

6.

การศึกษาสกุลโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1



นางสาวนฤมล ศุกจรรรยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2526

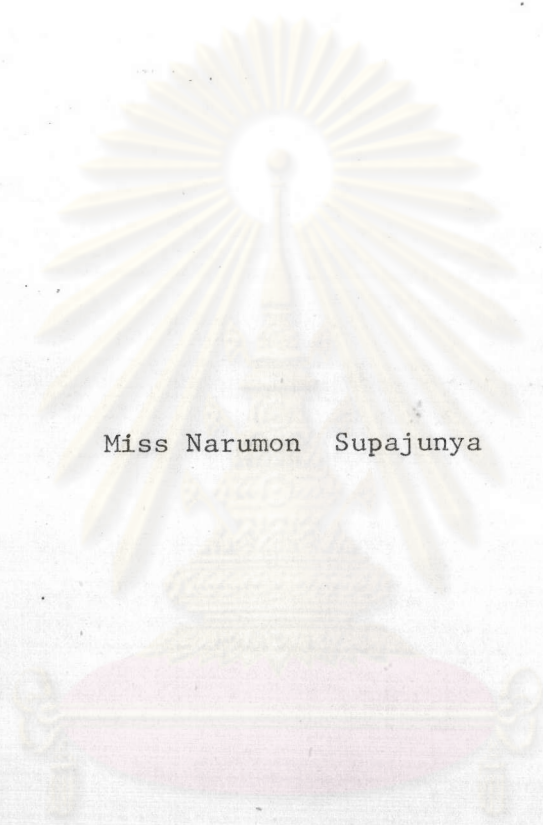
ISBN 974-561-818-7

011292

I1591684x

Studies on Glucose Isomerase Produced by Streptomyces sp.

strain 190-1



Miss Narumon Supajunya

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1983

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาจุลโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย Streptomyces sp.
สายพันธุ์ 190-1
โดย นางสาวนฤมล ศุกจรรรยา
ภาควิชา จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สุประดิษฐ์ บุณนาค
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุณนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ดร.นลิน นิลอุบล
..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์
..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาจุลโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย Streptomyces sp.
 สายพันธุ์ 190-1

ชื่อผลิต นางสาวนฤมล ศุภจรรยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปั้นพานิชการ

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2525



บทคัดย่อ

จากการตรวจหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. 132 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่าง ๆ พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ปริมาณสูงสุด จากการศึกษา ลักษณะของเชื้อ พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 จัดอยู่ในกลุ่มของ Streptomyces ที่มีสปอร์สีเทา (Gray series) สายสปอร์บิดเป็นเกลียว (Spirales) และ ผิวสปอร์มีหนาม (Spiny) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ Streptomyces arenae

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซลล์ โดยใช้ความร้อน 70 องศาเซลเซียส 10 นาที พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 7.0 ของโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หรือ pH 9.0 ของทริสบัฟเฟอร์ เอนไซม์นี้สามารถไอโซเมอเรสได้ทั้งกลูโคส และไซโลสภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยมีค่า Km สำหรับกลูโคสเท่ากับ 0.25 โมลาร์ และค่า Km สำหรับไซโลสเท่ากับ 0.125 โมลาร์ การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวต้องการ Mg^{2+} และ Co^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ 0.1 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์จะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้สามารถทนความร้อนได้ถึง 70 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ เมื่อต้มไว้เป็นเวลา 30 นาที

จากการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า แหล่งคาร์บอนราคาถูกที่เหมาะสมในการชักนำให้ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวในปริมาณสูง คือ 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด ส่วนสารแหล่งไนโตรเจนได้แก่ 1 % มอลต์ เอกซแทรก และ 0.3 % ยีสต์ เอกซแทรก นอกจากนี้เชื้อยังต้องการ $CoCl_2$ 0.01 % ในการสร้างเอนไซม์อีกด้วย ส่วน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์

ก็คือ 8.0 Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 สามารถสร้างเอนไซม์ปริมาณสูงสุดภายในเวลา 24 ชม. เมื่อเลี้ยงในขวดแก้วทรงกรวย และ 15 ชม. เมื่อเลี้ยงในถังหมัก

หลังจากการปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ 171-299 หน่วยต่อ 1 กรัมของเซลล์ (น.น.แห้ง)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Studies on Glucose Isomerase Produced by Streptomyces
 sp. strain 190-1

Name Miss Narumon Supajunya

Thesis Advisor Assistant Professor Piroh Pinphanichakarn Ph.D.

Department Microbiology

Academic Year 1982



Abstract

One hundred and thirty two strains of Streptomyces isolated from different soil samples were screened for ability to produce glucose isomerase. Streptomyces sp. strain 190-1 with the highest ability to produce the enzyme was selected. The organism had gray spores with spiny surface and spiral spore chains. Its morphological, physiological and cultural characteristics were similar to those of Streptomyces arenae

The properties of glucose isomerase from Streptomyces sp. strain 190-1 were studied with heat treated cells (70°C, 10 min.). The optimal pH for the enzyme activity was 7.0 with sodium phosphate buffer or pH 9.0 with tris-buffer. The enzyme could isomerize both glucose and xylose under the same condition. Km values for glucose and xylose were 0.25 M and 0.125 M, respectively. Mg²⁺ and Co²⁺ were required for its activity. The optimal temperature for the enzyme activity was at 80°C. The enzyme was heat stable upto 70°C in the absence of substrate and minerals when incubated for 30 minutes.

A 3 % sulfuric acid hydrolysate of corn hulls was found to be an appropriate inducer for the enzyme production whereas 1 % of malt extract and 0.3 % yeast extract were used as nitrogen sources. The optimal pH for the enzyme production was 8.0. The maximum enzyme

production was at 24 hrs. in batch cultures and 15 hrs. in fermentor.

At the optimal conditions for enzyme activity and for enzyme production, approximately 171-299 units of enzyme were produced from one gram of cells (dry weight).



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กิติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ, แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่ได้เอื้อเพื่อให้จุลินทรีย์มาใช้ในการวิจัยนี้ และได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเรื่องเชื้อเป็นอย่างดียิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เอื้อเพื่อให้เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสมาใช้ในการทดลอง และได้กรุณาแนะนำรวมทั้งให้แนวความคิดในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สาวิตรี บุญส่ง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเพื่อให้จุลินทรีย์มาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังศรี กุลปรีชา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประพิร์ เศรษฐรักษ์ ที่ได้ช่วยติดต่อเกี่ยวกับการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ขอขอบพระคุณ อาจารย์อรรณวดี อิ่มพูลทรัพย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ยืมเครื่องมือบางอย่างและช่วยเหลือในด้านเอกสารการวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ นางสาวดารารัตน์ รอดพยาธิ ที่ได้ให้คำแนะนำการจัดหมวดหมู่ของเชื้อที่นำมาศึกษา การใช้เครื่องมือบางอย่าง ตลอดจนให้คำแนะนำเกี่ยวกับการพิมพ์วิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านตลอดจนเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้ ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่าง ๆ

ท้ายสุดนี้ การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลงได้เนื่องจากการสนับสนุนและกำลังใจจากบิดามารดา ตลอดจนญาติพี่น้องของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์.



สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ณ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฉ
คำย่อ	ท
บทที่	
1 บทนำ	1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	23
3 ผลการวิจัย	31
4 การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย	70
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	86
ประวัติ	93

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. สายใยอากาศของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1	34
2. สายสปอร์ของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1	35
3. ผิวสปอร์แบบมีหนาม (Spiny) ของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1	36
4. ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์	41
190-1 เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด	
5. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ของ	42
<u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1	
6. อิทธิพลของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อแอกติวิตีของ เอนไซม์กลูโคส	44
ไอโซเมอเรส	
7. อิทธิพลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ..	46
8. อิทธิพลของแมกนีเซียมไอออนต่อเอนไซม์แอกติวิตี	47
9. อิทธิพลของโคบอลท์ไอออนต่อเอนไซม์แอกติวิตี	48
10. อิทธิพลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์แอกติวิตี	50
11. ก. ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อเอนไซม์แอกติวิตี	51
ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พล็อต ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสกับกลูโคส	51
12. ก. ผลของความเข้มข้นของโซโลสต่อเอนไซม์แอกติวิตี	52
ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พล็อต ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสกับโซโลส	52
13. ความคงทนของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสต่อความร้อน	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
14. เปรียบเทียบเอนไซม์แอกติวิตีของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีชนิดและปริมาณของสารแหล่งคาร์บอน ต่าง ๆ กัน	55
15. เปรียบเทียบเอนไซม์แอกติวิตีและปริมาณเซลล์ของ <u>Streptomyces</u> sp. ... สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีชนิดของสารแหล่งไนโตรเจน ต่าง ๆ กัน	57
16. เปรียบเทียบเอนไซม์แอกติวิตีของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณของมอลต์ เอกซแทรกต่าง ๆ กัน	58
17. เปรียบเทียบเอนไซม์แอกติวิตีของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณของยีสต์ เอกซแทรกต่าง ๆ กัน	59
18. เปรียบเทียบเอนไซม์แอกติวิตีของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่าง ๆ กัน	60
19. เปรียบเทียบเอนไซม์แอกติวิตีของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับความเป็นกรดต่างที่ระดับต่าง ๆ กัน	62
20. ความสัมพันธ์ของเอนไซม์แอกติวิตีกับการเจริญของ เซลในถังหมัก	64
21. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมที่สามารถต่อต้านแคลเซียม	66
ไอออนในการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึง อยู่ในอัลจีนา	
22. อิทธิพลของ pH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจีนา	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส	3
2.	สภาวะและปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อ <u>Streptomyces</u> sp. เพื่อ ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส	7
3.	คุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย	11
	<u>Streptomyces</u> sp.	
4.	การตรึงเซลล์ซึ่งมีเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ในโดย	16
	วิธีต่าง ๆ	
5.	เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส	32
	ของ <u>Streptomyces</u> sp.	
6.	ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) ของ	37
	<u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1	
7.	ลักษณะการเจริญ (Cultural Characteristics) ของ	38
	<u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1	
8.	ลักษณะสรีรวิทยา (Physiological Characteristics) ของ	39
	<u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1	
9.	เปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย	43
	<u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับ เตรียมหัวเชื้อชนิดต่าง ๆ	
10.	เปรียบเทียบเอนไซม์แอกติวิตีของเชื้อ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์	61
	190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือแร่เพียงชนิดเดียวและทั้ง 2 ชนิด	
11.	เปรียบเทียบความต้องการแมกนีเซียมไอออนในการทำงานของเอนไซม์	69
	ภายในเซลล์ที่ถูกรังด้วยอัลตราไวโอเล็ต ในสภาพที่เป็นกลางและเป็นด่าง	

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12.	เปรียบเทียบ เอนไซม์แอกติวิตีของ เชลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทและโคโตแซน ... กับเชลที่ไม่ได้ถูกตรึง	69
13.	เปรียบเทียบ เอนไซม์แอกติวิตีของ <u>Streptomyces</u> sp. สายพันธุ์ 190-1 กับจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม และจุลินทรีย์ ที่แยกได้ในห้องทดลอง	75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



คำย่อ

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
ตร.นิ้ว	=	ตารางนิ้ว
กก.	=	กิโลกรัม
น.น.	=	น้ำหนัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย