

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp. 190-1* ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรล
โดยการเชื่อมโยงพอลิแลสกับ *Streptomyces sp. 42-9* ที่ผลิตไซแพนเนล

นางสาว วรางคณา อินกรเลน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-599-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

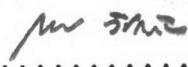
Chulalongkorn University

1991

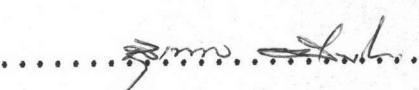
ISBN 974-578-599-7

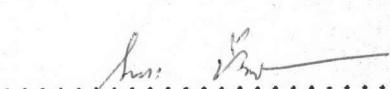
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. 190-1
 ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรล โดยการเชื่อมโปรต็อกลาล์กับ
Streptomyces sp. 42-9 ที่ผลิตไซแลนเนล
 โดย นางสาว วงศ์คณา อินกรเลน
 ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
 อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพรี ปันพาณิชการ

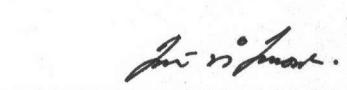
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ดังนี้เป็นล่วงหนึ่ง
 ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต


 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
 (ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการลอบวิทยานิพนธ์


 ประธานกรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิพร ชนิยวน)


 กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. ไพรี ปันพาณิชการ)


 กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ นำวิวรรณ)

พิมพ์ด้วยบั้งกอกที่ปั๊วิภาณีแทนที่ภายในกรอบลักษณะนี้ที่ยังแห้งเดียว

รายงาน อินทรเสน : การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp.190-1* ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการเชื่อมprotoplast กับ *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.ไพรีระ บินพันธุ์การ, 85 หน้า . ISBN 974-578-599-7

งานวิจัยนี้รายงานวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp.190-1* ซึ่งเป็นจินทรีย์ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงประมาณ 1200 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ให้ผลิตไซแลนเนสได้ด้วย โดยการเชื่อมprotoplast กับ *Streptomyces sp.42-9* ที่ผลิตไซแลนเนส ทั้งนี้ ผู้รายงานการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสต้องการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp.190-1* ให้มีความสามารถเจริญได้ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ โดยจะย่อยไซแลนไปเป็นไซโลส และมีผลลัพธ์จากการสร้าง กรูโคสไอโซเมอเรส

ผลการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ต่อการสร้างและกาวรูริเจนเนอเรท protoplast ของ *Streptomyces sp.190-1* สูง พบว่า การเติมไอกลีเซอร์อลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลต่อการเกิดprotoplast ของเชื้อทั้งสอง แต่ผลลัพธ์ของการเจริญของเชลล์ นอกจากนูนยังพบว่า อายุของเชื้อไม่มีผลต่อการเจนเนอเรท protoplast โดยพบว่า ในช่วงอายุ 50-55 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเตรียมprotoplast โดยให้ความถูกต้องของprotoplast คือ 12.83 % สำหรับ *Streptomyces sp.190-1* และ 1.60 % สำหรับ *Streptomyces sp.42-9*

การคัดเลือกถุงผสมโดยใช้ความสามารถในการต้านยาเตตราซัมคลิน ร่วมกับแอมพิชิลิน พิสิตริจิโนบิโนเนชัน โดยการเชื่อมprotoplast และการคัดเลือกเชลล์ รูปหัวใจ *Streptomyces sp.190-1* กับ *Streptomyces sp.42-9* มากเป็น 1.46×10^{-7} และ 4.54×10^{-7} ตามลำดับ ส่วนความถูกต้องของรูปหัวใจในชั่วโมง 4027 ซึ่งมีน้ำยาอัลกอฮอล์ 4.15 $\times 10^{-2}$ และ 8.41×10^{-6} ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกถุงผสมโดยใช้ความสามารถในการต้านยาเตตราซัมคลินร่วมกับอัลกอฮอล์ มีความถูกต้องเป็น 4.15 $\times 10^{-2}$ และ 8.41×10^{-6} ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกถุงผสมโดยใช้ความสามารถในการต้านยาเตตราซัมคลินร่วมกับอัลกอฮอล์ มีความถูกต้องเป็น

จากการสัมตัวอย่างถุงผสมมา 60 ถุงพันธุ์ พบร่วม 20 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ในช่วง 600 - 900 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเชลล์ บุลลัลชูบัวหง 20 สายพันธุ์ ผลิตไซแลนเนสสูงอยู่ในช่วง 0.30 ถึง 1.04 หน่วยต่อ มล. เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการรักษาไว้ เป็นองค์ประกอบ และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ จะผลิตไซแลนเนสได้อยู่ในช่วง 3.97 - 8.64 หน่วยต่อ มล.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนักศึกษา นัน พานิช
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นัน พานิช

หมายเหตุ: ขอสงวนสิทธิ์แก้ไขข้อความ

พิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์ เอกสารนี้เป็นที่ยอมรับในประเทศไทย

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
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนักศึกษา นิติรา พันธุ์สุข
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา พล. พล. พล.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอรับของรางวัล รองศาสตราจารย์ ดร.ไนเราะ บีนพานิชการ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอรับของรางวัล รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอบล และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเพื่อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ อนิยวน ผู้ช่วยศาสตราจารย์วินิจ ข่าวิวรรตน์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น.

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

ขอขอบพระคุณรังษักษามันบริโภคไทย ที่ให้การรำข้าว สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพัฒนา ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

และท้ายสุด ขอขอบคุณ พี่, เพื่อน และน้องๆ ทุกคน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจ ทำให้การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๑
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๒
กิตติกรรมประกาศ.....	๓
สารบัญ.....	๔
สารบัญตาราง.....	๕
สารบัญภาพ.....	๖
คำย่อ.....	๗
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	14
3 ผลการวิจัย.....	25
4 การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	59
เอกสารอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	73
ประวัติ	85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ <i>Streptomyces sp.</i> 190-1 และ <i>Streptomyces sp.</i> 42-9 เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่างกัน.....	26
2	เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของไกลชีนต่อการเกิดโปรต็อกลูตินของ <i>Streptomyces sp.</i> 190-1 และ <i>Streptomyces sp.</i> 42-9.....	29
3	แสดงความสามารถในการรีเจนเนอเรกของโปรต็อกลูตินที่แรงดันออกโนมิติกต่างกัน.....	33
4	แสดงความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ ชนิดต่างๆ ของ <i>Streptomyces sp.</i> 190-1 และ <i>Streptomyces sp.</i> 42-9.....	40
5	แสดงความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะอิริโทร์มัยซิน ของ <i>Streptomyces sp.</i> 42-9/pIJ4027.....	41
6	แสดงผลการรีคอมบินेशันของเชื้อมาตรฐาน <i>S.coelicolor M124</i> และ <i>S.coelicolor M130</i>	43
7	แสดงผลการรีคอมบินेशันของเชื้อ <i>Streptomyces sp.</i> 190-1 และ <i>Streptomyces sp.</i> 42-9	46
8	แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไฮโดรАЗของลูกพลม เปรียบเทียบกับ <i>Streptomyces sp.</i> 190-1 และ <i>Streptomyces sp.</i> 42-9.....	51
9	แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไฮเดรนเนลของลูกพลมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการรำข้าวเป็นองค์ประกอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮเดรนเนลเป็นองค์ประกอบ.....	55
10	สรุปการสร้างเอนไซม์กลูโคสไฮโดรАЗและไฮเดรนเนลของลูกพลม	57

สารบัญภาพ

รูปที่ ๗	หน้า
1 แสดงลักษณะการกระจายของไมซีเลียมของ <i>Streptomyces</i> <i>sp. 42-9</i> เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่างๆ กัน.....	27
2 แสดงผลของไกลชีนต่อประสิทธิภาพการเกิดโปรตอลส์ทของ <i>Streptomyces sp. 190-1</i>	30
3 แสดงผลของไกลชีนต่อประสิทธิภาพการเกิดโปรตอลส์ทของ <i>Streptomyces sp. 42-9</i>	31
4 แสดงโปรตอลส์ทของเชื้อ <i>Streptomyces sp. 190-1</i>	34
5 แสดงความสามารถในการรีเจนเนอเรชันของ <i>Streptomyces</i> <i>sp. 190-1</i> และ <i>Streptomyces sp. 42-9</i> ที่แรงดันออกโนมิติก ต่างกัน.....	35
6 แสดงผลของอายุเชื้อต่อการเกิดโปรตอลส์ทและการรีเจนเนอเรชัน ของ <i>Streptomyces sp. 190-1</i>	37
7 แสดงผลของอายุเชื้อต่อการเกิดโปรตอลส์ทและการรีเจนเนอเรชัน ของ <i>Streptomyces sp. 42-9</i>	38
8 แสดง master plate ของลูกผสมที่ได้จากการเชื้อมโปรตอลส์ท ระหว่าง <i>Streptomyces sp. 190-1</i> และ <i>Streptomyces sp.</i> <i>42-9</i> บนอาหารวุ้น MS.....	48
9 แสดงลักษณะทางลักษณ์วิทยา (morphology) ของเชื้อลูกผสมที่ แตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่.....	49
10 แสดงบริเวณใสรอนโคโลนี (clear zone) ของลูกผสมที่คัดเลือกได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ xylan complex medium.....	54

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม

นน. = น้ำหนัก

ชม. = ชั่วโมง

° ซ. = องศาเซลเซียส