การตรึงเซลล์สเตรปโตมัยซิส 190-1 ที่มีกลูโคสไอโซเมอเรส

นาย คำพูน คุณานุกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-271-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014445

I17503115

Whole Cell Immobilization of *Streptomyces* sp. 190-1 Containing Glucose Isomerase

Mr. Kampoon Kunanugorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-271-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตริงเซลล์สเตรพโตมัยซิส 190-1 ที่มีกลูโคสไอโซเมอเรส

โดย นาย คำพูน คุณานุกร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์เล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำพูน คุณานุกร : การตรึงเซลล์สเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 ที่มีกลูโคสไอโซเมอเรส (WHOLE CELL IMMOBILIZATION OF STREPTOMYCES SP. 19Ø-1 CONTAINING GLUCOSE ISOMERASE) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, ผศ.ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์, 99 หน้า.

สเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ในปริมาณสูง การสกัดแยกกลูโคสไอโซเมอเรสมาใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง เพราะไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ และต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ ปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ได้โดยการตรึงกลูโคสไอโซเมอเรสในรูปการตรึงเซลล์ที่มีกลูโคสไอโซเมอเรส จากการทดลองหาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการตรึง โดยคัดเลือกวิธีการตรึงที่ให้ความคงทนต่อการแตกสลายของเซลล์ตรึงรูปสูง จากนั้นแปรผันความเข้มข้นของสารที่ใช้ตรึง พีเอช และเวลาที่ใช้ในการตรึง ศึกษาการใช้เฟอรัสซัลเฟตเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แทนการใช้โคบอลท์คลอไรด์ซึ่งเป็นสารพิษต่อร่างกาย และการใช้อีดีทีเอเพื่อป้องกันการตกตะกอนของแมกนีเซียมอิออนในรูปแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ได้วิธีการตรึงดังนี้ ตรึงเซลล์ด้วยความร้อนที่ 7Ø °ซ 1Ø นาที นำเซลล์ไปตรึงด้วยสารละลายไคโตแซนในกรดอะซีติก จากนั้นนำไปตรึงซ้ำด้วย Ø.5% กลูตารัลดีไฮด์ ใน Ø.5 โมลาร์โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.Ø นาน 1 ชั่วโมง ขึ้นรูปและทำให้แห้ง เซลล์ตรึงรูปที่ได้มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย Ø.78 มม. ความยาว 2-4 มม. มีแอคติวิตีคงเหลือ 54Ø หน่วย/กรัม(น้ำหนักแห้ง) หรือ 5Ø% เมื่อเทียบกับเซลตรึงด้วยความร้อน มีค่าคงที่ไมคาลิสปรากฏ Ø.31 โมลาร์ ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลเท่ากับ Ø.55 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงในช่วง 3Ø-5Ø °ซ มีความเสถียรต่อพีเอชสูงสุดที่พีเอช 8.Ø มีครึ่งชีวิตในการเก็บ 25Ø วัน ที่ 4 °ซ ใน Ø.15 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 8.Ø การใช้เฟอรัสซัลเฟตความเข้มข้น $5.Ø \times 1Ø^{-5}$ โมลาร์สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เป็น 1.3 เท่าของการใช้ $1.Ø \times 1Ø^{-4}$ โมลาร์โคบอลท์คลอไรด์ พบว่าอีดีทีเอสามารถยับยั้งการเกิดตะกอนแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ได้แต่มีผลยับยั้งการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสด้วย แต่สามารถลดผลของการยับยั้งลดลงได้โดยปรับสัดส่วนความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และอีดีทีเอเป็น $1 \times 1Ø^{-4}$, Ø.Ø1 และ Ø.Ø1 โมลาร์ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบสมบัติของเซลล์ตรึงรูปในปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่ 65 °ซ พีเอช 8.Ø พบว่าเซลล์ตรึงรูปมีอัตราการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสสูงสุด 52% และมีครึ่งชีวิต 625 ชั่วโมง

ภาควิชา คณะวิทยาศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KAMPOON KUNANUGORN : WHOLE CELL IMMOBILIZATION OF
STREPTOMYCES SP. 190-1 CONTAINING GLUCOSE ISOMERASE.
THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.PAIROH PINPHANICHAKARN, PH.D.,
ASST.PROF.SURAPONG NAVANKASATTUSAS, PH.D., 120 PP.

Streptomyces sp. 190-1 can produce high activity of glucose isomerase. The use of isolated glucose isomerase in high fructose syrup pruduction is expensive because the enzyme cannot be reused and must be removed from the product. Immobilization of whole cell glucose isomerase may alleviate these problems. The appropriate technique and treatment conditions were studied as follows: firstly, the appropriate method which provided high mechanical strength of cell pellets was selected. Then, concentration of reagents used for immobilization, pH and duration of the treatment were optimized. And finally, the substitution of $CoCl_2$, a toxic substance, with $FeSO_4$ and the addition of EDTA to reaction mixture in order to prevent Mg^{2+} precipitation were studied. The suitable conditions for immobilization were obtained as follows: fresh cells were heat fixed at 70°c for 10 minutes. The heat fixed cells were treated with chitosan in acetic acid solution, then reimmobilized with 0.5% glutaraldehyde in 0.5 M sodium acetate buffer at pH 5.0 for 1 hour, shaped and dried, respectively. The cell pellets have average diameter of 0.78 mm. and 2-4 mm. long.The recovery activity of the immobilized cells was 540 unit/gm.(dry mass) or 50% relative to that of heat fixed cells. The $K_{m(app)}$ of the enzyme for glucose from the cell pellets was 0.31 M and the effectiveness factor was 0.55. The pellets showed good stability at 30-50°c and at pH 8.0. The storage half life was 250 days at 4°c in 0.15 M sodium phosphate buffer at pH 8.0. $FeSO_4$ could be used as an enzyme activator instead of $CoCl_2$ and it increased 1.3 times of activity. EDTA could prevent Mg^{2+} precipitation but also inhibit enzyme activity. However, the effect of inhibition could be decreased by adjusting the concentration of $FeSO_4$, $MgSO_4$ and EDTA as $1x10^{-4}$, 0.01 and 0.01 M, respectively. The activity of the immobilized cells was investigated in packed bed reactor. At 65°c and pH 8.0, the maximum conversion of fructose was 52%. The working half life of the pellets were 625 hours.

ภาควิชา คณะวิทยาศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ผศ.ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ท่านทั้งสองได้กรุณาให้คำแนะนำอันมีค่าและช่วยเหลือข้าพเจ้าด้วยความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.นลิน นิลอุบล ผู้อำนวยการสถาบันฯ และ รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร อดีตหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์ แห่งคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการหมัก

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การอุดหนุนทุนดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณชจีนาฏ โพธิเวชกุล คุณศิริลักษณ์ ธีระดากร และคุณสุนันทา คเชศะนันทน์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจตลอดเวลาหลายปีของงานวิจัยของข้าพเจ้า รวมทั้งช่วยเตรียมต้นฉบับวิทยานิพนธ์ วิทยานิพนธ์นี้จะสำเร็จไม่ได้หากปราศจากบุคคลทั้งสามนี้

ขอขอบคุณ คุณเพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล และคุณสาธิต อุรุวงศ์วณิช ที่ช่วยพิมพ์ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้อย่างหามรุ่งหามค่ำในเวลาที่ข้าพเจ้าขาดแคลนนักพิมพ์ดีด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณ คุณกรองทิพย์ ศรีตะปัญญะ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านข้อมูลงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆและน้องๆร่วมหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และบุคคลอื่นๆที่มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยของข้าพเจ้าซึ่งมิอาจกล่าวนามได้ทั้งหมด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณพ่อ แม่ และพี่ซึ่งเป็นผู้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จในปัจจุบันของข้าพเจ้า ประโยชน์ที่ได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ข้าพเจ้าขออุทิศให้เป็นส่วนหนึ่งของความก้าวหน้าในวงการวิทยาศาสตร์ ส่วนข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นขอให้เป็นอุทาหรณ์แก่นักวิจัยรุ่นต่อๆไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย 33

บทที่ 3 ผลการวิจัย 48

บทที่ 4 วิจารณ์ผลและข้อเสนอแนะ 81

เอกสารอ้างอิง 88

ภาคผนวก 1 96

ภาคผนวก 2 97

ภาคผนวก 3 98

ประวัติผู้เขียน 99

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบและการใช้งานของน้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูง	2
2	จุลินทรีย์ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส	7
3	วิธีการตรึงกลูโคสไอโซเมอเรส	13
4	การเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์	15
5	การตรึงเซลที่มีกลูโคสไอโซเมอเรส	18
6	กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตในเชิงการค้า	23
7	การบริโภคน้ำตาลภายในประเทศ ปี พ.ศ. 2526-2528	29
8	ปริมาณการซื้อน้ำตาลของอุตสาหกรรมภายในประเทศ	3Ø
9	ผลการตรึงสเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 โดยวิธีต่างๆ	49
1Ø	ผลของการทำให้แห้งต่อขนาดของเซลตรึงรูป	57
11	ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลของเซลตรึงรูป	65
12	ผลการใช้เฟอรัสซัลเฟตแทนโคบอลท์คลอไรด์ในการเร่งการทำงานของเอนไซม์	69
13	ผลการบ่มสารละลายสำหรับวัดแอคติวิตีและส่วนประกอบ	71
14	ผลการบ่มเซลตรึงรูปในสารละลายผสมสำหรับวัดแอคติวิตี	72
15	ค่าคงที่ไมคาลิสปรากฏของเซลตรึงรูปที่ตรึงโดยวิธีต่างๆ	84
16	อายุครึ่งชีวิตของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ตรึงด้วยวิธีต่างๆ	86

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสโดยปฏิกิริยาในด่างและด้วยกลูโคสไอโซเมอเรส	4
2	การตรึงเซลด้วยวิธีต่างๆ	10
3	การตรึงเซลโดยใช้สารตกตะกอน	20
4	กลไกการตรึงเอนไซม์ด้วยกลูตารัลดีไฮด์	21
5	การผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสจากแป้ง	24
6	อุปสงค์ของน้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูงและน้ำตาลทรายในสหรัฐอเมริกา	25
7	ปริมาณการใช้น้ำตาลทรายและน้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูงในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มในสหรัฐอเมริกา	26
8	ต้นทุนการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูงในสหรัฐอเมริกา	28
9	การเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสในปฏิกรณ์	32
10	การตรึงสเตรพโตมัยซิส 190-1 ด้วยไดโตแซน	38
11	การขึ้นรูปเซลที่ตรึงแล้ว	38
12	การเปรียบเทียบระหว่างเซลตรึงรูปในสภาพแห้งกับเซลตรึงด้วยความร้อนในสภาพชื้น	39
13	ปฏิกรณ์และอุปกรณ์ประกอบสำหรับผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส	45
14	เซลตรึงรูปที่บรรจุในปฏิกรณ์	45
15	การหาปริมาณฟรักโทสด้วยวิธีซิสเตอีน-คาร์บาซอล	47
16	ผลของพีเอชในการตรึงเซลต่อความคงทนต่อการแตกสลายของเซลตรึงรูป	51
17	ผลของพีเอชในการตรึงเซลต่อแอคติวิตีคงเหลือของเซลตรึงรูป	52
18	อิทธิพลของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเซลตรึงรูป	53

รูปที่ หน้า

19 ผลของความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการตริงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีคงเหลือของเซลตริงรูป 55

20 ผลของความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการตริงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงทนต่อการแตกสลายของเซลตริงรูป 56

21 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มล่วงหน้าของเอนไซม์ในเซลตริงรูปและแอคติวิตี 58

22 ความเสถียรต่อพีเอชของเอนไซม์ในเซลตริงรูป 60

23 ความเสถียรต่อพีเอชของเซลตริงรูปเทียบกับเซลที่ตริงด้วยความร้อน 61

24 ความเสถียรต่อความร้อนของเอนไซม์ในเซลตริงรูปและเอนไซม์ในเซลที่ผ่านการตริงด้วยความร้อน 62

25 ความเสถียรในการเก็บรักษาเซลตริงรูป 64

26 ก ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเซลตริงรูป 67

ข ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอทของกลูโคสไอโซเมอเรสในเซลตริงรูป 68

27 ผลของอีดีทีเอ แมกนีเซียมอิออน และเฟอรัสอิออนต่อแอคติวิตีของเซลตริงรูป

ก เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเซลตริงรูป 74

ข เมื่อเทียบกับเซลที่ตริงด้วยความร้อน 75

28 ความสัมพันธ์ระหว่างสเปซไทม์กับอัตราการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส 77

29 การประมาณครึ่งชีวิตของเซลตริงรูป

ก ที่พีเอช 7.0 78

ข ที่พีเอช 8.0 79

คำย่อและสัญญลักษณ์

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส