ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาสภาวะที่เหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรทของแอลฟาแมนโนซิเดสจากเชื้อราที่เจริญดีที่อุณหภูมิสูงไอโซเลท AD-3S

ชื่อผู้เขียน นางสาวอุมาภรณ์ ชูเกษ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

ผู้ช่วยศาสตราจารย์อภิญญา	ผลิโกมล	ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร.ดารารัตน์	ทองขาว	กรรมการ
อาจารย์ ดร.อุราภรณ์	สอาดสุด	กรรมการ

บทคัดย่อ

แอลฟาแมนโนซิเดสเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อแอลฟาแมนโนไซด์ในซับสเตรทต่างๆ มีความสำคัญในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารและยา และต่อการวินิจฉัยทางการแพทย์

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟาแมนโนซิเดสของเชื้อราไอโซเลท AD-3S โดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เปอร์เซ็นต์เชื้อตั้งต้น แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ วางการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 10 วัน เชื้อตั้งต้นที่ใช้คือ เชื้อผสมน้ำ (suspension)

และเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้นที่ตัดโดยที่ตัดจุกคอร์ก แหล่งไนโตรเจนคือ $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, NH_4Cl, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_3C_6H_5O_7$, ผง corn steep liqour, malt extract, bacto peptone และ glycine และใช้บุกจากญี่ปุ่น เซลโลไบโอส มอลโตส ฟรักโตส ลูกเดือย งา แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว ถั่วดำ ถั่วแดง ถั่วเขียว และถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเอนไซม์ที่เวลา 20, 40, 60 และ 80 นาที วัดค่าการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ 4 mM p-nitrophenyl-∝-D-mannoside เป็นซับสเตรทที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 55˚C วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ พบว่าเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมคือการใช้เชื้อราที่เจริญบนอาหารวุ้นที่ตัดโดยที่ตัดจุกคอร์ก จำนวน 2 ชิ้น เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีผง corn steep liqour 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และแป้งข้าวเหนียว 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45˚C เป็นเวลา 4 วัน ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์คือ 40 นาที มีค่าการทำงานของเอนไซม์และ specific activity หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วเท่ากับ 49.082 munit/ml เอนไซม์ และ 275.053 munit/mg ของโปรตีน เมื่อหาความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรท โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีกระดาษ พบว่าบุกจากญี่ปุ่น บุกจากอินโดนีเซีย และบุกจากจังหวัดกาญจนบุรี รวมทั้ง yeast mannan เป็นซับสเตรทจากธรรมชาติของแอลฟาแมนโนซิเดสได้ เมื่อนำเชื้อที่ไอโซเลท AD-3S มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาคาดว่าเป็นเชื้อ *Gliomastix murorum* AD-3S (Corda) Hughes, 1958สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45˚C

Thesis Title Optimization and Substrate Specificity of ∝ -Mannosidase from Thermophilic Mold Isolate AD-3S

Author Ms.Umaporn Chooket

M.S. Biology

Examining Committee :

Assistant Professor Abhinya Plikomol	**Chairman**
Lecturer Dr. Dararat Tongkao	**Member**
Lecturer Dr.Uraporn Sardsud	**Member**

Abstract

∝-Mannosidase is an enzyme which specific to ∝-mannoside in various substrates. It plays an important role in short chain oligosaccharide synthesis which is used in food and drug manufacturing as well as in medical diagnosis.

Optimal conditions for the production of ∝-mannosidase by the mold isolate AD-3S was investigated for various incubation times, percent inoculum, nitrogen and carbon sources and period for enzyme incubation. The Completely Randomized Design was followed for analysis of the results. Cultivation of the mold was done at various periods from for 0 to 10 days. Suspension and agar culture cut by cork borrer were used as inocula. Nitrogen sources were $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, NH_4Cl, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_3C_6H_5O_7$, corn steep liqour, malt extract, bacto peptone and glycine. Carbon sources were konjac mannan from Japan,

cellobiose maltose, fructose, Job's tears, sim seeds , corn flour, glutinous rice flour, black gram, rice bean, green gram and soya bean. Incubation of enzyme was done for 20, 40, 60 and 80 minutes. Enzyme activity was measured using 4 mM p-nitrophenyl-∝-D-mannoside as substrate at pH 6.0, 55° C. Lowry method was used for protein determination. It was found that the most suitable inoculum were 2 discs of agar culture of the mold cut by cork borror cultivated in the medium containing 2% (w/v), corn steep liqour and 0.5% (w/v) glutinous rice flour for nitrogen and carbon sources respectively. The cultivation was carried out with shaking at 200 revolutions per minute at 45° C for 4 days. Incubation time for the enzyme was 40 minutes. The maximum enzyme activity and specific activity at optimum conditions were 49.082 munit/ml of enzyme and 275.053 munit/mg of protein. Determination of substrate specificity by paper chromatography revealed that konjac mannan from Japan, Indonesia and Khanganaburi as well as yeast mannan could be use as natural substrates for ∝-mannosidase production. Morphological study suggested that the isolate AD-3S might be *Gliomastix murorum* AD-3S (Corda) Hughes, 1958.