การผลิตลินามาเรสจากยีสต์

นางสาวชัญญา นุทธิชันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
น.ศ. 2533

ISBN 974-577-895-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016389
I 10311436

Production of Linamarase from Yeasts

Miss Chunya Puttikhunt

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1990

ISBN 974-577-895-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตลินามาเรสจากยีสต์

โดย นางสาว ชัญญา พุทธิชันธ์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

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

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.มนตรี จุฬาวัฒนทล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ชัญญา พุทธิชันธ์ : การผลิตลินามาเรส่จากยีสต์ (PRODUCTION OF LINAMARASE FROM YEASTS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร , 99 หน้า.ISBN 974-577-895-8

ในการคัดแยกเชื้อยีสต์ 131 สายพันธุ์ที่แยกได้จากมันสำปะหลังสดหมัก พบว่ามีแอคติวิตีของเบต้า-กลูโคซิเดส 101 สายพันธุ์ เมื่อนำยีสต์ทั้ง 101 สายพันธุ์นี้มาตรวจสอบแอคติวิตีของลินามาเรส พบว่า มี 42 สายพันธุ์ที่มีลินามาเรสแอคติวิตีในอาหารที่มีลินามาริน และ 12 สายพันธุ์มีลินามาเรสแอคติวิตีในอาหารที่ไม่มีลินามาริน ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ที่ทำการศึกษาเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ผลิตลินามาเรสที่มีแอคติวิตีสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน แบคโตเปปโตน 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน ผงสกัดมอลท์ 0.3% และผงสกัดยีสต์ 0.3% เป็นแหล่งของวิตะมิน และโปแตสเซียมไซยาไนด์ 40ส่วนในล้านส่วน สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตลินามาเรสโดยยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ได้แก่ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 โดยเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ลินามาเรสที่มีแอคติวิตี 3.75 หน่วยต่อกรัมเซลเปียก

ผลการทดลองสกัดและทำให้ลินามาเรสจากยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 บริสุทธิ์ พบว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-60% ตามด้วยการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-โตโยเพิร์ล 650เอ็ม และคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน เอชคับเบิลยู-55 จะได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 61.5 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์ 41.2% เอนไซม์ลินามาเรสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 110,000 ดาลตัน มีค่า Km ต่อลินามารินและ PNPG เท่ากับ 2.94 และ 0.07 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 20-45 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาทางอนุกรมวิธาน เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ B-1-14 นี้อาจเป็น Hansenula anomala

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

CHUNYA PUTTIKHUNT : PRODUCTION OF LINAMARASE FROM YEAST. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SUMALEE PICHYANGKURA, Ph.D. 99 PP.

In the screening of 131 yeast strains isolated from fermented cassava, 101 strains were found to exhibit -glucosidase activities. Forty-two out of the 101 strains showed linamarase activity when grown in the presence of linamarin and 12 strains showed linamarase activity when grown in the absence of linamarin. The experimental results showed that linamarases from yeasts used in this study were intracellular enzymes..The yeast strain B-1-14 was found to produce linamarase with the highest activity in a liquid medium containing 0.5% glucose as a carbon source , 0.5%bactopeptone as a nitrogen source , 0.3% malt extract and 0.3% yeast extract as vitamin sources and 40 ppm KCN. The optimal cultivation conditions for linamarase production by the yeast strain B-1-14 were initial pH 6.0 , shaking speed 150 rpm , and 30 C growth temperature. Under these conditions , 3.75 units/g. fresh weight of linamarase activity was obtained when cultivated for 48 hours.

The results of the extraction and purification of linamarase from yeast strain B-1-14 showed that the fractional precipitation with 30-60% saturation of ammonium sulfate followed by column chromatography on DEAE-TOYOPEARL 650 M and TOYOPEARL HW-55 gel filtration yielded and enzyme with a 61.5-fold increase in purity and 41.2% recovery. The purified enzyme was found to have an apparent molecular weight of 110,000 daltons. The Km values for linamarin and PNPG were found to be 2.94 and 0.07 mM , respectively. The optimal conditions for enzyme activity were 40°C and pH 6.5. The enzyme was found to be stable in the temperature range of 20°-45°C.

The results of the taxonomic studies to identify the yeast strain B-1-14 indicated that the strain may be Hansenula anomala.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้สมบูรณ์ ภายใต้แนวความคิดคำปรึกษาอย่างดียิ่งในเชิงวิชาการ และการปฏิบัติของรองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ Dr.S.Kinoshita ภาควิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการเตรียมลินามาริน จากมันสำปะหลัง และการสกัดแยกเอนไซม์ลินามาเรสให้บริสุทธิ์ รวมทั้งได้กรุณามอบเจลที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วย และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพาณิชการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการจำแนกเชื้อยีสต์

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.มนตรี จุฬาวัฒนกล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อการใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย รวมทั้งเพื่อนและพี่น้อง ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่ได้สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญรูป..... ฌ

คำย่อ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง..... 17

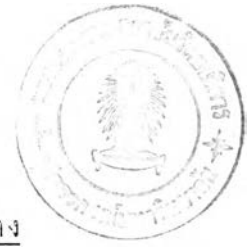
3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง..... 31

4 สรุปผลการทดลอง..... 76

เอกสารอ้างอิง..... 79

ภาคผนวก..... 86

ประวัติผู้เขียน..... 99



สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงสายพันธุ์ยีสต์ ที่มีการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสในอาหารเหลว ที่มีการเติมและไม่เติมลินามาริน 0.05% 34
2. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ลินามาเรส ในอาหารเหลว 2 ชนิด คือ YM และซาเพคคอกซ์ ที่ไม่มีลินามาริน 35
3. แสดงผลของ Tween-80 เข้มข้น 0-1.0% และ TRITON X-100 เข้มข้น 0-5% ต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ลินามาเรสจากเซลยีสต์ B-1-14 ... 51
4. ลำดับขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อยีสต์ B-1-14 ให้บริสุทธิ์ 60
5. แสดงผลการทดสอบทางสรีรวิทยาของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 เมื่อเลี้ยง ในอาหารชนิดต่าง ๆ 75

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แสดงการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสบนอาหารแข็งที่ฉาบด้วย 1%PNPG..... 32
2. แสดงผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส 37
3. ผลของการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 38
4. ผลของการแปรชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 39
5. แสดงผลของการแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดมอลท์ต่อการผลิตลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 41
6. ผลของการแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์ ต่อลินามาเรสแอคติวิตีของยีสต์ B-1-14 42
7. แสดงผลของการเติมแหล่งเกลือแร่บางชนิดในอาหารเหลวต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสของยีสต์ B-1-14 44
8. แสดงอิทธิพลของ pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 45
9. แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสของเชื้อยีสต์ B-1-14 47
10. แสดงผลของความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส 48
11. แสดงผลของโปแตสเซียมไซยาไนด์ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อยีสต์ B-1-14 50
12. ก) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และการเจริญกับการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสของเชื้อยีสต์ B-1-14 ในอาหารเหลวปรับสูตรที่เติม KCN 40 ppm 53
12. ข) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และการเจริญ กับการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสของยีสต์ B-1-14 ในอาหารเหลวปรับสูตรที่ไม่เติม KCN 54
13. แสดงโครมาโตกราฟีของเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อยีสต์ B-1-14 ในคอลัมน์ DEAE-TOYOPEARL 650 M 57

รูปที่ หน้า

14. แสดงโครมาโตกราฟีของเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อยีสต์ B-1-14 ในคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน TOYOPEARL HW-55 59
15. แสดงผลการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อยีสต์ B-1-14 61
16. แสดงเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 บนคอลัมน์ TOYOPEARL HW-55..... 63
17. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลและค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน 64
18. แสดงการหาค่า K_m ของเอนไซม์ลินามาเรส เมื่อใช้ลินามารินเป็นสับสเตรท 66
19. แสดงการหาค่า K_m ของเอนไซม์ลินามาเรสเมื่อใช้ PNPG เป็นสับสเตรท 67
20. แสดงผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรสจากยีส..ต์ B-1-14 69
21. แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14..... 71
22. แสดงความเสถียรของเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 72
23. แสดงแอสโคสปอร์ รูปหมวกในแอสคัสของเชื้อยีสต์ B-1-14 ในอาหารแข็งโปตัสเซียมอะซิเตท..... 74

ค่าย่อ

ซม. = เซนติเมตร

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม

ชม. = ชั่วโมง