ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250343

รายงานฉบับสมบูรณ์

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26

Partial purification of dextranase from *Aspergillus* sp. X26

ผศ. นิภา มิลินทวิสมัย

ผศ. สุวรรณา เนียมสนิท

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยทั่วไป

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

b00255293

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250343

รายงานฉบับสมบูรณ์

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26

Partial purification of dextranase from *Aspergillus* sp. X26

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผศ. นิภา มิลินทวิสมัย

ผศ. สุวรรณา เนียมสนิท

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยทั่วไป

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

บทคัดย่อ

250343

ปัญหาการปนเปื้อนเดกซ์แทรน (dextran) ที่มากับวัตถุดิบอ้อยทำให้มีผลกระทบต่อผลผลิตน้ำตาลของโรงงานน้ำตาลในประเทศไทย การกำจัดเดกซ์แทรนในอุตสาหกรรมน้ำตาลนิยมใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (dextranase) คณะผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อ *Aspergillus* sp. X 26 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสชนิดที่ผลิตออกนอกเซลล์สูงได้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก *Aspergillus* sp. X26 และศึกษาการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์โดยวิธีการทางโครมาโตกราฟฟี การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อรา *Aspergillus sp.* X26 ในอาหาร Fukumoto ซึ่งมี 2% dextran T200 ที่บ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C พบมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณการผลิต 1006 U/mg protein การแยกบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) สามารถทำให้บริสุทธิ์บางส่วนได้โดยใช้ Sephacryl S-300 เพียงขั้นตอนเดียว ให้ค่า Specific activity เท่ากับ 3437 U/mg ค่า Purification fold เท่ากับ 6.07 เท่า และมีค่า recovery เท่ากับ 43.46 % เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Aspergillus sp.* X26 มี 2 isoform ขนาด 84 และ 87 kDa เมื่อแยกขนาดโดย SDS-PAGE คุณสมบัติของเอนไซม์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบของ *Aspergillus sp.* X26 มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ pH 5 และ 30 °C ตามลำดับ สารละลายเอนไซม์แบบสกัดหยาบมีความเสถียรที่ 4 °C ในเวลา 1 เดือน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 91% เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ Sephacryl S-300 สามารถย่อย amylose และ pectinได้อย่างมีประสิทธิภาพ คิดเป็น 70% และ 31% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารตั้งต้นที่แท้จริงคือ dextran T2000 แต่ก็สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้เล็กน้อย เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Aspergillus sp.* X26 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยในสภาวะเลียนแบบขั้นตอนการหีบสกัดอ้อย ที่ 45 °C เป็นเวลา 10 นาที ดีกว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสชนิด commercial grade

Abstract

250343

Dextran contaminated in raw sugarcane has affected sugar yield loss in Sugar Industry in Thailand. Dextranase is widely used to eliminate the dextran problem. *Aspergillus* spp. X 26 isolated from form our research, exhibited high extracellular dextranase activity. In this research, dextran producing by *Aspergillus* spp. X 26 and partial purification of dextranase by chromatography was studied. The enzyme activity was determined by Somogyi-Nelson. The result of dextran producing by *Aspergillus* spp. X 26 in Fukumoto containing 2% dextran T200 incubated by shaking at 125 rpm 30°C showed that it produced highest specific activity of 3437 U/mg protein at 7 days of incubation. The medium cultured containing extracellular daxtranase were purified by one step Sephacryl S-300. There were purification fold and % recovery of 6.07 and 43.46 % for Sephacryl S-300. The dextranase of *Aspergillus* spp. X 26 had 2 isoform of 84 and 87 kDa when separated by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of the crude enzyme were pH 5 and 30 °C respectively. The stability of crude enzyme at 4 °C for one month had remaining activity of 91%. The partial purified dextranase from Sephacryl S-300 could degrade amylose and pectin for 70% และ 31% repectively when compared to the real substrate of dextran T2000. However, it could degrade sucrose a little bit. The dextranase of *Aspergillus* spp. X 26 showed high potential to degrade dextran in sugarcane juice like milling condition at 45 °C for 10 minutes when compared to commercial grade.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จากงบประมาณทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาสาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งผู้ช่วยวิจัย นางสาวสิริพร เขยไชย ที่ช่วยทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลงได้

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2553

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	14
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	21
บรรณานุกรม	22
ภาคผนวก	24
การนำเสนอผลงานวิจัย	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้ Sephacryl S-300	15
ตารางที่ 2 ผลของการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบในการลดปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย	20

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะการผลิต extracellular dextranase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto medium ซึ่งมี 2% dextran T2000 เป็นแหล่งต้นต่อคาร์บอน 14

รูปที่ 2 แสดงรูปแบบโปรตีนจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบบต่าง ๆ เมื่อแยกโดย 10 % SDS-PAGE , Native PAGE และ Activity gel staining 16

รูปที่ 3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสใน 0.05M Acetate buffer ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ 17

รูปที่ 4 แสดงความจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ 18

รูปที่ 5 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในรูปสารละลาย crude enzyme ที่ 4° C ที่เวลาต่าง ๆ 18

รูปที่ 9 ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการย่อยเดกซ์แทรน เข้มข้น 3,000 ppm 20