การผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *Proteus rettgeri* ในถังหมัก

นางสาวศรินทิพ อานามนารถ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN 974-577-519-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19381517

Production of Penicillin Acylase from *Proteus rettgeri* in Fermenter

Miss Sarintip Anamnart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-577-519-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *Proteus rettgeri* ในถังหมัก
โดย	นางสาวศรินทิพ อานามนารถ
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดี บัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ตำรงค์เลิศ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เป็นบทคัดย่อที่ส่งมาพร้อมกับ

ศรินทิพ อานามนารถ : การผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *Proteus rettgeri* ในถังหมัก
(Production of Penicillin Acylase from *Proteus rettgeri* in Fermenter)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สัณห์ พณิชยกุล, 77 หน้า.

Proteus rettgeri SPS-6 เป็นจุลชีพที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้แบบ constitutive เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยว จากการศึกษาแหล่งต้นตอคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูง พบว่า เมื่อเจริญ *P. rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยแป้งไฮโดรไลซ์ 1.0 % ที่อุณหภูมิ 28°ซ. จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 160 หน่วย/มก.โปรตีนรวมของเซลล์ โดยที่การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* SPS-6 จะถูกกดดันด้วยปฏิกิริยาคะตาโบไลท์ รีเพรสชั่น เมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งไฮโดรไลซ์สูงกว่านี้ นอกจากนี้ ยังสามารถใช้สารละลายกลูโค-เดกตริน(แบะแซ)เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ดีเช่นเดียวกัน แต่ไม่สามารถใช้กากน้ำตาล(10 %) หรือกรดอะมิโนซีสเตอีน(0.25 %)เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนของการเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้ ในขณะที่ กรดอะมิโนแอสปาร์ติกสามารถเพิ่มการเจริญของสายพันธุ์ SPS-6ได้สูงขึ้นแต่ความสามารถในการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลสลดต่ำลง ส่วนกรดอะมิโนวาลีนจะยับยั้งทั้งการสังเคราะห์เอนไซม์และการเจริญ

P. rettgeri SPS-6 สามารถใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนได้ดีพอ ๆ กัน ในขณะที่ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองจะมีผลไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และเมื่อลดอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อลงที่ 25°ซ. และปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.8 เซลล์ *P. rettgeri* SPS-6 จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นเกือบ 1.5 เท่า(280 หน่วย/มก.โปรตีนรวม) และในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ ของ *P. rettgeri* SPS-6 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า การใช้ความเร็วในการกวน 300 รอบ/นาที, อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25°ซ. เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.8 *P. rettgeri* SPS-6 จะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์สูงประมาณ 320 หน่วย/มก.โปรตีนรวม การป้อนกลูโคสอย่างต่อเนื่องเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 2-3 มก./มล. ไม่มีผลในการเพิ่มแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส แต่อย่างใด.

ภาควิชา บัณฑิตวิทยาลัย
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต ศรินทิพ อานามนารถ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

SARINTIP ANAMNART : Production of Penicillin Acylase from *Proteus rettgeri* in Fermenter. Thesis Advisor : Asso.Prof.Sanha Panichajakul, Ed.D. 77 pp.

Proteus rettgeri SPS-6 could produce penicillin acylase(PAase) constitutively in minimal medium with glucose as a sole carbon source. When *Proteus rettgeri* SPS-6 grown in a minimum medium containing 1.0 % starch hydrolysate at 28° c, yielding the maximum activity of PAase as high as 160 unit per mg total cell proteins. However, the production of *P. rettgeri* SPS-6 PAase was subject to catabolite repression by higher concentration of starch hydrolysate as well as glucose concentration more than 0.4 percents. The SPS-6 can not be growth on minimum medium supplement as the molasses(10 %) or cysteine(0.25 %) as a sole carbon source. Although aspartic acid(0.22 %) can stimulate growth of *P. rettgeri* but partially retarded rate of PAase production, whole valine partly decreased both growth and enzyme synthesis.

The SPS-6 strain can utilize both ammoniumsulfate and urea as a nitrogen source as well. Meanwhile, the acid hydrolysate of soybean meal inhibited PAase synthesis. Cultivation of *P. rettgeri* SPS-6 at 25°c and the initial pH at 7.8 rendered the maximum activity of PAase at 280 unit per mg total cell proteins. The optimal conditions for growth and enzyme production in 5-L fermenter were found as follows : agitation rate was 300 rpm with 0.5 vvm aeration rate, at initial pH 7.8 and keeping temperature constant at 25°c. Under the optimal conditions, SPS-6 strain can produce maximum PAase activity as high as 320 unit per mg total cell proteins. Continuous feeding of glucose to maintain a constant concentration of carbon source in between 2-3 mg/ml did not resulting in any significance enrichment of PAase activity.

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต สรินทิพ อานามนาท

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ แนวความคิด กำลังใจ และความเข้าใจ อันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์ (ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการคุมสอบวิทยานิพนธ์) ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ และรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณท่านคณาจารย์ของหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาจุลชีววิทยา ทุกท่านที่ได้ให้ความกรุณาและคำชี้แนะต่าง ๆ มาโดยตลอด

นอกจากนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และ น้อง ๆ ทุกคน ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (กพวท หรือ STDB) ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณครูวรเกต และทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ กำลังใจ กำลังกาย และกำลังทรัพย์ แก่ข้าพเจ้าตลอดมา.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญของเพนนิซิลิน..... 1

1.2 อุตสาหกรรมการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก(6-APA)..... 2

1.3 การค้นพบเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส..... 6

1.4 การเรียกชื่อ..... 6

1.5 ประเภทของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส..... 6

1.6 การผลิตกรด 6-APAโดยเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส..... 19

2. วิธีการทดลอง..... 21

2.1 เครื่องมือและเคมีภัณฑ์..... 21

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 23

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย..... 24

2.4 การเตรียมสารละลาย..... 25

2.5 การเตรียมแป้งไฮโดรไลซ์..... 27

2.6 การเตรียมกากถั่วเหลืองไฮโดรไลซ์..... 27

2.7 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส..... 27

2.8 การวัดปริมาณโปรตีน..... 28

2.9 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์..... 28

2.10 การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส..... 29

2.11 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด..... 29

สารบัญ

บทที่ หน้า

3. ผลการทดลอง..... 30

3.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในขวดเขย่า..... 30

3.1.1 ผลกระทบของแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 30

3.1.2 ผลกระทบของแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 33

3.1.3 ผลกระทบของปัจจัยทางกายภาพ..... 40

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 45

3.2.1 อัตราเร็วในการกวน..... 45

3.2.2 อัตราการป้อนอากาศ..... 48

3.2.3 การควบคุมความเป็นกรด-ด่าง..... 48

3.2.4 การเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่อง..... 51

4. บทสรุปและวิจารณ์..... 53

เอกสารอ้างอิง..... 65

ภาคผนวก..... 71

1. กราฟมาตราฐานสำหรับหาปริมาณ PABA..... 71

2. กราฟมาตราฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีน..... 72

3. กราฟมาตราฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์..... 73

4. กราฟมาตราฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส..... 74

5. ตารางแสดงองค์ประกอบของกากน้ำตาล..... 75

ประวัติผู้เขียน..... 77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างของจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส.....	8
1.2	สมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส.....	11
1.3	ตัวอย่างของจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส.....	13
1.4	สมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส.....	16
1.5	ตัวอย่างของจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์แอมพิซิลิน เอซิเลส.....	18

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	สูตรโครงสร้างของ 6-APA.....	1
1.2	สูตรโครงสร้างของเพนนิซิลิน และตัวอย่างหมู่ข้างเคียงชนิดต่างๆ.....	3
1.3	กระบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยวิธีทางเคมี.....	4
1.4	กระบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	5
3.1	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 - 0.8 %.....	31
3.2	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อใช้สารละลายแป้งไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแทนกลูโคสแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 - 2.0 %.....	32
3.3	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อใช้แบะแซเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยว ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 6.5 - 26 %.....	34
3.4	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	35
3.5	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % และแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตระหว่างความเข้มข้น 0.05 - 0.15 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน.....	37
3.6	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % และใช้ยูเรียเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0225 - 0.067 %.....	38
3.7	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % และใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเดี่ยวและเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต.....	39

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.8 ผลกระทบของความเป็นกรด-ด่าง(pH)เริ่มต้น ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 %และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 %เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน 41

3.9 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 %เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน... 43

3.10 การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 %เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 25° ซ., pH เริ่มต้น 7.8 เทียบกับ ที่อุณหภูมิ 28° ซ.,pH เริ่มต้น 7.1..... 44

3.11 ผลของการเสริมกรดอะมิโนบางชนิดในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้กลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ที่อุณหภูมิ 25° ซ.,pH เริ่มต้น 7.8..... 46

3.12 การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในถังหมัก โดยใช้อาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 %เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 25° ซ. โดยแปรผันความเร็วในการกวนตั้งแต่ 300 - 500 รอบ ต่อ นาที..... 47

3.13 การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในถังหมัก โดยใช้อาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 %เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 25° ซ. ความเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที และแปรผันอัตราการให้อากาศในช่วง 0.5 - 2.0 vvm 49

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.14 ผลการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำหมักในระหว่างการเจริญเติบโต ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในถังหมัก..... 50

3.15 ผลการเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่อง ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในถังหมัก..... 52