53401210: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คำสำคัญ: เอนไซม์อะไมเลส/การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์/จุลินทรีย์ย่อยแป้ง

วิสูต แก้วมหา: การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ย่อยแป้งให้ได้ผลผลิตที่มีค่า DP จำเพาะ และการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ.ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, ผศ.ดร.สุวัฒนา พฤกษะศรี และ ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม. 113 หน้า.

เอนไซม์อัลฟาอะไมเลสที่หลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์จุลินทรีย์จากเชื้อ W1 ที่คัดแยกได้จากดินและน้ำ บ้านสวนดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี มีความสามารถในการย่อยแป้งให้มีค่า DP อยู่ในช่วงระหว่าง 3 – 6 เพื่อใช้ในการผลิต microcapsule จึงมีการศึกษาลักษณะโดยการย้อมแกรมจุลินทรีย์ พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นแท่ง และนำมาผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสและแยกบริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วย ethanol, Q Sepharose anion-exchange และ Sephacryl S-200 gel filtration chromatography ตามลำดับ เอนไซม์ถูกทำให้เข้มข้นขึ้น โดยวิธี ultrafiltration พบว่า คุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ มีค่า specific activity เท่ากับ 4,428.502 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 18.3 เท่า และ recovery 11.4% น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่หาโดยวิธี SDS-PAGE คือ 38.6 kDa สอดคล้องกับวิธี gel chromatography คือ 39 kDa เอนไซม์บริสุทธิ์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7 และอุณหภูมิ 60 ^{o}C ซึ่งเอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 7 และช่วงอุณหภูมิ 30 - 50 ^{o}C ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ที่ได้คือ 0.01 mg/ml และ 51.02 $\mu mol.ml^{-1}min^{-1}$ ตามลำดับ เอนไซม์อัลฟาอะไมเลสของเชื้อชนิดนี้ถูกยับยั้งด้วยไอออนของ Cu^{2+} ในขณะที่ไอออนของ Co^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} และ K^{+} เป็นตัวกระตุ้นให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น จากการศึกษาสารตั้งต้นทั้ง 7 ชนิด พบว่า สารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุดคือ แป้งข้าวเหนียว เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งของเอนไซม์ให้ได้ผลผลิตที่มี DP ในช่วง 3 – 4 (maltotriose และ maltotetraose) ในปริมาณที่สูงสุด พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ pH 7 อุณหภูมิ 60 ^{o}C และระยะเวลาในการบ่มอย่างน้อย 60 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้สามารถนำไปศึกษาการใช้ประโยชน์ในการผลิต microcapsule ต่อไป

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา..... ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ..... 2. ..... 3. .....

53401210: MAJOR: BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS: AMYLASE/PURIFICATION/CHARACTERIZATION

WISOOT KAEWMAHA: STUDY ON STARCH-CONVERTING MICROORGANISMS YIELDING PRODUCTS OF SPECIFIC DP AND PURIFICATION OF ITS AMYLASE. THESIS ADVISORS: ASST. PROF. JESDAWAN WICHITWECHKARN, Ph.D. ASST. PROF. SUWATTANA PRUKSASRI, Ph.D. AND SINTHUWAT RITTHITHAM, Ph.D. 113 pp.

An extracellular α-amylase was extracted from W1 strain isolated from soil and water samples at Bansuan Damnoen Saduak, Rachaburi province. W1 strain is capable of converting starch to products having specific degree of polymerization (DP) between 3 – 6. W1 strain was investigated using Gram's staining and it was shown to be a Gram-positive rod bacterium. The α-amylase was produced from W1 strain and purified through 80% ethanol precipitation, Q sepharose anion-exchange, Sephacryl S-200 gel filtration chromatography and concentrated by an ultrafiltration, respectively. The purified amylase has specific activity of 4,428.502 U/mg protein with the enzyme purity increased 1.38 folds and the recovery yield of 11.4 %. The molecular mass of the purified enzyme as estimated by SDS-PAGE and gel filtration chromatography were approximately 38.6 and 39 kDa, respectively. The optimum pH and temperature for the α-amylase production were 7 and 60 ^{o}C, respectively. This enzyme had pH stability of 7.0 with thermal stability in the range of 30-50 ^{o}C. K_m and V_{max} values for α-amylase were 0.01 mg/ml and 51.02 μmol.ml^{-1}min^{-1}, respectively. The α-amylase from W1 strain was inhibited by Cu^{2+} but various mono- and divalent cations, such as Co^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} and K^{+} stimulated the activity of this enzyme. The optimum substrate for the enzyme was waxy starch. DP production was examined by analysing the hydrolysated soluble starch that were maltotriose and maltotetraose (between 3 – 4 of DP) using HPAC. The production of DP was optimized with optimum pH, temperature and time of 7, 60 ^{o}C and for a duration at least 60 minutes, respectively. Further studies on the production of microcapsules and its properties are being investigated.

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University

Student's signature ..... Academic Year 2013

Thesis Advisors' signature 1. ..... 2. ..... 3. .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย ประเภททุนอุดหนุนการทำวิจัยสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากเงินงบประมาณแผ่นดิน และสำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ผศ.ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อแนะนำต่างๆ และช่วยเหลือทุกๆ ปัญหาในการทำวิจัย พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนเสร็จสมบูรณ์ และประสบผลสำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุวัฒนา พฤกษะศรี ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม รศ.ดร.ธนิต ผิวนิ่ม และ ดร.อดิศักดิ์ จตุรพิริย์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบ ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และข้อแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างมาก

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเชษฐ์ สมุหเสนีโต ที่ให้คำปรึกษา สอนการใช้เครื่องมือตลอดจนอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือของภาควิชาเทคโนโลยีอาหารต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร วิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีตลอดในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้มีพระคุณทุกท่าน และครูอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้กับผู้วิจัยทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ขอบคุณพี่ เพื่อนและน้องทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยนี้