บทคัดย่อ

177230

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงวิธีการทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะของเพลลิเคิลโพลีแซคคาไรด์ (pellicle polysaccharide) จากแบคทีเรีย *Acetobacter lovanensis* IFO 3284 R strain ด้วยการดัดแปลงวิธีการของ Moonmangmee et al. (2002a) โดยเริ่มจากการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง French Pressure Cell Press จากนั้นแยกส่วนของ cell-free extract (ประกอบด้วยส่วนของ cytoplasm และส่วนของ cytoplasmic membrane) ออกจากเซลล์และเศษเซลล์ จากนั้นละลายองค์ประกอบของ cytoplasmic membrane ด้วยสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาไดอะไลซิสในสารละลาย 25 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตะกอนโปรตีนออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง และนำสารละลายส่วนใสมาทำการแยกส่วนของโพลีแซคคาไรด์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟีชนิด DEAE-cellulose เก็บสารละลายส่วนที่มีโพลีแซคคาไรด์มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยอัลตราฟิลเตรชัน (molecular weight cutoff, 50,000 dalton) แล้วตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล ทำให้โพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟีชนิด Sephacryl S-400 และ Sephacryl S-500 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า โพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดัดแปลงนี้มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับวิธี mild condition ของ Moonmangmee et al. (2002a) มีมวลโมเลกุลโดยประมาณ 700 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสองชนิดคือ กลูโคส และแรมโนส ในสัดส่วนของโมลาร์เท่ากับ 1:1 และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโอลิโกแซคคาไรด์จากโพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ของ *Acetobacter lovanensis* IFO 3284 R strain พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ย่อยโพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และทำให้โอลิโกแซคคาไรด์บริสุทธิ์ขนาดต่างๆแยกออกจากกันด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟีชนิด Bio-Gel P_4 เชื่อมต่อกับคอลัมน์ชนิด Bio-Gel P_2 จากนั้นทำการศึกษา glycosyl linkages ของโอลิโกแซคคาไรด์บริสุทธิ์โดยวิธี methylation analysis และทำการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของโอลิโกแซคคาไรด์บริสุทธิ์ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry จากการทดลองพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์บริสุทธิ์ peak ที่ 4 ประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ 3-linked-L-Rha*p*, terminal glucose, 2-terminal glucose และ 2-linked-D-Glu*p* ในสัดส่วนของโมลาร์เท่ากับ 1.7 : 5.6 : 1.0 : 4.0 ตามลำดับ

Abstract

177230

The aims of this research were to modify the polysaccharide purification method of Moonmangmee, et al. (2002a) and characterize the purified polysaccharide from *Acetobacter lovanensis* IFO 3284 R strain. Cells were crushed by French Pressure Cell Press. After removing cell debris by centrifugation, cell-free extract was obtained. Solubilization of cytoplasmic membrane component was performed with 2% Triton X-100 for 2 h. The solution was then dialyzed against 25 mM Tris-HCl (pH 8.5) at 4°C for 24 h. After centrifugation, the supernatant containing polysaccharide was then applied onto DEAE-cellulose column chromatography. Pooled polysaccharide containing fractions were collected, concentrated by ultrafiltration molecular weight cutoff 50,000 dalton and precipitatated with isopropanol. The polysaccharide was further purified with two successive column chromatography, Sephacryl S-400 and Sephacryl S-500 column, respectively. The results showed that the purified polysaccharide obtained from the modified method had the same characteristics and properties as the polysaccharide prepared by mild condition (Moonmangmee et al., 2002a) having molecular mass of 700 kDa, which composed of two different types of monosaccharide, glucose and rhamnose in the molar ratio of 1:1. The optimum conditions for oligosaccharide preparation from purified polysaccharide of *Acetobacter lovanensis* IFO 3284 R strain found that the polysaccharide was successfully hydrolyzed in an aqueous 0.1 N trifluoroacetic acid at temperature of 90°C for 5 h. Purification of various sizes of oligosaccharide was performed by applying onto Bio-Gel P_4 connected with Bio-Gel P_2 column chromatography. Purified oligosaccharide was used to study in order to obtain the glycosyl linkage information by Methylation analysis and analyse the sugar derivatives consisting in purified oligosaccharide by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. As the results, oligosaccharide peak no. 4 was consisting of the sugar derivatives of 3-linked-L-Rha*p*, terminal glucose, 2-terminal glucose and 2-linked-D-Glu*p* in the molar ratio of 1.7 : 5.6 : 1.0 : 4.0, respectively.