หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยของวัลยา เตชชัยกุล (2534) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase โดย *Bacillus* A11 ในระดับขวดเขย่า รวมทั้งศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้ งานวิจัยนี้เป็นผลงานต่อเนื่องโดยนำ *Bacillus* A11 มาศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และนำเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้นั้นมาตรึงบนตัวค้ำด้วยพันธะไอออนิก พร้อมทั้งศึกษาสมบัติและการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง

ในช่วงแรกของงานวิจัยได้นำ *Bacillus* A11 มาเลี้ยงในสภาวะเดียวกับที่เคยใช้ในงานวิจัยของวัลยา เตชชัยกุล (2534) โดยเจริญ *Bacillus* A11 ในสูตรอาหาร Medium II ปรากฏว่า ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ CGTase ลดลงมาก ไม่ว่าจะวัด dextrinizing หรือ CD-TCE activity โดยพบว่าแอคติวิตีจำเพาะลดลงจากที่เคยรายงานไว้ถึง 14 เท่า และ 32 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *Bacillus* A11 นี้ถูกเก็บไว้นาน สภาวะการเก็บไม่เหมาะสม หรือผ่านการถ่ายเชื้อ (subculture) มาหลายครั้ง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ดังนั้นจึงได้ลองหาสูตรอาหารอื่นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase เช่น Horikoshi's medium ซึ่ง Horikoshi(1971) สามารถใช้เจริญแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดี (Makela, 1990) ดังนั้นจึงได้ทดลองเจริญ *Bacillus* A11 และเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ระหว่าง Medium II และ Horikoshi's medium ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ พบว่า *Bacillus* A11 ที่เจริญใน Horikoshi's medium จะสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงกว่าเมื่อเจริญใน Medium II โดย CD-TCE activity สูงกว่าถึง 8 เท่า (รูปที่ 3.1) ดังนั้นจึงใช้ Horikoshi's medium เป็นสูตรอาหารเลี้ยง *Bacillus* A11 เพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase ตลอดการวิจัย

จากการรายงานของ Bender (1986) และวัลยา เตชชัยกุล (2534) พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase รวมทั้ง *Bacillus* A11 จะผลิตเอนไซม์นี้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งโดยปกติในสูตรอาหารทั่วไปมักจะใช้ soluble starch เป็นส่วนประกอบ แต่เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีผลิตผลทาง

การเกษตรมากมายและจากรายงานของวัลยา เตชชัยกุล (2534) พบว่าแป้งข้าวเจ้าซึ่งหาซื้อได้ตามท้องตลาดทั่วไปสามารถนำมาใช้ทดแทน soluble starch ใน Medium II ได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้แป้งข้าวเจ้าแทน soluble starch ในการเลี้ยง *Bacillus* A11 ใน Horikoshi's medium ซึ่งพบว่า *Bacillus* A11 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase มีแอคติวิตีสูงกว่าเมื่อใช้ soluble starch เป็นส่วนประกอบอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 3.2) ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดและสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูง จึงใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบของ Horikoshi's medium นอกจากนี้ยังได้มีรายงานถึงการใช้แป้งชนิดอื่นในการผลิตเอนไซม์ CGTase โดย Prema และคณะ (1990) พบว่าแป้งมันสำปะหลังก็เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ดีในการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* isolate Cl อีกด้วย

โซเดียมคาร์บอเนตใน Horikoshi's medium จะทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวควบคุม pH ซึ่งเมื่อเติมโซเดียมคาร์บอเนตแล้วจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH ประมาณ 10 ซึ่งสูงกว่าใน Medium II ที่มี pH 9.0 และจากผลการทดลองในรูปที่ 3.3 จะเห็นว่าเมื่อโซเดียมคาร์บอเนตมีความเข้มข้นสูง เอนไซม์จะมีแอคติวิตีลดลงและการผลิตเอนไซม์ก็จะช้ากว่าเมื่อให้โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่ำ ซึ่งการที่ผลเป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเมื่อเลี้ยง *Bacillus* A11 จะไม่มีการควบคุม pH โดยจะปล่อยให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นลงอย่างอิสระ ซึ่งตามรายงานของ Mauri และคณะในปี 1990 พบว่า ถ้าเจริญแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุม pH ให้คงที่ตลอดเวลา แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ CGTase ไม่ดีหรืออาจจะไม่ผลิตเลย ดังนั้นเมื่อให้โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นสูง (1.0%) จะทำให้การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นน้อย ทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงในขณะเดียวกันถ้าให้โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่ำเกินไป (0.5%) pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงมากเกินไป ซึ่งอาจมีผลทำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ได้ไม่ดีเท่าที่ควรเช่นกัน จากผลการทดลองนี้จึงเลือก Horikoshi's medium ที่มี 1% แป้งข้าวเจ้า และ 0.75 % โซเดียมคาร์บอเนตเป็นอาหารเลี้ยง *Bacillus* A11 เพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase ต่อไป

หลังจากปรับสภาวะให้เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ในขวดเขย่าแล้ว จึงได้ขยายการผลิตมาเลี้ยง *Bacillus* A11 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป เพื่อที่จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและมีแอคติวิตีสูงขึ้น โดยใช้สภาวะเดียวกับเมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า คือ เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน และเพื่อที่จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้

แอคติวิตีสูงสุดจึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* A11 ในถังหมักด้วย โดยทั่วไปปัจจัยที่มีการศึกษากันในระดับถังหมักคือ อัตราการป้อนอากาศและอัตราการกวน ซึ่งจากตารางที่ 3.2 จะพบว่าอัตราการป้อนอากาศมีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* A11 มาก โดยเมื่อเพิ่มอัตราการป้อนอากาศมากขึ้นแบคทีเรียจะมี lag phase ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่การผลิตเอนไซม์ CGTase จะมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อให้อัตราการป้อนอากาศเป็น 2 ลิตรต่อนาที ดังนั้นถ้าให้อากาศมากเกินไป แบคทีเรียก็อาจจะเจริญได้เร็วแต่จะผลิตเอนไซม์ได้น้อย

ส่วนการเพิ่มหรือลดอัตราการกวนนั้นจะมีผลต่อการเจริญน้อยมาก โดยดูได้จากตารางที่ 3.3 จะพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการกวนมากขึ้น lag phase ของแบคทีเรียจะลดลงไม่มากนัก แต่ขณะเดียวกัน อัตราการกวนจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase อย่างมาก โดย *Bacillus* A11 จะผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีที่สุด เมื่อให้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มหรือลดอัตราการกวนลง การผลิตเอนไซม์ก็จะลดต่ำลงด้วย จากผลที่ผ่านมาจะเห็นว่าอัตราการป้อนอากาศมีผลต่อการเจริญ ในขณะที่การผลิตเอนไซม์ CGTase จะขึ้นกับอัตราการกวน โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรคือ เมื่อมีอัตราการป้อนอากาศ 2 ลิตรต่อนาที และมีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และ *Bacillus* A11 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีแอคติวิตีสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในขวดเขย่ามาก

เมื่อศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (รูปที่ 3.4) พบว่าแบคทีเรียจะมี lag phase ค่อนข้างยาว และ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจะคงที่ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจะลดลงประมาณ 1.5 หน่วย pH และแบคทีเรียจะเริ่มมีการเจริญพร้อมกับผลิตเอนไซม์โดยจะพบทั้ง dextrinizing และ CD-forming activity และจะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อแบคทีเรียอยู่ในช่วง stationary phase และจะคงที่อยู่ประมาณ 12 ชั่วโมงก็จะลดลง ซึ่งรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus* A11 นี้คล้ายกับที่ Makela ได้รายงานในปี 1990 โดยการศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* (ATCC 21783) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่า ATCC 21783 นี้จะมี lag phase ค่อนข้างยาวเช่นกันและแบคทีเรียจะเริ่มมีการเจริญเมื่อ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลง นอกจากนี้ Makela ได้วัดปริมาณ reducing sugar ของน้ำเลี้ยงเชื้อ และพบว่ามี reducing sugar เกิดขึ้นในช่วงเวลา

สั้น ๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะแบคทีเรียจะสลายแป้งไปเป็น reducing sugar โดยส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคส หลังจากนั้น reducing sugar จะถูกเปลี่ยนเป็นกรด ทำให้ pH ลดลง และแบคทีเรียจะใช้กรดที่ถูกผลิตขึ้นมา pH ของน้ำเลี้ยงจึงสูงขึ้น

ในการทดลองนี้นอกจากจะศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 แล้ว ยังได้ศึกษา *Bacillus circulans var. alkalophilus* (ATCC 21783) โดยเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์CGTaseของแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus* A11 จากผลที่ได้พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จะมีรูปแบบการเจริญใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3.5) โดย ATCC 21783 จะมี lag phase และ log phase ยาวกว่า *Bacillus* A11เล็กน้อย และแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase จะใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3.4) แต่ ATCC 21783 จะผลิตเอนไซม์มีแอคติวิตีค่อนข้างคงที่ในช่วง stationary phase และจะลดลงเล็กน้อยเมื่อถึง declined phase แต่ Vandamme และคณะ (1984) ได้รายงานว่า หลังจากที่แอคติวิตีของเอนไซม์ขึ้นสูงสุดแล้ว เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีคงที่อยู่ประมาณ 2-3 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Makela ซึ่งเลี้ยง ATCC 21783 ในสูตรอาหารเดียวกันแต่ใช้โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.0 % พบว่าจะมีรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์คล้ายกันแต่แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่างานวิจัยนี้ 5 เท่า

การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจะทำให้สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ในปริมาณมาก ซึ่งประสิทธิภาพของการตรึงจะสูงขึ้นถ้าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ จึงนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนก่อน โดยวิธี starch adsorption ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้นอกจากจะอาศัยแรงดูดซับของเอนไซม์กับแป้งแล้ว ยังขึ้นกับความจำเพาะของการจับกันของเอนไซม์และสับสเตรทแป้งด้วย (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1988) และยิ่งแป้งมีพื้นที่ผิวมากเท่าใดก็จะมีผลดีต่อการ ดูดซับมากขึ้นเท่านั้น (Makela และคณะ, 1988) ผลการทดลองพบว่าเมื่อชะเอนไซม์ออกจากแป้งแล้วเอนไซม์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิมถึง 14 เท่า (ตารางที่ 3.5) แต่การชะเอนไซม์ออกจากแป้ง ถ้าใช้บัฟเฟอร์ปริมาตรน้อยเกินไปและเวลาไม่นานพอจะทำให้มีเอนไซม์เหลือเกาะอยู่บนแป้ง ดังนั้นจึงต้องใช้บัฟเฟอร์ปริมาตรมากพอที่จะชะเอนไซม์ออกมาให้มากที่สุด ดังนั้นจึงนำเอนไซม์นี้มาผ่าน ultrafiltration membrane เพื่อลดปริมาตรของเอนไซม์ลงหลังการทำ ultrafiltration พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นเป็น 16 เท่าจากเอนไซม์ตั้งต้น และสามารถแยกโปรตีนอื่นออกได้ถึง 95 % วัลยา เดชชัยกุล

(2534) และ Lloyed และคณะ (1984) ได้รายงานว่าวิธีดูดซับด้วยแป้งนี้สามารถทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์ขึ้นมากเช่นกัน

งานวิจัยนี้ได้ทำการตรึงเอนไซม์ CGTase บนตัวค้ำด้วยพันธะไอออนิก โดยใช้ DEAE-cellulose ซึ่งเป็น anion-exchange เป็นตัวค้ำ โดย DEAE-cellulose จะมีประจุบวก (มีหมู่ $-CH_2-CH_2\overset{+}{N}(C_2H_5)_2$ เป็นหมู่ฟังก์ชัน) และเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจาก *Bacillus* A11 มีค่า pI ประมาณ 4.85-5.0 (จิราพร โรจน์ทินกร งานที่ยังไม่ตีพิมพ์) ดังนั้นที่ pH 8.5 เอนไซม์นี้จึงมีประจุเป็นลบ และสามารถตรึงบนตัวค้ำนี้ได้โดยควรตรึงเอนไซม์ในpH ช่วง 7-9 (ผลการทดลองที่ไม่ได้รายงานไว้ในงานวิทยานิพนธ์นี้พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะหลุดจากตัวค้ำเมื่ออยู่ที่ pH 6.0) การตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้มีข้อดีคือ สภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง สามารถทำได้ง่าย ตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำได้ดี สามารถ regenerate เอนไซม์ได้ง่าย และมีราคาถูก อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อควรระวังคือ ต้องควบคุม pH ของระบบให้คงที่ และ ionic strength ต้องไม่สูงมากเพราะจะทำให้เอนไซม์หลุดจากตัวค้ำได้ง่าย (Scragg, 1988) โดยปกติเอนไซม์นี้ต้องอาศัยแคลเซียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มความเสถียร (รูปที่ 3.6) (วัลยา, 2534; Horikoshi, 1984) เนื่องจากเอนไซม์นี้มี Ca^{2+} เกาะอยู่ 2 ตำแหน่ง การใส่แคลเซียมคลอไรด์จึงเป็นการช่วยไม่ให้ Ca^{2+} ของเอนไซม์หลุดออกมาเพราะมี Ca^{2+} ในระบบมากพอ (Klein และ Schulz, 1990) ดังนั้นในระบบการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงนิยมเติม 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ลงไปด้วย (Bender, 1986) ในการทดลองเพื่อตรึงเอนไซม์ CGTase บน DEAE-cellulose ในครั้งแรก ๆ จึงใช้เอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ พบว่าเอนไซม์ไม่เกาะติดกับ DEAE-cellulose ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจาก ionic strength สูง ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยหาสภาวะที่เอนไซม์สามารถตรึงบน DEAE-cellulose ได้ดีและยังมีความเสถียรพอสมควร พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมควรเป็น 5 mM (ตารางที่ 3.6) เพราะเอนไซม์ยังสามารถตรึงบนตัวค้ำได้ค่อนข้างดีและมีแคลเซียมคลอไรด์มากพอที่จะช่วยเพิ่มความเสถียรได้ดี เช่นเดียวกับที่ Kato และ Horikoshi (1984) ได้ตรึงเอนไซม์ CGTase จาก ATCC 21783 บน synthetic adsorption resin DIAION HP-20 ใน 5 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่ pH 8.5 โดยมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ อยู่ด้วย

เมื่อทำการตรึงเอนไซม์ CGTase บน DEAE-cellulose ใน 10mM ทริส-

ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ซึ่งมี 5mM แคลเซียมคลอไรด์ pH 8.5 พบว่า DEAE-cellulose 1 กรัม มีความสามารถในการตรึงเอนไซม์ CGTase ได้ 350 units (0.32 มิลลิกรัม) (รูปที่ 3.7) สูงกว่าการทดลองของ Nakamura และ Horikoshi (1977) ซึ่งได้รายงานถึงการตรึงเอนไซม์ CGTase บน vinylpyridine polymer ซึ่งเป็น anion-exchange resin เช่นกัน พบว่าตัวค้ำนี้ 1 กรัม สามารถตรึงเอนไซม์ได้ 30 units แต่ถ้านำเอนไซม์มาเติมหมู่ succinyl แล้ว ความสามารถในการตรึงจะลดลง โดยตัวค้ำ 1 กรัม สามารถตรึงเอนไซม์ได้ 70 units

จากการเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ก่อนและหลังตรึง พบว่าเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมีความเสถียรดีที่ pH 7-9 เหมือนกัน และที่pH มากกว่า 9 เอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมีความเสถียรกว่าเอนไซม์อิสระ (รูปที่ 3.8) ส่วนผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อิสระและที่ถูกตรึงจะคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 3.9) โดยจะมีแอคติวิตีดีในช่วง pH 7.5-8.5

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อีกปัจจัยหนึ่ง คือ อุณหภูมิ การวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ อิสระและที่ถูกตรึงพบว่า เอนไซม์ทั้งสองสภาวะมีความเสถียรจนถึงอุณหภูมิ 55°ซ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความเสถียรดีกว่าเอนไซม์อิสระเล็กน้อย (รูปที่ 3.10) อาจเป็นได้ว่าการตรึงเอนไซม์อาจจะทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์มีความแข็งแรงมากขึ้น สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองสภาวะไม่แตกต่างกันคือจะอยู่ในช่วง 60-70°ซ (รูปที่ 3.11) ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว การทำงานของเอนไซม์อิสระจะมีช่วงอุณหภูมิกว้างกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ซึ่งอาจเป็นผลจากการตรึงทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป Kato และ Horikoshi (1984) รายงานว่าการตรึงเอนไซม์ที่ผลิตจาก ATCC 21783 บน synthetic adsorption resin DIAION HP-20 ไม่ทำให้สมบัติของเอนไซม์ต่อ pH และอุณหภูมิเปลี่ยนไป ในขณะที่ Nakamura และ Horikoshi (1977) ซึ่งตรึงเอนไซม์จากแบคทีเรียตัวเดียวกันบน vinylpyridine polymer พบว่าการตรึงเอนไซม์มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงขึ้นจาก 50 เป็น 55°ซ ส่วนสมบัติอื่น ๆ คงเดิม การเลือกตัวค้ำสำหรับการตรึงเอนไซม์จึงน่าจะเป็นปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึง

การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยเอนไซม์ที่ถูกตรึงส่วนใหญ่จะทำในคอลัมน์แก้ว ที่มีการควบคุม

อุณหภูมิ (Kato และ Horikoshi, 1984; Chin-Ping Yang และ Chein-Shyang Su, 1989) แต่เนื่องจากการทำในคอลัมน์ต้องใช้เวลานานในการเตรียมคอลัมน์ตั้งแต่การบรรจุและ equilibrate คอลัมน์และนอกจากนี้อาจจะเกิดการอุดตันขึ้นได้และราคาของคอลัมน์ยังสูงด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ถังปฏิกิริยาแบบกวน ซึ่งเป็นภาชนะแก้ว 2 ชั้นรูปทรงกระบอก ขนาด 80 มิลลิลิตร โดยชั้นนอกมีไว้สำหรับควบคุมอุณหภูมิด้วยการหมุนเวียนของน้ำที่อุณหภูมิ 40°ซ ส่วนชั้นในบรรจุเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงและน้ำแป้ง ใส่แท่งแม่เหล็กเพื่อกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ข้อดีของถังปฏิกิริยาแบบกวนคือ มีโครงสร้างง่าย สามารถสร้างได้โดยใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ มีราคาถูก สามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ pH ภายในถังปฏิกิริยาให้คงที่ได้ง่าย ขั้นตอนในการเตรียมปฏิกิริยาไม่ยุ่งยาก เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ (Hartmeier, 1986)

กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ในถังปฏิกิริยาในระดับอุตสาหกรรมมี 2 แบบคือ การผลิตแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง โดยการผลิตทั้งสองประเภทจะมีข้อดีและข้อเสียต่างกันไป การที่จะเลือกการผลิตแบบใดจึงต้องพิจารณาปัจจัยหลายอย่าง งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการผลิตทั้งสองประเภท สำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องนั้น ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตมีสองอย่างคือ ความเข้มข้นของสับสเตรทและอัตราการป้อนสับสเตรท ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแป้งเป็นไซโคลเดกซ์ทรินโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase เกิดได้ดี (85 %conversion) ในถังปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องเมื่อน้ำแป้งมีความเข้มข้น 1.25 % (รูปที่ 3.14) ที่อุณหภูมิ 40°ซ pH 8.5 อัตราการป้อนสับสเตรท 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทจะทำให้ %conversion ลดต่ำลง (Bergsma และคณะ, 1988) ซึ่งอาจเนื่องจากเกิดปฏิกิริยา disproportionation มาก ทำให้การเกิดไซโคลเดกซ์ทรินน้อยลงได้ (Starnes, 1990) และนอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทมากขึ้นโดยเฉพาะ 5% จะเกิดปัญหาต่อการทำปฏิกิริยา เพราะแป้งมีความหนืดมาก ทำให้การกระจายของของผสมไม่ดี โอกาสที่เอนไซม์จะสัมผัสกับสับสเตรทจะยากขึ้น จากรูปที่ 3.14 ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ 2.5 % แม้ว่าจะไม่ได้ให้ค่า %conversion สูงสุด แต่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะต้องพิจารณาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตหลายอย่างประกอบกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดลอง พบว่าเมื่อสับสเตรทมีความเข้มข้น 2.5% จะให้ผลผลิตไซโคลเดกซ์ทรินสูงกว่าเมื่อมีความเข้มข้น 1.25 % ประมาณ 2 เท่า ในเวลาเท่ากัน (งานไม่ได้แสดงผลในวิทยานิพนธ์นี้) จากรูปที่ 3.12 เมื่อผลิตไซโคล

เดกซ์ทรินแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้น 2.5 % พบว่าเอนไซม์ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุด (76% conversion) เมื่อเวลาผ่านไป 9 ชั่วโมง Yang และ Su (1989) ได้รายงานถึงการตรึงเอนไซม์ CGTase alkaline *Bacillus* sp. บน chitosan และพบว่าสามารถเปลี่ยน 46 % ของแป้ง (2.5% w/v) ไปเป็นไซโคลเดกซ์ทริน

ปัจจัยอีกประการที่มีผลต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องคืออัตราการป้อนสับสเตรท Su และ Yang (1990) ได้รายงานการตรึงเอนไซม์บน chitosan และผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องได้ 70 % conversion เมื่อใช้แป้ง 1%(w/v) และยังได้เสนอว่าจะเพิ่ม % conversion ได้ เมื่อสับสเตรทมีความเข้มข้นสูง โดยเพิ่มขนาดของถังปฏิกิริยา หรือลดอัตราการป้อนสับสเตรทลง จากงานวิจัยนี้พบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ผลผลิตสูงสุด (72 % conversion) เมื่อให้อัตราการป้อนสับสเตรท 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 3.15) ส่วนอัตราการป้อนสับสเตรทที่ต่ำลงจะมีผลให้ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินน้อยลง เพราะจะเป็นการเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยา (reaction time) ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการสลายไซโคลเดกซ์ทรินขึ้นได้ (Sakai และคณะ, 1991) Armbruster และ Jacaway (1972) ได้รายงานถึงการตกตะกอนเพื่อแยกไซโคลเดกซ์ทรินในระหว่างปฏิกิริยาด้วย solvent complexantซึ่งจะเป็นผลดีคือไซโคลเดกซ์ทรินไม่ถูกสลายและจะเกิดปฏิกิริยา cyclization มากขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ดีการใช้ solvent complexant จะต้องคำนึงถึงการนำไปใช้งานด้วย โดยเฉพาะถ้าจะนำไปไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมยาและอาหารแล้วจะต้องเลือก solvent complexant ที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นว่าการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงนี้จะให้ β-ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นผลิตผลหลัก โดยมีอัตราส่วนของ α : β : ɣ-CDs เป็น 1:8.5:2 ซึ่งผลการทดลองนี้ต่างจากการรายงานของวัลยา (2534) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจาก *Bacillus* A11 จะผลิตแต่ β-ไซโคลเดกซ์ทรินเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในงานวิจัยของวัลยา (2534) นั้นจะวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารไตรคลอโรเอธิลีน ซึ่งวิธีนี้จะสามารถตกตะกอน β-ไซโคลเดกซ์ทรินได้ดีกว่าไซโคลเดกซ์ทรินชนิดอื่น ส่วนงานวิจัยนี้จะนำสารละลายที่ได้จากการเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินไปวิเคราะห์โดยตรง จึงทำให้สามารถตรวจพบไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นผลที่ได้จากงานวิจัยทั้งสองจึงต่างกันแม้จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เหมือนกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรึงเอนไซม์จะมีประโยชน์สูงสุดเมื่อสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หรือใช้ได้เป็นเวลานาน โดยเมื่อเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบน DEAE-cellulose แบบนี้ พบว่าสามารถนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง (รูปที่ 3.13) และปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้ยังคงที่ แต่อย่างไรก็ดีเมื่อนำเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงมาวัด dextrinizing activity หลังการใช้แต่ละครั้งจะพบว่าหลังการใช้งานครั้งที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงจะลดลงเหลือเพียง 83 % ของแอคติวิตีตั้งต้น และเมื่อใช้ถึง 6 ครั้ง แอคติวิตีจะเหลือเพียง 60 % ของแอคติวิตีตั้งต้น การที่dextrinizing activity ของเอนไซม์ลดลงแต่ปริมาณการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินยังคงที่นั้น อาจเป็นเพราะบริเวณเร่งของเอนไซม์ส่วนที่ไฮโดรไลซ์พันธะ α-1,4-glucosidic ของแป้ง ซึ่งวัดได้โดย dextrinizing activity (Nakamura และ Horikoshi, 1976) สูญเสียแอคติวิตีไปเนื่องจากการตรึงเอนไซม์ เพราะบริเวณเร่งส่วนนี้จะมีกรดกลูตามิกและแอสปาติกเป็นส่วนประกอบสำคัญ (Klein และ Schulz, 1984) โดยในสภาวะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ที่ pH 8.5 นี้ บริเวณนี้จะมีประจุลบ ดังนั้นบริเวณนี้จึงอาจจะมีส่วนในการตรึงเอนไซม์นี้บน DEAE-cellulose ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไปบ้าง แต่บริเวณเร่งส่วนที่ทำหน้าที่ cyclization ยังคงทำงานได้เหมือนเดิม นั่นอาจเป็นเพราะบริเวณนี้มีฮีสติดีนเป็นส่วนประกอบสำคัญ ซึ่งจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องในการตรึงเอนไซม์ที่ pH ใช้งาน (Bender, 1990) เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่รายงานโดย Nakamura และ Horikoshi (1977) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบน vinylpyridine copolymer สามารถนำมาใช้ซ้ำได้ถึง 4 ครั้ง ครั้งละ 6 ชั่วโมง เมื่อทำแบบไม่ต่อเนื่อง โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเลย

การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องจะให้ผลดีเมื่อสามารถผลิตต่อเนื่องเป็นเวลานาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องเมื่อให้สับสเตรทความเข้มข้น 2.5% และอัตราการป้อนสับสเตรท 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่าเอนไซม์สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ปริมาณคงที่เป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 3.16) หลังจากนั้นปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินจะลดลงเรื่อย ๆ สาเหตุที่ทำให้ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินลดลงได้ อาจเนื่องจากเกิดการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ขึ้นในถังปฏิกิริยา สังเกตุได้จากการที่มีฟองและกลิ่นเหม็นในระหว่างการผลิต ดังนั้นจึงได้ทดลองใส่ยาปฏิชีวนะ streptomycin sulphate 50μg/ml ลงในสับสเตรทด้วย พบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงสามารถทำงานได้ดีขึ้นโดยจะผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ปริมาณคงที่เป็นเวลา 4 วัน และ

ปริมาณที่ผลิตลดลงเพียง 10 % ในช่วง 10 วัน (รูปที่ 3.17) โดยไม่มีอาการการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากนั้นปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินจะลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะ β-CD ที่ถูกผลิตขึ้นมามีผลยับยั้งปฏิกิริยาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ได้ โดยการยับยั้งเป็นแบบ non competitive (Lee และ Kim, 1992) ซึ่งแนวทางการแก้ปัญหานี้วิธีหนึ่งคือการเติม organic solvents เช่น isopropanol หรือ tertiary butanol ซึ่งพบว่าสามารถลดการยับยั้งปฏิกิริยาของ β-CD ได้ ทั้งนี้ organic solvent นี้ อาจทำให้ไซโคลเดกซ์ทรินตกตะกอนหรือมีโครงสร้างเปลี่ยนไป และนอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการสลายไซโคลเดกซ์ทรินโดยเอนไซม์ CGTase ได้อีกด้วย

เนื่องจาก streptomycin sulphate มีราคาแพงและมีอายุการใช้งานไม่นานจึงน่าจะทดลองใช้สารเคมีอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โซเดียมเอไซด์ แต่โซเดียมเอไซด์จะต้องไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CGTase ด้วย จึงทำการทดลองต่อไป พบว่าโซเดียมเอไซด์ที่ความเข้มข้น 0.02 % ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase อิสระ (ภาคผนวกที่ 9) การวิจัยนี้จึงเสนอว่าอาจจะใช้โซเดียมเอไซด์ ซึ่งมีราคาถูกกว่ายาปฏิชีวนะใช้ในปริมาณน้อยกว่าและมีอายุการใช้งานนานกว่า เป็นตัวป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในถังปฏิกิริยาต่อไป แต่อย่างไรก็ตามควรศึกษาผลของโซเดียมเอไซด์ต่อการตรึงเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ในถังปฏิกิริยาก่อน จึงจะมีข้อมูลเพียงพอสำหรับการพิจารณาใช้สารตัวนี้ต่อไปได้

สรุปผลการทดลอง

1.*Bacillus* A11 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูง เมื่อเลี้ยงใน Horikoshi's medium ซึ่งมี 1% แป้งข้าวเจ้า และ 0.75% $NaCO_3$ เป็นส่วนประกอบด้วย

2.สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือเจริญ *Bacillus* A11 ใน Horikoshi's medium ที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยมีอัตราการป้อนอากาศ 2 l/min และอัตราการกวน 300 rpm โดย *Bacillus* A11 จะสามารถผลิตเอนไซม์ให้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดประมาณ 300 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A11ในถังหมักจะคล้ายคลึงกับ *Bacillus circulan* ATCC 21783 โดยแบคทีเรียจะเริ่มเจริญเมื่อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลง พร้อมทั้งจะเริ่มมีการผลิตเอนไซม์และจะผลิตเอนไซม์ CGTase มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเซลล์อยู่ในช่วง stationary phase

4.เอนไซม์ CGTase สามารถตรึงบน DEAE-cellulose ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 - 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ และพบว่า DEAE-cellulose 1 กรัม สามารถตรึงเอนไซม์ CGTase ได้ 350 units (0.32 มิลลิกรัม)

5.เอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเป็น 7.5 และ60-70°ซ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากเอนไซม์อิสระ

6.เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงจะมีความเสถียรต่อ pH ไม่แตกต่างจากเอนไซม์อิสระเมื่ออยู่ในช่วง pH 7-9 แต่ที่ pH สูงกว่า 9.0 เอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมีความเสถียรดีกว่าเอนไซม์อิสระ และทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง55°ซ

7.ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวนแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงจะผลิตไซโคลเดกซ์ทรินเพิ่มขึ้นตามเวลาจนถึงค่าสูงสุด โดยมีอัตราการเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินสูงถึง 76 % เมื่อเวลาผ่านไป 9 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินจะค่อย ๆ ลดลง เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงสามารถนำมาผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบไม่ต่อเนื่องได้ถึง 6 ครั้ง โดยได้ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินคงที่

8.สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องคือ สับสเตรทมีความเข้มข้น 2.5 % โดยมีอัตราการป้อนสับสเตรท 3 ml/hr ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40°ซ pH 8.5 โดยมีอัตราการเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินเป็น 72 % และสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องได้ปริมาณค่อนข้างคงที่ประมาณ 10 วัน เมื่อมียาปฏิชีวนะช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์