ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาการผลิตซอร์บิทอลในปฏิกรณ์เอนไซม์

ชื่อผู้เขียน น.ส.บุณยรัศมิ์ สุขเชียว

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ.ดร.สุรีย์	ฟูตระกูล	**ประธานกรรมการ**
ผศ.ดร.ภาวิณี	คณาสวัสดิ์	**กรรมการ**
อ.ดร.บัณฑิต	ลีละศาสตร์	**กรรมการ**

บทคัดย่อ

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตซอร์บิทอลพบว่าใช้เซลล์ 10 % โดยปริมาตรของแบคทีเรีย Zymomonas mobilis สายพันธุ์ IFO 13756 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 250 กรัม/ลิตร Yeast extract และ Peptone อย่างละ 10 กรัม/ลิตร Potassium dihydrogen phosphate และ Magnesium sulphate อย่างละ 2 กรัม/ลิตร Ammonium sulfate 1 กรัม/ลิตร pH 7.5 ที่ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณซอร์บิทอลที่ผลิตได้เฉลี่ยประมาณ 25 กรัม/ลิตร และมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นถ้าได้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของปริมาณออกซิเจนต่อการผลิตซอร์บิทอล ซึ่งจากสภาวะที่เหมาะสมนี้ได้เลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อสกัดเอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจิเนส และศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ พบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.0 และ 25 °ซ ตามลำดับ ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อมีฟรุคโตส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นสับสเตรท พบว่าค่า K_m = 0.008 M และ V_{max} = 0.045 μmole/min เมื่อนำเอนไซม์นี้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดย DEAE-Sephadex A-50 column พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 2.96 เท่า และมี yield 11.14 % pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.5 และ 25 °ซ ตามลำดับ ค่า K_m = 0.007 M V_{max} = 0.004 μmole/min ส่วนเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย Blue-Sepharose Cl-4B column พบว่าสามารถทำเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 7.22 เท่า และมี yield 23.39 % pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 7.0 และ 25 °ซ ตามลำดับ ค่า K_m = 0.004 M V_{max} = 0.006 μmole/min เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนโดยการแยกด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอริซิส พบว่าเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์มีโปรตีนประมาณ 6 แถบ เอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์จากวิธีที่ 1 มี 2 แถบ และจากวิธีที่ 2 มี 2 แถบ แต่อีกแถบหนึ่งจางมาก และมีเพียงแถบเดียวเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ซอร์บิ-ทอลดีไฮโดรจิเนส ดังนั้นการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยผ่าน Blue-Sepharose Cl-4B column นั้นได้เอนไซม์ซอร์บิทอลดีไฮโดรจิเนสที่บริสุทธิ์มากกว่า และยังใช้เวลาในการทำให้บริสุทธิ์น้อยกว่าด้วย สำหรับการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์นั้นพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าการสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง (≃ 28 °ซ) คิดเป็น 73.07, 99.08 และ 99.88 %, ที่อุณหภูมิ 4 °ซ คิดเป็น 28.07, 42.39 และ 52.61 % และที่อุณหภูมิ -21 °ซ คิดเป็น 7.10, 16.49 และ 39.06 % ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ได้นี้ยังมีปริมาณและความเสถียรไม่มากพอที่จะนำไปศึกษาการตรึงร่วมกับโคเอนไซม์ β-NADH เพื่อการผลิตซอร์บิทอลในปฏิกรณ์เอนไซม์ จึงได้ศึกษาการตรึงเซล Z. mobilis สายพันธุ์ IFO 13756 โดยใช้ 4 % โซเดียมอัลจิเนต และศึกษาการผลิตซอร์บิทอลจากเซลตรึงนี้ในระบบถังหมัก และระบบต่อเนื่องที่ผ่านสับสเตรทที่เป็นซูโครสในอัตราเร็ว 10 มล./นาที พบว่าปริมาณของซอร์บิทอลที่เกิดขึ้นจากทั้ง 2 ระบบมีค่าใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 11 กรัม/ลิตร ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณซอร์บิทอลจากระบบต่อเนื่องยังคงมีความเป็นไปได้ที่จะมีปริมาณสูงขึ้น ถ้ามีการศึกษาสภาวะของการตริงเซลและวิธีการมากขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ก็เป็นเพียงการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ อันอาจจะมีแนวโน้มในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้ หากได้มีการศึกษาปรับปรุงให้เหมาะสมกว่านี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Study of Sorbitol Production in Enzyme Reactor

Author Ms.Boonyaras Sookkheo

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc.Prof.Dr.Suree	Phutrakul	**Chairman**
Assist.Prof.Dr.Pawinee	Kanasawut	**Member**
Lecturer Dr.Bundit	Leelasart	**Member**

Abstract

Inoculation 10 % (V/V) of the bacteria Zymomonas mobilis strains IFO 13756 in broth medium containing 250 g/l sucrose 10 g/l yeast extract 10 g/l peptone 2 g/l potassium dihydrogen phosphate 2 g/l magnesium sulphate and 1 g/l ammonium sulfate pH 7.5 at 30°C 48 hours are the optimum conditions for high sorbitol production (≃ 25 g/l). More details about the other factors such as the effect of oxygen in culture medium are needed for higher production of sorbitol. The cells cultured in these conditions were cultured harvested and extracted for the enzyme sorbitol dehydrogenase. The optimum pH and temperature for the activity of the enzyme in the crude extract was 6.0 and 25°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

respectively. The K_m value for fructose as substrate was 0.008 M and V_{max} was 0.045 µmol/min. Partial purified enzyme by DEAE-Sephadex A-50 column was showed the same optimum temperature but its optimum pH was 6.5. The enzyme was purified by 2.96 folds with 11.14 % yield. The K_m value was 0.007 M and V_{max} was 0.004 µmole/min. Purification of the enzyme by Blue-Sepharose Cl-4B column resulted in 7.22 fold of purification with 23.39 % yield. The optimum pH and temperature were 7.0 and 25°C respectively. The K_m value was 0.004 M and V_{max} was 0.006 µmole/min. Comparison of the crude extract and partial purified enzyme by both columns on polyacrylamide gel electrophoresis pattern showed the same position of only one activity band from 6, 2 and 2 bands in the crude, the DEAE-Sephadex A-50 purified and the Blue-Sepharose Cl-4B purified enzyme respectively. It can be concluded from the results that partial purification of the enzyme by Blue-Sepharose Cl-4B was quicker and gave a better results. Stability study of the enzyme at different temperatures found that the percent activity lost at room temperature (≃ 28°C) were 73.07, 99.08 and 99.88 %, at 4°C were 28.07, 42.39 and 52.61 % and at -21°C were 7.10, 16.49 and 39.06 % when the enzyme was kept for 24, 48 and 72 hours respectively. It can be suggested from the results of these experiments that the amount of enzyme sorbitol dehydrogenase and its stability were not suitable enough for

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

studying the enzyme immobilization along with its coenzyme β-NADH in order to produce sorbitol in an enzyme reactor. Therefore, the bacteria Z. mobilis strains IFO 13756 was immobilized with 4 % sodium alginate for studing the sorbitol production in batch fermentation and continuous fermentation using sucrose as substrate with the flow rate of 10 ml/min. The amount of sorbitol produced from both fermentations is about 11 g/l. Higher production of sorbitol by the immobilized cells in a continuous fermentation may be possible to obtain more details about the optimum conditions and/or the suitable method of cell immobilization. However, the results obtained from these experiments are only in laboratory scale which needs more basic studies for further industrial application.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved