บทที่ 4

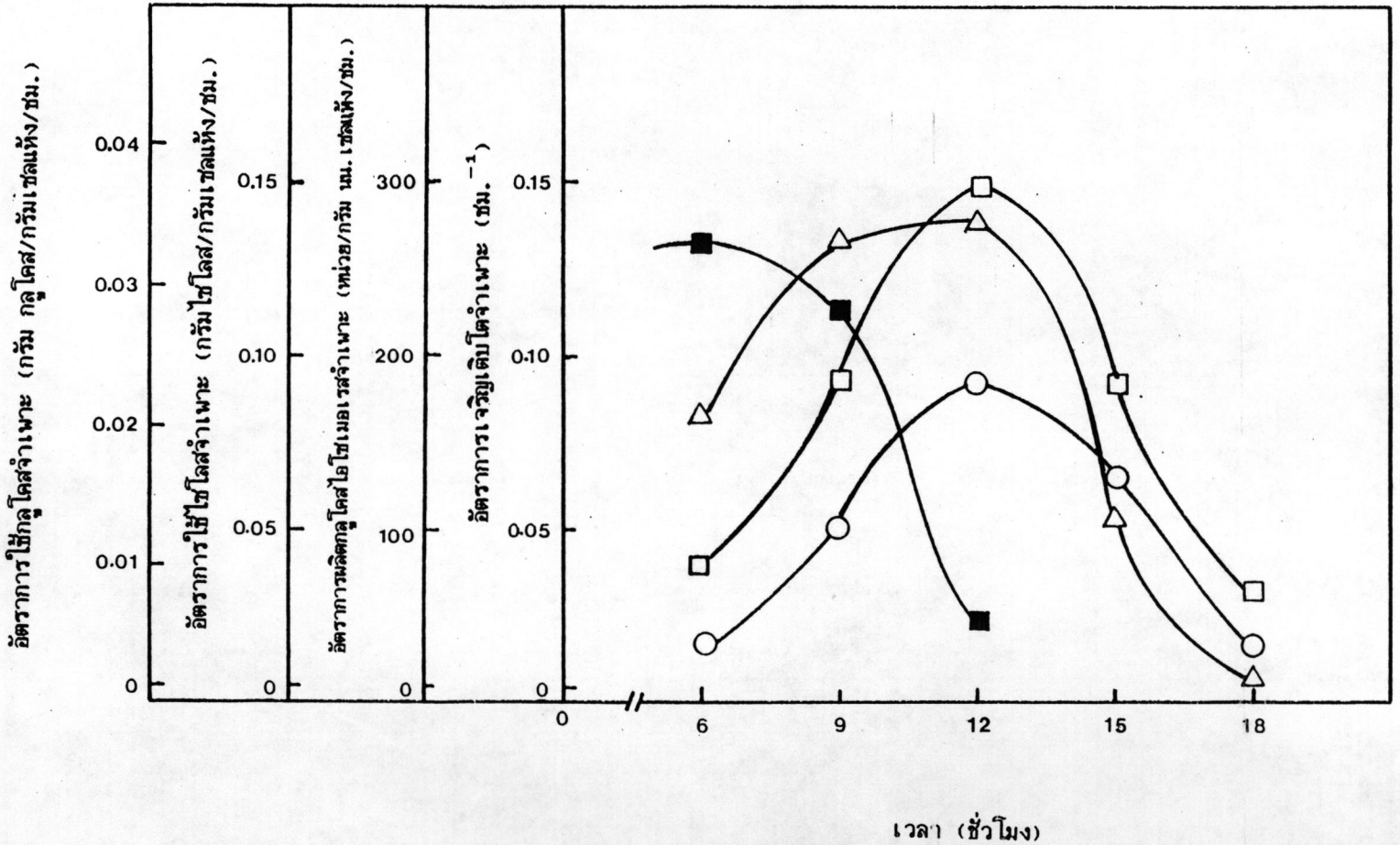
กลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยการชักนำของไซโลส ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและถูกเก็บไว้ภายในเซลของจุลินทรีย์ (9) ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์นี้จึงต้องคำนึงถึงการเจริญของเชื้อควบคู่ไปกับการสร้างเอนไซม์ เพราะการเพิ่มปริมาณของเซลจะเป็นการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไปด้วย การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อคือสารแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มการเจริญของเซลและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ นักวิจัยรุ่นก่อนพบว่าองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสส่วนใหญ่ใช้ไซโลสเป็นสารแหล่งคาร์บอน เช่นในปี 1966 Yoshimura และคณะ (26) ศึกษาการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Bacillus coagulans HN-68 พบว่าเมื่อใช้ไซโลสเป็นสารแหล่งคาร์บอนเทียบกับสารแหล่งคาร์บอนอื่นๆ อีก 20 ชนิด เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูง ต่อมา Takasaki (22) พบว่า Streptomyces albus YT-5 สามารถเจริญและผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ดี เมื่อใช้ไซแลน หรือวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบเป็นสารแหล่งคาร์บอน ต่อมาก็พบว่า Streptomyces wedmorensis ATCC21230 และ Streptomyces albus ATCC 21132 (11) สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น รำข้าวสาลี เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพดNand และคณะ (50) ได้รายงานว่า Streptomyces fradine ไม่สามารถเจริญ และสร้างเอนไซม์ได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีบด หรือซังข้าวโพดบด ทั้งนี้เพราะ เชื้อนี้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนส ออกมาย่อยไซแลนในรำข้าวสาลีบดหรือซังข้าวโพดบดได้ แต่ S.fradine สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดของเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดฝ้าย รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ฯลฯ ซึ่งนับเป็นข้อดีของ Streptomyces sp. เพราะในสารละลายย่อยด้วยกรดของวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบนี้จะประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่นเฟอร์ฟูรัล (furfural) ไฮดรอกซีเมททิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethyl furfural) และกรดลีวูลินิค(levulinic acid) ซึ่งปกติสารเหล่านี้จะยังยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ แต่ Streptomyces sp. สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ในอาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดนี้ (51)ศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) รายงานว่า Streptomyces sp. 190-1 สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ในปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์นี้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวสกัดไขมัน เป็นสารแหล่งคาร์บอน และใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง เป็นสารแหล่งไนโตรเจน

ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งจุดประสงค์หลักคือ การปรับปรุงสารแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน รวมทั้งการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายที่ใช้เติมอย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ งานทดลองนี้อาศัยผลการทดลองของ ศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับกำหนดระดับความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ ที่ต้องการศึกษา สารแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวสกัดไขมัน และเปลือกเมล็ดฝ้าย สารแหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และยีสต์เอกซแทรก ซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว ยังเป็นแหล่งวิตามิน และสารเสริมการเจริญ (growth factor) นำปัจจัยต่างๆ ที่ต้องการศึกษามาจัดแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล เนื่องจากสารอาหารต่างๆ ที่ใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ในงานวิจัยนี้ เป็นสารอาหารเชิงซ้อน (complex medium) จะมีทั้งสารแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบ (ดังตารางที่ 8) การวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล จะสามารถอธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้น อิทธิพลของปัจจัยหลักและอิทธิพลร่วมของทุกปัจจัย เมื่อใช้สารอาหารเชิงซ้อนเหล่านี้ เป็นองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการศึกษาสารแหล่งอาหารและปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Streptomyces sp. 190-1 เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ในระดับขวดเขย่า พบว่า สารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองในปริมาณ 0.44% โปรตีน สารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ 1% น้ำตาลรีดิวส์ ส่วนยีสต์เอกซแทรก ซึ่งเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน และแหล่งวิตามิน สารเสริมการเจริญ (growth factor) ปริมาณที่เหมาะสม คือ 0.30% Streptomyces sp. 190-1 สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ได้สูงถึง 5500 หน่วย/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญของเซล 4.2 กรัม นน. เซลแห้ง/ลิตร สูงกว่าผลการทดลองของศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) ซึ่งเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ประมาณ 1.25 เท่า จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย พอสรุปได้ดังนี้คือ ปริมาณน้ำตาล และโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของ Streptomyces sp.190-1 ถ้าปริมาณน้ำตาลมากเกินไป การเจริญ และสร้างเอนไซม์จะลดลง ปริมาณโปรตีนก็เช่นเดียวกัน ถ้ามากเกินไป การเจริญและการสร้างเอนไซม์จะลดลง ดังนั้นการเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม ต้องพิจารณาอัตราส่วนของสารอาหารที่ใช้ จากผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของเอนไซม์แอคติวิตี (ดังตารางที่ 33) พบว่าปัจจัย B คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย มีผลต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์มากที่สุด ถ้าเพิ่มความเข้มข้นจาก 1% ขึ้นไป การเจริญและสร้างเอนไซม์จะลดลง ไม่ว่าอัตราส่วนระหว่าง ปัจจัย A และ C จะเป็นเท่าไร ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ B ต่ำๆ คือ 1% (น้ำตาลรีดิวส์) ส่วนปัจจัย A คือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง และปัจจัย C คือสยีสต์เอกซแทรก ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีผลต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์ของเชื้อรองจาก สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของ

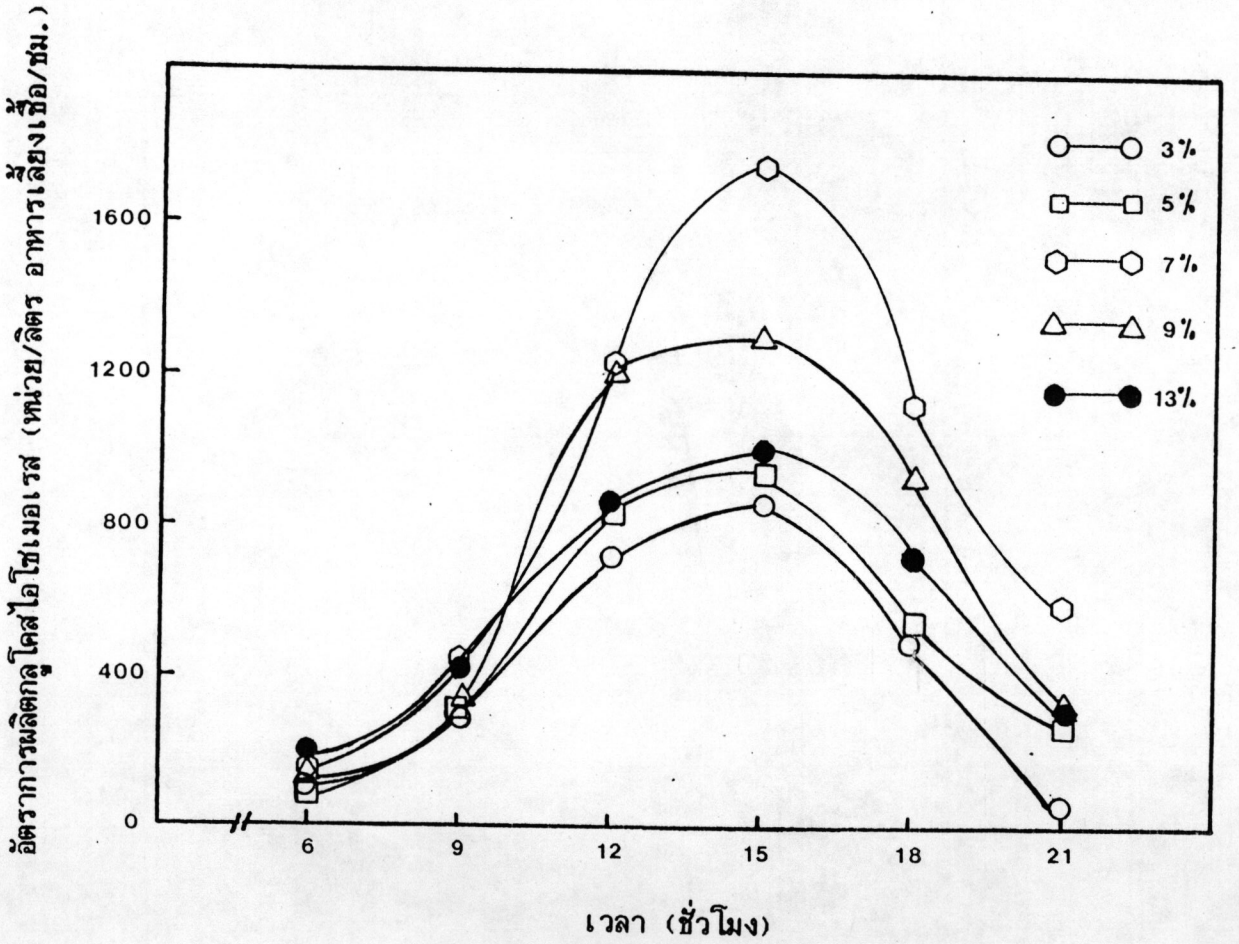
เปลือกเมล็ดฝ้าย ถ้าใช้ A เข้มข้นสูง C ต้องมีความเข้มข้นต่ำๆ การเจริญและสร้างเอนไซม์จึงจะสูง ถ้าใช้ C สูง ความเข้มข้นของ A ต้องต่ำๆ แสดงว่าปริมาณโปรตีนในอาหารก็มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์รองลงมาจากน้ำตาล Outtrup (17) รายงานว่าในการเลี้ยง Bacillu coagulans เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส เมื่อให้สารแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาณสูงมากกว่า 1% และ 3% ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เมื่อเปรียบเทียบราคาระหว่าง ปัจจัย A กับ C พบว่า C มีราคาแพงกว่า A มาก ดังนั้นจึงเลือกใช้ A ที่ระดับความเข้มข้นสูงคือ 0.44% และใช้ C ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ คือ 0.30% เพื่อใช้เป็นองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองในระดับขวดเขย่า เชื้อสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 7670 หน่วย/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ และให้ปริมาณเซลสูงสุด 6.5 กรัม นน. เซลแห้ง/ลิตร ในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งสูงกว่าในระดับขวดเขย่าประมาณ 1.4 เท่า ปริมาณโปรตีนที่เหลือในน้ำหมัก ประมาณ 5 กรัม/ลิตร จากการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่า (parameter) ต่างๆ (รูปที่ 4) จะเห็นว่าการเจริญของเชื้อ เริ่มเข้าสู่ ช่วงการเจริญ แบบคงที่ (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 18 เอนไซม์แอคติวิตี และการใช้น้ำตาลไซโลส เริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีกลูโคสอยู่ด้วยแต่ปริมาณค่อนข้างน้อย จะเห็นว่าเชื้อมีการใช้กลูโคสควบคู่ไปกับไซโลส แต่ในช่วงแรกๆ อัตราการใช้กลูโคสจะสูงกว่าไซโลส เพราะกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ถูกใช้ได้ง่ายที่สุด จาก รูปที่ 17 จะเห็นว่าอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ (specific rate of substrate utilization) สูงสุดประมาณ 0.033 กรัม กลูโคส/กรัม เซลแห้ง/ชม. ในชั่วโมงที่ 6 ส่วนอัตราการไซโลสจำเพาะสูงสุดประมาณ 0.150 กรัม ไซโลส/กรัม เซลแห้ง/ชม. ที่ชั่วโมงที่12 หลังจากการเลี้ยงเชื้อแต่เชื้อเพิ่งเริ่ม เข้าสู่การเจริญแบบทวีคูณ (Log phase) แสดงว่าเชื้อใช้กลูโคสในการเจริญและสร้างเอนไซม์ช่วงแรกๆ เท่านั้น ส่วนช่วงที่เชื้อมีการเจริญเต็มที่ ไซโลส มีอิทธิพลต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์มากที่สุด และยังมีความสัมพันธ์กับการใช้โปรตีน คือ เมื่อปริมาณไซโลสเริ่มคงที่ การเจริญของเชื้อ และการสร้างเอนไซม์ก็เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ การใช้โปรตีนก็เริ่มคงที่ด้วย จากการคำนวณค่า จลนศาสตร์ของการหมัก (kinetic of fermentation)ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของการหมัก (ดูรูปที่ 17) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(specific growth rate) อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific rate of product formation)และอัตราการใช้อาหาร จำเพาะ (specific rate of substrate utilization) มีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 คือ 0.1388 ชม$^{-1}$. , 186.488 หน่วย/กรัม เซลแห้ง/ชม. และ 0.150 กรัม ไซโลส/กรัม เซลแห้ง/ชม. ตามลำดับ จะเห็นอัตราการใช้ไซโลสของเชื้อสูงสุดในช่วงที่อัตราการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด นั้นคือ อัตราการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ เป็นปฏิภาคโดยตรงกับอัตราการใช้สารอาหารแสดงว่าเชื้อใช้ไซโลสเพื่อการเจริญและการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ดังนั้นการเจริญของเชื้อจึงควรจะเป็นแบบ growth associate

รูปที่ 17 แสดงค่าทางจลนศาสตร์ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยง Streptomyces sp. 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีองค์ประกอบอาหารเหมือนรูปที่ 4
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (△) อัตราการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจำเพาะ (○)
อัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ (■) อัตราการใช้ไซโลสจำเพาะ (□)



จุดประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือ การเพิ่มปริมาณเซลและการสร้างเอนไซม์ให้สูงขึ้น การเลี้ยง streptomyces sp. 190-1 ในถังหมักเพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส เป็นการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic fermentation) มีรายงานว่าการเจริญของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีออกซิเจนนั้น 50-55% ของสารแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของเซล (52) การเพิ่มปริมาณสารแหล่งคาร์บอนก็เท่ากับเป็นการเพิ่มการเจริญของเซลด้วย มีรายงานว่าไซโลสนอกจากจะเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ แล้วยังใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอนได้ด้วย (17,42) งานวิจัยนี้เลือกใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นสารแหล่งคาร์บอนซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส (ดูตารางที่ 8) shieh และ Donnelly (43) พบว่าการเติมสารชักนำคือ ไซโลสในรูปของสารละลายของเยื่อกระดาษที่ย่อยแล้วในการเลี้ยง Acrobacter Levanicum เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในถังหมัก โดยเติมสารชักนำนี้ในช่วงระยะการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณนั้น สามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น ศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) รายงานว่าไซโลสทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและสารชักนำการสร้างเอนไซม์ในการเลี้ยง Streptomyces sp. 190-1 การเติมไซโลสในระยะก่อนเชื้อจะเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่สามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ได้สูงขึ้น 5 เท่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมไซโลส และจากการทดลองเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ไซโลส 1% โดยแบ่งเติมที่ระยะเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ 0.50% และช่วงที่เชื้ออยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณอีก 0.50% จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 37% และการเจริญของเซลเพิ่มขึ้นประมาณ 20% จากข้อมูลต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย เพื่อใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง เพราะมีรายงานว่าการเติมไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณสูงเกินไปจะมีผลกระทบต่อการเจริญ และผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ (53) เลือกเติมในชั่วโมงที่ 12 หลังการเลี้ยงเชื้อ เพราะเชื้ออยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณ และที่ชั่วโมงที่ 12 นี้ อัตราการใช้สารอาหาร (ไซโลส) การเจริญและสร้างเอนไซม์สูงสุด (ดูรูปที่ 17) จากการผันแปรระดับความเข้มข้นของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย 5 ระดับ คือ 3,5,7,9 และ 13% (น้ำตาลไซโลส) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 7% (ไซโลส) Streptomyces sp. 190-1 สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 15600 หน่วย/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ปริมาณเซลสูงสุด 12 กรัม นน. เซลแห้ง/ลิตร ในชั่วโมงที่ 21 สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์นี้ในถังหมัก เมื่อไม่เติมสารชักนำ ประมาณ 2 เท่า และสูงกว่าผลการทดลองของ ศิริลักษณ์ (42) ประมาณ 3.5 เท่า และมีปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือน้อยที่สุด คือ 1.5 กรัม/ลิตร จากรายงานของ Lamm และคณะ (54) ในการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces ATCC 21175 ในถังหมักขนาด 50 แกลลอน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ ประมาณ 4300 หน่วย/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากรูปที่ 18 จะเห็นว่าอัตราการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส เมื่อเติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้ 7% (ไซโลส) อย่างต่อเนื่อง มีค่าสูงที่สุด ประมาณ 1766 หน่วย/ลิตรอาหารเลี้ยง

รูปที่ 18 เปรียบเทียบอัตราการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผันแปรความเข้มข้นของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายที่ใช้เติมอย่างต่อเนื่อง



เชื้อ/ชม. ที่ชั่วโมงที่ 15 ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ 7% เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกลูโคสไอโซ-เมอเรสในถังหมัก จากผลการทดลองจะเห็นว่าน้ำตาลไซโลสมีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ รวมทั้งการใช้โปรตีน การเติมสารชักนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 7% การเจริญของเชื้อยังน้อยอยู่ อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนของสารอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญ สารอาหารบางอย่างอาจยังไม่เพียงพอแก่ความต้องการ ส่วนการเติมสารชักนำที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 7% การเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อเริ่มลดลง อาจมีผลมาจากสารอาหารบางตัว อาจมีมากเกินไป เช่น ปริมาณน้ำตาล จึงมีผลต่อการเจริญของเชื้อ และการเติมไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณสูงเกินไป จะมีผลกระทบต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ (53) จากการพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) (รูปที่ 19) ภายหลังจากการเติมไซโลสอย่างต่อเนื่อง พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะสูงอยู่ที่ช่วงเวลาหนึ่ง แล้วจะค่อยๆ ลดลง แม้ว่าจะยังมีการเติมไซโลสอยู่ แสดงว่าไซโลสไม่ใช่ Limiting Substrate จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าไซโลสจะมีอิทธิพลต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ ของ Streptomyces sp. 190-1 มากที่สุด แต่ตัวเชื้อเองก็มีผลด้วย เพราะจากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ของการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแต่ละครั้ง (ตารางที่ 34) ในช่วงเวลาก่อนที่จะเติมสารชักนำ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของการทดลองแต่ละครั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง มีความเข้มข้นไม่เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตาม ผลจากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นประกอบการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในระดับขยายส่วนต่อไป

ตารางที่ 34 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ Streptomyces sp. 190-1 ในชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

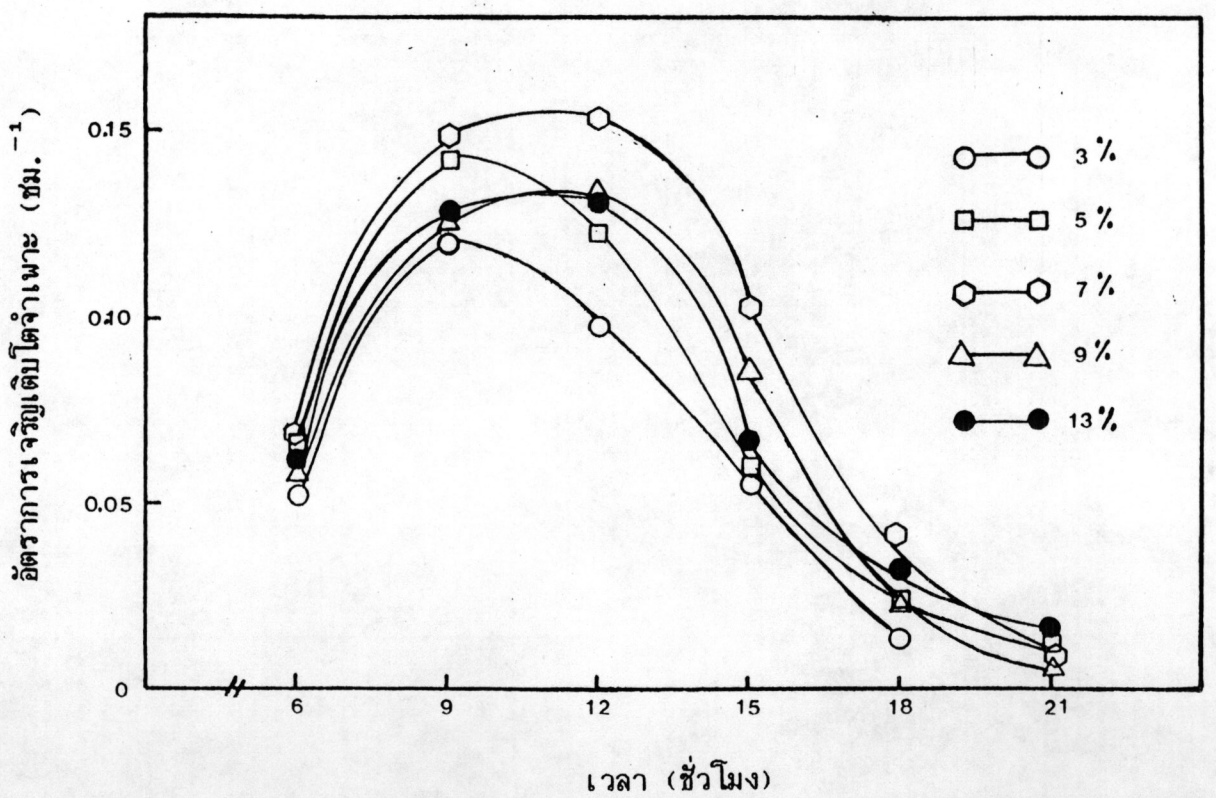
Source of Variation	df	SS	MS	F 4, 5
U	4	0.0012	$3x10^{-4}$	คำนวณ ตาราง
Error	5	0.0001	$2x10^{-5}$	15* 5.19
Total	9	0.0013		

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปผล และ ข้อเสนอแนะ

1. ผลการศึกษาสารแหล่งอาหาร และปริมาณที่เหมาะต่อการเจริญและผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ Streptomyces sp. 190-1 ในขวดแก้วทรงกรวย พบว่า สารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายในปริมาณที่ให้น้ำตาลรีดิวส์ 1% สารแหล่งไนโตรเจนคือ

รูปที่ 19 เปรียบเทียบอัตรการเจริญเติบโตจำเพาะของ Streptomyces sp. 190-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผันแปรความเข้มข้นของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย ที่ใช้เติมอย่างต่อเนื่อง



สารละลายย่อยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง ในปริมาณที่ให้โปรตีน 0.44% ปริมาณที่เหมาะสมของยีสต์เอกซแทรก 0.30% เชื้อสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ 5500 หน่วย/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้ปริมาณเซลสูงสุด 4.2 กรัม นน. เซลแห้ง/ลิตร สูงกว่าผลการทดลองของศิริลักษณ์ (42) ซึ่งเลี้ยงเชื้อในถังหมัก 1.25 เท่า

2. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองในขวดแก้วทรงกรวย เชื้อสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 7670 หน่วย/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ปริมาณเซลสูงสุด 6.5 กรัม นน. เซลแห้ง/ลิตร ในชั่วโมงที่ 18 สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย ประมาณ 1.4 เท่า

3. ผลการศึกษาระดับความ เข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย เพื่อใช้เติมอย่างต่อเนื่อง พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ ปริมาณที่ให้ 7% น้ำตาลไซโลส โดยเติมในชั่วโมงที่ 12 ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ ด้วยอัตรา 0.27 มล./นาที เชื้อสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 15600 หน่วย/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ปริมาณเซลสูงสุด 12 กรัม นน. เซลแห้ง/ลิตร ในชั่วโมงที่ 21 สูงกว่าเมื่อไม่เติมสารชักนำประมาณ 2 เท่า และสูงกว่าผลการทดลองของ ศิริลักษณ์ (42) ประมาณ 3.5 เท่า มีปริมาณโปรตีนเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 กรัม/ลิตร

จากการพิจารณาค่าทางจลนศาสตร์ ของการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (ดูรูปที่ 17) จะเห็นว่าเชื้อมีการใช้กลูโคสควบคู่ไปกับไซโลส โดยอัตราการใช้กลูโคสจะสูงในชั่วโมงแรกๆ ของการเลี้ยงเชื้อ จึงน่าที่จะมีการศึกษาหาความเข้มข้นที่ของกลูโคส และช่วงเวลาที่เหมาะสม เพื่อใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นให้เชื้อเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกลูโคส กับไซโลสที่ใช้เติม นอกจากนี้ควรจะมีการควบคุมหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง ให้มีปริมาณเซลค่อนข้างสม่ำเสมอเพื่อขจัดปัญหาความแตกต่างของการทดลอง แต่ละครั้งที่เกิดจากการใช้หัวเชื้อที่เข้มข้นไม่เท่ากัน ซึ่งมีผลต่อการเจริญ และผลิตเอนไซม์