ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตแอลฟาแมนโนซิเดส

ชื่อผู้เขียน นายทรงยศ อนุชปรีดา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อภิญญา ผลิกมล ประธานกรรมการ

อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.พูนศุข ศรีโยธา กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการทดลองแยกเชื้อรา และคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติและที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สามารถผลิตแอลฟาแมนโนซิเดสได้ โดยแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน มูลสัตว์ น้ำพุร้อน ปุ๋ยหมัก ดินบริเวณข้างกองขยะ แป้งบุกที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ และอาหารหมักดอง รวมทั้งหมด 52 ตัวอย่าง และเชื้อราจากห้องปฏิบัติการ จำนวน 43 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อ โดยใช้อาหารเหลวเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ (enrichment media) 2 ครั้ง เป็นเวลา 6 วัน และใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตแอลฟาแมนโนซิเดส (cultivation media) อีก 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งมีแมนแนนจากแป้งบุก 0.25% เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 45 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน วัดการทำงานของเอนไซม์แอลฟาแมนโนซิเดสโดยใช้ p-nitrophenyl-α-D-mannopyranoside เป็นซับสเตรท บ่มเอนไซม์ที่ 30 °C pH 5.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินบริเวณภาควิชาชีววิทยาบริเวณใต้ต้นมะยม ซึ่งเป็นไอโซเลต AD-3S มีการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity เท่ากับ 1.464 munit/ ml. ของเอนไซม์ และ 7.611 munit/ mg.ของโปรตีน ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อรามาตรวจสอบดูลักษณะทางสัญฐานวิทยา พบว่า เป็นเชื้อรา Petriellidium sp. สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต แอลฟาแมนโนซิเดส พบว่า ความเข้มข้นของแมนแนน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จาก Petriellidium sp. คือที่ความเข้มข้น 0.7% (w/v) และผลของแมนแนนและแมนโนส ต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าการเติมแมนโนส 0.04% (w/v) ร่วมกับ แมนแนน 0.7% (w/v) จะช่วยให้การเจริญของเชื้อราในช่วงแรกดีขึ้น แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟาแมนโนซิเดส คือ $(NH_4)_2SO_4$ 2.0% (w/v)และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และนำมาใช้แทนแมนแนนจากหัวบุก คือแป้งข้าวเหนียว ความเข้มข้น 0.6% (w/v)โดยไม่ต้องเติม แมนโนสเหมือนใช้แมนแนน pH ของอาหารก่อนการเพาะเลี้ยงคือ pH 7.0 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 4 วัน ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 55 °C pH 6.0 คุณสมบัติต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา Petriellidium มีความเสถียรช่วงอุณหภูมิ 4 °C ถึง 50 °C และ pH ในช่วง 5.0 ถึง 8.0 จากการทดลองเก็บรักษาเอนไซม์ โดยการแช่แข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ดีกว่าการแช่แข็ง ระยะเวลาที่เก็บรักษา พบว่าในสัปดาห์ที่ 6 การทำงานของเอนไซม์ลดลง 6.52 % ของการทำงานเริ่มต้น เอนไซม์มีการทำงานสูงสุดหลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว เท่ากับ 35.462 munit/ml. ของเอนไซม์ และมี specific activity เท่ากับ 175.071 munit/ mg. ของโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Isolation and Selection of Mould Capable of α-Mannosidase Production

Author Mr.Songyot Anuchapreeda

M.S. Biology

Examining Committee :

Assist.Prof.Abhinya Plikomol Chairman

Lecturer Dr.Dararat Tongkao Member

Assoc.Prof.Dr.Poonsook Sriyotha Member

Abstract

Isolation and selection of moulds from natural and stock cultures of the Microbiological Laboratory, Faculty of Science, Chiang Mai University, which are capable of α- mannosidase production The natural sources of mould, providing 52 samples, were from soils, fermented food, hot springs,dung, non sterile conyannku mannan, manure and soil from the side of rubbish tips. Stock culture provided 43 samples. Moulds from natural sources were isolated using enrichment media, changed twice in 6 days and cultivation media for 4 days. The latter used 0.25% mannan as a carbon source and cultivation was carried out at 45 °C, pH 5.0 with shaking at 200 rpm. The supernatant was used for measuring the alpha mannosidase activity using p-nitrophenyl-α-D-mannopyranoside as substrate and incubation at 30 °C, pH 5.5, for 4 hours. It was found that the mould isolate AD-3S, taken from soil at the Department of Biology, near Otaheite goose-berry bushes, was the best for producing alpha mannosidase.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The enzyme activity and specific activity were 1.464 munit/ml. of enzyme and 7.611 munit/mg. of protein respectively. From the basis of morphological identification, it was shown that isolate AD-3S is Petriellidium sp., the maximum growth takes place at 45°C; the optimum pH is 5.5

It was found that the optimum concentration of mannan for alpha mannosidase production was 0.7% (w/v). It was also found that using a medium containing 0.04% mannose with 0.7% mannan could help growth at first. For optimum enzyme production, the nitrogen source was 2.0% $(NH_4)_2SO_4$, the most suitable carbon source, used instead of konyannku mannan, was 0.6% glutinous rice flour,the pH of the medium was 7.0 and cultivation was at 45°C for 4 days. The optimized conditions for enzyme activity were 55°C and pH 6.0 . The properties of the enzyme from Petriellidium sp. are as follows : the range of temperature and pH stability for the enzyme was from 4°C - 50°C and pH 5.0 - 8.0. For preserving the enzyme,the best conditions are between 4 °C and freezing, but it was found that 4°C was better than freezing. By the sixth week enzyme activity had dropped by 6.52% in the frist week at 4°C. The maximum enzyme activity and specific activity at optimun conditions, were 35.462 munit/ml. of enzyme and 175.071 munit/mg. of protein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved