ผลของคาร์โบไฮเดรตบางชนิดต่อการเหนี่ยวนำไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานสเฟอเรสและการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดย *Bacillus* sp. A11

นางสาว นารถนารี รัฐปัตย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-478-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17212157

EFFECT OF SOME CARBOHYDRATES ON THE INDUCTION OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE AND CYCLODEXTRIN PRODUCTION BY *Bacillus* sp. A11

Miss Nartnaree Rattapat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974 - 636 - 478 - 2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของคาร์โบไฮเดรตบางชนิดต่อการเหนี่ยวนำไซโคลเดกซ์ทรินกลูคาโนทรานสเฟอเรสและการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดย *Bacillus* sp. A11
โดย	นางสาว นารถนารี รัฐปัตย์
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต)

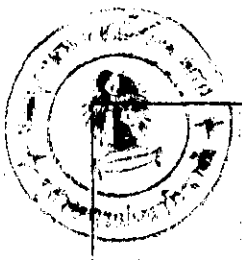
อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นารถนารี รัฐปัดย์ : ผลของคาร์โบไฮเดรตบางชนิดต่อการเหนี่ยวนำไซโคลเดกซ์ทรินกลูคาโนทรานสเฟอเรสและการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดย *Bacillus* sp. A11 (EFFECT OF SOME CARBOHYDRATES ON THE INDUCTION OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE AND CYCLODEXTRIN PRODUCTION BY *Bacillus* sp. A11) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์ , 106 หน้า, ISBN 974 - 636 - 478 - 2

จากการศึกษาการชักนำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส(CGTase) ในปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi ด้วยคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างและขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน พบว่า Dextrin typeII (2.0%; w/v) เหมาะสมในการชักนำการผลิต CGTase ที่สุดเมื่อนำเอนไซม์มาศึกษาสมบัติด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสียสภาพ ตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนกับแอคติวิตีผลไม่แตกต่างกัน แต่จากการทำ Isoelectric focusing polyacrylamide gel (IEF) พบว่าเอนไซม์ที่เกิดจากการชักนำด้วย Dextrin type II ให้ค่าไอโซไซม์บางชนิดสูงกว่าเอนไซม์ที่เกิดจากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า ส่วนการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ พบว่าคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดสั้นๆ สามารถให้สัดส่วนของ γ-CD ในปริมาณสูงเมื่อใช้น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรทในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน วิเคราะห์โดยวิธี TLC และ HPLC พบว่ามอลโตเตตราโอส (G4) และมอลโตเพนตาโอส (G5) เป็นสับสเตรทที่เหมาะสมในการให้ผลผลิต γ-CD ในสัดส่วนที่สูงขึ้นโดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต γ-CD คือ เอนไซม์ปริมาณ 50 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (E:S = 1:200,000: w/w) บ่มกับสับสเตรท 2.0 เปอร์เซนต์ (%; w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....
สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626746 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE / CYCLODEXTRIN / OLIGOSACCHRIDES / CARBOHYDRATE / *Bacillus* sp. A11

NARTNAREE RATTAPAT : EFFECT OF SOME CARBOHYDRATES ON THE INDUCTION OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE AND CYCLODEXTRIN PRODUCTION BY Bacillus sp. A11. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D., 106 p.p. ISBN 974 - 636 - 478 - 2

Several kinds of carbohydrate were used to induce cyclodextrin glycosyltransferase in *Bacillus* sp. A11 and it was found that *Bacillus* sp. A11 was able to produce high amount of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) in the Horikoshi' s medium which contained 2.0% dextrin type II (w/v) as inducer. Comparison of CGTase induced by dextrin type II and rice starch by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis found that the protein pattern and enzyme activities pattern were similar. Isoelectric focusing gel electrophoresis (IEF) showed that dextrin type II may be able to induced some form of CGTase isozyme better than rice starch. The CGTase induced by dextrin type II was further studies for cyclodextrin production by using different carbohydrates and oligosaccharide as substrates. It was shown that short-chain carbohydrates gave higher γ-CD than long-chain carbohydrates. When maltooligosaccharides were used as substrate, maltotetraose(G4) and maltopentaose(G5) produced high proportion of γ-CD and were selected as the most appropriate substrates for high γ-CD production. The optimum condition for high γ-CD was incubating 50 units CGTase/g carbohydrates (E:S = 1:200,000; w/w) with 2.0 % substrate(w/v) for 24 hours.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม –

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาแนะนำให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการดำเนินงานวิจัยด้วยดีตลอดมา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ดร.ศิริพร สิทธิประณีต ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณารับกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความกรุณาและคำแนะนำสำหรับการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ขอขอบคุณ นิสิตปริญญาโทเทคโนโลยีชีวภาพและวิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณจันทิมา จิรนุชนาฏ ที่ช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ความเข้าใจ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เคารพรัก และพี่ๆ ทุกคนที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ และกำลังใจ อย่างมากมาย จนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฐ

สารบัญรูป ..... ณ

คำย่อ ..... ต

บทที่

1. บทนำ 1

2. วัสดุ

    2.1 เครื่องมือ 18

    2.2 วัสดุภัณฑ์ 19

    2.3 เคมีภัณฑ์ 19

    2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 20

3. วิธีการทดลอง

    3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 21

        3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I 21

        3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi 22

    3.2 การเลี้ยงเชื้อ 22

บทที่ หน้า

3.3 การเก็บรักษาเชื้อ....23

3.3.1 การเก็บรักษาระยะสั้น....23

3.3.2 การเก็บรักษาระยะยาว....24

3.4 การเตรียมสารละลาย....24

3.4.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของ CGTase....24

3.4.2 สารละลายสำหรับหาโปรตีน....25

3.4.3 สารละลายสำหรับทำ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน....25

3.4.4 สารละลายสำหรับทำดิสค์โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเล็กโทรโฟรีซิส แบบไม่เสียสภาพ....26

3.4.5 สารละลายสำหรับทำไอโซอิเล็กทริค โฟคัสซิง โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟริซิส (IEF)....28

3.4.6 สารละลายสำหรับโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC)....29

3.5 การวัดแอคติวิตีของ CGTase....30

3.5.1 Dextrinizing Activity(Iodine Method)....30

3.5.2 Cyclodextrin-Trichloroethylene Assay (CD-TCE Assay)....30

3.6 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford....31

3.6.1 Protein Assay (Standard method)....31

3.6.2 Micromethod Assay....32

3.7 การดูดซับโดยแป้ง (Starch Adsorption)....32

3.8 การทำดิสค์โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเล็กโทรโฟริซิส แบบไม่เสียสภาพ (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)....35

บทที่ หน้า

3.9 การวิเคราะห์ค่า pI ด้วยวิธีไอโซอิเล็กทริค โฟคัสซิง
โพลีอะคริลาไมด์ เจล (IEF) 37
3.10 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน 39
3.10.1 โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) 39
3.10.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 40
3.11 ศึกษาการใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรทของ CGTase 41
4. ผลการทดลอง
4.1 การชักนำการผลิต CGTase ให้สูงขึ้น 42
4.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 43
4.3 การเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำ
ด้วยแป้งข้าวเจ้าและ Dextrin type II 50
4.4 การผลิตไซโคลเดกซ์จากสับสเตรทที่เป็นโพลีแซคคาไรด์
ขนาดความยาวของโมเลกุลแตกต่างกัน 57
4.5 การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากสับสเตรทที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์
ที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบตั้งแต่ 2-7 โมเลกุล 58
4.6 การวิเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินโดยวิธี TLC 61
4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน
โดยใช้สับเสตรท Maltotetraose และ Maltopentaose 71
4.7.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์
ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน 71
4.7.2 การแปรผันปริมาณสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose 74

บทที่ หน้า

4.7.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 77

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 80

รายการอ้างอิง 93

ภาคผนวก 101

ประวัติผู้เขียน 106

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. สมบัติบางประการของไซโคลเดกซ์ทริน 4

2. สรุปกลไกการทำงานของ CGTase 12

3. การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียตามชนิดของ CGTase 15

4. แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase
ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ 16

5. เปรียบเทียบผลจากการชักนำการผลิต CGTase
ด้วยคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ 44

6. สรุปผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากการเลี้ยงเชื้อด้วย1.0 % Dextrin II 46

7. เปรียบเทียบปริมาณ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีผลต่อการชักนำ CGTase 47

8. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากการเลี้ยงเชื้อด้วย 2.0 % Dextrin type II 49

9. เปรียบเทียบแอคติวิตีและชนิดของผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์
ที่ได้จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้าและ Dextrin type II 56

10. เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน
จากสับสเตรทแป้งชนิดต่าง ๆ 59

11. เปรียบเทียบชนิดและสัดส่วนของไซโคลเดกซ์ทริน
ที่ได้จากสับสเตรทน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ 60

12. แสดงค่า RT ของน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ และ
ไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐานจาก HPLC โครมาโตรแกรม 62

ตารางที่ หน้า

13. แสดงค่า Rf ของไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน และ
Reaction mixture G4, G5 จาก TLC โครมาโตรแกรม 67
14. เปรียบเทียบชนิดและสัดส่วนของไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้
จากสับสเตรทน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ 70
15. แสดงสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของแป้งชนิดต่าง ๆ 82
16. แสดงโครงสร้างและความยาวของแป้งชนิดต่าง ๆ 87

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทริน 2

2. โครงสร้างการจัดเรียงตัวของ β-CD 5

3. แสดงการเกิด Inclusion Complex ของไซโคลเดกซ์ทริน 7

4. แสดงการเกิด Modification of Guest Physical Properties

และ Guest Chemical Activity 8

5. อนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของไซโคลเดกซ์ทริน 10

6. แผนภาพแสดงการทำ CGTase ให้บริสุทธิ์ 34

7. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะและค่า dilution limit ของ

CGTase จากการชักนำด้วยคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ 45

8. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะและค่า dilution limit ของ

CGTase จากการชักนำด้วย Dextrin type II ความเข้มข้นต่างๆ 48

9. เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ

ของการทำให้ CGTase บริสุทธิ์ 51

10. เปรียบเทียบรูปแบบการย้อมสี Dextrnizing activity ของ CGTase 52

11. เปรียบเทียบรูปแบบการย้อม Dye staining for cyclodextrin ของ CGTase 54

12. เปรียบเทียบค่า pI ของ CGTase ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน 55

13. HPLC โครมาโตรแกรมของน้ำตาล G4-G6 และ

ไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐานที่มีน้ำตาล G4-G6 63

รูปที่ หน้า

14. TLC โครมาโตรแกรมของ Reaction mixture ที่ใช้
น้ำตาล G2-G7 เป็นสับสเตรท 65

15. TLC โครมาโตรแกรมของ Reaction mixture ที่ใช้
น้ำตาล G4 และ G5 เป็นสับสเตรท 66

16. HPLC โครมาโตรแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม G4 และ G5
และสารละลายตัวอย่างก่อนและหลังย่อยด้วย β-amylase 69

17. ปริมาณ CGTase ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน เมื่อใช้
น้ำตาล G4 เป็นสับสเตรท 72

18. ปริมาณ CGTase ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน เมื่อใช้
น้ำตาล G5 เป็นสับสเตรท 73

19. แสดงผลความเข้มข้นของสับสเตรทน้ำตาล G4
ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน 75

20. แสดงผลความเข้มข้นของสับสเตรทน้ำตาล G5
ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน 76

21. แสดงผลของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน
เมื่อใช้น้ำตาล G4 เป็นสับสเตรท 78

22. แสดงผลของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน
เมื่อใช้น้ำตาล G5 เป็นสับสเตรท 79

คำย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซนต์
cm.	=	เซนติเมตร
g.	=	กรัม
mg.	=	มิลลิกรัม
ml.	=	มิลลิลิตร
µg	=	ไมโครกรัม
rpm	=	จำนวนรอบต่อนาที
w/w	=	weight by weight
w/v	=	weight by volume
v/v	=	volume by volume
CD	=	Cyclodextrin
CGTase	=	Cyclodextrin glycosyltransferase
TEMED	=	NNN' N-tetramethylethyleneddiamine
RT	=	Retention time

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย