



1. Bucke, C. Industrial Glucose Isomerase in Enzyme and Fermentation Biotechnology. (Wiseman, A. ed.) pp. 147 - 171, John Wiley & Sons Inc., New York, 1977.
2. Richard, L.A., William, C. and Bern, J.C. Glucose Isomerase Production of High-Fructose Syrups. in Applied Biochemistry and Bioengineering Vol. 2. (Lamuel, B.W., Ephraim, K.K. and Leon, G.S. eds.) pp. 97 - 155, Academic Press, New York, 1979.
3. Speck, J.C., Jr. "The Lobry De Bruyn-Alberda Van Ekenstein Transformation". Adv. Carbohyd. Chem. 13 (1958) : 63 - 103.
4. MacAllister, R.V., Lloyd, N.E., Oworschack, R.G. and Nelson, W.J. "Improvements in or Relating to Fructose-Containing Syrups". Brit. Pat. 1,267,119. March 15, 1972.
5. Marshall, R.O. and Kooi, E.R. "Enzymatic Conversion of D-Glucose to D-Fructose". Science 125 (1957) : 648 - 649.
6. Tsumura, N. and Sato, T. "Enzymatic Conversion of D-Glucose to D-Fructose. Part VI. Properties of the Enzyme from Streptomyces phaeochromogenus". Agric. Biol. Chem. 29 (1965) : 1129 - 1134.
7. Takasaki, Y., Kosugi, Y. and Kanbayashi, A. "Studies on Sugar-isomerizing Enzyme Purification, Crystallization and Some Properties of Glucose Isomerase from Streptomyces sp". Agric. Biol. Chem. 33 (1969) : 1527 - 1534.

8. Natake, M. and Yoshimura, S. "Studies on Glucose Isomerase of Bacteria. I. Formation of Glucose Isomerase by Aerobacter aerogenes strain HN-56, and Its Relationship to Xylose Isomerase". Agric. Biol. Chem. 27 (1963) : 342 - 348.
9. Takasaki, Y. and Tanabe, O. "Formation of Fructose from Glucose by Bacteria. I. Properties of Glucose Isomerase". Hakko Kyokaishi 20 (1962) : 449 - 455.
10. Takasaki, Y. and Tanabe, O. "NAD-linked D-Glucose - isomerizing and D-mannose - isomerizing Enzyme from Paracolobactrum aerogenoides". Agric. Biol. Chem. 28 (1964) : 740 - 741.
11. Weber, P. "Glucose Isomerase from Streptomyces glaucescens". Ger. Pat. 2,408,708. Sep. 5, 1974.
12. Meers, J.L. "Production of Glucose Isomerase". U.S. Pat. 4,059,489 July 30, 1974.
13. Chen, W.P. "Glucose Isomerase (a Review)". Process Biochem. 15 (1980) : 30 - 35.
14. Yoshimura, S., Danno, G. and Natake, M. "D-Glucose Isomerizing Activity of D-Xylose Grown Bacterial Cells Similar to Bacillus coagulans strain HN-68. I. Description of the Strain and Conditions for Formation of the Activity". Agric. Biol. Chem. 10 (1966) : 1015 - 1023.
15. Shieh, K.K. "Media Containing Molasses and Corn Steep Liquor for Producing Glucose Isomerase from Actinoplanes sp. and Method". U.S. Pat. 3,992,262. Nov. 16, 1976.

16. Shieh, K.K. "Media Contain Molasses and Soy Flour For Producing Glucose Isomerase and Method". U.S. Pat. 4,003,793.  
Jan 18, 1977.
17. Shieh, K.K. and Donnelly, B.J. "Method of Making Glucose Isomerase and of Converting Glucose to Fructose". U.S. Pat. 3,813,320 May 28, 1974.
18. Long, M.E. "Process of Preparing Glucose Isomerase". U.S. Pat. Reissue. 29,692 July 4, 1978.
19. Long, M.E. "Process of Preparing Glucose Isomerase". U.S. Pat. Reissue 29,691 July 4, 1978.
20. Outtrup, H. "Production of Glucose Isomerase By Bacillus coagulans". U.S. Pat. 3,979,261 Sept. 7, 1976.
21. Suekane, M., Kanno, M. and Hasegawa, S. "Thermophilic Glucose Isomerase Enzyme Preparation". U.S. Pat. 3,826,714  
Oct 26, 1974.
22. Coker, L.E. and Gardner, D.E. "Glucose Isomerizing Enzyme". U.S. Pat. 3,956,066 May 11, 1976.
23. Kojima, I., Sato, H. and Fujiwara, Y. "Process For Producing Glucose Isomerase". U.S. Pat. 4,086,138 April 25, 1978.
24. Kelly, J.M. and Meers, J.L. "Process for the Preparation of Glucose Isomerase Using Curtobacterium sp." U.S. Pat. 4,053,361 Oct 11, 1977.
25. Lee, C.K. and Salem, W. "Preparation and Use of Glucose Isomerase". U.S. Pat. 4,061,539 Dec. 6, 1977.

26. Horwath, R.O. and Cole, G.W. "Process for Enzymatically Isomerizing Glucose to Fructose". U.S. Pat. 3,829,362 Aug. 13, 1974.
27. Hirota, T., Hishida, T., Kamata, A., Nakazawa, I. and Takamisawa, H. "Method For Preservation of Aqueous Glucose Isomerase Solution". U.S. Pat. 4,106,993 Aug. 15, 1978.
28. Weber, P. "Process for Preparing Glucose Isomerase Using Streptomyces glaucescens Mutants". U.S. Pat. 4,137,126 Jan. 30, 1979.
29. Cory, R.P. "Stabilized Glucose Isomerase Enzyme Concentrate". U.S. Pat. 4,077,842 Mar. 19, 1978.
30. Zienty, M.F. "Enzyme Stabilization". U.S. Pat. 3,779,869 Dec. 18, 1973.
31. Takasaki, Y. and Tanabe, O. "Enzyme Method For Converting Glucose in Glucose Syrups to Fructose". U.S. Pat. 3,616,221 Oct. 26, 1971.
32. Bailey, J.E. and Ollis, D.F. Isolation and Utilization of Enzymes in Biochemical Engineering Fundamentals. (Bailey, J.E. and Ollis, D.F. eds.) pp. 215, McGraw-Hill Kogakusha Ltd., 1977.
33. Vaheri, M. and Kauppinen, V. "Improved Microbial Glucose Isomerase Production" Process Biochem. 12 (1977) : 5 - 8.
34. Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Nishida, Y. and Chibata, T. "Using Carrageenan as Matrix" Biotech. Bioeng. 21 (1979) : 1697 - 1709.

35. Shieh, K.K., Lee, H.A. and Donnelly, B.J. "Manufacture and Use of Glucose Isomerase" Brit. Pat. 1,399,408 Apr. 25, 1974.
36. Dworchack, R.G., Chen, J.C., Lamm, W.R. and Davis, L.G. "Sorbitol for Increased Production by Streptomyces" U.S. Pat. 3,736,232 May 29, 1973.
37. Bengtson, B.L. and Lamm, W.R. "Process for Isomerizing Glucose to Fructose" U.S. Pat. 3,654,080 Apr. 4, 1972.
38. Bengtson, B.L. and Lamm, W.R. "Enzymatic Isomerizing of Glucose and Fructose" Brit. Pat. 1,368,511 Nov. 9, 1974.
39. Brownwell, C.E. and Streets, B.W. Jr. "Glucose Isomerase" Brit. Pat. 1,376,781 Oct. 26, 1974.
40. The Agency of Industrial Science and Technology. "Glucose Isomerizing Enzyme" Brit. Pat. 1,361,846 May. 5, 1974.
41. Takasaki, Y. "Sugar - isomerizing Enzyme. Production and Utilization of Glucose Isomerase from Streptomyces species". Agric Biol Chem. 39 (1966) : 1247 - 1253.
42. Nand, K., Srikanta, S., Joseph, R., Shanthamma, M.S. and Murthy, V.S. "Production of Glucose Isomerase by Streptomyces fradiae". Indian. J. Exp. Biol. 15 (1977) : 668 - 669.
43. Armbruster, F.C., Heady, R.E. and Cory, R.P. "Xylose (glucose) Isomerase Enzyme Composition". Brit. Pat. 1,411,763 Mar. 22, 1975.

44. Shieh, K.K., Lee, H.A. and Donnelly, B.J. "Method of Making Glucose Isomerase and Using Same to Convert Glucose to Fructose". U.S. Pat. 3,834,988 Oct. 10, 1972.
45. Lee, C.K., Lawrence, E.L. and Magaret, C. "Fructose Production by Fermentation of Glucose with Arthrobacter strains". Brit. Pat. 1,328,970 May 27, 1973.
46. Robinson, J.W. and Food Technical Service Staff. "Will High Fructose Corn Syrup Sweeten Your Future ?" Food Eng. 47 (1975) : 57 - 61.
47. ฝ่ายวิจัยและวางแผน "อุตสาหกรรมอาหาร (แป้ง)" รายงานผลการวิจัยบริษัทเงินทุนอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย 2527.
48. วรรณญา ผ่านเจริญ "สถานการณ์และศักยภาพของ เอนไซม์ย่อยแป้งในประเทศไทย" รายงานผลการวิจัยกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และการพลังงาน 2528.
49. นฤมล คู่ภรรยา "การศึกษากลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2526.
50. ขจีนาฏ จรรยาอุดม "การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการศึกษาคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2528.
51. Kasumi, T., Hayashi, K. and Tsumura, N. "Purification and Enzymatic Properties of Glucose Isomerase from Streptomyces griseofuscus, S-41" Agric. Biol. Chem. 45 (1981) : 619 - 627.

52. Chen, W.P., Anderson, A.W. and Han, Y.W. "Production of Glucose Isomerase by Streptomyces flavogriseus" Appl. Environ. Microbiol. 37 (1979) : 324 - 331.
53. Suminoe, K. and Okamura, K. "Manufacturing Method of Xylose with Cottonseed Hulls as Material" U.S. Pat. 3,565,687 Feb. 23, 1971.
54. Takasaki, Y., Kosugi, Y. and Kanbayashi, A. Streptomyces Glucose Isomerase in Fermentation Advances (Perlman, D. ed.) pp. 561 - 570. Academic Press Inc., New York, 1969.
55. Dische, Z. and Borenfreund, E. "A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses". J. Biol. Chem. 192 (1951) : 583 - 587.
56. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. "Protein Measurement with Folin Phenol Reagent". J. Biol. Chem. 193 (1951) : 265 - 275.
57. Bernfeld, P. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$  in Methods in Enzymology. (Colowick, P.S. and Kaplan, O.N. eds.) Vol. I. pp. 149, Academic Press Inc., New York, 1955.
58. Huggett, A. St. G. and Nixon, D.A. "Enzymatic Determination of Blood Glucose". Biochem. J. 66 No. I (1957) : 12.
59. Goodwin, J.F. "Micromethod for Measuring Pentoses by Use of an Aniline Reagent". Clin. Chem. 17 No. 5 (1971) : 397 - 399.

60. Zittan, L., Poulsen, P.B., and Hemmingsen, S.H. "Sweetzyme - A new Immobilized Glucose Isomerase". Die Stärke 27 (1975) : 236 - 241.
61. Takasaki, Y. "Glucose Isomerase" Jap. Pat. 7,673,184 Jun. 24, 1976.
62. พิเชษ อธิฐกอ "การผลิตแอลฟาอะไมเลสจาก Bacillus amyloliquefaciens KA 63" วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2528.
63. Diers, I.V. and Vaerlose, L. "Method For Producing Glucose Isomerase". U.S. Pat. 4,042,460 Aug. 16, 1977.
64. Amotz, S.M., Nelsen, T.K. and Thiesen, N.O. "Immobilization of Glucose Isomerase". U.S. Pat 3,980,521 Sept. 14, 1976.
65. Paabo, G.J. and Uesson, A.M. "Process of Extracting Sugar from Dried Alkali Metal or Alkali Earth Metal Sulfite Lye Residue". U.S. Pat 3,542,590 Nov. 24, 1970.
66. Steiner, K. and Lindlar, H. "Process for the Production of Xylose". U.S. Pat 3,586,537 June 22, 1971.
67. Friese, H. "Process for the Production of Xylose Solutions". U.S. Pat. 3,579,380 May 18, 1971.
68. Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F. (eds.) The Characteristics of Biological Material in Biochemical Engineering 2<sup>nd</sup> pp. 18 - 54, Academic Press Inc., New York, 1973.
69. Gutcho, S.J. (ed.) Microbial Enzyme Production in Chemical Technology Review No. 28 pp. 28 - 35, Noyes Data Corporation, New Jersey, 1974.



70. Takasaki, Y. and Kamibayashi, A. "Method of Converting Glucose into Fructose". U.S. Pat 3,753,858 Aug. 21, 1973.



1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 100 มล. ประกอบด้วย

ไซโลส (xylose)	1.0 กรัม
กลูโคส (glucose)	0.1 กรัม
เปปโตน (peptone)	1.0 กรัม
ยีสต์เอกซแทรก (yeast extract)	0.4 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ )	0.05 กรัม
วุ้นผง (agar)	2.0 กรัม
พีเอช 7.0	

อบฆ่าเชื้อที่ลภาวะมาตรฐาน (ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตร.นิ้ว, 121 องศาเซลเซียส, 15 นาที)

1.2 สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (starter or inoculum medium) ใน 100 มล. ประกอบด้วย

* สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด ( $H_2SO_4$ hydrolysate of com hulls)	3.0 มล.
ไซโลส	0.5 กรัม
เปปโตน	1.0 กรัม
ยีสต์เอกซแทรก	0.5 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1 กรัม
พีเอช 7.0	

อบฆ่าเชื้อที่ลภาวะมาตรฐาน

\* การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen และ Anderson (52) โดยนำเปลือกข้าวโพดอบแห้งที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ มา 3 กรัม ใส่ลงใน 100 มล. ของกรดกำมะถันเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.นิ้ว นาน 30 นาที กรองเอากากออก ปรับพีเอชของสารละลายที่สกัดได้ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 และ 1 นอร์มอล กรองตะกอนที่เกิดขึ้นทิ้งไป เก็บส่วนสารละลายไว้ใช้ต่อไป

### 1.3 สูตรอาหารสำหรับผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส จากการศึกษาการผลิตในขวดแก้วทรงกรวย

(49) โดย นฤมล ศุภจรรยา ใน 100 มล. ประกอบด้วย

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด	3	มล.
มอลท์ เอกซ์แทรก	1.0	กรัม
ยีสต์ เอกซ์แทรก	0.3	กรัม
โคบอลท์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )	0.01	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.94	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.06	กรัม
พีเอช	8.0	

อบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน

### 1.4 สูตรอาหารสำหรับผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ปรับปรุงใหม่จากการศึกษาการผลิตในถังหมัก

ขนาด 5 ลิตร ใน 100 มล. ประกอบด้วย

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ hydrolysate of defatted rice bran)	2.0 %	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ hydrolysate of soy bean meal)	0.5 %	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
ยีสต์ เอกซ์แทรก	0.3	กรัม
โคบอลท์คลอไรด์	0.01	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.47	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.03	กรัม
พีเอช	8.0	
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ hydrolysate of cottonseed hulls)	1.0 %	(น้ำหนักต่อปริมาตร)

อบฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตร.นิ้ว, 121 องศาเซลเซียส, 30 นาที

## 2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย



### 2.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ใน Lowry's Method

#### 2.1.1 สารละลายลอร์รี่ เอ (Lowry A) ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )	12	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมตาเตรท ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3,000	กรัม

#### 2.1.2 สารละลายลอร์รี่ บี (Lowry B) ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	50	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1,000	มล.

#### 2.1.3 สารละลายลอร์รี่ ซี (Lowry C) ประกอบด้วย

สารละลายลอร์รี่ เอ	50	ส่วน
สารละลายลอร์รี่ บี	1	ส่วน

#### 2.1.4 สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin ciocalteu's phenol reagent)

สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

### 2.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

#### 2.2.1 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid; DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ 20 มล. เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาเตรท 30 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 200 มล. เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล

### 2.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณกลูโคส

2.3.1 การเตรียมสารละลาย พี.จี.โอ. เอนไซม์ (P.G.O. Enzymes, Sigma chemical, U.S.A)

ละลาย พี.จี.โอ. เอนไซม์ 1 แคปซูล (capsule) ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส ออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย เปรอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วย และบัฟเฟอร์ในน้ำกลั่น 60 มล. เติมสารละลายของโอ-ไดอะนิซิน (O-dianisidine) 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอล (Ethanol) ปริมาตร 0.5 มล. ทำปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บไว้ในตู้เย็น

### 2.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณไฮโลล

2.4.1 การเตรียมสารละลายแอนนิลีน (aniline reagent)

ไธโอยูเรีย (thiourea)	1.5	กรัม
กรดอะซิติก (glacial acetic)	750	มล.
กรดบอริก (boric acid)	6	กรัม
แอนนิลีน (aniline)	100	มล.

เขย่าให้เข้ากัน และเติมกรดอะซิติกจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 สัปดาห์

### 3. การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของน้ำตาลฟรักโทส

ขั้นตอนดำเนินการมีดังนี้ เตรียมสารละลายของน้ำตาลฟรักโทสที่มีความเข้มข้น 2, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมล. บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1.0 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) เติม 0.2 มล. ของ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซีลเตฮิน ไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine - HCl) และ 6.0 มล. ของ 70 เปอร์เซ็นต์สารละลาย กรดซัลฟูริกเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 0.2 มล. ของ 0.12 เปอร์เซ็นต์อัลกอลฮอลิก คาร์บาโซล (alcoholic carbazole) ลงไปทันที เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง (ice bath) ทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสักครู่ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟรักโทสและค่าการดูดกลืนแสง

ประวัติ

นางสาวศิริลักษณ์ ธีระดากร เกิดวันที่ 23 มกราคม 2503 ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร  
ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ในปีการศึกษา 2524.

