ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เอนไซม์กลูโคอะมิเลสจากเชื้อรา Sporothrix sp. KS20 และการประยุกต์

ชื่อผู้เขียน น.ส.อาภรณ์ ดาราพงษ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ.ดร.พูนศุข	ศรีโยธา	ประธานกรรมการ
อ.ดร.ดารารัตน์	ทองขาว	กรรมการ
รศ.สายสมร	ลำยอง	กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาสมบัติของกลูโคอะมิเลสซึ่งผลิตโดยเชื้อรา Sporothrix sp. KS20 พบว่าเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีค่าอุณหภูมิ optimum เป็น 65 °ซ และ pH optimum เป็น 4.5 เอนไซม์สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °ซ ได้ 22 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 65 °ซ แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว ความเสถียรของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นถ้ามีแป้งอยู่ด้วย

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 0-90 % $(NH_4)_2SO_4$ saturation ตามด้วยไดอะไลซีส แล้วแยกด้วย DEAE-Sepharose CL-6B และ Sephacryl S-200 ให้กลูโคอะมิเลส 4 ชนิด คือ กลูโคอะมิเลส I, II(1), II(2) และ III มีความบริสุทธิ์เป็น 2.40, 58.19, 1.22 และ 2.66 เท่า ตามลำดับ เอนไซม์ทุกเอนไซม์มีอุณหภูมิ optimum เป็น 65 °ซ และ pH optimum เป็น 4.0, 4.5,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.0-4.5 และ 4.0 ตามลำดับ กลูโคอะมิเลส II(2) เสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °ซ มากกว่ากลูโคอะมิเลสอื่น คือ หลัง 10 ชั่วโมง ยังมีแอคติวิตี้เหลืออยู่ถึง 61.0 % เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดเสถียรต่อ pH ในช่วง 3.0-6.5 ที่ 4 °ซ ถึง 48 ชั่วโมง การเติม Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในช่วง 0-60 ppm ไม่มีผลต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ แต่ Ca^{2+} 30 และ 60 ppm ทำให้เอนไซม์เสถียรต่ออุณหภูมิ 65 °ซ ได้มากขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย soluble starch เมื่อตรวจสอบโดยวิธีทางเอนไซม์, HPLC และ TLC พบว่าส่วนใหญ่เป็นกลูโคส มีมอลโตสปนมาด้วยเล็กน้อยโดยที่กลูโคอะมิเลส I ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสมากที่สุด กลูโคอะมิเลส I, II(1), II(2) และ III เร่งปฏิกิริยาใช้ soluble starch เป็นสับสเตรท มีค่า K_m เป็น 3.953, 3.846, 3.953 และ 3.846 มก./มล. และ V_{max} เป็น 3.333, 2.702, 1.219 และ 1.389 มก./มล./นาที ตามลำดับ

เมื่อนำกลูโคอะมิเลสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 0-90 % saturation และมีเอนไซม์ 99 หน่วย มาสลายน้ำแป้ง 43.3 % ที่ผ่านการสลายด้วย Termamyl 120 L 3.12 KNU (0.026 กรัม) ที่อุณหภูมิ 100 °ซ pH 6.0 นาน 1 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา 50 ชั่วโมง ที่ 65 °ซ pH 5.0 ให้สารละลายที่มีค่าสมมูลเดกซ์โตรสเป็น 94.38 % แต่ถ้าใช้ระบบเอนไซม์ผสมแบบขั้นตอนเดียวซึ่งมีกลูโคอะมิเลส 99 หน่วย Termamyl 120 L 3.12 KNU (0.026 กรัม) บ่มที่ 65 °ซ pH 5.0 นาน 70 ชั่วโมง จะได้สมมูลเดกซ์โตรส 56.77 % เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Glucoamylases from *Sporothrix* sp. KS20 and Its Applications

Author Ms.Arporn Darapong

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc.Prof.Dr.Poonsook Sriyotha Chairman

Lecturer Dr.Dararat Tongkao Member

Assoc.Prof.Saisamorn Lumyong Member

ABSTRACT

A crude enzyme, having glucoamylase activity, was obtained from *Sporothrix* sp. KS20 cultured in a starch containing medium. The temparature and pH optima of the enzyme were found to be 65°C and 4.5 respectively. The enzyme was considerably stable to heating at 55°C over 22 hours. However, heating at 65°C caused a sharp decrease in its activity. The presence of starch had some stabilizing effect on the enzyme.

When the enzyme was purified by precipitation with $(NH_4)_2SO_4$ at 0-90 % saturation, followed by dialysis and chromatography on DEAE-Sepharose CL-6B and Sephacryl S-200, four Glucoamylases were obtained. The purified enzymes had a purity fold

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

of 2.40, 58.19, 1.22 and 2.66 for Glucoamylase I, Glucoamylase II(1), Glucoamylase II(2) and Glucoamylase III respectively. Activity assays at various temparatures and pH 5.0 indicated the temparature optimum of 65°C for all the four enzymes whereas the pH optima were 4.0, 4.5, 4.0-4.5 and 4.0. Heat treatment of the four enzymes at 55°C indicated that the Glucoamylase II(2) was most stable, with 61.0 % of the activity remained after 10 hours. Incubation at 4°C in a solution buffered at pH 3.0-6.5 did not cause a decrease in the enzyme activity over 48 hours. Furthermore, addition of Ca^{2+} or Mg^{2+} at 0-60 ppm did not have any effect on the enzyme activity, although the Ca^{2+} at 30 and 60 ppm could stabilize the enzymes towards heating at 65°C.

Using soluble starch as the substrate, the kinetic constants K_m and V_{max} of each Glucoamylase were determined to be 3.953 mg/ml, V_{max} = 3.333 mg/ml/min for Glucoamylase I, K_m = 3.846 mg/ml and V_{max} = 2.702 mg/ml/min for Glucoamylase II(1), K_m = 3.953 mg/ml and V_{max} = 1.219 mg/ml/min for Glucoamylase II(2) and K_m 3.846 mg/ml and V_{max} = 1.389 mg/ml/min for Glucoamylase III. Analysis of the products by an enzymatic method, separation by HPLC and TLC revealed the presence of glucose in an amount higher than that of maltose.

The Sporothrix sp. KS20 Glucoamylases, obtained by precipitation the crude enzyme with $(NH_4)_2SO_4$ at 0-90 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

saturation, when added to a starch hydrolysate prepared by incubation the 43.3 % starch suspension with Termamyl 120L for 1 hours at 100°C pH 6.0, yielded a sugar solution having a dextrose equivalent value of 94.38 %. In a single step utilizing a mixture of the two enzymes, however, the dextrose equivalent of the sugar solution was only 56.77 %.

CHIANG MAI UNIVERSITY 1964
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved