การศึกษากิจกรรมเอ็นซายม์ของลูกแป้ง

นางจิราภรณ์ สุขุมาวาสี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2519

000426

I15306045

STUDIES ON ENZYMATIC ACTIVITIES OF "LOOK PANG"

Mrs. Jiraporn Sukhumavasi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

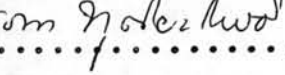
Department of Microbiology

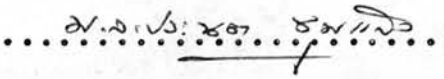
Chulalongkorn University

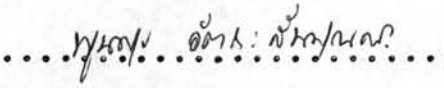
1976

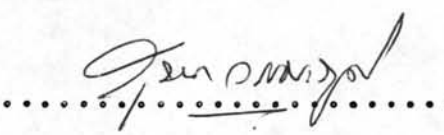
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์  ประธานกรรมการ

 กรรมการ

 กรรมการ

 กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิสวาท ทุติยะโพธิ
น.ส. พูนศุข อัตถะสัมปุณณะ

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษากิจกรรมเอ็นซายม์ของลูกแป้ง

ชื่อ นางจิราภรณ์ สุขุมาวาสี แผนกวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2518

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษากิจกรรมเอ็นซายม์ของลูกแป้ง ซึ่งเป็นส่าในการทำอาหารหมัดพื้นเมืองของไทย มีจุดประสงค์เพื่อจะคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจประสิทธิภาพเอ็นซายม์ย่อยแป้งของลูกแป้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าลูกแป้งตัวอย่างที่ 2 ซึ่งใช้ในการทำขนมปังให้ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งสูงสุด ผลจากการทดลองยังชี้ให้เห็นว่า ลูกแป้งนั้นนอกจากจะเป็นส่าคือ มีจุลลินทรีย์ที่เป็นตัวเริ่มต้นในการหมักแล้ว ยังเป็นแหล่งที่ให้เอ็นซายม์อีกด้วย

จากการแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ออกจากลูกแป้งทั้ง 6 ตัวอย่าง แล้วนำมาหาประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพมากน้อยไม่เท่ากัน ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของจุลินทรีย์หลายชนิดหลายสายพันธุ์ ที่อยู่รวมกันในลูกแป้งแต่ละตัวอย่าง มีค่ามากกว่าที่ได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แสดงว่ามีเอ็นซายม์แอมีเลสหลายชนิดช่วยกันทำหน้าที่ในการย่อยแป้ง

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของจุลินทรีย์ที่แยกได้ปรากฏว่ายีสท์สายพันธุ์ 1Y มีประสิทธิภาพสูงสุด สายพันธุ์นี้คือ Endomycopsis fibuligera ยีสท์นี้ให้เอ็นซายม์ย่อยแป้ง 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งซึ่งมีปริมาณมาก คือ

glucoamylase ชนิดที่สองมีปริมาณน้อยเป็น endolytic type ของ amylase ที่สามารถย่อย cyclodextrins ได้ เอ็นซายม์ glucoamylase ที่ผ่านการแยกสิ่งแปลกปลอมออกจนบริสุทธิ์ (25 เท่าของประสิทธิภาพเดิม) แล้ว มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งเป็น 42% ของประสิทธิภาพทั้งหมด น้ำหนักโมเลกุลของเอ็นซายม์เท่ากับ 5.8×10^4 เอ็นซายม์จะทรงคุณสมบัติในการย่อยแป้งได้ดี ถ้าสิ่งที่ต้องการให้ย่อยมีความเป็นกรดด่าง (pH) ระหว่าง 4.0 ถึง 9.0 และที่อุณหภูมิระหว่าง 10° ถึง 60° ซ. เอ็นซายม์ยังคงมีประสิทธิภาพดีอยู่ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงถึง 80° ซ. ประสิทธิภาพจะถูกทำลายหมดไป ส่วนประสิทธิภาพสูงสุดอยู่ที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 55° ซ. ความจำกัดในการย่อยสารของเอ็นซายม์ glucoamylase นี้เหมือนกับของเอ็นซายม์ glucoamylase ที่ได้จาก Endomyces sp. IFO 0111 และ Endomycopsis fibuligera IFO 0108 อย่างไรก็ดี ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลของ glucoamylase นี้สูงกว่าที่ได้จากสายพันธุ์ทั้งสองที่กล่าวมาเล็กน้อย.

Thesis Title Studies on Enzymatic Activities of "Look Pang"

Name Mrs. Jiraporn Sukhumavasi

Department of Microbiology

Academic Year 1975

ABSTRACT

The enzymatic activities of Thai locally produced starter "Look Pang" were studied to select the amylolytic potent strains for future industrial fermentation development.

Six samples of "Look Pang" were determined for amylase activity. Sample No. 2 which was used in bakery gave highest activity. The result suggested that "Look Pang" played the role of not only the starter but also the source of enzyme. The amylolytic activity of all strains combined together was higher than that of one single potent strain of the same "Look Pang".

The 1Y strain, which was considered as the most potent amylolytic isolate had been identified as Endomycopsis fibuligera. It produced two kinds of extracellular amylase. The major is glucoamylase and the minor is an endolytic type of amylase hydrolyzing cyclodextrins. The glucoamylase was purified 25-fold from the culture filtrate, the final yield of

total activity was 42%. Its molecular weight was 5.8×10^4. The pH stability ranged between 4.0 to 9.0 with the maximum at pH 5.5. The enzyme activity was stable in the range of 10° to 60° C with maximum at 55° C, but its activity was completely lost at 80° C. The substrate specificity of this glucoamylase is similar to that of the glucoamylase of Endomyces sp. IFO 0111 and Endomycopsis fibuligera IFO 0108. However, the saccharifying activity of 1Y strain is slightly higher than that of the two strains.

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her sincere gratefulness to Assistant Professor Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her suggestion of this problem and able guidance in performing the task. She also desires to extend her thank to Dr. Malee Sundhagul, Assistant Director, Technological Research Institute, Applied Scientific Research Corporation of Thailand, for helpful discussion and constant encouragement throughout the study.

Special gratitude is due to Miss Poonsook Atthasampunna, Head of Microbiology Unit, Technological Research Institute, Applied Scientific Research Corporation of Thailand, for wholehearted help, valuable advice in this work and her kindness in reviewing the manuscript for its improvement.

Furthermore, hearty thanks are due to Professor Tokuya Harada, Head of Applied Biochemistry Laboratory, and Mr. Kanji Kato, enzymologist, Applied Biochemistry Laboratory, the Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Japan, for their valuable interesting information and supply of some chemicals.

Finally, the author would like to acknowledge the indebtedness to the Graduate School, Chulalongkorn University for the research grant.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	IV
ENGLISH ABSTRACT	VI
ACKNOWLEDGEMENT	VIII
TABLE OF CONTENTS	IX
LIST OF TABLES	X
LIST OF FIGURES	XI
CHAPTER	
1. INTRODUCTION	1
PURPOSE OF STUDY	3
SCOPE OF WORK	3
LITERATURE REVIEW	4
2. MATERIALS AND METHODS	8
3. RESULTS AND DISCUSSION	17
4. CONCLUSION AND RECOMMENDATION	39
REFERENCES	41
APPENDIX	45
VITA	71

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Isolates from various sources of "Look Pang" ..	23
2	α-amylase activity of "Look Pang"	24
3	α-amylase producing capacity	25
4	Medium test	27
5	Enzyme purification	30
6	Substrate specific activity of amylase	36
7	Substrate specific activity of an endolytic type of amylase hydrolyzing cyclodextrin	38

LIST OF FIGURES

Figures		Page
1	Samples of "Look Pang"	22
2	Cell morphology and fermentation of LY strain	26
3	Formation of the amylase from Endomycopsis sp.	28
4	Elution patterns of amylase from column of DEAE-cellulose and Sephadex G-200	29
5	Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified amylase	31
6	Effect of pH and temperature on activity and stability of amylase	32
7	Paper chromatogram of amylase hydrolysis on starch, amylase and amylopectin	33
8	Paper chromatogram of amylase hydrolysis on glycogen	34
9	Radioautogram showing the action of the amylase on maltodextrin labeled at the reducing end	35

Figures Page

10 Paper chromatogram of endolytic amylase hydrolysis on cyclodextrin and cycloocta-dextrin 37