สมบัติของเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนด่าง *Bacillus* sp. PS304 และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

Properties of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) Produced from Alkaline-tolerant *Bacillus* sp. PS304 and Media Optimization

นิศารัตน์ ดำเนียร

Nisarat Damnian

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2540

เลขหมู่ QP601 น65 2540 ฉ.2

Bib Key 210910

....../....../......

ชื่อวิทยานิพนธ์ สมบัติของเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนด่าง *Bacillus* sp. PS304 และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ผู้เขียน นางสาวนิศารัตน์ ดำเนียร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

....กรรมการ
(อาจารย์ผ่องผกา เธียรมนตรี)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

....กรรมการ
(อาจารย์ผ่องผกา เธียรมนตรี)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทร โสตถิพันธุ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	สมบัติของเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนด่าง *Bacillus* sp. PS304 และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม
ผู้เขียน	นางสาวนิศารัตน์ ดำเนียร
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา	2539

บทคัดย่อ

การทำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ตรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส (CGTase) ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซ็นต์ และดีอีเออี-เซลลูโลสคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่า เอนไซม์ซีจีทีเอสมีความบริสุทธิ์ขึ้น 27 เท่า มีความเสถียรที่พีเอช 4 ถึง 11 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอนไซม์มีความเสถียรจนถึงอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอนไซม์ซีจีทีเอสมีน้ำหนักโมเลกุล 76,000 ดัลตัน ซึ่งตรวจโดย SDS-PAGE ส่วนค่า Vmax และ Km สำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ตรินมีค่าเท่ากับ 0.0066 ไมโครโมลต่อนาที และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้บางส่วนโดยคอปเปอร์อิออน (Cu^{2+}) 10 มิลลิโมลาร์ และถูกยับยั้งทั้งหมดโดย 3,4-ดีซีไอ (3,4-dichloroisocoumarin) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ซีจีทีเอสประกอบด้วยกรดอะมิโนโปรลีนมากที่สุด และรองลงมาคือ กรดแอสพาติค, กรดกลูตามิค และอะลานีน ตามลำดับ กรดอะมิโนที่ตรวจพบปริมาณน้อยคือ ซีสทีอีน และฮีสติดีน และกรดอะมิโนที่ตรวจไม่พบคือ ไกลซีน, เมทไธโอนีน และทริปโตเฟน

ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหาร starch medium พีเอช 8 ซึ่งเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมยีสต์สกัด 1 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งซีจีทีเอสได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่เติมยีสต์สกัด และเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี

ยีสต์สกัด พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 เติบโตได้ดีกว่าเดิม 1.5 เท่า สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ตรินได้มากกว่าเดิม 2.2 เท่า และผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสได้เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า

การโคลนยีนซีจีทีเอสขนาด 1.4 กิโลเบส จาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 เข้า *Escherichia coli* DH5α โดยใช้พลาสมิด pBluescript พบว่า รีคอมบิแนนท์ *E. coli* สามารถย่อยแป้งโดยเห็นวงใสรอบโคโลนี แต่ไม่สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ตรินเป็นผลผลิตสุดท้าย

Thesis Title	Properties of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) Produced from Alkaline-tolerant *Bacillus* sp. PS304 and Media Optimization
Author	Miss Nisarat Damnian
Major Program	Biological Sciences
Academic Year	1996

Abstract

A cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) produced from *Bacillus* sp. PS304 was purified upto 27 folds by ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose column chromatography. The purified enzyme was stable at a pH range from 4 to 11 for 2 hours. The enzyme was stable up to 45 ^{o}C for 2 hours. The apparent molecular weight as determined by SDS-PAGE was 76 Kd. The maximum rate of formation of cyclodextrin (Vmax) and the Michaelis-Menten constant (Km) were 0.0066 μmol/min and 0.05 mg/ml, respectively. The enzyme activity was found partially suppressed by 10 mM copper ion (Cu^{2+}) and was completely inhibited in the presence of 3,4-dichloroisocoumarin at 1 mM. From amino acid analysis, the purified enzyme contained high amounts of proline, aspartic acid, glutamic acid and alanine, relatively low amounts of cysteine and histidine, and was devoid of glycine, methionine and tryptophan.

Bacillus sp. PS304 produced the highest amount of CGTase when cultivated in the starch medium pH 8.0 in the presence of 1% yeast extract.When 1% NaCl was added to starch medium supplemented with 1% yeast extract , *Bacillus* sp. PS304 grew 1.5 times better than in the medium without any supplement, with 2.2 times higher in the production of cyclodextrins (CDs), and 1.7 times more enzyme secretion.

When a 1.4 Kb CGTase gene from *Bacillus* sp. PS304 was cloned into *Escherichia coli* DH5α using plasmid pBluescript, the recombinant *E. coli* expressed starch hydrolysing activity as evidenced by clear zone around the colony but did not produce cyclodextrin as end product.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จได้ด้วยดี พร้อมทั้งอาจารย์ผ่องผกา เธียรมนตรี, รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาแนะนำ และแก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์กาญจนา วีระเดชาพล, วนัสนันท์ ธัญญพาณิชย์, อาจารย์ลัดดา ปรีชาวีรกุล ประจำภาควิชาคณิตศาสตร์, คุณจิตติมา ยอดสกุล เจ้าหน้าที่งานบริการการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์, นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน รวมทั้งเพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และ คุณแม่ รวมทั้งพี่สาวที่ได้ให้ความห่วงใย และให้กำลังใจตลอดจนให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

นิศารัตน์ คำเนียร

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	62
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	63
วัสดุ	63
อุปกรณ์	63
วิธีการ	68
3. ผลการทดลอง	86
4. วิจารณ์	116
5. สรุป	123
เอกสารอ้างอิง	125
ภาคผนวก	140
ประวัติผู้เขียน	142

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ชนิดของแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง	5
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต	64
3. ส่วนประกอบของเจลสำหรับ SDS-PAGE	74
4. ผลของแต่ละขั้นตอนในการทำเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ให้บริสุทธิ์	87
5. สมบัติของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	92
6. ผลของอิออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	94
7. ผลของสารเคมีอื่นๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	96
8. ปริมาณกรดอะมิโนของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	99
9. ผลของ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	100
10. ผลของเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	102

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11. ผลการทำงานร่วมกันของเกลือชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	104
12. การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ระหว่างในอาหารที่มีการเติม และไม่มีการเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์	108

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	โครงสร้างทางเคมีของ α-, β- และ γ-CD	48
2.	การทำ SDS-PAGE ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนมาตรฐานกับโปรตีนที่ผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส	88
3.	ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์	90
4.	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์	91
5.	กราฟ Line weaver-Burk แสดงค่า Vm และ Km ของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	97
6.	จลนศาสตร์ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ และ yeast extract ที่มีพีเอช 8.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	106
7.	จลนศาสตร์ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์,โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ที่มีพีเอช 8.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	107
8.	ผลจากการทำ partial digestion ของดีเอ็นเอจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS304	110
9.	การโคลนยีนซีจีทีเอสของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ใน *E. coli* DH5α	112

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

10. เปรียบเทียบโคโลนีของ *E. coli* (PS818) กับโคโลนีของ *E. coli* ที่เป็นตัวควบคุม 113
11. ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 114
12. ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 115

ตัวย่อและสัญลักษณ์

α	=	alpha
&	=	and
β	=	beta
BSA	=	bovine serum albumin
^{o}C	=	degree Celcius
CDs	=	cyclodextrins
CGTase	=	cyclodextrin glycosyltransferase
3,4 DCI	=	3,4-dichloroisocoumarin
DEAE-cellulose	=	diethylaminoethyl-cellulose
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
γ	=	gamma
HPLC	=	high performance liquid chromatography
hr	=	hour
Kb	=	kilobase
Kd	=	kilodalton
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
M.W.	=	molecular weight
μ	=	specific growth rate
pH	=	-log hydrogen ion concentration
PMSF	=	phenylmethylsulphonyl fluoride
SDS	=	sodium dodecyl sulfate

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

td	=	doubling time
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethyl aminomethane) hydrochloride
TCE	=	trichloroethylene
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
w/v	=	weight by volume

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ตรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส (CGTase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะ แอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ในแป้ง ทำให้ได้ไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งแบ่งได้ 3 ประเภท คือ แอลฟา-, บีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน โดยมีลักษณะเป็นวงแหวน ประกอบด้วยกลูโคส 6, 7 หรือ 8 หน่วย ตามลำดับ ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ซึ่งไซโคลเดกซ์ตรินสามารถจับกับโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน และมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านกายภาพ และทางเคมี จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านอาหาร, เคมี, ยา, เครื่องสำอางค์ และอุตสาหกรรมพลาสติค โดยใช้เป็น อิมัลซิไฟเออร์ (emulsifiers), ตัวป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (anti-oxidant) และสารช่วยให้คงตัว (stabilizing agents) โดยบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะถูกนำมาใช้ และมีการพัฒนาการนำไปใช้กันอย่างกว้างขวางเมื่อเปรียบเทียบกับ แอลฟา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน โดยที่แอลฟา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะมีราคาสูงมากสำหรับนำมาใช้ทางด้านอุตสาหกรรม เพราะว่าในการทำให้แอลฟา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตรินบริสุทธิ์นั้นจะมีวิธีการที่ซับซ้อนกว่า บีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งชนิดของไซโคลเดกซ์ตรินที่ผลิตได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ชนิดนี้จะแตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอส ได้แก่ *Bacillus* sp. เช่น *Bacillus marcerans, Bacillus circulans, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus, Bacillus ohbensis* และ *Bacillus* sp. ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง นอกจากนี้มี *Klebsiella pneumoniae* M5a1, *Micrococcus* sp. และ *Thermoanaerobacter* sp. โดยในการผลิตไซโคลเดกซ์ตรินจะใช้แป้งเป็นสับสเตรทเนื่องจากแป้งมีราคาถูก และให้ผลผลิตของไซโคลเดกซ์ตรินในปริมาณที่สูง ซึ่งเป็นข้อดีในการนำมาใช้ทางด้านอุตสาหกรรม ไซโคลเดกซ์ตริน จึงเป็นที่ต้องการของตลาดอย่างมาก จึงมีการศึกษาการพัฒนาการผลิตไซโคลเดกซ์ตริน โดยให้ความสนใจกับการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ตริน และจินตนา (2538) ได้แยกเชื้อ

แบคทีเรียที่ทนด่าง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 จากตัวอย่างดิน ซึ่งเติบโตได้ที่พีเอช 5.0-9.5 แต่มีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสย่อยแป้งได้ผลผลิตเป็นไซโคลเดกซ์ตริน ในอัตราส่วน แอลฟา: บีตา: แกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน เท่ากับ 1.1: 4.8: 1 ตามลำดับ (จินตนา, 2538) ดังนั้นเพื่อให้เข้าถึงเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 จึงได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์, ศึกษาสมบัติของเอนไซม์, สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และการโคลนยีนเข้า *E. coli* DH5α

การตรวจเอกสาร

1.1 แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (alkalophilic bacteria)

จุลินทรีย์จะปรากฏอยู่ทั่วไปบนพื้นผิวโลก ตั้งแต่บริเวณที่อุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์ไปจนถึงบริเวณบ่อน้ำพุร้อน, บริเวณใต้ทะเลลึก และในน้ำที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เติบโตได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ซึ่งหมายถึง พวกนิวโตรไฟล์ (neutrophile) แต่อย่างไรก็ตามมีการแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียได้หลายกลุ่มตามการเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่างสูง ซึ่งสามารถแบ่งอย่างกว้างๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ

1.1.1 แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 7.0-9.0 แต่ไม่สามารถเติบโตได้ที่พีเอชสูงกว่า 9.5 (alkaline-tolerant organism)

1.1.2 แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 10.0-12.0 (extreme alkalophilic organism) โดยพวกนี้ยังแบ่งย่อยได้ดังนี้

1.1.2.1 แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่พีเอช 10.0 หรือสูงกว่านี้ แต่จะสามารถเติบโตได้ในช่วงพีเอชที่เป็นกลางเช่นกัน (facultative alkalophiles) ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะเป็นที่สนใจในการนำมาใช้ในการทดลอง เพื่อตรวจสอบโครงสร้างและหน้าที่ที่ทำให้เซลล์เติบโตได้ในที่พีเอชมีค่าสูง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาพวกแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง โดยรวมถึงส่วนประกอบของไขมันที่อยู่ในชั้นของเมมเบรน, อัตราส่วนของไลปิด และโปรตีนที่อยู่ในชั้นเมมเบรน, ระดับของส่วนประกอบที่อยู่ในห่วงโซ่หายใจในชั้นของเมมเบรน, ปริมาณของกรดอะมิโน (acid amino acid) ที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่หลั่งออกมา และวัฏจักรของโซเดียมอิออนที่ทำให้มีการนำสารไปใช้ และทำให้เกิดการคงที่ของพีเอช (Krulwich และ Guffanti, 1983)

1.1.2.1 แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่พีเอชมากกว่า 10.0 แต่ไม่สามารถเติบโตได้ที่พีเอชต่ำกว่า 8.5-9.0 (obligate alkalophiles)

แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างเป็นพวกที่สนใจ และจากการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านจุลชีววิทยา โดยที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่จะนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม (Krulwich และ Guffanti, 1989)

1.2 การกระจายของแบคทีเรียที่เติบโตได้ในสภาวะที่เป็นด่าง (biodiversity of alkalophiles)

จากรายงานครั้งแรกของจุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่างสูงนั้นปรากฏมามากกว่า 60 ปีแล้วโดยจากรายงานเป็นพวก alkaline-tolerant nitrifying bacteria และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus faecalis* ซึ่งเป็นพวกที่เติบโตได้ในสภาวะที่เป็นด่าง (อ้างโดย Krulwich และ Guffanti, 1989) ซึ่งปัจจุบันนี้แบคทีเรียที่เติบโตได้ในสภาวะที่เป็นด่างเป็นที่รู้ว่าเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างภายในกลุ่ม คือตั้งแต่พวก *Eubacteria* เช่น *Bacillus* spp. ไปจนถึงพวก *Archaebacteria* เช่น *Natronobacterium* spp. ซึ่งสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยที่แบคทีเรียที่เติบโตได้ในสภาวะที่เป็นด่างเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) หรือพวกที่เติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) แต่ก็มีบางพวกที่เติบโตได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน คือสายพันธุ์ *Clostridium* และ *Methanobacterium* (Krulwich และ Guffanti, 1989)

จุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่างเป็นที่สนใจมาก เนื่องจากเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ของจุลินทรีย์พวกนี้จะมีความคงตัวในสภาวะที่เป็นด่าง โดยที่เอนไซม์ที่ได้จากพวกแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิที่สูง (thermophilic alkalophiles) อาจจะคงตัวได้ทั้งในสภาวะที่เป็นด่างและที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ (Krulwich และ Guffanti, 1989)

Kitada และคณะ (1987) ได้อธิบายเกี่ยวกับแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่างและมีอุณหภูมิสูง (thermophilic alkalophiles) ซึ่งใช้เรียก *Bacillus* sp. 1C ซึ่งต่อมาได้วิเคราะห์แล้วว่าเป็น *Bacillus licheniformis* โดยที่ *Bacillus* sp. 1C นี้ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส และเติบโตได้ดีมากในช่วงพีเอชระหว่าง 8.0 และ 10.0 แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่เติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกลาง โดยได้พิสูจน์เอนไซม์ที่ผลิตภายในเซลล์ชนิดหนึ่งคือ อีนอลเลส (enolase) พบว่ามีความเสถียรจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง

ตารางที่1 ชนิดของแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง

Group	pH range for growth	Natural habitat
Eubacteria		
Gram-negative photo-autotrophs		
Spirulina sp.	8.0-11.0	Alkaline soda lakes, Rift Valley, pH 10.5
Synechococcus sp.	6.5-10.0, optimum pH 8.0	Yellowstone, 55 °C, pH 5.5
Ectothiorhodospira sp.	8.0-10.0	mud from alkaline salt lakes, pH 11.0
Gram-negative nonendosporeformers		
Aeromonas sp.	7.0-10.0	Soil
Flavobacterium sp.	7.0-11.2	Soil
Vibrio alginolyticus	6.0-9.2	Seawater
Gram-positive nonendosporeformers		
Exignobacterium sp.	7.0-11.5, optimum 8.5-9.5	Potato-processing effluent
Actinomyces sp.	8.0-11.5, optimum 9.0-9.5	Soil
Streptococcus sp.	5.0-11.0, optimum 8.0-9.0	Alkaline potato-processing effluent
Coryneform bacteria	6.6-9.5	Seawater
Gram-positive endosporeformers		
Clostridium sp.	8,0-11.3, optimum 9.5	Alkaline springs
Bacillus alkalophilus	8.5-11.5, optimum 10.6	Soil (acid-alkaline)

ตารางที่1 ชนิดของแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง (ต่อ)

Group	pH range for growth	Natural habitat
Gram-positive		
endosporeformers		
Bacillus strain A007	9.0-11.0	Soil
Bacillus strain WN13	8.0-11.5, optimum 9.0-9.5	Soil
Archaebacteria		
Aerobes		
Natronobacterium sp.	optimum 9.0-10.0	Alkaline saline lakes
Natronococcus sp.		
Anaerobes		
Methanobacterium	6.5-10.0	Biogas plant, optimum
thermoalkaliphilum		pH 7.5-8.5

Methanobacterium thermoalkaliphilum (Blotevogel และคณะ, 1985) เป็น thermophilic methanogen พวกแรก จะเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชที่สูง โดยเติบโตได้จนถึงพีเอช 9.0-9.5 แต่จะเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 7.5 และ 8.5 ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้แสดงให้เห็นว่ามีการเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Kimura และ Horikoshi, 1988)

1.3 เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง

จุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่างสามารถผลิตเอนไซม์ต่างๆ ดังนี้

1.3.1 เซลลูเลส (cellulase; β-1,4-glucan 4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4)

เอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ตัดพันธะ บีตา-1,4 กลูโคซิดิค (β-1,4 glucosidic) ในเซลลูโลส (cellulose) หรือ เซลลูโลสที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือทางกายภาพ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Kulp, 1975) ดังนี้

1.3.1.1 เซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobiohydrolase; C1) จะทำหน้าที่ในการทำลายพันธะในผลึกของเซลลูโลส

1.3.1.2 บีตา-กลูคาเนส (β-glucanase) ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เอกโซ-บีตา-1,4-กลูคาเนส (exo-β-1,4-glucanase) และ เอนโด-บีตา-1,4-กลูคาเนส (endo-β-1,4-glucanase) โดยที่เอกโซ-บีตา-1,4-กลูคาเนส จะทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ในการแยกกลูโคสที่เชื่อมติดต่อกันหลายๆ หน่วย ซึ่งมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างตรงตำแหน่งคาร์บอน ส่วนเอนโด-บีตา-1,4-กลูคาเนส จะสุ่มแยกในเซลลูโลสทำให้ได้กลูโคสโดยการทำงานแบบนี้เป็น Cx-แอคทิวิตี (Cx-activity)

1.3.1.3 บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) จะมีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

Horikoshi และคณะ (1984) และ Fukumori และคณะ (1985) ได้รายงานแบคทีเรียที่แยกได้ใหม่ คือ *Bacillus* sp. No.N-4 และ No.1139 ที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (carboxymethylcellulase; CMCases) ในอาหารที่มีสภาวะเป็นด่าง โดยที่ *Bacillus* sp. No.N-4 ผลิตเอนไซม์มัลติ-คาร์บอกซี

เมททิลเซลลูเลส (multi-CMCases) ซึ่งสามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ 5.0-10.0 และ *Bacillus* sp. No.N-4 ที่แยกได้จากดินจะเป็นพวกแกรมบวก สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ โดยมีการสร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ จะมีลักษณะเป็นท่อน ซึ่งจะเหมือน *Bacillus pasteurii* แม้ว่าจะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตสูงกว่า *Bacillus pasteurii* โดยเอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ 5.0-10.0 และมีความเสถียรมากในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-10.0 และ CMCase นี้แยกได้จากการทำคอลัมน์โครมาโตรกราฟี (column chromatrography) โดยผ่านเซฟาเด็กซ์ จี-150 (sephadex G-150) และไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxy apatite) และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานสูงกว่า และได้มีการโคลนยีนของ *Bacillus* sp. No.N-4 ใน *E. coli* (Sashihara และคณะ, 1984)

นอกจากนี้ เซลลูเลสชนิดใหม่ที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. No.1139 ซึ่งส่วนใหญ่ทำงานได้ที่พีเอช 9.0 และยังคงรักษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 10.5 (Fukumori และคณะ, 1985) โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีความเสถียรในช่วงพีเอช ระหว่าง 6.0-11.0 จากการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิที่เพิ่มจนถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยเซลโลไตรโอส (cellotriose) หรือ เซลโลเตตราโอส (cellotetraose) แต่ไม่ย่อยเซลโลไบโอส (cellobiose) โดยที่เซลโลไตรโอสจะถูกเปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นผลิตผลหลัก (Horikoshi, 1990) และได้มีการโคลนยีนเซลลูเลสใน *E. coli* ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จะมีคุณสมบัติเหมือนกับเซลลูเลสที่ได้จาก *Bacillus* sp. No.1139 แต่จะมีขนาดของโมเลกุล 94 กิโลดัลตัน มากกว่า 92 กิโลดัลตัน ซึ่งอาจเป็นเพราะกระบวนการที่เกิดในตำแหน่งที่ต่างจากใน *Bacillus* sp. (Fukumori และคณะ, 1986) ต่อมา Ito และคณะ (1989) ได้ทำการแยก *Bacillus* sp. KSM-635 จากดินซึ่งมีลักษณะคล้าย *Bacillus* sp. NO.1139 และเป็นตัวที่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตเซลลูเลส

Shikata และคณะ (1990) ได้ทำการแยก *Bacillus* อีก 3 สายพันธุ์ คือ KSM-19, KSM-64 และ KSM-520 ซึ่งสามารถผลิตเซลลูเลสที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้เติมในผลิตภัณฑ์ผงซักฟอกเพื่อปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยที่การ

ทำงานของเอนไซม์จะไม่ถูกยับยั้งด้วยโลหะอิออน หรือ ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ผงซักฟอก เช่น สารลดแรงตึงผิว (surfactants), สารคีเลต (chelating agent) และโปรตีเนส (proteinases) ซึ่งเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 8.5-9.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ ต้องการคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการทำงานของเอนไซม์จะถูกควบคุมด้วยกลไกซึ่งรวมทั้งแคตทาโบไลท์รีเพรสชัน (catabolite repression) และอินดักชัน (induction)

การนำเซลลูเลสมาผสมลงในผงซักฟอกนอกเหนือจากการใช้โปรตีเอส เนื่องจาก ผ้าฝ้ายสามารถดูดซับสิ่งสกปรกได้ดี ซึ่งยากต่อการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารซักฟอกที่ใช้กันอยู่ โดยจะทำงานที่อุณหภูมิต่ำ แต่เมื่อมีการเติมเซลลูเลสจะทำให้สิ่งสกปรกถูกกำจัดได้ง่าย โดยพบว่าเซลลูเลสทำงานได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง และมีกิจกรรมการทำงานที่สูงภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง นอกจากนี้ยังมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง โดยเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. N-1 จะให้ผลดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามผลิตผลของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดนี้ยังไม่เพียงพอถ้ามองในแง่ของการนำมาใช้ทางอุตสาหกรรม (Horikoshi, 1990)

1.3.2 บีตา-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucanase)

เอนไซม์บีตา-1,3-กลูคาเนส ทำหน้าที่ย่อยบีตา-1,3-กลูแคน (β-1,3-glucan) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่พบในจุลินทรีย์บางชนิด เช่น รา, ยีสต์ และในพืชชั้นสูง (Horikoshi, 1990) ทำให้ได้ กลูโคส, ลามินาไรไบโอส (laminaribiose) และลามินาไรไตรโอส (laminaritriose) เป็นผลผลิตสุดท้าย

จากการรายงานเกี่ยวกับบีตา-1,3-กลูคาเนสซึ่งส่วนใหญ่พบว่า จะทำงานที่พีเอชค่อนข้างเป็นกรด ส่วน บีตา-1,3-กลูคาเนส ที่สามารถทำงานได้ที่พีเอชมากกว่า 8.0 นั้นได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. NO.K-12-5 และ *Bacillus* sp. No.221 ซึ่งแยกได้จากดินที่มีสภาพเป็นด่าง ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ซึ่งใช้ ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) ที่พีเอช 8.0 นำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (ammoniumsulfate) 70 เปอร์เซ็นต์ และทำเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้

เซฟาเด็กซ์ จี-100 หรือ จี-75 (sephadex G-100/ G-75) เอนไซม์บีตา-1,3-กลูคาเนสนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 40,000 และ 36,000 ดัลตัน (Horikoshi, 1990)

1.3.3 เอนไซม์ย่อยแมนแนน (mannan-degrading enzymes)

เอนไซม์ บีตา-แมนโนซิเดส (β-mannosidase) และ บีตา-แมนเนส (β-mannase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อย บีตา-ดี-แมนแนน (β-D-mannans) ทำให้ได้ ดี-แมนโนส (D-mannose) และ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (manno-oligosaccharides) ตามลำดับ (Horikoshi, 1990)

Akino และคณะ (1988a, 1988b) ได้ทำการแยก *Bacillus* sp. AM-001 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ บีตา-แมนโนซิเดส หรือ บีตา-แมนเนสได้ในปริมาณที่สูง และเอนไซม์ บีตา-แมนเนส ที่ผลิตและหลั่งออกมานอกเซลล์ คือ เอ็ม-I (M-I), เอ็ม-II (M-II) และ เอ็ม-III (M-III) นำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการนำตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซ็นต์ และทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) และนำมาหาขนาดของโมเลกุลด้วยวิธี เอสดีเอส-เพจ (SDS-PAGE) ซึ่งจะได้ 58,500 ดัลตัน (M-I), 59,500 ดัลตัน (M-II) และ 42,000 ดัลตัน (M-III) โดยที่เอนไซม์บีตา-แมนเนส เอ็ม-I และ เอ็ม II ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีที่พีเอช 9.0 ส่วน เอ็ม-II มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 8.5 นอกจากนี้ได้มีการนำยีนแมนเนส มาโคลนใน *E. coli* โดยใช้ pUC 19 เป็นเวคเตอร์ (vector) (Horikoshi,1990)

ส่วนเอนไซม์บีตา-แมนโนซิเดส ซึ่งได้นำมาทำให้บริสุทธิ์และนำมาทดสอบด้วย ไตรตรอน เอกซ์-100 (tritron X-100) จะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 94,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 5.5 โดยเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีที่พีเอช 6.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในช่วงพีเอชระหว่าง 6.5-8.0 (Horikoshi,1990)

1.3.4 ไลเปส (lipase; triacylglycerol acylhydrolase)

เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่ช่วยในปฏิกิริยาการย่อย ซึ่งผลผลิตที่ได้ขึ้นอยู่กับสภาวะของปฏิกิริยา โดยเมื่ออยู่ในอาหารเหลวจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ได้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งไลเปสจะจำเพาะกับพันธะ

ที่1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ปริมาณน้ำถูกจำกัด ไลเปสจะเร่งในการเกิดเอสเตอริฟิเคชัน (esterification) ของกรดไขมันให้ได้เป็นกลีเซอรอล, โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerols) และ ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerols) (Schuch และ Mukherjee, 1989) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะพบในจุลินทรีย์, พืช และสัตว์ โดยในจุลินทรีย์หลายชนิดจะผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาอย่างเดียว หรือรวมอยู่กับเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะไม่ถูกยับยั้งด้วยไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropyl fluorophosphate) และจะไม่สามารถย่อยเอสเตอร์ (ester) เช่น เมทธิลบิวทีเรท (methyl butyrate) และเอทธิลอะซิเตท (ethyl acetate) แต่จะย่อยน้ำมันจากธรรมชาติ และไขมัน ได้ดีเท่ากับกลีเซอไรด์ที่สังเคราะห์ (synthetic glycerides) (Shahani, 1975)

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สนใจ และมีการศึกษากันมาก โดยได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้เติมในสารซักฟอก และพบว่ามีเอนไซม์ไลเปสบางตัวที่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายกรดไขมัน (fatty acid) โดยพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั่วไปจะอยู่ในช่วง 5.0-8.0 แต่ก็มียกเว้นโดยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Penicillium crustosum* และ *Mucor lipolyticus* จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 9.0 (Horikoshi, 1990)

นอกจากนี้ได้มีการพยายามแยกแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส จากตัวอย่างดิน พบว่า *Iodate* No.865 เป็นแบคทีเรียอยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์ *Achromobacter* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสหลั่งออกมานอกเซลล์ได้เป็นจำนวนมากในอาหารที่มีพีเอช 10.0 โดยพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ คือ 10.0 และจะยังคงรักษากิจกรรมของเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ จากกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-11.8 แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไลเปสจะถูกยับยั้งโดยการเติมสารลดแรงตึงผิว(surfactant) 0.025 เปอร์เซ็นต์ เช่น ทวีน 80 (tween 80) และ สแปน 80 (span 80) (Horikoshi, 1990)

Watanabe และคณะ (1977) ได้สืบหาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนด่าง จากตัวอย่าง ดิน และน้ำ ซึ่งแยกได้ 1,606 สายพันธุ์ และเลือกเอาแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ 26.1B และ 22.39B ซึ่งผลิตไลเปสได้มาก จากการวิเคราะห์พบว่าเป็น *Pseudomonas nitroreducens* var. *thermotolerans* และ *Pseudomonas fragi* ตามลำดับ โดยเอนไซม์ไลเปสจากทั้ง 2 สายพันธุ์ มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 9.5 และจะถูกยับยั้งด้วยโซเดียมโคเลท (sodium cholate), โซเดียมดีออกซีโคเลท (sodium deoxycholate) และโซเดียมทอโรโคเลท (sodium taurocholate) ที่มีความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากกลุ่ม *Staphylococcal* จะถูกยับยั้งด้วย ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde), เมอร์แคปโตเอทธานอล (mercaptoethanol), ซิสทีน (cystein), กลูตาไทโอน (glutathione) และเทอร์รามัยซิน (terramycin) ขณะที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และโซเดียมทอโรโคเลท (sodium taurocholate) จะช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์

1.3.5 บีตา-แลคตาเมส (β-lactamases)

เอนไซม์บีตา-แลคตาเมส ทำหน้าที่ตัดพันธะเอไมด์ (amide) ของวงแหวนบีตา-แลคแตม (β-lactam) หรือ เพนนิซิลิน (penicillin) หรือ เซฟาโลสปอร์ลิน (cephalosporin) และจะถูกนำมาใช้ในการพัฒนาการผลิตยาปฏิชีวนะสังเคราะห์ชนิดใหม่ขึ้น ซึ่งทำให้ทนต่อการทำงานของเอนไซม์

ในปี 1976 ได้มีการค้นพบแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง คือ *Bacillus cerens* NO.170 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส หลั่งออกมานอกเซลล์ (Sunaga และคณะ, 1979) โดยเอนไซม์ที่แยกได้มี 3 ส่วน (fraction) คือ เอฟ1, เอฟ2 และ เอฟ3 (F1, F2, F3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการทำงานเป็นแบบเอนไซม์เพนนิซิลิเนส (penicillinase) โดยจะสังเกตได้จากการเลี้ยง *Bacillus cerens* NO.170 ในอาหารเหลวที่มีการเติมเบนซิลเพนนิซิลิน (benzylpenicillin) ส่วนขนาดโมเลกุลของเพนนิซิลิเนสในเอฟ1 และเอฟ2 ประมาณ 26,000 ดัลตัน และเอฟ3 ประมาณ 24,000 ดัลตัน โดยมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 6.0-6.5 และมีความเสถียรอยู่ใน

ช่วงพีเอชที่กว้างคือ 7.0-10.0 ซึ่งเอฟ3 สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูง และจะถูกกระตุ้นได้โดยการเติมซินค์อิออน (Zn^{2+}) 5 มิลลิโมลาร์ (อ้างโดย Horikoshi, 1990)

มีการนำเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ 170 มาโคลนใน *E. coli* (Kato และคณะ, 1985) และทำการตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) พร้อมทั้งแสดงรหัสของกรดอะมิโน (amino acid) 257 ตัว โดยมีกรดอะมิโน 30 ตัว เป็นซิกนัลเปปไทด์ (signal peptide) ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่ามีบางส่วนที่เหมือนกับ เอนไซม์บีตา-แลคตาแมส (II) ที่ผลิตโดย *Bacillus cerens* (Krulwich และ Guffanti, 1989) โดยส่วนใหญ่พลาสมิด (plasmid) ของเอนไซม์เพนซิลิเนส จะถูกหลั่งออกมาในอาหารเหลวโดย *E. coli* พร้อมๆ กับโปรตีนชนิดอื่น เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase)

1.3.6 โปรตีเอส (protease)

พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิด, กลุ่ม *Streptomycetes* และ รา (fungi) ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส และหลั่งออกมานอกเซลล์ (Meyrath และ Volavsek, 1975) ซึ่งเอนไซม์โปรตีเอสจะมีหลายชนิด โดยแบ่งตามแหล่งที่ผลิต, การทำงาน และ ลักษณะของบริเวณเร่ง (catalytic site) เอนไซม์โปรตีเอสจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เอกโซเปปติเดส (exopeptidases) และ เอนโดเปปติเดส (endopeptidases) (Nissen, 1993)

1.3.6.1 เอนโดเปปติเดส หรือโปรตีเนส (proteinase) เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่ที่ส่วนใหญ่ใช้ในกระบวนการทางด้านอาหาร โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการตัดสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ตรงพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ซึ่งแบ่งย่อยได้เป็น 4 แบบ คือ ซีรีนโปรตีเอส (serine proteases), ซิสทีนโปรตีเอส (cystein proteases), แอสพาติคโปรตีเอส (aspartic proteases) และ เมทัลโลโปรตีเอส (metalloproteases) โดยการตั้งชื่อ ซีรีนโปรตีเอส, ซีสทีนโปรตีเอส และแอสพาติคโปรตีเอส จะหมายถึงเอนไซม์โปรตีเอสที่มีซีรีน, ซีสทีน และแอสพาติค เป็น side chain ซึ่งเป็นส่วนที่จำเป็นของบริเวณเร่งของเอนไซม์ (catalytic site) โดยถ้ามีการเปลี่ยนแปลงหรือการบล็อก (block) side chain นี้จะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

1.3.6.1.1 ซีรีนโปรตีเอส สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเป็นด่าง ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ ทริปซิน (trypsin), ไคโมทริปซิน

(chymotrypsin) และ ซับทิลิซิน (subtilisins) (Nissen, 1993) และจะถูกยับยั้งด้วยไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropyl fluorophosphate; DFP) โดยจะมีผลต่อกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในส่วนของซีริล (seryl) (Yamamoto, 1975)

1.3.6.1.2 ซิสทีนโปรตีเอส จะทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ ปาเปอิน (papain), โปรมิลาอิน (promelain) และฟิซิน (ficin) (Nissen, 1993) โดยการทำงานจะขึ้นอยู่กับกลุ่มซัลไฮดริล (sulfhydril group) ที่บริเวณเร่ง (Yamamoto, 1975)

1.3.6.1.3 แอสพาติคโปรตีเอส จะทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกรด ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ เปปซิน (pepsin), ไคโมซิน (chymosin), เรนเนท (microbial rennets) และแอสเปอร์จิลลัสโปรตีเอส (aspergillus protease) (Nissen, 1993)

1.3.6.1.4 เมทัลโลโปรตีเอส จะมีพวกอะตอมของโลหะที่จำเป็น โดยปกติจะเป็นซิงค์ (Zn) และทำงานได้ดีที่พีเอชที่ใกล้ความเป็นกลาง โดยแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) จะช่วยให้เอนไซม์นี้มีความเสถียร ส่วนอีดีทีเอจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ เทอร์โมไลซิน (thermolysin) (Nissen, 1993)

1.3.6.2 เอกโซเปปติเดส เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ย่อยกรดอะมิโน โดยถ้าย่อยทางด้านปลายไนโตรเจนจะเรียกอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) และถ้าย่อยทางด้านปลายคาร์บอนจะเรียก คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase)

1.3.6.2.1 อะมิโนเปปติเดส พบอยู่ทั่วไป แต่จะพบน้อยมากในการนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า เนื่องจากส่วนใหญ่จะอยู่ในเซลล์ หรือในชั้นของเมมเบรน โดยเอนไซม์ที่ผลิตทางการค้าคือ โปรเนส (pronase) ซึ่งผลิตโดย *Streptomyces griseus* และจะมีพวกเอนโดเปปติเดส ช่วยในการทำงานของอะมิโนเปปติเดส และคาร์บอกซีเปปติเดส ซึ่งโปรเนสส่วนใหญ่จะใช้ในห้องทดลอง (lab) เพื่อย่อยโปรตีน แต่จะมีราคาสูงมากในการเตรียมเพื่อนำมาใช้ทางด้านอาหาร (Clegg และคณะ, 1974; Clegg, 1978)

1.3.6.2.2 คาร์บอกซีเปปติเดส จะแบ่งย่อยได้คือ ซีรีนคาร์บอกซีเปปติเดส (serine carboxypeptidases), เมทัลโลคาร์บอกซีเปปติเดส (metallo carboxypeptidases) และ ซิสทีนคาร์บอกซีเปปติเดส (cystein carboxypeptidases) ซึ่งแบ่งตามลักษณะที่บริเวณเร่ง (catalytic site)

นอกจากนี้เอนไซม์โปรตีเอสกลุ่ม เอกโซเปปติเดสยังรวมถึงพวกไดเปปไทด์ไฮโดรเลส (dipeptide hydrolases) ซึ่งจะจำเพาะกับสับสเตรท (substrate) ที่เป็นไดเปปไทด์ และทำให้ไม่สามารถแบ่งเป็นอะมิโนเปปติเดส หรือ คาร์บอกซีเปปติเดสได้ (Nissen, 1993)

เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่ทนด่างได้มีการรายงานเป็นครั้งแรก โดย Horikoshi (1971a) และ Aunstrup และคณะ (1972) ซึ่งได้มีการแยก *Bacillus* sp. NO.221 จากดิน ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยจะแตกต่างจากกลุ่มที่ผลิต ซับทิลิซิน (subtilisin) มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 11.5 และที่พีเอช 13.0 เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรม 75 เปอร์เซ็นต์ แต่จะถูกยับยั้งด้วยไดไอโซโพรพิลฟอสโฟฟลูออร์ริเดท (diisopropylphosphofluoridate) หรือ ยูเรีย (urea) ที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยอีดีทีเอ (EDTA) หรือ พารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซเอท (p-chlomercuribenzoate) จะมีขนาดของโมเลกุลประมาณ 30,000 ดัลตัน โดยที่แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) มีผลต่อกิจกรรม และความเสถียรของเอนไซม์ ซึ่งเมื่อเติมแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) 5 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Horikoshi, 1990)

จากรายงานของ Aunstrup และคณะ (1972) เกี่ยวกับ *Bacillus* 2 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส คือ เอบี42 (AB42) และ พีบี12 (PB12) พบว่ามีขนาดของโมเลกุลประมาณ 20,000 และ 26,000 ดัลตัน ตามลำดับ และมีค่าพีไอ 11.0 โดยจะทำงานได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 9.0-12.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส สำหรับเอบี42 และ 50 องศาเซลเซียส สำหรับพีบี12 ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 นี้จะถูกยับยั้งด้วยฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethane sulfonyl fluoride)

ต่อมาได้มีการแยกเอนไซม์อีลาสเทส (elastase) ที่ทนด่าง ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. Ya-B ซึ่งจะมีผลต่ออีลาสติน (elastin) มากกว่าโปรตีนชนิดอื่น โดยมีขนาดของโมเลกุลประมาณ 25,000 ดัลตัน และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ที่มีต่อเคซีน (casein) คือ 12,000 ส่วนอีลาสติน คือ 2,440 ที่พีเอช 11.75 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ มีค่าพีไอ 10.6 และเอนไซม์จะมีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-10.0 ในที่มี แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ซึ่งเอนไซม์อีลาสเทสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของซีรีน (serine) และจะถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งของโปรตีเนส (alkaline proteinase) และสับทิลิซิน (Streptomyces subtilisin) แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งของเมทัลโลโปรตีเนส (metalloproteinase) และเมื่อนำมาตรวจหาลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลายไนโตรเจน (N-terminal) และเปรียบเทียบกับสับทิลิซิน BPN, สับทิลิซินคาลเบอร์ก (subtilisin Carlsberg) และ โปรตีเอสของ *Bacillus* No.221 พบว่าลำดับจะมีความเหมือนกัน แต่จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน

Manachini และคณะ (1988) ได้ทำการแยก *Bacillus thermoruber* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส และเมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์โปรตีเอส ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 1 สาย มีค่าพีไอ 5.3 ส่วนพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่มีต่อเคซีน (casein) คือ พีเอช 9.0 และ 45 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยฟีนิลเมทธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF) และอีดีทีเอ ซึ่งความเสถียรของเอนไซม์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเติมแคลเซียมอิออน (Ca^{2+})

Yamagata และ Ichishima (1989) ได้ทำการแยกเอนไซม์ซีรีนโปรตีเอส (serine protease) ชนิดใหม่ จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. NKS-21 มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีขนาดของโมเลกุลประมาณ 32,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 2.8 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 10.2

Takami และคณะ (1989) ได้ทำการแยกเอนไซม์โปรตีเอสชนิดใหม่ จาก *Bacillus* sp. No.AH-101 ซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยทำ 2 ขั้นตอน ซึ่งขนาดของโมเลกุลที่ได้ประมาณ 29,000-30,000 ดัลตัน เอนไซม์ส่วนใหญ่ทำงานที่พีเอช 12-13

และจะมีความเสถียรเป็นเวลา 10 นาที เมื่อนำเอนไซม์มาบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-13.0 เอนไซม์ชนิดนี้จะมีผลต่อเคซีน (casein) นอกจากนี้ แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ ประมาณ 80 องศาเซลเซียส ในที่มีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) 5 มิลลิโมลาร์ และที่อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 30-70 องศาเซลเซียส จะมีความเสถียรเมื่อมีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) 5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethan sulfonyl fluoride) แต่สำหรับอีดีทีเอ (EDTA), เอสดีเอส (SDS) และโซเดียมโดดีซิลเบนซีนซัลโฟเนท (sodium dodecylbenzene sulfonate; DBS) จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งผลที่ได้แสดงว่า เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง และมีสภาวะเป็นด่างสูงเมื่อมี detergent อยู่ด้วย ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้จึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาใช้เติมในสารซักฟอก

เอนไซม์ที่ทนด่างจะถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม คือ โรงงานผลิตสารซักฟอก ซึ่งประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ จากเอนไซม์ทั่วโลกทั้งหมดที่ผลิตได้จะถูกนำมาใช้เป็นสารซักฟอก และเอนไซม์ที่ทนด่างจะเป็นตัวอย่างที่ดีในการนำมาผลิตใช้ในทางการค้าเป็นผลสำเร็จ โดยปกติแล้วสารซักฟอกมีพีเอชที่เหมาะสมในการละลายอยู่ในช่วง 8.0-10.5 สำหรับเอนไซม์ที่นำมาใช้ประโยชน์โดยการเติมในสารซักฟอกจะต้องทำงานได้ในสารละลายที่มีค่าพีเอชเป็นด่าง และมีความเสถียรในที่มีสารต่างๆ ที่เป็นส่วนผสมในสารซักฟอก เช่น สารฟอกย้อม (bleaching agent, bleach activator), สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และน้ำหอม (perfume) นอกจากนี้เอนไซม์ต้องมีความเสถียรเป็นระยะเวลานานในสารซักฟอก โดยเอนไซม์กลุ่มซีรีนโปรตีเอส (serine protease) จะถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของสารซักฟอกกันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ได้มีการผลิตโปรตีเอสชนิดใหม่ๆ หลายชนิด จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง และนำมาใช้ทางการค้า (Horikoshi, 1990)

นอกจากนำมาใช้เป็นส่วนผสมของสารซักฟอกแล้ว ยังได้นำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมการฟอกหนัง (Sharp และ Munster, 1988)

และได้มีการนำเอนไซม์โปรตีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ B21-2 มาใช้ย่อยเจลาติน (gelatin) ที่เคลือบอยู่บนฟิล์มเอ็กซ์-เรย์ (X-ray) อีกด้วย

1.3.7 ไซลาเนส (xylanase)

เอนไซม์ไซลาเนส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะบีตา-1,3 (β-1,3) ในไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบในพืชหลายชนิด ได้ผลผลิตเป็นไซโลส (xylose), ไซโลไบโอส (xylobiose), ไซโลไตรโอส (xylotriose) และโอลิโกแซคคาไรด์ (high oligosaccharides) ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสจึงมีความสำคัญในกระบวนการอุตสาหกรรมที่ต้องการการย่อยส่วนของพืช

Niimura และคณะ (1987) ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง ทั้งในที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลน โดยแบคทีเรียที่ได้เป็นพวกแกรมบวก ในทุกๆ ระยะในขั้นตอนแรกของการเติบโต มีการสร้างสปอร์เป็นรูปแท่ง แต่จะไม่มีไซโตโครม (cytochrome), ควิโนน (quinone) และเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ซึ่งอัตราการเติบโตจำเพาะของพวกที่เติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน คือ 0.70 ต่อชั่วโมง ส่วนพวกที่เติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.82 ต่อชั่วโมง โดยผลผลิตหลักที่ได้จากการย่อยไซแลนโดยแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน คือ กรดฟอร์มิค (formic acid), เอทธานอล (ethanol), กรดอะซิติค (acetic acid) และกรดไพรูวิค (pyruvic acid) ส่วนในแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ผลผลิตหลัก คือ กรดอะซิติค (acetic acid) และกรดไพรูวิค (pyruvic acid) ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้มีลักษณะอยู่ระหว่างกลุ่ม *Bacillus* และ *Clostridium*

นอกจากนี้ได้มีการแยกแบคทีเรียที่ทนด่าง 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* sp. No.C-59-2 และ No.C-11 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ (Horikoshi และ Atsukawa, 1973) โดยทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ 6.0-8.0 ซึ่งย่อยไซแลนได้สูงสุด คือ ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 6.0 หรือ 9.0 โดยพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. No.C-11 คือ 7.0 และกิจกรรมของเอนไซม์จะยังคงอยู่ 37 เปอร์เซ็นต์ แม้อยู่ที่พีเอช 10.0 โดยเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่ทนด่างจะยัง

คงรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงในช่วงพีเอชที่เป็นด่างมากกว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชนิดอื่น

Bacillus sp. No.C-125 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 2 แบบ คือ เอนไซม์ไซลาเนสเอ (xylanase A) และเอนไซม์ไซลาเนสเอ็น (xylanase N) โดยมีขนาดของโมเลกุล ประมาณ 43 และ 16 กิโลดัลตัน ตามลำดับ (Honda และคณะ, 1985a; Honda และคณะ, 1985b) เอนไซม์ไซลาเนสเอ็น ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-7.0 แต่เอนไซม์ไซลาเนสเอ ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-10.0 และจะยังคงทำงานได้แม้พีเอชสูงถึง 12.0 โดยอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 70 องศาเซลเซียส และเมื่อนำมาโคลนใน *E. coli* พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสเอจะถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (Hamamoto และ Horikoshi, 1987; Honda และคณะ, 1986a; Honda และคณะ, 1986b) และมีคุณสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. No.C-125 (Honda และคณะ, 1985a; Honda และคณะ, 1985b) แต่เอนไซม์ที่ผลิตโดย *E. coli* จะมีความเสถียรในที่มีค่าพีเอชต่ำได้น้อยกว่า แต่ *E. coli* จะผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า *Bacillus* sp. No.C-125 ซึ่งอาจเป็นเพราะการลดการกดยีนของเอนไซม์ไซลาเนสเอใน *E. coli* และปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงจะยับยั้งการแสดงออกของยีนเอนไซม์ไซลาเนสเอที่โคลนเข้าไปอาจเป็นเพราะเกิดแคทตาบอไลท์รีเพรสชัน (catabolite repression) และที่ความเข้มข้นของกลูโคสปานกลาง (1 กรัมต่อลิตร) จะมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเอหลั่งออกมานอกเซลล์เพียงเล็กน้อย แต่จะสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และเพอริพลาสซึม (periplasm) นอกเหนือจากนี้เอนไซม์ไซลาเนสเอที่ผลิตโดย *E. coli* จะไม่เหมือนกับเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. No.C-125 โดยอาจมีการแสดงออกเมื่อมีไซแลน หรือไม่มีก็ได้ และการผลิตของเอนไซม์ไซลาเนสเอ โดย *E. coli* จะถูกควบคุมโดยแรงดันออสโมติค (osmotic pressure)

Bacillus sp. No.C-125 จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากเมื่อมีการเติมไกลซีน (glycine) หรือ ดี,แอล-นอร์วาลีน (D,L-norvaline) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการผ่านเข้า-ออกเซลล์ (Ikura และ Horikoshi, 1987a) ซึ่งการเติมกรดอะมิโน (amino acid) เหล่านี้จะไปยับยั้งการผลิต

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

เอนไซม์โปรตีเอส (protease) ออกนอกเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ไซลาเนส (Krulwich และ Guffanti, 1989)

นอกจากนี้ยังได้มีการแยกแบคทีเรียทนด่างที่เติบโตในที่มีอุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้จากดิน 4 สายพันธุ์ คือ W1, W2, W3 และ W4 โดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท (Okazaki และคณะ, 1985) ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตโดย W1 และ W3 คือ 6.0 และ สำหรับ W2 และ W4 การทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-7.0 โดยที่เอนไซม์นี้มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.5-10.5 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของ W1 และ W3 คือ 65 องศาเซลเซียส และสำหรับ W2 และ W4 จะอยู่ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยที่เอนไซม์จะมีความเสถียรจนถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 5 มิลลิโมลาร์ จะไม่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ในอุณหภูมิที่สูง โดยเปอร์เซ็นต์การย่อยไซแลนหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คือ 70

1.3.8 เพคติเนส (pectinase)

เอนไซม์เพคติเนส หรือ โพลีกาแลคตูโลเนส (polygalactulonase) ทำหน้าที่ย่อยกรดโพลีกาแลคตูโลนิค (polygalactulonic acid) และโพลิเมอร์ (polymer) ที่ประกอบด้วยกรดดี-กาแลคตูโลนิค (D-galacturonic acid) เพื่อให้อยู่ในรูปของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ที่ละลายน้ำได้ (Ramunas, 1993) ซึ่งผลผลิตที่ได้คือ กรดโมโน-กาแลคตูโลนิค (mono-galacturonic acid), ได-กาแลคตูโลนิค (di-galacturonic acid) และ ไตร-กาแลคตูโลนิค (tri-galacturonic acid) (Fogarty และ Kelly, 1983) เอนไซม์เพคติเนสแบ่งออกเป็นกลุ่มตามหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ที่มีต่อสับสเตรท (Horikoshi, 1990) โดยแบ่งตามการทำงานของเอนไซม์ที่มีต่อส่วนของกาแลคตูโลแนน (galactulonan) ในโมเลกุลของเพคติน (pectin) (Pilnik และ Voragen, 1993) ได้ 3 กลุ่ม คือ เอสเตอเรส (esterases), ไฮโดรเลส (hydrolases) และไลเอส (lyases) แต่โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์จะเป็นเอนโด-โพลีกาแลคตูโลเนส (endo-polygalacturonases) และเอนโด-โพลีกาแลคตูโลเนทไลเอส (endo-polygalacturonate lyases) ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนโด-โพลีกาแลค

ตูโลเนส โดยทั่วไปอยู่ในช่วงระหว่าง 4.0-5.0 และ เอนโด-โพลีกาแลคตูโลเนทไลเอส อยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 7.0-10.0 (Horikoshi, 1990)

จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์เอนโด-โพลีกาแลคตูโลเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียทนด่าง *Bacillus* sp. No.P-4-N ซึ่งนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยใช้ ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose), เซฟาเดกซ์ จี-100 (sephadex G-100) และเซฟาเดกซ์ จี-200 (sephadex G-200) ซึ่งจะได้ความบริสุทธิ์จากเดิม 300 เท่า โดยพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่มีต่อกรดเพคติค (pectic acid) คือ 10.0 ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเอนไซม์ชนิดนี้ และจะแตกต่างจากเอนไซม์โพลีกาแลคตูโรเนสตัวอื่น โดยทั่วไปการย่อยของเอนไซม์เพคติเนสไม่จำเป็นต้องมีแคลเซียมก็ได้ แต่การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ด้วยแคลเซียมก็เป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่ง โดยเอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 6.5 จนถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในที่มีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) แต่จะหยุดทำงานที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส

จากรายงานเกี่ยวกับ *Bacillus* sp. RK9 ที่แยกได้จากดิน ซึ่งสามารถเติบโตได้ดีอาหารที่มีสภาวะเป็นด่าง คือมีค่าพีเอช 9.7 และสามารถผลิตเอนไซม์เอนโด-โพลีกาแลคตูโลเนทไลเอส และนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์จากเดิม 136 เท่าด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 10.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จะยังคงรักษากิจกรรมได้ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 10.0

มีการนำแบคทีเรียทนด่างที่ผลิตเอนไซม์เพคติเนส มาใช้ในระบบน้ำเสียของโรงงานที่เกี่ยวกับกระบวนการที่มีส้มเป็นวัตถุดิบ (Horikoshi, 1990) และได้มีการพยายามพัฒนาระบบบำบัดน้ำเสียแบบใหม่โดยการใช้จุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง โดยได้ทำการแยก *Bacillus* sp. GIR621 จากดินในประเทศไทย ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เอนโด-เพคเตทไลเอส (endo-pectatelyase) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 10.0 และจากการนำ *Bacillus* sp. GIR621-7 มาใช้ พบว่ามีประโยชน์ในการที่จะใช้แยกเอาเพคติคออกก่อนที่จะเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย และเอนไซม์เอนโด-เพคเตทไลเอส ที่

ผลิตโดย *Bacillus* sp. GIR621-7 เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ และหาลักษณะเฉพาะ พบว่ามีขนาดของโมเลกุลประมาณ 33,000 ดัลตัน มีค่าพีไอ 8.8 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 9.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงระหว่าง 55-60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานได้ดีเมื่อมีการเติมแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) 0.4 มิลลิโมลาร์

1.3.9 เอนไซม์ย่อยแป้ง (starch-degrading enzyme)

1.3.9.1 แป้ง (starch)

แป้งเป็นแหล่งที่เก็บคาร์โบไฮเดรตของพืช โดยจะพบในส่วนของเมล็ด, ราก หรือ หัว ซึ่งในแต่ละแหล่งที่เก็บสะสมแป้งจะทำให้มีความแตกต่างในด้านคุณสมบัติทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพ ผลที่ตามมาทำให้วิธีการที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งเหล่านี้ให้เป็นน้ำตาลในทางอุตสาหกรรมจะมีวิธีการที่แตกต่างกัน โดยแป้งที่พบในเซลล์พืชมีลักษณะเป็นแกรนูล (granules) ที่ใหญ่มาก สามารถมองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์ โดยแกรนูลเหล่านี้อาจเรียงตัวเป็นวงโดยมีศูนย์กลางร่วมกัน (concentric) เช่น ในพวกเมล็ดธัญพืช หรือเรียงตัวแบบกระจาย (eccentric) เช่นในมันฝรั่ง

แป้งเกิดจากกลูโคสที่เชื่อมต่อเป็นโพลิเมอร์ (polymer) ซึ่งแบ่งได้ 2 แบบ ตามลักษณะโครงสร้าง คือ อะไมโลส (amylose) ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อเป็นโซ่ยาวด้วยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก (α-1,4 glucosidic bond) จำนวน 250-300 ยูนิต โดยไม่มีการแตกแขนง ซึ่งเรียงตัวเป็นรูปเกลียว (helix) ซึ่งขนาดของโมเลกุลจะแตกต่างตามแหล่งของแป้ง (Kulp, 1975) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก (α-1,4 glucosidic bond) แต่จะมีการแตกแขนง โดยที่ตำแหน่งที่แตกแขนงกลูโคสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก (α-1,6 glucosidic bond) ซึ่งจำนวนกลูโคสอาจมีมากถึง 1,000 ยูนิต

ในธรรมชาติอะไมโลเพคติน และอะไมโลสจะรวมอยู่ในรูปของสารเชิงซ้อนกับส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ ตัวอย่างเช่น อะไมโลสจะอยู่ในรูปเชิงซ้อนกับกรดไขมัน (fatty acid), ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และสารอื่นๆ โดยพบได้ในแป้งของพวกธัญพืช และอะไมโลเพคตินจะอยู่ในรูปเชิงซ้อนกับกรด

ฟอสฟอริค (phosphoric acid esters) โดยจะพบในแป้งมันฝรั่ง ซึ่งในการตรวจสอบพบว่าอะไมโลสจะมีการจับกับไอโอดีน (iodine) ทำให้เกิดสีน้ำเงิน ส่วนอะไมโลเพคตินจะไม่จับกับไอโอดีน (iodine) จึงเกิดเป็นสีแดง

อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายแป้งให้มีลักษณะเป็นวุ้น (gelatinization) เริ่มตั้งแต่ประมาณ 50-68 องศาเซลซียส สำหรับแป้งธรรมดาทั่วไป แต่การเกิดจะสมบูรณ์ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 64-78 องศาเซลเซียส และถ้าน้ำมีปริมาณจำกัด กระบวนการนี้จะเกิดที่อุณหภูมิสูง การพองของแกรนูลก็จะถูกจำกัด ซึ่งผลที่ได้เหล่านี้เกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างแป้ง และน้ำเป็น 1:1 และดำเนินต่อไปถ้าปริมาณน้ำลดลง ซึ่งการเติมเกลือ และน้ำตาล โดยทั่วไปจะเป็นการเพิ่มอุณหภูมิในการเกิดกระบวนการนี้ ซึ่งขึ้นกับชนิดของสาร และปริมาณของสารที่เติม ส่วนเบส (bases), ไอโอไดด์ (iodides) และไธโอไซยาเนท (thiocyanates) จะทำให้อุณหภูมิในการละลายแป้งลดลง (Zobel, 1992)

1.3.9.2 เอนไซม์ย่อยแป้ง (starch degrading enzyme)

เอนไซม์หลายชนิดที่สามารถย่อยแป้งได้ เช่น อะไมเลส (amylase), ไซโครมอลโตเดกซ์ตรินกลูคาโนทรานเฟอเรส (cyclomaltodextrin glucanotransferase), พูลลูลาเนส (pullulanase), แอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase) เป็นต้น (Fogarty, 1983) และได้มีการศึกษาเอนไซม์กันอย่างแพร่หลาย โดยส่วนใหญ่ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ว่าอยู่ในช่วงที่เป็นกรดหรือเป็นกลาง (Horikoshi, 1990) ซึ่ง Horikoshi (1971b) เป็นคนแรกที่ตรวจพบเอนไซม์อะไมเลส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทนด่าง *Bacillus* sp. No.A-40-2 ในอาหาร Horikoshi II ต่อมาได้มีการค้นพบเอนไซม์ย่อยแป้งได้อีกหลายชนิด จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง

ก. อะไมเลส (amylases)

เอนไซม์อะไมเลสทำหน้าที่ในการสลายพันธะในแป้งและไกลโคเจน (glycogen) โดยการย่อยพันธะแอลฟา-1,4 ไกลโคซิดิค (α-1,4 glycosidic bond) (Kulp, 1975)

มีการค้นพบเอนไซม์อะไมเลสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นด่างได้หลายแบบ (Yamamoto และคณะ, 1972) ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 4 แบบ โดยแบ่งตามพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

แบบที่ 1 พีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 10.5

แบบที่ 2 ช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 4.0-4.5 และ 9.0-10.0

แบบที่ 3 พีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 4.5, 7.0 และพีเอชที่อยู่ในช่วง 9.5-10.0

แบบที่ 4 พีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 4.0

พบว่าเอนไซม์อะไมเลสบางแบบมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ 2-3 พีค (peak) เมื่อนำมาเขียนกราฟ แสดงว่าในเอนไซม์มีส่วนประกอบหลายส่วน แต่จากการทดลองการโคลนยีนของเอนไซม์อะไมเลสที่แสดงให้เห็นว่าเป็นของเอนไซม์ชนิดเดียวไม่มีส่วนผสม พบว่าจากกราฟกิจกรรมของเอนไซม์ยังคงแสดงให้เห็น 3 พีค (peak)

โดยที่แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) มีส่วนช่วยป้องกันเอนไซม์เหล่านี้ แม้ว่าขอบเขตในการป้องกันจะแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์อะไมเลสทั้ง 4 โดยเอนไซม์อะไมเลส แบบที่1 จะไม่ทนต่ออุณหภูมิที่สูงเป็นส่วนใหญ่ แต่เอนไซม์ทั้ง 4 แบบ จะไม่สามารถทำงานเมื่อโดนความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในที่มีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเอนไซม์แบบที่ 2 และ 4 จะมีความเสถียรมากกว่าแบบที่ 1 โดยยังคงรักษากิจกรรมได้ประมาณ 70-95 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น หลังจากที่ให้ความร้อนเช่นเดียวกัน ส่วนเอนไซม์แบบที่ 3 จะมีความเสถียรมากที่สุด โดยยังคงรักษากิจกรรมของเอนไซม์ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมของเอนไซม์ ที่พีเอช 4.0 หรือ 10.0 แม้จะมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

Bacillus sp. No. A-59 (ATCC21591) ที่แยกได้จากดินสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสแบบที่ 1 ได้จากการเลี้ยงในอาหาร Horikoshi II โดยเอนไซม์ที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน (fraction) ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสที่เป็นส่วนหลัก (major) มี

ขนาดโมเลกุลประมาณ 50,000 ดัลตัน และเอนไซม์อีกส่วน (minor) มีขนาดโมเลกุลประมาณ 70,000 ดัลตัน โดยอัตราส่วนของเอนไซม์ทั้ง 2 ส่วน เป็น 10:1 และคุณสมบัติในด้านอื่นไม่แตกต่างจากเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. No.A-40-2 (Horikoshi, 1990)

นอกจากนี้ *Bacillus* sp. NCIB 11203 ที่แยกได้จากดินสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดในอาหารเหลว เช่น เอนไซม์อะไมเลส, เอนไซม์โปรตีเอส (protease) และเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) โดยในอาหารเหลวจะตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase) หลั่งออกมานอกเซลล์ทั้ง 2 ชนิด และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 7.0 ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus* ชนิดอื่น แต่จะเหมือนกับเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus* sp. No.A-59

เอนไซม์อะไมเลส แบ่งย่อยได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

(1) แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการแยกพันธะที่อยู่ในโมเลกุลของสับสเตรท (endoamylase) (Kulp, 1975) ปกติจะพบทั่วไปในพืช, เนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และจุลินทรีย์ โดยที่การทำงาน, คุณสมบัติ และการย่อยผลิตผลของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ (Robyt และ Whelan, 1968) โดยการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสต่ออะไมโลสของแป้ง จะมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกจะทำการย่อยอะไมโลสอย่างรวดเร็ว ทำให้ได้มอลโตส (maltose) และมอลโตไตรโอส (maltotriose) โดยการย่อยกลูโคสที่เชื่อมต่อด้วยพันธะแอลฟา-1,4 แต่ไม่สามารถย่อยกลูโคสที่เชื่อมต่อด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ในแป้งได้ จัดเป็นเอนไซม์ที่ย่อยได้เฉพาะภายใน (endo-acting enzymes) จะทำให้ความหนืดของแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้การเปลี่ยนสีของไอโอดีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (Fogarty และ Kelly, 1979) ส่วนในขั้นตอนที่ 2 (Walker และ Whelan, 1960a) จะช้ากว่าขั้นตอนแรกมาก โดยมีการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) อย่างช้าๆ ทำให้ได้กลูโคส และมอลโตส เป็นผลิตผลสุดท้าย และในการย่อยอะไมโลเพคตินจะทำให้ได้กลูโคส, มอลโตส และแอลฟา-เดกซ์ตริน (α-limit dextrin)

โดยความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส อยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 3.5-9.2 และอุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 35-75 องศาเซลเซียส (Fogarty และ Kelly, 1979)

Horikoshi (1971b) ได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ No. A-40-2 (ATCC21592) จากโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมด 300 โคโลนี โดยเอนไซม์ที่ผลิตทำงานได้ดีที่พีเอช 10.0-10.5 และยังคงรักษากิจกรรมของเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นที่พีเอชระหว่าง 9.0 และ 11.5 ซึ่งเอนไซม์จะไม่ถูกยับยั้งด้วยอีดีทีเอ (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และไม่สามารถทำงานได้เมื่อมียูเรีย (urea) 8 โมลาร์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะยังคงอยู่ 95 เปอร์เซ็นต์เมื่อมีการแยกยูเรียออก และเอนไซม์นี้สามารถย่อยแป้งได้ 70 เปอร์เซ็นต์ ได้เป็นกลูโคส, มอลโตส และมอลโตไตรโอส ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้เป็นพวกแอลฟา-อะไมเลส โดยที่อะลานีน (alanine), ดีแอล-นอร์วาลีน (DL-norvaline) และดี-เมทไธโอนีน (D-methionine) ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตของเอนไซม์ที่ทำงานได้ในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งเมื่อเติมดีแอล-นอร์วาลีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และดี-เมทไธโอนีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ 1.7 เท่า ขณะเดียวกันก็ไปกดดันการเติบโตของแบคทีเรีย (Ikura และ Horikoshi, 1987b)

Kelly และคณะ (1983) แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. No.A-59 (ATCC21591) สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ในสภาวะที่เป็นด่างได้ 3 ชนิด คือ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส, เอนไซม์พูลลูลาเนส (pullulanase) และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

(2) บีตา-อะไมเลส (β-amylase)

เอนไซม์บีตา-อะไมเลส อาจเรียกว่าเอนไซม์แซคคาไรจีนิคอะไมเลส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยพันธะ แอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ในแป้ง และไกลโคเจน แต่ไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก ในอะไมโลเพคติน ดังนั้นการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดนี้จะไม่สมบูรณ์ โดยทั่วไปในการย่อยอะไมโลเพคตินจะได้มอลโตส (maltose) 50-60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือ คือ ลิมิตเดกซ์ตริน (limit dextrins) และการทนต่อความร้อนของเอนไซม์บีตา-อะไมเลส ขึ้นอยู่กับแหล่งที่ผลิต และพบว่าการให้ความร้อนทั้งและ บีตา-อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในที่มีแคลเซียมอิออน

(Ca^{2+}) จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารในกลุ่มซัลไฮดริล (sulfhydryl reagent) เช่น พารา-คลอโรเมอคิวรีเบนโซเอท (p-chloromercuribenzoate) และเอ็น-เมทธิลมาลไมด์ (N-methylmaleimide) ซึ่งป้องกันได้โดยการเติมซีรั่มอัลบูมิน (serum albumin) และลดกลูตาไธโอน (glutathione) โดยที่สคาร์ดินเจอร์เดกซ์ตริน (schardinger dextrin) และมอลโตสเป็นตัวยับยั้งแข่งขัน (competitive inhibitor) ของเอนไซม์ (Kulp, 1975)

Sohn และคณะ (1996) ได้นำเอนไซม์บีตา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus polymyxa* No.26-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่ มาทำให้บริสุทธิ์ 22.5 เท่า โดยมีขนาดของโมเลกุล 53,000 ดัลตัน และค่าพีไอ (pI) 9.1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 45 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 ในกรณีที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นสับสเตรท เอนไซม์มีความเสถียรในที่อุณหภูมิสูง คือ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรในช่วงพีเอช ระหว่าง 5.0-8.5

Etok และ Eka (1996) ได้นำเอนไซม์ 2 ชนิด คือ อะไมเลส และโปรตีเอส ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptomyces* มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์อะไมเลสสามารถย่อยแป้ง และให้มอลโตสเป็นผลผลิตหลัก และจากการวิเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้ พบว่าเป็นเอนไซม์บีตา-อะไมเลส มีขนาดของโมเลกุล 48,000 ดัลตัน ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 โดยค่า Km ของเอนไซม์ต่อแป้งข้าวโพด คือ 0.333 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในทางตรงข้ามเอนไซม์โปรตีเอสมีขนาดของโมเลกุล 21,000 ดัลตัน และทำงานได้ดีที่พีเอช 10.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งค่า Km ของเอนไซม์ต่อเคซีน (casein) คือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาเอนไซม์บีตา-อะไมเลส ที่ผลิตโดย *Bacillus megaterium* B-6 พบว่ามีการเหนี่ยวนำโดยแป้ง แม้ว่าจะมีมอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrin) เป็นตัวเหนี่ยวนำ และในระหว่างการทดสอบแหล่งคาร์บอน พบว่ากลูโคสเป็นตัวกดดัน (repressor) และเมื่อเติมลงในอาหารที่มีแป้งเป็นตัวเหนี่ยวนำจะทำให้เกิดความล้มเหลวในการสังเคราะห์เอนไซม์ ตลอดจนเกิดแคตาบอไลท์รีเพรสชัน (catabolite repression) ซึ่งความกดดันนี้จะไม่เป็นผล หลังจากที่ปริมาณกลูโคสในอาหารลดลงต่ำกว่าระดับที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (Ray และคณะ, 1996)

(3) กลูโคอะไมเลส (glucoamylase)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยหน่วยกลูโคสจากด้านปลาย (non-reducing end) ในแป้ง ซึ่งผลผลิตสุดท้ายที่ได้คือกลูโคส จะแตกต่างจากเอนไซม์แอลฟา- และ บีตา-อะไมเลส โดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสยังมีชื่ออื่นที่ใช้เรียก คือ อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) และกลูคาไมเลส (glucamylase) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีเปอร์เซ็นต์ของความจำเพาะ (specificity) ที่ต่ำ เนื่องมาจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถตัดพันธะแอลฟา-1,3 และ แอลฟา-1,6 ได้ดีเท่ากับการตัดพันธะแอลฟา-1,4 (อ้างโดย Kulp, 1975)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ยกเว้นเอนไซม์ที่ได้จาก *Aspergillus anamori* ซึ่งได้มีการรายงานว่า สามารถย่อยแป้งดิบได้รวดเร็ว นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* สามารถย่อยมอลโตส, มอลโตไตรโอส (maltotriose), มอลโตเตตระโอส (maltotetraose) และมอลโตเพนตาโอส (maltopentaose) (อ้างโดย Kulp, 1975)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสนี้สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,2, แอลฟา-1,3, แอลฟา-1,4 และ แอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก อัตราการย่อยเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเพิ่มความยาวของสาย (chain) เช่น จากมอลโตสเป็นมอลโตเพนตาโอส (maltopentaose) และก็จะคงที่ เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดต่อพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก แต่จะย่อยพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก ได้อย่างรวดเร็วเมื่อพันธะถัดไปเป็นแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก และอัตราการย่อยสูงสุดของเอนไซม์ที่มีต่อพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิกในไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomaltooligosaccharides) ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของอัตราการย่อยไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมด (Meagher และคณะ, 1989)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเร่งการเกิดไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของกลูโคสให้ได้เป็นโพลิเมอร์ (polymer) เมื่อมีความเข้มข้นของกลูโคสสูง เป็นผลทำให้ลดผลผลิตของกลูโคส เนื่องจากอัตราการย่อยของสารที่มีน้ำหนักของโมเลกุลสูงจะช้ากว่าอัตราการเกิดโพลิเมอไรเซชันของกลูโคส และที่ภาวะสมดุลการผันกลับของกลูโคสจะพบเมื่อมีการลดลงของไอโซมอลโตส (isomaltose), ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose), โคจิไบโอส (kojibiose), ไนจีโรส (nigerose),

มอลโตส (maltose), แอลฟา-, บีตา-เตรฮาโลส (α-, β-trehalose), พาโนส (panose) และไอโซมอลโตเตตราโอส (isomaltotetraose) (Nikolov และคณะ, 1989)

ข. เอนไซม์ที่ผลิตมอลโตเฮกซาโอส (maltohexaose-forming enzymes)

เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 ได้มีการแยกแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งจะช่วยในเร่งการย่อยแป้งให้ได้มอลโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (malto-oligosaccharide; G_n-amylase) และบ่งบอกชนิดของเอนไซม์ เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ให้ได้มากสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงได้มีการแยกเอา *Bacillus* sp. No.707 มาใช้โดยการนำเอายีนอะไมเลสที่สร้างมอลโตเฮกซาโอส (G_6-amylase) มาโคลนใน *E. coli* (phage λ D69) ซึ่งผลิตผลหลักที่ได้จากการย่อยสารละลายแป้งโดยเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. No.707 คือ จี4 (G_4) แต่ในทางตรงข้ามผลิตผลที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* (pTUB812) และ *E. coli* (pTU306) คือ จี6 (G_6) ซึ่งปริมาณของ จี6 ที่ได้จากการย่อยมีประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ได้มีการแยก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ที่ทำให้ได้มอลโตเฮกซาโอสจากการย่อย (Hayashi และคณะ, 1988a,b) โดยหนึ่งในจำนวนนั้นคือ *Bacillus* sp. H-167 ที่สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลส ได้ 3 แบบ ซึ่งผลผลิตหลักที่ได้จากการย่อยแป้งคือ มอลโตเฮกซาโอส โดยเอนไซม์ทั้งหมดจะทำงานได้ดีที่พีเอช 10.5 และมีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 7.5-12.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ทั้งหมดนี้จะผลิตมอลโตเฮกซาโอสได้ในขั้นตอนแรกของการย่อย โดยผลผลิตที่ได้มีประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ และเพื่อที่จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับยีนของเอนไซม์และอธิบายการควบคุมการสร้างเอนไซม์จึงได้มีการโคลนยีนจี6-อะไมเลส (G_6-amylase) ของ *Bacillus* sp. H-167 เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนใน *E. coli* (Shirokizawa และคณะ, 1989)

ค. พูลลูลาเนส (pullulanase)

เอนไซม์พูลลูลาเนสที่พบใน *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก ในพูลลูแลน

(pullulan) โดยที่กลูโคส, มอลโตส และมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้งของเอนไซม์ชนิดนี้ โดยเอนไซม์พูลลูลาเนสที่แยกได้ครั้งแรกจาก *Aerobacter aerogenes, Escherichia intermedia* และ *Streptococcus mitis*

เอนไซม์พูลลูลาเนสที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* var. *mycoides* ช่วยผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ (G_6) และผลผลิตสุดท้าย คือ มอลโตไตรโอส จากพูลลูแลน และถึงแม้ว่าผลผลิตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ คือ มอลโตส, มอลโตไตรโอส และมอลโตเตตระโอส (maltotetraose) แต่จะไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นเมื่อย้อมด้วยไอโอดีน หลังจากนำมาใช้ย่อยอะไมโลเพคติน แต่จะมีความเสถียรมากเมื่อถูกความร้อนในกรณีที่มีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) อยู่ แต่จะถูกยับยั้งด้วยพารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซเอท (p-chloromercuribenzoate) โดยได้มีการค้นพบ *Bacillus* sp. No. 202-1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์พูลลูลาเนสหลั่งออกมานอกเซลล์ ในอาหารที่มีค่า พีเอช 10.0 และจากการวิจัยของ Horokoshi (1990) เอนไซม์พูลลูลาเนสจะมีขนาดของโมเลกุล 92,000 ดัลตัน และค่าพีไอต่ำกว่า 2.5 เอนไซม์ชนิดนี้มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 8.5-9.0 และมีความเสถียรอยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 6.5-11.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดี คือ 55 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในที่มีสับสเตรท เอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยเมอร์คิวรีอิออน (Hg^{2+}) และ ซิงซ์อิออน (Zn^{2+}) แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยสารกลุ่มซัลไฮดริล (sulfhydryl) เช่น โมโนไอโอโดอะซีเตท (monoiodoacetate) และพารา-คลอโรเมอร์คิวรีเบนโซเอท (p- chloromercuribenzoate) หรือ สารกลุ่มคีเลต (chelating agent) เช่น อีดีทีเอ (EDTA) ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าไม่มีส่วนของซัลไฮดริล (sulfhydryl) หรือ ซีรีน (serine) เกี่ยวข้องตรงตำแหน่งเร่ง (catalytic site) ของเอนไซม์

Kelly และคณะ (1983) พบว่า *Bacillus* sp. No. A-59 (ATCC21591) สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 3 ชนิด คือ เอนไซม์อะไมเลส, เอนไซม์พูลลูลาเนส และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase) จากการเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะผลิตแยกกัน และระดับของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และเอนไซม์พูลลูลาเนสจะมีปริมาณสูงสุดหลังจากที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24

ชั่วโมง ในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 9.7 และแม้ว่าเอนไซม์พูลลูลาเนสไม่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 7.0 ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้จึงต่างจากเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง (*Bacillus* sp.) สายพันธุ์อื่น ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 9.5 และ 11.5

เอนไซม์พูลลูลาเนสที่นำมาใช้ในกระบวนการที่เกี่ยวกับแป้ง จะได้มาจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Bacillus* sp. โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะมีประโยชน์ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับแป้ง เนื่องจากจะช่วยปรับปรุงผลผลิตของกลูโคส และช่วยลดเวลาในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการผลิตมอลโตสไซรัป (maltose syrup) ซึ่งทนต่ออุณหภูมิสูง และทนกรด ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะนำมาใช้ในระหว่างกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) (Takasaki และคณะ, 1981; Slominska และ Maczynski, 1985; Boyce, 1986; Sheppard, 1986)

จากการวิจัยของ Kusano และคณะ (1988) โดยการนำเอนไซม์ พูลลูลาเนสที่ผลิตโดย *Bacillus acidopullulyticus* ซึ่งอยู่ในรูปที่พร้อมจะทำงาน คือ เอฟ1 (F1) และเอฟ2 (F2) มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟี (chromatography) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 5.0 และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ คือ 200-220 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งเอฟ1 และเอฟ2 มีขนาดของโมเลกุลประมาณ 115,000 และ 116,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 5.0 และ 5.2 โดยที่ค่า Km ของเอฟ1 และเอฟ2 ที่มีต่อพูลลูแลนจะเท่ากัน และกิจกรรมของเอฟ1 และเอฟ2 ที่มีต่อไกลโคเจนบีตา-ลิมิตเดกซ์ตริน (glycogen β-dextrins) คิดเป็น 26-46 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมที่มีต่อพูลลูแลน

จากรายงานของ Takanori และคณะ (1989) พบว่ามีการสังเคราะห์มอลโตซิล (แอลฟา 1$\rightarrow$6) แอลฟา-, บีตา- หรือ แกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน (maltosyl (α1$\rightarrow$6) α-, β-, γ-cyclodextrin) จากมอลโตส และ แอลฟา-, บีตา- หรือแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน โดยใช้เอนไซม์พูลลูลาเนส จาก *Bacillus acidopullulyticus* ซึ่งไซโคลเดกซ์ตรินแต่ละชนิดจะถูกเปลี่ยนเป็นมอลโตซิล (แอลฟา 1$\rightarrow$6) ไซโคลเดกซ์ตรินมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณความเข้มข้นของมอลโตส และไซโคลเดกซ์ตรินคิดเป็น 70-75 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และอัตราส่วนของมอลโตสต่อไซโคล

เดกซ์ตริน คือ 9-18 ส่วนปริมาณของเอนไซม์พูลลูลาเนส คือ 100-200 ยูนิตต่อกรัมของไซโคลเดกซ์ตริน ภายใต้อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.0-4.5 โดยที่มอลโตซิล (แอลฟา 1→6) ไซโคลเดกซ์ตรินแต่ละชนิดที่สังเคราะห์ได้จะทำการแยกโดยการตกตะกอนด้วยเมทธานอล (methanol) และเอทธานอล (ethanol) และก่อนหน้านี้ได้มีการวิจัยการสังเคราะห์มอลโตซิล (α 1→6) ไซโคลเดกซ์ตริน จากมอลโตซิลฟลูออไรด์ (maltosyl fluoride) และไซโคลเดกซ์ตรินโดยเอนไซม์พูลลูลาเนส

Kimura และ Horikoshi (1990) ได้ทำการศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ที่ย่อยพูลลูแลน โดย *Micrococcus* sp. 207 ซึ่งหลังจากนำมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่า มีขนาดของโมเลกุลประมาณ 120,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 4.9 จะทำงานได้ดีที่พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) แต่เอนไซม์จะทนต่ออุณหภูมิสูงหลังจากที่แยกเอาแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ออกไป เอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6 ในอะไมโลเพคติน, ไกลโคเจน (glycogens) และพูลลูแลน ส่วน Km ในการย่อยพูลลูแลนมีค่าประมาณ 0.018 เปอร์เซ็นต์ และพูลลูแลนที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.012 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยการทำงานจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดยไซโคลเดกซ์ตริน

ง. กลูโคสไอโซเมอเรส (glucose isomerase)

เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ในทางการค้าเรียกว่าไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของ ดี-กลูโคส (D-glucose) ทำให้ได้ ดี-ฟรุคโตส (D-fructose) โดยค่า Km สำหรับดี-ไซโลส (D-xylose) อยู่ในช่วงระหว่าง 5-93 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ค่า Km สำหรับดี-กลูโคส อยู่ในช่วงระหว่าง 86-250 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังเร่งปฏิกิริยาการเกิดไอโซเมอไรเซชันของดี-ไรโบส (D-ribose) ให้ได้ ดี-ไรบูโรส (D-ribulose) ซึ่งมีค่า Km อยู่ในช่วงระหว่าง 350-670 มิลลิโมลาร์ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในทางการค้า จะผลิตโดย *Actinoplanes missouriensis, Bacillus coagulans, Microbacterium arborescens* และ *streptomyces* อีก 6 สายพันธุ์ ซึ่งเอนไซม์ทั้งหมดมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 7-8 แต่ถ้าอยู่ในรูปของการตรึง อาจมีพีเอช

ที่เหมาะสมในการทำงานที่เป็นด่างมากกว่านี้ ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus coagulans* และ *Streptomyces olivochromogenes* ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 8.0-10.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จะแตกต่างกัน แต่ทั้งหมดจะทำงานที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงระหว่าง 80-85 องศาเซลเซียส (อ้างโดย Teague และ Blumm, 1992)

เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสทั้งหมดจะเป็นชนิดเมทัลโลโปรตีน (metalloproteins) โดยที่แคลเซียมอิออนซึ่งจำเป็นต่อความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และพบในแป้งข้าวโพด จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ แต่มีอิออนของโลหะหลายชนิด โดยเฉพาะโคบอลท์ (cobalt) และแมกนีเซียม (magnesium) จะกระตุ้นการทำงานและเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ และความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรทจะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะอิออนที่จับตรงตำแหน่งที่จับ (binding site) ของเอนไซม์ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยเอนไซม์ทำงานได้ต่ำในการไอโซเมอไรเซชันของฟรุคโตส ในกรณีที่ไม่มีอิออนของโลหะ ซึ่งลำดับในการกระตุ้นเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus coagulans* ให้เกิดไอโซเมอไรเซชันของฟรุคโตสด้วยอิออนของโลหะ มีดังนี้ โคบอลท์ (Co^{2+}) > แมกนีเซียม (Mg^{2+}) > แมงกานีส (Mn^{2+}) (Marg และ Clark, 1990)

จ. ทรานส์กลูโคซิเดส (transglucosidase)

เอนไซม์ทรานส์กลูโคซิเดส โดยทั่วไปใช้ชื่อ แอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase) ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตโดยรา เป็นพวกไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีขนาดของโมเลกุล 116,000 ดัลตัน มีค่าพีไอ 5.0 และ 5.1 พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 4.0 และ 4.5 จะมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีสับสเตรท เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ย่อยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ในมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (maltooligosaccharides), ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomaltooligosaccharides) และสารละลายแป้ง แต่เอนไซม์ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* ทำงานได้ต่ำในสารละลายแป้ง (อ้างโดย Teague และ Blumm, 1992) ซึ่งต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตโดยยีสต์ และเอนไซม์ทรานส์กลูโคซิเดสที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* มีกิจกรรมที่สูง ในการย้ายกลูโคสจากด้านปลาย (nonreducing end)

ของมอลโตส หรือเดกซ์ตริน ไปยังกลูโคส หรือมอลโตส และในกระบวนการแซคคาริฟิแคชัน ผลผลิตหลักที่ได้จากเอนไซม์ชนิดนี้ คือ ไอโซมอลโตส และพาโนส ส่วนโคจิไบโอส และไนจีโรส เกิดในปริมาณน้อย (Mccleary และคณะ, 1989)

ฉ. ไอโซอะไมเลส (isoamylase)

เอนไซม์ไอโซอะไมเลส เป็นเอนไซม์ย่อยไกลโคเจนให้สมบูรณ์ และนำมาใช้ทางการค้า โดยใช้ *Pseudomonas amyloderamosa* เท่านั้นเป็นแหล่งผลิตของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้ไม่สามารถย่อยพูลลูแลน เอนไซม์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) ที่มีขนาดของโมเลกุล 45,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 4.4 ซึ่งไม่ต้องการโลหะเป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) มอลโตไตรโอส และมอลโตเตตราโอส จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสมบูรณ์ ส่วนซอร์บิตอล (sorbitol) และมัลติตอล (maltitol) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่ออะไมโลเพคตินเป็นสับสเตรท (Teague และ Blumm, 1992)

ช. ไซโคลเดกซ์ตรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase; CGTase)

เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ตรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส หรือซีจีทีเอสทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นสายสั้นๆ แล้วเชื่อมปลายด้วยปฏิกิริยาแอลฟา-1,4-ดี-กลูโคไพราโนซิลทรานเฟอร์ (α-1,4-D-glucopyranosyltransfer) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้ (Forgarty และ Kelly, 1990)

$$G_n \underset{\text{coupling}}{\overset{\text{cyclization}}{\rightleftharpoons}} G_{(n-x)} + CDs$$

$$G_n + G_o \overset{\text{disproportionation}}{\rightleftharpoons} G_{(n-x)} + G_{(o+x)}$$

โดย Gn และ Go เป็นสายของแอลฟา-1,4-ดี-กลูโคไพราโนซิล ที่มีจำนวนของดี-กลูโคไพราโนส (D-glucopyranose) เท่ากับ n และ o ตามลำดับ ซึ่ง x เป็นส่วนหนึ่งของสายแอลฟา-1,4-กลูโคไพราโนส

เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ย่อยแป้ง ทำให้ได้ไซโคลเดกซ์ตริน (cyclodextrins; CDs) และนอกจากนี้ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาทรานเฟอเรส (transferase) ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ ไซไคลเซชัน (cyclization), คอบปลิงก์ (coupling), ดิสพรอปพอร์ชันเนชัน (disproportionation) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) (Bovetto และคณะ, 1992) โดยหน้าที่ของเอนไซม์ซีจีทีเอส (CGTase) จะสัมพันธ์กับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Klein และคณะ, 1992; Lawson และคณะ, 1994; Nakamura และคณะ, 1992) ซึ่งในปฏิกิริยาไซไคลเซชัน แป้งจะถูกย่อย และทำให้ตรงด้านปลายเชื่อมติดกันเกิดเป็นโครงสร้างวงกลมปิด เรียกว่า ไซโคลเดกซ์ตริน (cyclodextrins) ซึ่งปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ และวงแหวนสามารถเปิดออกได้โดยการทำงานของเอนไซม์ซีจีทีเอส และในปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน (transglycosylation) รวมถึงการย่อยแป้ง หรือโมเลกุลของไซโคเดกซ์ตริน และเชื่อมพวกนี้กับโมเลกุลของกลูโคส หรือโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่ เป็นผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวของสายโมเลกุลที่ไม่ได้เป็นวงปิด ในกรณีที่น้ำเป็นแอคเซบเตอร์ (acceptor) ปฏิกิริยาการย่อยก็จะเกิดขึ้น ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ซีจีทีเอสเหมือนกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และถ้าปฏิกิริยายังคงดำเนินต่อไปในระยะเวลาที่เพียงพอ ก็จะเกิดภาวะสมดุลระหว่างไซโคลเดกซ์ตริน และเดกซ์ตรินที่ไม่มีลักษณะเป็นวง โดยที่ภาวะสมดุลนี้อาจเกิดได้โดยการใช้แป้ง หรือไซโคลเดกซ์ตริน เป็นสับสเตรทเริ่มต้น (Hedges, 1992)

นอกจากนี้ยังได้มีการนำสารละลายเคมีมาใช้ควบคุมทิศทางการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการผลิตไซโคลเดกซ์ตรินแต่ละชนิด ตัวอย่างสารละลาย เช่น โทลูอีน (toluene) โดยบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะถูกผลิตขึ้นก่อน ในขณะที่แอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะถูกผลิตเมื่อมีดีคานอล (decanol) และในการผลิตแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะมีการใช้ร่วมกันของแอลฟา-แนบทอล (α-naphthol) และเมทธิลเอทธิลคีโตน (methylethylketone) หรือสารประกอบพวกที่เป็นวงแหวน โดยที่ผลผลิตและปัจจัยการเพิ่มผลผลิตจะแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารอินทรีย์ที่นำมาใช้โดยตรงต่อปฏิกิริยา และเอนไซม์ที่ใช้ (Hedges, 1992) นอกจากนี้เอนไซม์ยังต้องการแคลเซียมอิออน เช่นเดียวกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เพื่อให้มีความเสถียรได้สูง

เอนไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่ผลิตโดย *Bacillus* sp. และ *Klebsiella* sp.(Teague และ Blumm, 1992)

เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตจากกลุ่ม *Bacillus* เช่น *Bacillus marcerans* (Kitahata และคณะ, 1974), *Bacillus circulans* (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1988), *Bacillus megaterium* และกลุ่ม *bacillus* ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง (Nagamura และ Horikoshi, 1976; Nomoto และคณะ, 1986) จะนำมาใช้ในการผลิตไซโคลเดกซ์ตรินจากแป้งข้าวโพด หรือแป้งมันสำปะหลังในทางอุตสาหกรรม

โดยปกติในการย่อยแป้งจะใช้ความร้อน ซึ่งอาจมีเอนไซม์ย่อยหรือไม่ก็ได้ แต่ได้มีการเติมเอนไซม์ซีจีทีเอสเพื่อย่อยแป้งให้ได้ไซโคลเดกซ์ตริน โดยในขั้นตอนนี้ต้องใช้พลังงานเป็นจำนวนมาก และเป็นการยากมากที่จะใช้แป้งที่มีความเข้มข้นสูง เพราะความหนืดของสารละลายแป้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้แป้งยังเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก และให้ผลผลิตของไซโคลเดกซ์ตรินในปริมาณที่สูง ซึ่งมีประโยชน์ในทางเศรษฐกิจ โดยนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม แต่ราคาของไซโคลเดกซ์ตรินที่ผลิตยังคงสูง ดังนั้นการขยายการนำไซโคลเดกซ์ตรินไปใช้ยังอยู่ในวงจำกัด จึงได้มีการพยายามหาวิธีที่จะเพิ่มผลผลิตของไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งส่วนใหญ่ค้นหาจากพวกจุลินทรีย์ ดังนั้น Lee และ Kim (1991) ได้ทำการแยก *Bacillus* sp. BE101 ที่ผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสที่สามารถย่อยแป้ง และให้ผลผลิตของไซโคลเดกซ์ตรินในปริมาณที่สูง

Kaneko และคณะ (1987)ได้ทำการคัดเลือก *Bacillus* sp. No.38-2 ซึ่งผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสได้ดีที่สุด จากทั้งหมด 1,000 สายพันธุ์ โดยการทำงานของเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 3 ช่วง คือ 4.5, 6.0 และ 8.5 ซึ่งไม่จำเพาะจะต้องอยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง และก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus stearothermophilus* พบว่ามีขนาดของโมเลกุล 68,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 4.6 เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus macerans* คือมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 6.0 และมีความเสถียรมากที่พีเอชสูง คือในช่วงระหว่าง 8.0-10.0 โดยเอนไซม์ทนต่อความร้อนมากที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (อ้างโดย Teague และ Blumm, 1992)

เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. No.38-2 มีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม เพราะทนต่ออุณหภูมิสูง และยังสามารถให้ผลผลิตของไซโคลเดกซ์ตรินในปริมาณที่สูง (Horikoshi และ Akiba, 1982; Sharp และ Munster, 1988)

เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. No.382 และ *Bacillus* sp. No.17-1 ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำดีอีเออี-เซลลูโลสโครมาโตกราฟี (DEAE-cellulose chromatography) และเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) ด้วยเซฟาเดกซ์ จี-100 คอลัมน์ (sephadex G-100 column) แล้วนำส่วนของเอนไซม์ที่ได้มาทำเจลอิเลคโตรฟอรีซิส (gel electrophoresis) โดยเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของ *Bacillus* sp. No.38-2 จะมีส่วนผสมของเอนไซม์ 3 แบบ คือ เอซิดซีจีทีเอส (acid CGTase) มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 4.6, นิวตรัลซีจีทีเอส (neutral CGTase) มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 7.0 และอัลคาไลน์ซีจีทีเอส (alkaline CGTase) มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 8.5 (Horikoshi, 1990)

นอกจากนี้พบว่า *Bacillus circulans* ผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสได้ 2 ชนิด โดยชนิดแรกมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 4.5-4.7 ขณะที่เอนไซม์ซีจีทีเอสอีกชนิดไม่ทนในสภาวะที่เป็นกรด มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 7.0-9.0 แต่เอนไซม์ซีจีทีเอสทั้ง 2 ชนิด มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 45 องศาเซลเซียส มีขนาดของโมเลกุล 88,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 5.4 (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1988)

เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus macerans* มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 6.0-8.0 และอุณหภูมิในช่วงระหว่าง 55-60 องศาเซลเซียส หน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์ มีขนาดของโมเลกุลประมาณ 75,000 ดัลตัน แต่มีรายงานบางฉบับแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตเป็นพวกโมโนเมอริคโปรตีน (monomeric protein) ขณะที่รายงานฉบับอื่นบ่งบอกว่าเป็นไดเมอริคโปรตีน (dimeric protein) โดยที่เอนไซม์ซีจีทีเอสนี้มีค่าพีไอ 4.6 (Kitahata และคณะ, 1974)

Lee และคณะ (1992) ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอส และจากการวิเคราะห์พบว่าเป็น *Klebsiella oxytoca* ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน โดยส่วนใหญ่แหล่งคาร์บอนที่เหนี่ยวนำการผลิตของเอนไซม์ซีจีทีเอส คือ อะไมโลเพคติน และสารละลายแป้ง ขณะที่โมโนแซคคาไรด์ (monosaccharides), ไดแซคคาไรด์ (disaccharides)และอะไมโลส ไม่เหนี่ยวนำการผลิตของเอนไซม์ซีจีทีเอส โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน คือ ใช้แป้งข้าวโพดปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และอัตราส่วนของเอนไซม์ซีจีทีเอสต่อแป้งข้าวโพดประมาณ 10 ยูนิตต่อกรัมของแป้งข้าวโพด ใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.0 เป็นเวลา 19 ชั่วโมง ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ซีจีทีเอส คือ สามารถผลิตแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตรินในปริมาณที่มากจากแป้ง โดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่สั้น และไม่ต้องมีสารตัวอื่นมาช่วย และภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ ผลิตไซโคลเดกซ์ตรินได้สูงถึง 14.75 กรัมต่อลิตร ในเวลา 19 ชั่วโมง ซึ่งอัตราส่วนของแอลฟา-, บีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน คือ 96.5:3.5:0

Kometani และคณะ (1994) ได้นำเอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีกิจกรรมของไซไคลเซชัน, คอปปลิงก์ และกิจกรรมการย่อยแป้ง โดยจากกราฟระหว่างพีเอช และกิจกรรมแต่ละชนิดของเอนไซม์ซีจีทีเอสจะมีพีค (peak) เพียงพีคเดียวเท่านั้น ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 5.5 และปฏิกิริยาการเกิดทรานส์ไกลโคซิเลชันให้ได้แซคคาไรด์ (saccharides) และฟลาวานอยด์ (flavanoids) เกิดที่พีเอชเป็นด่าง ได้ผลมากกว่าพีเอชที่เป็นกลาง และในระหว่างพวกฟลาวานอยด์เดียวกัน พบว่าพวกที่มีรูติโนส (rutinose) เช่น ไดออสมิน (diosmin) และเฮสเปอริดิน (hesperidin) จะเกิดทรานส์ไกลโคซิเลชันได้ดีกว่าพวกที่มีนีโอเฮสเปอริโดส (neohesperidose) เช่น นาริจิน (narigin) และนีโอเฮสเปอริดิน (neohesperidin)

Mori และคณะ (1994) ได้นำเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Brevibacterium* sp. No.9605 มาทำให้บริสุทธิ์พบว่า มีขนาดของโมเลกุลประมาณ 75,000 ดัลตัน และมีค่าพีไอ 2.8 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่

พีเอช 10.0 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์เสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-8.0 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งความเสถียรจะลดลงเมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โดยเอนไซม์ผลิตแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน เป็นผลผลิตหลักจากแป้งในขั้นตอนแรกของปฏิกิริยา และบีตา-ไซโคเดกซ์ตรินจะเพิ่มในเวลาต่อมา และในปี ค.ศ.1995 Mori และคณะ ได้ทำการศึกษาสภาวะของปฏิกิริยาการสร้างแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน โดยเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียตัวเดียวกันนี้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน คือที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยการเติมแคลเซียมอิออนทำให้เอนไซม์ซีจีทีเอสเพิ่มการทนความร้อนและการผลิตไซโคลเดกซ์ตรินเป็นผลเนื่องมาจากความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน และในที่มีเอทธานอล พบว่าผลผลิตของแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตรินจากสารละลายแป้งเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาลักษณะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ผลิตโดย *Clostridium thermosulfurogenes* EM1 เพิ่มเติม และเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการวิเคราะห์แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ใหม่เป็น *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ผลิตเป็นเอนไซม์ซีจีทีเอส และผลผลิตที่วิเคราะห์ได้หลังจากการบ่มเอนไซม์กับแป้ง คือ แอลฟา-, บีตา- และ แกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งกิจกรรมจำเพาะสำหรับปฏิกิริยาไซไคลเซชันของเอนไซม์ชนิดนี้คล้ายกับเอนไซม์ซีจีทีเอสชนิดอื่นๆ แต่กิจกรรมในการย่อยจะสัมพันธ์กันมากเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ซีจีทีเอส (Wind และคณะ, 1995)

Lee และ Tao (1995) ได้ทำการศึกษารูปแบบจลนศาสตร์ของเอนไซม์ซีจีทีเอสสำหรับสับสเตรท และการยับยั้งผลผลิตของปฏิกิริยาไซไคลเซชันของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus macerans* และได้มีการสังเกตจลนศาสตร์ในการยับยั้งของสับสเตรทต่อเอนไซม์ซีจีทีเอส พบว่ายับยั้ง 5.89±0.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสม คือ 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการศึกษาการยับยั้งด้วยผลผลิต โดยใช้แอลฟา-, บีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งปฏิกิริยาไซไคลเซชันของเอนไซม์ซีจีทีเอสอาจขึ้นอยู่กับชนิดของไซโคลเดกซ์ตรินหลักที่เอนไซม์ผลิตได้ ซึ่งจลนศาสตร์การยับยั้งของผลผลิตเกิดไม่สมบูรณ์ โดยมีค่ายับยั้ง 0.77±0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับแอลฟา-

ไซโคลเดกซ์ตริน และ 0.16±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ของทั้งบีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน และอัตราสูงสุดในการสร้างไซโคลเดกซ์ตริน และค่า Km ที่วิเคราะห์ได้ คือ 0.0046±0.0001 ไมโครโมลต่อนาทีต่อไมโครกรัม และ 0.054±0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยรูปแบบที่วิเคราะห์ได้เป็นการยืนยันสมมติฐานของโครงสร้างของเอนไซม์ซีจีทีเอส ซึ่งจะประกอบด้วยตำแหน่งที่ให้สารอื่นมาจับ (binding site) อย่างน้อยมี 2 ตำแหน่ง

เอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ มีบทบาทเพิ่มมากขึ้นในเทคโนโลยีด้านอาหาร ตัวอย่างเอนไซม์ที่นำมาใช้ คือ เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Thermoanaerobacter* และพวกที่ทนความร้อนได้สูงที่เติบโตในที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งเอนไซม์ทนต่อความร้อนได้สูง และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 90-95 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.0 (Pedersen และคณะ, 1995)

จากการนำเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์มาตรวจสอบพบว่า เอนไซม์ผลิตได้ดีเมื่อมีการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อ และได้นำ *Bacillus macerans* 314 และ *Bacillus amyloliquifaciens* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ส่วนใหญ่ใช้กัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose และมีการเติมคอร์น-สตีฟลิเควอร์ (corn-steep liquor) เพื่อเพิ่มผลผลิตของไซโคลเดกซ์ตริน และการเติมแป้งโดยตรงทำให้มีการผลิตแอลฟา- และบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus macerans* 314 ใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสได้มากที่สุดในอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ที่ผ่านการไลโอฟิไลส์ (lyophilized) ให้กิจกรรมสูงสุดที่ความเข้มข้น 1.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 6.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Ismail และคณะ, 1996)

Ferrarotti และคณะ (1996) ได้เพาะเลี้ยง *Bacillus circulans* DF9 ที่ผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอส พบว่า โคโลนีที่แยกได้มีความแตกต่างเป็น 2 ชนิด ซึ่งแยกเป็น ชนิดเอส และอาร์ (S , R type) โดยที่ทั้ง 2 ผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอส

ได้เหมือนกัน ต่อมา Marechal และคณะ (1996) ได้นำเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus circulans* DF9 ชนิดอาร์ มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีค่าพีไอ 5.3 และมีขนาดของโมเลกุล 78,000 ดัลตัล โดยพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 4.5-7.5 ซึ่งเอนไซม์ทนต่ออุณหภูมิที่สูงถึง 55 องศาเซลเซียส และความเสถียรจะเพิ่ม 4-5 เท่า เมื่อมีการเติมแคลเซียมอิออน 10-100 มิลลิโมลาร์ หรือ แอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน 10 มิลลิโมลาร์ โดยอัตราส่วนระหว่าง แอลฟา-, บีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน ที่ผลิตคิดเป็น 1: 0.9: 0 และผลิตไซโคลเดกซ์ตรินสูงสุดเมื่อใช้สารละลายแป้ง 5 เปอร์เซ็นต์

1.3.9.3 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้ง

ก. มอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrins)

มอลโตเดกซ์ตรินมีลักษณะเป็นโพลิเมอร์ของแซคคาไรด์ (saccharide) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคส (D-glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 และมีค่าดีอี (dextrose equivalent; DE) น้อยกว่า 20 ซึ่งค่าดีอีเป็นค่าที่บอกปริมาณของน้ำตาลรีดิวซิงค์ (reducing sugar) ที่อยู่ในรูปของน้ำหนักแห้ง โดยเป็นการบอกขอบเขตในการย่อยแป้ง ซึ่งสัมพันธ์กับน้ำหนักของโมเลกุลเฉลี่ยของโพลิเมอร์ของกลูโคสในมอลโตเดกซ์ตริน โดยถ้าการย่อยเพิ่มมากขึ้น ทำให้น้ำหนักของโมเลกุลเฉลี่ยลดลง และค่าดีอีก็จะเพิ่มขึ้น โดยแป้งที่ไม่ถูกย่อยมีค่าดีอีเท่ากับศูนย์ ซึ่งค่าดีอีเป็นค่าที่บอกถึงเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ดี โดยมอลโตเดกซ์ตรินผลิตได้จากการย่อยแป้งข้าวโพดด้วยกรด หรือเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งจะไม่มีรสหวาน โดยจะเตรียมเป็นผงสีขาว หรือสารละลายเข้มข้น (Alexander, 1992)

ในการผลิต liquefact ใช้เอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย เช่น แอลฟา-อะไมเลส ในการย่อยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ที่อยู่ภายในไกลโคเจนหรือแป้ง แต่จะย่อยไม่สมบูรณ์ทำให้ได้มอลโตเดกซ์ตริน และการผลิตในทางการค้าแบคทีเรียที่ใช้คือ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus thermophilus* (Alexander, 1992) โดยได้มีการศึกษาหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในยีนของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ามีความเหมือนกัน 65 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างยีนของ *Bacillus thermophilus* กับ *Bacillus*

amyloliquefaciens หรือ *Bacillus licheniformis* และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus licheniformis* พบว่า มีลำดับของยีนเหมือนกัน 80 เปอร์เซ็นต์

โดยทั่วไปมอลโตเดกซ์ตรินมีความเหนียวที่ต่ำ แต่อย่างไรก็ตาม ความเหนียวเพิ่มมากขึ้นเมื่อค่าดีอีลดลง นอกจากนี้ปฏิกิริยาบราวนิง (blowning) ที่เกิดในผลิตภัณฑ์ของอาหาร พบว่าระดับของน้ำตาลรีดิวซิงค์สูง และพบโปรตีนจากกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับของน้ำตาลรีดิวซิงค์ที่ต่ำในมอลโตเดกซ์ตรินทำให้ปฏิกิริยาบราวนิงลดลง และกลุ่มของอัลดีไฮด์ (aldehyde group) มีผลต่อการเกิดน้ำตาลรีดิวซิงค์ด้วย

คุณสมบัติในการจับกับสารอื่นของมอลโตเดกซ์ตรินลดลงเมื่อค่าดีอีเพิ่มขึ้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับขนาดโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต โดยเมื่อมีขนาดเล็กจะจับกับสารอื่นได้ต่ำ และมอลโตเดกซ์ตรินที่มีค่าดีอีต่ำ จะมีขนาดโมเลกุลใหญ่ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำฟิลม์ หรือสารเคลือบ (coating agent) นอกจากนี้มอลโตเดกซ์ตรินละลายน้ำได้เมื่อมีค่าดีอีสูง และเมื่อค่าดีอีเพิ่ม เป็นผลทำให้เพิ่มเดกซ์โตรส (dextrose) และเพิ่มความหวาน แต่อย่างไรก็ตาม มอลโตเดกซ์ตรินที่มีค่าดีอีอยู่ในช่วงระหว่าง 5-115 พบว่า เดกซ์โตรสมีปริมาณสูงสุดเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ซึ่งมีผลต่อความหวานเพียงเล็กน้อย

มอลโตเดกซ์ตรินได้จากการย่อย ซึ่งผลผลิตที่ได้มีค่าดีอี (dextrose equivalent; DE) น้อยกว่า 20 ดังนั้นจึงมีรสนุ่มพร้อมทั้งไม่มีความหวาน มอลโตเดกซ์ตรินส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในรูปแห้ง โดยใช้เป็นสารช่วยกระจายในกาแฟ (dispersing agent) นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำขนมปัง, สบู่, เครื่องดื่ม, แป้ง, อาหารที่ให้แคลอรีต่ำ และจำพวกอาหารว่าง ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการนำไปใช้อย่างรวดเร็ว โดยใช้มอลโตเดกซ์ตรินแทนไขมัน (fat) ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ (Alexander, 1992)

ข. กลูโคสไซรัป (glucose syrup) (Howling, 1992)

กลูโคสไซรัปทั้งหมดเป็นผลิตผลที่ได้จากการย่อยแป้งและเป็นส่วนผสมของโพลิเมอร์ของดี-กลูโคส โดยแหล่งของแป้งที่ใช้ในการผลิต

กลูโคสไซรัปทั่วไป คือ ข้าวโพด ซึ่งมีการใช้ทั้งในอเมริกา และยุโรป โดยในอุตสาหกรรมบดเปียก (wet- milling) จะผลิตกลูโคสไซรัปได้หลายชนิด (corn syrup, starch syrup) โดยมีค่า ดีอีอยู่ในช่วงระหว่าง 20-99.4 ซึ่งโดยทั่วไปในอุตสาหกรรมจะใช้กรดในการย่อยเพื่อให้ได้ไซรัปที่มีค่าดีอีสูงถึง 42 และสำหรับไซรัปที่มีค่าดีอีอยู่ในช่วงระหว่าง 42-64 จะใช้เอนไซม์ในการควบคุมในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน ไซรัปที่มีค่าดีอีสูงโดยเฉพาะเดกซ์โตรส หรือ ไฮด์ฟรุคโตรสคอร์นไซรัป (high fructrose corn syrup) จะผลิตโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และในอุตสาหกรรมการผลิตเอทธานอลบางแห่งใช้คอร์นไซรัปที่มีค่าดีอีสูงเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในถังหมักของยีสต์

จากคุณสมบัติของกลูโคสไซรัป พบว่า ความเหนียวขึ้นอยู่กับระดับของของแข็ง และอุณหภูมิ โดยที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิเดียวกัน พบว่า ความเหนียวขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์โบไฮเดรต และน้ำหนักของโมเลกุล ซึ่งถ้าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงจะทำให้มีความเหนียวสูงด้วย

ในการผลิตกลูโคสไซรัปทางการค้า จะใช้การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนกรด ซึ่งได้จากราที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus* และ *Rhizopus* ซึ่งมีความสำคัญมากในการนำมาใช้ผลิตกลูโคสไซรัป โดยในอุตสาหกรรมการบดเปียกในยุโรปและอเมริกาเหนือจะใช้ *Aspergillus niger* var. เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ ถึงแม้ว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ที่ทำงานแตกต่างกัน แต่จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเร่งการย่อยในระยะแรก และความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ใช้ คือ 15-45 มิลลิกรัมต่อกรัมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งผลิตผลที่ได้มีการปนเปื้อนของเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (α-glucosidase) หรือ ทรานส์กลูโคซิเดส (transglucosidase) ทำให้เป็นผลเสียในการผลิตกลูโคสไซรัป ดังนั้นเอนไซม์ทุกชนิดที่นำมาใช้จะต้องกำจัดออกจากผลผลิต และผลผลิตที่ได้จาก *Aspergillus niger* var. จะมีการปนเปื้อนของเอนไซม์เซลลูเลส, เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และโปรตีเอส แต่มีผลเพียงเล็กน้อยในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Teague และ Blumm, 1992)

ในการผลิตกลูโคสไซรัป โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส อาจมีการใช้เอนไซม์ชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น พูลลูลาเนส, หรือ อะไมเลส จาก *Bacillus megaterium* ซึ่งช่วยลดเวลาในการทำปฏิกิริยา และเพิ่มระดับของกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้าย (Teague และ Blumm, 1992)

มีการนำกลูโคสไซรัปมาใช้กันมากในปฏิกิริยาการหมักในอุตสาหกรรมยา และสารเคมี ซึ่งความสามารถในการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ โดยยาปฏิชีวนะบางชนิดผลิตได้จากการหมักของกลูโคสไซรัปที่มีค่าดีอี 26 หรือ มอลโตเดกซ์ตริน นอกจากนี้มีการใช้กลูโคสไซรัปในอุตสาหกรรมเบียร์ แต่ยังไม่แพร่หลาย ซึ่งอาจเป็นเพราะกฎหมายท้องถิ่น ซึ่งในอังกฤษจะมีการใช้กลูโคสไซรัปคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคสไซรัปทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ในยุโรป และในทางตรงข้ามในประเทศเยอรมันไม่มีตลาดการค้าของกลูโคสไซรัปในการผลิตเบียร์ ถึงแม้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงหลังปี ค.ศ. 1992 แต่ในอเมริกา, แคนาดา และออสเตรเลีย มีการนำกลูโคสไซรัปมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเบียร์

ค. มอลโตสไซรัป (maltose syrup)

มอลโตสไซรัปผลิตได้จากกระบวนการแซคคาริฟิเคชันของแป้งliquefact ที่มีน้ำหนักแห้ง 35-45 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 4.8-5.2 ซึ่งในอุตสาหกรรมแป้ง มอลโตสไซรัปที่ผลิตได้แบ่งเป็นไฮด์มอลโตส (high maltose) และเอกซ์ตราไฮด์มอลโตส (extra-high maltose) หรือไฮด์คอนเวอร์ชันไซรัป (high conversion syrup) ซึ่งในการผลิตมอลโตสไซรัปทั้ง 2 แบบ เริ่มต้นโดยการใช้ liquefact ที่มีค่าดีอี 5-10 นำมาเปลี่ยนเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ผลิตโดย *Aspergillus oryzae* หรือเอนไซม์บีตา-อะไมเลส ที่ได้จากพืช ทำให้ไฮด์มอลโตสไซรัปที่ได้มีค่าดีอีในช่วงระหว่าง 48-52 ซึ่งมีน้ำหนักของกลูโคสน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักของมอลโตส 48-52 เปอร์เซ็นต์ และมีการใช้เอนไซม์ชนิดอื่นร่วมกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส หรือ เอนไซม์บีตา-อะไมเลส ในการผลิตเอกซ์ตราไฮด์มอลโตสไซรัป ซึ่งไซรัปชนิดนี้มีค่าดีอี 50-60 โดยมีน้ำหนักของกลูโคสน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักของมอลโตส 70-85 เปอร์เซ็นต์ โดยเอนไซม์ที่นำมาใช้ร่วมกันคือ เอนไซม์ไอโซอะไมเลส หรือ เอนไซม์พูลลูลาเนส

ไฮด์คอร์นเวอร์ชันไซรัป ที่เตรียมจากส่วนที่ได้จากการย่อยแป้งที่มีค่าดีอี 38-42 นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ หรือกรด และผ่านกระบวนการแซคคาริฟิริเคชันด้วยเอนไซม์บีตา-อะไมเลส หรือ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ผลิตโดย *Aspergillus oryzae* ร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากรา โดยไซรัปที่ได้มีค่าดีอี 62-63 จะมีน้ำหนักของกลูโคส 30-35 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักของมอลโตส 30-45 โดยที่เป็นน้ำหนักของมอลโตไตรโอส 8-13 เปอร์เซ็นต์ (Hebeda, 1993)

ง. ไฮด์ฟรุคโตสคอร์นไซรัป (high fructose corn syrup; HFCS)

การใช้วัตถุดิบในการผลิตฟรุคโตสไซรัป ครั้งแรกจะใช้ข้าวโพด และฟรุคโตสไซรัปที่ได้จากแป้งข้าวโพด เรียกว่า ไฮด์ฟรุคโตสคออร์นไซรัป ต่อมาได้มีการนำแป้งจากแหล่งต่างๆ เช่น ข้าว, ข้าวสาลี และมันฝรั่ง มาใช้ซึ่งมีจำนวนมาก และราคาถูกเมื่อเทียบกับข้าวโพด โดยฟรุคโตสไซรัปที่ได้จากแหล่งเหล่านี้เรียก ไฮด์ฟรุคโตสไซรัป (White, 1993)

ในระหว่างการพัฒนาไซรัปในขั้นตอนแรก ได้มีการใช้เอนไซม์ไอโซเมอเรสในการผลิตฟรุคโตส ซึ่งจำเป็นต้องใช้ในปริมาณที่สูง หรือใช้เวลาทำปฏิกิริยานาน โดยปริมาณของเอนไซม์ที่สูงจะไม่เป็นที่ยอมรับ และการใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่นาน จะเป็นสาเหตุในการเกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการ เช่น แมนโนส (mannose) และไซโคส (psicose) รวมทั้งสี และกลิ่นไม่ดี จึงทำให้เพิ่มราคาในการทำให้บริสุทธิ์ (Hebeda, 1993)

ได้มีการใช้เครื่องบดเปียกในการผลิตเฮชเอฟซีเอส ที่มีฟรุคโตส 42 เปอร์เซ็นต์ โดยการไอโซเมอไรเซชันด้วยเอนไซม์ โดยใช้เดกซ์โตรส (dextrose hydrolysate) เป็นสับสเตรท ทำได้โดยการผ่านสับสเตรทลงในคอลัมน์ที่มีการตรึงของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส โดยสภาวะในการเกิดปฏิกิริยานี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ที่ถูกตรึง ซึ่งในการเตรียมต้องทำให้สับสเตรทใสด้วยคาร์บอน หรือ ทำอิออน-เอกซ์เชนจ์ด้วยเรซิน และทำให้มีความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เป็นของแข็ง ซึ่งในการทำให้สับสเตรทใสจะเป็นการกำจัดส่วนที่เป็นพิษต่อคอลัมน์ ขณะเดียวกันก็กำจัดแคลเซียมอิออนซึ่งเป็นพิษต่อการทำงานของเอนไซม์

ด้วย และปรับพีเอชของไซรัปให้อยู่ในช่วงระหว่าง 7.0-8.5 และเติมแมกนีเซียมอิออน ปริมาณ 0.5-5.0 มิลลิโมลาร์ โดยพีเอชที่จำเพาะในการทำงานจะขึ้นอยู่กับความจำเป็นของระบบที่ใช้ผลิต แมกนีเซียมที่เติมจะช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ และเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ ขณะเดียวกันก็จะขัดขวางการยับยั้งซึ่งเป็นผลมาจากแคลเซียมอิออน และในกระบวนการไอโซเมอไรเซชันของกลูโคสเพื่อให้ได้ฟรุคโตส ทำโดยกระบวนการแบบต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 53 ถึง 61 องศาเซลซียส (Teague และ Blumm, 1992)

คุณสมบัติที่สำคัญของเอชเอฟซีเอส คือ ความหวาน โดย 42 เปอร์เซ็นต์ของเฮชเอฟซีเอส มีความหวานเช่นเดียวกับซูโครส (sucrose) โดยทั่วไปให้ความหวานได้ดีที่สุด ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำ และพีเอชต่ำ และมีความหวานน้อยที่อุณหภูมิสูงขึ้นและ พีเอชเป็นกลาง (Hebeda, 1993)

โดยทั่วไปผลึกของฟรุคโตสมีความหวานกว่าซูโครส 20-80 เปอร์เซ็นต์ (อ้างโดย Hebeda, 1993) ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของความหวานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง รวมทั้งอุณหภูมิ, พีเอช และความเข้มข้น (Osberger, 1986)

จุดประสงค์หลักของไซรัปชนิดนี้คือ นำไปใช้ในการทำเครื่องดื่ม ซึ่งได้มีการใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1974 โดยใช้เฮชเอฟซีเอส-42 แทนซูโครส 25 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1980 ได้มีการใช้ เฮชเอฟซีเอส-55 แทนซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ และในปี ค.ศ. 1984 ได้มีการใช้เฮชเอฟซีเอสแทนซูโครส 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท (อ้างโดย Hebeda, 1993) โดยไซรัปชนิดนี้มีราคาถูก และให้พลังงานต่ำกว่าซูโครส แต่ยังคงรักษาระดับความหวานได้เหมือนน้ำตาลธรรมดา เนื่องจากมีความหวานกว่าซูโครส 1.2-1.8 เท่า จึงได้มีการนำมาใช้แทนน้ำตาล (invert sugar) โดยไซรัปที่มีฟรุคโตส 42 เปอร์เซ็นต์ (w/w) จะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ของอาหาร และไซรัปที่มีฟรุคโตส 55 เปอร์เซ็นต์ (w/w) จะนำมาใช้ในการผลิตเครื่องดื่ม (Ramunas, 1993)

จ. ไซโคลเดกซ์ตริน (cyclodextrin) (Hedges, 1992)

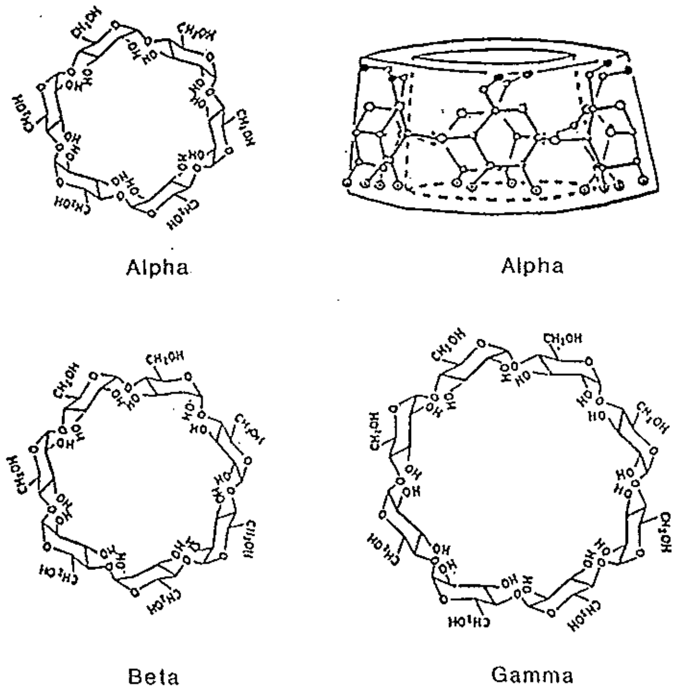
ไซโคลเดกซ์ตรินผลิตได้จากการย่อยแป้ง หรืออนุพันธ์ของแป้งด้วยเอนไซม์ซีจีทีเอส ซึ่งมีลักษณะเป็นวงแหวนของกลูโคไพราโนส

(glucopyranose) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส 6, 7 หรือ 8 โดยจะมีชื่อเรียกตามลำดับ ดังนี้ แอลฟา-, บีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน (รูปที่1) (Hedges, 1992) โดยภายในไซโคเดกซ์ตรินเป็นแบบไม่มีขั้ว (apolar) และสามารถจับกับโมเลกุลของสารอินทรีย์เกิดเป็นสารเชิงซ้อนได้ ไซโคลเดกซ์ตรินมีความเสถียรทั้งทางด้านเคมี และด้านกายภาพ ทั้งยังมีปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น โดยที่หมู่ไฮดรอกซิลของไซโคเดกซ์ตรินมีส่วนในการเปลี่ยนความสามารถในการละลายของไซโคลเดกซ์ตรินในน้ำ และในสารละลายอื่นๆ และเปลี่ยนความสามารถในการจับระหว่างไซโคลเดกซ์ตรินกับสารประกอบ ไซโคลเดกซ์ตริน และอนุพันธ์จะมีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ไซโคลเดกซ์ตรินสามารถป้องกันสารประกอบที่มาจับจากแสง, ความร้อน และออกซิเจน นอกจากนี้นำมาใช้แยกสารประกอบที่จำเพาะออกจากสารผสม (Shieh และ Hedges, 1996)

Villiers เป็นคนแรกที่ค้นพบ ไซโคลเดกซ์ตริน ในขณะที่กำลังเพาะเลี้ยง *Bacillus amylobacter* ในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนผสม จึงทำการแยกและศึกษาคุณสมบัติของผลึกที่ได้ ซึ่งเรียกว่า เซลลูโลซีน (cellulosine) ต่อมาในระหว่างที่ Schardinger ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเสีย ตรวจพบเซลลูโลซีนตามที่ Villiers ได้อธิบาย ในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนผสม จึงได้ทำการแยกเชื้อ และวิเคราะห์เป็น *Bacillus macerans* ซึ่งปัจจุบันยังคงใช้เป็นแหล่งผลิตของเอนไซม์ในการผลิตไซโคลเดกซ์ตริน

ในการผลิตทางการค้ามี 2 วิธี คือ วิธีที่ใช้สารเคมี และวิธีที่ไม่ใช้สารเคมี พบว่า สารเคมีมีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยตรงในการผลิตไซโคลเดกซ์ตริน ส่วนอีกวิธีจะไม่มีการนำสารเคมีอินทรีย์มาใช้โดยตรงต่อปฏิกิริยา โดยไซโคลเดกซ์ตรินที่ผลิตขึ้นอยู่กับเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการผลิต

การใช้วิธีของสารเคมี ประกอบด้วย แป้งที่ใช้เป็นสับสเตรท, เอนไซม์ และสารเคมี ซึ่งมีผลโดยตรงต่อปฏิกิริยา โดยสับสเตรทที่ใช้ทั่วไป คือ แป้งที่ผ่านการย่อยที่มีค่าดีอีน้อยกว่า 10 มีการควบคุมความเข้มข้นของแป้งเพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ตริน และผลผลิตของไซโคลเดกซ์ตรินต่อหน่วยน้ำหนักของสับสเตรท และหน่วยปริมาตรของปฏิกิริยา จะเปลี่ยนแปลงความ



รูปที่1 โครงสร้างวงแหวนของโมเลกุลของ α-, β- และ γ-CD โดยการการมองจากด้านบน (top view) ด้านข้าง (side view) ของ α-CD จะแสดงความสัมพันธ์ของกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) ที่อยู่ด้านนอกวงแหวน กับอะตอมของไฮโดรเจน และอะตอมของไกลโคซิดิกออกซิเจน ที่อยู่ตามแนวช่องของโมเลกุลไซโคลเดกซ์ตริน

เข้มข้นของแป้ง และเอนไซม์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพบว่า มีส่วนผสมของไซโคลเดกซ์ตรินที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนกับสารเคมีอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งไซโคลเดกซ์ตรินที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนนี้ แยกออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ของปฏิกิริยาได้โดยการปั่น หรือ กรอง และหลังจากที่แยกเอาสารเคมีออกจากไซโคลเดกซ์ตรินแล้ว ไซโคลเดกซ์ตรินก็จะละลายน้ำได้ ซึ่งนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้เหมือนกับผลผลิตที่ได้จากสารละลายแป้ง และทำให้อยู่ในรูปของผลึก โดยผลผลิตที่ได้นี้มีความบริสุทธิ์สูง และมีไซโคลเดกซ์ตรินเป็นอย่างน้อย 98 เปอร์เซ็นต์

วิธีที่ไม่มีการใช้สารเคมี ประกอบด้วยส่วนของแป้งที่ผ่านการย่อย และเอนไซม์ เนื่องจากไม่มีสารเคมีจึงไม่สามารถป้องกันการเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจทำให้มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในผลผลิตสุดท้าย จึงต้องใช้สภาวะที่ปลอดเชื้อ (sterile) และมีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งจะแย่งกับเอนไซม์ซีจีทีเอสในการใช้สับสเตรท ทำให้สูญเสียผลผลิต เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซีจีทีเอสด้วยความร้อน หรือกรด และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่เติมลงไปจะไม่ย่อยไซโคลเดกซ์ตริน แต่จะย่อยเดกซ์ตรินที่ไม่อยู่ในรูปของวงแหวน (noncyclic dextrin) และหลังจากทำให้บริสุทธิ์ น้ำจะถูกระเหยออกจากปฏิกิริยาโดยการกลั่น เพื่อเพิ่มผลผลิตของบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งละลายน้ำได้น้อยที่สุด โดยทั่วไปถ้ามีการระเหยน้ำออกในปริมาณที่มาก จะพบผลึกของไซโคลเดกซ์ตรินมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งแยกผลึกออกได้โดยการปั่น หรือกรอง นำมาล้างโดยใช้น้ำปริมาณที่น้อย และทำให้แห้ง ซึ่งผลผลิตที่ได้มีไซโคลเดกซ์ตรินอยู่อย่างน้อย 98 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนของเดกซ์ตรินที่ไม่อยู่ในรูปของวงแหวนมีมากกว่าที่พบในวิธีที่มีการใช้สารเคมี

การสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ตรินจากมอลโตสที่มีน้ำหนักของโมเลกุลต่ำ โดยใช้เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus macerans* ได้มีการพัฒนาในระบบที่มีการใช้สารละลายอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะถูกสังเคราะห์ในระบบที่ประกอบด้วยน้ำ และไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) แต่อย่างไรก็ตาม ไซโคลเดกซ์ตรินไม่ถูกสร้างในสารละลายบัฟเฟอร์ และบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินจะผลิตได้สูงสุดเมื่อใช้ไซโคลเฮกเซนปริมาณ 44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการสังเคราะห์ต้องทำที่อุณหภูมิต่ำ

เท่านั้น ตัวอย่างเช่น ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีสารละลายอินทรีย์อีกหลายชนิดที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ตรินจากมอลโตส โดยบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะถูกสังเคราะห์ในระบบที่มีการใช้สารละลายอินทรีย์ต่างๆ ที่ผสมกับน้ำ เช่น เฮกเซน (hexane), โดดีเคน (dodecane) และเฮกซาดีเคน (hexadecane) นอกจากนี้ แอลฟา- และบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินถูกสังเคราะห์ในสารละลายอินทรีย์ที่มีหมู่ของอัลกอฮอล์ เช่น เอทธานอล, โพรพานอล (propanol), บิวทานอล (butanol) และเพนทานอล (pentanol) ที่ผสมกับน้ำ ในช่วงอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา คือ 7-50 องศาเซลเซียส โดยในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวนี้ แอลฟา- และบีตา- ไซโคลเดกซ์ตรินถูกสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินผลิตจากมอลโตสได้สูงสุดประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง (Morita และคณะ, 1996)

จากโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ตรินพบว่า หมู่ไฮดรอกซิลจะอยู่ด้านนอกของโมเลกุล ทำให้ไซโคลเดกซ์ตรินมีคุณสมบัติในการละลาย ส่วนอะตอมของไฮโดรเจน และกลุ่มของไกลโคซิดิกออกซิเจนจะอยู่ภายในโมเลกุล ทำให้ภายในโมเลกุลของไซโคลเดกซ์ตรินมีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) ซึ่งสามารถจับกับโมเลกุลของสารอินทรีย์เกิดเป็นสารเชิงซ้อน โดยที่คาร์บอนจำนวน 6 ตัว ของโมเลกุลของกลูโคสมีการหมุนแบบอิสระ เป็นผลทำให้ด้านปลายของช่องเปิดจะแคบกว่าอีกด้าน ซึ่งมีกลุ่มไฮดรอกซิลจับที่ซี-2 (C-2) และซี-3 (C-3)

เส้นผ่านศูนย์กลางของช่องที่อยู่ภายในแอลฟา-, บีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน มีขนาด 4.7-5.3, 6.0-6.5 และ 7.5-8.3 อังสตรอม ตามลำดับ เมื่อจำนวนของกลูโคสในวงเพิ่มขึ้น ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของช่องเพิ่มขึ้นด้วย ส่วนความยาวของช่องในไซโคลเดกซ์ตรินจะเหมือนกันหมด โดยขนาดของช่องมีความสำคัญในการตรวจสอบความสามารถของสารโมเลกุลอื่นที่มาจับกับไซโคลเดกซ์ตรินเกิดเป็นสารเชิงซ้อน โดยทั่วไปสารประกอบที่มาจับเป็นสารเชิงซ้อนกับแอลฟา- หรือแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน ก็จะจับกับบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินด้วย

ความสามารถในการละลายน้ำของไซโคลเดกซ์ตริน พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการละลายก็จะสูงด้วย ซึ่งลำดับความสามารถในการละลายของไซโคลเดกซ์ตริน เป็นดังนี้ บีตา-< แอลฟา-< แกมมา-ไซโคลเดกซ์

ตริน ซึ่งความแตกต่างในการละลายน้ำของไซโคลเดกซ์ตรินที่เกิดขึ้นเป็นเพราะแรงภายในวงแหวน จึงทำให้เกิดความแตกต่างในแรงที่กระทำต่อกันของหมู่ไฮดรอกซิลในการจับกับไฮโดรเจนในไซโคลเดกซ์ตรินแต่ละชนิด โดยหมู่ของไฮดรอกซิลที่จับที่ตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของกลูโคสที่ติดกันในบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน จะหันออกเพื่อทำให้แรงที่กระทำต่อกันแข็งแรงกว่าในแอลฟา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน ดังนั้นหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 2 และ 3 ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำเหมือนกับของแอลฟา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน จึงทำให้ความสามารถในการละลายลดลง และในการที่ไซโคลเดกซ์ตรินจับกับสารอื่นๆ เกิดเป็นสารเชิงซ้อน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลายของไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นอยู่กับสารที่มาจับกับไซโคลเดกซ์ตริน มีผลทำให้ความสามารถในการละลายเพิ่ม หรือลดก็ได้

บีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินส่วนใหญ่ไม่ละลายในสารอินทรีย์ แต่จะละลายได้ในสารละลายบางชนิด เช่น สารละลายที่มีส่วนผสมของน้ำ และอัลกอฮอล์ โดยการละลายลดลงเมื่อความเข้มข้นของอัลกอฮอล์เพิ่มขึ้น และการละลายเพิ่มขึ้นจนสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของอัลกอฮอล์เพิ่มขึ้นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นความสามารถในการละลายจะลดลง และพบว่าไซโคลเดกซ์ตรินที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนไม่มีความเสถียรในสารละลายอินทรีย์ เพราะมีการแข่งขันแย่งกันจับไซโคลเดกซ์ตริน นอกจากนี้ความเสถียรยังขึ้นอยู่กับสารที่เข้ามาจับกับไซโคลเดกซ์ตริน

ไซโคลเดกซ์ตรินมีความเสถียรในที่อุ ณหภูมิสูง จากการวิเคราะห์โดยใช้เทอร์โมแกรม (thermogram) พบว่า ภายใต้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จะไม่สังเกตเห็นปฏิกิริยาการดูดความร้อน หรือคายความร้อน และความร้อนถูกดูดกลืนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยน้ำที่อยู่ในผลึกของไซโคลเดกซ์ตรินถูกระเหยออกไป และหลังจากนี้จะไม่มีปฏิกิริยาใดๆ เกิดขึ้น จนกระทั่งอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส ความร้อนก็จะถูกดูดกลืนใหม่อีกครั้ง เมื่อผลึกของไซโคลเดกซ์ตรินละลาย และมีการแทนที่ของอุณหภูมิที่ทำให้ย่อยไซโคลเดกซ์ตรินเกิดขึ้นด้วย

คุณสมบัติในการดูดความชื้นของไซโคลเดกซ์ตรินพบว่า จากการนำไซโคลเดกซ์ตรินที่อยู่ในรูปแห้ง ตั้งทิ้งไว้ในที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 24 ชั่วโมง แอลฟา- และบีตา-ไซโคล

เดกซ์ตริน ถึงจุดสมดุล โดยมีส่วนของน้ำ 12 และ 13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตรินจะใกล้เคียงกับจุดสมดุล แต่ยังคงมีการดูดความชื้นจากชั้นบรรยากาศต่อไป เมื่อเพิ่มเวลาอีก 24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ถึงจุดสมดุล โดยมีส่วนของน้ำ 17 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าสมดุลของความชื้นเหล่านี้พบว่า ไซโคลเดกซ์ตรินยังคงมีลักษณะเป็นแป้ง และเมื่อจับจะมีความรู้สึกแห้ง ซึ่งไซโคลเดกซ์ตรินจะคล้ายกับแป้งในเรื่องจุดสมดุลความชื้น

ไซโคลเดกซ์ตรินจะถูกย่อยด้วยกรดที่เข้มข้น เช่น กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) หรือกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) โดยอัตราการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด และอุณหภูมิ โดยอัตราการย่อยเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิ หรือความเข้มข้นของกรดเพิ่มมากขึ้น และอัตราการย่อยบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินจะช้ากว่าแป้งภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของกรด และอุณหภูมิเหมือนกัน ส่วนกรดอินทรีย์ไม่สามารถย่อยบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินได้ดีเหมือนกรดที่มีความเข้มข้นสูง และที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิสูงประมาณ 60 องศาเซลเซียส พบว่าการย่อยด้วยกรดอินทรีย์เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย หรือไม่เกิดเลย แต่มีกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดซิตริก (citric acid) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 2.0 สามารถย่อยบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ไซโคลเดกซ์ตรินทนต่อการย่อยด้วยด่าง แม้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจากการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.35 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ผลที่ได้คือ ตรวจไม่พบการย่อยบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน โดยไซโคลเดกซ์ตรินจะทำปฏิกิริยากับสารออกซิไดซ์ (oxidizing agents) ซึ่งบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินจะถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) อย่างรวดเร็ว และสมบูรณ์ โดยใช้ความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในน้ำยาซักแห้ง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และถูกออกซิไดซ์ได้ช้าเมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยไซโคลเดกซ์ตรินเพียง 11 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ถูกออกซิไดซ์ใน 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนี้ นอกจากนี้ไซโคลเดกซ์ตรินจะไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือบีตา-อะไมเลส แต่มีเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส บางชนิดที่ย่อยแอลฟา- และ บีตา-ไซโคเดกซ์ตรินได้ และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตรินก็จะถูกย่อยด้วย

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยอัตราการย่อยไซโคลเดกซ์ตรินด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสช้ากว่าอัตราการย่อยแป้ง และผลผลิตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซมชนิดนี้คือ กลูโคส และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยไซโคลเดกซ์ตรินที่อยู่ในรูปสารเชิงซ้อนทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้มากกว่าตัวของไซโคลเดกซ์ตรินเอง

จากการเปลี่ยนแปลงของไซโคลเดกซ์ตริน โดยการเพิ่มคุณสมบัติเพื่อที่ขยายขอบเขตในการนำไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น ไฮดรอกซีโพรพิล (hydroxypropyl group), ไฮดรอกซีเอทธิล (hydroxyethyl group), เมทธิล (methyl group), หรือ ซัลเฟต (sulfate group) ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มการละลายของไซโคลเดกซ์ตรินในน้ำ นอกจากนี้การเพิ่มความสามารถในการละลายยังทำได้โดยการเชื่อมของไซโคลเดกซ์ตรินเพื่อให้ได้เป็นโพลิเมอร์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโพลิเมอไรเซชันที่ต่ำ และความสามารถในการละลายที่ลดลง ทำได้โดยการเชื่อมไซโคลเดกซ์ตรินกับสารเคมี เช่น อีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin) เพื่อให้อยู่ในรูปของโพลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งโพลิเมอร์นี้สามารถนำมาใช้ในการแยกสารอินทรีย์ออกจากสารละลาย

ความสามารถในการละลายของสารประกอบเพิ่มขึ้น เมื่ออยู่ในรูปเชิงซ้อนกับไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งทำให้โมเลกุลส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic molecule) จะอยู่ภายในช่อง (cavity) ของไซโคลเดกซ์ตรินถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลที่ละลายน้ำ (hydrophilic molecule) ได้ เช่น หมู่ไฮดรอกซีที่อยู่ด้านนอกโมเลกุลของไซโคลเดกซ์ตริน เป็นผลให้เพิ่มการละลาย ซึ่งการเพิ่มความสามารถในการละลายมีความสำคัญในการนำมาใช้ในหลายๆ ด้าน โดยในอุตสาหกรรมการผลิตยาพบว่า มียาหลายชนิดไม่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากไม่สามารถละลายได้เพียงพอ จึงได้มีการนำไซโคลเดกซ์ตรินมาใช้ ทำให้ยาเพิ่มการละลาย นอกจากนี้ มีน้ำมันหลายชนิดที่ยากต่อการผสมกัน ซึ่งเมื่อประกอบเป็นสารเชิงซ้อนกับไซโคลเดกซ์ตริน ทำให้ในการผสมน้ำมันง่ายขึ้น โดยไซโคลเดกซ์ตรินมีผลในการเจือจางน้ำมันเหล่านี้ เพื่อที่จะผสมได้ง่าย

จากการเกิดกลิ่น และรสที่ไม่ต้องการที่เกิดขึ้นในอาหารบางชนิด รวมทั้งยา และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการบริโภคอื่นๆ ซึ่งจะลดการเปลี่ยนแปลงที่

เกิดขึ้นเหล่านี้ได้โดยการจับกับไซโคลเดกซ์ตริน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน และมีสารประกอบหลายชนิดจากกระบวนการทางเคมีที่เป็นพิษ ซึ่งการใช้ไซโคลเดกซ์ตรินสามารถลด หรือกำจัดพิษได้

แรงที่กระทำของโมเลกุลของสารต่อผนังของช่องในไซโคลเดกซ์ตริน ทำให้สารประกอบมีความเสถียร โดยสารประกอบหลายชนิดที่มีพันธะคู่จะง่ายต่อการถูกออกซิไดซ์ หรือเกิดซิส-ทรานส์ไอโซเมอไรเซชัน (cis-trans isomerization) ซึ่งแรงที่กระทำต่อผนังของช่องในไซโคลเดกซ์ตรินช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้ได้ และจากการที่มีสารอื่นมาจับอยู่ภายในช่องของไซโคลเดกซ์ตริน ทำให้โมเลกุลอื่นไม่สามารถเข้ามาอยู่ในช่อง และจับกับสารเหล่านี้ได้ ซึ่งเป็นการป้องกันการเกิดปฏิริยาที่ไม่ต้องการกับสารอื่น

การที่มีโมเลกุลของสารอื่นจับกับไซโคลเดกซ์ตริน และเกิดเป็นสารเชิงซ้อน ทำให้เกิดผลดีหลายอย่างกับสารที่มาจับกับไซโคลเดกซ์ตริน รวมถึงการเพิ่มการละลาย, ความเสถียรเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง, ลดการถูกทำลายอันเนื่องมาจากแสง หรือความร้อน และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ดีเช่นเดียวกับการควบคุมทิศทางการเกิดปฏิกิริยาเคมี ทั้งยังช่วยแยกสารเคมีต่างๆ ซึ่งข้อดีเหล่านี้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมด้านอาหาร, สารเคมี, ยา และอุตสาหกรรมในด้านอื่นๆ รวมถึงใช้ในการวิเคราะห์ และการวินิจฉัย

ไซโคลเดกซ์ตรินมีความเสถียรมาก และสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลานานโดยปราศจากการสูญเสีย โดยในระหว่างการเก็บไซโคลเดกซ์ตริน ควรเก็บในรูปของผลึกแห้ง เพื่อป้องกันการเติบโตของแบคทีเรีย และเก็บภายใต้สภาวะที่ปิดมิดชิดเพื่อป้องกันการดูดซับกลิ่น หรือสารอื่นจากชั้นบรรยากาศ ภาชนะที่บรรจุต้องสะอาด และไม่ควรบรรจุสารอื่น ซึ่งอาจจับกับไซโคลเดกซ์ตริน ในระหว่างการเก็บหรือเมื่อขนย้ายจากที่เก็บเพื่อนำไปใช้

1.4 การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

เนื่องจากในธรรมชาติจะมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกัน ซึ่งความสามารถของจุลินทรีย์ในการแลกเปลี่ยนข้อมูลทางพันธุกรรม ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ซึ่งการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย ส่วนใหญ่เป็นการเชื่อมดีเอ็นเอกับเรพลิคอน (replicon) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์รับ (recipient) เพื่อที่จะมีการแสดงออก และสามารถถ่ายทอดได้ ในขณะที่มีการขนถ่ายยีนจะขึ้นอยู่กับการเกิดเรคคอมบิเนชัน (recombinaion) ระหว่างลำดับของยีนที่เหมือนกัน (homologous) ซึ่งจำเป็นสำหรับเซลล์ที่เป็นตัวให้ (donor) และเซลล์รับ ต้องมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด แต่ในบางครั้งการถ่ายทอดยีนระหว่างเซลล์ที่ต่างสายพันธุ์ หรือต่างพันธุกรรมกัน อาจเกิดขึ้นได้โดยที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดเรคคอมบิเนชัน (Porter, 1988)

การเกิดเรคคอมบิเนชันของยีน เป็นกระบวนการทางชีววิทยาขั้นพื้นฐานในการแลกเปลี่ยนข้อมูลทางพันธุกรรมระหว่างโครโมโซมจากต่างชนิดกัน โดยการเกิดในระหว่างที่มีการวิวัฒนาการมีการแลกเปลี่ยนยีนได้เอง ทำให้เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการปรับตัวให้เหมาะสมในสภาวะแวดล้อม โดยธรรมดาแล้วกระบวนการนี้จะรวมถึงการแลกเปลี่ยนของสารพันธุกรรม และต้องการลำดับของดีเอ็นเอที่เหมือนกันในการแลกเปลี่ยน ส่วนการเกิดกระบวนการนี้โดยไม่มีการแลกเปลี่ยน เช่น การสอดส่วนของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของโครโมโซมที่มีการแสดงออกเพียงเล็กน้อย หรือไม่มีลำดับของดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในหลายระบบ (Timmis, 1984)

กระบวนการในการถ่ายโอนยีน มีดังนี้

1.4.1 กระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation)

กระบวนการคอนจูเกชัน ของแบคทีเรียพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1946 จากการสังเกต *E. coli* K-12 ที่ผ่าเหล่า จากการถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างเซลล์ที่สัมผัสกัน ซึ่งมีการส่งผ่านจากเซลล์ตัวให้ (donor) ไปยังเซลล์รับ(recipient) โดยมีเอฟ-พลาสมิด (F-plasmid) ที่อยู่เป็นอิสระในเซลล์ เป็นปัจจัยสำคัญในการถ่ายทอดพลาสมิดจากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเอฟ-พลาสมิดสามารถสอดในโครโมโซม

จึงเรียกว่า Hfr donor (high frequency recombination) ซึ่งมีการเกิดเรคคอมบิเนชัน อัตราสูง (อ้างโดย O'Connell, 1984)

กระบวนการคอนจูเกชัน เป็นกระบวนการถ่ายทอดดีเอ็นเอระหว่างเซลล์ 2 เซลล์ จากการติดต่อ (contact) กันโดยตรง เริ่มแรกจากการต่อกันระหว่างเซกซ์พิลัส (sex pilus) ของเซลล์ตัวให้ (donor) กับส่วนที่อยู่ด้านนอกของเซลล์รับ (recipient) (อ้างโดย Porter, 1988) และเกิดการรวมกัน (mating) ทำให้มีการถ่ายทอดดีเอ็นเอจากเซลล์ให้ไปยังเซลล์รับ ซึ่งทั้ง 2 เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นโดยตรงจากยีนเอฟ-พลาสมิดที่ควบคุมพิลัส ซึ่งเป็นอวัยวะที่อยู่ด้านนอกของเซลล์ตัวให้ ทำให้เกิดการรวมกันระหว่าง 2 เซลล์ ทำให้มีการส่งผ่านของดีเอ็นเอ โดยในกระบวนการนี้พลาสมิดจะขาดตรงตำแหน่งที่จำเพาะ คือ Ori T (origin of transfer replication) ของสาย (strand) ดีเอ็นเอที่จำเพาะ และมีการถ่ายโอนสายดีเอ็นเอที่ขาดจากเซลล์ให้ไปยังเซลล์รับ และมีการสร้างสายดีเอ็นเอที่ขาดให้เป็นวงขึ้นมาใหม่ (recircularized) ตามด้วยการสร้างพลาสมิด 2 สาย (double strand) ขึ้นมาใหม่ทั้งในเซลล์ให้ และเซลล์ที่มีการส่งผ่านของดีเอ็นเอ (transconjugant) (O'Connell, 1984)

1.4.2 กระบวนการทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation)

กระบวนการทรานส์ฟอร์เมชัน เป็นกระบวนการถ่ายโอนโมเลกุลของดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย และมีการอินทิเกรตของดีเอ็นเอในโครโมโซม หรือพลาสมิดในเซลล์รับ โดยเรียกเซลล์ของแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะที่รับดีเอ็นเอนี้ว่าคอมพีเทนต์เซลล์ ซึ่งแบคทีเรียบางสายพันธุ์อยู่ในสภาวะคอมพีเทนต์ได้เองในระหว่างการเติบโตภายใต้สภาวะธรรมดา แต่มีบางสายพันธุ์ที่ต้องการการเหนี่ยวนำเป็นพิเศษเพื่อที่จะอยู่ในสภาวะคอมพีเทนต์ (O'Connell, 1984) ตัวอย่างของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่เกิดการทรานส์ฟอร์เมชัน ได้แก่ *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae* และ Cyanobacteria บางชนิด (Porter, 1988)

พบว่า *E. coli* ไม่สามารถเกิดการทรานส์ฟอร์เมชันได้ ถ้าไม่มีการเหนี่ยวนำเป็นพิเศษ เช่น การเกิดคอมพีเทนต์ต้องถูกเหนี่ยวนำ ซึ่งอาจประสบผลสำเร็จโดยการแยกเอาผนังเซลล์ (cell wall) ออก หรือทำให้มีการเปลี่ยนแปลงส่วนที่หุ้มเซลล์ เพื่อที่

ยอมให้ดีเอ็นเอผ่าน โดยการเหนี่ยวนำด้วยแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) และเพิ่มอุณหภูมิสูงทันที (heat shock) (อ้างโดย O'Connell, 1984) โดยการทรานส์ฟอร์เมชันของ *E. coli* มีความสำคัญในด้านเทคโนโลยีการโคลนยีน เพราะว่าเซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* ทำให้เรพลิคอน (replicon) ผ่านเข้ามาได้ และง่ายต่อการเกิดทรานส์ฟอร์เมชัน นอกจากนี้มีการใช้โพลีเอทธีลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) กับโปรโตพลาส (protoplast) ของ *Bacillus subtilis* ซึ่งอาจเป็นตัวที่ทำให้สามารถถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ เพราะว่าจะมีประสิทธิภาพสูง และมีการนำวิธีอิเลคโตรพอเรชัน (electroporation) มาใช้ พบว่าประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดใน *Campylobacter jejum* และอาจนำไปใช้ในการถ่ายโอนพลาสมิดในแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Porter, 1988)

โดยปกติคอมพีเทนต์เซลล์ จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่ซับซ้อน โดยพบในระยะหนึ่งของการเติบโตในอาหารพิเศษของแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งส่วนใหญ่คอมพีเทนต์เซลล์จะรับเอาดีเอ็นเอสายคู่ (double strand) แต่อาจมีการรับเอาดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single strand) พบในปริมาณที่จำกัด และความจำเพาะของดีเอ็นเอที่ถ่ายโอน พบว่าจะแตกต่างตามชนิดของแบคทีเรีย

กระบวนการเกิดทรานส์ฟอร์เมชันในแบคทีเรียแกรมบวก (O'Connell, 1984) แบ่งได้เป็นขั้นตอน ดังนี้

1.4.2.1 ทำให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะคอมพีเทนต์เซลล์ เนื่องจากมีการหลั่งของโปรตีนเพียงเล็กน้อย

1.4.2.2 การจับของโมเลกุลของดีเอ็นเอสายคู่กับแบคทีเรีย

1.4.2.3 การถ่ายโอนโมเลกุลของดีเอ็นเอ

1.4.2.4 การเคลือบโมเลกุลของดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยโปรตีนที่เฉพาะ เพื่อป้องกันดีเอ็นเอจากนิวคลีเอส (nucleases)

1.4.2.5 การเกิดเรคคอมบิเนชัน ทำให้ดีเอ็นเอที่ถ่ายโอนอินทิเกรตอยู่ในโครโมโซมของเซลล์รับ

1.4.2.6 การเกิดเรพลิเคชัน (replication) ในส่วนของดีเอ็นเอที่ถ่ายโอนและมีการรวมกันของอัลลีล (alleles) ของเซลล์ให้ และเซลล์รับ ในแบคทีเรียรุ่นใหม่ทำให้เกิดลักษณะ (phenotype) ใหม่ขึ้นมา

ในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Haemophilus* spp. มีกระบวนการถ่ายโอนดีเอ็นเอที่ต่างจากแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นการทรานส์ฟอร์เมชันเกิดขึ้นได้เมื่อมีดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (homologous) เท่านั้น

1.4.3 กระบวนการทรานส์ดัคชัน (transduction)

กระบวนการทรานส์ดัคชัน เป็นการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรีย โดยมีแบคเทอริฟาจก์ (bacteriphage) เป็นพาหะ ซึ่งกระบวนการนี้ค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Lederberg และคณะ (1951) ในระหว่างที่ทำการคอนจูเกชัน (conjugation) ของ *Salmonella typhimurium* และจากการศึกษาแสดงว่า เรคคอมบิแนนท์ (recombinant) ที่ได้ไม่เพียงแต่เกิดจากการผสมของแบคทีเรียที่ผ่าเหล่า (mutant) เท่านั้น แต่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อมีการผสมกับสารสกัดที่แยกเซลล์ออกแล้ว ซึ่งกระบวนการนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1.4.3.1 สเปคเชียลไลซ์ทรานส์ดัคชัน (specialized transduction)

กระบวนการนี้เป็นการอินทิเกรต (integrate) ส่วนของโครโมโซมดีเอ็นเอที่จำเพาะ เช่น แกลโอเปอรอน (*gal* operon) ใน 4 จีโนม (genome) ของฟาจก์ (phage) และมีการแบ่งตัวต่อไป (O'Connell, 1984)

1.4.3.2 เจนเนอรอลไลซ์เซชันทรานส์ดัคชัน (generalized transduction)

กระบวนการนี้จะไม่มีการจำเพาะระหว่างฟาจก์ และจีโนมของแบคทีเรีย ว่าจะต้องมีลักษณะทางกายภาพที่สัมพันธ์กัน โดยในการขนถ่ายยีนประกอบด้วย ไวรอลแคบซิด (viral capsid) และดีเอ็นเอของโฮส (hose) ซึ่งจะถูกปล่อยเมื่อเซลล์แตก (lysis) และผ่านเข้าเซลล์รับในเวลาต่อมา แต่ถ้ายีนที่ส่งผ่านเซลล์รับเข้ามาไม่มีจีโนมของฟาจก์ เซลล์ที่ถูกอินเฟค (infect) ก็จะไม่แตก แต่ถ้าดีเอ็นเอที่ผ่านเข้ามาสามารถเข้าคู่กับโครโมโซมของเซลล์รับ มันก็จะสามารถอินทิเกรตโดยการเรคคอมบิเนชั่น ได้เป็นทรานส์ดัคแตนท์ (transductant) (O'Connell, 1984)

1.4.4 กระบวนการทรานส์เฟคชัน (transfection)

กระบวนการทรานส์เฟคชันนี้ มีกลไกที่คล้ายกับกระบวนการทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation) โดยมีการถ่ายโอนเฉพาะดีเอ็นเอของแลมดาฟาจก์ (λ phage) ไปยังคอมพีเทนต์แบคทีเรีย (competent bacteria) และดีเอ็นเอนี้สามารถ

เรพลิเคท (replicate) ตัวมันเอง ซึ่งกระบวนการนี้สามารถนำมาใช้ในการโคลนยีน แต่ประสิทธิภาพของกระบวนการนี้จะต่ำมาก (O'Connell, 1984)

1.4.5 การโคลนยีน (gene cloning)

การโคลนยีนในปัจจุบันได้มีการพัฒนา และยอมรับดีเอ็นเอที่ได้จากโปรคารีโอท (prokaryote) และยูคารีโอท (Eukaryote) หลายชนิด โดยในการโคลนยีนประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (Timmis, 1984) ดังนี้

1.4.5.1 สร้างส่วนของดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการโคลน ซึ่งรวมถึงการใช้เอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (Restriction endonuclease) ตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่จำเพาะ และมีลำดับของโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม

1.4.5.2 นำส่วนของดีเอ็นเอที่ตัด นำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์โดยใช้ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) เชื่อมต่อระหว่างส่วนของดีเอ็นเอ และเวคเตอร์ โดยอาจใช้พลาสมิด, แบคเทอริโอฟาจก์แลมดา (bacteriophage λ) หรือคอสมิด (cosmid) เป็นเวคเตอร์ในการโคลนยีน

1.4.5.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมกับเวคเตอร์เข้าสู่โฮสเซลล์ (host cell) เช่น *E. coli* โดยการทรานส์ฟอร์เมชัน, ทรานส์เฟคชัน หรืออินเฟคชัน

1.4.5.4 ทำการตรวจสอบชนิดของดีเอ็นเอที่ต้องการ หลังจากที่มีการโคลนในโฮสเซลล์

1.4.5.5 ทำการแยก และศึกษาลักษณะเฉพาะของดีเอ็นเอที่โคลนได้

จากการศึกษาเอนไซม์ซีจีทีเอส พบว่าก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาทางด้านยีนรวมถึงการวิจัยในการโคลนยีนของเอนไซม์ซีจีทีเอส โดย Takano และคณะ (1986) ได้ทำการโคลนยีนซีจีทีเอสของ *Bacillus macerans* ใน *Bacillus subtilis* พบว่ายีนมีการแสดงออกใน *Bacillus subtilis*

Kimura และคณะ (1987) ได้ตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนซีจีทีเอสใน *Bacillus* sp. 1011 พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนในด้านปลายของหมู่อะมิโนของเอนไซม์ซีจีทีเอสมีความเหมือน (homology) กับลำดับของกรดอะมิโนในเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ใน 3 บริเวณ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของศูนย์กลางการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และต่อมา Kimura และคณะ (1989) ได้ทำการโคลนยีนบีตา

-ซีจีทีเอส ของ *Bacillus* sp. #1011 โดยที่โครงสร้างของยีนประกอบด้วยเบส 2,139 คู่ (กรดอะมิโน 713 ตัว) ที่มีเบส 81 คู่ (กรดอะมิโน 27 ตัว) เป็นซิกนอลเปปไทด์ (signal peptide) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์บีตา-ซีจีทีเอสกับของเอนไซม์บีตา-อะไมเลส แสดงให้เห็นว่า ลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณด้านปลายของหมู่อะมิโนในเอนไซม์บีตา-ซีจีทีเอส 3 บริเวณ คือ เอ, บี และซี จะสอดคล้องกับที่พบในเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ดังนั้นบริเวณด้านปลายของหมู่อะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ของเอนไซม์บีตา-ซีจีทีเอสเกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง โดยสามารถตัดพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ของแป้ง และทำการวิเคราะห์หน้าที่บริเวณด้านปลายของหมู่คาร์บอกซิลิคในเอนไซม์บีตา-ซีจีทีเอส พบว่าสามารถย่อยแป้งทำให้ได้กลูโคส, มอลโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน นอกจากนี้ยังทำให้ความเสถียรในช่วงพีเอชที่เป็นด่างลดลง

Sin และคณะ (1991) ได้ทำการโคลนยีนซีจีทีเอสของ *Bacillus Ohbensis* ใน *E. coli* และตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ พบว่าการแสดงออกของยีนซีจีทีเอสใน *E. coli* อยู่ภายใต้การควบคุมของแลคโอเพอรอน (*lac* operon) เท่านั้น

Paloheimo และคณะ (1992) ได้โคลนยีนซีจีทีเอสของ *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783 ใน *E. coli* และ *Bacillus subtilis* และเมื่อโคลนจาก *E. coli* ไปยัง *Bacillus subtilis* โดยส่วนที่โคลนเข้าไปคือ ยีนซีจีทีเอสอาจจะไม่เสถียร หรือ *Bacillus subtilis* ที่ผ่านการโคลนยีนแล้วไม่หลั่งเอนไซม์ออกมาในปริมาณที่สังเกตเห็นได้ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างพลาสมิด เพื่อที่จะประสบความสำเร็จให้มีการผลิตเอนไซม์ใน *Bacillus subtilis* ยีนต้องอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ (promoter) ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ผลิตโดย *Bacillus amyloliquefaciens* โดยทั้งโปรโมเตอร์และลำดับของยีนที่บอกรหัสบางส่วนจะถูกแทนที่จากของ *Bacillus amyloliquefaciens* แต่เฉพาะบริเวณโปรโมเตอร์เท่านั้นที่มีการแลกเปลี่ยน และ *Bacillus subtilis* ที่มีการโคลนของพลาสมิดเหล่านี้ จะหลั่งเอนไซม์ซีจีทีเอสออกมาในอาหารประมาณ 14 เท่า ซึ่งมากเท่ากับสายพันธุ์เดิมที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่มีการเขย่า และเมื่อใช้ในการหมักในอุตสาหกรรมมีการผลิตเอนไซม์มากคิดเป็น 1.2 กรัมต่อลิตร ประมาณ 33 เท่าของ

จำนวนเอนไซม์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์เดิม และโครงสร้างพลาสมิดจะคงตัวแม้ว่ามีการเติบโตมากกว่า 50 รุ่น

วัตถุประสงค์

1. สกัดเอนไซม์ซีจีทีเอส จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

2. ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ย่อยแป้งที่แยกได้จาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

3. ศึกษาผลของอิออน และสารเคมีต่างๆ ต่อกิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ซีจีทีเอส

4. ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ซีจีทีเอส

5. วิเคราะห์หากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ซีจีทีเอส

6. เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสระหว่างการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารที่มีการเติม yeast extract และโซเดียมคลอไรด์ กับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติม yeast extract และโซเดียมคลอไรด์

7. ทำการโคลนยีนของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ใน *E. coli* DH5α

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองและบริษัทผู้ผลิตได้แสดงในตารางที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั้งหมดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะนำมาใช้) และสารเคมีเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์

อุปกรณ์

เครื่องมือทั่วไป

Autoclaves : Tomy Seiko Co., Nerima-ku, Tokyo, Japan.

Bench-top centrifuge : Kokusan Enshinki Co., Tokyo, Japan.

Deep freeze : Pheen Manufacturing Co., Asheville, North Carolina, USA.

Electronic balance : A&D Company, Ltd., Toshima-ku, Tokyo, Japan.

Environmental incubator shaker : Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, Illinois, USA.

Eppendorf centrifuge : Brinkmann Instruments Inc., Wesbury, N.Y., USA.

Gel electrophoresis apparatus :

Electrophoresis power supply : Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA.

Mini-protein II-Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Thermoseparation Products, Riviera Beach, Florida, USA.

Hot air oven : Heraeus GmbH, Postfach, Hanau, Fernschreiber, Germany.

Incubator : Heraeus GmbH, Postfach, Hanau, Fernschreiber, Germany.

Laminar air flow : Gelman Science Pty. Ltd., Lane Cove, Sydney, New South Wales, Australia.

Micropipette : Socorex Issa. S.A., Lausanne Suisse, Switzerland.

Millipore filter : Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA.

Sonicator : Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA.

Sorvall superspeed centrifuge : Du Pont Company, Welmington, Delaware, USA.

Stirring hot plate : Thermolyne Barnstead Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa, USA.

Vortex mixer : Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA.

Waterbath : Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Muromachi Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, Japan.

ตารางที่2 รายการ อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี, สีย้อม และเอนไซม์ รวมทั้งรายชื่อบริษัทผู้ผลิต

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ	
Alpha (α)-cyclodextrin	Sigma
Beta (β)-cyclodextrin	Sigma
Corn starch	Sigma
Gamma (γ)-cyclodextrin	Sigma
Nutrient agar	Difco
Nutrient broth	Difco
Tryptone	Difco
Yeast extract	Difco

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
2. สารเคมี และ ยาปฏิชีวนะ	
Agarose gel	Sigma
Ammonium acetate	Carlo Erba
Ammonium sulfate	Riedel-de Haen
Ampicillin	Sigma
Bovine serum albumin	Fluka
Calcium chloride-2-hydrate	BDH
Chloroform	Merck
Citric acid	Merck
Copper sulfate-5-hydrate	Merck
3,4-Dichloroisocoumarin	Sigma
di-Sodium hydrogen phosphate	Fluka
Ethanol	J.T. Baker
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma
Ferrous sulfate-7-hydrate	Fluka
Ficoll 400	Sigma
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Fluka
Hydrochloric acid	Merck
Imidazole	Fluka
Iodine	Fluka
Iodoacetic acid	Sigma
Isopropanol	Sigma
Lauryl sulphate sodium salt	Sigma
Magnesium chloride-6-hydrate	Fluka
Magnesium sulfate-7-hydrate	J.T. Baker
Maltooligosaccharide	Sigma

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
Manganese chloride-4-hydrate	M&B
Manganese sulfate monohydrate	Fluka
2-Mercaptoethanol	Sigma
Phenol	Merck
Phenyl methyl sulphonyl fluoride	Sigma
Potassium chloride	Merck
Potassium iodide	Carlo Erba
Potassium sodium tartrate-4-hydrate	Riedel-de Haen
Sodium acetate	Carlo Erba
Sodium carbonate	Carlo Erba
Sodium chloride	Carlo Erba
Sodium citrate	Fluka
Sodium dihydrogen phosphate	Fluka
Sodium dodecyl sulphate	Sigma
Sodium hydrogen carbonate	M&B
Sodium hydroxide	Carlo Erba
Soluble starch	Sigma
Trichloroethylene	Riedel-De Haen
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Merck
Zinc sulfate-7-hydrate	M&B
3. สีย้อม	
Bromocresol green	Riedel-de Haen
Bromophenol blue	Riedel-de Haen
Ethidium bromide	Sigma
Methyl orange	Riedel-de Haen
Phenolphthalein	Merck

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
4. เอนไซม์	
Bam HI	Gibco BRL
T4 DNA ligase	Gibco BRL
Pronase	Sigma
Ribonuclease A (RNAse A)	Sigma
Sau 3AI	Promega
Lysozyme	Sigma
Pst I	Gipco BRL
Hind III	Promega

***ที่อยู่ของบริษัทผู้ผลิต**

BDH : BDH Laboratory Supplies, Poole, England.

Carlo Erba : Farmitalia Carlo Erba S.P.A., Milano, Italy.

Difco : Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

Fluka : Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland.

Gibco BRL : Gibco BRL Life Technologies, Inc. Grand Island, N.Y., USA.

J.T. Baker : J.T. Baker Inc. Phillipsburg, USA.

May & Baker : May & Baker Ltd., Dagenham, England.

Merck : E. Merck, Damstadt, Postfach, Germany.

Promega : Promega Corporation, Madison, USA.

Riedel-de Haen : Reidel-de Haen AG, Seelze, Germany.

Sigma : Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

วิธีการ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง เป็นอาหารที่มีแป้ง (starch medium) โดยที่ในอาหารที่มีปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย nutrient broth จำนวน 13 กรัม และแป้งข้าวโพด (corn starch) จำนวน 10 กรัม ซึ่งมีการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 8.0 ในกรณีที่เป็นอาหารแข็งใช้ อาหาร nutrient agar แทนหรือเพิ่ม Bacto-agar 15 กรัม

2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว ใช้เชื้อเริ่มต้น (inoculum) ที่เพาะเลี้ยงมาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเหลว โดยใส่เชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด 1 หรือ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มในเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 การนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย โดยวิธี drop plate method (Supawong, 1972) โดยการหยดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง ซึ่งประกอบด้วย nutrient agar และ แป้งข้าวโพด (corn starch) ซึ่งมีพีเอช 8.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำมาคำนวณหาจำนวนเชื้อทั้งหมดต่อหนึ่งมิลลิลิตร (CFU/ml)

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้ง

วิเคราะห์หาปริมาณแป้งตามวิธี iodometric method (Nomoto และคณะ, 1986) โดยนำตัวอย่างซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการย่อยแป้งเกิดขึ้นแล้วในช่วงเวลาที่กำหนด มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น และใช้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลายไอโอดีน

(เตรียมจากการละลายไอโอดีน 1.2 กรัม ในโปแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) 40 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นซึ่งเตรียมเป็น stock solution และเมื่อนำมาใช้ เจือจาง stock 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งต้องปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และวางทิ้งไว้ 2 นาที ก่อนที่จะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์

2.5 การเตรียมเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกอนุภาคของแป้งและแบคทีเรีย ด้วยอัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งจะได้เอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในสารละลายใสสำหรับการทดลองต่อไป

2.6 การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ตามวิธีของ Pongsawasdi และ Yagisawa (1988) โดยเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ดังนี้ นำเอนไซม์ย่อยแป้งปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกับสารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายผสมปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายไอโอดีน (เตรียมจากการละลายไอโอดีน 1.2 กรัม ในโปแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) 40 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งเตรียมเป็น stock solution เมื่อนำมาใช้เจือจาง stock 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งต้องปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 2 นาที ก่อนที่จะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแป้ง

ที่มีความเข้มข้นต่อไปนี้ คือ 5,000, 4,500, 4,000, 3,500, 3,000, 2,500, 2,000, 1,500, 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งจากกราฟมาตรฐานดังกล่าว โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยแป้ง หมายถึง กิจกรรมการย่อยสารละลายแป้ง 10 มิลลิกรัม ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด ส่วนค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (relative activity) หมายถึง ค่าเปรียบเทียบที่ได้จากกิจกรรมเอนไซม์หารด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้นสูงสุดของการทดลองคูณด้วย 100

2.7 การสกัดสารละลายเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตภายในเซลล์ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

นำตัวอย่างสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกเอาส่วนใสออกโดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์ (bench-top centrifuge) ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 3 ครั้ง และเติมบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันนี้ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจาย หลังจากนั้น นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator; Branson sonifer 450) โดยใช้ % duty cycle เท่ากับ 20 และ output control เท่ากับ 4 หยุดเครื่องทุกๆ 1 นาที และต้องแช่สารละลายเซลล์ในน้ำแข็งระหว่างที่ทำการทดลอง เมื่อเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์ สารละลายจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส

2.8 การผลิตไซโคลเดกซ์ตรินโดยการเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในถังหมักจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงมาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเหลว โดยใส่เชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อยู่ในถังหมักจุลินทรีย์ขนาด 1.5 ลิตร (รุ่น M-100) โดยปรับความเร็วของใบพัดในการกวน 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 1 kg/cm^2 โดยมีการควบคุมพีเอชที่ 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.9 การวิเคราะห์หาไซโคลเดกซ์ตริน

2.9.1 การวิเคราะห์หาแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน (Lejeune และคณะ, 1989)

นำตัวอย่างสารละลายที่ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายที่ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 6.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร และเมทธิลออร์เรนจ์ (methyl orange) ที่มีความเข้มข้น 350 ไมโครโมล ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ และเตรียมกราฟมาตรฐานของแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 และ 0.039 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน

2.9.2 การวิเคราะห์หาบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน (Kaneko และคณะ, 1987)

นำตัวอย่างสารละลายที่ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และฟีนอฟธาลีน (phenolphthalein) 0.02 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ และเตรียมกราฟมาตรฐานของบีตา-ไซโคลเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.031 และ 0.0156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน

2.9.3 การวิเคราะห์หาแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน (Kato และคณะ, 1984)

นำตัวอย่างสารละลายที่ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายที่ประกอบด้วย บรอมกลีซอลกรีน (bromcresol green) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในเอทธานอล 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.2 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ และเตรียม

กราฟมาตรฐานของแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 2.5, 1.67, 1.25, 0.833, 0.625, 0.417, 0.208 และ 0.156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน

2.9.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไซโคลเดกซ์ตรินด้วยเครื่อง HPLC

นำตัวอย่างที่ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรองผ่านมิลลิพอร์ (millipore) ขนาด 0.45 ไมครอน นำมาวิเคราะห์หาไซโคลเดกซ์ตริน โดยการฉีดตัวอย่าง ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่อง HPLC ซึ่งจะใช้ Shodex RS Pak DC-613 oligosaccharide column ขนาด 6x150 มิลลิเมตร และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 65:35 ซึ่งไหลด้วยอัตราเร็ว 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของไซโคลเดกซ์ตรินด้วยเครื่องอินทิเกรเตอร์ (integrator) โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของแอลฟา-, บีตา- และ แกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน

2.10 การทำให้เอนไซม์ซีจีทีเอส (CGTase) บริสุทธิ์

2.10.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายที่ได้หลังจากการปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ปริมาตร 900 มิลลิลิตร มาเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัว โดยค่อยๆ เติมจนหมด ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการกวนตลอด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และนำไปไดแอไลส์ (dialyse) ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันในปริมาณที่มากเกินพอ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาตร และแบ่งมาหาปริมาณโปรตีน พร้อมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง ส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.10.2 การทำให้เอนไซม์ซีจีทีเอสบริสุทธิ์ โดยการใช้ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose)

นำเรซิน (resin) ชนิดดีอีเออี-เซลลูโลส (WHATMAN DE-52) มาแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และปรับพีเอชให้ได้ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ประมาณ 30 นาที เทสารละลายทิ้ง และทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (WHATMAN) 2 ชั้น ด้วยเครื่องปั๊มแบบสูญญากาศ นำมาผสมรวมกับสารละลายโปรตีนที่ได้จากข้อ 2.10.1 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 5:1:3 กวนทุกๆ 10 นาที ด้วยแท่งแก้วคน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยเครื่องปั๊มแบบสูญญากาศ และทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันนี้อีก 3 ครั้ง วัดกิจกรรมการย่อยแป้งของแต่ละครั้ง และทำการรวมสารละลายทั้งหมด ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เข้าด้วยกัน นำไปไดแอไลส์ (dialyse) ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาทำให้แห้งด้วยวิธีการไลโอฟิไลส์ (lyophilisation)

2.11 การตรวจหาโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรีซีส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

2.11.1 การเตรียมโพลีอะคลิลาไมด์เจลสำหรับ PAGE แบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ใช้วิธีประยุกต์ของ Laemmli (1970) ซึ่งมีส่วนประกอบของแผ่นเจล (slab gel) ดังที่แสดงในตารางที่ 1 โดยแบ่งเป็น เจลชั้นบน (stacking gel) 4 เปอร์เซ็นต์ และเจลชั้นล่าง (separating gel) 12 เปอร์เซ็นต์

2.11.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอรีซีส

หลังจากที่เตรียมเจลเรียบร้อยแล้วเติมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายโปรตีนมาตรฐานในแต่ละช่องของเจลชั้นบน (stacking gel) จากนี้เติมบัฟเฟอร์ที่เตรียมสำหรับทำอิเลคโตรฟอรีซีส (ทริส 25 มิลลิโมลาร์-ไกลซีน 0.192 โมลาร์, พีเอช 8.3 และเอสดีเอส 1 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 200 โวลต์ ประมาณ 50 นาที หลังจากนี้นำแผ่นเจลออกมาย้อมสี

2.11.4 การย้อมสีแถบโปรตีน

ย้อมสีแถบโปรตีนด้วยโคมาสซีบริลเลียนท์บลู (Coomassie brilliant blue R 250) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมในสารละลายผสมของเมทธานอล (methanol), กรดอะซิติค (acetic acid) และน้ำกลั่น ซึ่งเตรียมในอัตราส่วน 4:1:5 ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการแช่แผ่นเจลประมาณ 1-2 ชั่วโมง และล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารผสมชนิดเดิมจนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนชัดเจน หลังจากนั้นนำแผ่นเจลเก็บในสารละลายผสม ซึ่งเตรียมจากการผสมเมทธานอล 100 มิลลิลิตร กับกรดอะซิติค 70 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.12 การหาปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

2.12.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมโบวีนซีรั่มอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำแต่ละความเข้มข้นมาเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) (เตรียมจากการผสม โซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล, โปแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรท 1 เปอร์เซ็นต์ และคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 100:1:1 ตามลำดับ) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมโฟลิน-ฟีนอล (เตรียมจากการผสม Folin-Ciocalteu's phenol reagent กับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1

ตามลำดับ) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลังค์

2.12.2 การหาปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำการทดลองตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.12.1 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร และนำมาหาปริมาณโปรตีนได้จากกราฟมาตรฐาน

2.13 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ซีจีทีเอส ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่พีเอชต่างๆ กัน

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ซีจีทีเอสของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่พีเอชต่างๆ กัน โดยการนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วละลายในสารละลายของบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ดังนี้ ซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0-6.0, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0-8.0, ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0, โซเดียมคาร์บอเนต-โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (Na_2CO_3-$NaHCO_3$ buffer) พีเอช 10.0-11.0 และโซเดียมคาร์บอเนต-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (Na_2CO_3-NaOH buffer) พีเอช 12.0-13.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอสเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้ใช้ทดสอบ

2.14 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ซีจีทีเอส ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ซีจีทีเอส ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน โดยการนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอสเปรียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้ใช้ทดสอบ

2.15 การศึกษาผลของอิออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การศึกษาผลของอิออนต่อกิจกรรมเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 โดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส มาทดสอบกับสารเคมีชนิดต่างๆ ดังนี้ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$), คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$), แมงกานีสคลอไรด์($MnCl_2.4H_2O$), แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$), ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$), แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$), เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$), อีดีทีเอ (EDTA) และแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) โดยใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ ในแต่ละตัวอย่าง และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเอนไซม์ที่ผ่านการทดสอบกับสารแต่ละชนิดมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส โดยทำเทียบกับเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเหล่านี้

2.16 การศึกษาผลของสารเคมีอื่นๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การศึกษาผลของสารเคมีอื่นๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 โดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส มาทดสอบกับสารเคมีชนิดต่างๆ ดังนี้ อีดีทีเอ (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA), 3,4-ดีซีไอ (3,4-dichloroisocoumarin; 3,4-DCI), ไอโอโดอะซิติคเอซิด (iodoacetic acid), 2-เมอร์แคปโตเอทธานอล (2-mercaptoethanol) และพีเอ็มเอสเอฟ (phenylmethylsulphonyl; PMSF) โดยใช้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ 1 มิลลิโมลาร์ ในแต่ละตัวอย่าง และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเอนไซม์ที่ผ่านการทดสอบกับสารแต่ละชนิด มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส โดยทำเทียบกับเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเหล่านี้

2.17 การวิเคราะห์หาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 (Lee และ Tao, 1995)

นำเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 จากข้อ 2.10.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมกับอิมิดาโซล-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (imidazole-HCl buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีเมทธิลออร์เรนจ์ (methyl orange) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และเติมมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (maltooligosaccharide) ที่มีหน่วยกลูโคสตั้งแต่ G_4 ถึง G_6 เป็นสับสเตรท โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ 2.5, 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิกรัม โดยที่ปริมาตรรวมครั้งสุดท้ายได้ 2.5 มิลลิลิตร และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดดูดกลืนแสงยี่ห้อ Shimadzu ซึ่งใช้โปรแกรม kinetic ในการวัด เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าของ Vm และ Km

2.18 การวิเคราะห์หากรดอะมิโนของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การวิเคราะห์หากรดอะมิโนของเอนไซม์ซีจีทีเอส ตรวจวิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือรวม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยวิธีการดังนี้ คือ นำเอนไซม์มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริค (HCl) ที่มีความเข้มข้น 6 โมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยใช้ Picotag Work Station (Waters Co. Ltd., USA) นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยมาทำให้แห้ง และละลายใน Beckman's Na-S Sample Dilution Buffer ทำการแยกกรดอะมิโนในสารละลาย และนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Beckman System 6300 Amino Acid Analyzer (Beckman Co. Ltd., USA) ส่วนการวิเคราะห์ทริปโตแฟน (tryptophan) จะใช้กรดมีเธนซัลโฟนิค (methanesulphonic acid) ที่ความเข้มข้น 0.8โมลาร์ ในการย่อยเอนไซม์ ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และซีสทีอีน (cysteine) จะวิเคราะห์ในรูปของกรดซีสทีอิค (cysteic acid) หลังจากที่ออกซิไดซ์ (oxidized) ในกรดเพอร์ฟอร์มิค (performic acid)

2.19 การศึกษาผลของปริมาณ yeast extract ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ yeast extract ต่างๆ กัน ตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ โดยทำเทียบกับ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมเฉพาะแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

2.20 การศึกษาผลของเกลือชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และเกลือชนิดต่างๆ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$), เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$), แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$), โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยใช้ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างทั้งหมด ตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ โดยทำเทียบกับ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์

2.21 การศึกษาผลการทำงานร่วมกันของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์, โซเดียม

คลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือชนิดต่างๆ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$), โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) โดยใช้ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างทั้งหมด ตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ โดยทำเทียบกับ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

2.22 การโคลนยีนซีจีทีเอสใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

2.22.1 การเตรียมโครโมโซมดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

2.22.1.1 การสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 (Meade และคณะ, 1982)

นำ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นด้วยอัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาเฉพาะตะกอนของเซลล์ เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาเฉพาะตะกอนของเซลล์ เติมทีอีเอสบัฟเฟอร์ (ซึ่งเป็นส่วนผสมของทริส (tris) พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์, อีดีทีเอ (ethylenediaminetetra acetic acid; EDTA) ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์) ที่แช่เย็น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาเฉพาะตะกอน เติมทีอีบัฟเฟอร์ (ซึ่งเป็นส่วนผสมของทริส (tris) พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์) ที่แช่เย็นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม

สารไลโซไซม์ (lysozyme) (ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของทีอีบัฟเฟอร์) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมโซเดียมลอร์ริลซัลเฟต-โปรเนส (sodium lauryl sulfate-pronase) (เตรียมจากการผสม โซเดียมลอร์ริลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ กับโปรเนส ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของทีอีบัฟเฟอร์) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำมาสกัดด้วยฟีนอล (phenol) (เตรียมฟีนอลโดยทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เติมทริส-ไฮโดรคลอริก พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตรเท่าตัว เขย่าแรงๆ นาน 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดส่วนใสทิ้ง และสกัดด้วยทริส-ไฮโดรคลอริก พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อีก 2 ครั้ง หลังจากนี้เติม ทริส-ไฮโดรคลอริก พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ประมาณ 2-3 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และแยกเอาเฉพาะส่วนใสมาเติมแอมโมเนียมอะซิเตท (ammonium acetate; NH_4AC) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรของสารละลาย และเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 0.54 เท่าของปริมาตรของสารละลาย นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาล้างด้วยเอทธิลอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาเฉพาะดีเอ็นเอ เติมดีเอ็นเอบัฟเฟอร์ (ซึ่งเป็นส่วนผสมของทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride; $MgCl_2.6H_2O$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ที่ผสมกับ RNAse (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านการต้มเดือดเป็นเวลา 10 นาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.22.1.2 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ Sau 3AI

นำดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้จากข้อที่ 2.22.1.1 มาย่อยบางส่วนออกโดยวิธี partial digestion ด้วยเอนไซม์ Sau 3AI ซึ่งเตรียมทั้งหมด 6 หลอด โดยในหลอดแรกใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 30 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลืออีก 5 หลอด ใช้ปริมาตรของดีเอ็นเอหลอดละ 15 ไมโครลิตร นำหลอดแรกมาเติม Sau 3AI ปริมาตร 1 ยูนิต และบัฟเฟอร์ (10x) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หลังจากนี้ถ่ายจากหลอดแรกสู่หลอดที่ 2 ด้วย

ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และทำเช่นนี้ต่อไปจนครบทั้ง 5 หลอด นำทั้ง 6 หลอดมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.22.2 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competene cell) ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

เขี่ยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (อายุ 18 ชั่วโมง) ลงในอาหารเหลว LB broth ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำมาแบ่งใส่หลอด แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะนำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาเฉพาะตะกอนเซลล์ เติมแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะตะกอนเซลล์ เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล (glycerol) 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาแบ่งใส่หลอดๆ ละ 200 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.22.3 การเตรียมเวคเตอร์ (vector)

2.22.3.1 การสกัดเวคเตอร์ (vector)

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด Bluescript ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB agar ซึ่งประกอบด้วย ทริปโตน (tryptone), yeast extract, โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) และแอมพิซิลิน (ampicillin) (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ใส่ลงในอาหารเหลว LB broth ซึ่งมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหารแข็ง LB agar แต่จะไม่มีการเติมวุ้น (agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาเฉพาะตะกอน เติม STET solution (เตรียมจากการผสม ซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์, ไทรตอน X-100 (triton x-100) 5 เปอร์เซ็นต์, ทริส-ไฮโดรคลอริก พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และอีดีทีเอ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร

500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม STET solution ที่มีไลโซไซม์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดทันที เป็นเวลา 60 วินาที นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนใส เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที แยกเอาเฉพาะตะกอน ล้างด้วยเอทธิลอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2 ครั้ง โดยปั่นด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 นาที นำมาทำให้แห้งโดยการใส่ในโถดูดความชื้น (dessicator) เป็นเวลา 20 นาที นำมาเติมดีเอ็นเอบัฟเฟอร์ ที่มี RNAse (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.22.3.2 การตัดเวคเตอร์ด้วยเอนไซม์ Bam HI

นำเวคเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.22.3.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ Bam HI โดยใช้เวคเตอร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น (deionize water) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์ (10x) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Bam HI (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.22.4การโคลนยีนซีจีทีเอสจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

2.22.4.1 การเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ด้วยเอนไซม์ไลเกส (ligase)

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.22.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเวคเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.22.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำมาผสมรวมกัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนี้นำมาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมเอนไซม์ไลเกส 10 ยูนิต ซึ่งประกอบด้วย บัฟเฟอร์ (5x) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร,

น้ำกลั่น ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และเอนไซม์ไลเกส (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.22.4.2 การทรานฟอร์เมชั่น (transformation)

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่เตรียมได้จากข้อ 2.22.2 มาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำมาถ่ายใส่ในหลอดที่มีดีเอ็นเอเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.22.4.1 แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที รีบนำมาแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB agar ที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับที่กล่าวมมาแล้วข้างต้น แต่จะมีการเติม x-gal ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (เตรียม x-gal โดยการละลายในไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide) ให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.22.4.3 การทดสอบการโคลนยีนซีจีทีเอสใน *E. colli* สายพันธุ์ DH5α

เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวที่ขึ้นบนอาหารแข็ง nutrient agar ที่มีการเติม x-gal ซึ่งแสดงว่ามีการโคลนยีนเข้าไป (ส่วนโคโลนีสีฟ้าเป็นโคโลนีที่ไม่มีการโคลนยีน) มาแตะบนอาหารแข็ง LB agar ที่มีการเติม แป้งข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์ และแอมพิซิลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงใส

2.23 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรฟอรีซิส (agarose gel electrophoresis)

2.23.1 การเตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel)

เตรียมอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดประมาณ 2-3 นาที เติมอิเลคโตรฟอรีซิสบัฟเฟอร์ (10x) (ประกอบด้วยทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ที่มีความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์, โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ และอีดีทีเอ (ethylenediaminetetraacetic acid)

ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทใส่ถาดเจล (เตรียมถาดเจลโดยใช้เทปกระดาษปิดหัวท้ายของถาดเจล และวางหวี (comb) ขนาด 8 หลุม) ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที ดึงเทปกระดาษออก วางถาดเจลในอิเลคโตรฟอรีซิสแชมเบอร์ (electrophoresis chamber) โดยหันด้านที่มีหลุมไปทางขั้วลบ และค่อยๆ ดึงหวีออก

2.23.2 การเตรียมรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer)

นำอิเลคโตรฟอรีซิสบัฟเฟอร์ (10x) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 360 มิลลิลิตร เทลงในอิเลคโตรฟอรีซิสแชมเบอร์ (electrophoresis chamber) ให้ท่วมเจล

2.23.3 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณของดีเอ็นเอ เติม loading dye (ซึ่งเป็นส่วนผสมของฟิคอล 400 (ficoll 400) 15 เปอร์เซ็นต์ และโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) 0.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเติมดีเอ็นเอบัฟเฟอร์ให้ครบ 15 ไมโครลิตร และต้องเตรียมตัวอย่างตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน โดยใช้แลมดา-ดีเอ็นเอ (λ-DNA) ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ Hind III และนำมาทำตามวิธีการเดียวกับตัวอย่างดีเอ็นเอ

2.23.4 การทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรฟอรีซิส (agarose gel electrophoresis)

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.23.3 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมเจล แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ และเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ดูระยะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจาก loading dye หลังจากนี้นำเจลไปย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผสมกับอิเลคโตรฟอรีซิสบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15 นาที และนำเจลมาล้างสีส่วนเกินในอิเลคโตรฟอรีซิสบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนี้นำเจลมาส่องใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet) ที่ 254 นาโนเมตร บนทรานซิลลูมิเนเตอร์ (transilluminator)

3. ผลการทดลอง

3.1 การทำให้เอนไซม์ซีจีทีเอส ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 บริสุทธิ์

3.1.1 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

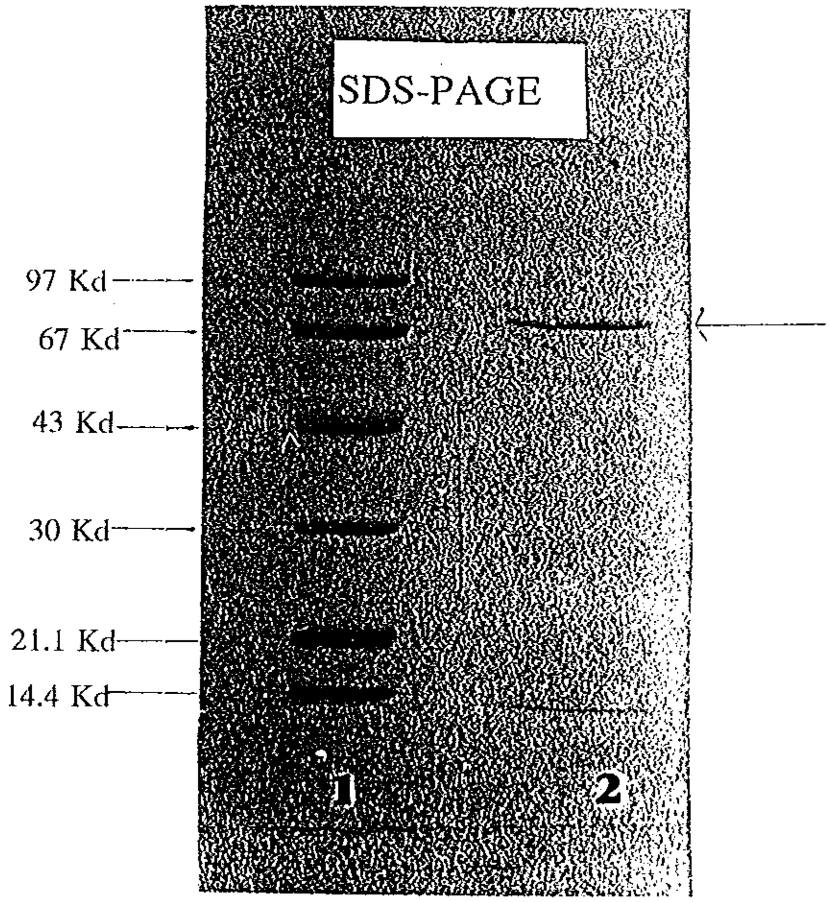
เพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ ที่มีพีเอช 8.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้วหาปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส พบว่าในส่วนใสที่ได้หลังจากการปั่น มีปริมาณโปรตีน 6.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์ 16.45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และหลังจากนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 80 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัวแล้ว พบว่ามีปริมาณโปรตีน 3.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์ 11.85 ยูนิต ซึ่งเมื่อคิดเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะมีค่าเท่ากับ 3.38 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หรือคิดเป็นความบริสุทธิ์เพิ่มจากเริ่มต้น 1.3 เท่า (ตารางที่ 4)

3.1.2 ผลการกรองเอนไซม์ซีจีทีเอสผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose)

นำสารละลายเอนไซม์มากรองผ่านดีอีเออี-เซลลูโลสได้เอนไซม์ซีจีทีเอสที่บริสุทธิ์ เนื่องจากส่วนของเอนไซม์ซีจีทีเอสจะไม่จับกับดีอีเออี-เซลลูโลส จึงถูกชะออกมาพร้อมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งในขั้นตอนนี้เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ได้มีปริมาณโปรตีน 0.0972 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 8.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อคิดเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 70.78 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หรือคิดเป็นความบริสุทธิ์เพิ่มจากเริ่มต้น 27 เท่า (ตารางที่ 4) และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปตรวจความบริสุทธิ์บน SDS-PAGE ปรากฏว่า มีโปรตีนเพียงแถบเดียว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 76,000 ดัลตัน (รูปที่ 2)

ตารางที่4 การทำเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ให้บริสุทธิ์

Purification steps	Activity (Units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (Units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
1. culture supernatant	16.45	6.29	2.61	100	1
2.ammonium sulfate precipitation	11.85	3.51	3.38	72.04	1.30
3. DEAE-cellulose	8.85	0.0972	70.78	53.8	27



รูปที่2 การทำ SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างโปรตีนมาตรฐานกับโปรตีนที่ผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส

แถวที่1: โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ phosphorylase B (97,000), albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (21,100) และ lysozyme (14,400)

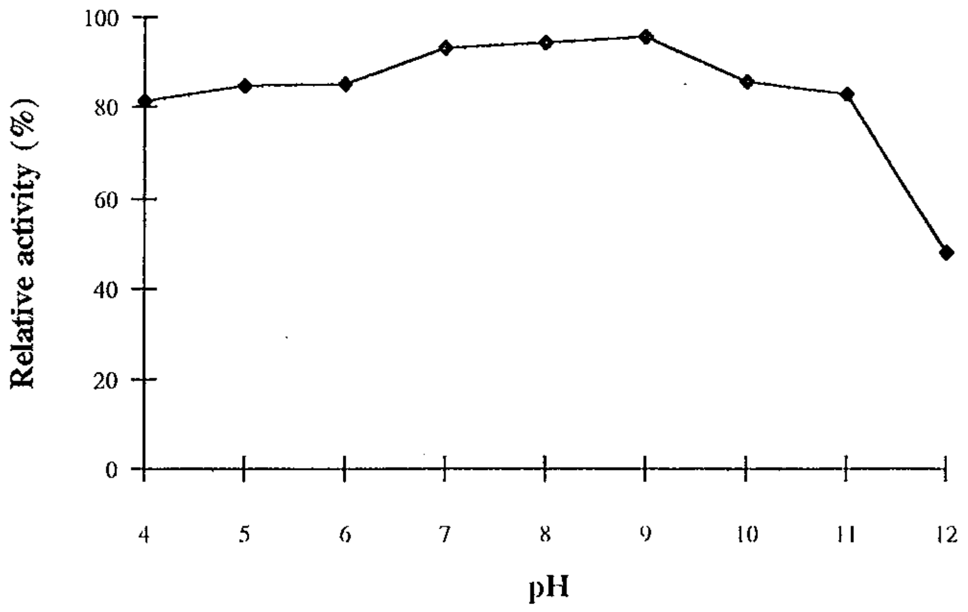
แถวที่2: โปรตีนที่ผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส

3.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ซีจีทีเอส ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่พีเอช และอุณหภูมิต่างๆ กัน

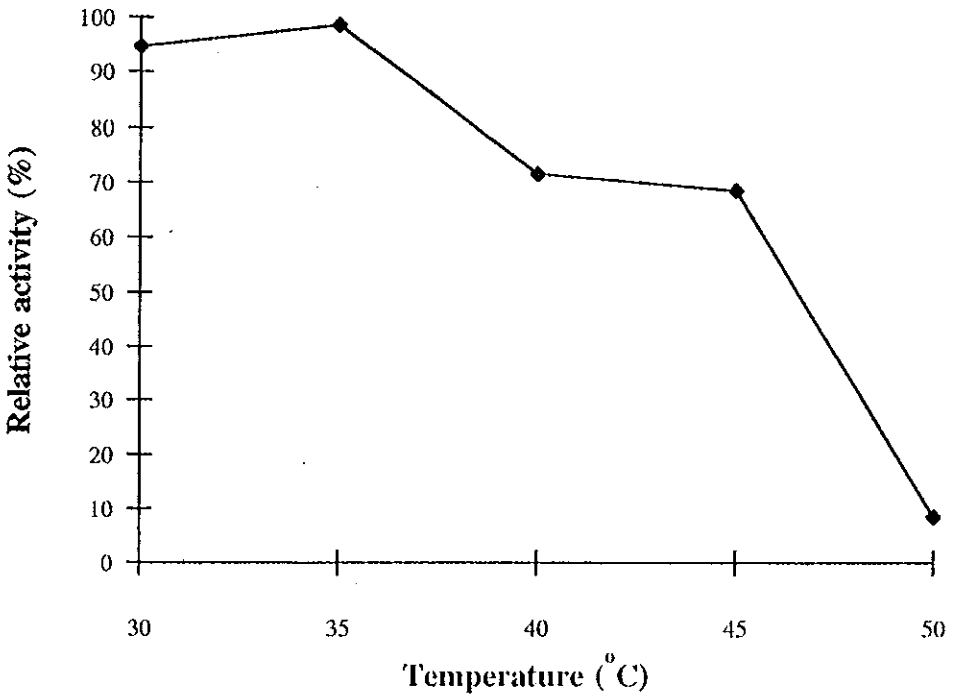
การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ซีจีทีเอส ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่พีเอช และอุณหภูมิต่างๆ กัน โดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านดีอีเออี-เซลลูโลสมาทดสอบ พบว่าเอนไซม์ยังคงมีความเสถียรที่พีเอชระหว่าง 4.0-11.0 โดยเฉพาะในช่วงระหว่าง 7.0-9.0 ซึ่งเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมที่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3 และตารางที่5) และเอนไซม์ยังคงมีความเสถียรที่อุณหภูมิระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4 และตารางที่ 5)

3.3 การศึกษาผลของอิออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การศึกษาผลของอิออนต่อกิจกรรมเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 โดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านดีอีเออี-เซลลูโลสมาทดสอบกับสารเคมีชนิดต่างๆ ดังนี้ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$), คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$), แมงกานีสคลอไรด์($MnCl_2.4H_2O$), แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$), ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$), แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$), เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$), อีดีทีเอ (EDTA) และแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) โดยทำเทียบกับเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเหล่านี้ (ตารางที่6) พบว่าที่ความเข้มข้นของสาร 1 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ดังนี้ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 16 เปอร์เซ็นต์, โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 7 เปอร์เซ็นต์, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 13 เปอร์เซ็นต์, คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 18 เปอร์เซ็นต์, แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซีจีทีเอส 5 เปอร์เซ็นต์, ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส, แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของ



รูปที่8 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์



รูปที่4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์

ตารางที่5 สมบัติของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

Characteristics	Results
Molecular weight	76,000
pH stability	4.0-11.0
Temperature stability	30-45 °C
Vmax (μmol/min)	0.0066
Km (mg/ml)	0.05

เอนไซม์ซีจีทีเอส, เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 7 เปอร์เซ็นต์, อีดีทีเอ (EDTA) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส และ แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเป็น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ดังนี้ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 15 เปอร์เซ็นต์, โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 5 เปอร์เซ็นต์, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 16 เปอร์เซ็นต์, คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 70 เปอร์เซ็นต์, แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส, ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 3 เปอร์เซ็นต์, แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 3 เปอร์เซ็นต์, เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 9 เปอร์เซ็นต์, อีดีทีเอ (EDTA) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส และแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 6 เปอร์เซ็นต์

3.4 การศึกษาผลของสารเคมีอื่นๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การศึกษาผลของสารเคมีอื่นๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 โดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส มาทดสอบกับสารเคมีชนิดต่างๆ ดังนี้ อีดีทีเอ (EDTA), 3,4-ดีซีไอ (3,4-DCI), ไอโอโดอะซิติคเอซิด (iodoacetic acid), 2-เมอร์แคปโตเอทธานอล (2-mercaptoethanol) และพีเอ็มเอสเอฟ (PMSF) โดยใช้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ 1 มิลลิโมลาร์ โดยทำเทียบกับเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเหล่านี้ (ตารางที่ 7) พบว่า ที่ความเข้มข้นของสาร 0.1 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ดังนี้ อีดีทีเอยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 14 เปอร์เซ็นต์, 3,4-ดีซีไอยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 100 เปอร์เซ็นต์, ไอโอโดอะซิติคเอซิดส่งเสริมกิจกรรม

ตารางที่6 ผลของอิออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

Ions	%Relative activity	
	1mM	10 mM
*Control	100	100
NaCl	84	85
KCl	93	95
$MgSO_4.7H_2O$	87	84
$CuSO_4.5H_2O$	82	30
$MnCl_2.4H_2O$	102	100
$MgCl_2.6H_2O$	95	97
$ZnSO_4.7H_2O$	101	103
$CaCl_2.2H_2O$	99	103
$FeSO_4.7H_2O$	93	91
EDTA	97	101
$MnSO_4.H_2O$	101	106

*Control คือ เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ไม่ได้ทดสอบกับอิออน

ของเอนไซม์ซีจีทีเอส 15 เปอร์เซ็นต์, 2-เมอร์แคปโตเอทธานอลส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 19 เปอร์เซ็นต์ และพีเอ็มเอสเอฟยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 13 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเป็น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ดังนี้ อีดีทีเอไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส, 3,4-ดีซีไอยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 100 เปอร์เซ็นต์, ไอโอโดอะซิติกเอซิดส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 12 เปอร์เซ็นต์, 2-เมอร์แคปโตเอทธานอลส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 15 เปอร์เซ็นต์ และพีเอ็มเอสเอฟยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส 19 เปอร์เซ็นต์

3.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 โดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส มาทำปฏิกิริยากับมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน) และเมทธิลออร์เรนจ์ ที่อยู่ในอิมิดาโซล-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/v กับ 1/s (รูปที่ 5) พบว่าค่า Vm ที่ได้เท่ากับ 0.0066 ไมโครโมลต่อนาที และค่า Km เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

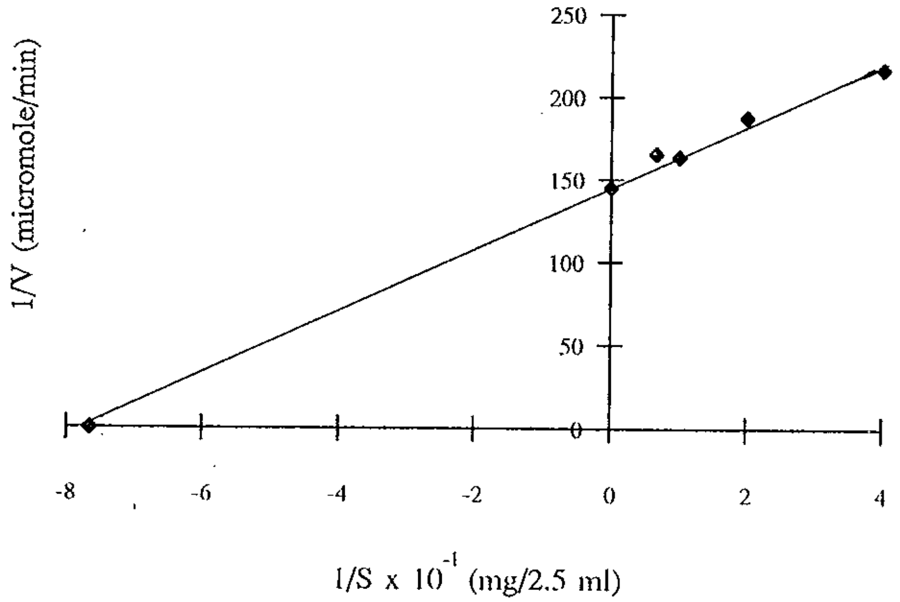
3.6 การวิเคราะห์หากรดอะมิโนของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

การวิเคราะห์กรดอะมิโนของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 โดยการนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส ไปทำให้ความเข้มข้นเพิ่มด้วยเครื่องฟรีซดรายด์ก่อนที่จะวิเคราะห์หากรดอะมิโน (ตารางที่8) พบว่าโปรลีน (proline) มีปริมาณมากที่สุด คิดเป็น 21.05 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด กรดอะมิโนที่มีปริมาณรองลงมา ได้แก่ กรดแอสพาติค (aspartic acid), กรดกลูตามิค (glutamic acid) และอะลานีน (alanine) ตามลำดับ กรดอะมิโนที่ตรวจพบ

ตารางที่7 ผลของสารเคมีอื่นๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

Chemicals	%Relative activity	
	0.1 mM	1 mM
*Control	100	100
EDTA	86	98
3,4-DCI	0	0
Iodoacetic acid	115	112
2-Mercaptoethanol	119	115
PMSF	87	81

*Control หมายถึง เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเคมี



รูปที่5 กราฟ Line weaver-Burk แสดงค่า Vm และ Km ของ
เอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

ปริมาณน้อย คือ ซิสทีอีน (cysteine) และฮิสทิดีน (histidine) ส่วนไกลซีน (glycine), เมทไธโอนีน (methionine) และทริปโตแฟน (tryptophan) ตรวจไม่พบ

3.7 การศึกษาผลของปริมาณ yeast extract ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำเทียบกับ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมเฉพาะแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (ตารางที่9) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีในอาหารที่เติม yeast extract ทุกความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีการเติม yeast extract โดยที่ความเข้มข้นของ yeast extract ตั้งแต่ 1 เปอร์เซ็นต์ ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้นของ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น

3.8 การศึกษาผลของเกลือชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และเกลือแร่ชนิดต่างๆ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$), เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$), แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$), โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยใช้ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทำเทียบกับ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่10) พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อกิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 18 เปอร์เซ็นต์, เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 61

ตารางที่8 ปริมาณกรดอะมิโนของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

Amino acid	% Amino acid
Alanine	12.23
Arginine	2.43
Aspartic acid	15.39
Cysteine	0.18
Glutamic acid	12.34
Glycine	-
Histidine	0.88
Isoleucine	2.18
Leucine	3.30
Lysine	5.43
Methionine	-
Phenylalanine	1.43
Proline	21.05
Serine	3.61
Threonine	3.08
Tryptophan	-
Tyrosine	1.04
Valine	4.23

ตารางที่9 ผลของ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

% Yeast extract	Relative activity (%)
*Control	100
1	114
2	107
3	104
4	111
5	109

*Control คือ อาหารเหลว nutrient broth ที่เติมเฉพาะแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์

เปอร์เซ็นต์, โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 47 เปอร์เซ็นต์, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 34 เปอร์เซ็นต์ และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 6 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อกิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 29 เปอร์เซ็นต์, เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 64 เปอร์เซ็นต์, โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 60 เปอร์เซ็นต์, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$), ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 55 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อกิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 91 เปอร์เซ็นต์, เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์, โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 10 เปอร์เซ็นต์, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ไม่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง แต่ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 72 เปอร์เซ็นต์

3.9 การศึกษาผลการทำงานร่วมกันของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์, โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือชนิดต่างๆ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$), โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) โดยใช้ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยทำเทียบกับ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1

ตารางที่10 ผลของเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

Mineral salts	Relative activity (%)		
	Mineral salt concentrations (%)		
	0.01	0.1	1.0
*Control	100	100	100
$CaCl_2.2H_2O$	118	71	9
$FeSO_4.7H_2O$	39	36	0
KCl	147	40	90
$MgSO_4.7H_2O$	66	90	100
$MnCl_2.4H_2O$	106	45	0
NaCl	100	100	172

*Control คือ อาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์

เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่11) พบว่าเมื่อเติมโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ทำให้ค่ากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงเหลือ 53 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ที่เติมลงไป ทำให้ค่ากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงเหลือ 72 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อมีการเติมเกลือพร้อมกัน 2 ชนิด ได้ผลดังนี้ เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) และโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ทำให้ค่ากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงเหลือ 43 เปอร์เซ็นต์, เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงเหลือ 49 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเติมโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) ทำให้ค่ากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงเหลือ 89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการเติมเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด พบว่าทำให้ค่ากิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงเหลือ 38 เปอร์เซ็นต์

3.10 การศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ จากการเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth ที่ไม่มีการเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

จากการเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในถังหมักจุลินทรีย์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 12 จะมีปริมาณมากที่สุด หลังจากนี้ปริมาณเชื้อก็ค่อยๆ ลดลง ส่วนเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ พบว่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากชั่วโมงที่ 2 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 หลังจากนี้จะลดลงและเพิ่มขึ้น โดยในชั่วโมงที่ 22 จะเพิ่มขึ้นสูง ก่อนที่จะลดลงในชั่วโมงต่อมา ส่วนปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 2-6 ชั่วโมง หลังจากนี้จะลดลงเรื่อยๆ ส่วนปริมาณของไซโคลเดกซ์ตริน พบว่า ผลิตมากในช่วง 2-6 ชั่วโมง (รูปที่ 6) ส่วนการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่า อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate,

ตารางที่11 ผลการทำงานร่วมกันของเกลือแร่ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

Mineral salts	relative activity (%)
*Control	100
$CaCl_2.2H_2O$	72
KCl	53
$MnCl_2.4H_2O$	71
$CaCl_2.2H_2O$ + KCl	43
$CaCl_2.2H_2O$ + $MnCl_2.4H_2O$	49
KCl + $MnCl_2.4H_2O$	89
$CaCl_2.2H_2O$ + KCl + $MnCl_2.4H_2O$	38

*Control คือ อาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

μ) เท่ากับ 0.29 ต่อชั่วโมง โดยมีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า (doubling time, td) เท่ากับ 2.4 ชั่วโมง และปริมาณของไซโคลเดกซ์ตรินทั้งหมด เท่ากับ 6.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 12)

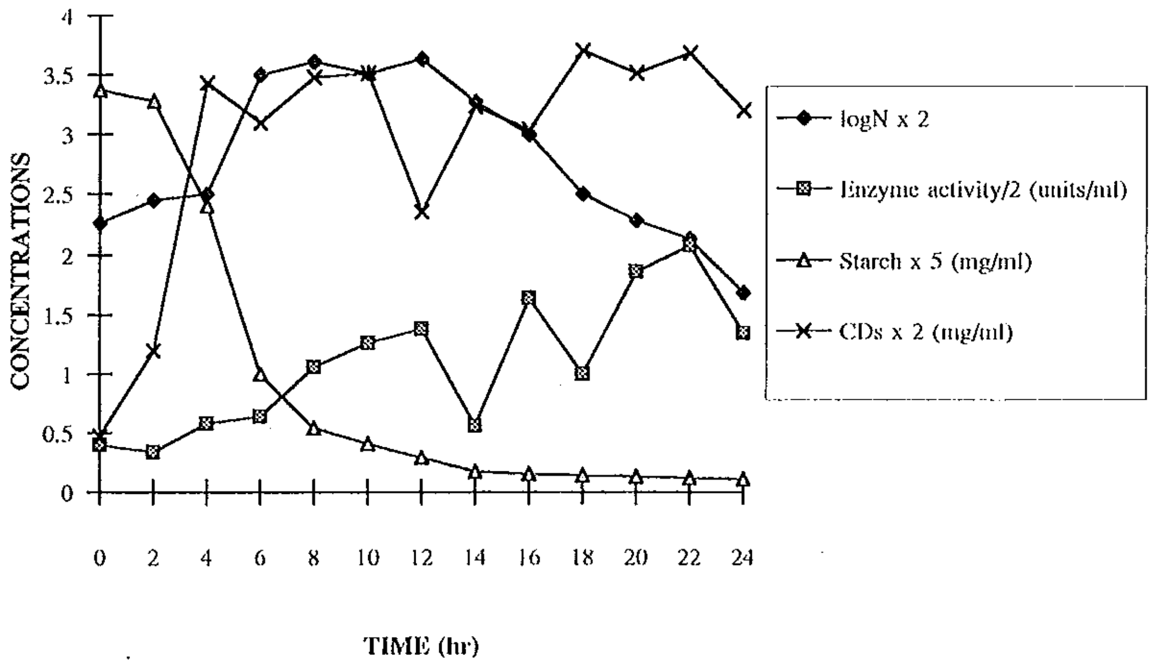
3.11 การศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์จากการเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

จากการเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth พีเอช 8.0 ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในถังหมักจุลินทรีย์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นในชั่วโมงแรกๆ ซึ่งปริมาณของเชื้อไม่แตกต่างกันมากตลอด 24 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ พบว่า เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 10 ก็ลดลง และเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16 หลังจากนี้จะลดลง และจะค่อยๆ เพิ่มหลังจากชั่วโมงที่ 18 ส่วนปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 2-8 ชั่วโมง หลังจากนี้จะลดลงเรื่อยๆ ส่วนปริมาณของไซโคลเดกซ์ตริน พบว่าผลิตเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ในช่วงเวลา 2-8 ชั่วโมง (รูปที่ 7) ส่วนการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่า อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) เท่ากับ 0.43 ต่อชั่วโมง โดยมีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า (doubling time, td) เท่ากับ 1.6 ชั่วโมง และปริมาณของไซโคลเดกซ์ตรินทั้งหมด 13.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 12)

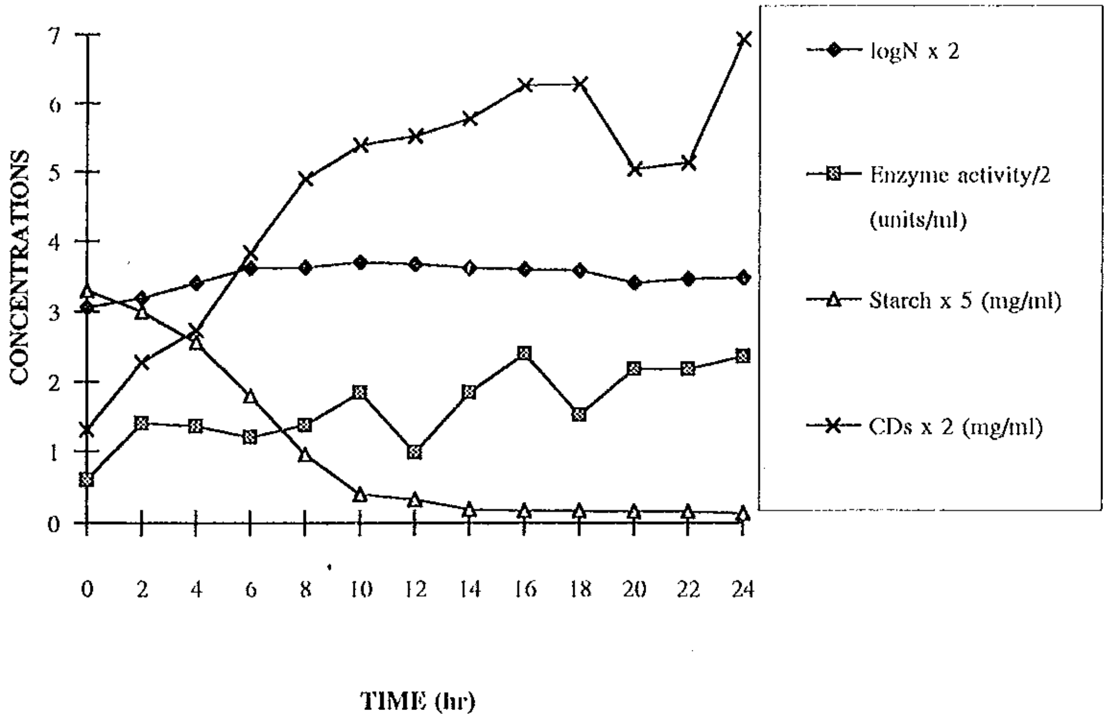
3.12 การศึกษาการโคลนยีนซีจีทีเอส ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

3.12.1 การเตรียมดีเอ็นเอ ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24



รูปที่6 จลน์ศาสตร์ของ Bacillus สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ และ yeast extract ที่มีพีเอช 8.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่7 จลน์ศาสตร์ของ Bacillus สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีพีเอช 8.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่12 การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ระหว่างในอาหารที่มีการเติม และไม่มีการเติม Yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

Characteristics	Starch medium	
	No supplement	Supplement
doubling time (hr)	2.4	1.6
specific growth rate (hr^{-1})	0.29	0.43
total cyclodextrin (mg/ml)	6.4	13.9
α-CD	1.9	3.36
β-CD	3.92	9.28
γ-CD	0.57	1.22
Relative activity (%)	57	100

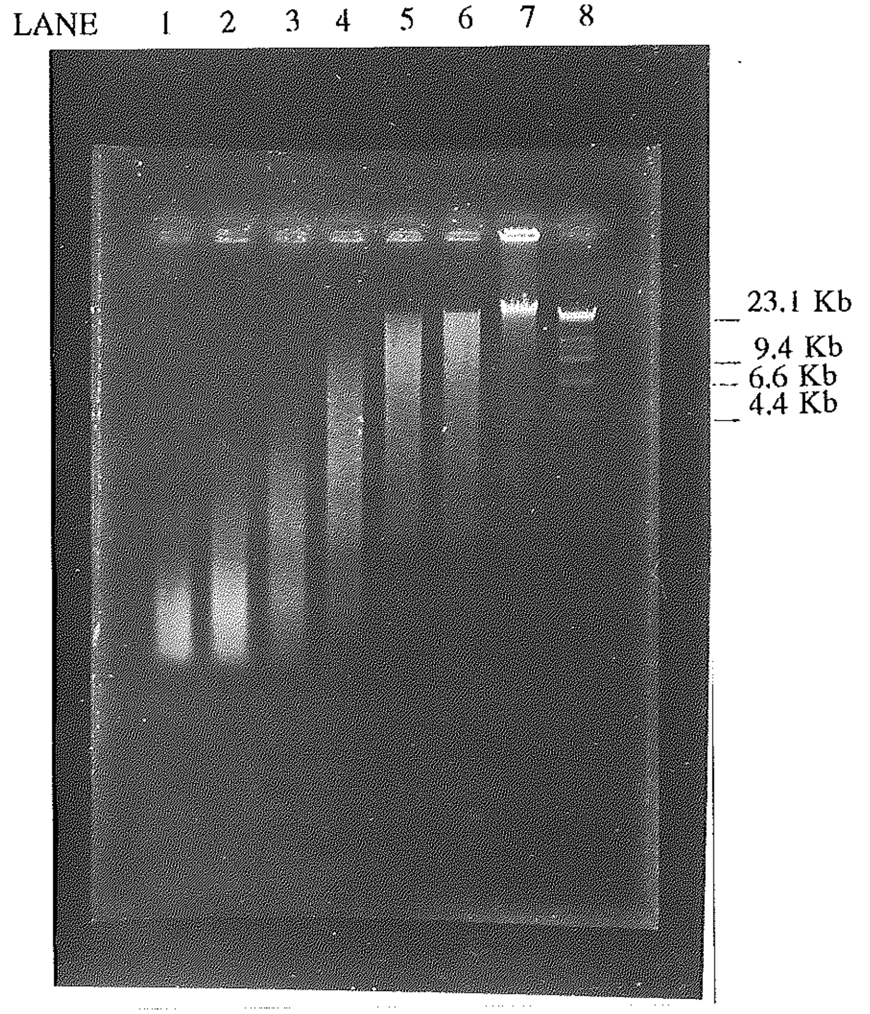
ชั่วโมง และนำเชื้อที่ได้มาสกัดเอาดีเอ็นเอตามวิธีของ Meade และคณะ (1982) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ Sau 3AI (รูปที่ 8) โดยการทำ partial digestion และนำมาทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรฟอรีซีส ก่อนที่จะนำมาส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต โดยได้ทำเปรียบเทียบกับแลมดา-ดีเอ็นเอ (λ-DNA) ที่ใช้เป็นตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน เพื่อเลือกขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการ พบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการอยู่ในเลน (lane) ที่ 6 (รูปที่ 8) โดยมีขนาดของดีเอ็นเอ อยู่ระหว่าง 0.6 ถึง 20 กิโลเบส ซึ่งก็คือดีเอ็นเอในหลอดที่ 6 ของการทำ partial digestion

3.12.2 การเตรียมเวคเตอร์ (vector) ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

จากการเพาะเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด Bluescript ที่ต้องการในอาหารเหลว LB broth ที่มีการเติมยาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่ได้มาสกัดเอาพลาสมิดด้วยวิธี lysis by boiling นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ Bam HI และนำมาทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรฟอรีซีสก่อนที่จะนำมาส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต โดยทำเปรียบเทียบกับแลมดา-ดีเอ็นเอ (λ-DNA) ที่ใช้เป็นตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน พบว่า พลาสมิดถูกตัดโดยสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 11

3.12.3 การโคลนยีนซีจีทีเอส ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธีทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation)

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 และผ่านขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ Sau 3AI มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.12.2 ด้วยเอนไซม์ไลเกส (T4 DNA ligase) ก่อนที่จะนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation) (รูปที่ 9) และนำมาลงบนอาหารแข็ง LB agar ที่มีการเติมแอมพิซิลิน (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ x-gal (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) โดยวิธี spread plate คัดเลือกโคโลนีสีขาว ซึ่งแสดงว่ามีการโคลนยีนเข้าไป นำมาทดสอบต่อบนอาหารแข็ง LB agar ที่มีการเติมแอมพิซิลิน (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และแป้งข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้แน่ใจว่าได้มีการโคลนยีนเข้าไปจริง พบว่า โคโลนีของ PS818 ให้วงใสกว้างและเห็นชัดเจน จากทั้งหมด 2,352

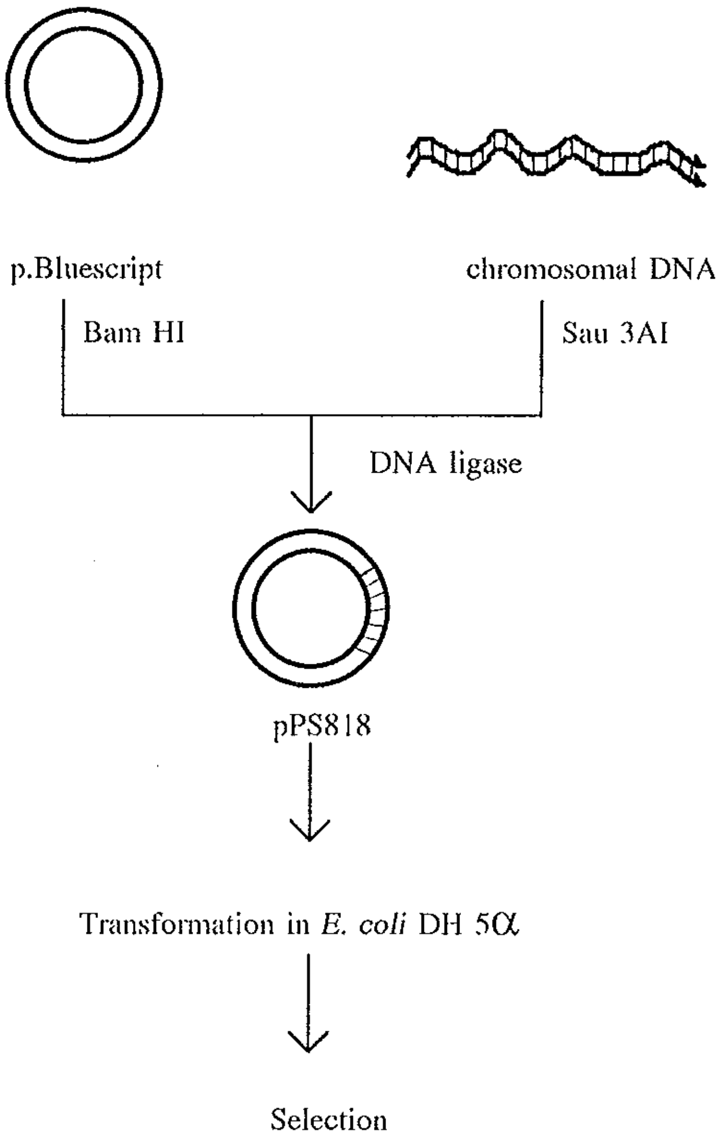


รูปที่8 ผลจากการทำ partial digestion ของดีเอ็นเอของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304

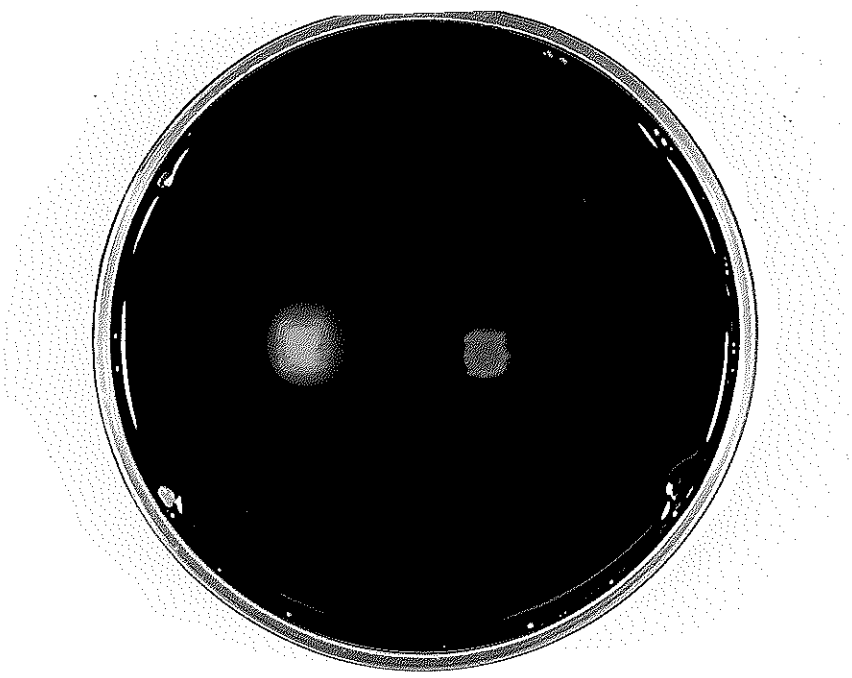
Lane ที่ 1-7 แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย Sau 3AI ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

Lane ที่ 8 λ-DNA ที่ใช้เป็นตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน

โคโลนี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเท่ากับ 0.125 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 8.95 มิลลิเมตร โดยได้เปรียบเทียบกับโคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีเฉพาะพลาสมิด Bluescript เท่านั้น ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 5.50 มิลลิเมตร (รูปที่ 10) และเมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ และตัดด้วยเอนไซม์ Bam HI พบว่าพลาสมิด pBluescript M13 มีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 2.9 กิโลเบส ส่วนพลาสมิด pPS818 ที่มีการโคลนยีนเข้าไปมีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 4.4 กิโลเบส (รูปที่ 11) และเมื่อนำดีเอ็นเอที่มีการโคลนยีนมาตัดด้วยเอนไซม์ Pst I และ Hind III พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 3.1 กิโลเบส (รูปที่ 12) จะเห็นว่ามีดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบสหายไป ซึ่งอาจเป็นเพราะดีเอ็นเอถูกตัดย่อยลงไปเป็นขนาดเล็กจนมองไม่เห็นด้วยบนเจล



รูปที่9 การโคลนยีนซีจีทีเอสของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ใน *E. coli* DH5α

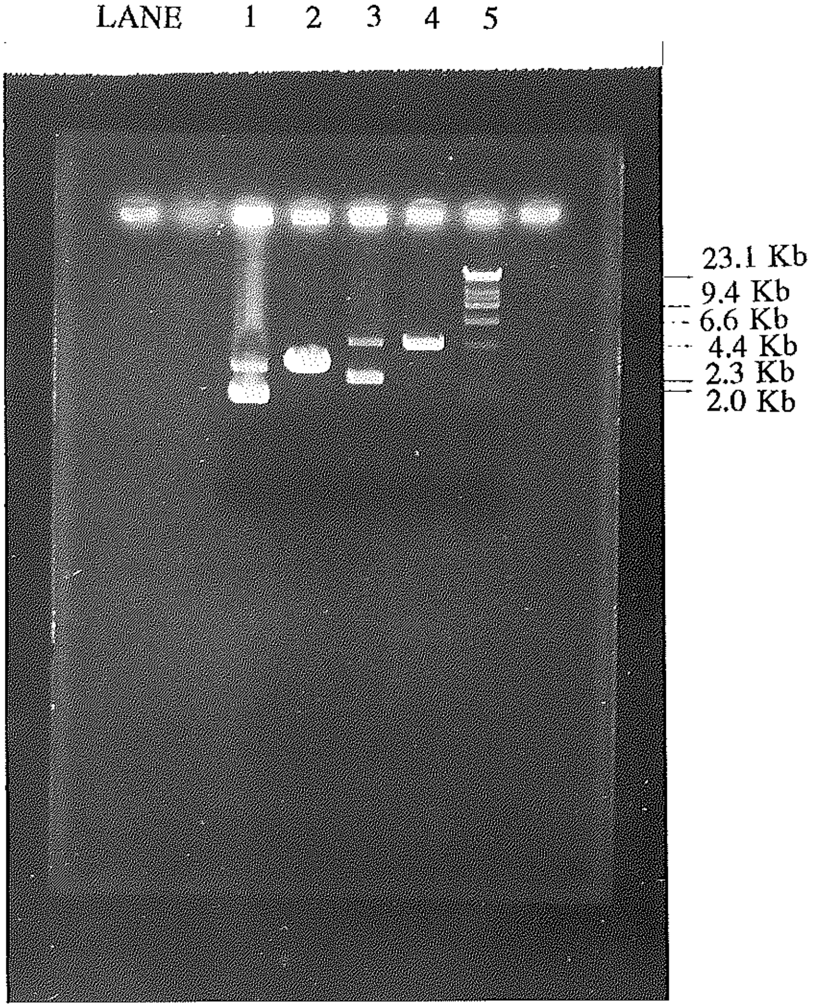


(1) (2)

รูปที่10 เปรียบเทียบโคโลนีของ *E. coli* (PS818) กับโคโลนีของ *E. coli* ที่เป็นตัวควบคุม

(1) โคโลนีของ *E. coli* (PS818)

(2) โคโลนีของ *E. coli* ที่เป็นตัวควบคุม



รูปที่11 ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

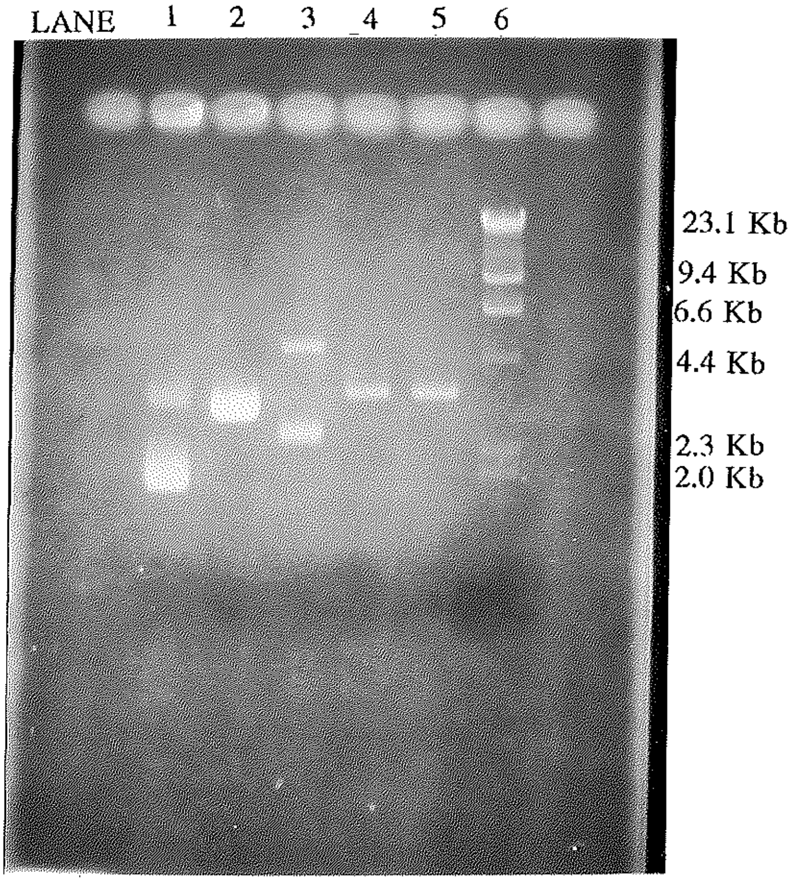
โดย Lane ที่ 1 pBluescript M13

Lane ที่ 2 pBluescript M13+Bam HI

Lane ที่ 3 pPS818

Lane ที่ 4 pPS818+Bam HI

Lane ที่ 5 λ-DNA+Hind III



รูปที่12 ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

โดย Lane ที่ 1	pBluescript M13
Lane ที่2	pBluescript M13+Bam HI
Lane ที่3	pPS818
Lane ที่4	pPS818+Bam HI+Pst I
Lane ที่5	pPS818+Bam HI+Hind III
Lane ที่6	λ-DNA+Hind III

4.วิจารณ์

จากการทำให้เอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 บริสุทธิ์ โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และดีอีเออี-เซลลูโลส แล้วตรวจความบริสุทธิ์ด้วยเอสดีเอส-เพจก์ พบว่าได้โปรตีนแถบเดียวหลังจากย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R.250 โดยมีน้ำหนักของโมเลกุลประมาณ 76,000 ดัลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus circulans* DF9 ชนิด R ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 78,000 ดัลตัน (Marechal และคณะ, 1996), *Brevibacterium* sp. No.9605 (Mori และคณะ, 1994) และ *Bacillus mcerans* (Kitahata และคณะ, 1974) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 75,000 ดัลตัน แต่มีขนาดต่างจากเอนไซม์ซีจีทีเอสที่มีรายงานมาก่อนดังนี้ *Bacillus* sp. A2-5a มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 80,000 ดัลตัน (Kometani และคณะ, 1994), *Bacillus ohbensis* มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 80,000 ดัลตัน (Sin และคณะ, 1991), *Bacillus stearothermophilus* มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดัลตัน (Kitahata และ Okada, 1982) และ *Bacillus* sp. 38-2 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 88,000 ดัลตัน เอนไซม์ที่แยกได้มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-11.0 ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 มีดังนี้ เอนไซม์ที่ผลิตโดย *Klebsiella oxytoca* 19-1 ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 30-45 องศาเซลเซียส (Lee และคณะ, 1992), เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* BE101 ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Lee และ Kim, 1991) แต่จะต่างจากเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus macerans* ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส (Kitahata และคณะ, 1974), เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งจะเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส (Kitahata และ Okada, 1982), เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย Brevibacterium sp. No.9605 โดยเอนไซม์เสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Mori และคณะ, 1994) และเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus*

circulans DF9 ชนิด R มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงคือ 55 องศาเซลเซียส (Marechal และคณะ, 1996) และได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และทำการศึกษาเอนไซม์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ *Thermoanaerobacter* ซึ่งทนต่อความร้อนได้สูง และมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานคือ พีเอช 6.0 และอุณหภูมิในช่วงระหว่าง 90-95 องศาเซลเซียส (Pedersen และคณะ, 1995)

จากการศึกษาสารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 พบว่า 3,4 ดีซีไอ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง3,4-ดีซีไอ เป็นสารยับยั้งซีรีนโปรตีเอส (serine protease) แสดงว่าเอนไซม์ซีจีทีเอสนี้มีกรดอะมิโนซีรีนอยู่ที่บริเวณเร่ง ส่วนกรดไอโอโดอะซิติคไม่มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แสดงว่าสารชนิดนี้ไม่สามารถจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณเร่งได้ เนื่องจากกรดชนิดนี้ปกติจะจับกับกลุ่มของซัลไฮดริล (sulfhydryl group) ในซีสทีอีน (cysteine) แต่เนื่องจากบริเวณเร่งของเอนไซม์ชนิดนี้ไม่มีซีสทีอีน (cysteine) หรือมีอยู่น้อยมาก ทำให้กรดชนิดนี้ไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ และพบว่าการทำงานของเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทธานอล (2-mercaptoethanol) เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นสารรีดิวซิ่ง (reducing agent) ซึ่งช่วยให้เอนไซม์บางชนิดมีความเสถียร ส่วนอีดีทีเอไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แสดงว่าเอนไซม์ซีจีทีเอสนี้ไม่ต้องการอิออนโลหะเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของอิออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 พบว่าถูกยับยั้งด้วยคอปเปอร์อิออน (Cu^{2+}) ซึ่งคอปเปอร์อิออนเป็นโลหะอิออน โดยอาจจับตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ แล้วทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง แต่ถ้าปริมาณของเอนไซม์มากกว่าโลหะอิออนชนิดนี้มากอาจทำให้โลหะอิออนชนิดไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ก็ได้ ซึ่งเมื่อปริมาณของโลหะอิออนชนิดนี้เพิ่มขึ้น เช่นจากการทดลอง เมื่อเพิ่มจาก 1 มิลลิโมลาร์ เป็น 10 มิลลิโมลาร์ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ส่วนโลหะอิออนชนิดอื่นไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เช่นเดียวกับเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Brevibacterium* sp. (Mori และ คณะ, 1994) ที่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยคอปเปอร์อิออน ส่วนกรดไอโอโดอะซิติค มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยที่อีดีทีเอไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และเอนไซม์จะเพิ่มความเสถียรเมื่อมีการเติมแคลเซียมอิออน

โดยทั่วไปแล้วโลหะอิออนมีส่วนสำคัญ เนื่องจากมีโลหะอิออนหลายชนิด เช่น แมกนีเซียม (Mg), แคลเซียม (Ca) และซิงค์ (Zn) เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) หรือโคสับสเตรท (cosubstrate) ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยที่มีโลหะหนักบางชนิด เช่น ตะกั่ว, ปรอท และแคดเมียม สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยพวกนี้จะมีผลต่อกลุ่มของซัลไฮดริลอิสระ (free sulfhydryl group) เช่น ในซิสทีอีน (cysteine)

ผลจากการศึกษาจลนศาสตร์ในการผลิตไซโคลเดกซ์ตริน ของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 จากกราฟ Lineweaver-Burke พบว่า มีค่า Vm 0.0066 ไมโครโมลต่อนาที และ Km 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่า Vm และ Km จากรายงานของ Lee และ Tao (1995) คือ 0.0056 ไมโครโมลต่อนาที และ Km 0.051 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่า เอนไซม์มีความสามารถในการผลิตไซโคลเดกซ์ตรินที่ต่ำ ซึ่งจากการทดลองจะวัดจากการผลิตแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน โดยอาจเป็นเพราะปฏิกิริยาไซไคลเซชันเกิดได้ช้า และจากการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ซีจีทีเอส พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนโปรลีน (proline) เป็นจำนวนมาก ซึ่งแสดงถึงความไม่ยืดหยุ่น (rigidity) ของโมเลกุลเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนแอสพาติค และกลูตามิค ในปริมาณที่รองลงมา ซึ่งสอดคล้องกับโปรตีนที่อยู่ในสภาวะด่างจะมีกรดอะมิโนที่เป็นกรดสูง ซึ่งจะทำให้เกิดสมดุลย์ของความเป็นกรดด่างในเซลล์

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ในอาหารเหลวที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับในอาหารที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ และ yeast extract พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมโซเดียมคลอไรด์ และ yeast extract ผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่า 1.7 เท่า โดยที่ yeast extract เป็นสารสกัดที่ได้จากเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces* ซึ่งอาจอยู่ในรูปผง หรือมีลักษณะคล้ายแป้งเปียก โดย yeast extract

เป็นสารอาหารที่ประกอบด้วย กรดอะมิโน, เปปไทด์ และวิตามิน ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ใน yeast extract เป็นพวกไกลโคเจน และทรีฮาโลส (trehalose) ซึ่งถูกย่อยในกระบวนการสกัดได้เป็นกลูโคส ส่วนกลูแคน และแมนแนนที่ผนังเซลล์ของยีสต์จะถูกกำจัดออกมาพร้อมกับสารอื่นๆ (Bridson และ Brecker, 1969)

โดยปกติแล้ว yeast extract สกัดมาจาก 2 แหล่ง คือ ยีสต์ที่ใช้ทำเหล้า (brewer yeast) ซึ่งยังมีฮอบเรซิ่น (hop resins) และถ้าไม่กำจัดออกไป สารนี้จะยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ และ yeast extract ที่เตรียมจากยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง (bakers' yeast) ซึ่งจะไม่มีฮอบเรซิ่น และมีสีที่อ่อนกว่ายีสต์ที่ใช้ทำเหล้า (Bridson และ Brecker, 1969)

นอกจากนี้ yeast extract ที่ผลิตจากบริษัทต่างๆ เช่น Difco, Oxoid และ BBL มีส่วนประกอบที่แตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มาของยีสต์ และวิธีการสกัด แต่อย่างไรก็ตาม yeast extract สามารถใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นแหล่งของวิตามินบีรวม, กระตุ้นการเติบโต และผลิตเอนไซม์ได้ดีขึ้น (Difco Manual, 1974)

Bacillus สายพันธุ์ PS304 สามารถเติบโตได้ดีเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว แสดงว่า โซเดียมเป็นอิออนที่เซลล์แบคทีเรียต้องการในการควบคุมความสมดุลของเซลล์ระหว่างโซเดียมอิออนที่อยู่ภายในเซลล์ กับไฮโดรเจนอิออนที่อยู่ภายนอกเซลล์ เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนประจุกัน (Krulwich และคณะ, 1984) นอกจากนี้โซเดียมอิออนยังเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารเข้าเซลล์ ซึ่งพวก *Bacillus* ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง และมีออกซิเจน จะมีการปั๊มโปรตอนออกนอกเซลล์ในครั้งแรกในกระบวนการหายใจ ทำให้มีการสะสมของโปรตอนของเซลล์ ซึ่งจะต้องการโซเดียมอิออน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง ในอาหารที่ไม่มีการเติมโซเดียมอิออน จะเป็นผลให้สภาวะความเป็นด่างในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จะเท่ากับพีเอชด้านนอกทันที และมีการรักษาพีเอชภายในเซลล์โดยโซเดียมอิออน/ไฮโดรเจนอิออน แอนติพอร์ทเตอร์ (Na^+/H^+ antiporter) ซึ่งก็คือ การแลกเปลี่ยนโซเดียมอิออนที่อยู่ภายในเซลล์กับไฮโดรเจนอิออนที่อยู่ภายนอกเซลล์ โดย Mclaggan และคณะ (1984) ได้ทำการศึกษาเพื่อแสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกในที่ไม่มีการเติมโซเดียมอิออน พบว่าค่าพีเอชที่อยู่ภายในของ *Exiguobacterium aurantiacum* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งเท่ากับพีเอชด้านนอก และเมื่อมีโซเดียมอิออน พบว่าพีเอชที่อยู่ภายใน

จะยังคงรักษาระดับ ซึ่งต่ำกว่าพีเอชด้านนอก นอกจากนี้โซเดียมอิออนยังเป็นตัวจับกับอิออนในกระบวนการแอคทีฟทรานส์พอร์ท (active transport) และพวกสารละลายจะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการซิมพอร์ท (symport) โดยใช้โซเดียมอิออนช่วย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกลไกในการทำให้พีเอชคงที่ (pH homeostasis) และในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่างยังขึ้นอยู่กับโซเดียมอิออน โดยโซเดียมอิออนจำเป็นในการเคลื่อนที่ของพวก *Bacillus* ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง โดยจะเพิ่มความเร็วเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอิออน (Krulwich และ Guffanti, 1989)

นอกเหนือจากโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีผลในการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 สูงขึ้นแล้ว ยังพบว่าการผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอสให้สูงกว่าเดิม ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือแร่ โดยส่วนใหญ่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น จะมีผลยับยั้งการเติบโต ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเกลือแร่บางชนิดจำเป็นในการเติบโตและเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ ซึ่งเกลือแร่ที่จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต้องการ ได้แก่ โซเดียม (Na), แมกนีเซียม (Mg), โปแทสเซียม (K), แมงกานีส (Mn), แคลเซียม (Ca), เฟอรัส (Fe), ฟอสฟอรัส (P) และซัลเฟอร์ (S) โดยจะใช้เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์บางชนิด ซึ่งกลไกการทำงานของโคแฟคเตอร์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันคือ บางชนิดมีผลต่อปฏิกิริยา นอกจากนี้มีส่วนร่วมในการเร่งปฏิกิริยาโดยตรง โดยมีผลต่อกลไกของปฏิกิริยา และช่วยในการจับกับสับสเตรท โดยแคลเซียม และแมกนีเซียมช่วยในการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ และยังเป็นองค์ประกอบของวิตามินบี12, เหล็กเป็นองค์ประกอบของไซโตโครม (cytochrome) และคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นกลุ่มพรอสทีติค (prosthetic group) โดยมีผลต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ในการทำงานของเอนไซม์ต่อกรดฟีนอลิค (phenolic acid)

การโคลนยีนซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 เข้าไปใน *E. coli* DH5α พบว่า *E. coli* PS818 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดี เนื่องจากเกิดวงใสรอบโคโลนี แต่ตรวจไม่พบไซโคลเดกซ์ตริน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ซีจีทีเอสไม่แสดงออกใน *E. coli* โดยมียีนบางส่วนที่สำคัญในการเกิดไซไคลเซชัน (cyclization)

หลุดหายไป ซึ่งจะต้องทำการโคลนยีนใหม่ อย่างไรก็ตามข้อมูลนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาการโคลนยีนซีจีทีเอสต่อไป แต่จากการรายงานการโคลนยีนซีจีทีเอสพบว่าได้มีการโคลนยีนซีจีทีเอสใน *E. coli* ดังนี้คือ ยีนซีจีทีเอสจาก *Bacilllus ohbensis* (6.3 กิโลเบส) ซึ่งผลิตบีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน 25 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Sin และคณะ, 1991), ยีนซีจีทีเอสจาก *Bacilllus* sp. #1011 (5.3 กิโลเบส) ผลิตไซโคลเดกซ์ตรินในอัตราส่วน แอลฟา-: บีตา-: แกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน คือ 1:8.8:0.05 (Kimura และคณะ, 1989) และยีนซีจีทีเอสจาก *Bacilllus* No. 38-2 (5.3 กิโลเบส) (Horikoshi, 1990) นอกจากนี้ได้มีการโคลนยีนซีจีทีเอสใน *Bacillus subtilis* เช่นยีนซีจีทีเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* No.2 ซึ่งผลิตแอลฟา- และบีตา-ไซโคลเดกซ์ตริน เป็นผลผลิตหลัก และ *Bacillus macerans* IFO3490 ซึ่งผลิตแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตรินเป็นผลผลิตหลัก (Fujiwara และคณะ, 1992) และยีนซีจีทีเอสจาก *Bacillus circulans* var. *alkalophiles* ATCC21783 ซึ่งจะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ 33 เท่า โดยต้องอยู่ภายใต้การควบคุมของแอลฟา-อะไมเลสโปรโมเตอร์ (α-amylase promoter) ของ *Bacillus amyloliquefaciens* (Paloheimo และคณะ, 1992) นอกจากนี้ Nakamura และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาผลจากการแทนที่ของกรดอะมิโนของยีนซีจีทีเอสจาก *Bacillus* sp. 1011 ที่แสดงออกใน *E. coli* ME8417 พบว่าเอนไซม์ซีจีทีเอส (wild type) จะผลิตบีตา-ไซโคเดกซ์ตริน มากที่สุด (มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เอนไซม์ซีจีทีเอสF183L, F259L และโดยเฉพาะ Y195L (Tyr-195 แทนที่ด้วย leucine) มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของแอลฟา-: บีตา-: แกมมา-ไซโคเดกซ์ตริน ในการผลิต โดย Y195L ผลิตแกมมา-ไซโคเดกซ์ตริน ในปริมาณที่มากกว่าเอนไซม์ซีจีทีเอสเดิม เนื่องมาจากกลุ่มของฟีนิล (phenyl group) ของ Phe-183, Tyr-195 และ Phe-259 มีส่วนในปฏิกิริยาไซไคลเซชันของเอนไซม์ โดยเมื่อมีการแทนที่ Tyr-195 ด้วยลิวซีน (leucine) จะมีผลต่อปฏิกิริยาไซไคลเซชันเป็นอย่างมาก โดย Y195L และ Y195V จะผลิตแกมมา-ไซโคเดกซ์ตริน ในปริมาณที่สูงกว่าเอนไซม์เดิมมาก และ F283L มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 7.0 ในขณะที่เอนไซม์ซีจีทีเอส (wild type) มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ 5.0 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงพีเอชของ F283L อาจเป็นผลมาจากการแทนที่ของกรดอะมิโนโดยตรง ซึ่งแสดงว่า Phe-23 สำคัญในการย่อยแป้งในช่วงพีเอชที่ไม่ได้เป็น

กรด และด่าง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงพีเอชยังพบในเอนไซม์ซีจีทีเอส H327N จาก *Bacillus* sp. 1011 ที่แสดงออกใน *E. coli* JM109 (Nakamura และคณะ, 1993) โดยเอนไซม์ซีจีทีเอส (wild type) ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 ส่วนเอนไซม์ซีจีทีเอส H327N มีการทำงานในช่วงพีเอชที่ต่างออกไป เนื่องจากการแทนที่ His-327 ด้วยแอสพาราจีน (asparagine) ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชเช่นเดียวกับการวิจัยของ Fujiwara และคณะ (1992) ที่ทำการศึกษาเอนไซม์จาก *Bacillus stearothermophilus* NO.2 พบว่า Cgt1-F191Y (Phe-191 ถูกแทนที่ด้วย Tyr) ผลิตแอลฟา-ไซโคเดกซ์ตริน ได้มากกว่า Cgt1 (ยีนซีจีทีเอสของ *Bacillus stearothermophilus* NO.2) และ Cgt1-F191Y-F255Y (Phe-191 และ Phe-255 ถูกแทนที่ด้วย Tyr) ซึ่งผลที่ได้แสดงว่า Phe-191 และ Phe-255 มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาไซไคลเซชัน และเอนไซม์ซีจีทีเอส Cgt1-W254V-F254I (Trp-254 ถูกแทนที่ด้วย Val และ Phe-255 ถูกแทนที่ด้วย Ile) จะสูญเสียกิจกรรมการผลิตของแอลฟา-ไซโคลเดกซ์ตริน และการที่เอนไซม์ไม่ผลิตไซโคลเดกซ์ตริน และมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่จำเพาะ แสดงว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก แต่ไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาไซไคลเซชัน นอกจากนี้ผลผลิตของไซโคเดกซ์ตริน จะลดลงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จากระดับของเอนไซม์เดิม ซึ่งขึ้นกับตำแหน่งที่สับสเตรทมาจับ อาจไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไซไคลเซชัน และตามการวิจัยของ Kaneko และคณะ (1989) พบว่าตรงบริเวณปลายด้านซี-เทอร์มินอล (C-terminal) มีกรดอะมิโน 30 ตัวที่ขาดไป ทำให้ตรวจไม่พบการทำงานของเอนไซม์ แสดงว่าส่วนของซี-เทอร์มินอลมีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซีจีทีเอส

5.สรุป

1. จากการทำให้เอนไซม์ซีจีทีเอสบริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซ็นต์ และผ่านดีอีเออี-เซลลูโลส พบว่า เอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มจากเริ่มต้น 27 เท่า และเมื่อนำมาทำเจลอิเลคโตรฟอรีซิส พบว่ามีโปรตีนเพียงแถบเดียว เมื่อย้อมด้วย Coomassie Blue และมีน้ำหนักของโมเลกุลประมาณ 76,000 ดัลตัน

2. เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ทำให้บริสุทธิ์ ยังคงมีความเสถียรที่พีเอชระหว่าง 4.0-12.0 แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอชระหว่าง 7.0-9.0 ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และนำไปทดสอบกับอิออนต่างๆ จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย 3,4-ดีซีไอ

3. การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ซีจีทีเอสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีค่า Vm เท่ากับ 0.0066 ไมโครโมลต่อนาที และค่า Km เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. เอนไซม์ซีจีทีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด โดยมีโปรลีนมากที่สุด และกรดอะมิโนที่มีปริมาณรองลงมา คือ กรดแอสพาติค, กรดกลูตามิค และอะลานีน ตามลำดับ

5. *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีที่สุดเมื่อมีการเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

6. จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ซีจีทีเอส โดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 มีเวลาเติบโตเป็น 2 เท่า คือ 1.6 ชั่วโมง โดยมีอัตราเติบโตจำเพาะ 0.43 ต่อชั่วโมง และผลิตไซโคลเดกซ์ตรินทั้งหมด 13.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

7. จากการโคลนยีนซีจีทีเอสของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ใน *E. coli* DH5α พบว่า โคโลนีของ PS818 ให้วงใสกว้าง และเห็นชัดเจน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 8.95 มิลลิเมตร แต่ตรวจไม่พบ แอลฟา-, บีตา- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ตริน

เอกสารอ้างอิง

จินตนา เพชรมณีโชติ. 2538. เอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Akino, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. 1988(a). Characterization of three β-mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 52:773-779.

Akino, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. 1988(b). Characterization of β-mannosidase of an alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 52:1459-1464.

Alexander, R.J. 1992. Maltodextrins: production, properties and applications. *In* Starch hydrolysis products: Worldwide technology, production and applications (F.W. Schenck and R.E. Hebeda, eds.), p.233-275. VCH Publishers, New York.

Aunstrup, K., Outtrup, H., Andresen, O. and Dambmann, C. 1972. Proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. Fermentation technology today, proceedings of the 4th International Fermentation Symposium. Society Ferment. Technol., Osaka, Japan, p. 299.

Blotevogel, K.H., Fischer, U., Mocha, M., Jannsen, S. 1985. *Methanobacterium thermoalcaliphilum* spec. nor., a new moderately alkalophilic and thermophilic autotrophic methanogen. Arch. Microbiol. 142:211-217.

Bovetto, L.J., D.P., Backer, J.R., Villette, P.J., Sicard and S.J.L., Bouquelet. 1992. Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E192. Biotechnol. Appl. Biochem. 15:48-68.

Boyce, C.O.L. 1986. Novo's handbook of practical biotechnology. Bagsvaerd, Denmark.

Bridson, E.Y. and Brecker, A. 1969. Design and formation of microbial culture media. *In* Method in Microbiology (J.R. Norrris and S.W. Ribbons, ads.), vol. 3A, p. 229-295. Academic Press. London.

Clegg, K.M. 1978. Dietary enzymic hydrolysates of protein. Biochemical aspects of new protein food (J. Adler-Nissen, B.O. Eggum, L. Munck and H.S. Ohen, eds.), p.109-117.Pergamon Press, Oxford.

Clegg, K.M:, Smith G. and Walker A.L. 1974. Production of an enzymic hydrolysate of casein on a kilogram scale. J. Food. Technol. 9:425-431.

Difco Manual. 1974. Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures, 9th edt. Published by Difco Laboratory, Incorporated, Detroit, Michigan. p.270.

Etok, C.A. and Eka, O.U. 1996. Characterization and chillproffing activity of two enzymes from *Streptomyces* species. J. Basic. Microbiol. 36:83-88.

Ferrarotti, S.A., Rosso, AM., Marechal,M.A., Krymkiewicz-N. and Marechal LR. 1996. Isolation of 2 strains (S-R type) of *Bacillus circulans*. and purification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase. Cellular and Molecular Biology 42:653-657.

Fogarty, W.M. 1983. Microbial amylases. *In* Microbial enzymes and biotechnology (W.M. Fogarty., ed.), p.1-71. Applied Science Publishers, London.

Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. 1979. Starch degrading enzymes of microbial origin. Prog. Indust. Microbiol. 15:96.

Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. 1983. Pectic enzymes. *In* Microbial enzymes and biotechnology (Fogarty, W.M., ed.), p.147-151. Applied Science Publishers, London.

Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. 1990. Recent advances in microbial amylases. *In* microbial enzymes and biotechnology (Fogarty W.M. and Kelly C.T., eds), 2nd. ed, p.111-118. Elsevier Applied Science, England.

Fujiwara, S., Kakihara, H., Sakaguchi, K. and Imanaka, T. 1992. Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. J. of Bact. 174:7478-7481.

Fukumori, F., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1985. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *bacillus* sp. No.1139. J. Gen. Microbiol. 131:3339-3345.

Fukumori, F., Kudo, T., Narahashi, Y. and Horikoshi, K. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alkaline cellulase gene from the alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1139. J. Gen. Microbiol. 132:2329-2335.

Hamamoto, T. and Horikoshi, K. 1987. Alkalophilic *Bacillus* xylanase A, a secretable protein through outer membrane of *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem. 51:3133-3135.

Hayashi, T., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1988(a). Production and purification of new maltohexaose-forming amylases from alkalophilic *Bacillus* sp. H-167. Agric. Biol. Chem. 52:443-448.

Hayashi, T., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1988(b). Properties of new alkaline maltohexose-forming amylases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:281-285.

Hebeda, R.E. 1993. Starch, sugar and syrups. Enzymes in food processing (Tilak Nagodawithana and Gerald Reed eds.), 3rd ed. p.321-344. Academic Press, Inc. Harcourt Brace and Company USA.

Hedges, A.R. 1992. Cyclodextrin: producction, properties and applications. *In* Starch hydrolysis product: Worldwide technology production and application (Shenck F.W. and Hebeda R.E., eds), p 319-332, VCH Verlagsgesellschaft Publishers, USA.

Honda, H., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1985(a). Selective excretion of alkaline xylanases by *Escherichia coli* carrying pCX311. Agric. Biol. Chem. 49:3011-3015.

Honda, H., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1985(b). Molecular cloning and expression of the xylanase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain C-125 in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 161:784-785.

Honda, H., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1986(a). Production of extracellular alkaline xylanase of alkalophilic *Bacillus* sp. C-125 by *Escherichia coli* carrying pCX311. Syst.Appl. Microbiol. 8:152-157.

Honda, H., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1986(b). Extracellular production of alkaline xylanase of alkalophilic *Bacillus* sp. by *Escherichia coli* carrying pCX311. J. Ferment. Technol. 64:373-377.

Horikoshi, K. 1971(a). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. alkaline protease produced by Bacillus No. 221. Agric. Biol. Chem. 35:1407-1414.

Horikoshi, K. 1971(b). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part II. alkaline amylase produced by *Bacillus* No.A-40-2. Agric. Biol. Chem. 35:1783-1791.

Horikoshi, K. 1990. Enzymes of alkalophiles. *In* Microbial enzymes and biotechnology (Fogarty, W.M. and Kelly C.T., eds.), 2nd. ed, p.276-291, Elsevier Applied Science, England.

Horikoshi, K. and Akiba, T. 1982. Alkalophilic microorganism. New York: Springer-Verlag. p.213.

Horikoshi, K. and Atsukawa Y. 1973. Xylanase produced by alkalophilic *Bacillus* No. C-59-2. Agric. Biol. Chem. 37:2097-2103.

Horikoshi, K., Nakao, M., Kurono, Y. and Sashihara, N. 1984. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. Can. J. Microbiol. 30:774-779.

Howling, D. 1992. Glucose syrups: production, properties and application. *In* Starch hydrolysis products: Worldwide technology production and applications (F.W. Schenck and R.E. Hebeda, eds.), p.277-316. VCH Publishers, New York.

Ikura, Y. and Horikoshi, K. 1987(a). Stimulatory effect of certain amino acids on xylanase production by alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 51:3143-3145.

Ikura, Y. and Horikoshi, K. 1987(b). Effect of amino compounds on alkaline amylase production by alkalophilic *Bacillus* sp. J. Ferment. Technol. 65:707-709.

Ismail, A.M.S., Sobieh, U.I. and Abdelfattah, A.F. 1996. Biosynthesis of cyclodextrin glucanotransferase and β-cyclodextrin by *Bacillus macerans* 314 and properties of the crude enzyme. 1996. Chem. Eng. J. and the Biochem. Eng. J. 61:247-253.

Ito, S., Inoue, S., Kawai, S., Takei, A., Shikada, S., Ozaki, K., Okamoto, K., Satoh, T. and Ohta, Y. 1989. Alkaline-cellulase for laundry detergents-production by Bacillus sp. Ksm-635 and enzymatic-properties. Agric. Biol. Chem. 53:1275-1281.

Jens, Adler-Nissen. 1993. Protease. Enzymes in Food processing. (Tilak Nagodawithana and Gerald Reed eds.) 3rd ed. Academic Press, Inc. Harcourt Brace and Company USA. p.159-197.

Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. 1987. Spectrophotometric determination of cyclization activity of β-cyclodextrin-forming cyclomaltodextrin glucanotransferase. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 34:45-48.

Kaneko, T., Song, K., Hamamoto, T., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1989. Construction of a chimeric series of *Bacillus* cyclomaltodextrin glucanotransferases and analysis of the thermal stabilities and pH optima of the enzymes. J. Gen. Microbiol. 135:3447-3457.

Kato, T. and Horikoshi, K. 1984. Colorimetric determination of γ-cyclodextrin. Anal. Chem. 56: 1738-1740.

Kato, C., Kudo, T., Watanabe, K. and Horikoshi, K. 1985. Nucleotide sequence of the β-lactamase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain 170. J. Gen. Microbiol. 131:3317-3324.

Kelly, C.T., O'Reilly, F. and Fogarty, W.M. 1983. Extracellular α-glucosidase of an alkalophilic microorganism, *Bacillus* sp. ATCC21591. FEMS. Microbiology Letters. 20:55-59.

Kimura, K., Kataoka, S., Ishii, Y., Takano, T. and Yamane, K. 1987. Nucleotide sequence of the β-cyclodextrin glucanotransferase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1011 and similarity of its amino acid sequence to those of α- amylases. J. Bact. 169:4399-4402.

Kimura, K., Kataoka, S., Nakamura, A., Takano, T., Kobayashi, S. and Yamane, K. 1989. Functions of the COOH-terminal region of cyclodextrin glucanotransferase of alkalophilic *Bacillus* sp. #1011: relation to catalyzing activity and pH stability. Biochem. and Biophy. Research Comm. 161:1273-1279.

Kimura, T. and Horikoshi, K. 1988. Isolation of bactria which can grow at both high pH and low temperature. Appl. Environ. Microbiol. 54:1066-1067.

Kimura, T. and Horikoshi, K. 1990. Characterization of pullulan-hydrolysing enzyme from an alkalopsychrotrophic *Micrococcus* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:52-56.

Kitada, M., Wijayanti, L. and Horikoshi, K. 1987. Biochemical properties of a thermophilic alkalophile. Agric. Biol. Chem. 51:2429-2435.

Kitahata, S. and Okada, S. 1982. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from Bacillus stearothermophilus TC-90. J. Jpn. Soc. Starch Sci. 29:7-12.

Kitahata, S., Tasuyama, N. and Okada, S. 1974. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from strain of *Bacillus* species. Agric. Biol. Chem. 38:387-393.

Klein, C., Hollender, J., Bender, H. and Schulz, G.E. 1992. Catalilytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from x-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. Biochemistry. 31:8740-8746.

Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takii, H. and Okada, S. 1994. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. Biosci. Biotech. Biochem. 58:517-520.

Krulwich, T.A. and Guffanti, A.A. 1983. Physiology of acidophilic and alkalophilic bacteria. Adv. Microb. Phisiol. 24:173-214.

Krulwich, T.A. and Guffanti, A.A. 1989. Alkalophilic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 43:435-463.

Krulwich, T.A., Federbush, J.G. and Guffanti, A.A. 1984. Presence of a nonmetabolizable solute that is translocated with Na^+-dependent pH homeostasis in an alkallophilic *Bacillus*. J. Biol. Chem. 260:4055-4058.

Kulp, Karel. 1975. Carbohydrates (Gerald Reed, ed.) Enzymes in food processing. 2nd ed. Academic press, New York, San Francisco, London. A subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, publishers. p.54-113.

Kusano, S-C., Nagahata, N., Takahashi, S-I., Fugimoto, D. and Sakano, Y. 1988. Purification and properties of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. Agric. Biol. Chem. 52:2293-2298.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteria phage T. Nature. 227: 680-695.

Lawson, C.L., R. van Montfort, B. Strokopytov, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, G.E. de Vries, D. Penninga, L. dijkhuizen and B.W. Dijkstra. 1994. Nucleotide sequence and x-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacilllus circulans* strain 251 in a maltose - dependent crystal form. J. Mol. Biol. 236:590-600.

Lederberg, J., Lederberg, E.M., Zinder, N.D. and Lively, E.R. 1951. Recombination analysis of bacteria heredity. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16:413.

Lee, J-H, Choi, K-H, Choi, J-Y, Lee, Y-S, Kwon, I-B and Yu, J-H. 1992. Enzymatic production of α-cyclodextrin with cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. Enz. Microb. Technol. 14:1017-1020.

Lee, K.C.P. and Tao, B.Y. 1995. A kinetic study of cyclodextrin glycosyltransferase : substrate and product inhibitions. Biotechnol. Appl. Biochem. 21:111-121.

Lee, Y-D. and Kim, H-S. 1991. Enzymatic production of cyclodextrins from unliquefied corn starch in an attrition bioreacter. Biotech. Bioeng. 37: 795-801.

Lejeune, A., Sakaguchi, K. and Imanaka, T. 1989. A spectrophotometric assey for cyclization activity of cyclomaltohexaose α-cyclodextrin glucanotransferase. Anal. Biochem. 181:6-11.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Manachini, P.L., Fortina, M.G. and Parini, C. 1988. Thermostable alkaline protease produced by *B. thermoruber*-a new species of *Bacillus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:409-413.

Marechal, L.R., Rosso, A.M., Marechal, M.A., Krymkiewicz, N. and ferrarotti, S.A. 1996. Some properties of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* DF9 R-type.Cellular and Molecular Biology. 42:659-664.

Marg, G.A. and Clark, D.S. 1990. Activation of glucose-isomerase by divalent-cations-evidence for two distinct metal-binding site 12:147-162.

Mccleary, B.V., Gibson, T.S., Casey, A., Oflaherty, J., Sheehan, H. and Horgan, L. 1989. Purification, properties and industrial significance of transglucosidase from *Aspergillus niger*. Carbohydrate Reasearch. 185:147-162.

Mclaggan, D., Selwyn, M.J. and Dawson, A.P. 1984. Dependence on Na^+ of control of cytoplasmic pH in a facultative alkalophile FEBS Lett. 165: 254-258.

Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.W. and Ausubel, F.M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by transposon Tn5 mutagenesis. J. Bacteriol. 149:114-122.

Meagher, M.M., Nikolov, Z.L. and Reilly, P.J. 1989. Subsite mapping of *Aspergillus niger* glucoamylase-I and glucoamylase-II with maltooligosaccharide and isomaltooligosaccharide. Biotech. Bioeng. 34:681-688.

Meyrath, J. and Volavsek, G. 1975. Production of microbial enzymes. (Gerald Reed, ed.) Enzymes in food processing. 2nd ed. Academic press, New York, San Francisco, London. A subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, publishers. p. 255-294.

Mori, S., Goto, M., Mase, T., Matsuura, A., Oya, T. and Kitahata, S. 1995. Reaction conditions for the production of γ-cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No.9605. Biosci. Biotech. Biochem. 59:1012-1015.

Mori, S., Hirose, S., Oya, T. and Kitahata, S. 1994. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No.9605. Biosci. Biotech. Biochem. 58:1968-1972.

Morita, T., Yoshida, N. and Karube, I. 1996. A novel synthesis method for cyclodextrins from maltose in water-organic solvent systems. Appl. Biochem. Biotech. 56:311-324.

Nakamura, A., Haga, K., Okawa, S., Kuwano, K., Kimura, K. and Yamane, K. 1992. Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and α-amylase. FEBS Lett. 296:37-40.

Nakamura, A., Haga, K. and Yamane, K. 1993. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. Biochem. 32:6624-6631.

Nakamura, A., Haga, K. and Yamane, K. 1994. Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of replacements on substrate binding and cyclization characteristicss. Biochem. 33:9929-9936.

Nakamura, N. and Horikoshi, K. 1976. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 40-753-757.

Niimura, Y., Yanagida, F., Uchimura, T., Ohara, N., Suzuki, K. and Kozaki, M. 1987. A new facultative anaerobic xylan-using alkalophile lacking cytochrome, quinone and catalase. 51:2271-2275.

Nikolov, Z.L., Reilly, P.J. and Meagher, M.M. 1989. Kinetics, equilibria and modeling of the formation of oligosaccharides from D-glucose with *Aspergillus niger* glucoamylase-I and glucoamylase-II. Biotech. Bioeng. 34:694-704.

Nomoto, M., Chem, C.C. and Sheu, D.C. 1986. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. Agric. Biol. Chem. 50:2701-2707.

O'Collnell, M.P. 1984. Genetic transfer in prokaryotes: transformation, transduction and conjugation. *In* Advance molecular genetic (Puhler, A. and Timmis, K.N., eds.), p.2-12. Springer-Verlag, Berlin.

Okazaki, W., Akiba, T., Horikoshi, K. and Akahoshi, R. 1985. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp. Agric. Biol. Chem. 49:2033-2039.

Osberger, T.F. 1986. Pure crystalline fructose. *In* "Alternative sweeteners" (L.O. Nabors and R.C.Gelardi, eds.), Marcel Dekker, New york. p.245-275.

Paloheimo, M., Haglun, D., Aho, S. and Korhola, M. 1992. Production of cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC21783 in *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:584-591.

Pedersen, S., Jensen, BF. and Jorgensen, ST. 1995. Enzymes from genitically-modified microorganisms. ACS Symposium Series. 605:196-208.

Pilnik, W. and Voragen,.A.G.J. 1993. Pectic enzymes in juice manufacture. enzymes in food processing (Nagodawithana and Reed eds.), 3rd ed., p.363-392. Academic Press, Inc. Harcourt Brace and Company USA.

Pongsawasdi, P. and Yagisawa, M. 1988. Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. Agric. Biol. Chem. 52:1099-1103.

Porter, R.D. 1988. Modes of gene transter in bacteria. *In* Genetic recombination (Kucherlapati, R. and Smith G.R., eds), p.1-30. American Sociaty for Microbiology. Washington D.C.

Ramunas, Bigelis. 1993. Carbohydrates. (Nagodawithana and Reed eds.), Enzymes in food processing. 3rd ed. Academic Press, Inc. Harcourt Brace and company USA. p.121-147.

Ray, R.R., Jana, S.C. and Nanda, G. 1996. Induction and carbon catabolite repression in the biosynthesis of β-amylase by *Bacillus megaterium* B-6. Biochem. Molec. Biol. Inter. 38:223-230.

Robyt, J.F. and Whelan, W.J. 1968a. Starch and its derivatives (J.A.Radley, ed.), 4th ed., p.477-497. Chapman and Hall, London.

Sashihara, N., Kudo, T. and Horikoski, K. 1984. Molecular cloning and expression of cellulase genes of alkalophilic *Bacillus* sp. strain N-4 in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 158:503-506.

Schuch, R. and Mukherjee, D. 1989. Lipase-catalyzed reactions of fatty acid with glycerol and acylglycerols. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:332-336.

Shahani, K.M. 1975. Lipases and esterase. (Gerald Reed, ed.) Enzymes in food processing. 2nd ed. Academic press, New York, San Francisco, London. A subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, publishers. p.182-214.

Sharp, R.J. and Munster, M.J. 1988. Biotechnological implications for microorganisms from extreme environments. See Ref. 28:215-295.

Sheppard, G. 1986. The production and uses of microbial enzymes in food processing. Prog. Ind. Microbiol. 23:237-283.

Shieh, W.J. and Hedges, A.R. 1996. Properties and applications of cyclodextrins. J. of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry. A33:673-683.

Shikata, S., Saeki, K., Okoshi, H., Yoshimatsu, T., Ozaki, K., Kawai, S. and Ito, S. 1990. Alkaline cellulases for laundry detergents : Production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes. Agric. Biol. Chem. 54:91-96.

Shiraishi, T., Kusano, S., Tsumuraya, Y. and Sakano, Y. 1989. Synthesis of maltosyl ($\alpha 1 \rightarrow 6$) cyclodextrins through the reverse reaction of thermostable *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. Agric. Biol. chem. 53:2181-2188.

Shirokizawa, O, Akiba, T. and Horikoshi, K. 1989. Cloning and expression of the maltohexaose-forming amylase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. H-167 in *E. coli*. Agric. Biol. Chem. 53;491-495.

Sin, K.A., Nakamura, A., Kobayashi, K., Masaki, H. and Uozumi, T. 1991. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:600-605.

Slominska, L. and Maczynski, M. 1985. Studies on the application of pullulanase in starch saccharification process. Die Starke. 37:386-390.

Sohn, C.B., Lee, S.M., Kim, M.H., Ko, K.H., Kim, K.S., Chang, J.E., Ahn, Y.K. and Kim, C.H. 1996. Purification and characterization of β-amylase from *Bacillus polymyxa* No.-26-1. J. Food Sci. 61:230-234.

Sunaga, T., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1979. Seperation and properties of penicillinase of an alkalophilic *Bacillus*. Agric. Biol. Chem. 43;477-480.

Supawong, K. 1972. The effect of growth of *Staphylococcus aureus* in milk bycertain bacteria and fatty acids. M.Sc. Thesis, University of Strathclyde, Glasgow. Scotland.

Takami, H., Horikoshi, K. and Akiba, T. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No-AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:120-124.

Takano, T., Fukuda, M., Monma, M., Kobayashi, S., Kainuma, K. and Yamane, K. 1986. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing and expression in *Bacillus subtilis.* cells of the *Bacillus macerans.* cyclodextrin glucanotransferase gene. J. Bacteriol. 166:1118-1122.

Takasaki, Y. and Yamanobe, T. 1981. Production of maltose by pullulanases and β- amylase. Enzyme in food processing (G.G. Birch, N. Blakebrough and K.J. Parker, eds.), p.73-88. Applied Science, London.

Teague, W.M. and Blumm, P.J. 1992. Comercial enzymes for starch hydrolysis products. *In* Starch hydrolysis products: Worldwide technology, production and applications (F.W. Schenck and R.E. Hebeda, eds.), p. 45-71. VCH Publishers, New York.

Timmis, K.N. 1984. Gene cloning. *In* Advance molecular genetics (Puhler, A. and Timmis, K.N., eds.),p.152-169. Springer-Verlag Berling Heidelberg, Germany.

Walker, G.J. and Whelan, W.J. 1960. Stages in the salivary α-amylosis of amylose, amylopectin and glycogen. Biochem. 76:257-263.

Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y. and Yamada, K. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. Agric. Biol. Chem. 41:1353-1358.

White, J.S. 1993. Fructose syrup: production, properties and application. *In* Starch hydrolysis products: Worldwide technology, production and applications (F.W. Schenck and R,E. Hebeda, eds.), p. 45-71. VCH Publishers, New York.

Wind, R.D., Liebl, W., Buitelaar, R.M., Penninga, D., Spreinat, A., Dijkhuizen, L. and Bahl, H. 1995. Cyclodextrin formation by the thermostable α-amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. Appl. and Envi. Micro. 61:1257-1265.

Yamagata, Y. and Ichishima, E. 1989. A new alkaline proteinase with pI 2.8 from alkalophilic *Bacillus* sp. Curr. Microbiol. 19:259-264.

Yamamoto, A. 1975. Proteolytic enzymes. *In* Enzymes in food processing (Gerald, Reed, ed.), 2nd ed., p.123-179. Academic Press, New York.

Yamamoto, M., Tanaka, Y. and Horikoshi, K. 1972. Alkaline amylases of alkalophilic bacteria. Agric. Biol. Chem. 36:1819-1823.

Zobel, H.F. 1992. Starch: sources, production and properties. *In* Starch hydrolysis products: Worldwide technology production and application (F.W. Schenck and R.E. Hebeda, eds.), p.23-24. VCH Publishers, USA.

ภาคผนวก

การศึกษาจลนศาสตร์การเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมแป้งข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

ก. การคำนวณอัตราเติบโตจำเพาะ (μ)

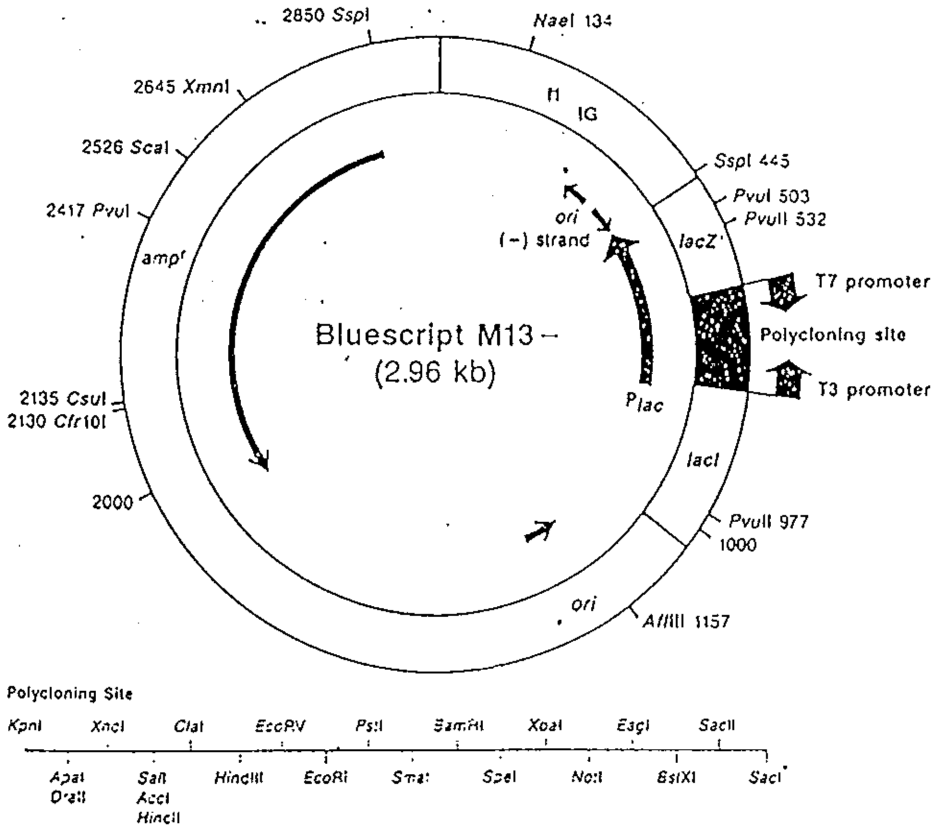
จากสูตร	log Nt	=	$\mu t / 2.3 + \log No$
โดย	Nt	=	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด
	No	=	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น
	μ	=	อัตราเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	t	=	เวลา (ชั่วโมง)
แทนค่าจากสูตร	μ	=	$(\log 4.0 \times 10^{6} - \log 2.0 \times 10^{6}) \times 2.3/1.6$
		=	0.43 ต่อชั่วโมง

ข. การคำนวณเวลาเติบโตเป็นสองเท่า (doubling time)

จากสูตร	td	=	$0.693/\mu$
โดย	td	=	เวลาเติบโตเป็นสองเท่า (ชั่วโมง)
แทนค่าจากสูตร	td	=	0.693/0.43
		=	1.6 ชั่วโมง

แสดงรูปของเวคเตอร์ pBluescript ที่ใช้ในการโคลนยีนซีจีทีเอส ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS304 ใน *E. coli* DH5α

Plasmid Bluescript (Stratagene, USA)



In Bluescript SK (M13 −), the *SacI* site lies immediately downstream from the bacteriophage T3 promoter and the *KpnI* site lies immediately downstream from the bacteriophage T7 promoter. In Bluescript KS (M13 −), the polycloning site is in the opposite orientation.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนิศารัตน์ ดำเนียร
วัน เดือน ปี เกิด	12 ธันวาคม 2510

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ. (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2533