ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่สามารถย่อยสลายกรดแกมมาพอลิกลูตามิก

ผู้เขียน นางสาววรรณา ทองมณี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ วันชัย สนธิไชย ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มรกต สุกโชติรัตน์ กรรมการ

บทคัดย่อ

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (PGA)เป็นสารโพลีเมอร์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ใช้ประโยชน์ในทางด้านอุตสาหกรรม โดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ ซึ่งต้องการกรดแกมมาพอลิกลูตามิกที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง จึงได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายกรดแกมมาพอลิกลูตามิกจาก Stock culture ตัวอย่างถั่วเน่าจากอำเภอสันทราย, อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่, อำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน, นัตโตที่ผลิตในประเทศไทย, นัตโตที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่น และรวมถึงถั่วเน่าที่ผลิตในห้องปฏิบัติการ ได้แบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 112 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบหาปริมาณ PGA โดยวิธี Colorimetry พบว่าไอโซเลท SS11 สามารถผลิต PGA ได้มากที่สุด 11.055 mg/ml. และไอโซเลท SS12, ST_4, MJ8, MH5 และ TP1 ผลิต PGA ได้ 1.942, 1.294, 0.091, 2.624, 1.400 mg/ml. ตามลำดับ นำมาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค paper chromatography พบว่าไอโซเลท MJ8 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างถั่วเน่าของอำเภอแม่แจ่ม มีความสามารถในการย่อย PGA จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถย่อยกรดแกมมาพอลิกลูตามิกโดยนำไอโซเลทที่ผลิต PGA ปริมาณมากที่สุดเลี้ยงผสมกับไอโซเลทที่ผลิต PGA ปริมาณน้อยอัตราส่วน 1:1 พบว่าไอโซเลท SS11 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ MJ8 จะให้ปริมาณ PGA ลดลงเป็น1.026 mg/ml. จากนั้นได้นำมาวิเคราะห์หาชนิดของเอนไซม์ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 10% polyacrylamide gel พบว่าเป็นเอนไซม์ γ- glutamyl hydrolase ที่ย่อยสลาย PGA โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 37 °C ที่ pH 8.0 และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ 40°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงใน 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) ซึ่งเอนไซม์ γ- glutamyl hydrolase นี้สามารถย่อยเฉพาะพันธะระหว่าง L- และ L- glutamate ซึ่งแสดงว่าเป็นการย่อยแบบ endo-type เมื่อนำไอโซเลท MJ8 มาศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าไอโซเลท MJ8 คือ *Bacillus subtilis*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Isolation and Selection of Bacteria from Thua-nao Capable of Degrading Gamma Polyglutamic Acid

Author Miss Wanna Thongmanee

Degree Master of Science (Biology)

Thesis Advisory Committee Associate Professor Wanchai Sonthichai Chairperson
Assistant Professor Morakot Sukchotiratana Member

Abstract

Gamma polyglutamic acid (PGA) is a polymer produced by microornisms. It has been used in industries particularly in the medical fields in which smaller molecules of PGA are required. Therefore, bacteria capable of degrading PGA were isolated and selected from stock cultures, sample of thua-nao from Sunsai and Maejam Districts, Chiang Mai province ; Muang District Mae Hongson Province, Natto produced in Thailand and Japan as well as the fermented soybeans made in the laboratory and 112 isolates were obtained. Colorimetry method was used for the determination of PGA. Isolate SS11 was found to produced the maximum amount of PGA of 11.055 mg/ml. Isolates SS12, ST4, MJ8, MH5 and TP1 produced 1.942, 1.294, 0.091, 2.624 and 1.400 mg/ml of PGA respectively. Preliminary examination with paper chromatography technique revealed that isolate MJ8 from Maejam was able to degrade PGA. The bacteria capable of degrading PGA were selected by co-culturing the maximum PGA producing isolate with the less PGA producer at ratio 1:1 . It was found that SS11 co-cultured with MJ8 produced lesser PGA of 1.026 mg/ml. Analysis of the enzyme with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% polyacrylamide gel indicated that it was γ-glutamyl hydrolase which degraded PGA. Tha optimum conditions for the enzyme activity was 37 $^{\circ}$C and pH 8.0. The enzyme was stable at 40°C for 1 hour in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cleaved the L- and L- glutamyl bond indicating the endo-type breakage. Morphological and biochemical studies showed that isolate MJ8 was *Bacillus subtilis.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved