

การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. 190-1 ในถังหมัก



นางสาวศิริลักษณ์ ธีระดากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

เทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2529

ISBN 974-566-223-2

013369

174 76239

Production of Glucose Isomerase From Streptomyces sp. 190-1

in Fermentor

Miss Siriluk Teeradakorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1986

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. 190-1
 ในถังหมัก

ชื่อ นิสิต นางสาวศิริลักษณ์ ธีระดากร

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2529



บทคัดย่อ

สเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้โดยใช้เวลา
 เหลือทิ้งจากการเกษตร เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาในขวดแก้วทรงกรวย
 พบว่าเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์นี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 1.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)
 สาระละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว, 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) สาระละลายย่อย
 ด้วยกรดกำมะถันของกากหัวเหลือง, 0.3 % ยีสต์ เอกซ์แทรก, 0.01 % โคบอลต์คลอไรด์
 และ 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) สาระละลายฟอสเฟตฟิเฟออร์, พีเอช 8.0 พบว่าจุลินทรีย์นี้
 สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ 210 หน่วย/กรัม นน.เซลล์แห้ง

จากการศึกษาผลของไซโลสและระยะเวลาในการเติมไซโลสต่อการชักนำการผลิต
 เอนไซม์นี้ในขวดแก้วทรงกรวย พบว่าการเติม 0.5 % ไซโลสในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ
 สามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์นี้ได้ประมาณ 1,000 หน่วย/กรัม นน.เซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่า
 เมื่อไม่มีไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อถึงประมาณ 5 เท่า และการเติมไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ
 หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นระยะเวลา 6 - 12 ชั่วโมง จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ใน
 ปริมาณใกล้เคียงกับเติมไซโลสในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้พบว่าการใช้สาร
 ละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)
 เป็นสารชักนำทดแทนไซโลส จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ประมาณ 800 หน่วย/กรัม นน.-
 เซลล์แห้ง

ผลการศึกษาในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า สเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1

สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 350 หน่วย/กรัม นน. เซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 15 เมื่อมี 1.5 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวเป็นสารแหล่งคาร์บอน และ 0.5 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากหัวเหลืองเป็นสารแหล่งไนโตรเจน จากการศึกษาผลของไซโลสในการชักนำการผลิตเอนไซม์นี้ พบว่าการเติม 0.5 % ไซโลสในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อสามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์นี้ได้ประมาณ 1,200 หน่วย/กรัม นน. เซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าเมื่อไม่มีไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 3.5 เท่า และการเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ทำให้ไซโลส 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารชักนำในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ สามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์นี้ได้ประมาณ 850 หน่วย/กรัม นน. เซลล์แห้ง นอกจากนี้พบว่าการเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ทำให้ไซโลส 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยแบ่งเติมในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ 0.5 % แล้วเติมเพิ่มอีก 0.5 % ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์นี้ได้ประมาณ 1,100 หน่วย/กรัม นน. เซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดประมาณ 4 กรัม นน. เซลล์แห้ง/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18

of rice bran and 0.5 % (W/V) of a H_2SO_4 hydrolysate of soy bean meal, 350 units of glucose isomerase was obtained from one gram of dry cells after 15 hrs of growth.

Similarly to the cultivation in a shaking flask, addition of 0.5 % (W/V) xylose to the above fermentation medium consequently increased the glucose isomerase production with the maximum yield of 1,200 units per gram of dry cells. Replacement of xylose with a H_2SO_4 hydrolysate of cottonseed hulls equivalent to 0.5 % xylose resulted in the production of 850 units of the enzyme per one gram of dry cells. Moreover, it was observed that further addition of a similar amount of a hydrolysate of cottonseed hulls to the medium after 12 hrs of cultivation remarkably increased the enzyme production to 1,100 units with the maximum cell mass of 4 grams (dry basis) per liter after 18 hrs of growth.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคส์ตฤคำลณี ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และอาจารย์ในคณะกรรมการบริหารหลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ได้กรุณา ให้คำแนะนำ ปรึกษา รวมทั้งแนวความคิดต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้กรุณา เอื้อเฟื้อสถานที่และ เครื่องมือในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณพี่, เพื่อน และน้อง ๆ ทุกคน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชา จุลชีววิทยาที่ได้ช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณะกรรมการปฏิบัติการกิจการวิจัย เพื่อการส่งเสริมอุตสาหกรรม และ เทคโนโลยีเพื่อการพัฒนา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่สนับสนุนและให้กำลังใจ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้.

สารบัญ



หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ณ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฉ
คำย่อ	ด
บทที่	
1 บทนำ	1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	23
3 ผลการวิจัย	29
4 การอภิปรายผลการวิจัยและสรุป	84
เอกสารอ้างอิง	96
ภาคผนวก	105
ประวัติ	110

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส	6
2	สภาวะและปัจจัยในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ในถังหมัก	8
3	จุลินทรีย์ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสที่ใช้ในอุตสาหกรรม	14
4	บริษัทที่ผลิตฟรักโทสไอโซรับมาตรฐานในประเทศสหรัฐอเมริกา	20
5	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส ที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผันแปรปริมาณสารแหล่งไนโตรเจน	31
6	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส ที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผันแปรปริมาณสารแหล่งคาร์บอน	32
7	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส ที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผันแปรปริมาณสารแหล่งคาร์บอนร่วมกับ สารแหล่งไนโตรเจน	33
8	ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถัน ของกากข้าว, กากถั่วเหลือง และเปลือกเมล็ดฝ้าย	39
9	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1 กับสรีทไทม์ ไทพ์ เอ	82
10	เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดซึ่งเป็นองค์ประกอบของ สเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1 และสรีทไทม์ ไทพ์ เอ	83
11	วัสดุจากการเกษตรที่ใช้เตรียมไฮโดรลีสบริลูทีนในทางอุตสาหกรรม ...	87

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสโดย เอนไซม์กลูโคส- ไอโซเมอเรส	2
2	ขบวนการผลิตฟรักโทสไซรับ	18
3	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และการทำงานของกลูโคส- ไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้ว ทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผันแปรปริมาณไซโลสต่าง ๆ กัน ..	36
4	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และการทำงานของกลูโคส- ไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้ว ทรงกรวย เมื่อมีการผันแปรระยะเวลาในการเติมไซโลสในอาหาร เลี้ยงเชื้อ	37
5	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และการทำงานของกลูโคส- ไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในขวดแก้ว ทรงกรวย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วย กรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลสปริมาณต่าง ๆ กัน ..	40
6	ผลของไซโลสต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	42
7	ผลของไซโลสต่อการเจริญของสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ใน ถังหมักขนาด 5 ลิตร	43
8	ผลของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิต กลูโคสไอโซเมอเรส โดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ใน ถังหมักขนาด 5 ลิตร	45
9	ผลของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการเจริญ ของสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
10	เปรียบเทียบการเจริญของสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สารแหล่งคาร์บอน และสารแหล่งไนโตรเจน ไม่ผ่านอ็อกซิเจน และผ่านอ็อกซิเจน	49
11	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สารแหล่งคาร์บอน และสารแหล่งไนโตรเจน ไม่ผ่านอ็อกซิเจน และผ่านอ็อกซิเจน	50
12	เปรียบเทียบการเจริญของสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว	52
13	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว	53
14	เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยงสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว	54
15	เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยงสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว	55
16	การเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดยสเตรปโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
17	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย สเตรพโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยง ในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของ เปลือกเมล็ดฝ้าย	59
18	เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณสารละลายย่อย ด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย	60
19	เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลดีวล์ที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยง สเตรพโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ผันแปร ปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย	61
20	เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เหลือในอาหาร เมื่อเลี้ยงสเตรพโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ผันแปรปริมาณสารละลายย่อย ด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย	62
21	การเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย สเตรพโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงใน อาหารที่มีการผันแปรปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือก เมล็ดฝ้าย	63
22	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการ ผันแปรปริมาณฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 8.0	65
23	เปรียบเทียบการเจริญของสเตรพโตมัยซีล สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 8.0	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
24	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณพอลิเพตบัพเฟอร์, พีเอช 8.0	67
25	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณโคบอลท์คลอไรด์	69
26	เปรียบเทียบการเจริญของล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณโคบอลท์คลอไรด์ ..	70
27	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการผันแปรอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ	72
28	เปรียบเทียบการเจริญของล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการผันแปรอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ	73
29	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการผันแปรอัตราการให้อากาศ	75
30	เปรียบเทียบการทำงานของล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการผันแปรอัตราการให้อากาศ	76
31	เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการผันแปรอัตราการกวน ..	78
32	เปรียบเทียบการเจริญของล่เตตรพโตมัยซีล่ สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการผันแปรอัตราการกวน	79

คำย่อ



มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
นน.	=	น้ำหนัก