บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การนำวัสดุจากการเกษตรมาใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

นฤมล คุ้มจรรยา (49) ได้ศึกษาการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์โดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในขวดแก้วทรงกรวย และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์นี้ประกอบด้วยสารแหล่งคาร์บอน คือ 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, สารแหล่งไนโตรเจน คือ 1 % มอลท์ เอกซ์แทรก และ 0.3 % ยีส์ต์ เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปตัส์เซียมไฮโดรเจนฟอส์เฟต และ 0.06 % โปตัส์เซียมไดไฮโดรเจนฟอส์เฟต, พีเอช 8.0 โดยให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดประมาณ 171 - 299 หน่วยต่อกรัม นน.เซลแห้ง

อย่างไรก็ตาม มอลท์ เอกซ์แทรกยังจัดว่าเป็นสารที่มีราคาค่อนข้างแพง และเนื่องจากประเทศไทยมีวัสดุจากการเกษตรที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายอีกหลายชนิด เช่น กากรำข้าว และกากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นวัสดุพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันพืช และอาจนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่มีคุณภาพดีขึ้น หรืออาจทดแทนมอลท์ เอกซ์แทรกได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงความสามารถในการนำวัสดุเหล่านี้มาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 เพื่อผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์

1.1 การใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองแทนมอลท์ เอกซ์แทรก

โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, 0.3 % ยีส์ต์ เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปตัส์เซียมไฮโดรเจนฟอส์เฟต และ 0.06 % โปตัส์เซียมไดไฮโดรเจนฟอส์เฟต, พีเอช 8.0 โดยผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง เป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนมอลท์ เอกซ์แทรก ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.5 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์

ที่มีแอคติวิตีใกล้เคียงกับเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1 % มอลท์ เอกซ์แทรก แต่อย่างไรก็ตามการเจริญของเซลยังจัดว่าต่ำมากโดยดูจากปริมาณน้ำหนักแห้งของเซล

1.2 <u>การใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวแทนสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด</u>

เนื่องจากกากรำข้าวเป็นวัสดุพลอยได้จากโรงงานน้ำมันพืชหาได้ง่ายกว่าเปลือกข้าวโพด ดังนั้นจึงนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแทนสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.2 โดยผันแปรปริมาณแหล่งคาร์บอนคือ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวเป็น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า 1.5 - 2.0 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวจะให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อได้ดีที่สุด

1.3 <u>ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนร่วมกับแหล่งไนโตรเจน</u>

ทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.2 โดยผันแปรแหล่งคาร์บอนคือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวเป็น 1.5 และ 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับการผันแปรแหล่งไนโตรเจนคือ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง เป็น 0.5, 1.0 และ 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1.5 หรือ 2.0 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวร่วมกับ 0.5 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง เชื้อจะเจริญและสร้างเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1.5 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว, 0.5 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง, 0.3 % ยีสต์ เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, 0.06 % โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, พีเอช 8.0

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญของเซลและการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, 0.3 % ยีส์ต์ เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, 0.06 % โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และฝันแปรปริมาณสารแหล่งไนโตรเจน คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง (% น้ำหนัก/ปริมาตร)	การเจริญของเซล (กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร)	การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ (หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง)
0.1	0.40	101
0.2	0.36	108
0.3	0.36	113
0.4	0.46	124
0.5	0.45	143
1 % มอลท์ เอกซ์แทรก	1.35	140

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญของเซลและการทำงานของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์ที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.5 %, สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง, 0.3 % ยีส์ต์ เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, 0.06 % โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และฝันแปรปริมาณสารแหล่งคาร์บอนคือ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว (% น้ำหนัก/ปริมาตร)	การเจริญของเซล (กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร)	การทำงานของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์ (หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง)
1.0	2.12	162
1.5	2.15	210
2.0	2.00	211
2.5	1.75	190
3.0	1.20	168
3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด	0.45	143

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของเซล และการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.3 % ยีส์ต์เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอส์เฟต, 0.06 % โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอส์เฟต และฝันแปรปริมาณสารแหล่งคาร์บอน คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว และสารแหล่งไนโตรเจน คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว (% น้ำหนัก/ปริมาตร)	สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง (% น้ำหนัก/ปริมาตร)	การเจริญของเซล (กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร)	การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ (หน่วย/กรัม นน. เซลแห้ง)
1.5	0.5	2.15	210
	1.0	2.04	159
	2.0	1.52	109
2.0	0.5	2.00	211
	1.0	2.05	114
	2.0	1.61	58

2. ผลของไซโลส์และระยะเวลาในการเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคส์-ไอโซเมอเรส์ในขวดแก้วทรงกรวย

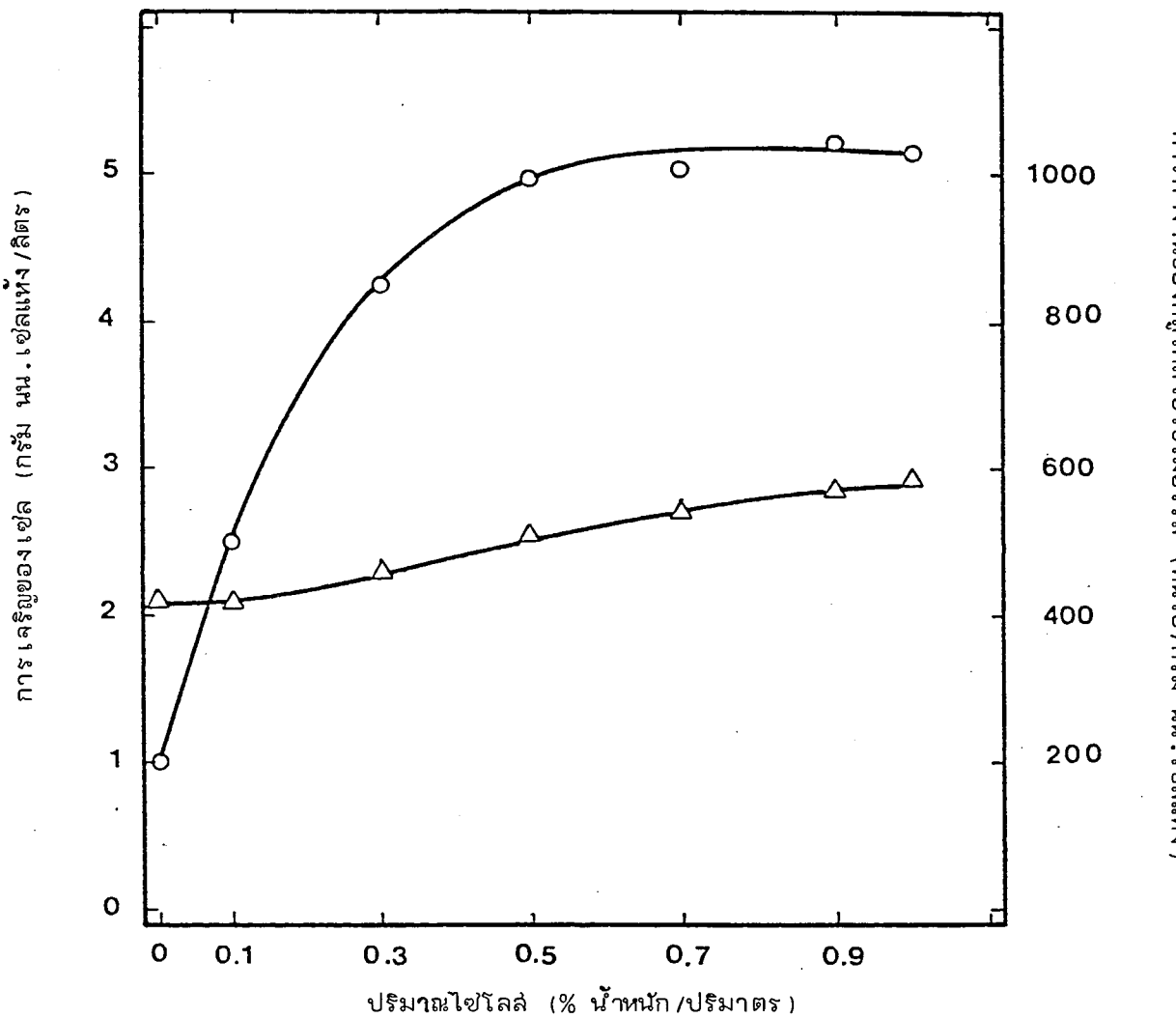
2.1 ผลของไซโลส์ต่อการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ในขวดแก้วทรงกรวย

กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ส์ร้างขึ้นโดยการชักนำของไซโลส์ (6, 14, 19, 20, 28, 30) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองถึงผลของไซโลส์ต่อการส์ร้างกลูโคส์ไอโซเมอเรส์โดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.2 โดยผันแปรปริมาณของไซโลส์ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ ผลการทดลองดังแส์ดงในรูปที่ 3 พบว่าไซโลส์มีผลต่อการชักนำการส์ร้างกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ในจุลินทรีย์ชนิดนี้ และเมื่อเติม 0.5 - 1 % ไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้การผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสูงกว่าเมื่อไม่เติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 เท่า ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกเติม 0.5 % ไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 ผลของระยะเวลาในการเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ในขวดแก้วทรงกรวย

นักวิจัยของ The Agency of Industrial Sciences and Technology (40) รายงานว่าการเติมไซโลส์เพื่อชักนำการส์ร้างกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ให้ได้ปริมาณสูงและมีการเจริญของเซลล์ ควรเติมในปริมาณที่น้อยที่สุด โดยอาจเติมปริมาณหนึ่งในตอนเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อแล้วเติมเพิ่มอีกปริมาณหนึ่งเมื่อเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้นในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบผลของเวลาต่อการเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อภายหลังจากการเติมไซโลส์แล้ว โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.2 โดยเปรียบเทียบการเติม 0.5 % ไซโลส์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 0, 6, 9, 12, 15 และ 18 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง หรือเลี้ยงเชื้อต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการเติมไซโลส์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองดังแส์ดงในรูปที่ 4 พบว่าการเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ กันแล้วบ่มให้เชื้อเจริญต่อจนครบ 24 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญและผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ในปริมาณที่สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก 24 ชั่วโมงหลังจากเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นระยะเวลา

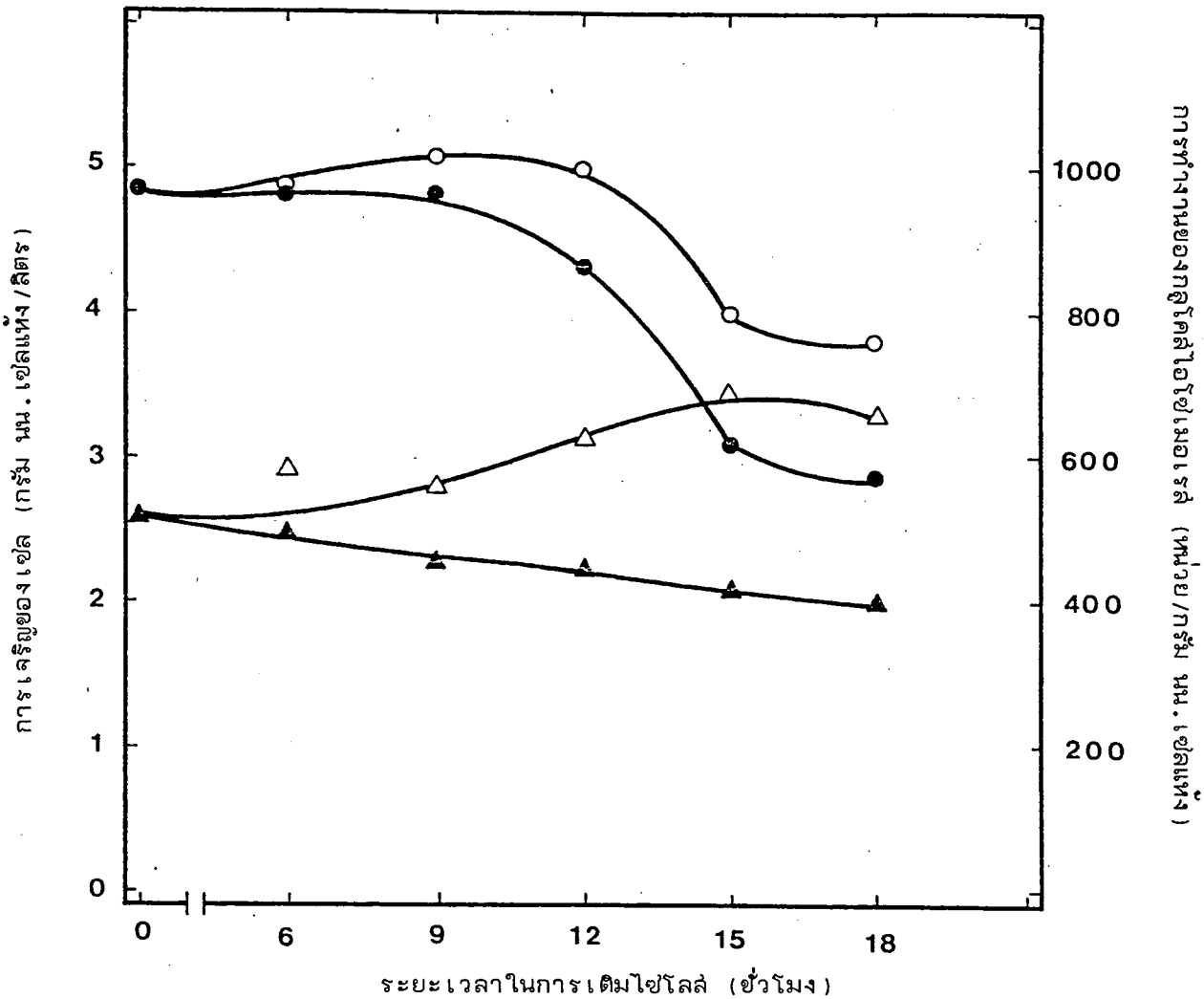
9 - 12 ชั่วโมง จะให้การผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับเมื่อเติมไซโลส์ในตอนเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ แต่การเติมไซโลส์หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นระยะเวลา 15 - 18 ชั่วโมง จะให้ปริมาณกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ค่อนข้างต่ำ



รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญของเซลและการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส่ายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1.5 %, ส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว, 0.5 % ส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง, 0.3 % ยีส์ต์ เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปแตส์เซียมไฮโดรเจนฟอส์เฟต และ 0.06 % โปแตส์เซียมไดไฮโดรเจนฟอส์เฟต, พีเอช 8.0 และผันแปรปริมาณไซโลส์ต่าง ๆ กัน

△——△ การเจริญของเซล

○——○ การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์



รูปที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญของเซลและการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเติม 0.5 % ไซโลส์ที่เวลาต่าง ๆ กัน

△——△ การเจริญของเซลเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

▲——▲ การเจริญของเซลเมื่อเลี้ยงเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง หลังจากเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

○——○ การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

●——● การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์เมื่อเลี้ยงเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง หลังจากเติมไซโลส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

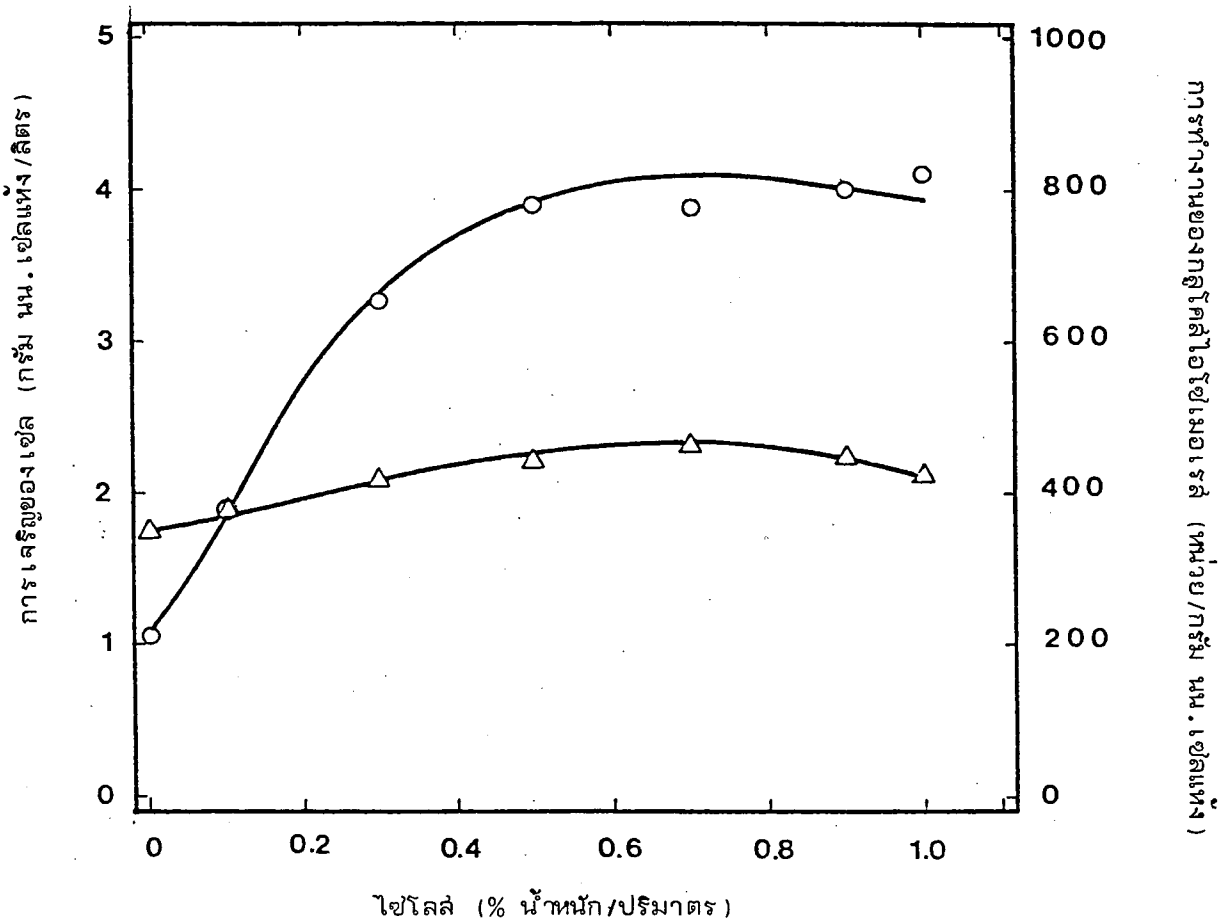
3. ผลของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ในขวดแก้วทรงกรวย

เนื่องจากไซโลสบริสุทธิ์เป็นสารที่มีราคาแพงและจากรายงานของ Takasaki (61) ซึ่งศึกษาการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดย Streptomyces albus YT4 พบว่าการเติมไซโลสในรูปของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % โดยมีรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และคอร์น สตีพ ลิเกอร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถเพิ่มการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ถึง 2 เท่า ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.3 แล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบเปรียบเทียบกับสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวและกากถั่วเหลือง ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าสารละลายย่อยด้วยกรด-กำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายมีปริมาณไซโลสสูงกว่ากากรำข้าวและกากถั่วเหลืองหลายเท่า

ต่อจากนั้นได้นำสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายนี้มาศึกษาความสามารถในการเพิ่มการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 โดยเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.2 โดยเติมสาร-ละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณต่าง ๆ กัน ซึ่งให้ไซโลสเป็น 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.0 % ตามลำดับ พบว่าที่ปริมาณไซโลส 0.5 % จะให้การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในปริมาณที่ใกล้เคียงกับเมื่อมีไซโลสในปริมาณ 1.0 % และมีปริมาณเอนไซม์สูงกว่าเมื่อไม่เติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือก-เมล็ดฝ้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 5 แต่การเจริญของเซลไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว, กากถั่วเหลือง และเปลือกเมล็ดฝ้าย

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของ	น้ำตาลรีดิวส์ (มก./มล.)	กลูโคส (มก./มล.)	ไซโลส (มก./มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	ปริมาณของแข็ง (% น้ำหนัก/ปริมาตร)
กากรำข้าว	42	31	8	18	11
กากถั่วเหลือง	24	6	5	36	11
เปลือกเมล็ดฝ้าย	240	3	160	30	24



รูปที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญของเซลและการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส่ายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้น เติมส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส์ปริมาณต่าง ๆ กัน

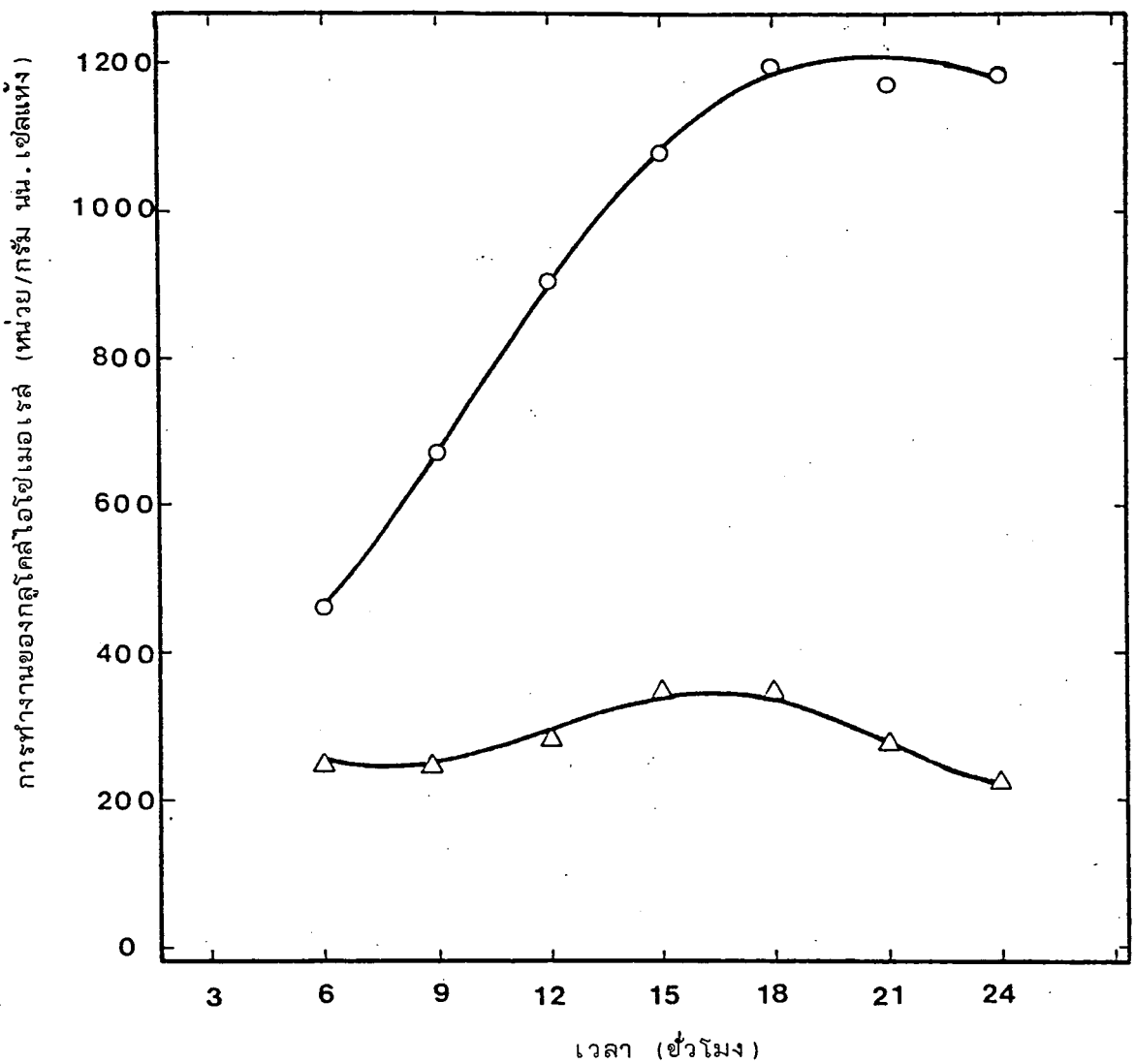
△——△ การเจริญของเซล

○——○ การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์

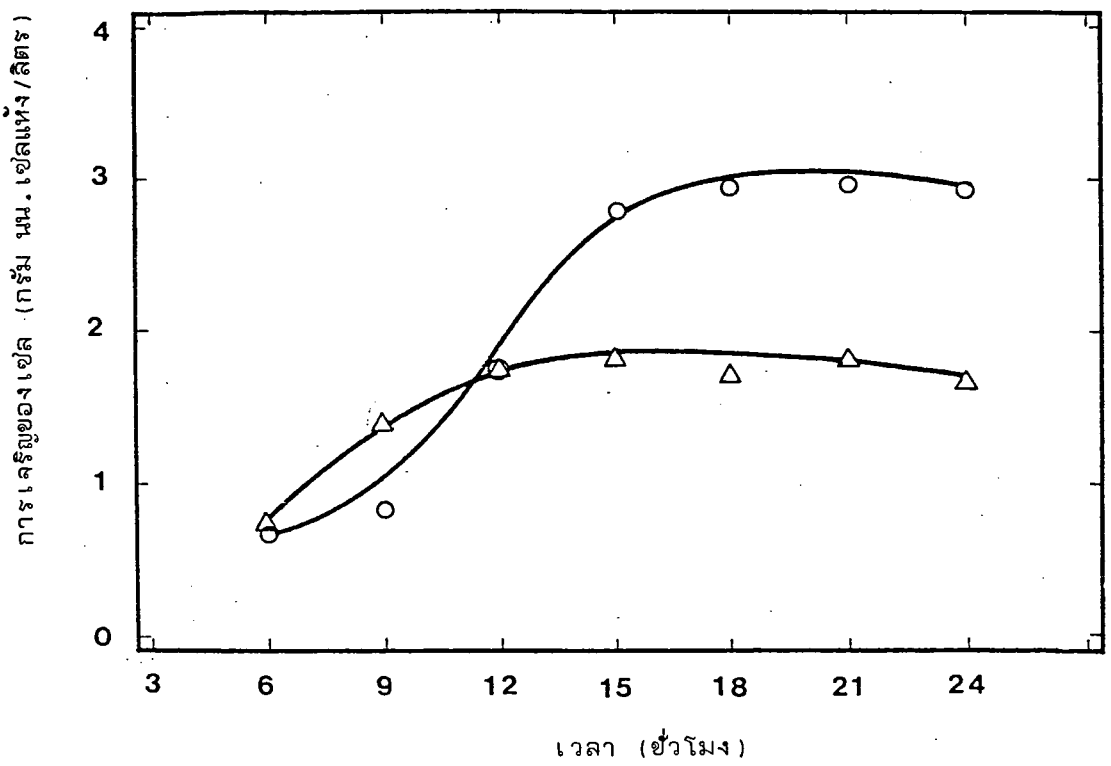
4. การศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.1 ผลของไซโลสต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสและการเจริญของเซล

จากผลการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 2 พบว่าไซโลสมีผลต่อการยักนำการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสในสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในขวดแก้วทรงกรวย โดยเมื่อเติม 0.5 % ไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสสูงกว่าเมื่อไม่เติมไซโลสประมาณ 5 เท่า ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของไซโลสต่อการผลิตเอนไซม์นี้โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 2.1 แต่เติม 0.5 % ไซโลส ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 1,200 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 18 ขณะที่จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้สูงสุดประมาณ 350 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 15 เมื่อไม่มีไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเติม 0.5 % ไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสสูงขึ้นประมาณ 3.5 เท่า ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดลองในขวดแก้วทรงกรวย นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังใช้ไซโลสเป็นสารแหล่งคาร์บอนอีกด้วย โดยพบว่าการเจริญของเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.5 % ไซโลส สูงกว่าเมื่อไม่เติมไซโลส 1.7 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยปริมาณสูงสุดของเซลที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.5 % ไซโลส มีค่าประมาณ 3 กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ขณะที่ปริมาณเซลสูงสุดเมื่อไม่เติมไซโลสคือ 1.8 กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12



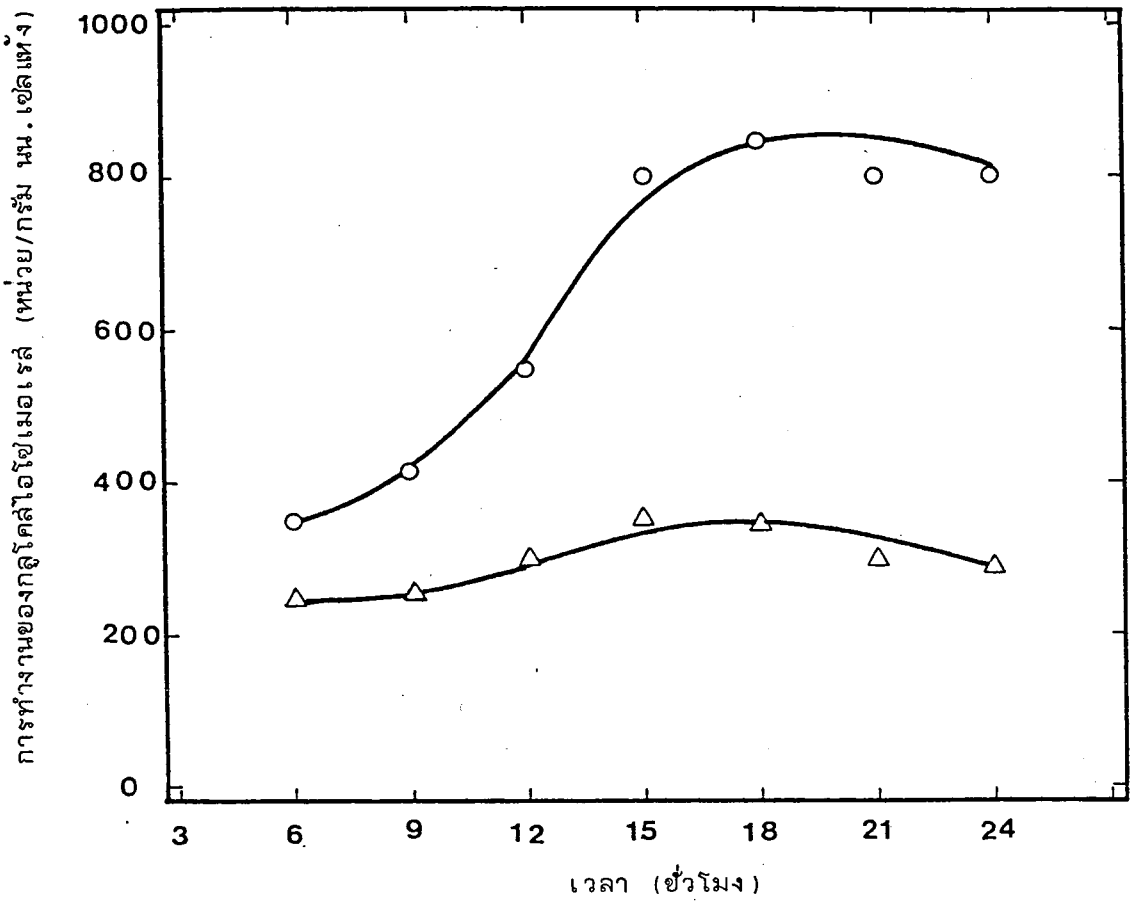
รูปที่ 6 ผลของไซโลส์ต่อการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์โดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อไม่มีไซโลส์ (△) และมีไซโลส์ปริมาณ 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) (○)



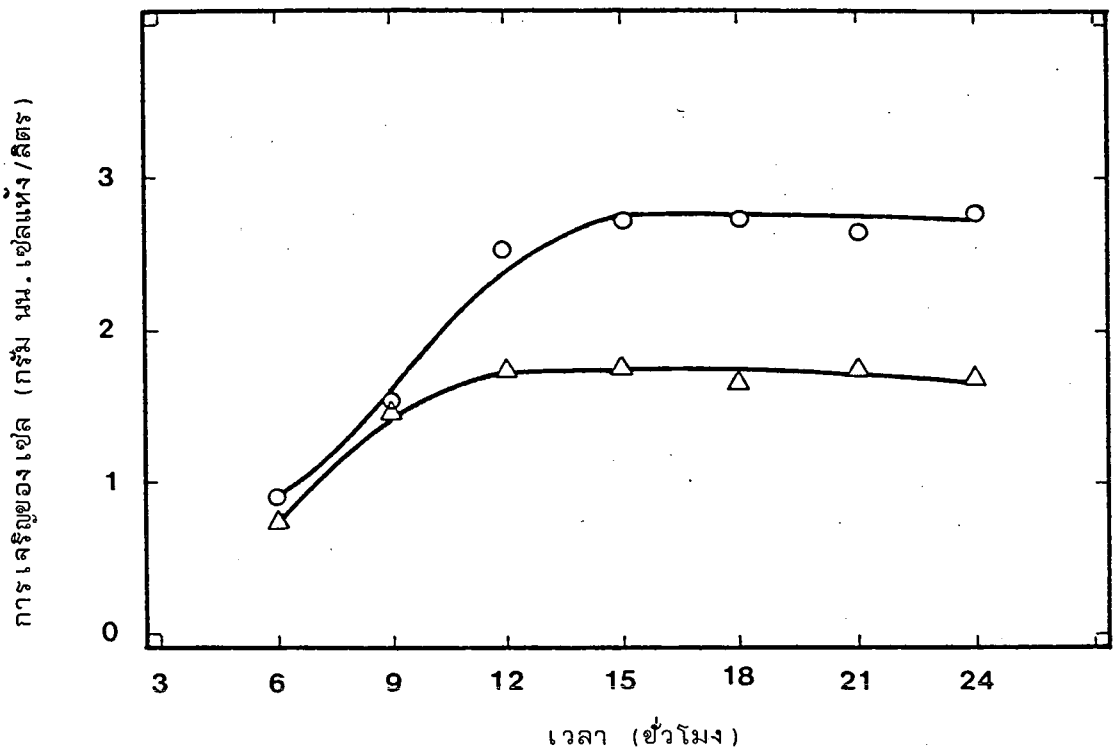
รูปที่ 7 ผลของไซโลส่ต่อการเจริญของส่เตรพโตมัยซีส่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อไม่มีไซโลส่ (△) และมีไซโลส่ปริมาณ 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) (○)

4.2 ผลของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสและการเจริญของเซล

จากผลการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3 พบว่าสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย ซึ่งเตรียมโดยวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.3 สามารถนำมาทดแทนไซโลสบริสุทธิ์ได้ โดยทำให้การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย สูงกว่าเมื่อไม่เติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4 เท่า ดังนั้นจึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายที่เตรียมได้นี้ในการชักนำการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 2.3 แต่เติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ 0.5 % ไซโลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 850 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 18 ดังแสดงในรูปที่ 8 ถึงแม้ว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการชักนำด้วยสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย จะต่ำกว่าเมื่อชักนำด้วยไซโลสบริสุทธิ์ แต่ก็ยังสูงกว่าการผลิตเอนไซม์เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารชักนำประมาณ 2.5 เท่า นอกจากนี้การเจริญของเซลสูงสุดประมาณ 2.8 กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเจริญของเซลเมื่อถูกชักนำด้วยไซโลสบริสุทธิ์ โดยมีการเจริญของเซลสูงกว่าเมื่อไม่ได้เติมสารชักนำประมาณ 1.5 เท่า



รูปที่ 8 ผลของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อไม่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย (△) และมีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ 0.5 % ไซโลส (○)



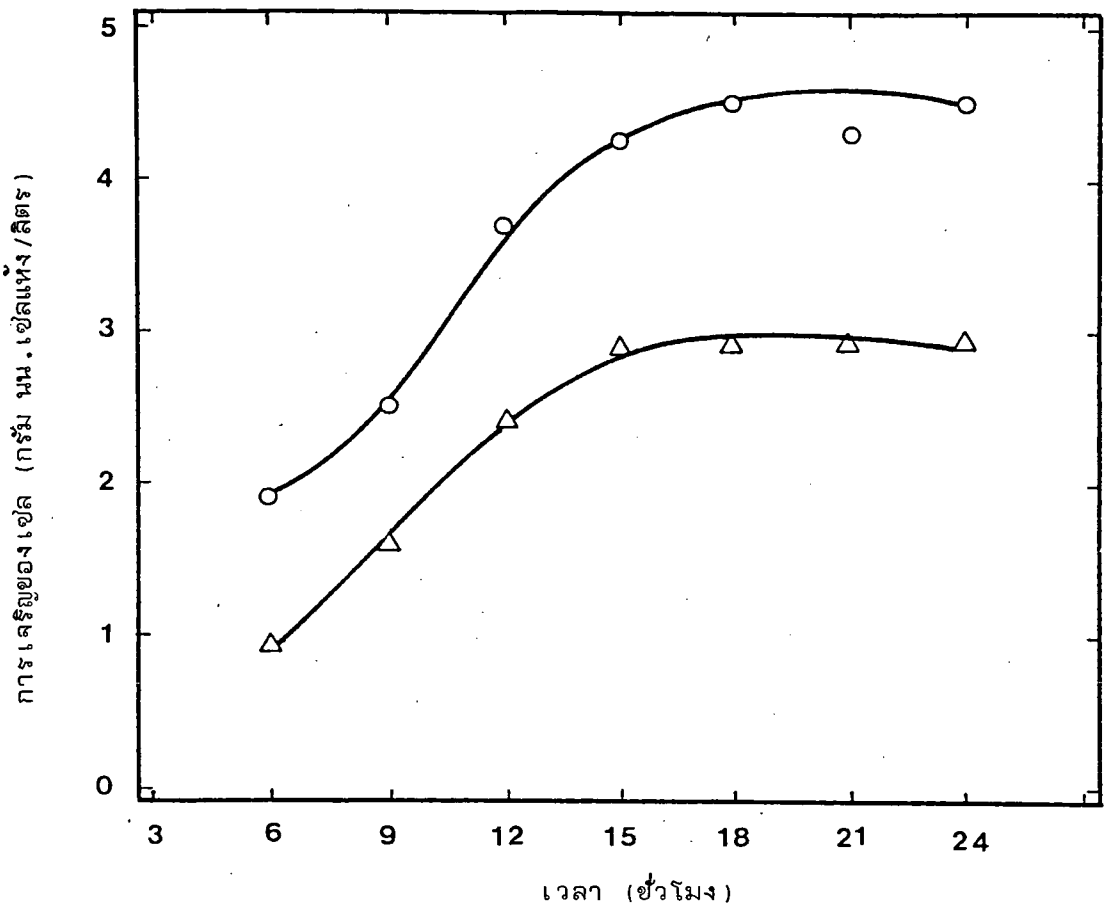
รูปที่ 9 ผลของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อไม่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย (△) และมีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ 0.5 % ไซโลส (○)

4.3 ผลของสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจน

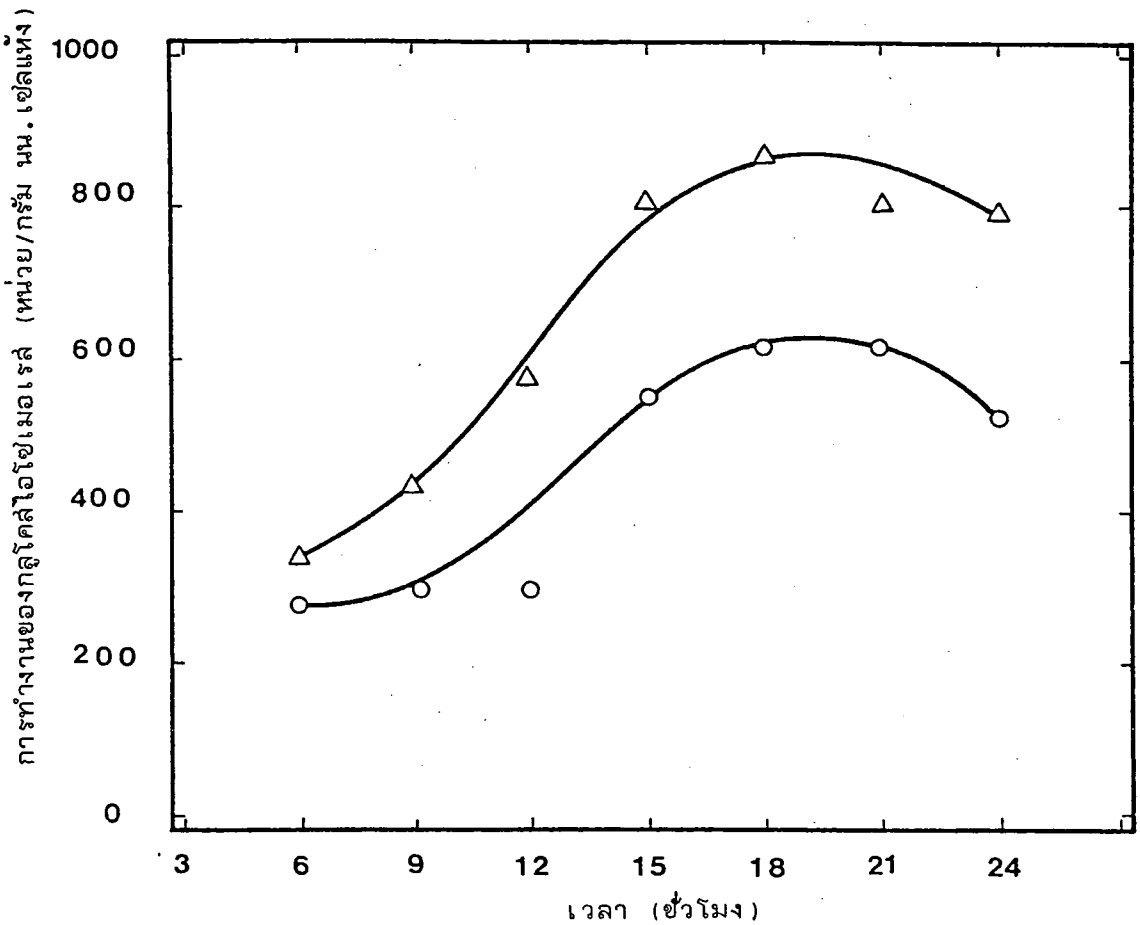
4.3.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมต่าง ๆ กัน

จากผลการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 4.1 และ 4.2 พบว่าการเติมสารชักนำคือไซโลสหรือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย ทำให้สเตรพโตมัยซีสลายพันธุ์ 190-1 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสเพิ่มขึ้น 2.5 - 3.5 เท่า เมื่อเทียบกับไม่เติมสารชักนำในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเจริญของเซลเพิ่มขึ้นเพียง 1.5 - 1.7 เท่า เมื่อเทียบกับไม่เติมสารชักนำในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเจริญของเซลนั้นขึ้นกับปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งคือ สารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจน ซึ่งในการทำวิจัยนี้ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวและสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนร่วมกัน จากงานวิจัยของ พิเชษฐ์ อิฐกอ (62) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนในกากรำข้าวและกากถั่วเหลือง พบว่ากากรำข้าวมีปริมาณคาร์บอนอยู่ 35.54 % และปริมาณไนโตรเจนอยู่ 3.71 % ส่วนกากถั่วเหลืองมีปริมาณคาร์บอนอยู่ 30.63 % และปริมาณไนโตรเจนอยู่ 8.72 % จากผลการวิเคราะห์นี้พบว่ากากรำข้าวและกากถั่วเหลืองน่าจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้ดี เมื่อเตรียมสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจนนี้ในรูปของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถัน โดยเตรียมตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.1 และ 2.2 และนำมาเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากผลการทดลองในข้อ 4.1 และ 4.2 พบว่าการเจริญของเซลที่ได้ยังต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณสารอาหารตั้งต้นที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาถึงการเตรียมสารอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น พบว่าต้องใช้สารละลายกรดและด่างในปริมาณมากเพื่อย่อยสลายสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจนและปรับพีเอชของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันเหล่านั้นให้เป็นกลาง ซึ่งอาจมีปริมาณอิออนเจือปนอยู่ในสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันเหล่านั้นในปริมาณสูง ดังนั้นเพื่อศึกษาการเพิ่มการเจริญของเซล จึงนำสารอาหารเลี้ยงเชื้อ คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวและสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองมากำจัดสารที่มีประจุโดยการผ่านอิออนเอกซ์เชนจ์ (Amberlite MB-1, Sigma Chemical, U.S.A.) แล้วทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว 1.5 % น้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 0.5 % น้ำหนักต่อปริมาตร โดยนำสารอาหารสองชนิดนี้ผ่านขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อยังประกอบด้วยยีสต์เอกซ์แทรก 0.3 %, โคบอลท์คลอไรด์ 0.01 %,

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.94 %, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.06 %, พีเอช 8.0 และเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ 0.5 % ไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองในรูปที่ 10 พบว่าสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวและกากถั่วเหลืองที่ผ่านอิออนเอกซเชนจ์ ทำให้การเจริญของเซลสูงถึง 4.5 กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตรที่ระยะการเจริญคงที่ของเซล (stationary phase) ในขณะที่การเจริญของเซลมีค่าประมาณ 3 กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร ที่ระยะการเจริญคงที่ของเซลเมื่อใช้สารอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านขั้นตอนการเตรียมดังกล่าวข้างต้น แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์นี้ พบว่าการผลิตเอนไซม์นี้ต่ำมาก โดยจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์นี้ได้สูงสุดเพียง 600 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 18 เมื่อใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวและกากถั่วเหลืองที่ผ่านอิออนเอกซเชนจ์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 11 ถึงแม้การทดลองในข้อนี้จะทำให้การเจริญของเซลเพิ่มขึ้น 50 % แต่ก็ทำให้จุลินทรีย์ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสลดลงประมาณ 30 % นอกจากนี้การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก ซึ่งการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผ่านขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นอาจก่อให้เกิดความไม่สะดวก ดังนั้นการเพิ่มการเจริญของเซลโดยวิธีดังกล่าวนี้ยังให้ผลไม่ดีนัก



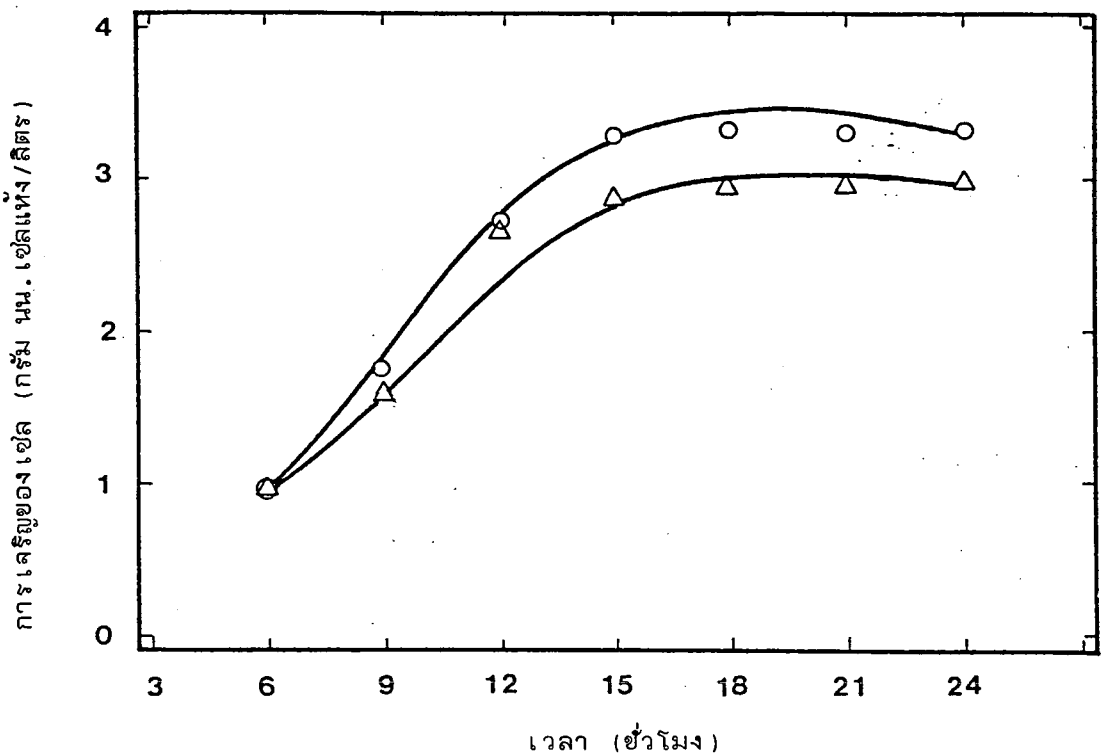
รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจน ไม่ผ่านอิออนเอกซ์เชนจ์ (△) และผ่านอิออนเอกซ์เชนจ์ (○)



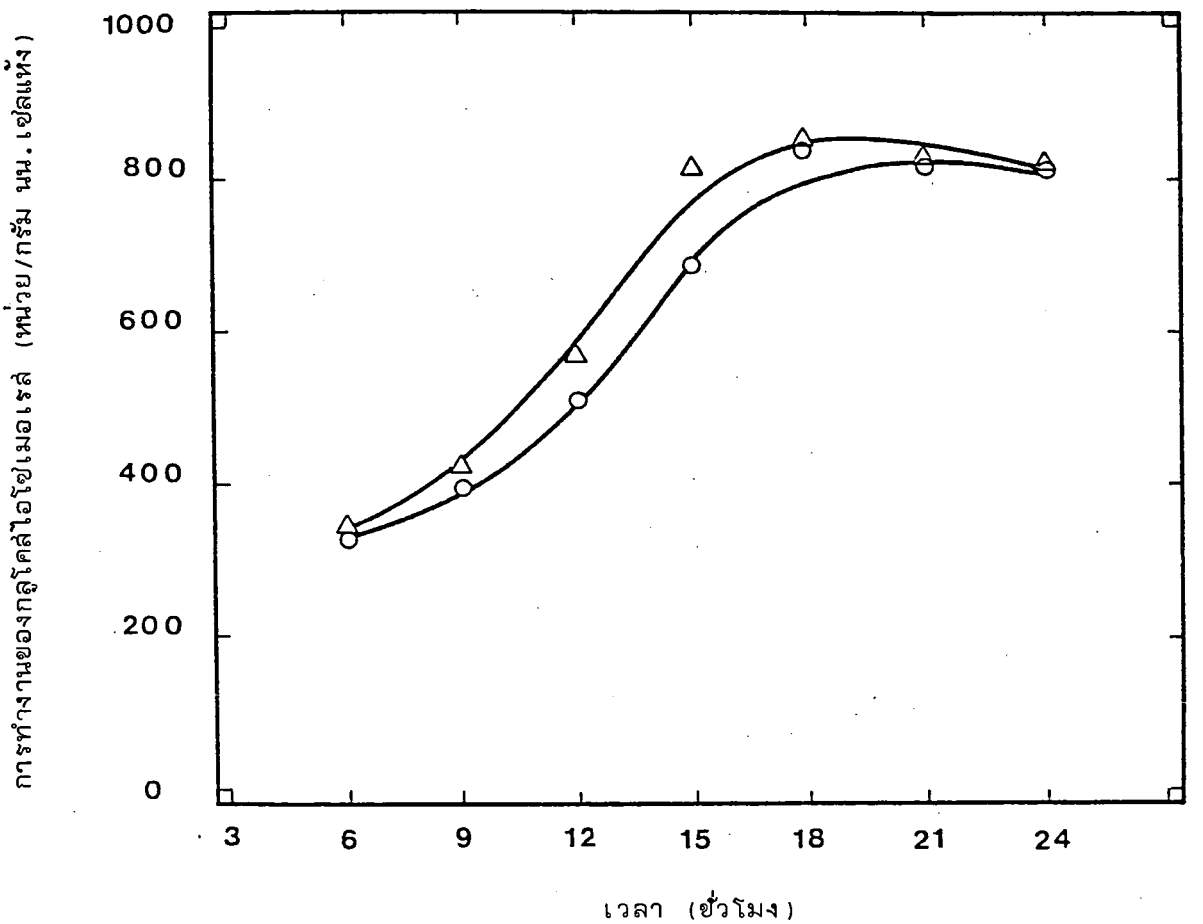
รูปที่ 11 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์ที่ผลิตโดย ส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นส์ารแหล่งคาร์บอนและส์ารแหล่งไนโตรเจน ไม่ผ่านอิออนเอกซ์เช่นจ์ (Δ) และผ่านอิออนเอกซ์เช่นจ์ (O)

4.3.2 ผลของปริมาณสารแหล่งคาร์บอน

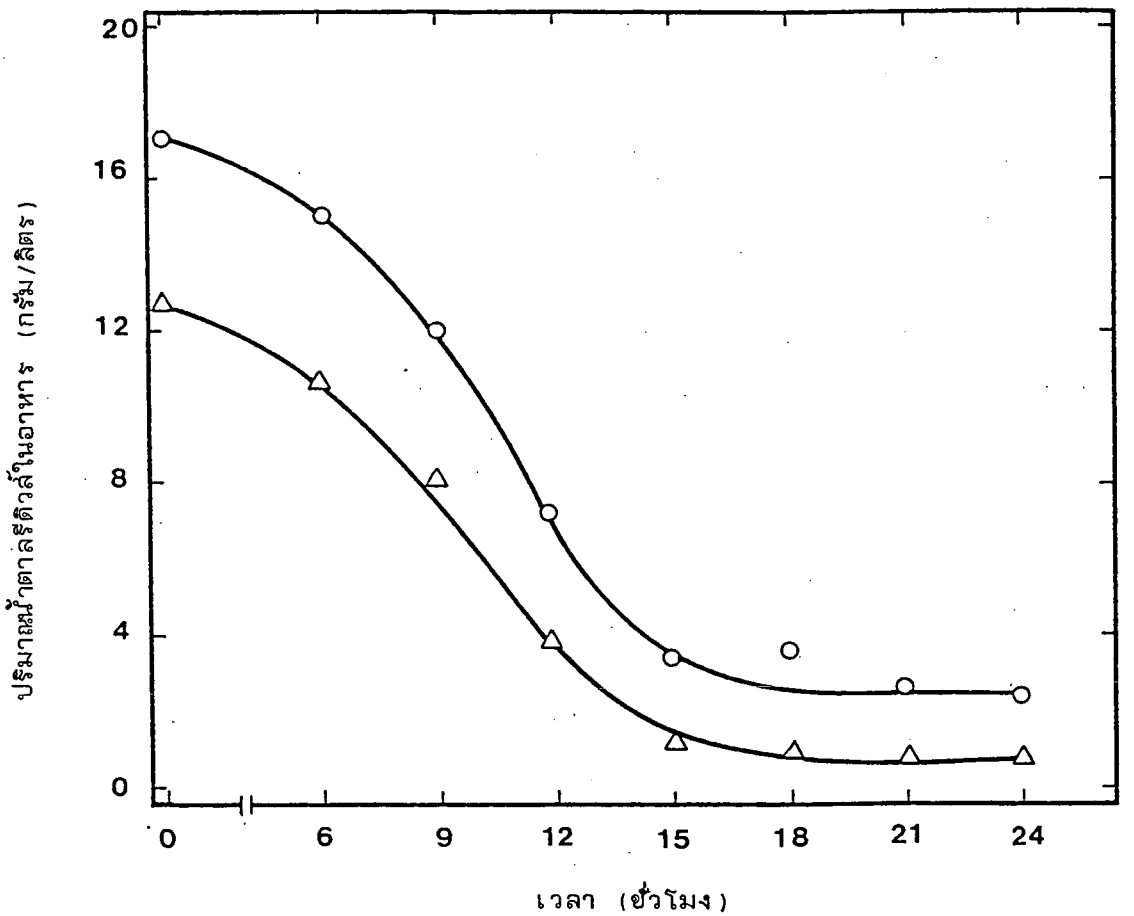
การเพิ่มการเจริญของเซลอีกวิธีหนึ่งอาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณสารอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงผลของปริมาณของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวซึ่งเป็นทั้งสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจน โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4.2 ยกเว้นใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 1.5 และ 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าการเพิ่มปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวนั้นไม่มีผลต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 โดยการผลิตเอนไซม์นี้สูงสุดประมาณ 850 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 18 ดังแสดงในรูปที่ 13 แต่พบว่าการเจริญของเซลจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 12 และจากผลการทดลองในรูปที่ 14 และ 15 ซึ่งแสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์และปริมาณโปรตีนสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว 1.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) การเจริญของเซลจึงสูงกว่าโดยให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 12 ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปเลือกใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวที่ความเข้มข้น 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และได้แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า (parameter) ต่าง ๆ เมื่อใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว 2.0 % เป็นสารแหล่งคาร์บอน ไว้ในรูปที่ 16



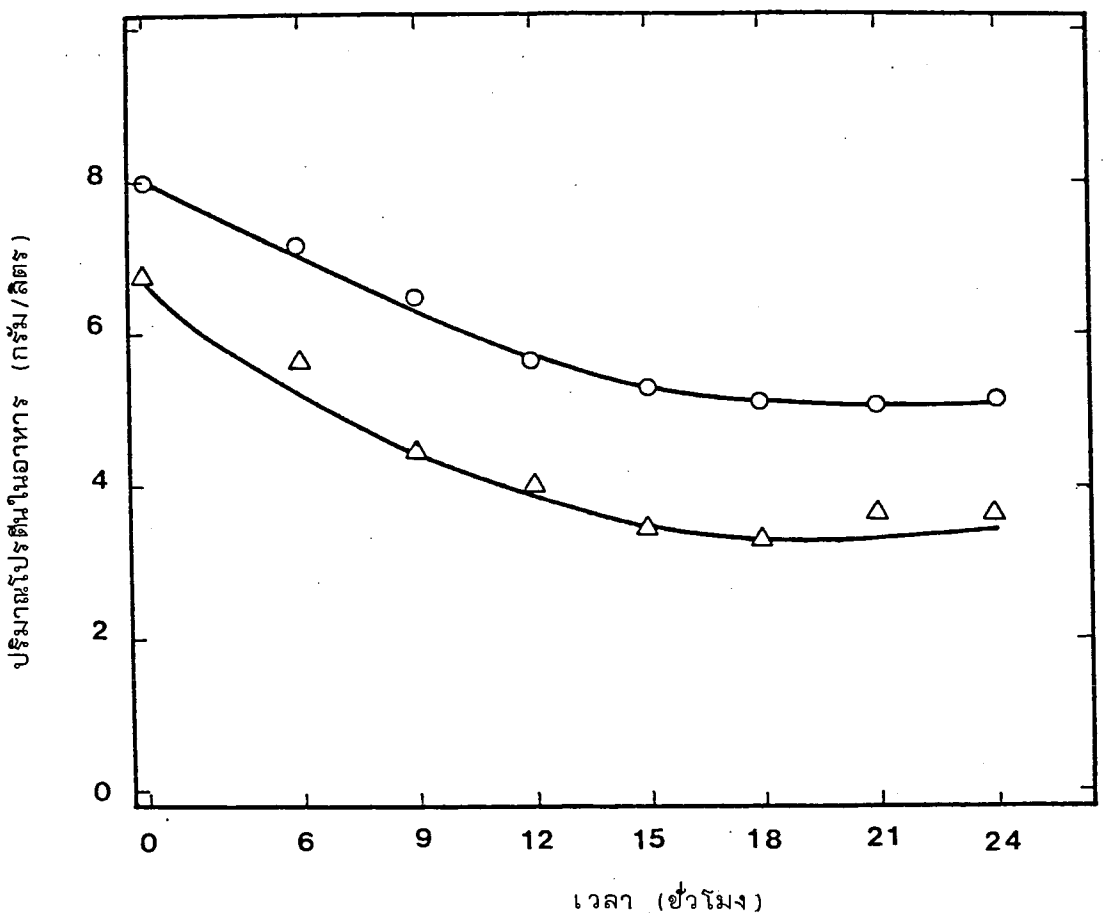
รูปที่ 12 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวเป็น 1.5 % (Δ) และ 2.0 % (O) (น้ำหนัก/ปริมาตร)



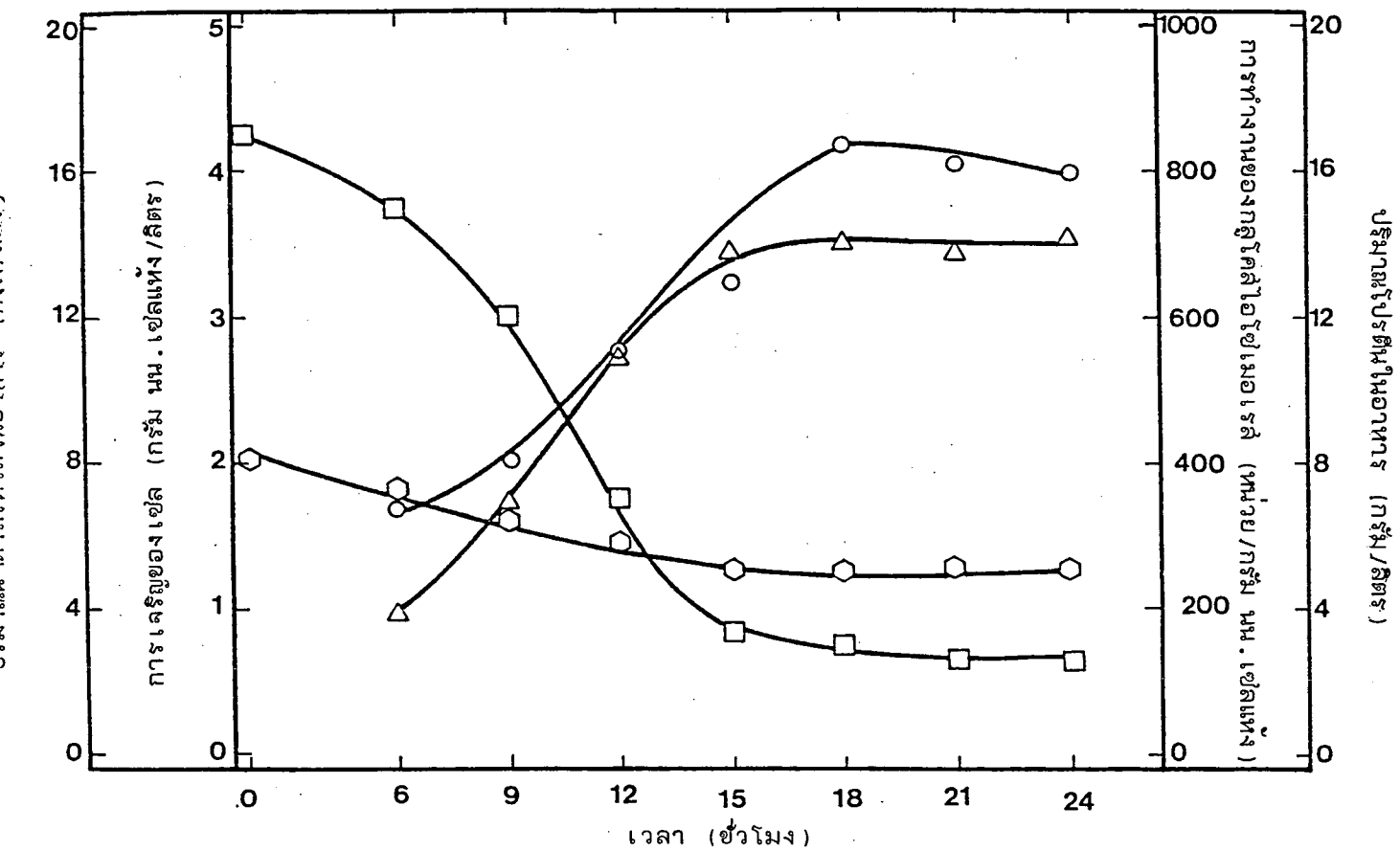
รูปที่ 13 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อผันแปรปริมาณส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวเป็น 1.5 % (△) และ 2.0 % (○) (น้ำหนัก/ปริมาตร)



รูปที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส ลายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว เป็น 1.5 % (△) และ 2.0 % (○) (น้ำหนัก/ปริมาตร)



รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส ลายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 3 ยกเว้นเมื่อผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวเป็น 1.5 % (△) และ 2.0 % (○) (น้ำหนัก/ปริมาตร)

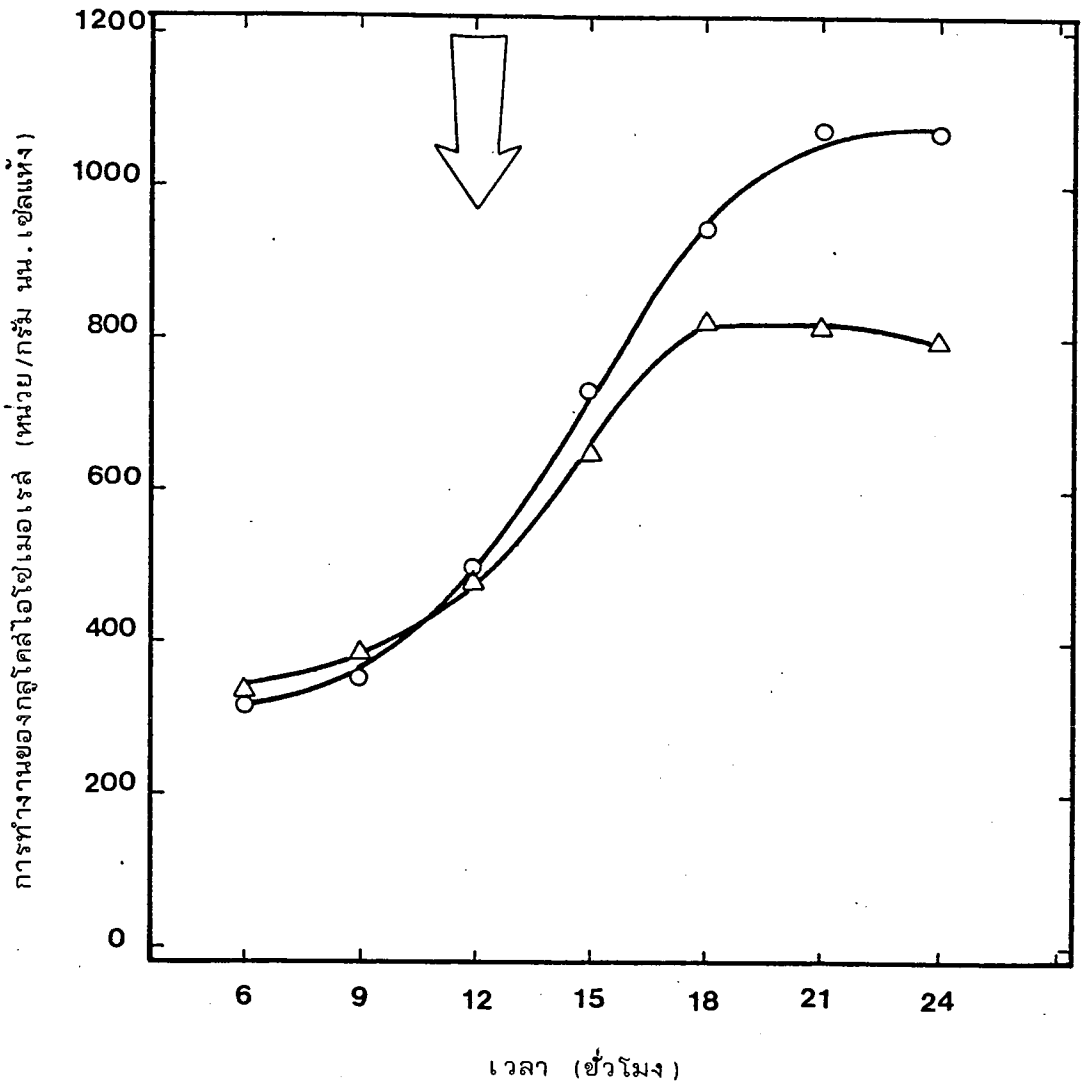


รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ในการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์โดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส่ายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 2.0 % ส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว, 0.5 % ส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง, 0.3 % ยีส์ต์เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์, 0.94 % ไดโปแตส์เซียมไฮโดรเจนฟอส์เฟต, 0.06 % โปแตส์เซียมไดไฮโดรเจนฟอส์เฟต, พีเอช 8.0 และส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ 0.5 % ไซโลส์ การเจริญของเซล (△), การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ (○), ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในอาหาร (□), ปริมาณโปรตีนที่เหลือในอาหาร (⬡)

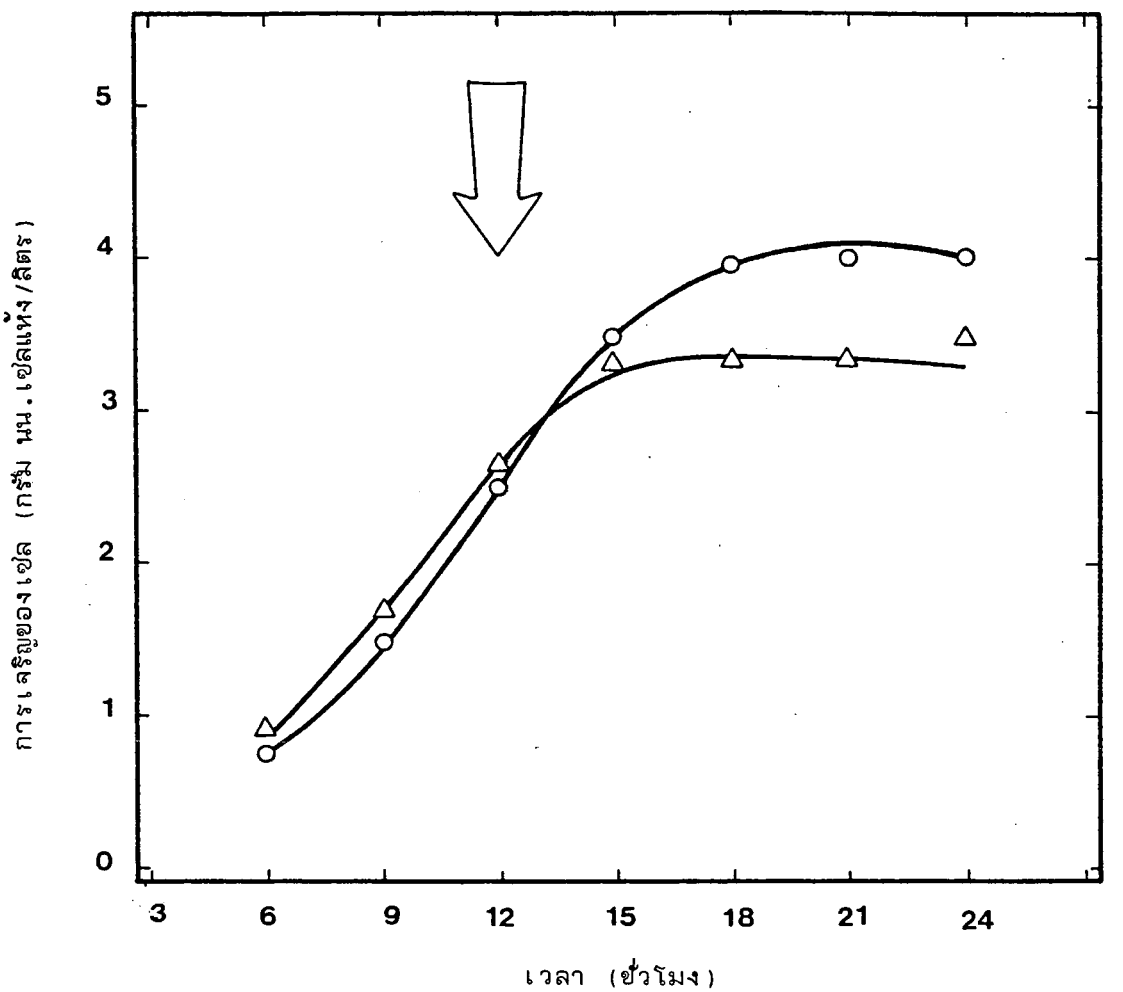
4.4 <u>ผลของระยะเวลาในการเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย</u>
<u>ต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส</u>

จากผลการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 4.2 พบว่าสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % สามารถชักนำให้สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสสูงขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับการผลิตเอนไซม์นี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารชักนำนี้ จึงศึกษาต่อไปอีกถึงผลของสารชักนำต่อการเพิ่มการผลิตกลูโคสไอเซเมอเรส โดยแยกเติมสารชักนำนี้เป็น 2 ครั้ง ซึ่งอาจเป็นการหลีกเลี่ยงมิให้จุลินทรีย์นี้ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ต้องการให้จุลินทรีย์ใช้สารอาหารนี้เป็นสารชักนำให้ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสสูงขึ้น ทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4.3.2 ยกเว้นเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 1.0 % โดยแยกเติมเป็น 2 ครั้ง เติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ และเติมอีกครั้งในปริมาณที่เท่ากันหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เนื่องจากผลการทดลองในรูปที่ 16 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 - 15 ชั่วโมง จึงเป็นเหตุผลที่เติมสารชักนำเพิ่มอีกครั้งในระยะการเจริญของเซลที่ชั่วโมงที่ 12 จากผลการทดลองในรูปที่ 17 เมื่อเติมสารชักนำนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 800 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 18 และเมื่อเติมสารชักนำนี้เพิ่มอีกครั้งหนึ่งในปริมาณเท่าเติมหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง การผลิตเอนไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะมีค่าสูงสุดประมาณ 1,100 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 21 ในทำนองเดียวกัน รูปที่ 18 แสดงการเจริญของเซลเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ช้าลง แต่การเจริญของเซลในระยะการเจริญคงที่นี้เพิ่มขึ้นเป็น 4 กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 และในรูปที่ 19 และ 20 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % อีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ก็ยังใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย ในการเจริญนอกเหนือจากใช้ไซโลสเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ ทั้งนี้เพราะเป็นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณโปรตีน ดังนั้นในการวิจัยขั้น

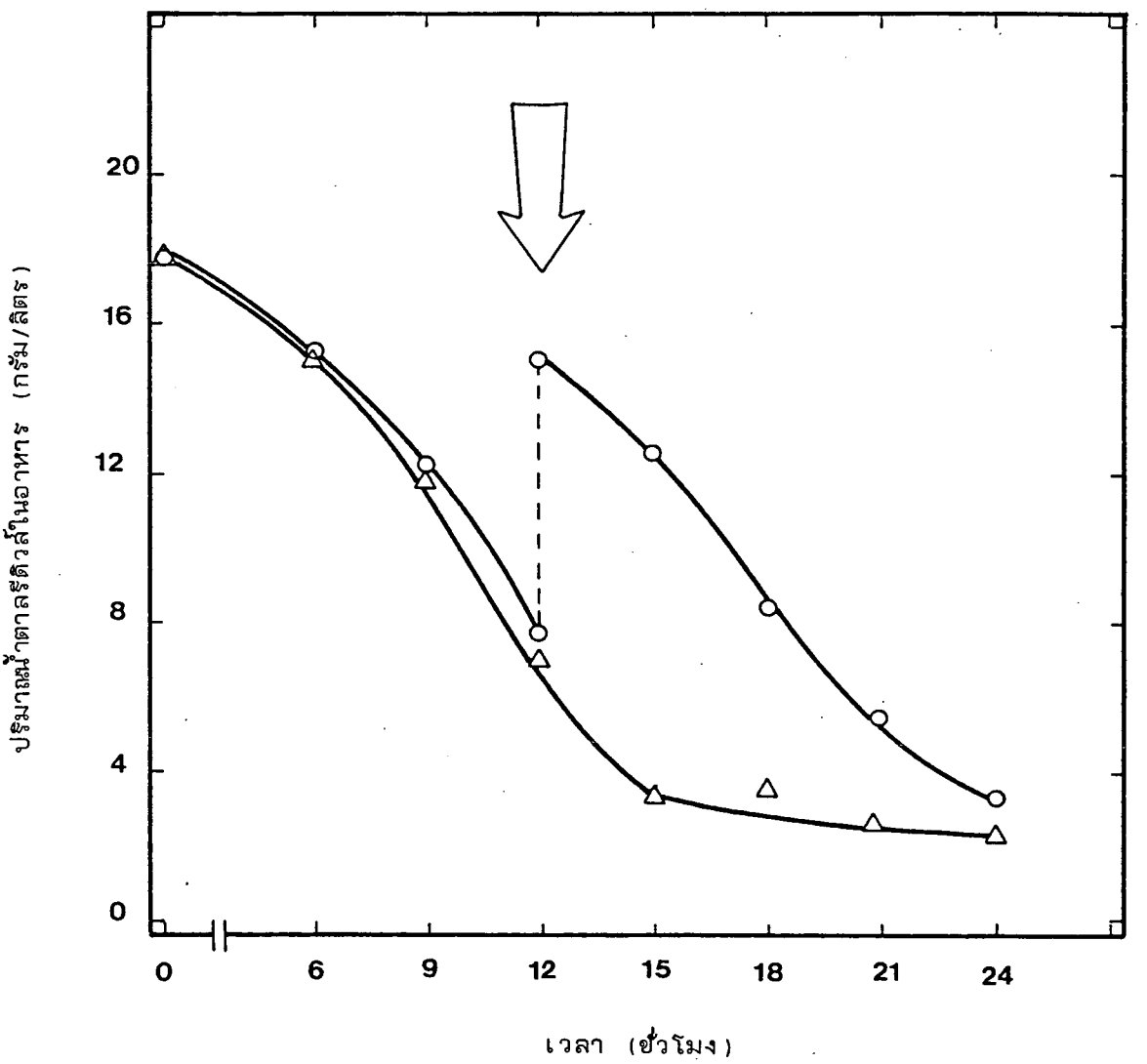
ต่อไปจึงแบ่งเติมสารชักนำนี้เป็น 2 ครั้ง คือเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อปริมาณหนึ่ง และเติมอีกครั้งหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเติมในปริมาณที่เท่ากัน คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % รูปที่ 21 ได้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ เมื่อใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลสทั้งหมด 1.0 % เป็นสารชักนำในการผลิตกลูโคส-ไอโซเมอเรส



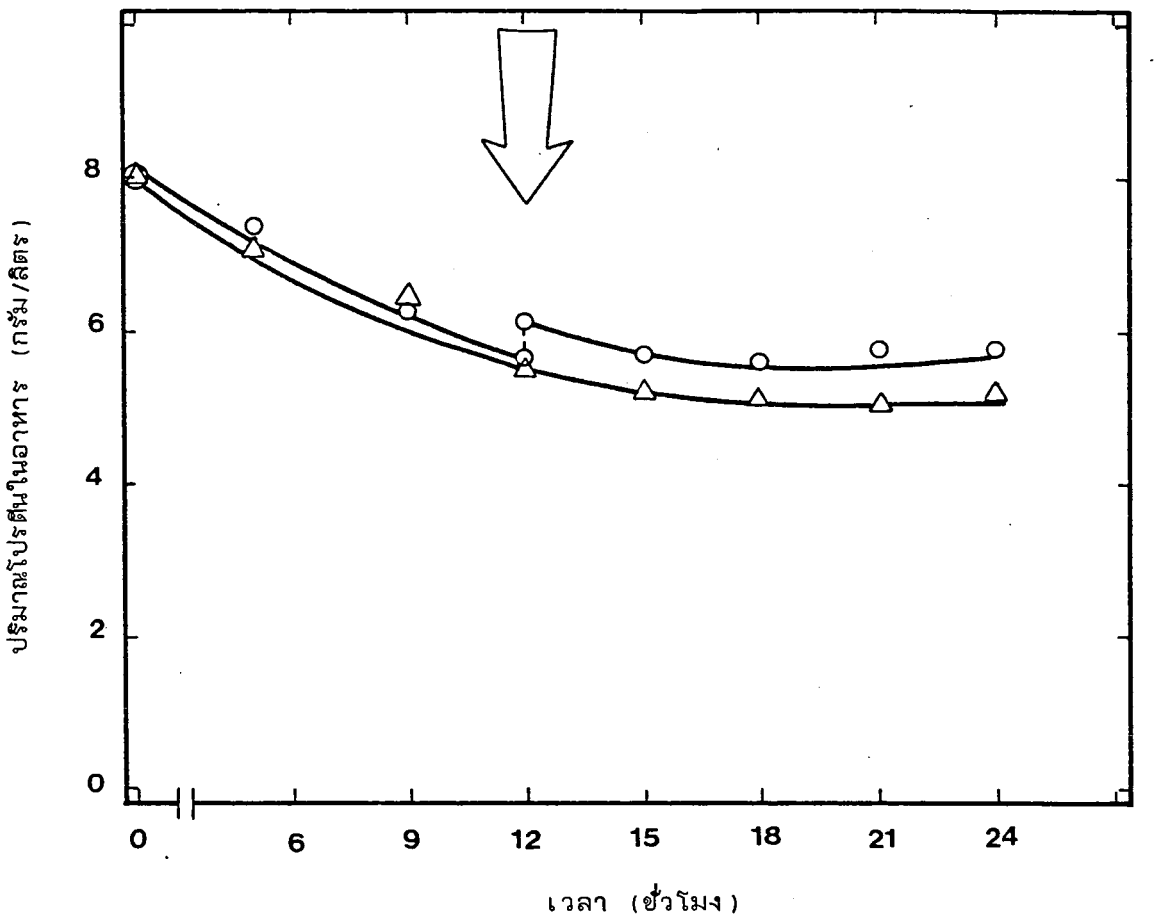
รูปที่ 17 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 16 ยกเว้นฝันแปรส์ารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส์ 0.5 % (△) โดยเติมในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ และ 1.0 % (○) โดยแบ่งเติมในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ 0.5 % แล้วเติมเพิ่มอีก 0.5 % ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชม. ดังแส์ดงโดยลูกศร



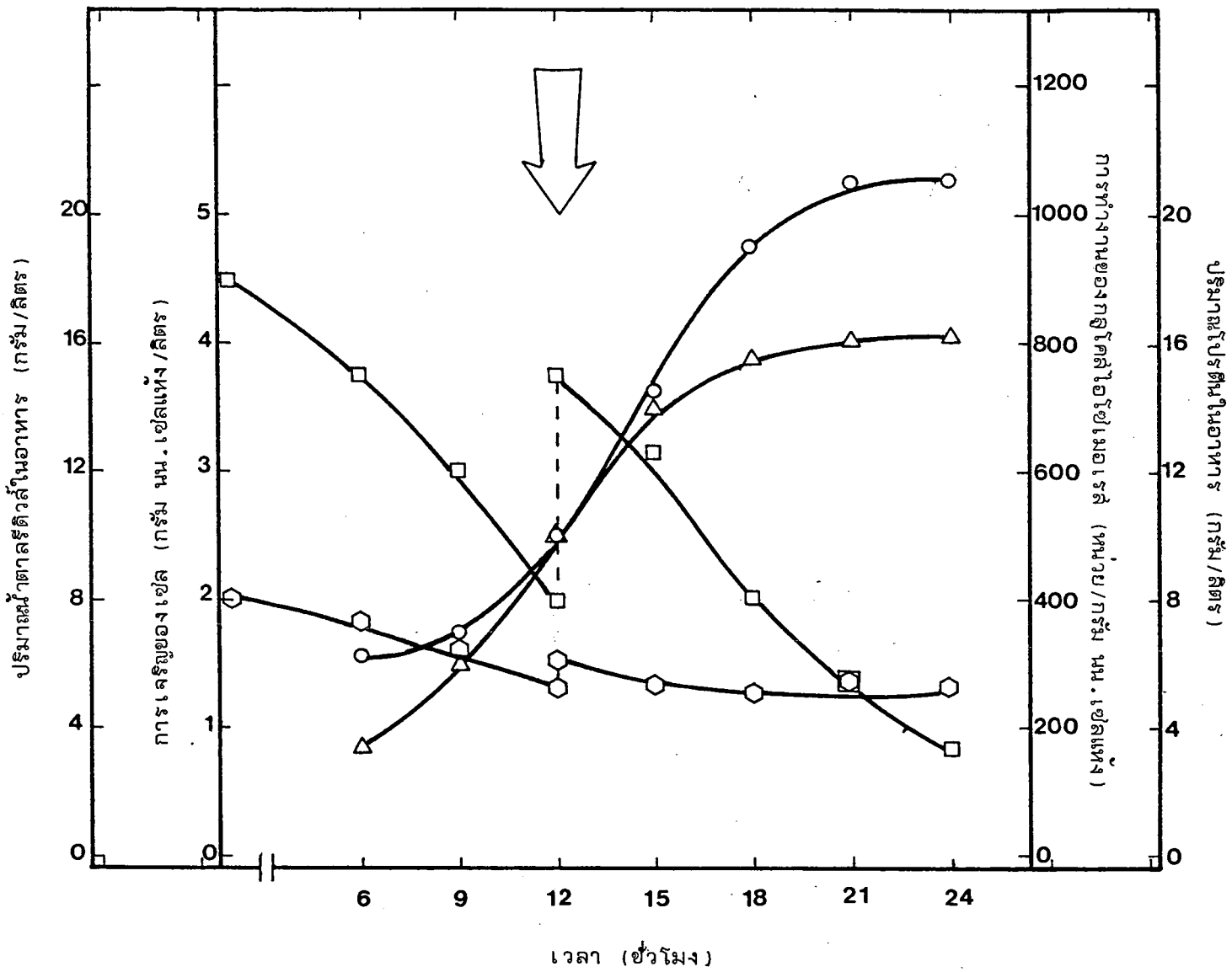
รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผันแปรสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % (△) และ 1.0 % (○) เช่นเดียวกับที่บรรยายใต้รูป 17



รูปที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส ลายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ผันแปรสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % (△) และ 1.0 % (○) เช่นเดียวกับที่บรรยายใต้รูป 17



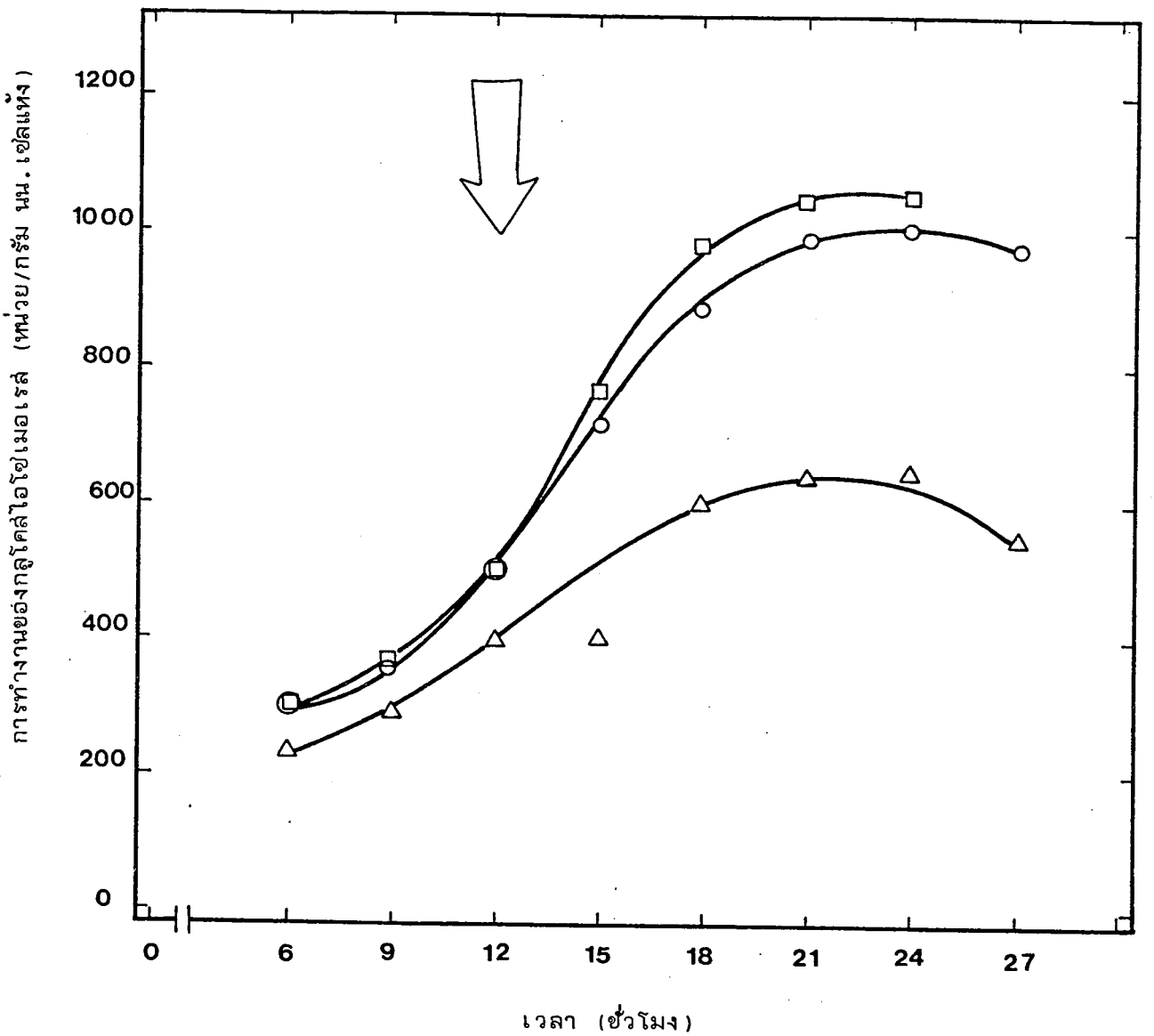
รูปที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ผันแปรสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % (△) และ 1.0 % (○) เช่นเดียวกับที่บรรยายใต้รูป 17



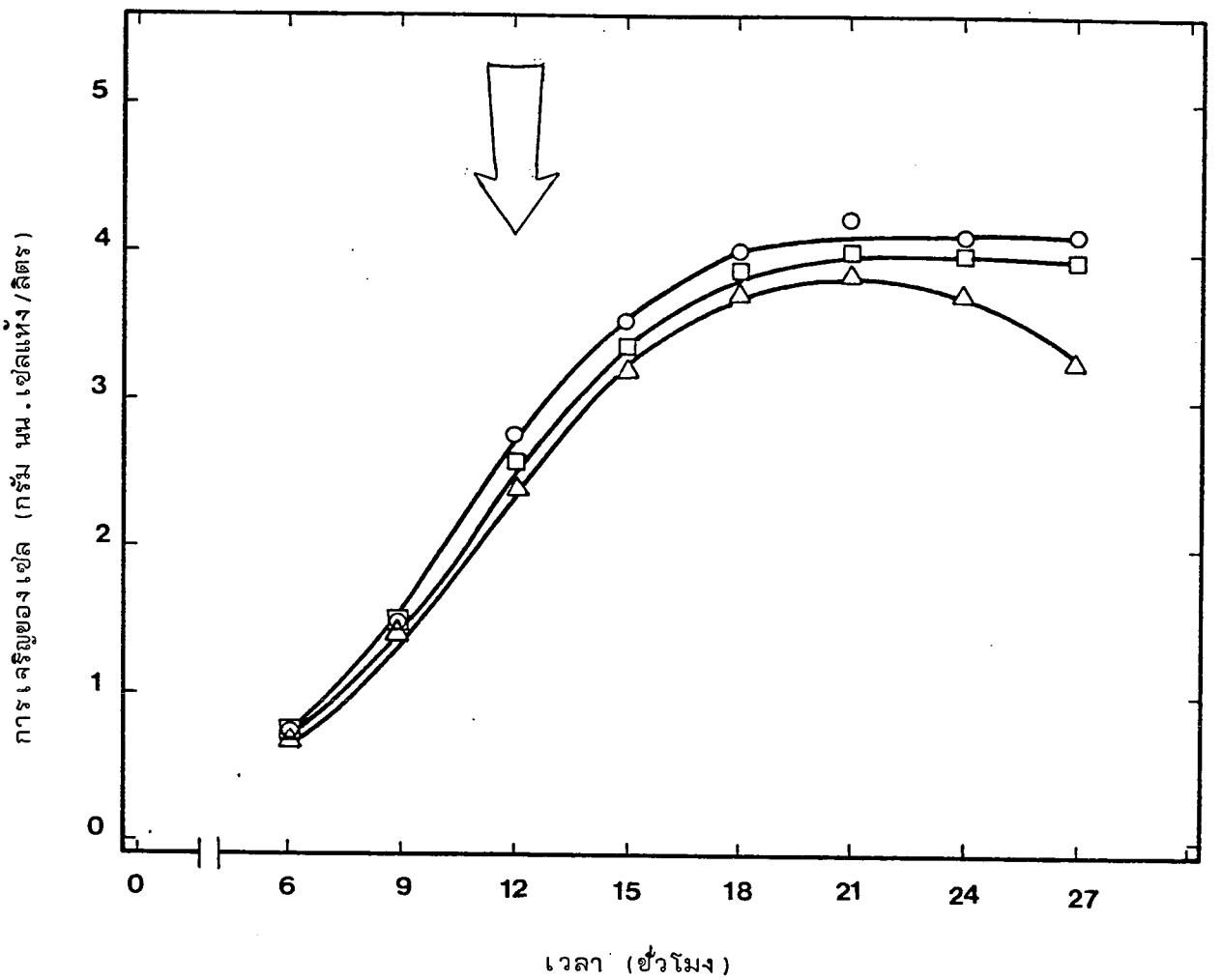
รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ในการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์โดยสเตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 16 ยกเว้นเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส์ทั้งหมด 1.0 % โดยแบ่งเติมในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ 0.5 % แล้วเติมเพิ่มอีก 0.5 % ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชม. ดังแสดงโดยลูกศร; การเจริญของเซล (△), การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ (○), ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในอาหาร (□), ปริมาณโปรตีนที่เหลือในอาหาร (⬡)

4.5 ผลของปริมาณฟอสเฟต

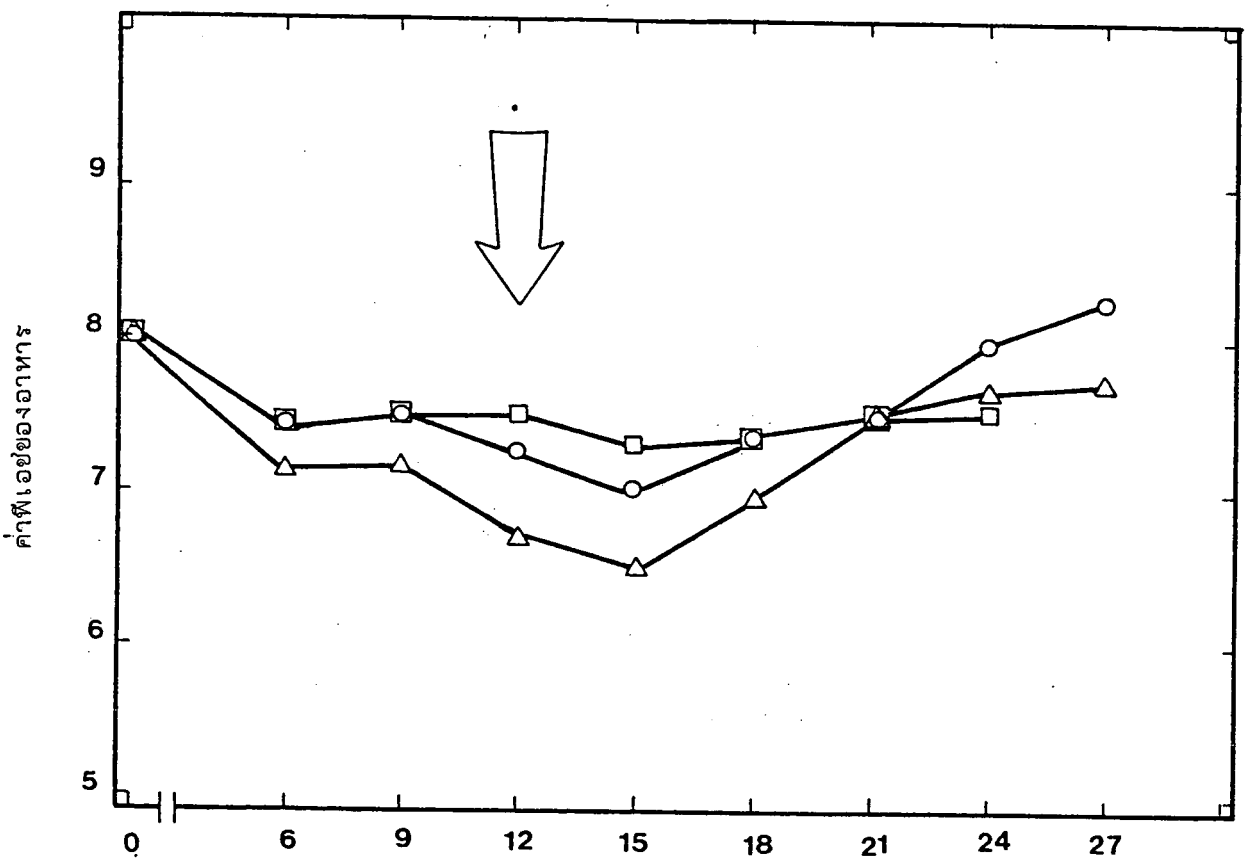
มีรายงานว่าการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรพโตมัยซีสนั้น สารแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคสทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงระหว่างที่เชื้อกำลังเจริญ ทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมสำหรับการสร้างเอนไซม์ (36) ดังนั้นการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์มาก วิธีหนึ่งที่ใช้ควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ ควบคุมโดยการเติมฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ นฤมล คุ้มจรรยา (49) ได้ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์นี้โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ พีเอช 8.0 ดังนั้นการทดลองนี้จะศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมของฟอสเฟตฟอสเฟต พีเอช 8.0 ในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4.4 ยกเว้นเติมฟอสเฟตฟอสเฟต, พีเอช 8.0 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.5 และ 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าเมื่อไม่มีฟอสเฟตฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์นี้ต่ำอย่างเห็นได้ชัด คือประมาณ 600 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง แต่เมื่อเติมฟอสเฟตฟอสเฟต พีเอช 8.0 ปริมาณ 0.5 และ 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์นี้ได้สูงและใกล้เคียงกัน คือประมาณ 1,000 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 21 ดังแสดงในรูปที่ 22 การเติมฟอสเฟตฟอสเฟต พีเอช 8.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างคงที่ ถึงแม้ว่าระหว่างการเจริญของเชื้อทำให้พีเอชของอาหารลดลงเล็กน้อย แต่หลังจากการเจริญของเซลเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่แล้ว คือที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อนั้น พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะคงที่ ในขณะที่เมื่อไม่มีฟอสเฟตฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงค่อนข้างกว้าง คือระหว่าง 6.5 ถึง 8.5 ดังแสดงในรูปที่ 24 และจากผลการทดลองในรูปที่ 23 พบว่าในระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ การมีหรือไม่มีฟอสเฟตฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่ำต่อการเจริญของเซล แต่ภายหลังการเจริญไปแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเจริญของเซลจะลดต่ำลงเมื่อไม่มีฟอสเฟตฟอสเฟต เนื่องจากการเติมฟอสเฟตฟอสเฟต พีเอช 8.0 ปริมาณ 0.5 และ 1.0 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งการเจริญของเซลและการผลิตเอนไซม์ให้ผลใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ฟอสเฟตฟอสเฟต พีเอช 8.0 ปริมาณ 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 22 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นผันแปรปริมาณฟอส์เฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 8.0 เป็น 0 (△), 0.5 (○) และ 1.0 % (□)



รูปที่ 23 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นฝันแปรปริมาณฟอสเฟต ทัฟเฟอร์, พีเอช 8.0 เป็น 0 (△), 0.5 (○) และ 1.0 % (□)

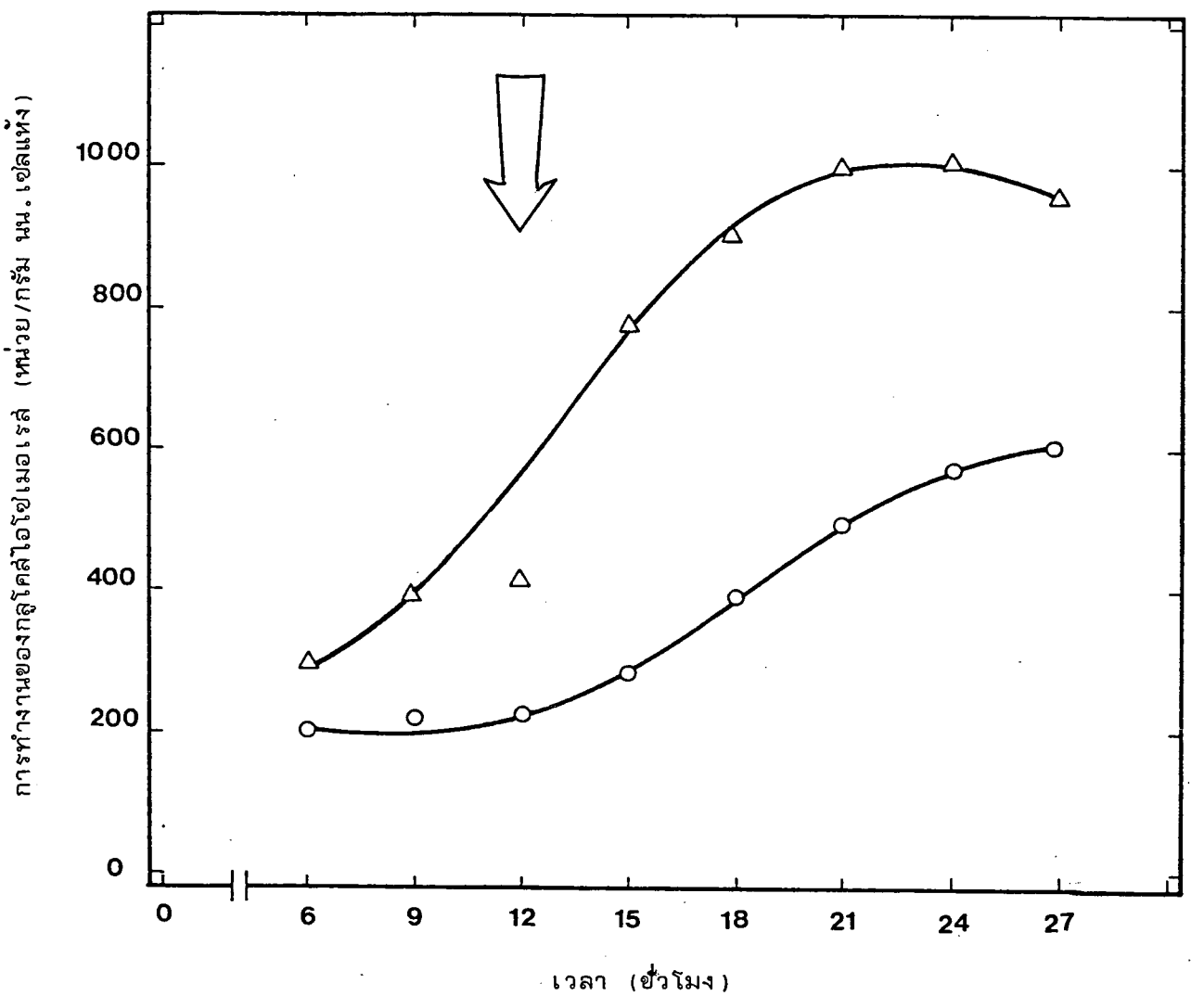


รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นฝันแปรปริมาณฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 8.0 เป็น 0 (△), 0.5 (○) และ 1.0 % (□)

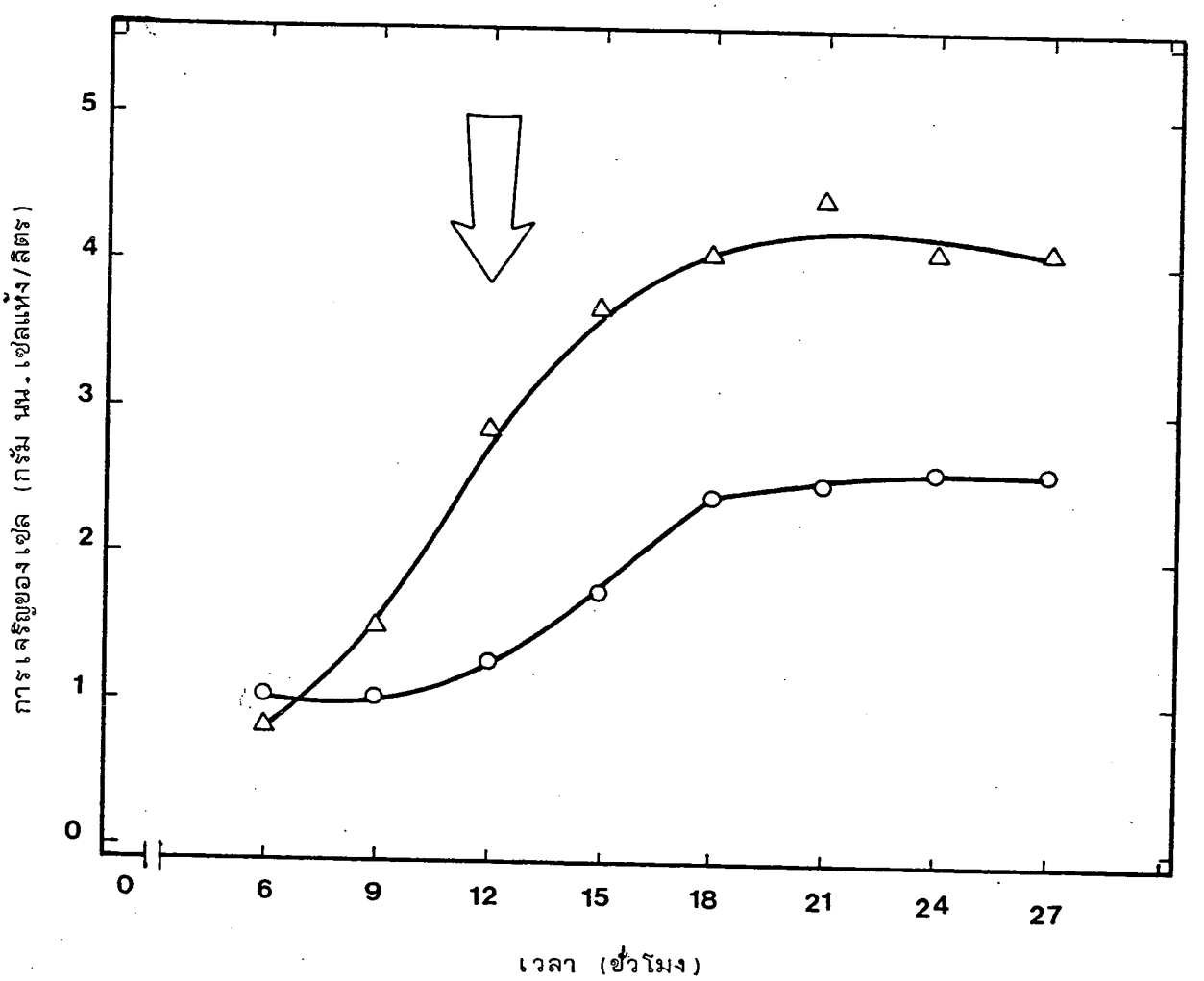
4.6 ผลของปริมาณโคบอลท์ต่อการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ในถังหมัก

นฤมล คุ้มจรรยา (49) ได้ศึกษาถึงชนิดและปริมาณของเกลือแร่ที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์โดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย โดยผันแปรชนิดและปริมาณของเกลือแร่ และพบว่าโคบอลท์คลอไรด์ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นี้คือ 0.01 % รองที่ 0.02 % และ 0.03 % โคบอลท์คลอไรด์มีผลให้การเจริญของเซลน้อยมากซึ่งไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาปริมาณของโคบอลท์คลอไรด์ในปริมาณต่างกัน โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4.5 ยกเว้นเติมโคบอลท์คลอไรด์ในปริมาณต่างกัน คือ 0.01 % และ 0.02 % จากรูปที่ 25 และ 26 พบว่าที่โคบอลท์คลอไรด์ ปริมาณ 0.01 % จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้สูงและการเจริญของเซลดีกว่าที่โคบอลท์คลอไรด์ปริมาณ 0.02 % ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการเลี้ยงจุลินทรีย์นี้ในขวดแก้วทรงกรวย โดยพบว่าเมื่อเติมโคบอลท์คลอไรด์ 0.01 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์นี้สูงสุดประมาณ 1,000 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ และการเจริญของเซลที่ระยะการเจริญคงที่มีค่าประมาณ 4 กรัม นน.เซลแห้ง/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 ในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ 0.01 % โคบอลท์คลอไรด์

สรุปผลการศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตกลูโคส์-ไอโซเมอเรส์โดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 และการเจริญของเซลในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร), สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร), ยีส์ต์ เอกซ์แทรก 0.3 %, โคบอลท์คลอไรด์ 0.01 %, ฟอส์เฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 8.0 0.5 % และสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายที่ให้ปริมาณไซโลส์ 1.0 % โดยแบ่งเติมในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ 0.5 % แล้วเติมเพิ่มอีก 0.5 % ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่กล่าวมาข้างต้น



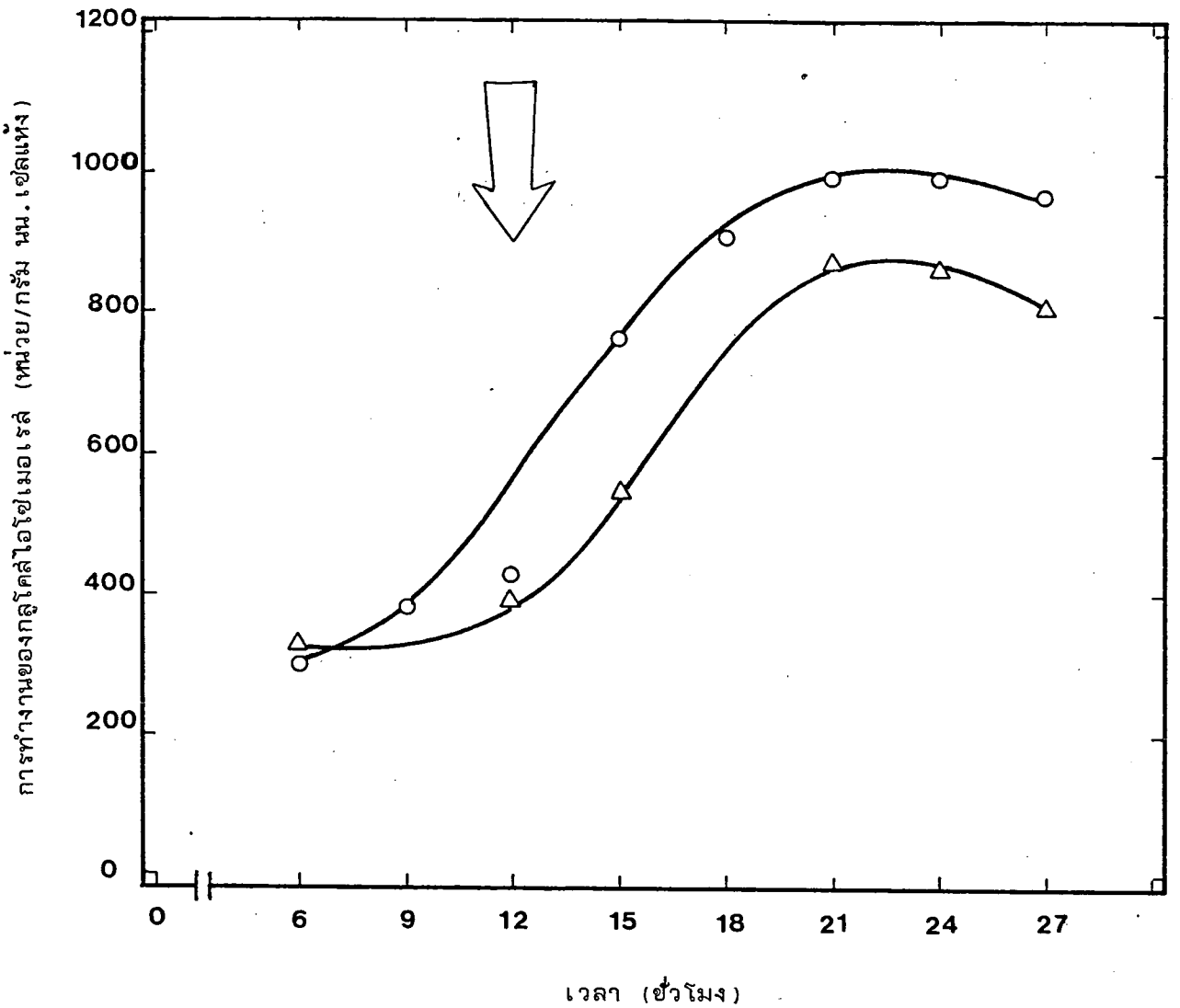
รูปที่ 25 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้ส์ภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นผันแปรปริมาณโคบอลท์คลอไรด์ เป็น 0.01 % (△) และ 0.02 % (○)



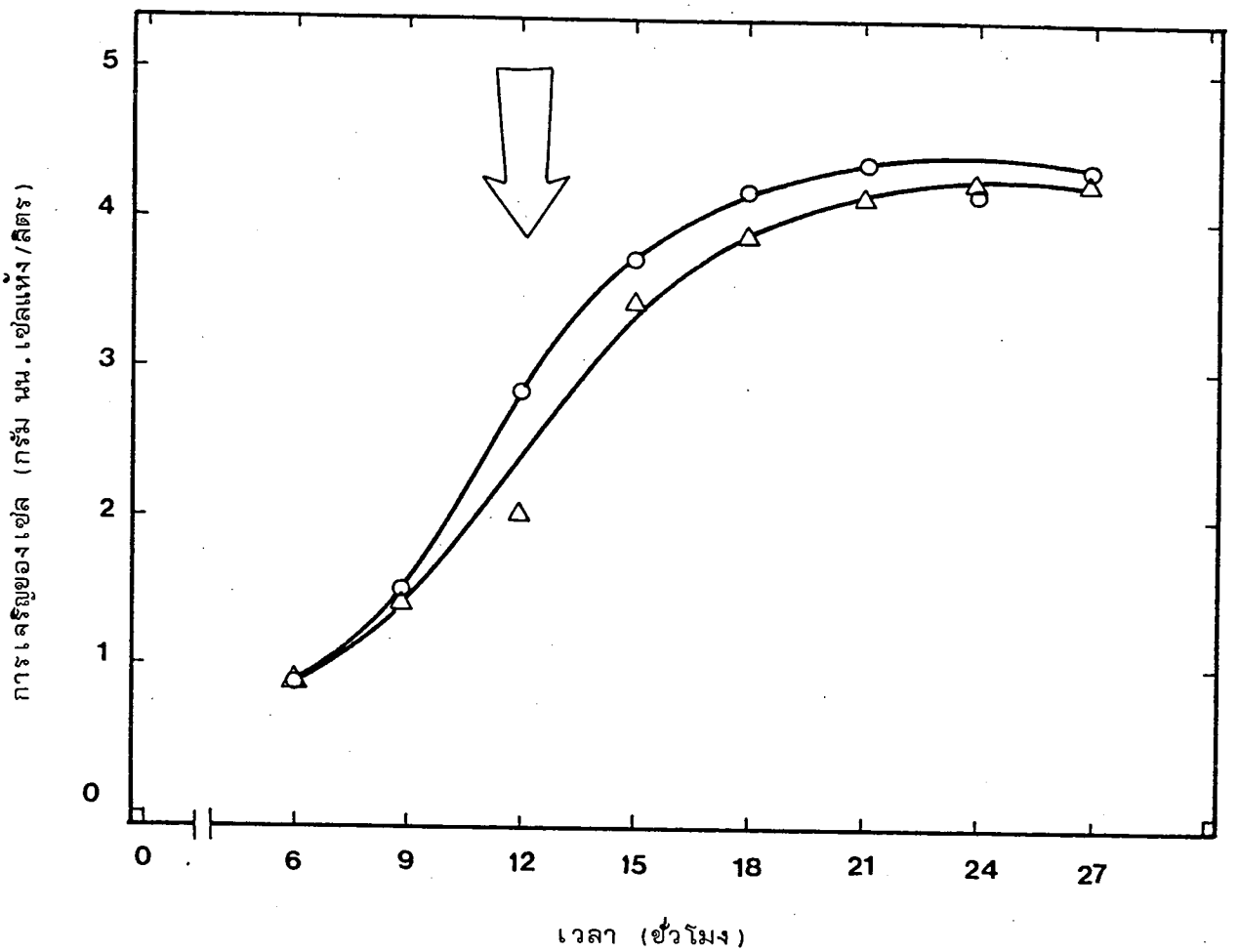
รูปที่ 26 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นผันแปรปริมาณโคบอลท์คลอไรด์เป็น 0.01 % (△) และ 0.02 % (○)

4.7 ผลของอุณหภูมิ

จากการเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4.6 โดยผันแปรอุณหภูมิเป็น 28 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของเซลและการผลิตเอนไซม์นี้โดยจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิทั้งสองอุณหภูมิให้ผลใกล้เคียงกัน โดยเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 27 และ 28 ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสสำหรับการวิจัยขั้นต่อไป



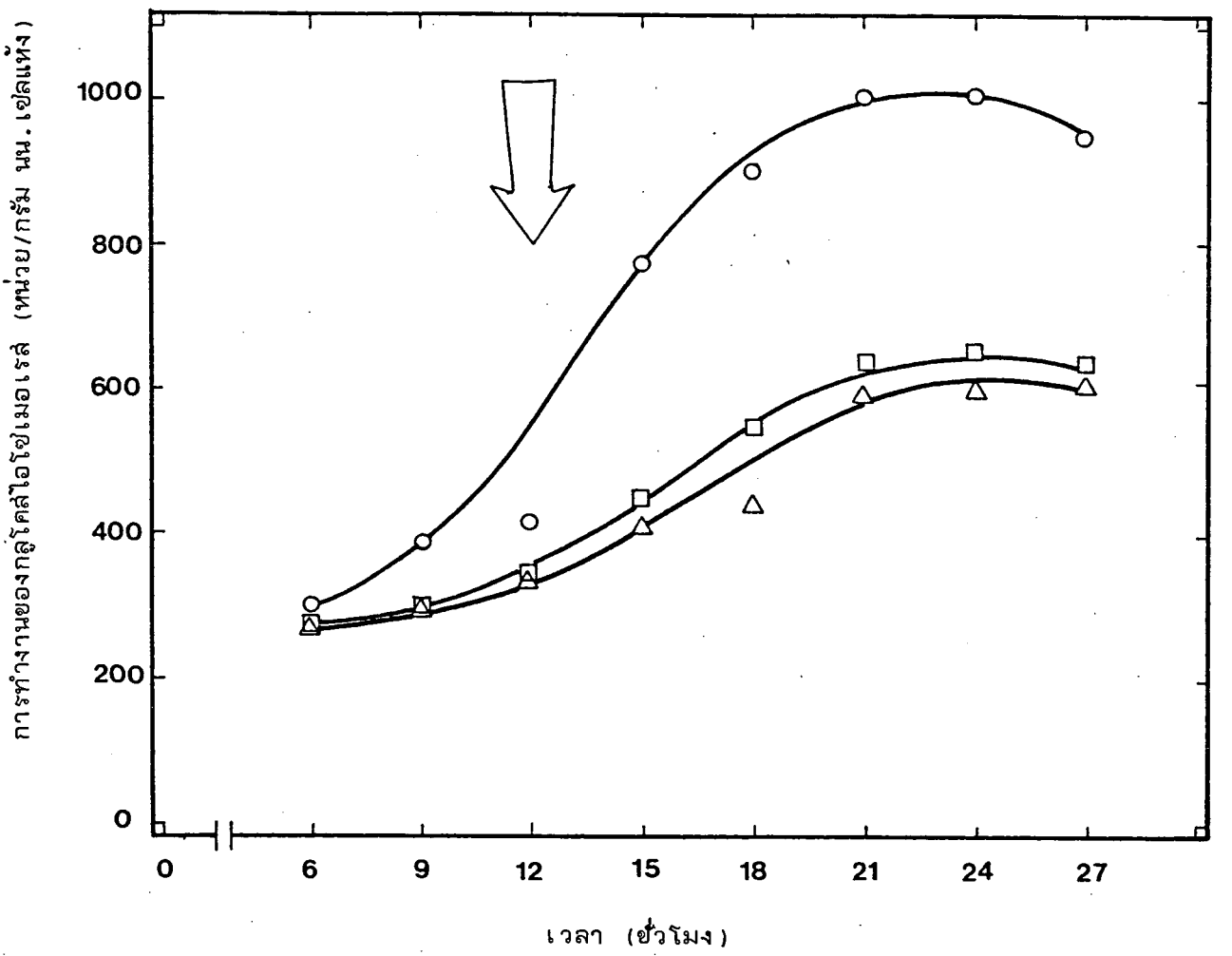
รูปที่ 27 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซ่เมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้ส์ภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นฝันแปรอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 28 (△) และ 30 องศาเซลเซียส (○)



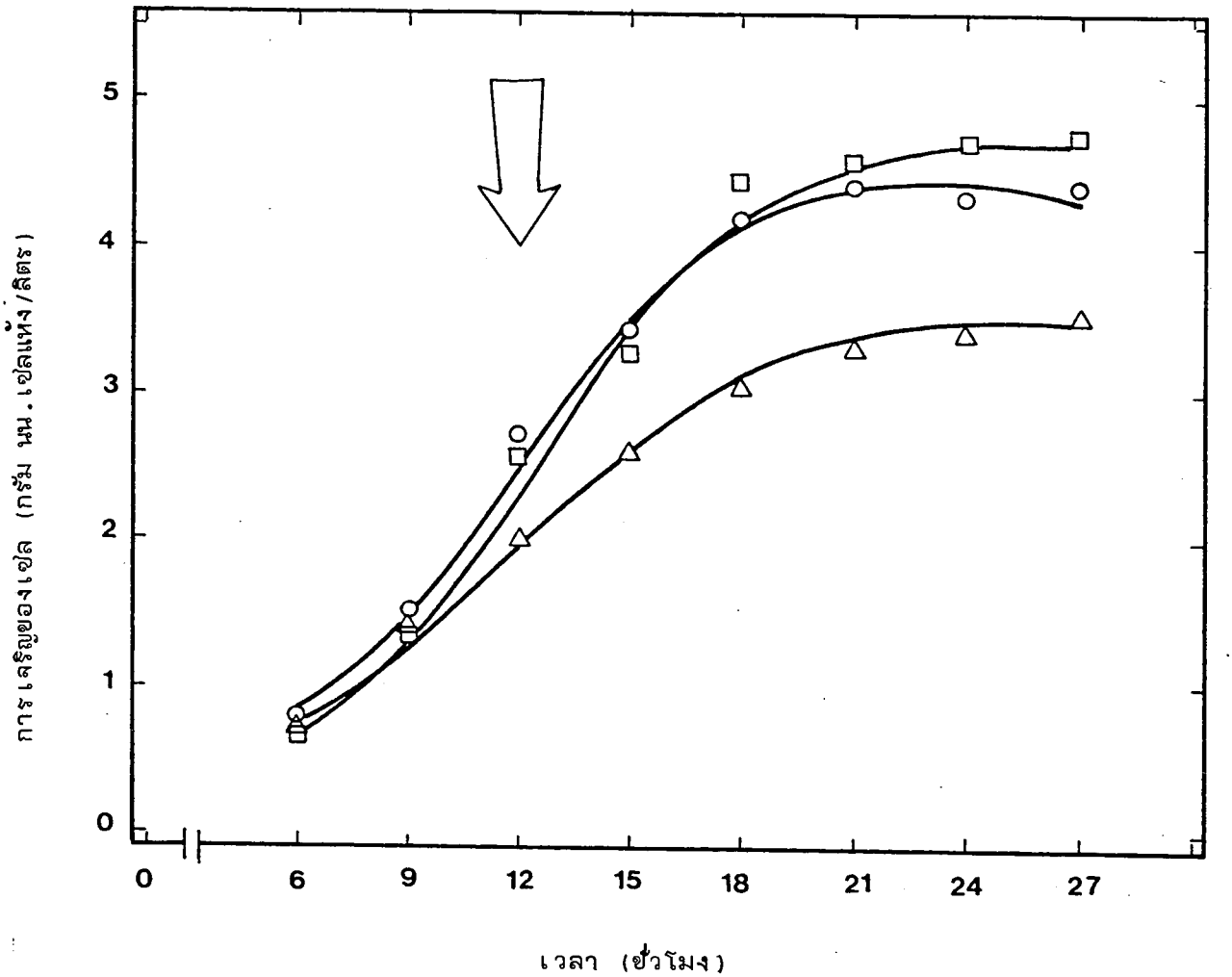
รูปที่ 28 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นฝันแปรอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 28 (△) และ 30 องศาเซลเซียส (○)

4.8 ผลของอัตราการให้อากาศ

เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน จากการเลี้ยงเชื้อสเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 และใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4.7 ยกเว้นผันแปรอัตราการให้อากาศเป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที พบว่าจุลินทรีย์ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงที่สุดเมื่ออัตราการให้อากาศเป็น 1.0 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที ดังแสดงในรูปที่ 29 แต่ที่อัตราการให้อากาศเป็น 0.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ต่ำซึ่งอาจเกิดจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารไม่เพียงพอ และที่อัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที จุลินทรีย์ยังคงผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ ก็เพราะว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนสูง เสถียรภาพของกลูโคสไอโซเมอเรสจะลดลงซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Diers และคณะ (63) จากรูปที่ 30 พบว่าที่อัตราการให้อากาศเป็น 1.0 และ 1.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที การเจริญของจุลินทรีย์มีการเจริญดีที่สุดและมีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่อัตราการให้อากาศเป็น 0.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที การเจริญของจุลินทรีย์มีค่าต่ำ ดังนั้นจึงเลือกอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป



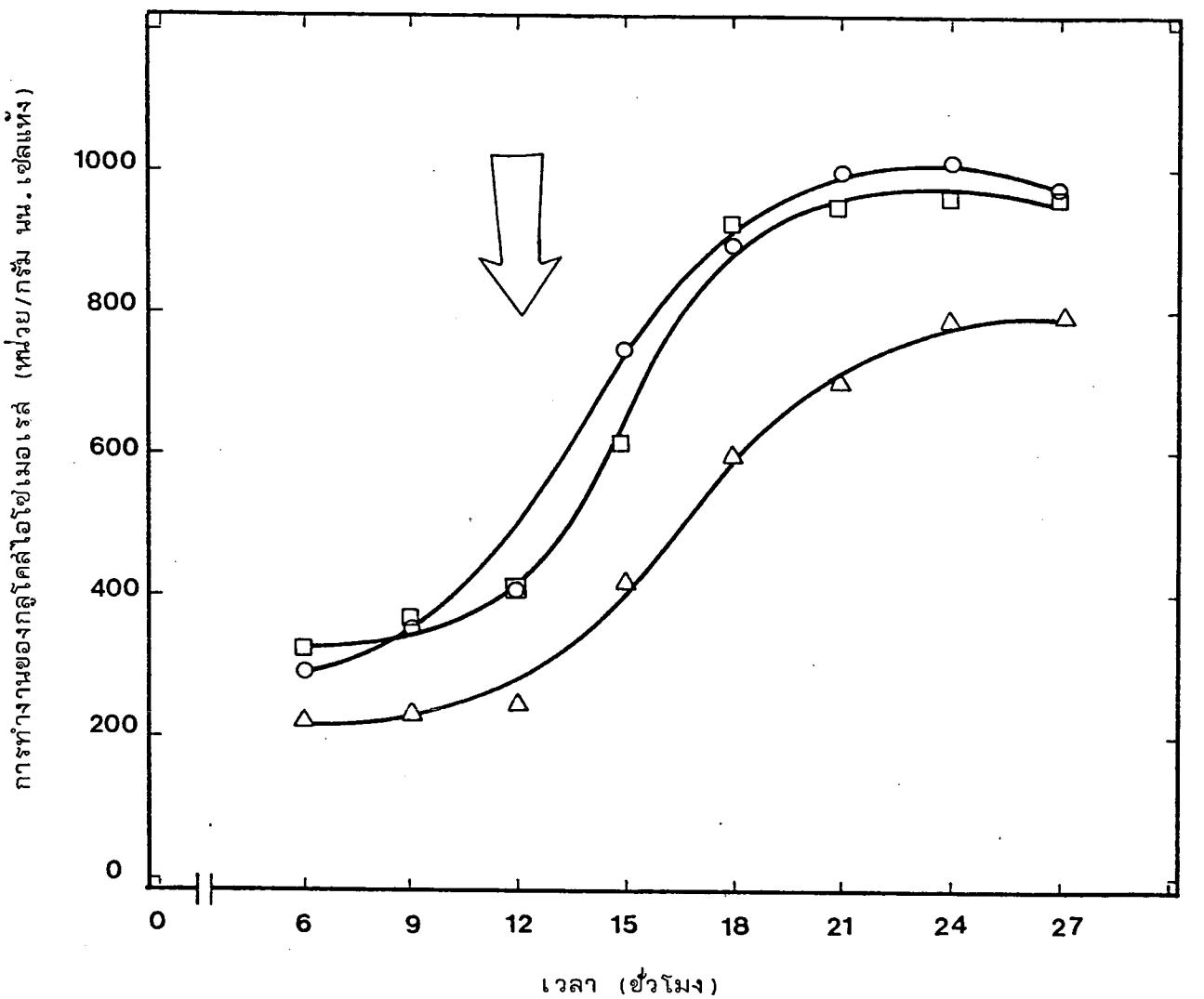
รูปที่ 29 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้ส์ภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นผันแปรอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 (△), 1.0 (○) และ 1.5 (□) ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที



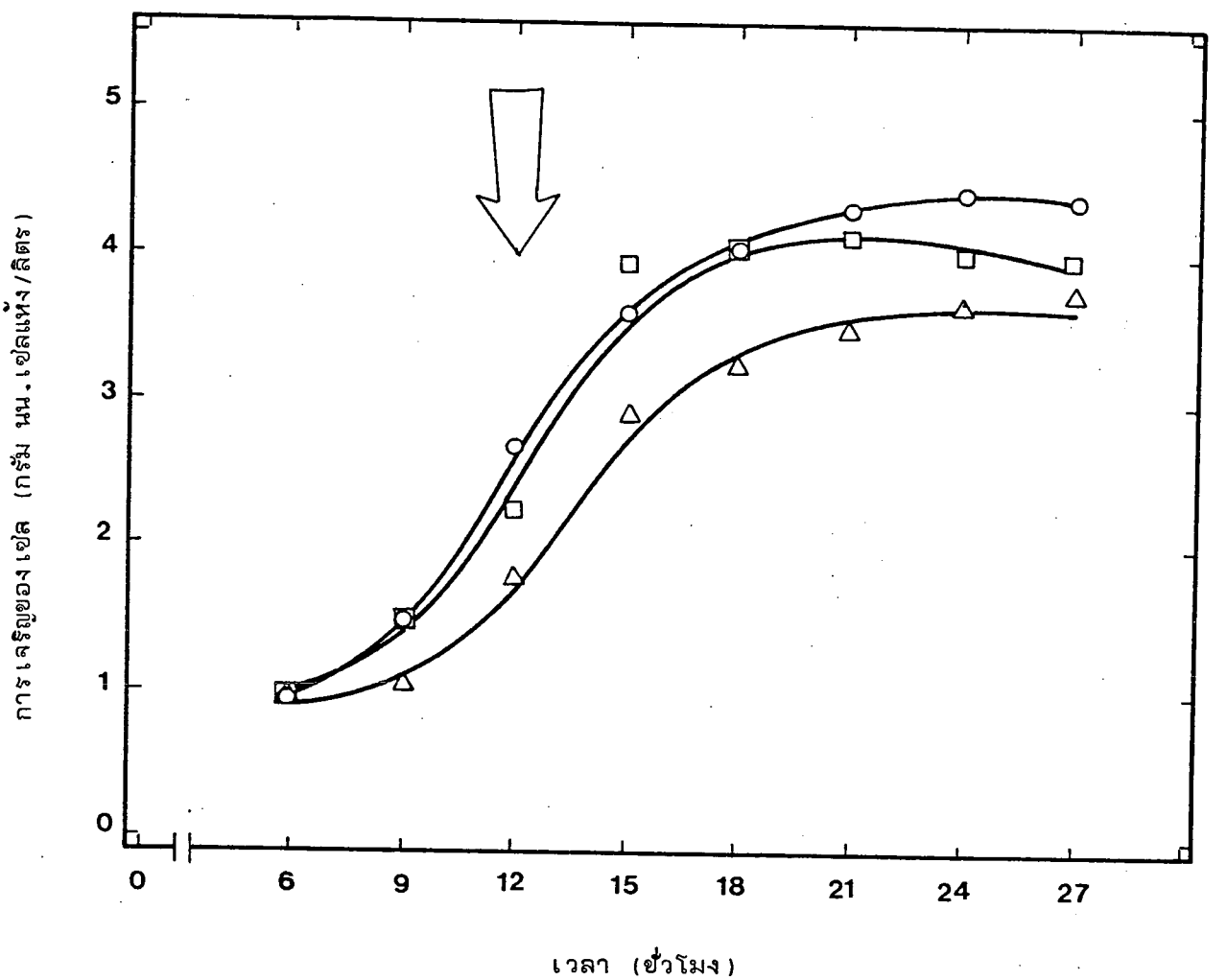
รูปที่ 30 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นผันแปรอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 (△), 1.0 (○) และ 1.5 (□) ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที

4.9 ผลของอัตราการกวน

อัตราการกวนก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใบกวนที่ใช้ในถังหมักทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็กมาก และแตกกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การกวนทำให้จุลินทรีย์หรือสารอาหารที่ใช้ไม่ตกตะกอนและเกิดการผสมและสัมผัสกันอย่างสม่ำเสมอ จากการเลี้ยงเชื้อสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 1.3 และใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4.8 ยกเว้นผันแปรอัตราการกวนเป็น 300, 400 และ 500 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อที่เจริญที่อัตราการกวน 400 และ 500 รอบต่อนาที สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงกว่าเชื้อที่เจริญที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 31 ในทำนองเดียวกันจุลินทรีย์ก็มีการเจริญที่อัตราการกวน 400 และ 500 รอบต่อนาที ดีกว่าเชื้อที่มีการเจริญที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 32 เนื่องจากการเจริญและการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์นี้ให้ผลใกล้เคียงกันเมื่อให้อัตราการกวนเป็น 400 และ 500 รอบต่อนาที แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เพราะว่าถ้าใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีนั้น เซลของจุลินทรีย์อาจเกิดการแตกสลาย (autolysis) ได้ง่าย เนื่องจากการกวนด้วยอัตราเร็วเกินไป



รูปที่ 31 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้ส์ภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นฝันแปรอัตราการกวนเป็น 300 (△), 400 (○) และ 500 (□) รอบ/นาที



รูปที่ 32 เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะดังกล่าวในรูปที่ 21 ยกเว้นฝันแปรอัตราการกวนเป็น 300 (△), 400 (○) และ 500 (□) รอบ/นาที

4.10 สรุปสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.10.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ประกอบด้วย

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว	2.0 %	(น้ำหนัก/ปริมาตร)
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง	0.5 %	(น้ำหนัก/ปริมาตร)
ยีสต์เอกซแทรก	0.3 %	"
โคบอลท์คลอไรด์	0.01 %	"
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.47 %	"
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.03 %	"

พีเอช 8.0

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส	1.0 %	(น้ำหนัก/ปริมาตร)
โดยแบ่งเติมในระยะที่เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ	0.5 %	"
แล้วเติมเพิ่มอีก	0.5 %	"

ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชม.

4.10.2 สภาวะที่เหมาะสม คือ

อุณหภูมิ	30	องศาเซลเซียส
อัตราการให้อากาศ	1.0	ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที
อัตราการกวน	400	รอบ/นาที

5. เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ได้จากส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 กับส์วีทไซม์ไทพ์ เอ

ส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 ส์ามารถผลิตกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่มีแอคติวิตีประมาณ 1,000 หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง ในส์ภาวะที่เหมาะส์มดังกล่าวข้างต้น ซึ่งพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ไม่ต่ำกว่าส์ายพันธุ์ของต่างประเทศ์บางส์ายพันธุ์มากนัก (ตารางที่ 3) ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 กับส์วีทไซม์ไทพ์ เอ ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยบริษัท Novo Industri, Denmark เอนไซม์นี้เตรียมจาก Bacillus coagulans NRRL B 5656 (64) โดยตรึงเอนไซม์นี้ไว้ภายในเซลโดยใช้กลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ส์ำหรับกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 ก็อยู่ในส์ภาวะที่ถูกตรึงไว้ภายในเซลเช่นกัน แต่ด้วยวิธีการตรึงเซลด้วยความร้อน (49) ในการเปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากจุลินทรีย์ทั้งส์องนี้ได้ทำการวิเคราะห์ภายใต้ส์องส์ภาวะ ซึ่งแต่ละส์ภาวะก็เป็นส์ภาวะที่เหมาะส์มในการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

การรายงานหน่วยการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์นั้น ส์ามารถรายงานได้ 2 แบบ คือ หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง และ หน่วย/กรัมไนโตรเจนทั้งหมดในเซล เนื่องจากส์วีทไซม์ไทพ์ เอ นั้นได้ผ่านขั้นตอนการตรึงเอนไซม์โดยใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อม ดังนั้นน้ำหนักแห้งที่ได้จึงไม่ใช่น้ำหนักที่แท้จริงของเซล จากผลการทดลองดังแส์ดงในตารางที่ 9 และ 10 พบว่าการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 มีค่าสูงกว่าการทำงานของส์วีทไซม์ไทพ์ เอ ทั้งในส์ภาวะที่หนึ่งและส์ภาวะที่ส์อง แต่จากรายงานของบริษัท Novo ซึ่งเป็นผู้ผลิตเอนไซม์นี้กล่าวว่า เอนไซม์ดังกล่าวนี้เมื่อผ่านขบวนการการตรึงเซลโดยใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อม จะมีแอคติวิตีลดลงประมาณ 40 - 50 % (64) แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 ในส์ภาวะที่ส์องก็มีค่าสูงกว่าการทำงานของส์วีทไซม์ไทพ์ เอ ทั้งที่ส์ภาวะที่ส์องนั้นเป็นส์ภาวะที่เหมาะส์มในการทำงานของส์วีทไซม์ ไทพ์เอ จากผลดังกล่าวนี้แส์ดงว่ากลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 มีโอกาส์ที่จะนำมาใช้ในวงการอุตส์าหกรรมของประเทศ์ไทยได้ในอนาคต

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ได้จากส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 กับส์วีทไซม์ ไทพ์ เอ

ชนิดของตัวอย่าง	การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์			
	หน่วย/กรัม นน.เซลแห้ง		หน่วย/กรัมไนโตรเจนทั้งหมดในเซล	
	สภาวะที่หนึ่ง	สภาวะที่สอง	สภาวะที่หนึ่ง	สภาวะที่สอง
ส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1	1,048	578	8,251	4,548
ส์วีทไซม์ ไทพ์ เอ	57	165	633	1,830

หมายเหตุ : สภาวะที่หนึ่ง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1

สภาวะที่สอง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ "ส์วีทไซม์ ไทพ์ เอ" ที่ผลิตโดย Bacillus coagulans NRRL B 5656

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดซึ่งเป็นองค์ประกอบของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 และสวีทไซม์ ไทพ์ เอ โดยวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีของ Kjeldahl

ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรัม/กรัม นน.เซลแห้ง)
สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1	0.13
สวีทไซม์ ไทพ์ เอ	0.09