

โครงการวิจัยเรื่อง

การผลิตซอร์บิทอลและเอทานอลโดยเอนไซม์ตรึงจากเซลล์ไร้ชีวิตของ
Zymomonas mobilis

ผู้เขียนรายงาน

รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวิณี คณาสวัสดิ์

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเซลล์ *Zymomonas mobilis* IFO 13756 ในอาหารที่ประกอบไปด้วยซูโครส 250 กรัม/ลิตร ล้างสกัดจากยีสต์และเปปไทน์อย่างละ 10 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต และโปตัสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอย่างละ 2 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร พีเอช 7.5 ที่ 30°C โดยไม่เขย่า เป็นเวลา 39 ชั่วโมง ทำให้ได้เซลล์เปียก 4 กรัม/ลิตร หรือเซลล์แห้ง 0.80 กรัม/ลิตร และในน้ำเลี้ยงพบว่ามีผลผลิตกลูโคส ฟรุคโทส ซอร์บิทอล กรดกลูโคนิก และเอทานอลในปริมาณ 9.22, 24.56, 30.94, 8.70 และ 79.32 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

การบำบัดเซลล์ที่มีชีวิตด้วย 1% โทลูอินในซีเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ได้เซลล์ไร้ชีวิตซึ่งมีแอกติวิตีของกลูโคส-ฟรุคโทสออกซิโดรีดักเทสและกลูโคโนแลคโทเนส เมื่อตรวจสอบด้วยสารผสมกลูโคสและฟรุคโทส (1 : 1 โดยน้ำหนัก) ได้ซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิก เป็นสารผลิตภัณฑ์ แต่ไม่มีการผลิตเอทานอลจากเซลล์ไร้ชีวิตในน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส และกลูโคสผสมฟรุคโทส

คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของกลูโคส-ฟรุคโทสออกซิโดรีดักเทสและกลูโคโนแลค - โทเนสที่ถูกตรึงในเซลล์ไร้ชีวิต มีประสิทธิภาพสูงสุดที่พีเอชเดียวกันคือ 6.0 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานที่ 25 และ 30°C ตามลำดับ ในปฏิกรแบบแบทช์ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญที่เกิดจาก ซูโครสหรือกลูโคสผสมฟรุคโทสคือซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิก กลูโคสหรือฟรุคโทสเพียงอย่างเดียว เป็นสับสเตรทที่ให้ผลผลิตซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิก ได้ต่ำกว่ากรณีที่มีสับสเตรทเป็นซูโครสหรือสารผสมของสารทั้งสอง การศึกษาการผลิตซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิกในปฏิกรแบบแบทช์โดยเซลล์ไร้ชีวิต ด้วยสารละลายของซูโครส 9-112.5 กรัม/ลิตร พบผลผลิตสูงสุดที่ 0.32 และ 0.49 กรัม/ลิตร/กรัม เซลล์ไร้ชีวิต ตามลำดับ ค่า K_m และ V_{max} ของกลูโคส-ฟรุคโทสออกซิโดรีดักเทส เท่ากับ 0.015 โมลาร์ของฟรุคโทส และ 6.67 ไมโครโมล ฟรุคโทส/นาที ตามลำดับ

เครื่องปฏิกรเส้นใยเยื่อเซลล์กลวงปริมาตร 220 ซม³ ซึ่งตรึงเซลล์ไร้ชีวิต 20-กรัม สามารถผลิตซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิกได้สูงสุดที่ 1.45 และ 6.71 กรัม/ลิตร ในเวลา 36 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายผสมของกลูโคสกับฟรุคโทสที่มีความเข้มข้นในน้ำ 10 กรัม/ลิตร (1:1โดยน้ำหนัก) ผ่าน เครื่องปฏิกรด้วยอัตราเร็ว 120 ซม³/นาที ผลผลิตของสารผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีปริมาณต่ำลงเมื่อใช้ สับสเตรทเข้มข้นมากกว่า 10 กรัม/ลิตร สับสเตรทซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส หรือซูโครส เพียง

ชนิดเดียว ไม่สามารถผลิตซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิกได้ ในกรณีที่มีซูโครสเป็นสับสเตรทพบแอคติวิตีของอินเวอร์เทส ซึ่งทำให้ได้กลูโคสและฟรุคโทสเป็นสารผลิตภัณฑ์ในปริมาณผลผลิตมากกว่า 50% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง การเปลี่ยนอัตราเร็วของสารละลายกลูโคสผสมฟรุคโทสให้ลดลงจาก 120 ให้เท่ากับ 90 และ 60 ซม³/นาทึ ทำให้ผลผลิตของซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิกเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ เมื่อมีสารละลายกลูโคสผสมฟรุคโทสเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ใน 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ผ่านเครื่องปฏิกรณ์เซลล์ตรึงด้วยอัตราเร็ว 120, 90 และ 60 ซม³/นาทึ จะได้ผลผลิตซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิกสูงสุดเมื่ออัตราเร็วของสับสเตรทเท่ากับ 60 ซม³/นาทึ และที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.82 และ 3.60 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลของซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสับสเตรท ทำให้ผลผลิตซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิกลดต่ำกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ผลการวิจัยโดยสรุปพบว่าเซลล์ *Z. mobilis* สามารถผลิตเอทานอลได้ในขณะที่มีการเจริญเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลทราย 250 กรัม/ลิตร โดยผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 115.71 กรัม/ลิตร การตรึงเอนไซม์ของเซลล์ไว้ในเซลล์ไร้ชีวิตของมันเอง สามารถผลิตซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิกได้ดีที่สุดเมื่อมีสับสเตรทที่ประกอบด้วยสารผสมกลูโคสกับฟรุคโทสในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และสามารถผลิตกลูโคสและฟรุคโทสได้เมื่อมีซูโครสเป็นสับสเตรท การตรึงเซลล์ไร้ชีวิตไว้ในปฏิกรณ์เส้นใยเยื่อเซลล์กลวงต้องการเซลล์ปริมาณมาก ดังนั้นในการศึกษาจะต้องมีเครื่องเซนติฟิวจ์ที่มีความจุสูงมาก ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของการวิจัยครั้งนี้ การศึกษาการผลิตซอร์บิทอลด้วยเซลล์ไร้ชีวิตตรึงในปฏิกรณ์เส้นใยเยื่อเซลล์กลวงให้ผลในระดับหนึ่งซึ่งจะต้องทำการวิจัยต่อไป สำหรับการประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรม

Project Title PRODUCTION OF SORBITOL AND ETHANOL BY IMMOBILIZED ENZYMES FROM NON VIABLE CELLS OF *ZYMONONAS MOBILIS*

Author Associated Professor Dr. Pawinee Kanasawud

ABSTRACT

Zymomonas mobilis IFO 13756 produced cell mass of 4 g wet weight and 0.80 g dry weight on cultivation in one litre medium at pH 7.5 containing 250 g sucrose, 10 g each of yeast extract and peptone, 2 g each of magnesium sulfate and potassium dihydrogen phosphate and 1 g ammonium sulfate at 30°C without shaking. The cultivation broth contained 9.22, 24.56, 30.94, 8.70 and 79.32 g/l of glucose, fructose, sorbitol, gluconic acid and ethanol respectively.

Treatment of wet cells with 1% toluene in citrate buffer pH 6.8 for 10 min performed non viable cells containing the activity of glucose-fructose oxidoreductase and gluconolactonase. Non viable cell produced sorbitol and gluconic acid from the mixture of glucose and fructose (1:1 w/w). No ethanol is produced from non viable cells in sugar such as glucose, fructose, sucrose and mixture of glucose and fructose.

The activity of the immobilized glucose-fructose oxidoreductase and gluconolactonase in non viable cells were maximum at the same pH 6.0 whereas the optimum temperature were at 25°C and 30°C respectively. In batch reactor, the production of sorbitol and gluconic acid were the principle products from sucrose or mixture of glucose and fructose. Single substrate such as glucose and fructose could produce sorbitol and gluconic acid less than the mixture of glucose and fructose or sucrose. The study of sorbitol and gluconic acid production in batch reactor by non viable cells in the solution of 9–112.5 g/l sucrose indicated the maximum production at 0.32 and 0.49 g/l/g of non viable cells respectively. K_m and V_{max} of glucose-fructose oxidoreductase were 0.015 M fructose and 6.67 μmol fructose/min respectively.

A hollow fibre membrane reactor with the volume of 220 cm^3 loading with 20 grams of non viable cells could produce the maximum yield of sorbitol and gluconic acid at 1.45 and 6.71 g/l in 36 hours by passing the mixture of glucose and fructose 10 g/l of water (1:1 w/w) at flow rate of 120 cm^3/min . The production yield of

sorbitol and gluconic acid were decrease for the higher concentration than 10 g/lof substrate. No production of sorbitol and gluconic acid by usingsingle substrate such as glucose, fructose and sucrose. Invertaseactivity was found by using sucrose as substrate and more than 50 % yield of glucose and fructose were produced in 24 hours. The changement of substrate's flow rate from 120 to 90 and 60 cm³/min induced respectively the increment yield for the production of sorbitol and gluconic acid. After 10 g/l of the mixture of glucose and fructose in 0.1 M citrate buffer pH 6.0 were passed through the immobilized cells reactor at flow rate of 120, 90 and 60 cm³/min, the highest yield of sorbitol and gluconic acid were obtained at 1.82 and 3.60 g/l respectively by using the flow rate substrate at 60 cm³/min for 36 hours. The yield of sorbitol and gluconic acid from the mixture of glucose and fructose were lower in water medium than in citrate buffer pH 6.0 medium.

The conclusion of the results indicate that *Z. mobilis* could produce ethanol during the growth. The maximum yield of ethanol was 79.32 g/l. The immobilized of enzymes fixing in non viable cell itself performed the maximum yield of sorbitol and gluconic acid by using the mixture of glucose and fructose (1:1 w/w) as substrates, whereas glucose and fructose were obtained from sucrose. The immobilization of non viable cells in a hollow fibre membrane reactor needs high quantity of cells, therefore the study should have a high capacity ofcentrifuge which was the major problem of this research. The study of the production of sorbitol by immobilization of non viable cells in a hollow fibre membrane reactor provide a certain level of results. The further work will be needed for the application in industry level.