การผลิตและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานสเฟอเรส จาก *Bacillus* spp.

นางสาววัลยา เตชชัยกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-450-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017217

Production and Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* spp.

Miss Walaya Techaiyakul

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-450-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทริน
กลูคาโนทรานสเฟอเรส จาก Bacillus spp.

โดย นางสาว วัลยา เตชชัยกุล

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วัลยา เตชัยกุล : การผลิตและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโน-ทรานสเฟอเรสจาก Bacillus spp. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE FROM BACILLUS SPP.) อ.ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล, 120 หน้า. ISBN 974-579-450-3

จากการตรวจหาสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase พบว่าบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากดินในประเทศไทย 57 สายพันธุ์ ไม่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน ส่วน Bacillus All ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากดินในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9.0 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน เมื่อเลี้ยง Bacillus All ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งชนิดต่าง ๆ พบว่าแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพดและ soluble starch จะเหนี่ยวนำให้ CGTase ผลิต CD ได้ดีกว่าแป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลังและแป้งสาลี เมื่อใช้แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และ soluble starch เป็นสับสเตรตของเอนไซม์ จะให้แอคติวิตีของ CGTase ดีกว่าการใช้แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพดและแป้งสาลี จากการวิเคราะห์สารไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้โดยวิธี TLC และ HPLC พบว่าเป็นไซโคลเดกซ์ทรินชนิดเบตา (β)

เอนไซม์ CGTase นี้มีความบริสุทธิ์ขึ้น 59 เท่า หลังจากการผ่านขั้นตอนการดูดซับเอนไซม์โดยแป้ง ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40 - 80 เปอร์เซ็นต์ แยกโดยคอลัมน์ ดีอีเออี - เซลลูโลส และ คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ซี - 100 เมื่อทำการแยกเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ซี - 100 โดยดิสค์โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แล้วติดตามแถบโปรตีนด้วยสีย้อมคูแมสซี บริลเลียนท์ บลูอาร์ 250 และย้อมสี Dextrinizing activity ของเอนไซม์พบว่ามีแถบชัดเจน 2 แถบ แต่เมื่อแยกโดย เอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่ามีแถบชัดเจนเพียงแถบเดียว แสดงว่าเอนไซม์ CGTase อาจเป็นไอโซเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุล 72,000 ดาลตัน แต่มีประจุต่างกัน เอนไซม์ CGTase ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีคุณสมบัติคล้ายกัน คือมีช่วงการทำงานที่ดีของ CGTase activity ที่ pH 4 - 9 และที่อุณหภูมิ 40 - 50 °ซ. เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 6 - 9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 °ซ.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

WALAYA TECHAIYAKUL : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D., 120 PP. ISBN 974-579-450-3.

Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) is a unique enzyme which converts starch or other α-1,4-glucans to cyclodextrins. Studies on Bacillus TISTR 57 strains showed that the bacteria grew but not produced CGTase in the culture broth. Bacillus A11 produce extracellular CGTase in the starch - containing growth medium, pH 9.0 at 37 ^{o}C for 3 days. Analysis by micro-crystalline cellulose thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography indicated that Bacillus A11 generates only β-cyclodextrin in this condition.

CGTase from Bacillus A11 was purified about 59 - fold by starch absorption, ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography. This enzyme preparation was separated into two fractions in disc-electrophoresis stained by coomassie brilliant blue R 250 and 0.2% iodine solution. The enzyme showed only a single band when assayed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was estimated to be 72,000. The crude and partially purified enzyme possessed its maximum cyclodextrin-forming activity in the pH range of 4 - 9 and at 40 - 50 ^{o}C and was stable in the pH range of 6 - 9 and up to 50 ^{o}C.

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำ ตลอดเวลาที่ผู้เขียนศึกษาในภาควิชาชีวเคมีจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล และรองศาตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีและศูนย์เครื่องมือที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ทดสอบ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตในภาควิชาชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการพิมพ์งานวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สารบัญ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ฎ

สารบัญรูป.....ฏ

คำย่อ.....ฒ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. เครื่องมือ วัสดุ และเคมีภัณฑ์

2.1 เครื่องมือ.....16

2.2 วัสดุภัณฑ์.....17

2.3 เคมีภัณฑ์.....18

2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....20

3. วิธีการทดลอง

3.1 แบคทีเรีย

3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย.....21

3.1.2 การเพาะเลี้ยง.....22

3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อ.....24

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase.....24

3.2.2 สารละลายสำหรับหาโปรตีน.....25

3.2.3 สารละลายสำหรับโครมาโตกราฟฟีแบบเยื่อบาง.....26

3.2.4 สารละลายสำหรับการทำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานส-เฟอเรส ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....26

3.2.5 สารละลายสำหรับการทำดิสค์โพลีอะไครลาไมด์ - เจล อีเลคโตรโฟรีซีส.....26

3.2.6 สารละลายสำหรับการทำเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ - เจล อีเลคโตรโฟรีซีส.....27

3.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

3.3.1 Dextrinizing activity (Iodine Method).....29

3.3.2 Cyclodextrin-trichloroethylene assay - (CD-TCE assay).....30

3.4 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน

3.4.1 วิธี Thin-Layer Chromatography (TLC).....31

3.4.2 วิธี High Performance Liquid Chromatography - (HPLC).....32

3.5 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

3.5.1 Protein assay.....33

3.5.2 Microprotein assay.....33

3.6 การทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วน

3.6.1 การดูดซับโดยแป้ง.....36

3.6.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....36

3.6.3 การทำโครมาโตกราฟฟีแบบแลกไอออนด้วย ดีอีเออี-เซลลูโลส.....37

3.6.4 การทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย เซฟาเด็กซ์จี-100.....38

3.6.5 การทำดิสค์โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส.....39

3.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และ ชีวเคมีบางประการของเอนไซม์ CGTase

3.7.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเซฟาเด็กซ์ จี-100....41

3.7.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น.....42

3.7.3 ศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase...44

3.7.4 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ.45

3.7.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อความเสถียรของ - เอนไซม์ CGTase.....45

3.7.6 ศึกษาการใช้แป้งชนิดต่างๆเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CGTase...45

4. ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะการเจริญและการสังเคราะห์ CD ของ Bacillus สายพันธุ์ต่างๆ.....46

4.2 การเพาะเลี้ยงและลักษณะการเจริญของ Bacillus A11.....54

4.3 ผลการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง Bacillus เพื่อให้ผลผิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูง.. 54

4.4 ผลของปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเหนี่ยวนำให้ Bacillus A11 ผลิตเอนไซม์ CGTase.....58

4.5 ผลของการเสริมแป้งชนิดต่างๆในอาหารเลี้ยง ต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase.....60

4.6 สมบัติของ crude CGTase ที่แยกได้จาก Bacillus A11.....63

4.7 เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus A11 กับ บาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 21783.....69

4.8 การทำให้เอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A11 ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....71

4.9 ผลการตตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซโยดิสด์ ไพลีอะไครลาไมด์ เจล - อิเลคโตรโฟรีซิส.....79

4.10 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางประการของเอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A11.....79

4.11 ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วน กับ crude enzyme.....88

4.12 การใช้แป้งชนิดต่างๆเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ CGTase.....88

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....97

เอกสารอ้างอิง.....105

ภาคผนวก.....113

ประวัติผู้เขียน.....120

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของสารไซโคลเด็กซ์ทรินและโครงร่างภายในโมเลกุล	2
2	โครงสร้างของไซโคลเด็กซ์ทรินชนิด α-,β- และ γ- ตามลำดับ	4
3	ลักษณะโครมาแกรมของสาร CD จาก Bacillus A11 เปรียบเทียบกับสารไซโคลเดกทรินซ์มาตรฐานชนิด α-,β-และ γ- โดยวิธี TLC	52
4	ลักษณะของโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ CD จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	53
5	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I pH 7.2 อุณหภูมิ 30°ซ ที่เวลาต่างๆ	55
6	แอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 7.2 อุณหภูมิ 30°ซ ที่เวลาต่างๆ	56
7	ผลของความเป็นกรด - ด่าง และอุณหภูมิของของอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II ต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A11	57
8	การเหนี่ยวนำ bacillus A11 ให้ผลิต CGTase ด้วยแป้ง ปริมาณ 0 - 5 กรัม% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ที่เวลาต่างๆ	59
9	การผลิต CD ของ Bacillus A11 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งปริมาณต่างๆ 0 - 5 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9.0 อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	61
10	ผลของความเป็นกรด - ด่าง ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase	64
11	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase	65
12	ผลของความเป็นกรด - ด่าง ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase	67
13	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase	68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะและสมบัติต่างๆของไซโคลเด็กซ์ทริน	5
2	สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase	8
3	ผลิตภัณฑ์ CD ที่สำคัญและสมบัติบางประการของเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	10
4	เปรียบเทียบสมบัติต่างๆของเอนไซม์ CGTase จากบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ หลังจากแยกเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์แล้ว	12
5	การนำผลิตภัณฑ์ไซโคลเด็กซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ คศ. 1984 - 1987 (หน่วยเป็นตัน)	14
6	ลักษณะการเจริญและการสังเคราะห์ CD ของบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR และ Bacillus A11	47
7	ผลของแป้งต่างๆต่อแอคติวิตีของ CGTase จาก Bacillus A11 เลี้ยงใน medium II pH 9 ที่เติมแป้งชนิดต่างๆ	60
8	ผลการดูดซับด้วยแป้งและการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-90 %	75
9	สรุปผลการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วน	80
10	เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase เมื่อใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรตของเอนไซม์	96
11	สมบัติของแป้งชนิดต่างๆ	100

รูปที่ หน้า

14 การผลิตเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus circulans ATCC 21783 ที่เวลาต่างๆ.....70

15 เปรียบเทียบ Dextrinizing activity และ .CGTase activity ของเอนไซม์ CGTase มาตรฐาน ATCC 21783 และ Bacillus A11 ที่ pH ต่างๆ.....72

16 เปรียบเทียบ Dextrinizing activity และ CGTase activity ของเอนไซม์ CGTase มาตรฐาน ATCC 21783 และ Bacillus A11 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....73

17 การแยกเอนไซม์ CGTase ด้วยคอลัมน์ DEAE - cellulose.....77

18 การแยกเอนไซม์ CGTase ด้วยคอลัมน์ Sephadex G - 100.....78

19 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆของการทำให้เอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วนแยกโดย ดิสด์ โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส...81

20 รูปแบบกการย้อมสี Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase ที่ได้จากขั้นตอนต่างๆของการทำให้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดย ดิสด์ โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.....82

21 รูปแบบโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ CGTase ในการหาน้ำหนักโมเลกุล ของเอนไซม์ CGTase โดยคอลัมน์ Sephadex G - 100.....84

22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนมาตรฐาน ใหหการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ CGTase โดย คอลัมน์ Sephadex G - 100.....85

23 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐาน และเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่างๆของการ ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดย เอสดีเอส - โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.....86

รูปที่ หน้า

24 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดย เอสดีเอส - โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.....87

25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี เอสดีเอส - โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.....89

26 ผลของความเป็นกรด - ด่าง ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านด้วยคอลัมน์ Sephadex G - 100.....90

27 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 100.....91

28 ผลของความเป็นกรด - ด่าง ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 100.....93

29 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 100.....94

คำย่อ

มล.	=	มิลลิลิตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
CD	=	Cyclodextrin
CGTase	=	Cyclodextrin Gluconotransferase
TLC	=	Thin Layer Chromatography
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
R_f	=	rate of fiow in chromatography
µl	=	Microlitre
µg	=	Microgram
mM	=	Millimolar
MW	=	Molecular Weight
M	=	Molar
A	=	Absorbance
BSA	=	Bovine Serum Albumin