บทคัดย่อ

T 147160

จากการศึกษาศักยภาพในการย่อยแป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้าของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Aspergillus oryzae* TISTR 3019, *A. phoenicis* TISTR 3252, *A. phoenicis* TISTR 3253, *A. niger* TISTR 3254 และ *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 เปรียบเทียบกับการย่อย soluble starch พบว่าเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยแป้งได้แตกต่างกัน นอกจากนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรา 5 สายพันธุ์ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่าเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในสภาวะอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารแข็งที่มีรำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวได้ในปริมาณมากกว่าอาหารแข็งถึง 2 เท่า สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมมีดังต่อไปนี้ ใช้แป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เติมเปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร chemical defined medium จะให้ผลผลิตของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงกว่าการเติมเกลือแร่เพียงชนิดเดียวหรือไม่เติมเกลือแร่ชนิดใดเลย สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบว่า การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่สัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสซึ่งมีค่าเท่ากับ 101.45 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อศึกษาการแยกและทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์

โดยการนำเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 จากนั้นผ่านการไดอะไลซีส และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้เจลฟิวเตรชันชนิดเซฟลาคริล เอส-100 และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิดดีอีเออี-เซฟลาโรส ได้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 2 ส่วนที่มีความบริสุทธิ์ 26.24 และ 19.57 เท่า ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้ง 2 ส่วนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ 4.0 และ 5.5 ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้ง 2 ส่วน คือ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ F1 และ F2 มีความคงตัวที่พีเอช 4.0 ถึง 5.5 และที่พีเอช 4.0 ถึง 6.0 เป็นเวลา 30 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ F1 และ F2 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 20 ถึง 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสชนิดโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 80,000 และ 73,000 ดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อศึกษาคุณลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่าจากการหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสับสเตรท โดยเอนไซม์ส่วน F1 มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.02 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และเอนไซม์ F2 มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 5.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.032 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ นอกจากนั้นได้ทำการหาค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้ soluble starch เป็นสับสเตรท พบว่า เอนไซม์ส่วน F1 มีค่า K_m และ V_{max} เป็น 6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.02 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ส่วน F2 มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.023 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

ABSTRACT

TE 147160

From the studies on potential of starch hydrolyses from corn starch , cassava starch , sticky-rice starch and rice starch of 5 species of fungi, i.e. *Aspergillus oryzae* TISTR 3019 , *A. phoenicis* TISTR 3252 , *A. phoenicis* TISTR 3253 , *A. niger* TISTR 3254 and *Rhizopus oryzae* TISTR 3165, in comparision with soluble starch, found that the results were different. Moreover, when the 5 species of fungi were grown in liquid media of the 5 types of starch, it was found that *A. niger* TISTR 3254 produced the highest amount of glucoamylase when rice liquid medium was used as carbon source. When the production of glucoamylase from *A. niger* TISTR 3254 in a liquid culture was compared with that in a solid culture, the glucoamylase activity in the liquid culture was 2 times higher than that in the solid culture. The optimal liquid culture conditions for obtaining maximum glucoamylase studied were as follows : 2 % (w/v) rice starch (as carbon source) was mixed with 1% (w/v) peptone (as nitrogen source) and the pH was adjusted to 7.0 followed by shaking in a 30 $^{\circ}$ C shaking incubator at the speed of 200 rpm. In addition , when the production of glucoamylase from *A. niger* TISTR 3254 in a chemical defined medium, it was found that the glucoamylase produced was higher than those when each of the three minerals was added separately or no added mineral sources. Moreover, from the studies on cell growth and glucoamylase production by *A. niger* TISTR 3254 in rice liquid medium, the result was that the production of glucoamylase did not agree with the cell growth of the fungal, and the glucoamylase activity was about 101.45 U/ml. When glucoamylase from *A. niger* TISTR 3254 was purified by 80 percents saturated ammoniumsulfate precipitation, dialysis, gel filtration with Sephacryl S-100 and DEAE Sepharose, two fractions of glucoamylase were obtained and were purified about 26.24 and 19.57 times, respectively. Characteristics of the two purified fractions of glucoamylase, i.e. F1 and F2 were as follows : for F1, the optimal pH and temperature were 4.0 and 60 $^{\circ}$ C , respectively, it was stable in a pH range of 4.0 to 5.5 and the temperatures between 20 to 50° C ; for F2, the optimal pH and temperature were 5.5 and 60 $^{\circ}$ C , respectively, and it was stable in a pH range of 4.0 to 6.0 and the temperatures between 20 to 40° C. The two purified fractions of the enzyme were protein of two sub-units with molecular weights of 80,000 and 73,000 dalton, respectively. When rice was used as substrate, the values of apparent K_m and V_{max} of F1 were 10 mg/ml and 0.02 μmol/ml/min , respectively, while those of F2 were 5.6 mg/ml and 0.032 μmol/ml/min , respectively. In addition, when soluble starch was used as substrate, the values of apparent K_m and V_{max} of F1 were 6.7 mg/ml and 0.02 μmol/ml/min , respectively while those of F2 were 5 mg/ml and 0.023 μmol/ml/min, respectively.