นางสาว อุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2535

ISBN 974-581-583-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 1807991X

Immobilization of Dextranase on Activated Carbon

Miss Usanee Kulintornprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-583-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดรึงรูปเดกซ์แทรนเลบนคาร์บอนกัมมันต์
โดย	นางสาวอุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนิยวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน ลีหนันทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนิยวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปราณี อ่านเปรื่อง)

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

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิระวุฒิ มหามนตรี)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ :การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์ (IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE ON ACTIVATED CARBON) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, รศ. ดร. บราณี อ่านเปรื่อง, 120 หน้า. ISBN 974-581-583-7

จากการศึกษาตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 โดยมีคาร์บอนกัมมันต์ขนาด 8-16 เมช เป็นตัวพยุง และตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์โดยใช้ 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลนเป็นสารกระตุ้น และกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปคือ ใช้ 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลน 2% โดยปริมาตรร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% โดยปริมาตร และความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส 25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยทำที่อุณหภูมิห้อง ความเป็นกรดด่างที่ 6 และเวลาที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงรูปคือ 3 ชั่วโมงสำหรับการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น 2 ชั่วโมงสำหรับการสร้างพันธะร่วม และ 2 ชั่วโมงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

ผลของการศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป พบว่า มีแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้น ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเปลี่ยนแปลงจาก pH 5.5 ไปเป็น pH 5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานนั้นไม่แตกต่างจากเอนไซม์อิสระ ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง และต่ออุณหภูมิดีกว่าเอนไซม์อิสระ และยังพบว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปนี้มีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 45 วัน เมื่อเก็บในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และค่าคงที่ไมคิลิสมีค่าเท่ากับ 9.1×10^{-7} โมลาร์สำหรับสับสเตรทเดกซ์แทรน ที-2000 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่าคงที่ไมคิลิสของเอนไซม์อิสระ

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C125849 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD : IMMOBILIZATION/DEXTRANASE/ACTIVATED CARBON
USANEE KULINTORNPRASERT : IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE ON ACTIVATED CARBON. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D. AND ASSO. PROF. PRANEE ANPRUNG, Ph.D. 120 PP. ISBN 974-581-583-7

Dextranase from Penicillium sp. strain 61 has been immobilized on 8-16 mesh activated carbon via covalent binding by the use of 3-aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde as activator and intermolecular cross-linker respectively. The optimum conditions for immobilization were : 2% (v/v) 3-amino-propyltriethoxysilane, 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 25 units/ml of crude dextranase at room temperature, pH 6. Times required for activating, cross-linking and enzyme immobilizing were 3,2 and 2 hours respectively.

Characteristics of the immobilized enzyme have been studied and revealed, it was found that the immobilized form possesses higher specific activity, more stable to pH and temperature effects compared to native from while optimum operating pH shifed from 5.5 to 5.0 and optimum temperature remained unchanged. A half-life of over 45 days was obtained when the immobilized enzyme was stored in 0.1 M. phosphate buffer pH 7, 4°C. Moreover, the apparent Km of the immobilized enzyme toward its substrate, dextran T-2000 was lowered to 9.1×10^{-7} M.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัย รวมทั้งการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์เป็นอย่างดี ซึ่งข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์ลิน สิหนนทน์ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้กรุณาให้กำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนวิจัยบางส่วนสำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณคุณสุวดี ศิริ ที่คอยช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งในการจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์เสร็จอย่างสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ญ

คำย่อ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 28

3. ผลการวิจัย 47

4. อภิปรายผลการวิจัย 84

5. สรุปผลการวิจัย 99

เอกสารอ้างอิง 103

ภาคผนวก 111

ประวัติผู้เขียน 120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบผลการสำรวจอ้อยประจำฤดูการผลิตปี 2532/33 และ 2531/32	2
2	ผลผลิตและประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลและกากน้ำตาล	3
3	การสูญเสียน้ำตาลในน้ำอ้อยทั้งที่เกิดในไร่อ้อยและในโรงงาน	10
4	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำอ้อย	11
5	เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตเดกซ์แทรนเนส	15
6	เปรียบเทียบการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนเมทริกซ์ชนิดต่างๆ	48
7	ผลของความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับต่างๆ ต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนคาร์บอนกัมมันต์	50
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน	51
9	การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน	52
10	ผลของความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับต่างๆ ต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนคาร์บอนกัมมันต์	54
11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
12	การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน.....	56
13	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$.....	58
14	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$.....	59
15	ผลของการแปรผันเวลาในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$.....	67
16	สรุปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในงานวิจัยอื่นๆ.....	95
17	ภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป.....	99
18	คุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ.....100	
19	คุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ.....101	

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายดิบ	8
2	กรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายขาว	9
3	ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนจากเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส	12
4	การตริงเอนไซม์แบบต่างๆ	18
5	ปฏิกิริยาการตริงเอนไซม์กับโปรตีนโดยเกิดพันธะเชื่อมระหว่างโมเลกุลโดยกลูตารัลดีไฮด์	20
6	กลไกที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในขั้นตอนของการตริงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์โดยมี APTS เป็นสารกระตุ้นและกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม	25
7	กลไกที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในขั้นตอนของการตริงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์โดยมี CNBr เป็นสารกระตุ้นและกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม	26
8	แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์	36
9	ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป	61
10	ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในขั้นตอนการกระตุ้นเมทริกซ์โดยสารกระตุ้น	64
11	ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในขั้นตอนการสร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์	65
12	ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในขั้นตอนการตริงรูปเดกซ์แทรนเนส	66
13	ผลของการหลุดของเอนไซม์ หลังจากที่แยกเอาเดกซ์แทรนเนสตริงรูปออกจากสารผสมปฏิกิริยาที่เกิดปฏิกิริยาแล้ว 15 นาที และบ่มต่ออีก 15 นาที	69

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระ	71
15	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระ	73
16	ผลความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป	75
17	ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระ	76
18	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน	78
19	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน	79
20	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน	80
21	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน	81
22	ผลของการหาค่า K_m โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์ก	83
23	การวิเคราะห์การสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างตัวพยุงกับเอนไซม์	86

คำย่อ

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม