บทที่ 1

บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา

ช่วงก่อน ค.ศ. 1970 แหล่งของสารให้ความหวานสำหรับอาหารจะเป็นน้ำตาลจากอ้อยและหัวบีท (beet root) เป็นส่วนมาก นอกจากนี้ยังมีการคิดค้น และสังเคราะห์สารให้ความหวานแทนน้ำตาลแต่ไม่มีคุณค่าทางโภชนาการเช่น ขัณฑสกร (saccharine) เมื่อความต้องการน้ำตาลสูงขึ้นจึงมีการค้นหาแหล่งน้ำตาลใหม่ขึ้นอีกพบว่าฟรักโทสเป็นน้ำตาลธรรมชาติ ซึ่งพบมากในผลไม้หลายชนิด (1) และมีความหวานสูงสุดในกลุ่มน้ำตาลธรรมชาติ โดยมีความหวานเป็น 1.8 เท่าของซูโครส (2) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่ดีทั้งทางกายภาพและทางเคมี คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีความดันออสโมติคสูง สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ดี (3) จึงเป็นที่นิยมใช้มากในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (1) การผลิตฟรักโทสช่วงแรก ๆ ใช้ปฏิกิริยาเคมีในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสในสภาพที่เป็นด่าง (alkaline isomerization) และอุณหภูมิสูง (4)แต่พบว่านอกเหนือจากฟรักโทสแล้วยังได้สารอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกมาด้วยทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงในการขจัดออก ด้วยเหตุนี้จึงไม่นิยมใช้วิธีการทางเคมีในการผลิตฟรักโทสในระดับอุตสาหกรรม ในปี ค.ศ.1957 Marshall และ Kooi (5) ได้ค้นพบฟอสโฟกลูโคสไอ-โซเมอเรส (phosphoglucose isomerase-E.C.5.3.1.9) จาก Pseudomonas hydrophila ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสได้ ต่อมาพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรส(glucose isomerase หรือ D-xylose ketol-isomerase-E.C.5.3.1.5) เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส ซึ่งต่างจากการใช้ปฏิกิริยาทางเคมี เพราะการใช้เอนไซม์จะเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเกิดขึ้นได้ในสภาวะอุณหภูมิไม่สูงนัก ตลอดจนความเป็นกรด-ด่างที่ไม่รุนแรง ระยะเวลาที่ใช้เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสสั้นกว่าและเนื่องจากเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ให้ปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อสับสเตรทจึงลดปัญหาการเกิดสารต่าง ๆ ที่ไม่ต้องการได้ดี ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาจะมีอัตราส่วนของกลูโคสกับฟรักโทส เท่ากับ 1:1 โดยประมาณ(6, 7)

2. แหล่งเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

หลังการการค้นพบการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสโดยฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส(phosphoglucose isomerase-E.C.5.3.1.9) ที่ได้จาก Pseudomonas hydrophila ก็ได้มีการศึกษาถึงเอนไซม์ที่มีสมบัติดังกล่าวมากขึ้น ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์มากกว่า65 ชนิดที่มีเอนไซม์ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส (8) ดังแสดงไว้ในตารางที่1 (1) เอนไซม์ที่พบส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและถูกเก็บไว้ในภายในเซลของจุลินทรีย์(intracellular enzyme)แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดสร้างเอนไซม์นี้และขับออกมานอกเซล(extracellular enzyme) เช่นStreptomyces glaucescens(9) กลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจและศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการใช้เป็นแหล่งผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส คือ Streptomyces sp.

การศึกษาสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces phaeochromogenes เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลส พบว่า เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและเก็บไว้ภายในเซลสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสได้ เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง9.3-9.5 ซึ่งค่อนข้างสูง(6) ต่อมาพบว่าหากเติมอิออนของโคบอลท์ 10^{-3} โมลาร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันนี้จะได้เอนไซม์ซึ่งทำงานที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำลงเหลือ7.5 (6) สำหรับ Streptomyces flavogriseus ที่แยกได้จากดิน เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส(hemicellulose) 1 เปอร์เซนต์ที่ 30 °ช นาน 3 ชั่วโมงจะตรวจพบเอนไซม์ภายในเซล(intracellular enzyme) สูงสุด 3.5 หน่วย/มล. แต่ถ้าเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมงจะตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 หน่วย/มล. สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการเลี้ยงเชื้อ คือ คอร์นสตีพลิเกอร์ (corn steep liquor) นอกจากนี้หากเติมอิออนของแมกนีเซียม แมงกานีส หรือเหล็กลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (10)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

พบว่าปัจจัยหลายชนิดมีผลต่อการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งได้แก่องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบผลผลิตของกลูโคสไอโซเมอเรสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ(1)

จุลินทรีย์	ผลผลิต (หน่วย/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)	อุณหภูมิที่ทดสอบ (องศาเซลเซียส)	พี เอช
Streptomyces sp.	20-1,160	70	7.5
Streptomyces sp. 21114	200	60	7.5
S. phaeochromogenes	24	70	7.2
S. wedmorensis	2,200-6,800	70	7.2
S. olivochromogenes	60	60	7.5
S. olivaceus NRRL-3583	2,560	60	7.8
NRRL-3916	2,960		
S. glaucescens ETH-22794	120-840	70	7.0
S. olivochromogenes			
CPC 3	4,800-11,440		
CPC 4	5,700-9,680	60	7.5
CPC 8	3,600-4,400		
S. flavogriseus	3,500	70	7.0
Streptomyces sp No.36	4,600		
Streptomyces sp No.59	3,900		
Streptomyces sp No.74	4,100		
Streptomyces sp No.93	5,000	65	6.6
Streptomyces sp No.102	4,800		
Streptomyces sp No.103	3,600		
Streptomyces sp No.135	4,200		
Streptomyces sp No.143	3,200		
Arthrobacter sp			
NRRL-B-3724	3,340		
NRRL-B-3726	4,720	60	7.5
NRRL-B-3727	2,220		
NRRL-B-3728	4,400		

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบผลผลิตของกลูโคสไอโซเมอเรสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

จุลินทรีย์	ผลผลิต (หน่วย/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)	อุณหภูมิที่ทดสอบ (องศาเซลเซียส)	พี เอช
Necardia asteroides	400		
N. dassonvillei	400		
Micromonospora coerula	320	70	6.7
Microbispora rosea	160		
Microellobosporo flavea	160		

1 หน่วยเอนไซม์ เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เปลี่ยน 1 ไมโครโมลของกลูโคสไปเป็นฟรักโทสต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

ตารางที่ 2 สภาวะและปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	เกลือแร่	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราการให้อากาศ (ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที)	อัตราการกวน (รอบ/นาที)	ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
Arthrobacter sp. NRRL B 3724	วัสดุที่ประกอบเป็นองค์ประกอบ	ทริปโตน + อีสต์เอกสแทรก + $(NH_4)_2HPO_4$ คอร์นสตีพลิเคอร์	$MgSO_4.7H_2O$ + KH_2PO_4	6.9	30	-	300	64	16
Bacillus coagulans	ไขโลส		K_2HPO_4						
B. Stearothermophilus	ไขโลส + แป้ง	อีสต์เอกสแทรก + $(NH_4)_2SO_4$ คอร์นสตีพลิเคอร์	+ $MgSO_4.7H_2O$ + $MnSO_4.H_2O$ NaCl	7.0	50	1	220	40	17
Corynebacterium candidus	ไขโลส	เปปโตน + อีสต์เอกสแทรก + มีทเอกสแทรก เปปโตน	+ $MgSO_4.7H_2O$ + $CoCl_2.6H_2O$	7.0	55	-	130	72	18
			KH_2PO_4 + $Na_2HPO_4.12H_2O$ + $MgSO_4.7H_2O$	4.5	30	-	-	48	19
Streptomyces wedmorensis ATCC 21178	น้ำข้าวสาลี	คอร์นสตีพลิเคอร์	$CoCl_2.6H_2O$	7.0	30	1		48	1
S. wedmorensis ATCC 21230	น้ำข้าวสาลี	คอร์นสตีพลิเคอร์	$MgSO_4.7H_2O$ + NaCl	7.0	30	0.75	200	20-25	11
Streptomyces sp.1329	ไขโลส	คอร์นสตีพลิเคอร์	$MgSO_4.7H_2O$ + KCl + $CoCl_2.6H_2O$	8.5	30	-		60	12
S. glaucescens NRRL B-2900	กลูโคส + ไขโลส + ซาโปนิน	อีสต์เอกสแทรก	$MgSO_4.7H_2O$ + $CoCl_2.6H_2O$	7.0	30	-	200	46	13
S. olivacus NRRL 3583	ไขโลส + แป้งข้าวโพด	เปปโตน + มีทเอกสแทรก + อีสต์เอกสแทรก	$MgSO_4.7H_2O$ + NaCl	7.0	32	3	400	24	14
Streptomyces sp. 765	ไขโลส	คอร์นสตีพลิเคอร์	$MgSO_4.7H_2O$ + K_2HPO_4	-	30			60	15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 สารแหล่งคาร์บอน

สารแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากกลูโคสไอโซเมอเรส ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและเก็บไว้ภายในเซลของจุลินทรีย์ (10) การผลิตเอนไซม์นี้ควรคำนึงถึงการเจริญของเชื้อควบคู่กันไปด้วย การใช้กลูโคสและแป้งในปริมาณที่สูงเกินไปจะไประงับการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรส (20) ทั้งนี้เพราะกลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยการชักนำโดยมีไซโลสเป็นสารชักนำ (inducer) (9) และยังพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสกับไซโลสคีโตสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไซโลไบโอส(xylobiose) ก็สามารถทำหน้าที่เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ด้วย (21) เนื่องจากไซโลสบริสุทธิ์มีราคาแพง จึงมีผู้ศึกษาปรับปรุงและดัดแปลงองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกมาทดแทนไซโลส Takasaki และคณะ (22) พบว่า Streptomyces albys YT-5 สามารถเจริญและผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ดีเมื่อใช้ไซแลนหรือวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด และเปลือกเมล็ดฝ้าย เป็นสารแหล่งคาร์บอน Chen และคณะ(10) พบว่า Streptomyces flavogriseus สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์นี้ได้เมื่อใช้สารสกัดเฮมิเซลลูโลสของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซึ่งผลของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ต่อการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสโดย Streptomyces flavogriseus แสดงในตารางที่ 3 ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถเจริญและผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้โดยไม่ต้องการไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น Arthrobacter sp. สารแหล่งคาร์บอนที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ กลูโคส โซโลส แมนโนส แลคโตส แมนนิทอล ซอร์บิทอลแป้ง โมแลส ไซแลน และวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

3.2 สารแหล่งไนโตรเจน

สารแหล่งไนโตรเจนจัดว่าเป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งในการเลี้ยงเชื้อ ส่วนมากจะเป็นสารอินทรีย์ เนื่องจากมีปัจจัยสำหรับการเจริญ (growth factor) อยู่ด้วยเช่น เปปโตน ทริปโตน คอร์นสตีพลิเกอร์ ยีสต์เอกซแทรก มีทเอกซแทรก มอลท์เอกซแทรก แสดงในตารางที่ 4 แต่มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่นไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ได้แก่ Aerobacter sp. Escherichia sp. Bacillus sp. และParacolobactrumsp. (23, 24, 25, 26).pa

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย Streptomyces flavogriseus เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (10)

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ปริมาณแหล่งไนโตรเจน(%)	เซล (มก. โปรตีน/มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ)	การทำงานของเอนไซม์ (หน่วย/ มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ)
เฮมิเซลลูโลส	2.0	2.02	3.04
ไซแลน	3.0	1.82	2.89
ไซโลส	1.5	2.24	2.81
ส่วนที่ได้จากการย่อยฟาง			2.76
ด้วยกรดกำมะถัน	1.0	1.38	2.76
ส่วนที่ได้จากการย่อย			
ด้วยไซดาไฟ	2.5	1.00	0.69
ฟางที่บดด้วยวัสดุทรงกลม	1.0	0.36	0.26
ฟางบด (100 เมช)	1.0	0.25	0.22
กาแลคโตส	1.0	0.81	0.67
กลีเซอรอล์	1.0	0.91	0.50
แมนโนส	1.0	1.06	0.41
กลูโคส	1.0	0.65	0.33
อราบิโนส	1.0	0.50	0.33

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย Streptomyces flarogriseus เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (10)

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ปริมาณแหล่งไนโตรเจน(%)	เซล (มก. โปรตีน/ มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ)	การทำงานของเอนไซม์ (หน่วย/ มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ)
คอร์นสตีพลิเกอร์	1.0	0.80	0.92
	1.5	0.96	1.76
	2.0	1.42	2.48
	2.5	1.42	2.89
	3.0	1.55	2.63
	4.0	1.48	2.52
ยีสต์เอกซแทรก	1.0	1.32	2.00
โพลีเปปโตน	1.0	1.35	1.85
โปรติโอส เปปโตน	1.0	1.06	1.85
เปปโตน	1.0	1.01	1.80
ทริปโตน	1.0	1.62	1.76
คาสิโตน	1.0	0.96	1.44
มีทเอกซแทรก	1.0	1.00	0.78
ยูเรีย	1.0	0.39	0.26

3.3 สารแหล่งเกลือแร่

อิออนของโลหะในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกันไปเช่น Streptomyces sp. YT No.5 ต้องการอิออนของโคบอลท์ในรูปของโคบอลท์คลอไรด์ 3 X 10^{-3} โมลาร์ (0.038 เปอร์เซนต์) เพื่อให้ได้การทำงานของเอนไซม์สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 5 (7)

Chou และคณะ (27) พบว่า Streptomyces sp. ที่แยกได้นอกจากไม่ต้องการอนุมูลโคบอลท์แล้ว อิออนของโลหะดังกล่าวไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ ส่วน Streptomyces flavogriseus ไม่ต้องการอิออนของโคบอลท์หากอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิออนของโลหะแมกนีเซียมและแมงกานีสอยู่ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 6 การหลีกเลี่ยงการใช้อนุมูลโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยลดมลภาวะลงได้(1) สารแหล่งเกลือแร่ชนิดอื่นที่นิยมใช้คือ เฟอรัสซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์

3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสแปรผันค่อนข้างกว้างตั้งแต่ 4.5-8.5 ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อดังแสดงในตารางที่2 Chen และคณะ(10) พบว่า Streptomyces flavogriseus สามารถเจริญและผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ดีที่ค่าควาเป็นกรด-ด่าง 6.0-8.5 ได้มวลของเซลสูงสุด 1.25 มก. โปรตีน/มล. หลังจากเลี้ยงเชื้อ 48 ชม. และได้เอนไซม์สูงสุด 2.78 หน่วย/มล. ภายหลังจากการเลี้ยงจุลินทรีย์พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารมีค่าประมาณ 8.0 แต่มีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกรด ได้แก่ Corynebacterium candidus (19)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส แต่มีจุลินทรีย์บางชนิดที่เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิสูง เช่น Bacillus sp. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส (18) ส่วนสภาวะอื่น ๆ เช่นอัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และอาหารที่ใช้เลี้ยง การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสสูงสุด จะอยู่ในช่วงระยะเวลา 24-72 ชม.ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย Streptomyces sp. YT-ND5 (7)

โคบอลท์คลอไรด์หกน้ำ ($CoCl_2 6H_2O$) (โมลาร์)	การทำงานของเอนไซม์ (หน่วย/มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ)
0	12.60
5×10^{-4}	15.60
1×10^{-3}	19.80
2×10^{-3}	18.66
3×10^{-3}	20.80
4×10^{-3}	10.14

ตารางที่ 6 ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย Streptomyces flarogriseus เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (10)

ชนิดของแหล่งเกลือแร่	ปริมาณแหล่งเกลือแร่(%)	เซลล์ (มก. โปรตีน / มล.)	การทำงานของเอนไซม์ (หน่วย / มล.)
แมงกานีสซัลเฟต	0.01	1.37	2.33
	0.03	1.42	2.74
	0.10	1.32	2.67
แมกเนเซียมซัลเฟต	0.03	1.48	1.81
	0.10	1.42	2.74
	0.50	1.42	2.48
โคบอลท์คลอไรด์	0.01	1.34	1.26
	0.03	1.43	1.72
	0.10	0	0
เฟอร์รัสซัลเฟต	0.01	1.32	2.74
ซิงค์ซัลเฟต	0.01	1.03	2.33
แคลเซียมคลอไรด์	0.01	1.45	1.85
เฟอร์ริกซัลเฟต	0.01	1.42	1.76
โซเดียมคลอไรด์	0.01	1.42	1.24
แบเรียมคลอไรด์	0.01	1.48	1.24
นิเกิลซัลเฟต	0.01	1.29	1.11
โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนส	0.01	0.71	0.74

ตารางที่ 6 ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดย Streptomyces flarogriseus เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ต่อ)

ชนิดของแหล่งเกลือแร่	ปริมาณแหล่งเกลือแร่(%)	เซล (มก. โปรตีน / มล.)	การทำงานของเอนไซม์ (หน่วย / มล.)
แมงกานีสซัลเฟต + แมกเนเซียมซัลเฟต	0.03 + 0.01	1.48	1.89
แมกเนเซียมซัลเฟต + โคบอลท์ คลอไรด์	0.01 + 0.01	1.22	1.43
แมงกานีสซัลเฟต + โคบอลท์คลอไรด์	0.03 + 0.03	1.35	1.08

4. การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในระดับอุตสาหกรรม

ปัจจุบันมีการนำกลูโคสไอโซเมอเรสมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารให้ความหวานค่อนข้างสูง และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ มีบริษัทที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและใช้เอนไซม์นี้อยู่หลายบริษัทได้แก่ คลินตันคอร์นโพรเซสซิง (Clinton Corn Processing) จิสต์ โบรเคดส์(Gist Brocades) โนโวอินดัสตรี (NOVO Industry) ไมลส์ แล็บส์ (Miles Labs, Inc.)(28) 1 ได้มีการศึกษาศึกษาค้นคว้าการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในระดับอุตสาหกรรมมาเป็นเวลานาน Buck (1) ได้ศึกษาและรวบรวมสรุปถึงปัญหาต่าง ๆ ไว้ดังนี้

4.1 วิธีการปรับปรุงเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์หรือการลดต้นทุนการผลิต

4.2 การลดหรือทดแทนการใช้น้ำตาลไซโลสในกระบวนการหมักโดยใช้สารอาหารชนิดอื่น ๆ ที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายกว่า

4.3 การสร้างจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่ไม่ต้องการปัจจัยร่วมในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส เช่น โคบอลท์อิออน เพราะปริมาณโคบอลท์อิออนที่สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

4.4 การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อสารแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

สำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างกลูโคสไอโซ-เมอเรสนั้นเป็นปัญหาสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม ทำให้นักวิทยาศาสตร์ต้องทำการศึกษาค้นคว้าหาจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง Demnerova และคณะ (29) ได้ทดลองเปรียบเทียบเชื้อ Streptomyces sp.11 กับ Streptomyces phacochromogenes พบว่า Streptomyces nigriticans3014 สามารถให้ผลผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสสูงกว่าสายพันธุ์อ้างอิง ถึง 80 เปอร์เซนต์และทำการกลายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้นี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อไป Bengston และ Lamm (30)รายงานถึงการทำให้ Streptomyces ATCC 21175 กลายพันธุ์โดยใช้เอทธิลลีนอิมีน ทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เพิ่มจากเดิม 62 เปอร์เซนต์

ส่วนการปรับปรุงสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโจนเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มการเจริญและผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดจะต้องการสารแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2

Lai (31) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ สำหรับเชื้อ Streptomyces s41-10 เมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลจากการย่อยของชานอ้อย พบว่าการใช้ถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ร่วมกับยีสต์เอชแทรกจะให้ผลดีที่สุด

Bok (32) ทำการคัดแยกเชื้อ Streptomyces sp. 260 จากดินของพื้นที่การเกษตร มาทดสอบการผลิตกลูโคสไอโซเมอรส พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญ ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลส

Han (33) ทดลองใช้เฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากชานอ้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5-10 เปอร์เซนต์ ในการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces flavogriseus เพื่อผลิตไซแลนเนส และกลูโคสไอโซเมอเรส พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสหรือไซแลน

Chen (34) ศึกษาการสกัดเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และเส้นใยจากต้นอ้อย โดยนำมาสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดลองใช้เลี้ยงเชื้อ Streptomyces flavogriseus พบว่าเชื้อเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากฟางข้าว

Stoichew และคณะ (35) ศึกษาการใช้วัตถุดิบชนิดต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ได้แก่ น้ำตาลไซโลส ไซแลนจากต้นยาสูบ รำข้าวสาลีที่ถูกย่อยสลายบางส่วน ฟางข้าวและเปลือกข้าวโพดบดละเอียด รำข้าวและฟางข้าวที่ถูกย่อยสลายด้วยกรด จากการทดลองพบว่า เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีทั้งน้ำตาลไซโลสและไซแลน

Younas และคณะ (36) ศึกษาการเจริญและสร้างเอนไซม์ของ Streptomyces albus WRL-7 ในระดับขวดเขย่า พบว่าวัตถุดิบที่มีน้ำตาลไซโลสและไซแลนเป็นองค์ประกอบ จัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด

Dworschach และคณะ (37) ทดลองใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งจากต้นข้าวโพดด้วยกรด เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย Streptomyces sp. ในถังหมัก พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูง

Takasaki (38) ทดลองเปรียบเทียบการเจริญและผลิตเอนไซม์ของ Streptomyces albus YT-4 (FERM-P-462) ในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสหรือไซลูโลสเป็นองค์ประกอบ พบว่า การเติมน้ำตาลไซโลส 0.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งได้จากการย่อยสลายเปลือกเมล็ดฝ้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1 เท่าของเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมไซโลส

5. เหตุจูงใจในการทำวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรเป็นปริมาณมากซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังมีผลผลิตจำพวกแป้ง เช่น แป้งมันสำปะหลังซึ่งสามารถผลิตได้ปีละมาก ๆ และมีราคาถูก (39) ในปัจจุบันได้มีการผลิตกลูโคสไซรัปจากแป้งมันสำปะหลัง และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภทเช่น ขนมหวาน ลูกกวาด เครื่องดื่ม อาหากระป๋อง ฯลฯ (1)

การเปลี่ยนกลูโคสไซรัปไปเป็นฟรักโทสไซรัป ซึ่งมีข้อดีกว่ากลูโคสไซรัปหลายประการดังได้กล่าวมาแล้ว เท่ากับเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์แป้งมันสำปะหลัง ช่วยพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศอีกทางหนึ่ง ประเทศไทยเรามีปัจจัยที่เหมาะสมหลายประการสำหรับการผลิตฟรักโทสไซรัปในระดับอุตสาหกรรมได้แก่ แหล่งวัตถุดิบมากมายและมีราคาต้นทุนต่ำ ค่าจ้างแรงงานถูกกว่าหลาย ๆ ประเทศที่มีการผลิตฟรักโทสไซรัปอยู่แล้วในแถบเอเชียด้วยกัน เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526 เป็นต้นมาคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้มีการวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดยทำการแยกและคัดเลือกจากตัวอย่างดินในประเทศไทยจนได้ Streptomyces sp. 190-1 ที่สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ในปริมาณสูง (40) ปี พ.ศ. 2528 ขจีนาฏ จรรยาอุดม (41) ศึกษาวิธีสกัดแยกทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์จาก Streptomyces sp. 190-1 ที่คัดเลือกได้ต่อมาปี พ.ศ. 2529 ศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) ได้ศึกษาการผลิตกูโคสไอโซเมอเรสในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในประเทศเป็นส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจเมื่อเปรียบเทียบกับของต่างประเทศ แม้ว่าผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในถังหมักจะให้ปริมาณเอนไซม์ค่อนข้างสูง แต่การเจริญของเซลค่อนข้างต่ำ โดยมีปริมาณเซลสูงสุดประมาณ 4 กรัม น.น. เซลแห้ง/ลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิตเซลของจุลินทรีย์เทียบกับปริมาณสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (Yield Cell Mass/Gram Substrae) มีค่าประมาณ 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก : น้ำหนัก) ซึ่งการเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปอัตราการผลิตเซลเทียบกับปริมาณสารอาหารที่ใช้ควรได้ประมาณ 20-50 เปอร์เซนต์ (43) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังการหมักเลี้ยงเชื้อในรายงานข้างต้น (42) ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อยังมีปริมาณสารอาหารเหลือใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างสูง โดยเฉพาะโปรตีนซึ่งจะกลายเป็นของเสียทำให้เกิดมลภาวะ ดังนั้นถ้านำองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปใช้ในระดับขยายส่วนจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียเพิ่มขึ้นเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะปรับ-

ปรุงองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มมวลของเซลและลดปริมาณสารอาหารเหลือทิ้งในอาหารเลี้ยงให้น้อยที่สุดและยังคงให้จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. 190-1(42)

สารอาหาร	ก่อนหมัก (กรัม/ลิตร)	หลังหมัก (กรัม/ลิตร)
โปรตีน	8	5
น้ำตาลรีดิวส์	18	3.8

6. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

6.1 ศึกษาสารแหล่งอาหารและปริมาณที่เหมาะสมสำหรับผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย Streptomyces sp. 190-1 ในระดับขวดเขย่า

6.2 ศึกษาปัจจัยบางอย่างที่สัมพันธ์กับการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในถังหมักขนาด 5 ลิตร

6.3 การเก็บข้อมูลจากตัวอย่างในถังหมัก เช่น น้ำหนักเซลแห้ง เอนไซม์แอคติวิตี พีเอช ของแข็งที่ละลายน้ำ น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลรีดิวส์ และโปรตีน ระหว่างการหมัก

6.4 วิเคราะห์ข้อมูลจากข้อ 6.3 เพื่อศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ