การผลิตและการทำไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *Rhizopus oligosporus* NS_1 ให้บริสุทธิ์

นางสาว นันทนา นิ่มเจริญนิยม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-157-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19861106

PRODUCTION AND PURIFICATION OF CHITIN DEACETYLASE FROM *Rhizopus oligosporus* NS_1

Miss Nunthana Nimcharoenniyom

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-333-157-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและการทำไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *Rhizopus oligosporus* NS_1 ให้บริสุทธิ์
โดย	นางสาว นันทนา นิ่มเจริญนิยม
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

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

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นันทนา นิ่มเจริญนิยม : การผลิตและการทำไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *Rhizopus oligosporus* NS_1 ให้บริสุทธิ์ (PRODUCTION AND PURIFICATION OF CHITIN DEACETYLASE FROM *Rhizopus oligosporus* NS_1) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร, 113 หน้า. ISBN 974-333-157-3

ในการคัดแยกเชื้อรา 67 สายพันธุ์ จากผลไม้ ลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งเหล้า จำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่ามี 18 สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส และได้จำแนกชนิดของเชื้อ พบว่า *Rhizopus oligosporus* NS_1 เป็นสายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงสุด เมื่อใช้สปอร์อายุ 2 วัน จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอน แบคโตเปปโตน 2.5% เป็นแหล่งไนโตรเจนและสารสกัดยีสต์ 0.4% เป็นแหล่งวิตามินที่ pH 5.0 ในภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) เป็นเวลา 4 วัน พบว่าราสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 0.948 มิลลิยูนิต

ได้สกัดเอนไซม์ไคติน - ดีอะเซทิลเลส จาก *R. oligosporus* NS_1 ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 55 - 85% แล้วแยกด้วยการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส และคอลัมน์เจลฟิลเตรชั่น เซฟาเด็กซ์ จี-75 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 24.4 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์ 6.7% จากเอนไซม์เริ่มต้น ไคติน-ดีอะเซทิลเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 28,000 ดาลตัน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส และจากวิธีเจลฟิลเตรชั่น จะได้น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29,000 ดาลตัน แสดงว่าเอนไซม์เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 55 °C ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 และเอนไซม์นี้มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างที่ 4.5-9.0 และเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 20-50 °C และพบว่า เอนไซม์ไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลออกจากสับสเตรทในรูปของผงไคติน และผงไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นต่างๆ (75.9-93.8 เปอร์เซ็นต์) ได้ต่ำ เมื่อใช้เวลาในการไฮโดรไลส์นาน 6 ชั่วโมง จึงอาจสรุปได้ว่า เอนไซม์จะทำงานได้ดีกับสับสเตรทไคติน ไคโตแซน ในรูปของสารละลาย มากกว่าในรูปของแข็ง

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นันทนา นิ่มเจริญนิยม

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

3970801523 : MAJOR INDUSTRAIL MICROBIOLOGY

KEY WORD : CHITIN DEACETYLASE / *Rhizopus oligosporus*

NUNTHANA NIMCHAROENNIYOM : PRODUCTION AND PURIFICATION OF CHITIN DEACETYLASE FROM *Rhizopus oligosporus* NS_1. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. SUMALEE PICHYANGKURA, Ph.D. 113 pp. ISBN 974-333-157-3

In the isolation of 67 isolates , obtained from 25 samples of fruits and lookpangs ,18 strains of fungi were found to produce chitin deacetylase. All isolates were compared, the highest chitin deacetylase producing strain was identified as *Rhizopus oligosporus* NS_1. The highest enzyme activity was determined after being cultured for 4 days from 10^6 inoculum of two days old spores/ml , in 50 ml of the medium that contained 1.5% glucose, 2.5% bactopeptone and 0.4% yeast extract, initial pH 5.0. The optimal cultivation conditions for chitin deacetylase production were shaking at 150 rpm, 30±2 ^{o}C, for 4 days , 0.948 mU/ml of chitin deacetylase activity was obtained. The results of the extraction and purification of chitin deacetylase from *R.oligosporus* NS_1 showed the fractional precipitation with 55-85% saturation of ammonium sulfate and followed by column chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G-75 gel filtration found 24.4 fold increase in the purity and 6.7% of recovery from the crude enzyme. The molecular weight of the purified enzyme , estimated via gel filtration , was 29,000 daltons. Analysis of the purified enzyme on SDS-PAGE revealed a single prominent band with molecular weight of 28,000 daltons. The result suggested that the enzyme chitin deacetylase consisted of a single polypeptide. The optimal temperature and pH of purified enzyme were determined. To be at 55 ^{o}C and pH 6.5 in acetate buffer. The enzyme was found to be stable in the pH range of 4.5-9.0 and temperature 20-50 ^{o}C. Chitin powder and chitosan powder with 75.9-93.8% degree of deacetylation were incubated with purified enzyme. The hydrolyzed activities were quite low after 6 hours of incubation period. It might indicate that the hydrolysis activities of this enzyme is better when chitin-chitosan were in a aqueous suspension than in the powder form.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต _____

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความช่วยเหลือและความกรุณาอย่างยิ่งของท่านรองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้ กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีวิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ รวมทั้งทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้ ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1.บทนำ..... 1

2.อุปกรณ์เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง..... 18

3.ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง..... 34

4.สรุปผลการทดลอง..... 81

รายการอ้างอิง..... 84

ภาคผนวก ก..... 88

ภาคผนวก ข..... 89

ภาคผนวก ค..... 95

ภาคผนวก ง..... 99

ภาคผนวก จ..... 100

ภาคผนวก ฉ..... 101

ประวัติผู้เขียน..... 113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปรียบเทียบราที่แยกได้ และให้ผลบวกของปฏิกิริยาโดยวิธี rapid test และให้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยวิธีเปรียบเทียบสี (colorimetric - method)..... 37

2 สรุปขั้นตอนต่างๆ ในการทำเอนไซม์ ไคติน-ดีอะเซทิลเลสจาก *R. oligosporus* NS_1 ให้บริสุทธิ์ 58

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของไคตินและเซลลูโลส.....	2
2	สูตรโครงสร้างของไคโตแซน.....	3
3	วิธีตรวจสอบแบบรวดเร็ว (rapid test).....	36
4	วิธีเปรียบเทียบสี (colorimetric method).....	36
5	Sporangium (A) Sporangiophore (B) และ Rhizoid (C) ของ *R. oligosporus* NS_1 (กำลังขยาย 20 เท่า) เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นพีดีเอ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3วัน	38
6	Chlamydospore ของ *R. oligosporus* NS_1 (กำลังขยาย 20 เท่า)	38
7	การเจริญ และการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลสของเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อวายพีจี.....	40
8	ผลการแปรผันอายุเชื้อ และจำนวนสปอร์ของเชื้อตั้งต้น ต่อแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1	41
9	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลแห้ง และแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยเลี้ยงเชื้อ *R.oligosporus* NS_1 เป็นเวลา 4 วันในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	43
10	ผลการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสในช่วง 1.0 - 3.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส.....	44
11	เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว150 รอบต่อนาที.....	46
12	เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน	

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
	ชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว150 รอบต่อนาที.....	47
13	ผลการแปรผันความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน - ดีอะเซทิลเลส โดยเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 4 วัน บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที.....	48
14	เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงในช่วง pH 3 - 8 และบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน.....	50
15	เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการ เลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 25-50 องศาเซลเซียสและบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4วัน.....	51
16	เปรียบเทียบแอคติวิตีของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร ปรับปรุง ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที.....	52
17	ผลการเติมสารบางชนิด เพื่อกระตุ้นการผลิต ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ใน อาหารสูตรปรับปรุงเปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติมสาร.....	54
18	น้ำหนักเซลล์แห้งและแอคติวิตีของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (extracellular enzyme) จากส่วนสกัดจากเซลล์ (intracellular enzyme) และจากส่วนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound enzyme) โดยการเลี้ยง เชื้อ *R. oligosporus* NS_1 เป็นเวลา 8 วัน ในอาหารสูตรปรับปรุงและเลี้ยงเชื้อ ภาวะที่เหมาะสม.....	56
19	โครมาโตกราฟีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *R. oigosporus* NS_1 บน คอลัมน์ DEAE - cellulose ขนาดคอลัมน์ 2.5 x 45 เซนติเมตร ชะเอนไซม์	

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
	โดยใช้ 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราการไหล 24 มิลลลิตรต่อชั่วโมง.....	60
20	โครมาโตกราฟี ของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 บนคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 1.6x60 เซนติเมตร ชะเอนไซม์โดยใช้ 0.05 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราการไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง..	61
21	ผลการเคลื่อนที่โปรตีนของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส.....	63
22	ผลเปรียบเทียบโปรตีนของไคติน-ดีอะเซทิลเลสบนเจลอิเลคโตรโฟริซิสจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์.....	64
23	เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของไคติน - ดีอะเซทิลเลสกับโปรตีนมาตรฐานโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ชนิดแผ่น	66
24	การหาน้ำหนักโมเลกุลของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์ ชนิดแผ่น.....	67
25	การหาน้ำหนักโมเลกุลของไคติน - ดีอะเซทิลเลส โดยการทำเจลฟิลเตรชั่นผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75.....	68
26	การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (Km) ของไคติน - ดีอะเซทิลเลสต่อไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9.....	70
27	ผลของความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ ไคติน-อะเซทิลเลส โดยตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรผันความเป็นกรดด่าง ต่างๆ ในการบ่มปฏิกิริยา.....	71
28	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก	

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
	R. oligosporus NS_1.....	73
29	ความเสถียรไคติน-ดีอะเซทิลเลสต่อความเป็นกรด-ด่าง โดยบ่มเอนไซม์ที่ pH 3-10 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์.....	74
30	ความเสถียรของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่ออุณหภูมิโดยบ่มเอนไซม์ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเดทบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส.....	75
31	ผลการใช้ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ไฮโดรไลส์ผงไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 85.4 และ 93.8 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดีอะเทิลเลชั่นที่เพิ่มขึ้น.....	78
32	เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ให้สมบูรณ์ของไคติน-ดีอะเซทิลเลสต่อสารละลายไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 85.4 และ 93.8 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นของสับสเตรทหลังบ่มด้วยเอนไซม์.....	79

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย