

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย Zymomonas mobilis IFO 13756
 เพื่อการผลิตซอร์บิทอล

ชื่อผู้เขียน นายชาติชาย โชนงนุช

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อภิญญา	ผลิโกมล	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. พูนศุข	ศรีโยธธา	กรรมการ
อาจารย์ ดร. อุราภรณ์	สอาดสุด	กรรมการ

บทคัดย่อ

การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย Zymomonas mobilis IFO 13756 เพื่อการผลิตซอร์บิทอล โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ปริมาณ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 20 นาที ที่ 30 °C ทำการคัดเลือกเซลล์กลายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลฟรุคโตสโดยวิธี "Replica plating" จากการนำเซลล์กลายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลฟรุคโตสจำนวน 120 โคโลนี มาทดสอบการผลิตซอร์บิทอลจากน้ำตาลซูโครส 25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ได้ Z. mobilis CS-92 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตซอร์บิทอล และสะสมในน้ำเลี้ยงในปริมาณสูงสุด เมื่อทดสอบเอนไซม์ฟรุคโตโคโคเนสและศึกษาชนิดของโปรตีน

จากสารสกัดของเซลล์จาก Z. mobilis CS-92 โดย anionexchange chromatography พบว่า Z. mobilis CS-92 สามารถสร้างโปรตีนฟรุคโตโคโคเนส แต่โปรตีนนั้นไม่สามารถทำหน้าที่ของเอนไซม์ฟรุคโคโคเนสได้

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตซอร์บิทอลจากน้ำตาลซูโครสของ Z. mobilis CS-92 ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) yeast extract 1% และ $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, bactopectone และ KH_2PO_4 อย่างละ 0.2% พบว่าที่อุณหภูมิ 30 °C, pH เริ่มต้น 6.0-7.0 และระยะเวลาในการเลี้ยง 48 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ทำให้ Z. mobilis CS-92 สามารถผลิตซอร์บิทอลได้สูงที่สุดในปริมาณ 45.11 กรัม/ลิตร ในขณะที่สายพันธุ์เดิมคือ Z. mobilis สามารถผลิตได้ 38.02 กรัม/ลิตร ที่สภาวะเดียวกัน

ผลของการเติม $FeSO_4$ และ Na_2SO_4 ด้วยความเข้มข้น 10-50 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้การผลิตซอร์บิทอลในน้ำเลี้ยงลดลงเล็กน้อย แต่การเติมเกลือ NaCl จะมีผลทำให้การผลิตซอร์บิทอลลดลงโดยปริมาณที่ลดลงแปรตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของ NaCl ทำให้เซลล์สามารถผลิตซอร์บิทอลและสะสมในน้ำเลี้ยงน้อยมาก สาเหตุเพราะ Cu^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้นดังกล่าวยับยั้งการเจริญของเซลล์.

Thesis Title Strains Improvement of Zymomonas mobilis IFO 13756
for Sorbitol Production

Author Mr. Chartchai Khanongnuch

M.S. Biology

Examining Committee :

Assist. Prof. Abhinya	Plikomol	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Poonsook	Sriyotha	Member
Lecturer. Dr. Urapron	Sardsud	Member

Abstract

Strains improvement of Zymomonas mobilis IFO 13756 for sorbitol production was carried out by induced mutation using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 2,000 µg/ml for 20 min. at 30 °C. One hundred and twenty fructose negative mutants (Fru⁻) were isolated by ampicillin and penicillin G enrichment and replica plating method. These were screened for sorbitol production using 25% sucrose as a carbon source. The Z. mobilis CS-92 which produced and accumulated the

highest amounts of sorbitol was selected. Cell extract of Z. mobilis CS-92 was studied for fructokinase activity and separated by anionexchange chromatography. It was found that Z. mobilis CS-92 could produce fructokinase protein, but that protein had lost its functional properties.

Optimal conditions for sorbitol production of Z. mobilis CS-92 were studied. The CS-92 strains produced and accumulated maximum amounts of sorbitol 45.11 g/l in a medium containing 25% sucrose, 1% yeast extract and 0.2% of each of $MgSO_4$, $(NH_4)SO_4$, KH_2PO_4 and bactopectone, at initial pH 6.0-7.0, at 30 °C, after incubation for 48 hours.

The addition of $FeSO_4$ and Na_2SO_4 at concentrations of 10-50 mM slightly decreased sorbitol formation, but NaCl addition clearly reduced sorbitol formation and the degree of reduction increased with increasing NaCl concentration. $CuSO_4$ and $ZnSO_4$, even at the lowest concentration of 10 mM, could reduce sorbitol formation completely, due to inhibition of cell growth.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved