

เอนไซม์ย่อยสลายแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีส



นายจตุรพร พรศิลป์พิทย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับสูงตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-517-6

009316

RAW STARCH HYDROLYZING ENZYME FROM AMYLOMYCES SP.



Mr. Jaturaporn Pornsilapatip

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1985

หัวข้อวิทยานิพนธ์

โดย

ภาควิชา

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอนไซม์ย่อยสลายแป้งคิบจากเชื้ออะไมโลไมซีส


นายจตุรพร พรศิลป์พิชัย

จุลชีววิทยา


รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร



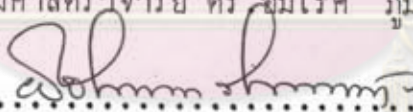
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์)


..... กรรมการ
(ดร.พิจิต รัตกุล)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์
ชื่อนิติศ
อาจารย์ที่ปรึกษา
ภาควิชา
ปีการศึกษา

เอนไซม์ย่อยสลายแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีส
นายจตุพร พรศิลป์
รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิษณุางกูร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2527



บทคัดย่อ

ในการศึกษาเชื้ออะไมโลไมซีส 18 สายพันธุ์จากแหล่งต่างๆทั่วประเทศ พบว่าเชื้ออะไมโลไมซีสที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา จังหวัดชัยภูมิ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยวิธีคัดเลือก คัดเจอร์ มีความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิมได้ดี การเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์นี้ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. เพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิมมีสภาวะที่เหมาะสมอาหารแห้ง 10 ก. ที่ประกอบด้วยรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าคิมในอัตราส่วน 3:2 ผสมกับกากถั่วเหลือง 5 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 % โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15 % และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 % ความชื้นในอาหารเริ่มต้น 50 % ที่พีเอช 3.5 ใส่เชื้อปริมาณ 5×10^6 สปอร์ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิมได้ 780 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการสกัดเอนไซม์ย่อยแป้งคิมในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.5 โดยการแช่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10°ซ นำน้ำสกัดเอนไซม์ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 40-80 % แล้วผ่านลงในคอลัมน์ของซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ ซี-50 ะเอนไซม์ออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.23 โมลาร์ และคอลัมน์ของดีอีเอ-เซฟาเดกซ์ เอ-50 ตามลำดับ เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์บางส่วน มีความบริสุทธิ์ 23.7 เท่าของเอนไซม์ที่สกัดได้ คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ 2.2 % ของแอกติวิตีเริ่มต้น

จากการศึกษาคูสมบัติของเอนไซม์ย่อยแป้งคิมของเชื้ออะไมโลไมซีส พบว่าเป็นกลูโคอะไมเลส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44,000 คาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 5.0-7.0 และที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า 35°ซ สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งคิมอยู่ระหว่างพีเอช 4.5 ถึง 5.5 และที่อุณหภูมิ 45°ซ สามารถย่อยแป้งคิมและไกลโค-

เจนได 81 และ 93 % ตามลำดับ และย่อยแป้งคิมไดแก แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวสาลี
แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลังได 82 44 30 22 และ 16 % ตามลำดับ
โดยมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งคิมที่ 4.5-5.5 ค่า K_m ของการย่อยแป้งมัน-
สำปะหลังคิมเท่ากับ 12.5 มก./มล. อัตราการดูดซับแป้งคิมของกลูโคอะไมเลสมีความ
จำเพาะกับชนิดของแป้งที่พีเอชต่างๆ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๑

Thesis Title Raw Starch Hydrolyzing Enzyme from Amylomyces sp.
Name Mr. Jaturaporn Pornsilapatip
Thesis Advisor Associate Professor Sumalee Pichyangkura, Ph.D.
Department Microbiology
Academic Year 1984

ABSTRACT

Eighteen strains of Amylomyces sp. were collected from various parts of the country. The Amylomyces sp. which was isolated from alcoholic starter (loop-pang) from Chaiyapoom province showed highest ability to produce a raw starch hydrolyzing enzyme by disc culture screening technique. A 250 ml Erlenmeyer flask containing 10 g of solid substrate which composed of coarse rice bran and raw rice flour in the ratio of 3:2 supplemented with 5% soy bean meal, 0.5% ammonium citrate, 0.15% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% magnesium sulfate heptahydrate and 50% water, pH 3.5, were used in order to promote enzyme production. The inoculum size was 5×10^6 spores. The optimal incubation time was 36 hours at 30 °C. Under these conditions, up to 780 units of enzyme with raw starch hydrolyzing activity was obtained from 1 g of the mold bran.

The raw starch hydrolyzing enzyme was extracted from mold bran by soaking in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 for 1 hour at 10 °C. The crude enzyme was precipitated with ammonium sulfate at 40-80 % saturation followed by chromatography on CM-sephadex C-50, eluted at 0.23 M sodium chloride and then on DEAE-sephadex A-50. The purity of this partially purified enzyme was achieved up to 23.7 folds from the crude extract with 2.2% recovery.

The raw starch hydrolyzing enzyme from Amylomyces sp. was found to be glucoamylase. The molecular weight was estimated about 44,000 daltons. It was most stable at the pH range between 5.0 to 7.0 and at the temperature up to 35 °C. The optimal conditions for its activity on gelatinized starch were at 45 °C and pH 4.5 - 5.5 . Hydrolysis of gelatinized starch and glycogen were 81 and 93 %, respectively. The raw starch digestibility on glutinous rice starch, wheat starch, rice starch, corn starch and tapioca starch was 82, 44, 30, 22 and 16 %, respectively. The maximum digestion of raw starch occurred at pH 4.5 - 5.5 . The K_m value for raw starch was 12.5 mg/ml . The enzyme showed a specific adsorption rate to different kinds of raw starch at various pHs.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ภายใต้แนวความคิด คำปรึกษาอย่างดียิ่งในเชิงวิชาการและการปฏิบัติของรองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ Dr. S. Hayashida ภาควิชาเคมีการเกษตร มหาวิทยาลัยคิวชู ประเทศญี่ปุ่น ที่กรุณาแนะนำในเชิงปฏิบัติการศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งคิม อีกทั้งขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชกร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ Dr. S. Kinoshita ภาควิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น ในคำแนะนำเกี่ยวกับการสกัดแยกเอนไซม์ใหม่บริสุทธิ์

ขอขอบพระคุณ ดร.พิจิตต์ รัตกุล รองผู้อำนวยการศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน ซึ่งได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ในท้ายสุดนี้ ขอขอบคุณกรมสรรพสามิต กระทรวงการคลัง ในความอนุเคราะห์การจัดเก็บตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆทั่วประเทศ และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และ วิธีการทดลอง.....	12
2.1 อุปกรณ์.....	12
2.2 เคมีภัณฑ์.....	12
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	15
2.4 การแยกเชื้ออะไมโลไมซีสจากลูกแป้ง.....	16
2.5 การคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบได้สูง.....	16
2.6 การตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์.....	17
2.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบน อาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบ.....	18
2.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์กับการเจริญ เติบโตของเชื้อราบนอาหารแข็ง.....	20
2.9 การตรวจวัดความเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารแข็ง.....	20
2.10 การตรวจสอบความสามารถในการคุ้ซับแป้งคิบ.....	21
2.11 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ย่อยแป้งคิบ.....	22
2.12 การทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์บนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	22
2.13 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลจากการย่อยแป้งด้วย โครมาโตกราฟีกระดาษ.....	23

3.	ผลการทดลอง.....	25
3.1	การแยกและคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสที่ผลิตเอนไซม์ ย่อยแป้งคิบได้สูง.....	25
3.2	สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเพื่อผลิต เอนไซม์ย่อยแป้งคิบ.....	25
3.3	ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบกับการเจริญ ของเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็ง.....	40
3.4	การทำเอนไซม์ย่อยแป้งคิบให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	40
3.5	การทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ย่อยแป้งคิบ.....	46
3.6	คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ย่อยแป้งคิบ.....	46
4.	การอภิปรายผล.....	64
5.	สรุปผลการวิจัย.....	74
	บรรณานุกรม.....	77
	ประวัติ.....	85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. คุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สกัดได้จากราและยีสต์ สายพันธุ์ต่างๆ.....	9
2. ผลการคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสโดยวิธีคัสคัลเจอร์.....	27
3. ผลการคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสมนอาหารแห้ง.....	28
4. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์.....	37
5. ปริมาณของกากถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซีเทรทที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์.....	38
6. ลำดับขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์ย่อยแป้งคิมของเชื้ออะไมโลไมซีส ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. แผนผังการเกิดรูปแบบต่างๆ ของกลูโคอะไมเลส.....	3
2. แบบจำลองโมเลกุลกลูโคอะไมเลสของเชื้อ <u>Aspergillus awamori</u> ..	6
3. เชื้ออะไมโลไมซีส.....	11
4. การคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสโดยวิธีคัสคัลเจอร์.....	26
5. อัตราส่วนของรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าคิบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ย่อยแป้งคิบของเชื้ออะไมโลไมซีส.....	31
6. อิทธิพลของความชื้นต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบบนอาหารแข็ง.....	32
7. อัตราส่วนของรำหยาบ แป้งข้าวเจ้าคิบ และแกลบ ที่เหมาะสมต่อการ ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบของเชื้ออะไมโลไมซีส.....	33
8. อิทธิพลของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบ ของเชื้ออะไมโลไมซีส.....	34
9. ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ย่อยแป้งคิบของเชื้ออะไมโลไมซีส.....	35
10. อิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบของ เชื้ออะไมโลไมซีส.....	36
11. ผลของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตต่อ การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคิบของเชื้ออะไมโลไมซีส.....	39
12. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตกับการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งคิบ ของเชื้ออะไมโลไมซีส.....	41
13. โครมาโทกราฟีของเอนไซม์ย่อยแป้งคิบจากเชื้ออะไมโลไมซีสบน ซีเอ็ม-เซฟาเคกซ์ ซี-50.....	43
14. โครมาโทกราฟีของเอนไซม์ย่อยแป้งคิบจากเชื้ออะไมโลไมซีสบน คีโอเออี-เซฟาเคกซ์ เอ-50.....	44

15. อิเล็กโทรโพรีซิสบนโพลีโอคริสตาไมด์ เจลของ เอนไซม์ย่อยแป้งคิมที่ได้ผ่าน
ผ่านขั้นตอนการสกัดแยกให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 47
16. แอคติวิตีของ เอนไซม์ย่อยแป้งคิมที่ได้ผ่านขั้นตอนการสกัดแยกให้บริสุทธิ์
บางส่วนบนโพลีโอคริสตาไมด์ เจลอิเล็กโทรโพรีซิส..... 48
17. โครมาโทกราฟีของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของ
เอนไซม์ย่อยแป้งคิมบนคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-50..... 52
18. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีน
มาตรฐาน..... 53
19. อิทธิพลของพีเอชต่อการย่อยแป้งและแป้งคิมของกลูโคอะไมเลส
ย่อยแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีส..... 54
20. อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการย่อยแป้งและแป้งคิมของกลูโคอะไมเลส
ย่อยแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีส..... 55
21. เสถียรภาพของ เอนไซม์ย่อยแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีสที่อุณหภูมิต่างๆ.. 56
22. เสถียรภาพของ เอนไซม์ย่อยแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีสที่พีเอชต่างๆ... 57
23. (ก) ผลของความเข้มข้นแป้งสำหรับแป้งคิมต่อแอคติวิตีของ เอนไซม์
ย่อยแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีส
(ข) การหาค่า K_m ของเอนไซม์ย่อยแป้งคิม..... 58
24. การดูคัมแป้งคิมของเอนไซม์ย่อยแป้งคิมจากเชื้ออะไมโลไมซีสที่ระดับ
พีเอชต่างๆ..... 59
25. อิทธิพลของพีเอชต่อการย่อยแป้งคิมชนิดต่างๆ ของเอนไซม์ย่อยแป้งคิม
จากเชื้ออะไมโลไมซีส..... 60
26. ความสามารถในการย่อยแป้งคิมของกลูโคอะไมเลสจากเชื้ออะไมโลไมซีส 61
27. การย่อยแป้งและไกลโคเจนของกลูโคอะไมเลสย่อยแป้งคิม..... 62
28. โครมาโทกราฟีบนกระดาษของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง..... 63