# บทที่ 3

## ผลการวิจัย

1. ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อ Streptomyces sp. ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

จากตัวอย่างดินที่เก็บมาสามารถแยกเชื้อ Streptomyces sp. ได้ 72 สายพันธุ์ ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 40 สายพันธุ์ และจากอาจารย์ สาวิตรี บุญส่ง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์อีก 20 สายพันธุ์ รวมทั้งหมดเป็น 132 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ พบว่ามีอยู่ 94 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ คิดเป็นเปอร์เซนต์ประมาณ 71 % ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Joseph และคณะ (31) แยกได้ โดยเขาแยกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ 95 เชื้อจากทั้งหมด 134 เชื้อคิดเป็นเปอร์เซนต์ประมาณ 70 % ในบรรดาเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้นี้ บางสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ได้น้อย บางสายพันธุ์สร้างได้มาก แต่ที่มีแอคติวิตีค่อนข้างสูงพบว่ามีอยู่ 13 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 5 จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 พบว่าสายพันธุ์ 190-1 มีแอคติวิตีสูงสุด จึงกำหนดให้มีแอคติวิตีสัมพัทธ์ (relative activity) เป็น 100 % ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ มีแอคติวิตีสัมพัทธ์ต่ำกว่าของสายพันธุ์ 190-1 ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ 190-1 มาศึกษาเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* sp.

| เชื้อสเตรพโตไมซีส | เอนไซม์แอคติวิตี (หน่วย/กรัม น.น. เซลชื้น) | เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีสัมพัทธ์ | สถานที่เก็บตัวอย่างดิน |
|---|---|---|---|
| 190-1 | 4.6 | 100.0 | ดินสวนยาง อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.ดร.นลิน นิลอุบล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) |
| 111-1 | 3.4 | 73.9 | ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ. ดร.นลิน นิลอุบล |
| 83-1 | 3.4 | 73.9 | " " " |
| 1-16 | 4.1 | 89.1 | แกลบปนดิน อ.บางบัวทอง จ.สุพรรณบุรี |
| 1-17 | 3.9 | 84.8 | " " " |
| 11-3 | 3.8 | 82.6 | แกลบปนดิน จ.อยุธยา |
| 11-4 | 3.6 | 78.3 | " " " |
| 11-6 | 4.0 | 87.0 | " " " |
| 11-7 | 3.7 | 80.4 | " " " |
| 12-1 | 4.1 | 89.1 | ดินนาข้าว จ.อยุธยา |
| 17-1 | 3.9 | 84.8 | ฟางข้าวผุ ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน |
| 11201 | 3.7 | 80.4 | ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก อ.สาวิตรี บุญส่ง ม.เกษตร-ศาสตร์ บางเขน |
| 11908 | 3.6 | 78.3 | " " " |

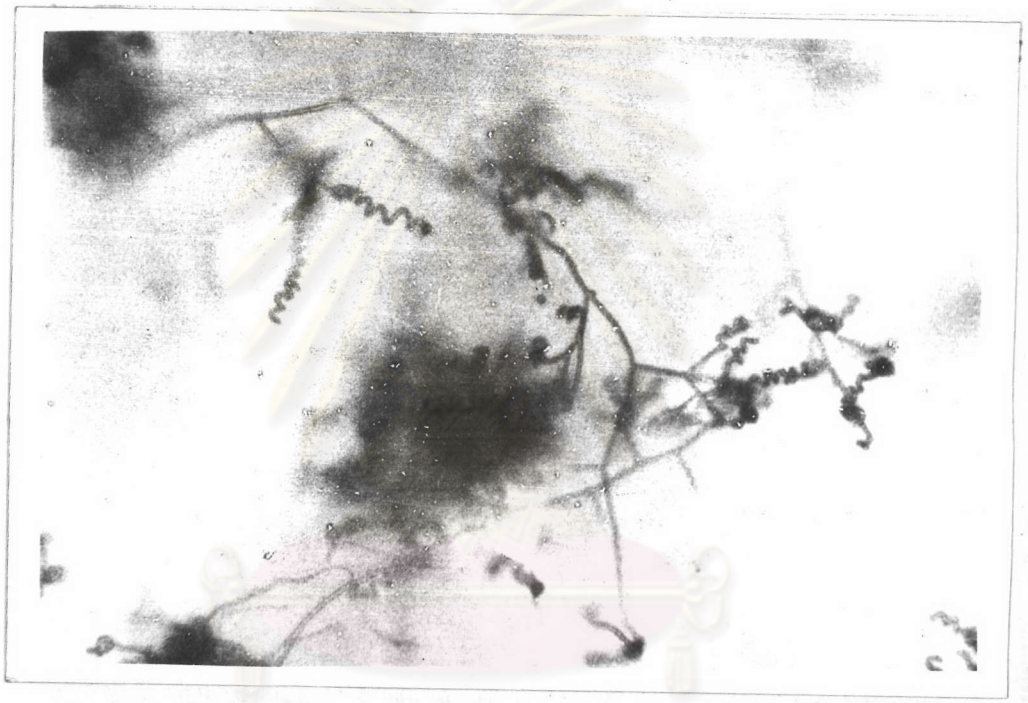
2. ผลการจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

จากการศึกษาคุณสมบัติของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 พบว่าสายใยอากาศ (aerial mycelium) มีลักษณะแตกแขนง ตรงปลายจะขดเป็นเกลียว ดังในรูปที่ 1 ที่ปลายของสายใยอากาศที่เจริญเต็มที่จะมีสปอร์สีเทา ด้านหลังของโคโลนีมีสีน้ำตาลอมเหลือง (yellow-brown) ซึ่งจากการศึกษาลักษณะของสายสปอร์โดยใช้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน พบว่า สายสปอร์ยาวมีจำนวนสปอร์มากกว่า 10 สปอร์ต่อสาย ดังในรูปที่ 2 และจากการดูผิวสปอร์ พบว่า ผิวสปอร์มีลักษณะเป็นหนาม (spiny) ดังในรูปที่ 3 ลักษณะเหล่านี้พบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ ยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์, โอทมิลล์ อการ์, อินออร์แกนนิก ซอลท์-สตาร์ช อการ์ และกลีเซอรอล-แอสพาราจีน อการ์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

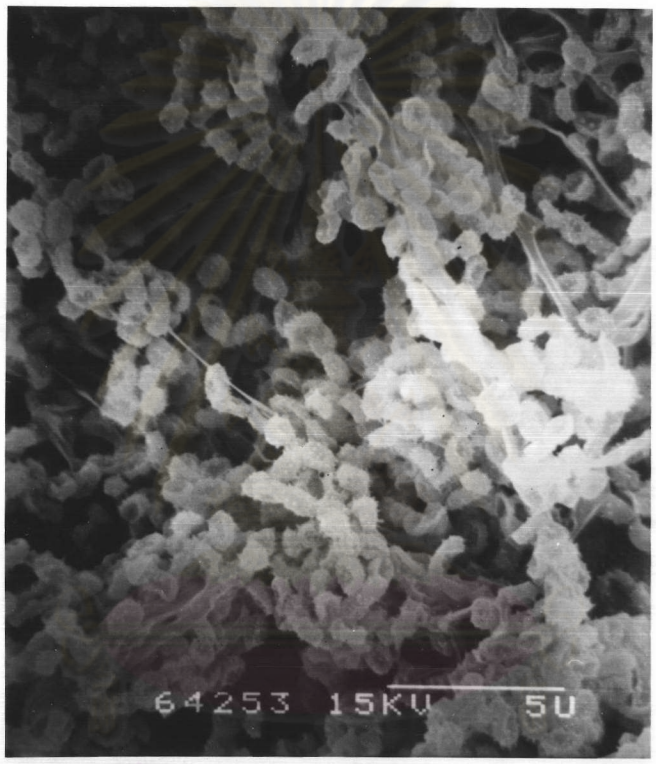
เชื้อนี้สร้างเมลานอยด์พิกเมนต์ในอาหารชนิดเปปโตน-ยีสต์ เอกซแทรก ไอร์ออน อการ์, ไทโรซีน อการ์ และทริปโตน-ยีสต์ บรอท สามารถใช้น้ำตาลดี-กลูโคส, ดี-ฟรุคโตส, ดี-แมนนิทอล, กาแลคโตส, ไอ-อินโนซิทอล, ดี-ไซโลส, แอล-อราบิโนส, แรมโนส และแรฟฟิโนสในการเจริญเติบโตได้ดี ส่วนซัลลิซินนั้นใช้ได้น้อยมาก ลักษณะการเจริญและสรีรวิทยาของเชื้อดังกล่าว ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

จากผลการศึกษาลักษณะของเชื้อดังกล่าว พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 มีลักษณะใกล้เคียงกับ S. arenae ตามคำบรรยายของ Shirling และ Gottlieb (70)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



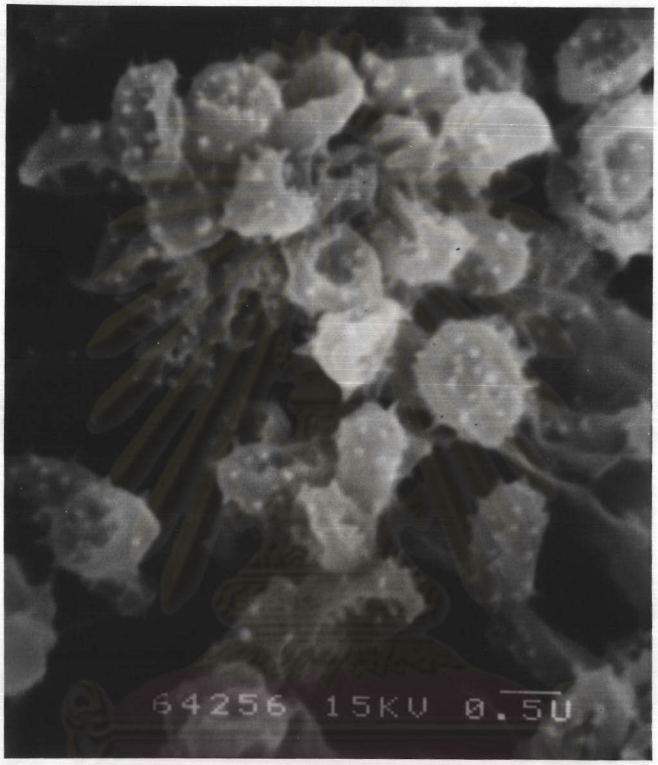
รูปที่ 1 สายใยอากาศของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์ นาน 14 วัน (กำลังขยาย 400 เท่า)




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2. สายสปอร์ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ถ่ายจากเชื้ออายุ 14 วัน ซึ่งเจริญบนยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์ โดยใช้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบสแกนนิง

I15911687X




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3. ผิวสปอร์แบบมีหนาม (Spiny) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ถ่ายจากเชื้ออายุ 14 วัน ซึ่งเจริญบนอาหารยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์ โดยใช้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบสแกนนิง

ตารางที่ 6. ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

| ลักษณะ | รายละเอียด |
|---|---|
| 1. แบบของสายใยอากาศและสายสปอร์ | สไปราเลส (Spirales) |
| 2. สัณฐานวิทยาของสปอร์และผิวสปอร์ | ทรงรี, ผิวเป็นหนาม (spiny) |
| 3. สีของสายใยอากาศ (aerial mycelium) | เทาอมน้ำตาล |
| 4. สีของสปอร์ | เทา |
| 5. สีของสายใยซับสเตรท (Substrate mycelium) | น้ำตาลอมเหลือง (Yellowish-brown) |
| * ปฏิกิริยาของสีของสายใยซับสเตรทต่อการเปลี่ยนระดับความเป็นกรดด่าง | |
| กรด | ไม่เปลี่ยนแปลง |
| ด่าง | ไม่เปลี่ยนแปลง |

หมายเหตุ * ใช้ 0.05 N HCl และ 0.05 N HaOH หยดลงบนสายใยซับสเตรท แล้วดูความเปลี่ยนแปลงของสีทันที และหลังจาก 10 และ 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ลักษณะการเจริญ (Cultural characteristics)ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

| ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ | ลักษณะการเจริญ | การสร้างเมลานอยด์ พิกเมนต์ |
|---|---|---|
| โอทมิลล์ อการ์ | ดี | + |
| กลีเซอรอล-แอสพาราจีน อการ์ | ปานกลาง | + |
| ยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์ | ดี | + |
| อินออร์แกนนิกซอลท์ สตาร์ช อการ์ | ดี | - |
| สตาร์ช อการ์ | ดี | SP |
| ซาเพค อการ์ | น้อยมาก | - |
| ไทโรซีน อการ์ | ดี | + |
| เปปโตส ยีสต์ เอกซแทรก ไอร์ออน อการ์ | ดี | + |

หมายเหตุ + : สร้างเมลานอยด์ พิกเมนต์

- : ไม่สร้างเมลานอยด์ พิกเมนต์

SP : สร้างพิกเมนต์ที่ละลายน้ำ (soluble pigment)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8. ลักษณะสรีรวิทยา (Physiological characteristics) ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1

| ลักษณะที่ศึกษา | ลักษณะสรีรวิทยา |
|---|---|
| 1. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ | 28-30 องศาเซลเซียส |
| 2. ระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเจริญ | pH 7-8 |
| 3. การสร้างเมลานอยด์พิกเมนต์ | สร้างในอาหารชนิดยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์, โอทมิลล์ อการ์, อินออร์แกนนิก ซอลท์-สตาร์ช อการ์, กลีเซอรอล-แอสพาราจีน อการ์, ไทโรซีน อการ์, เปปโตน-ยีสต์ เอกซแทรก ไอร์ออน อการ์ และทริปโตน-ยีสต์ บรอท |
| 4. การสร้างสีละลายน้ำ (soluble pigment) | สร้างสีเหลืองอ่อนในอาหารชนิด สตาร์ช อการ์ และซอลท์ โทเรอแรนซ์ อการ์ |
| 5. การเจริญบนซาเพค อการ์ | น้อยมาก |
| 6. การทนเกลือ (NaCl Tolerance) | มากกว่า 7 % แต่น้อยกว่า 10 % |
| 7. การใช้สารแหล่งคาร์บอน | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ดี-กลูโคส | + | กาแลคโตส | + | แรมโนส | + |
| ดี-แมนนิทอล | + | ซูโครส | + | แรฟฟิโนส | + |
| ดี-ฟรุคโตส | + | แอล-อราบิโนส | + | ซัลลิซิน | ± |
| ดี-ไซโลส | + | ไอ-อินโนซิทอล | + | | |

หมายเหตุ + : เจริญได้ดีเมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่ได้ใส่สารแหล่งคาร์บอน

± : เจริญได้เล็กน้อยเมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่ได้ใส่สารแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

จากการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีดำเนินการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 16,18,21,24,27 และ 41 ชม. พบว่าเชื้อจะสร้างเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีสูงสุดภายในเวลา 24 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเก็บเซลที่เวลา 24 ชม.

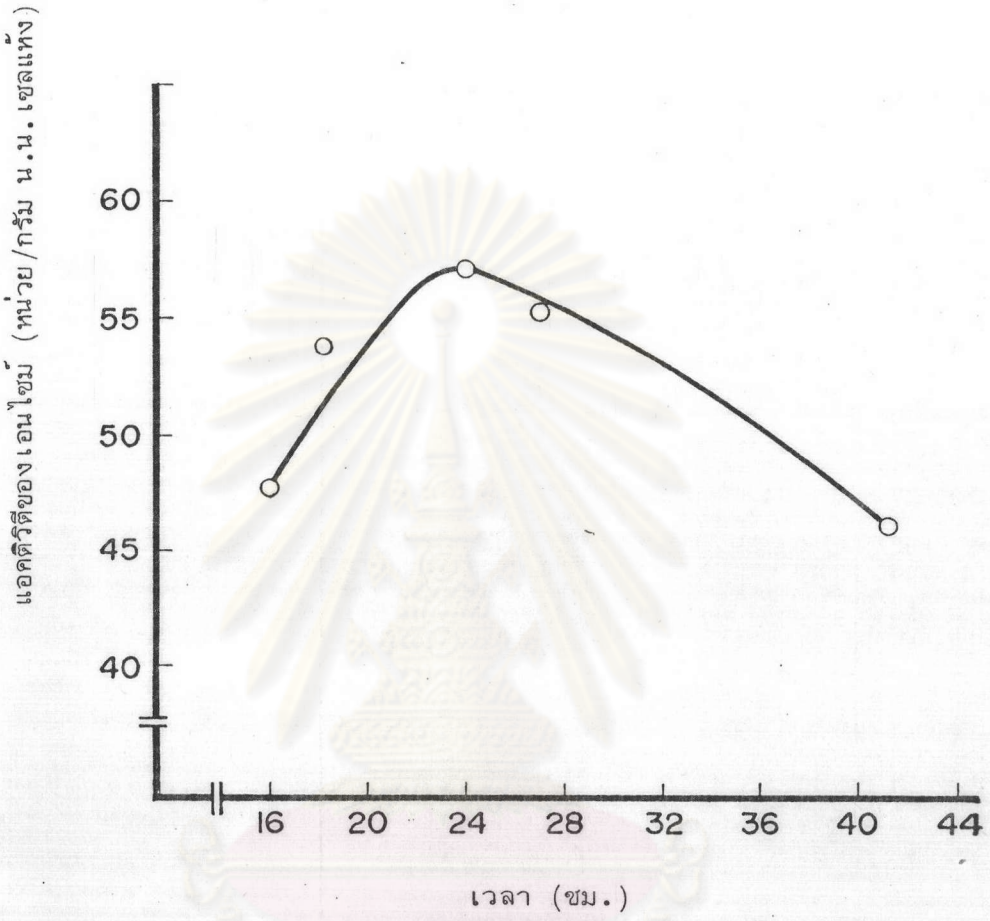
4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อน

จากการนำเซลของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 มาตรึงเอนไซม์ด้วยความร้อนตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5 โดยบ่มเซลที่อุณหภูมิ 60,70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 5.

5. การศึกษาชนิดของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

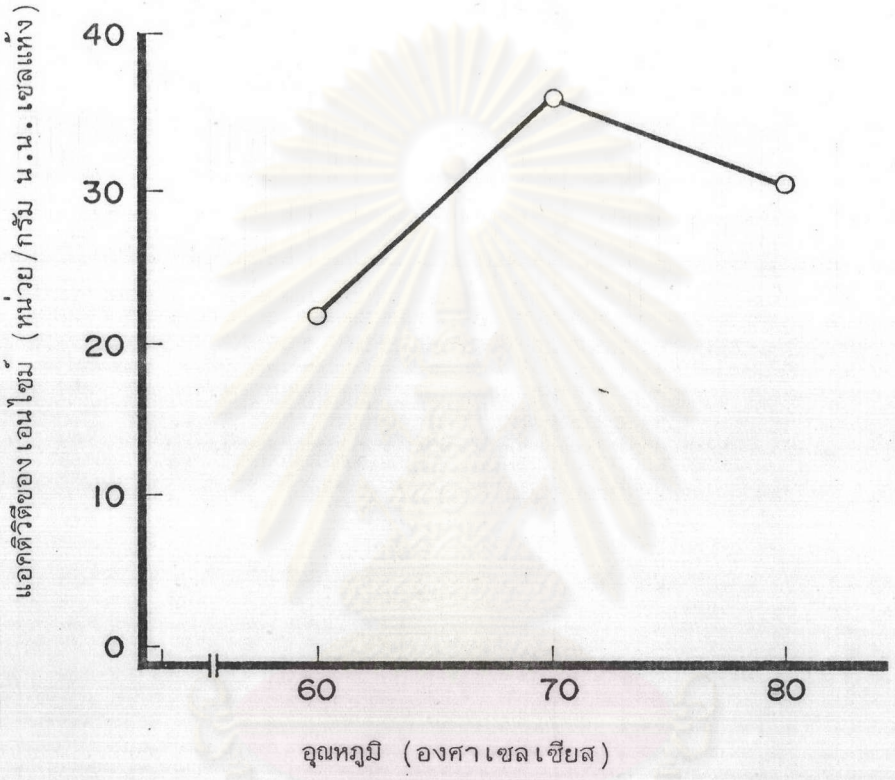
จากการเตรียมหัวเชื้อของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 10 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อชนิดต่าง ๆ ผลการทดลองในตารางที่ 9 จะเห็นว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ในอาหารหัวเชื้อแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันมาก เพื่อเป็นการประหยัดไซโลส จึงเลือกใช้อาหารหัวเชื้อที่ประกอบด้วย 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว, 0.5 % ไซโลส, 1 % เปปโตน, 0.5 % ยีสต์ เอกซแทรก, 0.1 % $MgSO_4.7H_2O$ (pH 7.0) ในการทดลองต่อ ๆ ไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 4. แสดงระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด ตรวจสอบเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 8.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 5. แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซล ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อชนิดต่าง ๆ

| ชนิดของอาหารหัวเชื้อ | ปริมาณเซล/80 มล. บรอท (กรัม น.น. เซลแห้ง) | แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/กรัม น.น. เซลแห้ง) | ปริมาณเอนไซม์ (หน่วย/80 มล.บรอท) |
|---|---|---|---|
| 1 % ไซโลส | 0.066 | 104.12 | 6.87 |
| 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว + 0.5 % ไซโลส | 0.088 | 94.20 | 8.29 |
| 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว + 1.0 % ไซโลส | 0.069 | 101.50 | 7.00 |

หมายเหตุ เลี้ยงเชื้อตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 10 ตรวจสอบเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 8.1

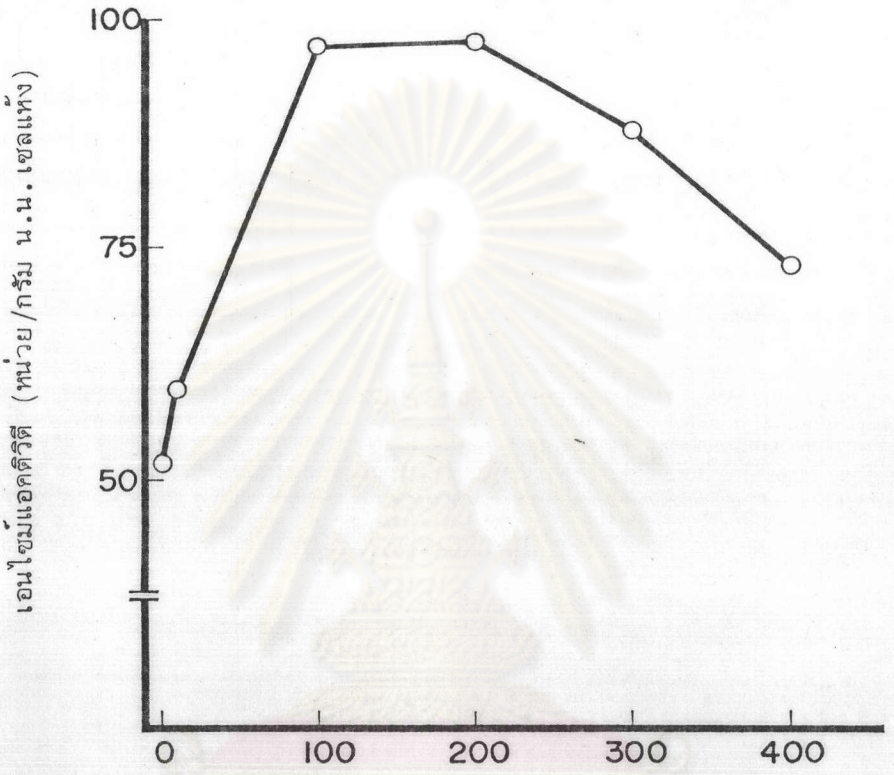
6. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซลด้วยความร้อนของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

6.1 อิทธิพลของบัฟเฟอร์ต่อเอนไซม์แอคติวิตี

จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 โดยใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันพบว่า เอนไซม์ต้องการบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำงาน ดังแสดงในรูปที่ 6 ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 100-200 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจะใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์

6.2 อิทธิพลของ pH ต่อเอนไซม์แอคติวิตี

จากการบ่มเซลที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ภายใน ในสารละลายที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับ




รูปที่ 6. อิทธิพลของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

วัดเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นความเข้มข้นของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7

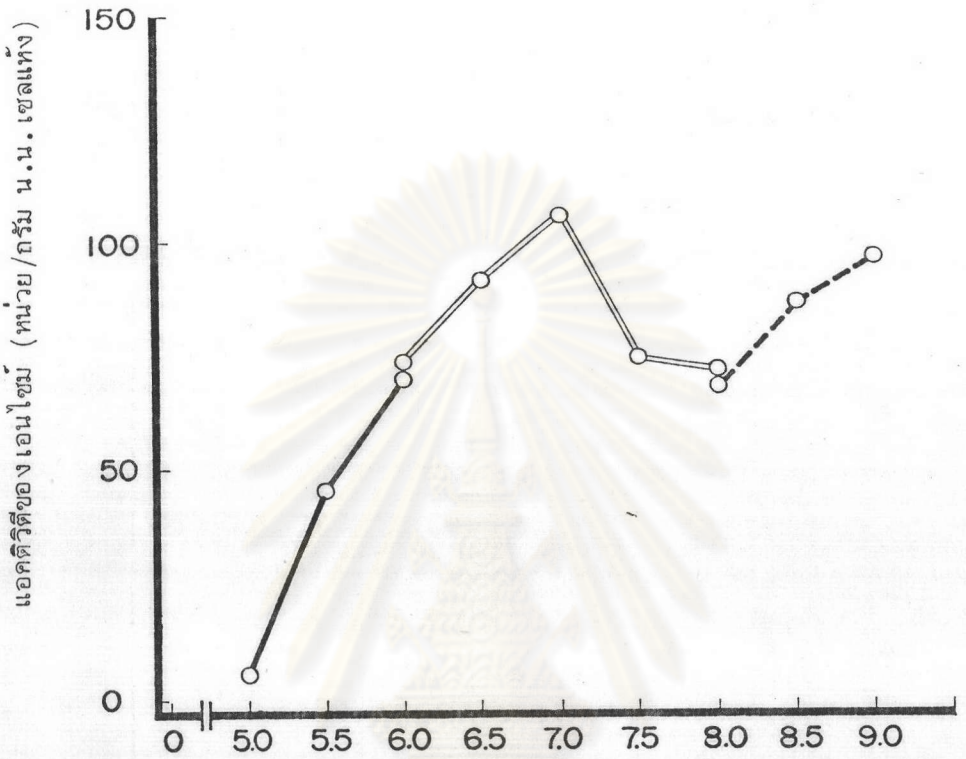
ที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นใช้บัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ โดยผันแปรความเป็นกรดด่างที่ระดับต่าง ๆ กัน โดยในช่วง pH 5.0-6.0 ใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer), pH 6.0-8.0 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ pH 8.0-9.0 ใช้ทริส บัฟเฟอร์ [Tris (hydroxymethyl) aminomethane] พบว่าที่ pH 7.0 ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด และเมื่อใช้ทริสบัฟเฟอร์ที่ pH 8.0-9.0 ปรากฏว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ก็จัดอยู่ในระดับที่สูงแต่ยังต่ำกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ดังแสดงในรูปที่ 7. ดังนั้นจึงเลือกใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 ในการทดลองต่อ ๆ ไป

6.3 อิทธิพลของแมกนีเซียมไอออนต่อเอนไซม์แอคติวิตี

จากการบ่มเซลที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ภายใน ในสารละลายที่มีองค์ประกอบดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ $MgSO_4.7H_2O$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0,1,5,10 และ 15 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์จะมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น แอคติวิตีจะสูงสุดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ แล้วแอคติวิตีจะค่อย ๆ ลดต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 8 แสดงว่า แมกนีเซียมไอออนมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจะใช้แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

6.4 อิทธิพลของโคบอลท์ไอออนต่อเอนไซม์แอคติวิตี

จากการศึกษาผลของโคบอลท์ไอออนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นใช้แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และโคบอลท์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่า โคบอลท์จะช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกับแมกนีเซียม ดังแสดงในรูปที่ 9 แต่ความเข้มข้นของโคบอลท์ที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดค่อนข้างต่ำคือ 0.1 มิลลิโมลาร์ ยิ่งกว่านั้นที่ความเข้มข้นสูง โคบอลท์จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์



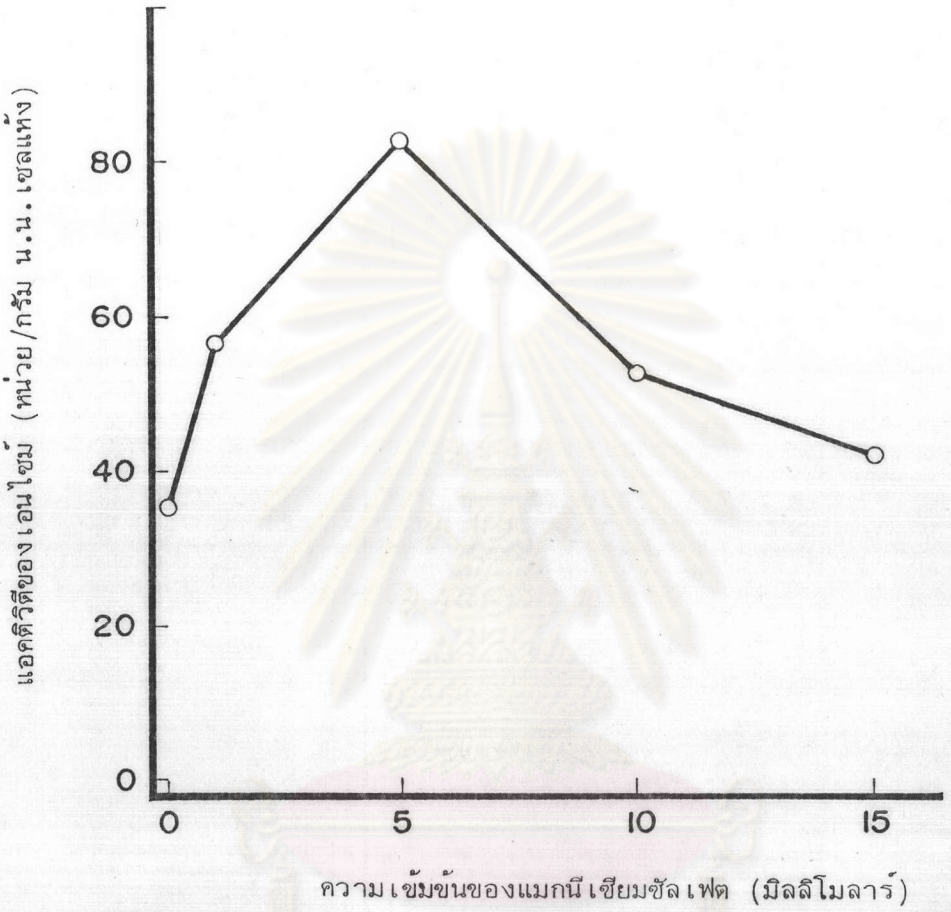

รูปที่ 7 อิทธิพลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

วัดเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในช่วง pH ต่าง ๆ กัน

o——o อะซิเตท บัฟเฟอร์ (pH 5.0-6.0)

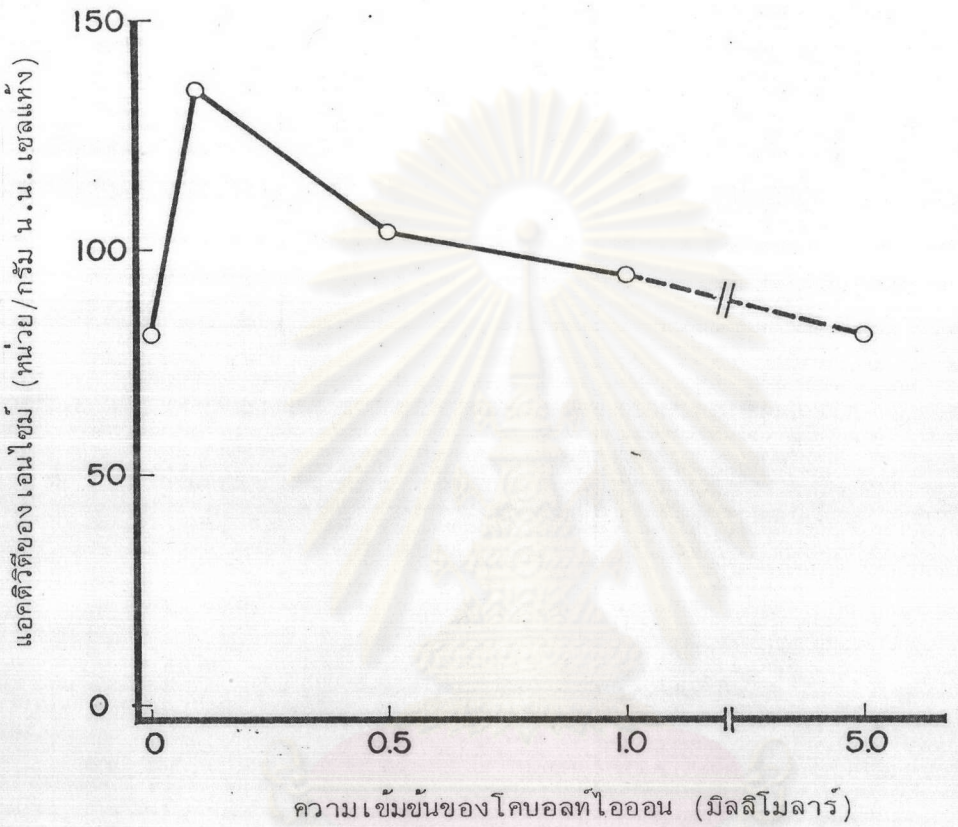
o═══o โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 6.0-8.0)

o- - -o ทริส บัฟเฟอร์ (pH 8.0-9.0)




รูปที่ 8. อิทธิพลของแมกนีเซียมไอออนต่อเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ในขณะที่มีโคบอลท์ไอออนที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 9 อิทธิพลของโคบอลท์ไอออนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ในขณะที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.5 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์แอคติวิตี

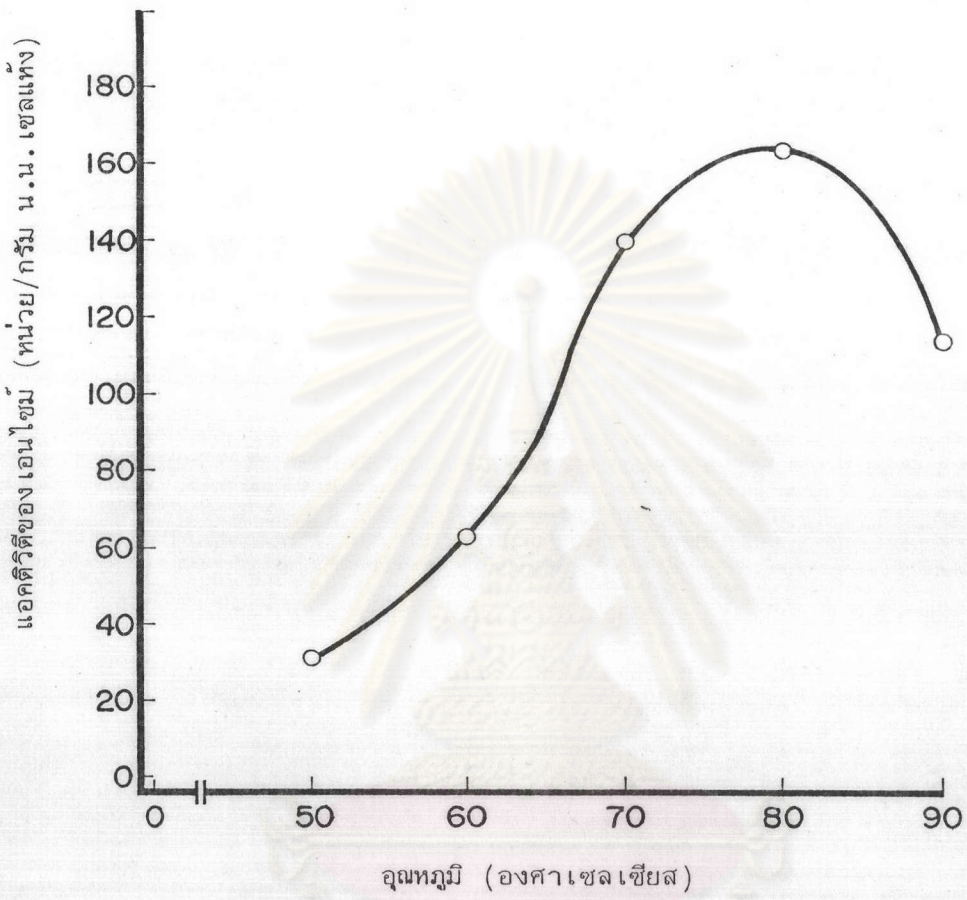
จากการบ่มเซลที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ภายใน ในสารละลายซึ่งมีองค์ประกอบดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นมีโคบอลท์คลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 10

6.6 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสหรือไซโลสต่อเอนไซม์แอคติวิตี

จากการบ่มเซลที่ถูกตรึงเอนไซม์ไว้ภายใน ในสารละลายซึ่งมีองค์ประกอบดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นใช้ความเข้มข้นของกลูโคสต่าง ๆ กันคือ 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 และ 600 มิลลิโมลาร์ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ของกลูโคส เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 11 ก. และจากการเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk) สามารถหาค่า Km สำหรับกลูโคสได้เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 11 ข. นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้สามารถไอโซเมอไรซ์ไซโลสได้ ภายใต้สภาวะเดียวกับเมื่อใช้กลูโคส โดยเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุด เมื่อใช้ไซโลสที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ และ Km สำหรับไซโลสมีค่าเท่ากับ 0.125 โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 12 ก. และ 12ข. ตามลำดับ ซึ่งคุณสมบัติข้อนี้เหมือนกับคุณสมบัติของ Streptomyces sp. อีกหลายสายพันธุ์ เช่น S. flavogriseus (57) ซึ่งมีค่า Km สำหรับกลูโคสเท่ากับ 0.376 โมลาร์ และค่า Km สำหรับไซโลสเท่ากับ 0.12 โมลาร์, S. griseofuscus S-41 (42) มีค่า Km สำหรับกลูโคสเท่ากับ 0.22 โมลาร์ และค่า Km สำหรับไซโลสเท่ากับ 0.054 โมลาร์ นอกจากนี้ S. phaeochromogenes NRRL B-3559 (35) และ S. olivochromogenes (22) ก็สามารถไอโซเมอเรซ์ได้ทั้งกลูโคสและไซโลส โดยมีค่า Km สำหรับกลูโคสและไซโลสใกล้เคียงกับของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 อีกด้วย

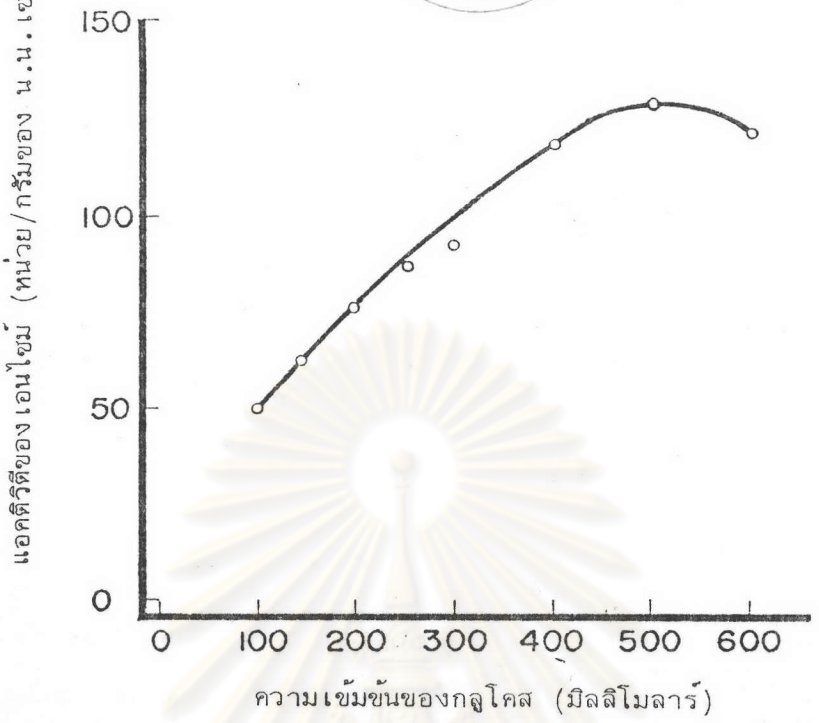
6.7 ความคงทนของเอนไซม์ต่อความร้อน

จากการตรวจสอบความคงทนของเอนไซม์ต่อความร้อน ซึ่งบ่มไว้ในบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน นาน 30 นาที แล้วนำมาตรวจหาเอนไซม์แอคติวิตีที่เหลือตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 พบว่าเอนไซม์ซึ่งถูกตรึงอยู่ภายในเซลสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียส โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างช้า ๆ แต่ที่อุณหภูมิ 80 และ 90องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างฉับพลัน ดังแสดงในรูปที่ 13

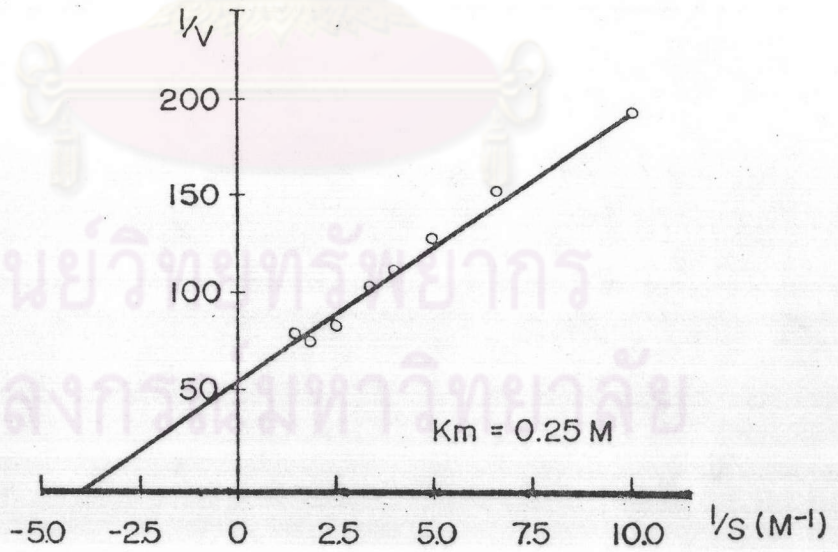



รูปที่ 10 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

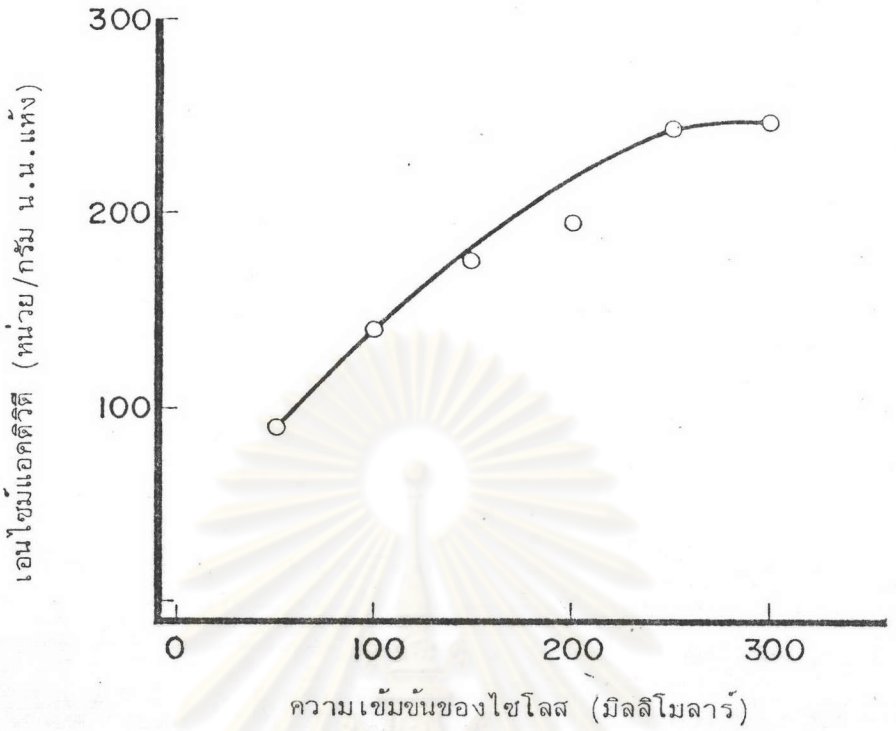
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



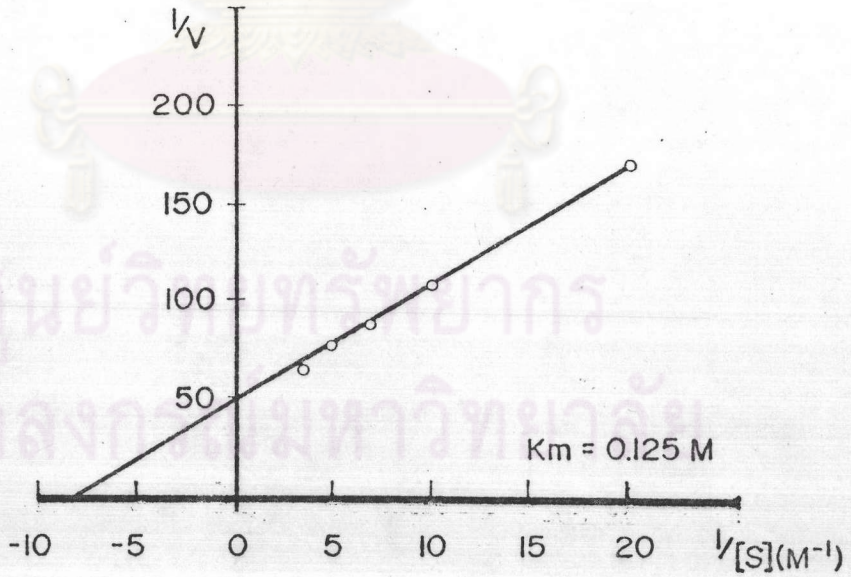

รูปที่ 11 ก. ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อเอนไซม์แอคติวิตี ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1



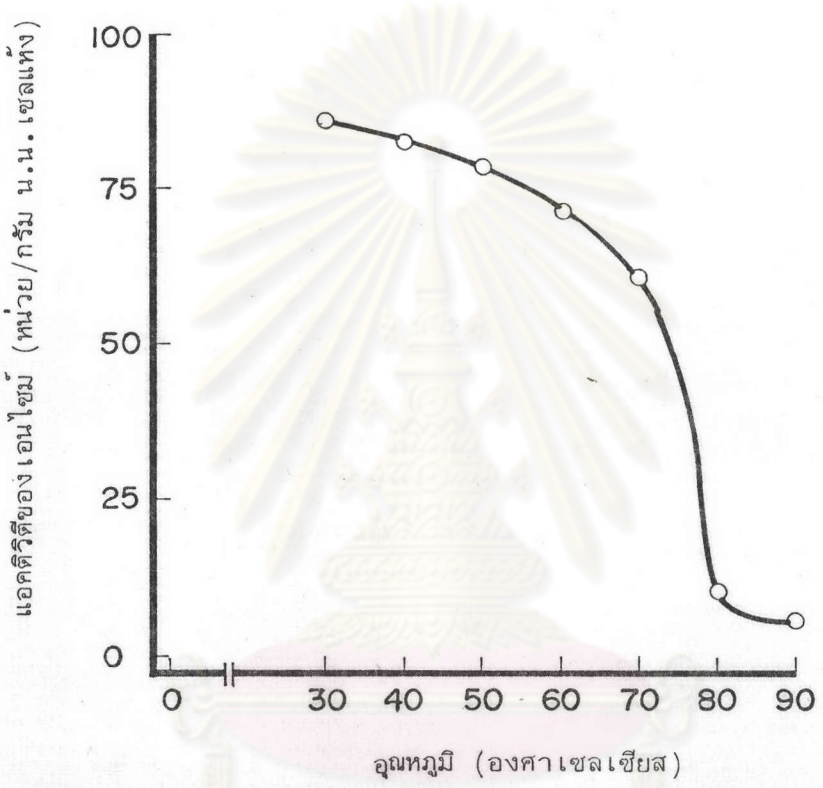

รูปที่ 11 ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พลอทของเอนไซม์กลูโคส ไอโซเมอเรสกับกลูโคส




รูปที่ 12 ก. ผลของความเข้มข้นของไซโลสต่อเอนไซม์แอคติวิตี ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1




รูปที่ 12 ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พลอท ของเอนไซม์กลูโคส ไอโซเมอเรสกับไซโลส



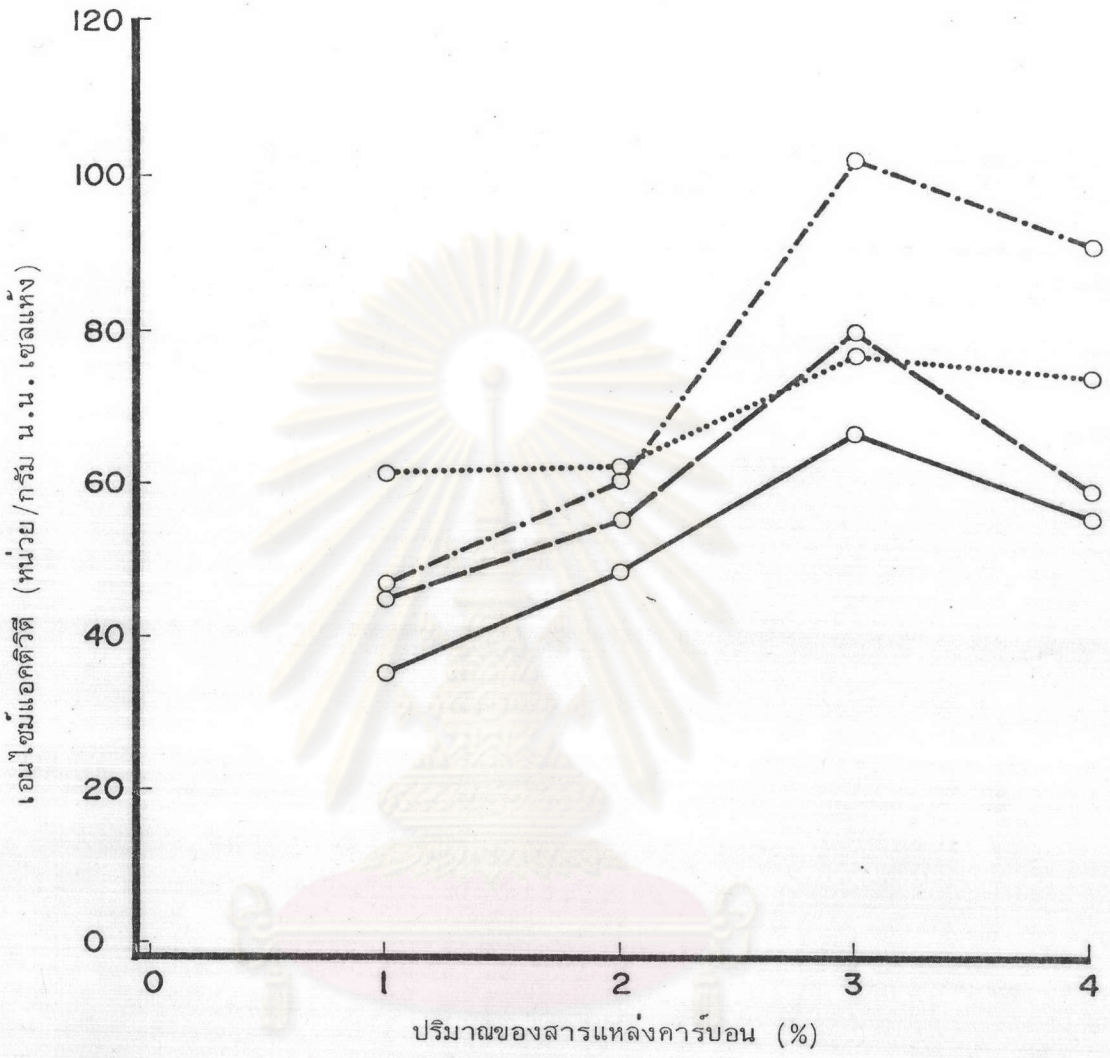

รูปที่ 13 แสดงความคงทนของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ต่อความร้อน ตรวจสอบเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ยกเว้นบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

7. ผลการศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

7.1 ชนิดและปริมาณของสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ คือ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว, เปลือกข้าวโพด, ซังข้าวโพด และแกลบ ซึ่งเตรียมโดยวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3 โดยผันแปรปริมาณของสารแหล่งคาร์บอนเหล่านี้เป็น 1, 2, 3 และ4 % พบว่า เชื้อที่เจริญในอาหารที่มี 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 14 ส่วนสารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นก็สามารถนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ได้เช่นเดียวกัน แต่แอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด ส่วนการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีสารแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน พบว่าปริมาณเซลที่ได้จากสารแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด ซึ่งให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงสุดเป็นสารแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 14 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีชนิดและปริมาณของสารแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน

—●—●— สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของแกลบ

—●—·—●— " " " เปลือกข้าวโพด

—●·····●— " " " ซังข้าวโพด

—●—●— " " " ฟางข้าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.2 ชนิดและปริมาณของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการหาเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กันคือ ทริปโตน, เปปโตน, โพลีเปปโตน, โปรตีโอสเปปโตน, บีฟ เอกซแทรก, มอลท์ เอกซแทรก และพีนัท เคกไฮโดรไลเซท ปรากฏว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีโพลีเปปโตนจะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงที่สุด รองลงมาคือ มอลท์ เอกซแทรก และเปปโตน ตามลำดับ ดังในรูปที่ 15 แต่เนื่องจากเอนไซม์แอคติวิตีไม่แตกต่างกันมาก และถ้าดูจากการเจริญของเชื้อแล้ว จะเห็นว่าเชื้อสามารถเจริญในอาหารที่มีมอลท์ เอกซแทรก ได้ดีกว่าในอาหารที่มีโพลีเปปโตน หรือเปปโตน นอกจากนี้โพลีเปปโตนยังมีราคาแพงกว่ามอลท์ เอกซแทรก ดังนั้นจึงเลือกใช้มอลท์ เอกซแทรก เป็นสารแหล่งไนโตรเจน

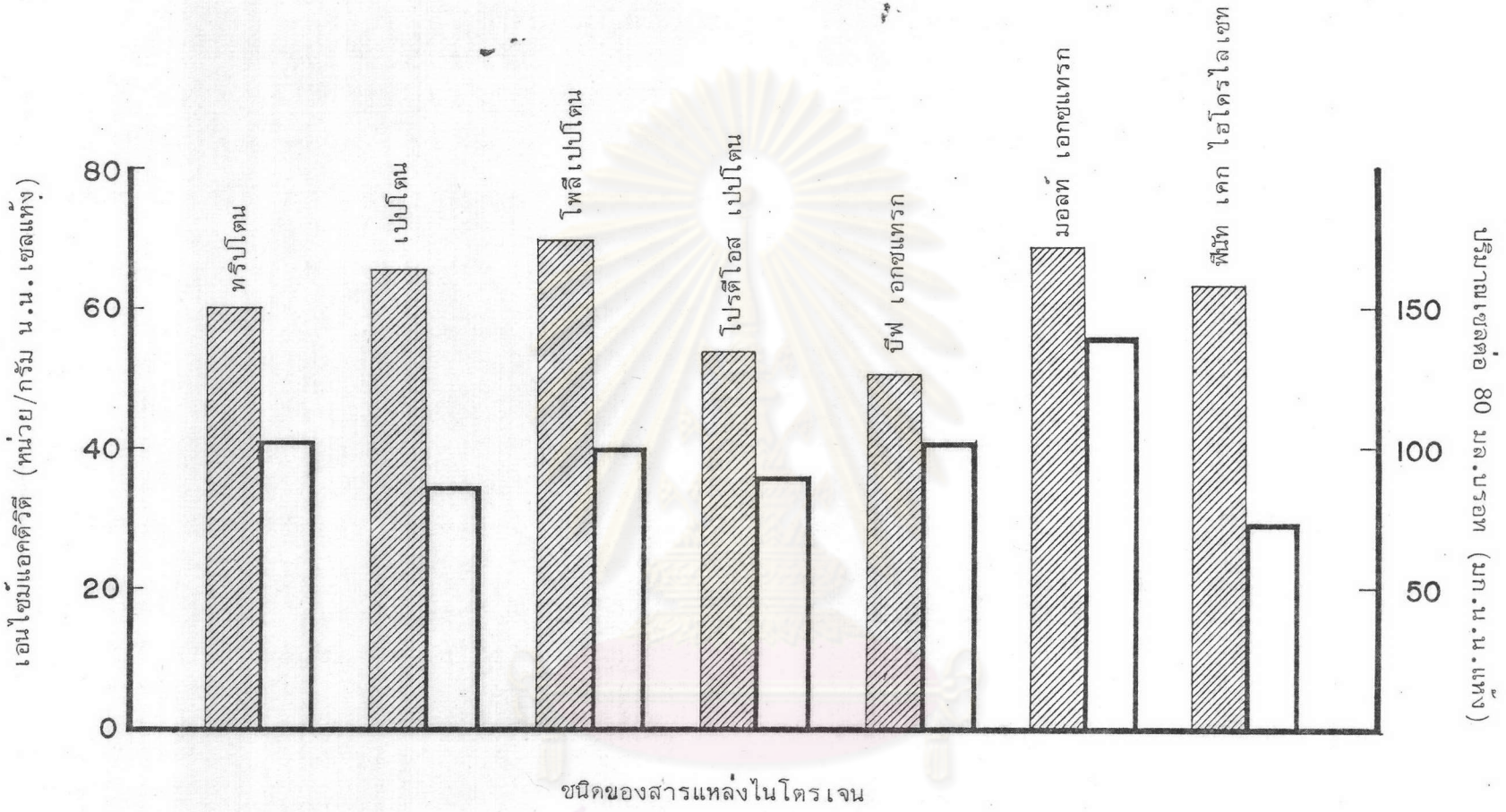
จากการผันแปรปริมาณของมอลท์ เอกซแทรกในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อใช้มอลท์ เอกซแทรก ตั้งแต่ 0.5-2.0 % เอนไซม์แอคติวิตีไม่ได้แตกต่างกันมาก แต่ที่ 1.0 % มอลท์ เอกซแทรก เชื้อจะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงสุด ดังในรูปที่ 16 ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1.0 % มอลท์ เอกซแทรก เป็นสารแหล่งไนโตรเจนในการทดลองต่อ ๆ ไป

จากการผันแปรปริมาณของยีสต์ เอกซแทรก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีมอลท์ เอกซแทรก 1.0 % พบว่า เมื่อใช้ยีสต์ เอกซแทรก 0.3 % เชื้อจะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงสุด ดังในรูปที่ 17 ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์ เอกซแทรก ที่ 0.3 %

7.3 ชนิดและปริมาณของเกลือแร่ที่เหมาะสม

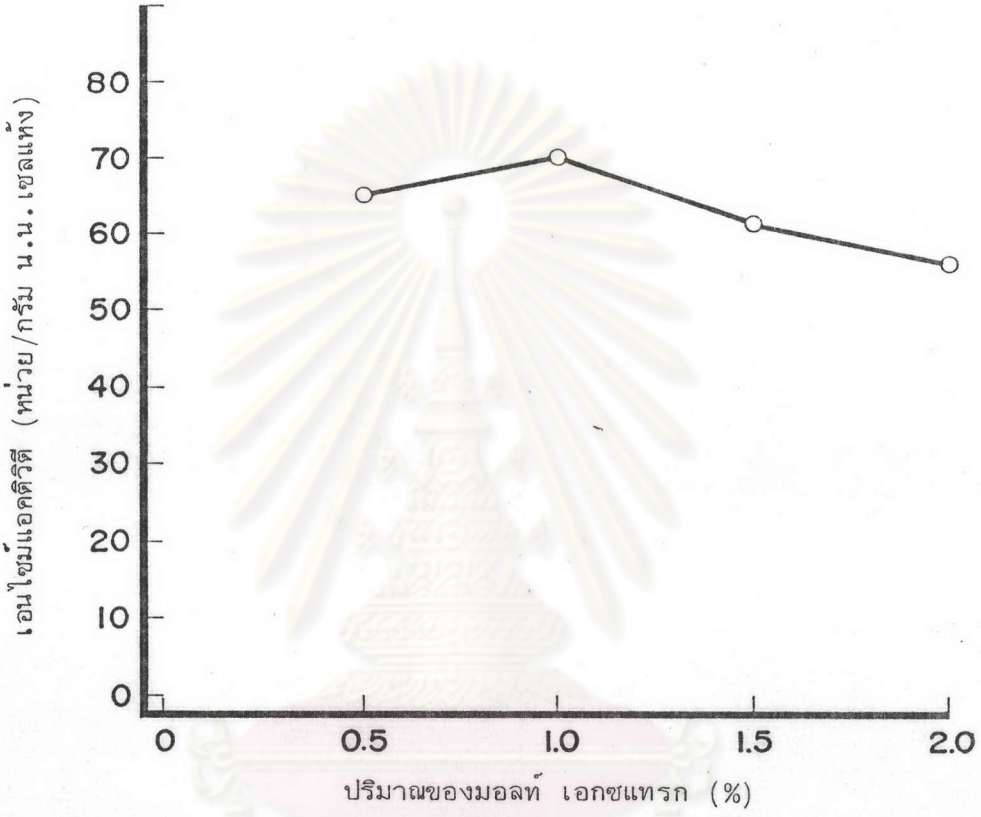
จากการศึกษาชนิดของเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีโคบอลท์คลอไรด์ จะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแมงกานีสซัลเฟต หรือแมกนีเซียมซัลเฟต ดังในรูปที่ 18 ซึ่งจากการผันแปรปริมาณของโคบอลท์คลอไรด์ พบว่าที่ 0.01 % $CoCl_2.6H_2O$ เชื้อจะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงสุด ส่วนที่ 0.02 และ 0.03 % $CoCl_2.6H_2O$ เชื้อเจริญได้น้อยมากไม่สามารถหาเอนไซม์แอคติวิตีได้ แสดงว่าโคบอลท์คลอไรด์ไม่ช่วยในการเจริญของเชื้อ แต่ช่วยเพิ่มเอนไซม์แอคติวิตี ส่วนปริมาณของแมงกานีสซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตที่ให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงสุดคือ 0.005 และ 0.01 % ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีที่ได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเกลือแร่เพียงชนิดเดียว หรือทั้งสองชนิดผสมกัน พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีโคบอลท์คลอไรด์เพียงอย่างเดียว จะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือแร่ทั้งสองชนิดผสมกัน ดังแสดงในตารางที่ 10



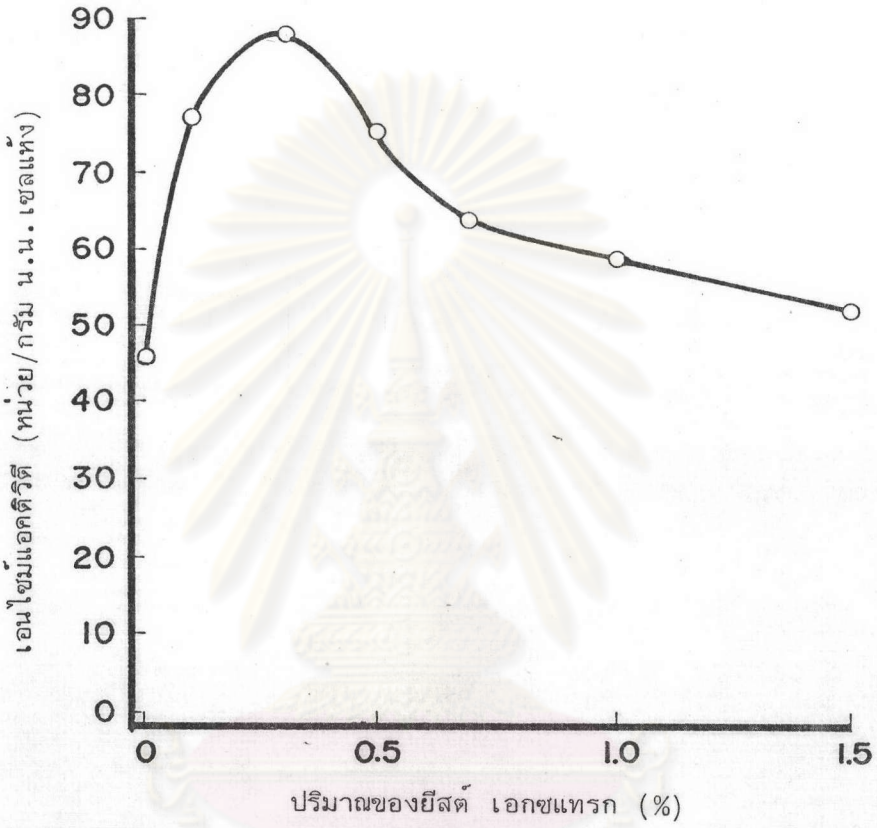

รูปที่ 15 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีและปริมาณเซลของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



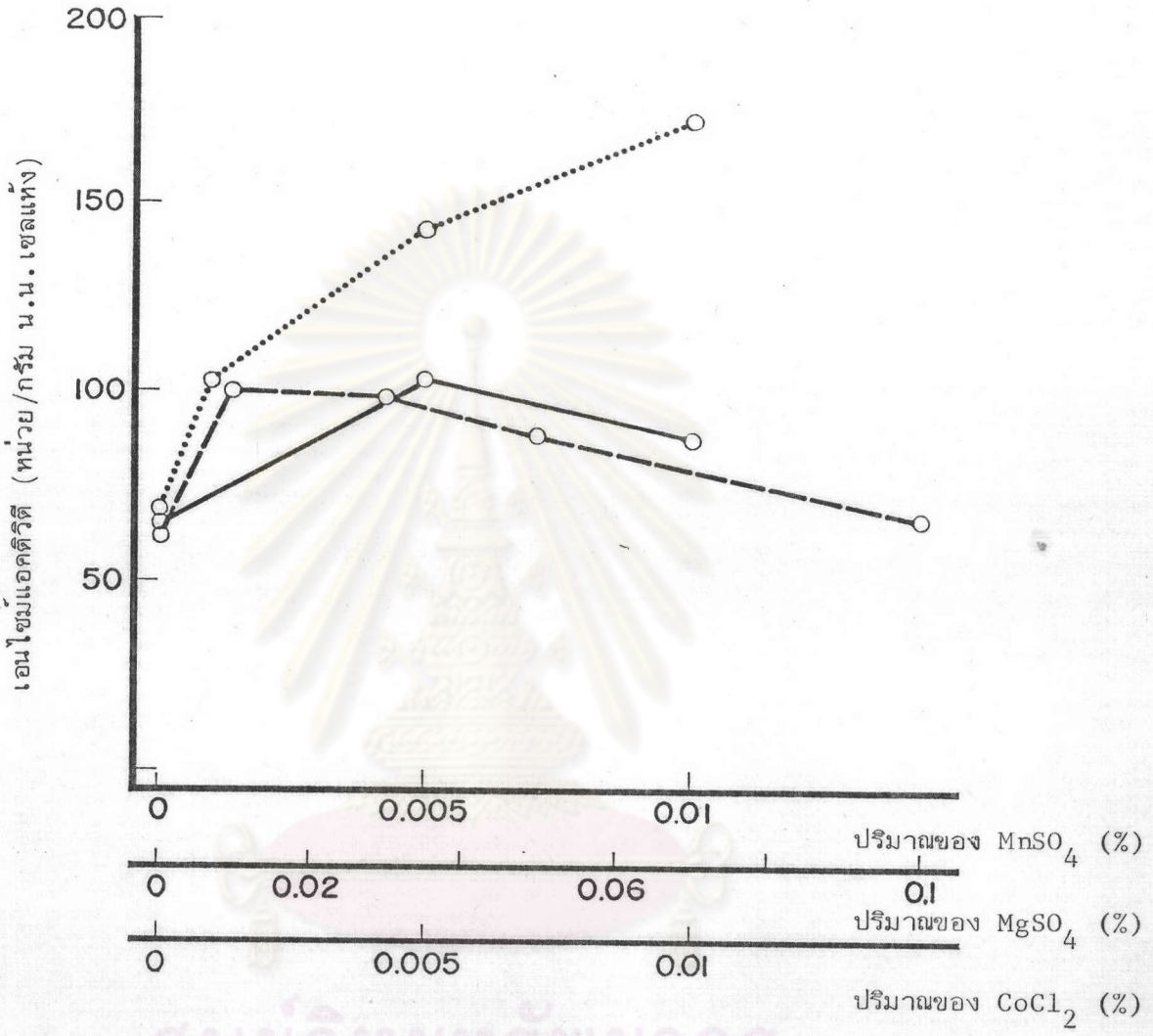

รูปที่ 16 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณของมอลท์เอกซแทรกต่าง ๆ กัน และมียีสต์ เอกซแทรก 0.5 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 17 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณของยีสต์เอกซแทรกต่าง ๆ กัน และมีมอลท์ เอกซแทรก 1.0 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 18 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่าง ๆ กัน

—○— $MnSO_4.7H_2O$

-○-○- $MgSO_4.7H_2O$

·····○····· $CoCl_2.6H_2O$

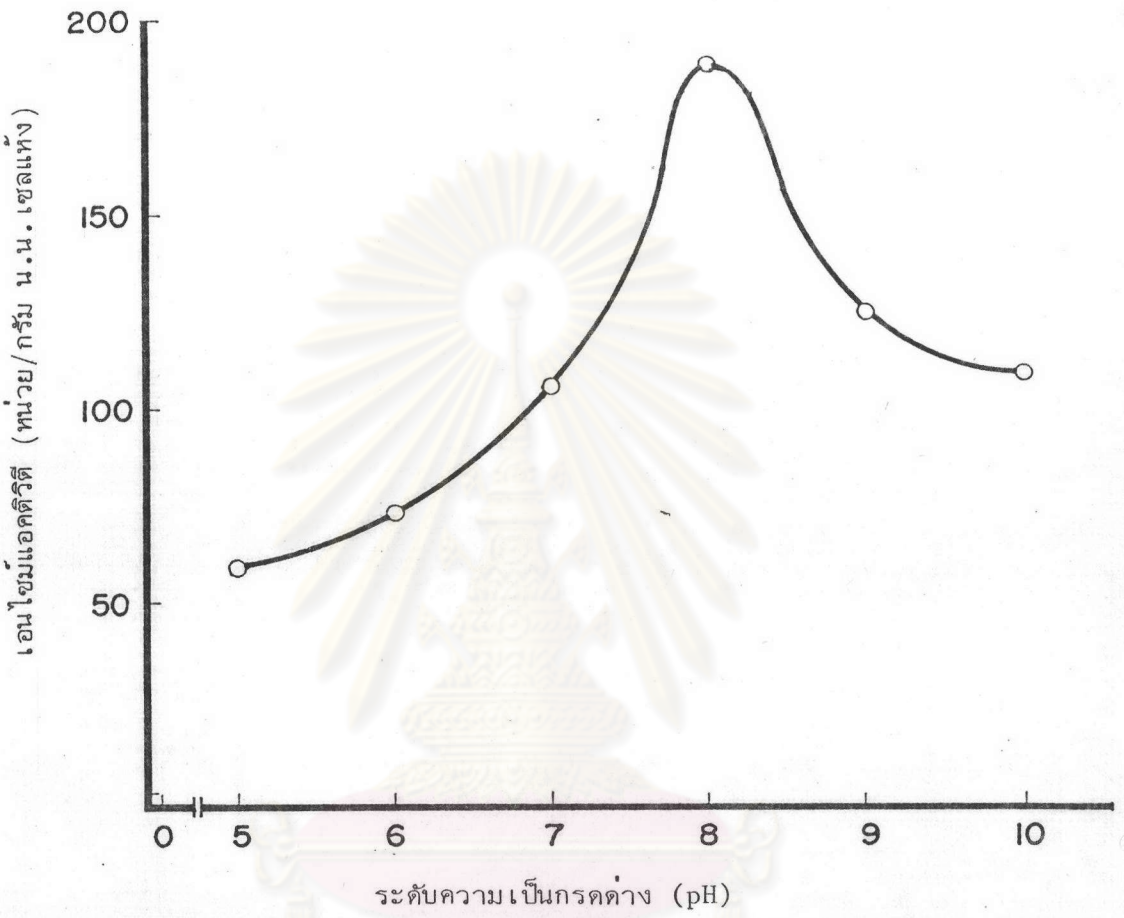
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือแร่เพียงชนิดเดียวและทั้ง 2 ชนิด

| ปริมาณของเกลือแร่ (%) | เอนไซม์แอคติวิตี (หน่วย/กรัม น.น. เซลแห้ง) |
|---|---|
| None | 108.4 |
| $MnSO_4.7H_2O$ (0.005 %) | 118.4 |
| $MgSO_4.7H_2O$ (0.01 %) | 118.4 |
| $CoCl_2.6H_2O$ (0.01 %) | 298.8 |
| $MnSO_4.7H_2O$ (0.005 %) + $MgSO_4.7H_2O$ (0.01 %) | 173.7 |
| $MnSO_4.7H_2O$ (0.005 %) + $CoCl_2.6H_2O$ (0.01 %) | 217.4 |
| $MgSO_4.7H_2O$ (0.01 %) + $CoCl_2.6H_2O$ (0.01 %) | 205.9 |

ดังนั้นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ ประกอบด้วย 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, 1 %มอลท์ เอกซแทรก, 0.3 % ยีสต์ เอกซแทรก และ 0.01 % $CoCl_2.6H_2O$

7.4 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารตามสูตรในข้อ 7.3 ซึ่งปรับความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 5.0-10.0 พบว่าที่ระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 เชื้อจะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงสุด ดังในรูปที่ 19 ดังนั้นสภาพความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์คือ 8.0

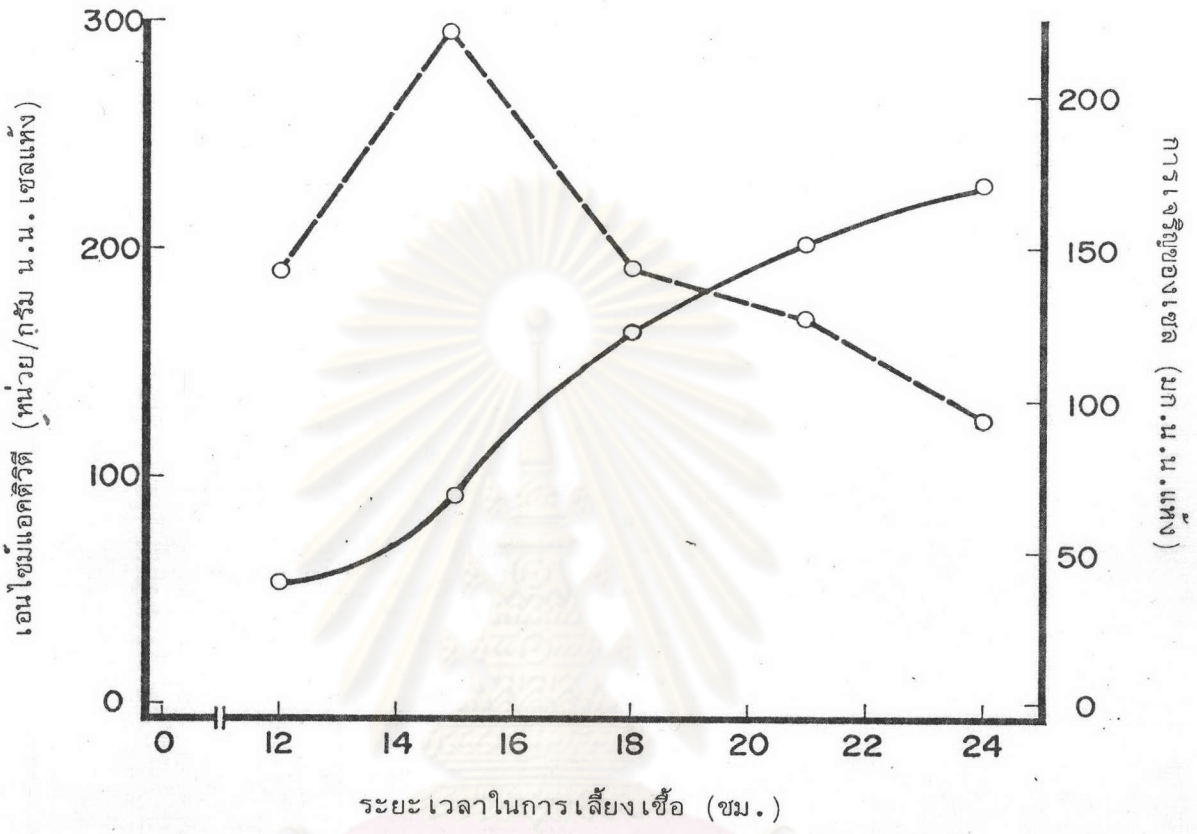



รูปที่ 19 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ที่ระดับต่าง ๆ กัน

8. ความสัมพันธ์ของเอนไซม์แอคติวิตีกับการเจริญของเซล เมื่อเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ในถังหมัก

จากการเก็บตัวอย่างเซลในถังหมักครั้งละ 100 มล.ทุก ๆ 3 ชม. ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อจะสร้างเอนไซม์ปริมาณสูงสุดในช่วงแรกของการเจริญคือ ที่ชั่วโมงที่ 15 หลังจากนั้นเอนไซม์แอคติวิตีจะลดลง แต่เชื้อยังมีการเจริญอยู่จนถึงเวลาสุดท้ายที่เก็บตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 20 การสร้างเอนไซม์ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 นี้ คล้ายกับการสร้างเอนไซม์ของ S. bambergiensis ATCC 13879 (71) ซึ่งเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลสและซอร์บิทอลเป็นสารแหล่งคาร์บอน เชื้อดังกล่าวจะสร้างเอนไซม์ปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 18-20 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนปริมาณเซลจะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 40-42 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 32 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าการสร้างเอนไซม์และการเจริญของเซลเร็วขึ้นกว่าเดิม แต่อย่างไรก็ตามก็ยังพบว่าปริมาณการสร้างเอนไซม์สูงสุดไม่ได้อยู่ที่การเจริญของเซลสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ของเอนไซม์แอคติวิตีกับการเจริญของเซล เมื่อเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ใน 3 % สารย่อยสลายด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, 1 % มอลท์ เอกซแทรก, 0.3 % ยีสต์ เอกซแทรก, 0.01 % $CoCl_2.6H_2O$ (pH 8.0) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งกวนด้วยใบพัดความเร็ว 400 รอบ/นาที, ความดันอากาศ 3.5 กก./ตร.ซม, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

o——o เอนไซม์ แอคติวิตี

o——o การเจริญของเซล

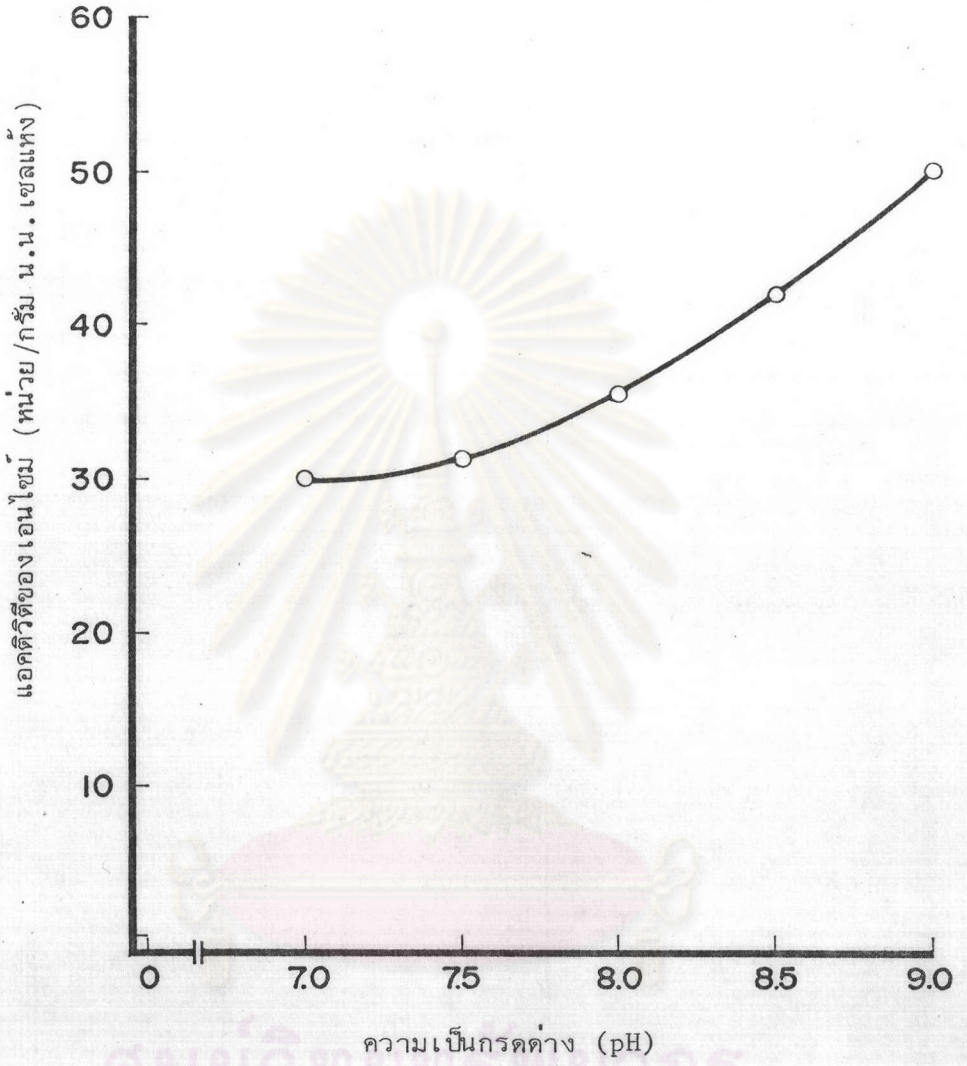
9. ผลของความเป็นกรดด่างต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท

เนื่องจากเม็ดเจลที่ตรึงเซลด้วยอัลจิเนท จะต้องรักษาความคงตัวของเม็ดเจลโดยการแช่ใน 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ การใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์พบว่าไม่เหมาะสม เนื่องจากการเกิดตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต $\left[Ca_3(PO_4)_2\right]$ ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นทริสบัฟเฟอร์ จากการนำเม็ดเจลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.2 โดยผันแปร pH ของทริส-บัฟเฟอร์เป็น 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ พบว่าที่ pH 9.0 เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 21

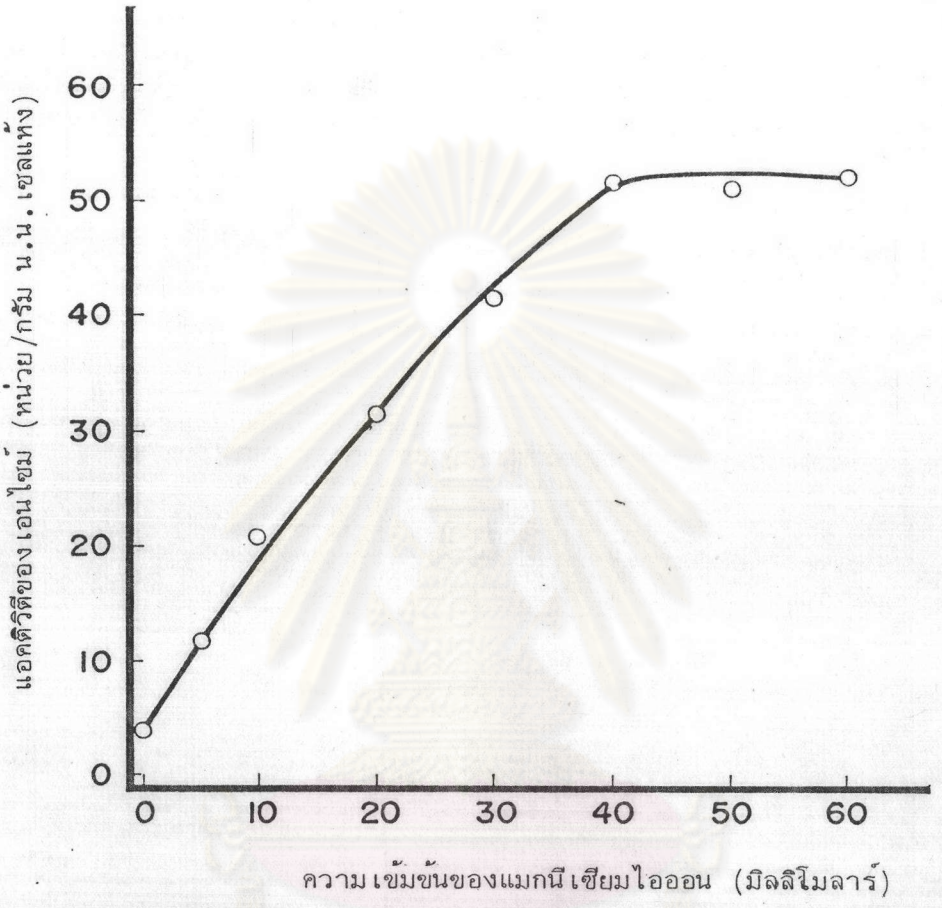
10. อิทธิพลของแมกนีเซียมไอออนในการต่อต้านการยับยั้งของแคลเซียมไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากแคลเซียมไอออนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (72) ทำให้การตรึงเซลด้วยอัลจิเนทได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร Barker ได้รายงานว่าแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้น 10 เท่าของแคลเซียมไอออนสามารถต่อต้านการยับยั้งของแคลเซียมไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ (73) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยนำเม็ดเจลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทไปตรวจสอบแอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 โดยผันแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนตั้งแต่ 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนตั้งแต่ 40 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป สามารถต่อต้านแคลเซียมไอออนในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 21 อิทธิพลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลซึ่งถูกตรึงด้วยอัลจิเนท ตรวจสอบเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.2




รูปที่ 22 แสดงความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมที่สามารถต่อต้านแคลเซียมไอออนในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่ในอัลจิเนท

11. ผลของความต้องการแมกนีเซียมไอออนในการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทในสภาพที่เป็นกลางและเป็นด่าง

จากรายงานที่ว่าความต้องการแมกนีเซียมไอออนในการทำงานของเอนไซม์นั้น ขึ้นอยู่กับสภาพความเป็นกรดด่าง คือที่ pH ต่ำกว่า 8.0 เอนไซม์ต้องการแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นสูงกว่าในสภาพที่ pH สูงกว่า 8.0 (73) จึงได้ทำการทดลองโดยนำเม็ดเจลที่ถูกตรึงด้วยอัลจีเนทมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.2 โดยใช้ทริสบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 และ 9.0 และใช้แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 5 และ 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในขณะที่มีและไม่มีแคลเซียม-ไอออน ตามลำดับ พบว่าที่ pH 9.0 เอนไซม์แอคติวิตีเมื่อมีแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้น 5 และ 40 มิลลิโมลาร์นั้นไม่แตกต่างกัน ส่วนที่ pH 7.0 เอนไซม์แอคติวิตีเมื่อมีแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ จะสูงกว่าเมื่อมีแมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 11

12. เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทและไคโตแซน

ถึงแม้ว่าการตรึงเซลด้วยอัลจิเนทจะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่เอนไซม์แอคติวิตีที่ได้ต่ำ จึงได้ทำการตรึงเซลโดยใช้ไคโตแซนตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7.2 จากการตรวจสอบเอนไซม์แอคติวิตีของเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทและไคโตแซน โดยเปรียบเทียบกับเซลที่ไม่ได้ถูกตรึงตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.2 ปรากฏว่า เซลที่ถูกตรึงด้วยไคโตแซนมีเอนไซม์แอคติวิตีสูงกว่าเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท โดยมีแอคติวิตีต่ำกว่าเซลที่ไม่ได้ถูกตรึงเพียง 30 % ในขณะที่เซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทมีแอคติวิตีต่ำกว่าเซลที่ไม่ได้ถูกตรึงถึง 60 % ดังแสดงในตารางที่ 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบความต้องการแมกนีเซียมไอออนในการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท ในสภาพที่เป็นกลางและเป็นด่าง

| ระดับความเป็นกรดด่าง (pH) | ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนที่ต้องการ (มิลลิโมลาร์) | เอนไซม์แอคติวิตี (หน่วย/กรัมน.น. เซลแห้ง) |
|---|---|---|
| 7.0 | 5.0 | 31.0 |
| | 40.0 | 89.1 |
| 9.0 | 5.0 | 68.4 |
| | 40.0 | 69.3 |

หมายเหตุ วัดเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.2

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนทและไคโตแซนกับเซลที่ไม่ได้ถูกตรึง

| เซล | เอนไซม์แอคติวิตี (หน่วย/กรัมน.น. เซลแห้ง) | แอคติวิตีสัมพัทธ์ |
|---|---|---|
| เซลที่ไม่ได้ถูกตรึง | 194.83 | 100.0 |
| เซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท | 78.02 | 40.05 |
| เซลที่ถูกตรึงด้วยไคโตแซน | 136.07 | 69.84 |

หมายเหตุ วัดเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.2