บทที่ 3

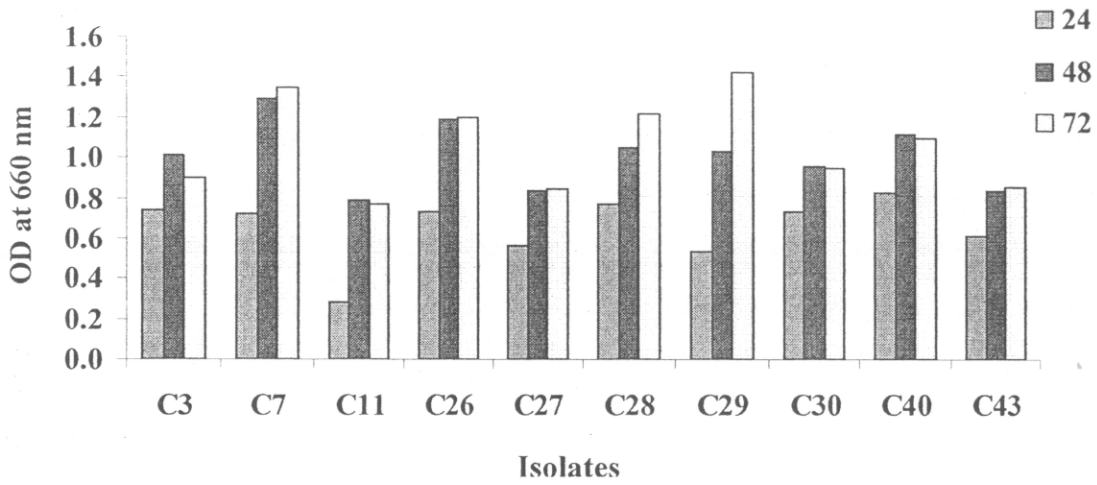
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase

1.1 การคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase จากแหล่งต่างๆ

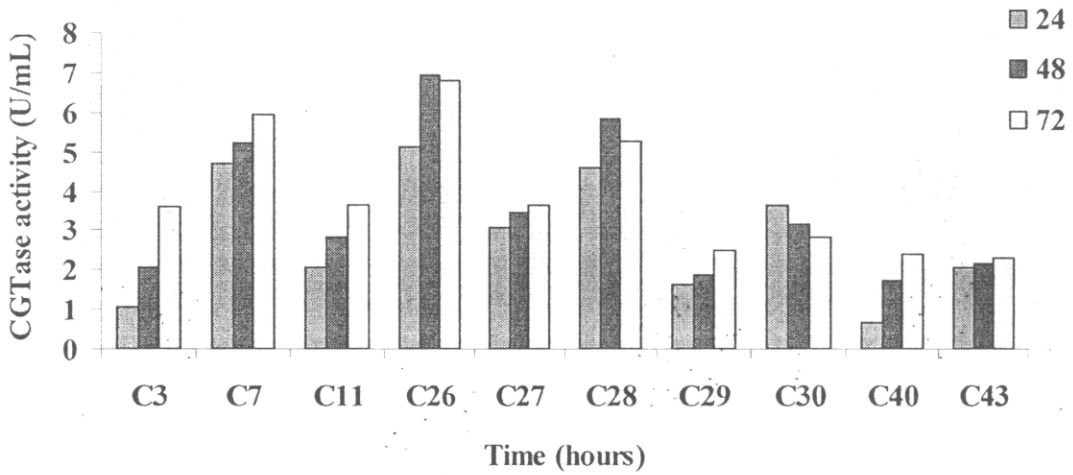
จากการทดลองแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase จากตัวอย่างดินบริเวณสนามหญ้าและแปลงเกษตรภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เศษอาหารสัตว์จากรำข้าว จากโรงเลี้ยงไก่และสุกร และเศษแป้งจากโรงงานที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบเพื่อทำการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II สำหรับวัดปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินเชิงคุณภาพ ซึ่งประกอบด้วย soluble starch ร้อยละ 1, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5, เปปโตนร้อยละ 0.5, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.02, ฟีนอฟทาลีน (phenolphthalein) ร้อยละ 0.02, Na_2CO_3 ร้อยละ 1.0 และผงวุ้นร้อยละ 1.5 โดยเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase จะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี เนื่องจากเอนไซม์ CGTase จะสร้างเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินจากการย่อยแป้ง และเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินจะดูดซับฟีนอฟทาลีนซึ่งมีขนาดพอดีกับโพรงของเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน ทำให้ฟีนอฟทาลีนเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสี ผลการทดลองพบว่าเชื้อที่คัดแยกจากโรงเลี้ยงไก่, โรงเลี้ยงสุกรและตัวอย่างดินในแปลงเกษตรที่สามารถสร้างวงใสรอบๆ โคโลนีมี 8, 12 และ 56 ไอโซเลต ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้ขั้นต้นนี้ไปศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร Horikoshi II เพื่อวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์ CGTase เชิงปริมาณต่อไป

ผลการทดลองการผลิตเอนไซม์ CGTase ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้จำนวน 33 ไอโซเลต จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดเพียง 10 ไอโซเลต มาศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมง จนครบเวลา 72 ชั่วโมง ดังภาพที่ 7 และ 8 ซึ่งแสดงค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร และกิจกรรมเอนไซม์ CGTase ของเชื้อที่คัดแยกได้ 10 ไอโซเลต ตามลำดับ พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II ซึ่งดูได้จากค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 660 นาโนเมตร แต่เชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ มี 3 ไอโซเลต คือ เชื้อ C7, C26 และ C28 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่



ภาพที่ 7 การเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้ 10 ไอโซเลต ในอาหารเหลว Horikoshi II 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Figure 7 Growth of 10 isolates in 50 mL Horikoshi II medium at 37°C for 24, 48 and 72 hours

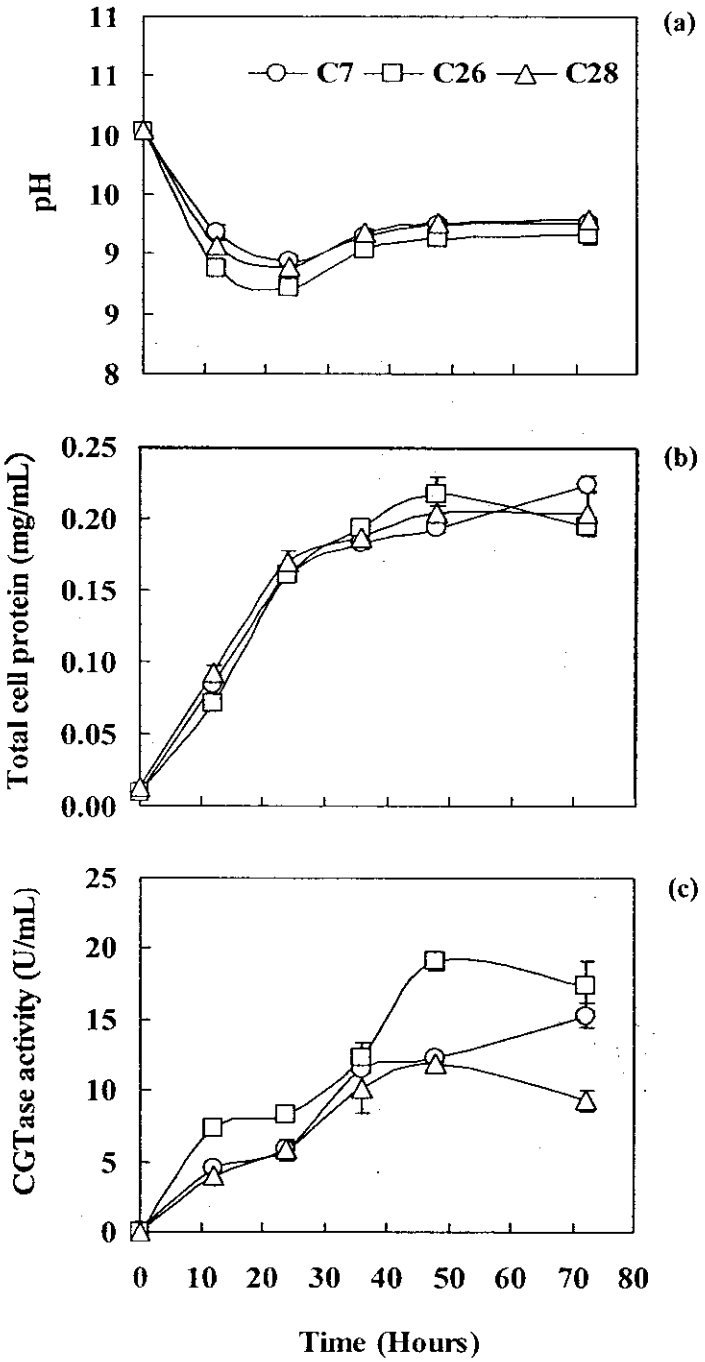


ภาพที่ 8 การผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อที่คัดแยกได้ 10 ไอโซเลต ในอาหารเหลว Horikoshi II 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Figure 8 Production of CGTase from 50 isolates in 10 mL Horikoshi II medium at 37°C for 24, 48 and 72 hours

1.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูง

นำเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูง 3 ไอโซเลต คือ C7, C26 และ C28 มาศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II 50 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้น 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งดูได้จากปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นและการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตจะเริ่มคงที่หลัง 24 ชั่วโมง ส่วนค่าพีเอชลดลงในช่วง 12 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นเริ่มคงที่ (ดังภาพที่ 9 (a)) การลดลงของพีเอชอยู่ในช่วงที่เชื้อกำลังเจริญอย่างรวดเร็ว และเมื่อการเจริญของเชื้อเริ่มคงที่ (หลัง 24 ชั่วโมง) ค่าพีเอชก็เริ่มคงที่เช่นกัน การผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตมีการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 9 (b)) แต่เชื้อไอโซเลต C 26 มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงกว่าเชื้อ C7 และ C28 จึงคัดเลือกเชื้อ C26 มาทำการศึกษาหาสภาวะในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ให้ได้ปริมาณมากที่สุด นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 9 (a) และ (b) พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ CGTase ไปพร้อมกับการเจริญ (Growth associate)



ภาพที่ 9 การเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ C7, C26 และ C28 ที่คัดแยกได้ ในอาหารเหลว Horikoshi II 50 มิลลิลิตร

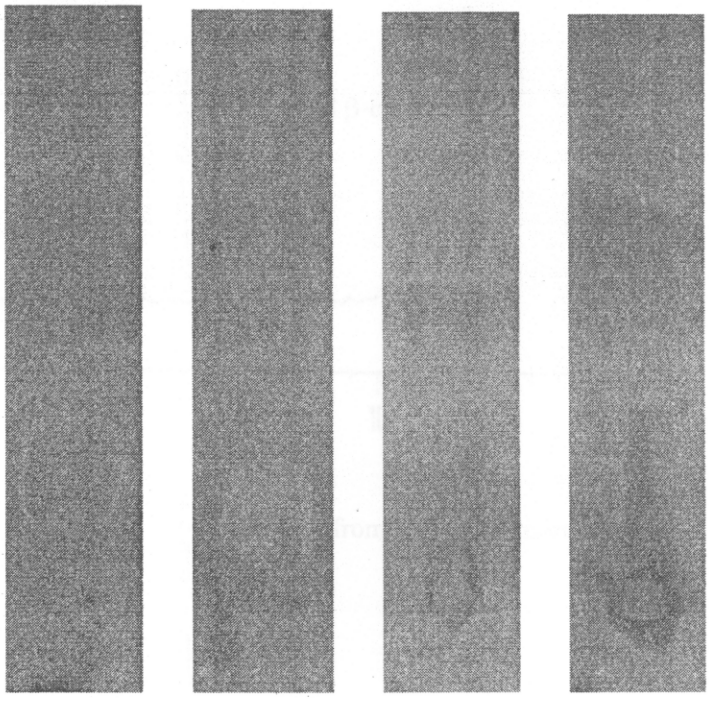
(a) พีเอช (b) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg/mL) (c) กิจกรรม CGTase (U/mL)

Figure 9 Growth and CGTase production of isolates C7, C26 and C28 in Horikoshi II medium 50 mL

(a) pH (b) Total cell protein (mg/mL) (c) CGTase activity (U/mL)

1.3 การบ่งชี้ผลผลิตและชนิดของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตจากเชื้อ C26

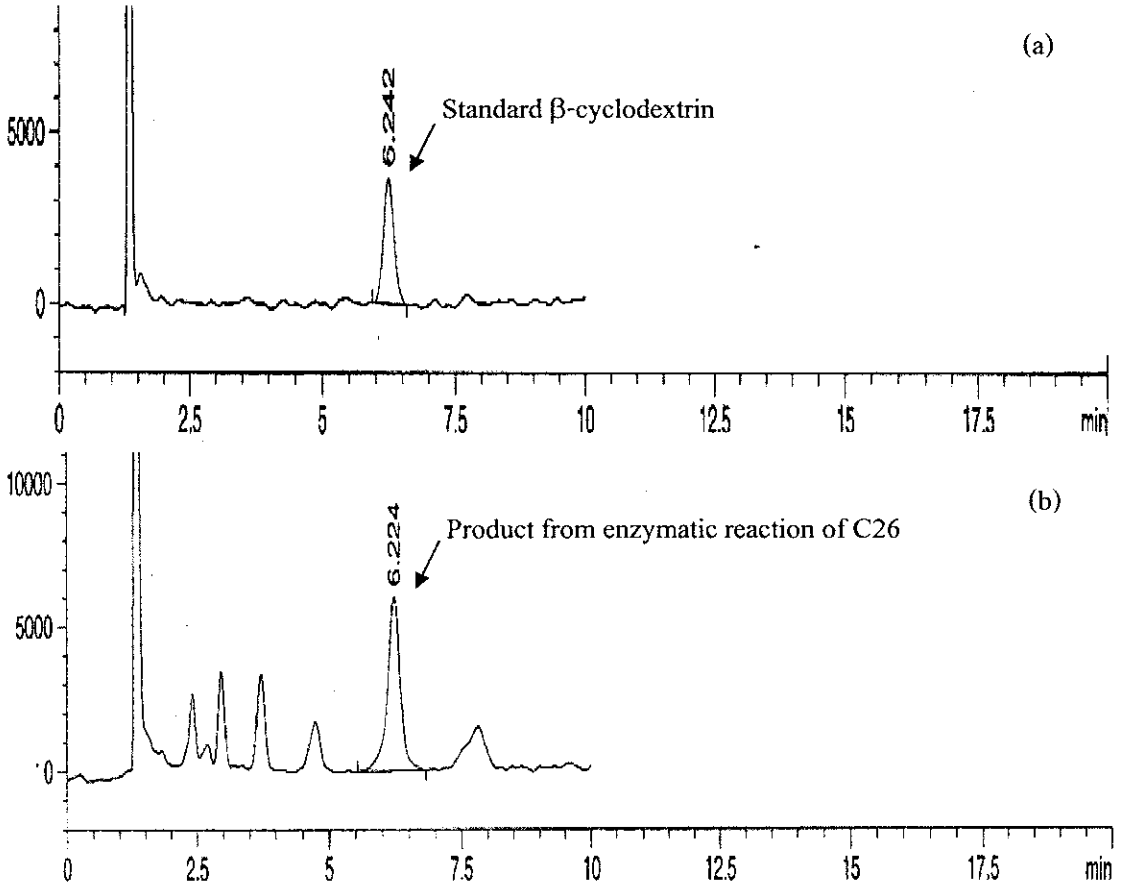
การบ่งชี้ผลผลิตของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตจากเชื้อ C26 โดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ (paper chromatography) พบว่าหลังย้อมสีสารละลายจะปรากฏจุดของสาร ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (a), มอลโทส (b), เบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (c) และสารละลายตัวอย่าง C26 (d) ผลการทดลองพบว่าระยะการเคลื่อนที่ของสารน้อยมาก และยังพบว่าสารเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษได้ เนื่องจากวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษไวต่อสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในสภาพเป็นตัวรีดิวซ์เท่านั้น (reducing carbohydrate compounds) ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เพื่อบ่งชี้ว่าในตัวอย่างเชื้อ C26 มีการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินเทียบกับสารมาตรฐานเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (ภาพที่ 11) พบว่า peak ของสารละลายตัวอย่างตรงกับสารละลายมาตรฐานเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน แสดงว่าเชื้อ C26 มีการผลิตเอนไซม์ CGTase เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลของแป้งเป็นสารไซโคลเด็กซ์ตริน



(a) (b) (c) (d)

ภาพที่ 10 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้ง (soluble starch) ด้วยเอนไซม์ CGTase จากเชื้อไอโซเลต C26 โดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ สารละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) : ไพริดีน (pyridine) : น้ำ ผสมกันในอัตราส่วนของปริมาตรเท่ากับ 6 : 4 : 3 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส, มอลโทส และเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินเป็นสารมาตรฐาน : (a) glucose, (b) maltose, (c) เบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน และ (d) สารละลายตัวอย่าง C26

Figure 10 Paper chromatography analysis of the products from the hydrolysis of soluble starch by CGTase, it was produced by isolate C26. The sovent system contained n-butanol : pyridine : H_2O (6 : 4 : 3). Standards were (a) glucose, (b) maltose, (c) β-CD and (d) sample C26



ภาพที่ 11 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินและผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเอนไซม์ของ C26 ที่ผ่านการอัลตร้าฟิวเตชันและการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

(a) สารมาตรฐานเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (b) ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเอนไซม์ของ C26

Figure 11 HPLC chromatogram of standard β-cyclodextrin and product from enzymatic reaction of C26 after ultrafiltration and glucoamylase treatment

(a) Standard β-cyclodextrin (b) Product from enzymatic reaction of C26

1.4 การจัดจำแนกสกุลเชื้อ C26

เมื่อนำเชื้อ C26 มาจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่าเมื่อทำการย้อมแกรมเชื้อ C26 มีรูปร่างแบบแท่ง, ติดสีแกรมบวกและเมื่อทำการย้อมสีเอนโดสปอร์ (endospore) เชื้อมีการสร้างเอนโดสปอร์ เมื่อนำเชื้อมาทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์แคทาเลส และเพื่อความถูกต้องและแม่นยำในการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย จึงทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA โดยส่ง

วิเคราะห์ผลที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต C26 คือ เชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต C26 คือ เชื้อ *Bacillus* sp.

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ที่คัดเลือกได้

2.1 แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา คือ soluble starch, แป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวโพด, แป้งสาคู และแป้งข้าวเจ้า แป้งที่เลือกใช้ในการทดลองเป็นแป้งที่มีการผลิตกันมากในประเทศไทย ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II ร้อยละ 1 ใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 และเปปโตนร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตารางที่ 10 แสดงการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 เมื่อใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดการเจริญจะวัดเป็นปริมาณโปรตีน เนื่องจากในอาหารที่ใช้แป้งอื่นๆ ที่นอกเหนือจากแป้ง soluble starch จะมีความขุ่นอยู่ ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. C26 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้า, soluble starch, แป้งสาคู , แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แต่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้า, แป้งสาคู และ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลผลิตต่อน้ำหนักโปรตีน พบว่าการใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตสูงกว่าแป้งข้าวเจ้าและแป้งชนิดอื่นๆ แป้งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ CGTase แตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของแป้ง (Ibrahim *et al.*, 2005) จากการศึกษาของ Jin-Bong และคณะ (1990) พบว่าเชื้อ *Bacillus strearothermophilus* สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีเมื่อใช้ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน ขณะที่เชื้อ *Bacillus* sp. G1 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน (Ibrahim *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับเชื้อ *Bacillus circulans* DF 9R (Rosso *et al.*, 2002)

จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำการผลิตเอนไซม์ CGTase เนื่องจากเชื้อสามารถให้กิจกรรมเอนไซม์สูง รวมทั้งแป้งสาคูเป็นวัตถุดิบที่มีการผลิตมากในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งการใช้แป้งสาคูในการผลิตเอนไซม์ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่แป้งสาคูอีกด้วย

ตารางที่10 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

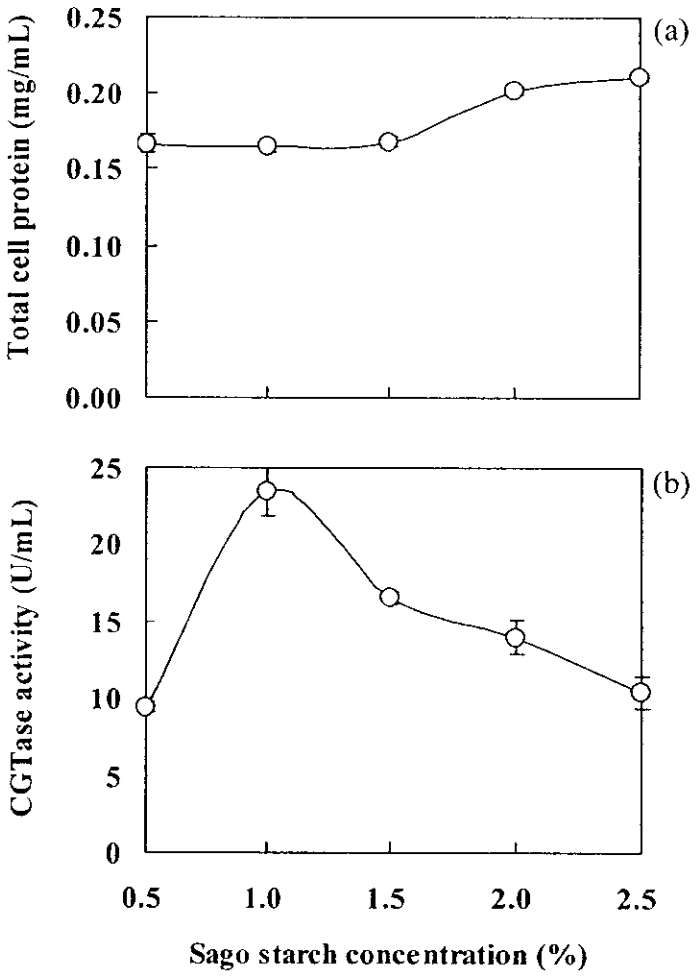
Table 10 Effect of carbon sources on CGTase production from *Bacillus* sp. C26 at 37°C for 48 h

Carbon source (1 %)	Total cell protein (mg/mL)	CGTase activity (U/mL)	CGTase yield (U/mg-protein)
Soluble starch	$0.211 \pm 0.003^{a*}$	19.052 ± 0.620^{c}	90.162 ± 3.68^{c}
Tapioca starch	0.165 ± 0.003^{b}	3.031 ± 0.302^{d}	18.369 ± 0.79^{e}
Corn starch	0.154 ± 0.006^{c}	4.267 ± 0.634^{d}	27.778 ± 4.04^{d}
Sago starch	0.167 ± 0.003^{b}	22.370 ± 0.118^{b}	134.217 ± 4.28^{a}
Rice starch	0.217 ± 0.001^{a}	25.124 ± 0.328^{a}	115.686 ± 1.14^{b}

* Different letters in the same column indicate significant differences ($p<0.05$)

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งสาคูในการผลิตเอนไซม์ CGTase ภาพที่ 12 แสดงการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 โดยใช้แป้งสาคูที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II พีเอชเริ่มต้น 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งสาคูที่ร้อยละ 0.5 - 1.5 เชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีการเจริญที่ใกล้เคียงกัน แต่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุด 23.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนเข้มข้นร้อยละ 1 เมื่อแหล่งคาร์บอนมีความเข้มข้นสูงขึ้นจะไปส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มากกว่าการผลิตเอนไซม์ CGTase ดังภาพที่ 12 ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งสาคูที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาของ Mahat และคณะ (2004) ซึ่งได้ออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาสัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. TS1-1 พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. TS1-1 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดเมื่อใช้แป้งสาคูที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.48 เป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่เชื้อ *Bacillus stearothermophilus* HR1 ใช้แป้งสาคูที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.60 ในการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุด 14.80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Rahman *et al.*, 2004)



ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้นแป้งสาคูต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

(a) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg/mL) (b) กิจกรรมเอนไซม์ CGTase (U/mL)

Figure 12 Effect of sago starch concentrations on CGTase production from *Bacillus* sp. C26 at 37°C for 48 h

(a) Total cell protein (mg/mL) (b) CGTase activity (U/mL)

2.2 แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

แหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. C26 คือ ยีสต์สกัด, เปปโตน, ทริปโตน และยีสต์สกัดผสมเปปโตน (อัตราส่วน 1:1) โดยใช้แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 1 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II พีเอชเริ่มต้น 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตารางที่ 11 แสดงการเจริญและการผลิต

เอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อมีการเจริญและให้ผลผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ปริมาณต่ำ และเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีการผลิตเอนไซม์ CGTase สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อใช้ยีสต์สกัด, เปปโตน และยีสต์สกัดผสมเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งดูได้จากการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งผลการทดลองคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus* sp. G1 ที่สามารถใช้เปปโตนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดี (Ibrahim *et al.*, 2005) ในขณะที่เชื้อ *Bacillus circulans* DF9R สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Rosso *et al.*, 2002) ดังนั้นเมื่อยีสต์สกัดสามารถส่งเสริมการเจริญและการผลิตเอนไซม์ได้ดีใกล้เคียงกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ จึงเลือกยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อศึกษาต่อไป

ตารางที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

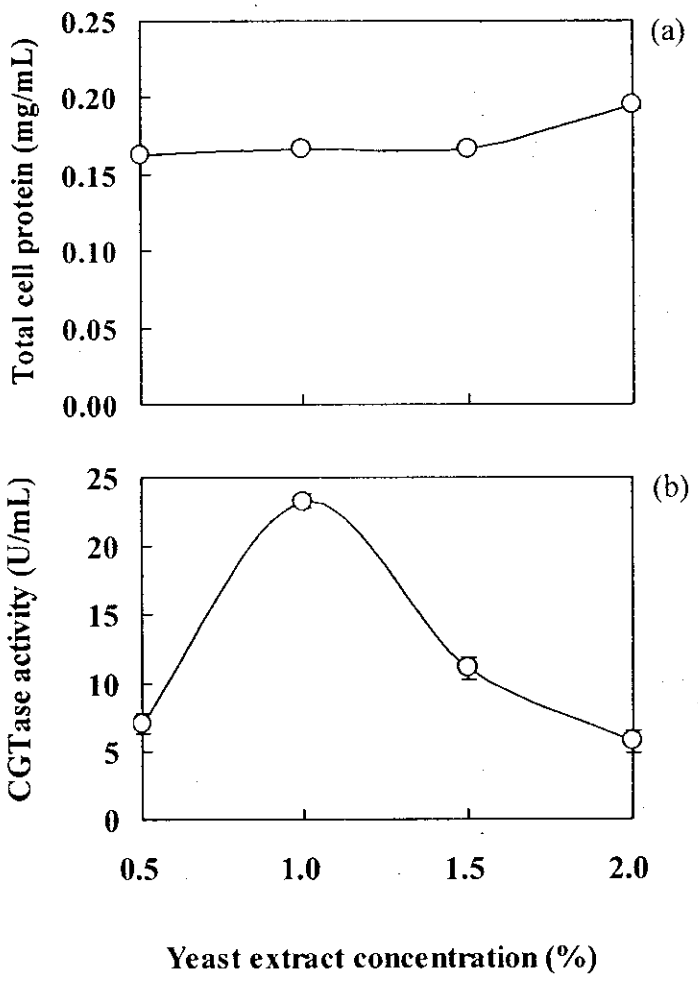
Table 11 Effect of nitrogen sources on CGTase production from *Bacillus* sp. C26 at 37°C for 48 h

Nitrogen source (1 %)	Total cell protein (mg/mL)	CGTase activity (U/mL)	CGTase yield (U/mg-protein)
Peptone	$0.172 \pm 0.000^{a*}$	23.496 ± 0.590^{a}	136.58 ± 3.68^{a}
Yeast extract	0.167 ± 0.003^{a}	23.309 ± 0.561^{a}	139.57 ± 0.26^{a}
Peptone+yeast	0.165 ± 0.001^{a}	22.390 ± 0.620^{a}	134.22 ± 4.74^{a}
Tryptone	0.125 ± 0.002^{b}	12.520 ± 0.590^{b}	99.82 ± 1.40^{b}

* Different letters in the same column indicate significant differences ($p<0.05$)

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดในการผลิตเอนไซม์ CGTase ภาพที่ 13 แสดงการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 - 1.5 เชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีการเจริญได้ดีไม่แตกต่างกันและที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 2.0 มีการเจริญได้ดีที่สุด แต่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ต่ำ เชื้อ *Bacillus* sp. C26 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และเมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงขึ้นจะไปส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มากกว่าการผลิตเอนไซม์ CGTase ดังภาพที่

13 ซึ่งต่างจากเชื้อ alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นยีสต์สกัดร้อยละ 1.89 (Mahat *et al.*, 2004) ส่วน Rohman และคณะ (2004) พบว่าเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* HR1 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดเมื่อใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 นอกจากนี้ Rosso และคณะ (2002) พบว่าการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus circulans* DF 9R ที่คัดแยกจากหัวมันฝรั่งเน่าสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดี เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.4



ภาพที่ 13 ผลของความเข้มข้นยีสต์สกัดต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

(a) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg/mL) (b) กิจกรรมเอนไซม์ CGTase (U/mL)

Figure 13 Effect of yeast extract concentrations on CGTase production from *Bacillus* sp. C26 at 37°C for 48 h

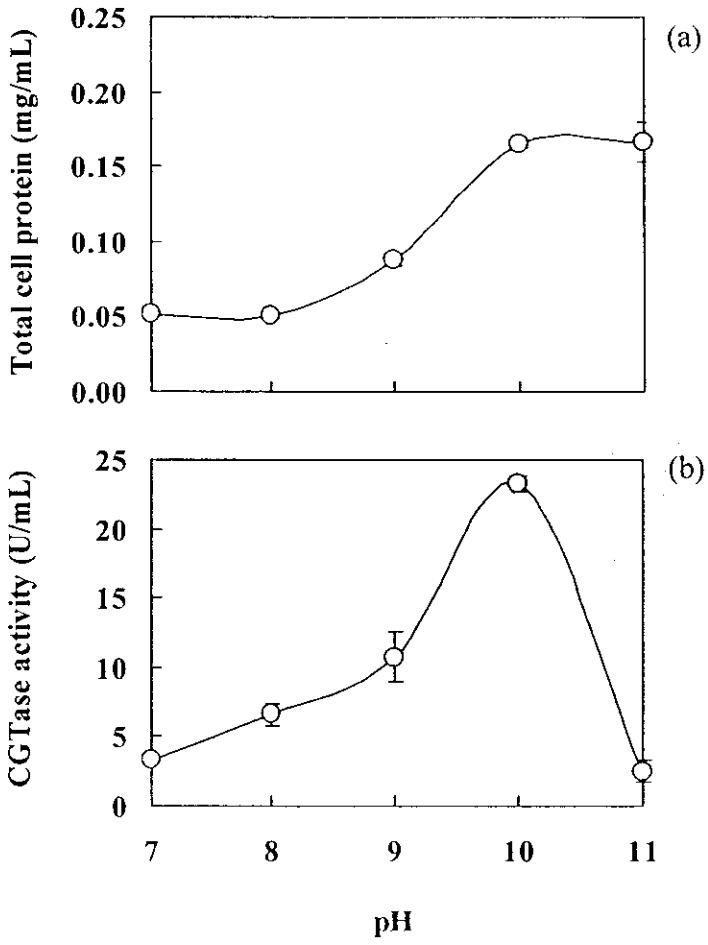
(a) Total cell protein (mg/mL) (b) CGTase activity (U/mL)

2.3 พีเอชเริ่มต้นของอาหาร

การศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารทำการทดลองโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 7, 8, 9, 10 และ 11 ภาพที่ 14 แสดงการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ ผลการทดลองพบว่าเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพิ่มขึ้น เชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase เพิ่มขึ้นด้วย โดยมีการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase สูงสุดที่พีเอช 10 จึงจัดได้ว่าเชื้อ *Bacillus* sp. C26 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง หรือที่เรียกว่า alkalophiles และเมื่อเพิ่มพีเอชเริ่มต้นเป็น 11 พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ลดลง เนื่องจากในการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมเกลือโซเดียมคาร์บอเนตในปริมาณมากเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นที่ต้องการ ทำให้มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคาร์บอเนตในอาหารสูง จึงไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ดังนั้นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase คือ พีเอช 10 ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับเชื้อ *Bacillus* sp. G1 (Ibrahim *et al.*, 2005) ขณะที่เชื้อ *Bacillus circulans* DF 9R สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.3 (Rosso *et al.*, 2002)

จินตนา เพชรมณีโชติ (2538) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. PS304 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth ที่ใช้แป้งข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 5.0-12.0 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. PS304 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ตั้งแต่พีเอช 5.0-9.5 แต่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.0

Rahman และคณะ (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* HR1 ที่คัดแยกจากน้ำพุร้อน โดยใช้แป้งสาคูและเปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ พบว่า *B. stearothermophilus* HR1 สามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-8.0 แต่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีที่พีเอช 7.6



ภาพที่ 14 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

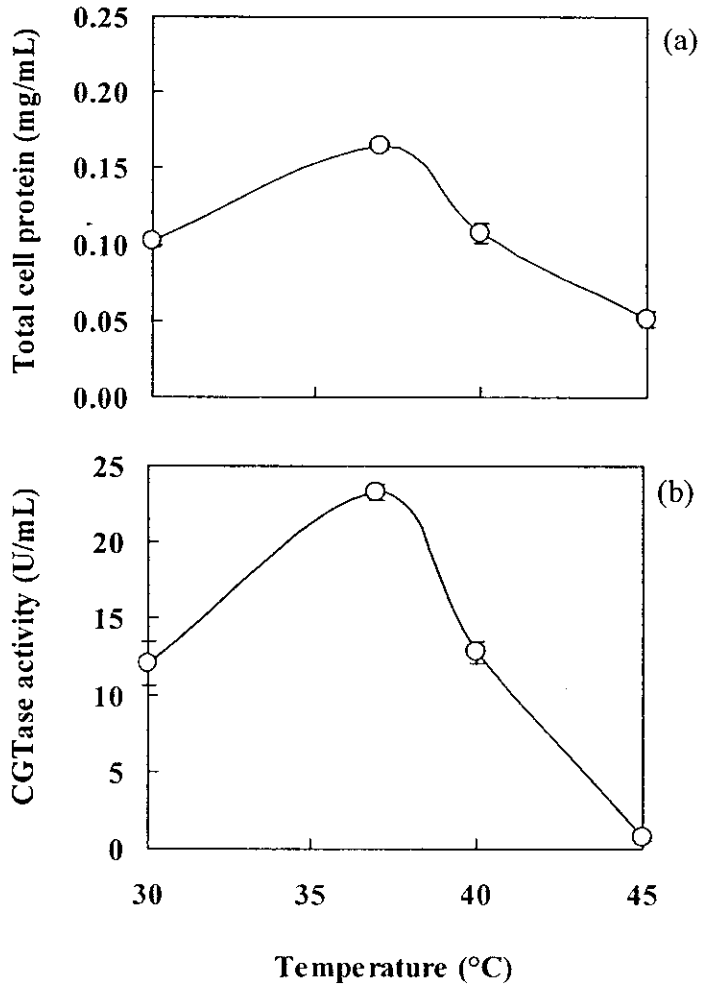
(a) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg/mL) (b) กิจกรรมเอนไซม์ CGTase (U/mL)

Figure 14 Effect of initial pH on CGTase production from *Bacillus* sp. C26 at 37°C for 48 h

(a) Total cell protein (mg/mL) (b) CGTase activity (U/mL)

2.4 อุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II พีเอชเริ่มต้น 10.0 อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา คือ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ภาพที่ 15 แสดงการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีการเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เมื่อลดหรือเพิ่มอุณหภูมิขึ้นส่งผลให้การเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ลดลง ดังภาพที่ 15 ดังนั้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและ



ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 บ่มระยะเวลา 48 ชั่วโมง

(a) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg/mL) (b) กิจกรรมเอนไซม์ CGTase (U/mL)

Figure 15 Effect of temperature on CGTase production from *Bacillus* sp. C26 for 48 h

(a) Total cell protein (mg/mL) (b) CGTase activity (U/mL)

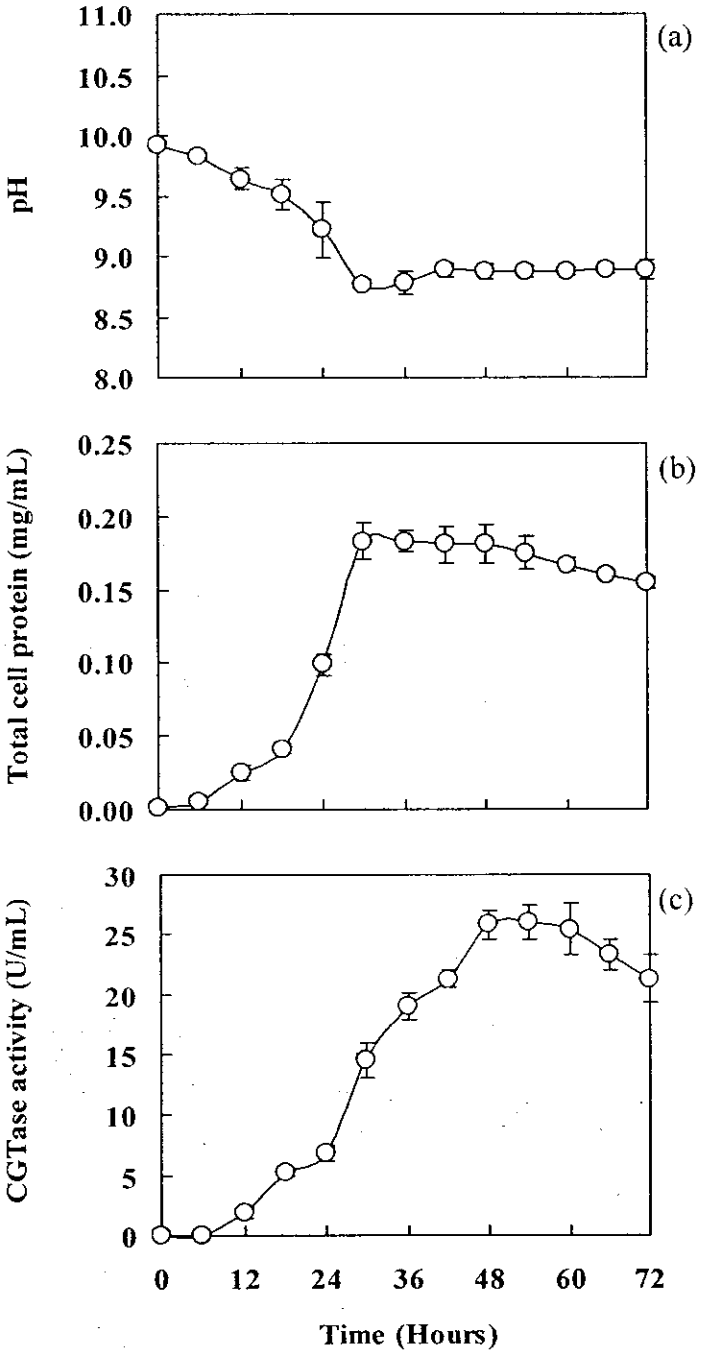
ผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Rosso และคณะ (2002) ที่ใช้เชื้อ *B. circulans* DF 9R ในการผลิตเอนไซม์ CGTase พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่มากนัก แต่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ต่ำกว่า เนื่องจากเอนไซม์มีความคงตัวลดลงที่อุณหภูมิสูงๆ แต่เชื้อ *Bacillus stearothermophilus* HR1 ที่คัดแยกจากน้ำพุร้อนสามารถผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการหาสภาวะที่

เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 14.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Rahman *et al.*, 2004)

จินตนา เพชรมณีโชติ (2538) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. PS304 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอชเริ่มต้น 8.0 ใช้แป้งข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. PS304 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ลดลง

2.5 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เมื่อทำการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ทุกๆ 6 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ แป้งสาคูร้อยละ 1, ยีสต์สกัดร้อยละ 1, พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. C26 สามารถเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 18–30 ชั่วโมง และการเจริญเริ่มคงที่หลัง 30 ชั่วโมง ซึ่งดูได้จากค่าพีเอชที่ลดลง เนื่องจากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อทำให้เกิดกรดขึ้นและปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 16 (a) และ (b) ตามลำดับ และเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีการผลิตเอนไซม์ CGTase พร้อมกับการเจริญ (growth associate) โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 0.193 ต่อชั่วโมง และ 5.94 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง คือ 25.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 16 (c) และการผลิตเอนไซม์ CGTase คงที่จนถึง 60 ชั่วโมง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ CGTase เริ่มลดลง เนื่องจากอุณหภูมิและพีเอชไม่เหมาะสมทำให้เอนไซม์ CGTase มีการเสียสภาพ จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่แล้ว แต่ยังคงผลิตเอนไซม์ CGTase เนื่องจากเอนไซม์จะถูกเก็บไว้ระหว่างผนังเซลล์ เมื่อเชื้อเริ่มตายทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยเอนไซม์ CGTase ออกมานอกเซลล์ (Stanburry and Whitaker, 1984 อ้างโดย Illias *et al.*, 2002) ซึ่งต่างจากเชื้อ *Bacillus* sp. G1 ที่คัดแยกจากดินในสวนยาง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II พีเอชเริ่มต้น 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. G1 ที่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ในระยะที่เชื้อมีการเจริญคงที่ (stationary phase; Non-growth associate) และมีการผลิตเอนไซม์สูงสุด 19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 28 ชั่วโมง และการผลิตเอนไซม์ CGTase ลดลงหลัง 28 ชั่วโมง (Illias *et al.*, 2002)



ภาพที่ 16 การเจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ : แป้งสาคูร้อยละ 1, ยีสต์สกัดร้อยละ 1, พีเอชอาหารเริ่มต้น 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ

(a) พีเอช (b) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg/mL) (c) กิจกรรม CGTase (U/mL)

Figure 16 Growth and CGTase production profile of *Bacillus* sp. C26 in basal medium : 1% sago starch, 1% yeast extract, initial pH 10.0 and 37°C

(a) pH (b) Total cell protein (mg/mL) (c) CGTase activity (U/mL)

3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase

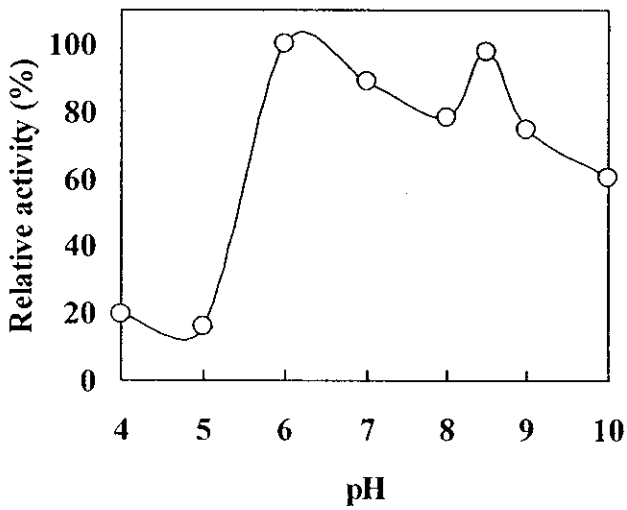
การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 โดยนำสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้มาทำให้เข้มข้นโดยการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและทดสอบสมบัติของเอนไซม์ CGTase

3.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CGTase

การศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ พบว่าเอนไซม์ CGTase สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชในช่วงพีเอช 6.0-9.0 และเอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่ 2 พีเอช คือ ที่พีเอช 6.0 และพีเอช 8.5 เนื่องจากเอนไซม์ CGTase มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในรูปของกรดและเกลือเป็นหมู่โปรโตโทรปิค (prototropic group) ที่อยู่บริเวณเร่ง (active site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน คือ Asp 135, His 140, Arg 227, Asp 229, Glu 257, His 327 และ Asp 329 (Uitdehaag *et al.*, 2002) ส่งผลให้เอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมสูงทั้งสภาพกรดและด่างที่พีเอช 6.0 และ 8.5 ตามลำดับ ถ้าพีเอชต่ำหรือสูงกว่าพีเอชที่เหมาะสมจะมีผลให้ side chain ของกรดอะมิโนถูกเปลี่ยนรูปจากกรดเป็นเกลือหรือจากเกลือเป็นกรด ทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเกิดขึ้นได้ไม่ดี โดยเอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมสูงที่พีเอช 6.0 เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase จะลดลง และเพิ่มขึ้นสูงอีกที่พีเอช 8.5 ดังภาพที่ 17 และมีกิจกรรมการทำงานสูงไม่แตกต่างจากพีเอช 6.0 พีเอชมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของไอออน (ionization) ของหมู่โปรโตโทรปิคที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ โดยมีกรดอะมิโนในรูปของกรดหรือด่างหรือทั้งกรดและด่าง ทำหน้าที่เป็นหมู่โปรโตโทรปิคในบริเวณเร่งที่สามารถปล่อยไอออนได้ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติ ซึ่งจะมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับของสับสเตรทหรือการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้พีเอชยังไปมีผลต่อการแตกไอออนของสับสเตรท โคแฟกเตอร์ซึ่งจะนำไปสู่การจับตัวกับเอนไซม์เปลี่ยนไปด้วย (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ซึ่งได้ผลการทดลองสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจากเชื้อ alkalophilic *Bacillus* sp. 277 ที่สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 2 พีเอช คือ พีเอช 5.0 และ 8.5 (Cao *et al.*, 2005) และกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. G1 ที่สามารถทำงานได้ดีที่ 2 พีเอช คือ ที่พีเอช 6.0 และพีเอช 9.0 (Illias *et al.*, 2002)

จินตนา เพชรมณีโชติ (2538) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. PS304 โดยนำตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียและอนุภาคของแป้งไปทดสอบหากิจกรรมของ

เอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.0-11.0 พบว่าเอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมการทำงานดีในช่วงพีเอช 4.5-6.5 และมีกิจกรรมการทำงานดีที่สุดที่พีเอช 6.5 ซึ่งต่างกับพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คือ พีเอชระหว่าง 7.5-8.5



ภาพที่ 17 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่ 60 องศาเซลเซียส (พีเอช 4- 5; 0.1 M อะซิเตทบัฟเฟอร์, พีเอช 6-8; 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8.5-10; 0.1 M ไกลซีน–โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์)

Figure 17 Effect of pH on CGTase activity at 60°C (pH 4-5; 0.1 M acetate buffer, pH 6-8; 0.1 M phosphate buffer and pH 8.5-10; 0.1 M Glycine – NaOH buffer)

Gawande และ Patkar (2001) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* AS-22 โดยใช้ soluble starch เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร กับเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ พีเอชอาหารเริ่มต้น 7.0 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* AS-22 มีกิจกรรมการทำงานได้ดีที่พีเอชระหว่าง 5.5-9.0 และมีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 7.0-7.5

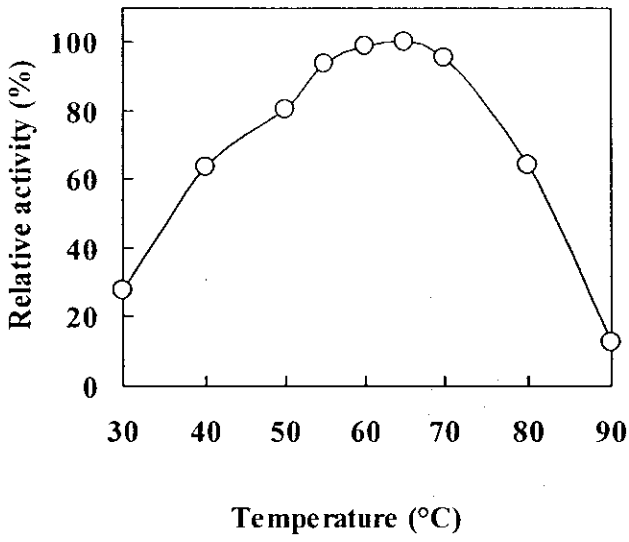
Jemli และคณะ (2007) ได้ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus pabuli* US132 ที่คัดแยกได้จากดิน โดยใช้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *P. pabuli* US132 มีกิจกรรมสูงในช่วงพีเอช 5.5-9.0 และพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase คือ ที่พีเอช 6.5 แต่ค่าไม่แตกต่างจากช่วงพีเอช 6.0-8.5

3.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CGTase

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 โดยหากิจกรรมเอนไซม์ CGTase ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส ในสารละลาย 0.1 โมล ไกลซีน – โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์พีเอช 8.5 พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ CGTase กับสับสเตรท (soluble starch) เอนไซม์ CGTase จะมีกิจกรรมการทำงานเพิ่มขึ้นและสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 18 ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ที่โมเลกุลของสารส่งผลให้เกิดการชนกันในปฏิกิริยาได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา สำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เช่นเดียวกัน เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเนื่องจากโครงสร้างระดับตติยภูมิ (tertiary structure) เรียงตัวอย่างมีระเบียบในทิศทางที่จะต้องจับสับสเตรทที่บริเวณจับและบริเวณเร่งปฏิกิริยา แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงกว่า 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase จะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ระดับตติยภูมิมีพันธะแรงอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์จำนวนมาก ด้วยเหตุนี้โมเลกุลของเอนไซม์มีโครงสร้างที่ละเอียดอ่อนมาก ถ้าโมเลกุลของสารปฏิกิริยามีพลังงานมากเกินไปโครงสร้างทุติยภูมิจะเสียหาย (disrupt) มีผลให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติและสูญเสียกิจกรรมไปเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cao และคณะ (2005) ที่พบว่าเชื้อ alkalophilic *Bacillus* sp. 277 มีกิจกรรมการทำงานสูงที่ช่วงอุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Paenibacillus* sp. F8 มีกิจกรรมการทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase จะลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน (Larsen *et al.*, 1998)

Gawande และ Patkar (2001) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* AS-22 พบว่าเอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมการเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท และเอนไซม์ CGTase สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 35-50 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมการทำงานเหมาะสมที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase จะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากเอนไซม์เสียสภาพ

Jemli และคณะ (2007) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus pabuli* US132 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าเอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์จากเชื้อ *P. pabuli* US132 มีกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเติม 10 มิลลิโมลแคลเซียมเอนไซม์สามารถมีกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิสูงขึ้น คือ 65 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่พีเอช 8.5

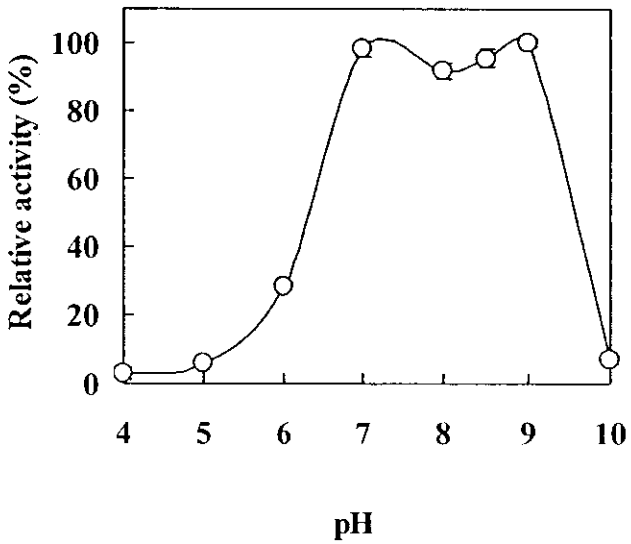
Figure 18 Effect of temperature on CGTase activity at pH 8.5

3.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่พีเอชต่าง ๆ

จากผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์พีเอช 4.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหลือ พบว่าเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 7.0-9.0 ดังภาพที่ 19 แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่ำกว่า 7.0 หรือสูงกว่า 9.0 ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูง ทำให้ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์หรือการจับกับสับสเตรทลดลงด้วย ซึ่งให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* AS-22 ที่มีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 ในช่วงพีเอช 6.0-9.0 (Gawande and Patkar, 2001) และเชื้อ *Paenibacillus* sp. F8 มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-8.0 (Larsen *et al.*, 1998)

Coa และคณะ (2005) ได้ศึกษาคุณสมบัติความคงตัวของเอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์จากเชื้อ alkalophilic *Bacillus* sp. ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ ในช่วงพีเอช 4.0-11.0 พบว่าเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชกว้าง คือ ที่ช่วงพีเอช 6-10 แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่ำกว่าพีเอช 6 หรือสูงกว่าพีเอช 10 เอนไซม์ CGTase มีความคงตัวลดลงอย่างรวดเร็ว

Jemli และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus pabuli* US132 ที่พีเอชต่างๆ พบว่าเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *P. pabuli* US132 มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 6-9 เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่ำกว่า 6 หรือสูงกว่าพีเอช 9 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากเอนไซม์เสียสภาพ

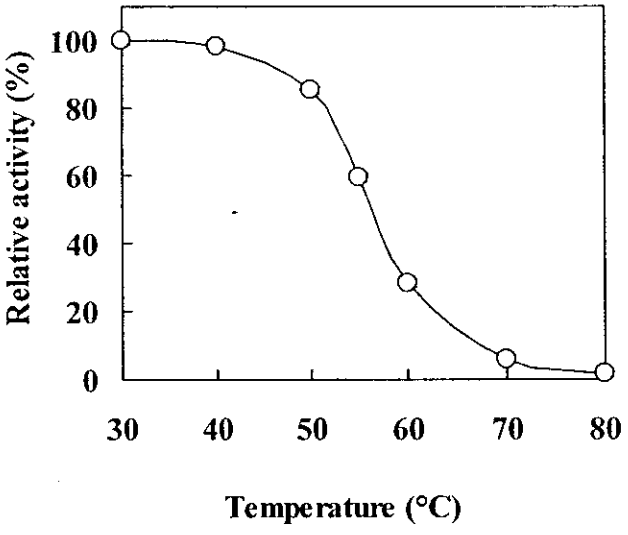


ภาพที่ 19 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ CGTase

Figure 19 Effect of pH on CGTase stability

3.4 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เมื่อนำเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 มาทำการทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ CGTase ยังคงมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 20 แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเอนไซม์มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน เมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์หรือการจับกับสับสเตรทลดลงด้วย และจากการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* AS-22 ที่สูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 20 นาที ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Gawande and Patkar, 2001)



ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่พีเอช 8.5

Figure 20 Effect of temperature on CGTase stability at pH 8.5

Jemli และคณะ (2007) ได้ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus pabuli* US132 โดยบ่มเอนไซม์ CGTase ในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิ 40-65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *P. pabuli* US132 สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 55 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 60 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 65 องศาเซลเซียส ทำให้เอนไซม์ CGTase สูญเสียกิจกรรมหมด

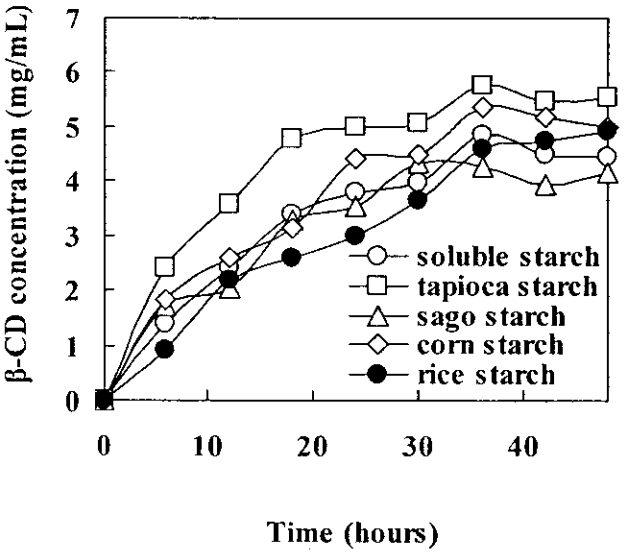
จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงที่พีเอช 6.0 กับ 8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 7.0-9.0 ดังนั้นจึงเลือกสภาวะในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินที่พีเอช 8.5 เนื่องจากในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินต้องใช้ระยะเวลานานในการผลิต ซึ่งต้องคำนึงถึงความคงตัวของเอนไซม์ด้วย หากเอนไซม์มีความคงตัวสูงจะทำให้เอนไซม์ยังคงโครงสร้างและคุณสมบัติความเป็นโปรตีน ทำให้มีกิจกรรมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินได้นาน สำหรับอุณหภูมิในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินเลือกอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงและมีความคงตัวดีกว่าที่อุณหภูมิอื่น ซึ่งหากเลือกที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูง แต่เอนไซม์จะเสียสภาพไปอย่างรวดเร็ว

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

4.1 ชนิดของแป้งในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

จากการทดลองเพื่อหาสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยใช้แป้งชนิดต่างๆ คือ soluble starch, แป้งสาคู, แป้งข้าวเจ้า, แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพด โดยใช้แป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้แป้งเกิดการเจลลาทิไนเซชัน จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ CGTase เข้มข้น 12 ยูนิตต่อกรัมแป้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าแป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากเอนไซม์ CGTase ดังภาพที่ 21 จะเห็นได้ว่าถึงแม้แป้งสาคูจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 แต่แป้งสาคูไม่ใช่สับสเตรทที่ดีในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากเอนไซม์ CGTase ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและคุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิด ซึ่งให้ผลการทดลองคล้ายกับ Sian และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินด้วยเอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์ จากเชื้อ *Bacillus* sp. G1 โดยใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ให้ปริมาณไซโคลเด็กซ์ตรินสูงสุด

Gawande และ Patkar (2001) ศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยใช้เอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* AS-22 โดยใช้แป้งชนิดต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ผ่านการทำให้เกิดเจลลาทิไนเซชันในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินได้ดีเมื่อใช้ soluble starch และแป้งสาลี เป็นสับสเตรท ตามลำดับ



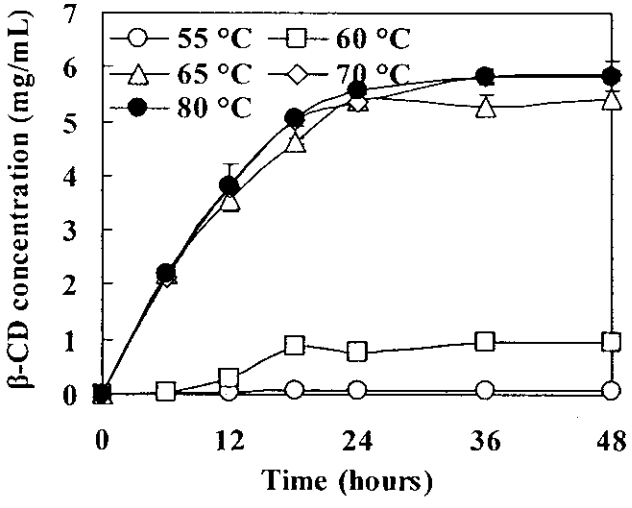
ภาพที่ 21 ผลของแหล่งสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยเอนไซม์ CGTase

Figure 21 Effect of substrate on cyclodextrin production by CGTase

4.2 ผลของการให้ความร้อนกับแป้ง

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการให้ความร้อนแก่แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นสับสเตรทที่คัดเลือกได้ ก่อนการนำไปใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน โดยนำแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 มาให้ความร้อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55, 60, 65, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้วทำการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยเติมสารละลายเอนไซม์ CGTase เข้มข้น 12 ยูนิตต่อกรัมแป้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าการให้ความร้อนแก่แป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส มีปริมาณไซโคลเด็กซ์ตรินเกิดขึ้นต่ำ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 65 องศาเซลเซียส มีปริมาณการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินเพิ่มสูงขึ้น ดังภาพที่ 22 การให้ความร้อนแก่แป้งส่งผลให้การผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากความร้อนทำให้พันธะไฮโดรเจนคลายตัวลง เม็ดแป้งสามารถดูดน้ำแล้วพองตัว หรือเรียกว่า การเกิดเจลาทิไนเซชัน ทำให้เอนไซม์สามารถสัมผัสกับแป้งได้ดีขึ้น และพบว่าการให้ความร้อนแป้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินใกล้เคียงกับที่ให้ความร้อนแป้งที่ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการให้ความร้อนแก่แป้งก่อนการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน คือ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับ Kim และคณะ (1995) ที่ทำการศึกษาอุณหภูมิในการเจลาทิไนซ์แป้งข้าวโพดเพื่อผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินด้วยเอนไซม์ CGTase ทางการค้าที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus macerans* โดยให้ความร้อนแก่แป้งข้าวโพดที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีปริมาณการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินต่ำกว่าแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศา

เซลเซียส เพียงร้อยละ 20 และสามารถแยกส่วนของแป้งที่เหลือจากการผลิตออกจากไซโคลเด็กซ์ตรินได้ง่ายอีกด้วย แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 70 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินไม่แตกต่างจากแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

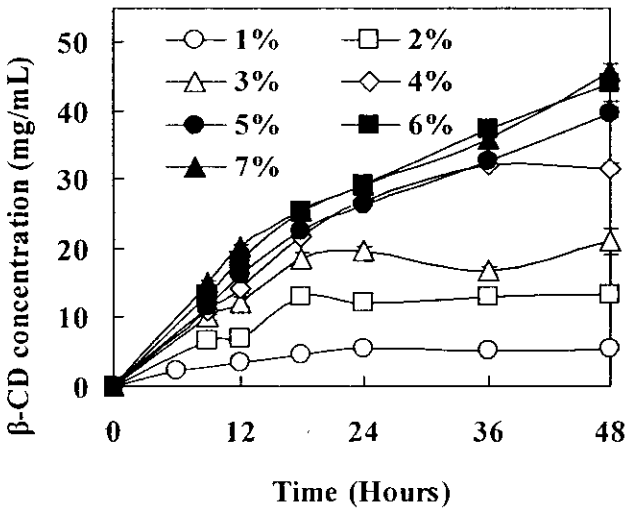


ภาพที่ 22 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 1 ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยเอนไซม์ CGTase

Figure 22 Effect of temperature in heat pretreatment of 1% tapioca starch on cyclodextrin production by CGTase

4.3 ความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

จากการทดลองการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 แล้วนำไปผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ CGTase ความเข้มข้น 12 ยูนิตต่อกรัมแป้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นสูงขึ้นปริมาณการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินก็เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ดังภาพที่ 23 และพบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 มีอัตราเร็วในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินใกล้เคียงกับแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 7 แต่เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินต่อกรัมแป้ง พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 ให้ผลผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินสูงกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 7 ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 6 ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 23 ผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยเอนไซม์ CGTase

Figure 23 Effect of tapioca starch concentration on cyclodextrin production by CGTase

Gawande และ Patkar (2001) ศึกษาความเข้มข้นของสับสเตรทเพื่อผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน โดยใช้เอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* AS-22 โดยใช้ soluble starch ที่ผ่านการทำให้เกิดเจลลาทิไนเซชันในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 เป็นสับสเตรท และเอนไซม์ CGTase เข้มข้น 22 ยูนิตต่อกรัมแป้ง บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของสับสเตรท คือ soluble starch ร้อยละ 10

Sian และคณะ (2005) ศึกษาความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท และเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. G1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 13.1 ยูนิตต่อกรัมแป้ง พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินได้สูงสุด หากใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังสูงกว่านี้แป้งจะหนืด และทำให้เอนไซม์ CGTase สัมผัสกับโมเลกุลของแป้งในการทำปฏิกิริยาได้ยาก

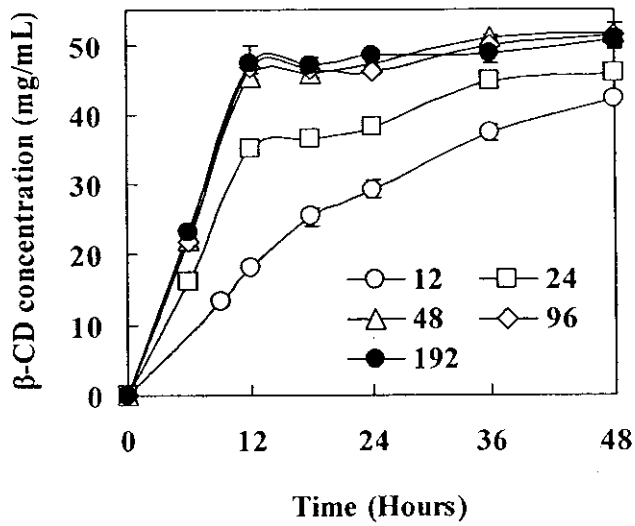
4.4 อัตราส่วนของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

เมื่อนำแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 และผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง มาศึกษาอัตราส่วนของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 12, 24, 48, 96 และ 192 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ CGTase ความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้อัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินเพิ่มสูงขึ้นด้วย และที่ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase 48 ยูนิตต่อกรัม

แป้ง มีอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินได้ใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้น 96 และ 192 ยูนิตต่อกรัมแป้ง โดยมีการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินเริ่มคงที่ ซึ่งพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ CGTase ที่ความเข้มข้น 48 ยูนิตต่อกรัมแป้ง สามารถผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินได้ 45.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ดังภาพที่ 24 ดังนั้น เอนไซม์ CGTase ที่ความเข้มข้น 48 ยูนิตต่อกรัมแป้ง จึงเหมาะสมที่สุดในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Kim และคณะ (1995) ที่ทำการศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 7.5 ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus macerans* (CGTase Amano) ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้า พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน คือ 48 ยูนิตต่อกรัมแป้ง โดยให้ปริมาณไซโคลเด็กตรินสูงสุด 17 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง

Jimli และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยใช้แป้งมันฝรั่งที่ผ่านการเจลลาทิไนซ์แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 เติมสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 100 ยูนิตต่อกรัมแป้ง แล้วทำการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินได้ 42 กรัมต่อลิตร

Kim และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งข้าวโพดดิบ โดยบ่มแป้งข้าวโพดกับเอนไซม์ CGTase ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงโดยปราศจากการปรับสภาพสับสเตรทและเอนไซม์เบื้องต้น สภาวะที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน คือ อุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา 60 องศาเซลเซียส แป้งข้าวโพดร้อยละ 7.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เอนไซม์ 22 ยูนิตต่อกรัมแป้ง พบว่ามีผลิตภัณฑ์ไซโคลเด็กซ์ตรินร้อยละ 47 โดยไซโคลเด็กซ์ตริน 12.68 มิลลิกรัม ใช้เอนไซม์ CGTase 1 ยูนิต



ภาพที่ 24 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยเอนไซม์ CGTase ในอัตราส่วนต่างๆ คือ 12, 24, 48, 96 และ 192 ยูนิตต่อกรัมแป้ง

Figure 24 Effect of enzyme concentration on cyclodextrin production by CGTase using various amounts of enzyme : 12, 24, 48, 96 and 192 U/g starch

4.5 อัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ตรินแต่ละชนิดที่ผลิตได้

นำแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 และผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และใช้อัตราส่วนเอนไซม์ CGTase 48 ยูนิตต่อกรัมแป้ง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง และนำสารละลายมาศึกษาอัตราส่วนของแอลฟา, เบต้า และแกมมาไซโคลเด็กซ์ตริน โดยวิธี HPLC ผลการทดลองพบว่ามีการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 66 ของสับสเตรทเริ่มต้น ซึ่งสูงกว่างานวิจัยของ Kim และคณะ (1997) ที่ผลิตได้ร้อยละ 47 และงานวิจัยของ Jimli และคณะ (2007) ที่ผลิตได้ร้อยละ 42 และสัดส่วนของแอลฟา, เบต้า และแกมมาไซโคลเด็กซ์ตรินที่ผลิตได้เท่ากับ 0.35:0.65:0 ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus firmus* ความเข้มข้น 22 ยูนิตต่อกรัมแป้ง และใช้สับสเตรทเป็นแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการเจลลาทิไนซ์แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 15 พบว่าให้สัดส่วนแอลฟา, เบต้า และแกมมาไซโคลเด็กซ์ตรินเท่ากับ 0.02:0.92:0.06 ตามลำดับ (Gawande *et al.*, 1999) Jimli และคณะ (2007) ศึกษาอัตราส่วนไซโคลเด็กซ์ตรินโดยใช้แป้งมันฝรั่งที่ผ่านการเจลลาทิไนซ์แล้ว พบว่าให้สัดส่วนแอลฟา, เบต้า และแกมมาไซโคลเด็กซ์ตรินเท่ากับ 0.22:0.63:0.15 ตามลำดับ