หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเอนไซม์อะไมเลสจาก Thermoactinomyces sp. ที่แยกได้จากดิน
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพิพารัตน์ มณีรัตน์
สาขาวิชา	ชีววิทยา
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเส้นใย Thermoactinomyces sp. เทียบเคียงได้เป็น *Thermoactinomyces vulgaris* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร STYA-10 pH 7-9 เชื้อนี้มีเส้นใยสีขาวที่มีสปอร์เดี่ยวเกิดขึ้นบนก้านชูสปอร์สั้นจำนวนมาก เส้นใยติดสีแกรมบวก เชื้อเจริญได้ที่ 35-65°ซ pH 7-9 แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิห้อง 70°ซ pH 5 และ pH 11 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 55-60°ซ อาหาร STYB-30 pH 8 บ่มที่ 55°ซ เป็นสภาวะที่ดีสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลสโดยได้เอนไซม์สูงสุด 130 D.U.ต่อมิลลิลิตร ภายใน 48 ชั่วโมง การเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ในเฟอร์เมนเตอร์ที่มี STYB-30 pH 8 ที่ 55°ซ ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3 กรัมต่อลิตร ภายใน 12 ชั่วโมงและได้อะไมเลส 136 D.U.ต่อมิลลิลิตรภายใน 48 ชั่วโมงเมื่อเติมกลูโคสลงในเฟอร์เมนเตอร์ในชั่วโมงที่ 8 พบว่ามีเอนไซม์สูงสุด 102 D.U.ต่อมิลลิลิตรผลการทดลองนี้แสดงว่าอาจมีกลไก glucose catabolite repression ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์นี้ การเตรียม crude enzyme โดยทำไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8 ที่ไม่มีอนุมูลแคลเซี่ยมหรือมี 1 mM 5 mM หรือ 10 mM Ca^{++} ได้ yield 52% 47% 28% หรือ 26% ตามลำดับ crude enzyme มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5 ถึง 8.5 เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมที่อุณหภูมิต่างๆอนุมูลแคลเซี่ยม (2 mM) ในสารละลายซับสเตรทไม่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของ crude enzyme และพบว่า crude enzyme มีกิจกรรมดีที่สุดที่ 65°ซ อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของอนุมูลแคลเซี่ยมช่วยเพิ่มคุณสมบัติความทนความร้อนของเอนไซม์ crude enzyme ทนความร้อนที่ 60°ซ ได้โดยมีครึ่งชีวิตนานกว่า 15 นาที เอนไซม์นี้เสียสภาพอย่างรวดเร็วที่ 68°ซ หรืออุณหภูมิที่สูงกว่า อนุมูลโลหะ Na^{+} Cu^{++} Ca^{++} และ Fe^{+++} ที่ความเข้มข้น 0.5 mM ไม่สามารถกระตุ้นและกกกิจกรรมของ crude enzyme อนุมูลโลหะ Mg^{++} Mn^{++} และ Ag^{+} (0.5 mM) Ca^{++}

และNa^+ (5 mM) กดกิจกรรมเอนไซม์ได้บ้าง (พบกิจกรรม 81-88% ของกิจกรรมในหลอดควบคุม) อนุมูล Zn^{++} (0.5 mM) Na^+ (50-150 mM) และ Ca^{++} (10 mM) และ EDTA (0.5 mM) กดกิจกรรมเอนไซม์ได้ปานกลางเนื่องจากพบกิจกรรม 57-74% ของกิจกรรมในหลอดควบคุม ในจำนวนอนุมูลโลหะที่ทำการทดสอบทั้งหมดนี้พบว่าอนุมูลปรอท (mercuric ion) ที่ความเข้มข้น 0.5 mM แสดงฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งที่แรงที่สุดเนื่องจากพบกิจกรรมเหลืออยู่เพียง 16% ของหลอดควบคุมเมื่อในตัวอย่าง crude enzyme มีอนุมูลแคลเซี่ยม แคลเซียมทำให้ลดการเกาะของเอนไซม์บน Q-Sepharose Fast Flow และได้เอนไซม์กลับคืนมามาก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบการเกาะของเอนไซม์ที่ทำในหลอด eppendorfs ดังนั้นจึงสรุปว่า Ca^{++} ไม่เพียงแต่ช่วยลดการเกาะของเอนไซม์บน Q-matrix แต่ยังช่วยความทนทานของเอนไซม์นี้ด้วย