บทที่ 1

บทนำ

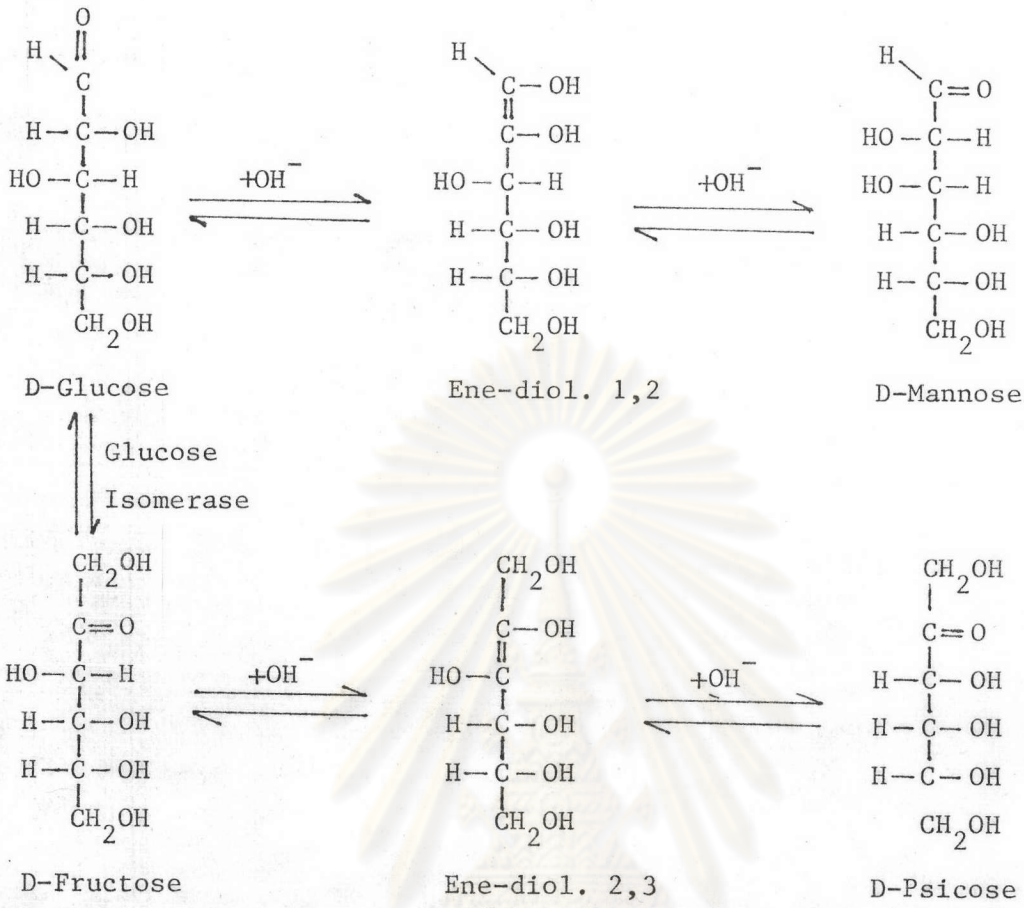
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติความเป็นมา

เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสหรือไซโลสไอโซเมอเรส (E.C. 5.3.1.5) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส (1) นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลสได้อีกด้วย (2) ในอุตสาหกรรมได้ใช้เอนไซม์นี้ผลิตน้ำเชื่อมฟรุคโตส (Fructose syrup) เอนไซม์นี้ส่วนใหญ่พบว่าเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและถูกเก็บอยู่ภายในเซลของจุลินทรีย์ (intracellular enzyme) มีบางชนิดที่สร้างเอนไซม์แล้วขับออกมานอกเซล (extracellular enzyme) เช่น Streptomyces glaucescens ETH 22794 (3)

น้ำเชื่อมฟรุคโตสเป็นน้ำเชื่อมที่เตรียมจากแป้งโดยขบวนการของเอนไซม์ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน (4) ขั้นแรกได้แก่การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำเชื่อมกลูโคส โดยใช้จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Bacillus subtilis (4-6) เป็นต้น แต่ความหวานของน้ำตาลกลูโคสจะต่ำกว่าความหวานของซูโครส จึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นน้ำเชื่อมกลูโคสจึงถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำเชื่อมฟรุคโตสซึ่งมีความหวานสูงกว่าซูโครส โดยใช้เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสซึ่งได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดในวงศ์ต่าง ๆ กัน

การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสนั้น เริ่มแรกใช้ปฏิกิริยาเคมีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง (7) ได้มีผู้พยายามศึกษาปฏิกิริยานี้อย่างละเอียด (8-11) เพื่อที่จะนำไปผลิตฟรุคโตสในระดับอุตสาหกรรม แต่พบว่าปฏิกิริยาดังกล่าวไม่จำเพาะ คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกลูโคสจะไม่ให้ฟรุคโตสเพียงอย่างเดียว แต่จะได้สารประกอบที่ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิสมได้ เช่น พไซโคส (psicose) และให้สารประกอบหลายชนิดที่มีสีดังแสดงในรูปที่ 1. ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการกำจัดสิ่งเจือปนเหล่านี้ (12) ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงไม่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส



รูปที่ 1. ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส โดยสารละลายด่างหรือเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

เอนไซม์ที่ให้ปฏิกิริยาจำเพาะในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสก็คือ เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งจะช่วยขจัดปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นโดยขบวนการทางเคมี เอนไซม์นี้ได้ถูกค้นพบโดย Marshall และ Kooi ในปี ค.ศ.1957 (13) ทั้งสองพบว่าเอนไซม์ที่ได้จาก Pseudomonas hydrophila สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสได้ ทั้งยังสามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลสได้อีกด้วย แต่เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จาก Pseudomonas hydrophila นี้ต้องการอาร์ซิเนทในปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ได้จาก Aerobacter cloacae (14), A. aerogenes, Escherichia freundii (15) และ E. intermedia (16) อาร์ซิเนท เป็นสารที่มีพิษ ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้จุลินทรีย์เหล่านี้มาผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม

Yamanaka (17) เป็นคนแรกที่พบว่า heterolactic acid bacteria สามารถ

สร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ ในบรรดาแบคทีเรียเหล่านี้ Lactobacillus brevis สามารถสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงสุด ถึงแม้เอนไซม์นี้จะสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสได้ที่ pH ต่ำ แต่เนื่องจากเอนไซม์ทนความร้อนได้ต่ำ จึงยังไม่มีการพัฒนาเพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรม

นอกจากนี้ก็มีการค้นพบเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในจุลินทรีย์อีกหลายชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1. จุลินทรีย์ที่ได้ทำการศึกษามากที่สุดและนิยมใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ได้แก่ เชื้อในสกุล Streptomyces เชื้อตัวแรกในสกุลนี้ที่พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้คือ S. phaeochromogenus (1)ต่อมาได้มีการค้นพบ Streptomyces ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้อีกหลายสายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

Microorganism	Reference
Actinomyces olivocinereus	18
Aerobacter levanicum NRRL B-3342	19
Arthrobacter sp. NRRL B-3724	20
Bacillus coagulans HN-68	21
Bacillus stearothermophilus	22
Brevibacterium incertum NRRL B-5383	23
Flavobacterium devorans NRRL B-5384,ATCC 10829	23
Lactobacillus sp.	24
Lactobacillus brevis	17
Nocardia sp.	25
Micromonospora sp.	25
Microbispora sp.	25
Microellobospora sp.	25
Paracolobactrum aerogenoides	26
Streptomyces sp.	27

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Microorganism	Reference
S. bikiniensis	28
S. albus	29,30
S. cinnamonensis	31
S. flavogriseus	32
S. fradiae	31,33
S. glaucescens ETH - 22794	3
S. olivochromogenes	22
S. griseus	34
S. phaeochromogenes NRRL B- 3559	35
S. flavovirens	36

ในบรรดาจุลินทรีย์เหล่านี้ บางชนิดได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรม โดยปรับปรุงพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้น ๆ ให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง อาทิเช่น S. flavovirens TKK 1. ซึ่งเป็นมิวแตนท์ของ S. flavovirens IFO 3197 มิวแตนท์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงใกล้เคียงกับ Actinoplanes missouriensis ที่ใช้ในอุตสาหกรรม (36) นอกจากนี้ Armbruster และคณะ (37) ได้แยกมิวแตนท์ของ S. olivochromogenes ATCC 21114 ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ได้ในอาหารที่ไม่มีไซโลสหรือวัสดุที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบเป็นต้น

วิธีการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากตัวอย่างดิน

วิธีการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากตัวอย่างดินนี้ มีอยู่ 2 วิธีคือ วิธีแรกโดยการนำดินไปใส่ในอาหารเหลวที่มีไซโลสเป็นสารแหล่งคาร์บอนบ่มไว้หลาย ๆ วัน แล้วนำไปเพาะบนอาหารแข็ง เก็บเชื้อที่ได้บนอาหารแข็งเอียง (agar slant) วิธีนี้เรียกว่า เอนริชเมนต์ เทคนิค (Enrichment technique; 14,15,21,22) ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ ไดเรค-เพลทติง เทคนิค (Direct-plating technique) โดยการแยกเชื้อจากดินบนอาหารแข็งที่มีไซโลสเป็นสารแหล่งคาร์บอน Sanchez และ Smiley (30) ได้ใช้วิธีนี้แยกเชื้อ

S. albus จากดิน โดยเพาะเชื้อบนอาหารชนิดอินออร์แกนนิค อการ์ ซึ่งมีไซโลสเป็นสารแหล่งคาร์บอน Chen และคณะ (28) ก็ใช้วิธีนี้แยก S. flavogriseus จากดินโดยใช้เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ที่สกัดจากฟางข้าวเป็นสารแหล่งคาร์บอนแทนไซโลส ปรากฏว่าวิธีไดเรค-เพลทติง เทคนิคให้ผลดีกว่าเอนริชเมนต์ เทคนิค การแยกเชื้อต่าง ๆ โดยใช้ 2 วิธีนี้จะได้เฉพาะเชื้อที่สามารถเจริญในอาหารที่ใช้แยกเท่านั้น ถ้าจะแยกเชื้อให้ได้ทุกชนิด จะต้องเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งเป็นการยุ่งยากและเสียเวลามาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงยังไม่มีวิธีใดที่มีประสิทธิภาพและประหยัดเวลาในการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

สภาวะและปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. เพื่อผลิตเอนไซม์

กลูโคสไอโซเมอเรสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยการชักนำ (inducible enzyme) การสร้างเอนไซม์นี้ต้องการไซโลสเป็นตัวชักนำ ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จึงต้องเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสอยู่ด้วย แต่เนื่องจากไซโลสมีราคาแพงและหายาก ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรม จึงได้มีการคิดค้นหาวัสดุราคาถูกที่สามารถนำมาใช้แทนไซโลสได้ ในปี 1966 Takasaki (3) ได้พบว่า S. albus สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซ-เมอเรสได้ในอาหารที่มีวัสดุซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น รำข้าวสาลี, เปลือกข้าวโพด, และซังข้าวโพด ต่อมาก็พบว่า S. wedmorensis ATCC 21230 และ S. albus ATCC 21132 (38) สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัสดุซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

Nand และคณะ (33) ได้รายงานว่า S. fradiae ไม่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีบด หรือซังข้าวโพดบด ทั้งนี้เพราะเชื้อนี้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสออกมาย่อยไซแลนในรำข้าวสาลีหรือซังข้าวโพดได้ แต่ S. fradiae สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดของเปลือกข้าวโพด, ซังข้าวโพด, เปลือกเมล็ดฝ้าย, รำข้าวสาลี, รำข้าวเจ้า ฯลฯ ซึ่งนับเป็นข้อดีของ Streptomyces sp. เพราะในสารละลายย่อยด้วยกรดของวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบนี้จะประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural), ไฮดรอกซีเมทธิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethyl furfural) และกรดลีวูลินิค (levulinic acid) ซึ่งปกติสารเหล่านี้จะยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย แต่ Streptomyces sp. สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ในอาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดนี้ (39)

Chen และคณะ (32,40) พบว่า S. flavogriseus ก็สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้

เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว และเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากฟางข้าว และพบว่าเมื่อเลี้ยง S. flavogriseus ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3 % ของสารละลายฟางข้าวย่อยด้วย 0.1 N H_2SO_4 เชื้อจะสร้างเอนไซม์ปริมาณสูงสุด

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ซอร์บีทอลสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซ-เมอเรสของ Streptomyces sp. ได้ เมื่อเลี้ยง Streptomyces sp. ในอาหารที่มีซอร์บีทอล 0.8-1.2 % และกลูโคส 0.6-0.8 % โดยซอร์บีทอลจะไปช่วยเพิ่มความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนกลูโคสจะช่วยลดความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างเชื้อที่กำลังเจริญ ทำให้ระดับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมสำหรับการสร้างเอนไซม์ (41) มี Streptomyces หลายสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ในอาหารที่มีสารแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันเช่น ไซโลสกับกลูโคส, ไซโลสกับแป้ง หรือไซโลสกับกลีเซอรอล เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.

สารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนมากจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น เปปโตน, ทริปโตน, โพลีเปปโตน, ยีสต์ เอกซแทรก, มีท เอกซแทรก, มอลท์ เอกซแทรก, บีฟ เอกซแทรก และคอร์นสตีพลิเกอร์ (corn steep liquors) ดังในตารางที่ 2 ในบรรดาสารแหล่งไนโตร-เจน เหล่านี้ คอร์นสตีพลิเกอร์มีการใช้มากที่สุด รองลงมาก็เป็นเปปโตนและยีสต์ เอกซแทรก

ส่วนเกลือแร่ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์นั้น ส่วนมากจะเป็น $MgSO_4.7H_2O$ หรือ $CoCl_2.6H_2O$ ดังในตารางที่ 2 บางสายพันธุ์ต้องการเกลือแร่ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงขึ้น นอกจากนี้ก็มีอีกหลายสายพันธุ์ที่ต้องการ Co^{2+} ในการผลิตเอนไซม์ เช่น S. albus YT-5 (3), S. flavovirens TKK 1 (36), S. griseofuscus S-41 (42) และ S. phaeochromogenes NRRL B-3559 (35) เป็นต้น

Streptomyces sp. ส่วนมากจะเจริญและสร้างเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เป็นกลาง คือระหว่าง pH 7.0-7.2 ส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส แต่ S. albus YT-6 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 45 องศาเซลเซียส (43) ระยะเวลาในการสร้างเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แต่ส่วนมากจะอยู่ในช่วง 24 ชม. ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. สภาวะและปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

Microorganism	Carbon source	Nitrogen source	Mineral	pH	Temperature (°c)	Time (h.)	Reference
S. flavogriseus	straw hemicellulose or H_2SO_4 hydrolysate of straw	Corn steep liquor	$MgSO_4.7H_2O$	7.0	30	36	32
Streptomyces sp.	xylose or xylan	Tryptone + yeast extract	$MgSO_4.7H_2O$	7.0-7.2	30	96	27
S. albus YT-5	wheat bran or xylose or xylan	Corn steep liquor	$CoCl_2.6H_2O$	7.0	30	20-30	29
S. fradiae	xylose + glucose	yeast extract + malt extract + corn steep liquor	-	7.3	30	72	21
S. flavovirens TKK 1	xylose + glycerol	yeast extract + peptone	$MgSO_4.7H_2O$ + $CoCl_2.6H_2O$ + K_2HPO_4	7.1	30	24	36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. (ต่อ)

Microorganism	Carbon source	Nitrogen source	Mineral	pH	Tempera-ture (°c)	Time (h.)	Reference
S. griseofuscus, S-41	xylose + glucose	polypeptone + meat extract + yeast extract	$CoCl_2.6H_2O$ + NaCl + $MgSO_4.7H_2O$	7.0	29-30	24	42
S. cinnamonensis, MFS-4	partially hydro-lysated wheat bran + glucose	peptone + yeast extract + corn steep liquor	$MnCl_2.7H_2O$ + $FeSO_4.7H_2O$ + $CoCl_2.6H_2O$ + $MgSO_4.7H_2O$	7.0	28-30	24	31
S. phaeochromogenus, SK.	xylose + starch	peptone + meat extract + yeast extract	NaCl + $MgSO_4.7H_2O$	7.0	29-30	24	1
S. olivaceus NRRL 3916	xylose + corn starch	peptone + yeast extract + beef extract	$MgSO_4.7H_2O$ + NaCl	7.0	-	-	66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. (ต่อ)

Microorganism	Carbon source	Nitrogen source	Mineral	pH	Tempera-ture (°c)	Time (h.)	Reference
S. albus YT-6	wheat bran	Corn steep liquor	$CoCl_2.6H_2O$	-	45	20	43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย Streptomyces sp.

คุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ Streptomyces sp. ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 3. เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อซับสเตรทหลายชนิด เช่น กลูโคส, ไซโลส และไรโบส เป็นต้น ค่า Km ของกลูโคสและไซโลสนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่ว ๆ ไปพบว่าค่า Km สำหรับกลูโคสอยู่ในช่วง 0.086-0.5 โมลาร์ และสำหรับไซโลสประมาณ 0.032-0.093 โมลาร์ เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 3 นั้น ส่วนมากจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยประมาณ 80 องศาเซลเซียส สำหรับ S. phaeochromogenus, SK. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 80 องศาเซลเซียส แต่จะเพิ่มขึ้นเป็น 90 องศาเซลเซียสเมื่อมี Co^{2+} อยู่ด้วย

โดยปกติเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจะทำงานได้ดีในช่วง pH 7.0-9.0 มีบางสายพันธุ์ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่สูงกว่า 9.0 คือ S. phaeochromogenus, SK. (ตารางที่ 3) แต่เนื่องจากในสภาพที่เป็นด่างและที่อุณหภูมิสูง สารละลายของกลูโคสและฟรุคโตสจะเปลี่ยนเป็นพไซโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ร่างกายย่อยสลายไม่ได้ (18) ดังนั้นเอนไซม์ที่ทำงานได้ที่ pH ต่ำจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์มากกว่าเอนไซม์ที่ต้องการ pH สูงในการทำงาน เพราะการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสที่ pH เป็นกลางหรือที่ pH ต่ำกว่า จะสามารถป้องกันการเกิดพไซโคสได้

ในการทำงานของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส โดยทั่ว ๆ ไปพบว่าต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน (Divalent cation) เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Co^{2+} ซึ่งบางสายพันธุ์ต้องการเพียงชนิดเดียว และบางสายพันธุ์ต้องการ 2 ชนิดรวมกัน อาทิเช่น เอนไซม์ของ S. phaeochromogenes NRRL B-3559 ต้องการเฉพาะ Mg^{2+} ในการทำงานเท่านั้น (35) ส่วน S. albus (30) ต้องการทั้ง Mg^{2+} และ Co^{2+} ในการทำงานเช่นเดียวกับ S. flavovirens IFO 3197 (36) Isumura พบว่า Co^{2+} จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตโดย S. phaeochromogenus, SK. ในขณะที่มี Mg^{2+} อยู่ด้วย โดย Co^{2+} จะป้องกันไม่ให้เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติโดยความร้อน (1)

เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จาก Streptomyces sp. สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิสูง ๆ เช่น เอนไซม์จาก S. phaeochromogenes (35) สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชม. ในทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดยสูญเสียแอคติวิตีไป

ตารางที่ 3. คุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย Streptomyces sp.

Microorganism	Substrate specificity	Km (M)	Temperature optimum (°c)	pH optimum	Metal requirement	Heat Stability (%)	Reference
Streptomyces sp.	Glucose	0.40	80	7.0-8.0	Mg^{2+}	50(70°c, 120 h.)	27
	xylose	-					
S. albus YT-5	Glucose	0.16	80	8.0-8.5	Mg^{2+} or Co^{2+}	90(70°c, 10')	47
	xylose	0.032					
S. albus NRRL B-5778	Glucose,	0.086	70-80	-	Mg^{2+}, Co^{2+}	-	30
	xylose,	0.093					
	ribose,	0.350					
	arabinose,	-					
	rhamnose,	-					
	allose	-					

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3. (ต่อ)

Microorganism	Substrate specificity	Km (M)	Temperature optimum (°c)	pH optimum	Metal requirement	Heat Stability (%)	Reference
S. bikiniensis	Glucose xylose ribose rhamnose	-	80	8.0-9.0	Mg^{2+}, Co^{2+}	-	28
S. flavogriseus	Glucose	0.249	70	7.5	Mg^{2+}, Co^{2+}	100(70°c, 10')	22
	xylose	0.078					
S. flavovirens	Glucose	0.50	85	8.5	Mg^{2+}, Co^{2+}	-	36
IFO 3197	xylose	-					
S. phaeochromogenus,	Glucose	0.3	90	9.3-9.5	Mg^{2+}, Co^{2+}	96(80°c, 10')	1
SK	xylose						

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3. (ต่อ)

Microorganism	Substrate specificity	Km (M)	Temperature optimum (°c)	pH optimum	Metal requirement	Heat Stability (%)	Reference
S. olivochromogenes	Glucose, xylose, ribose, arabinose	-	80	8.0-9.0	Mg^{2+}, Co^{2+}	-	22
S. phaeochromogenes NRRL B-3559	Glucose	0.25	80	8.0	Mg^{2+}	40(70°c, 24 h)	35
	xylose	-					

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

40 % Sanchez และ Smiley พบว่าเอนไซม์จาก S. albus สามารถทนความร้อนได้ที่ 70 องศาเซลเซียสนาน 24 ชม. โดยมีการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตีน้อยมาก เมื่อบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีทั้ง Mg^{2+} และ Co^{2+} (30) เป็นต้น

การตรึงเซลซึ่งมีเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ภายใน

เนื่องจากในปัจจุบันเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสมีความสำคัญทางการค้ามาก จึงได้มีการคิดค้นหาเทคนิคที่จะนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างมีประสิทธิภาพและเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด วิธีการตรึงเอนไซม์หรือเซลไว้กับตัวยึด (carrier) ก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดค่าใช้จ่ายได้ เนื่องจากเอนไซม์หรือเซลนั้นสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ การตรึงเซลนั้นมีข้อได้เปรียบกว่าการตรึงเอนไซม์คือ ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายและเวลาในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์, ขจัดปัญหาเกี่ยวกับการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ และลดปัญหาการปะปนจากเชื้ออื่น (contamination) วิธีการตรึงเซลมีอยู่หลายวิธี คือโดยการใช้ความร้อน (heat treatment), โดยการตกตะกอน (flocculation) โดยการหุ้มหรือโอบล้อม (entrapment), โดยการเกาะติด (adsorption) และการเชื่อมโยง (cross-linking)

จากที่กล่าวมาแล้วว่าเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ที่สร้างอยู่ในเซล ซึ่งมีข้อเสียคือ เซลจะแตกสลายที่อุณหภูมิระหว่าง 15-50องศาเซลเซียส (44) ทำให้เอนไซม์ออกมาอยู่นอกเซล ซึ่งทำให้มีโอกาสสูญเสียแอคติวิตีได้ อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่สามารถทนความร้อนได้สูง Takasaki (45) ได้รายงานว่าเมื่อเซลของ Streptomyces sp. ถูกนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่ภายในเซล แม้นำเซลดังกล่าวไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะต่อการแตกสลาย (autolysis) เซลก็จะไม่สูญเสียเอนไซม์ดังกล่าว

ในปี 1972 Lloyd และคณะ (46)ได้รายงานว่า เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจะถูกตรึงอยู่ในเซลของ Streptomyces sp. เมื่อนำเซลนั้นไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียสในช่วง pH 7.0-8.0 เป็นเวลา 10-20 นาที ซึ่ง Lloyd ได้ให้เหตุผลว่าสาเหตุที่เซลไม่แตกสลาย เนื่องจากเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเซลนั้นสูญเสียสภาพธรรมชาติไประหว่างที่มีการตรึงเอนไซม์ด้วยความร้อน นอกจากนี้ Takasaki ยังพบว่าถ้าใส่ $CoCl_2$ ในปริมาณ 0.001-0.01 โมลาร์ในขณะที่ตรึงเอนไซม์จะช่วยให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีน้อยลง (47)

Takata และคณะ (48) ได้ทดลองตรึงเซลของ S. phaeochromogenes โดยใช้

โซเดียมอัลจิเนทและแคปปา-คาราจีแนน (kappa-carrageenan) เนื่องจากวิธีนี้ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีน้อยกว่าการตรึงเซลโดยใช้โพลีอะคริลามายด์ (polyacrylamide) แต่ 2 วิธีนี้ก็ยังมีข้อเสียคือ แคลเซียมไอออนที่ใช้ทำให้เกิดเจลสำหรับอัลจิเนทนั้นจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วนแคปปา-คาราจีแนนก็ไม่สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสได้เพราะจะทำให้คาราจีแนนหลอมละลาย

มีวิธีการตรึงเซลวิธีหนึ่งที่นำเทคนิคพื้นฐานหลาย ๆ วิธีมารวมกัน (49) โดยนำเซลของ S. phaeochromogenes ไปตรึงเอนไซม์ด้วยความร้อน แล้วนำไปผสมรวมกับคอลลาเจน (collagen) ซึ่งมี pH 6.5 ค่อย ๆ ปรับ pH ให้เป็น 11.2 นำไปแผ่เป็นแผ่นบาง ๆ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแช่ในกลูตารัลดีไฮด์หรือฟอร์มัลดีไฮด์ พบว่าเซลที่ถูกตรึงบนคอลลาเจนนี้นำไปใช้เปลี่ยนกลูโคสให้เป็นฟรุคโตสแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้นานถึง 40 วัน

นอกจากนี้ก็มีการตรึงเซลของ S. phaeochromogenes (50) โดยนำไปผสมกับไคโตแซนที่ละลายอยู่ในกรดอะซิติค (pH 6.0) จะได้ตะกอนของเซลกับไคโตแซน นำไปแช่ในกรดซิตริค ทำให้เป็นเม็ดแล้วเป่าให้แห้ง วิธีนี้คล้าย ๆ กับการตรึงเซลของ Streptomyces บางสายพันธุ์ ซึ่งผสมเซลกับเกลือซิลิเคท หรือเกลือฟอสเฟต หรือเกลือคาร์บอเนต ในสารละลายไคโตเซน เซลที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะมีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) 357, 276 และ 340 หน่วย/กรัม น.น.เซลแห้ง ตามลำดับ (51-53)

วิธีการตรึงเซลนั้นยังมีอีกหลายวิธี ซึ่งได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 4 ตามเทคนิคพื้นฐานที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น วิธีการตรึงเซลที่นับว่าแปลกใหม่ก็คือ การตรึงเอนไซม์กลูโคอะมายเลส (glucoamylase) ที่ได้จากเชื้อ Rhizopus sp. กับเซลของ Streptomyces sp. ซึ่งมีเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ภายใน โดยใช้สารพวก Toluene diisocyanate, xylene diisocyanate, epichlorohydrin และกลูตารัลดีไฮด์ เชื่อมระหว่างเอนไซม์กับเซล วิธีนี้จะสามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำเชื่อมฟรุคโตสได้โดยตรง (54) การใช้เทคนิคการตรึงเซลที่มีเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ภายในมาผลิตน้ำเชื่อมที่มีฟรุคโตสเป็นองค์ประกอบสูงในระดับอุตสาหกรรมนี้ได้รับความสนใจอย่างมาก (18, 55)

การตรึงเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

ถึงแม้การตรึงเซลจะมีข้อได้เปรียบกว่าการตรึงเอนไซม์ตรงที่ไม่ต้องแยกสกัดเอนไซม์ออกจากเซลและทำให้บริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ แต่สำหรับการตรึงเอนไซม์นั้นพบว่าเอนไซม์สามารถ

011292

ตารางที่ 4. การตรึงเซลซึ่งมีเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ภายในโดยวิธีต่าง ๆ (55)

Microorganism	Immobilization method	Remarks	Company or Institution
Arthrobacter sp. Streptomyces sp. Saccharomyces sp.	Flocculation by a polyelectrolyte	Flocculated cells were used in a colum reactor	R.J. Reynolds Tobacco
Lactobacillus brevis Streptomyces sp.	Flocculation by chitosan	Half life of 25 days at 65°c	National Food Research Inst., Japan
S. venezuelae	Microencapsulation in a colloidion membrane	-	McGill University
S. venezuelae	Entrapment in collagen membranes	column reactor operated 40 days at 70°c	Rutgers University
-	Entrapment in cellulose triacetate membranes	-	Purdue University

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4. (ต่อ)

Microorganism	Immobilization method	Remarks	Company or Institution
S. phaeochromogenes	Cell crosslinked with diazotized diamines	Crosslinked cells retained 18 % of original activity	Baxter Laboratories
Streptomyces sp.	Adsorption to DEAE-sephadex A-50	Column lost 20 % activity after 40 days at 60°c	Denki Kagaku Kogyo, K.K.
S. griseus	Adsorption to celite particles attached to anion exchange resin	-	Denki Kagaku Kogyo, K.K.
S. griseus S. olivacens	Entrapment in poly-acrylamide gel	-	Tanabe Seiyaku
S. albus	Flocculation by cationic electrolyte	-	-
Streptomyces sp.	Entrapment in polyacry-lamide gel	Gel used in sheets in plate frame reactor	Osaka University

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4. (ต่อ)

Microorganism	Immobilization method	Remarks	Company or Institution
Streptomyces sp.	Cells crosslinked with diazotized benzidine	Useful half life of 5 days	Corning Glass
Actinoplanes missouriensis	Cell entrapped in ∝-cellulose fibers	Fibers lost no activity during 20-day continuous operation at 60°c	University of Helsinki
S. violaceoniger	Filtration recovery of mycelia pellets	Pellets recycled six times	Roquette Freres
S. olivacens	Crosslinking with glutaraldehyde	Cells used over 1,000 hr. continuously with little lost of activity	Miles Laboratories
S. phaeochromogenes	Crosslinking with diazotized 3,6-diaminoacridine	48 % activity remained after 20 reactions	Baxter Laboratories

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4. (ต่อ)

Microorganism	Immobilization method	Remarks	Company or Institution
S. phaeochromogenes	Entrapment in polyacryl-amide gel	-	Nagase Scientific K.K.
Streptomyces sp.	Heat treatment used to "fix" enzyme in cells	Heat treated mycelia used in continuous reactor	Inst. Microbiol.Tech-nology
Arthrobacter sp.	Cells adsorbed to glass beads	Column reactor used	Standard Brands Inc.
Streptomyces sp.	Heat treated cells coated on filter	Process operated commercially	Clinton Corn Processing Co.
Streptomyces sp.	Entrapment in polyacryl-amide gel	Vertical gel plate reactor employed	Osaka University
Streptomyces sp.	Adsorption to DEAE-Sephadex	Column reactor continuously isomerizes glucose for 40 days	Denki Kagaku Kogyo K.K.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกาะกับตัวกลางได้ดีกว่าเซล และเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวกลางที่เหมาะสมจะสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสได้เร็วกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซล ที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นการรวบรวมวิธีการตรึงเอนไซม์อย่างย่อ ๆ บางวิธีเท่านั้น

เริ่มแรก Strandberg และ Smiley (35) ได้ตรึงเอนไซม์ของ S. phaeochromogenes NRRL B-3559 ด้วยโพลีอะคริลามายด์ แต่เอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายในจะสูญเสียแอคติวิตีในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส ทำให้ไม่ค่อยนิยมใช้วิธีนี้ ต่อมาก็ได้ตรึงเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อตัวเดิมบนเม็ดแก้วรูพรุน เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเม็ดแก้วนี้มีครึ่งชีวิตในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสประมาณ 12-14 วัน (55)

Lee และคณะ (56) ได้ตรึงเอนไซม์ที่ได้จาก Streptomyces sp. บน ZnO_2 ที่เคลือบอยู่บนเม็ดแก้วรูพรุน เอนไซม์ที่ถูกตรึงนี้จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 56 % และมีครึ่งชีวิตมากกว่า 200 วัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ก็มีการตรึงเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสกับ DEAE-cellulose เช่นเอนไซม์ของ S. flavogriseus (57) เมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงนี้ไปบรรจุในคอลัมน์แบบ plug-flow พบว่าหลังจากเอนไซม์ทำงานไปได้ 5 วันที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 75 % เมื่อมี Mg^{2+} และ Co^{2+} อยู่ในสารละลายกลูโคส แต่ถ้าขจัดเอา Co^{2+} ออกเอนไซม์แอคติวิตีจะลดลงเหลือ 65 %

บริษัท CPC International (58) พบว่า เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่กับแมกนีเซียมคาร์บอเนตจะมีแอคติวิตีสูง เอนไซม์ดังกล่าวได้มาจากเชื้อสกุล Streptomyces เอนไซม์ที่ถูกตรึงนี้มีแอคติวิตีอย่างน้อยที่สุดประมาณ 175 หน่วย/กรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสได้อย่างน้อยประมาณ 45 %

นอกจากนั้นก็ได้มีการนำ Porous alumina, Zirconia หรือ titania มาใช้ตรึงเอนไซม์ของ Streptomyces sp. (59,60) ซึ่งสารเหล่านี้ทนต่อสภาพที่เป็นด่างได้ดีโดยไม่สึกกร่อน การตรึงเอนไซม์วิธีนี้เหมาะสำหรับคอลัมน์แบบ plug-flow

Stanley และคณะ (61) ได้ตรึงเอนไซม์ของ S. phaeochromogenes บนไคตินโดยใช้กลูตาร์ลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมโยง วิธีนี้จะมีเอนไซม์แอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 40 %

ประโยชน์ของน้ำเชื่อมฟรุคโตส

น้ำเชื่อมฟรุคโตสมาตรฐานที่ได้จากการเปลี่ยนน้ำเชื่อมกลูโคส ประกอบด้วยฟรุคโตส 42 % กลูโคส 50 % และน้ำตาลโมเลกุลสูงอีก 8 % คุณสมบัติของน้ำเชื่อมฟรุคโตสที่ได้ไม่มีสี,

ไม่มีกลิ่น และมีความดันออสโมติคสูง จึงมีความสามารถในการต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลานานโดยไม่ตกผลึก (62)

น้ำเชื่อมฟรุคโตสเป็นที่นิยมใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร (63) เช่น เครื่องดื่มประเภทน้ำหวานและน้ำอัดลม, ผลไม้กระป๋อง, น้ำผลไม้กระป๋อง, ช็อสมะเขือเทศ, ขนมหวาน เช่น ลูกกวาดและลูกอม, ขนมอบ, อาหารหมัก, เครื่องปรุงรส, อาหารประเภทนมเนย และไวน์ เป็นต้น การใช้น้ำเชื่อมฟรุคโตสอาจใช้ในลักษณะน้ำเชื่อมจากแป้งโดยตรง หรืออาจใช้ในลักษณะของน้ำเชื่อมผสม เช่น ผสมกับน้ำตาลซูโครส หรือน้ำตาลกลูโคส ขึ้นอยู่กับลักษณะของการใช้ เช่น ในอุตสาหกรรมไวน์ จะใช้น้ำตาลกลูโคสในขั้นแรกเพื่อการเจริญของเชื้อ แล้วเติมน้ำตาลฟรุคโตสในระยะหลังของการหมักเพื่อเพิ่มความหวาน

ได้มีการศึกษาและเป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่า ฟรุคโตสเป็นน้ำตาลที่ใช้ได้ดีกับผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน โดยพบว่าฟรุคโตสจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วยได้ดี และ 80% ของน้ำตาลฟรุคโตสจะถูกเมตาโบไลส์ที่ตับ เปลี่ยนเป็นกลูโคสหรือไกลโคเจน (64)

นอกจากนั้นยังมีรายงานอีกว่า ฟรุคโตสเป็นน้ำตาลที่ทำให้การเกิดโรคฟันผุค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อใช้ซูโครส (65) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าฟรุคโตสสามารถจัดเป็นน้ำตาลทดแทนที่ให้คุณประโยชน์ค่อนข้างสูง

ในประเทศไทยนั้นมีวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น ฟางข้าว, เปลือกข้าวโพด และซังข้าวโพด เป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ประเทศไทยยังเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ในดินมากมายหลายชนิด ทั้งยังมีผลผลิตจำพวกแป้งเป็นจำนวนมาก เช่น มันสำปะหลัง และข้าวโพด จึงน่าที่จะมีการศึกษาเอนไซม์กลูโคสไอโซ-เมอเรสในจุลินทรีย์เหล่านี้ เพื่อนำมาผลิตน้ำเชื่อมฟรุคโตสซึ่งจะช่วยให้เศรษฐกิจของประเทศดีขึ้นอีกทางหนึ่ง โดยสามารถเปลี่ยนผลิตผลทางเกษตรกรรมให้เป็นผลิตผลทางอุตสาหกรรม

การวิจัยนี้จะกล่าวถึงการแยกเชื้อ Streptomyces sp. จากตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย เช่น จากนาข้าว, ฟางข้าวผุ, แกลบจากโรงสีที่ถูกทับถมเป็นเวลานาน, ดินสวนยาง, ดินจอมปลวก, ดินบริเวณที่มีการผุพังของต้นไม้หรือใบไม้ เป็นต้น และการตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส นอกจากนี้จะกล่าวถึงการศึกษาลักษณะและการจำแนกชนิดของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงสุด และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซล รวมทั้งสภาวะและส่วน

ประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ และเทคนิคในการตรึงเซลพร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติบางประการของเซลที่ถูกตรึง.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย