



ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะการเจริญและการสังเคราะห์ CD ของ Bacillus สายพันธุ์ต่าง ๆ

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR 57 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อบาซิลลัสทุกสายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I pH 7.2 และ จะเจริญเข้าสู่ระยะสูงสุด (stationary phase) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา ประมาณ 14 - 24 ชั่วโมง เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase พบว่า เชื้อบาซิลลัส 44 สายพันธุ์มี dextrinizing activity แต่ในจำนวนนี้ มีเพียง 14 สายพันธุ์ที่ทำให้ตะกอนขุนขาว (TCE precipitate) จากการตรวจวัดด้วยวิธี CD-TCE assay จึงอาจแบ่งบาซิลลัสสายพันธุ์ต่าง ๆ ออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 6) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่มี dextrinizing activity และตะกอนขุนขาว 13 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 2 มี dextrinizing activity อย่างเดียว 30 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 3 มี dextrinizing activity และตะกอนขุนขาว 14 สายพันธุ์

งานวิจัยนี้ยังได้ตรวจวัดการผลิต CD ของ Bacillus A11 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ นำมาจากประเทศญี่ปุ่น และเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากดินในแถบเอเชียอาคเนย์ และมีรายงานว่า ว่ามีแอกติวิตีของ CGTase สูง (Pongsawasdi และ Yakisawa , 1988) พบว่า Bacillus A11 เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งนานกว่าบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR Bacillus A11 จะผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงในระยะนี้ และแอกติวิตีของเอนไซม์ไม่ลดลงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 - 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 ลักษณะการเจริญและการสังเคราะห์ CD ของบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR และ *Bacillus* A11 แยกกลุ่มตาม dextrinizing activity และการเกิดตะกอนขุนขาว

กลุ่มที่	TISTR No.	<i>Bacillus</i> spp.	การเจริญ		dextrinizing activity (unit/ml/min)	CD-TCE activity (dilution limit)
			A ₂₈₀	เวลาเจริญสูงสุด (ชั่วโมง)		
1	2	<i>B. lateroporus</i>	1.78	18	-	-
	3	<i>B. megaterium</i>	1.96	24	-	-
	18	<i>B. licheniformis</i>	1.76	24	-	-
	19	<i>B. licheniformis</i>	1.82	24	-	-
	20	<i>B. licheniformis</i>	1.78	24	-	-
	28	<i>B. subtilis</i>	1.76	24	-	-
	37	<i>B. sp.</i>	1.98	18	-	-
	61	<i>B. cereus</i>	1.82	24	-	-
	67	<i>B. pumilus</i>	1.92	24	-	-
	124	<i>B. megaterium</i>	1.84	18	-	-
	329	<i>B. laterosporus</i>	1.92	24	-	-
	480	<i>B. stearothermophilus</i>	1.82	18	-	-
	528	<i>B. thuringiensis</i>	1.84	24	-	-

กลุ่มที่	TISTR No.	Bacillus spp.	การเจริญ		dextrinizing activity (unit/ml/min)	CD-TCE activity (dilution limit)
			A ₂₈₀	เวลาเจริญสูงสุด (ชั่วโมง)		
2	4	<u>B. sp.</u>	1.95	18	16.86	-
	13	<u>B. licheniformis</u>	2.06	24	55.56	-
	14	<u>B. licheniformis</u>	1.95	16	36.67	-
	15	<u>B. licheniformis</u>	1.78	14	27.55	-
	16	<u>B. licheniformis</u>	1.82	14	37.22	-
	17	<u>B. licheniformis</u>	2.04	14	9.21	-
	25	<u>B. licheniformis</u>	1.86	24	41.04	-
	121	<u>B. subtilis</u>	2.14	18	2.41	-
	123	<u>B. coagul</u>	2.02	24	5.97	-
	352	<u>B. sp.</u>	1.78	18	328.57	-
	479	<u>B. coagulans</u>	2.01	24	7.83	-
	481	<u>B. thuringiensis</u>	1.72	24	14.32	-
	482	<u>B. thuringiensis</u>	1.60	24	8.41	-
	483	<u>B. thuringiensis</u>	1.92	24	6.34	-
	484	<u>B. thuringiensis</u>	1.28	24	1.11	-
	485	<u>B. thuringiensis</u>	1.56	24	6.10	-
	487	<u>B. thuringiensis</u>	1.95	24	13.18	-
	488	<u>B. thuringiensis</u>	1.40	24	4.25	-
	489	<u>B. thuringiensis</u>	1.88	18	13.92	-
	490	<u>B. thuringiensis</u>	1.60	24	7.59	-

กลุ่มที่	TISTR No.	<u>Bacillus</u> spp.	การเจริญ		dextrinizing	CD-TCE activity (dilution limit)
			A ₂₈₀	เวลาเจริญสูงสุด (ชั่วโมง)	activity (unit/ml/min)	
2(ต่อ)	491	<u>B. thuringiensis</u>	1.42	24	1.50	-
	492	<u>B. thuringiensis</u>	1.94	24	5.30	-
	493	<u>B. thuringiensis</u>	1.72	24	11.73	-
	495	<u>B. thuringiensis</u>	1.54	24	13.04	-
	498	<u>B. thuringiensis</u>	1.96	18	4.97	-
	500	<u>B. thuringiensis</u>	1.82	24	8.71	-
	502	<u>B. thuringiensis</u>	1.80	24	8.88	-
	503	<u>B. thuringiensis</u>	1.89	24	15.23	-
	504	<u>B. thuringiensis</u>	1.82	24	4.34	-
	505	<u>B. thuringiensis</u>	1.92	24	4.31	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

กลุ่มที่	TISTR No.	<u>Bacillus</u> spp.	การเจริญ		dextrinizing	CD-TCE activity (dilution limit)
			A ₂₈₀	เวลาเจริญสูงสุด (ชั่วโมง)	activity (unit/ml/min)	
3	5	<u>B. licheniformis</u>	1.98	18	0.55	1 : 2
	22	<u>B. licheniformis</u>	1.39	24	20.61	1 : 2
	35	<u>B. cereus</u>	2.25	24	6.15	1 : 2
	36	<u>B. cereus</u>	2.24	24	6.89	1 : 2
	122	<u>B. sp.</u>	1.80	24	0.97	1 : 2
	126	<u>B. thuringiensis</u>	1.82	20	14.17	1 : 2
	127	<u>B. thuringiensis</u>	2.20	20	4.83	1 : 2
	128	<u>B. thuringiensis</u>	2.78	18	13.63	1 : 2
	486	<u>B. thuringiensis</u>	1.82	18	4.17	1 : 2
	494	<u>B. thuringiensis</u>	1.70	24	1.72	1 : 2
	496	<u>B. thuringiensis</u>	1.84	24	3.79	1 : 2
	497	<u>B. thuringiensis</u>	1.72	18	12.73	1 : 2
	499	<u>B. thuringiensis</u>	1.94	18	4.90	1 : 2
	501	<u>B. thuringiensis</u>	1.86	24	2.67	1 : 2
<u>Bacillus All</u>			1.74	46	21.42	1 : 2

อนึ่ง สังเกตได้ว่าตะกอนขุนขาวใน TCE ของบาซิลลัสกลุ่มที่ 3 มีลักษณะแตกต่างจากตะกอนที่เกิดจาก Bacillus A11 กล่าวคือ ตะกอนที่เกิดจากบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR ทั้ง 14 สายพันธุ์มีลักษณะละเอียด ไม่เป็นผลึก มีสีขาวบนเหลืองเล็กน้อย ส่วนตะกอนจาก Bacillus A11 มีลักษณะหยาบ และละลายน้ำได้ดีกว่าตะกอนจากสายพันธุ์ TISTR ตกผลึกเป็นสีขาวใส เมื่อนำตะกอนที่เกิดใน TCE จากแบคทีเรียทั้ง 15 สายพันธุ์นั้นมาวิเคราะห์หา CD โดยวิธี TLC และวิธี HPLC ได้ผลการทดลองดังนี้

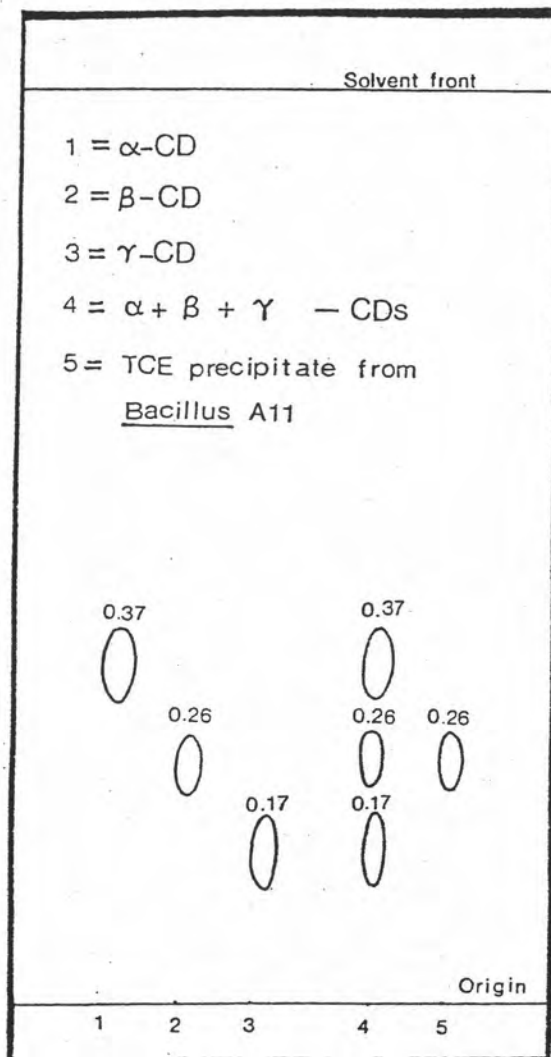
4.1.1 การวิเคราะห์ CD โดยวิธี TLC

ผลการวิเคราะห์ตะกอนขุนขาวใน TCE ด้วยวิธี TLC (ข้อ 3.4.1) พบว่า ตะกอนขุนขาวจากบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR ทั้ง 14 สายพันธุ์ ไม่ใช่ตะกอน CD เนื่องจากไม่ปรากฏจุดใด ๆ บนแผ่น TLC เมื่อพ่นด้วยสารละลาย methanolic iodine 1 % ส่วนตะกอนที่เกิดจาก Bacillus A11 จะให้จุดสีเหลืองกับสารละลาย methanolic iodine และมีค่า $R_f = 0.26$ ซึ่งตรงกับสีและค่า R_f ของ β -CD มาตรฐาน (R_f ของ α -, β - และ γ -CD มาตรฐาน เท่ากับ 0.37, 0.26 และ 0.17 ตามลำดับ (รูปที่ 3))

4.1.2 การวิเคราะห์ CD โดยวิธี HPLC

เมื่อวิเคราะห์ตะกอนใน TCE ด้วยวิธี HPLC (ข้อ 3.4.2) พบว่า ตะกอนขาวจาก Bacillus A11 จะให้พีค (peak) เดียว ซึ่งตรงกับ peak ของ β -CD มาตรฐาน (รูปที่ 4) ส่วนตะกอนขาวจากบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR อีก 14 สายพันธุ์ จะให้ peak ของกลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส แต่ไม่มี peak ของ CD ทั้ง 3 ชนิด แสดงว่าตะกอนขุนขาวดังกล่าวไม่ใช่ CD แต่เป็นตะกอนน้ำตาลกลูโคสหรือ oligosaccharides ขนาดเล็ก ๆ

การศึกษาข้างต้นนี้ แสดงว่า Bacillus A11 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ที่ให้ผลิตภัณฑ์ β -CD ปริมาณมาก ดังนั้นจึงเลือก Bacillus A11 ในการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ CGTase รวมทั้งการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย



รูปที่ 3 ลักษณะ โครมาโตแกรมของสาร CD จาก Bacillus A11 เปรียบเทียบกับ สารไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน ชนิด α -, β -และ γ - โดยวิธี TLC (ข้อ 3.4.1) ระบบตัวทำละลายผสม , n-butyl alcohol : ethyl alcohol : water = 4:3:3 (v/v) (ตัวเลขเหนือจุดเป็นค่า Rf)

รูปที่ 4 ลักษณะของโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ CD จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

(ข้อ 3.4.2) โดยใช้คอลัมน์ Supelco - NH₂ ตัวทำละลายผสม

Acetonitrile : water = 67:33 (v/v) อัตราเร็ว 1 มล./นาที

รูปที่ 4 ก สารละลายผสม CD มาตรฐานชนิด α -, β - และ γ -

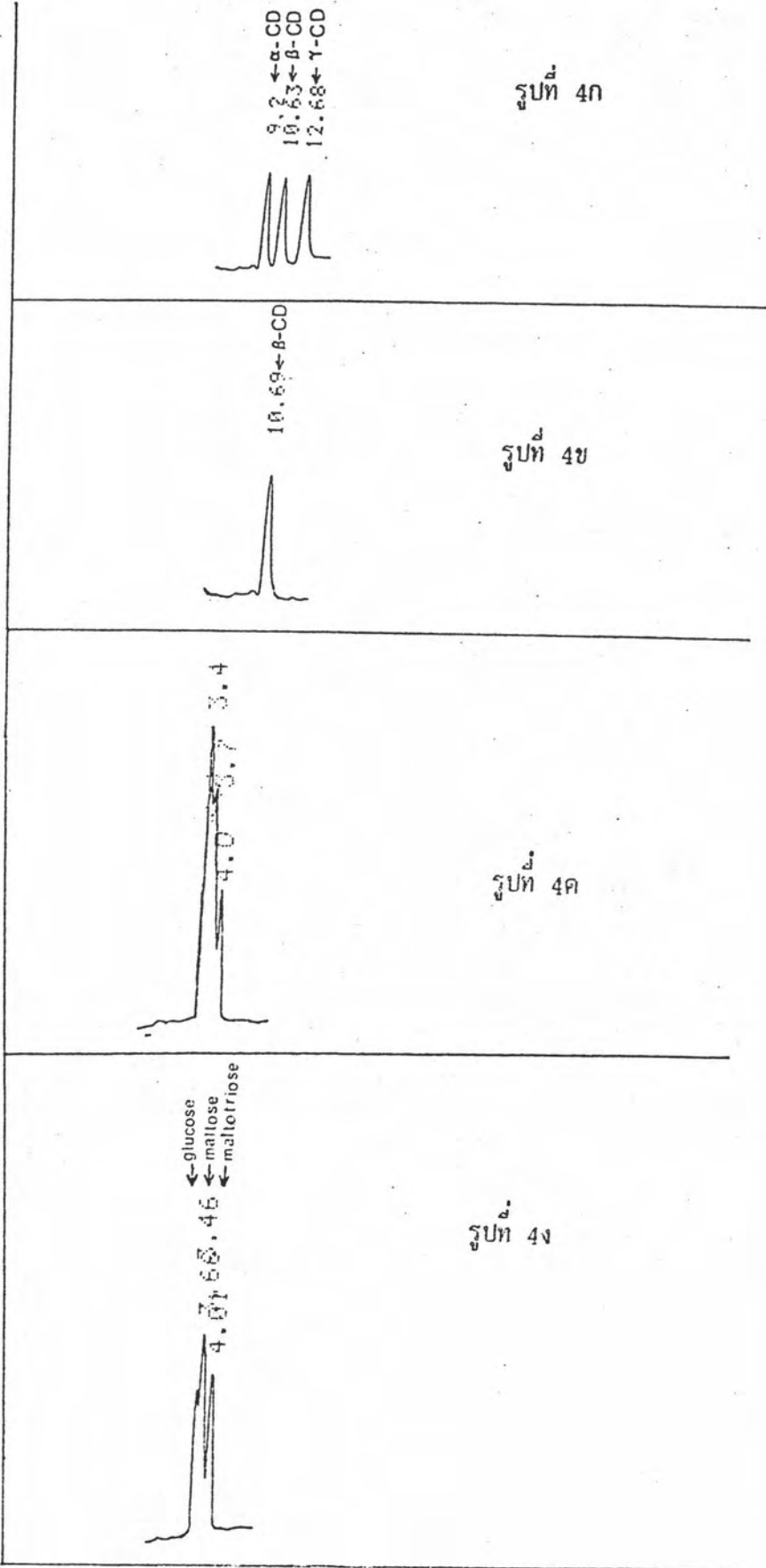
(ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร , 10 μ l)

รูปที่ 4 ข ตะกอนขุนขาวที่ได้จาก Bacillus A11 (10 μ l)

รูปที่ 4 ค ตะกอนที่ได้จาก TISTR 22 (10 μ l)

รูปที่ 4 ง สารละลายผสมของกลูโคส มอลโตสและมอลโตไตรโอสมาตรฐาน

(ความเข้มข้นอย่างละ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร , 10 μ l)

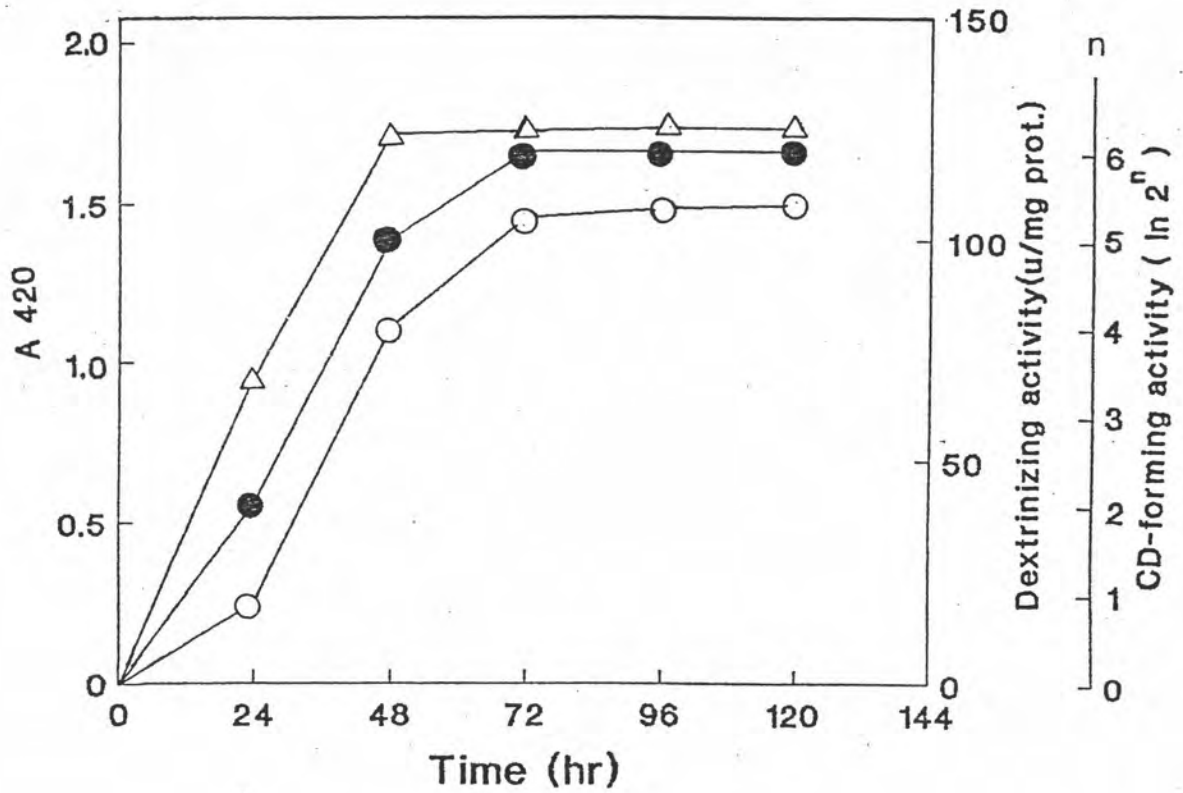


4.2 การเพาะเลี้ยงและลักษณะการเจริญของ Bacillus A11

ได้ทำการศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus A11 เพื่อที่จะหาภาวะที่แบคทีเรีย จะมีแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase สูงสุด โดยเพาะเลี้ยง Bacillus A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I (ข้อ 3.1.1.1) หรือ medium II (ข้อ 3.1.1.2) pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดความขุ่นที่เวลาต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า Bacillus A11 สามารถเจริญเข้าสู่ระยะสูงสุด (stationary phase) ใน medium I เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง และมี dextrinizing activity สูงสุดเมื่อเวลาประมาณ 72 - 120 ชั่วโมง ที่ทำการทดลอง ซึ่งตรงกับระยะปลายของการเจริญสูงสุด (late stationary phase) (รูปที่ 5) ส่วนใน medium II พบว่า Bacillus A11 มีแอกติวิตีสูงสุดเมื่อเวลาประมาณ 72-120 ชั่วโมง (รูปที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ CGTase พบว่า Bacillus A11 ผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II ได้ปริมาณสูงกว่าใน medium I โดยมีค่า CD-Forming activity เป็น 2⁷ ใน medium II และ 2⁶ ใน Medium I ในการทดลองต่อ ๆ ไป จึงเพาะเลี้ยง Bacillus A11 ใน medium II

4.3 ผลการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง Bacillus A11 เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูง

ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ Bacillus A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II ที่มีค่าความเป็นกรด - ด่างอยู่ในช่วง 6 - 10 ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42° ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตรที่เวลาต่างๆไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ พบว่า Bacillus A11 มี dextrinizing activity สูงในช่วง pH 8 - 9 อุณหภูมิ 37° ซ (รูป 7 ก) ส่วนที่ pH 6 หรือ pH > 9 จะมีแอกติวิตีต่ำไม่ว่าจะบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ, 37°ซ หรือ 42°ซ ผลจากรูปที่ 7 ข แสดงให้เห็นว่า Bacillus A11 มี CD-forming activity สูงในช่วง pH 7 - 10 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ และ 37°ซ



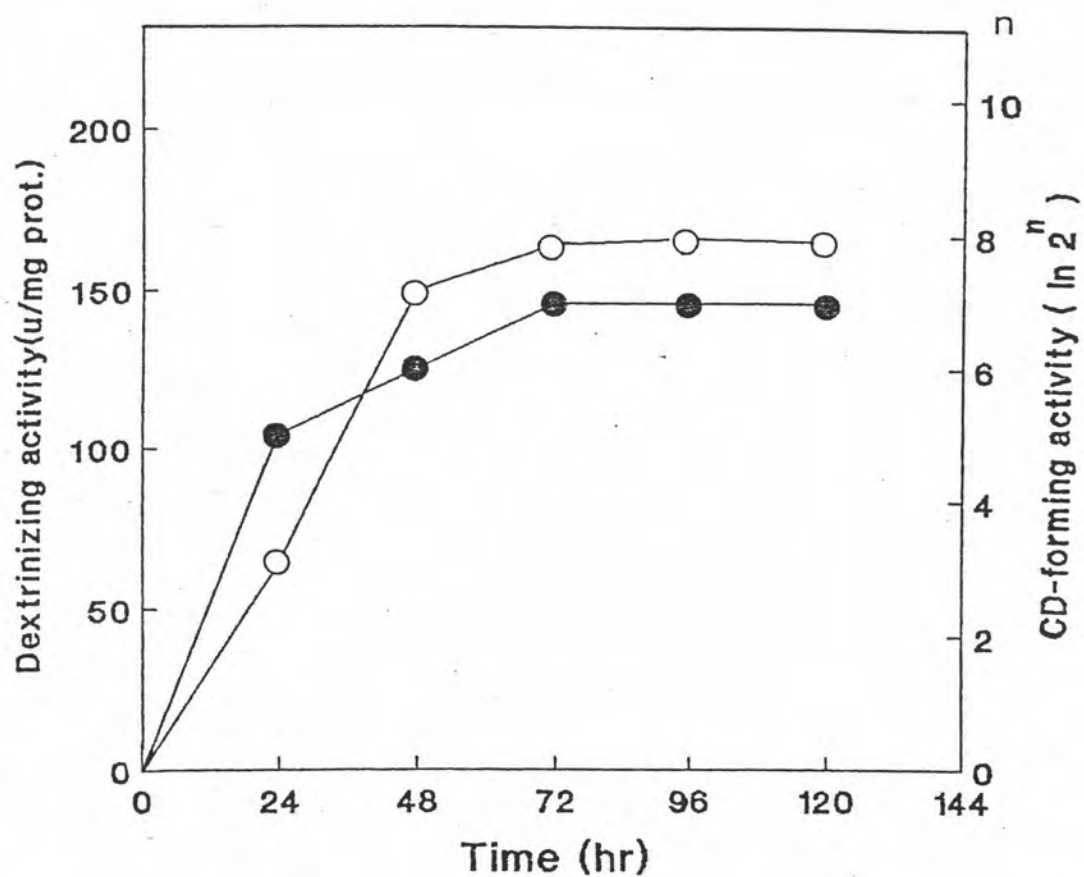
รูปที่ 5 ลักษณะการเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I pH 7.2 อุณหภูมิ 30°C ที่เวลาต่าง ๆ ของการเจริญ

Dextrinizing activity (○)

CD-forming activity (●)

A₄₂₀ (△)

n = dilution stage

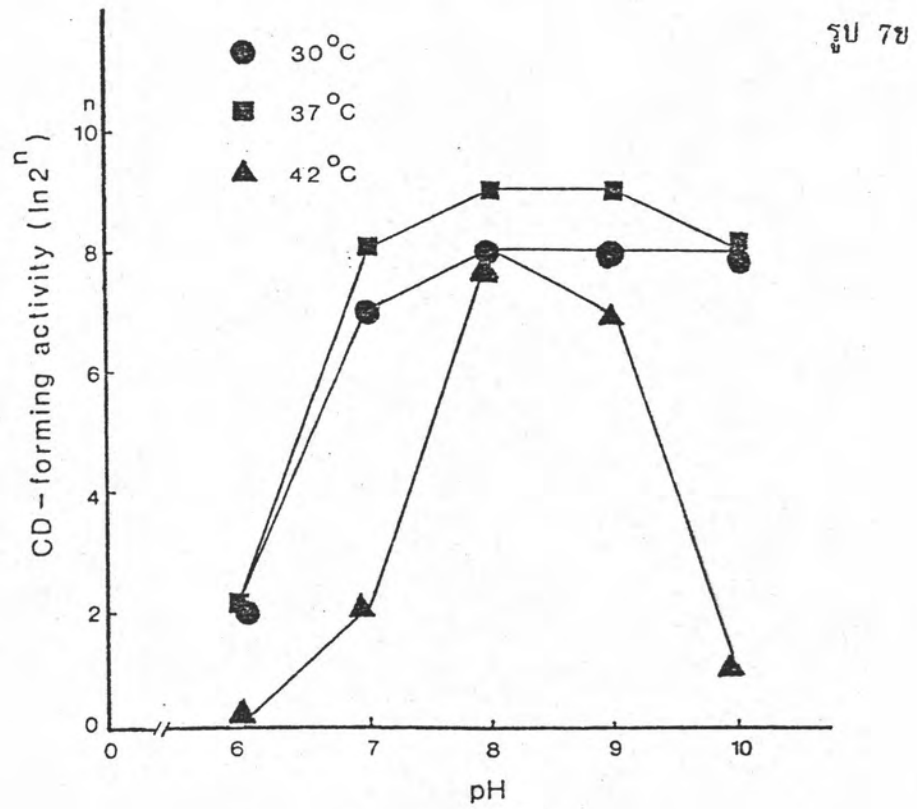
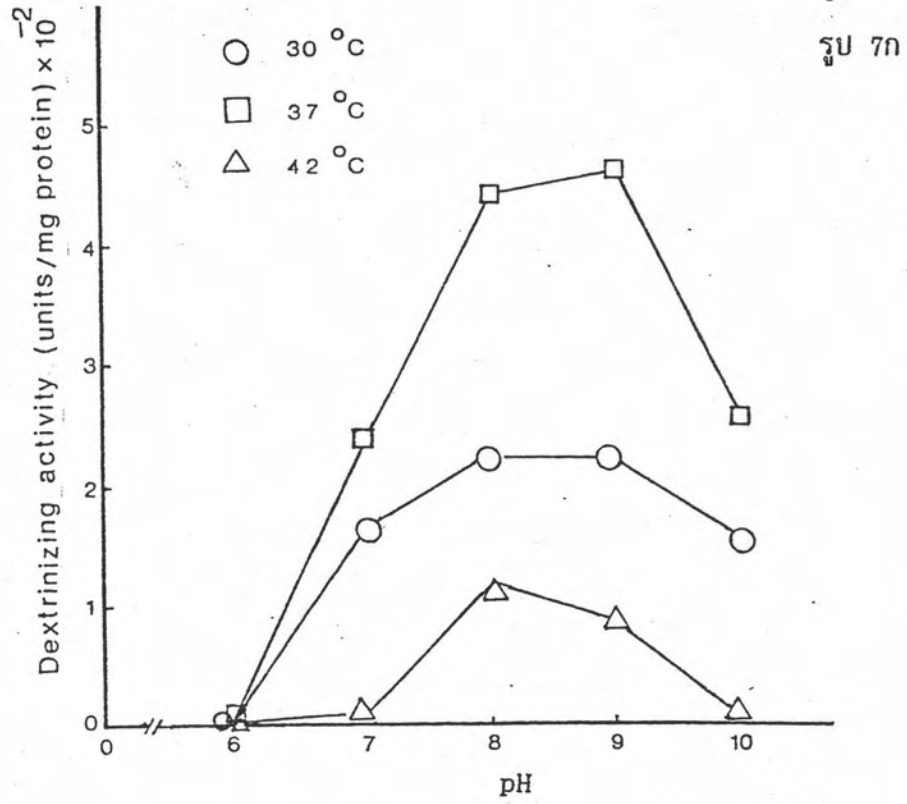


รูปที่ 6 แอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
medium II pH 7.2 อุณหภูมิ 30°C ที่เวลาต่าง ๆ

Dextrinizing activity (—○—)

CD-forming activity (—●—)

n = dilution stage



แต่ถ้าบ่มที่อุณหภูมิ 42°C จะมี CD-Forming activity ในช่วงที่แคบกว่าคือ pH 8 - 9 เท่านั้น

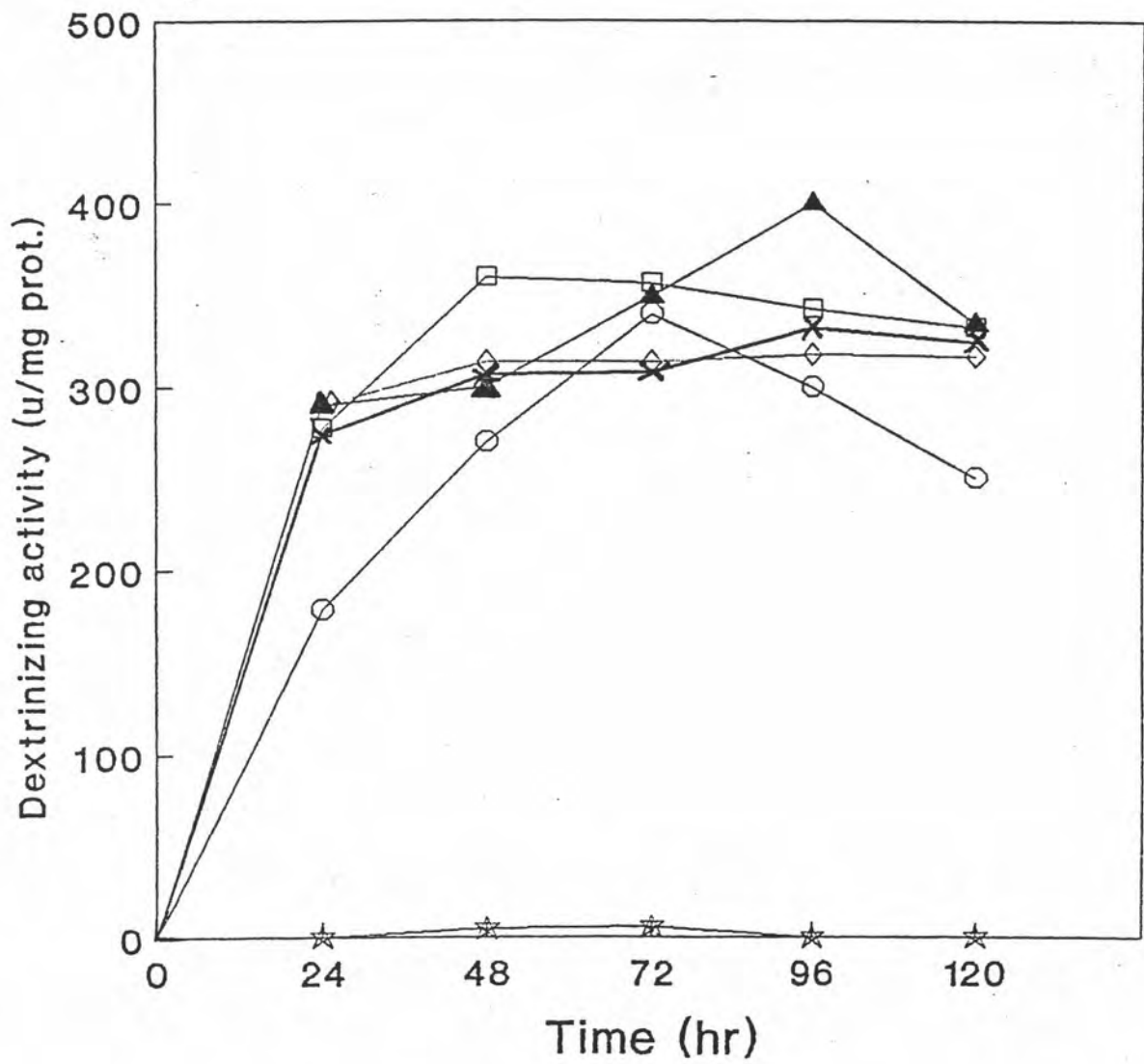
นอกจากนี้ ผลการทดลองในรูปที่ 7 ยังแสดงให้เห็นว่ารูปแบบของผลกระทบบ จาก pH และอุณหภูมิต่อ dextrinizing activity และ CGTase activity คล้ายคลึงกัน เช่น ในช่วง pH 8 - 9 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลกระทบต่อทั้ง Dextrinizing activity และ CGTase activity เพียงเล็กน้อย

เนื่องจากการวิจัยนี้ติดตามแอกติวิตีของ CGTase ด้วยวิธี dextrinizing activity และการตกผลึก CD ใน TCE (CD - forming activity) ในการศึกษาต่อ ๆ ไป จึงเลือกเลี้ยง Bacillus A11 ในสภาวะของ medium II ที่ pH 9 อุณหภูมิ 37°C ซึ่งเป็นสภาวะที่มีแอกติวิตีทั้งสองชนิดสูงที่สุด (รูปที่ 7 ก และ ข)

4.4 ผลกระทบของปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเหนี่ยวนำให้ Bacillus A11 ผลิต เอนไซม์ CGTase

เพื่อทดสอบหาปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II ที่เหมาะสม จึงทำการเพาะเลี้ยง Bacillus A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I (ข้อ 3.1.1) จนเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง log phase แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9 (ข้อ 3.1.2) ที่ไม่ได้เติมแป้งและเติมแป้ง (soluble starch) ปริมาณต่างๆ (1-5 %, น้ำหนัก/ปริมาตร) เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตรที่เวลาต่าง ๆ ไปวัด dextrinizing activity ของ เอนไซม์

ผลการศึกษา (รูปที่ 8) พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่ได้เติมแป้งจะไม่มีแอกติวิตีของ เอนไซม์ และการเติมแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเหนี่ยวนำให้ Bacillus A11 มี dextrinizing activity สูงสุดเมื่อเสริมด้วยแป้งปริมาณ 2 % การเสริมด้วยแป้งปริมาณสูงกว่า 2 % เช่นที่ 3 - 5 % ไม่ได้ทำให้มีเอนไซม์แอกติวิตีสูงขึ้น แต่มีแนวโน้มที่จะยับยั้งเอนไซม์แอกติวิตีด้วย



รูปที่ 8 การเหนี่ยวนำ *Bacillus* A11 ให้ผลิตเอนไซม์ CGTase ด้วยแป้ง (soluble starch) ปริมาณ 0-5 กรัม % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9.0 ที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลาต่าง ๆ กัน

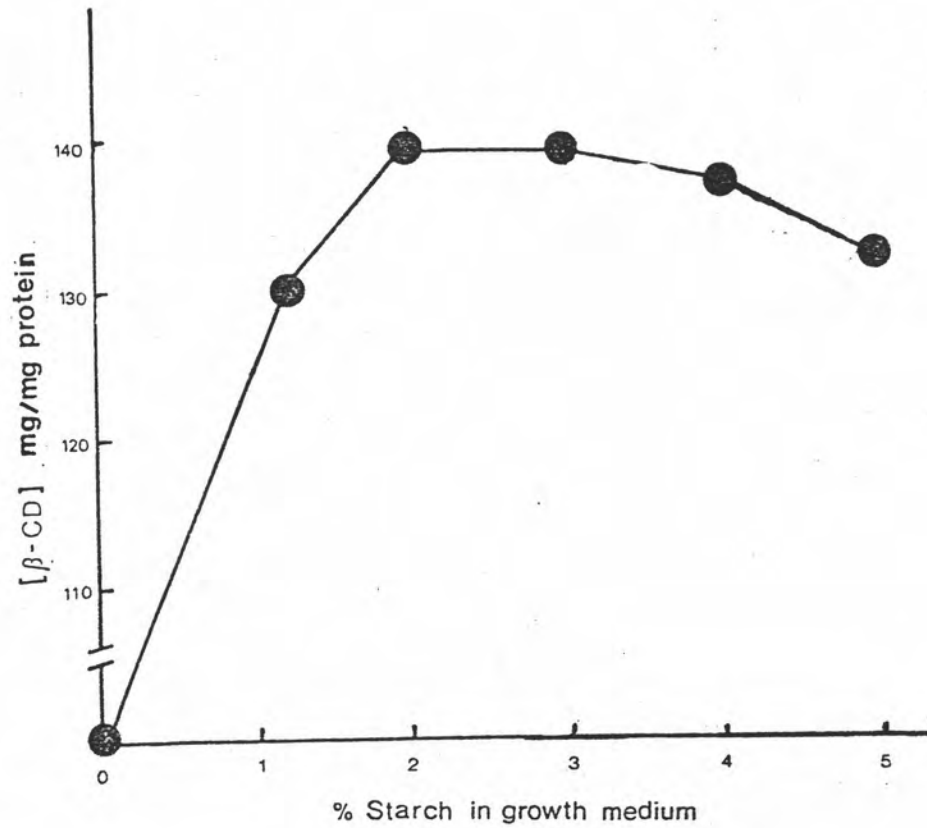
- ★ ไม่มีได้เสริมแป้ง
- เสริมแป้ง 1 %
- ▲ เสริมแป้ง 2 %
- เสริมแป้ง 3 %
- ✕ เสริมแป้ง 4 %
- ◇ เสริมแป้ง 5 %

ในทานองเดียวกัน ถ้าวิเคราะห์หาปริมาณ CD ด้วยวิธี HPLC พบว่าแบคทีเรียจะให้ปริมาณ CD สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยง Bacillus A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II ที่เสริมด้วยปริมาณแป้ง 2 - 3 % (รูปที่ 9) แต่การเสริมแป้งเพียง 1 % ก็เพียงพอที่จะให้เหี่ยวน้ำตาลที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ (85 %) ดังนั้น ในการเพาะเลี้ยง Bacillus A11 ส่วนใหญ่ในงานวิจัยนี้จึงทำในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II ที่มีแป้ง 1 %

4.5 ผลกระทบของชนิดแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase

เพื่อทดสอบว่าแป้งที่ผลิตภายในประเทศไทยสามารถนำไปเปลี่ยนเป็น CD ได้ดีหรือไม่ จึงทดลองเลี้ยงเชื้อ Bacillus A11 ใน medium II ที่เติมแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง หรือแป้งสาลี ซึ่งเป็นวัตถุดิบภายในประเทศแทน soluble starch (บริษัท BDH) ที่ใช้ในการทดลองอื่น ๆ แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อที่ pH 9 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ (ข้อ 3.3.1 และ 3.3.2)

ผลการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่าการเพาะเลี้ยง Bacillus A11 ใน medium II ที่เติมแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง หรือแป้งสาลี สามารถให้ตะกอน CD ใน TCE ได้ดีเท่ากับ soluble starch (บริษัท BDH) คือมี dilution limit $n = 9$ เท่ากัน แต่ถ้าวิเคราะห์หาปริมาณ CD ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี HPLC พบว่า แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และ soluble starch จะให้เหี่ยวน้ำตาลที่ผลิต CGTase ของ Bacillus A11 ผลิต β -CD ได้ดีกว่าแป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และแป้งสาลี นอกจากนี้ผลในตารางที่ 7 ยังแสดงว่าแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดที่ผลิตในประเทศไทยผลิต CD ได้ดีกว่า soluble starch ที่ซื้อจากต่างประเทศด้วย



รูปที่ 9 การผลิต CD ของ *Bacillus A11* เมื่อเลี้ยงอาหารที่มีแป้ง (soluble starch) ปริมาณต่าง ๆ 0-5 กรัม% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9.0 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

วัดปริมาณ CD ด้วยเครื่อง HPLC (ข้อ 3.4.2)

ตารางที่ 7 ผลกระทบของชนิดแป้งต่าง ๆ ต่อแอกติวิตีของ CGTase จาก Bacillus A11 เลี้ยงใน medium II pH 9.0 ที่เติมแป้งชนิดต่าง ๆ ดังระบุในตาราง ความเข้มข้น 1 % ที่เวลา 72 ชั่วโมง

Type of Starch	CGTase activity			
	Dextrinizing activity (unit/mg protein)	CD-TCE (dilution limit)	β -CD* (mg)	% conversion**
soluble starch (BDH)	703.01	1 : 2 ⁹	8.2	50
แป้งข้าวเจ้า	714.14	1 : 2 ⁹	9.3	54
แป้งข้าวโพด	664.84	1 : 2 ⁹	9.2	56
แป้งข้าวเหนียว	645.72	1 : 2 ⁹	6.9	42
แป้งมันสำปะหลัง	595.58	1 : 2 ⁹	6.5	42
แป้งสาลี	534.25	1 : 2 ⁹	5.5	41

* วัดค่าโดยวิธี HPLC ใช้สารละลายเอโนไซม์ เจือจางที่ dilution stage , n = 8

** % Conversion = $\frac{\text{ปริมาณ CD ที่เกิดขึ้น (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณแป้งเริ่มต้น (มิลลิกรัม)}} \times 100$

4.6 สมบัติของ crude CGTase ที่แยกได้จาก Bacillus A11

4.6.1 ภาวะความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

CGTase

น้ำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ที่เตรียมได้ตามข้อ 4.3 ไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยวิธีจาก dextrinizing activity (ข้อ 3.3.1) และ CD - TCE assay (CD - forming activity) (ข้อ 3.3.2) โดยเปลี่ยนสภาวะการทดลองจาก pH 6 เป็น pH 3 - 10 (ใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ ในข้อ 3.2.1.1 - 3.2.1.5) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 พบว่า CGTase มีช่วงการทำงานกว้างระหว่าง pH 4 - 9 และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 ส่วน dextrinizing activity ถึงแม้จะทำงานได้ดีในช่วง pH 4 - 9 เช่นเดียวกัน แต่จะมีแอกติวิตีสูงสุดที่ pH 5.0

4.6.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase

น้ำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ในข้อ 4.3 ไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยเปลี่ยนสภาวะการทดลอง จากอุณหภูมิ 40°C เป็นอุณหภูมิ 20 - 70°C ผลการทดลอง (รูปที่ 11) พบว่า CGTase ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือระหว่าง 20-60°C แต่ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40- 50°C ที่อุณหภูมิ 70°C แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียงประมาณ 20 %

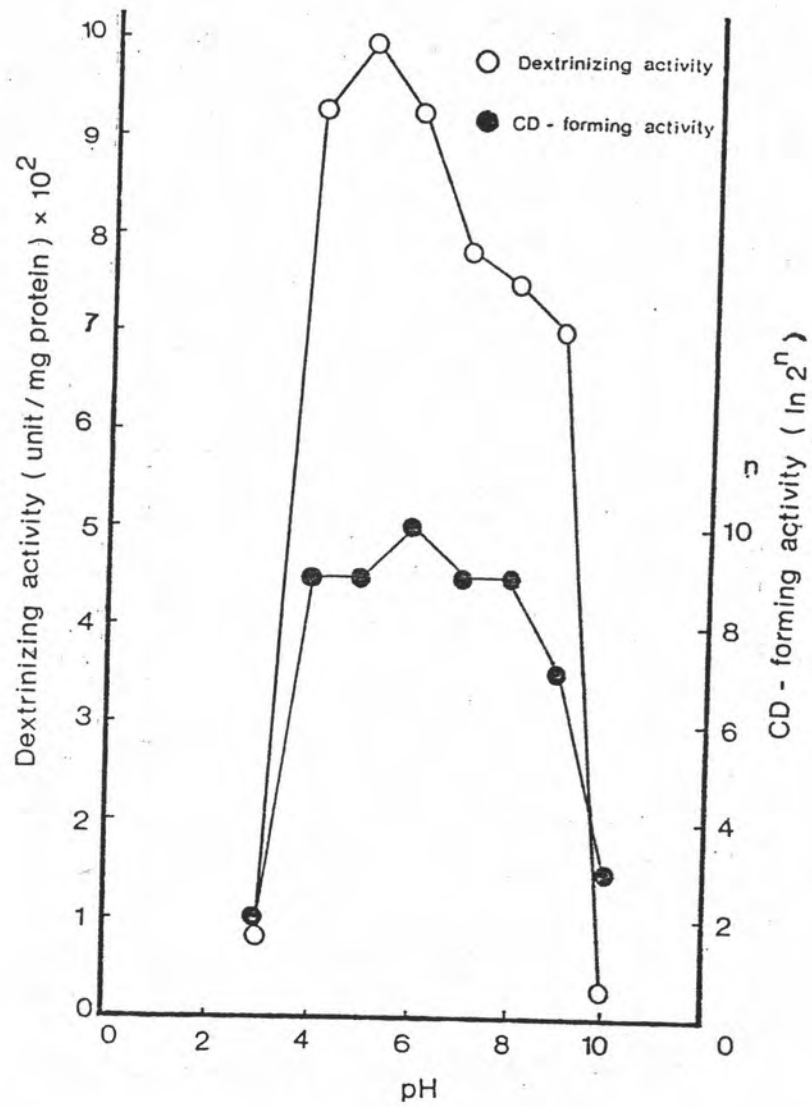
ในกรณี dextrinizing activity นั้นพบว่า crude extract จะมีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °C ส่วนที่ 40 และ 50 °C ซึ่งเป็นช่วงที่มีแอกติวิตีของ CGTase สูงนั้น จะมี dextrinizing activity เพียงประมาณ 20 % และ 65 % ตามลำดับ

4.6.3 ความเสถียรของเอนไซม์ CGTase

4.6.3.1 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อความเสถียรของเอนไซม์

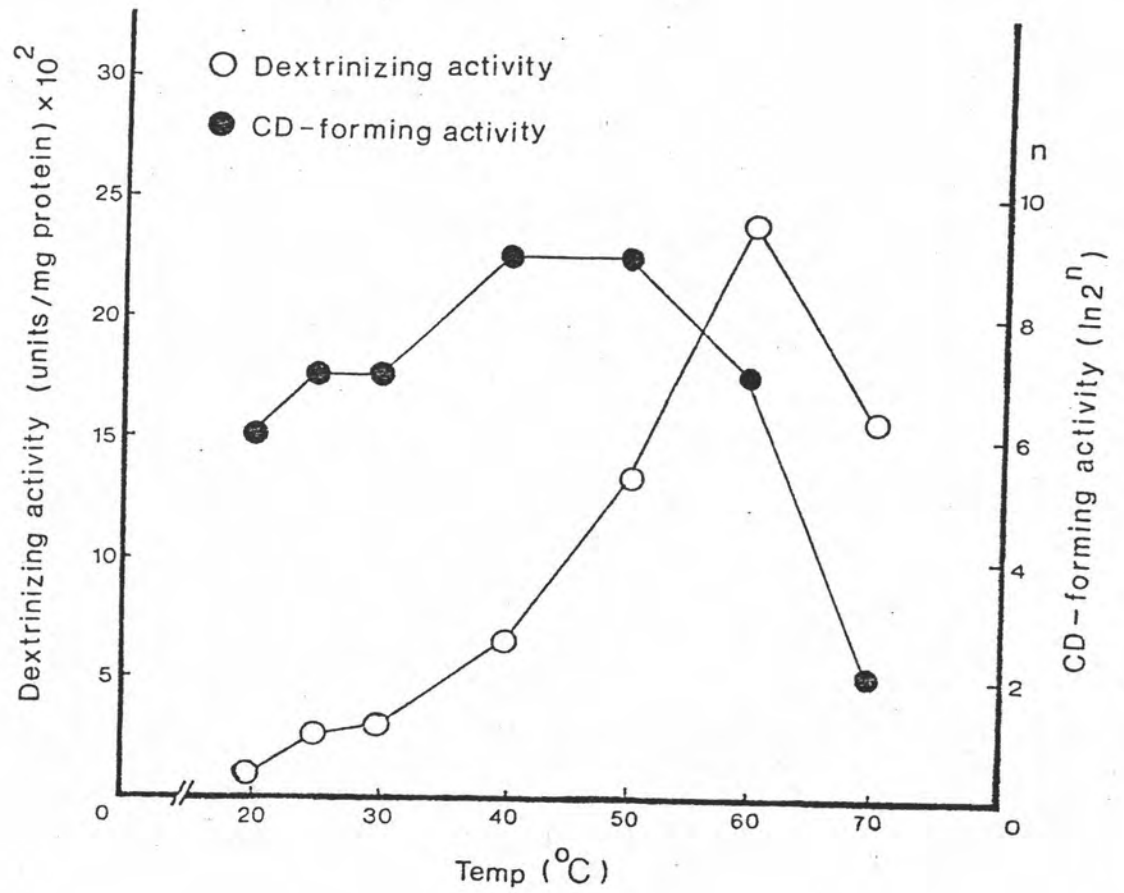
CGTase

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ จึงทดลองเก็บ



รูปที่ 10 ผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase

ทำตามวิธีในข้อ 3.7.3 วัด Dextrinizing activity และ
 CD-forming activity ตามวิธีในข้อ 3.3.1 และข้อ 3.3.2
 ตามลำดับ



รูปที่ 11 ผลของอุณหภูมิ ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase

ทำตามวิธีในข้อ 3.7.3 วัด Dextrinizing activity และ
 CD - forming activity ตามวิธีในข้อ 3.3.1 และข้อ 3.3.2
 ตามลำดับ

สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และที่ 4°C นำไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ทุก ๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 40 สัปดาห์ติดต่อกัน

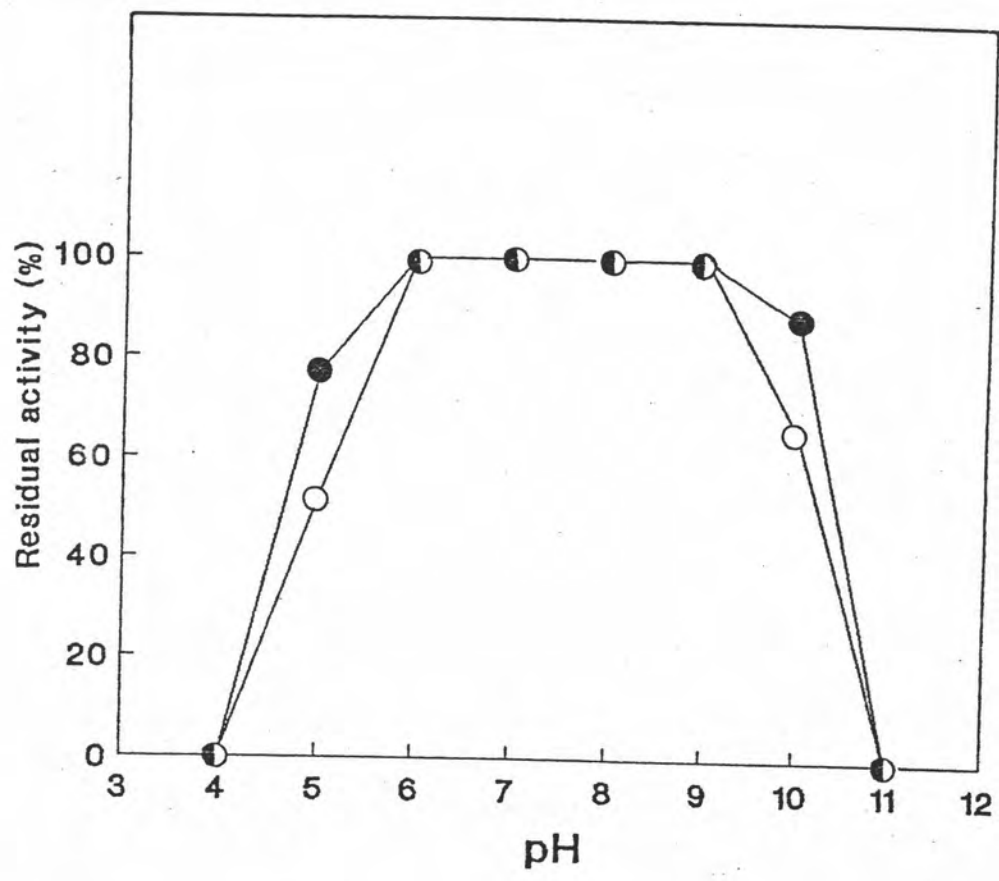
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ CGTase มีความเสถียรมากเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20°C พบว่าในระยะ 28 สัปดาห์แรก ไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์เลย หลังจากนั้น จะสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (ประมาณ 9 %) ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นั้น จะไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์ตลอดช่วงการทดลอง 20 สัปดาห์ (การทดลองนี้ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

4.6.3.2 ผลของความเป็นกรด - ค่างต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase

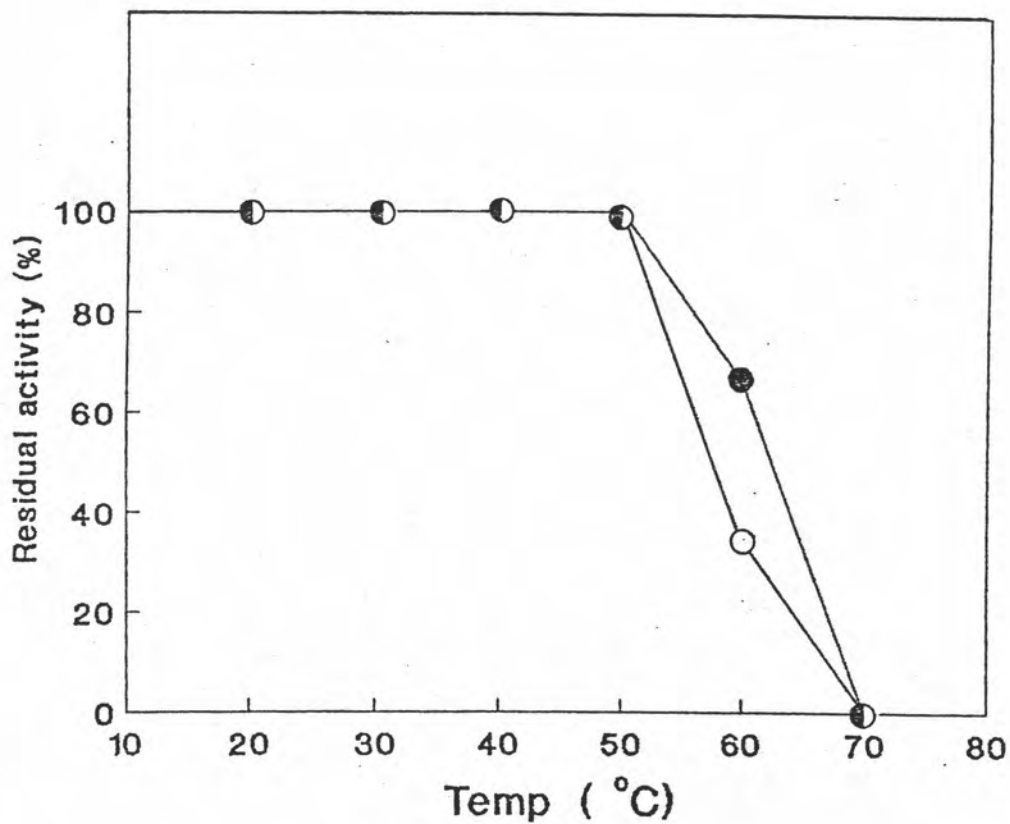
บ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ pH 4 -11 (ใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ในข้อ 3.2.1.1 - 3.2.2.6) โดยเจือจางสารละลายเอนไซม์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์อัตราส่วน 1:4 (โดยปริมาตร) (pH สุดท้ายเป็น 4.1-10.85) ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ให้อัตราส่วนระหว่างสารละลายเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 1 : 5 (โดยปริมาตร) (pH สุดท้ายเป็น 5.6-6.3) แล้วนำไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ (residual activity) เปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์ซึ่งเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ในอัตราส่วนเดียวกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 12 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 6 - 9 การบ่มเอนไซม์ที่ pH 5 , pH 10 จะทำให้ CGTase และ Dextrinizing activity ของเอนไซม์ลดลงเหลือ 75, 85% และ 50, 65% ตามลำดับ ส่วนที่ pH 4 และ pH 11 จะไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งหมด

4.6.3.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ในบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 70 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ (residual activity) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 13 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50°C การบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60°C จะ



รูปที่ 12 ผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase บ่มเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ (pH 4-11) ที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 1 ชม. วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ โดยวิธี Dextrinizing activity (—○—) และ CD-forming activity (—●—) ตามวิธีในข้อ 3.3.1 และข้อ 3.3.2 ตามลำดับ เปรียบเทียบผลกับแอกติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์



รูปที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30-70°C เป็นเวลา 15 นาที
วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือโดยวิธี Dextrinzing activity (○) และ CD-forming activity (●) ตามข้อ 3.3.1 และข้อ 3.3.2 ตามลำดับ เปรียบเทียบผลกับแอกติวิตีดั้งต้นของเอนไซม์

ทำให้ CGTase และ dextrinizing activity ของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 35 และ 67 % ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิ 70 °ซ จะทำลายแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งหมด

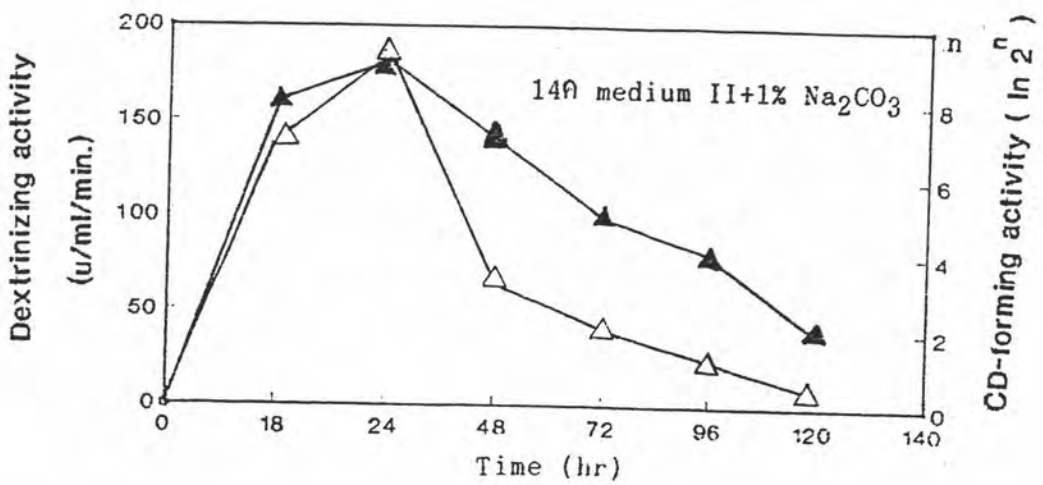
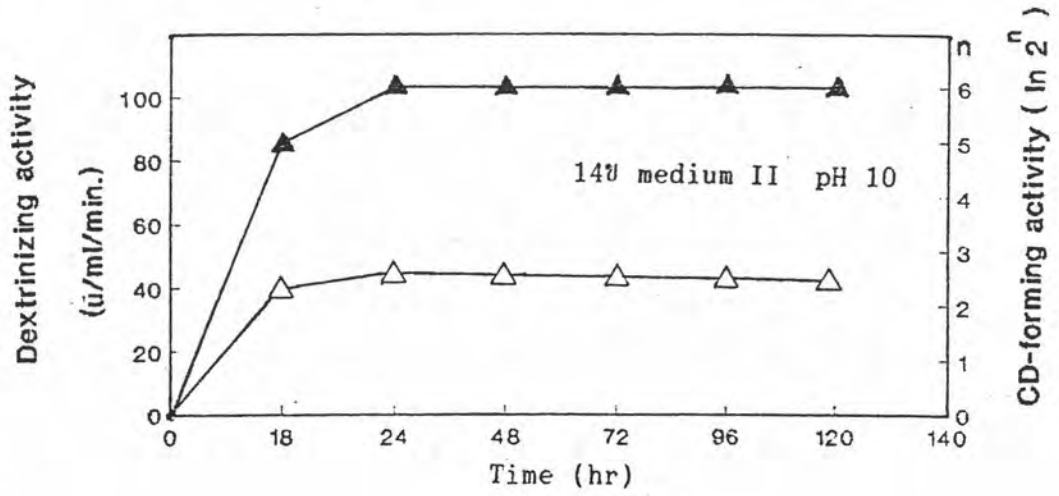
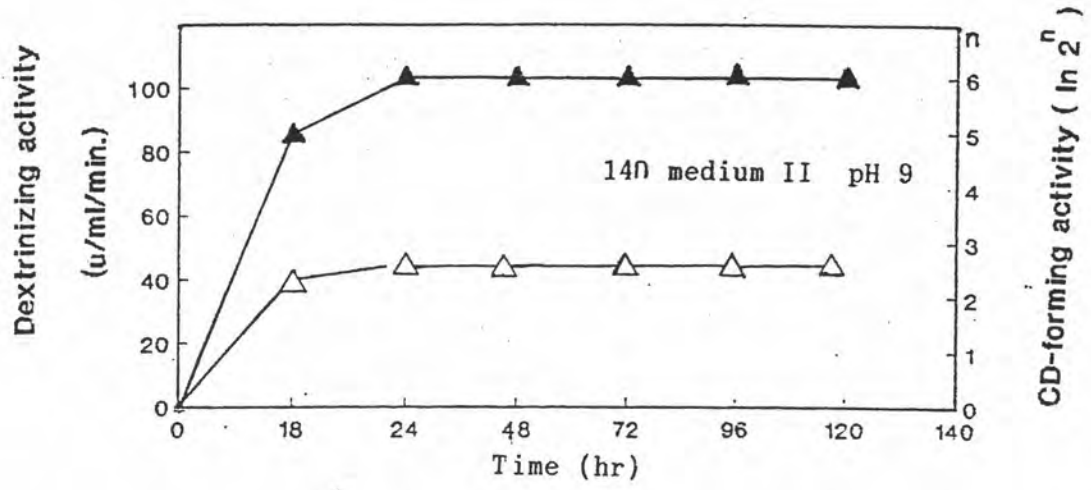
4.7 เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus A11 กับบาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐาน Bacillus circulans (ATCC 21783)

4.7.1 การผลิตเอนไซม์ CGTase ของ ATCC 21783

เพื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus A11 กับบาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 21783 จึงเพาะเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 21783 ซึ่งเป็น alkalophilic bacteria ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I pH 7.2, 9.0 และ 10.0 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ บาซิลลัสสายพันธุ์ ATCC 21783 ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase เลย แต่ถ้าเพาะเลี้ยงเชื้อ ATCC 21783 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9.0 และ 10.0 หรือ medium II ที่เสริมด้วย Na_2CO_3 1 % (pH = 10.03) จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 14 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ATCC 21783 สามารถผลิต CD ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สภาวะ แต่จะมี CGTase activity สูงสุดใน medium II + 1 % Na_2CO_3 ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแอกติวิตีของเอนไซม์จะต่ำลงตามระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ส่วนใน medium II pH 9 และ 10 (ไม่ได้เสริม 1 % Na_2CO_3) พบว่า CGTase มีแอกติวิตีสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน และระดับแอกติวิตีจะคงที่ต่อไปตลอด 120 ชั่วโมง ที่ทำการศึกษา รูปที่ 14 ยังชี้ให้เห็นว่ารูปแบบแอกติวิตีของ CGTase และ dextrinizing คล้ายคลึงกัน

4.7.2 เปรียบเทียบผลความเป็นกรด-ด่างต่อเอนไซม์ CGTase จาก ATCC 21783 และ Bacillus A11

เมื่อสารละลาย crude CGTase ของ ATCC 21783 ของ Bacillus A11 ควบคุมที่ pH 3-10 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.6.1) พบว่า ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง 2



ชนิดเหมือนกัน และเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH 4-8 (รูปที่ 15 ก และ ข) มีแอกติวิตีสูงสุดที่ pH 5-6

4.7.3 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase จาก ATCC 21783

ทำการทดลองคล้าย 4.7.2 แต่บ่มเอนไซม์ที่ pH 6.0. ที่เวลาต่างๆ (วิธีการทดลองในข้อ 3.7.3) รูปที่ 16 แสดงว่า CGTase ของ ATCC 21783 และ Bacillus A11 มีช่วงการทำงานที่ดี ที่อุณหภูมิ 40-50 °ซ อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของ CGTase จาก ATCC 21783 มากกว่า Bacillus A11 จะเห็นว่า Bacillus A11 มีการทำงานที่ดีของ CGTase และ Dextrinizing ที่อุณหภูมิต่างกัน (40 - 50-° ซ และ 60 ° ซ ตามลำดับ) แต่แอกติวิตีทั้งสองอย่างของ ATCC 21783 จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากัน (40-50 °ซ)

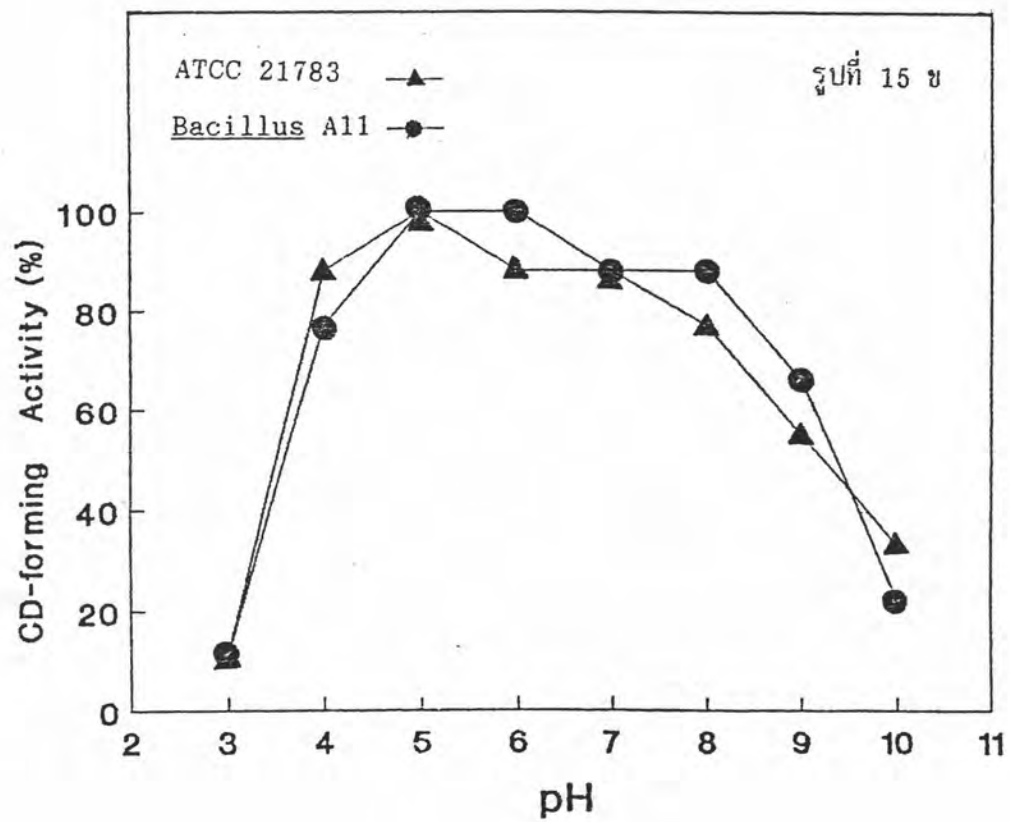
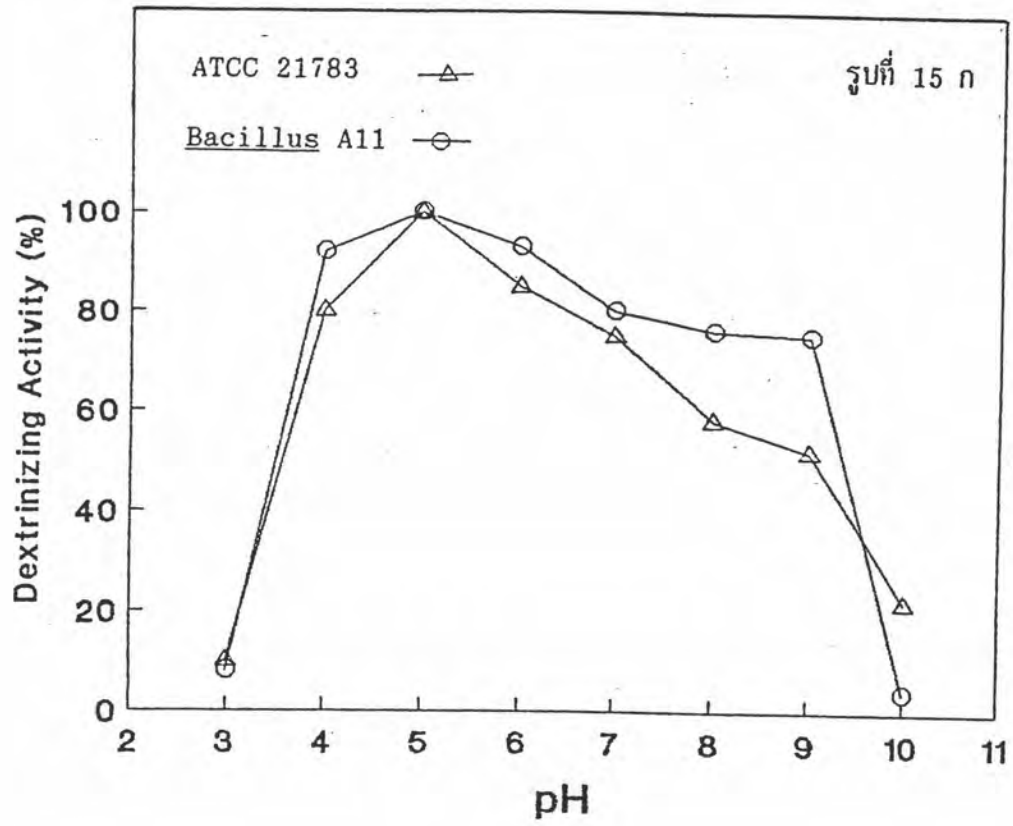
4.8 การทำให้เอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A11 บริสุทธิ์บางส่วน

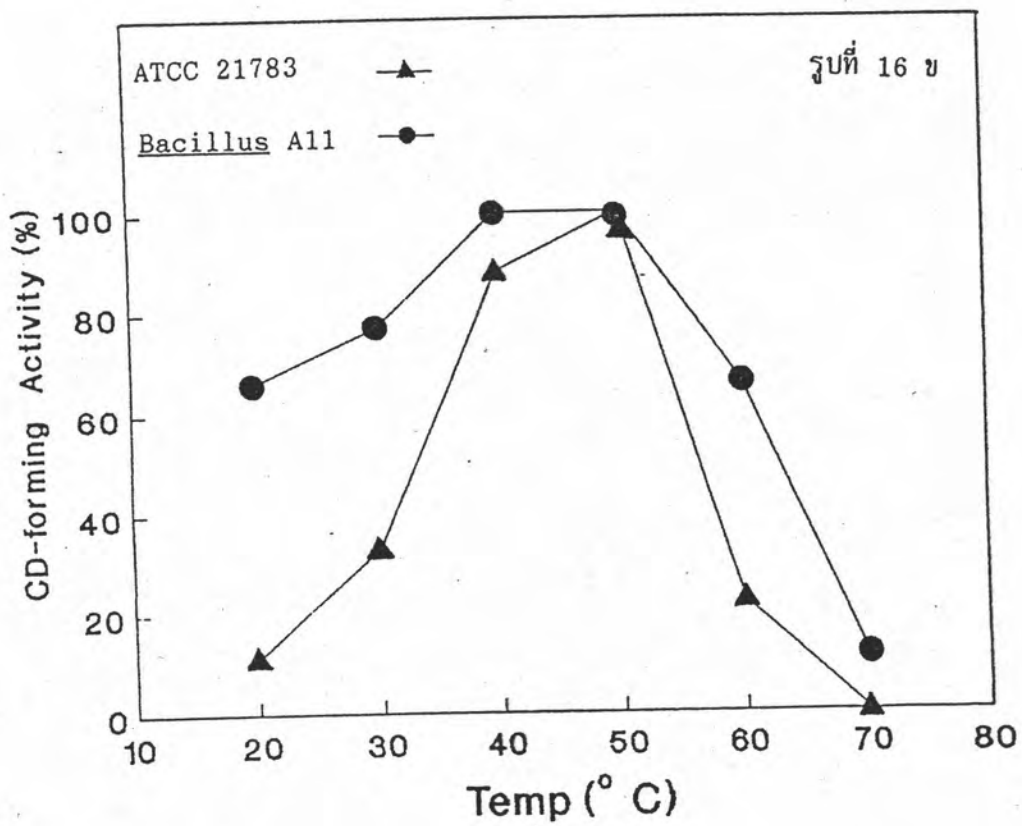
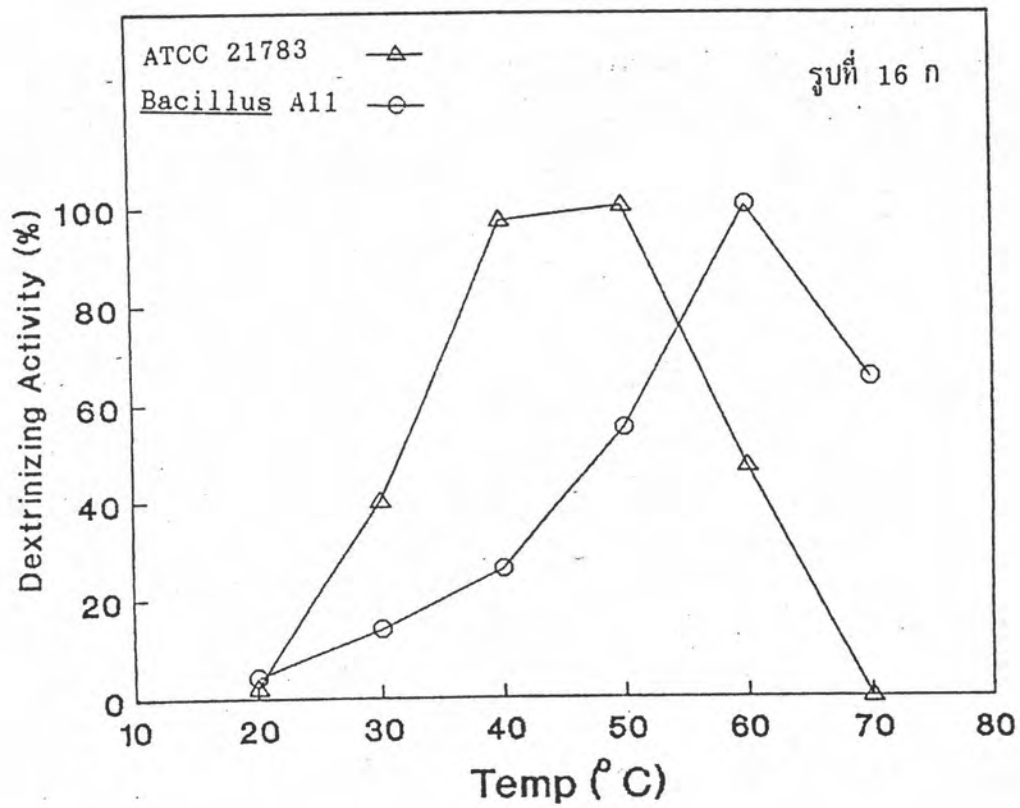
นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ข้อ 4.3 ไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ที่ 4° ซ ตามวิธีในแผนภาพที่ 1 (ข้อ 3.6)

4.8.1 ผลการศึกษาการดูดซับโดยแป้ง (Starch adsorption)

อบแป้งข้าวโพดในตู้อบอุณหภูมิ 120 °ซ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำไปเติมลงในสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) หลังจากนั้นล้างตะกอนแป้งด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 mM pH8.5 ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 20 % แล้วนำไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ พบว่าในการล้างตะกอนแป้ง 2 ครั้งด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ในส่วนบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้างเลย แสดงว่าเอนไซม์ถูกดูดซับโดยแป้งอย่างแน่นหนา หลังจากนั้นชะเอนไซม์ออกจากแป้งด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 mM ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ 10 mM และมกลีโคส 0.2 M พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในส่วนบัฟเฟอร์ลดลงจากแอกติวิตีตั้งต้น (ก่อนการดูดซับโดยแป้ง) ประมาณ 10 % และจากค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

รูปที่ 15 เปรียบเทียบผลของความเป็นกรด - ด่างต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase จาก
บาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 21783 และ Bacteria A11
ตามวิธีในข้อ 3.7.3 วัด Dextrinizing activity (รูปที่ 15 ก)
และ CD - forming activity (รูปที่ 15 ข) ตามวิธีข้อ 3.3.1 และ
ข้อ 3.3.2 ตามลำดับ





ก่อนการดูดซับโดยแบ่งเป็น $174 \text{ unit mg}^{-1} \text{ protein}$ หลังจากผ่านการดูดซับโดยแบ่ง
เพิ่มเป็น $1990 \text{ unit mg}^{-1} \text{ protein}$ ดังนั้นหลังจากผ่านการดูดซับโดยแบ่งแล้ว
หากให้เอนไซม์ CGTase มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 11 เท่า yield ประมาณ 90 %
น้ำตาลละลายที่ได้ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อไป

4.8.2 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate precipitation)

ทำการตกตะกอนโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ข้อ 4.8.1 โดยค่อย ๆ
เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงไป ให้เพิ่มความเข้มข้นของเกลือแรดชั้นละ 10 %
จนกระทั่งสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 80 % ผลการทดลองพบว่า ที่ความ
เข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 30 % จะเริ่มเห็นตะกอนของโปรตีนเล็กน้อย ที่
ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 40 % จะเห็นตะกอนโปรตีนเพิ่มขึ้นมาก แต่
เมื่อเห็นตะกอนที่ความเข้มข้นดังกล่าวไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ พบว่ามีแอกติวิตีน้อยมาก ต่อ
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 40 - 80 % จึงมีแอกติวิตีจำเพาะของ
เอนไซม์ CGTase เพิ่มขึ้นมาก (ตารางที่ 8) ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ จึงจะเลือก
ตกตะกอนเอนไซม์ CGTase ด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 - 80 %
ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ CGTase มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 15 % yield ประมาณ 50 %

4.8.3 ผลการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose

น้ำตะกอนโปรตีน ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว
40 - 80 % (ข้อ 4.7.2) ไปไดอะไลซ์ในทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 หลังจาก
เอาเกลือแอมโมเนียมออก น้ำสารละลายเอนไซม์ทั้งหมด 18 มิลลิลิตร ไปผ่านลงใน
คอลัมน์ DEAE-cellulose ๕๕ ด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 mM pH 8.5
จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก ($A_{280} = 0$) จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt

ตารางที่ 8 ผลการดูดซับด้วยแป้งและตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอัตรา 0-90% ทว่าการทดลองตาม ข้อ 3.6.2

Ammonium sulfate saturation range (%)	Volume (ml)	Protein (mg)	Enzyme activity		Specific activity (unit/mg protein)	%Yield	Purifi- cation fold
			dext.act. (total units)	CD-TCE act. (dilution limit)			
crude enzyme	100	53.24	9754.30	1 : 2 ⁹	183.20	100	1.0
starch adsorption (NH ₄) ₂ SO ₄ ppt.	100	4.37	8778.87	1 : 2 ⁸	2009.00	90.00	11.0
0-30	2	0.6	20.70	1 : 2 ³	34.50	0.02	0.1
0-40	2	2.0	91.16	1 : 2 ⁵	45.58	0.93	0.2
40-50	2	1.41	2224.00	1 : 2 ¹¹	1577.30	22.80	8.6
40-70	2	1.85	4304.20	1 : 2 ¹³	2326.59	44.13	12.7
40-80	2	1.88	5074.20	1 : 2 ¹⁴	2699.04	52.02	14.7
80-90	1	0.018	75.30	1 : 2 ⁸	4183.33	0.77	22.8

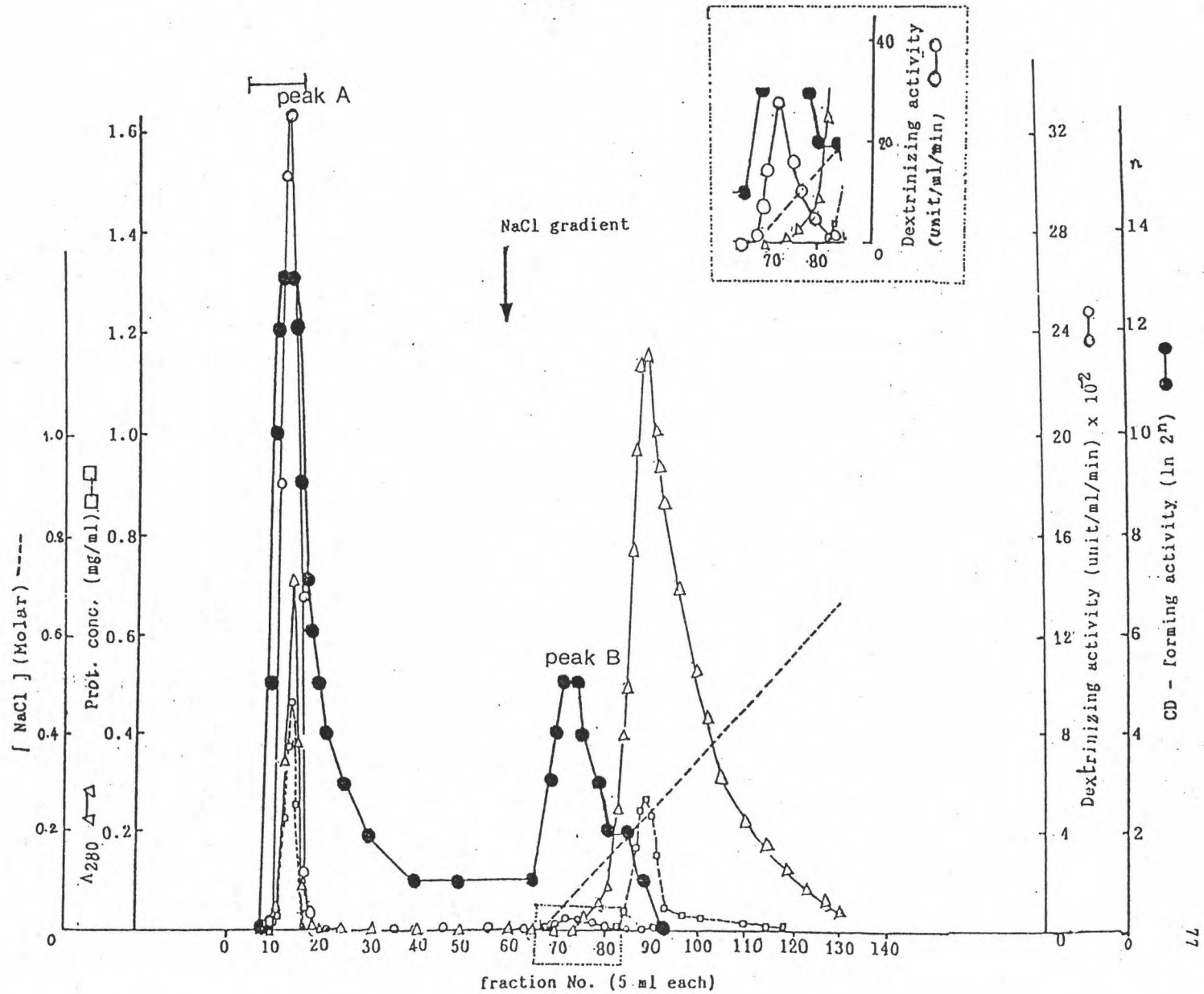
gradient 0 - 0.66 M ของโซเดียมคลอไรด์ ในทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 mM pH 8.5 (ข้อ 3.6.3.2)

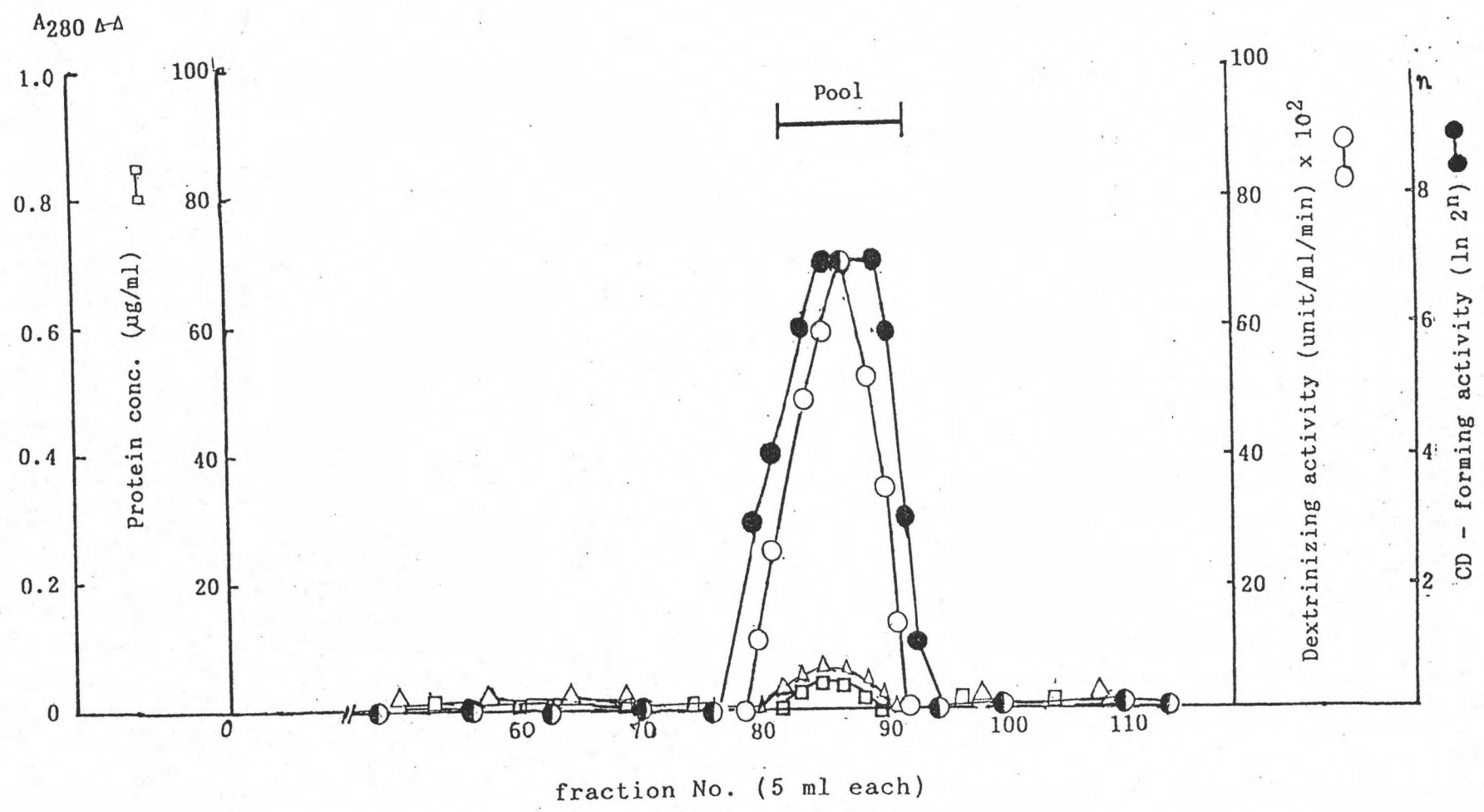
ผลการทดลองในรูปที่ 17 แสดงว่าเมื่อผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ DEAE - cellulose สามารถแยกโปรตีนออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ โดยส่วนแรก (peak A) จะออกจากคอลัมน์เมื่อชะด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 โปรตีนส่วนที่ 2 (peak B) จะออกจากคอลัมน์เมื่อชะด้วย linear salt gradient ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 0.22 M ตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์ส่วนใหญ่ในโปรตีน peak A (sp. act. = 7,430 unit mg⁻¹ protein) โดยยังมีเอนไซม์ติดค้างอยู่ในคอลัมน์อีกเล็กน้อย (sp. act. = 800 unit mg⁻¹ protein) ซึ่งชะออกได้ด้วย NaCl 40 mM เป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์ จะถูกชะออกด้วย NaCl ก่อนโปรตีนตัวอื่น ๆ ที่ติดค้างในคอลัมน์

เอนไซม์ CGTase ในส่วนแรก มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 43 เท่า นำ สารละลายเอนไซม์ส่วนนี้ไปผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์จี - 100 ต่อไป

4.8.4 ผลการทำใหเอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์จี - 100

นำสารละลายเอนไซม์ที่ออกจากคอลัมน์ DEAE - cellulose ในพีคแรก (peak A) ในข้อ 4.7.3 ไปลดปริมาตรลงเหลือประมาณ 2 มิลลิลิตร โดยวิธี ultrafiltration แล้วนำไปผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี - 100 (ขนาด 1.8 x 76 ซม.) เมื่อชะด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 mM pH 8.5 ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 100 mM เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ครั้งละ 2 มิลลิลิตร ไปวัดเอนไซม์แอกติวิตี และปริมาณโปรตีน (วิธีทดลองข้อ 3.6.4.2) ผลการทดลอง (รูปที่ 18) พบว่า โปรตีนจะออกมาในช่วงหมายเลขแฟรคชัน 80-90 ตรวจพบ dextrinizing activity และ CD - forming activity ที่แฟรคชันเดียวกัน มีแอกติวิตีสูงสุดในช่วงแฟรคชันที่ 85 - 89 มี specific activity 10,200 unit mg⁻¹protein การผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-100 จะทำใหเอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ





60 เท่า yield = 18 % (ตารางที่ 9)

4.9 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธีโพลีอะคริลามิด เจล - อีเลคโตรโฟเรซิส (Disc - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

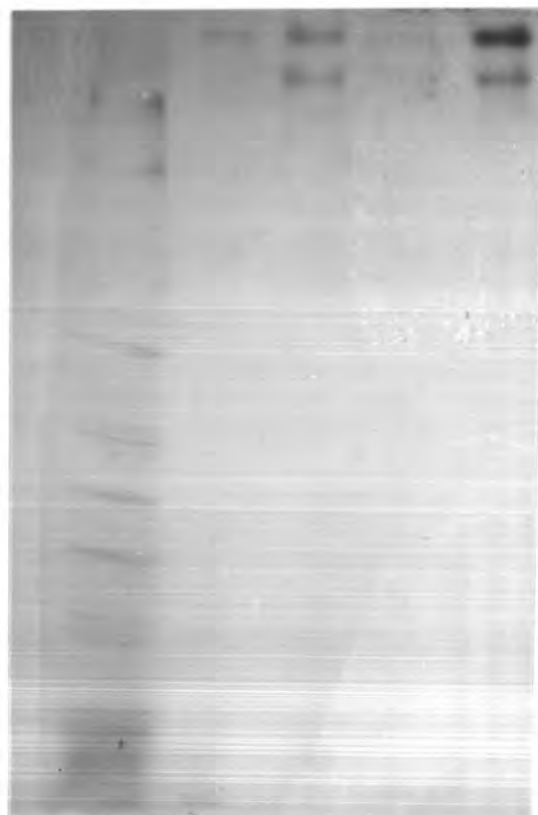
นําสารละลายเอนไซม์ส่วนต่าง ๆ ที่เตรียมได้คือ นําน้ำเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) หลังการดูดซับโดยแป้ง หลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต หลังการแยกด้วย DEAE - cellulose และหลังจากผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 100 ไปทำอีเลคโตรโฟเรซิส ตามวิธีข้อ 3.6.5.3 ติดตามแถบโปรตีนโดยย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 (วิธีทดลองข้อ 3.6.5.4) ดังแสดงผลในรูปที่ 19 จะเห็นว่า สารละลายเอนไซม์ก่อนทำห้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ และหลังจากผ่านขั้นตอนการดูดซับโดยแป้งแล้ว จะปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน 2 แถบ แต่หลังจากนั้นจนถึงขั้นตอนสุดท้าย คือ ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี -100 ยังปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน 2 แถบ แต่มีความชัดเจนยิ่งขึ้น เมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน เพื่อติดตาม dextrinzing activity ของเอนไซม์ในแผ่นเจล (วิธีการทดลองข้อ 3.6.5.5) รูปที่ 20 จะพบแถบสีในแผ่นเจลอย่างชัดเจน 2 แถบ ซึ่งตรงกับแถบโปรตีน 2 แถบนั้น ($R_f = 0.05$ และ 0.1)

4.10 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางประการของเอนไซม์ CGTase

เนื่องจากเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจาก Bacillus ต่าง ๆ มีสมบัติแตกต่างกัน (Horikoshi และคณะ, 1981) การวิจัยนี้จึงศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางประการของ Bacillus A11 ว่าคล้ายคลึงหรือแตกต่างจาก Bacillus สายพันธุ์อื่นๆ อย่างไร โดยนําสารละลายเอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A11 ทั้งเอนไซม์ชนิดไม่บริสุทธิ์ (crude enzyme) และที่เตรียมห้บริสุทธิ์บางส่วน มาศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางประการ ดังนี้

ตารางที่ 9 สรุปผลการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่าง ๆ

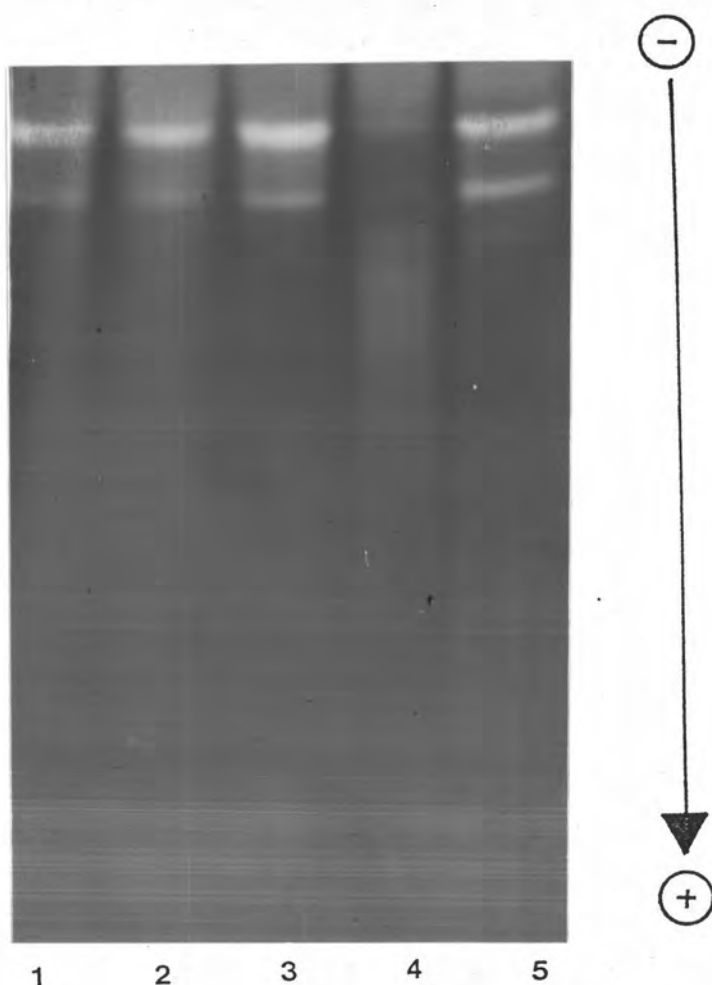
Step	Volume (ml)	Enzyme activity		Total Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
		dext.act. (total units)	CD-TCE (dilution limit)				
crude enzyme	1200	110770	1:2 ⁹	636	174	100	1
starch absorption	1000	99537	1:2 ⁹	50	1991	90	.11
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40-80%	15	59279	1:2 ¹⁴	22.5	2635	54	15
DEAE-Cellulose	45	50528	1:2 ¹³	6.8	7430	46	43
Sephadex G-100	30	20398	1:2 ¹²	2.0	10199	18	59



1 2 3 4 5

รูปที่ 19 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์ บางส่วน แยกโดยดิสต์โทลอะโครลาไมต์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส, 30 mA ต่อ แผ่นเจล อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (วิธีทดลองข้อ 3.6.5.4) แล้วติดตามแถบโปรตีนด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R 250

- | | |
|--|-----------------------|
| 1. crude enzyme | (110 ไมโครกรัมโปรตีน) |
| 2. CGTase หลังจากการดูดซับโดยแป้ง | (10 ไมโครกรัมโปรตีน) |
| 3. CGTase จากแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80% | (30 ไมโครกรัมโปรตีน) |
| 4. CGTase จากคอลัมน์ DEAE-cellulose (peak A) | (10 ไมโครกรัมโปรตีน) |
| 5. CGTase จากคอลัมน์ Sephadex G-100 | (10 ไมโครกรัมโปรตีน) |



รูปที่ 20 รูปแบบการย้อมสี Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase ที่ได้ จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน (วิธีทดลองข้อ 3.6.5.5) แยกโดยวิธีดีคัสต์ โพลีอะคริลามัด เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

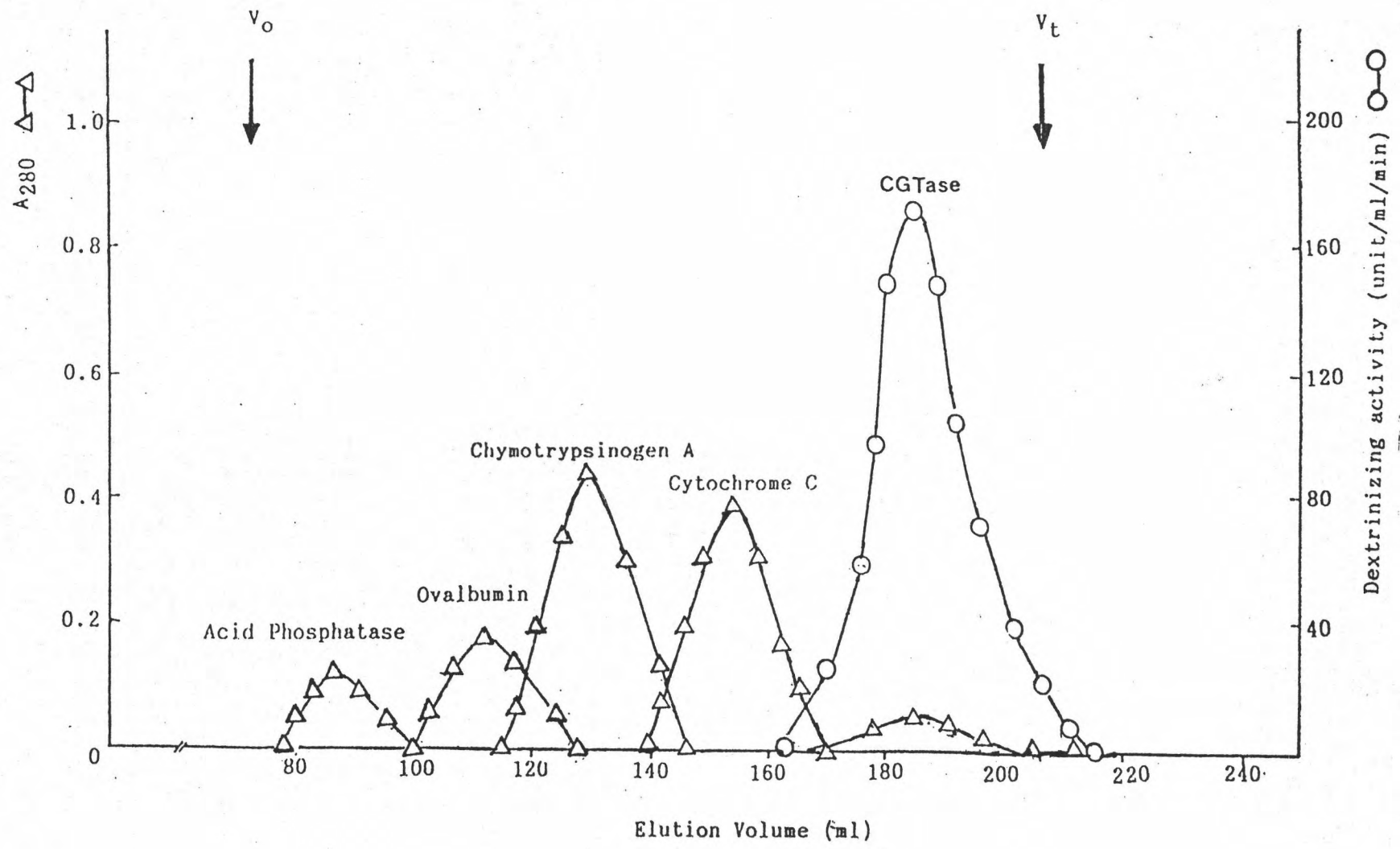
1. crude enzyme (10 ไมโครกรัมโปรตีน)
2. CGTase จากแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 % (1 ไมโครกรัมโปรตีน)
3. CGTase จากคอลัมน์ DEAE - cellulose peak A (0.5 ไมโครกรัมโปรตีน)
4. CGTase จากคอลัมน์ DEAE-cellulose peak B (0.2 ไมโครกรัมโปรตีน)
5. CGTase จากคอลัมน์ Sephadex G-100 (0.2 ไมโครกรัมโปรตีน)

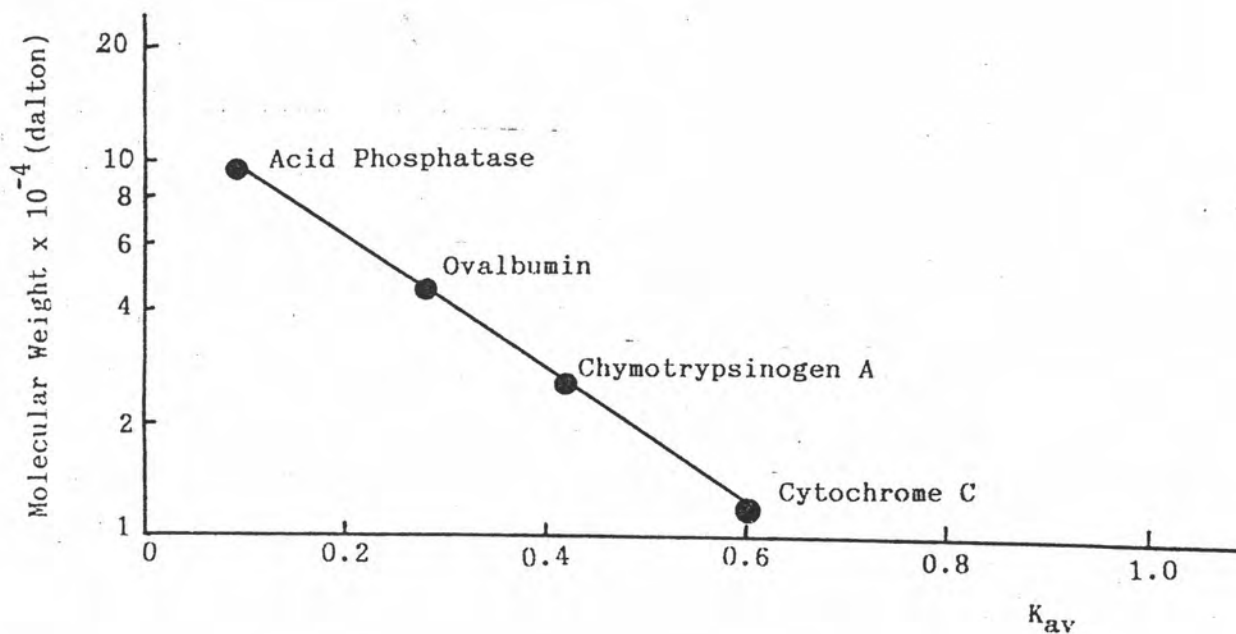
4.10.1 ผลการศึกษาหน้าหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี - 100

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายเอนไซม์ที่ออกจากคอลัมน์ DEAE-cellulose peak แรก ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี - 100 แล้วชะด้วยทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 15 mM pH 8.5 ที่มี NaCl 0.1 M (วิธีทดลองข้อ 3.7.2.1) ผลการทดลอง (รูปที่ 21) พบว่า โปรตีนมาตรฐาน Acid phosphatase , ovalbumin , chymotrypsinogen และ cytochrome C จะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ด้วย elution volume 86 , 112 , 130 และ 154 มล. ตามลำดับ ($K_{av} = 0.09, 0.28, 0.42$ และ 0.60 ตามลำดับ) (รูปที่ 22) ในขณะที่เอนไซม์ CGTase ถูกชะออกจากคอลัมน์หลังโปรตีนมาตรฐาน cytochrome C คือที่ elution volume 184 มล. คำนวณค่า $K_{av} = 0.82$ จึงไม่สามารถหาหน้าหนักโมเลกุลของเอนไซม์ CGTase ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี - 100 ได้จากการทดลองนี้

4.10.2 ผลการศึกษาหน่วยย่อยและหน้าหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ด้วยวิธีเอสดีเอส - โพลีอะคริลามิด เจล อิเล็กโตรฟอริซิส

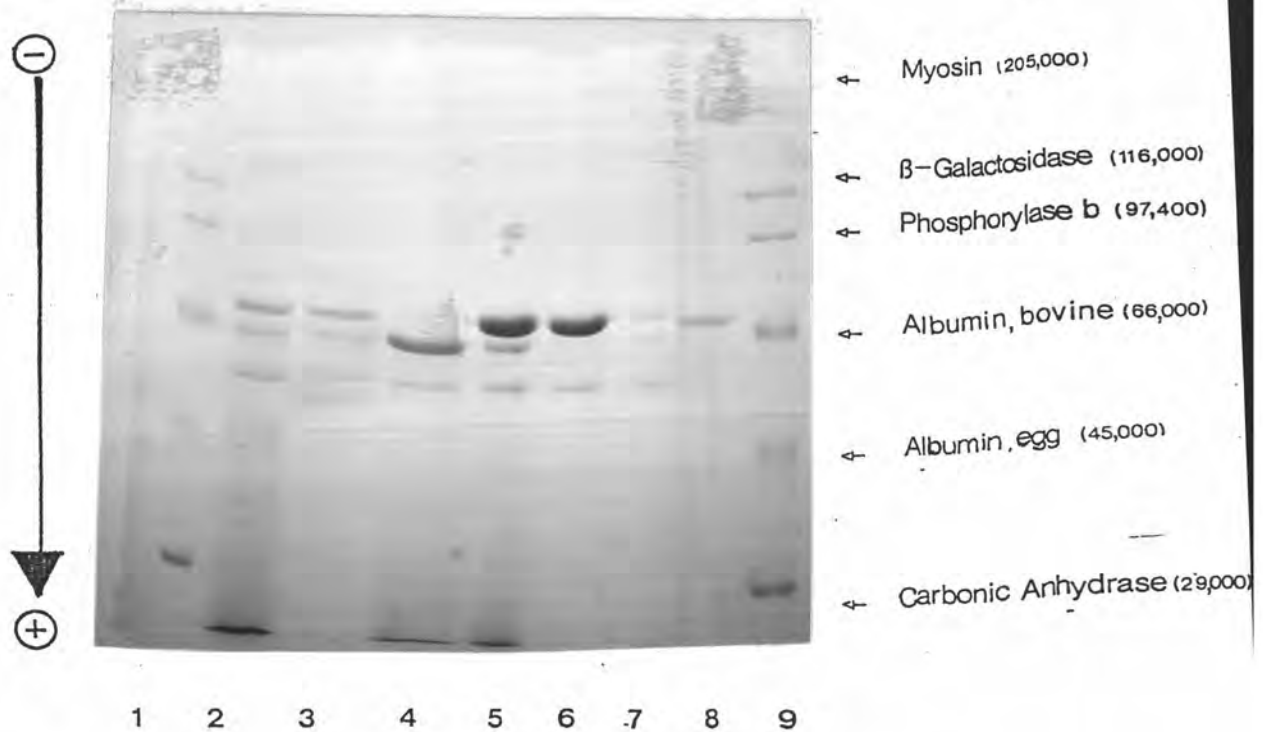
นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) และสารละลายเอนไซม์ที่แยกให้บริสุทธิ์บางส่วน ไปทำ SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis ตามวิธีข้อ 3.7.2 ผลการทดลอง (รูปที่ 23) พบว่า crude enzyme (Lane 2) จะปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ หลังจากผ่านขั้นตอนดูดซับโดยแป้งแล้ว จะเหลือแถบโปรตีนชัดเจน 3 แถบ (Lane 3) หลังจากการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 % แถบล่าง 2 แถบจะปรากฏชัดเจนขึ้น ส่วนแถบบนซึ่งตรงกับแถบ CGTase ในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี - 100 จะหายไป (Lane 4) ซึ่งเมื่อนำตะกอนโปรตีนส่วนนี้ไปทำแอกติวิตีของเอนไซม์ พบว่า มีน้อยมาก (yield ประมาณ 0.93 %) (ตารางที่ 8) หลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80 % พบว่า ปรากฏแถบชัดเจน 3 แถบ แต่แถบบนสุดจะปรากฏชัดเจนกว่าแถบโปรตีนอื่น (Lane 5) หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose พบว่า peak A ที่ออกจากคอลัมน์ปรากฏแถบ 2 แถบ โปรตีนแถบกลางหายไป (Lane 6) ส่วน peak B ที่ออกจากคอลัมน์หลังผ่าน linear salt gradient และมีแอกติวิตี





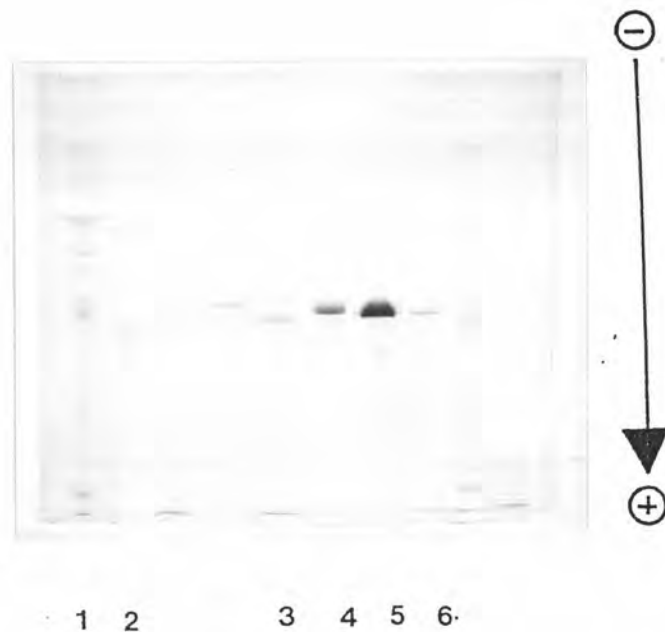
รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ CGTase โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 (ขนาดคอลัมน์ 1.8 x 85 ซม.) (วิธีทดลองข้อ 3.7.1)

Acid Phosphatase	MW	95,000	dalton
Ovalbumin	MW	45,000	dalton
Chymotrypsinogen	MW	25,000	dalton
Cytochrome C	MW	12,400	dalton



รูปที่ 23 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่างๆ ของการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดย เอสดีเอส - โพลีอะคริลามัด เจล อีเลคโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 30 mM ต่อแผ่นเจล อุณหภูมิ 10° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (วิธีทดลองข้อ 3.7.2.)

1. Standard mixture of Myosin, β -Galactosidase, Phosphorylase B , BSA , Albumin , egg และ Carbonic Anhydrase (30 ไมโครกรัมโปรตีน)
2. crude enzyme (110 ไมโครกรัมโปรตีน)
3. CGTase จากการดูดซับโดยแป้ง (15 ไมโครกรัมโปรตีน)
4. CGTase จากแอมโมเนียมซัลเฟต 0-40 % (30 ไมโครกรัมโปรตีน)
5. CGTase จากแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 % (30 ไมโครกรัมโปรตีน)
6. CGTase จากคอลัมน์ DEAE - cellulose peak A (15 ไมโครกรัมโปรตีน)
7. CGTase จากคอลัมน์ DEAE - cellulose peak B (15 ไมโครกรัมโปรตีน)
8. CGTase จากคอลัมน์ Sephadex G-100 (5 ไมโครกรัมโปรตีน)
9. Standard mixture (เหมือน Lane 1)



รูปที่ 24 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและ เอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่างๆ ของการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดย เอสดีเอส - โพลีอะคริลามด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 30 mA ต่อแผ่นเจล อุณหภูมิ 10° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (วิธีทดลองข้อ 3.7.2.)

1. Standard mixture of Myosin, β -Galactosidase, Phosphorylase B , BSA , Albumin , egg และ Carbonic Anhydrase (30 ไมโครกรัมโปรตีน)
2. α Amylase from bacteria (40 ไมโครกรัมโปรตีน)
3. CGTase จากแอมโมเนียมซัลเฟต 0-40 % (30 ไมโครกรัมโปรตีน)
4. CGTase จากแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 % (30 ไมโครกรัมโปรตีน)
5. CGTase จากคอลัมน์ DEAE - cellulose peak A (20 ไมโครกรัมโปรตีน)
6. CGTase จากคอลัมน์ Sephadex G-100 (5 ไมโครกรัมโปรตีน)

ของเอนไซม์ CGTase เล็กน้อย จะปรากฏแถบจาง ๆ 3 แถบ เช่นเดียวกับหลังการดูดซับโดยแป้ง (Lane 7) หลังจากผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่า จะเหลือแถบโปรตีนชัดเจนเพียงแถบบนสุดแถบเดียว (Lane 8) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานแล้ว (Lane 1 และ Lane 9) สามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 72,000 ดาลตัน (รูปที่ 25)

4.11 ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วนกับ crude enzyme

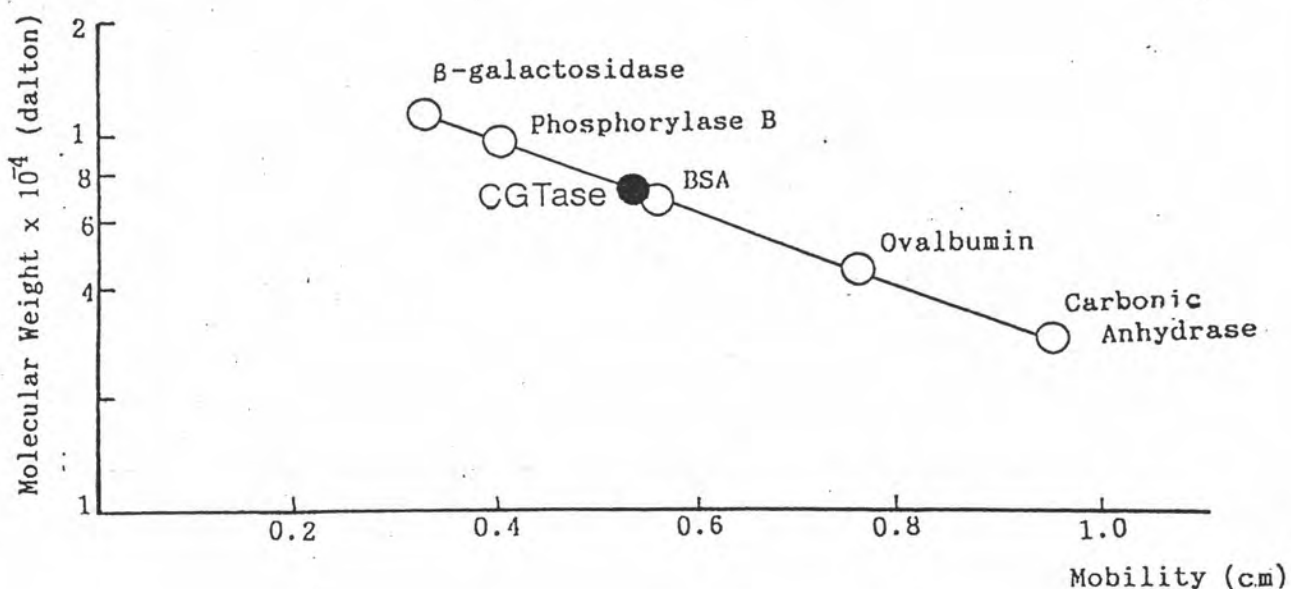
เมื่อเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมมาให้บริสุทธิ์บางส่วนว่าแตกต่างจาก crude enzyme หรือไม่ จึงนำเอาสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการแยกด้วย Sephadex G-100 ไปทำการทดลองดังนี้

4.11.1 ผลการศึกษาผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ในบัฟเฟอร์ pH 3-11 (ใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ในข้อ 3.2.1.1-3.2.1.5) วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยดูจาก Dextrinizing activity (ข้อ 3.1.1) และ CD-TCE activity (ข้อ 3.6.2) ผลการทดลอง (รูปที่ 26) จะเห็นว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วนอยู่ในช่วง 5-8 แต่เอนไซม์ยังทำงานได้ในช่วง pH 3-10 ที่ pH 11 จะทำลายแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งหมด การวัด dextrinizing activity จะทำได้ดีเฉพาะในช่วง pH 5-8

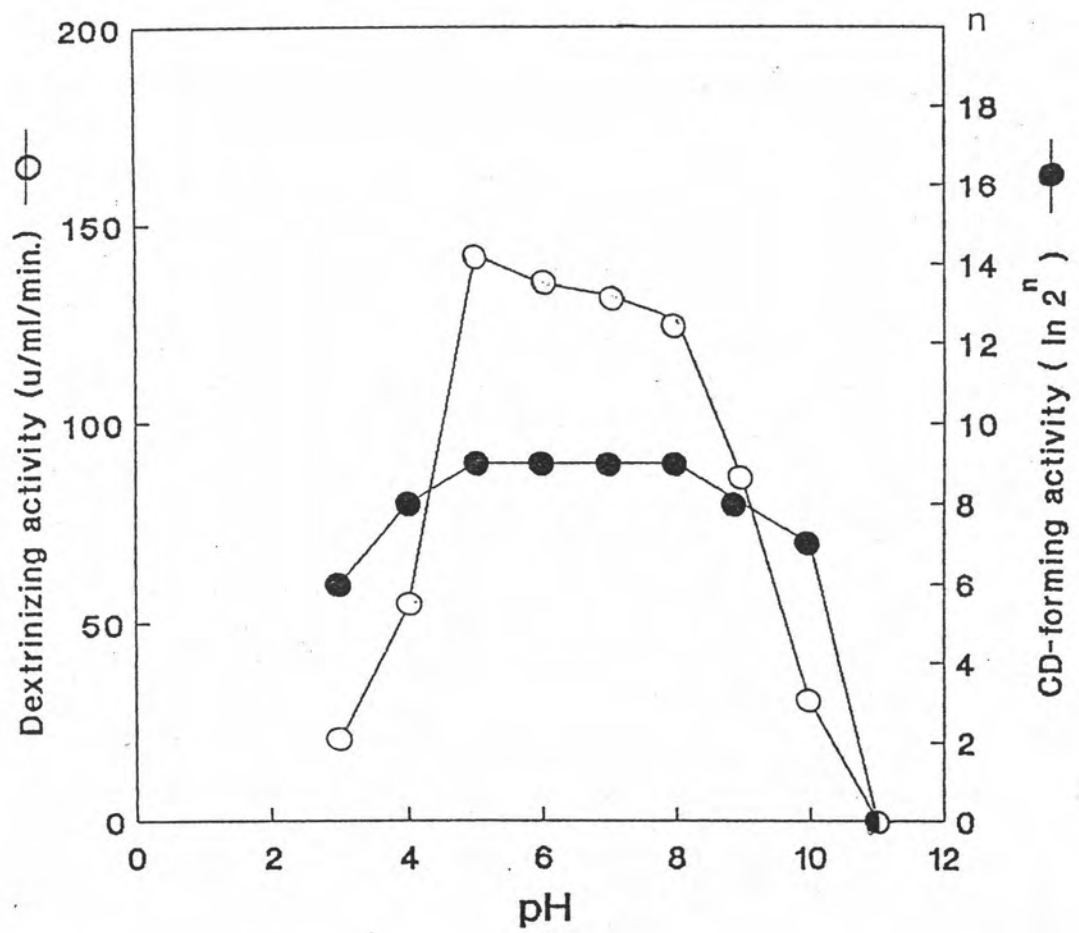
4.11.2 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 มาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ (วิธีข้อ 3.6.1 และ 3.6.2) โดยเปลี่ยนสภาวะการทดลอง จากอุณหภูมิ 40 °C เป็น 20-70 °C ผลการทดลอง (รูปที่ 27) พบว่า CGTase เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ



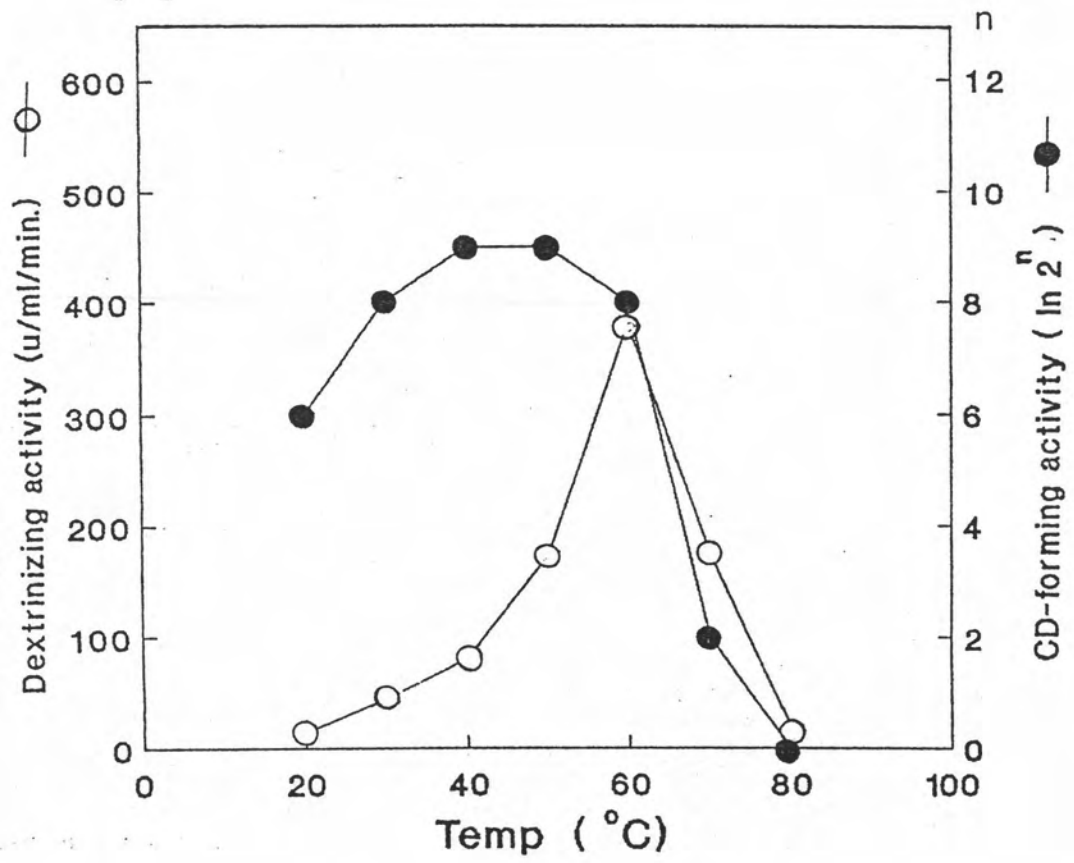
รูปที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ CGTase โดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะคริลามัด เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

β -galactosidase	MW	116,000	dalton
Phosphorylase B	MW	97,000	dalton
BSA	MW	66,000	dalton
ovalbumin	MW	45,000	dalton
Carbonic Anhydrus	MW	29,000	dalton
CGTase	MW	72,000	dalton



รูปที่ 26 ผลของความเป็นกรด - ด่างต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์

Sephadex G-100



รูปที่ 27 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ เอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

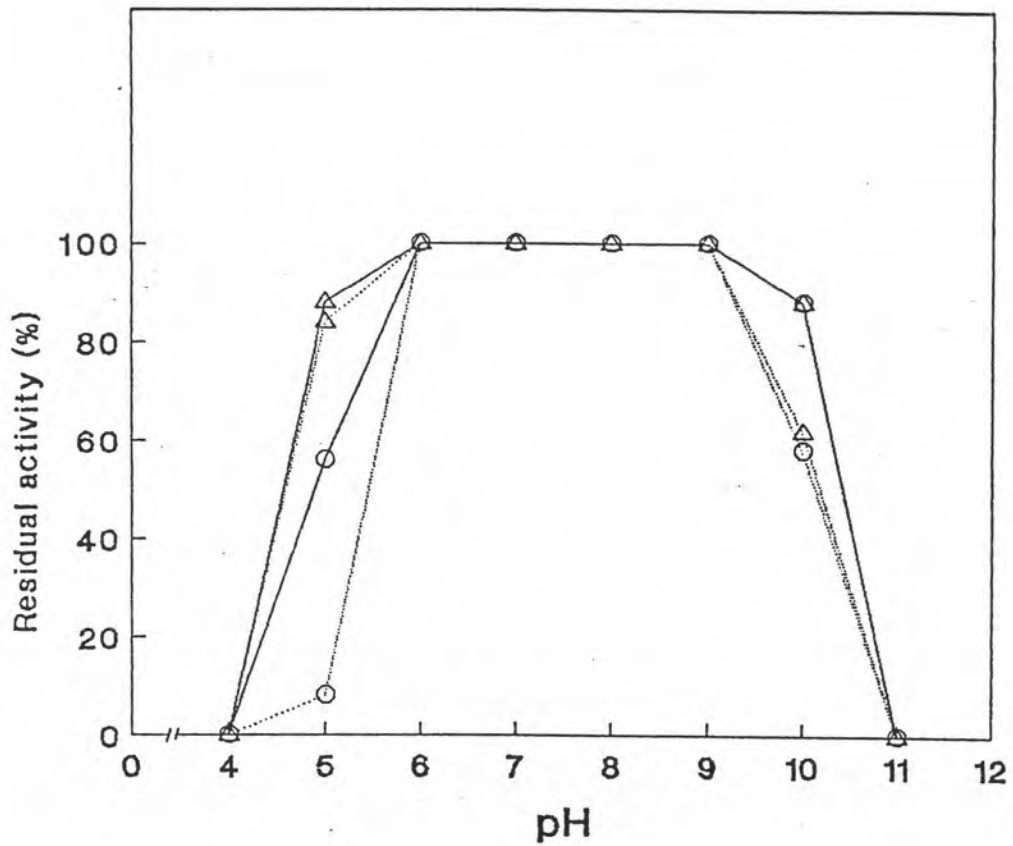
30-60 °C โดยมี optimum temperature อยู่ในช่วง 40-50°C แอคติวิตีของเอนไซม์ ลดลงมากที่อุณหภูมิ 20 °C หรือสูงกว่า 60 °C ส่วน dextrinizing activity มี optimum temperature ที่ 60 °C ส่วนที่อุณหภูมิต่ำอื่น ๆ จะเหลือแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย (0-50 %)

4.11.3 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase

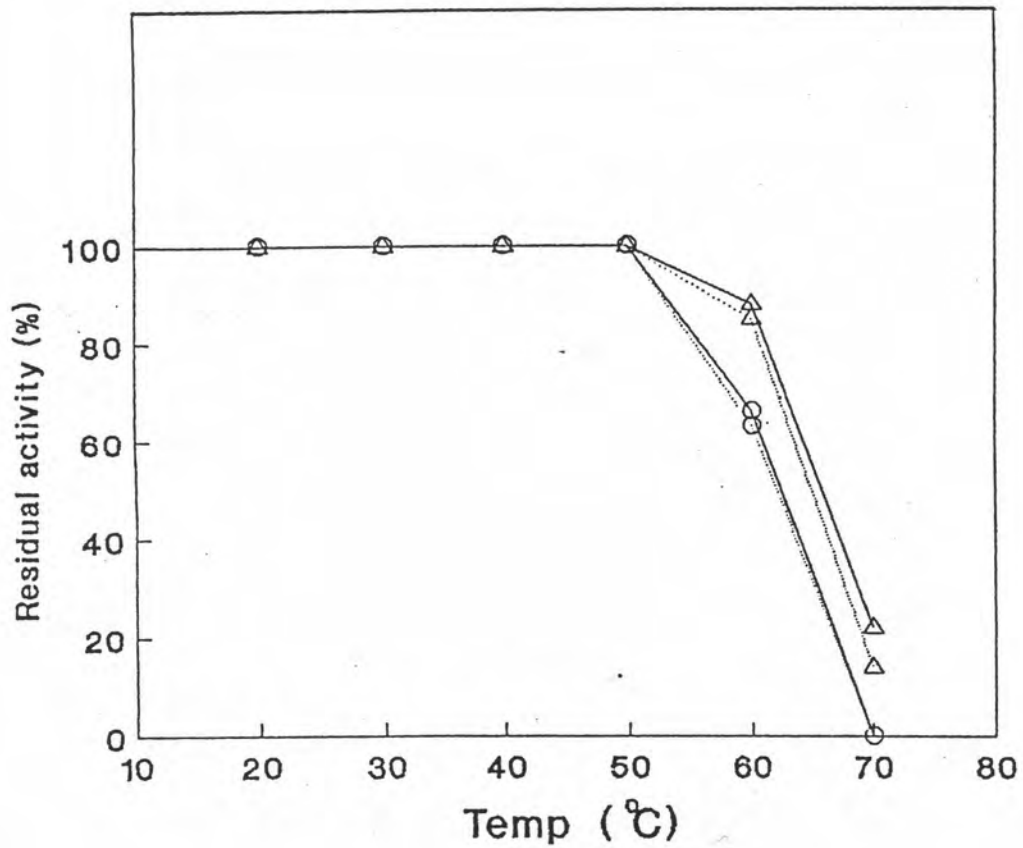
บ่มสารละลายเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ตั้งแต่ pH 4-11 (ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) ซึ่งมีและไม่มี CaCl_2 10 mM ตามวิธีทดลองในข้อ 4.6.3.2 ผลการทดลอง (รูปที่ 28) จะเห็นว่าแอคติวิตีของ CGTase และ dextrinizing activity มีความเสถียรสูงที่ pH 6-9 แต่ pH ต่ำกว่า 6 และสูงกว่า 9 จะทำลายแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ที่ pH 4-11 การเติม CaCl_2 จะช่วยให้ CGTase มีความเสถียรมากขึ้น เฉพาะที่ pH 4 โดยแอคติวิตีของ CGTase ที่ pH 4 เพิ่มจากเดิมซึ่งมี activity ประมาณ 60% เป็น 90% ส่วน dextrinizing activity จะทนต่อภาวะกรด-ด่าง ได้ดีกว่า CGTase เล็กน้อย และพบว่า การเติม CaCl_2 10 mM จะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 5 เพิ่มขึ้นประมาณ 70 % ส่วนที่ pH อื่น ๆ Ca^{++} ไม่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์

4.11.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30-80 °C ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6 ที่เติม CaCl_2 10 mM และไม่ได้เติม CaCl_2 เป็นเวลา 15 นาที นำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ ตามวิธีข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น ผลการทดลอง (รูปที่ 29) จะเห็นว่า แอคติวิตีของ CGTase และ dextrinizing activity มีความทนทานต่ออุณหภูมิ 0-50 °C ที่อุณหภูมิ 60 °C แอคติวิตีของ CGTase จะเหลือ 65 % การเติม CaCl_2 10 mM จะช่วยให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นเป็น 85 % และในทางตรงกันข้าม การเติม CaCl_2 จะช่วยเพิ่ม dextrinizing



รูปที่ 28 ผลของความเป็นกรด - ด่างต่อความเสถียรของ เอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4-11 ที่ 40 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปรับ pH ให้เป็น 6 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH 6 นำไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือโดยวิธี Dextrinizing activity (\circ -Ca²⁺, \triangle +Ca²⁺) และ CGTase - activity (\ominus -Ca²⁺, \triangleleft +Ca²⁺) เปรียบเทียบกับ แอกติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์



รูปที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 บ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่ 4 °ซ นำไปวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ โดยวิธี Dextrinizing - activity (\circ - Ca²⁺, \triangle + Ca²⁺) และ CGTase - activity (\circ - Ca²⁺, \triangle + Ca²⁺) เปรียบเทียบกับ แอกติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์

activity จาก 65% เป็น 90% เอนไซม์จะเสียดสภาพที่อุณหภูมิ 70 °ซ ขึ้นไป การเติม CaCl_2 จะช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ที่ 70 °ซ โดยจะมีแอกติวิตีเหลือประมาณ 15-20 %

4.12 การจำแนกชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ CGTase

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ (crude enzyme) และสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ตามวิธีข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 โดยเปลี่ยนสับสเตรทของเอนไซม์จาก Soluble starch เป็นแป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และแป้งมันสำปะหลัง วัดแอกติวิตีของเอนไซม์โดยวิธี dextrinizing activity และ CD-forming activity ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10 จะเห็นว่า การจำแนก soluble starch เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ จะได้แอกติวิตีของ CGTase สูงกว่าการจำแนกชนิดอื่นเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ ยกเว้นแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งจะให้ตะกอน CD เท่าหรือใกล้เคียงกับ soluble starch

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบแอกติวิตีของ เอนไซม์ CGTase เมื่อใช้แป้งต่างชนิดกันเป็นสับสเตรตของ เอนไซม์

	CRUDE ENZYME		PARTIALLY PURIFIED ENZYME	
	DEXTRINING ACTIVITY	CD-TCE	DEXTRINING ACTIVITY	CD-TCE
	(unit/ml/min)	(dilution limit,n)	(unit/ml/min)	(dilution limit,n)
soluble starch	107.692	9	179.775	14
แป้งข้าวเจ้า	188.341	7	356.522	11
แป้งข้าวโพด	59.306	7	68.966	12
แป้งข้าวเหนียว	*	8	*	12
แป้งมันสำหรั่ง	105.000	9	253.589	13
แป้งสาลี	249.135	7	280.783	11

* วัดได้เป็นสีม่วงแดง