ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาแมนโนซิเดส จากเชื้อราไอโซเลท AD-3S บนอาหารแข็ง

ชื่อผู้เขียน นางชนิกานต์ คุ้มนก

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์อภิญญา ผลิโกมล ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.พูนศุข ศรีโยธา กรรมการ
ดร. ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท AD-3S บนอาหารแข็งเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาแมนโนซิเดส โดยการศึกษาระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ปริมาณความชื้นของการเพาะเลี้ยง แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสม แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาแมนโนซิเดส ชนิดของสารละลายและเวลาที่ใช้ในการสกัด ชนิดของซับสเตรทที่เหมาะสม ลักษณะของซับสเตรทที่เหมาะสม และการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยใช้ปริมาณความชื้น 45%, 50%, 55%, 58%, 62%, 64%, 66%, 68% และ 70% ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรทและยูเรีย และใช้รำข้าวเหนียว รำข้าวจ้าว รำข้าวสาลี แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวจ้าว แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง glucose, sucrose และ

manitol เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 10 วัน และอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง 5 ระดับคือ 30, 37, 45, 50 และ 55 °ซ ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการสกัด 3 ชนิดคือน้ำกลั่น, sodium chloride ความเข้มข้น 0.85%และ phosphate buffer pH 6.0 ความเข้มข้น 0.2 M ระยะเวลาที่ใช้ 1, 5 และ 24 ชั่วโมง ส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานประกอบด้วยแป้งบุก 5 กรัม KH_2PO_4 0.014 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.0125 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.0035 กรัม และ Yeast extract 0.05 กรัม ชนิดของซับสเตรทที่ทดลองคือแป้งบุก รำข้าวเหนียว ข้าวเหนียว ข้าวจ้าว แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวจ้าว ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองกับข้าวเหนียว ถั่วเหลืองกับข้าวจ้าว และถั่วเขียว ส่วนลักษณะของซับสเตรทที่ใช้คือบดละเอียดและหั่นฝอย วัดการเจริญโดยเทียบจากเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่ลดลงในระยะต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยง วัดค่าการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ p-nitrophenyl-α-D-mannopyranoside เป็นซับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระดับความชื้นที่เหมาะสมเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ โดยที่แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมคือรำข้าวเหนียว 0.6% และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซับสเตรทเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือบุก โดยการใช้บุกบดละเอียดจะให้การทำงานของเอนไซม์มากที่สุด สารละลายที่ใช้สกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดคือน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในอ่างน้ำแข็ง จากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วันพบว่าเอนไซม์มีการทำงานสูงสุดและมีค่า enzyme activity เท่ากับ 32.564 munit/ml.enzyme และ specific activity เท่ากับ 104.707 munit/mg.protein เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่ลดลงเพิ่มขึ้นทุกวันและมากที่สุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เอนไซม์แอลฟาแมนโนซิเดสจากเชื้อราไอโซเลท AD-3S สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิและ pH เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 ถึง 60 องศาเซลเซียส และ pH 5.5 ถึง 8.0 ตามลำดับ

Thesis title : Optimal Conditions for α-Mannosidase Production from Mold Isolate AD-3S on Solid Culture

Author Mrs. Chanikarn Koomnok

M.S. Biology

Examining Committee :

Assistant Prof.Abhinya Plikomol	Chairman
Associate Prof.Dr.Phoonsuk Sriyotha	Member
Dr.Dararat Tongkao	Member

Abstract

A solid state fermentation of the mold isolate AD-3S for the production of α-mannosidase was evaluated under various culture times, moisture content of the culture medium, nitrogen sources, carbon sources and characteristic of the substrates. For each set of experiments, the Completely Randomized Design statistic was followed for analysis of the results. Among those investigates were the moisture content of 45, 50, 55, 58, 62, 64 66, 68 and 70 %, the nitrogen sources of $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 or urea, the carbon sources of glutinous rice bran, rice bran, wheat bran, glutinous rice fluor, rice flour, wheat fluor, cassava fluor glucose, sucrose or manitol, cultured at 30°, 45°, 50° and 55°C for

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

0 to 10 days. The enzyme produced by the mold was extracted with either distilled water, 0.85% sodium chloride or 0.2 M phosphate buffer pH 6.0 for 1, 5 and 24 hours and the amount determined by measuring the absorbance at 400 nm of the p-nitrophenol released from the p-nitrophenyl-α-D-mannopyranoside substrate on the basis of total protein content as measured by the method of Lowry The basal medium consisted of konyaku flour 5 g. KH_2PO_4 0.014 g. $MgSo_4.7H_2O$ 0.0125 g. $CaCl_2.2H_2O$ 0.0035 g. and yeast extract 0.05 g. Konyaku mannan, glutinous rice bran, glutinous rice, rice glutinous rice fluor, rice fluor, soybean, soybean+glutinous rice, soybean+rice and mungbean were used as the substrates for comparison. The characteristics of konyaku mannan were fluor and small pieces. The mold growth was evaluated from percentage loss of weight.

It was found that the growth temperature of 45 °C at the moisture content of 64 % using 0.6 % of glutinous rice bran as carbon source and 2 % of $(NH_4)_2SO_4$ as nitrogen source over 5 days gave the highest enzyme activity of 32.564 munit/ml.enzyme and specific activity of 104.707 munit/mg.protein when extracted with distilled water for one hour in an ice bath. The enzyme was stable at 4-60 °C and between pH 5.5 to 8.0 with the optimal temperature and pH being 55 °C and 6.0 respectively over the reaction time of 20 minutes.