ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสกัดเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากแบคทีเรีย (Leuconostoc sp. Streptomyces sp.) และการทำให้บริสุทธิ์

ชื่อผู้เขียน น.ส.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

ผศ.ดร.เกรียงศักดิ์	ไชยโรจน์	**ประธานกรรมการ**
อ.ดร.นวลศรี	รักอริยะธรรม	**กรรมการ**
อ.ดร.บัณฑิต	ลีละศาสตร์	**กรรมการ**

บทคัดย่อ

ได้ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Leuconostoc sp. และ Streptomyces sp. เพื่อให้ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส โดยเชื้อแบคทีเรีย Leuconostoc sp. เลี้ยงในอาหาร citrate medium 2 สูตร ได้แก่ สูตรที่เติมและไม่เติม Xylose ส่วน Streptomyces sp. เลี้ยงในอาหาร nutrient agar และ yeast starch agar อย่างละ 2 สูตรเช่นกัน จากการศึกษา การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Streptomyces sp. จะใช้ระยะเวลาประมาณ 3-4 วัน ของการเจริญเติบโตสูงสุด

เมื่อทำการสกัดแยกเอาเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสออกจากเซลของแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว นำไปวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสม ซึ่งหาได้จากการใช้เอนไซม์ Sweetzyme type.Q ของบริษัท Novo

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

crude enzyme ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่เติม Xylose จะมีแอคติวิตี้มากกว่าที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม Xylose โดยเรียงลำดับของแอคติวิตี้ของเอนไซม์จากมากไปหาน้อย Leuconostoc dextranicum, Streptomyces albogriseolus, Streptomyces aminophilus, Streptomyces sp. จากหญ้าหมักใต้ต้นไม้, Streptomyces alboniger และ Streptomyces sp. จากหญ้าหมักบริเวณแปลงเกษตร ทั้งอาหาร 2 สูตร

การสกัดเอนไซม์โดยใช้ detergent และทราย พบว่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่สกัดโดยการใช้ทรายจะมีค่ามากกว่าการใช้ detergent ในแบคทีเรียแต่ละชนิด และเพื่อศึกษาการสกัดเอนไซม์จากเซลแบคทีเรียในขณะที่อยู่ในอาหารเหลว ทำโดยใช้ไลโซไซม์เป็นตัวทำให้เซลแตก แล้วตรวจสอบฟรุคโตสที่เกิดขึ้นโดย Cysteine-Carbazole method สีม่วงเข้มแสดงว่ามีฟรุคโตสเกิดขึ้นมาก เอนไซม์มีแอคติวิตี้ดี วิธีการใช้ไลโซไซม์เหมาะสำหรับการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสซึ่งมีเป็นจำนวนมาก ผลการทดลองที่ได้จะสอดคล้องกับการวัดค่าแอคติวิตี้

ในการศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสม, ความคงทนต่อความร้อน, pH ที่เหมาะสม และความจำเพาะต่อสับสเตรทของ crude enzyme พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์มีค่าประมาณ 70 °ซ เอนไซม์ทนต่อความร้อนได้ประมาณ 80 °ซ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH 7.0-7.5 ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต, ไดอะลิซิส, ใช้ DEAE-Sephadex A-50 คอลัมน์ และ Sephadex G-200 คอลัมน์ เอนไซม์จาก Leuconostoc dextranicum และ Streptomyces albogriseolus จะมีความบริสุทธิ์มากขึ้น 26.41 เท่า และ 28.44 เท่า และมีเปอร์เซ็นต์ yield เหลืออยู่ 14.71 % และ 15.00 % ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จะได้แถบของโปรตีนเพียง 1 แถบ เมื่อหามวลโมเลกุล SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามี 2 แถบทั้งเอนไซม์จาก Leuconostoc

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

dextranicum และ Streptomyces albogriseolus และมวลโมเลกุลของเอนไซม์อยู่ในช่วงมวลโมเลกุลต่ำของโปรตีนมาตรฐาน จึงศึกษามวลโมเลกุลโดยวิธี gel filtration โดยใช้โปรตีนมาตรฐานในช่วงโมเลกุลต่ำ หาค่าเฉลี่ยมวลโมเลกุลของเอนไซม์จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ คือ แถบที่ 1 ของเอนไซม์จาก Leuconostoc dextranicum มีค่าประมาณ 80,000 ดาลตัน ส่วนแถบที่ 2 มีค่าประมาณ 70,000 ดาลตัน และแถบที่ 1 ของเอนไซม์จาก Streptomyces albogriseolus มีค่าประมาณ 78,500 ดาลตัน ส่วนแถบที่ 2 มีค่าประมาณ 65,000 ดาลตัน เมื่อทำการศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสม, ความคงทนต่อความร้อน และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้ว พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ค่าประมาณ 70 °ซ สำหรับ Streptomyces albogriseolus และ 80 °ซ สำหรับ Leuconostoc dextranicum ส่วนความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์จากทั้ง 2 แหล่ง สามารถทนได้ถึง 80 °ซ และ pH ที่เหมาะสมของ Streptomyces albogriseolus ประมาณ pH 7.2 ส่วน pH ที่เหมาะสมของ Leuconostoc dextranicum ประมาณ pH 7.4 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การศึกษาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์จาก Leutonostoc dextranicum K_m และ V_{max} มีค่าเท่ากับ 0.011 M และ 0.27 μMole/min ส่วนเอนไซม์จาก Streptomyces albogriseolus พบว่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.013 M และ 0.189 μMole/min

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Extraction and Purification of Glucose Isomerase from Leuconostoc sp. and Streptomyces sp.

Author Ms.Janpen Intaraprasert

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assist.Prof.Dr.Griangsak	Chairote	Chairman
Lecturer Dr.Nuansri	Rakariyatham	Member
Lecturer Dr.Bundit	Leelasart	Member

Abstract

Bacteria Leuconostoc sp. and Streptomyces sp. for production of glucose isomerase were used. Cultivation of the Leuconostoc, Streptomyces was done in liquid citrate medium, nutrient agar liquid and yeast starch agar liquid with and without xylose. The Streptomyces sp. showed maximum growth after 3-4 days.

After extraction of crude enzyme from the microorganisms, the glucose isomerase activity was determined by using glucose which was determined using enzyme Sweetzyme type.Q from Novo. Glucose isomerase activity of crude enzyme from bacteria

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

growing in the medium with xylose was higher than in the medium without xylose, activity of crude enzyme from Leuconostoc dextranicum was much more higher than Streptomyces albogriseolus, Streptomyces aminophilus, Streptomyces sp. isolated from grass composted under the trees, Streptomyces alboniger and Streptomyces sp. from composted grass in agricultural area with and without xylose respectively.

Glucose isomerase activity of crude extracted by seasand was higher than by detergent. Extraction using lysozyme was also tried. Cell suspension was reacted with lysozyme before determination of glucose isomerase activity. The production of fructose was determined by cysteine-carbazole method showed purple color. The color intensity increased by increasing of fructose concentration. Lysozyme treatment was good for selection of glucose isomerase produced microorganisms if there is a lot of isolates.

The optimum temperature of activity was 70°C, heat stability for activity was 80°C and optimum pH was around 7.0-7.5.

Glucose isomerase was purified by $(NH_4)_2SO_4$ fraction, chromatography on DEAE-Sephadex A-50 and gel filtration on Sephadex G-200. The enzyme from Leuconostoc dextranicum and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Streptomyces albogriseolus was purified 26.41 fold and 28.44 fold with percentage yield were 14.71 % and 15.00 % respectively. The purified enzyme was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis. Glucose isomerase from Leuconostoc and Streptomyces was found to consist of two bands and molecular weight were in the range of low molecular weight standard protein by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Consequently, in the studies of determination of molecular weight by gel filtration, we used low molecular weight standard protein was used. The average molecular weight from these two methods were 80,000 dalton for the first bna and 70,000 dalton for the second band of the enzyme from Leuconostoc dextranicum and 78,500 dalton and 69,000 dalton for the first and second band of the enzyme from Streptomyces albogriseolus. The properties of the purified glucose isomerase from the bacteria were examined. The optimum temperature was 70°C for the enzyme from Streptomyces albogriseolus and 80°C for enzyme from Leuconostoc dextranicum. For the heat stability, the enzyme from both organism were active upto 80°C. The optimum pH was 7.2 for Streptomyces albogriseolus and 7.4 for Leuconostoc dextranicum.

The K_m and V_{max} values of the enzyme from Leuconostoc dextranicum were 0.011 M and 0.27 μMole/min while K_m and V_{max} of enzyme from Streptomyces albogriseolus were 0.013 M and 0.189 μMole/min, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved