บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำการผลิต CGTase ด้วยคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆในอาหารเลี้ยง *Bacillus* sp. A11

จากการศึกษาและทำการวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับ CGTase ได้มีการรายงานว่า CGTase จะถูกผลิตออกมาเมื่อมีการเติมแป้งเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแสดงว่า CGTase เป็นเอนไซม์ที่ต้องได้รับการกระตุ้นให้เกิดการผลิตออกมา (Inducible enzyme) (Bender, 1981) จากการศึกษาของ Lane และ Pirt (1973) ได้รายงานว่า แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และการผลิต CGTase แต่อย่างใด ในทางตรงกันข้ามการผลิตของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นให้มีการผลิตได้เมื่อมีการเติมแป้ง (Carbon source) เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม โดยมีการผลิตในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (Early stationary phase)

ได้มีการศึกษาถึงผลของการใช้แป้งชนิดต่างๆ ในการชักนำให้มีการผลิต CGTase Bender (1981) รายงานว่าเมื่อมีการใช้ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และ Soluble starch สามารถชักนำให้เกิดการผลิต CGTase ได้ดีกว่าแป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และแป้งสาลี จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ วัลยา เตชชัยกุล (2534) ได้มีการทดลองศึกษาผลของการใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิต CGTase พบว่าแป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวโพด ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Medium II สามารถชักนำให้ผลิต CGTase ได้ดีที่สุด จึงได้เลือกใช้แป้งข้าวเจ้าที่เป็นแป้งที่ผลิตภายในประเทศ มีราคาถูก นำมาใช้ทดแทน Soluble starch ที่ต้องสั่งมาจากต่างประเทศรวมทั้งมีราคาแพง หลังจากนั้น อุไรวรรณ รัชธร (2536) ได้ทำการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร

Horikoshi แทนสูตร Medium II โดยที่ยังใช้แป้งข้าวเจ้าในการชักนำการผลิต CGTase เช่นเดิม จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมี(Physical และ chemical properties) ของแป้งชนิดต่างๆพบว่าแป้งต่างชนิดกันมีสมบัติที่แตกต่างกันและมีส่วนประกอบของ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 15) ความแตกต่างเหล่านี้เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ คือ องค์ประกอบของโมโนแซคคาไรด์ในโพลีแซคคาไรด์แต่ละชนิด ลักษณะของการเชื่อมโยงกันระหว่างหน่วยของโมโนแซคคาไรด์ และการเชื่อมด้วยพันธะไฮโดรเจน กับ ionic interaction ภายในโพลีแซคคาไรด์เอง และระหว่างโพลีแซคคาไรด์สายอื่น(ศิวาพร, 2535) ซึ่งส่งผลให้เกิดการชักนำการผลิต CGTase ในปริมาณที่ต่างกัน แม้ว่าแป้งบางชนิด เช่น แป้งข้าวเจ้ากับแป้งมันสำปะหลัง จะมีสัดส่วนของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน ใกล้เคียงกันก็ตาม

Makela และคณะ(1989) ได้รายงานไว้ว่าการเติมแป้งปริมาณ 1.0 เปอร์เซนต์ (w/v) จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากปริมาณแป้งที่สูงขึ้นทำให้เกิดการย่อยน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ เกิดขึ้นในปริมาณมาก เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย ในช่วง Stationary phase แหล่งอาหารและพลังงานจะลดน้อยลง เชื้อจะเริ่มมีการสร้างสปอร์พร้อมๆกับการสร้างเอนไซม์ หากมีปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป กลูโคสจะกดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมา หรือทำให้มีการสร้างออกมาช้าลง (Catabolic repression) (Doi,1973)

Nakamura และ Horikoshi (1975) ได้ทดลองชักนำให้มีการผลิต CGTase โดยใช้น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (กลูโคส, ฟรุคโตส), ไดแซคคาไรด์ (มอลโตส, ซูโครส), Soluble starch, Dextrin และ β-CD พบว่าน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ และไดแซคคาไรด์ ไม่สามารถชักนำให้มีการผลิต CGTase ได้ ส่วน Soluble starch สามารถชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ได้

ตารางที่ 15 แสดงสมบัติทางกายภาพและทางเคมี (Physical and chemical properties) ของแป้งชนิดต่าง ๆ (Pomeranz, 1985)

Starch	Granule size (um)	Amylose(%)	Solubility at 95°C(%)	Gelatinization range (° C)	Source	Granule Shapes	Resistance to shear
Corn	5-25	26	25	62-77	Cerial,Seed	Round, Polygonal	Medium
Potato	15-100	24	82	56-69	Tuber,Root	Egg-like,oster indentation	Low
Rice	3-8	17	-	61-78	Cerial,Seed	Polygonal cluster	Medium
Sago	20-60	27	-	60-72	Pith,Stem	Egg-like,truncate form	Low
Tapioca	3-35	17	48	52-64	Tuber,Root	Round-oval,truncate form	Low
Wheat	2-35	25	41	62-75	Cerial,Seed	Round.eliptical	Medium

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และชักนำได้ดีที่สุดรองจาก Dextrin เนื่องจากส่วนประกอบของ Soluble starch ได้มาจากการย่อยแป้งด้วยสารละลายกรด จึงประกอบไปด้วย โพลีแซคคาไรด์ Dextrin และ น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (Harry,1965) ส่วน Dextrin นั้นได้มาจากแป้งที่ผ่านการไฮโดรไลส์ด้วยกรดและความร้อนทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลงทั้งหมด (homogeneous) มีขนาดประมาณ 5-15 หน่วยกลูโคส (Kaih และ Sterling, 1962) แสดงให้เห็นว่าความยาวของโมเลกุล (chain length) มีผลต่อการชักนำการผลิตเอนไซม์ได้เช่นเดียวกัน

ดังนั้น ในช่วงเริ่มต้นจึงทำการศึกษาผลของคาร์โบไฮเดรต ชนิดต่างๆ ที่มีโครงสร้างและขนาดของโมเลกุลที่แตกต่างกันเป็นตัวชักนำให้มีการผลิต CGTase โดยใช้แป้งอะไมโลส, อะไมโลเพคติน, Dextrin type II และ Dextrin type III จากแป้งข้าวโพด เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับการใช้แป้งข้าวเจ้า ที่มีการใช้เป็นตัวชักนำภายในภาควิชาชีวเคมีอยู่ก่อนแล้ว จากการทดลองนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยวิธีการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้งข้าวโพดและอาศัยความจำเพาะระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทแป้ง (Pongsawasdi และ Yagisawa,1987) พบว่า Dextrin type II สามารถชักนำให้มีการเอนไซม์ได้สูงที่สุด (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับการของ Nakamura และ Horikoshi (1975) ที่รายงานว่า Dextrin เป็นตัวชักนำให้มีการผลิต CGTase ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ Soluble starch

สำหรับการชักนำด้วยอะไมโลสนั้น พบว่าไม่มีการผลิต CGTase ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะทางโครงสร้างของอะไมโลสมีลักษณะเป็นโพลิเมอร์เส้นตรงโดยมีหมู่ไฮดรอกซิลปฐมภูมิ (Primary hydroxyl group) 1 หมู่ และมีหมู่ไฮดรอกซิลทุติยภูมิ (Secondary hydroxyl group) 2 หมู่ ทำให้สามารถเกิดการเรียงตัวขนานกันขึ้น เกิดการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้โมเลกุลมีความแข็งแรงสูง บิดตัวเป็นเกลียว ไม่ละลายน้ำ ในการทำให้เกิดการละลายต้องใช้ความร้อนสูงถึง 150 องศาเซลเซียส และมีอัตราการคืนตัวสูงเกิดเป็นตะกอนแข็งสีขาวขุ่น

(Carroll และ Cheung, 1960) จึงอาจเป็นไปได้ว่า เอนไซม์ที่หลั่งออกมาในช่วงแรกของการเจริญเติบโต มีปริมาณต่ำ และไม่สามารถเข้าไปย่อยอะไมโลสได้ จึงไม่ได้สารที่อาจเป็นตัวชักนำ จึงไม่เกิดการผลิต CGTase ออกมา

เมื่อทำการแปรผันปริมาณของ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ปริมาณ Dextrin type II เท่ากับ 2.0 เปอร์เซนต์ (w/v) เหมาะสมในการชักนำมากที่สุด ได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 5,435 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และค่า dilution limit เท่ากับ 2^{12}

เมื่อทำการเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า และจากการชักนำด้วย Dextrin type II ทางด้านต่างๆ ได้แก่ รูปแบบของโปรตีน (Protein pattern) จากการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟริซิส แบบไม่เสียสภาพ (รูปที่9) พบว่ารูปแบบของโปรตีนที่ปรากฏทั้งรูปแบบโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude enzyme) (ช่อง1,2) และเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partially purify) (ช่อง 3,4) พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยช่องที่ 3 และ 4 ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ แถบที่ 1 เป็นแถบที่คมชัดที่สุด เช่นเดียวกัน เมื่อทำการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์บนแผ่นเจล ที่ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน (รูปที่ 10) พบว่า ช่องที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นแถบของแอคติวิตีของน้ำเลี้ยงเชื้อ ปรากฏจำนวนแถบใสขึ้นมา 4 แถบ เท่ากัน โดยแถบที่ 4 ของช่องที่ 2 มีความคมชัดน้อยกว่าช่องอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเจลที่ย้อมด้วย Dye staining for cyclodextrin ซึ่งเป็นวิธีย้อมที่มีความจำเพาะกับแอคติวิตีของ CGTase (รูปที่ 11) ปรากฏแถบสีเหลืองขึ้น 2 แถบ ทั้งสองช่อง เนื่องจากการที่ Phenolphthalein เข้าไปอยู่ในโพรงของไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นทำให้บริเวณที่ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินนั้นไม่ติดสีแดง ซึ่งทั้งสองแถบนี้ตรงกับแถบที่ 1 และ 2 ของทุกช่องในรูปที่ 9 และรูปที่ 10 อาจบอกได้ว่าแถบที่ 1 และ 2 ของทุกช่อง (รูปที่ 9, 10 และ 11) เป็นแถบของ CGTase ที่มีไอโซไซม์ (Isozyme) อย่างน้อย 2 ไอโซไซม์ จึงอาจบอกได้

ว่าเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำด้วย แป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II มีรูปแบบของโปรตีนไม่แตกต่างกัน

เมื่อทำการแยกโปรตีนที่ได้โดยการทำ IEF (รูปที่ 12) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI (ช่องที่ 1) จากการทำเป็นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 4) พบว่าช่องที่ 2 ปรากฏแถบโปรตีนขึ้น 4 แถบที่ค่า pI ประมาณ 5.67, 5.77, 5.96 และ 7.87 ส่วนช่องที่ 3 ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ ที่ค่า pI ประมาณ 5.77, 5.96 และ 7.87 โดยแถบที่ปรากฏมีความคมชัดน้อยกว่าและไม่ปรากฏแถบที่ 1 ของช่องที่ 2 จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับ CGTase

Mattsson และคณะ (1990) พบว่า CGTase จาก *Bacillus circulans* var. *alkalophillus* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography แล้ววิเคราะห์หาค่า pI ด้วยวิธี Immobilized pH gradient (IPG) สามารถแยกเอนไซม์ได้มากกว่า 6 subforms ที่ช่วง pI ประมาณ 4.75-4.99

Bovetto และคณะ (1992) ทำการแยก CGTase จาก *Bacillus circulans* E 192 ด้วยการตกตะกอนแล้วนำสารละลายที่ได้ผ่าน Ion exchange และ Affinity chromatography วิเคราะห์ด้วยวิธี Chromatofocusing column แยกได้ 2 ไอโซไซม์ ที่ค่า pI 6.7 และ 6.9

Abelyan และคณะ (1994) ทำการแยก CGTase จาก *Bacillus* stain INMIA-T6, INMIA-T42, INMIA-A71/1 และ INMIA-1919 สามารถแยกไอโซไซม์ได้ 4-6 subforms

สำหรับการศึกษาภายในภาควิชาชีวเคมี พบว่า CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต และผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose พบว่ามี 4 ไอโซไซม์ ค่า pI ประมาณ 4.4-4.9 เมื่อนำเอนไซม์ไปผ่านคอลัมน์ PBE 94 Chromatofocusing (pH 4-6) พบว่ามี 2 ไอโซไซม์ ที่ค่า pI ประมาณ 4.8 (จิราพร, 2537) ดังนั้น จึงคาดว่าแถบที่ 1-3 ในช่องที่ 2 และแถบที่ 1-2 ของช่องที่ 3 เป็นไอโซไซม์ของ CGTase แต่เนื่องจากวิธีการในการวิเคราะห์ค่า pI ที่แตกต่างจากจิราพร(2537)

และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ตัวอย่าง รวมทั้งในการทำการทดลองใช้ Ampholine pH 5-7 และใช้โปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI ที่มีค่า pI ตั้งแต่ 4.65-9.60 การอ่านค่า pI แล้วนำไปทำเป็นกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบค่าที่อ่านได้จึงอาจมีความคลาดเคลื่อนกันโดยที่ค่า pI ที่อ่านได้อาจสูงเกินจริง เพราะการใช้โปรตีนมาตรฐานที่ไม่เหมาะสมกับช่วง pH ที่สามารถแยกได้ดี ต้องทำการพิสูจน์โดยการใช้โปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI ที่อยู่ในช่วง 5-7 มาทำการเปรียบเทียบ · ดังนั้น อาจบอกได้ว่าเอนไซม์จากการชักนำด้วย Dextrin type II มีการชักนำให้มีการผลิตไอโซไซม์บางตัวได้มากกว่าเอนไซม์จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า เช่น แถบโปรตีนแถบที่ 1 ที่ค่า pI 5.67 หรืออาจเป็นไปได้ว่า การที่ใช้แป้งต่างชนิดกันเป็นตัวชักนำอาจได้ไอโซไซม์ที่ค่า pI ต่างกัน ซึ่งไม่สามารถแยกให้เห็นความแตกต่างโดย โพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟริซิส แบบไม่เสียสภาพได้ เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะ และค่า dilution limit พบว่าเอนไซม์จากการชักนำด้วย Dextrin typeII มีค่าสูงกว่าเอนไซม์จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้าเมื่อพิจารณาถึงผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน (% conversion และ α:β:γ ratio) พบว่ามีสัดส่วนและผลผลิตใกล้เคียงกัน

ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่า ทั้งแป้งข้าวเจ้า และ Dextrin typeII สามารถชักนำให้มีเกิดการผลิต CGTase ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันบ้างในสัดส่วนของไอโซไซม์ หรือรูปแบบของไอโซไซม์ การที่ Dextrin typeII มีความเหมาะสมต่อการชักนำการผลิต CGTase นั้น อาจเนื่องมาจากโครงสร้างและความยาวของโมเลกุล (ตารางที่ 16) ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ และการผลิตเอนไซม์มากที่สุด

ตารางที่ 16 แสดงความยาวและโครงสร้างของแป้งชนิดต่าง ๆ (Mc illroy, 1948)

Starch	Chain length (glucose unit/chain)	Structure
Amylose	300-400	Unbranched
Amylopectin	20-25	Branched
Dextrin Type II	11-12	Branched
Dextrin Type III	7-8	Branched

การใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรทของ CGTase

ได้มีรายงานว่าแป้งต่างชนิดกันมีผลกระทบต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน โดยพบว่า CGTase จากการชักนำด้วย แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า และ waxy maize จาก *Thermoanaerobacter* ATCC 53627 ให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 28.2, 29.5, 17.7 และ 23.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (Starnes, Flint และ Katkocin, 1990)

จากรายงานของ ทิพย์สุภา มาลัย (2538) ว่าเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการย่อยด้วย α-amylase เพื่อให้ขนาดของโมเลกุลเล็กลงพอเหมาะกับการทำปฏิกิริยา เป็นสับสเตรทของ CGTase สามารถเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินได้ และเมื่อแปรผันความเข้มข้นของสับสเตรทแป้งข้าวเจ้า และความเข้มข้นของ CGTase พบว่าสามารถให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินได้ทั้ง 3 ชนิด โดยที่ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β-CD

ในการทำการทดลองจึงเลือกใช้คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการชักนำการผลิตCGTase (อะไมโลส, อะไมโลเพคติน, Dextrin type II และ Dextrin type III ; 2.0% ,w/v) มาเป็นสับสเตรทในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน (ตารางที่ 8) พบว่าสับสเตรทที่แตกต่างกันจะให้สัดส่วนของ α:β:γ ที่แตกต่างกัน โดยให้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ β-CD และพบว่าเมื่อโมเลกุลของสับสเตรทเล็กลง จะปรากฏ γ-CD ในสัดส่วนที่สูงขึ้น ในขณะที่ α– และ β-CD มีแนวโน้มที่จะลดลง

จากวัตถุประสงค์ของการทำวิจัยมุ่งเน้นในการศึกษา หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดอื่นนอกเหนือจาก β-CD ดังนั้นผลการทดลองแสดงว่าสับสเตรทที่มีความยาวของหน่วยกลูโคสสั้นๆน่าจะเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมที่จะสามารถให้ผลิตภัณฑ์ γ-CDได้ดีจึงทำการทดลองเปลี่ยนสับสเตรทมาใช้น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลของกลูโคส เป็นส่วนประกอบ 2-7 โมเลกุล (2.0 %; w/v) ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน ผลการทดลองดังตารางที่ 10 พบว่าสับสเตรท Maltotetraose (G4) และสับสเตรท Maltopentaose (G5) ได้ให้ผลิตภัณฑ์ γ-CD ในปริมาณที่สูงแต่อย่างไรก็ตาม พบว่าสารละลายผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่นำไปทำการวิเคราะห์อาจมีการปนเปื้อนของน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาปนเปื้อนอยู่ด้วย พีคที่ปรากฏอาจมีน้ำตาล G4, G5 และ G6 ปนอยู่กับพีคของ α–,β– และ γ–CD (รูปที่ 15) ซึ่งมีลักษณะของพีคที่มีการเหลื่อมซ้อนกันและมีสัดส่วนของ α:β:γ ไซโคลเดกซ์ทรินผิดไปบ้างโดยเฉพาะสัดส่วนของ β-CD จึงทำการทดลองยืนยันผลการทดลองโดยใช้วิธี โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้สารละลายในการแยกในปริมาณต่ำ (3-5 ไมโครกรัม) และสามารถแยกผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน ทั้ง 3 ชนิด ได้อย่างชัดเจนเพราะน้ำตาลที่ปนเปื้อนกับสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินนั้นไม่ปรากฏสีกับ Methanolic iodine (Wolfrom และคณะ,1965 และ Takeo และคณะ, 1970) แสดงผลการทดลองดัง รูปที่ 16 พบว่าสับสเตรท G2 ไม่ให้

ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินเลย และพบว่าสับสเตรทที่จำนวนหน่วยกลูโคสเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มของการให้ผลิตภัณฑ์ β-CD เพิ่มขึ้นในขณะที่แนวโน้มของการให้ α-CD ลดลง และสำหรับสับสเตรท G4 และ G5 ปรากฏสีน้ำตาลของ γ–CD อย่างชัดเจน (รูปที่ 15) จึงเป็นการยืนยันว่าการใช้น้ำตาล G4 และ G5 เป็นสับสเตรทให้ γ–CD สูงกว่าน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ

จากรายงานของ ทิพย์สุภา มาลัย (2538) พบว่าเมื่อใช้ β-amylase 20 ยูนิต บ่มกับสารละลายผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกตัดออกเป็นน้ำตาล G2 และ G3 โดยไม่มีผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินแต่อย่างใด ทำให้น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ไม่เข้ามาปนเปื้อนกับพีคของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน

จากรูปที่ 16 พบว่าเมื่อบ่มสารละลายจากปฏิกิริยาระหว่าง CGTase กับน้ำตาล G4 และ G5 กับ β-amylase 20 ยูนิต บ่ม 1 ชั่วโมง สามารถย่อยน้ำตาล G4 และ G5 เกิดเป็นน้ำตาล G2 และ G3 ได้หมดจริง เมื่อทำการทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ แล้วบ่มด้วย β-amylase ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (ตารางที่ 14) พบว่าได้สัดส่วนของไซโคลเดกซ์ทรินแตกต่างกับเมื่อไม่ได้ผ่านการย่อย reaction mixture ด้วย β-amylase (ตารางที่ 11) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลที่เหลือในปฏิกิริยามีผลต่อสัดส่วนของไซโคลเดกซ์ทริน โดยเฉพาะ β–CD และพบว่าเมื่อหน่วยของสับสเตรทกลูโคสเพิ่มขึ้นผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยมีสัดส่วนของ α:β:γ แตกต่างกันโดย α–CD มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ β–CD มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ส่วนสับสเตรท G4 และ G5 ให้สัดส่วนของ γ–CD ในปริมาณที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการใช้วิธี TLC วิเคราะห์

ดังนั้น สับสเตรท G4 และ G5 จึงเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับการผลิต γ–CD ในสัดส่วนที่สูง โดยอาจเป็นไปได้ว่าไอโซไซม์ที่ได้แต่ละรูปแบบอาจมีความสามารถในการใช้

สับสเตรทความยาวต่างกัน ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินต่างกันด้วย โดยในกรณีนี้การใช้ Dextrin type II อาจชักนำไอโซไซม์ที่มีค่า pI ต่างจากการใช้แป้งข้าวเจ้า ซึ่งเมื่อได้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เหมาะสมจึงได้ผลิตภัณฑ์ γ-CD สูงขึ้น

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน

สภาวะที่เหมาะสมจำเป็นต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งประกอบไปด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณเอนไซม์ ความเข้มข้นของสับสเตรท และระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท การปรับสภาวะต่างๆเหล่านี้ให้เหมาะสมจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินสูงขึ้น (Starnes,1990)

จากการแปรผันปริมาณ CGTase ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทน้ำตาล G4 และ G5 โดยทำการแปรผันตั้งแต่ 50, 150, 250 และ 500 ยูนิตต่อมิลลิกรัมสับสเตรท เนื่องจากที่ปริมาณเอนไซม์ที่ 25 ยูนิตต่อมิลลิกรัมสับสเตรท นั้นให้ปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินและสัดส่วนของ γ-CD ที่ต่ำจึงไม่ทำการแปรผันในความเข้มข้นนี้ (รูปที่ 17, 18) พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมสับสเตรทเพิ่มขึ้นจะทำให้ความสามารถในการผลิต β- และ γ-CD ลดลงในขณะที่ α-CD มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นที่ปริมาณเอนไซม์ 50 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทจึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิต γ-CD มากที่สุด เมื่อคิดเป็นสัดส่วน CGTase ต่อปริมาณสับสเตรทได้ค่า E:S เท่ากับ 1:200,000 (w/w) ได้มีรายงานว่า สัดส่วน 1:1,000-5,000 เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในการผลิตระดับอุตสาหกรรมมากที่สุด (Horikoshi และคณะ, 1982 ; Bender, 1983, 1984) จากการศึกษาของ ทิพย์สุภา มาลัย (2538) ได้ใช้สัดส่วน E:S เท่ากับ 1:100,000 ในการผลิต β-CD ได้ % conversion เท่ากับ 15.59 และสำหรับ γ-CD เท่ากับ 2.56 เมื่อไม่มีการใช้ complexing agent ช่วยในการตกตะกอน β-CD จึงเป็นไปได้ว่าสัดส่วน E:S ต่ำจะทำให้ β-CD สูง แต่เมื่อสัดส่วน E:S สูงขึ้นมากๆ

เช่น ในการทดลองนี้ซึ่งใช้สัดส่วน 1:200,000 จะได้ผลิตภัณฑ์ γ-CD สูงขึ้น (รูปที่ 19, 20) และพบว่าเมื่อใช้ปริมาณสับสเตรทเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณ β-CD เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ γ-CD นั้นมีการผลิตสูงที่สุดที่ความเข้มข้นสับสเตรท 2.0 เปอร์เซนต์ ดังนั้นปริมาณสับสเตรท 2.0 เปอร์เซนต์ จึงเหมาะสมในการผลิต γ-CD ที่สุด หลังจากนั้น ทำการแปรผันระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของ CGTase กับสับสเตรท G4 และ G5 (รูปที่ 21, 22) พบว่าสับสเตรทน้ำตาล G4 และ G5 ให้รูปแบบของกราฟที่คล้ายคลึงกันคือ ระยะเวลาที่ 0-24 ชั่วโมง มีการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินเพิ่มขึ้นทั้ง β- และ γ-CD และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นที่ระยะเวลาการบ่ม 36 ชั่วโมง ปริมาณผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน β- และ γ-CD จะลดลง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ α-CD จากการใช้สับสเตรท G5 ได้มีสัดส่วนเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย

ดังนั้น ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเหมาะสมในการผลิต γ-CD มากที่สุด ทั้งสับสเตรทน้ำตาล G4 และ G5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. ขนาดโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการชักนำการผลิต CGTase
2. Dextrin type II 2.0 เปอร์เซนต์ (%; w/v) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมในการชักนำการผลิต CGTase ให้สูงขึ้น
3. จากการชักนำด้วย Dextrin type II อาจทำให้มีการผลิตไอโซไซม์บางตัวได้มากกว่าเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า
4. ขนาดโมเลกุลของแป้งที่ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินมีผลต่อสัดส่วนผลิตภัณฑ์ α:β:γ ไซโคลเดกซ์ทริน และสับสเตรทที่มีขนาดโมเลกุลสั้นจะให้สัดส่วนของ γ-CD สูงขึ้น
5. น้ำตาล G4 และ G5 เป็นสับสเตรทที่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ γ-CD ได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าสับสเตรทน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์อื่นๆ
6. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต γ-CD คือใช้ CGTase 50 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (E:S; 1:200,000; w/w) บ่มกับสับสเตรท G4 และ G5 2.0 เปอร์เซนต์ (%; w/v) และใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย