เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในทะเล

นางสาวณฐินี สุวรรณสิงห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2533

ISBN 974-579-134-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017714

DEXTRANASE PRODUCED BY MARINE BACTERIA

Miss Natinee Suvanasingha

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 974-579-134-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียในทะเล

โดย นางสาวณฐินี สุวรรณสิงห์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....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)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ณฐินี สุวรรณสิงห์ : เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในทะเล (DEXTRANASE PRODUCED BY MARINE BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน , 118 หน้า. ISBN 974-579-134-2

ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในทะเลจากดินเลนและน้ำทะเลแหล่งต่างๆจำนวนทั้งสิ้น 1092 สายพันธุ์ พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ 19 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 จะให้ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรม (น้ำหนักโมเลกุล 3 - 50 x 10^6) ความเข้มข้น 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอนและกรดคาซามิโน ความเข้มข้น 3.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 ในสภาวะดังกล่าวนี้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 12.8 หน่วยต่อมล.

ผลการศึกษาสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 พบว่า เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5 - 7.5% เอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.5 - 8.0 และเสถียรต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสได้นานกว่า 30 นาที ในขณะที่สูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดหากบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 ด้วยโครมาโตกราฟีกระดาษจะพบน้ำตาลไอโซมอลโตสเป็นส่วนผลิตภัณฑ์หลักร่วมกับโอลิโกแซคคาร์ไรด์เป็นบางส่วน ซึ่งแสดงว่า เอนไซม์นี้มีรูปแบบการย่อยสลายชนิด เอนโด- (endo-) และการย่อยสลายนี้มีความจำเพาะต่อพันธะชนิด α-1,6

การทำเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีของเซฟาโรส 4บี และ ดีอีเออี-เซลลูโลสนั้น พบว่า สามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 222.8 เท่า ในขณะที่ให้ผลผลิตรวม 2.28% สำหรับค่า Km ของเอนไซม์นี้ต่อสับสเตรต เดกซ์แทรน ที-2000 จะเป็น 0.558 x 10^{-6} โมลาร์ เมื่อศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 จะพบว่า เชื้อแบคทีเรียนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ Micrococcus sp.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ณฐินี สุวรรณสิงห์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

NATINEE SUVANASINGHA : DEXTRANASE PRODUCED BY MARINE BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.SUTHEP THANIYAVARN,Ph.D. 118 pp.

Out of 1092 bacterial strains isolated from mud and seawater , nineteen of such were found capable of producing dextranase. Among these , bacterial strain Z-10 was found to produce highest yield of dextranase. Maximum dextranase production was obtained when organisms were grown aerobically at 30 - 35 °C (room temperature) for 48 hours in medium containing 0.5% industrial dextran (M.W. 3 - 50 x 10^6) and 3.5% casamino acid as carbon source and nitrogen source respectively while initial pH was at 9.0. Under these conditions,the maximal dextranase activity was found to be 12.8 units per ml.

Properties of dextranase from bacterial strain Z-10 were characterized , the maximal activity was observed at 55°C in 0.01 M. phosphate buffer pH 7.0 with the presence of 2.5 - 7.5% NaCl. The enzyme was quite stable over broad range of pH (5.5 - 8.0) and could withstand temperature upto 55 °C for 30 minutes, however , such activity was completely lost at 70 °C (within 30 minutes). Paper chromatography of products from dextran T-2000 hydrolysis were characterized as isomaltose and additional oligosaccharides. The action of this enzyme was found to be an endo-type with specificity toward α - 1,6 glycosidic linkage.

The enzyme was partially purified by ammonium sulphate fractionation , passed through sepharose 4B and finally DEAE-cellulose ion-exchange column chromatography. Via these procedures the purification was achieve by as much as 222.8 folds with a 2.28% yield. The apparent Km of dextranase for dextran T-2000 was 0.558 x 10^{-6} molar. Taxonomic studies made it possible to identify the bacterial strain Z-10 as Micrococcus sp..

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต ณฐินี สุวรรณสิงห์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำแนวความคิดตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์บทนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ อ.ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่ได้รับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.กาญจนา จันทองจีน ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อเชื้อแบคทีเรียจากทะเลและให้คำแนะนำในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากทะเล และ รศ.ดร.อัปสรสุดา ศิริพงษ์ แห่งภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างดินชายเลน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อน และน้องๆที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนผู้ช่วยวิจัย และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคนที่ได้สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสมบูรณ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
คำย่อ ..... ฎ
บทที่
1.บทนำ 1
2.อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 25
3.ผลการวิจัย 39
4.คำอภิปรายและสรุปผลการวิจัย 91
เอกสารอ้างอิง 100
ภาคผนวก 108
ประวัติผู้เขียน 118

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. การรวมตัวกันของเซลล์แบคทีเรียในช่องปาก 13
2. วิถีไกลโคลิซิสที่แบคทีเรียในช่องปากใช้ 16
3. ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียจากทะเลที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน 40

4ก. ผลของสูตรอาหารต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 44

4ข. ผลของสูตรอาหารต่างๆต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 45

5ก. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 46

5ข. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-0 47

6ก. ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 48

6ข. ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 49

7ก. ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 51

7ข. ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 52

8ก. ผลของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซมเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 54

8ข. ผลของเดกซ์แทรนต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 55

9. ผลของการเติม K_2HPO_4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 57

10. ผลของการเติม KH_2PO_4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 58

11. ผลของการเติม $MgSO_4$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 59

12. ผลของการเติมกรดคาซามิโนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 62
13. ผลของการเติมผงสกัดจากยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 63
14. ผลความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 66
15. ผลการชักนำของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 67
16. ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 69
17. ผลความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อความเป็นกรด-ด่าง 70
18. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 72
19. ผลความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่ออุณหภูมิ 73
20. ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 74
21. ผลความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ 75
22. ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส .. 77
23. ผลความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 78
24. แสดงผลของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 82
25. โครมาโตแกรมของเอนไซม์หลังผ่านคอลัมน์เซฟาโรส 4บี 83
26. โครมาโตแกรมของเอนไซม์หลังผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส 84
27. การหาค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยวิธี Lineweaver-Burk 88

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงการกระจายของแบคทีเรียในช่องปาก	3
2. แสดงชนิดของแบคทีเรียบนฟันหลังทำความสะอาด	4
3. แสดงแบคทีเรียที่พบในคราบฟัน	5
4. แสดงแบคทีเรียในช่องปากที่สังเคราะห์โพลีแซคคาร์ไรด์	14
5. แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส	19
6. แสดงแหล่งของสายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบเอนไซม์ เดกซ์แทรนเนส	41
7. แสดงขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ที่ทำการคัดเลือกบนอาหารวุ้นแข็ง	42
8. แสดงแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่มีผลในการชักนำการสร้างเอนไซม์ เดกซ์แทรนเนส	53
9. แสดงแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10	60
10. แสดงผลการเติมแร่ธาตุที่มีในน้ำทะเลต่อการผลิตเอนไซม์ เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10	64
11. แสดงสูตรอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ที่ได้ปรับปรุงแล้ว	65
12. แสดงผลของเกลือแร่และสารบางชนิดต่อการทำงานของ เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส	79
13. แสดงผลการย่อยสลายสารโพลิเมอร์บางชนิดของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส	81
14. แสดงขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน	85
15. แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์หลังผ่านการระเหิด	86
16. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10	89
17. แสดงคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10	90
18. แสดงสภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส	97
19. แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานบางประการของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส	98
20. แสดงค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแหล่งต่างๆ	99

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม