

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การชักนำการผลิต CGTase ให้สูงขึ้นโดยคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทำการวิจัยที่ผ่านมาภายในภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้มีความสนใจเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการชักนำการผลิต CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ให้มีปริมาณที่สูงขึ้นด้วยการใช้แป้งที่ผลิตได้ภายในประเทศไทยทดแทน Soluble starch ซึ่งมีราคาแพงในการทดลองครั้งนั้นได้สรุปว่า แป้งข้าวเจ้า ซึ่งเป็นผลิตผลทางการเกษตรหลักของประเทศไทยสามารถชักนำให้มีการผลิต CGTase ได้ดีที่สุด (วัลยา เดชชัยกุล, 2534)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความสนใจเกี่ยวกับผลของคาร์โบไฮเดรตที่มีความยาวของโมเลกุลและมีลักษณะของโครงสร้างที่แตกต่างกัน ต่อการชักนำให้มีการผลิต CGTase ของ *Bacillus* sp.A11 โดยทำการเลี้ยง *Bacillus* sp. A11 ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ กัน 5 ชนิดเป็นตัวชักนำให้มีการผลิต CGTase ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า, อะไมโลส, อะไมโลเพคติน, Dextrin type II และ Dextrin type III ซึ่งผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi ในปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หลังจากเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดซึ่งจะเรียกว่า Crude enzyme มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้งข้าวโพด (รูปที่ 6) แล้วทำการชะเอนไซม์ออกจากแป้ง ด้วยสารละลาย 0.2 โมลาร์ มอลโตสใน 10 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.5 (ใช้สารละลายมอลโตส ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในการชะเมื่อเริ่มต้นจาก Crude enzyme ปริมาตร 1 ลิตร) หลังจากนั้น จึงนำเอนไซม์

มาทำการไดอะไลส์ (Dialyzed) ในสารละลาย 50 mM โซเดียมอะซิเตต pH 6.0 แล้วจึงนำเอนไซม์มาทำการทดสอบแอกติวิตี จากผลการทดลองพบว่า Dextrin type II สามารถชักนำให้เกิด CGTase ที่มีค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์และ dilution limit สูงที่สุด (ตารางที่ 5, 6 และรูปที่ 7) จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวชักนำให้มีการผลิต CGTase ให้เพิ่มสูงขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม ในการใช้ Dextrin type II เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์นี้ ยังต้องมีการศึกษาปริมาณ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะสามารถชักนำให้ *Bacillus* sp. A11 ผลิต CGTase ได้มากที่สุด

4.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

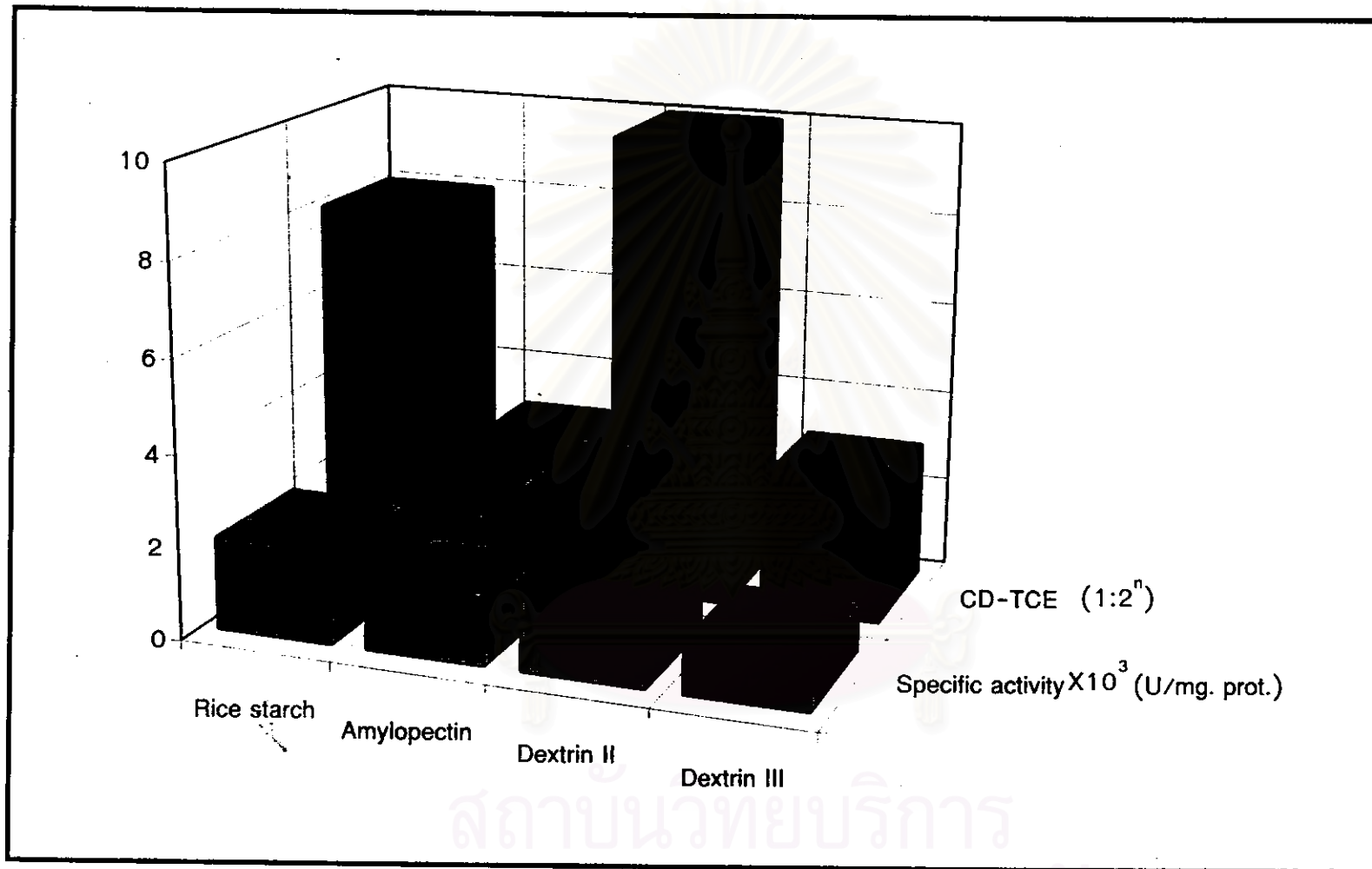
ในการหาปริมาณของ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi ที่จะสามารถชักนำให้แบคทีเรียผลิต CGTase ได้สูงสุดทำการทดลองโดยแปรผันปริมาณ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. A11 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงนำ Crude enzyme จากการ กระตุ้นด้วย Dextrin type II ในปริมาณที่แตกต่างกันมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้งข้าวโพดแล้วจึงทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์

จากการทดลองพบว่าปริมาณของ Dextrin type II ที่สามารถชักนำให้มีการสร้าง CGTase ได้สูงที่สุดคือ 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่า Specific activity เท่ากับ 5,435 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และให้ค่า dilution limit เท่ากับ 2^{12} (ตารางที่ 7, 8 และ รูปที่ 8)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลจากการชักนำการผลิต CGTase ด้วยคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ (1.0%, w/v)

Type of starch	Partial purified (ml)	Enzyme Activity		Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification fold
		Dextrinizing (Total units)	CD-TCE (dilution limit)				
Rice starch	148	11,650	2 ⁸	7.96	2,026	55.72	26
Amylose	146	-	-	-	-	-	-
Amylopectin	148	1,899	2 ³	1.43	1,328	57.56	23
Dextrin II	147	18,049	2 ¹⁰	4.59	3,932	45.77	28
Dextrin III	146	1,699	2 ³	1.54	1,103	62.05	28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 เปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะและค่า dilution limit ของ CGTase จากการชักนำด้วยคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 6 สรุปผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. A11 ด้วย

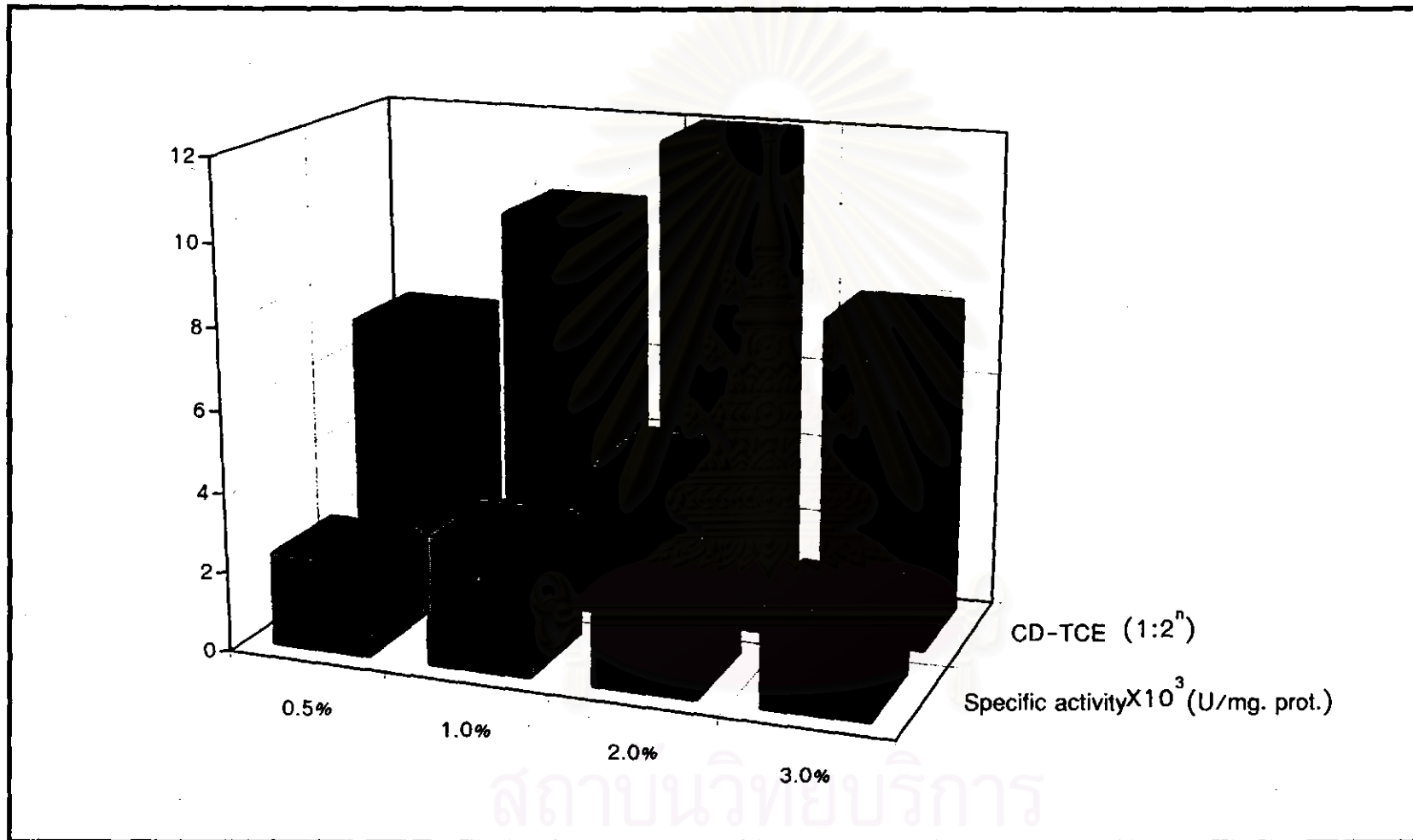
1.0 เปอร์เซนต์ Dextrin type II

Step	Volume (ml)	Enzyme Activity		Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification fold
		Dextrinizing (Total units)	CD-TCE (dilution limit)				
Crude enzyme	590	39,435	2 ⁸	282	140	100	1
Partial purified enzyme	147	18,049	2 ¹⁰	4.59	3,932	46	28

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณ Dextrin type II ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการชักนำการผลิต CGTase

Percent of Dextrin type-II (%)	Partial purified (ml)	Enzyme Activity		Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification fold
		Dextrinizing (Total units)	CGTase (dilution/limit)				
0.5	97	7,683	2 ⁷	3.30	2,328	47	16
1.0	101	12,777	2 ¹⁰	3.94	3,243	46	22
2.0	98	16,512	2 ¹²	3.04	5,435	51	26
3.0	98	11,250	2 ⁸	4.41	2,551	53	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 เปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะและค่า dilution limit ของ CGTase จากการชักนำด้วย Dextrin type II ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 8 สรุปผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. A11 ในอาหาร
เลี้ยงเชื้อ Horkoshi ที่มี 2.0 เปอร์เซ็นต์ Dextrin type II เป็นสับสเตรท

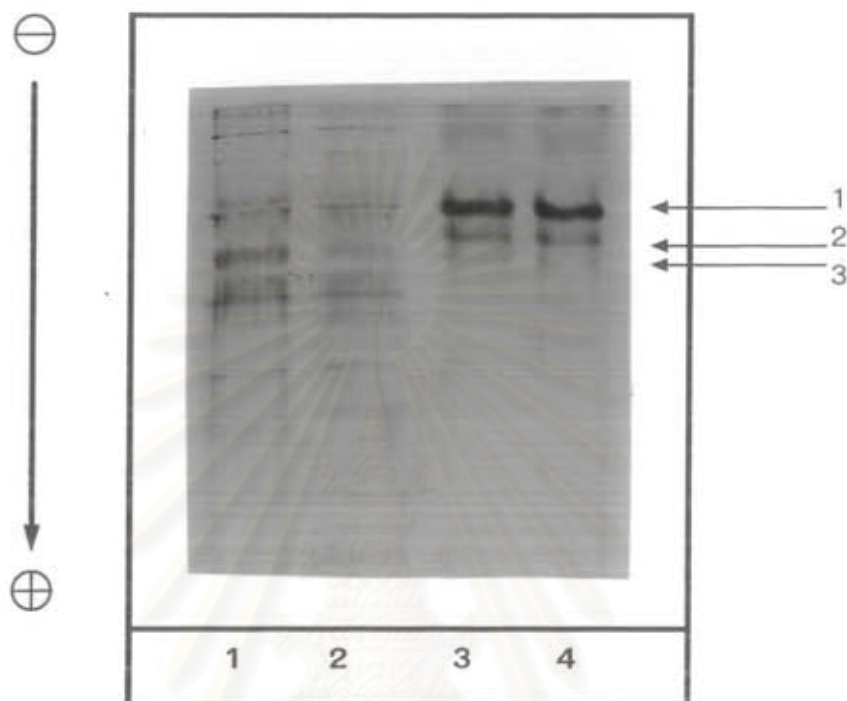
Step	Volume (ml)	Enzyme Activity		Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification fold
		Dextrinizing (Total units)	GD-TCE (dilution limit)				
Crude enzyme	396	32,080	2^9	151	212	100	1
Partial purified enzyme	98	16,512	2^{12}	3.04	5,435	51	26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้น ในการทำการทดลองขั้นต่อไป จึงใช้เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi โดยมีใช้ Dextrin type II ในปริมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นส่วนประกอบเพื่อชักนำการสร้าง CGTase

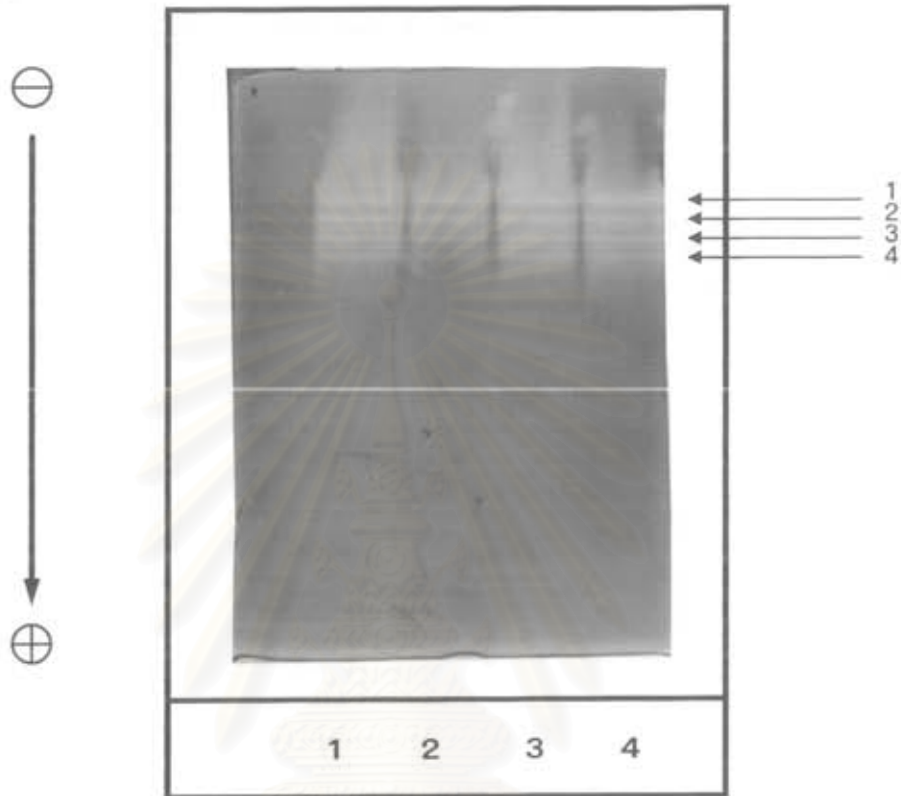
4.3 การเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำด้วย แป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II

เพื่อตรวจสอบว่า CGTase ที่ได้มาจากการชักนำด้วย แป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ได้แก่ Crude enzyme และสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purified enzyme) จะมีความแตกต่างกันบ้างหรือไม่ในสมบัติเบื้องต้น มาเปรียบเทียบ เช่น รูปแบบโปรตีนที่แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบไม่เสียสภาพ, ค่า pI หรือสัดส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้ เมื่อแยกโปรตีนที่ได้จากการชักนำทั้งสองแบบมาแยก โดยวิธีการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ ติดตามแถบโปรตีนบนแผ่นเจล (enzyme protein pattern) โดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 9 จะเห็นว่า แถบโปรตีนของ Crude enzyme จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II (ช่อง 1,2) ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (ช่อง 3,4) จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II (ช่อง 3, 4) พบว่าทั้งสองช่องเหลือโปรตีนเพียง 3 แถบ และเมื่อติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์บนแผ่นเจลด้วยสารละลายไอโอดีน (รูปที่ 10) จะพบแถบใสในแผ่นเจล โดยที่แถบของน้ำเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย แป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II (ช่อง 1,2) และเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (ช่อง 3,4) ปรากฏแถบใส 4 แถบ เช่นเดียวกันทั้ง 4 ช่อง โดยแถบที่ 4 ในช่องที่ 2 มีความคมชัดน้อยกว่าแถบอื่นๆ



รูปที่ 9 เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆของการทำให้ CGTase บริสุทธิ์จาก การชักนำด้วย แป้งข้าวเจ้าและ Dextrin type II แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบไม่เสียสภาพ

1. Crude enzyme	จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า	10	ไม่โครกรมโปรตีน
2. Crude enzyme	จากการชักนำด้วย Dextrin type II	10	ไม่โครกรมโปรตีน
3. Partially purified CGTase	จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า	15	ไม่โครกรมโปรตีน
4. Partially purified CGTase	จากการชักนำด้วย Dextrin type II	15	ไม่โครกรมโปรตีน



รูปที่ 10 เปรียบเทียบรูปแบบการย้อมสี Dextrinizing activity ของ Crude enzyme และ CGTase ที่ผ่าน

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II

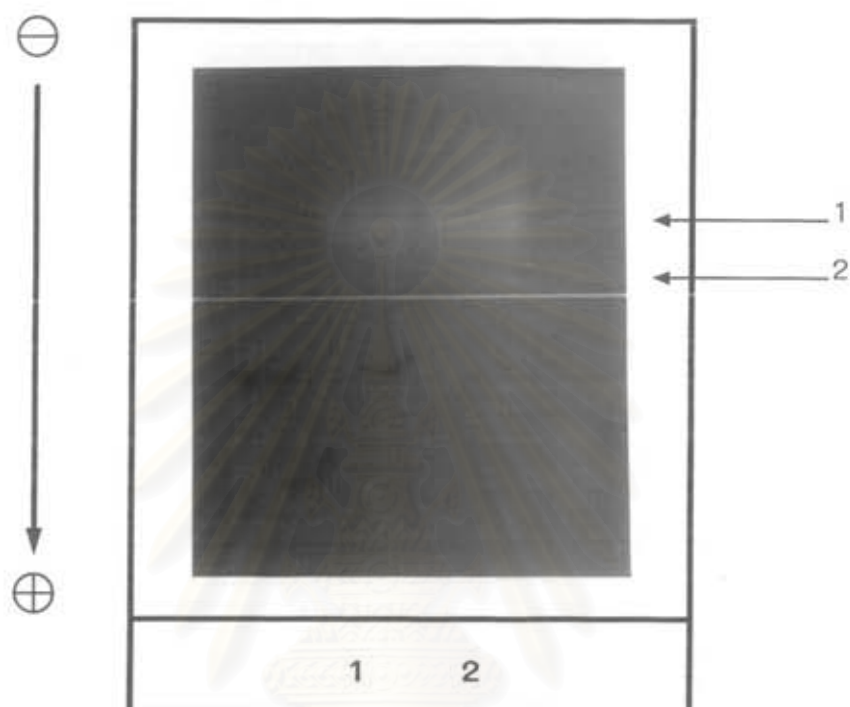
แยกโดยโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบไม่เสียสภาพ อุณหภูมิ 4 °ซ

- | | | | |
|------------------------------|---------------------------------|-----|-------|
| 1. Crude enzyme | จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า | 0.2 | ยูนิต |
| 2. Crude enzyme | จากการชักนำด้วย Dextrin type II | 0.2 | ยูนิต |
| 3. Partially purified CGTase | จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า | 0.2 | ยูนิต |
| 4. Partially purified CGTase | จากการชักนำด้วย Dextrin type II | 0.2 | ยูนิต |

จากการย้อมเจลดด้วยวิธี Dye staining for cyclodextrin (รูปที่ 11) ในตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้าและ Dextrin type II ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปรากฏแถบสีเหลืองในแผ่นเจลดที่มีสีพื้นเป็นสีแดง-ส้ม 2 แถบ ตรงกับแถบที่ 1,2 ของช่องที่ 3,4 ในรูปที่ 10

เมื่อทดลองด้วยการหาค่า pi ของเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้าและ Dextrin type II ด้วยวิธีการทำไอโซอิเล็กทริก โฟลัสซิง เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (IEF) โดยใช้ Ampholine ช่วง pH 5-7 เปรียบเทียบค่า pi กับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ช่อง 1) (ภาคผนวก 4) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 พบว่าเอนไซม์จากการชักนำด้วย Dextrin type II (ช่อง 2) ปรากฏแถบขึ้น 4 แถบ ที่ค่า pi ประมาณ 5.67 5.77 5.96 และ 7.87 ตามลำดับ ในขณะที่แถบของเอนไซม์จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า (ช่องที่ 3) ปรากฏแถบในรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน แต่แถบที่ pi 5.67 และ 7.87 มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า จึงปรากฏแถบที่ไม่คมชัดเท่ากับช่องที่ 2

เมื่อทำเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธี Dextrinizing assay และ CD-TCE method รวมทั้งตรวจสอบผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้จากการใช้ CGTase (50 units/g. starch) บ่มกับสารละลายแป้งข้าวเจ้า (2.0%, w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตกตะกอนไซโคลเดกซ์ทรินด้วย TCE ตรวจสอบชนิดและปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เปรียบเทียบกับไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 1, 2 และ 3) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9 พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำด้วย Dextrin type II ให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะและให้ค่า dilution limit สูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จากชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า เมื่อพิจารณาชนิดของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้ พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากทั้งสองการทดลองให้ β -CD เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และให้อัตราส่วนของ $\alpha:\beta:\gamma$ ใน สัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 11 รูปแบบการย้อม Dye staining for cyclodextrin ที่เกิดจากปฏิกิริยาของ CGTase จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้าและ Dextrin type II แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบไม่เสียสภาพ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1. Partially purified CGTase

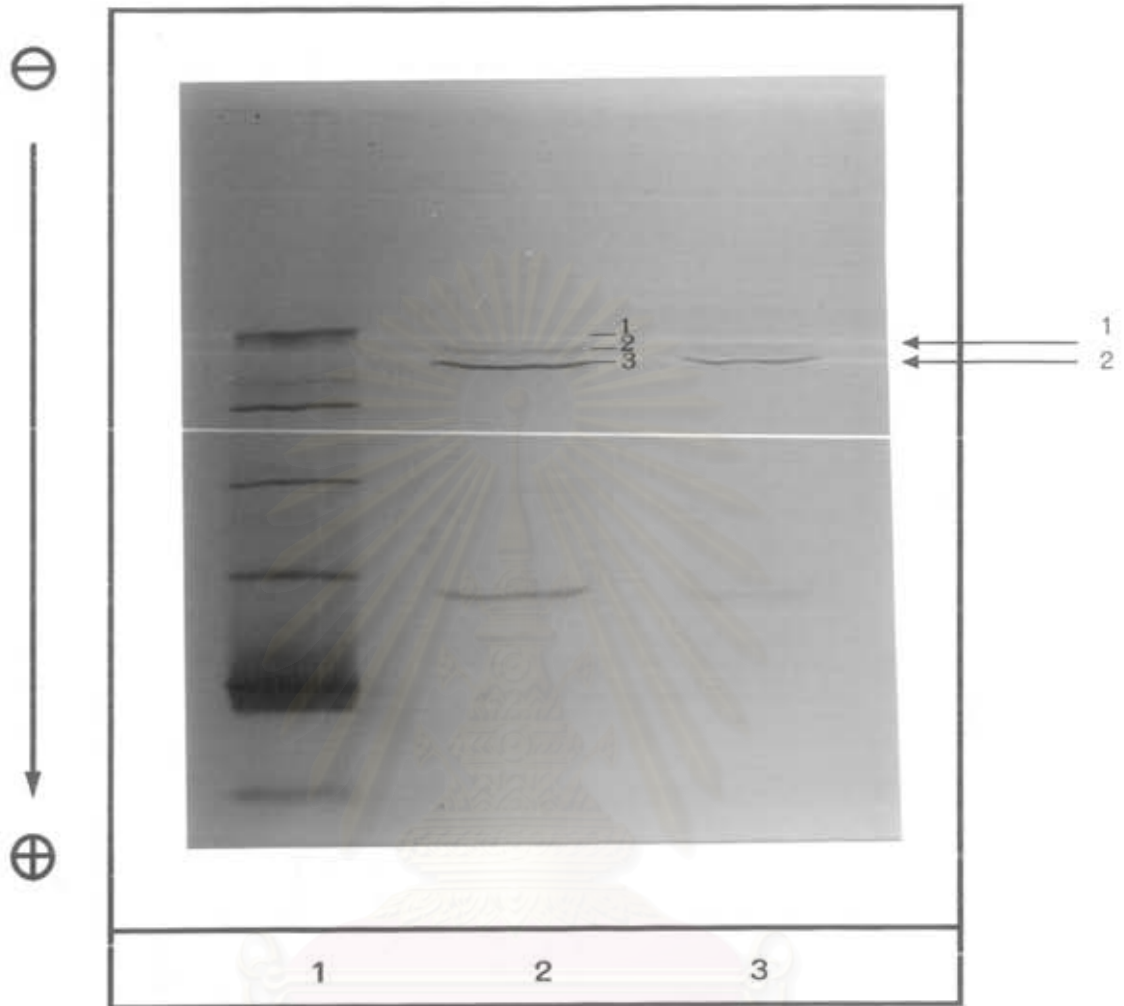
จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า

2.0 ยูนิต

2. Partially purified CGTase

จากการชักนำด้วย Dextrin type II

2.0 ยูนิต



รูปที่ 12 เปรียบเทียบค่า pI ของ CGTase ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า และ Dextrin type II กับโปรตีน pI มาตรฐาน โดยไอโซอิเล็กทริก โฟคัสซิง เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (IEF)

1. โปรตีน pI มาตรฐาน
2. Partially purified CGTase จากการชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้า
3. Partially purified CGTase จากการชักนำด้วย Dextrin type II

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบแอกติวิตีของ CGTase ที่ชักนำด้วยแป้งข้าวเจ้าและ Dextrin II และชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้

Inducer	Volume (ml)	Enzyme Activity		Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield of cyclodextrin (g%)				Ratio $\alpha:\beta:\gamma$
		Dextrinizing (Total units)	CD-TCE (dilution limit)			α -CD	β -CD	γ -CD	Total CDs	
Rice starch	148	11,650	2 ⁸	7.96	2,026	1.76	5.73	0.78	8.27	2:7:1
Dextrin II	98	16,512	2 ¹²	3.04	5,435	1.58	6.13	0.97	8.92	2:6:1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากสับสเตรทที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ขนาดความยาวของโมเลกุลแตกต่างกัน

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า CGTase ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. A11 ให้ผลผลิตหลักจากการทำงานคือ เบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน (β -Cyclodextrin; β -CD) (วัลยา เตชชัยกุล, 2534) และจากการทำการวิจัยของ ทิพย์สุภา มาลัย (2535) ได้ทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเจ้า ซึ่งได้มีการนำมาผ่านการย่อยด้วย α -Amylase ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับ CGTase เพื่อให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลงเหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา สามารถให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดต่างๆ ได้ในสัดส่วนและปริมาณที่แตกต่างกัน ในการทำการทดลองนี้ จึงสนใจในการหาสภาวะที่จะทำให้ CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทริน (Gamma-Cyclodextrin; γ -CD) เพิ่มขึ้นโดยทดลองเปลี่ยนสับสเตรทจากเดิมที่ใช้แป้งข้าวเจ้ามาเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ที่มีความยาวของโมเลกุลแตกต่างกันมาใช้ในการผลิต โดยใช้ Soluble starch ซึ่งเป็นสับสเตรทที่นิยมใช้โดยทั่วไป และแป้งข้าวเจ้า ซึ่งเป็นสับสเตรทที่สามารถหาได้ในประเทศเป็นตัวเปรียบเทียบ ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีการ CD-TCE นำ CGTase ที่ได้มาจากการทดลองข้อ 4.2 (50 unit/g starch) บ่มกับสับสเตรทคือสารละลายแป้งชนิดต่างๆ ได้แก่ Soluble starch, แป้งข้าวเจ้า, อะไมโลส, อะไมโลเพคติน, Dextrin type II และ Dextrin type III เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริяд้วยสารละลาย Trichloroethylene (TCE) แล้วแยกตะกอนไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นอยู่ระหว่างชั้นน้ำแป้ง และ TCE ออกมาวิเคราะห์ชนิดของไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นด้วยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นดังที่ปรากฏในตารางที่ 10 พบว่า สับเสตรา Soluble starch, แป้งข้าวเจ้า, อะไมโลส, อะไมโลเพกติน สามารถให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และให้อัตราส่วนของ $\alpha : \beta : \gamma$ ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน โดยมีผลิตภัณฑ์หลักคือ β -CD สำหรับสับเสตรา Dextrin type II และ Dextrin type III พบว่าสามารถเปลี่ยนสับเสตราแป้งให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินในปริมาณที่สูง และให้สัดส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เป็น γ -CD ในสัดส่วนที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสับเสตราแป้งชนิดอื่นๆ

ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าสับเสตราที่มีขนาดโมเลกุลสั้น จะสามารถให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน γ -CD ในสัดส่วนที่สูงขึ้นได้

4.5 การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากสับเสตราที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบตั้งแต่ 2-7 โมเลกุล

ทดลองเปลี่ยนสับเสตราที่ใช้ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งมาเป็นสับเสตราที่มีขนาดและความยาวโมเลกุลน้อยลง โดยใช้ Maltooligosaccharide ที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กกว่าการทดลองที่ผ่านมา โดยใช้ Maltooligosaccharide ที่มีโมเลกุลของกลูโคสเป็นส่วนประกอบ 2-7 โมเลกุล เข้ามาใช้ ได้แก่ Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose และ Maltoheptaose มาเป็นสับเสตราในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ด้วยวิธีการผลิตแบบ CD-TCE ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี HPLC ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 11

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากสับสเตรทชนิดต่าง ๆ

Substrate	Yield of Cyclodextrins				Ratio $\alpha:\beta:\gamma$
	% Conversion				
	α -CD	β -CD	γ -CD	Total	
Soluble starch	1.08	4.77	0.75	6.70	1:6:1
Rice starch	1.23	5.26	0.95	7.44	2:6:1
Amylose	1.20	5.73	0.63	7.56	2:9:1
Amylopectin	0.81	5.12	1.14	7.07	1:6:1
Dextrin type II	1.27	12.57	2.45	16.29	1:10:2
Dextrin type III	1.59	14.57	3.62	19.79	1:9:2

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบชนิดและสัดส่วนของไซโคลเดกซ์ทริน ที่ได้จากสับสเตอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์

Substrate	Yield of Cyclodextrins				Ratio
	% Conversion				$\alpha:\beta:\gamma$
	α -CD	β -CD	γ -CD	Total	
Maltotriose	1.74	3.59	0.55	5.99	3:6:1
Maltotetraose	1.40	16.23	7.18	18.41	1:12:5
Maltopentaose	1.18	18.66	8.01	27.85	1:16:8
Maltohexaose	2.53	19.98	5.79	28.30	1:8:2
Maltoheptaose	1.87	24.47	2.87	29.21	1:13:2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดลองพบว่า สับสเตรทแต่ละชนิดให้สัดส่วนของไซโคลเดกซ์ทรินที่แตกต่างกัน โดยมี β -CD เป็นผลิตภัณฑ์หลัก สำหรับสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose ให้สัดส่วนของ γ -CD สูง และ Maltohexaose ให้สัดส่วนของ α -CD สูง เช่นเดียวกัน เนื่องจากค่า Retention time (RT) ของ Maltotetraose มีค่าใกล้เคียงกับ α -CD, RT ของ Maltopentaose มีค่าใกล้เคียงกับ β -CD และ RT ของ Maltohexaose มีค่าใกล้เคียงกับ γ -CD (ตารางที่ 12) อาจทำให้เกิดการซ้อนทับกันขึ้นระหว่างพีคของไซโคลเดกซ์ทรินกับน้ำตาลทั้งสามชนิด เมื่อวิเคราะห์ผลโดยวิธี HPLC (รูปที่ 13)

ดังนั้น การวัดผลผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงอาจจะไม่ใช่ค่าที่เกิดจากไซโคลเดกซ์ทรินที่แท้จริง จึงทำการทดลองยืนยันชนิดของไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC

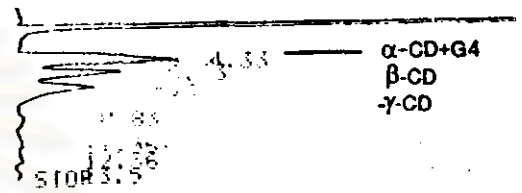
4.6 การวิเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินโดยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography)

ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้ Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose และ Maltoheptaose เป็นสับสเตรท เป็นผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดใดบ้าง โดยการนำสารละลายผสม (Reaction mixture) ที่ได้มาจากการใช้สับสเตรททั้ง 7 ชนิด มาจุดบนแผ่น TLC Plate ที่เคลือบด้วย Microcrystalline cellulose (Avicel) ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน α -, β - และ γ -CD ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม เมื่อจุดสารละลายตัวอย่างทั้งหมดแล้ว นำแผ่นแก้ววางในถังที่มีตัวทำละลายผสมอยู่ (n-butyl alcohol : ethyl alcohol : water ; 4:3:3 ; v/v) ปลอຍให้ตัวทำละลายซึมผ่านตามแผ่นแก้วขึ้นมา จนระดับของตัวทำละลายห่างจากปลายบนประมาณ 1-2 เซนติเมตร แล้วยกแผ่นกระจกออกจากถัง วางผึ่งให้แห้งทำการทดลองซ้ำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง เมื่อแผ่นกระจกแห้งดีแล้วทำการตรวจวัดผลด้วยการพ่นสารละลาย

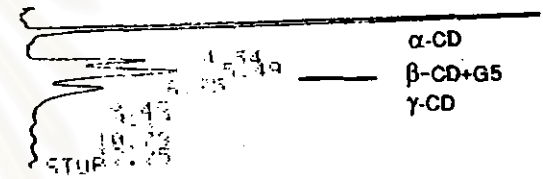
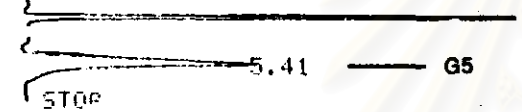
ตารางที่ 12 แสดงค่า Retention time ของน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ และ
ไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน จาก HPLC Supelco-NH₂ column

Standard		Retention Time (RT)
Glucose	(G1)	2.57
Maltose	(G2)	2.97
Maltotriose	(G3)	3.55
Maltotetraose	(G4)	4.21
Maltopentaose	(G5)	5.41
Maltohexaose	(G6)	6.76
Maltoheptaose	(G7)	8.25
α -CD		4.43
β -CD		5.39
γ -CD		6.63

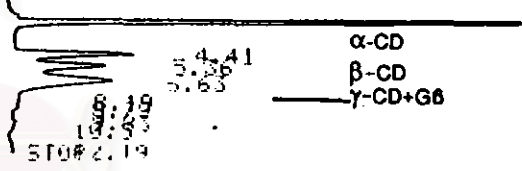
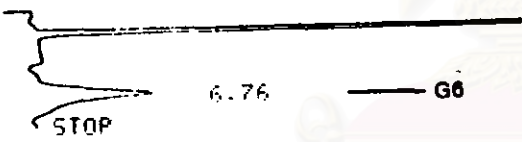
Maltotetraose
(G4)



Maltopentaose
(G5)



Maltohexaose
(G6)



(A)

(B)

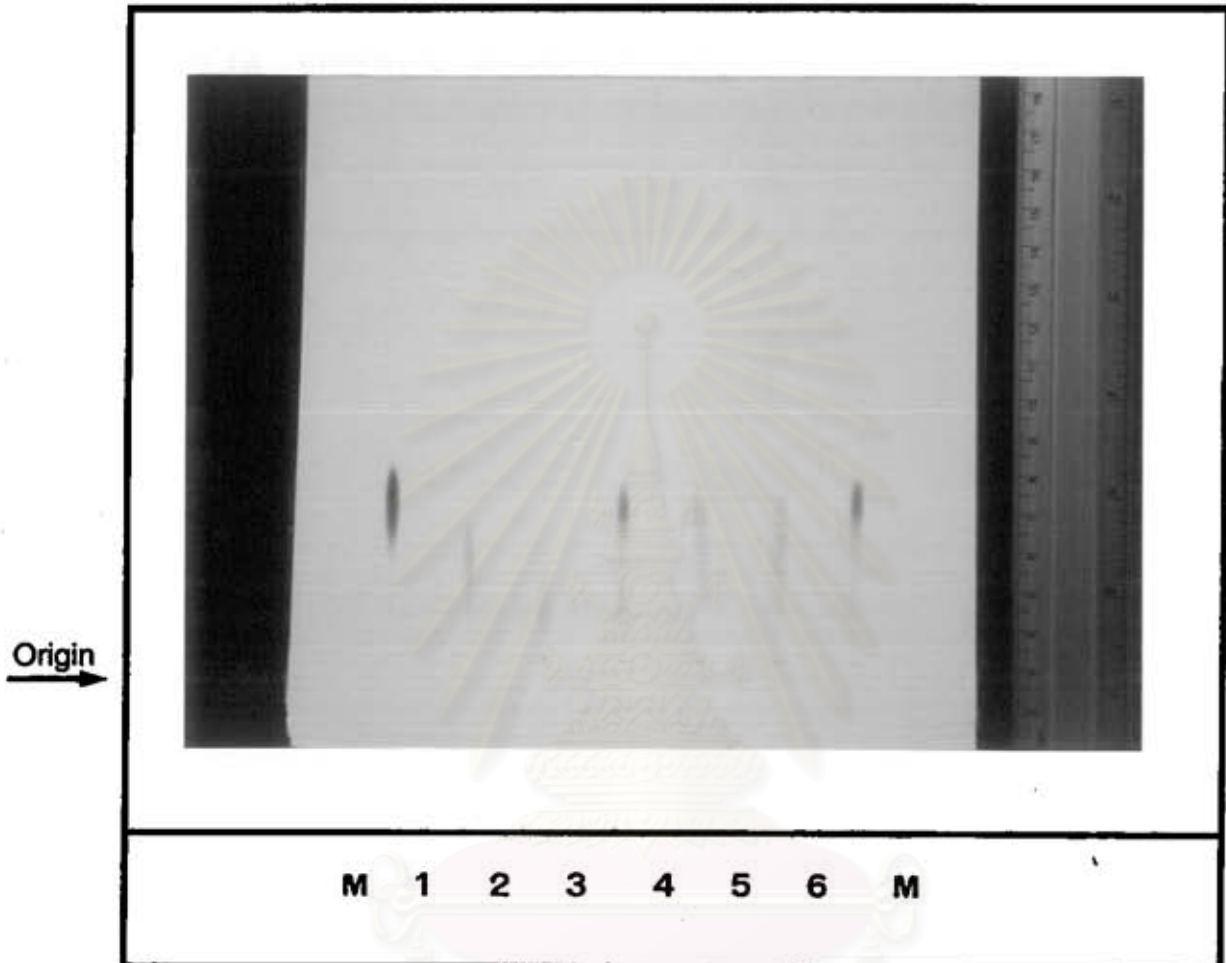
รูปที่ 13 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของ Maltotetraose (G4) Maltopentaose (G5) และ Maltohexaose (G6) (A) และ โครมาโตแกรมแสดงการซ้อนกันระหว่างไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐานกับน้ำตาล G4, G5 และ G6 (B)

1.0 เปอร์เซ็นต์ methanolic iodine จะให้แถบสีของสารละลายมาตรฐาน α -, β - และ γ -CD เป็นสีที่แตกต่างกันคือ สีม่วง, สีเหลือง และ สีน้ำตาล ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ความยาวต่างๆ ที่ใช้จะไม่ปรากฏสีบนแผ่น TLC วัฏธนะทางที่ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน เคลื่อนที่ขึ้นไปจากจุดเริ่มต้น มาคำนวณหาค่า R_f เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานผสม α -, β - และ γ -CD

จากผลการทดลองรูปที่ 14 พบว่า โครมาโตแกรมบนแผ่น TLC พบว่า Reaction mixture ที่ใช้น้ำตาล maltose เป็นสับสเตรทไม่ปรากฏสีของไซโคลเดกซ์ทรินเกิดขึ้น ส่วน Reaction mixture ที่ใช้น้ำตาล Maltotriose, Maltohexaose และ Maltoheptaose พบว่าเมื่อ จำนวนหน่วยกลูโคสเพิ่มขึ้นการให้สีม่วงของ α -CD ลดลงในขณะที่ให้สีเหลืองของ β -CD เพิ่มขึ้น ส่วน Maltotetraose และ Maltopentaose นอกจากให้สีม่วงของ α -CD สีเหลืองของ β -CD แล้วยังให้น้ำตาลของ γ -CD อย่างชัดเจน (รูปที่ 15) สรุปค่า R_f ได้ดังตารางที่ 13

แต่อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วยวิธีการ TLC นี้ก็ไม่สามารถบอกปริมาณของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นได้ จึงต้องกำจัดส่วนของน้ำตาลที่ปนอยู่กับพีคของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

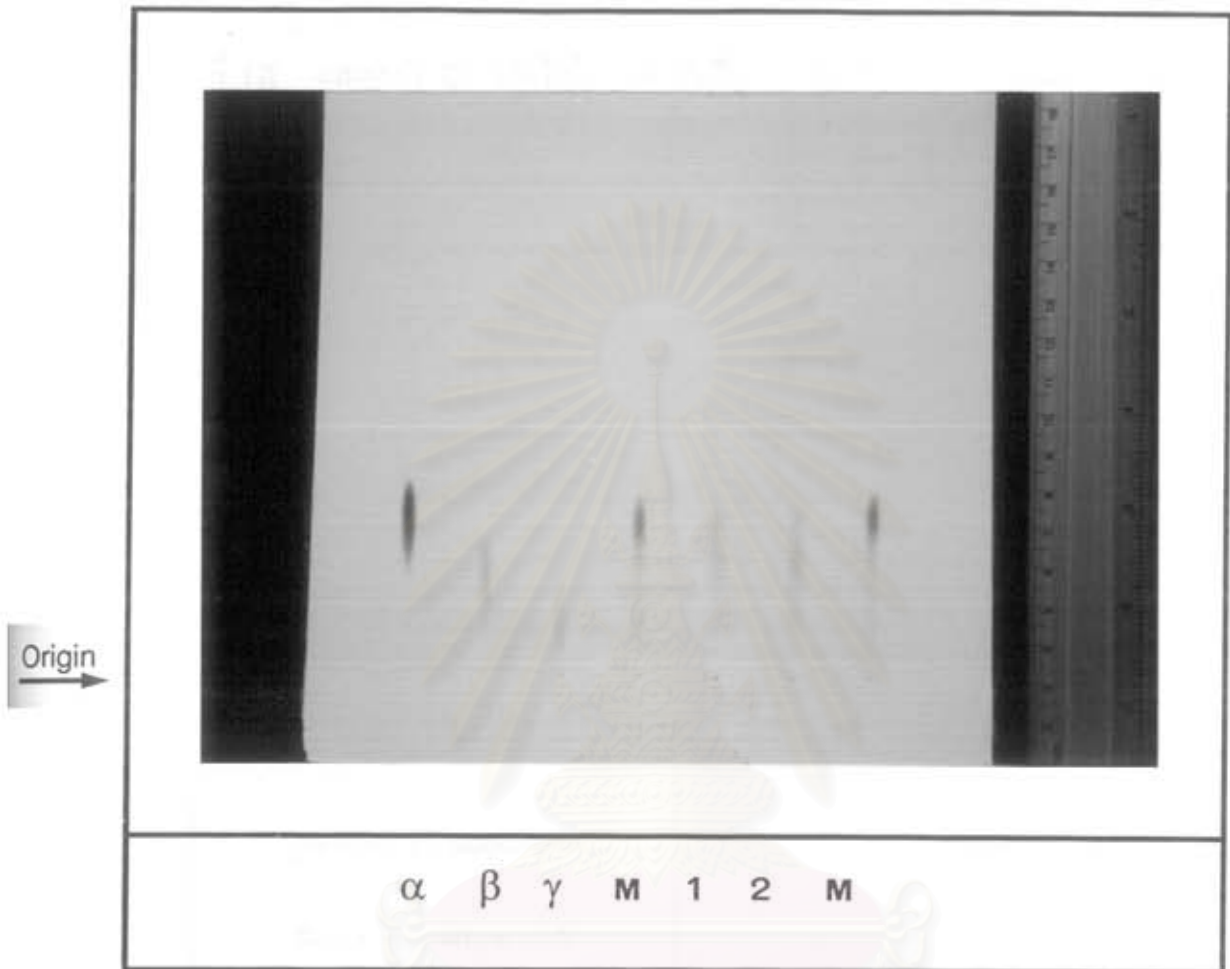
จากการทดลองของ ทิพย์สุภา มาลัย (2538) ได้ใช้ β -amylase 20 ยูนิต บ่มกับ สารละลายไซโคลเดกซ์ทรินเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัด Maltooligosaccharides ออกเป็นน้ำตาลสายสั้นๆ ซึ่งจะไม่ถูกแยกโดย HPLC ในบริเวณของ ไซโคลเดกซ์ทริน และ β -amylase ไม่สามารถย่อยไซโคลเดกซ์ทรินได้ จึงไม่มีผลกระทบต่อ ปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน ได้ทำการทดลองใช้ β -amylase เพื่อย่อย Maltooligosaccharides ที่เหลือในปฏิกิริยาโดยบ่ม Reaction mixture กับ β -amylase 20 ยูนิต ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถย่อย Maltotetraose และ Maltopentaose ออกเป็นน้ำตาล Maltose และ Maltotriose จนหมด (รูป 16 a) ดังนั้นในปฏิกิริยาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินใน



รูปที่ 14 แสดงโครมาโตแกรมของ Reaction mixture จากสับสเตรทโอลิโกแซคคาไรด์ จากการแยกวิธี TLC "Microcrystalline cellulose"(Avicel) ด้วยสารละลายผสม (n-butyl alcohol : ethyl alcohol : water ; 4:3:3 ; v/v) ย้อมด้วย 1.0 % Methanolic iodine

หมายเหตุ M = Standard α -, β -, γ - cyclodextrin 3 ไมโครกรัม

- | | |
|--|--|
| 1= Reaction mixture เมื่อใช้ G2 เป็นสับสเตรท | 4= Reaction mixture เมื่อใช้ G5 เป็นสับสเตรท |
| 2= Reaction mixture เมื่อใช้ G3 เป็นสับสเตรท | 5= Reaction mixture เมื่อใช้ G6 เป็นสับสเตรท |
| 3= Reaction mixture เมื่อใช้ G4 เป็นสับสเตรท | 6= Reaction mixture เมื่อใช้ G7 เป็นสับสเตรท |



รูปที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมของ Reaction mixture จากสับสเตอร์ท Maltotetraose และ Maltopentaose จากการแยกวิธี TLC “Microcrystalline cellulose” (Avicel) ด้วยสารละลายผสม (n-butyl alcohol : ethylalcohol : water ; 4:3:3 ; v/v) ย้อมด้วย 1.0 เปอร์เซ็นต์ Methanolic iodine

หมายเหตุ M = Standard α -, β -, γ - cyclodextrin 3 ไมโครกรัม
 1 = Reaction mixture เมื่อใช้ G4 เป็นสับสเตอร์ท
 2 = Reaction mixture เมื่อใช้ G5 เป็นสับสเตอร์ท

ตารางที่ 13 แสดงค่า Rf ของไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน และ Reaction mixture G4, G5 จาก TLC "Microcrystalline cellulose" (Avicel) ที่แยกด้วยตัวทำละลายผสม (n-butyl alcohol : ethyl alcohol : water ; 4:3:3 ; v/v)
 ย้อมด้วย 1.0 เปอร์เซ็นต์ methanolic iodine

Sample	Rf
Standard α -cyclodextrin	0.23
Standard β -cyclodextrin	0.16
Standard γ -cyclodextrin	0.08
Reaction mixture G4	0.08, 0.16, 0.23
Reaction mixture G5	0.08, 0.16, 0.24

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

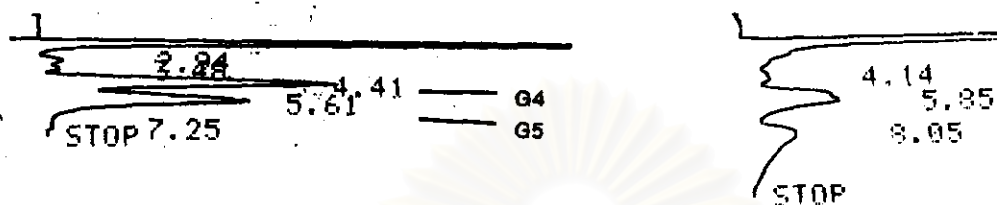
ขั้นตอนการตกตะกอนด้วย TCE ได้นำสารละลายไปต้มก่อนทิ้งให้เย็นเติม β -amylase 20 ยูนิต
ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเติม TCE เพื่อตกตะกอนไซโคลเดกซ์ทริน

หลังจากแยกตะกอนไซโคลเดกซ์ทรินแล้วนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า
ปรากฏพีคของน้ำตาล Maltose และ Maltotriose เพิ่มสูงขึ้นและให้พีคของไซโคลเดกซ์ทรินที่ชัดเจน
และไม่มีการเคลื่อนของ RT ดังรูปที่ 16 และสามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ดังตารางที่ 14

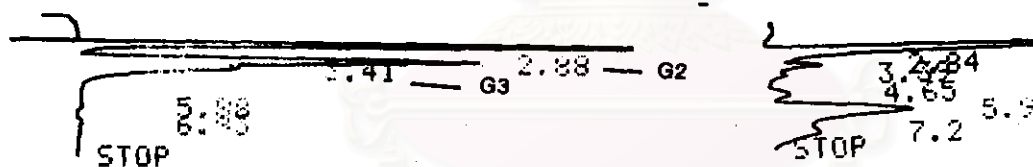


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A)



(B)



Std. G4+G5

Reaction products

รูปที่ 16 HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม Maltotetraose (G4)

กับ Maltopentaose(G5) และ สารละลายตัวอย่างจากการใช้ Maltotetraose

เป็นสับสเตรท

(A) control (B) ย่อยด้วย β -amylase 20 ยูนิต 25 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบชนิดและสัดส่วนของไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้จากสับสเตรทที่ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ด้วย HPLC หลังจากการย่อยด้วย β -amylase (20 ยูนิต 1 ชั่วโมง)

Substrate	Yield of Cyclodextrins				Ratio $\alpha:\beta:\gamma$
	% Conversion				
	α -CD	β -CD	γ -CD	Total	
Maltotriose	1.01	3.21	0.25	4.47	4:13:1
Maltotetraose	0.83	15.12	4.57	20.10	1:18:6
Maltopentaose	0.76	18.32	6.12	25.11	1:24:8
Maltohexaose	0.67	20.07	2.52	23.26	1:30:4
Maltoheptaose	0.58	22.91	1.78	25.27	1:40:3

จากการทดลองพบว่าปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินเพิ่มขึ้นตามขนาดของ Maltooligosachrides โดยเฉพาะ β -CD เมื่อพิจารณาสับสเตรทแต่ละตัวพบว่า Maltotriose ให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินในปริมาณที่ต่ำมากจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ส่วนสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose สามารถให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิด β -CD และ γ -CD ได้ในสัดส่วนที่สูง สำหรับ Malthexaose และ Malthepentaose ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น β -CD ในปริมาณที่สูงและเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

ในการทดลองนี้ มีความสนใจสภาวะที่จะให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน ชนิด γ -CD ปริมาณสูงขึ้น ดังนั้น จึงเลือก Maltotetraose และ Maltopentaose เป็นสับสเตรทที่ใช้ในการผลิต γ -CD อย่างไรก็ตาม ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินนี้จำเป็นต้องมีการแปรผันสภาวะในการผลิต เพื่อให้เหมาะสมกับการผลิตที่สุด เพื่อให้ได้ปริมาณผลิตผลของ γ -CD สูงที่สุด

4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยใช้สับสเตรท

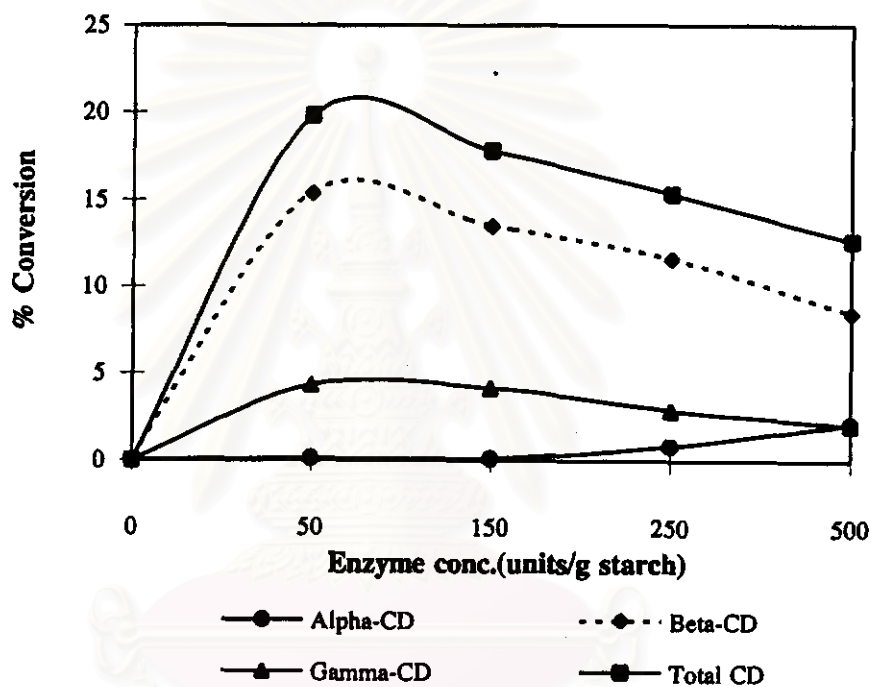
Maltotetraose และ Maltopentaose

4.7.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน

แปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา เป็น 50, 150, 250 และ 500 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน ด้วยวิธี HPLC

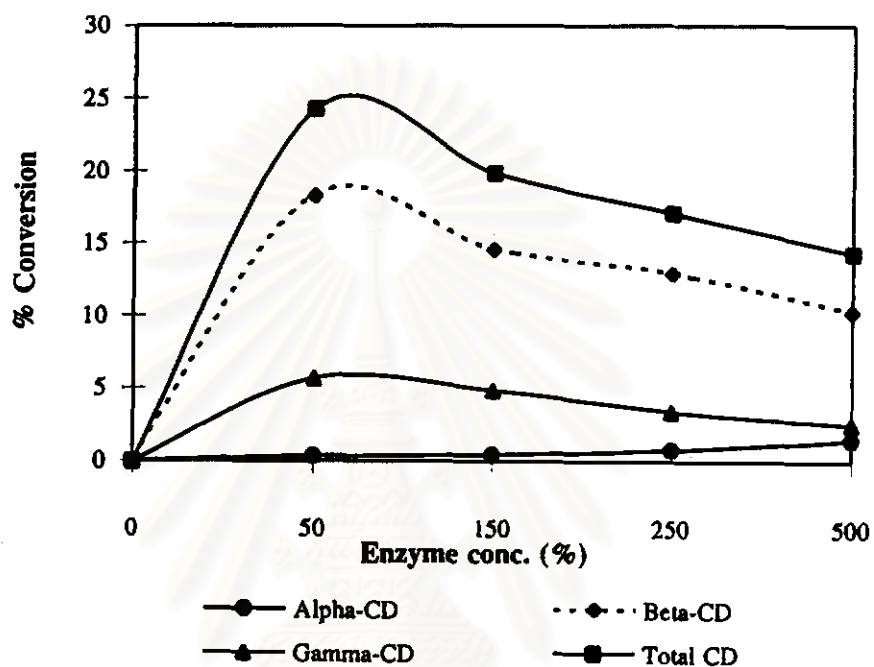
จากผลการทดลองพบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นปริมาณของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นกลับลดลง (รูปที่ 17, 18) เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดพบว่า

ผลิตภัณฑ์ α -CD เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของเอนไซม์ ในทางกลับกัน β -CD และ γ -CD กลับลดลง ดังนั้น ความเข้มข้นของเอนไซม์ 50 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เหมาะสมในการผลิต ผลิตภัณฑ์ γ -CD ที่สุด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 แสดงผลของปริมาณของ CGTase ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยบ่ม
สับสเตรท Maltotetraose (2.0%; w/v) กับ CGTase เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



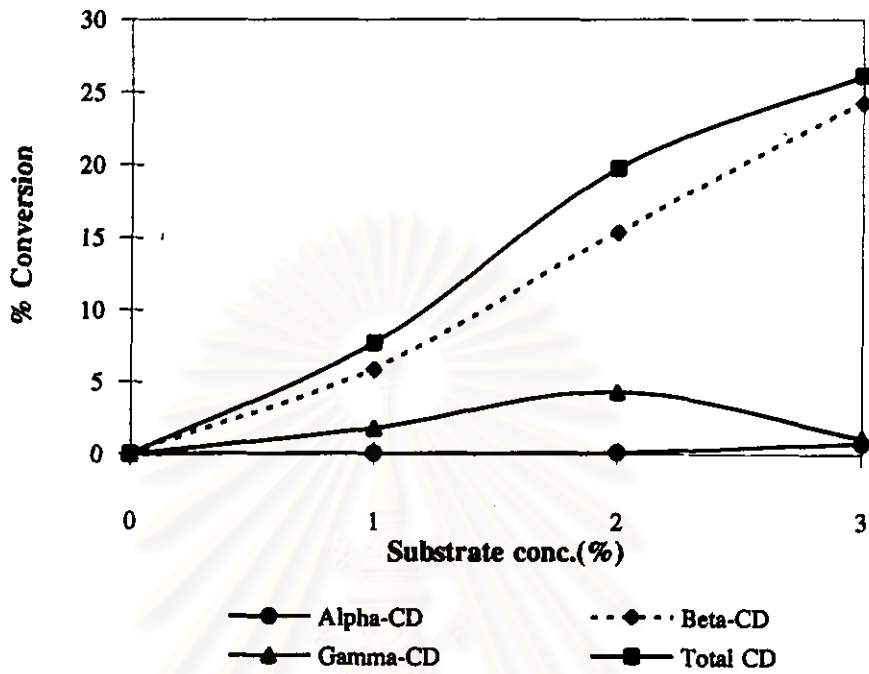
รูปที่ 18 แสดงผลของปริมาณของ CGTase ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน โดยบ่ม
 สับสเตรท Maltopentaose (2.0%;w/v) กับ CGTase เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.7.2 การแปรผันปริมาณสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose

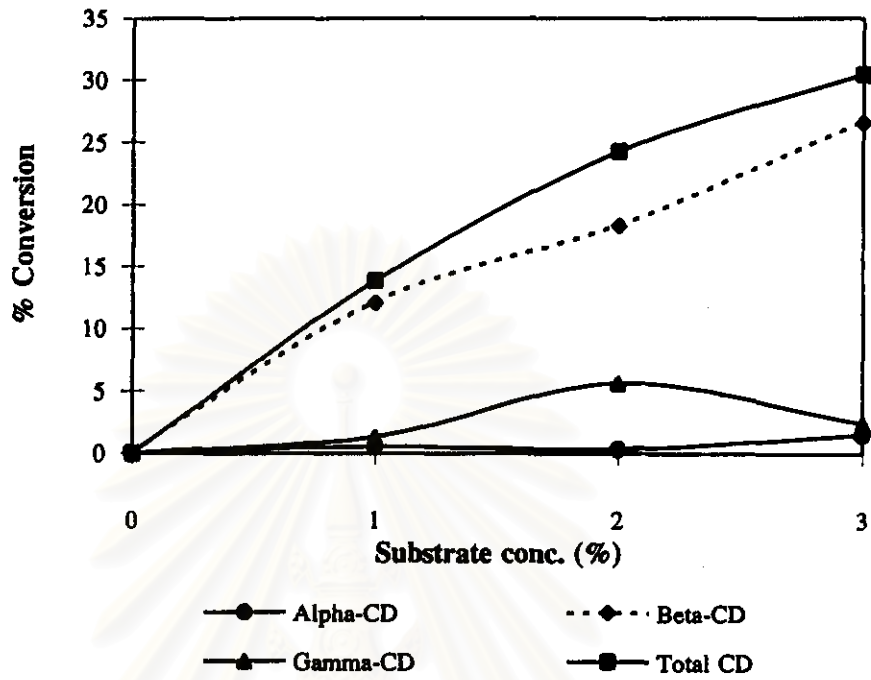
ทดลองแปรผันปริมาณสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ด้วยวิธี CD-TCE เป็น 1.0, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) บ่มกับเอนไซม์ 50 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC จากผลการทดลอง (รูปที่ 19, 20) พบว่าสับสเตรททั้งสองชนิดให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณสับสเตรทเมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด พบว่า α -CD และ β -CD เพิ่มขึ้น ตามปริมาณสับสเตรทโดยมี % conversion สูงสุดที่ปริมาณสับสเตรท 3.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ γ -CD มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากการใช้สับสเตรทจาก 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการใช้สับสเตรท 3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณของ γ -CD กลับลดลง

ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากวัตถุประสงค์ในการทดลองที่ต้องการปรับสภาวะในการให้ผลิตภัณฑ์ γ -CD สูงขึ้น แล้วจึงเลือกปริมาณสับสเตรท 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นสับสเตรทที่ใช้ในการผลิต γ -CD

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 แสดงผลของความเข้มข้นของสับสเตรท Maltotetraose ต่อการผลิต
ไซโคลเดกซ์ทริน โดยบ่มสับสเตรทกับ CGTase (50 units/g starch)
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



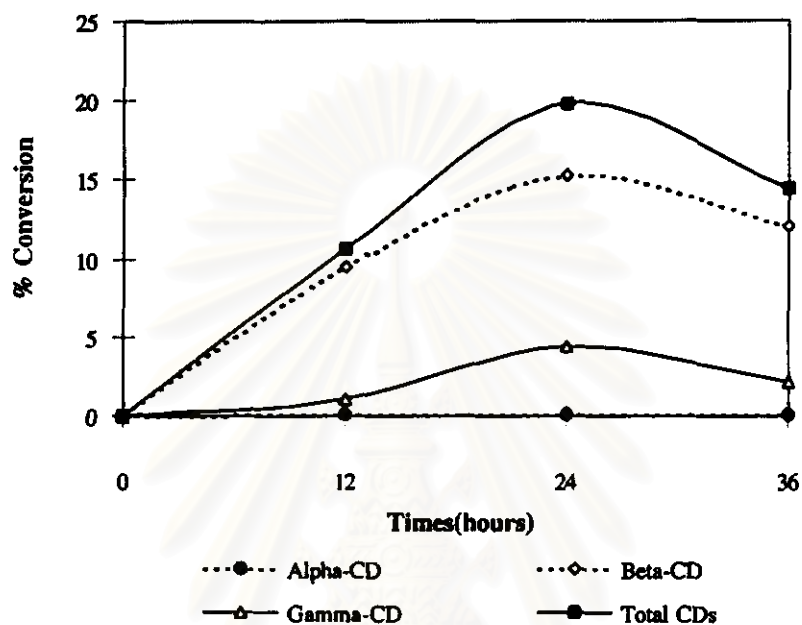
รูปที่ 20 แสดงผลของความเข้มข้นของสับสเตรท Maltopentaose ต่อการ
ผลิตไซโคลเดกซ์ทริน โดยบ่มสับสเตรทกับ CGTase (50 units/g
starch) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำการทดลองโดยใช้สับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose ปริมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มกับ CGTase (50 units/g starch) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยแปรผันระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ตรวจสอบชนิดและปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นด้วยวิธี HPLC จากผลการทดลอง (รูปที่ 21, 22) พบว่าทั้งสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose ได้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง α -CD , β -CD และ γ -CD โดยที่ผลิตภัณฑ์ β -CD และ γ -CD มี % conversion สูงที่สุดขึ้นในช่วงการทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง และลดลงเมื่อถึงให้มีการทำปฏิกิริยาจน 36 ชั่วโมง ส่วน α -CD พบว่าสับสเตรท Maltotetraose และ Maltopentaose ให้ผลิตผลต่ำ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงในปริมาณจากระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามาก

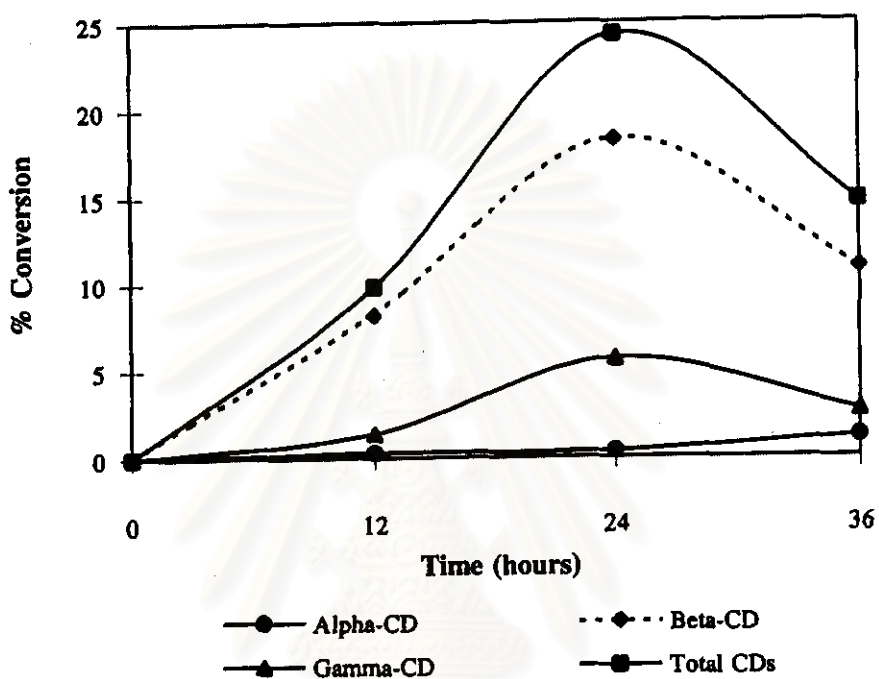
ดังนั้น ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ที่เหมาะสมมากที่สุดคือ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 21

แสดงผลของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน

โดยใช้สับสเตรท Maltotetraose (2.0 %;w/v) บ่มกับ CGTase (50
units/g starch)



รูปที่ 22 แสดงผลของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อการสร้างไซโคล
 เดกซ์ทรินโดยใช้สับสเตอร์ท Maltopentaose (2.0 %;w/v)
 บ่มกับ CGTase (50 units/g starch)