4

เดกซ์แทรนเนสจาก Penicillium sp. สายพันธุ์ 61

นาย เอก แสงวิเชียร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974-576-287-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015781
i 10300446

Dextranase from *Penicillium* sp.strain 61

Mr. Ek Sangvichien

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A.Thesis submitted in Partial Fulfillments of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-576-287-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ เดกซ์แทรนเนส จาก Penicillium sp.สายพันธุ์ 61

โดย นายเอก แสงวิเชียร

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ การศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอก แสงวิเชียร : เดกซ์แทรนเนสจาก Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 (Dextranase from Penicillium sp. strain 61) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, 93 หน้า.

จากการคัดเลือกเชื้อราจากตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 240 สายพันธุ์ พบว่ามีราที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ 22 สายพันธุ์ โดยมีเชื้อรา 5 สายพันธ์ สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูง เชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 เป็นราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถให้เดกซ์แทรนเนสได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเดกซ์แทรนน้ำหนักโมเลกุล $3-50\times10^{5}$ ความเข้มข้น 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่า $NaNO_3$ เป็นสารที่ทำให้การผลิตเอนไซม์เกิดได้ดี ในขณะที่เกลือแอมโมเนียมชนิดต่าง ๆ และสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เปปโตน สารสกัดยีสต์ และ corn steep liquor กลับให้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำกว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากรา Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 นี้ คือ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 5-6 อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) โดยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ Penicilllium sp. สายพันธุ์ 61 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 42 หน่วยต่อมล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อภายในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ

สำหรับคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 นี้ มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 5.5 ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเอนไซม์จะมีความเสถียรต่อกรดด่างที่ pH 5-8 อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสได้นานกว่า 30 นาที เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสนี้มีค่า Km เป็น 1.6×10^{-5} โมลาร์สำหรับสับสเตรทเดกซ์แทรน T-2000 และมีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะ แอลฟา 1,6

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

EK SANGVICHIEN : Dextranase from Penicillium sp. strain 61 .
THESIS ADVISOR : ASST.PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D. 93 pp.

Of all 240 fungal strain isolated from Thai soil samples, twenty two isolates possessed capability of producing the enzyme dextranase . Among them ,the Penicillium sp. strain 61 gave the highest yield of dextranase when cultivated in a medium containing 1.0% dextran (mw.3-50x10^6) as carbon source .In case of nitrogen source ,enzyme from medium with $NaNO_3$ as nitrogen source showed higher activity than any other ammonium salts as well as other organic nitrogen materials such as: yeast extract, peptone and corn steep liquor. The optimal conditions for the dextranase production were at the initial pH 5-6 and at 30-35°C (room temperature) by these optimal conditions the Penicillium sp. strain 61 yielded of 42 units/ml. when cultivated for 6 days.

The properties of dextranase from Penicillium sp. strain 61 were characterized ,the maximal activity was observed at 55°C in 0.05 M acetate buffer pH 5.5 .The enzyme possesses pH stability from 5 to 8 and thermal stability up to 55°C for 30 minutes. The Km value of the dextranase for dextran T-2000 as a substrate was 1.6x10^{-6} molar and the enzyme showed its specificity toward α-1,6 glucosidic linkage.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์บทนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอ.ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อน และ น้องๆ ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ ของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติ พี่ น้อง ทุกคน ที่ได้สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
คำย่อ ..... ฎ
บทที่
1. บทนำ 1
2. อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย 19
3. ผลการวิจัย 31
4. คำอภิปราย และสรุปผลการวิจัย 74
เอกสารอ้างอิง 82
ภาคผนวก 88
ประวัติผู้เขียน 94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อราที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน	34
2.	ผลเปรียบเทียบหัวเชื้อจากอาหาร PDA และอาหารแข็งสูตร Fukumoto ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส	38
3.	ผลของสูตรอาหารชนิดต่างๆต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	39
4.	ผลของชนิดเดกซ์แทรนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ...	41
5.	ผลของปริมาณเดกซ์แทรนที่ใช้ในอาหารต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	42
6.	ผลของแหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือไนเตรทต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	43
7.	ผลของแหล่งไนโตรเจนในรูปสารประกอบอินทรีย์ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	45
8.	ผลของแหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือแอมโมเนียมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส .	46
9.	ผลของการเติม K_2HPO_4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	48
10.	ผลของการเติม KCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	49
11.	ผลของการเติม $MgSO_4$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	50
12.	ผลของการเติม $FeSO_4$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	51
13.	ผลของเกลือแร่บางชนิดที่เสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	52
14.	ผลของสารบางชนิดที่เสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Pencillium sp. สายพันธุ์ 61.....	54
15.	ผลของความเป็นกรดด่าง(pH) เริ่มต้นต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส	56
16.	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61	57
17.	ผลความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61	58

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
18.	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส	60
19.	ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส	61
20.	ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส	62
21.	ผลความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสต่ออุณหภูมิ	65
22.	ผลความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสต่อความเป็นกรดด่าง	66
23.	ผลความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสต่อความเข้มข้นอะซีเตทบัฟเฟอร์	68
24.	การหาค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยวิธี Lineweaver-Burk ..	72
25.	แสดงผลของการหาชนิดผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน	73
26.	แสดงลักษณะสายใยและสปอร์ของเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61..	92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

มล.= มิลลิลิตร

มก.= มิลลิกรัม

ก.= กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย