isolates of endophytic *Xylaria* spp. were screened on poly R-478 agar plate. Among them, strain CMUX15 and CMUX144 decolorized the dye. In LBM medium, supplemented with 0.2% (w/v) lignin powder CMUX15 produced extracellular laccase 10 mU/ml and the same condition Manganese-independent Peroxidase (MIP) activity of 105 mU/ml was obtained from culture broth of CMUX144. Optimum condition for MIP production from CMUX144 was investigated. The highest MIP activity of 276 mU/ml was achieved after cultivation in a medium containing 4% glucose, 0.75% ammonium tartrate, 0.3% lignin powder, pH 5.5 at 30°C for 6 days. In optimized medium, CMUX144 showed 96% poly R-478 decoloration rate at 10 days of cultivation. The decoloration of Remazol brilliant blue R, Remazol brilliant violet, Coomassie brilliant blue R and Phenol Red was also determined. The dyes were decolorized with 99.8, 99.6, 100 and 99.8%, respectively within 10 days. MIP was purified to homogeneity using DEAE-

Sepharose Fast Flow column chromatography, Ultrafiltration and Sephadex G-150 gel filtration. The enzyme was purified 77.65-fold with a 26.95% yield. The protein determination by SDS-PAGE led to the one predominant protein band with a molecular mass of approximately 70 kDa. The purified enzyme exhibited the highest specificity to 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) and consequently reacted with guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol (DMP), syringaldazine (SYG), *p*-anisidine and veratryl alcohol. The optimal pH of the purified enzyme activity was very depend on substrates. With ABTS, the pH optimum was 3.0. For the oxidation of DMP, guaiacol, SYZ, *p*-anisidine and veratryl alcohol, the pH optima were 4.5, 5.0, 5.5, 5.0 and 4.5, respectively. The purified MIP remained quite stable within the pH range of 4.0-7.0 after 24 h of incubation at 4°C. The half-life of the enzyme after heat inactivation at 50, 60°C were 60 and 10 min, respectively. K_m and V_{max} of the enzyme toward DMP were 826.3 μM and 16.5 μmole/mg protein and toward with H_2O_2 were 92.04 μM and 18.25 μmole/mg protein, respectively. The purified MIP was strongly inhibited by Fe^{2+}, NaN_3 and KCN at 1 mM concentration.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การคัดเลือก, การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อราเอนโดไฟติกไซลาเรีย
ชื่อผู้เขียน	นางสาว ชลทิชา อุไรรุจน์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.สายสมร ลำยอง ประธานกรรมการ
	ดร. ชาติชาย โขนงนุช กรรมการ
	ผศ.ดร. สิทธิสิน บวรสมบัติ กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟติกไซลาเรียทั้งหมด 581 ไอโซเลต พบว่าสายพันธุ์ CMUX15 และ CMUX144 สามารถเปลี่ยนสี Poly R-478 ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเบื้องต้นได้ และเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 0.2% (w/v) ผงลิกนิน พบว่า CMUX15 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส 10 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่ CMUX144 ผลิตเอนไซม์แมงกานีส-อินดีเพนเดน เปอร์ออกซิเดส 105 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตรที่สภาวะเดียวกัน สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมงกานีส-อินดีเพนเดน เปอร์ออกซิเดสจากสายพันธุ์ CMUX144 คืออาหารเหลวที่มี 4% น้ำตาลกลูโคส, 0.75% แอมโมเนียมทาร์เทรต, 0.3% ผงลิกนิน, 0.05% veratryl alcohol ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 276 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร จากการศึกษาการย่อยสลายสีต่างๆ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ CMUX144 สามารถย่อยสลายสี Poly R-478 มากกว่า 96% เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน รวมทั้งสี Remazol brilliant blue R, Remazol brilliant violet, Coomassie brilliant blue R และ Phenol Red ถูกย่อยสลายมากกว่า 99.8, 99.6, 100 และ 99.8% ตามลำดับภายในระยะเวลา 10 วัน เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้การแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE-Sepharose Fast Flow, อัลตราฟิวเตรชั่น และเจลฟิวเตรชั่น Sephadex G-150 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 77.65 เท่า ที่ผลผลิต 26.95% และมีค่ามวลโมเลกุลประมาณ 70 กิโลดาลตันจากการทำ SDS-PAGE เอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วมีค่ากิจกรรมสูงสุด เมื่อใช้ 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS), guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol (DMP),

syringaldazine (SYG), *p*-anisidine และ veratryl alcohol เป็นสับสเตรทตามลำดับ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานพบว่าขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท โดยเมื่อใช้ ABTS, guaiacol, SYZ, *p*-anisidine และ veratryl alcohol เป็นสับสเตรท ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมคือ 3.0, 4.5, 5.0, 5.5, 5.0 และ 4.5 ตามลำดับ และมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0-7.0 มีค่าครึ่งชีวิตของการเสียสภาพการทำงานด้วยความร้อนนาน 60 และ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ เอนไซม์มีค่า K_m และ V_{max} ต่อ DMP เท่ากับ 826.3 ไมโครโมลาร์ และ 16.5 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และต่อ H_2O_2 เท่ากับ 92.04 ไมโครโมลาร์ และ 18.25 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงจากการเติม Fe^{2+}, NaN_3 และ KCN ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University