บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ในขวดเขย่า

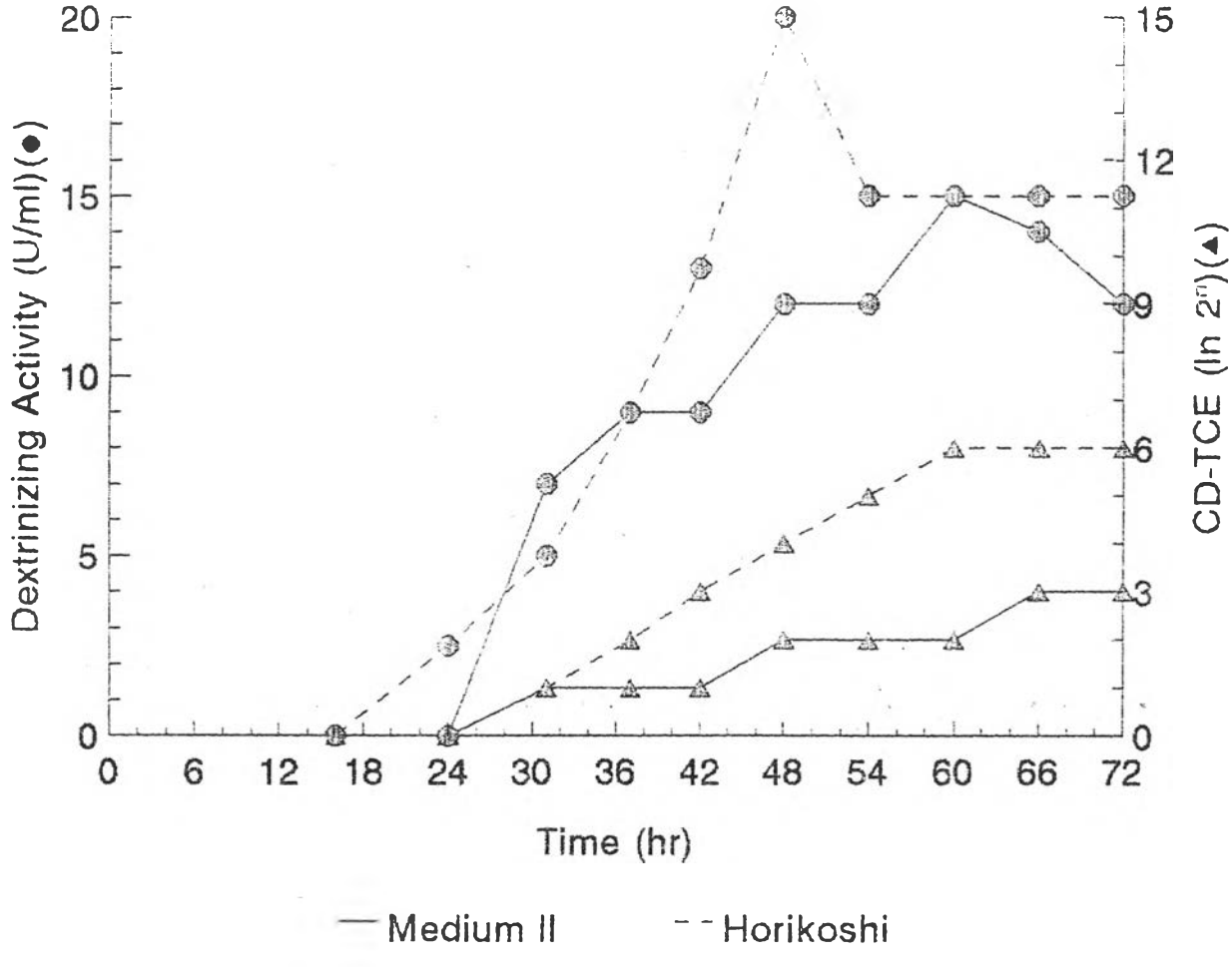
3.1.1 ผลการเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยง *Bacillus* A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Medium II และ Horikoshi's medium โดยใช้ soluble starch ความเข้มข้น 1 % เป็นส่วนประกอบ เขย่าที่ความเร็ว 200-250 รอบต่อนาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.1 พบว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus* A11 ใน Horikoshi's medium แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงใน Medium II ไม่ว่าจะวัดแอคติวิตีด้วยวิธี Dextrinizing หรือ CD-forming assay อีกทั้งเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียใน Horikoshi's medium แล้ว เวลาในการผลิตเอนไซม์ CGTase สูงสุดจะเร็วกว่าใน Medium II โดยใน Horikoshi's medium จะมี Dextrinizing activity หรือ CD-forming activity สูงสุดเมื่อเวลาประมาณ 48 และ 60 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนใน Medium II จะมี Dextrinizing activity หรือ CD-forming activity สูงสุดเมื่อเวลาประมาณ 60 และ 66 ชั่วโมงตามลำดับ

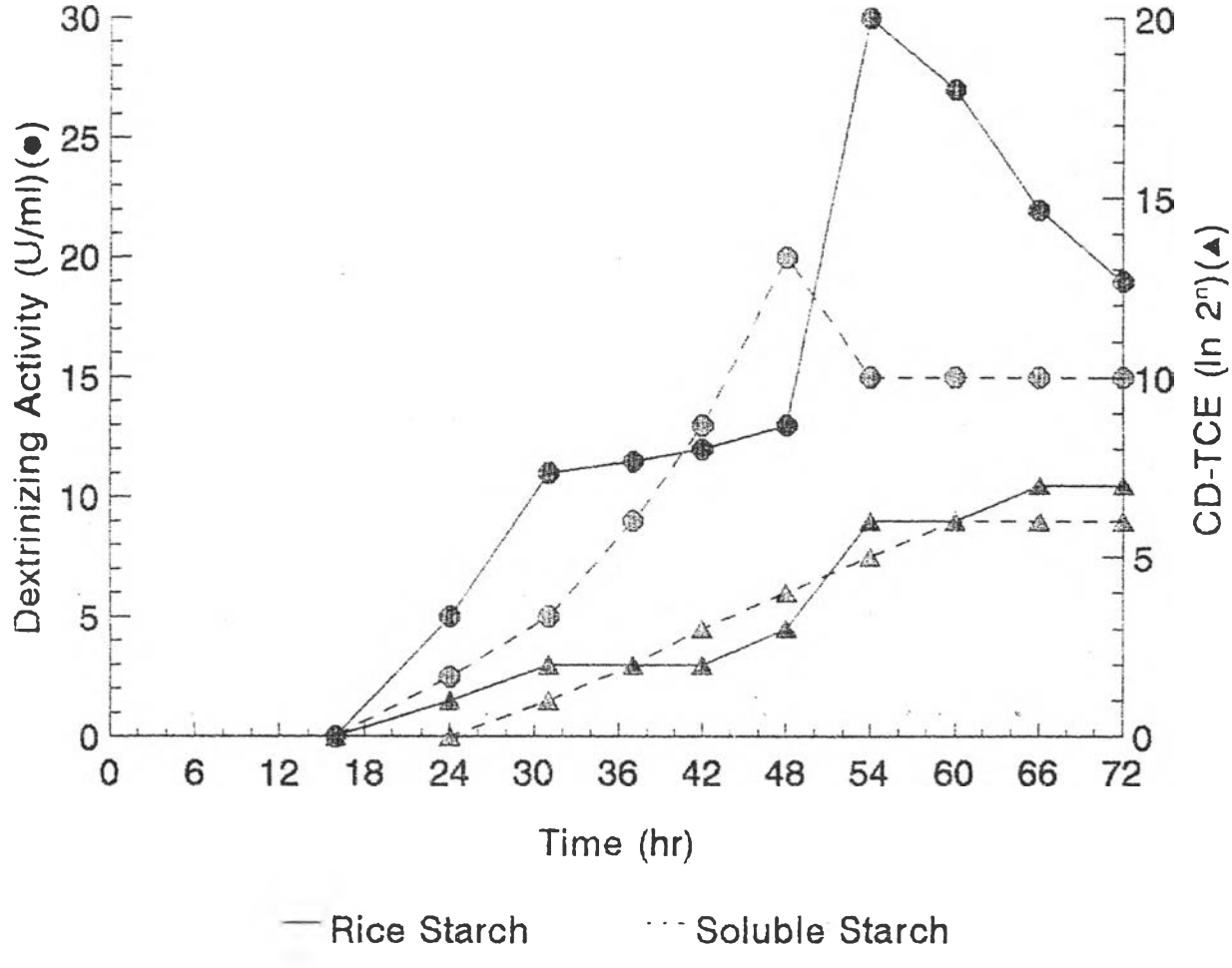
3.1.2 ผลการเปรียบเทียบชนิดของแป้ง

หลังจากได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase คือ Horikoshi's medium แล้ว ได้ทดลองใช้แป้งข้าวเจ้าใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน soluble starch โดยสืบเนื่องมาจากงานวิจัยของ วัลยา เตชชัยกุล (2534) ซึ่งพบว่าแป้งข้าวเจ้าสามารถทดแทน soluble starch ได้ดีในการเลี้ยง *Bacillus* A11 ใน Medium II ในงานวิจัยนี้ได้เลี้ยง *Bacillus* A11ใน Horikoshi's medium โดยใช้ soluble starch และแป้งข้าวเจ้า ความเข้มข้น 1 % เป็นส่วนประกอบและเปรียบเทียบ Dextrinizing activity หรือ CD-forming activity หลังจากเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 3.1.1

จากผลการทดลองในรูป 3.2 จะเห็นว่า แป้งข้าวเจ้าสามารถใช้ทดแทน soluble starch ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี โดย Dextrinizing และ



รูปที่ 3.1 เปรียบเทียบ Dextrinizing และ CD-forming activity ของ *Bacillus* A11 เมื่อเลี้ยงใน Medium II และ Horikoshi's medium ที่อุณหภูมิ 37°ซ



รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบ Dextrinizing และ CD-forming activity ของ *Bacillus* A11 เมื่อเลี้ยงใน Horikoshi's medium ที่มี 1 % แป้งข้าวเจ้าและ soluble starch เป็นส่วนประกอบ ที่อุณหภูมิ 37°ซ

CD-forming activity ของ เอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งข้าวเจ้าจะมีค่าสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี soluble starch เป็นส่วนประกอบ และเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าจะมีแอคติวิตีสูงสุดเร็วกว่าเมื่อใช้ soluble starch

3.1.3 **ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตที่เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ**

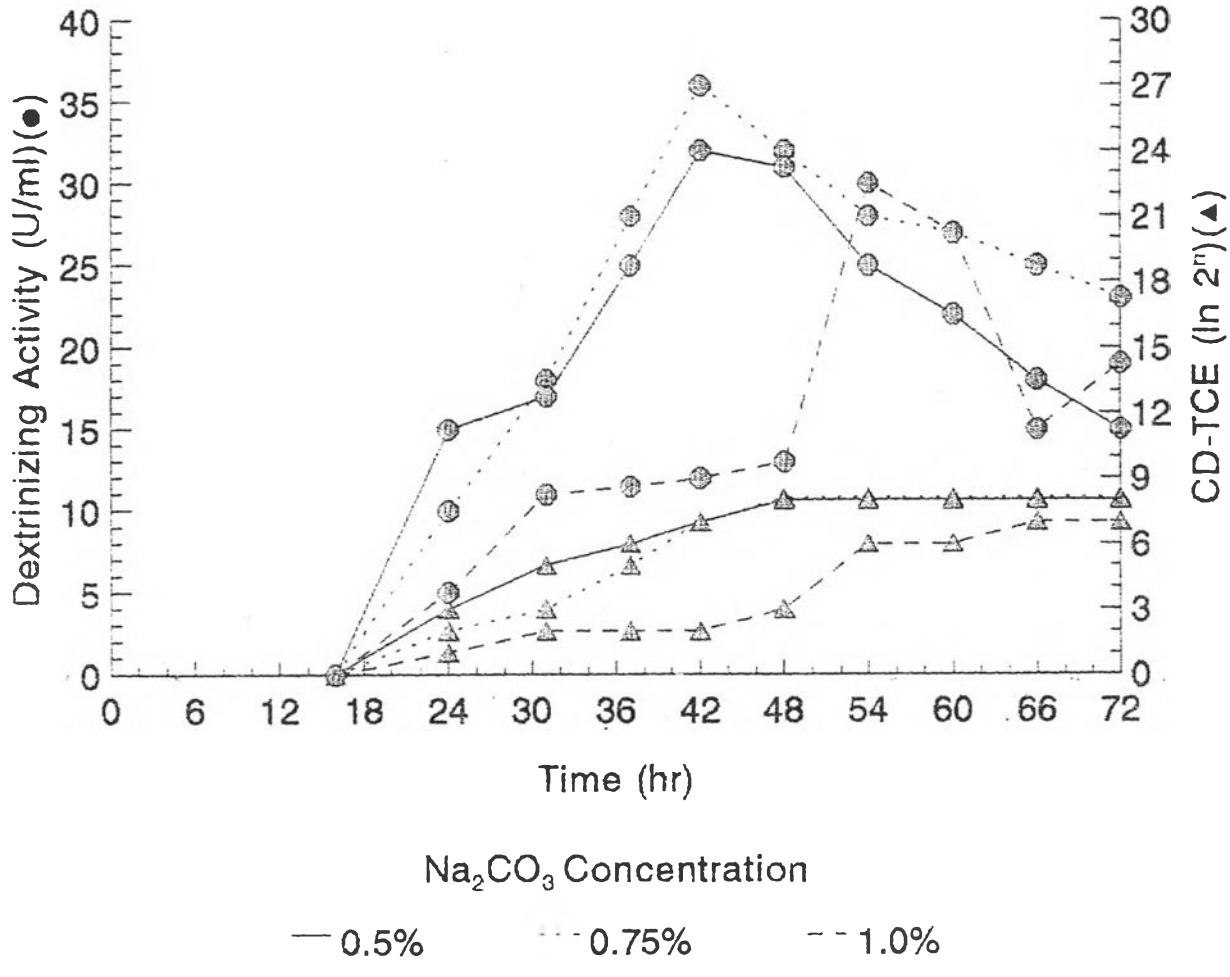
เมื่อเลี้ยง *Bacillus* A11 ใน Horikoshi's medium ที่มีแป้งข้าวเจ้า 1 % ที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตที่ใช้ตั้งแต่ 0.5-1.0 % ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 3.3 พบว่า *Bacillus* A11 จะผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีเมื่อเลี้ยงใน Horikoshi's medium ที่มีโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.75 % และเมื่อเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตแล้ว *Bacillus* A11 จะผลิตเอนไซม์ CGTase มีแอคติวิตีต่ำลง แต่จะเห็นว่าเมื่อใช้โซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 % เอนไซม์ CGTase จะมีแอคติวิตีดีกว่าเมื่อใช้โซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1.0 %

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ในระดับขวดเขย่าสามารถสรุปผลได้ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 3.1

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.2.1 **ผลของอัตราการป้อนอากาศ (Aeration rate)**

การผลิตเอนไซม์ในถังหมักจะทำให้ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง ซึ่งจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยปัจจัยหนึ่งที่น่าสนใจคืออัตราการป้อนอากาศ โดยเมื่อเจริญ *Bacillus* A11 ใน Horikoshi's medium ที่มี 1% แป้งข้าวเจ้าและ 0.75% โซเดียมคาร์บอเนต เป็นส่วนประกอบ โดย pH เริ่มต้นเป็น 10.1 และควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที แล้วแปรอัตราการป้อนอากาศตั้งแต่ 1-3 ลิตรต่อนาที ติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ตามวิธีข้อ 2.9 และ 2.10 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2 พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการป้อนอากาศมากขึ้น lag phase ของ *Bacillus* A11 จะสั้นลงอย่างเห็นได้ชัด (lag phase คือช่วงเวลาก่อนที่แบคทีเรียจะเจริญ) แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์ CGTase แล้ว *Bacillus* A11 จะผลิตเอนไซม์ CGTase มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อให้อัตราการป้อนอากาศ 2 ลิตรต่อนาที โดยเมื่อให้อัตราการป้อนอากาศเป็น 1 หรือ 3 ลิตรต่อนาที แอคติวิตีจำเพาะของ



รูปที่ 3.3 เปรียบเทียบ Dextrinizing และ CD-forming activity ของ *Bacillus* A11 เมื่อเลี้ยงใน Horikoshi's medium ที่เสริมด้วยโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-1.0 % ที่อุณหภูมิ 37°ซ

Medium	Maximum activity obtained		
	Dextrinizing		CD-TCE
	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	(dilution limit)
Horikoshi	20	40	2^6
Medium II	15	12	2^3
Horikoshi			
rice starch	30	60	2^7
soluble starch	20	40	2^6
Horikoshi (rice starch)			
0.5% Na_2CO_3	31	67	2^8
0.75% Na_2CO_3	36	78	2^8
1.0% Na_2CO_3	30	60	2^7

ตารางที่ 3.1 สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11

Aeration rate (l/min)	Lag phase (hr)	Maximum activity obtained: Dextrinizing Activity (U/ml)	Maximum activity obtained: Dextrinizing Specific activity (U/mg)	Maximum activity obtained: CD-TCE (dilution limit)
1	36	45	73	2^{7}
2	21	58	112	2^{8}
3	14	51	92	2^{8}

ตารางที่ 3.2 ผลของอัตราการป้อนอากาศต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใน Horikoshi's medium ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน โดยให้อัตราเร็วในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที

พระจอมเกล้า สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า อุตสาหกรรมมหาวิทยาลัย

เอนไซม์ CGTase จะต่ำกว่า ส่วน CD-forming activity จะมีค่าเท่ากันเมื่อให้อัตราการป้อนอากาศเป็น 2 และ 3 ลิตรต่อนาที

3.2.2 **ผลของอัตราเร็วในการกวน (Agitation speed)**

อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตในถังหมักเช่นกันคือ อัตราเร็วในการกวน ซึ่งเมื่อเจริญ *Bacillus* A11 ในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.2.1 โดยมีอัตราการป้อนอากาศเป็น 2 ลิตรต่อนาที แล้วแปรเปลี่ยนอัตราเร็วในการกวนเป็น 200, 300 และ 400 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ตามวิธีข้อ 2.9 และ 2.10 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.3 พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนทั้ง 3 ค่า *Bacillus* A11 จะมี lag phase ใกล้เคียงกันมาก แต่ที่อัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที *Bacillus* A11 จะผลิตเอนไซม์ CGTase มีแอคติวิตีสูงสุดทั้ง Dextrinizing และ CD-forming activity และจะสังเกตุเห็นว่า *Bacillus* A11 จะผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อัตราการกวนค่อนข้างต่ำเพราะเมื่อให้อัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ CGTaseมีค่าต่ำสุด

3.2.3 **รูปแบบการเปลี่ยน pH การเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase**

จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 จะเห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงใน Horikoshi's medium ที่มี 1% แป้งข้าวเจ้าและ 0.75% โซเดียมคาร์บอเนตเป็นส่วนประกอบ ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน โดยมีอัตราการป้อนอากาศ 2 ลิตรต่อนาที และอัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที จากผลการทดลองรูปที่ 3.4 พบว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus* A11 โดยไม่ควบคุม pH แล้ว แบคทีเรียจะเริ่มเจริญเมื่อ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลงประมาณ 1.5 หน่วย pH และในขณะเดียวกันก็จะเริ่มผลิตเอนไซม์ CGTase และหลังจากนั้น pH จะเริ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นเดียวกับแอคติวิตีของเอนไซม์และการผลิตเอนไซม์จะสูงสุดเมื่อ pH สูงขึ้นจนต่ำกว่า pH เริ่มต้น 0.6 หน่วย ซึ่งเป็นช่วงการเจริญระยะคงที่ (stationary phase)

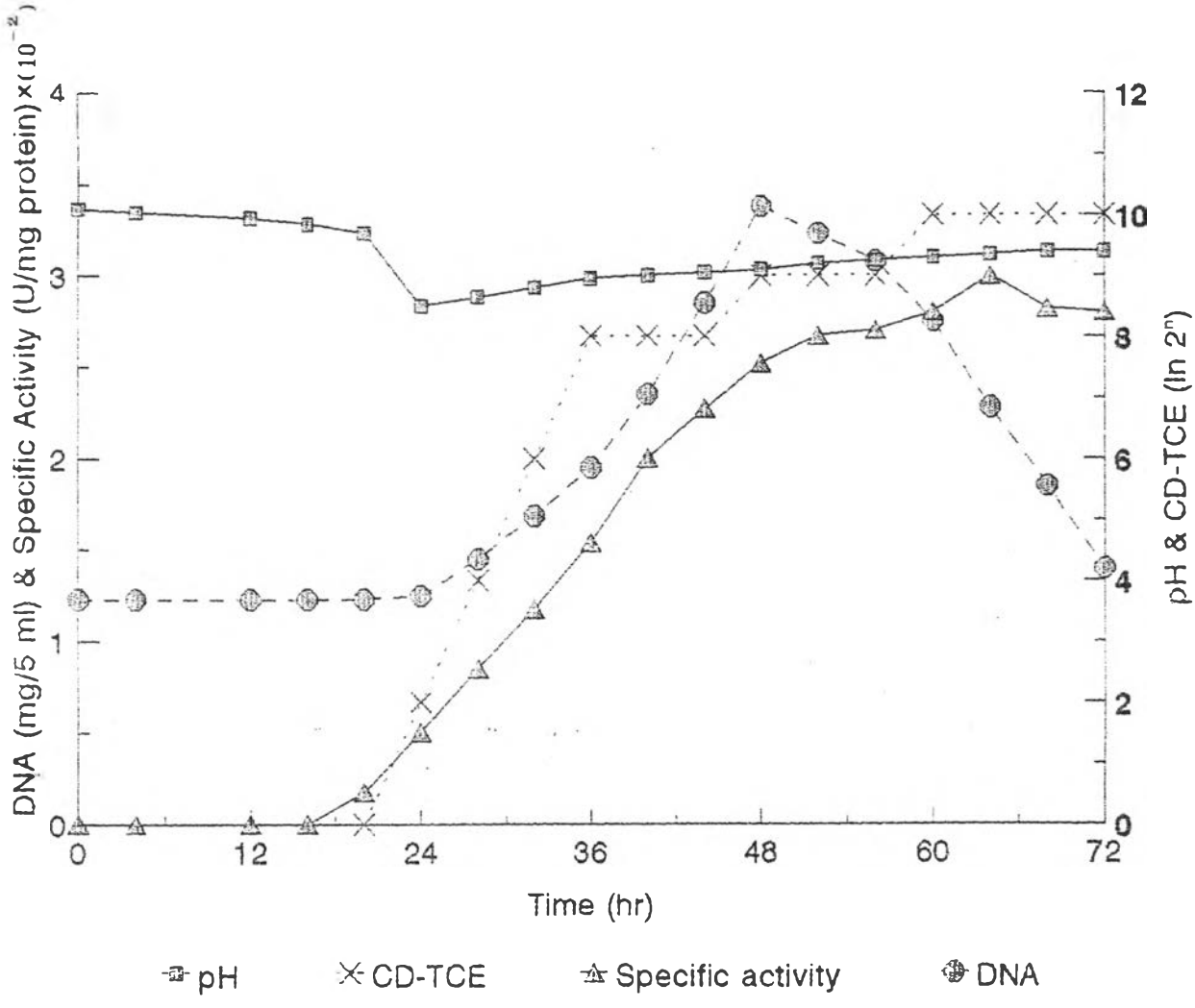
3.2.4 **ผลการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 และ *Bacillus circulans* ATCC 21783 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร**

Bacillus circulans ATCC 21783 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้ใน

117150097

Agitation speed (rpm)	Lag phase (hr)	Maximum activity obtained: Dextrinizing Activity (U/ml)	Maximum activity obtained: Dextrinizing Specific activity (U/mg)	Maximum activity obtained: CD-TCE (dilution limit)
200	25	72	190	2^{9}
300	23	155	300	2^{10}
400	21	58	112	2^{8}

ตารางที่ 3.3 ผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 เมื่อเจริญในสภาวะเดียวกับตารางที่ 3.2 โดยให้อัตราการป้อนอากาศเป็น 2 ลิตรต่อนาที



รูปที่ 3.4 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 เมื่อเจริญใน Horikoshi's medium ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน โดยมีอัตราการป้อนอากาศ 2 ลิตรต่อนาที และอัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที

อุตสาหกรรมการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ดังนั้นจึงได้นำมาศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase เปรียบเทียบกับ *Bacillus* A11 โดยเจริญแบคทีเรียทั้งสองชนิดในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.3 ซึ่งได้ผลตามตารางที่ 3.4 พบว่า lag phase ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดใกล้เคียงกัน และเช่นเดียวกับการผลิตเอนไซม์ CGTase พบว่า ทั้ง Dextrinizing และ CD-forming activity ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน

นอกจากนี้เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญของ *Bacillus circulans* ATCC 21783 ดังรูปที่ 3.5 จะพบว่าคล้ายกับของ *Bacillus* A11 ด้วย โดยแบคทีเรียจะเริ่มเจริญเมื่อ pH ลดลง พร้อมกับการผลิตเอนไซม์ โดย pH จะลดลงประมาณ 1.6 หน่วยpH หลังจากนั้นจะค่อยๆเพิ่มขึ้นและเอนไซม์จะมีค่าแอคติวิตีสูงสุดในช่วง stationary phase เมื่อ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่า pH เริ่มต้น 0.7 หน่วย

3.3 การทำให้เอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 บริสุทธิ์บางส่วน

หลังจากผลิตเอนไซม์ได้แล้ว นำเอนไซม์นี้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนก่อนเพื่อกำจัดโปรตีนตัวอื่นออกไปบ้างโดยนำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ไปผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 4°ซ ตามรูปที่ 2.2 (วิธีทดลองข้อ 2.13) ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.5 ซึ่งจะพบว่าในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์นั้น เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีในขั้นตอนการดูดซับด้วยแป้งและการล้างตะกอนด้วย 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ประมาณ 10.5 % และเมื่อชะเอนไซม์ออกจากแป้งด้วยบัฟเฟอร์เดิม ซึ่งมี 0.2 M มอลโตส พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ชะออกมาอยู่ในบัฟเฟอร์แล้ว จะมีแอคติวิตีจำเพาะ 3,170 Unit mg^{-1}protein ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าเอนไซม์ตั้งต้น 14 เท่า และเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้มาผ่าน Ultrafiltration จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 15.7 เท่า จากผลที่ได้จะพบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำมาตรึงแล้ว

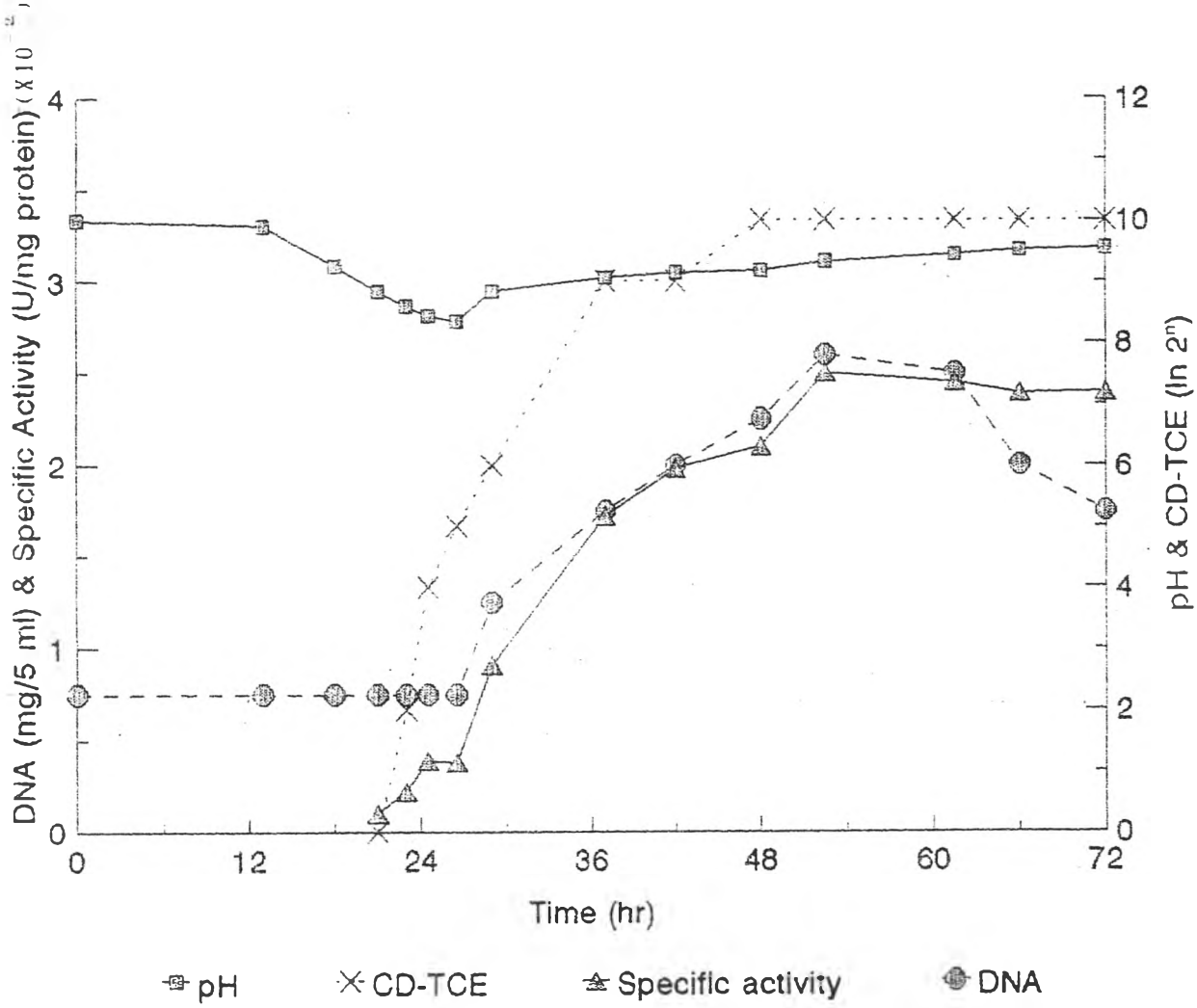
3.4 การตรึงเอนไซม์ CGTase

3.4.1 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการตรึงเอนไซม์

หลังจากเปลี่ยนสูตรอาหารสำหรับเลี้ยง *Bacillus* A11 เป็น Horikoshi's medium แล้ว จึงได้ทดลองตรึงเอนไซม์ CGTase ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว

Bacillus strain	Lag phase (hr)	Maximum activity obtained		
		Dextrinizing		CD-TCE
		Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	(dilution limit)
Bacillus A11	23	136	269	2^{10}
ATCC 21783	29	156	240	2^{10}

ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 และ *B.circulans* ATCC 21783 เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร สภาวะเช่นเดียวกับรูป 3.4



รูปที่ 3.5 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *B. circulans* ATCC 21783 เมื่อเจริญในถังหมักขนาด 5 ลิตร สภาวะเช่นเดียวกับรูป 3.4

Step	Volume (ml)	Total Dext. act. (units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification fold
Crude enzyme	1,000	85,000	380	223	100	1
Supernatant (A + B)	900	9,000	360	20	-	-
Enzyme suspension(C)	280	76,000	24	3,170	89	14.2
Partial purified enzyme	100	70,000	20	3,500	82	15.7

ตารางที่ 3.5 สรุปผลการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่าง ๆ ตามรูปที่ 2.2

ตามวิธีของวัลยา เตชชัยกุล (2534) พบว่าเอนไซม์นี้สามารถตรึงบน DEAE-cellulose ได้ดี แต่แคลเซียมคลอไรด์ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์จะมีผลต่อการตรึงเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะหลุดจากตัวค้ำได้ง่ายขึ้น ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ต่อไป

เตรียม DEAE-cellulose ตามวิธีข้อ 2.14.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-10 mM หลังจากนั้นนำ DEAE-cellulose ในบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้นหนัก 10 กรัม ผสมกับเอนไซม์ CGTase ที่ทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 2.13 (เอนไซม์มีแอคติวิตี 3,553 Unit และมีโปรตีน 5.9 มิลลิกรัม) แช่ที่อุณหภูมิ 30°ซ ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึง ได้ผลดังตารางที่ 3.5 พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ CGTase โดยเอนไซม์ CGTase จะสามารถตรึงบนตัวค้ำได้ดีถ้าในบัฟเฟอร์ที่ใช้ไม่มีหรือมีแคลเซียมคลอไรด์น้อยมาก (0-1 mM $CaCl_2$) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 5 mM แล้ว เอนไซม์จะติดบนตัวค้ำได้น้อยลงและยิ่งน้อยลงเมื่อแคลเซียมคลอไรด์มีความเข้มข้น 10 mM แล้ว เอนไซม์จะตรึงได้เพียงประมาณครึ่งหนึ่ง

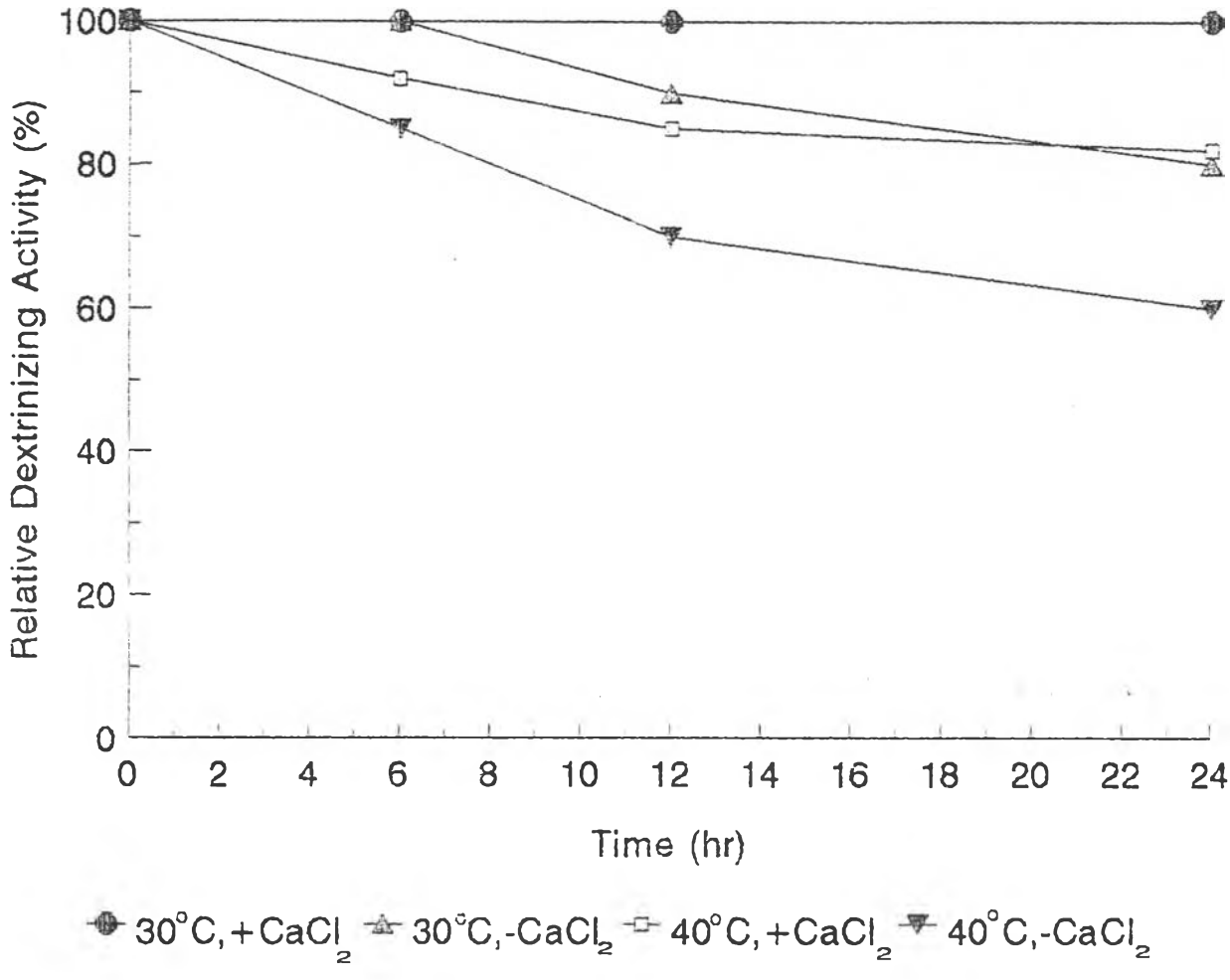
3.4.2 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อความเสถียรของของเอนไซม์ CGTase

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.5 จะเห็นว่าถ้าแคลเซียมคลอไรด์มีความเข้มข้นสูง เอนไซม์จะตรึงบน DEAE-cellulose ไม่ดี แต่อย่างไรก็ตามแคลเซียมคลอไรด์มีความสำคัญต่อความเสถียรของเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องเลือกความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่ำสุดเท่าที่จะเป็นได้ โดยเอนไซม์ยังสามารถตรึงบนตัวค้ำได้ดี ในการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้น 5 mM จึงต้องทำการศึกษาด้วยว่ายังเพียงพอที่จะช่วยเพิ่มความเสถียรให้แก่เอนไซม์ได้หรือไม่ โดยนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนมา dialyse 2 ครั้ง ครั้งละ 4 ชั่วโมง ด้วย10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งปราศจากแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อกำจัดแคลเซียมคลอไรด์ออกจากเอนไซม์ หลังจากนั้นนำเอนไซม์ CGTase จากข้อ 2.13 และที่ผ่านการ dialyse แล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 40°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.6 จะพบว่า เมื่อเอนไซม์ CGTase อยู่ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ เอนไซม์จะมีความเสถียรดีขึ้นทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 40°ซ และแคลเซียมคลอไรด์จะมีส่วนช่วยเพิ่มความเสถียรต่อเอนไซม์ได้มาก เมื่อเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ

[$CaCl_2$] (mM)	Enzyme			
	bound (%)		free (%)	
	activity	protein	activity	protein
0	98.5	60	0	39
1	97.0	60	2.0	38
5	87.0	57	12.0	40
10	65.0	48	35.0	54

ตารางที่ 3.6 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการตรึงเอนไซม์ CGTase บน DEAE-cellulose

(กำหนดให้แอคติวิตี 3,553 Unit และ protein 5.9 mg = 100%)



รูปที่ 3.6 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase โดยเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ที่อยู่ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ และเอนไซม์ในบัฟเฟอร์เดิมแต่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°ซ

40°ซ โดยถ้าไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงถึง 40 % เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 1 วัน ดังนั้นจึงเลือกแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 มM สำหรับตริงเอนไซม์ CGTase ต่อไป

3.4.3 **ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมสำหรับการตริงบนDEAE-cellulose**

เตรียม DEAE-cellulose ตามวิธีข้อ 2.14.1 โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 มM หลังจากนั้นชั่ง มา 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร ใส่เอนไซม์ CGTase ลงไปในแต่ละขวด โดยแปรปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์ตั้งแต่ 0 ถึง 500 units แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ได้ผลดังรูปที่ 3.7 ซึ่งจะพบว่า DEAE-cellulose หนัก 1 กรัม สามารถตริงเอนไซม์ CGTase ได้ 350 units (0.32 มิลลิกรัม)

3.5 <u>การศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตริง</u>

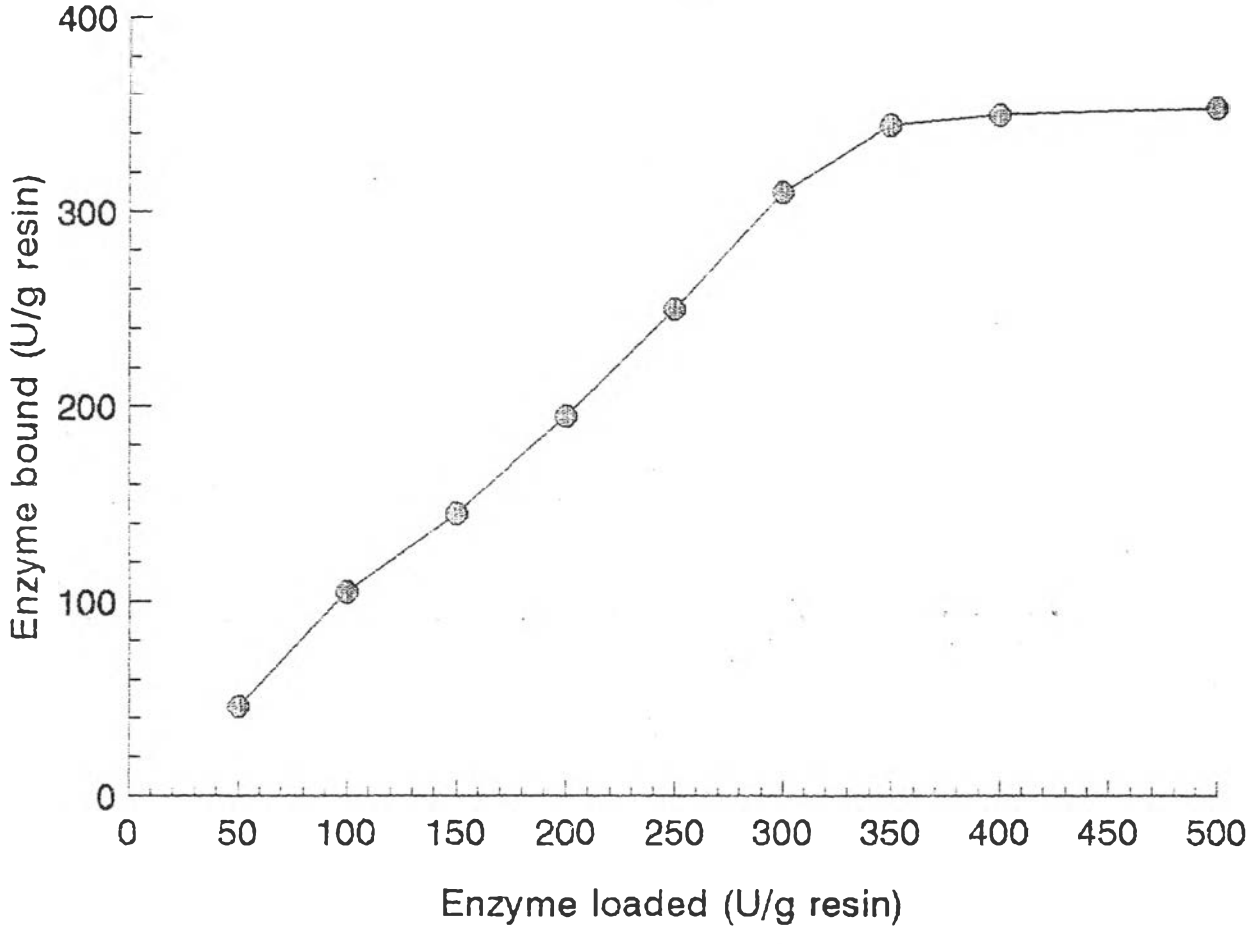
เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase หลังจากตริงบน DEAE-cellulose โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ จึงได้ศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อเอนไซม์ CGTase

3.5.1 **ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตริง**

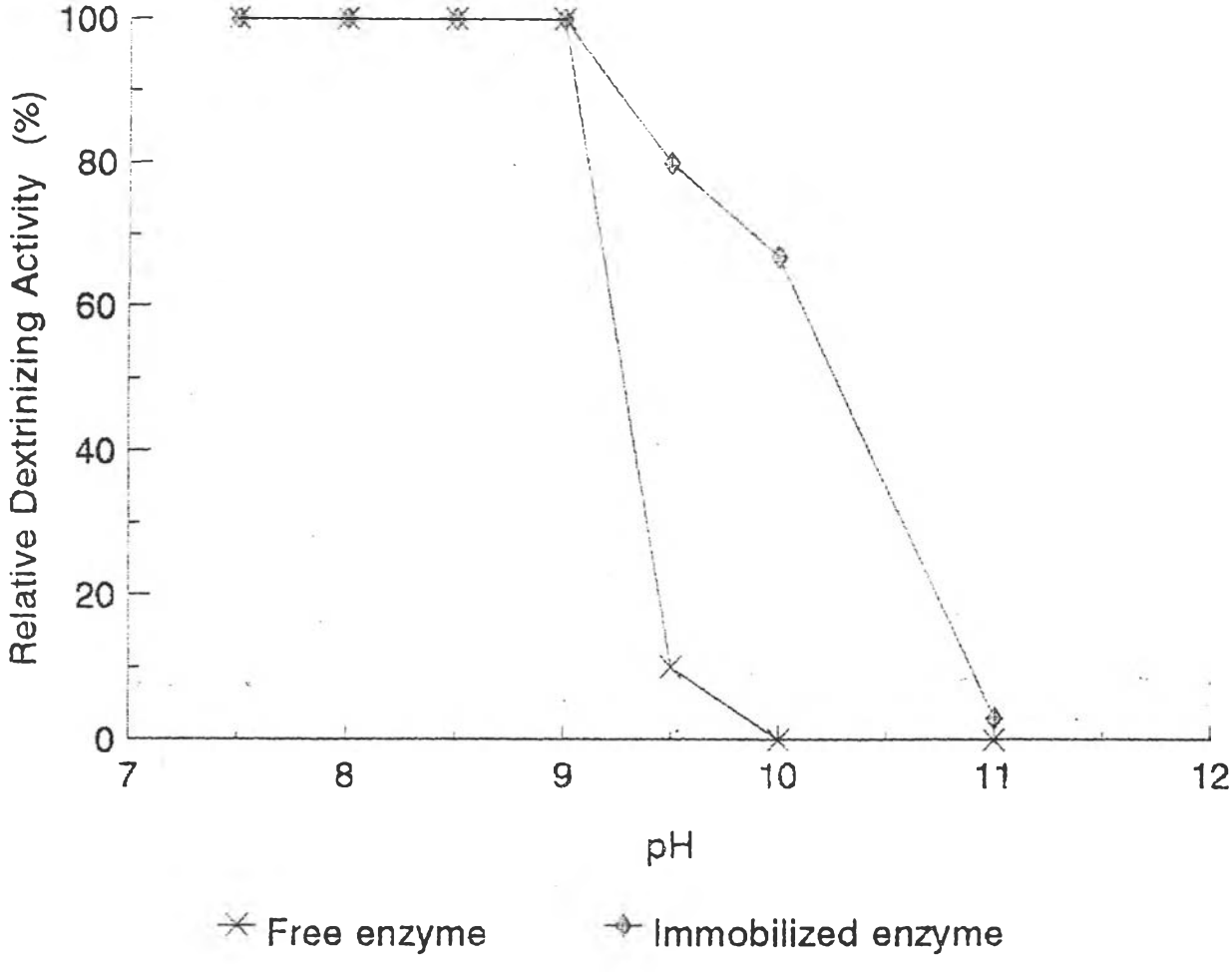
บ่มเอนไซม์อิสระและที่ถูกตริงในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มM ที่มีค่า pH แตกต่างกันตั้งแต่ pH 7.5-11.0 (pH 7.5 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 8.0-9.0 ใช้สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์และ pH 10.0-11.0 ใช้สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) ที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ตามวิธีข้อ 2.10.1 ได้ผลดังรูปที่ 3.8 พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตริงมีความเสถียรต่อ pH ช่วงกว้างกว่าเอนไซม์อิสระ โดยที่ pH สูงกว่า 9.0 เอนไซม์อิสระจะมีความเสถียรต่ำกว่าเอนไซม์ที่ถูกตริงมาก

3.5.2 **ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตริง**

นำเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตริงไปวัดแอคติวิตีโดยวิธีข้อ 2.10.1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH แตกต่างกันในช่วง 7.5-11.0 (pH 7.5 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 8.0-9.0 ใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ และ pH 10.0-11.0 ใช้สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.9 จะพบว่าเอนไซม์อิสระ



รูปที่ 3.7 ความสามารถในการดึงเอนไซม์ CGTase ของ DEAE-cellulose



รูปที่ 3.8 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึงเมื่อบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ ที่มี pH ต่างกันตั้งแต่ 7.5-11 ที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดแอคติวิตี

และเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7.5 เหมือนกัน และจากผลการทดลองจะเห็นว่าผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะคล้ายคลึงกัน

3.5.3 **ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึง**

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึงทำได้โดยการบ่มเอนไซม์ CGTase ทั้งที่อิสระและที่ถูกตรึงใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิแตกต่างกันในช่วงตั้งแต่ 25-90°ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์อิสระและที่ถูกตรึง โดยวิธี Dextrinizing activity ตามวิธีข้อ 2.10.1 พบว่าเอนไซม์ทั้งสองสภาวะมีความเสถียรคล้ายคลึงกัน คือมีความเสถียรจนถึงอุณหภูมิ 55 °ซ (รูปที่ 3.10) ต่อจากนั้นความเสถียรจะลดลงตามลำดับและสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดที่อุณหภูมิ 85-90°ซ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์อิสระเล็กน้อย

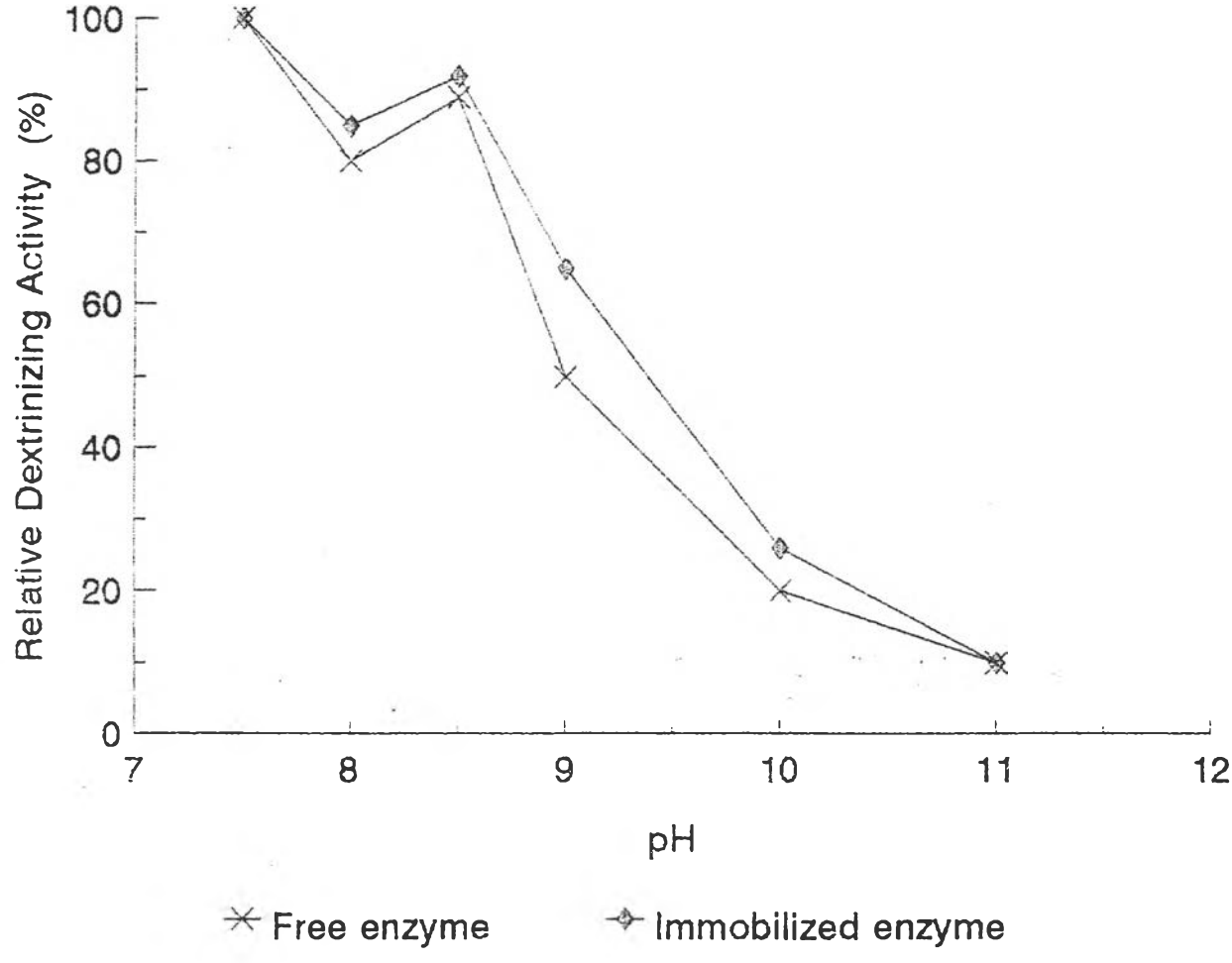
3.5.4 **ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึง**

นำเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึงไปบ่มกับแป้งที่อุณหภูมิแตกต่างกันในช่วง 20-90°ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดแอคติวิตีตามวิธีข้อ 2.10.1 ได้ผลดังรูปที่ 3.11 พบว่าเอนไซม์ทั้งสองสภาวะจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-70°ซ เหมือนกัน แต่เมื่อพิจารณาทั้งช่วงอุณหภูมิที่ทำการวัดแอคติวิตี (20-90°ซ) จะสังเกตเห็นว่าเอนไซม์อิสระจะทำงานในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 50°ซ และสูงกว่า 70°ซ ได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง

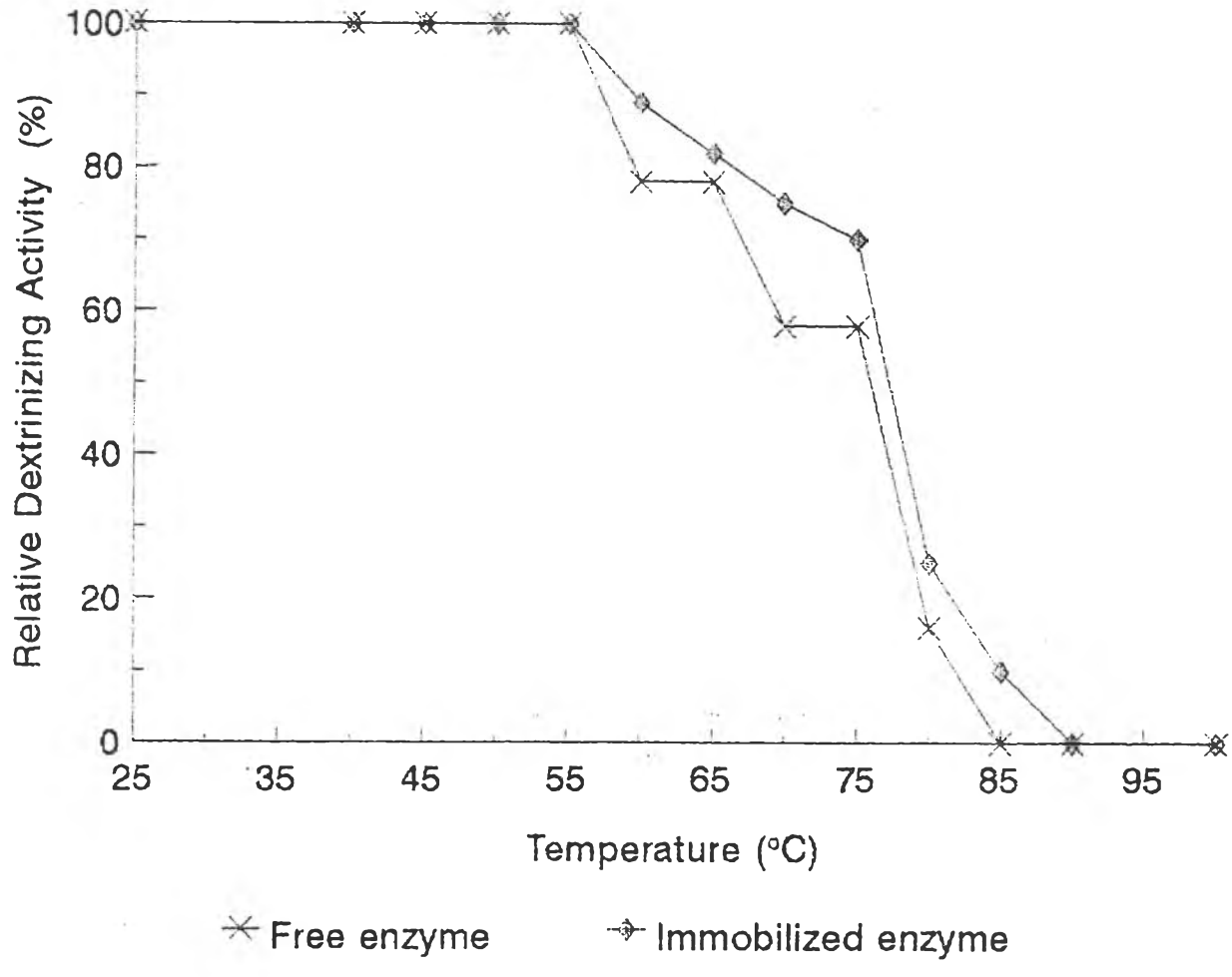
3.6 <u>ผลการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงในถังปฏิกิริยาแบบไม่ต่อเนื่อง</u>

3.6.1 **ผลการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบไม่ต่อเนื่อง**

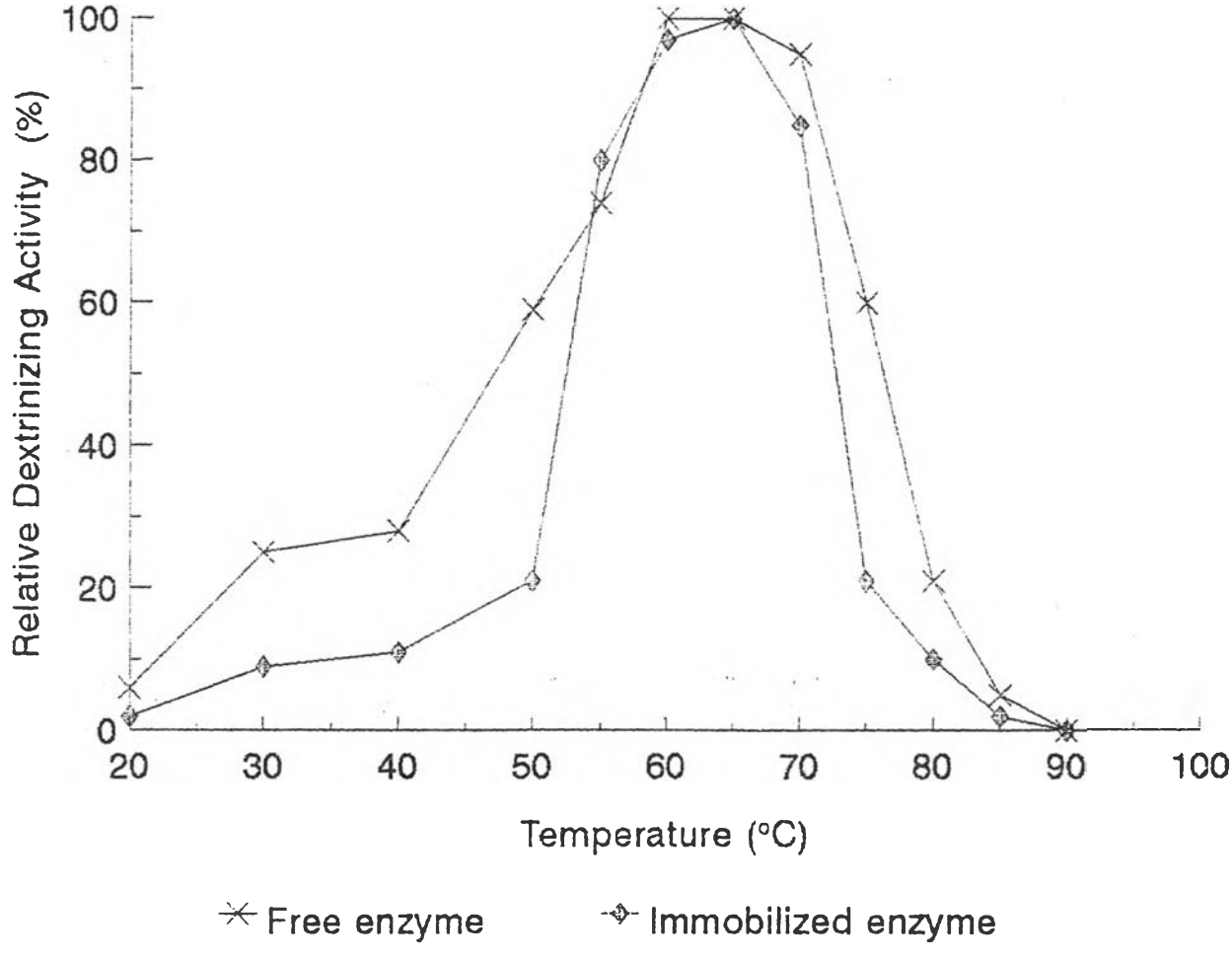
ศึกษาช่วงเวลาที่ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินมีความเข้มข้นสูงสุดโดยทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาตามวิธีในข้อ 2.15 ผสมเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง (150 U/g resin) กับ 2.5% (w/v) soluble starch ใน10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยวิธี HPLC ผลการทดลองดังรูปที่ 3.12 พบว่าเอนไซม์จะสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 9 ชั่วโมง โดยจะมี



รูปที่ 3.9 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึง เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH แตกต่างกันตั้งแต่ pH 7.5-11.0 ตามวิธีข้อ 2.10.1



รูปที่ 3.10 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึง เมื่อบ่มเอนไซม์ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปวัดแอคติวิตี



รูปที่ 3.11 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase อิสระและที่ถูกตรึง เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.10.1 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

% conversion (อัตราการเปลี่ยนสับสเตรทแป้งเป็นผลิตภัณฑ์ ดูภาคผนวก) เท่ากับ 76 % และเอนไซม์จะผลิต β-CD เป็นผลิตภัณฑ์สำคัญ (%conversion เท่ากับ 40%)

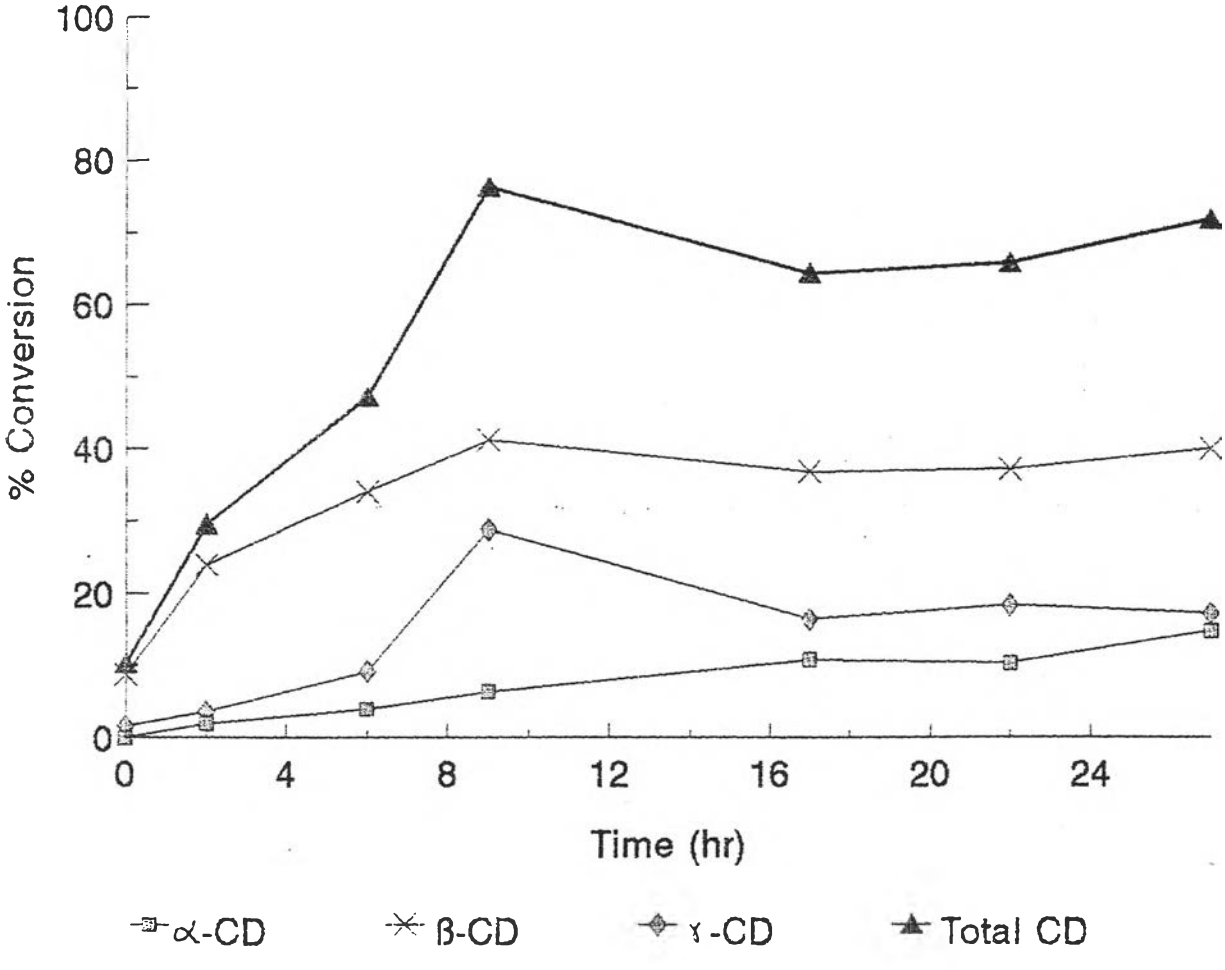
3.6.2 **ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงเมื่อนำมาผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำหลาย ๆ ครั้ง**

เพื่อศึกษาว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะสามารถนำไปใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบไม่ต่อเนื่องได้กี่ครั้ง จึงทำการทดลองต่อไป โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปบ่มกับ 2.5 % soluble starch ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง (ข้อ 2.15) วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ หลังจากนั้นนำเอนไซม์มาล้างด้วย 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ 3 ครั้ง แล้วผลิตไซโคลเดกซ์ทรินอีกในสภาวะเดิม ทำเช่นนี้ซ้ำกันทั้งหมด 6 ครั้ง ได้ผลดังรูปที่ 3.13 พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีลดลงหลังการใช้งาน โดยครั้งที่ 2-5 จะมีแอคติวิตีเหลือประมาณ 80 % หลังจากการใช้งานครั้งที่ 6 เอนไซม์จะมีแอคติวิตีเหลือประมาณ 60 % ของเอนไซม์ตั้งต้น แต่ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ใกล้เคียงกันตลอดการใช้งานทั้ง 6 ครั้ง

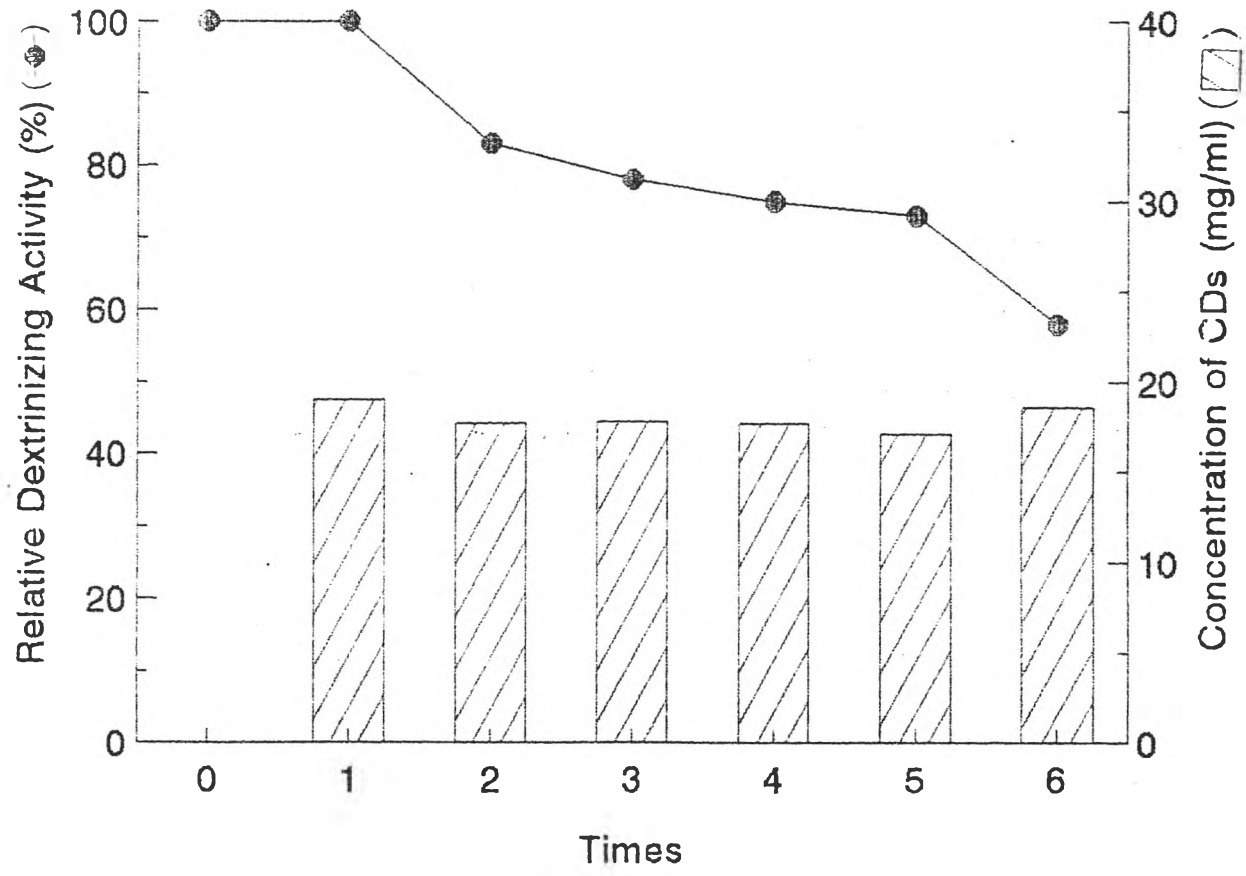
3.7 <u>ผลการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์CGTase ที่ถูกตรึงในถังปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง</u>

3.7.1 **ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ในถังปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง**

การตรึงเอนไซม์จะทำให้สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตนี้ โดยปัจจัยหนึ่งซึ่งมีความสำคัญคือ ความเข้มข้นของสับสเตรท ดังนั้นจึงทำการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องตามวิธีในข้อ 2.16.1 แต่แปรผันความเข้มข้นของสับสเตรท (soluble starch) ที่ใช้ตั้งแต่ 1.25-5.0 % (w/v) มีอัตราการป้อนสับสเตรท 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°ซ วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ และหา % conversion ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้น จากรูปที่ 3.14 จะพบว่าเมื่อใช้สับสเตรทความเข้มข้น 1.25 % เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงจะผลิตไซโคลเดกซ์ทรินสูงสุดคือ ให้ % conversion 85 % และ



รูปที่ 3.12 ผลการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง ในถัง ปฏิกิริยาแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้ 2.5 % soluble starch เป็น สับสเตรท บ่มกับเอนไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิ 40°ซ



รูปที่ 3.13 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง เมื่อถูกใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำหลายครั้งในถังปฏิกิริยา จาก 2.5% soluble starch ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ บ่มกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40°ซ นานครั้งละ 9 ชั่วโมง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงขึ้น % conversion ของไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้จะลดต่ำ

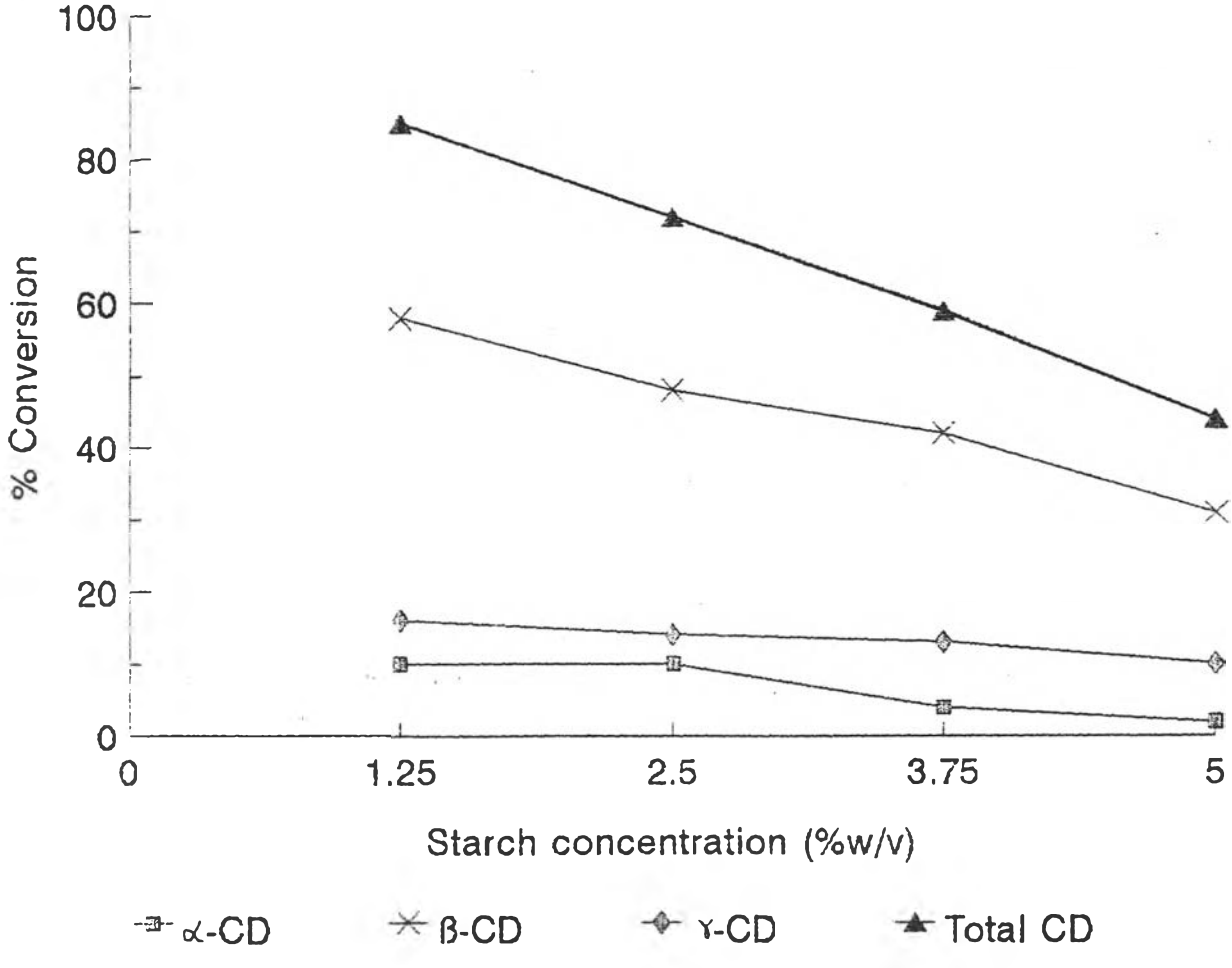
3.7.2 **ผลของอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง**

จากผลการทดลองในข้อ 3.7.1 แม้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 1.25 % จะให้ % conversion สูงสุด แต่ผลผลิตที่ได้เมื่อให้ความเข้มข้นสับสเตรทเท่ากับ 2.5 % (ซึ่งทำให้ % conversion ต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 1.25 % เพียงประมาณ 10%) จะสูงเกือบเป็น 2 เท่าของความเข้มข้น 1.25 % ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นสับสเตรทเท่ากับ 2.5 % ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องต่อไป ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินอีกปัจจัยหนึ่งคือ อัตราการป้อนสับสเตรท จึงทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาตามข้อ 2.12 แต่แปรผันอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรทตั้งแต่ 2, 3 และ 4.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยใช้ 2.5 % soluble starch เป็นสับสเตรท ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°ซ วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ และหา % conversion ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้น จากรูปที่ 3.15 พบว่าอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินคือ 3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยจะได้ % conversion สูงสุดเท่ากับ 72 %

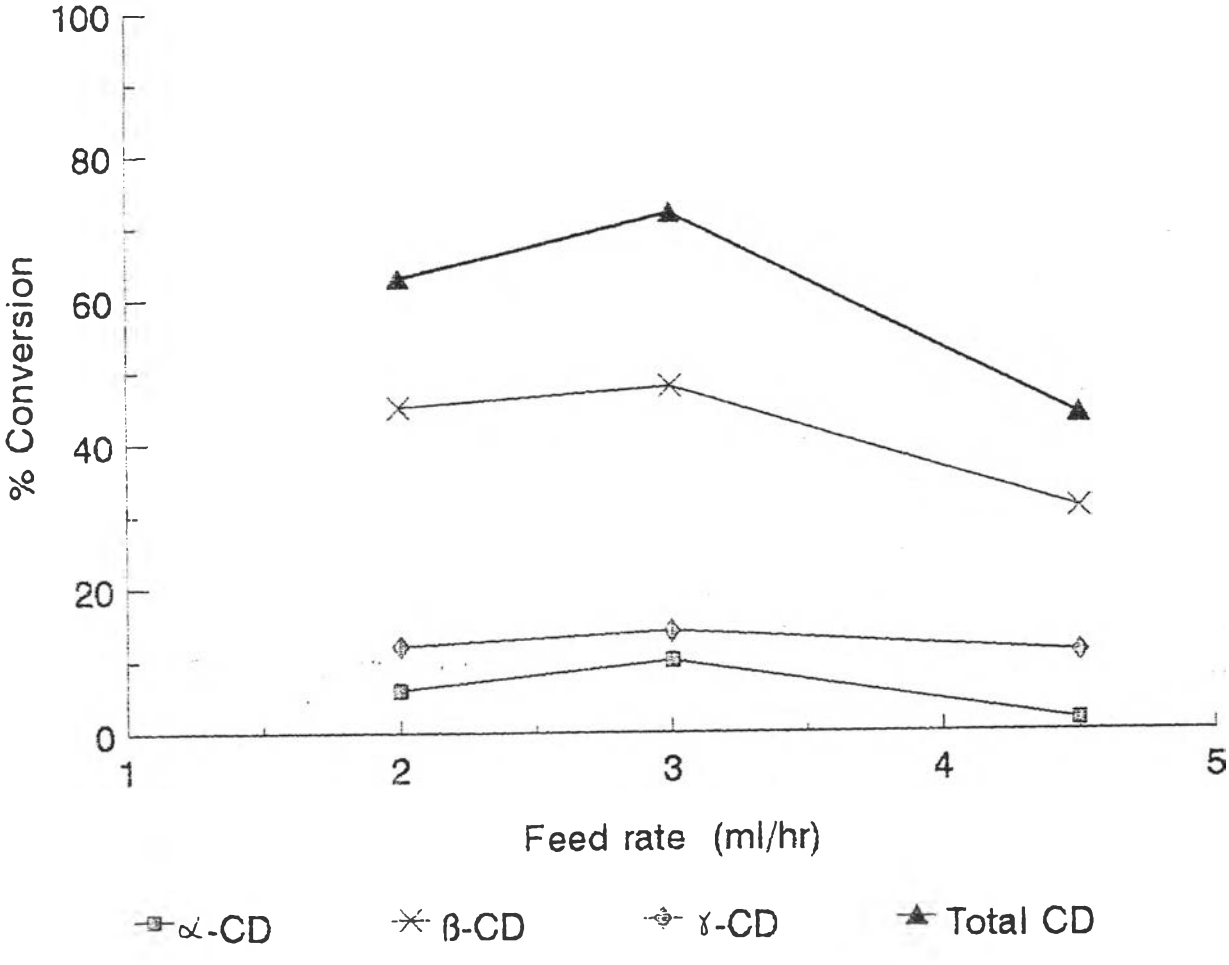
3.7.3 **ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง เมื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องติดต่อกันเป็นเวลานาน**

3.7.3.1 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน โดยไม่เสริมยาปฏิชีวนะ

หลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องแล้ว จึงได้ทำการทดลองว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงมีอายุการใช้งานได้กี่วัน โดยทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงในถังปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องตามวิธีข้อ 2.16 เป็นเวลา 7 วัน ใช้ 2.5 % soluble starch ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ เป็นสับสเตรท มีอัตราการป้อนสับสเตรทเป็น 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°ซ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.16 พบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องโดยปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นจะไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเวลา 3 วัน แต่หลังจากนั้นปริมาณไซโคล



รูปที่ 3.14 ผลการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงในถังปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง เมื่อแปรผันความเข้มข้นของ soluble starch ตั้งแต่ 1.25-5.0 % ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 40°ซ

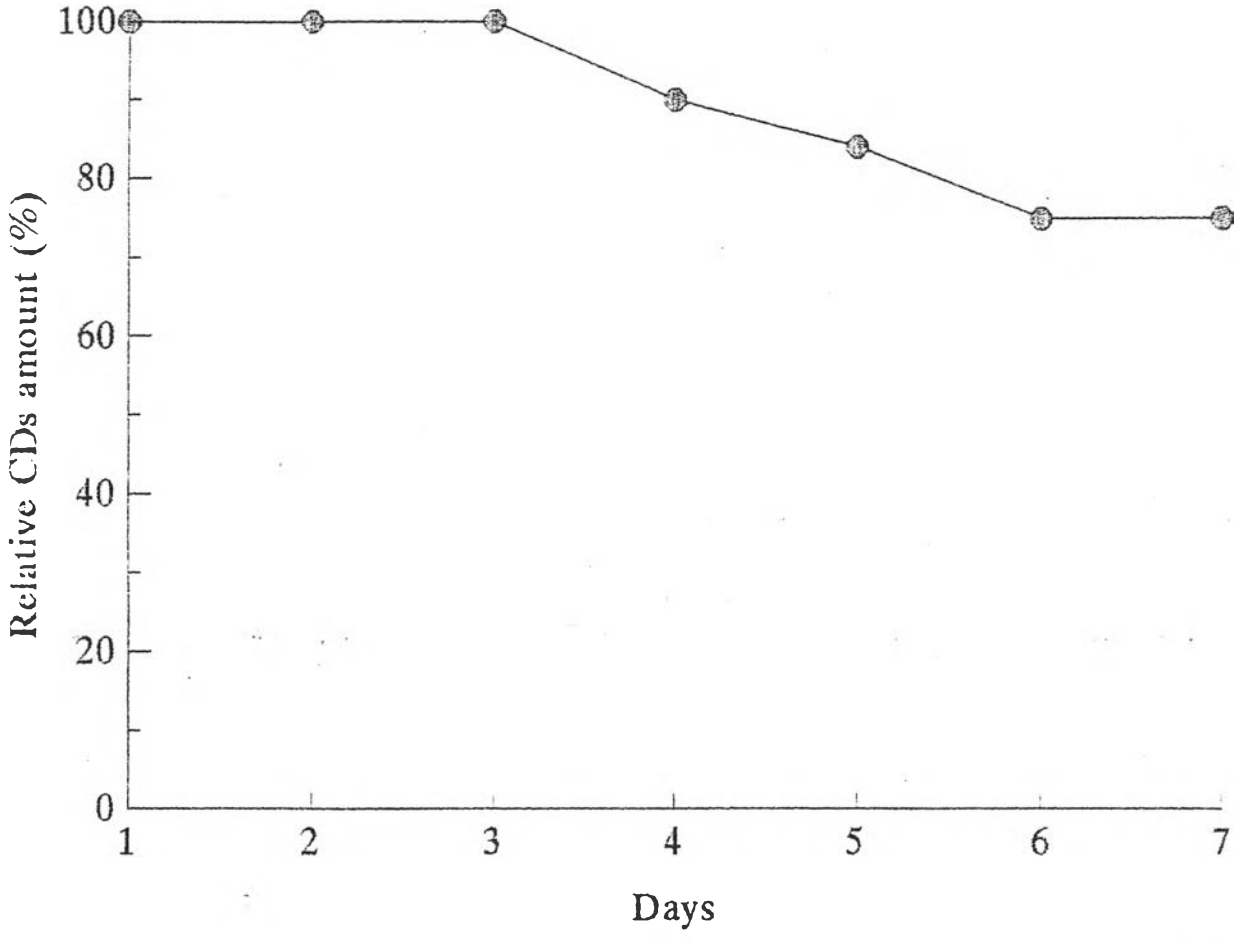


รูปที่ 3.15 ผลของอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง เมื่อใช้ 2.5 % soluble starch เป็นสับสเตรท และควบคุมสภาวะการทำงานเช่นเดียวกับรูปที่ 3.14

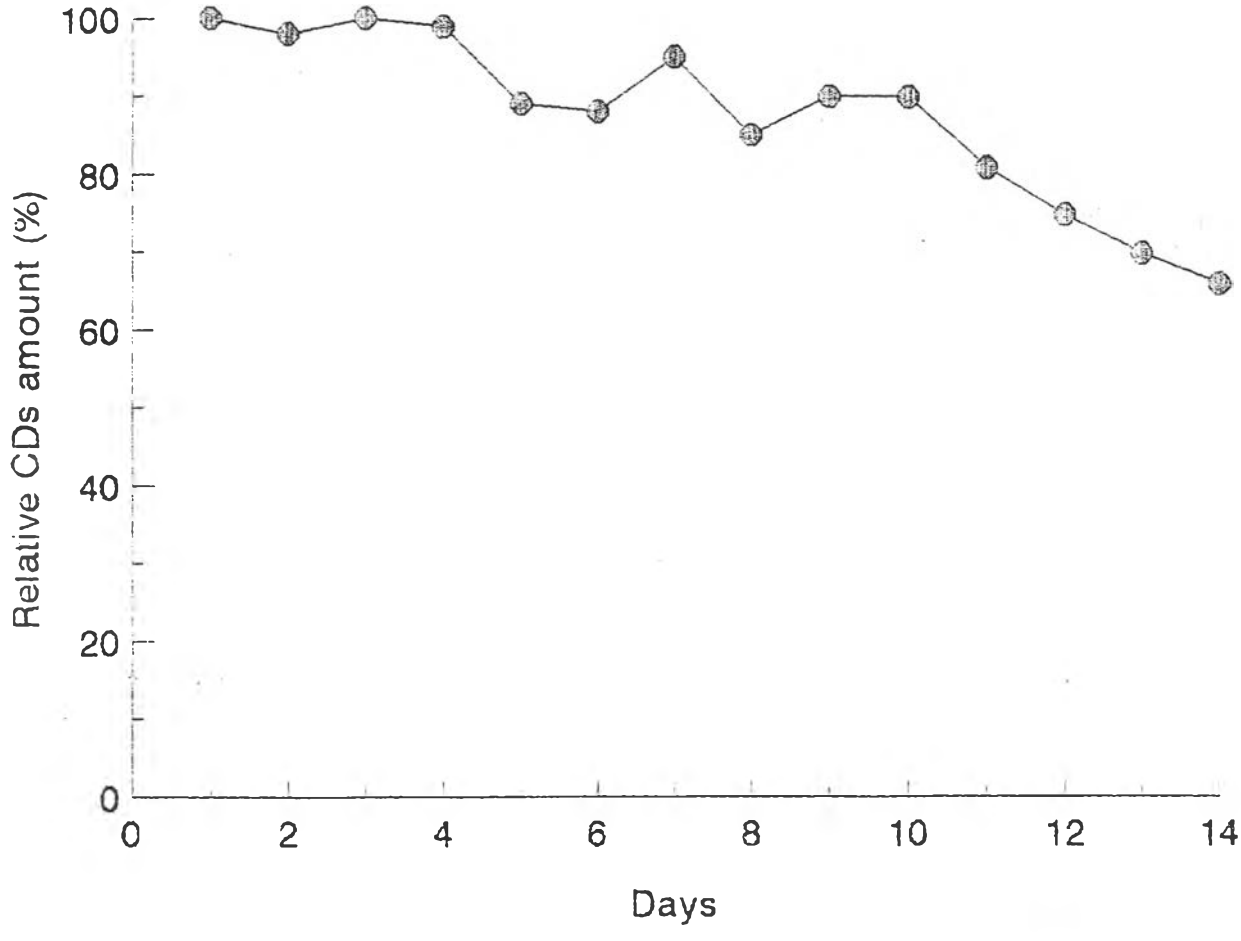
เดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นก็จะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 6 ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินจะเหลือเพียง 75% ของปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน และนับตั้งแต่วันที่ 3 จะเริ่มมีฟองอากาศเกิดขึ้นในถังปฏิกิริยา

3.7.3.2 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องโดยเสริมยาปฏิชีวนะ

จากผลการทดลองข้อ 3.7.3.1 จะเห็นว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงมีอายุการทำงานสั้น ซึ่งอาจเนื่องจากเกิดการปนเปื้อนขึ้น ดังนั้นจึงได้ทดลองใส่ยาปฏิชีวนะในระบบด้วย กล่าวคือผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยใช้สภาวะเดียวกับข้อ 3.7.3.1 แต่เติม streptomycin sulphate 50 μg/ml ลงไปใน 2.5 % soluble starch ด้วย และเตรียมสับสเตรทที่มียาปฏิชีวนะนี้ในปริมาณที่พอใช้วันต่อวันเท่านั้น เมื่อทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องก็จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.17 พบว่า streptomycin sulphate ทำให้เอนไซม์จะสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ในปริมาณค่อนข้างคงที่ เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินจึงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 3.16 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°ซ โดยใช้ 2.5 % soluble starch เป็นสับสเตรทและอัตราการป้อนเป็น 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง



รูปที่ 3.17 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องโดยใช้สภาวะเดียวกับรูปที่ 3.16 แต่เติม Streptomycin sulphate 50 μg/ml ลงในสับสเตรท