174867

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต
นักศึกษา	สุนันทา มีชนะ
รหัสประจำตัว	45064567
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *Aspergillus niger* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตให้กับสปอร์ของเชื้อ *A. niger* ที่เวลา 3.5 นาที เพื่อให้มีความอยู่รอดของเชื้อ *A. niger* เหลือประมาณร้อยละ 10 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายบนอาหาร minimal medium โดยพบว่าได้สายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. niger* จำนวน 18 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 6 เชื้อสายพันธุ์กลาย *A. niger* ML 1 มีค่าอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีที่สูงสุด (เท่ากับ 3.16) สำหรับที่พีเอชเท่ากับ 7 พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *A. niger* ML 13 มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ (3.39) และที่พีเอชเท่ากับ 8 ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย *A. niger* ML 249 ที่มีค่าอัตราดังกล่าวส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.61 นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 3 ชนิด มาเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้ออาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้อาหารสูตรดัดแปลง พบว่าเชื้อ *A. niger* ML 3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุด (18.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่สูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (13.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 2 ของน้ำหนักโดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและทริปโตน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตเจน โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 สามารถส่งเสริมให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 118.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เชื้อ *A. niger* ML 3 ที่เลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสมดังกล่าวนี้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (41.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ถึง 2.82 เท่า

174867

จากการศึกษาการแยกและการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนโดยการนำเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 ของความอิ่มตัว ตามด้วยการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration) และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยใช้เจลฟิวเตรชันชนิดเซฟลาครีลเอส -100 (gelfiltration Sephacryl S-100) และโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิดดีอีเออี-ไฮแทรป เซฟลาโรส (DEAE-Hitrap Sepharose) ได้เอนไซม์ไซลาเนสที่มีความบริสุทธิ์ 4.97 เท่า เมื่อศึกษาถึงปัจจัยที่มีต่อคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน พบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 4.5 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวดีที่สุดที่ พีเอช 4.5 (ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (เป็นเวลา 30 นาที) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยอิเลคโทรโฟรีซีสชนิดโซเดียมโดดีซิล-ซัลเฟตพอลิอะคริ-ลาไมด์เจล (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนนี้ มีแถบโปรตีนเกิดขึ้น 4 แถบ คือมีน้ำหนักโมเลกุล 16, 15.7, 15.4 และ 15.2 ดาลตัน สำหรับการศึกษาคุณลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 3.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 250 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เมื่อใช้ไซแลนเป็นสับสเตรต

174867

Thesis Title	Studies on production and characteristics of xylanase produced by an ultraviolet inducing mutant of *Aspergillus niger*.
Student	Miss Sunanta Meechana
Student ID.	45064567
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2006
Thesis Advisor	Asst. Prof. Aree Rittiboom

ABSTRACT

From the studies on inducing mutation of *Aspergillus niger* using ultraviolet irradiation found that after exposing the fungal spores under UV for 3.5 minutes the percentage of survival of the spores was reduced to 10 %. The irradiated fungal spores were plated on a minimal medium containing xylan as the only carbon source and a total of eighteen mutants of *A. niger* were screened for xylanase activity by measuring the ratio between the size of the diameter of the clear zone formed around the colony and the diameter of colony. The result demonstrated that the mutant strains ML1, ML13 and ML 249 had the maximum ratios of 3.16, 3.39 and 3.61, respectively. Moreover, when the *A. niger* mutant strains were grown in a modified liquid medium, it was found that *A. niger* ML 3 produced the highest amount of xylanase when xylan was used as the carbon source (18.56 U/ml). This value was higher that from the wild type (13.11 U/ml).

The optimal liquid culture conditions for xylanase production by the mutant strain ML 3 were as follows: 2 % (w/v) corncobs (as carbon source), 3 % tryptone nitrogen/litter (as nitrogen source) and the initial pH 6.0. Under these conditions, the highest xylanase activity was 118.21 U/ml whereas small amount of cellulase activity (0.10 U/ml) was found. The xylanase produced by *A. niger* ML 3 under these conditions was found higher than that of the wild type for 2.82 fold.

The culture broth of partially from *A. niger* ML3 was purified by 70 % saturated ammonium sulfate precipitation, followed by ultrafiltration and separated by gel filtration with Sephacryl S-100 and DEAE-Hitrap Sepharose column chromatography . The specific activities of the purified xylanase were increased approximately 4.97 fold. The optimal pH and temperature partially of the purified xylanase were 4.5 and 50 ^{0}C, respectively. It was stable at pH and temperature of 4.5 (at 4 $^{\circ}$C for 24 hours) and 40 $^{\circ}$C (for 30 min), respectively. By SDS-PAGE, the partially purified xylanase contained four protein bands with the molecular weights of 16, 15.6, 15.4 and 15.2 kilodaltons. When xylan was used as a substrate, the values of apparent K_m and V_{max} were 3.60 mg/ml and 250 μmol/ml/min, respectively.