

การคัดกรองแบบที่เรียกว่าผลิตดีแวนเนสและลักษณะสมบัติของเอนไซม์



นายรัชต ไชคชัยชวลิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

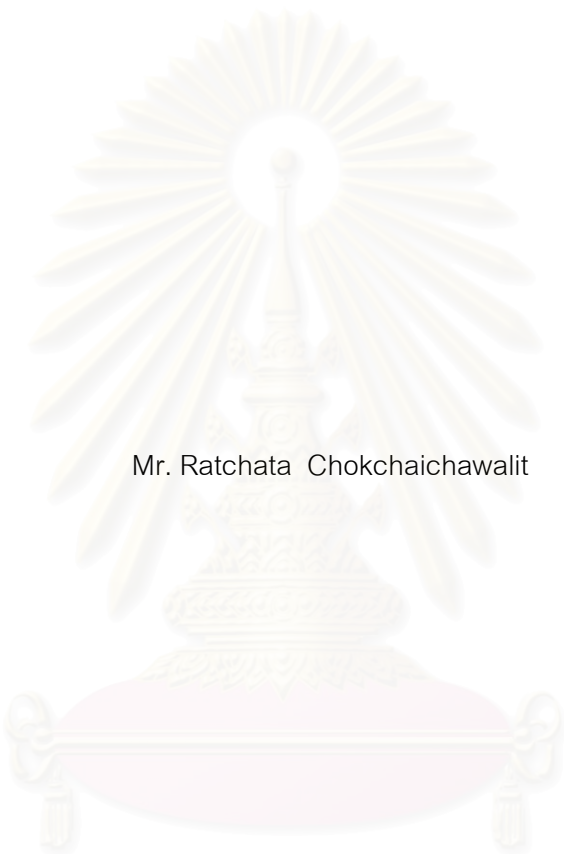
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-1944-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF LEVANASE-PRODUCING BACTERIA
AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME



Mr. Ratchata Chokchaichawalit

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

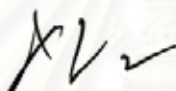
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-1944-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนเนสและลักษณะสมบัติของเอนไซม์
โดย นายรัชต ไชคชัยชวลิต
สาขาวิชา ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

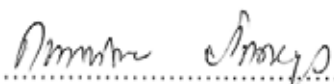
รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาราชการแทน
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธราพงษ์ วิจิตรศานต์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์)

กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง)

รัชต โชคชัยชวลิต : การคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนเนสและลักษณะสมบัติของเอนไซม์
(SCREENING OF LEVANASE-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE
ENZYME) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต 78 หน้า, ISBN 974-14-1944-9

การคัดกรองลิแวนเนสที่ย่อยลิแวนให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอส หรือ ลิแวนไตรโอส จากแบคทีเรีย ได้อิโซเลตที่มีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าเป็น *Microbacterium* sp. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิแวนเนสเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียใน levan minimum medium คือ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นระยะเวลา 12–20 ชั่วโมง หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตติดตามด้วยการแยกโดยโครมาโตกราฟีคอลัมน์ดีอีเออีโตโยเฟิร์ล และคอลัมน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล เอนไซม์จะมีความบริสุทธิ์ขึ้น 9 เท่า เหลือแถบโปรตีน 2 แถบ ซึ่งติดสีย้อมแอกติวิตีเพียง 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุลของลิแวนเนสเมื่อวิเคราะห์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100 มีค่า 43,900 ดาลตัน และวิเคราะห์โดยเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสมีค่า 43,800 ดาลตัน ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของลิแวนเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน คือ 7.0 ใน cacodylate buffer และมีเสถียรภาพสูงสุดใน glycine-HCl buffer ที่ pH 8.0–9.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของลิแวนเนส คือ 37°C และเอนไซม์มีเสถียรภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ 30°C เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อลิแวนสูงมาก ไม่สามารถย่อยสับสเตรตชนิดอื่นได้นอกจากนี้ยังพบว่า serine อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์และควรมีโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลิแวนด้วยเอนไซม์นี้คือ ลิแวนไบโอส และลิแวนไตรโอส โดยมีลิแวนไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก การย่อยลิแวนของลิแวนเนสเป็นการย่อยจากด้านปลาย (exo-acting manner)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต... รัชต โชคชัยชวลิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา... ศิริพร สิทธิประณีต

4572446723: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : LEVANASE / SCREENING / CHARACTERIZATION

RATCHATA CHOKCHAICHAWALIT : SCREENING OF LEVANASE-PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME. THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROF. SIRIPORN SITTHIPRANEED, Ph. D., 78pp. ISBN 974-14-1944-9.

Levan-assimilating microorganisms were screened for levanbiose or levantriose-generating enzyme production. The isolate which produced the highest enzyme activity was identified using 16S rRNA gene sequences as *Microbacterium* sp. Optimum conditions for producing levanase in levan minimum medium were pH 7.0 at 40°C for 12-20 hours. Levanase was partially purified 9 folds from culture medium of *Microbacterium* sp. by using ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl column and Butyl-Toyopearl column. The two protein bands obtained with only one activity band. The molecular weight of the levanase was estimated to be 43,900 and 43,800 Da by Sephadex G-100 column and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. The optimum pH for levanase activity was 7.0 (cacodylate buffer). The partial purified enzyme was stable at pH range of 8.0-9.0 in glycine-HCl buffer. Optimum temperature for enzyme reaction was 37°C. Enzyme was the most stable at 30°C. Levanase showed an absolute substrate specificity for levan. Serine residues in the enzyme might play an important role in the catalysis. The enzyme may have metal ion as cofactor. The enzyme hydrolyzed levan in an exo-acting manner.

Department of Biochemistry
Field of study Biochemistry
Academic year 2005

Student's signature. *Ratchata Chokchaichawalit*
Advisor's signature. *Siriporn Sitthipraneed*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิริทิพย์ประณีต ที่ได้ให้ความกรุณา เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์, รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง ที่กรุณาให้คำแนะนำต่อ ผู้เขียน รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล ที่คอยให้คำแนะนำและให้ ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอบคุณพี่โอม พี่ชัย พี่บิ่ง น้องต๋ม น้องเอิร์น น้องตุล น้องนก และ เจ๊ียบ เป็นพิเศษ ที่ให้ ความเป็นกันเอง คอยให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และกำลังใจขณะทำวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกด้าน เอกสารและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ ความช่วยเหลือและกำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคุณพ่อและคุณแม่ ที่ให้ความรัก กำลังใจ ความเข้าใจ และคอยให้ ความอนุเคราะห์ทุก ๆ ด้านอย่างสมบูรณ์ตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

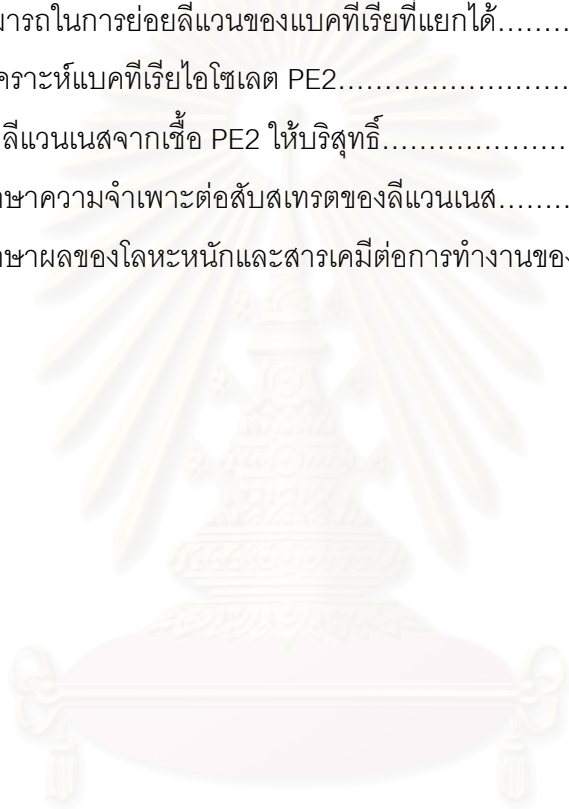
หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ลิแวน.....	1
ลิแวนกับการประยุกต์ใช้.....	5
ลิแวนเนส.....	5
ลิแวนเนสกับการประยุกต์ใช้.....	7
การศึกษาลิแวนเนสจากแบคทีเรียต่าง ๆ	10
2 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง.....	14
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	14
2.2 สารเคมี.....	15
2.3 เอนไซม์.....	16
2.4 ไพโรเมอ์.....	16
2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	17
2.6 วิธีการทดลอง.....	17
2.6.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่ร้อนที่ผลิตลิแวนเนส	17
2.6.2 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้.....	18
2.6.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิต ลิแวนเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้.....	20
2.6.4 การทำลิแวนเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	20
2.6.5 การศึกษาลักษณะสมบัติของลิแวนเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน.....	23

บทที่		
3	ผลการทดลอง.....	26
	3.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตดีเอ็นเอ.....	26
	3.2 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยลักษณะสมบัติทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ยีน 16s rRNA.....	33
	3.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้.....	36
	3.4 การทำดีเอ็นเอสำหรับวิธีบางส่วน.....	39
	3.5 การศึกษาลักษณะสมบัติของดีเอ็นเอสำหรับวิธีบางส่วน.....	46
4	วิจารณ์ผลการทดลอง.....	59
5	สรุปผลการทดลอง.....	64
	รายการอ้างอิง.....	66
	ภาคผนวก.....	70
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	78

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิแวน..... 3
1.2	เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิแวนเนส..... 6
1.3	เปรียบเทียบลักษณะสมบัติของลิแวนเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ 12
3.1	ความสามารถในการย่อยลิแวนของแบคทีเรียที่แยกได้..... 29
3.2	ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียไฮโซเลต PE2..... 34
3.3	ผลการทำลิแวนเนสจากเชื้อ PE2 ให้บริสุทธิ์..... 43
3.4	ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของลิแวนเนส..... 56
3.5	ผลการศึกษาผลของโลหะหนักและสารเคมีต่อการทำงานของลิแวนเนส..... 57



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ.....	2
1.2	แบบจำลองรูปร่างโมเลกุลของดีเอ็นเอ.....	2
1.3	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากซูโครสโดยดีเอ็นเอซูโครส.....	4
1.4	ปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอโดยดีเอ็นเอเนส.....	6
3.1	ผลการวิเคราะห์ TLC เพื่อดูความสามารถในการย่อยดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละไอโซเลต	27
3.2	การเจริญเติบโตและการผลิตดีเอ็นเอเนสที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแต่ละชนิด	30
3.3	agarose gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากแม่พิมพ์ที่เป็น genomic DNA จากเชื้อ PE2 โดยใช้ primer pA และ pH'	32
3.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนจาก genomic DNA ของเชื้อ PE2 ด้วยไพรเมอร์ pA และ pH'	35
3.5	ผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อ PE2.....	37
3.6	ผลของอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อ PE2.....	38
3.7	คอลัมน์ดีอีเอซีโตโยเฟิร์ล.....	41
3.8	คอลัมน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล.....	42
3.9	รูปแบบของโปรตีนที่แยกโดย 10% พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (PAGE) จากแต่ละขั้นตอนของการทำดีเอ็นเอเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	44
3.10	รูปแบบของดีเอ็นเอเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 7.5% พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (PAGE) ที่มี 0.1% ดีเอ็นเอผสมอยู่.....	45
3.11	ความสัมพันธ์ระหว่าง Kav และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอเนสโดย คอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100.....	47
3.12	รูปแบบของโปรตีนจากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้ดีเอ็นเอเนสบริสุทธิ์บางส่วนที่แยกด้วย 7.5% เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (SDS-PAGE).....	48
3.13	ความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอเนสโดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส.....	49
3.14	ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของดีเอ็นเอเนส.....	51

รูปที่		หน้า
3.15	ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของดีแวนเนส.....	52
3.16	ผลของ pH ต่อความเสถียรของดีแวนเนส.....	53
3.17	ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อความเสถียรของดีแวนเนส.....	54
3.18	ผลการวิเคราะห์ TLC เพื่อดูขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยดีแวนด้วยดีแวนเนส จาก PE2.....	58



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

A	Absorbance
bp	Base pair(s)
β -ME	2-Mercaptoethanol
cm	Centimetre(s)
$^{\circ}$ C	Degree celcius
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiothretol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene-diaminetetra-acetic acid
IAM	Iodoacetamide
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
M	Molar
OD	Optical Density
μ g	Microgram
μ L	Microlitre
mg	Milligram
ml	Millilitre
NEM	N-Ethyl-maleimide
U	Unit
min	Minute
ng	Nanogram
PCMB	p-Chloromercuribenzoic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethane-sulphonyl fluoride
rpm	Revolution per minute

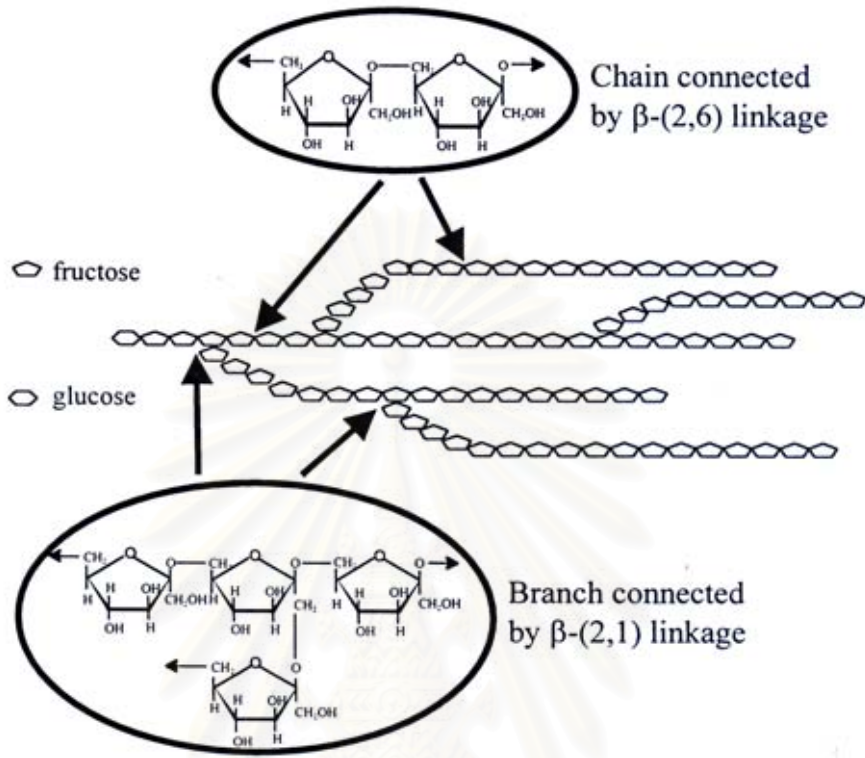
บทที่ 1

บทนำ

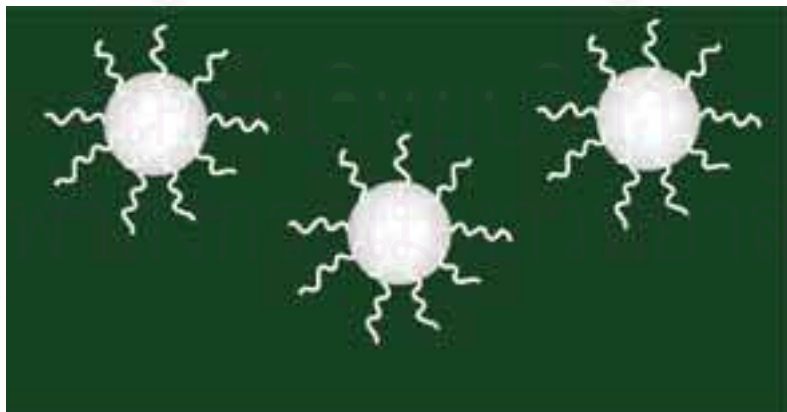
หนึ่งในไบโอพอลิเมอร์ที่พบได้มากในธรรมชาติ คือ พรุทแทนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ (polymer) ของพรุทโทสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา 2,1 ($\beta(2-1)$ fructosyl-fructose links) และ/หรือปีตา 2,6 ($\beta(2-6)$ fructosyl-fructose links) พรุทแทนแยกได้เป็น 2 ชนิดตามประเภทของพันธะที่เชื่อมต่อกันคือ อินูลิน (inulin) และลีแวน (levan) โดยอินูลินเป็นพรุทแทนที่ประกอบด้วยพรุทโทส 2-150 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา 2,1 บางโมเลกุลของอินูลินอาจมีปลายด้านหนึ่งเชื่อมกับกลูโคสในลักษณะเดียวกับการเชื่อมของซูโครส ในธรรมชาติแหล่งที่พบอินูลินได้มาก ได้แก่ พืช เช่น กล่ำวย หอมใหญ่ กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง และ แห้วบัวตอง เป็นต้น ส่วนลีแวนเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยพรุทโทส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา 2,6 โดยปลายด้านหนึ่งอาจมีกลูโคสที่เชื่อมต่อกับพรุทโทสในลักษณะการเชื่อมของซูโครสเช่นเดียวกับอินูลิน

ลีแวนเป็นโฮมอพอลิเมอร์ (homopolymer) ของพรุทโทสซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะปีตา 2,6 เป็นสายหลักและอาจมีกิ่งที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา 2,1 ดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 1.1 รูปร่างโมเลกุลของลีแวนเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะมีลักษณะเป็นทรงกลม ดังภาพจำลองที่แสดงในรูปที่ 1.2 ลีแวนที่ผลิตจากพืช (plant levan) จะถูกเรียกได้อีกอย่างว่า graminans หรือ phleins จะมีขนาดอยู่ในช่วง 10 ถึงประมาณ 200 หน่วยพรุทโทส ซึ่งสั้นกว่าลีแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (microbial levan) ซึ่งโดยปกติมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2×10^6 ถึง 10^8 ดาลตัน ประกอบด้วยพรุทโทส 10,000-600,000 หน่วย ขนาดโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับอิทธิพลของภาวะในการสังเคราะห์ เช่น ความแรงไอออน (ionic strength) อุณหภูมิ และตัวถูกละลายร่วม (co-solutes) นอกจากนี้ลีแวนจากพืชยังมีจำนวนกิ่งมากกว่าลีแวนจากจุลินทรีย์

ลีแวนพบเป็นองค์ประกอบของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น หญ้า (*Dactylis glomerata*, *Poa secunda* และ *Agropyron cristatum*) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) (Han, 1990) นอกจากนี้ยังมีการรายงานใน รา (*Aspergillus sydawi* และ *Aspergillus versicolor*) และ ยีสต์ (Han, 1990) ด้วย Han (1990) และ Hendry และ Wallace (1993) รายงานชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลีแวน ดังแสดงในตารางที่ 1.1 การผลิตลีแวนจากจุลินทรีย์นั้นอาศัยปฏิกิริยาทรานส์พรุทโทซิเลชัน (transfructosylation) จากการทำงานของลีแวนซูเครส (levansucrase) โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสับสเตรต ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.1 โครงสร้างโมเลกุลของดีแวน

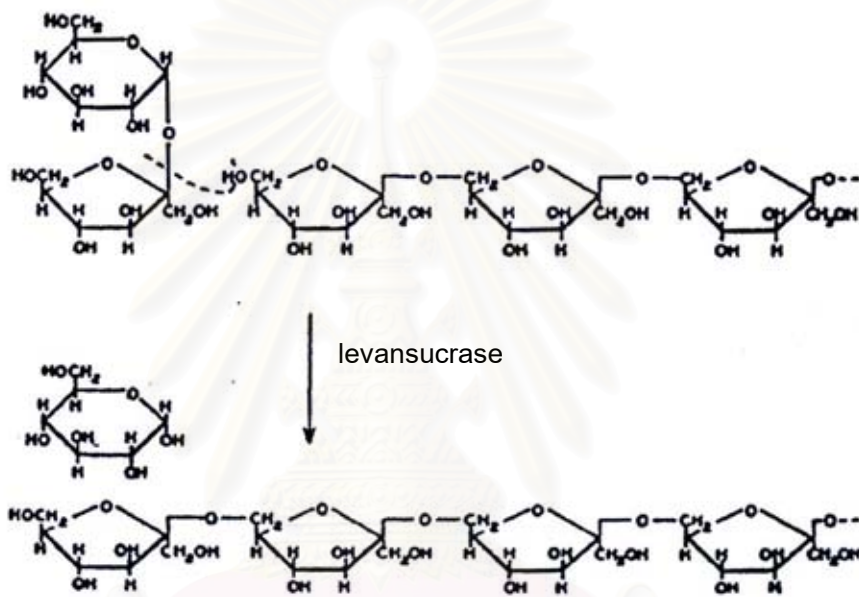


รูปที่ 1.2 แบบจำลองรูปร่างโมเลกุลของดีแวน

ตารางที่ 1.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสีแวน

Microorganisms	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Acetobacter xylinum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Mycobacterium laevaniformans</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Odontomyces viscosus</i>
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Phylomonas pruni</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Aerobacter levanicum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. glycinea
<i>Azotobacter chroococum</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Serratia levanicum</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Xanthomonas</i> sp.
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Corynebacterium beticola</i>	
<i>Corynebacterium levaniformans</i>	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	
<i>Gluconobacter oxydans</i>	

ที่มา : Han (1990) และ Hendry และ Wallace (1993)



รูปที่ 1.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลิแวนจากซูโครสโดยลิแวนซูเครส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

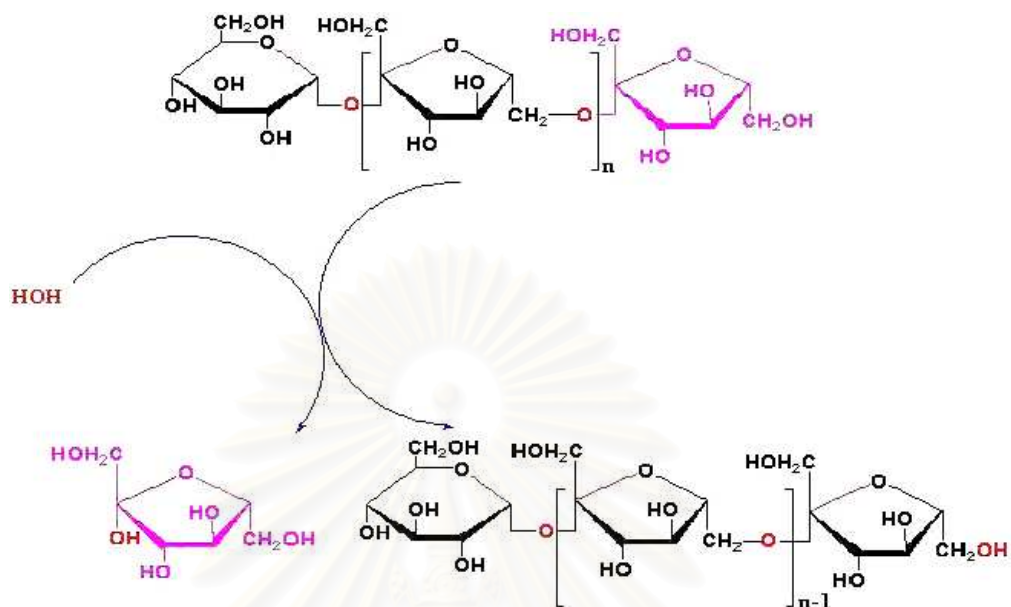
ลิแวนถูกสังเคราะห์จากซูโครสที่ผนังด้านนอกของแบคทีเรีย ลิแวนมีลักษณะเป็นสารเมือก (mucoid) ที่มีบทบาทเกี่ยวกับระบบ symbiosis ระบบ phytopathogenesis และระบบการป้องกันในสภาวะที่เย็นหรือแห้ง นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งอาหารสะสม ในแบคทีเรียที่ก่อโรคต่อพืช ลิแวนจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของแบคทีเรีย (bacterial fitness) และทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านฤทธิ์ของสารที่พืชใช้ในการป้องกันการบุกรุก นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าลิแวนช่วยต่อต้านมะเร็งชนิด sarcoma 180 (Calazans *et al.*, 1997) โดยสมบัตินี้จะขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของลิแวนด้วย (Calazans *et al.*, 2000) ลิแวนในพืชนอกจากจะเป็นคาร์โบไฮเดรตสะสมในส่วนลำต้นและใบแล้ว ยังช่วยเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะที่รุนแรง ได้แก่ สภาพอากาศหนาวจัด หรือแห้งแล้งจัด เป็นต้น (Vandamme *et al.*, 2002)

ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ลิแวนในหลาย ๆ ด้าน ทั้งด้านการเกษตร ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง, อาหาร และใช้เป็นยา (Vijn and Smeekens., 1999; Rhee *et al.*, 2000) นอกจากนี้เมื่อย่อยลิแวนด้วยลิแวนเนสจะได้ผลิตภัณฑ์ที่นำไปประยุกต์ใช้งานในด้านต่าง ๆ อีกมากมาย ผลิตภัณฑ์นี้ได้แก่ ฟรุคโทส ลิแวนไบโอส และลิแวนโพลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น

ลิแวนเนส (levanase)

ลิแวนเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะบีตา 2,6 ของสายลิแวนให้ได้เป็น ฟรุคโทส, ลิแวนไบโอส หรือ ลิแวนโพลิโกแซคคาไรด์อื่น ดังปฏิกิริยาที่แสดงในรูป 1.4 การทำงานของลิแวนเนสแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ แบบเอกโซไฮโดรเลส (exo-hydrolase) และเอนโดไฮโดรเลส (endo-hydrolase) (Uchiyama, 1993) แหล่งสิ่งมีชีวิตที่มีการผลิตลิแวนเนสพบได้ทั้งใน พืช เช่น หญ้า *Lolium perenne* และในจุลินทรีย์หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.4 ปฏิกริยาการย่อยสลายดีแวนโดยดีแวนเนส

ตารางที่ 1.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตดีแวนเนส

Microorganisms	
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Pseudomonas caryophylli</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	
<i>Gluconobacter oxydans</i>	

ชนิดของลิแวนเนส

เอกโซลิแวนเนส (Exo-levanase) (2,6-beta-D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.65)

เอกโซลิแวนเนสจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ฟรุกแทนปีตา-ฟรุกโทซิเดส (fructan- β -fructosidase) ซึ่งจำเพาะต่อโมเลกุลทางด้านที่มีฟรุกโทสอยู่ปลายนอนรีดิวิซ์ (non-reducing end) ดังนั้นจึงมีกิจกรรมในการสลายฟรุกโทสออกที่ละหนึ่งหรือสองโมเลกุลจากปลายด้านนอนรีดิวิซ์ของโมเลกุลลิแวน โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยสลายลิแวน และอิโนลินได้ (Uchiyama, 1993)

เอนโดลิแวนเนส (Endo-levanase)

เอนโดลิแวนเนสเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะปีตา 2,6 ระหว่างฟรุกโทสกับฟรุกโทสภายในโมเลกุลของลิแวน ให้ผลิตภัณฑ์ผสมที่เป็นลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดหรือค่าดีกรีพอลิเมอไรเซชัน (degree of polymerization) ต่าง ๆ กัน (Uchiyama, 1993)

ประโยชน์ของลิแวนเนส

ในปัจจุบันได้มีการนำลิแวนเนสมาใช้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อมหลายอย่าง เช่น การนำลิแวนเนสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษโดยตรง เนื่องจากในกระบวนการผลิตกระดาษมักประสบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะผลิตสารเมือกซึ่งส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเครื่องจักรในกระบวนการผลิตและยังทำให้กระดาษที่ได้คุณภาพต่ำลง ฉะนั้นการขจัดจุลินทรีย์และสารเมือกเหล่านี้จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ ด้วยเหตุที่สารเมือกบางชนิดเป็นลิแวน (Han, 1990) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ลิแวนเนสร่วมกับสารฆ่าจุลินทรีย์ (biocide) เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ โดยลิแวนเนสจะย่อยสารเมือกที่หุ้มแบคทีเรียอยู่จึงทำให้สารฆ่าจุลินทรีย์ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Chaudhary *et al.*, 1998)

ประโยชน์ของลิแวนเนสทางอ้อมนั้นคือการนำผลิตภัณฑ์ เช่น ฟรุกโทส หรือ ลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยลิแวนโดยลิแวนเนสมาประยุกต์ใช้ ดังต่อไปนี้

บทบาทของฟรุกโทส

ฟรุกโทสเป็นสารให้ความหวานที่มีบทบาทสำคัญ เนื่องจากฟรุกโทสมีความหวานสูงกว่าน้ำตาลซูโครส 20-30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลเพื่อความหวานเท่ากันระหว่างฟรุกโทสและซูโครส ฟรุกโทสจะให้พลังงานต่อร่างกายน้อยกว่า ทำให้เหมาะสมที่จะใช้ฟรุกโทสเป็น

สารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทพลังงานต่ำ มีรายงานว่าฟรุกโทสไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับอินซูลินของตับอ่อนดังเช่นกลูโคส นอกจากนี้ฟรุกโทสยังช่วยเร่งการสลายของแอลกอฮอล์ รวมทั้งยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุในร่างกายได้อีกด้วย ฟรุกโทสมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เนื่องจากฟรุกโทสสามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ ทำให้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้าง ฟรุกโทสไม่ตกผลึก ดังนั้นเมื่อใช้ในผลิตภัณฑ์พวกขนมอบกรอบ จึงช่วยคงความชื้นของผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ขนมอบกรอบมีความชุ่มฉ่ำไม่แห้งเกินไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้ฟรุกโทสในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม เพื่อเร่งการเกิดปฏิกิริยาเมายส์ลาร์ด (การเกิดสีน้ำตาล) ได้อีกด้วย (Guiraud and Gallzy, 1990; Barta, 1993)

บทบาทของลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์

1) เมแทบอลิซึมของลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์

ลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์ไม่สามารถถูกย่อยและดูดซึมได้ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ เนื่องด้วยสายโซ่โมเลกุลของลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์มีฟรุกโทสเชื่อมกันด้วยพันธะบีตา (β -linkage) จึงไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น แอลฟาไกลูโคซิเดส มอลเทส ไอโซมอลเทส และซูเครส จากระบบทางเดินอาหารของคนได้ (Flamm *et al.*, 2001) นอกจากมนุษย์ไม่สามารถย่อยลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์ในลำไส้เล็กได้แล้วยังไม่สามารถดูดซึมได้อีกด้วย เมื่อลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์ผ่านเข้าไปในลำไส้ใหญ่จะเกิดการหมัก (fermentation) โดยบิฟิโดแบคทีเรีย (bifidobacteria) และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ (Oku *et al.*, 1994) ดังนั้นการรับประทานลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์จึงไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของกลูโคสหรือระดับอินซูลินในเลือด เนื่องจากจะไม่เกิดการย่อยสลายของลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นฟรุกโทสหรือซูโครส แต่ลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกใช้เป็นสับสเตรตในการหมักของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ผลของการหมักอย่างสมบูรณ์จะได้กรดไขมันสายสั้น ๆ เช่น กรดแอซิติค (acetic acid) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดวาเลริก (valeric acid) ซึ่งจะช่วยกระตุ้นให้แบคทีเรียเหล่านี้มีการเติบโตและยังทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ ขับออกทางลมหายใจหรือทางทวารหนัก ส่วนกรดไขมันสายสั้นนั้นจะถูกดูดซึมเข้าทางร่างกายเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป ดังนั้นการบริโภคลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์จึงให้พลังงานต่ำ (Robertfroid *et al.*, 1993 และ Tomomatsu, 1994)

2) ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและความดันเลือด

จากผลของกระบวนการหมักลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้นหลายชนิด กรดโพรพิโอนิกที่ผลิตขึ้นสามารถยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอล

รอล (Chloesterol) ได้ การศึกษาถึงผลของการบริโภคไขมันโกลีโคแซคคาไรด์ต่อระดับคอเลสเตอรอล และระดับความดันเลือด พบว่าโกลีโคแซคคาไรด์ช่วยลดทั้งระดับคอเลสเตอรอลและระดับความดันเลือด (Tomomatsu, 1994)

3) การบริโภคไขมันโกลีโคแซคคาไรด์ไม่ก่อให้เกิดฟันผุ

การเกิดฟันผุขึ้นกับปัจจัยสำคัญ 3 ประการ คือ การบริโภคน้ำตาลที่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในปาก การติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ เช่น *Streptococcus mutans* และบริเวณผิวฟันได้รับความเสียหาย ถ้าขาดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งฟันผุจะไม่เกิดขึ้น การเติบโตและสะสมของเชื้อ *Streptococcus mutans* บนฟันทำให้เกิดการสังเคราะห์บีตาไกลูแคน (β -glucan) จากน้ำตาลซูโครส บีตาไกลูแคนมีลักษณะข้นเหนียวไม่ละลายน้ำและจะเปลี่ยนไปเป็นคราบฟัน (plaque) ที่จะทำลายสารเคลือบฟัน ในสภาวะที่มี pH ต่ำกว่า 5.5 ดังนั้นปัจจัยหลักของการเกิดฟันผุคือการบริโภคน้ำตาลซูโครส จึงได้มีการพัฒนาสารให้ความหวานชนิดใหม่เพื่อใช้ทดแทนซูโครส ดังนั้นการบริโภคไขมันโกลีโคแซคคาไรด์แทนซูโครสจะสามารถป้องกันการเกิดฟันผุได้ (Oku, 1994 และ Yun, 1996)

4) ช่วยป้องกันการท้องผูก

การเพิ่มปริมาณของบีฟิโดแบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์ด้วยการบริโภคไขมันโกลีโคแซคคาไรด์จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความชื้นและแรงดันออสโมติกในอุจจาระ รวมทั้งการเพิ่มปริมาณกากอุจจาระด้วย ทำให้เกิดการขับถ่ายได้ง่ายและเป็นปกติ (Tomomatsu, 1994)

5) ส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์สุขภาพในลำไส้

หลังการบริโภคไขมันโกลีโคแซคคาไรด์ ซึ่งจะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารจนเมื่อผ่านเข้าสู่ลำไส้ใหญ่จะถูกหมักโดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้โดยเฉพาะพวกบีฟิโดแบคทีเรีย ผลจากการหมักจะเกิดกรดไขมันสายโซ่สั้นจำนวนมาก มีผลไปกระตุ้นการบีบของลำไส้ช่วยป้องกันการเกิดโรคท้องร่วง และกรดไขมันสายโซ่สั้นยังทำให้ pH ส่วนลูเมน (lumen) ของลำไส้ใหญ่ลดลงและมีสภาพเป็นกรด ทำให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเช่น *Bifidobacterium* sp. (*B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adotescentis*, *B. longum*) (Marx et al., 2000) และ *Lactobacillus* sp. เจริญได้ดี แต่แบคทีเรียที่ให้โทษ เช่น *Clostridium* sp., *Salmonella* sp. และ *E. coli* ซึ่งไม่ทนต่อสภาพเป็นกรดจะเจริญไม่ได้ (Twomey et al., 2003) เนื่องด้วยจำนวนแบคทีเรียบีฟิโดในลำไส้ใหญ่เพิ่มมากขึ้นจึงมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของอุจจาระ การเพิ่มจำนวนของของบีฟิโดแบคทีเรียจะเพิ่มการสร้างอนุพันธ์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย อินโดล

(indole) และฟีนอล (phenol) ซึ่งช่วยกำจัดสารก่อมะเร็ง จึงลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้บีโอดีแบคทีเรียยังสร้างสารไนแอสซิน (niacin หรือ nicotinic acid) ซึ่งสามารถลดการดูดซึมไมเซลล์ของคอเลสเตอรอล (cholesterol micelle) ที่ผนังลำไส้ทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเส้นเลือดลดลง ช่วยลดอัตราการเกิดโรคอ้วนหรือปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในเลือดสูง นอกเหนือจากนี้บีโอดีแบคทีเรียยังสามารถผลิตวิตามิน บี1 บี2 บี6 บี12 ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกด้วย จึงมีการนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารที่เรียกว่า พรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งจะส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ทำให้เป็นผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค ช่วยลดอาการท้องผูกและปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ (Ogata *et al.*, 1991; Spiegel *et al.*, 1994; Tomamats, 1994; Jun, 1996 และ Kleesen *et al.*, 2001)

การศึกษาลิแวนเนสจากแบคทีเรียต่าง ๆ

งานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ชนิดนี้ยังมีการรายงานไม่มากนัก ในปี 1983 Takahashi และคณะ ได้แยกลิแวนเนสให้บริสุทธิ์ (purification) จากเชื้อ *Streptococcus salivarius* KTA-19 เอนไซม์จากเชื้อนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 100 กิโลดาลตัน อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับแอกติวิตีเท่ากับ 40-50°C และ 6.5 ตามลำดับ ลิแวนเนสจากเชื้อนี้ย่อยลิแวนให้ผลิตภัณฑ์เป็นฟรุกโทส

Igarashi และคณะ (1987) ได้แยกลิแวนเนสให้บริสุทธิ์ (purification) จาก *Actinomyces viscosus* ATCC19246 พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 89 กิโลดาลตัน ให้แอกติวิตีสูงสุดที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 45°C

Murakami และคณะ (1990) ทำการศึกษาลิแวนเนสใน *Streptomyces* sp.No.7-3 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 54 กิโลดาลตัน pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอกติวิตีเท่ากับ 6.5 และ 40°C ตามลำดับ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอส ในปี 1992 Murakami และคณะ ได้ทำการศึกษาใน *Bacillus* sp.No.71 พบว่าลิแวนเนสจากเชื้อนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 135 กิโลดาลตัน ย่อยลิแวนด้านในโมเลกุล (endo-acting manner) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนเฮปทาโอส (levanheptaose) มีแอกติวิตีสูงสุดที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 40°C

Chaudhary และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาลิแวนเนสจาก *Rhodotorula* sp. พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอกติวิตีเป็น 6.0 และ 40°C ตามลำดับ

ในปี 1998 Lim และคณะทำการศึกษาใน *Streptomyces* sp. 366L พบว่าเอนไซม์จากเชื้อนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 78 กิโลดาลตัน ย่อยลิแวนจากด้านปลายโมเลกุลแบบ *exo-acting manner* ให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนเฮปทาโอส ให้แอกติวิตีสูงสุดที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 40°C และในปีเดียวกันนี้ Kang และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาใน *Pseudomonas* strain K-52 เอนไซม์จากเชื้อนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38 กิโลดาลตัน pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแอกติวิตีเท่ากับ 7.0 และ 35°C ตามลำดับ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนออกทาโอส (levanooctose) Kang และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาใน *Pseudomonas* sp.No.43 เอนไซม์จากเชื้อนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 36 กิโลดาลตัน ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม (pH= 7.0, 40°C) สำหรับแอกติวิตีนั้นเหมือนกับลิแวนเนสจาก *Streptomyces* sp. 366L แต่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอส

ปี 2000 Saito และคณะ ทำการศึกษาลิแวนเนสใน *Streptomyces exfoliates* F3-2 พบว่าเอนไซม์จากเชื้อนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 54 กิโลดาลตัน ให้แอกติวิตีสูงสุดที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 60°C ย่อยลิแวนให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอส ลักษณะสมบัติของลิแวนเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จะสรุปไว้ดังตารางที่ 1.3

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายชิ้นที่ทำการโคลนยีนลิแวนเนสเข้าสู่จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อมุ่งที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตลิแวนเนส ในปี 1991, Wanker และคณะได้ทำการโคลนยีนลิแวนเนสจาก *Bacillus subtilis* เข้าสู่ *E. coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งพบว่าในจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถแสดงออกลิแวนเนสยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อมา Bezzate และคณะ (1994) ได้ทำการโคลนยีนลิแวนเนสจาก *Bacillus polymyxa* CF43 เข้าสู่ *Bacillus subtilis* และ *E. coli* Miasnikov (1997) โคลนยีนเอนโดลิแวนเนสจาก *Bacillus* sp.L7 เข้าสู่ *Bacillus subtilis* และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ (ตารางที่ 1.3) ปี 2002, Song และคณะทำการโคลนยีนลิแวนไบโอไฮโดรเลสจาก *Microbacterium laevaniformans* ATCC15953 เข้าสู่ *E. coli* และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ (ตารางที่ 1.3) ในปีเดียวกัน Menendez และคณะ (2002) ได้ทำการโคลนยีนลิแวนเนสจาก *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 เข้าสู่ *Escherichia coli* และ ในปี 2004 Menendez และคณะได้โคลนยีนจากเชื้อเดียวกันเข้าสู่ *Pichia pastoris* และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ (ตารางที่ 1.3)

ตารางที่ 1.3 เปรียบเทียบลักษณะสมบัติของลิแวนเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

Microorganisms	Molecular weight	Optimum condition		Stability range		Products from levan	Reference
		pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)		
<i>Streptococcus salivarius</i> KTA-19	100,000	6.5	40-50	-	-	F	Takahashi <i>et al.</i> (1983)
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC19246	89,000	6.0	45	-	-	-	Igarashi <i>et al.</i> (1987)
<i>Streptomyces</i> sp.No.7-3	54,000	6.5	40	5.5-8.5	≤ 40	F, F2, F3	Murakami <i>et al.</i> (1990)
<i>Bacillus</i> sp.No.71	135,000	6.0	40	6.0-10.0	≤ 30	F7	Murakami <i>et al.</i> (1992)
<i>Rhodotorula</i> sp.	39,000	6.0	40	5.5-6.5	≤ 40	F	Chaudhary <i>et al.</i> (1996)
<i>Bacillus</i> sp.L7	86,000	5.5	50	-	-	F	Miasnikov AN. (1997)
<i>Pseudomonas</i> strain K-52	38,000	7.0	35	6.0-9.0	≤ 40	F8	Kang <i>et al.</i> (1998)
<i>Streptomyces</i> sp. 366L	78,000	7.0	40	6.0-10.0	≤ 45	F7	Lim <i>et al.</i> (1998)
<i>Pseudomonas</i> strain K-52	36,000	7.0	40	6.0-8.0	≤ 50	F2	Kang <i>et al.</i> (1999)
<i>Streptomyces exfoliates</i> F3-2	54,000	5.5	60	3.5-8.0	≤ 50	F, F2	Saito <i>et al.</i> (2000)
<i>Microbacterium laevaniformans</i> ATCC15953	68,800	6.0	30	5.5-7.0	≤ 45	F, F2, F3	Song <i>et al.</i> (2002)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> SRT4	57,000	5.0	30	-	-	F	Menendez <i>et al.</i> (2004)

F : fructose F2 : levanbiose F3 : levantriose F7 : levanheptaose F8 : levanoctaose

เนื่องจากลิแวนเนสสามารถย่อยลิแวนให้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์หลายชนิดดังกล่าวมาแล้ว อีกทั้งยังไม่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับการคัดกรอง (screening) เชื้อที่ผลิตลิแวนเนสจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จะทำการคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนเนสจากแหล่งดินและน้ำที่คาดว่าจะมีโอกาสพบเชื้อดังกล่าวได้สูง หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้บางส่วนแล้วจะศึกษาสมบัติต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญสำหรับการนำเอนไซม์นี้มาประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Autoclave: Model H-88LL, Kokusan Ensinki Co., Ltd., Japan

Autopipette: Pipetman, Gilson, France

Centrifuge, refrigerated centrifuge: Model J-21C, Beckman Instrument Inc., U.S.A.

Centrifuge, microcentrifuge high speed: Model MC-15A, Tomy Seiko Co.Ltd., Tokyo, Japan

Electrophoresis Unit: 2050 MIDGET, LKB, Sweden and Mini-protein, Bio-Rad, U.S.A.;

Submarine agarose gel electrophoresis unit

GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, U.S.A.

HPLC Model water™ 600 system

Incubator: Model 1H-100, Gallenkamp, England

Incubator shaker controlled environment: Psycho-threm, New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

Incubator shaker: Model G76, New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, U.S.A.

Incubator, water bath: Model M20S, Lauda, Germany

Magnetic stirrer: Model Fisherbrand, Fisher Scientific, U.S.A.

Magnetic stirrer and heater: Model Ikama[®] GRH, Janke&Kunkel GMBH&Co.KG, Japan

Microcentrifuge tube 1.5 mL, Bioactive, Thailand

pH meter: Model PHM95, Radiometer Copenhagen, Denmark

Power supply: Model POWER PAC 300, Bio-Rad, U.S.A.

Spectrophotometer: Spectronic 2000, Bausch&Lomp, U.S.A.

Spectrophotometer UV-240, Shimadzu, Japan, and DU Series 650, Beckman, U.S.A.

Spectrophotometer UV-240, Shimadzu, Japan, and Du series 1050, Beckman, U.S.A.

Thin-wall microcentrifuge tubes 0.2 mL, Axygen Hayward, U.S.A.

UV transilluminator: Model 2011 Macrovue, SanGabriel California, U.S.A.

Vortex: Model K-550-GE, Scientific Industries, U.S.A.

Water bath: Charles Hearson Co., Ltd., England

2.2 สารเคมี

Acrylamide: Merck, U.S.A.

Agarose: Seakem LE Agarose, FMC Bioproducts, U.S.A.

Aqua sorb: Fluka, Switzerland

Ammonium persulphate: Sigma, U.S.A.

Ammonium sulphate: Sigma, U.S.A.

Bacto-Agar: DIFCO, U.S.A.

BlueRanger[®] Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix: PIERCE, U.S.A.

β -mercaptoethanol: Fluka, Switzerland

Bovine serum albumin (BSA): Sigma, U.S.A.

Bromphenol blue: Merck, Germany

Chloroform: BDH, England

Coomassie brilliant blue R-250: Sigma, U.S.A.

Dialysis tubing: Sigma, U.S.A.

di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous: Carlo Erba Reagenti, Italy

di-Sodium ethylenediaminetetra acetate: M&B, England

DNA marker: Lamda (λ) DNA digest with *Hind* III: GIBCOBRL, U.S.A.

Ethidium bromide: Sigma, U.S.A.

Ethyl alcohol absolute: Carlo Erba Reagenti, Italy

Ficoll type 400: Sigma, U.S.A.

Glacial acetic acid: Carlo Erba Reagenti, Italy

Glycine: Sigma, U.S.A.

Glucose: BDH, England

Magnesium sulphate 7 hydrate: BDH, England

Magnesium chloride: BDH, England

Methanol: Merck, Germany

N, N'-methylene-bis-acrylamide: Sigma, U.S.A.

NNN'-tetramethyl-1,2-diaminoethane (TEMED): Carlo Erbo Reagenti, Italy

Phenol: BDH, England

Phosphoric acid: Mallinckrodt, U.S.A.

Potassium phosphate monobasic: Carlo Erba Reagenti, Italy

QIAquick Gel Extraction Kit: Qiagen, Germany

Sodium carbonate anhydrous: Carlo Erba Reagenti, Italy

Sodium chloride: Carlo Erba Reagenti, Italy

Sodium dodecyl sulfate (SDS): Boehringer Mannheim Gmbtt, Germany

Sodium hydroxide: Merck, Germany

Sucrose: Sigma, U.S.A.

Tris (hydroxymethyl) aminomethane: Carlo Erba Reagenti, Italy

Tryptone: DIFCO, U.S.A.

Xylene cyanole FF: Sigma, U.S.A.

Yeast extract: DIFCO, U.S.A.

2.3 เอนไซม์

Lysozyme: Sigma, U.S.A.

Proteinase K: Sigma, U.S.A.

RNase: Sigma, U.S.A.

Taq DNA polymerase: Pacific science, France

2.4 ไพรมเมอร์ (Primer)

pA : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ($T_m = 60^\circ\text{C}$)

pH' : AAGGAGGTGATGCAGCCGCA ($T_m = 64^\circ\text{C}$)

สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน 16S rRNA

pA : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ($T_m = 60^\circ\text{C}$)

pD : CAGCAGCCGCGGTAATAC ($T_m = 58^\circ\text{C}$)

pD' : GTATTACCGCGGCTGCTG ($T_m = 64^\circ\text{C}$)

pF : CATGGCTGTCGTCAGCTCGT ($T_m = 69^\circ\text{C}$)

สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Luria-Bertani (LB) medium

ประกอบด้วย tryptone 1.0%, yeast extract 0.5% และ NaCl 0.5% สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง จะเติมผงวุ้น (agar) ลงไป 1.5%

Levan minimum medium

ประกอบด้วย levan 0.1% (w/v), yeast extract 0.2%, NaNO₃ 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.05% และ KH₂PO₄ 0.1% สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จะเติมผงวุ้น (agar) ลงไป 1.5%

2.6 วิธีการทดลอง

2.6.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนเนส

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากบริเวณโรงงานน้ำตาลมิตรผล และเก็บดินจากบริเวณรอบ ๆ เตาเคี้ยวน้ำตาลโตนดจังหวัดเพชรบุรี นำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วย normal saline (0.85% NaCl) แล้วนำมากระจายบน levan minimum medium plate pH 7.0 บ่มที่ 50°C จนปรากฏโคโลนี แยกแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ levan minimum medium broth ที่ 40°C โดยเขย่า 250 rpm (Incubator shaker) เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง บ่มเหียงที่ความเร็วรอบ 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใส (supernatant) ถูกใช้เป็นเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) หลังจากนั้นนำเอนไซม์หยาบ 1 ml มาบ่มกับ 1% ลิแวนใน 100 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.5 ml ที่ 40°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำสารละลายผสมที่ได้จากการทำปฏิกิริยามาทดสอบด้วย Thin layer chromatography (TLC) ตามวิธีของ Iizuka *et al.* (2002) โดยใช้ Kieselgel 60 F254 plates ตัวทำละลายประกอบด้วย 1-propanol:ethyl-acetate:water (70:10:20, v/v/v) ตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้ บนแผ่น TLC โดยการพ่น (spray) ด้วย 20% sulfuric acid ใน ethanol แล้วนำไปอบที่ 110°C ประมาณ 20 นาที สังเกตจุดสีดำที่เกิดขึ้นเนื่องจากเกิด dehydration ในน้ำตาลที่อยู่ในรูปวงปิด เกิดเป็น furfural เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์และความสามารถในการย่อยลิแวน

เลี้ยงเชื้อใน levan minimum medium broth ที่ 40°C โดยเขย่า 250 rpm เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาตั้งแต่ 0-96 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตโดยวัด optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของลิแวนเนสในส่วนเอนไซม์หยาบโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kung (1998) โดยบ่มเอนไซม์หยาบปริมาตร 10 µl ใน 0.3% ลิแวนใน 100 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 50 µl ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) ที่ได้จากปฏิกิริยาโดยใช้วิธีของ Somogyi-Nelson (1952) หน่วย (unit)

ของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตน้ำตาลรีดิซิง (ฟรุกโตส) 1 μmol ใน 1 นาที ณ ภาวะที่กำหนด

2.6.2 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทำโดยใช้ 2 วิธี คือ การจำแนกด้วยลักษณะสมบัติทางชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยลักษณะสมบัติทางชีวเคมีด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ API ทำโดยศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ทำการทดลองโดยนำ genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเพิ่มจำนวนขึ้นยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ pH' (5'-AAGGAGGTGATCCAGC CGCA-3') นำขึ้นยีนที่เพิ่มจำนวนได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), pD (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'), pD' (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'), และ pF (5'-CATGGCTGTCGTCAGCTCGT-3') (Edwards *et al.*, 1989) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเข้าโปรแกรม BLAST เพื่อเทียบเคียงหาสายพันธุ์ของแบคทีเรียจากข้อมูลที่มีใน Gene Bank

2.6.2.1 การสกัด genomic DNA

การสกัด genomic DNA ของเชื้อ PE2 โดยวิธีของ Maniatis (1982) ทำโดยนำเชื้อที่คัดเลือกไว้ (PE2) จากโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 10 ml ที่ 37°C โดยเขย่า 250 rpm ข้ามคืน เก็บเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 1.5 ml โดยปั่นในเครื่อง microcentrifuge 5,000 rpm 5 นาที เทน้ำใสด้านบนทิ้ง กระจายเซลล์ใน SET buffer [25 mM (w/v) Tris-HCl pH 8.0, 10 mM (w/v) EDTA, 50 mM (w/v) sucrose] ปริมาตร 100 μl จากนั้นเติม SET buffer ที่มี lysozyme 5 mg ผสมอยู่ลงไป 400 μl นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม 10% (w/v) SDS ลงไป 5 μl ติดตามด้วยการเติม 20 mg/ml proteinase K ลงไป 3 μl ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่ 50°C ข้ามคืน

จากนั้นแยกเศษเซลล์ออกโดยนำไปปั่นที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้วดูส่วนน้ำใสลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate ลงไป 50 μl ผสม

ให้เข้ากันโดยพลิกหลอดเบา ๆ แล้วเติม phenol chloroform [phenol:chloroform:isoamyl alcohol, 25:24:1] ลงไปปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่ นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm 10 นาที สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้นและจะมีเศษโปรตีนสีขาวอยู่ระหว่างกลางของชั้นทั้งสอง ดูดเฉพาะส่วนใสส่วนบนไปยังหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ทำการสกัดด้วย phenol-chloroform ซ้ำอีกครั้ง

นำส่วนใสส่วนบนมาตกตะกอน genomic DNA โดยเติม absolute ethanol ลงไป 2.5 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเบา ๆ และทิ้งไว้ -20°C เป็นเวลา 30 นาทีปั่นเก็บตะกอน genomic DNA ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 500 µl 70% ethanol จากนั้นนำไประเหย ethanol ออกโดยนำไปอบไว้ในตู้อบ 37 °C ให้แห้งหมาด ๆ แล้วละลายตะกอน genomic DNA ใน TE buffer [10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1 mM EDTA pH 8.0] ลงไป 100 µl ตรวจสอบและประมาณความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis เก็บสารละลาย DNA ไว้ที่ 4°C

2.6.2.2 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

เพิ่มจำนวนชิ้นยีน 16S rRNA ด้วย PCR ในสารผสมให้เกิดปฏิกิริยา 50 µl ที่ประกอบด้วย 1X ThermoPol buffer (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100), 100 ng genomic DNA, 0.3 µM ของทั้งไพรเมอร์ pA และ pA', 200 µg dNTP และ 5 unit ของ Taq DNA polymerase (Fermentus) ปฏิกิริยาดำเนินไปโดยมีขั้นตอน pre-denature ที่ 95°C เป็นเวลา 20 นาที และ 30 รอบของขั้นตอน denature ที่ 95°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่ 50°C เป็นเวลา 2 นาที, extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นให้เกิดปฏิกิริยาในขั้นตอน final extension ที่ 72°C อีก 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis

หลังแยกผลิตภัณฑ์ PCR (16S rRNA) โดยการสกัดจาก agarose gel ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำแล้ว จึงจัดส่ง 16S rRNA ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยไพรเมอร์ 4 ชนิด (pA, pD, pD' และ pF) ที่บริษัท Macrogen (เกาหลี) ต่อไป

2.6.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตลิแวนเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตลิแวนเนสของเชื้อแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก จะทำโดย inoculate เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB มาแล้วข้ามคืนลงไป 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ levan minimum medium ที่มี pH ต่าง ๆ กัน คือ 5.5, 7.0, 8.0 และ 10.0 (โดยใช้ 7 mM ของ buffer ต่อไปนี้คือ acetate buffer, phosphate buffer, phosphate buffer และ glycine buffer ตามลำดับ) เลี้ยงโดยเขย่า 250 rpm ที่อุณหภูมิ 40°C ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (sterile technique) จำนวน 3 ml เมื่อเวลาเลี้ยงครบ 0, 5, 9, 13, 17, 21, 28, 37 และ 48 ชั่วโมง, ตามลำดับ นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนหนึ่งมาวัดการเจริญเติบโตโดยวัด optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อีกส่วนหนึ่งนำมาแยกเอนไซม์หยาบออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยการปั่น 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเอนไซม์หยาบมาวัดแอกติวิตีของลิแวนเนสโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kung (1998) (2.6.1)

หลังเลือก pH ที่เหมาะสมได้แล้วจึงใช้อาหารที่ pH ดังกล่าวมาทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดย inoculate เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB มาแล้วข้ามคืน 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ levan minimum medium เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 23, 30, 37, 40 และ 50°C โดยเขย่า 250 rpm ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ จำนวน 3 ml เมื่อเวลาเลี้ยงครบ 0, 5, 9, 13, 17, 21, 28, 37 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนหนึ่งมาวัดการเจริญเติบโตโดยวัด optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และอีกส่วนหนึ่งนำมาแยกเอนไซม์หยาบออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยการปั่น 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเอนไซม์หยาบมาวัดแอกติวิตีของลิแวนเนสโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kung (1998) (2.6.1)

2.6.4 การทำลิแวนเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

2.6.4.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การทำลิแวนเนสให้บริสุทธิ์บางส่วนทำโดยเลี้ยงเชื้อใน levan minimum medium pH 7.0 จำนวน 2.2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40°C โดยเขย่า 250 rpm นาน 20 ชั่วโมง ปั่นเชื้อที่เก็บด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (เอนไซม์หยาบ) มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ vivaflow (cut off 10 kDa) หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ทำให้เข้มข้นแล้วมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัว 20-50% ที่อุณหภูมิ 4°C โดยเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในเอนไซม์หยาบทีละน้อย ๆ พร้อมคนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปเรื่อย ๆ จนความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 20% หลังจากคนต่อไปอีก 30 นาที นำไปปั่นแยกตะกอนและส่วนลอยด้วยความเร็ว

12,000xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำส่วนสารละลายไปตกตะกอนต่อจนสารละลายมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 50% หลังจากคนต่อไปอีก 30 นาที จึงนำไปปั่นแยกตะกอนและส่วนลอยด้วยความเร็ว 12,000xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.0 แล้วนำไปไดอะไลไซสใน 20 mM phosphate buffer pH 7.0 เพื่อกำจัดเกลือ แล้วจึงวัดปริมาณ ตรวจวัดแอกติวิตีของลิแวนเนสและวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford (1976)

2.6.4.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ดีเอไอโตโยเพิร์ล (DEAE-Toyopearl)

ในขั้นตอนต่อมาจะทำลิแวนเนสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ดีเอไอโตโยเพิร์ล (DEAE-Toyopearl) การเตรียมคอลัมน์ดีเอไอโตโยเพิร์ลทำโดย ล้างดีเอไอโตโยเพิร์ลด้วย 0.5 N HCl จากนั้นล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งจน pH สูงกว่า 3.0 แล้วจึงล้างด้วย 0.5 N NaOH 1 ครั้ง ตามด้วยล้างน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งจนได้ pH ต่ำกว่า 11.0 แล้วเปลี่ยนเป็นล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 3-4 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.0 จนน้ำล้างมี pH ใกล้เคียงกับบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง หลังจากนั้นนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ให้ได้ปริมาตรเจล 10 ml ผ่าน 20 mM phosphate buffer pH 7.0 ลงในคอลัมน์ที่บรรจุดีเอไอโตโยเพิร์ล ปริมาตรอย่างน้อย 3-5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราไหล 60 ml/h เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเติมลงในคอลัมน์ดีเอไอโตโยเพิร์ล แล้วชะด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.0 จนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ (วัดค่า A_{280} เท่ากับ 0) จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วยการเพิ่มความแรงประจุแบบลำดับขั้น (stepwise elution) ซึ่งจะใช้บัฟเฟอร์ที่มี NaCl เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 M ตามลำดับ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ นำแฟรคชันที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์มารวมกัน หลังทำให้ปริมาตรลดลงโดยใช้ aquasorb ดึงน้ำออกแล้วจึงนำไปไดอะไลไซส หลังวัดปริมาณแล้ว ตรวจวัดแอกติวิตีของลิแวนเนสและปริมาณโปรตีน

2.6.4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ล

ทำลิแวนเนสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้คอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ล (Butyl-Toyopearl) การเตรียมคอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ลทำโดย ล้างบิวทิลโตโยเพิร์ลด้วย 0.5 N NaOH 2

ครั้ง ตามด้วยล้างน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง แล้วเปลี่ยนเป็นล้างด้วย 15% แอมโมเนียมซัลเฟตใน 20 mM phosphate buffer pH 7.0 อีก 3-4 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาบรรจุบิวทิลโตโยเพิร์ลที่ล้างแล้วลงในคอลัมน์ให้ได้ปริมาตรเจล 5 ml ผ่านคอลัมน์ด้วย 15% แอมโมเนียมซัลเฟตใน 20 mM phosphate buffer pH 7.0 ด้วยปริมาตรอย่างน้อย 3-5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราไหล 60 ml/h เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออีโตโยเพิร์ลมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตจนสารละลายอิ่มตัวด้วยของแอมโมเนียมซัลเฟต 15% หลังจากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ (11 ml) ลงในคอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ล แล้วชะด้วย 15% แอมโมเนียมซัลเฟตใน 20 mM phosphate buffer pH 7.0 จนโปรตีนที่ไม่เกาะติดคอลัมน์ออกหมด จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วยการลดความเข้มข้นเกลือแบบลำดับขั้น (stepwise elution) ซึ่งจะใช้บัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 10, 5 และ 0% ตามลำดับ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดค่าแอกติวิตีของลีแวนเนส นำแฟรคชันที่มีแอกติวิตีของลีแวนเนสมารวมกันจากนั้นทำให้ปริมาตรลดลงโดยใช้ aquasorb ดึงน้ำออก แล้วนำไปไดอะไลซ์ วัดปริมาตรตรวจวัดแอกติวิตีของลีแวนเนสและปริมาณโปรตีน

2.6.4.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลีแวนเนสโดยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จะสามารถทดสอบได้โดยอาศัยเนทีฟ-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Native-polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE) โดยใช้ 5.0% stacking gel และ 0.1% levan ใน 7.5% separating gel หยดโปรตีนตัวอย่างประมาณ 40 μ l ลงบนเจล โดยทำเป็น 2 ชุด สำหรับย้อมโปรตีน 1 ชุด และสำหรับย้อมแอกติวิตี 1 ชุด จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในที่เย็น เมื่อเสร็จแล้วตัดเจลส่วนหนึ่งมาย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อดูแถบโปรตีน เจลอีกส่วนหนึ่งนำมาทำการย้อมแอกติวิตีด้วย 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride ตามวิธีของ Gabriel และ Wang (1969) โดยล้างเจลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำมาบ่มให้เกิดปฏิกิริยาการย้อมลีแวนเนสใน 100 mM cacodylate buffer pH 7.0 ที่ 40°C นาน 30 นาที จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเบา ๆ แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยย้อมด้วย 0.5% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride ใน 1.0 M NaOH เป็นเวลา 15 นาที ไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด หรือจนปรากฏแถบสีชมพู

ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 7.5% acetic acid หลาย ๆ ครั้ง และเก็บเจลไว้ใน 7.5% acetic acid แถบโปรตีนที่มีแอกติวิตีของสีแวนเนสจะปรากฏเป็นแถบสีชมพู

2.6.5 การศึกษาลักษณะสมบัติของสีแวนเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

ทำการศึกษาลักษณะสมบัติหลายประการของสีแวนเนส คือ น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) และคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100 (Sephadex G-100) จากนั้นศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ติดตามด้วยการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรต ศึกษาผลของโลหะหนักและสารเคมีต่อการทำงานของเอนไซม์ และศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยสีแวนเนส

2.6.5.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสีแวนเนส

ก. โดยใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100 (Sephadex G100) ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วยสารละลายโปรตีนต่อไปนี้อย่างละ 1 ml ได้แก่ Bovine serum albumin (5 mg/ml) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน, Ovalbumin (5 mg/ml) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน, Chymotrypsinogen A (5 mg/ml) น้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน และ Cytochrome C (3 mg/ml) น้ำหนักโมเลกุล 11,700 ดาลตัน ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.0 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน วัดปริมาณโปรตีนในทุกหลอดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่า K_{av} และสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

เมื่อ V_e คือ elution volume (ปริมาตรของสารละลายเมื่อโปรตีนหรือเอนไซม์ผ่านออกมา)

V_o คือ void volume (ปริมาตรของสารละลายเมื่อบลูเดกซ์แทรนผ่านออกมา)

V_t คือ bed volume (ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่)

หลังจากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.0 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายทุกหลอดไปวัดปริมาณโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของสีแวนเนส จากนั้นคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ข. โดยใช้เฮสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) การทดลองทำโดยใช้ 0.5% stacking gel และ 7.5% separating gel ที่มี SDS 0.1% โปรตีนตัวอย่างจะถูกต้มกับ sample buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, β -mercaptoethanol และ 1% bromophenolblue) ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที หยอดโปรตีนตัวอย่างพร้อมกับโปรตีนมาตรฐานลงบนเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อเสร็จแล้วนำมาย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อดูแถบโปรตีน วัดระยะที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วนำมา คำนวณหาระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility) ดังนี้

$$\text{ระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility)} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

คำนวณหาระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility) ของเอนไซม์แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

2.6.5.2 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของลิแวนเนส

ทำโดยนำเอนไซม์ที่ได้มาวัดแอกติวิตีที่บัฟเฟอร์ต่าง ๆ กัน คือ 100 mM acetate buffer pH 3.0–7.0, 100 mM phosphate buffer pH 6.0–8.0, 100 mM MOPS buffer pH 6.0–8.0, 100 mM cacodylate buffer pH 5.0–8.0 และ 100 mM glycine-HCl buffer pH 8.0–10.0 แล้วคำนวณค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับแอกติวิตีของ pH ที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด

2.6.5.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของลิแวนเนส

ทำโดยนำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30–70°C โดยใช้ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.6.5.2 แล้วคำนวณค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับแอกติวิตีของอุณหภูมิที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด

2.6.5.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ

ทำโดยบ่มสารละลายเอนไซม์ใน 20 mM acetate buffer pH 3.0–5.5, 20 mM phosphate buffer pH 6.0–8.0, 20 mM MOPS buffer pH 6.0–8.0, 20 mM cacodylate buffer pH 5.5–8.0 และ 20 mM glycine-HCl buffer pH 8.0–10.0 ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตี แล้วคำนวณค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับแอกติวิตีของ pH ที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40,

50 และ 60°C ในบัฟเฟอร์ที่เอนไซม์มีเสถียรภาพสูงสุดโดยบ่มที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ ตั้งแต่ 0 ถึง 78 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตี แล้วคำนวณค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับแอกติวิตีของอุณหภูมิและเวลาที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด

2.6.5.5 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์

ทำโดยนำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตี โดยใช้สับสเตรตต่าง ๆ ได้แก่ ลีแวน, อินูลิน, แป้งที่สามารถละลายน้ำ (soluble starch), เซลลูโลส, เดกซ์แทรน, พูลูลแลน (pullulan), เมลิไบโอส (melibiose), ราฟฟิโนส (raffinose), ซูโครส, แลคโตส, มอลโตส, กลูโคส, ฟรุคโตส, แมนโนส และกาแลคโตส ความเข้มข้น 0.3% แล้วคำนวณค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เทียบกับแอกติวิตีเมื่อใช้ลีแวนเป็นสับสเตรต

2.6.5.6 การศึกษาผลของโลหะหนักและสารเคมีบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำโดยนำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีในภาวะที่มีโลหะหนักหรือสารเคมีแต่ละชนิดอยู่ด้วย ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , CoCl_2 , NaCl , KCl , MnCl_2 , MgCl_2 , NH_4Cl , LiCl , HgCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 และ AgNO_3 ที่ความเข้มข้น 10 mM และ CdCl_2 , EDTA, PMSF, IAM, NEM, PCMB, DTT และ β -mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1 mM แล้วคำนวณค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เทียบกับแอกติวิตีในภาวะที่ไม่มีโลหะหนักหรือสารเคมี

2.6.5.7 การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลีแวนด้วยลีแวนเนส

ทำโดยนำเอนไซม์ 50 μl (80 U) มาย่อย 1% ลีแวนใน 100 mM cacodylate buffer pH 7 บ่มไว้ที่ 40°C เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 3, 5, 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาที นำไปต้ม 20 นาที แล้วนำสารละลายผสมที่ได้จากการทำปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์ด้วย Thin layer chromatography (TLC) ตามวิธีของ Iizuka *et al.* (2002) ดังวิธีข้างต้น (2.6.1) เพื่อดูขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยลีแวนเนส

บทที่ 3

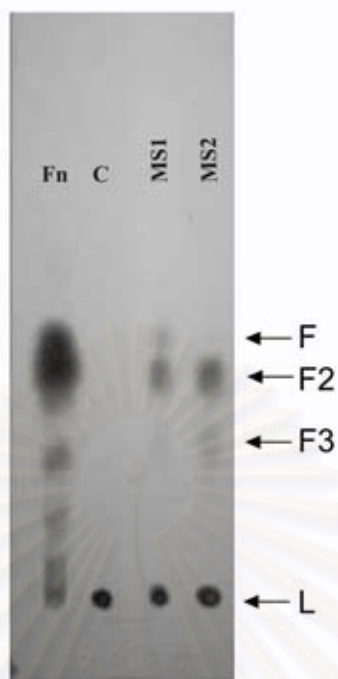
ผลการทดลอง

3.1 การคัดกรอง (screening) แบคทีเรียที่ผลิตลิแวนเนส

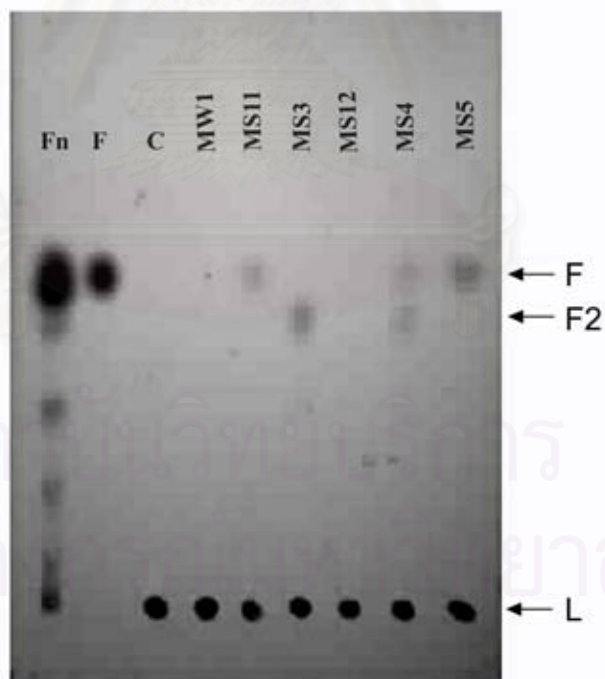
เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนเนสจากตัวอย่างดินและน้ำ 10 ตัวอย่างโดยกระจายแบคทีเรียในงานคัดเชื้อที่มีลิแวนเป็นสารตั้งต้นของคาร์บอนและบ่มที่ 50°C พบว่ามีแบคทีเรีย 21 ไอโซเลต (isolate) ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในภาวะที่อุณหภูมิสูง 50°C นี้ จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการย่อยลิแวนของเชื้อทั้ง 21 ไอโซเลต โดยเลี้ยงเชื้อในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีลิแวนเป็นสารตั้งต้นของคาร์บอนพร้อมเขย่าที่ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังแยกเซลล์ออกด้วยการปั่นแล้วจึงนำเอนไซม์หยาบมาทำปฏิกิริยากับลิแวนที่ 40°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ TLC ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 3.1 จากรูปจะเห็นว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายลิแวนในแต่ละไอโซเลตจะต่างกัน โดยส่วนใหญ่จะเป็น fructose และลิแวนไบโอส บางเชื้อนอกจากให้ผลิตภัณฑ์เป็น fructose และลิแวนไบโอสแล้วยังมีลิแวนไตรโอสปนอยู่ด้วยเล็กน้อย ตัวอย่างเช่น เชื้อ MS3 ให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอส (รูป 3.1 ข) เชื้อ MS5 ให้ผลิตภัณฑ์เป็น fructose (รูป 3.1 ข) เชื้อ MS6, MS7, MS8 (รูป 3.1 ค) ให้ผลิตภัณฑ์เป็น fructose เป็นต้น มีเชื้อ 8 ไอโซเลตคือ เชื้อ MW1, MS12 (รูป 3.1 ข), MS13, MS14, MS17 (รูป 3.1 ค) และ MS15, MS16, PE3 (รูป 3.1 ง) ที่ไม่สามารถย่อยลิแวนได้ มีเชื้อ 13 ไอโซเลตที่สามารถย่อยลิแวนได้ดังสรุปไว้ในตาราง 3.1

เมื่อนำเชื้อ 13 ไอโซเลตที่สามารถย่อยลิแวนมาศึกษาการเจริญในอาหารเหลวที่ 40°C เป็นเวลาสูงสุด 96 ชั่วโมงและติดตามการผลิตลิแวนเนสดังรายละเอียดการทดลองใน 2.6.1 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.2 จากภาพ MS1, MS2 และ MS3 การเจริญจะเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 24 ทั้ง MS1 และ MS2 ให้แอกติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.074 และ 0.071 U/ml ของน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ส่วนเชื้อ MS3 ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.072 U/ml ขณะที่ MS4 การเจริญจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 21 และให้แอกติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 0.014 U/ml ส่วน MS5, MS6, MS7 และ MS8 การเจริญจะเข้าสู่ stationary phase ใน 5 ชั่วโมง ซึ่ง MS5 จะให้แอกติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 15 เท่ากับ 0.031 U/ml ขณะที่ MS6, MS7, และ MS8 แอกติวิตีจะสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.015, 0.070 และ 0.086 U/ml ตามลำดับ MS9 จะเข้าสู่ stationary phase ที่ 24 ชั่วโมง และให้แอกติวิตีสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเช่นกัน เท่ากับ 0.024 U/ml ทั้ง MS10 และ MS14 จะไม่สามารถวัดการเจริญได้เนื่องจากมีลักษณะการเจริญเป็นก้อน (clump) ซึ่งเชื้อ MS10 ให้แอกติวิตีสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.027

ก.

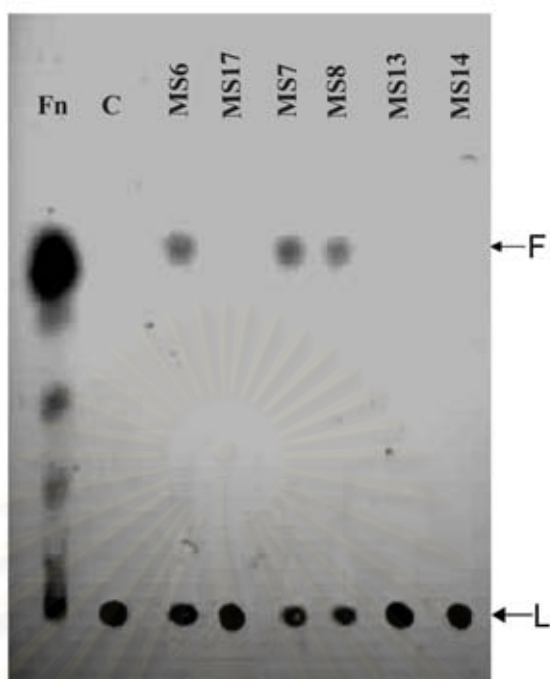


ข.

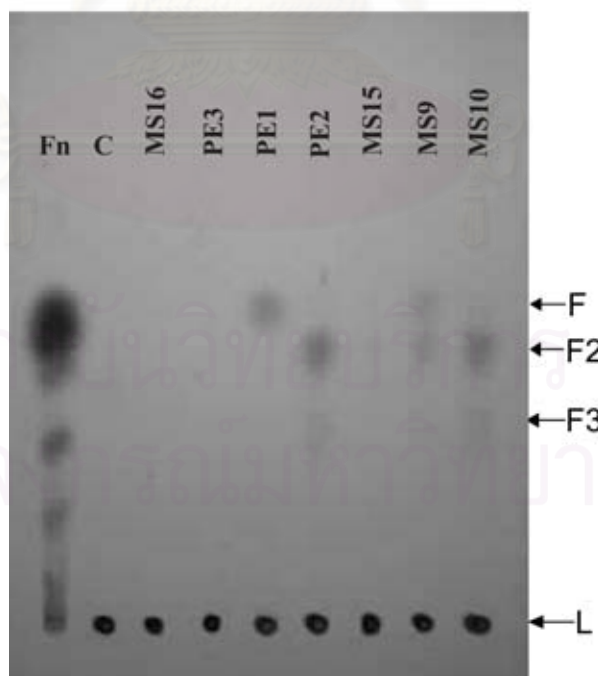


รูปที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์ TLC เพื่อดูความสามารถในการย่อยลิแวนของเชื้อแต่ละไอโซเลต
 (Fn : partial hydrolysed levan F : fructose F2 : ลิแวนไบโอส
 F3 : ลิแวนไตรโอส C : control)

ค.



ง.



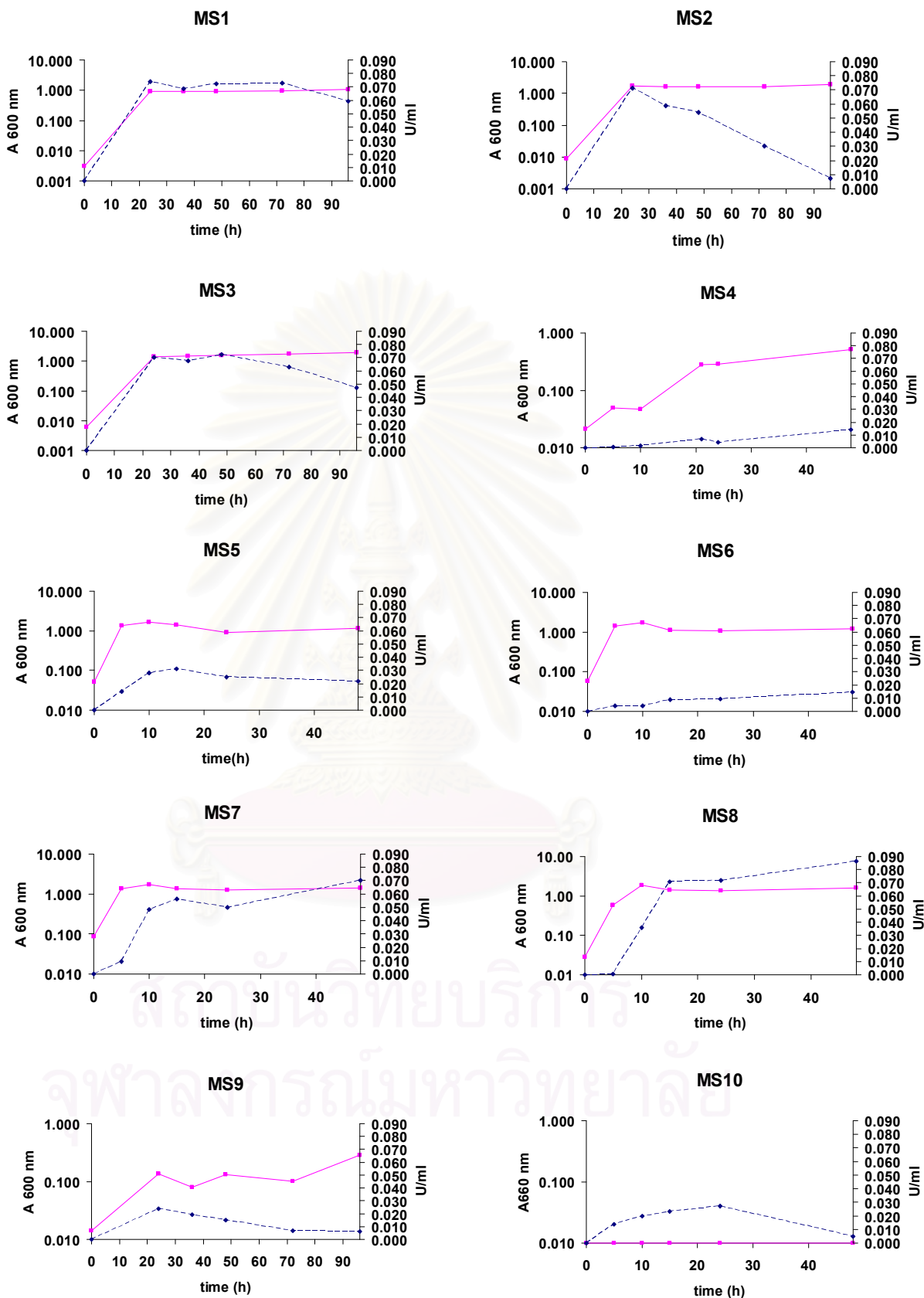
รูปที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์ TLC เพื่อดูความสามารถในการย่อยลิแวนของเชื้อแต่ละไอโซเลต (ต่อ)
 (Fn : partial hydrolysed levan F : fructose F2 : ลิแวนไบโอส
 F3 : ลิแวนไตรโอส C : control)

ตารางที่ 3.1 ความสามารถในการย่อยลิแวนของแบคทีเรียที่แยกได้

เชื้อที่เจริญที่ 50°C ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีลิแวนเป็นแหล่งคาร์บอน	ผลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการย่อยลิแวนด้วย TLC	ผลิตภัณฑ์สุดท้าย
MS1	+	F, F2, F3
MS2	+	F2, F3
MS3	+	F2
MS4	+	F, F2
MS5	+	F
MS6	+	F
MS7	+	F
MS8	+	F
MS9	+	F, F2
MS10	+	F2, F3
MS11	+	F
MS12	-	-
MS13	-	-
MS14	-	-
MS15	-	-
MS16	-	-
MS17	-	-
MW1	-	-
PE1	+	F
PE2	+	F2, F3
PE3	-	-

+ : สามารถย่อยลิแวนได้ - : ไม่สามารถย่อยลิแวนได้

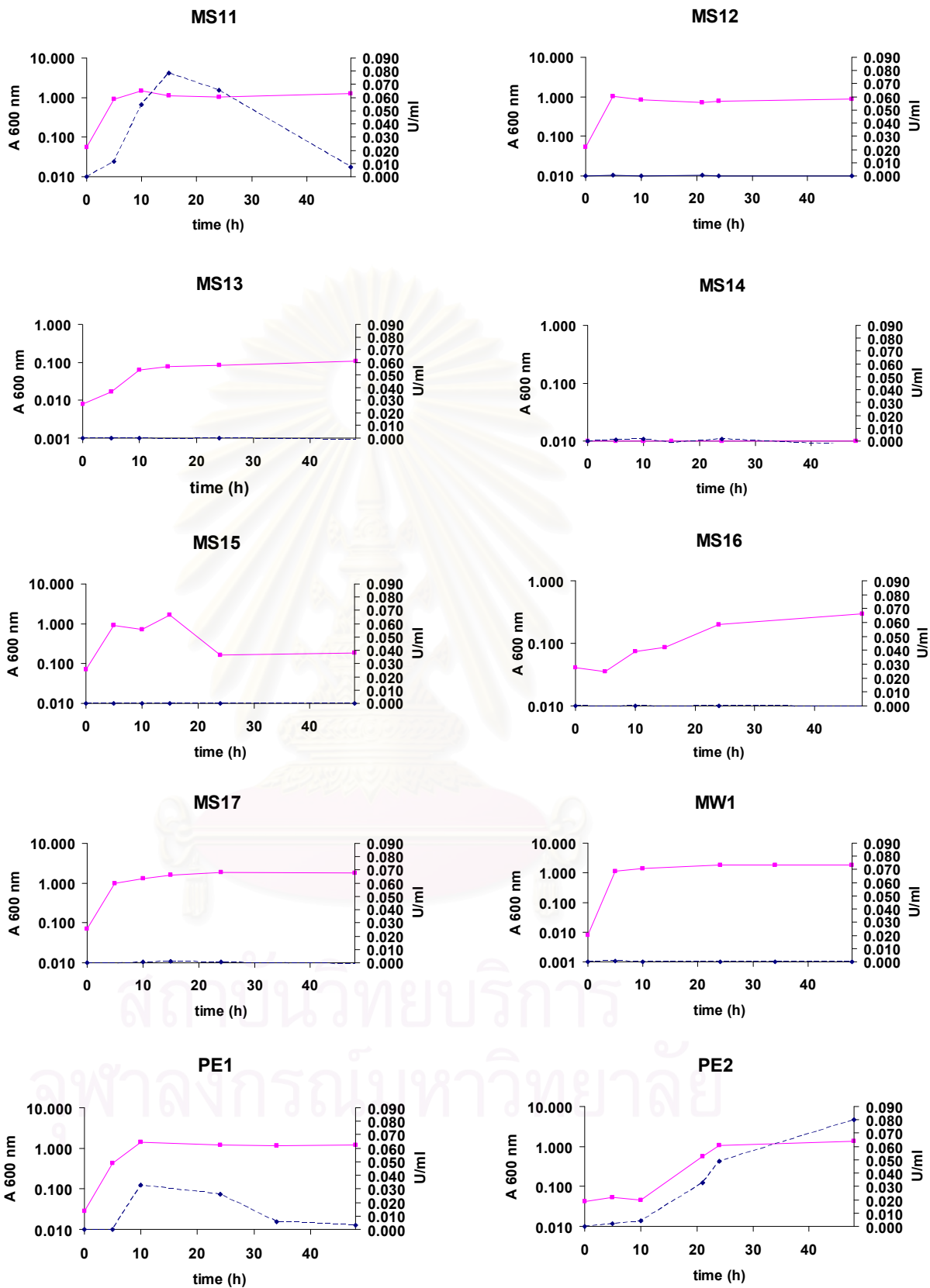
F : fructose F2 : ลิแวนไบโอส F3 : ลิแวนไตรโอส



รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตและการผลิตลิแวนเนสที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแต่ละชนิด

_____ : การเจริญเติบโต

_____ : การผลิตลิแวนเนส



รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตและการผลิตลิแวนเนสที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแต่ละชนิด (ต่อ)

————— : การเจริญเติบโต

..... : การผลิตลิแวนเนส

U/ml แต่ MS14 จะไม่พบแอกติวิตีของลิแวนเนสในทุกช่วงเวลา MS11 เจริญเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 5 ของการเลี้ยง และ ให้แอกติวิตีสุงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 มีค่าเท่ากับ 0.079 U/ml ส่วน MS12, MS13, MS15, MS16, MS17, MW1 และ PE3 จะไม่พบแอกติวิตีของลิแวนเนสในทุกช่วงเวลาทำการเลี้ยง PE1 มีการเจริญเข้าสู่ stationary phase ภายใน 10 ชั่วโมง และให้แอกติวิตีสุงสุดที่ 15 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.033 U/ml และสุดท้าย PE2 เจริญเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 24 และให้แอกติวิตีสุงสุดที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.080 U/ml

จากผลการคัดกรองที่ได้กล่าวมา พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 7 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยลิแวนแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอส และ/หรือลิแวนไตรโอสเป็นหลัก ได้แก่ MS1, MS2, MS3, MS4, MS9, MS10 และ PE2 จากเชื้อเหล่านี้ PE2 จะพบว่ามีแอกติวิตีสุงสุด ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ PE2 เพื่อทำการศึกษาต่อไป

3.2 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยลักษณะสมบัติทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ PE2 ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลตนี้คือ *Micrococcus* spp.

การระบุเชื้อ PE2 โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำโดยเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ pH' (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') และใช้ genomic DNA จากเชื้อ PE2 เป็นแม่พิมพ์ เมื่อวิเคราะห์ PCR product (16S rDNA) ด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.3 จากรูปจะเห็นว่าได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1,500 bp เพียงแถบเดียว ไม่มีแถบ non-specific product เกิดขึ้น หลังจากสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าได้นิวคลีโอไทด์ความยาว 1,531 bp ดังแสดงใน รูปที่ 3.4 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มาเข้าโปรแกรม BLAST จะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจำนวนจาก genomic DNA ของเชื้อ PE2 มีความคล้ายคลึงกับยีน 16S rRNA ของ *Microbacterium* sp. OVE ที่มีความยาว 1,446 bp อยู่ 93% (ภาคผนวก จ)

ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียไอโซเลท PE2

การตรวจวิเคราะห์	ผลการตรวจวิเคราะห์
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from :	
-D-Glucose	-
-D-Fructose	-
-D-Mannose	-
-Maltose	+
-Lactose	-
-D-Trehalose	+
-D-Mannitol	-
-Xylitol	-
-D-Melibiose	-
-Raffinose	-
-Xylose	-
-Sucrose	-
- α -methyl-D-glucoside	-
-N-acetyl-glucosamine	-
Reduction of nitrate	-
Alkaline phosphatase	-
Acetyl-methyl-carbinol production	-
Arginine dihydrolase	-
Urease production	-

+ve : Gram positive bacteria + : Positive reaction - : Negative reaction

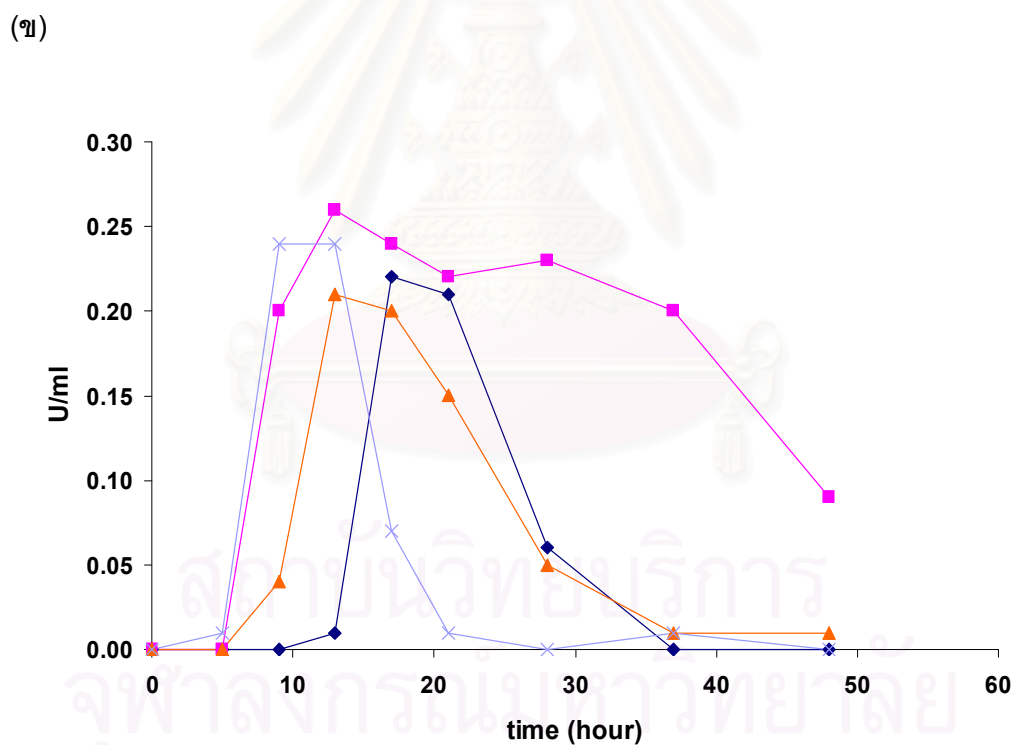
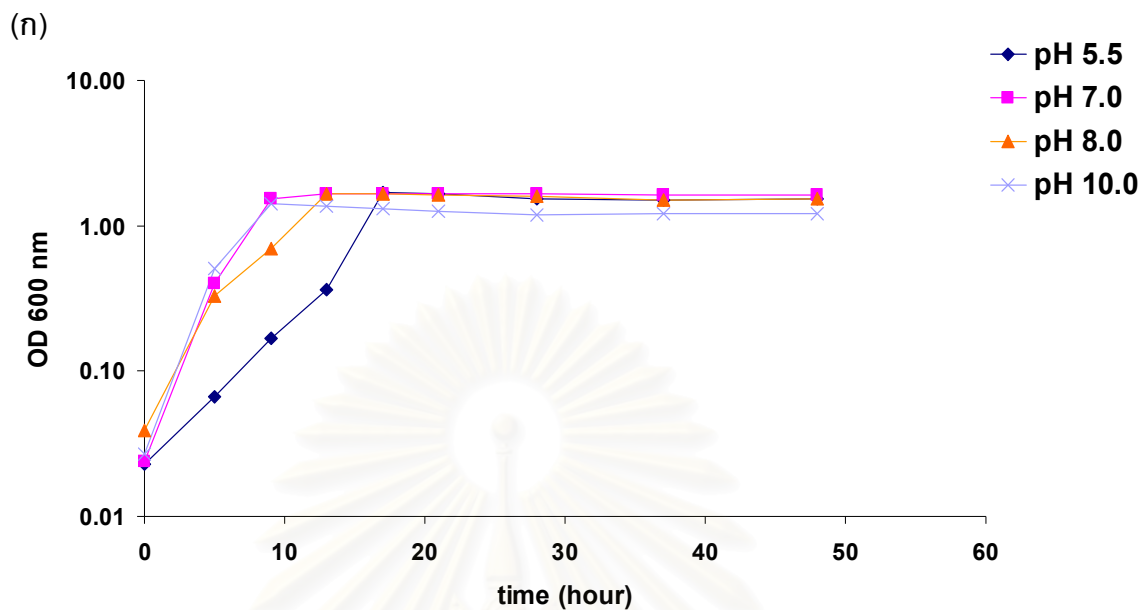
ATAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
 GAAGCTGGAGCTTGCTCTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCC
 CTGACTCTGGGATAACAGCCGGAACGGCTGCTAATACCGGATATGCACCATGAACGCATGTTCT
 GTGGTGGGAAAGATTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATG
 GCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGC
 AGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGA
 GAGTGACGGTCTGCGAAAGGCGACTCCTTTTTACGTGCCTCCAACCGCGGGAATACGTAGAGCT
 CTCGCCTCATCCTGAATTATTGGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAAC
 TGGAGGCTCAACCTCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGA
 ATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCT
 GGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATAACCTGGTAGT
 CCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGACCTTCCACGGTTTCCGTGACGCAGCTAACG
 CATTAAGTTCCCCGCCTGAGGAGTACGGCCGCAAGGTTAATACGCCTAGGAATTGTTGGGGACAC
 GAAGAAGCCCATCTCTATGCGGCTTCCCCCACCCAAGGCGCTGCATCCCCCAAAAACAGGGTG
 GAAAAGATCGCACGCCCAAAGAGGGCAATGATGTTTTCCCTCCTCACCAACAAGCAAAGAGTTTCA
 TCTCCTTACCCTGGAGCGCATAACAATGACCTCTGATAGCACACACTGCCCATGCTACTAGACATC
 TAAATTGTCTCTCTCCCTCCCTATATTATTGCCAAGAGTCTCCCGTCAATCCTTTTTGTCATTTATT
 CATTACGCCTCAACAAGACTGGGTTTTACCTTCCCTCCCATCTGAAAAGGAGAACTATTATTG
 GTGATAACCTTTAACCGGATGTTCTTATGATTCATAACTAACCCCCACCCTTCAACAAAAAAAAACAA
 ACCCACCCTTGCCGGCCTCCTCCCGTTCCCTCCCATGTTCCTCCCAAAGAGAAAAGAGAATACT
 CTTGGATAATCACTTTCTAATATGGATGCTGTTCAAGCATATAAAAAAACCGCCAACCCCTTCCCATC
 AAAAAAAGAACGAAACCCACCATTTGGCCTGCTGCCGGCCGGTACCTACCCAAGGATACCTC
 GACCAACCACGACCGCTGCCTTCTAAA

รูปที่ 3.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนจาก genomic DNA ของเชื้อ
 PE2 ด้วยไพรเมอร์ pA และ pH' โดย DNA ที่เพิ่มจำนวนได้มีจำนวน 1531 bp

3.3 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตลิแวนเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (PE2)

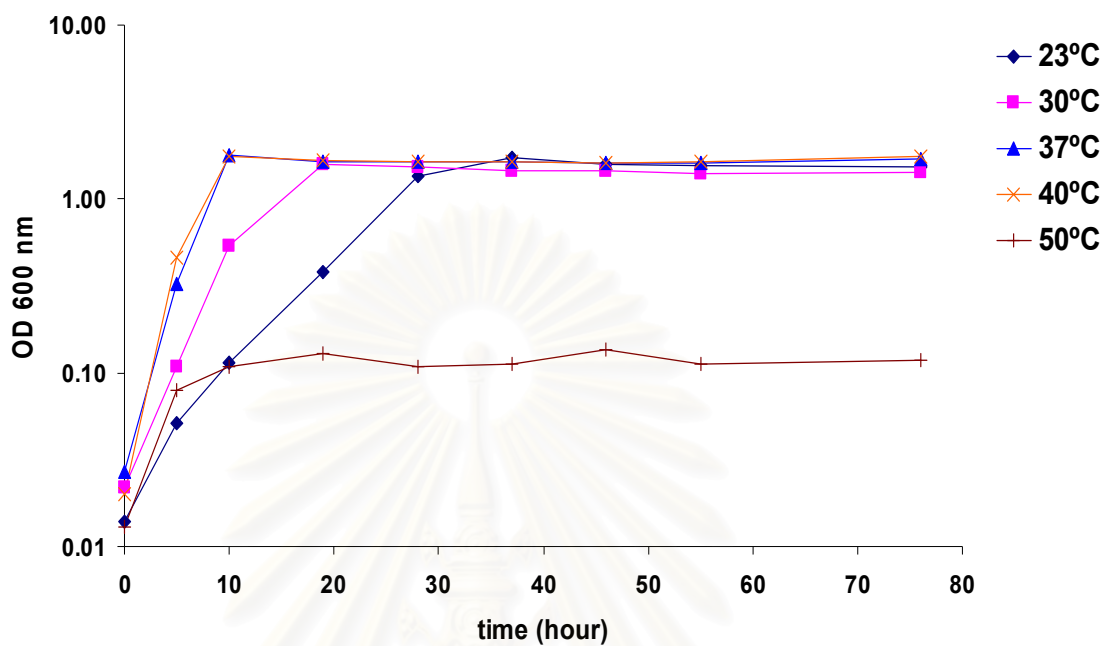
ในการศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตลิแวนเนสทำโดยเลี้ยงเชื้อ PE2 ใน levan minimum medium ที่ pH 5.5, 7.0, 8.0, และ 10.0 ที่ 40°C (ตัวควบคุม pH 5.5 ใช้ 7 mM acetate buffer, pH 7.0 และ 8.0 ใช้ 7 mM phosphate buffer และ pH 10.0 ใช้ 7 mM glycine buffer) ทำการเก็บเชื้อที่เวลาต่าง ๆ มาวัดการเจริญและแอกติวิตี ดังรายละเอียดการทดลองใน 2.6.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.5 จากกราฟจะเห็นได้ว่า PE2 สามารถเจริญได้ในช่วง pH 5.5-10.0 โดยการเจริญที่ pH 5.5 จะเจริญได้ช้าที่สุดขึ้นถึง stationary phase ที่ประมาณ 18 ชั่วโมง ส่วนที่ pH 7.0, 8.0 และ 10.0 การเจริญใกล้เคียงกัน เข้าถึง stationary phase ที่เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง ส่วนในการผลิตลิแวนเนสนั้นพบค่าแอกติวิตีจะสูงสุดที่ pH 7.0 และยังคงตรวจพบแอกติวิตีในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ pH นี้สูง โดยที่ 40 ชั่วโมง ยังคงพบแอกติวิตีเหลือ 60% ขณะที่การเลี้ยงที่ pH 10.0 ถึงจะมีการผลิตลิแวนเนสใกล้เคียงกับการเลี้ยงที่ pH 7.0 แต่แอกติวิตีเกือบหมดไปที่เวลา 20 ชั่วโมง การเลี้ยงเชื้อที่ pH 8.0 จะมีการผลิตลิแวนเนสต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงที่ pH 7.0 และยังพบแอกติวิตีลดลงเร็วกว่าที่ pH 7.0 การเลี้ยงเชื้อที่ pH 5.5 นอกจากเชื้อมีการเจริญได้ช้าแล้วยังผลิตลิแวนเนสได้ต่ำกว่าที่ pH 7.0 เล็กน้อยและการผลิตจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงเลือกใช้ pH 7.0 ในการเลี้ยงแบคทีเรียในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

การศึกษาคอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตลิแวนเนส ทำโดยเลี้ยงเชื้อ PE2 ใน levan minimum medium ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 23, 30, 37, 40 และ 50°C แล้วเก็บเชื้อที่เวลาต่าง ๆ มาวัดการเจริญและแอกติวิตี ดังรายละเอียดการทดลองใน 2.6.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.6 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 23-50°C และเจริญดีที่อุณหภูมิ 37-40°C ส่วนในการผลิตลิแวนเนสค่าแอกติวิตีจะสูงสุดที่อุณหภูมิในช่วงอุณหภูมิ 37°C และ 40°C ข้อแตกต่างระหว่าง 2 อุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิ 37°C ยังคงพบแอกติวิตีเหลือเกือบ 80% ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 76 ชั่วโมง ส่วนการเลี้ยงเชื้อที่ 40°C หลัง 40 ชั่วโมง แอกติวิตีจะลดอย่างรวดเร็วเหลือประมาณ 8% ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 76 ชั่วโมง การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C จะผลิตลิแวนเนสใกล้เคียงกับที่ 37°C แต่การผลิตจะเพิ่มขึ้นช้ากว่า การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23°C การผลิตจะช้าและให้ค่าเพียง 80% ของแอกติวิตีที่เลี้ยงที่ 40°C ขณะที่เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50°C พบว่าแทบจะไม่ปรากฏการผลิตลิแวนเนสเลย ถึงแม้จะพบว่าแอกติวิตีของลิแวนเนสจะลดลงมากหลัง 40 ชั่วโมง แต่การทดลองนี้จะเลือกใช้อุณหภูมิ 40°C โดยเลี้ยงเชื้อเพียง 12-20 ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะที่อุณหภูมิ 40°C มีเชื้อหลายชนิดที่ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้ไม่ดี จึงเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ดี ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 40°C ในการเลี้ยงแบคทีเรียในการทดลองต่อไป

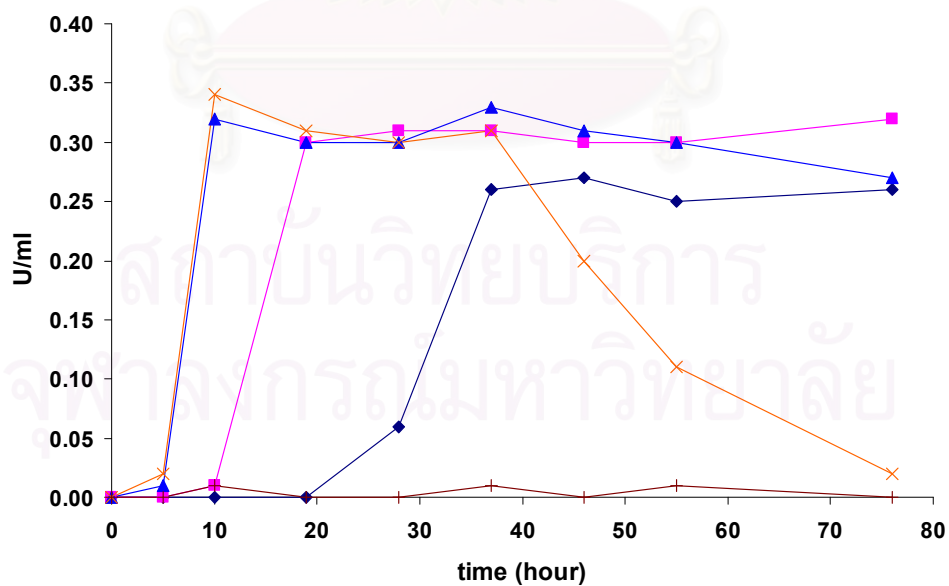


รูปที่ 3.5 ผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อ PE2 (ก) และแอกติวิตีของ ดีแวนเนส (ข)

(ก)



(ข)



รูปที่ 3.6 ผลของอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเชื้อ PE2 (ก) และแอกติวิตีของลิแวนเนส (ข)

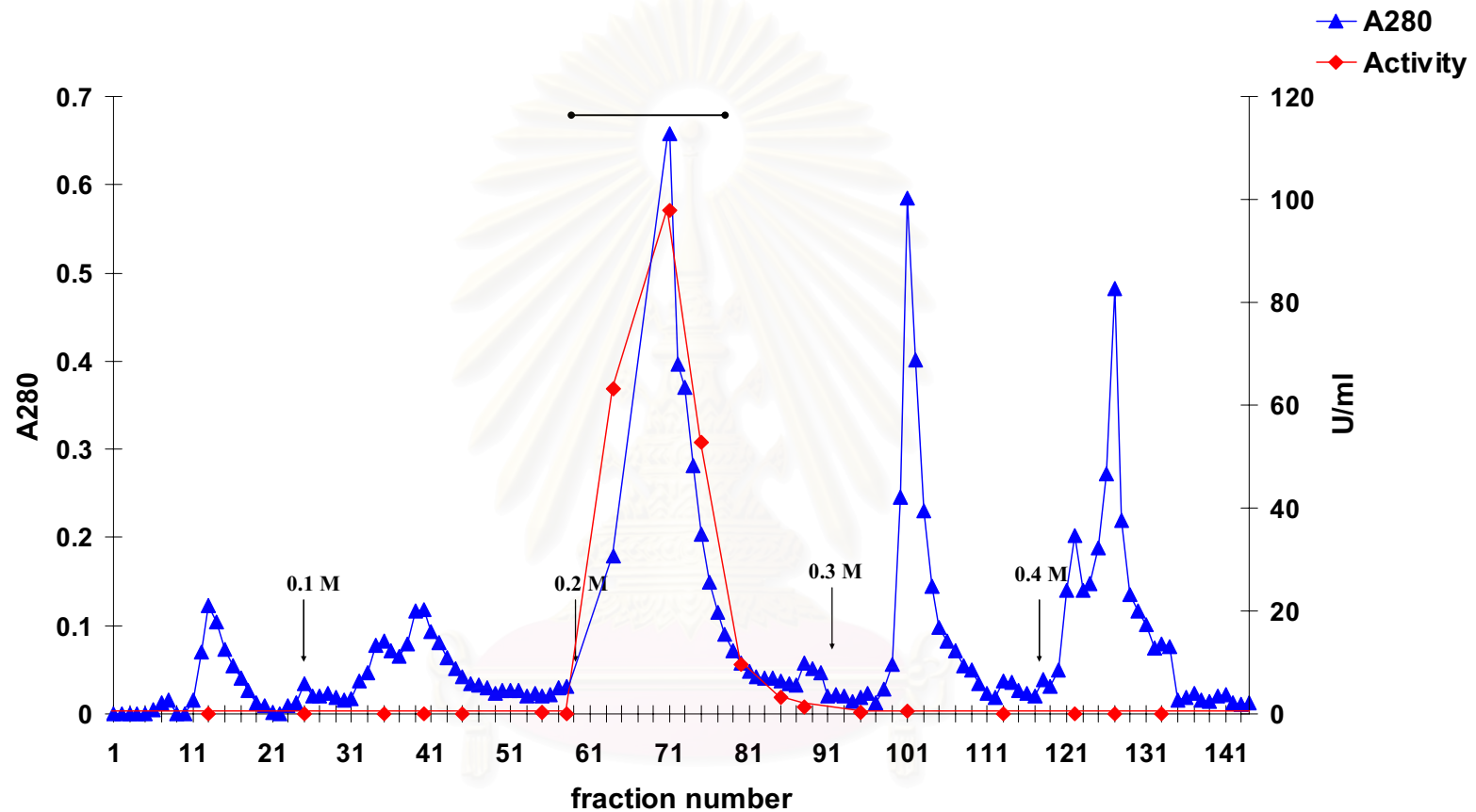
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตลิแวนเนสของเชื้อ PE2 สรุปได้ว่าสภาวะที่ใช้ในการผลิตลิแวนเนสคือ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร levan minimum medium pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลาประมาณ 12-20 ชั่วโมง

3.4 การทำลิแวนเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำเชื้อ PE2 ที่ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตลิแวนเนสแล้ว มาเลี้ยงในอาหาร levan minimum medium ในสภาวะ pH 7.0 ที่ 40°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเพื่อกำจัดเซลล์ออก จากเอนไซม์หยาบปริมาตร 2.1 ลิตร ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ vivaflow จนเหลือปริมาตร 46 ml แล้วนำสารละลายเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีและปริมาณโปรตีน พบว่าค่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 20,700 หน่วย ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 36.6 mg และค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 565.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 3.3) จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-50% แล้วนำมาตรวจวัดแอกติวิตีและปริมาณโปรตีน พบว่าค่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 14,800 หน่วย ซึ่งจะเหลือประมาณ 71.5% ของแอกติวิตีรวมของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 10.1 mg และค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,465.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ขึ้น 2.6 เท่า (ตารางที่ 3.3) จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยนำแฟรกชันที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 20-50% ที่ได้อะไรซ์แล้วผ่านลงในคอลัมน์ดีเอไอโธเพิร์ล ได้ผลการแยกโปรตีนแสดงดังกราฟรูปที่ 3.7 จากกราฟเห็นได้ว่าเมื่อชะด้วยการเพิ่มความแรงประจุแบบลำดับขั้น (stepwise elution) เอนไซม์ถูกชะออกมาจากคอลัมน์เมื่อชะด้วย 0.2 M NaCl ที่แฟรกชัน 59 ถึง 94 กำจัดโปรตีนอื่นออกได้บางส่วน ดังนั้นจึงทำการรวมแฟรกชันที่มีแอกติวิตีเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน (แฟรกชัน 59 ถึง 78) หลังจากที่ได้ดึงน้ำออกจากสารละลายจากการรวมแฟรกชัน แล้วด้วยการใช้ aquasorb จึงนำไปได้อะไรซ์ที่อุณหภูมิ 4°C ในสารละลาย 20 mM phosphate buffer pH 7.0 นำสารละลายที่ได้มาตรวจวัดแอกติวิตีและปริมาณโปรตีน พบแอกติวิตีรวมเท่ากับ 4,040 หน่วย ซึ่งเหลือประมาณ 19.5% ของแอกติวิตีรวมของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 4.67 mg และค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 865.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.5 เท่า (ตารางที่ 3.3) ต่อจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกโดยผ่านคอลัมน์บิวทิลไดโธเพิร์ล ได้ผลการแยกโปรตีนแสดงดังรูปที่ 3.8 สังเกตได้ว่าเมื่อชะด้วย 15% แอมโมเนียมซัลเฟตใน 20 mM phosphate buffer pH 7.0 สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกได้ค่อนข้างมากพอสมควรและเมื่อชะด้วยการลดความเข้มข้นเกลือแบบลำดับขั้น (stepwise elution) พบว่าเอนไซม์ถูกชะออกมาจากคอลัมน์เมื่อชะด้วย 5% แอมโมเนียมซัลเฟตใน 20 mM phosphate buffer pH 7.0 ที่แฟรกชัน 53 ถึง 70 ทำ

การรวมแฟรกชันที่มีเอนไซม์ส่วนมากเข้าด้วยกันคือตั้งแต่แฟรกชัน 56 ถึง 66 หลังจากที่ตั้งน้ำออกด้วยการใช้ aquasorb แล้วนำไปไดอะไลซ์ สารละลายที่ได้มาตรวจวัดแอกติวิตีและปริมาณโปรตีน จะได้แอกติวิตีรวมเท่ากับ 3,350 หน่วย ซึ่งเหลือประมาณ 16.2% ของแอกติวิตีรวมของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 0.66 mg และค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 5,075.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ขึ้น 9 เท่า (ตารางที่ 3.3)

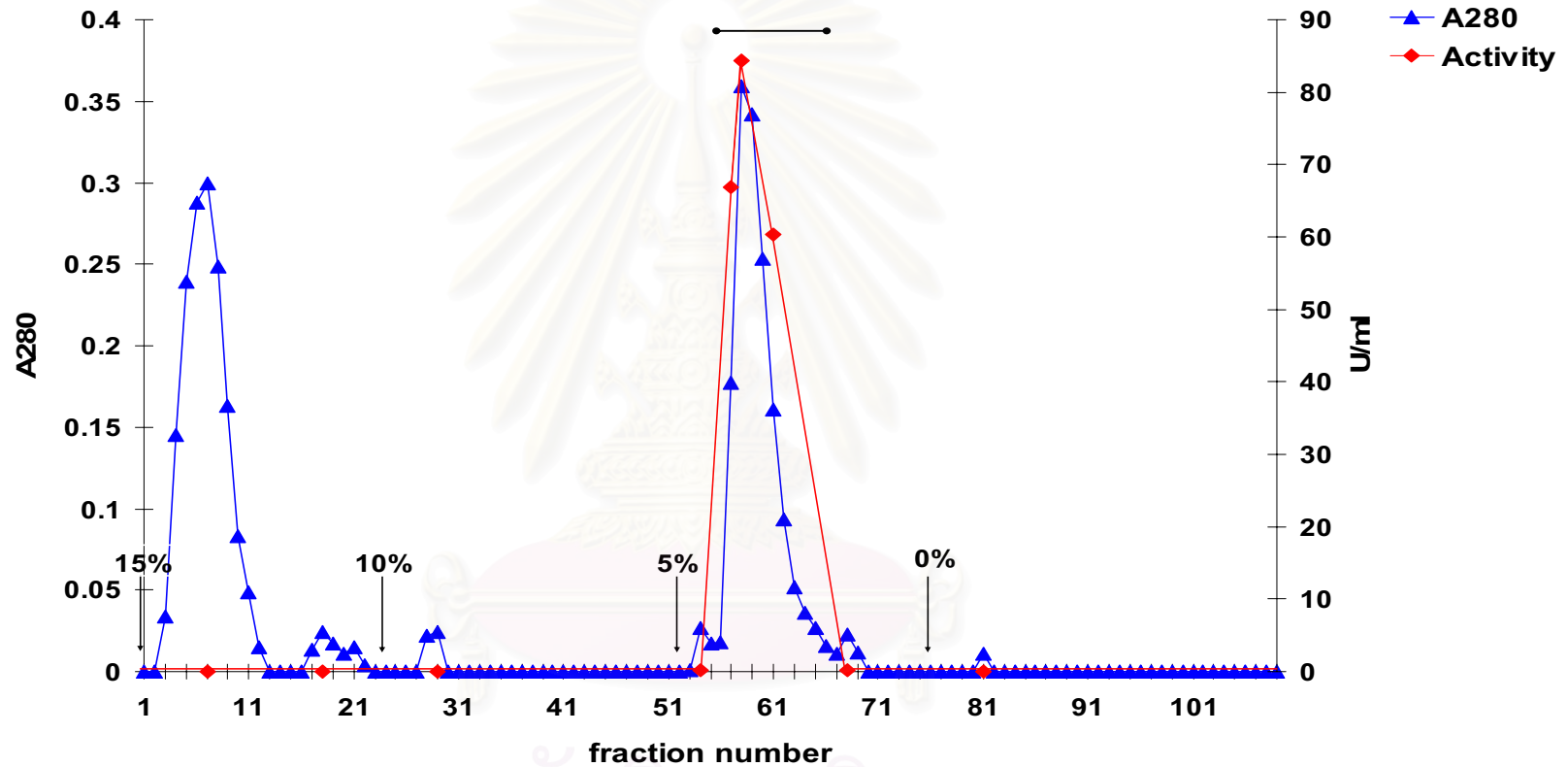
จากการตรวจแยกโปรตีนที่ได้จากแต่ละขั้นตอนการทำลิแวนเนสให้บริสุทธิ์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลแสดงไว้ในรูปที่ 3.9 จะเห็นว่าโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายปรากฏแถบโปรตีนน้อยกว่าในขั้นตอนเริ่มต้นมาก แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีแถบโปรตีนเหลือ 2 แถบชัดเจน ซึ่ง 2 แถบมีความเข้มไม่เท่ากัน โดยแถบบนมีความเข้มมากกว่าแถบล่าง แสดงว่าการทำให้บริสุทธิ์ครั้งนี้เป็นการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนเท่านั้น จากนั้นได้นำโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายจากคอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ลมาทำการย้อมแอกติวิตี โดยการเติมลิแวนเนสลงในไนเนทีฟเจลแล้วทำการแยกโปรตีนโดยกระแสไฟฟ้าในที่เย็น (บนน้ำแข็ง) จากนั้นนำเจลส่วนหนึ่งมาย้อมโปรตีนและอีกส่วนหนึ่งที่เหมือนกันมาย้อมแอกติวิตีด้วย TTC ได้ผลแสดงดังรูป 3.10 จากรูปในช่องที่ 2 จะปรากฏแถบโปรตีนค้างอยู่ด้านบนของ separating gel และอีกแถบจะปรากฏอยู่กลางเจล โดยความเข้มของแถบโปรตีนสอดคล้องกับแถบโปรตีนในช่องที่ 4 ในรูป 3.9 แถบที่มีแอกติวิตีของลิแวนเนสคือ แถบบนซึ่งมีความเข้มในการย้อมสีโปรตีนสูงกว่า ซึ่งติดสีเมื่อย้อมแอกติวิตีในช่องที่ 4 ของรูป 3.10



รูปที่ 3.7 คอลัมน์ดีอีเออียูเพิร์ล

ผลการแยกเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (20-50%) หลังจากผ่านคอลัมน์ดีอีเออียูเพิร์ล (10 มิลลิลิตร) ชะด้วยการเพิ่มความแรงประจุแบบลำดับขั้น (stepwise elution) ซึ่งใช้บัฟเฟอร์ที่มี NaCl เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 โมลาร์ ตามลำดับ อัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 2 มิลลิลิตร

● — ● รวมแฟรคชัน 59-78



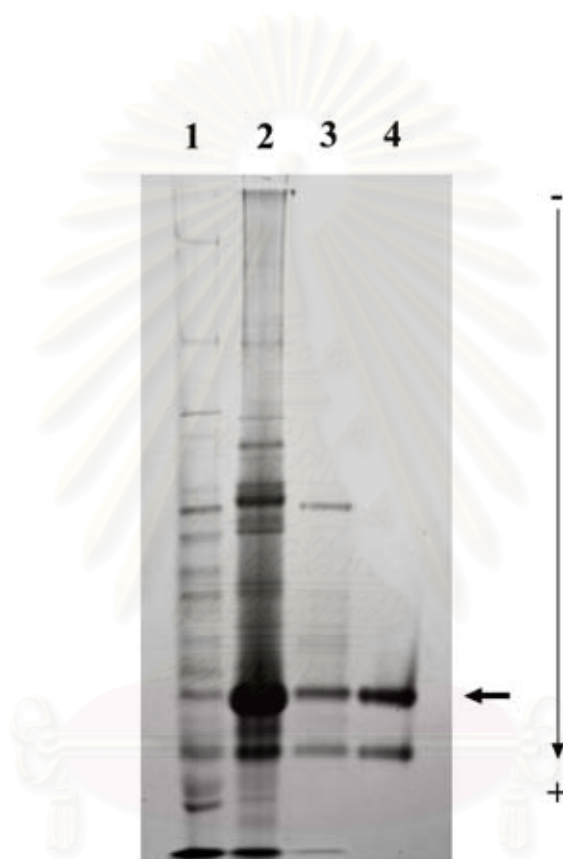
รูปที่ 3.8 คอลัมน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล

ผลการแยกเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีโตโยเฟิร์ล โดยผ่านคอลัมน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล (5 มิลลิลิตร) ะด้วยการลดความเข้มข้นเกลือแบบลำดับขั้น (stepwise elution) ซึ่งจะใช้บัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 10, 5 และ 0% ตามลำดับ อัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 2 มิลลิลิตร

●————● รวมแฟรคชัน 56-66

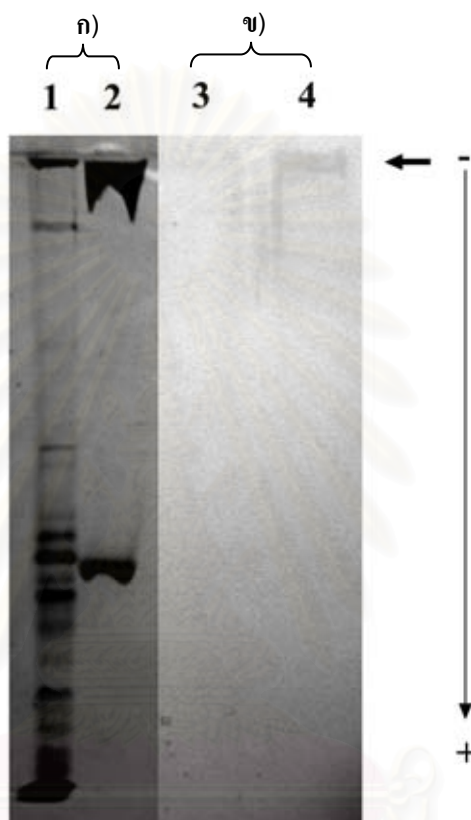
ตารางที่ 3.3 ผลการทำลิแวนเนสจากเชื้อ PE2 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	แอดติวิตีรวม (หน่วย)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอดติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)	% ผลิตผล (yield)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายเอนไซม์ตั้งต้น	20,700	36.6	565.4	100.0	1.0
แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-50%	14,800	10.1	1,465.3	71.5	2.6
คอลลัมน์ดีเอไอโตโยเพิร์ล	4040	4.67	865.1	19.5	1.5
คอลลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ล	3350	0.66	5,075.8	16.2	9.0



รูปที่ 3.9 รูปแบบของโปรตีนที่แยกโดย 10% พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (PAGE) จากแต่ละขั้นตอนของการทำสีแว่นเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

ช่องที่ 1	เอนไซม์หยาบ	32 μg
ช่องที่ 2	โปรตีนจากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-50%	73 μg
ช่องที่ 3	โปรตีนจากคอลัมน์ดีอีเอไอโตโยเฟิร์ล (แฟรกชัน 59-78)	16 μg
ช่องที่ 4	โปรตีนจากคอลัมน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล (แฟรกชัน 56-66)	13 μg



รูปที่ 3.10 รูปแบบของดีเอ็นเอเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 7.5% พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (PAGE) ที่มี 0.1% ดีเอ็นเอผสมอยู่ ส่วน ก) ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 ส่วน ข) ย้อมสีแอสเทอริวดี

ส่วน ก)	ช่องที่ 1	เอนไซม์หยาบ	32 μ g
	ช่องที่ 2	โปรตีนจากคอสมอน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล (แฟรกชัน 56-66)	13 μ g
ส่วน ข)	ช่องที่ 3	เอนไซม์หยาบ	32 μ g
	ช่องที่ 4	โปรตีนจากคอสมอน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล (แฟรกชัน 56-66)	13 μ g

3.5 การศึกษาลักษณะสมบัติของลิแวนเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

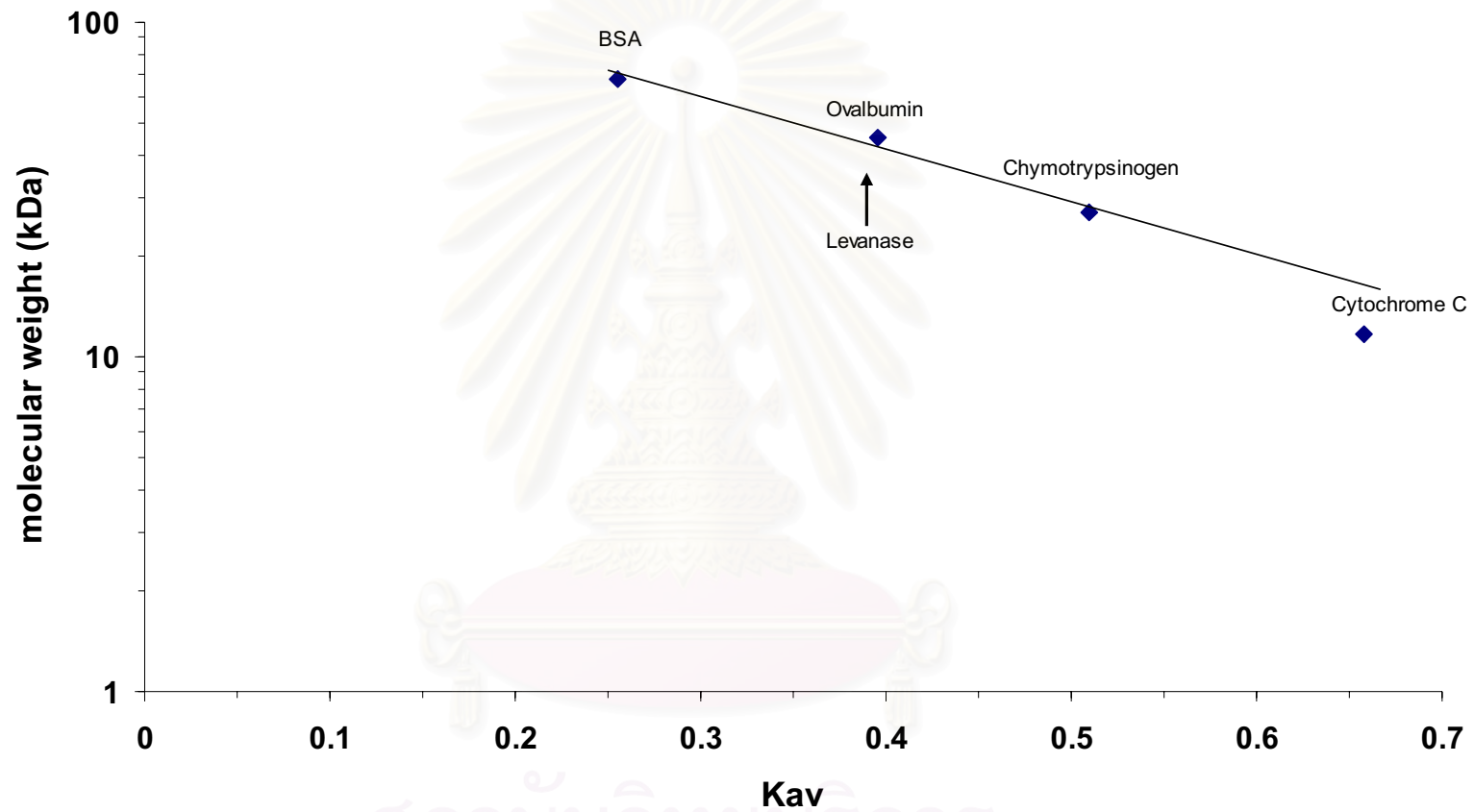
3.5.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของลิแวนเนส

ก. โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ ลงในคอลัมน์แล้วชะด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.0 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A และ cytochrome C ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ elution volume (Ve) เท่ากับ 152, 173, 190 และ 212 ml ตามลำดับ เอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนจากการรวมแฟรกชัน 56-66 จากคอลัมน์บิวทิลไดโอยเฟิร์ล เมื่อผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 โปรตีนจะถูกชะออกมาเพียง 1 peak ที่มีน้ำหนักโมเลกุล และให้แอกติวิตีเพียง 1 peak ที่ elution volume เท่ากับ 172 ml ในขณะที่ void volume (Vo) ของคอลัมน์เท่ากับ 114 ml และ bed volume (Vt) 263 ml เมื่อคำนวณค่า Kav แล้วเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.11) พบว่าลิแวนเนสมีน้ำหนักโมเลกุล 43,900 ดาลตัน

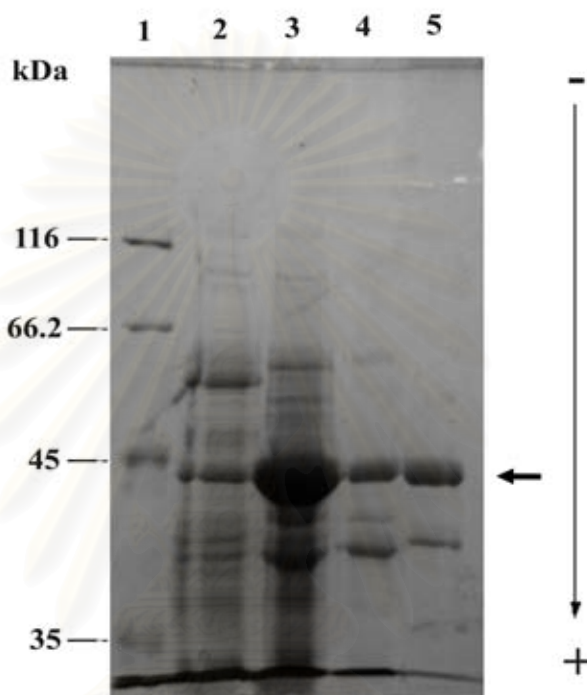
ข. โดยใช้เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำสารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนมาทำเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังแสดงในการทดลองที่ 2.6.5.1 ข. ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.12 จากรูปจะเห็นว่าช่องที่ 5 จะปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ที่เข้มไม่เท่ากัน ซึ่งแถบที่เข้มมีระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility) เท่ากับ 0.67 และแถบที่อ่อนกว่ามีระยะทางสัมพัทธ์เท่ากับ 0.78 ส่วนแถบของโปรตีนมาตรฐานในช่องที่ 1 ได้แก่ β -galactosidase, bovine serum albumin, ovalbumin และ lactate dehydrogenase มีระยะทางสัมพัทธ์เท่ากับ 0.29, 0.42, 0.64 และ 0.94 ตามลำดับ จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.13) สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของทั้ง 2 แถบของโปรตีนในช่องที่ 5 ได้ โดยแถบที่เข้มมากมีขนาดเท่ากับ 43,800 ดาลตัน ส่วนแถบที่เข้มน้อยกว่ามีขนาดเท่ากับ 39,900 ดาลตัน ซึ่งคาดว่าแถบ 43,800 ดาลตัน จะเป็นแถบของลิแวนเนส เนื่องด้วยมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลที่หาด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 เท่ากับ 43,900 ดาลตัน

3.5.2 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของลิแวนเนส

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.6.5.2 โดยนำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีที่ pH ต่าง ๆ คือ 100 mM acetate buffer pH 3.0-7.0, 100 mM phosphate buffer pH 6.0-8.0, 100 mM MOP buffer pH 6.0-8.0, 100 mM cacodylate buffer pH 5.0-8.0 และ 100 mM glycine-HCl buffer 8.0-10.0 ได้ผลดังรูปที่ 3.14 จากกราฟแสดงให้เห็นว่าแอกติวิตีของลิแวนเนสมีค่าสูงสุด ที่ pH 7.0 ใน cacodylate buffer pH 7.0 และแอกติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH ต่ำกว่า 5.0 ใน acetate buffer และที่ pH สูงกว่า 8.5 ใน glycine-HCl buffer

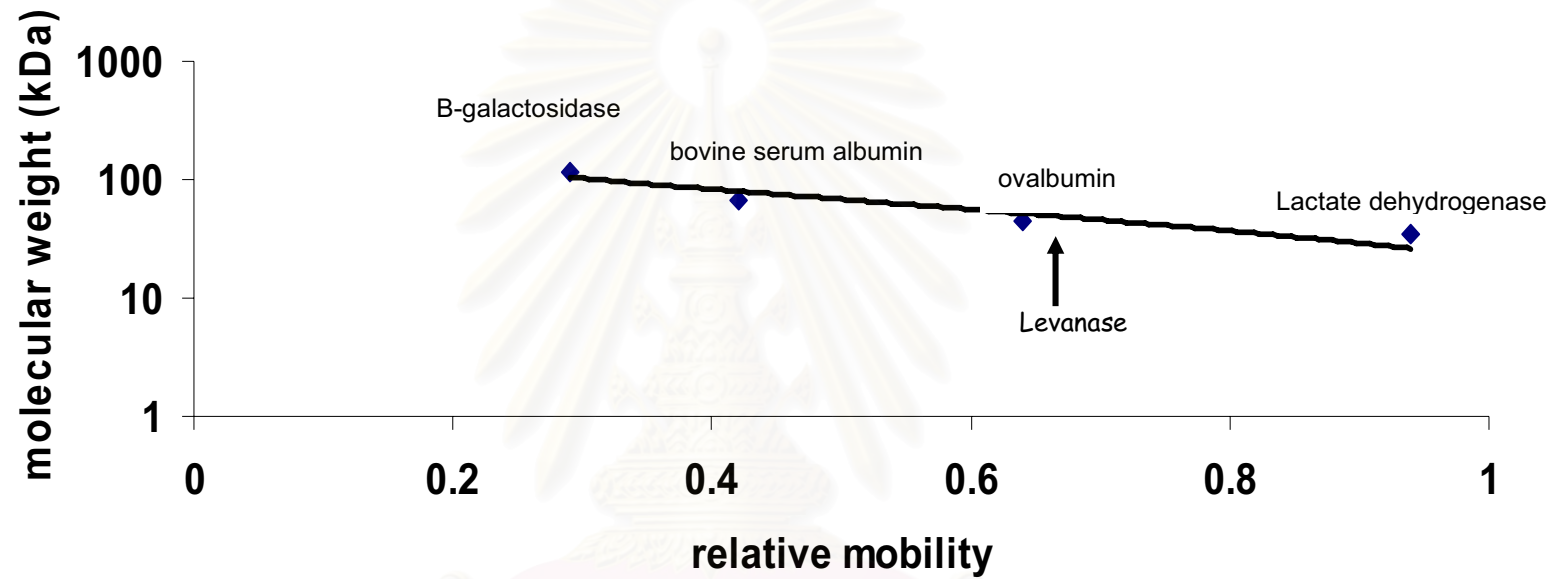


รูปที่ 3.11 ความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100 (ขนาด 2.5×67 เซนติเมตร)



รูปที่ 3.12 รูปแบบของโปรตีนจากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้ลิแวนเนสบริสุทธิ์บางส่วนที่แยกด้วย 7.5% เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

ช่องที่ 1	โปรตีนมาตรฐาน	
ช่องที่ 2	เอนไซม์หยาบ	32 μg
ช่องที่ 3	โปรตีนจากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-50%	73 μg
ช่องที่ 4	โปรตีนจากคอลัมน์ดีอีเออิตโยเฟิร์ล (แฟรกชัน 59-78)	16 μg
ช่องที่ 5	โปรตีนจากคอลัมน์บิวทิลโตโยเฟิร์ล (แฟรกชัน 56-66)	13 μg



รูปที่ 3.13 ความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ ดีแวนเนสโดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

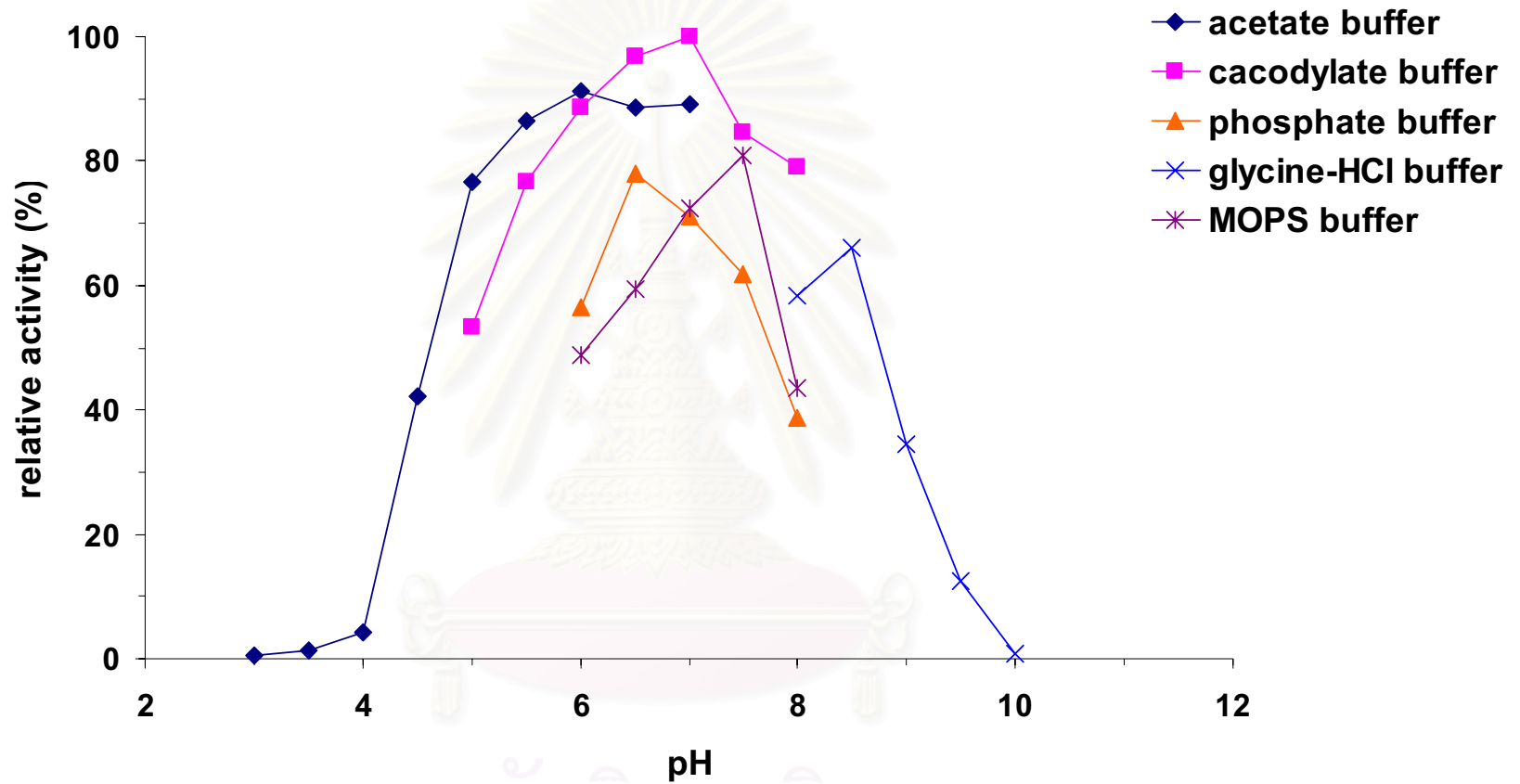
3.5.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของลิแวนเนส

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.6.5.3 โดยนำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-70°C เป็นเวลา 30 นาที ใน 100 mM cacodylate buffer pH 7.0 (จากผลการทดลองในข้อ 3.5.2) ได้ผลดังรูปที่ 3.15 จากกราฟจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ทำให้แอกติวิตีของลิแวนเนสสูงที่สุดเท่ากับ 40°C และแอกติวิตีจะลดอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 50°C

3.5.4 การศึกษาความเสถียรของลิแวนเนสที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ

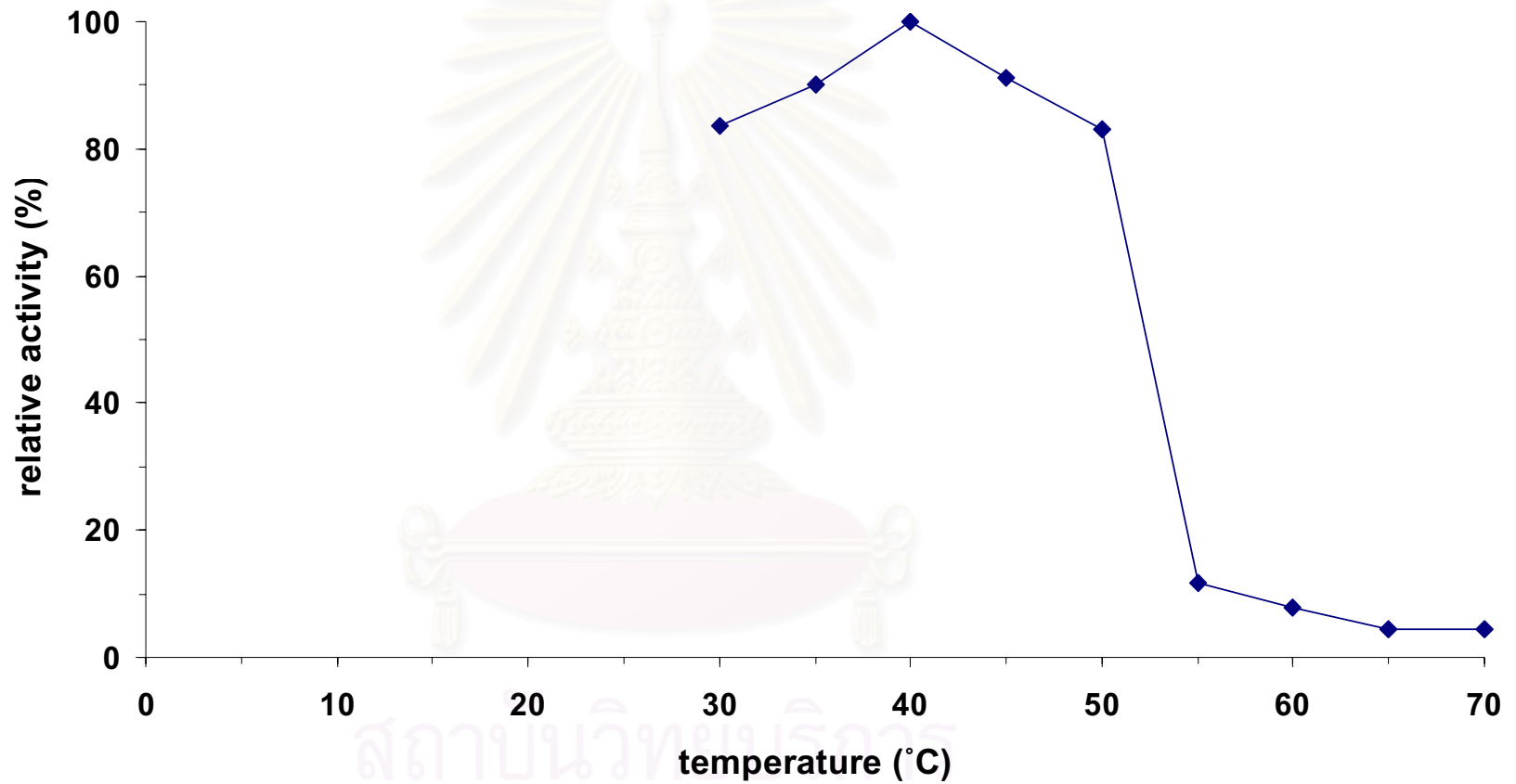
ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.6.5.4 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ใน 20 mM acetate buffer pH 3.0-5.5, 20 mM phosphate buffer pH 6.0-8.0, 20 mM MOPS buffer pH 6.0-8.0, 20 mM cacodylate buffer pH 5.5-8.0 และ 20 mM glycine-HCl buffer pH 8.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตี ได้ผลแสดงในรูปที่ 3.16 จากรูปจะเห็นได้ว่าลิแวนเนสมีเสถียรภาพสูงสุดใน glycine buffer pH 8.0-9.0 และแอกติวิตีลดลงเหลือประมาณ 70% เมื่อบ่มใน glycine-HCl pH 10.0 และภายหลังการบ่มใน acetate buffer ที่ต่ำกว่า pH 5.5 แอกติวิตีลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่เหลือแอกติวิตีใน acetate buffer ที่ pH 3.0 หลังจากนั้นนำสารละลายลิแวนเนสมาบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60°C ใน 20 mM glycine-HCl buffer pH 8.0 โดยบ่มที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 - 78 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดแอกติวิตีได้ผลดังรูปที่ 3.17 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30°C ลิแวนเนสมีเสถียรภาพยาวที่สุดโดยที่ 36 ชั่วโมงยังมีแอกติวิตี 100% และเหลือ 95% ที่ 78 ชั่วโมง นอกจากอุณหภูมินี้เสถียรภาพของลิแวนเนสจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มสูงขึ้น ที่อุณหภูมิ 40°C แอกติวิตียังคงเหลือ 100% ตั้งแต่เริ่มบ่มจนถึงชั่วโมงที่ 28 จากนั้นแอกติวิตีจะค่อย ๆ ลดลงจนเหลือประมาณ 85% ในชั่วโมงที่ 78 ส่วนที่อุณหภูมิ 50°C แอกติวิตีจะลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มบ่มจนถึงชั่วโมงที่ 78 แอกติวิตีเหลือประมาณ 42% และที่อุณหภูมิ 60°C แอกติวิตีหมดภายใน 6 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



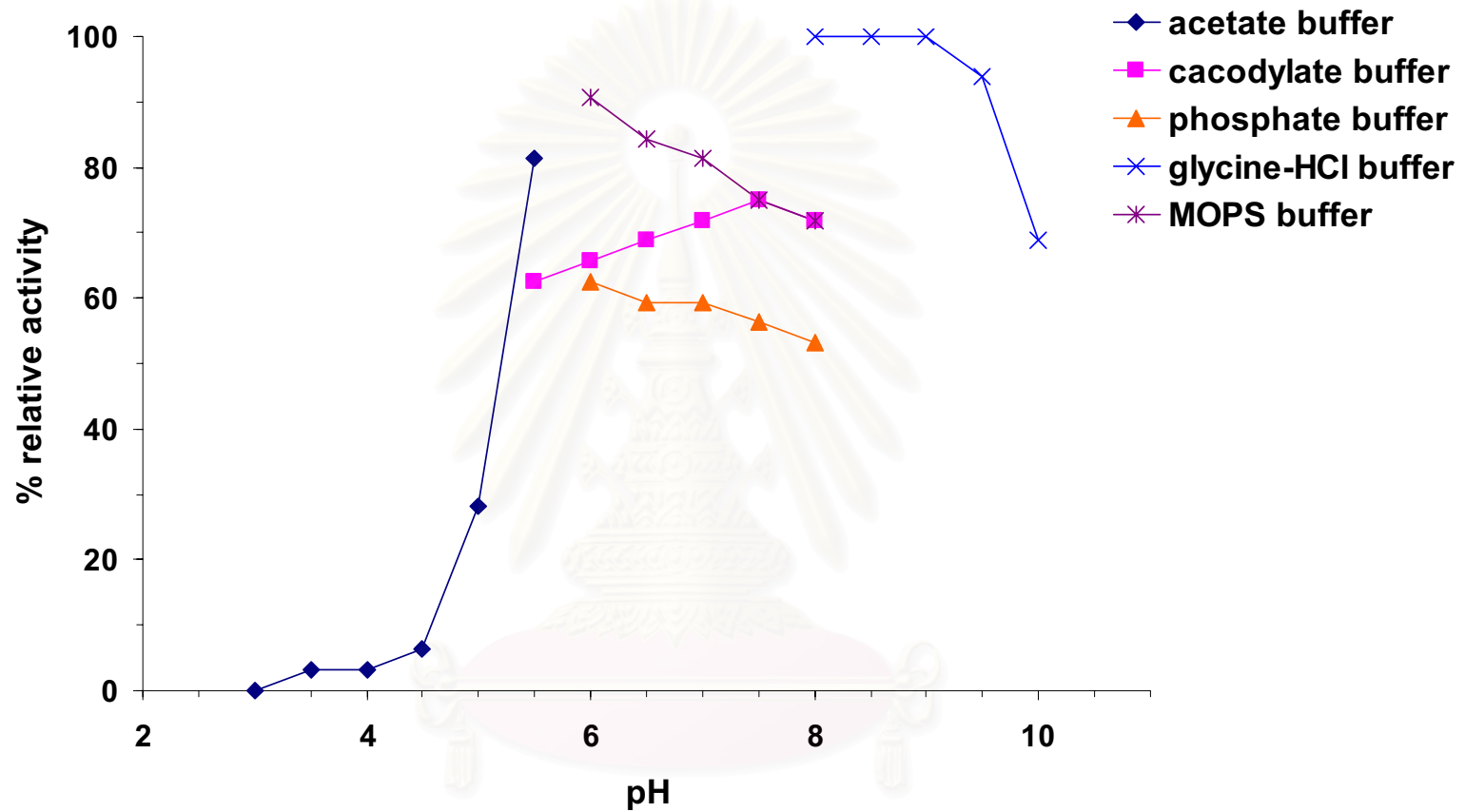
รูปที่ 3.14 ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของลิแกนด์

นำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีที่ pH ต่าง ๆ คือ 100 mM acetate buffer pH 3.0-7.0, 100 mM phosphate buffer pH 6.0-8.0, 100 mM MOPS buffer pH 6.0-8.0, 100mM cacodylate buffer pH 5.0-8.0 และ 100 mM glycine-HCl buffer 8.0-10.0

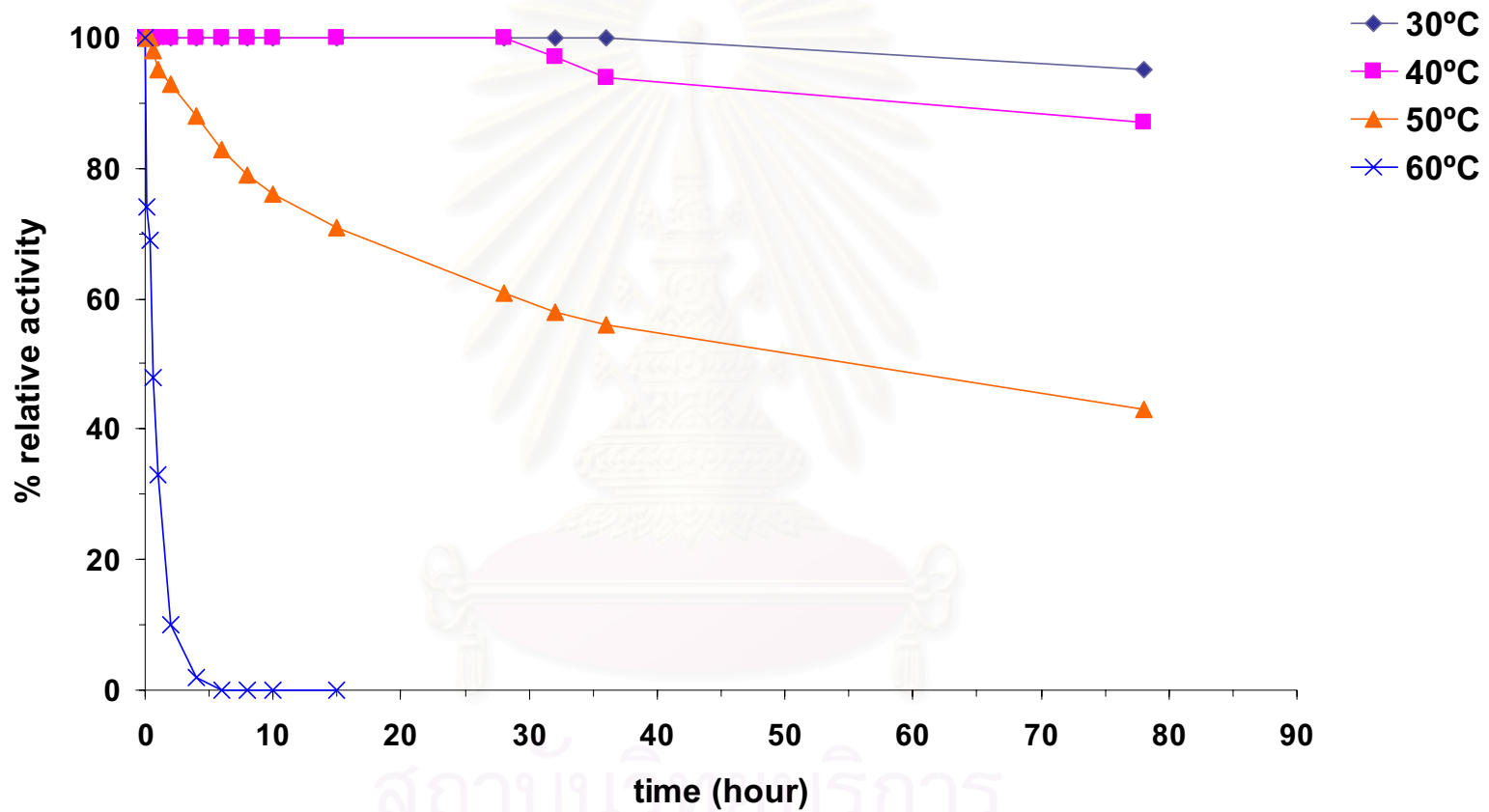


รูปที่ 3.15 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของลีแวนเนส

นำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-70°C เป็นเวลา 30 นาที ใน 100 mM cacodylate buffer pH 7.0



รูปที่ 3.16 ผลของ pH ต่อความเสถียรของลิแกนด์
 บ่มสารละลายเอนไซม์ใน 20 mM acetate buffer pH 3-5.5, 20 mM phosphate buffer pH 6.0-8.0, 20mM MOPS buffer pH 6.0-8.0, 20 mM cacodylate buffer pH 5.5-8.0 และ 20 mM glycine-HCl buffer pH 8.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตี



รูปที่ 3.17 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อความเสถียรของลีแวนเนส

นำสารละลายลีแวนเนสมาบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60°C ใน 20 mM glycine-HCl buffer pH 8.0 โดยบ่มที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 – 78 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดแอกติวิตี

3.5.5 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของลีแวนเนส

จากการทำปฏิกิริยาโดยใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ (ความเข้มข้น 0.3%) เป็นสับสเตรตแทนลีแวน โดยให้เกิดปฏิกิริยาใน 100 mM cacodylate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที เทียบกับแอคติวิตีที่ใช้ลีแวน 0.3% เป็นสับสเตรตได้ผลดังตารางที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อลีแวนสูง โดยลีแวนเนสไม่สามารถใช้ อินูลิน, แป้งที่สามารถละลายน้ำ (soluble starch), เซลลูโลส, เดกซ์แทรน, พูลูลูแลน, เมลิโบไอส, ราฟฟิโนส, ซูโครส, แลคโตส, มอลโตส, ฟรุคโตส และแมนโนสเป็นสับสเตรตได้ เมื่อใช้กลูโคส และกาแลคโตส เป็นสับสเตรตค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เมื่อเทียบกับใช้ลีแวนเป็นสารตั้งต้นเท่ากับ 3% ในสารทั้งสองชนิด

3.5.6 การศึกษาผลของโลหะหนักและสารเคมีต่อการทำงานของลีแวนเนส

จากการทดลองโดยนำเอนไซม์มาทำการวัดแอคติวิตีใน 100 mM cacodylate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที ในภาวะที่มีโลหะหนักหรือสารเคมีชนิดต่าง ๆ อยู่ด้วย ได้แก่ ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , CoCl_2 , NaCl , KCl , MnCl_2 , MgCl_2 , NH_4Cl , LiCl , HgCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 และ AgNO_3 โดยใช้ความเข้มข้น 10 mM ส่วน CdCl_2 , EDTA, PMSF, IAM, NEM, PCMB, DTT และ β -ME จะใช้ความเข้มข้น 1 mM ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในภาวะที่มี CaCl_2 , NaCl , MgCl_2 และ LiCl จะทำให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอคติวิตีในภาวะที่ไม่มีโลหะหนักหรือสารเคมี และยังพบว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CoCl_2 , MnCl_2 , HgCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , AgNO_3 , CdCl_2 , EDTA, PMSF และ PCMB ทำให้แอคติวิตีลดลงเมื่อเทียบกับแอคติวิตีในภาวะที่ไม่มีโลหะหนักหรือสารเคมี

3.5.7 การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลีแวนด้วยลีแวนเนส

ทำโดยนำลีแวนเนส (80 U) มาย่อย 1% ลีแวนใน 100 mM cacodylate beffer pH 7.0 บ่มที่ 40°C เก็บตัวอย่างที่ เวลา 0, 1, 2, 3, 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาที หลังหยุดปฏิกิริยาแล้ว นำมาตรวจขนาดของผลิตภัณฑ์คาร์โบไฮเดรตที่เกิดขึ้นด้วย thin layer chromatography (TLC) ได้ผลดังรูปที่ 3.18 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นลีแวนโบไอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่งพบเป็นแถบเข้มตั้งแต่ในเวลาบ่มช่วง 1 นาทีแรก

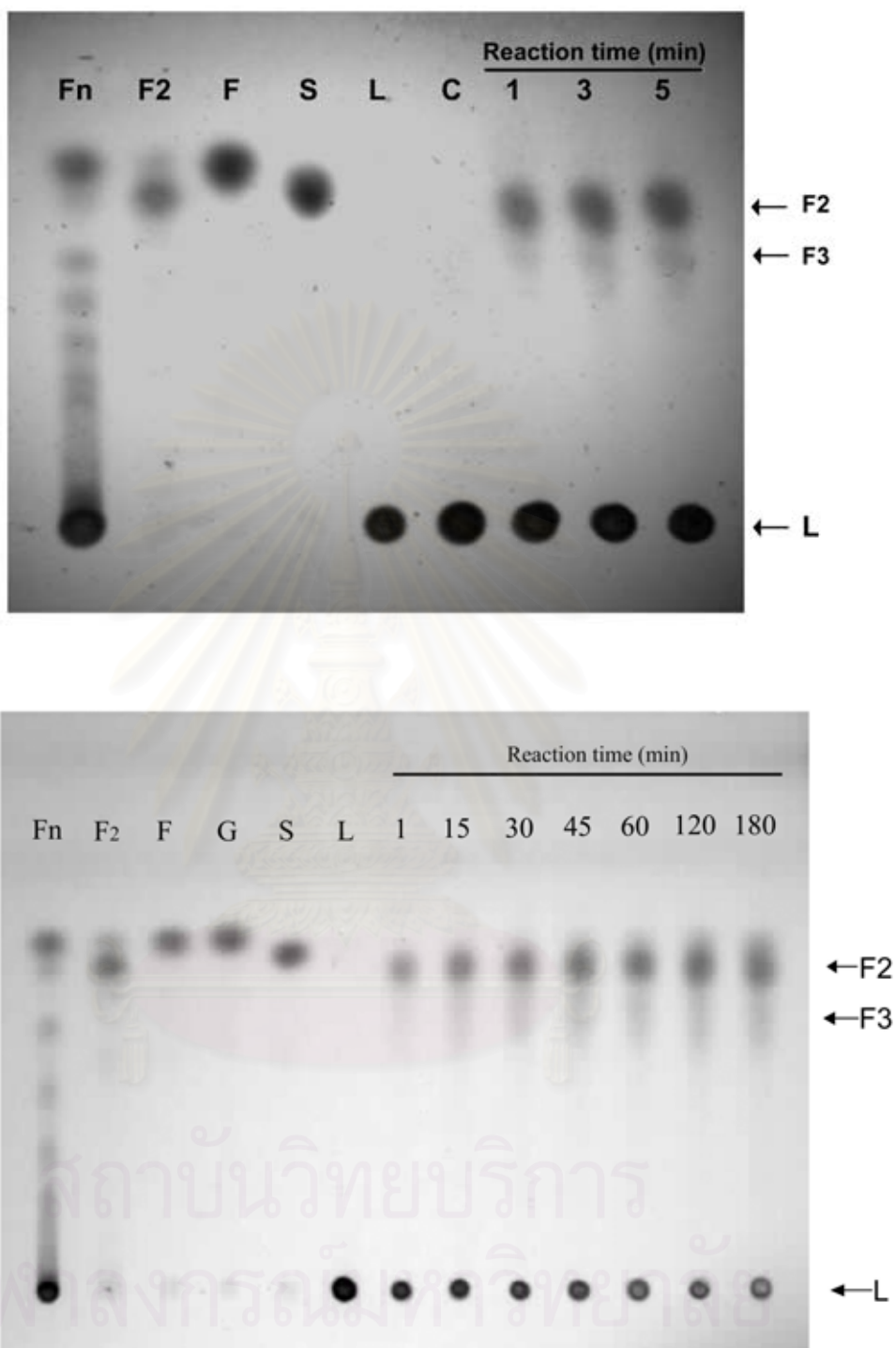
ตารางที่ 3.4 ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสปีชีส์ของลิแวนเนส

สปีชีส์ (0.3%)	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (%)
ลิแวน	100
อินูลิน	0
แป้งที่สามารถละลายน้ำ	0
เซลลูโลส	0
เดกซ์แทรน	0
พุลลูแลน	0
เมลีไบโอส	0
ราฟฟิโนส	0
ซูโครส	0
แลคโตส	0
มอลโตส	0
กลูโคส	3
ฟรุคโตส	0
แมนโนส	0
กาแลคโตส	3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.5 ผลการศึกษาผลของโลหะหนักและสารเคมีต่อการทำงานของลิแวนเนส

โลหะหนักและสารเคมี	ความเข้มข้น (mM)	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (%)
ภาวะควบคุม	-	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	17
CaCl ₂	10	138
CoCl ₂	10	54
NaCl	10	133
KCl	10	88
MnCl ₂	10	0
MgCl ₂	10	129
NH ₄ Cl	10	83
CdCl ₂	1	0
LiCl	10	125
HgCl ₂	10	0
FeSO ₄	10	8
ZnSO ₄	10	0
CuSO ₄	10	0
AgNO ₃	10	0
EDTA	1	38
PMSF	1	50
IAM	1	113
NEM	1	113
PCMB	1	25
DTT	1	96
β-ME	1	92



รูปที่ 3.18 ผลการวิเคราะห์ TLC เพื่อดูขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลิแวนด้วยลิแวนเนสจาก PE2

(Fn : partial hydrolysed levan F : fructose F2 : ลิแวนไบโอส

F3 : ลิแวนไตรโอส G : glucose S : sucrose

L : ปฏิกริยาควบคุมที่มีลิแวนแต่ขาดเอนไซม์

C : ปฏิกริยาควบคุมที่มีลิแวนและเอนไซม์ที่ทำให้เสียสภาพด้วยการต้ม)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันทั้งด้านอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์ได้เห็นความสำคัญของลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์มากขึ้น เนื่องด้วยลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์สามารถนำมาใช้เป็นสารให้ความหวานที่ปราศจากแคลอรี รวมทั้งช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์สุขภาพในลำไส้ และเป็นสารให้ความหวานที่ไม่ก่อให้เกิดฟันผุ (Robertfroid *et al.*, 1993; Tomomatsu, 1994; Oku, 1994; Yun, 1996)

ลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยลิแวนโดยลิแวนเนส ลิแวนเนสส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรีย พบในพืชเป็นส่วนน้อย เท่าที่ผ่านมามียังไม่เคยมีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนเนสได้ในประเทศไทย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนเนสได้จากตัวอย่างดินและน้ำในประเทศไทย

เนื่องจากชูโครสเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตลิแวน ดังนั้นแหล่งที่พบชูโครสมากน่าจะมีโอกาสที่จะพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนได้และก็มีโอกาสที่จะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนเนสด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการคัดกรองเชื้อจากตัวอย่างดินและน้ำจากบริเวณโรงงานน้ำตาลมิตรผล และเก็บดินจากบริเวณรอบ ๆ เตาเคี้ยวน้ำตาลโตนดจังหวัดเพชรบุรี

แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานจะเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเป็นได้ทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน กรณีที่คาร์โบไฮเดรตนั้นเป็นมोनอแซคคาไรด์ แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีการย่อย แต่ถ้าคาร์โบไฮเดรตเป็นสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์หรือพอลิแซคคาไรด์ แบคทีเรียต้องย่อยให้ได้เป็นมोनอแซคคาไรด์เสียก่อนจึงจะสามารถเมตาบอลิซึมได้ แบคทีเรียที่สามารถใช้ลิแวน (พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยฟรุกโตสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า 2,6 (β (2-6) fructosyl-fructose links) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้จะต้องสามารถผลิตลิแวนเนสเพื่อย่อยลิแวนให้มีขนาดเล็กได้เป็น ฟรุกโตส ซึ่งเป็นมोनอแซคคาไรด์ หรือ ลิแวนโอลิโกแซคคาไรด์ที่เชื่อมนั้นใช้ได้ ดังนั้นการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนเนสในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้อาหารประเภท minimum medium ที่มีลิแวนเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก จากการคัดกรองพบว่าแบคทีเรียไฮโซเลตที่มีลิแวนเนสที่สามารถย่อยลิแวนให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอสและ/หรือลิแวนไตรโอส และให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด คือ PE2

จากการจำแนกสายพันธุ์ของไอโซเลต PE2 ด้วยลักษณะสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ API สรุปไว้ว่าเป็น *Micrococcus* sp. เมื่อจำแนกสายพันธุ์โดยใช้การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA สรุปได้ว่าเป็น *Microbacterium* sp. ผลที่ได้จาก 2 วิธีนี้มีความแตกต่างกัน แต่เนื่องด้วยเคยมีรายงานการเปรียบเทียบวิธีจำแนกสายพันธุ์ โดยใช้ลักษณะสมบัติทางชีวเคมีกับโดยใช้การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ซึ่งแสดงไว้ในตารางภาคผนวก ค (Patrick *et al.*, 2003) ผลในตารางแสดงให้เห็นว่าระบบจัดจำแนก API ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ *Microbacterium* หรือ *Micrococcus* เพราะในการจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ระบบ API จะจัดจำแนก *Micrococcus* เป็น *Staphylococcus* แต่การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ระบบ Vitek และโดยใช้การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ระบุเป็น *Micrococcus* และใน *Microbacterium* ระบบ API จะจัดจำแนกเป็น *Aureobacterium* หรือ *Corynebacterium* ทั้งที่การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ระบุเป็น *Microbacterium* และเมื่อดูจากตารางการจัดจำแนกเชื้อของระบบ API (ตารางที่ 3.2) ผลที่ได้คือ ได้ผลบวกในช่องของ maltose และ D-trehalose ซึ่งเมื่อเทียบกับตารางมาตรฐานการจัดจำแนกเชื้อของระบบ API (ภาคผนวก ง) เปอร์เซนต์ผลบวกในช่องของ maltose และ D-trehalose (1%) มีค่าต่ำมากอาจทำให้ผลการจัดจำแนกผิดพลาดได้สูง ดังนั้นไอโซเลต PE2 จึงควรจะเป็น *Microbacterium* sp. มากกว่า

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตดีแวนเนสของไอโซเลต PE2 อยู่ในช่วง pH 7.0 และ อุณหภูมิประมาณ 37-40°C ตามลำดับ ที่ pH 7.0 ไอโซเลต PE2 เจริญได้ดี มีการผลิตดีแวนเนสได้มาก นอกจากนั้นยังพบว่าดีแวนเนสน่าจะมีคุณสมบัติสูง ทั้งนี้เพราะยังคงพบแอกติวิตีของดีแวนเนสสูงอยู่เป็นเวลายาวกว่าที่ pH อื่น ๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของไอโซเลต PE2 และการผลิตดีแวนเนสจะอยู่ในช่วง 37-40°C ในการเลี้ยงเชื้อจะเลือกใช้ที่อุณหภูมิ 40°C ถึงแม้จะพบว่าแอกติวิตีของดีแวนเนสจะลดลงมากหลัง 40 ชั่วโมงก็ตาม เลี้ยงเชื้อโดยใช้เวลาเพียง 12 – 20 ชั่วโมง แอกติวิตีของเอนไซม์ยังคงสูงอยู่นอกจากนั้นการเลี้ยงไอโซเลต PE2 ที่อุณหภูมิ 40°C มีข้อได้เปรียบเพราะมีเชื้อหลายชนิดที่ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้ไม่ดี จึงเป็นการป้องกันการปนเปื้อนได้ดี

การทำดีแวนเนสจากไอโซเลต PE2 ให้บริสุทธิ์บางส่วนจะเริ่มโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเข้มข้น 20 – 50% หลังขั้นตอนนี้เปอร์เซ็นต์ผลิตผล (% yield) ลดลงจาก 100% เหลือเพียง 72% การสูญเสียดีแวนเนสไปในขั้นตอนนี้เกิดจากหลายสาเหตุ โดยพบว่ามีเอนไซม์ส่วนหนึ่งปะปนไปในแฟรกชันข้างเคียง (ประมาณ 13%) อีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจาก pH ที่ลดลงเมื่อเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต อาจมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยอาจทำให้เอนไซม์

เสียสภาพธรรมชาติ (denature) ไปบางส่วน (Cooper, 1997) นอกจากนั้นเราไม่ทราบว่าโปรตีนเอนไซม์อยู่ในเอนไซม์หยาบหรือไม่ ในการทดลองนี้ไม่ได้ใส่ตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีน เช่น EDTA, PMSF และ PCMB ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเมทัลโลโปรตีน อัลคาไลน์โปรตีน และไทออลโปรตีน ตามลำดับ เหตุที่ไม่ได้ใส่ตัวยับยั้งลงไปเพราะมีรายงานว่าสารเคมีเหล่านี้มีผลต่อแอกติวิตีของลีแวนเนส (Lim *et al.*, 1998; Kung *et al.*, 1999)

หลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ดีเอไอโตโยเพิร์ล พบว่าแอกติวิตีรวมของเอนไซม์จะลดลงมาก ทั้งนี้เนื่องจากมีเอนไซม์ส่วนหนึ่งสูญเสียไปในแฟรกชันข้างเคียง นอกจากนี้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนอาจมีผลต่อประจุบนเอนไซม์ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์เสียไปด้วย อย่างไรก็ตามทั้งวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนสามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้มาก

การใช้คอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ลซึ่งแยกโปรตีนโดยอาศัยลักษณะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ที่แตกต่างกันในแต่ละโปรตีน จะต้องมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อบังคับให้โปรตีนแสดงลักษณะไฮโดรโฟบิก ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดไปบางส่วน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์พบว่ามีค่าสูงขึ้นมา เมื่อนำโปรตีนที่ได้จากแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย Native-PAGE พบว่าในชั้นของคอลัมน์บิวทิลโตโยเพิร์ลเหลือโปรตีนเพียง 2 แถบอยู่ใกล้เคียงกัน แต่มีความเข้มต่างกัน

การตรวจสอบว่าแถบโปรตีนที่ได้จากคอลัมน์บิวทิลแถบบน (เข้มกว่า) หรือแถบล่าง (จางกว่า) แถบใดเป็นลีแวนเนส ทำโดยการแยกโปรตีนด้วย Native-PAGE ที่มีลีแวน 1% ผสมอยู่ใน separating gel หลังเสร็จสิ้นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วจึงตัดเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie อีกส่วนย้อมแอกติวิตีด้วยการตรวจน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยลีแวนด้วย 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride ในส่วนที่ย้อมโปรตีนจะพบว่าแถบโปรตีน 2 แถบ มีแถบหนึ่งค้างอยู่ที่ด้านบนของ separating gel และอีกแถบจะอยู่ที่กลางเจล ซึ่งเมื่อเทียบกับส่วนที่ย้อมแอกติวิตี พบว่าแถบบนที่ค้างด้านบน separating gel จะติดสีย้อมแอกติวิตี ซึ่งแสดงว่าเป็นแถบที่เป็นลีแวนเนส สาเหตุที่ทำให้แถบค้างด้านบนของ separating gel น่าจะเกิดจากการที่เอนไซม์นี้สามารถจับกับลีแวนได้ดีจึงไม่เกิดการเคลื่อนที่ ซึ่งจะสนับสนุนว่าแถบบนเป็นแถบของลีแวนเนส จากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ชุดนี้มีแถบโปรตีนเหลือ 2 แถบ และมีแอกติวิตีของลีแวนเนสเพียงหนึ่งแถบ ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์ครั้งนี้เป็นการทำให้บริสุทธิ์ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น

การประมาณหาน้ำหนักโมเลกุลของดีแวนเนสทำได้ 2 วิธี คือ ใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 และ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส ซึ่งได้น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 43,900 ดาลตัน และ 43,800 ดาลตัน ตามลำดับ จากทั้งสองวิธีนี้ได้ขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่าเป็น เอนไซม์ที่ไม่มีหน่วยย่อย (subunit) เหมือนกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เคยมีรายงานมา (Saito *et al.*, 2000)

ดีแวนเนสจากไฮโซเลต PE2 จะมีเสถียรภาพใน pH ช่วงที่เป็นกลางถึงด่าง และมีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 8.0-9.0 ผลของ pH ต่อการทำงานของดีแวนเนส ในการทดลองนี้เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่สูงกว่า 4.0 และต่ำกว่า 10.0 โดยที่ในแต่ละชนิดของบัฟเฟอร์ก็จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งดีแวนเนสจากไฮโซเลต PE2 ทำงานได้แอกติวิตีสูงสุดใน cacodylate buffer ที่ pH 7.0 ซึ่งเชื้อ *Streptomyces sp.* และ *Pseudomonas sp.* ก็ให้แอกติวิตี สูงสุดที่ pH 7.0 เช่นเดียวกัน (Lim *et al.*, 1998; Kung *et al.*, 1999)

ดีแวนเนสจากไฮโซเลต PE2 มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิที่ 30°C นานที่สุด และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเสถียรภาพของเอนไซม์จะลดลง ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของดีแวนเนส ไฮโซเลต PE2 ผลิตดีแวนเนสที่ให้แอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 40°C เช่นเดียวกับ *Streptococcus salivarius*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhodotorula sp.* และ *Pseudomonas sp.* (Takahashi *et al.*, 1983; Murakami *et al.*, 1992; Chaudhary *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 1998; Kung *et al.*, 1999) ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ คือ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลไปเพิ่มพลังงานกระตุ้นทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น และจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิตั้งหนึ่ง แต่ถ้าอุณหภูมิตั้งสูงกว่านั้นจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ ส่งผลให้แอกติวิตีลดลงอย่างรวดเร็ว

ความจำเพาะต่อสับสเตรตของดีแวนเนสที่ได้จากไฮโซเลต PE2 จะมีความจำเพาะต่อดีแวนสูงมาก ไม่สามารถย่อยพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่นได้ เช่น อินูลิน, เซลลูโลส และเดกซ์แทรน เป็นต้น ซึ่งต่างจากดีแวนเนสที่ได้จาก *Rhodotorula sp.* ที่นอกจากสามารถย่อยดีแวนเป็นหลักได้แล้วยังสามารถย่อย อินูลิน และซูโครสได้อีกด้วย ฉะนั้นดีแวนเนสจากไฮโซเลต PE2 มีความจำเพาะในการย่อยพันธะปีตา 2, 6 ของดีแวน

EDTA, PCMB และ PMSF ที่มีความเข้มข้น 1 mM มีผลในการยับยั้งแอกติวิตีของดีแวนเนส และไอออนของผล NH_4^+ , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ ที่ความเข้มข้น 10 mM และ Cd^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 mM มีผลยับยั้งการทำงานของดีแวนเนสเช่นกัน ส่วน Ca^{2+} , Na^+ ,

Mg²⁺ และ Li⁺ ที่มีความเข้มข้น 10 mM มีผลในเชิงกระตุ้นแอกติวิตีของลิแวนเนส จากผลที่ไอออนของโลหะบางชนิดกระตุ้นแอกติวิตี แต่ EDTA มีผลยับยั้งแอกติวิตี จึงคาดว่าลิแวนเนสอาจจะต้องมีโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ ส่วน PMSF มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ จึงคาดว่า serine มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนั้น PCMB, Hg²⁺ และ Cd²⁺ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่ IAM และ NEM ไม่มีผลต่อแอกติวิตี คาดว่า cysteine ไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ แต่ที่ PCMB ยับยั้งน่าจะเป็นผลมาจากเมอคิวริกไอออนในโมเลกุล (Rex *et al.*, 1986; Debashis *et al.*, 1997 และ Faixova and Faix, 2002)

ลิแวนเนสจากไอโซเลต PE2 สามารถย่อยลิแวนดีแวนไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยจะพบลิแวนไบโอสได้ตั้งแต่ช่วงเวลาแรก ๆ ของการบ่ม และเมื่อเวลาที่ใช้บ่มมากขึ้น จะปรากฏลิแวนไตรโอส จากลักษณะการย่อยที่ให้ผลิตภัณฑ์เช่นนี้จะเป็นการย่อยแบบเอกโซลิแวนเนส (exolevanase) ใน *Streptomyces* sp., *Streptomyces exfoliates* และ *Pseudomonas* sp. ก็จะทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอสเช่นกัน (Lim *et al.*, 1998; Kung *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2000)

ลักษณะสมบัติของลิแวนเนสจากไอโซเลต PE2 ซึ่งเป็น *Microbacterium* sp. เมื่อเทียบกับลิแวนเนสจากเชื้อ genus เดียวกัน ได้แก่ *Microbacterium laevaniformans* ATCC15953 สรุปลไว้ในภาคผนวก ข พบว่าลิแวนเนสจากไอโซเลต PE2 มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (pH = 7.0, 40°C) สูงกว่า และมีความเสถียรของเอนไซม์ที่ pH (8.0-9.0) และอุณหภูมิ (50°C) สูงกว่าที่ได้จาก *Microbacterium laevaniformans* ATCC15953 นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลของลิแวนเนสจากไอโซเลต PE2 จะมีขนาดต่ำกว่าลิแวนเนสจาก *Microbacterium laevaniformans* ATCC15953 (Song *et al.*, 2002)

จากงานวิจัยนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลในเชิงโมเลกุลและสามารถผลิตลิแวนเนสที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอสได้มากขึ้น ควรจะมีการทำโคลนนิ่งในขั้นต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวน ซึ่งย่อยลิแวนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนไบโอสและลิแวนไตรโอสได้ และสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *Microbacterium* sp.
2. ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตลิแวนในปริมาณมาก คือ เลี้ยงในอาหาร levan minimum medium ที่ pH 7.0 ในอุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 12-20 ชั่วโมง
3. ขั้นตอนการทำลิแวนเนสจาก *Microbacterium* sp. ให้บริสุทธิ์บางส่วน คือ ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-50% จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ดีเอไอโธโยเพิร์ล และบิวทิลโธโยเพิร์ล ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9 เท่า และมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 16.1% และเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์บิวทิลโธโยเพิร์ลจะให้แถบโปรตีน 2 แถบและแถบแอกติวิตีเพียง 1 แถบ
4. น้ำหนักโมเลกุลของลิแวนเนสจาก *Microbacterium* sp. ที่หาได้โดยใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100 เท่ากับ 43,900 ดาลตัน และที่หาได้โดยใช้เอสดีเอส-พอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เท่ากับ 43,800 ดาลตัน
5. pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของลิแวนเนสคือ pH 7 โดยชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือ cacodylate buffer
6. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของลิแวนเนสคือ ที่ 40°C
7. ลิแวนเนสจะมีเสถียรภาพสูงสุดใน glycine-HCl buffer ที่ pH 8.0-9.0 และ ที่อุณหภูมิ 30°C และเสถียรภาพจะลดลงเรื่อยๆ เมื่ออุณหภูมิที่เข้าปฏิกิริยาสูงขึ้น
8. ลิแวนเนสจาก *Microbacterium* sp. มีความจำเพาะต่อลิแวนสูงมาก โดยไม่สามารถย่อยสับสเตรตชนิดอื่น ๆ ได้

9. ไอออนของโลหะและสารเคมีได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , MnCl_2 , CdCl_2 , HgCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , AgNO_3 , EDTA, PMSF และ PCMB มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ ส่วน CaCl_2 , NaCl , MgCl_2 และ LiCl มีผลกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ และ KCl , NH_4Cl , IAM, NEM, DTT และ β -ME ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์
10. ลีแวนเนสจาก *Microbacterium* sp. สามารถย่อยลีแวนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นลีแวนไบโอส เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และให้ลีแวนไตรโอสเป็นผลิตภัณฑ์รอง โดยมีการทำงานเป็นแบบเอกไซลีแวนเนส



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Barta J. 1993. *Jerusalem artichoke as a multipurpose raw material for food products of high fructose or inulin content. Inulin and inulin containing Crops*. BV: Elsevier Science Publishers.
- Bergeron LJ and Burne RA. 2001. Roles of fructosyltransferase and levanase-sucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism. *Infect. Immun.* 69: 5395-402
- Bezzate S, Steinmetz M and Aymerich S. 1994. Cloning, sequencing and disruption of a levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J. Bacteriol.* 176: 2177-2183.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Calazans GMT, Lima RC, de Franca FP and Lopes CE. 2000. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int. J. Biol. Macromol.* 27: 245.
- Calazans GMT, Lopes CE, Lima RMOC and de Franca FP. 1997. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol. Lett.* 19: 19-21.
- Chaudhary A, Gupta LK, Gupta JK and Banerjee UC. 1996. Purification and properties of levanase from *Rhodotorula* sp. *J. Biotechnol.* 46: 55-61
- Chaudhary A, Gupta LK, Gupta JK and Banerjee UC. 1998. Levanses for control of slime in paper manufacture. *Biotechnol. Adv.* 16: 899-912.
- Debashis B, Ajay KC and Asoke GD. 1997. Effect of cadmium, mercury and copper on partially purified hepatic flavokinase of rat. *Mol. Cell. Biochem.* 167: 73-80.
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M and Bottger EC. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire gene. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 7843-7853.
- Faixova Z and Faix S. 2002. Influence of metal ions on ruminal enzyme activities. *Acta Vet. Brno.* 71: 451-455
- Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L and Roberfroid M. 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41(5): 353-362.
- Guiraud J and Galzy P. 1990. Inulin conversion by yeasts. In Verachtert H, De Mot R. (eds.). *Yeast: biotechnology and biocatalysis*. pp. 255-266. New York: Marcel-Dekker.

- Han YW. 1990. Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol.* 35: 171–194.
- Hendry GAF, Wallace RK. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In Suzuki M, Chatterton NJ. (eds.). *Science and Technology of Fructans*. pp. 119–139. Boca Raton: CRC Press.
- Igarashi T, Takahashi M, Yamamoto A, Etoh Y and Takamori K. 1987. Purification and characterization of levanase from *Actinomyces viscosus* ATCC 19246. *Infect. Immun.* 55: 3001-3005.
- Jun JW. 1996. Fructooligosaccharides occurrence, preparation and application. *Enzyme Microb. Technol.* 19: 107-117.
- Kang EJ, Lee SO, Lee JD and Lee TH. 1999. Purification and characterization of a levanbiose-producing levanase from *Pseudomonas* sp.No.43. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 263-268.
- Kang SK, Lee SO, Lim YS, Jang KL and Lee TH. 1998. Purification and characterization of a novel levanooctaoase-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27: 159-166.
- Kim MG, Seo JW, Song KS, Kim CH, Chung BH and Ki RS. 1998. Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Biotechnol. Lett.* 20: 333–336.
- Kleessen B, Hartmann L and Blaut M. 2001. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.* 86: 291-300.
- Lim YS, Kang SK, Lee SO, Lee JD and Lee TH. 1998. Purification and characterization of a levanase from *Streptomyces* sp. 366L. *J. Biotechnol.* 61: 33-41.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York: Cold Spring Harbor.
- Marx SP, Winkler S and Hartmeier W. 2000. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEBS Lett.* 182: 163-169.
- Menendez C, Hernandez L, Banguela A and Pais J. 2004. Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 446-452.

- Menendez C, Hernandez L, Selman G, Mendoza MF, Hevia P, Sotolongo M and Arrieta JG. 2002. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Curr. Microbiol.* 45: 5-12.
- Miasnikov AN. 1997. Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp. L7. *FEMS Microbiol. Lett.* 154: 23-28.
- Murakami H, Muroi H, Kuramoto T, Tamura Y, Mizutani K, Nakano H and Kitahata S. 1990. Purification and some properties of a levanase from *Streptomyces* sp. No. 7-3. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2247-2255.
- Murakami H, Kuramoto T, Mizutani K, Nakano H and Kitahata S. 1992. Purification and some properties of a new levanase from *Bacillus* sp. No. 71. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 608-613.
- Ogata M, Fujiyama T, Terayama A, Hara H, Mitsuoka T, Hara K, Ishigami H and Fujimori I. 1991. Effects of lactosucrose on human intestinal microflora and putrefactive products. *Abstracts of the 12th Academic Meeting of Nippon Bifidus Bacteria Center.* No. 6.
- Oku T. 1994. Special physiological functions of newly development mono- and oligosaccharides. In Golberg I. (ed.). *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods and Nutraceutical.* pp. 202–218. London: Chapman and Hill.
- Patrick CYW, Kenneth HLN, Susanna KPL, Kam-tong Y, Ami MYF, Kit-wah L, Dorothy MWT, Tak-lun Q and Kwok-yung Y. 2003. Usefulness of the microseq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J. Clin. Microbiol.* 41(5): 1996-2001
- Rex MCD, Daphne CE, William HE and Kenneth MJ. 1986. *Data for Biochemical research.* Oxford, Clarendon press.
- Rhee SK, Song KB, Yoon BD and Kim CH. 2000. Animal feed containing simple polysaccharide. PCT-KR00-01556
- Roberfroid MB, Gibson GR and Delzenne N. 1993. Biochemistry of oligofructose, a non-digestible fructo-oligosaccharide: an approach to estimate its caloric value. *Nutr. Rev.* 51: 137-146.

- Saito K, Kondo K, Kojima I, Yokota A and Tomita F. 2000. Purification and characterization of 2,6- β -D-fructan 6-levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 252–256.
- Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19–23.
- Song EK, Kim H, Sung HK and Cha J. 2002. Cloning and characterization of a levanbiohydrolase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC15953. *Gene.* 291: 45-55.
- Spiegel JE, Rose R, Karabell P, Frankos VH and Schmitt DF. 1994. Safety and benefit of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.* 48: 85-89.
- Takahashi N, Mizuno F and Takamori K. 1983. Isolation and properties of levanase from *Streptococcus salivarius* KTA-19. *Infect. Immun.* 42: 231-236.
- Tomomatsu H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.* 48: 61-65.
- Twomey LN, Pluske JR, Rowe JB, Choct M, Brown W and Pethick DW. 2003. The effects of added fructooligosaccharide (Raftilose[®] P95) and inulinase on faecal quality and digestibility in dogs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108: 83-93.
- Uchiyama T. 1993. Metabolism in microorganisms, Part II. Biosynthesis and degradation of fructans by microbial enzymes other than levansucrase. In M Suzuki, NJ Chatterton. (eds.). *Science and Technology of Fructans.* pp. 169–190. Boca Raton: CRC Press.
- Vandamme EJ, Baets SD and Steinbuchel A. 2002. *Biopolymers, Volume 6, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes.* US: Wiley press.
- Vijn I and Smeekens S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiol.* 120: 351-359.
- Wanker E, Schorgendorfer K and Schwab H. 1991. Expression of the *Bacillus subtilis* levanase gene in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 18: 243-254.
- Yun JW. 1996. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and application. *Enzyme Microb. Technol.* 19(2): 107-117.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

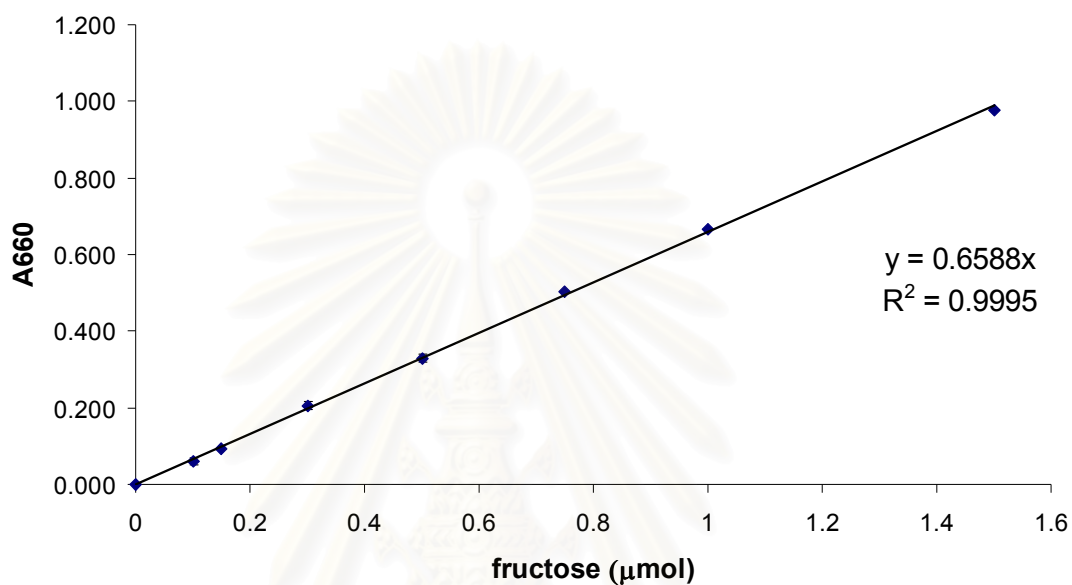
ภาคผนวก ก

การวัดแอกติวิตีของลีแวนเนสด้วยวิธีของ Kang (1998)

10 μ l enzyme + 50 μ l 0.3% levan in 100 mM phosphate buffer, pH7.0↓
บ่มที่ 40°C, 30 min↓
เติม 0.1 ml ของ Somogyi's reagent↓
ต้มในน้ำเดือด 10 นาที↓
ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง↓
เติม 0.1 ml ของ Nelson's reagent↓
ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที↓
ปรับปริมาตรให้เป็น 2.5 ml ด้วยน้ำ↓
วัดค่า Absorbance ที่ 660 nm บันทึกผล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน fructose
(สำหรับการหาน้ำตาลรีดิวซ์ในการวัดแอกติวิตีของสีแวนเนส)



มีค่า slope = 0.6588

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตารางเปรียบเทียบการจดจำแนกจุลินทรีย์ด้วยวิธีต่าง ๆ

Identification by conventional 16S rRNA gene sequencing	Identification by commercially available bacterial identification system				Identification by MicroSeq 500 16S rDNA-based bacterial identification system	
	Vitek		API		Identity	Percentage difference between sequence of isolates and that of identified bacterium in database
	Card used for identification	Identity ^a	Strips for identification	Identity		
<i>Staphylococcus aureus</i>	GPI	95% <i>Staphylococcus simulans</i> , 3% <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	STAPH	87% <i>Staphylococcus aureus</i> , 5% <i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GPI	53% <i>Staphylococcus epidermidis</i> , 27% <i>Staphylococcus capitis</i>	STAPH	99% <i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
<i>Micrococcus luteus</i>	GPI	99.9% <i>Micrococcus</i> sp.	STAPH	99% <i>Staphylococcus auricularis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	0.2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	GPI	Unidentified	20 STREP	77% <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0.6
<i>Streptococcus iniae</i>	GPI	Unidentified	20 STREP	99% <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	GPI	Unidentified	20 STREP	Unidentified	<i>Streptococcus salivarius</i>	0.4
<i>Streptococcus anginosus</i>	GPI	Unidentified	20 STREP	70% <i>Streptococcus intermedius</i> , 30% <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	0
<i>Granulicatella adiacens</i>	GPI	98% <i>Gemella morbillorum</i> or <i>Streptococcus agalactiae</i> or <i>Streptococcus acidominimus</i>	20 STREP	80% <i>Granulicatella adiacens</i> , 16% <i>Gemella morbillorum</i>	<i>Abiotrophia defectiva</i>	9.9
<i>Abiotrophia defectiva</i>	GPI	Unidentified	20 STREP	Unidentified	<i>Abiotrophia defectiva</i>	1.1
<i>Gemella morbillorum</i>	GPI	63% <i>Gemella morbillorum</i> or <i>Streptococcus agalactiae</i> or <i>Streptococcus acidominimus</i> , 22% <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20 STREP	60% <i>Leuconostoc</i> sp., 28% <i>Streptococcus mitis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	0.1
<i>Gemella haemolysans</i>	GPI	68% <i>Gemella morbillorum</i> or <i>Streptococcus agalactiae</i> or <i>Streptococcus acidominimus</i> , 24% <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20 STREP	95% <i>Gemella haemolysans</i> , 6% <i>Gemella morbillorum</i>	<i>Gemella haemolysans</i>	0.6
<i>Helcococcus kunzii</i>	GPI	Unidentified	20 STREP	50% <i>Gemella haemolysans</i> , 30% <i>Gemella morbillorum</i> , 18% <i>Abiotrophia adiacens</i>	<i>Clostridium hastiforme</i>	13.9
<i>Microbacterium</i> sp.	GPI	Unidentified	CORYNE	99% <i>Aureobacterium</i> or <i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	0.8

ภาคผนวก ง

ตารางสำหรับจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยระบบ API STAPH

IDENTIFICATION TABLE

Table 3

% of reactions positive after 24 hrs. at 35-37°C

API STAPH	V4.0	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>		0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>		0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>		0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>		0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>		0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>		0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
<i>Staphylococcus cohnii ssp. cohnii</i>		0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph. cohnii ssp. urealyticum</i>		0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>		0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>		0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>		0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>		0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>		0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>		0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>		0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosus</i>		0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>		0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria varians/rosea</i>		0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
<i>Micrococcus spp</i>		0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91

Sbjct	241	TCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGR	300
Query	333	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAAC	392
Sbjct	301	CTCCTACGGGAGRCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAAC	360
Query	393	GCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAGA	452
Sbjct	361	GCCGCGTGAGGRATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAA	420
Query	453	GTGACGGT-CCTGC-GAAAG-GCGACTCCTTTTTACGTGCCTCCAACCGGGGAATACGT	509
Sbjct	421	GTGMCGTACCTGCAGAAARAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGT	480
Query	510	AGAGCTCTCGCCTCATCCTGAATTATTGGGCGT-AAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGT	568
Sbjct	481	AGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGT	540
Query	569	CTGCTGTGAAAACCTGGAGGCTCAACCTCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTG	628
Sbjct	541	CTGCTGTGAAAATCCGGAGGCTCAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTG	600
Query	629	CGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA	688
Sbjct	601	CGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA	660
Query	689	CCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAG	748
Sbjct	661	CCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAG	720
Query	749	CAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAC TAGTTGTGGGGA	808
Sbjct	721	CAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAC TAGTTGTGGGGT	780
Query	809	CCTTTCCACGGTTTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGAGGAGTACGGC	868
Sbjct	781	CCATTCCACGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGC	840
Query	869	CGCAAGG 875	
Sbjct	841	CGCAAGG 847	



ภาคผนวก ข

ตารางเปรียบเทียบลักษณะสมบัติของดีแวนเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ genus *Microbacterium*

Microorganisms	Molecular weight	Optimum condition		Stability range		Products from levan	Reference
		pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)		
<i>Microbacterium laevaniformans</i> ATCC15953	68,800	6.0	30	5.5-7.0	≤ 45	F, F2, F3	Song <i>et al.</i> (2002)
<i>Microbacterium</i> sp.	43,800	7.0	40	8.0-9.0	≤ 50	F2, F3	This study

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายรัชต โชคชัยชวลิต เกิดเมื่อวันที่ 7 กันยายน พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนราชประชาสมาสัย ฝ่ายมัธยม รัชดาภิเษก ในพระบรมราชูปถัมภ์ สมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เมื่อปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา ในสาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย