การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp.190-1* ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์กับ *Streptomyces sp.42-9* ที่ผลิตไซแลนเนส

นางสาว วรางคณา อินทรเสน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-599-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017435 i 10313278

Strain Improvement of Glucose Isomerase Producing *Streptomyces sp.190-1* by Protoplast Fusion with Xylanase Producing *Streptomyces sp.42-9*

Miss Varangkana Intharasen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-578-599-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp. 190-1* ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์กับ *Streptomyces sp.42-9* ที่ผลิตไซแลนเนส
โดย	นางสาว วรางคณา อินทรเสน
ภาควิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วรางคณา อินทรเสน : การปรับปรุงสายพันธุ์ Streptomyces sp.190-1 ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์กับ Streptomyces sp.42-9 ที่ผลิตไซแลนเนส (STRAIN IMPROVEMENT OF GLUCOSE ISOMERASE PRODUCING STREPTOMYCES SP.190-1 BY PROTOPLAST FUSION WITH XYLANASE PRODUCING STREPTOMYCES SP.42-9) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 85 หน้า . ISBN 974-578-599-7

งานวิจัยนี้รายงานวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ Streptomyces sp.190-1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงประมาณ 1200 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ให้ผลิตไซแลนเนสได้ด้วย โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์กับ Streptomyces sp.42-9 ที่ผลิตไซแลนเนส ทั้งนี้เพราะ การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ต้องการไซโลสเป็นสารชักนำ ถ้าจุลินทรีย์นี้ผลิตไซแลนเนสได้ก็จะสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ โดยจะย่อยไซแลนไปเป็นไซโลส และมีผลชักนำการสร้าง กลูโคสไอโซเมอเรส

ผลการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ต่อการสร้างและการรีเจนเนอเรท โปรโตพลาสท์ของเชื้อทั้งสอง พบว่า การเติมไกลซีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ของเชื้อทั้งสอง แต่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ นอกจากนั้นยังพบว่า อายุของเชื้อไม่มีผลต่อการรีเจนเนอเรท โปรโตพลาสท์ โดยพบว่า ไมซีเลียมของทั้ง Streptomyces sp.190-1 และ Streptomyces sp.42-9 ที่ช่วงอายุ 50-55 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเตรียมโปรโตพลาสท์ โดยให้ความถี่ของการรีเจนเนอเรทสูงสุด คือ 12.83 % สำหรับ Streptomyces sp.190-1 และ 1.60 % สำหรับ Streptomyces sp.42-9

การคัดเลือกลูกผสมโดย ใช้ความสามารถในการต้านยาเตตราซัยคลิน ร่วมกับแอมพิซิลิน พบว่าความถี่ของรีคอมบิเนชัน โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์ และการคอนจูเกชัน ระหว่าง Streptomyces sp.190-1 กับ Streptomyces sp.42-9 มีค่าเป็น 1.46×10^{-7} และ 4.54×10^{-7} ตามลำดับ ส่วนความถี่ของรีคอมบิเนชัน โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์ และคอนจูเกชัน ระหว่าง Streptomyces sp.190-1 กับ Streptomyces sp.42-9 ที่ได้รับพลาสมิด PIJ 4027 ซึ่งมียีนต้านยาอีริโทรมัยซิน มีค่าสูงขึ้นเป็น 4.15×10^{-2} และ 8.41×10^{-6} ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกลูกผสมโดยใช้ความสามารถในการต้านยาเตตราซัยคลินร่วมกับอีริโทรมัยซิน

จากการสุ่มตัวอย่างลูกผสมมา 60 สายพันธุ์ พบว่ามี 20 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ในช่วง 600 - 900 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และพบว่าทั้ง 20 สายพันธุ์นี้ ผลิตไซแลนเนสได้อยู่ในช่วง 0.30 - 1.04 หน่วยต่อ มล. เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว เป็นองค์ประกอบ และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ จะผลิตไซแลนเนสได้อยู่ในช่วง 3.97 - 8.64 หน่วยต่อ มล.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

VARANGKANA INTHARASEN: STRAIN IMPROVEMENT OF GLUCOSE ISOMERASE PRODUCING STREPTOMYCES SP.190-1 BY PROTOPLAST FUSION WITH XYLANASE PRODUCING STREPTOMYCES SP.42-9. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 85 PP.

Strain improvement of Streptomyces sp.190-1, an organism capable to produce glucose isomerase at a high level of 1200 units per gram of dry cells, has been carried out in order to generate xylanase by protoplast fusion with xylanase producing Streptomyces sp.42-9. Since the production of glucose isomerase required xylose, if Streptomyces sp.190-1 could produce xylanase, it would then be able to grow in medium with xylan containing material by hydrolyzing xylan to xylose which subsequently acted as inducer for glucose isomerase production.

Optimal conditions for formation and regeneration of protoplasts were investigated. Addition of glycine to the culture medium had no effect on protoplast formation of both species but markedly reduced cell growth. Age of mycelium also had no effect on protoplast formation, however, affected the regeneration of protoplasts. The mycelial age of 50-55 hours was optimum for protoplast regeneration in both species. With this mycelial age, the protoplast regeneration frequencies of 12.83 % and 1.60 % were obtained with Streptomyces sp. 190-1 and Streptomyces sp. 42-9, respectively.

Recombination frequencies obtained through protoplast fusion and conjugation between Streptomyces sp.190-1 and Streptomyces sp.42-9 were 1.46×10^{-3} and 4.54×10^{-7}, respectively by using their resistance to tetracycline in combination with ampicillin as markers. Higher recombination frequencies which were 4.14×10^{-2} for protoplast fusion and 8.41×10^{-5} for conjugation of Streptomyces sp.190-1 with Streptomyces sp.42-9 harboring plasmid pIJ4027 were obtained by using resistant ability to tetracycline and erythromycin for recombinant selection.

Twenty recombinants from 60 randomly selected recombinants could produce glucose isomerase at the level ranging from 600-900 units per gram of dry cells. They could produce xylanase in the range of 0.30 - 1.04 units per ml. when grown in a medium containing defatted rice bran and 3.97 - 8.64 units per ml. when grown in a medium containing xylan.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์วินิจ ขำวิวรรธน์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ David A.Hopwood แห่งสถาบัน John Innes, Norwich ,สหราชอาณาจักร ที่ได้เอื้อเฟื้อให้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *S. coelicolor M124* และ *S.coelicolor M130* ขอขอบคุณ Dr. Mervynn J.Bibb ที่ได้เอื้อเฟื้อให้พลาสมิด pIJ 4207

ขอขอบพระคุณบริษัทน้ำมันบริโภคไทย ที่ให้กากรำข้าว สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

และท้ายสุด ขอขอบคุณ พี่, เพื่อน และน้องๆ ทุกคน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจ ทำให้การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

คำย่อ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 14

3 ผลการวิจัย..... 25

4 การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย..... 59

เอกสารอ้างอิง..... 66

ภาคผนวก..... 73

ประวัติ..... 85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9* เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่างกัน.....	26
2	เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของไกลซีนต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9*.....	29
3	แสดงความสามารถในการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์ ที่แรงดันออสโมติกต่างกัน.....	33
4	แสดงความสามารถ ในการต้านยาปฏิชีวนะ ชนิดต่างๆ ของ *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9*.....	40
5	แสดงความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะอีริโทรมัยซิน ของ *Streptomyces sp.42-9/pIJ4027*.....	41
6	แสดงผลการรีคอมบิเนชันของเชื้อมาตรฐาน *S.coelicolor M124* และ *S.coelicolorM130*.....	43
7	แสดงผลการรีคอมบิเนชันของเชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp.42-9*	46
8	แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของลูกผสม เปรียบเทียบกับ *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9*.....	51
9	แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของลูกผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ.....	55
10	สรุปการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและไซแลนเนสของลูกผสม	57

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะการกระจายของไมซีเลียมของ *Streptomyces sp.42-9* เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่างๆกัน.....	27
2	แสดงผลของไกลซีนต่อประสิทธิภาพการเกิดโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces sp.190-1*.....	30
3	แสดงผลของไกลซีนต่อประสิทธิภาพการเกิดโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces sp.42-9*.....	31
4	แสดงโปรโตพลาสท์ของเชื้อ *Streptomyces sp.190-1*.....	34
5	แสดงความสามารถในการรีเจนเนอเรทของ *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9* ที่แรงดันออสโมติกต่างกัน.....	35
6	แสดงผลของอายุเชื้อต่อการเกิดโปรโตพลาสท์และการรีเจนเนอเรชันของ *Streptomyces sp.190-1*.....	37
7	แสดงผลของอายุเชื้อต่อการเกิดโปรโตพลาสท์และการรีเจนเนอเรชันของ *Streptomyces sp.42-9*.....	38
8	แสดง master plate ของลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* บนอาหารวุ้น MS.....	48
9	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อลูกผสมที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่.....	49
10	แสดงบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) ของลูกผสมที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ xylan complex medium.....	54

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม

นน. = น้ำหนัก

ชม. = ชั่วโมง

°ซ. = องศาเซลเซียส