

นางสาว อุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-583-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 1807991x

Immobilization of Dextranase on Activated Carbon

Miss Usanee Kulintornprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School


Chulalongkorn University

1992

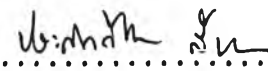
ISBN 974-581-583-7

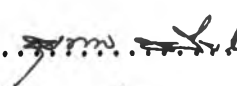
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์
โดย นางสาวอุษณีย์ กลินทรประเสริฐ
ภาควิชา จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนีสวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเป็รื่อง

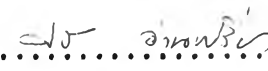
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรกาญช์)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สินี สิทธิพนธ์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนีสวัน)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปราณี อ่านเป็รื่อง)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไนเราะช ปิ่นพานิชการ)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี)

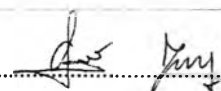
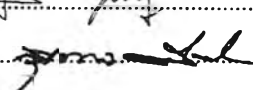
พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

อุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ : การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์ (IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE ON ACTIVATED CARBON) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, รศ. ดร. บราณี อ่านเบรื่อง, 120 หน้า. ISBN 974-581-583-7

จากการศึกษาตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 โดยมีคาร์บอนกัมมันต์ขนาด 8-16 เมชเป็นตัวพียง และตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้ 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไฮเลนเป็นสารกระตุ้น และกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปคือ ใช้ 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไฮเลน 2% โดยปริมาตรร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% โดยปริมาตร และความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส 25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยทำที่อุณหภูมิห้อง ความเป็นกรดต่างที่ 6 และเวลาที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงรูปคือ 3 ชั่วโมงสำหรับการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น 2 ชั่วโมงสำหรับการสร้างพันธะร่วม และ 2 ชั่วโมงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

ผลของการศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป พบว่า มีแอกติวิตีจำเพาะสูงขึ้น ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเปลี่ยนแปลงจาก pH 5.5 ไปเป็น pH 5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานนั้นไม่แตกต่างจากเอนไซม์อิสระ ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง และต่ออุณหภูมิดีกว่าเอนไซม์อิสระ และยังพบว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปนี้มีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 45 วัน เมื่อเก็บในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และค่าคงที่ไมคิสิสมิค่าเท่ากับ 9.1×10^{-7} โมลาร์สำหรับลีสเตรทเดกซ์แทรน ที-2000 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่าคงที่ไมคิสิสของเอนไซม์อิสระ

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่อนิสิต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C125849 : MAJOR MICROBIOLOGY

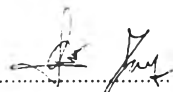

KEY WORD : IMMOBILIZATION/DEXTRANASE/ACTIVATED CARBON

USANEE KULINTORNPRASERT : IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE ON ACTIVATED CARBON. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF SUTHEP THANİYAVARN, Ph.D. AND ASSO. PROF. PRANEE ANPRUNG, Ph.D. 120 PP. ISBN 974-581-583-7

Dextranase from *Penicillium* sp. strain 61 has been immobilized on 8-16 mesh activated carbon via covalent binding by the use of 3-aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde as activator and intermolecular cross-linker respectively. The optimum conditions for immobilization were : 2% (v/v) 3-amino-propyltriethoxysilane, 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 25 units/ml of crude dextranase at room temperature, pH 6. Times required for activating, cross-linking and enzyme immobilizing were 3, 2 and 2 hours respectively.

Characteristics of the immobilized enzyme have been studied and revealed, it was found that the immobilized form possesses higher specific activity, more stable to pH and temperature effects compared to native form while optimum operating pH shifted from 5.5 to 5.0 and optimum temperature remained unchanged. A half-life of over 45 days was obtained when the immobilized enzyme was stored in 0.1 M. phosphate buffer pH 7, 4°C. Moreover, the apparent K_m of the immobilized enzyme toward its substrate, dextran T-2000 was lowered to 9.1×10^{-7} M.

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่อนิสิต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนนิวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่างเปื้อง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัย รวมทั้งการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์เป็นอย่างดี ซึ่งข้าพเจ้าขอกราบขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประทีปศิรินทร์ สีหนนทน์ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นมาธิการ และรองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้กรุณาให้กำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนวิจัยบางส่วนสำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณคุณสุชาติ คิริ ที่คอยช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอขอบคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์เสร็จอย่างสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
คำย่อ	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	28
3. ผลการวิจัย	47
4. อภิปรายผลการวิจัย	84
5. สรุปผลการวิจัย	99
เอกสารอ้างอิง	103
ภาคผนวก	111
ประวัติผู้เขียน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	เปรียบเทียบผลการสำรวจอ้อยประจำฤดูกาลผลิตปี 2532/33 และ 2531/32 2
2	ผลผลิตและประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลและกากน้ำตาล..... 3
3	การสูญเสียน้ำตาลในน้ำอ้อยทั้งที่เกิดในไร่อ้อยและในโรงงาน..... 10
4	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำอ้อย..... 11
5	เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตเดกซ์แทรนเนส..... 15
6	เปรียบเทียบการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนเมทริกซ์ชนิดต่างๆ..... 48
7	ผลของความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูทาร์ลดีไฮด์ที่ระดับ ต่างๆ ต่อแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนคาร์บอนกัมมันต์..... 50
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และสารละลาย กลูทาร์ลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน..... 51
9	การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของ สารละลาย APTS และสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน..... 52
10	ผลของความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และกลูทาร์ลดีไฮด์ที่ระดับ ต่างๆ ต่อแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนคาร์บอนกัมมันต์..... 54
11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และสารละลาย กลูทาร์ลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน..... 55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
12	การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของ สารละลาย CNBr และสารละลายกลูตาไรลไฮดรต ในระดับต่างๆกัน..... 56
13	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป ที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ 58
14	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป ที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$ 59
15	ผลของการแปรผันเวลาในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเดกซ์แทรนเนส ตริงรูปของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ 57
16	สรุปคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอีสรีและ เดกซ์แทรนเนสตริงรูปในงานวิจัยอื่นๆ..... 95
17	ภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป..... 99
18	คุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอีสรี..... 100
19	คุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ..... 101

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	กรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายดิบ..... 8
2	กรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายขาว..... 9
3	ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนจากเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส..... 12
4	การตรึงเอนไซม์แบบต่างๆ..... 18
5	ปฏิกิริยาการตรึงเอนไซม์กับโปรตีนโดยเกิดพันธะเชื่อมระหว่าง โมเลกุลโดยกลูตารัลดีไฮด์..... 20
6	กลไกที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในขั้นตอนของการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยมี APTS เป็นสารกระตุ้นและกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม.... 25
7	กลไกที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในขั้นตอนของการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยมี CNBr เป็นสารกระตุ้นและกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม.... 26
8	แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะ โควาเลนต์..... 36
9	ผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป..... 61
10	ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในขั้นตอนการกระตุ้น เมทริกซ์โดยสารกระตุ้น..... 64
11	ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในขั้นตอนการสร้าง พันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์..... 65
12	ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในขั้นตอนการตรึงรูป เดกซ์แทรนเนส..... 66
13	ผลของการหลุดของเอนไซม์หลังจากที่แยกเอาเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออก จากสารผสมปฏิกิริยาที่เกิดปฏิกิริยาแล้ว 15 นาที และบ่มต่ออีก 15 นาที... 69

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
14	ผลของความเป็นกรดค้างที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรังรูป และเอนไซม์อิสระ..... 71
15	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปและ เอนไซม์อิสระ..... 73
16	ผลความเสถียรต่อความเป็นกรดค้างของเดกซ์แทรนเนสตรังรูป..... 75
17	ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปและเอนไซม์อิสระ..... 76
18	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระ ต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน..... 78
19	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระ ต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน..... 79
20	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระ ต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน..... 80
21	เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ เทียบกับเอนไซม์อิสระ ต่อระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน..... 81
22	ผลของการหาค่า K_u โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์ก..... 83
23	การวิเคราะห์การสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างตัวพุงกับเอนไซม์..... 86

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม