

การผลิตและลักษณะสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสและอินูลิเนสจาก  
*Streptomyces* PC22 และ CH7



นางสาวกัลกิตยา ชนิตรนันต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE ISOMERASE AND  
INULINASE FROM *Streptomyces* PC22 AND CH7



Miss Kankiya Chanitnun

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตและลักษณะสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสและ  
อินนูลินสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7

โดย

นางสาวกัลกิตยา ชนิตรนนต์

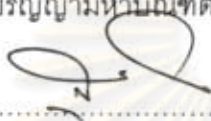
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

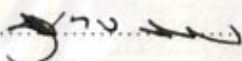
รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

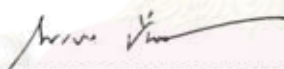


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

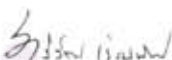
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)



..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)



..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)



..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ขจันฎา โพธิเวชกุล)

กัลกิตยา ชนิตรนันต์ : การผลิตและลักษณะสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสและอินูลิเนสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE ISOMERASE AND INULINASE FROM *Streptomyces* PC22 AND CH7)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 165 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces* PC22 และ CH7 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลเนสและบีตา-ไซโลเตสได้ดีตามลำดับ พบว่าการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสต้องการไซโลสเป็นสารชักนำโดยให้เอนไซม์ 1.2 และ 1.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลส 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้สูงถึง 3.5 และ 5.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้พบว่าเมื่อใช้วัสดุทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบแทนไซแลนบริสุทธิ์ซึ่งมีราคาแพง สามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ได้ในเกณฑ์ดี โดยพบว่ารำข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกข้าวโพด 2.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับ PC22 และ CH7 โดยผลิตเอนไซม์ได้ 2.2 และ 3.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ งานวิจัยนี้ยังทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออีและเซฟาคริล เอส-300 พบว่าได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 20 และ 16 เท่า เหลือแอกติวิตีอยู่ 38.6 และ 64.6 เปอร์เซ็นต์สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันพบว่าเอนไซม์จาก PC22 และ CH7 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันประมาณ 170 กิโลดาลตันและประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE เท่ากันคือ 43.6 กิโลดาลตัน พบว่าเอนไซม์จาก PC22 และ CH7 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 80 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากันคือ 7.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงตั้งแต่ 6.0-8.0 และ 6.0-7.0 ตามลำดับ ค่า  $K_m$  ต่อกกลูโคสและไซโลสของเอนไซม์จาก PC22 เท่ากับ 435.9 และ 177.3 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และสำหรับ CH7 มีค่าเท่ากับ 258.96 และ 82.77 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และพบว่าเอนไซม์เชื้อทั้งสอง ต้องการ  $Mg^{2+}$  และ  $Co^{2+}$  ในการเพิ่มทำงาน โดย  $Co^{2+}$  ที่ 0.1 มิลลิโมลาร์ทั้ง 2 เอนไซม์และ  $Mg^{2+}$  ที่ 5 มิลลิโมลาร์สำหรับ PC22 และ 10 มิลลิโมลาร์สำหรับ CH7 ให้แอกติวิตีสูงสุด งานวิจัยนี้ยังศึกษาถึงความสามารถเบื้องต้นในการผลิตอินูลิเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อมีอินูลินสกัดจากหัวแค้นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตอินูลิเนสได้ประมาณ 0.16 และ 0.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอินูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน อินูลิเนสจาก PC22 และ CH7 มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 และ 55 องศาเซลเซียส และ 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....กัลกิตยา ชนิตรนันต์  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ปีการศึกษา.....2552.....

# # 4972215423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: D-GLUCOSE/XYLOSE ISOMERASE / XYLANOLYTIC ENZYME / INULINASE / AGRICULTURAL RESIDUES / *Streptomyces*

KANKIYA CHANITNUN : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE ISOMERASE AND INULINASE FROM *Streptomyces* PC22 AND CH7. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., 165 pp.

The present work reported D-glucose isomerase production by *Streptomyces* PC22 and CH7, efficient xylanase- and  $\beta$ -xylosidase-producing strains, respectively. The enzyme production required xylose as an inducer and the maximum activities of 1.2 and 1.8 U/mg were obtained from PC22 and CH7, respectively when grown on 2% xylose. With 1% xylan as a carbon source, higher glucose isomerase activities of 3.5 and 5.0 U/mg were produced from PC22 and CH7, respectively. When hemicellulosic agricultural residues were used to replace an expensive xylan, 2% wheat bran was the best carbon source for PC22 whereas 2.5% corn husk was for CH7 giving considerably good levels of the enzyme productions of about 2.2 and 3.1 U/mg, respectively. The enzymes from PC22 and CH7 were then purified by consecutive column chromatography on Macro-prep DEAE and Sephacryl-300 to approximately 20 and 16 folds with recovery yields of 38.6% and 46.6 %, respectively. The apparent molecular weights of the pure enzymes from both strains were similar of 170 kDa estimated by gel filtration and revealed four identical subunits of 43.6 kDa estimated by SDS-PAGE. The enzymes from PC22 and CH7 had temperature optima of 80°C and 85°C, respectively but they had the same pH optimum of 7.0. The enzymes were stable to temperature up to 50°C for PC22 and 60°C for CH7 and to broad ranges of pH from 6.0-8.0 for PC22 and 6.0-7.0 for CH7. The  $K_m$  values of the enzymes for glucose and xylose were 435.9 and 177.3 mM for PC22 and 258.96 and 82.77 for CH7, respectively. The enzymes required both  $Mg^{2+}$  and  $Co^{2+}$  for their activities in which  $Co^{2+}$  at 0.1mM for both enzymes and  $Mg^{2+}$  at 5mM for PC22 and 10 mM for CH7 gave the maximum enzyme activities. Furthermore, the present work also determined inulinase-producing abilities of PC22 and CH7 when grown on inulin extract from Jerusalem artichoke. Both PC22 and CH7 could produce inulinases of about 0.12 and 0.16 U/ml, respectively. Temperature optima of 60° C and 65° and pH optima of 6.0 and 6.5 were for inulinases from PC22 and CH7, respectively.

Department : .....Microbiology.....Student's signature.....Kankiya Chanitnun.....

Field of Study : .....Industrial Microbiology....Advisor's signature.....Paih Pinyu.....

Academic Year : ...2009.....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ฐนิยวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ขจีนาฏ โพธิเวชกุล ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 1 ประจำปีงบประมาณ 2551 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ปาริฉัตร ราวีศรี คุณธีระนันท์ สุวรรณอำไพ คุณกัญชนิกา รุ่งเรืองสุข คุณฐิติรัตน์ เลิศเชาวยุทธ คุณวิไลสา คำจริง คุณรุ่งตระกูล จันทรพันธ์ และคุณนิโลบล เหลลากลม ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา และขอบคุณน้องๆ ที่ห้อง 407 ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาวและคุณพิษณุ พงษ์มณีที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม.....	6
2.1 กลูโคสไอโซเมอเรส.....	6
2.2 แหล่งของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	11
2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส.....	13
2.4 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์.....	15
2.5 น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	17
2.6 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	18
2.7 อินูลิเนส.....	23
3. ปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....	29
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	29
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	33
3.3.1 การเลี้ยง <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 และการเตรียมกลูโคสไอโซเมอเรส.....	33
3.3.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	35
3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสตามวิธี cysteine carbazole sulfufic acid method.....	35
3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน.....	36
3.3.5 ผลของไซโลสต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	36

3.3.6 ผลของไซแลนต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	37
3.3.7 การวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส.....	38
3.3.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952) และ Nelson (1944).....	38
3.3.9 การวิเคราะห์แอกติวิตีของปีตา-ไซโลไซด์.....	39
3.3.10 ผลของวัสดุทางการเกษตรต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	39
3.3.11 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์.....	41
3.3.12 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยวิธีพอลิอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส.....	43
3.3.13 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	44
3.3.14 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7....	46
3.3.15 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินนูลินเนสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 เมื่อมีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน.....	49
3.3.16 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อและความเข้มข้นของอินนูลินต่อการผลิตอินนูลินเนสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 เมื่อมีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน.....	53
3.3.17 สมบัติของอินนูลินเนสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	54
4. ผลการทดลอง.....	55
4.1 รูปแบบการเจริญของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	55
4.2 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	55
4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	57
4.4 ผลของความเข้มข้นของไซโลสและไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	60



4.5 ผลของวัสดุทางการเกษตรต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	65
4.6 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์.....	72
4.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส.....	80
4.8 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	81
4.9 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	89
4.10 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินนูลินของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 เมื่อมีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนเบื้องต้น.....	105
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	112
รายการอ้างอิง.....	131
ภาคผนวก.....	144
ภาคผนวก ก.....	145
ภาคผนวก ข.....	147
ภาคผนวก ค.....	156
ภาคผนวก ง.....	163
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	165

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกลูโคสไอโซเมอเรส.....	11
2.2 น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ.....	17
2.3 คุณสมบัติและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	18
2.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	19
2.5 ค่าความจำเพาะ ( $K_m$ ), ของกลูโคสไอโซเมอเรสของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ	20
2.6 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอินูลิเนส.....	25
2.7 คุณสมบัติและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	28
4.1 ความสามารถในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 เมื่อมีไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	57
4.2 แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส บีตา-ไซโลลิเดส และไซแลเนสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดวัสดุทางการเกษตร.....	68
4.3 แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส บีตา-ไซโลลิเดส และไซแลเนสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 เมื่อเลี้ยงในอาหารแปรผันความเข้มข้นของรำข้าวสาลีและเปลือกข้าวโพด.....	71
4.4 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ให้บริสุทธิ์.....	79
4.5 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7 ให้บริสุทธิ์.....	79
4.6 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity) ของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	97
4.6 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส.....	102
5.1 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตร.....	114
5.2 การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม.....	116

ตาราง	หน้า
5.3 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอไรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	121
5.4 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอไรสบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	125
5.5 เปรียบเทียบค่า $K_m$ , $V_{max}$ และ $K_{cat}$ ของกลูโคสไอโซเมอไรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ...	127



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูป

๘

รูปที่	หน้า
1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน.	4
2.1 ปฏิกริยาไอโซเมอไรเซชันของกลูโคสและไซโลส โดยกลูโคส(ไซโลส)ไอโซเมอเรส.....	6
2.2 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสจากการย่อยสลายแป้งในอุตสาหกรรม.....	9
2.3 การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase).....	10
2.4 โครงสร้างของอินนูลิน.....	23
4.1 รูปแบบการเจริญของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	56
4.2 คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	58
4.3 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	59
4.4 ผลของความเข้มข้นของไซโลสต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	61
4.5 ผลของความเข้มข้นของไซแลนจากเปลือกข้าวไร้ต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	62
4.6 การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส บีตา-ไซโลสดีเอส และไซแลนเนสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	64
4.7 ผลของวัสดุการเกษตรชนิดต่างๆต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	67
4.8 ผลของความเข้มข้นของรำข้าวสาลีต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	69
4.9 ผลของความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพดต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	70
4.10 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรป ดีอีเออี.....	74
4.11 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรป ดีอีเออี.....	75

รูปที่	หน้า
4.12 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp.PC22 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300.....	77
4.13 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp.CH7 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300.....	78
4.14 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	80
4.15 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 ของโปรตีนมาตรฐาน.....	82
4.16 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 ของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	83
4.17 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 ของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	84
4.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300.....	85
4.19 การหาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล.....	87
4.20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส.....	88
4.21 คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	91
4.22 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	92
4.23 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	93
4.24 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7 ต่ออุณหภูมิ.....	94
4.25 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ต่อความเป็นกรดต่าง.....	95

รูปที่	หน้า
4.26 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7 ต่อความเป็นกรดต่าง.....	96
4.27 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า $K_m$ กลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 ต่อกกลูโคสและไซโลส.....	99
4.28 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า $K_m$ กลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7 ต่อกกลูโคสและไซโลส.....	100
4.29 ผลของความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	103
4.30 ผลของความเข้มข้นของโคบอลต์อิออนต่อแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	104
4.31 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	106
4.32 ผลของความเข้มข้นอินูลินต่อการผลิตอินูลิเนสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	107
4.33 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก <i>Streptomyces</i> PC22 และ CH7.....	109
4.34 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	110
4.35 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	111

# บทที่ 1

## บทนำ

### ประวัติความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฟรักโทส (fructose) หรือลิวูโลส (levulose) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม พบมากในน้ำผึ้งและผลไม้หลายชนิด (Bucke, 1981) ฟรักโทสมีความหวานสูงสุดในกลุ่มน้ำตาลธรรมชาติ โดยมีความหวานเป็น 1.3 เท่าของซูโครสและ 1.7 เท่าของกลูโคส นอกจากนี้ยังมีสมบัติที่ดีทั้งทางด้านกายภาพและทางเคมี คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และมีความดันออสโมติกสูง ทำให้สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดีและยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียสได้โดยไม่เกิดการตกผลึก (Andres, 1987) จึงเป็นที่นิยมใช้ฟรักโทสแทนซูโครสในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

การผลิตฟรักโทสในอุตสาหกรรมอาหารนั้น เดิมใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสในภาวะที่เป็นด่าง (alkaline isomerization) และอุณหภูมิสูง (Speck, 1958) เรียกปฏิกิริยานี้ว่า “Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Transformation” แต่วิธีนี้ไม่นิยมใช้ผลิตฟรักโทสในระดับอุตสาหกรรม เพราะปฏิกิริยาดังกล่าวไม่จำเพาะ อัตราการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสต่ำ และได้สารประกอบอื่นที่ไม่ต้องการมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เช่น ฟไซโคส (psicose) และแมนโนส ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความหวานลดลง และทำให้เกิดสีและกลิ่นที่ไม่ต้องการ จึงต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารเจือปนเหล่านี้ (Shehalata และคณะ, 1996) ปัจจุบันการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสทำโดยใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีความจำเพาะสูงไม่ให้สารประกอบอื่นที่ไม่ต้องการ และหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้ปฏิกิริยาทางเคมี เช่น สามารถกระทำที่อุณหภูมิสูง และ pH ต่ำๆ ได้ (Amira และคณะ, 1987)

การผลิตฟรักโทสในอุตสาหกรรม ทำโดยการเปลี่ยนกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งให้เป็นฟรักโทสด้วยการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และกลูโคสไอโซเมอเรส (glucose isomerase) ซึ่งกลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส โดยให้ฟรักโทสที่มีความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 42 - 45 เปอร์เซ็นต์ (Kochhar และคณะ, 1997)

กลูโคสไอโซเมอเรส หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) เนื่องจากมีความจำเพาะกับสับสเตรท 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคสและไซโลส โดยเร่งปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชันของกลูโคสไปเป็นฟรักโทส และไซโลสไปเป็นไซลูลูส (Marshall และ Kooi, 1957)

กลูโคสไอโซเมอเรสผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิด แต่การสร้างเอนไซม์ต้องถูกชักนำด้วยไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในอุตสาหกรรม ปัจจุบันมีรายงานถึงการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสของจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น *Streptomyces* sp. EC10 (Belfaquir และ Penninckx, 2000) ซึ่งพบว่าเชื้อนี้ผลิตเอนไซม์ที่มีสมบัติเป็นทั้งปีตา-ไซโลซิเดสและไซโลสไอโซเมอเรส และเร็วๆนี้ก็มีรายงานการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Bacillus thermoantarcticus* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (Calik และคณะ, 2009)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช โดยโครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ประกอบด้วยไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา-1,4-ไซโลซิดิก ( $\beta$ -1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (Ebringerova และ Heinze, 2000) และมีสารประกอบอื่นมาเชื่อมต่อเป็นหมู่ข้างเคียงเช่น หมู่อะราบิโนส หมู่กลูคูโรนิก และหมู่แอสีติล (Puls และ Schuseil, 1993) โดยไซแลนจากพืชแต่ละชนิดมีหมู่ข้างเคียงชนิดต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยไซแลนในไม้เนื้ออ่อนและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่น พืชจำพวกหญ้าได้แก่ ฟางข้าว กล้วยพืชจำพวกเปลือกข้าวโอ๊ต รำข้าวสาลี จะมีอะราบิโนสเป็นหลัก (Schyns และคณะ, 1994) ส่วนไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีหมู่แอสีติลเป็นหลัก (Degrassi และคณะ, 2003)

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายได้โดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) (Tsao และ Chiang, 1983) ซึ่งการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์นั้นเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงกว่าและไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างอีกทั้งยังได้ไซโลสในปริมาณที่สูง ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายพันธะปีตา-1,4-ไซโลซิดิกของสายหลัก ให้ได้ไซโลส (xylose) หรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่มใหญ่คือ

1. เอนโดไซแลเนส (endoxylanase) หรือ 1,4-ปีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4- $\beta$ -D-xylan-xylanohydrolase: EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-ปีตา-ดี-ไซโลซิดิกแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายใน (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert และคณะ, 1993)



2. บีตา-ไซโลลิเดส ( $\beta$ -xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4- $\beta$ -D-xylan-xylohydrolase: EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซดีนโอลิโกแซคคาไรด์สั้นๆ ที่ละหน่วยจากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards, 1976)

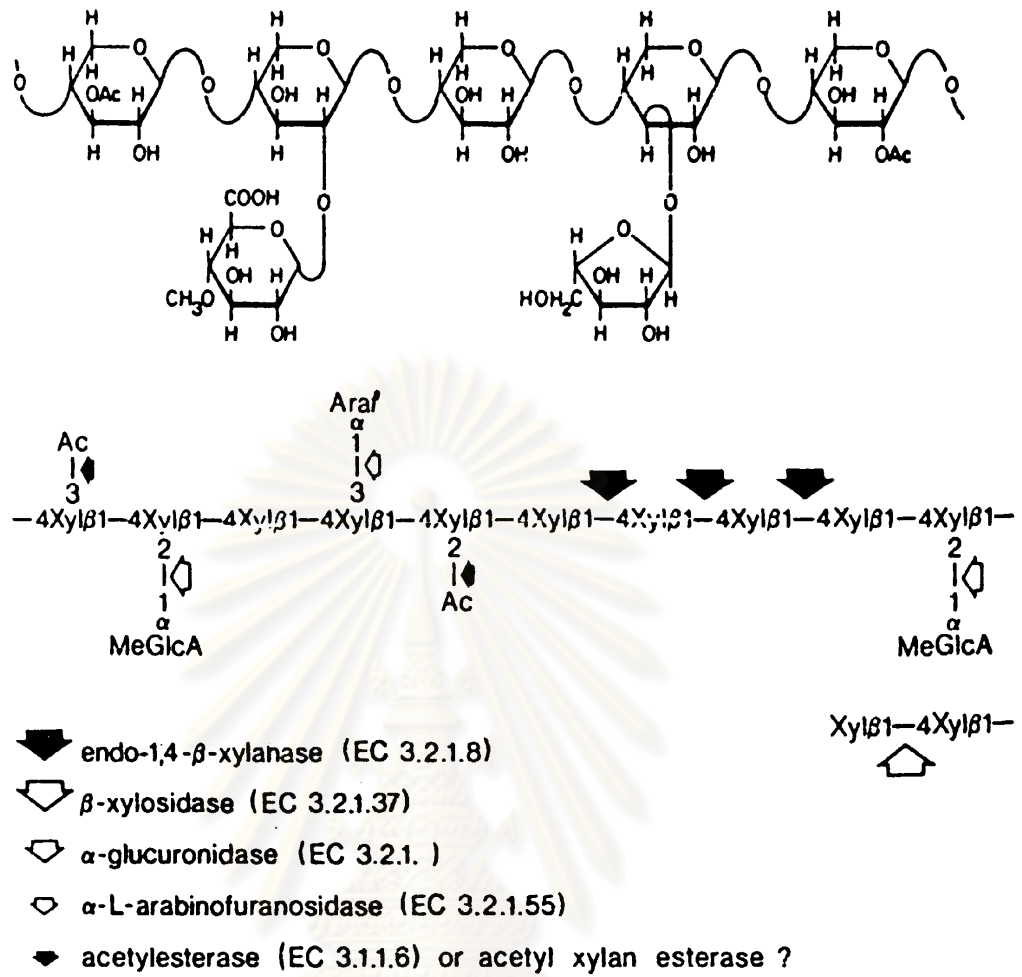
เนื่องจากไซแลนมีโครงสร้างซับซ้อน หมู่ข้างเคียงมีส่วนบดบังการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายสายหลัก ดังนั้นการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์จึงต้องอาศัยเอนไซม์ที่สามารถย่อยหมู่ข้างเคียงร่วมด้วยได้แก่

- แอซีติล (ไซแลน) เอสเทอเรส (acetyl (xylan) esterase: EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะ บีตา-1,2 หรือ บีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่แอซีติลกับสายหลัก ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแอซีติก (Johnson และคณะ, 1988)

- แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดส ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase: EC 3.2.1.55) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่นอนรีดิวซ์ แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิล ได้อะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Kormelink และคณะ, 1993)

- แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส ( $\alpha$ -D-glucuronidase: EC 3.2.1.139) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด จากโมเลกุลของไซแลน แต่หมู่แอลฟา-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิดพบว่ามีอยู่ในปริมาณน้อยคือ ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยด่างจะมี 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิดเหลืออยู่เพียง 0.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณไซโลสทั้งหมดในไซแลน (Teleman และคณะ, 2001) ดังนั้นแอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส จึงจัดว่ามีบทบาทสำคัญน้อยกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นในกลุ่มย่อยสลายไซแลนจากเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถแสดงแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนได้ดังแสดงในรูปที่ 1.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

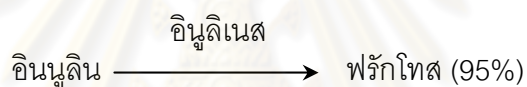


รูปที่ 1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่แอซีติล
Araf	แทน	แอล-อะราบินโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	กรด 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิก
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

สำหรับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนได้หลายชนิด ได้แก่ ไซแลเนส แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดส และอะซีติลเอสเทอร์เลส (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998; Lauruengtana และ

Pinphanichakarn, 2006; Chungool และคณะ, 2008) และ *Streptomyces* sp. CH7 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตบีตา-ไซโลซิเดส (Pinphanichakarn, และคณะ, 2004) จุลินทรีย์ดังกล่าวแยกได้จากดิน และเจริญได้ในวัสดุการเกษตรที่มีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ โดยสามารถย่อยสลายไซแลนและเฮมิเซลลูโลสให้เป็นไซโลสได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความสามารถของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตฟรักโทสจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งแล้ว ปัจจุบันยังพบว่าเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ อินูลิเนส (inulinase) ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจสูงเพื่อนำมาใช้ผลิตฟรักโทสโดยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินูลิน ปัจจุบันมีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตอินูลิเนสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบ และเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายอินูลินโดยใช้ปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวให้ฟรักโทสได้สูงถึง 95% (Guirard และ Galzy, 1981; Pandey และคณะ, 1999; Singh และคณะ, 2006)



อินูลินเป็นพอลิฟรักแทนที่พบมากในพืชหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงของฟรักโทสที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-2,1 ( $\beta$ -2,1 linkage) โดยมีโมเลกุลของซูโครสเชื่อมอยู่ปลายสาย (Vandamme และ Derycke, 1983) นอกจากนี้ยังพบว่าอินูลินถูกสะสมอยู่ในหัวหรือรากของพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม กระเทียม รากต้นรักเร่ หัวชิโครี (chicory root) และรากของ Jerusalem artichoke เป็นต้น (Pandey และคณะ, 1999; Rocha และคณะ, 2006)

Jerusalem artichoke มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. มีอินูลินสะสมสูงถึง 14-19 % (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (Lingyun และคณะ, 2007) พืชนี้เป็นพืชล้มลุกมีความใกล้เคียงกับทานตะวัน (*Helianthus annuus*) มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปอเมริกาเหนือ ปัจจุบันได้มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยให้ชื่อว่า แก่นตะวัน และมีการส่งเสริมการปลูกกับเกษตรกรทั่วไป (นิมิตร วรสุตร และสนั่น จอกลอย, 2549) เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสุขภาพ พืชสมุนไพรสัตว์ และพืชพลังงานทดแทน

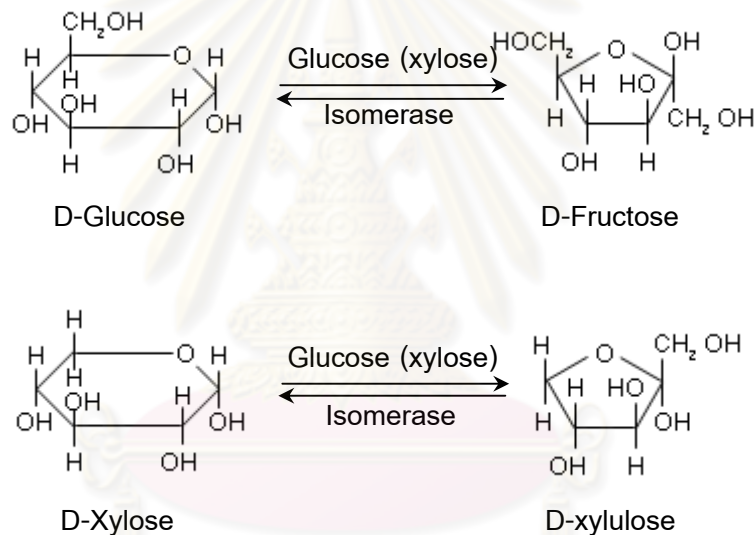
งานวิจัยนี้ยังมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงความสามารถเบื้องต้นของ *Streptomyces* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในการผลิตอินูลิเนสเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ส่วนของพืชที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบ เช่น หัวของแก่นตะวัน เป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งจะศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 กลูโคสไอโซเมอเรส

กลูโคสไอโซเมอเรส หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) (E.C.5.3.1.5) เร่งปฏิกิริยาไอโซเมโรเซชันของกลูโคสไปเป็นฟรุคโทส และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาไอโซเมโรเซชันของไซโลสไปเป็นไซลูลูส (Marshall และ Kooi, 1957) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



**รูปที่ 2.1** ปฏิกิริยาไอโซเมโรเซชันของกลูโคสและไซโลส โดยกลูโคส(ไซโลส)ไอโซเมอเรส (Marshall และ Kooi, 1957)

กลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมเช่นเดียวกับ อะไมเลส และ โปรตีเอส (Wiseman, 1975) จึงมีรายงานการค้นพบกลูโคสไอโซเมอเรสหลายชนิด อาจแบ่งกว้างๆได้ 4 ประเภท คือ

ประเภทที่ 1 คือ ไซโลสไอโซเมอเรส (D-xylose ketol-isomerase. E.C.5.3.1.5) ซึ่งถูกค้นพบโดย Marshall และ Kooi ในปี ค.ศ. 1957 เป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas hydrophila* ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูลูส และเปลี่ยนกลูโคสไปเป็น

ฟรักโทสได้ แต่ประสิทธิภาพการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสต่ำกว่าการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลสถึง 160 เท่า จึงไม่นิยมใช้กลูโคสไฮโซเมอเรสจาก *Pseudomonas hydrophila* ในทางการค้า และการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดนี้ต้องการไซโลสเป็นสารชักนำ ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์นี้คือ อุณหภูมิ 42-43 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 8.5

Tsumura และ Sato (1965) ได้แยกสเตรปโตไมซีสจากแหล่งดินประเทศญี่ปุ่น พบว่า *Streptomyces phaeochromogenes* SK สามารถสร้างไซโลสไฮโซเมอเรสได้โดยมีไซโลสเป็นสารชักนำ และพบว่าในการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดนี้ต้องการไอออนบวกสองประจุ (divalent cation) 2 ชนิดร่วมกัน คือแมกนีเซียมไอออน และโคบอลต์ไอออน โดยโคบอลต์ไอออนช่วยป้องกันไม่ให้เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติโดยความร้อน อย่างไรก็ตามเอนไซม์นี้มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานเป็นต่าง (pH 9.3-9.5) ซึ่งทำให้มีสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการในปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส จึงไม่นิยมใช้เอนไซม์นี้ในทางการค้า

ต่อมานักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้ค้นพบสเตรปโตไมซีสอีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ เช่น *Streptomyces bikiniensis*, *Streptomyces flavogriseus* และ *Streptomyces olivochromogenes* และเอนไซม์ไซโลสไฮโซเมอเรสจากสเตรปโตไมซีสเหล่านี้มีข้อดีคือ สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิสูงๆและทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง ซึ่งป้องกันการเกิดสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการในปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสได้ (Bucke, 1977)

ประเภทที่ 2 คือ กลูโคสฟอสเฟตไฮโซเมอเรส (D-glucose-6-phosphate ketol-isomerase, E.C.5.3.1.9) ซึ่งถูกค้นพบโดย Nataka และ Coshimura ในปี ค.ศ. 1963 เป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Escherichia intermedia* ซึ่งไม่ต้องการไซโลสเป็นสารชักนำในการสร้างเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ต้องการอาร์ซิเนต (arsenate) ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส โดยมีภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 เนื่องจากเอนไซม์สามารถเปลี่ยนกลูโคส-6-ฟอสเฟตไปเป็นฟรักโทส-6-ฟอสเฟตได้ด้วย จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า กลูโคส-6-ฟอสเฟตไฮโซเมอเรส

ประเภทที่ 3 คือ กลูโคสไฮโซเมอเรส (D-glucose ketol-isomerase, E.C.5.3.1.18) ซึ่งถูกค้นพบโดย Takasaki และ Tanade ในปี ค.ศ. 1962 เป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus megaterium* A1 โดยเอนไซม์นี้ให้ปฏิกิริยาจำเพาะในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสเท่านั้น การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ  $\text{NAD}^+$  โดยมีภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ pH 7.8

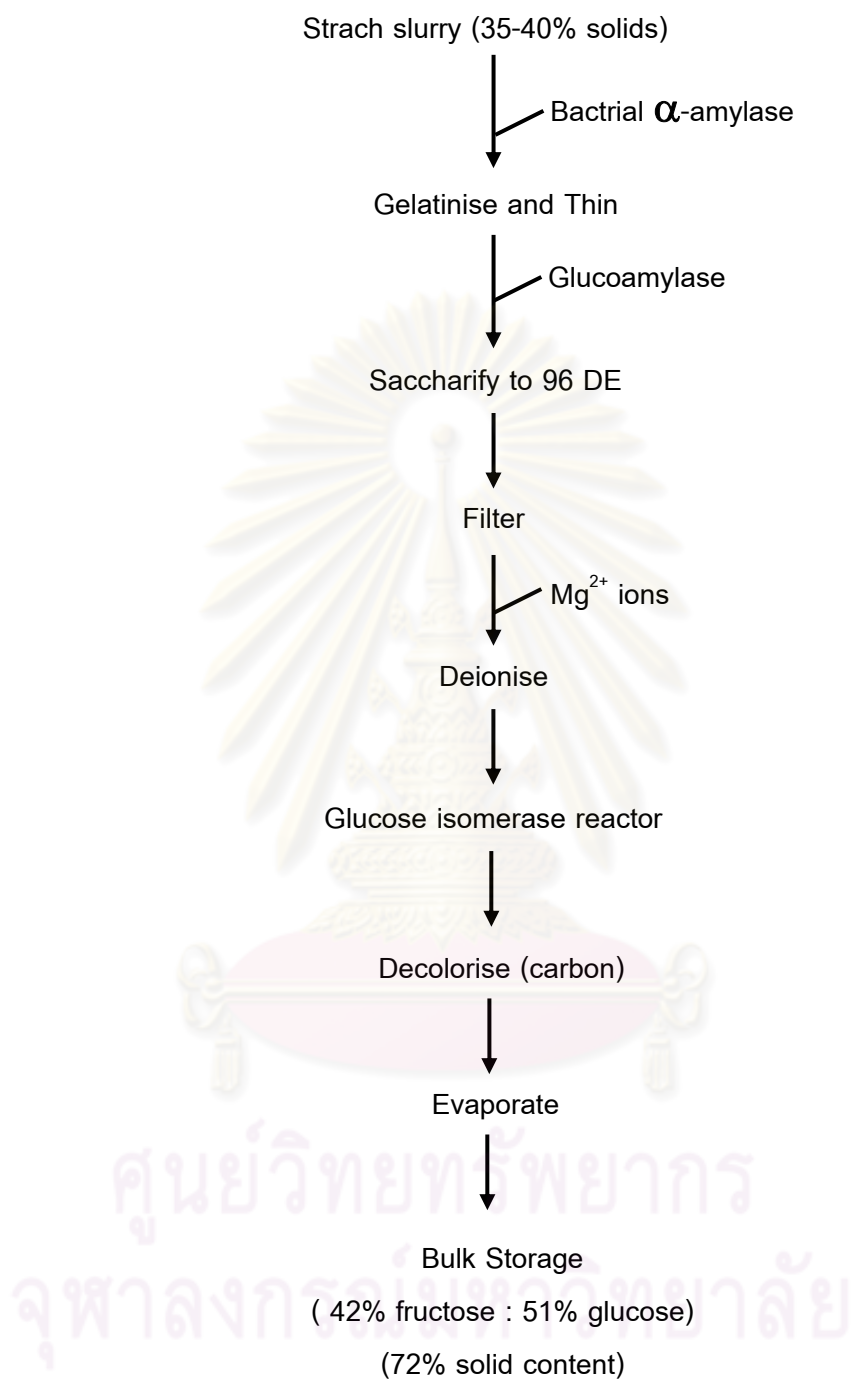
ประเภทที่ 4 คาดว่าเป็นกลุ่มย่อย (subclass) ของกลูโคสไอโซเมอเรส (D-glucose ketol-isomerase, E.C.5.3.1.18) ซึ่งถูกค้นพบโดย Takasaki และ Tanade ในปี ค.ศ. 1964 เป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Paracolobacterium aerogenoides* ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนกลูโคสและแมนโนส (mannose) ไปเป็นฟรักโทสได้ การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ  $\text{NAD}^+$  และแมกนีเซียมไอออนในปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสและแมนโนสไปเป็นฟรักโทสโดยมีภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7.5

เอนไซม์ในกลุ่มกลูโคสไอโซเมอเรสทั้ง 4 ประเภทที่กล่าวมาข้างต้นนั้น พบว่าเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในทางการค้าคือ ไชโลสไอโซเมอเรส โดยเฉพาะจากสเตรปโตมัยซีส เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถให้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสได้ที่อุณหภูมิสูงและค่าความเป็นกรดต่างที่เป็นกลาง นอกจากนี้ยังมีความคงทนความร้อน (heat stability) สูง ทำให้ป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ และการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ไม่ต้องการปัจจัยร่วม (cofactor) เช่น  $\text{NAD}^+$  หรือ อาร์ซิเนท จากคุณสมบัติเหล่านี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตฟรักโทสไซรัปมาก (Robinson, 1975)

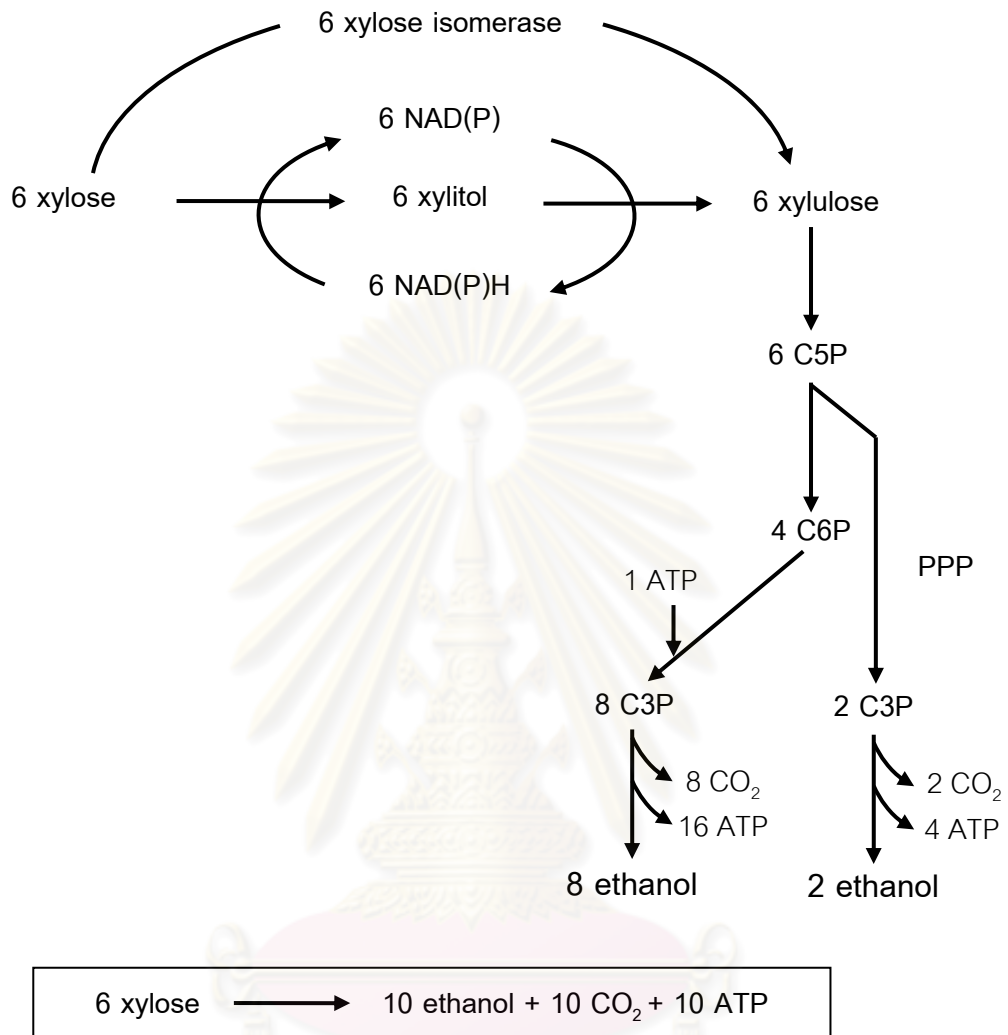
### 2.1.2 ประโยชน์ของกลูโคสไอโซเมอเรส

กลูโคสไอโซเมอเรสมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส (high fructose syrup) เนื่องจากเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้เปลี่ยนกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งโดยแอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ไปเป็นฟรักโทส แต่ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาผันกลับจึงให้ฟรักโทสที่ความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 42 - 45 เปอร์เซ็นต์ (Kochhar และคณะ, 1997) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 นอกจากนี้กลูโคสไอโซเมอเรสยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมและลูกกวาด (Chen, 1980)

ปัจจุบันกลูโคสไอโซเมอเรสยังมีบทบาทในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ เนื่องจาก *Saccharomyces cerevisiae* ทั่วๆ ไป สามารถหมักกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น ไชโลสไปเป็นเอทานอลได้ (Saha, 2003) ดังนั้นกลูโคสไอโซเมอเรสจึงทำหน้าที่เปลี่ยนไชโลสไปเป็นเป็นไชลูโลสก่อนที่ยีสต์ทั่วๆ ไปสามารถหมักไชลูโลสเป็นเอทานอลได้ (Gong และคณะ, 1981) จึงมีการใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยทรานสฟอร์มยีนประมวลรหัสไชโลสไอโซเมอเรสจากยีสต์เข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้สามารถหมักไชโลสเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสจากการย่อยสลายแป้งในอุตสาหกรรม (Buck, 1977)



**รูปที่ 2.3** การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดย *Saccharomyces cerevisiae* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) (Kuyper และคณะ, 2004)

C3P คือ triose-3-phosphate

C5P คือ pentose-5-phosphate

C6P คือ hexose-6-phosphate

PPP คือ pentose phosphate pathway



นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำกลูโคสไอโซเมอเรสไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆอีก ได้แก่ Ishihara และคณะ (2002) รายงานการนำไซโลสไอโซเมอเรสไปใช้ในการผลิตเซลลูโลสโดย acetic acid bacteria เมื่อมีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยไซโลสไอโซเมอเรสจะทำหน้าที่เปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส เพื่อให้แบคทีเรียนำไปใช้ในการผลิตเซลลูโลสได้สูงขึ้น Pastinen และคณะ (1999) รายงานถึงบทบาทของไซโลสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces rubiginosus* ในปฏิกิริยาไอโซเมอเรชัน ไซโลสไปเป็นไซลูโลสและไลโซส ตามลำดับ และปฏิกิริยาไอโซเมอเรชันอะราบิโนสไปเป็น ไรมูโรสและไรโบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการผลิตสารเคมีที่มีราคาแพง เช่น แอล-ไรโบส และ แอล-ไรบูโลส จากสารตั้งต้นราคาถูก เช่น แอล-อะราบิโนสได้

## 2.2 แหล่งของกลูโคสไอโซเมอเรส

กลูโคสไอโซเมอเรสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และยีสต์ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีกสร่างและเก็บเอนไซม์ไว้ในเซลล์ (intracellular enzyme) แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เช่น *Streptomyces glucescens* (Weber, 1974) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกลูโคสไอโซเมอเรส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Amore และ Hollenberg, 1989
<i>Arthrobacter</i> sp. NCIM 2934	Prabhakar และ Raju, 1993
<i>Arthrobacter</i> sp. NRRL B-3728	Smith และคณะ, 1991
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	Chauthaiwale และคณะ, 1994
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	Lama และคณะ, 2001
<i>Bacillus thermoantarcticus</i> DSMZ 9572	Calik และคณะ, 2009
<i>Candida boidinii</i>	Vongsuvanlert และ tani, 1988
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Lactobacillus bifementans</i>	Givry และ Duchiron, 2007
<i>Lactobacillus lactis</i>	Park และ Batt, 2004
<i>Pseudomonas hydrophila</i>	Marshall และ Kooi, 1957

## ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. C <sub>7</sub>	Amira และคณะ, 1987
<i>Streptomyces</i> sp. EC10	Belfaquih และ Penninck, 2000
<i>Streptomyces cyaneus</i> 190-1	Teeradakorn และคณะ, 1998
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	Chen และคณะ, 1979
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	Kaneko และคณะ, 2000
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Carrell และคณะ, 1984
<i>Streptomyces thermonitrificans</i>	Deshmukh และคณะ, 1994
<i>Streptomyces violaceoniger</i>	Glasfeld และคณะ, 1988
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Callens และคณะ, 1986
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. B6A	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL-YS 489	Liu และคณะ, 1996
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigen</i>	Meng และคณะ, 1993
<i>Thermotoga maritime</i>	Brown และคณะ, 1993
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Vieille และคณะ, 1995
<i>Thermus aquaticus</i>	Lehmbacher และ Bisswanger, 1990
<i>Thermus thermophilus</i>	Dekker และคณะ, 1991

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์นั้นต้องการไซโลส (xylose) เป็นสารชักนำ (Marshall และ Kooi, 1957) ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จึงต้องเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังรายงานของ Yoshimura และคณะ (1966) ศึกษาการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus coagulans* HN-68 พบว่าเมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ อีก 20 ชนิด เชื้อสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูง

Chen และคณะ (1979) ศึกษาการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces flavogriseus* ที่แยกได้จากดิน พบว่าสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสที่เก็บไว้ในเซลล์ (intracellular enzyme) ได้ 1.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซโลสเป็นสารชักนำ และพบว่า *Streptomyces flavogriseus* ยังสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ดีในอาหารที่มีเฮมิเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ คอรัลสตีพลิเกอร์ (corn steep liquor) อีออนของแมกนีเซียม แมงกานีสและเหล็กช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้

Younas และคณะ (1982) ศึกษาการเจริญและการสร้างเอนไซม์นี้โดย *Streptomyces albus* WRL-7 ในระดับขวดเขย่า พบว่าวัตถุดิบที่มีน้ำตาลไซโลสและไซแลนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเป็นองค์ประกอบ จัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด

Bok และคณะ (1984) คัดแยก *Streptomyces* sp. 260 จากดินของพื้นที่การเกษตรมาทดสอบการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญและผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลส

Meng และคณะ (1993) พบว่า *Thermoanaerobacterium thermosulfurigen* สามารถผลิตดี-ไซโลสไอโซเมอเรส (D-xylose isomerase) ที่ทนความร้อน และสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 80 – 90 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ต้องการแมกนีเซียมอีออนเพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์ในภาวะอุณหภูมิสูง

Prabhakar และ Raju (1993) ศึกษาการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Arthrobacter* sp. NCIM 2934 พบว่าสามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 11.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลส 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ เปปโทนและสารสกัดจากยีสต์ และพบว่าการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของไซโลสเพิ่มขึ้น

Kaneko และคณะ (2000) ศึกษาลักษณะสมบัติกัญโคสไฮโซเมอเรสจาก *Streptomyces olivaceoviridis* สายพันธุ์ E86 พบว่ามีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรดสูง (pH5) นั่นคือ เอนไซม์ดังกล่าวไม่สูญเสียสภาพการทำงาน ด้วยสมบัตินี้ทำให้สามารถผลิตน้ำตาลฟรักโทสได้มากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด

เนื่องจากไซโลสเป็นน้ำตาลที่มีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสในอุตสาหกรรม จึงมีรายงานศึกษาการใช้ไซแลน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์กลุ่มเฮมิเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรส ได้แก่ Teeradakorn และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสจาก *Streptomyces fusant* D3 ที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสของ *Streptomyces cyaneus* 190-1 และ *Streptomyces greiseoruber* 42-9 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสและไซแลเนส ตามลำดับ พบว่า *Streptomyces fusant* D3 สามารถผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสได้ 1.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนจากไม้เบิร์ช 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

Belfaquih และ Penninckx (2000) ศึกษาการผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสและปีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC10 พบว่าสามารถผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสและปีตา-ไซโลสิเดสได้สูงถึง 8.78 และ 43.93 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนจากไม้เบิร์ชเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Manhas และ Bala (2004) พบว่าแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ และ *Streptomyces* spp. 8 สายพันธุ์ สามารถผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสได้ โดย *Streptomyces* spp. สามารถผลิตได้ 0.01-0.03 หน่วยต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 0.02-0.29 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ *Streptomyces* spp. ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารที่ประกอบด้วยข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ pH 6-6.5 ทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์เพราะวัสดุทางการเกษตรหลายชนิดมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ฟางข้าว กากเมล็ดฝ้าย เปลือกข้าวโพด และ ชังข้าวโพด

Calik และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสจาก *Bacillus thermoantarcticus* พบว่าสามารถผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสได้ 1.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสได้เพียง 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่า *Bacillus thermoantarcticus* ผลิตกัญโคสไฮโซเมอเรสได้สูงสุด 1.63 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในไซแลนจากไม้เบิร์ช 1.06 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 2.4 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์

กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ส่วนมากจะถูกนำไปใช้ในรูปแบบที่มีการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพและราคาถูก ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นมีความสำคัญต่อการศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ เช่น โครงสร้าง หน้าที่และสมบัติของเอนไซม์

กลูโคสไอโซเมอเรสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างแล้วเก็บไว้ในเซลล์ (intracellular enzyme) ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์นี้ต้องมีการสกัดแยกเอนไซม์จากเซลล์ก่อน โดยทั่วไปจะใช้วิธีการทำให้เซลล์แตก ซึ่งอาจใช้วิธีการทางกล เช่น การใช้คลื่นเสียง การบด หรือการกวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน หรือใช้วิธีทางเคมีทำให้เกิดจากสลายตัวของผนังเซลล์ (autolysis) เช่น การใช้ไลโซไซม์ โทลูอิน ซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethyl ammonium bromide) และอื่นๆ

การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์มีหลายขั้นตอน ได้แก่ การใช้ความร้อน การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อะซีโตน แมกนีเซียมออกไซด์ หรือ เกลือของแมกนีเซียมออกไซด์ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) และเจลฟิวเตรชัน (gel filtration) (Chen, 1980) นอกจากนี้มีรายงานการใช้โครมาโทกราฟีแบบดูดซับโดยใช้ตัวดูดซับเป็นไซลิทอล-เซฟารอส (xylytol-sepharose) เพื่อทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* spp. ให้บริสุทธิ์ หรือใช้ไบโอเจล-พี 100 (Biogel-P 100) ที่มีไซโลสหรือแมนนิทอลตรึงอยู่บนซิลิโครมเป็นตัวดูดซับ และยังมีรายงานถึงการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. NCIM 2730 ด้วยวิธีรวดเร็วโดยการโครมาโทกราฟีแบบการดูดซับโดยใช้ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (Ghatge, 1991)

Smith และคณะ (1991) ศึกษาการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Arthrobacter* sp. NRRL B-3728 ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์ด้วย DNase และ ไลโซไซม์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการโครมาโทกราฟีบนดีเออี-เซฟาคริล (DEAE-Sephacel) ไดอะไลส์แล้วนำไปทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตรชัน (gel filtration) พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 19.8 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลือ 50.0 เปอร์เซ็นต์

Inyang และคณะ (1995) ศึกษาการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PLC ให้บริสุทธิ์โดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนน้ำใสไปทำโครมาโทกราฟีบนดีเออี-เซลลูโลส (DEAE-Cellulose) รวมส่วนที่มีแอกติวิตีไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ไดอะไลส์แล้วนำไปทำโครมาโทกราฟีบน

เซฟาโรส ซีแอล 2 บี (Sephacryl CL 2B) และสุดท้ายทำโครมาโทกราฟีชนิด ฟาสต์โปรตีนลิควิด (Fast Protein Liquid Chromatography) ที่มีฟินิล ซูเปอร์โรส (Phenyl Superose) เป็นตัวกลาง พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.3 เท่า และมีแอกติวิตีคิงเหลือ 10.0 เปอร์เซ็นต์

Liu และคณะ (1996) ศึกษาการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Thermoanaerobacterium* sp. JW/SL-YS 489 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 65-85 เปอร์เซ็นต์ ไดอะไลส์แล้วนำไปทำโครมาโทกราฟีบนดีเออี-เซฟาโรส (DEAE-Sepharose) ซูเปอร์โรส-12 เอชอาร์ (Superose-12 HR) และ ฟินิล-เซฟาโรส (Phenyl-Sepharose) ตามลำดับ พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 28.2 เท่า และมีแอกติวิตีคิงเหลือ 46.0 เปอร์เซ็นต์

Lama และคณะ (2001) ศึกษาการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus thermoantarcticus* ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์ด้วย DNase และ โลโซไซม์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บั่นเหวี่ยงนำส่วนน้ำใสไปไดอะไลส์ จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นๆ ต่อมานำไปทำโครมาโทกราฟีบนคิว-เซฟาโรส ฟาสท์ (Q-Sepharose Fast Flow) เซฟาคริล เอส-200 (Sepacryl S-200) และ ฟินิล-เซฟาโรส ซีแอล-4บี (Phenyl-Sepharose CL-4B) ตามลำดับ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีชนิด FPLC (Fast-performance liquid chromatography) ที่มีโมโน คิว เอชอาร์/5/5 (Mono Q HR/5/5) เป็นตัวกลาง พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 73 เท่า และมีแอกติวิตีคิงเหลือ 23.3 เปอร์เซ็นต์

Borgi และคณะ (2004) ศึกษาการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. SK ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40-60 เปอร์เซ็นต์ ไดอะไลส์แล้วทำให้โปรตีนเข้มข้นโดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่านโดยกักโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตันไว้ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีชนิด FPLC (Fast-performance liquid chromatography) ที่มียูโน-คิว 12 (UNO-Q 12) เป็นตัวกลาง พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 21.5 เท่า และมีแอกติวิตีคิงเหลือ 17.6 เปอร์เซ็นต์

## 2.5 น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรส

มีรายงานการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีขนาดแตกต่างกันและยังประกอบด้วยจำนวนหน่วยย่อยต่างๆกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน) (เจลฟิวเทรชั่น)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Arthobacter</i> sp. NRRL B3728	185,000	(4), 47,000	Smith และคณะ, 1991
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	160,000	(3), 50,000	Chauthaiwale และ Rao, 1994
<i>Bacillus</i> sp. TX-3	140,000	(3), 45,000	Kitada และคณะ, 1989
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	200,000	(4), 47,000	Lama และคณะ, 2001
<i>Hordeum vulgare</i>	100,000	(2), 55,000	Kristo และคณะ, 1996
<i>Streptomyces</i> sp. PLC	183,000	(4), 46,000	Inyang และคณะ, 1995
<i>Streptomyces</i> sp. SK	180,000	(4), 43,000	Borgi และคณะ, 2004
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.B6A	200,000	(4), 50,000	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS-489	200,000	(4), 50,000	Liu และคณะ, 1996
<i>Thermotoga neapolitana</i>	200,000	(4), 50,000	Hess และคณะ, 1998
<i>Thermus aquaticus</i> HB8	196,000	(4), 50,000	Lehmacher และ Bisswanger, 1990

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงจำนวนหน่วยย่อย

## 2.6 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรส

### 2.6.1 คุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีคุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.3** คุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
	คุณภูมิ (องศา เซลเซียส)	ความเป็น กรดต่าง	
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	85	8.0	Chauthaiwale และ Rao, 1994
<i>Bacillus</i> sp. TX-3	80	7.5-9.0	Kitada และคณะ, 1996
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	90	7.0	Lama และคณะ, 2001
<i>Chainia</i> sp.	60	9.0	Khire และคณะ, 1990
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	80	7.0-7.5	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Hordeum vulgare</i>	60	7.0-7.9	Kristo และคณะ, 1996
<i>Streptomyces</i> sp. PLC	80	7.0	Inyang และคณะ, 1995
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	80	8.0-10.0	Suekane และคณะ, 1978
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	60-85	7.0	Raykovska และคณะ, 2001
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.B6A	80	7.0-7.5	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS-489	80	6.8	Liu และคณะ, 1996
<i>Thermotoga neapolitana</i>	95	7.1	Hess และคณะ, 1998
<i>Thermotoga maritima</i>	105-110	6.5-7.5	Brown และคณะ, 1993
<i>Thermus aquaticus</i> HB8	85	7.5	Lehmacher และ Bisswanger, 1990



## 2.6.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างของกลูโคสไอโซเมอเรส

กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4

**ตารางที่ 2.4** ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความเสถียรต่อ		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ความเป็น กรดต่าง	
<i>Bacillus</i> sp. KX-6	50 (1hr)	6.0-11.0	Kwon และคณะ, 1987
<i>Bacillus</i> sp. TX-3	40-75 (10min)	7.0-9.0	Kitada และคณะ, 1996
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	75 (10min)	5.0	Suekane และคณะ, 1978
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	90 (30min)	9.0	Lama และคณะ, 2001
<i>Chainia</i> sp	60 (30min)	8.0	Khire และคณะ, 1990
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	85 (1hr)	5.5-12.0	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Streptomyces</i> sp. PLC	98 (15min)	-	Inyang และคณะ, 1995
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	RT, (24hr)	5.0-9.0	Chen และ Anderson, 1979
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	50 (30min)	4.0	Suekane และคณะ, 1978
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.B6A	85 ( hr)	5.5-12.0	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	80 (1hr)	-	Liu และคณะ, 1996
JW/SL YS-489			
<i>Thermotoga neapolitana</i>	95 (24hr)	-	Hess และคณะ, 1998
<i>Thermotoga maritima</i>	100 (10hr)	-	Brown และคณะ, 1993

หมายเหตุ : เครื่องหมาย – หมายถึง ไม่ได้รายงานไว้

### 2.6.3 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของกลูโคสไอโซเมอเรส

โดยทั่วไปกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีความจำเพาะต่อสับสเตรท 2 ชนิด คือ กลูโคสและไซโลส ซึ่งมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกันไปแล้ว้วยรายงานกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆยังมีความจำเพาะกับน้ำตาลชนิดอื่นๆอีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ค่าความจำเพาะ ( $K_m$ ) ของกลูโคสไอโซเมอเรสของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของสับสเตรท	$K_m$ (มิลลิโมลาร์)	เอกสารอ้างอิง
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	ดี-ฟรักโทส	1670	Gong และคณะ, 1980
	ดี-กลูโคส	1330	
<i>Arthobacter</i> sp. NRRL B3728	ดี-อะราบิโนส	280	Smith และคณะ, 1991
	ดี-ฟรักโทส	170	
	ดี-กลูโคส	225	
	ดี-ไรโบส	190	
	ดี-ไซโลส	3.3	
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	ดี-กลูโคส	142	Chauthaiwale และ Rao, 1994
	ดี-ไซโลส	6.66	
<i>Bacillus</i> sp. TX-3	ดี-กลูโคส	290	Kitada และคณะ, 1996
	ดี-ไซโลส	100	
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	ดี-กลูโคส	167	Lama และคณะ, 2001
	ดี-ไซโลส	33	
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	ดี-ฟรักโทส	60	Lee และ Zeikus, 1991
	ดี-กลูโคส	140	
	ดี-ไซโลส	20	
<i>Streptomyces</i> sp. PLC	ดี-กลูโคส	400	Inyang และคณะ, 1995
	ดี-ไซโลส	35	

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของ สับสเตรท	$K_m$ (มิลลิโม ลาร์)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	ดี-กลูโคส	55.5	Raykovska และคณะ, 2001
	ดี-ไรโบส	13.3	
	ดี-ไซโลส	4.4	
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.B6A	ดี-ฟรักโทส	50	Lee และ Zeikus, 1991
	ดี-กลูโคส	120	
	ดี-ไซโลส	46	
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS-489	ดี-ฟรักโทส	50	Liu และคณะ, 1996
	ดี-กลูโคส	130	
	ดี-ไซโลส	19	
<i>Thermotoga neapolitana</i>	ดี-ฟรักโทส	106.5	Hess และคณะ, 1998
	ดี-กลูโคส	88.5	
	ดี-ไซโลส	16	
<i>Thermotoga maritima</i>	ดี-ฟรักโทส	225	Brown และคณะ, 1993
	ดี-กลูโคส	118	
	ดี-ไซโลส	74	

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 2.6.4 อีออนโลหะต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

จากการศึกษาผลของอีออนโลหะต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่ต้องการไอออนไดวาเลนต์ (divalent cation) ได้แก่ แมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) โคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) หรือแมงกานีสอีออน ( $Mn^{2+}$ ) ในการทำงาน (Tsumura และคณะ, 1965) ซึ่งต่อมา Kasumi และคณะ (1982) รายงานว่ากลูโคสไอโซเมอเรสส่วนใหญ่ต้องการแมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) ในการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ต้องการโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) เพื่อช่วยป้องกันการทำให้ถูกเสียสภาพด้วยความร้อน กรด และไซเตียมโดเดซิลซัลเฟต หรืออาจช่วยเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ด้วย แต่อย่างไรก็ตามอีออนแต่ละชนิดจะมีผลต่อเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แตกต่างกันไป ดังรายงานวิจัยต่างๆ ดังนี้

Marg และ Clark (1990) ศึกษาผลของอีออนโลหะต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus coagulans* พบว่าแมงกานีสอีออน ( $Mn^{2+}$ ) และโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) มีผลต่อแอกติวิตีของไซโลสไอโซเมอเรส ในขณะที่แมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) และโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) มีผลต่อแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus coagulans* มีตำแหน่งจับกับอีออนโลหะ 2 ตำแหน่ง

Sushama และคณะ (1992) ศึกษาบทบาทของแมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) และโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) ต่อแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. NCIM 2730 พบว่าจุลินทรีย์นี้ไม่ต้องการโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) ในการผลิตเอนไซม์ แต่ต้องการแมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) และโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) ในการทำงานของเอนไซม์ โดยแมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) จะช่วยเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ ส่วนโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) ช่วยรักษาเสถียรภาพโครงสร้างของเอนไซม์เมื่อทำงานในอุณหภูมิสูง

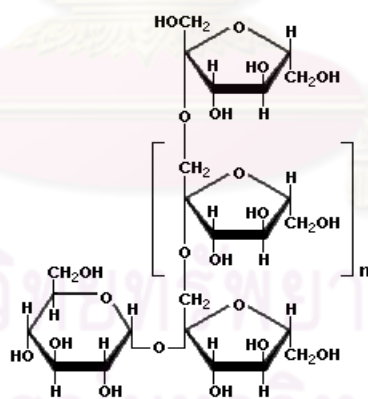
Lama และคณะ (2001) พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสที่ทนร้อนจาก *Bacillus thermoantarcticus* ต้องการแมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) หรือโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) ในการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่ในปฏิกิริยาที่มีแมงกานีสอีออน ( $Mn^{2+}$ ) และโคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ และนอกจากนี้ยังพบว่าแมกนีเซียมอีออน ( $Mg^{2+}$ ) โคบอลต์อีออน ( $Co^{2+}$ ) หรือแมงกานีสอีออน ( $Mn^{2+}$ ) มีผลต่อแอกติวิตีของไซโลสไอโซเมอเรส

## 2.7 อินนูลิเนส

นอกจากกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตฟรักโทสจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งแล้ว ปัจจุบันยังพบว่าเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ อินนูลิเนส (inulinase) ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจสูงเพื่อนำมาใช้ผลิตฟรักโทสโดยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินนูลิน เอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายอินนูลินโดยใช้ปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวให้ฟรักโทสได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Guirard และ Galzy, 1981; Pandey และคณะ, 1999; Singh และคณะ, 2006)

### 2.7.1 อินนูลิน

อินนูลินเป็นพอลิฟรักแทนที่พบมากในพืชหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงของฟรักโทสที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-2,1 ( $\beta$ -2,1 linkage) โดยมีโมเลกุลของซูโครสเชื่อมอยู่ปลายสาย (Vandamme และ Derycke, 1983) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 อินนูลินถูกสะสมอยู่ในหัวหรือรากของพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม กระเทียม รากต้นรักเร่ หัวชิโครี (chicory root) และรากของ Jerusalem artichoke เป็นต้น (Pandey และคณะ, 1999; Rocha และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของอินนูลิน (Roubroeks และคณะ, 2001)

Jerusalem artichoke มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. มีอินนูลินสะสมสูงถึง 14-19% (w/w) (Lingyun และคณะ, 2007) พืชนี้เป็นพืชล้มลุกที่มีความใกล้เคียงกับทานตะวัน (*Helianthus annuus*) มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปอเมริกาเหนือ ปัจจุบันได้มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยให้ชื่อว่า แก่นตะวัน และมีการส่งเสริมการปลูกกับเกษตรกรทั่วไป (นิมิตร

วรสูตร และสนั่น จอกลอย, 2549) เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสุขภาพ พืชสมุนไพร และพืชพลังงานทดแทน

ปัจจุบันอินนูลินได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากมีราคาถูกและสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นสูง (High Fructose Syrup) ซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตยา เช่น การผลิตน้ำตาลสำหรับคนไข้ที่เป็นโรคเบาหวาน นอกจากนี้อินนูลินยังช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็กในเด็ก และใช้เป็นสารให้ความหวานสำหรับคนที่ต้องการลดน้ำหนัก (Roberfroid, 1999) กระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacteria* ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ (Kolida, 2002) ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และใช้เป็นเส้นใยในระบบย่อย (Roberfroid, 1999) เป็นต้น

### 2.7.2 อินนูลิเนส

อินนูลิเนส (inulinase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะระหว่างน้ำตาลฟรักโทสในอินนูลินด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลฟรักโทส และอินนูลูโลอิโกลิแกแซคคาไรด์ อินนูลิเนสสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล และอุตสาหกรรมการผลิตโอลิโกฟรักแทนจากอินนูลิน เป็นต้น (Sheng และคณะ, 2007)

อินนูลิเนสแบ่งตามรูปแบบของกลไกการไฮโดรไลซ์ออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. เอนโดอินนูลิเนส (Endoinulinase, 2,1,  $\beta$ -D-fructan fructanohydrolase) จะย่อยสลายพันธะปีตา 2,1 ภายในโมเลกุลของอินนูลินแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูลูโลไตรโอส (Inulo-triose) อินนูลูโลเตตระโอส (Inulo-tetraose) และอินนูลูโลเพนตะโอส (Inulo-pentaose) (Kumiko และคณะ, 1999) ซึ่งเป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำจัดเป็นพรีไบโอติก และใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสุขภาพ

2. เอกโซอินนูลิเนส (Exoinulinase,  $\beta$ -D-fructan fructanohydrolase) ตัดพันธะปีตา 2,1 ในโมเลกุลของอินนูลินออกทีละโมเลกุลทางด้านปลายอนนรีติวซ์ ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรักโทสและอินนูลูโลอิโกลิเมอร์ (Kumiko และคณะ, 1999)

การทำงานร่วมกันของเอนโดอินนูลิเนสและเอกโซอินนูลิเนสทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยอินนูลินเป็นฟรักโทส ซึ่งสามารถย่อยสลายอินนูลินไปเป็นฟรักโทสได้สูงถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์

### 2.7.3 แหล่งของอินูลิเนส

อินูลิเนสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น รา ยีสต์ แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะสร้างอินูลิเนสแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) และมีจุลินทรีย์บางชนิดจะสร้างอินูลิเนสแล้วเก็บไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอินูลิเนส ดังแสดงในตารางที่ 2.6

**ตารางที่ 2.6** ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอินูลิเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Arthrobacter</i> sp.	Kang และคณะ, 1998
<i>Arthrobacter</i> sp. S37	Kim และคณะ, 2008
<i>Aspergillus awamori</i>	Nagem และคณะ, 2004
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gill และคณะ, 2006
<i>Aspergillus niger</i>	Skowronek และคณะ, 2006
<i>Aspergillus niger</i>	Kango และคณะ, 2008
<i>Aspergillus niger</i> AF10	Zhang และคณะ, 2004
<i>Aspergillus oryzae</i>	Anil และคณะ, 1998
<i>Bacillus subtilis</i>	Wanker และคณะ, 1995
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Sheng และคณะ, 2007
<i>Kluyveromyces</i> S120	Xiong และคณะ, 2007
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	Vranesic และคณะ, 2002
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	Paula และคณะ, 2008
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	Singh และคณะ, 2007
<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85	Wenling และคณะ, 1999
<i>Penicillium janczewskii</i>	Marcia และคณะ, 2007
<i>Penicillium</i> sp. TN-88	Nakamura และคณะ, 1997
<i>Rhizopus</i> sp. TN-96	Ohta และคณะ, 2002
<i>Streptomyces</i> sp.	Sharma และคณะ, 2007
<i>Streptomyces</i> sp. GNDU 1	Gill และคณะ, 2003

#### 2.7.4 การผลิตอินูลิเนสโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตอินูลิเนสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบ ดังรายงานของ Jing และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตและแยกเอนโดอินูลิเนสและเอกโซอินูลิเนสจาก *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

Cazetta และคณะ (2005) รายงานว่า *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* สามารถผลิตอินูลิเนสได้เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากยาคอน (yacon extract) และให้แอกติวิตีของอินูลิเนสสูงเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 4.0

Singh และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 เมื่อใช้สารสกัดจากรากหน่อไม้ฝรั่งซึ่งมีอินูลิน 3.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้น 6.1 เท่าหลังจากปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Singh และคณะ (2007) ศึกษาการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 30.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย อินูลิน สารสกัดจากเนื้อ (meat extract) แคลเซียมคลอไรด์ และไซโตเดียมโตดีซิลซัลเฟต และพบว่าเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินูลินที่สกัดจากรากต้นรักเร่ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง สามารถผลิตอินูลิเนสได้ 55.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Sheng และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Cryptococcus aureus* G7a ที่แยกได้จากตะกอนดินในทะเลจีนใต้ สามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 85 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยอินูลิน 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและ pH 5.0 และพบว่าอินูลิเนสที่ผลิตโดย *Cryptococcus aureus* G7a มีแอกติวิตีสูงสุดที่เคยมีรายงานมา

Kango (2008) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* NK-126 ที่แยกได้จากเปลือกหอมใหญ่และใช้รากของ dandelion (*Taraxacum officinale*) เป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 12.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0



เนื่องจาก *Streptomyces* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในดิน บริเวณแหล่งน้ำจืด และน้ำทะเล เจริญได้ดีในภาวะแวดล้อมหลากหลาย ดังนั้นจึงจัดเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาการผลิตอินูลิเนส ซึ่งน่าจะได้ออนไซม์ที่มีสมบัติหลากหลายตามภาวะแวดล้อมของแหล่งที่คัดแยกเชื้อได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังมีรายงานการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* ค่อนข้างน้อยมาก ดังรายงานต่อไปนี้

Gill และคณะ (2003) ศึกษาผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. GNDU1 พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 0.552 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินูลิน 1 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ และพบว่าแอมโมเนียมีอิทธิพลในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 5.5

Sharma และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณปมรากต้นรักเร่ ในอาหารที่มีกระเทียมผงเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินูลินบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน 1.6 เท่า ภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้ดี คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 6.0 ต่อมา Sharma และ Gill (2007) รายงานว่าเอกโซอินูลิเนสซึ่งทนความร้อนจาก *Streptomyces* sp พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0

## 2.7.5 สมบัติของอินูลิเนส

### 2.7.5.1 คุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

อินูลิเนสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีคุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.7

**ตารางที่ 2.7** คุณภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
	คุณภูมิ (องศา เซลเซียส)	ความเป็น กรดต่าง	
<i>Arthrobacter</i> sp.	50	7.5	Kang และคณะ, 1998
<i>Aspergillus fumigatus</i>	60	6.0	Gill และคณะ, 2006
<i>Aspergillus candidus</i>	45	5.5	Kochhar และคณะ, 1997
<i>Aspergillus niger</i>	60	5.0	Chen และคณะ, 1997
<i>Bacillus Smithii</i> T7	70	4.5	Gao และคณะ, 2009
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	50	5	Sheng และคณะ, 2008
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	30 และ 33	3.6	Vranesic และคณะ, 2002
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	55	4.75	Kushi และคณะ, 2000
<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85	50	5.5	Singh และคณะ, 2007
<i>Penicillium janczewskii</i>	60	5.5	Pessoni, 2007
<i>Pichia guilliermondii</i>	60	6.0	Gong และคณะ, 2007
<i>Rhizopus</i> sp. TN-96	40	5.5	Ohta และคณะ, 2002
<i>Streptomyces</i> sp.	70	6.0	Sharma และคณะ, 2006
<i>Streptomyces</i> sp. GNDU 1	60	5.5	Gill และคณะ, 2003

## บทที่ 3

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., U.S.A.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น Kubota 1920 บริษัท Kubota, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, U.S.A., รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัท PerkinElmer, Inc., U.S.A.
6. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
8. ตู้แช่แข็ง Clean รุ่น V3-4 และรุ่น V6 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส Mitsubishi Electric รุ่น MR-F56R-SL บริษัทกันยงอีเลคทริก จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W 200 และรุ่น WB 22 บริษัท Memmert, Germany
11. อ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น GFL 1086 บริษัท Gesellschaft für Labortechnik Co., Ltd., Germany
12. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.

13. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502-P บริษัท PMC, U.S.A. และรุ่น HS10-2 บริษัท Torrey Pines Scientific, Inc. U.S.A.
14. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Logic LP บริษัท Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
15. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแผ่น (Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของ BioRad, U.S.A.
16. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
17. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eylea, Japan
18. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
19. ตู้อบความร้อน รุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
20. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
21. ซีมาไซโทมิเตอร์ บริษัท Schott Duran, Germany

### 3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ไซโลส (xylose) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
2. ฟรุคโทส (Fructose) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
3. กลูโคส (Glucose) บริษัท Merck, Germany
4. ไซลูโลส (D-Xylulose) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
5. อินนูลินจากหัวขีคโครี (inulin from chicory) บริษัท Fluka, U.S.A.
6. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
7. พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
8. พารา-ไนโตรฟีนิล (*p*-nitrophenol) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
9. ดีอีเออี-ไบโอ เจล เอ (DEAE-Bio Gel A) บริษัท Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
10. เซฟาคริล เอส-300 (Sephacryl S-300) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
11. อะคริลาไมด์ (Acrylamide) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
12. N,N,N',N'-เตตระเมทิลีนไดอะมีน (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine, TEMED) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
13. N,N'-เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-Methylene bis acrylamide) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

14. สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) บริษัท Fluka, Switzerland.
15. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
16. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุล บริษัท Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
17. อะลูมินา (Alumina) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
18. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
19. แคตาเลส (Catalase) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
20. เฟอริติน (Ferritin Type I: From Horse Spleen) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
21. แกมมา-กลอบูลิน ( $\gamma$ -Globulins from bovine blood) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
22. ทริปติกซอยบรอก (Tryptic Soy Broth) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
23. เพปโตน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
24. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
25. พอลิเพปโตน (Polypeptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
26. โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
27. แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) บริษัท Merck, Germany
28. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
29. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
30. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
31. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
32. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
33. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
34. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
35. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
36. โซเดียมแอสซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) บริษัท Merck, Germany
37. กรดแอสซิติค ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) บริษัท Merck, Germany
38. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
39. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
40. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกซะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany

41. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
42. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
43. โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
44. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
45. กรดซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
46. โซเดียมอาร์ซีเนต ( $NaHAsO_4$ ) บริษัท Ajax Chemicals, Australia
47. โซเดียมคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ ) บริษัท Merck, Germany
48. สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent) บริษัท Merck, Germany
49. บลาโนส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) บริษัท Bronson and Jacobs International Co., Ltd., Thailand



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.3.1 การเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 และการเตรียมกลุ่มโคสไอโซเมอเรส

##### 3.3.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* PC22 และ CH7

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในอาหารแข็งเชิงข้าวไรย์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เท่ากับ 9.0 สำหรับ PC22 และ 7.0 สำหรับ CH7 บ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 -15 วัน จึงนำมาชุดสปอร์โดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่น ปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ชุดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยสปอร์ที่ได้ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาณน้อยๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

##### 3.3.1.2 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* PC22 และ CH7

ศึกษารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 โดยถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดวัดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ ติดตามการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

### 3.3.1.3 การเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 เพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอร์

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริง อยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log ที่ได้จากข้อ 3.3.1.2

จากนั้นถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกลูโคสไอโซเมอร์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีไซโลส (xylose) ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และปั่นล้างไมซีเลียมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ที่สภาวะเดิม นำไมซีเลียมที่ได้มาสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยแขวนลอยใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซีทิล ไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 5 ไมโครโมลาร์ โคบอลต์คลอไรด์ ในอัตราส่วนไมซีเลียม 1 กรัม ต่อ สารละลาย 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสและความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกชิ้นส่วนไมซีเลียมออกโดยการปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอร์และปริมาณโปรตีน



### 3.3.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส

วิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen และคณะ (1979) โดยการวัดปริมาณฟรักโทสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชันของกลูโคสโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าว โดยนำเอนไซม์ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย

0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0	ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร
0.1 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
0.001 โมลาร์ โคบอลต์คลอไรด์	ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) จากนั้นเติมสับสเตรท ได้แก่ 2 โมลาร์ กลูโคส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายของปฏิกิริยานาทีที่ 0 และ 20 ออกมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 300 เท่า แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่เกิดขึ้นโดยวิธี cysteine carbazole sulfuric acid method (Dische และ Borenfreund, 1951) เปรียบเทียบกับสารละลายฟรักโทสมาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

กำหนดให้ 1 หน่วยของกลูโคสไอโซเมอเรส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

### 3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสตามวิธี cysteine carbazole sulfuric acid method (Dische และ Borenfreund, 1951)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นเติมสารละลายซีสทีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine-HCl) เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ิก คาร์บาโซล (alcoholic carbazole) เข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทันที ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณฟรักโทสจากกราฟมาตรฐานของฟรักโทสที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

### 3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วเติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

### 3.3.5 ผลของไซโลสต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7

#### 3.3.5.1 ผลของความเข้มข้นไซโลสต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีชนิดลวดสปริง อยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของไซโลสที่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นล้างไมซีเลียมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ที่ภาวะเดิม นำไมซีเลียมที่ได้มาสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยแขวนลอยในสารละลาย 0.1เปอร์เซ็นต์ CTAB ดังข้อ 3.3.1.3 ปั่นในอ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสและความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกชิ้นส่วนไมซีเลียมออกโดยการปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสและปริมาณโปรตีน

### 3.3.6 ผลของไซแลนต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7

#### 3.3.6.1 ผลของความเข้มข้นไซแลนต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน ปั่นเขี่ยบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 0.5, 1.0, และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เป็นเวลา 1-4 วัน

เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นล้างไมซีเลียมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ที่ภาวะเดิม นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส ส่วนไมซีเลียมที่ได้นำมาสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยแขวนลอยในสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ CTAB ดังข้อ 3.3.1.3 ปั่นในอ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสและความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นแยกชิ้นส่วนไม่ซีเลียมออกโดยการปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส บีตา-ไซโลลิเคสและปริมาณโปรตีน

### 3.3.7 การวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส

การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (1984) โดยการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน ซึ่งสารถละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

สารถละลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5	ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร
สารถละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม	ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952) และ Nelson (1944) เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.2)

กำหนดให้ 1 หน่วยของไซแลเนส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

### 3.3.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952) และ Nelson (1944)

นำสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารถละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมสารถละลายเนลสัน (Nelson's reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.2)

### 3.3.9 การวิเคราะห์แอกติวิตีของบีตา-ไซโลลิเดส

การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของบีตา-ไซโลลิเดสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Nakanishi และคณะ (1987) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสซีเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสซีเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

สารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 125 ไมโครลิตร

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปวัดปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้พารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้นในช่วง 0-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

กำหนดให้ 1 หน่วยของบีตา-ไซโลลิเดส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนอล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ แล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

### 3.3.10 ผลของวัสดุทางการเกษตรต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces* PC22 และ CH7

#### 3.3.10.1 การหาชนิดของวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

วัสดุทางการเกษตรที่ใช้แทนไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) มีดังนี้ กากเมล็ดฝ้าย (cotton seed husk) ชังข้าวโพด (corn cob) เปลือกข้าวโพด (corn husk) รำข้าวเจ้า (rice bran) และรำข้าวสาลี (wheat bran) โดยวัสดุเหล่านี้ผ่านการอบแห้ง บด และร่อนด้วยตะแกรงขนาด 35 เมช

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ

40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่ไม่เติมไซแลน (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยแปรผันชนิดของวัสดุทางการเกษตร ได้แก่ กากเมล็ดฝ้าย ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด รำข้าวเจ้าและรำข้าวสาลี โดยใช้ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เป็นเวลา 1-4 วัน

เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นล้างไมซีเลียมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ที่ภาวะเดิม นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส ส่วนไมซีเลียมที่ได้นำมาสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยแขวนลอยในสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ CTAB ดังข้อ 3.3.1.3 บ่มในอ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสและความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกชั้นส่วนไมซีเลียมออกโดยการปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส บีตา-ไซโลลิเดสและปริมาณโปรตีน

### 3.3.10.2 ผลของความเข้มข้นวัสดุทางการเกษตรต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่ไม่เติมไซแลน (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยนำวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.10.1 มาแปรผันความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เป็นเวลา 1-4 วัน

เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นล้างไมซีเลียมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ที่ภาวะเดิม นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส ส่วนไมซีเลียมที่ได้นำมาสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยแขวนลอยในสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ CTAB ดังข้อ 3.3.1.3 บ่มในอ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสและความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกชิ้นส่วนไมซีเลียมออกโดยการปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์ แอกติวิตีของ กลูโคสไอโซเมอเรส ปีตา-ไซโลลิเดสและปริมาณโปรตีน

### 3.3.11 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์

#### 3.3.11.1 การสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยวิธีการบด

การเตรียมเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นเพียงพอที่จะนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ทำโดยการสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยวิธีการบด โดยนำไมซีเลียมของ *Srteptomyces* PC22 และ CH7 ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเหมาะสม มาบดกับผงอะลูมินาละเอียด (fine alumina powder) ในอัตราส่วน 1 : 1 ละลายเอนไซม์ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตรเล็กน้อย จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรส่วนน้ำใสที่ได้ วิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสและปริมาณโปรตีน

#### 3.3.11.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

##### 3.3.11.2.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟีบนดีเออี-ไบโอเจล เอ (DEAE-Bio Gel A)

ล้างสารแขวนลอยดีเออี-ไบโอเจล เอ ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนกัน เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ จากนั้นแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ปริมาตรเจล

45 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.11.1 ลงบนผิวเจลแล้วชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับดีเออี-ไบโอเจล เอ (unbound fraction) ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม แล้วติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออก (bound fraction) โดยใช้ 0-800 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรดเคมิกใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าด้วยกัน แล้วทำตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี aquasorb ด้วยผงบลานอส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ข้ามคืนใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ละลายอยู่ โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ละลายอยู่ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสและปริมาณโปรตีน

### 3.3.11.2.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 (Sephacryl S-300)

ล้างสารแขวนลอยเซฟาคริล เอส-300 ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจเลนอนกัน เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ จากนั้นแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สูญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 45 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ละลายอยู่ ลงในคอลัมน์ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.11.2.1 ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของ



กลูโคสไอโซเมอเรสเข้าด้วยกัน แล้วทำตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี aquasorb ด้วยผงบลานอสซีเอ็มซี (Blanose CMC) จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลซิสข้ามคืนใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ละลายอยู่ โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง สุดท้ายนำไปไดอะไลซิสใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ละลายอยู่ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสและปริมาณโปรตีน

### 3.3.12 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Native polyacrylamide gel electrophoresis)

ประกบแผ่นแก้วขนาด  $8.2 \times 10.2$  เซนติเมตร และขนาด  $7.4 \times 10.2$  เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้าง ประกบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล จากนั้นเทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.8) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 6 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้เต็มแผ่น ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ใช้น้ำออกให้หมด แล้วจึงเทสารละลายผสมสแตคกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.9) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟริซิส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.1) เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่ใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.6) จากนั้นหยดสารละลายโปรตีน 20 ไมโครลิตร ในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเล็กโทรโฟริซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว แช่เจลในสารละลายย้อมโปรตีน (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

### 3.3.13 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรส

3.3.13.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยการทำให้เจลฟลิเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 (Sephacryl S-300)

ล้างสารแขวนลอยเซฟาคริล เอส-300 ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนกัน เทส่วนน้ำใส่พร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ จากนั้นแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลงลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 35 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ละลายอยู่ ลงในคอลัมน์ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆ ใส่น้ำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.11.2.2 ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสในแต่ละลำดับส่วน

จากนั้นใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ เฟอริติน (ferritin), คตะเลส (catalase), และกลอบูลิน (globulin) น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 450,000, 250,000 และ 150,000 ดาลตัน ตามลำดับ ผ่านลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 โดยใช้ภาวะเดียวกันกับเอนไซม์ข้างต้น นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร สำหรับคตะเลสติดตามโดยการหยด 3 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละลำดับส่วนที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร เช่นกัน แล้วตรวจหาฟองอากาศที่เกิดขึ้น โดยกำหนดให้การสิ้นสุดของการเกิดฟองอากาศภายในทุก 10 วินาทีเท่ากับ 1 หน่วย (AU; arbitrary unit) หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะโปรตีนแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์

3.3.13.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยการใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Laemmli (1970)

นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ข้อ 3.3.11.2.2 และสารละลายโปรตีนมาตรฐานมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด  $8.2 \times 10.2$  เซนติเมตร และขนาด  $7.4 \times 10.2$  เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้าง ประกบแผ่นแก้วนี้เข้ากับจุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.10) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 6 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงเต็มแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ชับน้ำออกจนหมด เทสารละลายสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.11) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.1) เติมน้ำอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในช่องชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.8) ต้มในน้ำเดือด 5 นาที หยอดสารละลายโปรตีนนี้ 20 ไมโครลิตร และโปรตีนมาตรฐานซึ่งเป็น Prestained SDS-PAGE standard 7.5 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วและย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.12) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก ด้วยสารละลายล้างสี (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.13) (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของกลูโคสไอโซเมอเรสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

### 3.3.14 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7

#### 3.3.14.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังแต่ 40-90 องศาเซลเซียส

#### 3.3.14.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างต่าง ๆ ดังนี้

500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.0
500 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

#### 3.3.14.3 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสต่ออุณหภูมิ

บ่มกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 35-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีกลูโคสไอโซเมอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

#### 3.3.14.4 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสต่อความเป็นกรดต่าง

บ่มกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 ดังระบุในข้อ 3.3.14.2 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาหาแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีกลูโคสไอโซเมอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

### 3.3.14.5 การตรวจสอบความจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรสต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity)

นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ ดังต่อไปนี้

กลูโคส (D-glucose) 500 มิลลิโมลาร์

ไซโลส (D-xylose) 100 มิลลิโมลาร์

*p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-xylopyranoside (*p*-NPX) 5 มิลลิโมลาร์

สำหรับ *p*-NPX วิเคราะห์ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาตามวิธีการใน

ข้อ 3.3.9

### 3.3.14.6 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ( $K_m$ ) ของกลูโคสไอโซเมอเรส

นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาผสมกับสับสเตรท คือ กลูโคสและไซโลส ให้ความเข้มข้นสุดท้ายขณะที่ทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 100–800 มิลลิโมลาร์ สำหรับกลูโคส และ 20-160 มิลลิโมลาร์ สำหรับไซโลส แล้วนำไปหาแอดติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส ตามวิธีในข้อ 3.3.2 แล้วนำมาเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) และคำนวณค่า  $K_m$  จากสูตร  $V_0 = V_{max}[S_0] / [S_0] + K_m$

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3.14.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมา ไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 100 มิลลิโมลาร์ ของอูรีที่ละลายอยู่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดอูรีที่เอออกโดยการไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดิม 2 ครั้ง นำเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยเติมอิออนของโลหะชนิดต่างๆลงในปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 หรือ 1.0 มิลลิโมลาร์ ดังนี้ โดยมีกลูโคสไอโซเมอเรสที่ไม่ผ่านการไดอะไลส์ด้วยอูรีที่เอนไซม์เป็นตัวเปรียบเทียบ

แคลเซียมคลอไรด์	(CaCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O)
โคบอลต์คลอไรด์	(CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)
เฟอรัสซัลเฟต	(FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)
แมกนีเซียมซัลเฟต	(MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)
แมงกานีสซัลเฟต	(MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3.15 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินนูลินเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อมีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนเบื้องต้น

#### 3.3.15.1 การเตรียมอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวัน

##### 3.3.15.1.1 การเตรียมหัวแก่นตะวัน

หัวแก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) ที่ใช้ทำการทดลองมาจากโครงการปลูกแก่นตะวันเพื่อผลิตการเอทานอล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (นิมิตร และ สนั่น, 2549) โดยนำแก่นตะวันมาล้างให้สะอาด ปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบให้แห้งในเตาอบควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นบดให้เป็นผงเพื่อใช้ในส่วนต่อไป

##### 3.3.15.1.2 การสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน

ซึ่งหัวแก่นตะวันอบแห้งปริมาณ 10 กรัม แช่วนลอยู่ในน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปสกัดอินนูลินในหม้อหนึ่งควบคุมอุณหภูมิด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองกากหัวแก่นตะวันออกด้วยผ้าขาวบาง ส่วนน้ำใส่ที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนละเอียดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรส่วนน้ำใส่ที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยวิธี cysteine carbazole sulfuric acid method (Dische และ Borenfreund, 1951) วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959) และวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol sulfuric acid method (Dubois และคณะ, 1956) คำนวณปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์) ที่ได้ดังแสดงในสมการที่ 1-3

(1) อินนูลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Lingyun และคณะ, 2007)

$$= \text{น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} - \text{น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}$$

(2) อินนูลิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (Dische และ Borenfreund, 1951)

$$= \text{อินนูลิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} - \text{น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}$$

(3) เปอร์เซ็นต์อินนูลินในการสกัดเทียบกับแก่นตะวัน(น้ำหนัก/น้ำหนัก)

$$= \frac{[\text{อินนูลิน(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรสารสกัด(มิลลิลิตร)}]}{\text{น้ำหนักผงแก่นตะวันอบแห้ง(กรัม)}} \times 100$$

3.3.15.2 การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยวิธี cysteine carbazole sulfuric acid method (Dische และ Borenfreund, 1951)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นเติมสารละลายซีสทีน ไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine-HCl) เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ คาร์บาโซล (alcoholic carbazole) เข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทันทีก่อนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปวัดปริมาณอินนูลินโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณอินนูลินจากกราฟมาตรฐานของอินนูลิน (inulin) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.5)

3.3.15.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.3) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วต้มปฏิกิริยาในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรักโทสที่ความเข้มข้น 0 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)



### 3.3.15.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid Method (Dubois และคณะ, 1956)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรักโทสเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.4)

### 3.3.15.5 การเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 เพื่อผลิตอินูลิน

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดดัดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log ที่ได้จากข้อ 3.3.1.2

จากนั้นถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตอินูลิน (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยมีอินูลินสกัดจากหัวแค้นตะวัน ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Gill และคณะ, 2003) บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปวิเคราะห์แอสติวิตีของอินูลิน

### 3.3.15.6 การวิเคราะห์แอสติวิตีของอินูลิเนส

การตรวจวิเคราะห์แอสติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sharma และ Gill (2007) โดยการวัดปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่เกิดจากการย่อยสลายอินูลิน ซึ่งประกอบด้วย 2 ปฏิกริยา ดังนี้

1. ปฏิกริยาการทำงานของอินูลิเนส ซึ่งสารละลายในปฏิกริยาประกอบด้วย สารละลายอินูลินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 95 ไมโครลิตร 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 55 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method ดังแสดงในข้อ 3.3.15.3 เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)

2. ปฏิกริยาการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งสารละลายในปฏิกริยาประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method ดังแสดงในข้อ 3.3.15.3 เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)

กำหนดให้ 1 หน่วยของอินูลิเนส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายอินูลินแล้ว ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับฟรักโทส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

### 3.3.16 ผลของระยะเวลาเลี้ยงเชื้อและความเข้มข้นของอินนูลินต่อการผลิตอินนูลิเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อมีอินนูลินสกัดจากหัวแค้นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน

#### 3.3.16.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตอินนูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตอินนูลิเนส (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยมีอินนูลินสกัดจากหัวแค้นตะวัน ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Gill และคณะ, 2003) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ โดยแปรระยะเวลาเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1-5 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปวิเคราะห์แอกติวิตีของอินนูลิเนส

#### 3.3.16.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของอินนูลินสกัดจากหัวแค้นตะวันต่อการผลิตอินนูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตอินนูลิเนส (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นของอินนูลินสกัดจากหัวแค้นตะวันที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

นำไปปบมบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ ด้วยระยะเวลาเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.16.1 เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปวิเคราะห์แอสติวิตีของอินูลิเนส

### 3.3.17 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7

#### 3.3.17.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

นำอินูลิเนสปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอสติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.15.6 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 40-80 องศาเซลเซียส

#### 3.3.17.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

นำอินูลิเนสปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอสติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.15.6 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างต่าง ๆ ดังนี้

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.0
50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

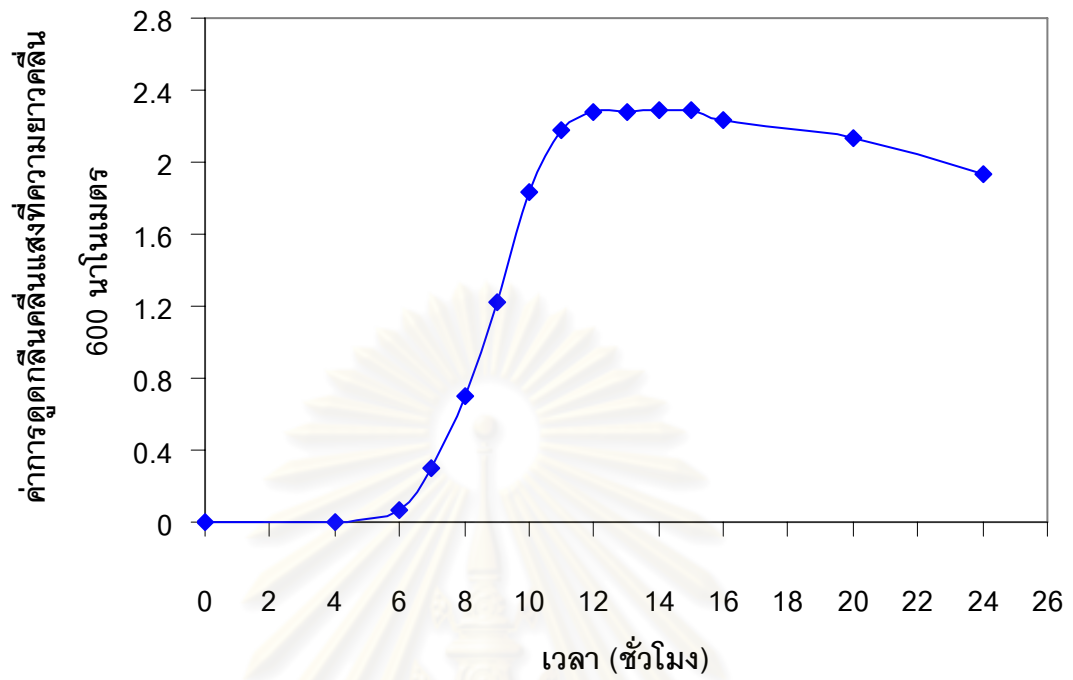
#### 4.1 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* PC22 และ CH7

เนื่องจากการเจริญของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีลักษณะเป็น pellet เล็กๆกระจายตัวอยู่ในอาหารอย่างสม่ำเสมอจึงสามารถติดตามรูปแบบการเจริญของเชื้อได้โดยการวัดความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 สำหรับ PC22 และ pH 7.0 สำหรับ CH7 เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเตรียมหัวเชื้อต่อไป ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายกันโดยพบการเจริญของเชื้อในระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 13 โดยระยะ mid log อยู่ที่ชั่วโมงที่ 9 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.2 และ 1.0 ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ระยะ stationary และ สุดท้ายเข้าสู่ dead phase ในชั่วโมงที่ 24

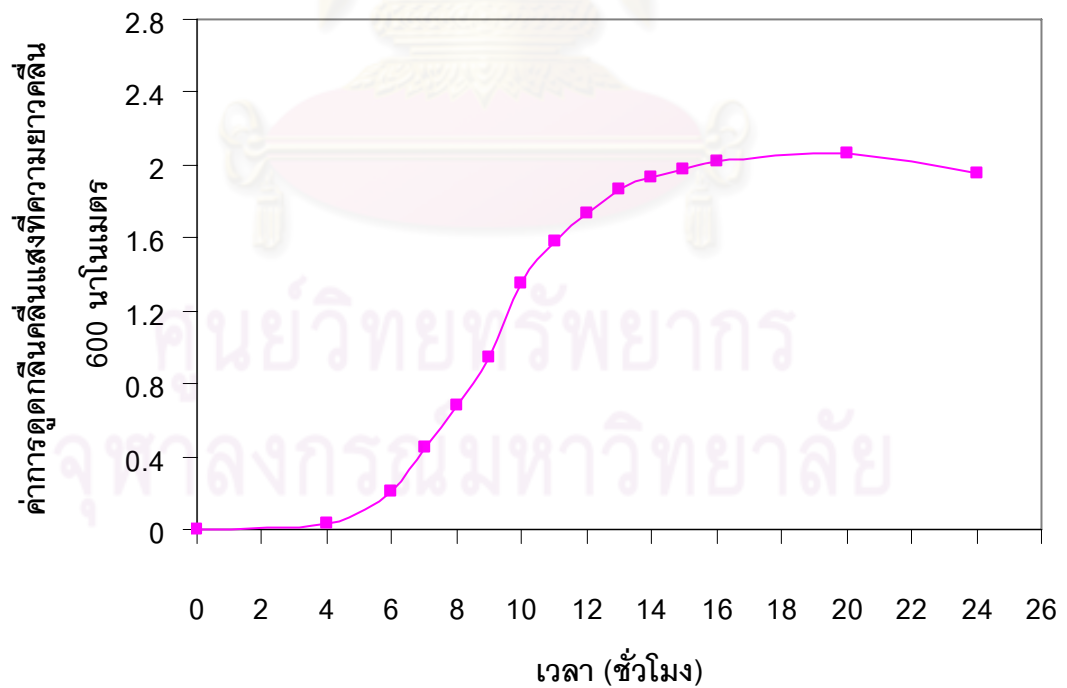
#### 4.2 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7

การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่พบว่าเกิดจากการชักนำของไซโลสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะถูกเก็บไว้ในเซลล์ (intracellular enzyme) ดังนั้นในเบื้องต้นของงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสามารถในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำโดยใช้หัวเชื้อระยะ mid log เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.3.1.3 ที่มีไซโลสหรือกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบดเซลล์นำสารสกัดจากเซลล์ (crude enzyme) มาวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส pH 7.0 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสเมื่อเจริญไซโลสในปริมาณสูงกว่าเมื่อเจริญในกลูโคสเกือบ 2 เท่า แสดงว่าการสร้างเอนไซม์นี้ต้องการไซโลสในการชักนำ

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.1 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข)

**ตารางที่ 4.1** ความสามารถในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อมีไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

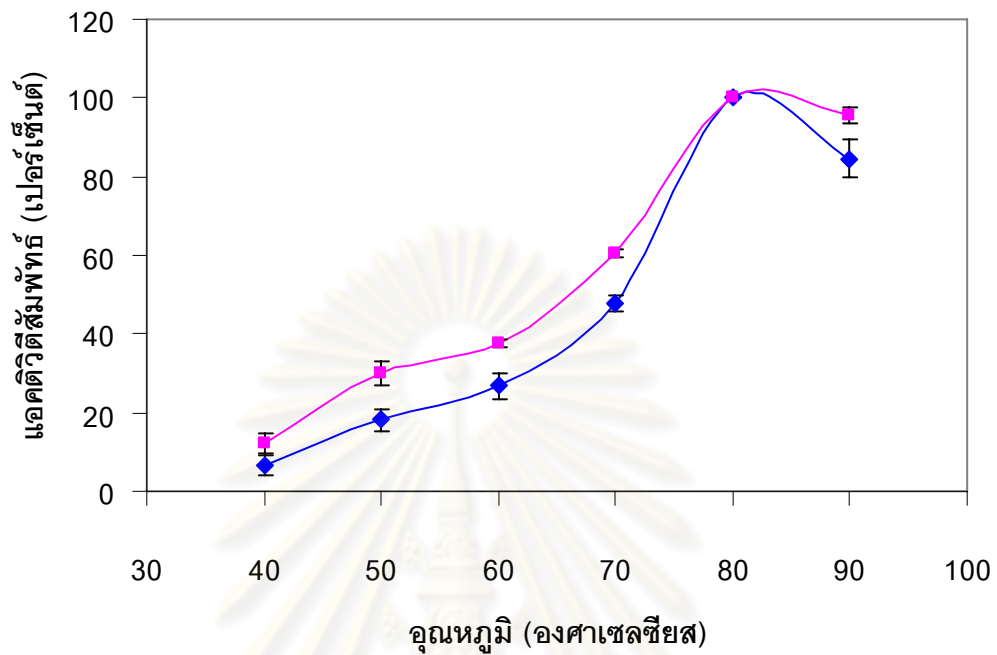
สายพันธุ์	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	
	ไซโลส	กลูโคส
PC22	0.43 ± 0.15	0.19 ± 0.06
CH7	0.54 ± 0.21	0.20 ± 0.07

**4.3** ศึกษาภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7

การวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในการทดลองข้างต้นทำโดยการบ่มปฏิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส pH 7.0 ตามรายงานของ Chen และคณะ (1979) ซึ่งภาวะดังกล่าวอาจไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เบื้องต้น เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสในการทดลองอื่นๆต่อไป

**4.3.1** ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

นำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มาวิเคราะห์แอกติวิตีโดยแปรผันอุณหภูมิในการทำปฏิริยาตั้งแต่ 40 – 90 องศาเซลเซียส พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (◆) และ CH7 (■)

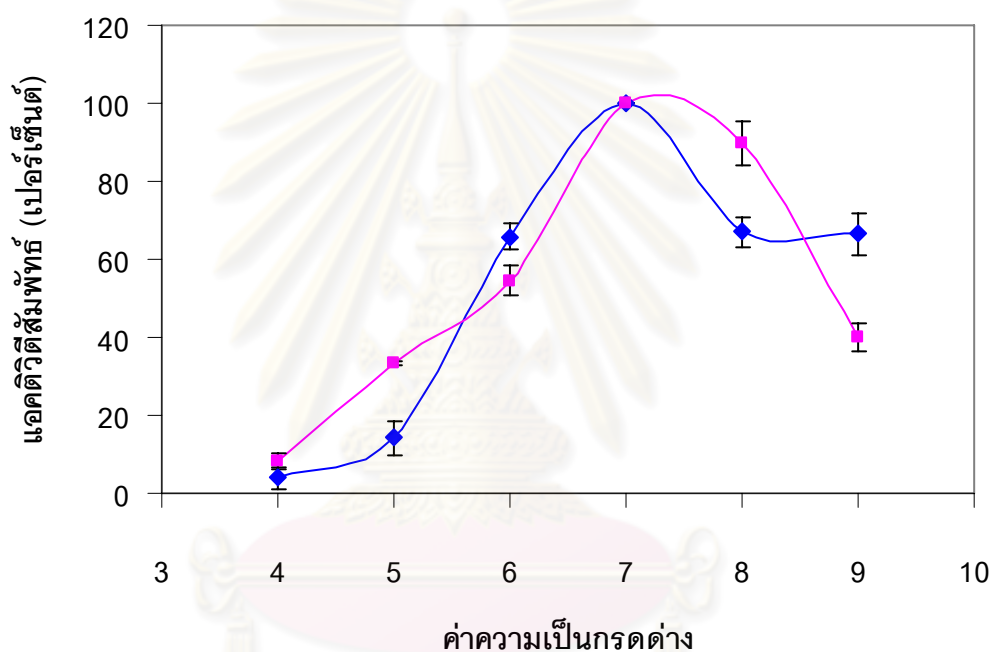
กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#### 4.3.2 ผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

นำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มาวิเคราะห์แอกติวิตี้ในปฏิกิริยาที่แปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ในช่วง 4.0 – 9.0 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีแอกติวิตี้สูงสุดในปฏิกิริยาที่มีโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (◆) และ CH7 (■)

กำหนดให้แอกติวิตี้สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในการทดลองต่อไป จะวิเคราะห์แอกติวิตี้ของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

#### 4.4 ผลของความเข้มข้นไซโลสและไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7

จากรายงานของ Ungchaithum และ Pinphanichakarn (1998) และ Pinphanichakarn, และคณะ (2004) พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน เช่น ไซแลเนส และบีตา-ไซโลลิเดสได้ ซึ่งสามารถย่อยสลายไซแลนให้เป็นไซโลส ดังนั้นจุลินทรีย์นี้จึงน่าจะเป็นแหล่งผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสที่ดี ใช้ต้นทุนต่ำ โดยสามารถเจริญได้ในวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบแล้วย่อยให้เป็นไซโลส ซึ่งนำไปชักนำการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสต่อไป

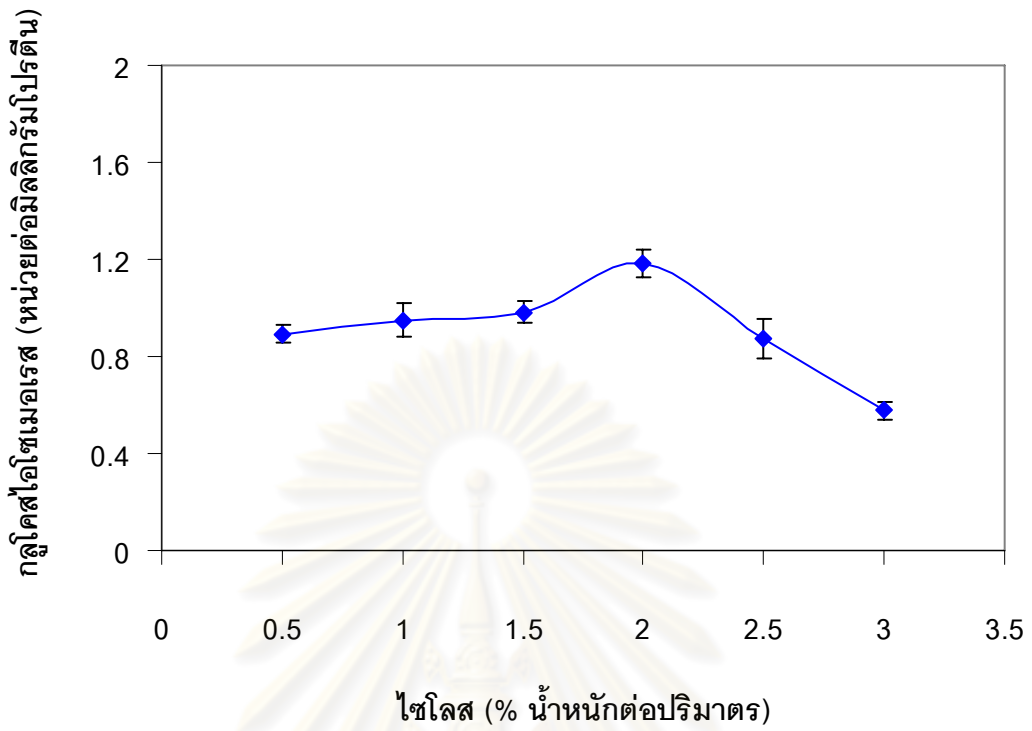
##### 4.4.1 ผลของความเข้มข้นของไซโลสต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในไซโลสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เช่นเดียวกันซึ่งมีแอกติวิตีจำเพาะประมาณ 1.2 และ 1.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

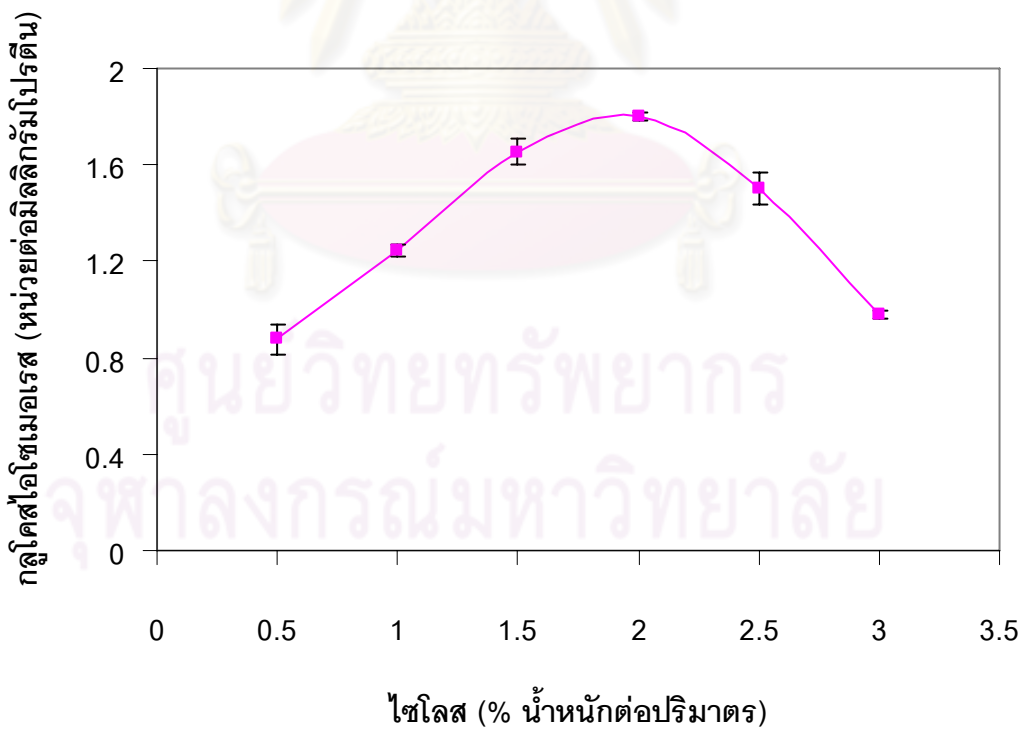
##### 4.4.2 ผลของความเข้มข้นของไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

การทดลองนี้จะศึกษาความสามารถในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ทำโดยเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในอาหารที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต โดยแปรผันความเข้มข้นที่ 0.5, 1.0, และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พร้อมทั้งแปรระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 1, 2, 3 และ 4 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ปริมาณสูง โดย *Streptomyces* sp. PC22 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 3.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 วัน ส่วน *Streptomyces* sp. CH7 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 5.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 3 วัน

(ก)

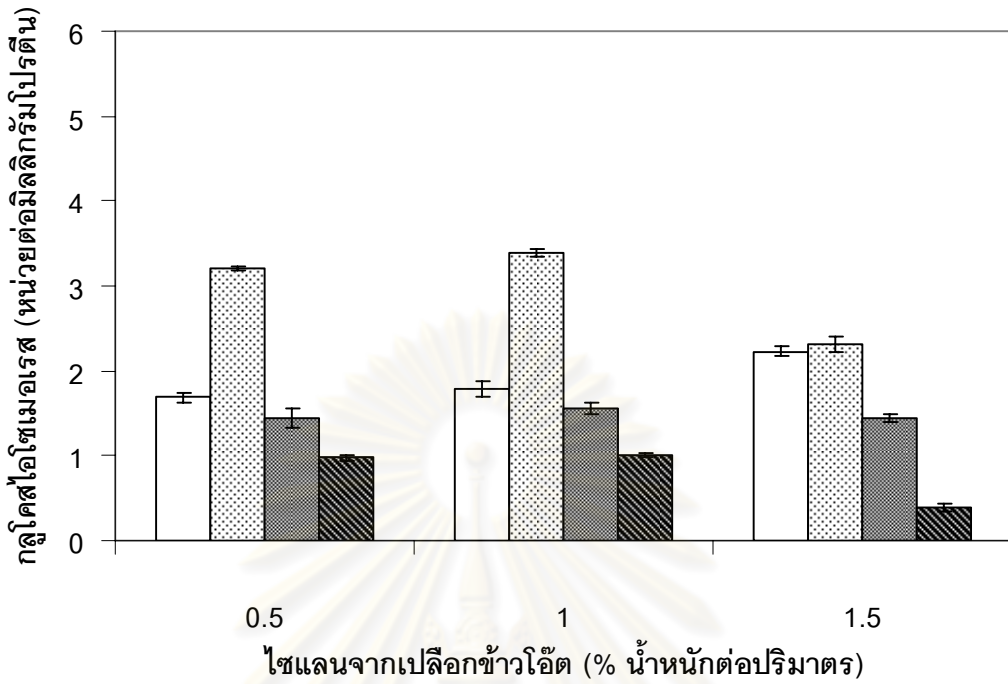


(ข)

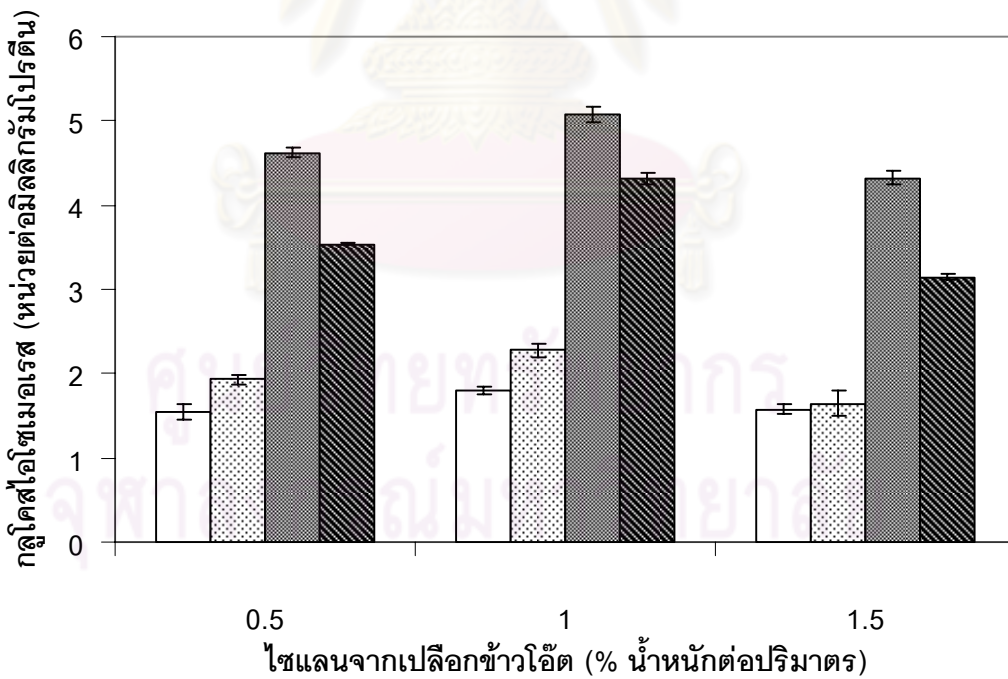


รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของไซโลสต่อการผลิตกดูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข)

(ก)



(ข)



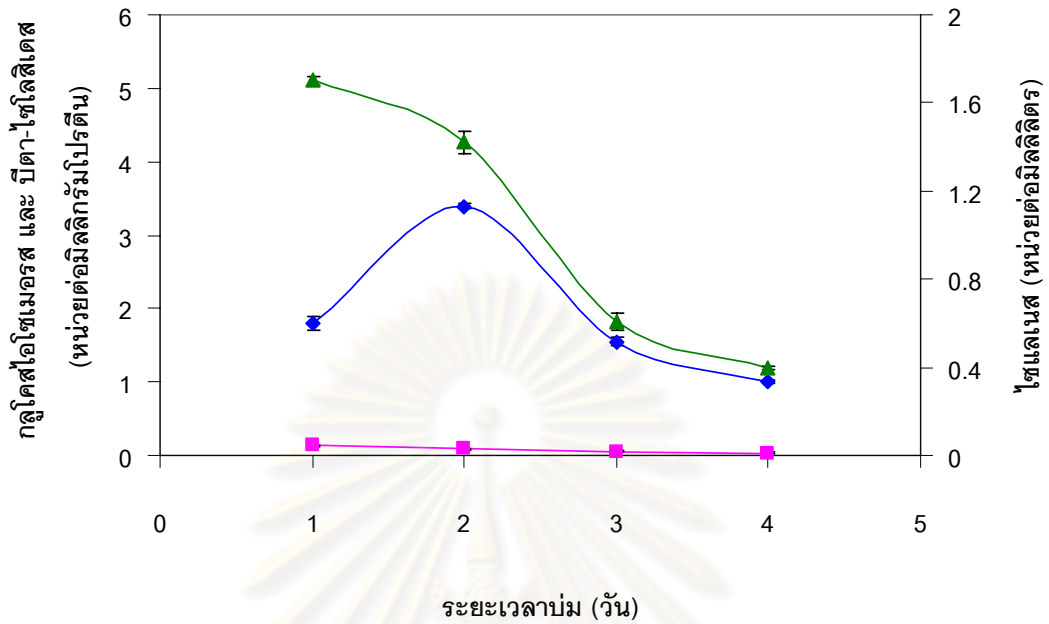
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของไชลันจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน (□) 2 วัน (▨) 3 วัน (▧) และ 4 วัน (■)

นอกจากแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสแล้ว การทดลองนี้ยังติดตามแอกติวิตีของ เอนไซม์ในกลุ่มการย่อยสลายไซแลน ได้แก่ ปีตา-ไซโลสิเดสและไซแลเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ซึ่งมีผลต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสด้วย ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 วันและ 3 วัน ตามลำดับ และพบว่า *Streptomyces* sp. PC22 มีแอกติวิตีของไซแลเนสสูงกว่าปีตา-ไซโลสิ เดสสอดคล้องกับรายงานของ Ungchaithum และ Pinphanichakarn (1998) ที่พบว่า PC22 มี ประสิทธิภาพสูงในการสร้างไซแลเนส โดยงานวิจัยนี้พบว่าสร้างไซแลเนสได้สูงสุดประมาณ 1.7 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันแรก สร้างปีตา-ไซโลสิเดสได้เล็กน้อยประมาณ 0.1 หน่วยต่อมิลลิกกรัม โปรตีน ขณะที่ *Streptomyces* sp. CH7 มีแอกติวิตีของปีตา-ไซโลสิเดสสูงกว่าไซแลเนสสอดคล้อง กับรายงานของ Pinphanichakarn และคณะ (2004) ที่พบว่าเชื้อนี้มีประสิทธิภาพสูงในการสร้าง ปีตา-ไซโลสิเดส โดยงานวิจัยนี้พบว่าสามารถสร้างปีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุดประมาณ 3.5 หน่วยต่อ มิลลิกกรัมโปรตีนในวันแรก แต่สร้างไซแลเนสได้เล็กน้อย ประมาณ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร

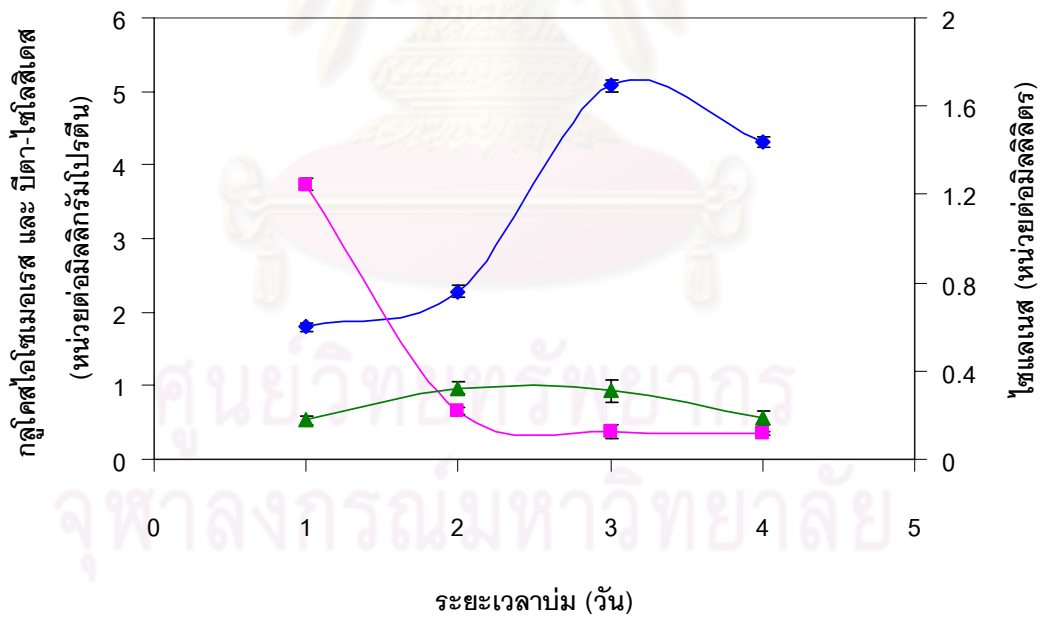


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.6 การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส (◆) บีตา-ไซโลลิตเดส (■) และ ไชแลนเนส (▲) จาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 4 วัน

## 4.5 ผลของวัสดุทางการเกษตรต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7

### 4.5.1 ชนิดของวัสดุทางการเกษตร

จากผลการทดลองข้อ 4.4.2 พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ดีเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เนื่องจากไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ผลิตขายทางการค้ามีราคาแพง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทดลองใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (Takasaki, 1966) ได้แก่ กากเมล็ดฝ้าย ชั่งข้าวโพด เปลือกข้าวโพด รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในอาหารที่มีวัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 2 และ 3 วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 และข้อมูลในตารางที่ 4.2 พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 1.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และ *Streptomyces* sp. CH7 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 1.85 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการติดตามแอสติวิตีของปีตา-ไซโลลิเดสและไซแลเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดย *Streptomyces* sp. PC22 สร้างไซแลเนสได้สูงสุดประมาณ 0.97 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และ *Streptomyces* sp. CH7 สร้างปีตา-ไซโลลิเดสได้สูงสุดประมาณ 0.49 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.2)

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้รำข้าวสาลีสำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 และเปลือกข้าวโพด สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 เพื่อศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

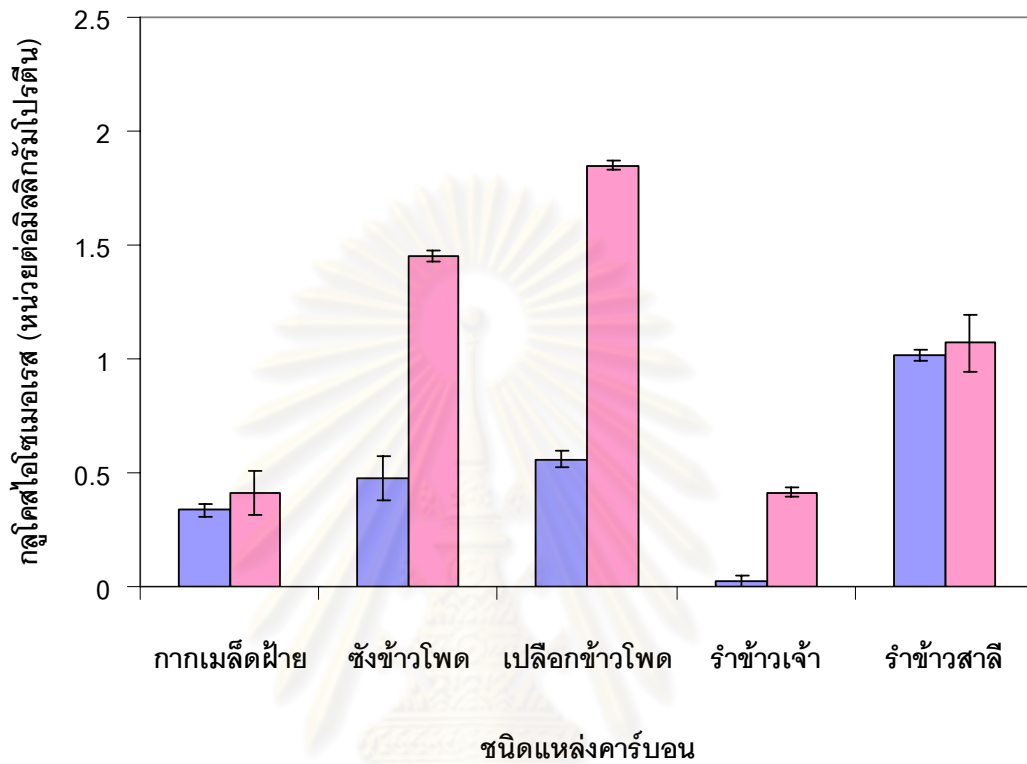
#### 4.5.2 ผลของความเข้มข้นของรำข้าวสาลีต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* sp. PC22

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.3 พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 2.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีรำข้าวสาลีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอกติวิตีของปีตา-ไซโลดีเอสเท่ากับ 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และไซแลเนสเท่ากับ 1.59 หน่วยต่อมิลลิลิตร

#### 4.5.3 ผลของความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพดต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* sp. CH7

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.4 พบว่า *Streptomyces* sp. CH7 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงสุด 3.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอกติวิตีของปีตา-ไซโลดีเอสเท่ากับ 1.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และไซแลเนสเท่ากับ 0.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร



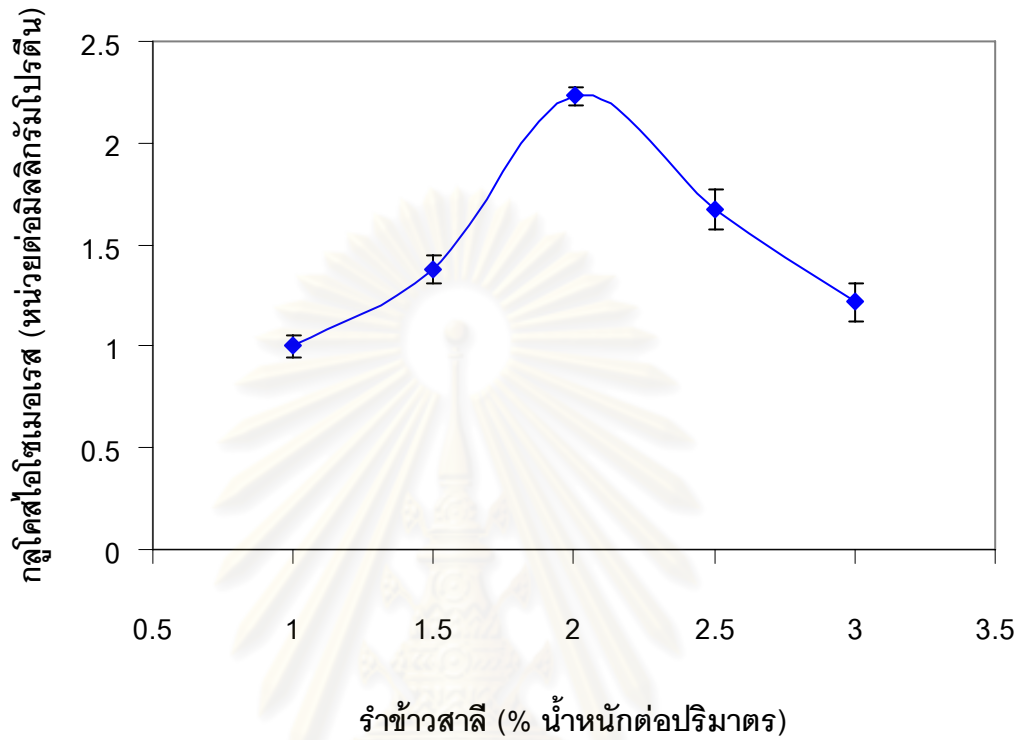


รูปที่ 4.7 ผลของวัสดุการเกษตรชนิดต่างๆต่อการผลิตกดูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* PC22 (■) และ CH7 (□) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 และ 3 วัน ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

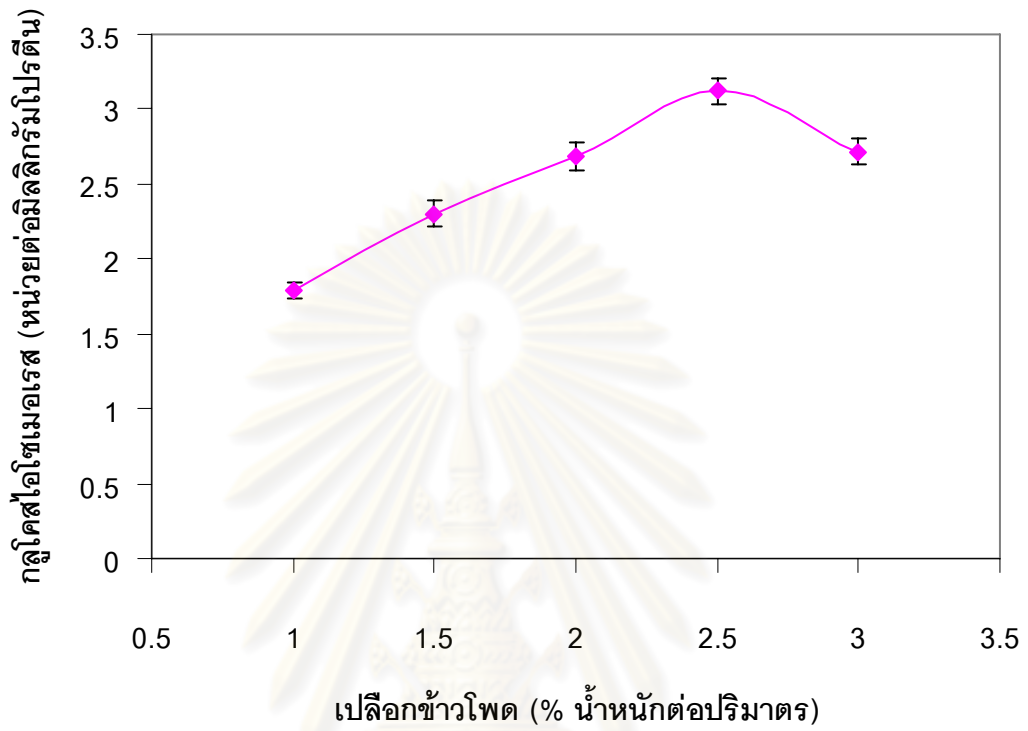
ตารางที่ 4.2 แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส บีตา-ไซโลลิเดส และไซแลเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดวัสดุทางการเกษตร เป็นเวลา 2 และ 3 วัน ตามลำดับ

สายพันธุ์	ชนิดวัสดุทางการเกษตร	กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	บีตา-ไซโลลิเดส (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ไซแลเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
PC22	กากเมล็ดฝ้าย	0.34 ± 0.03	0	0.30 ± 0.02
	ซังข้าวโพด	0.48 ± 0.10	0	0.49 ± 0.05
	เปลือกข้าวโพด	0.56 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.70 ± 0.02
	รำข้าวเจ้า	0.02 ± 0.03	0	0.06 ± 0.01
	รำข้าวสาลี	1.02 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.97 ± 0.04
CH7	กากเมล็ดฝ้าย	0.41 ± 0.09	0.37 ± 0.03	0.11 ± 0.03
	ซังข้าวโพด	1.45 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.13 ± 0.01
	เปลือกข้าวโพด	1.85 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.23 ± 0.01
	รำข้าวเจ้า	0.41 ± 0.02	0.14 ± 0.11	0.06 ± 0.01
	รำข้าวสาลี	1.07 ± 0.12	0.33 ± 0.06	0.49 ± 0.08



รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของรำข้าวสาลีต่อการผลิตกณูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพดต่อการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces* sp. CH7 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส ปีตา-ไซโลลิดีส และไซแลเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของรำข้าวสาลีและเปลือกข้าวโพด เป็นเวลา 2 และ 3 วัน ตามลำดับ

สายพันธุ์ (ชนิดวัสดุทางการเกษตร)	ความเข้มข้นของ แหล่งคาร์บอน (% น้ำหนักต่อ ปริมาตร)	กลูโคส ไอโซเมอเรส (หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีน)	ปีตา- ไซโลลิดีส (หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีน)	ไซแลเนส (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)
PC22 (รำข้าวสาลี)	1.0	1.00 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.97 ± 0.04
	1.5	1.38 ± 0.07	0.02 ± 0.01	1.18 ± 0.10
	2.0	2.23 ± 0.05	0.03 ± 0.01	1.59 ± 0.06
	2.5	1.67 ± 0.10	0.01 ± 0.01	1.81 ± 0.04
	3.0	1.12 ± 0.09	0.01 ± 0.01	2.16 ± 0.03
CH7 (เปลือก ข้าวโพด)	1.0	1.80 ± 0.06	0.49 ± 0.02	0.23 ± 0.01
	1.5	2.30 ± 0.09	0.58 ± 0.05	0.34 ± 0.04
	2.0	2.69 ± 0.10	1.09 ± 0.04	0.45 ± 0.04
	2.5	3.12 ± 0.08	1.52 ± 0.05	0.50 ± 0.02
	3.0	2.71 ± 0.09	1.46 ± 0.11	0.52 ± 0.03

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 4.6 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์

### 4.6.1 การเตรียมกลูโคสไอโซเมอเรส

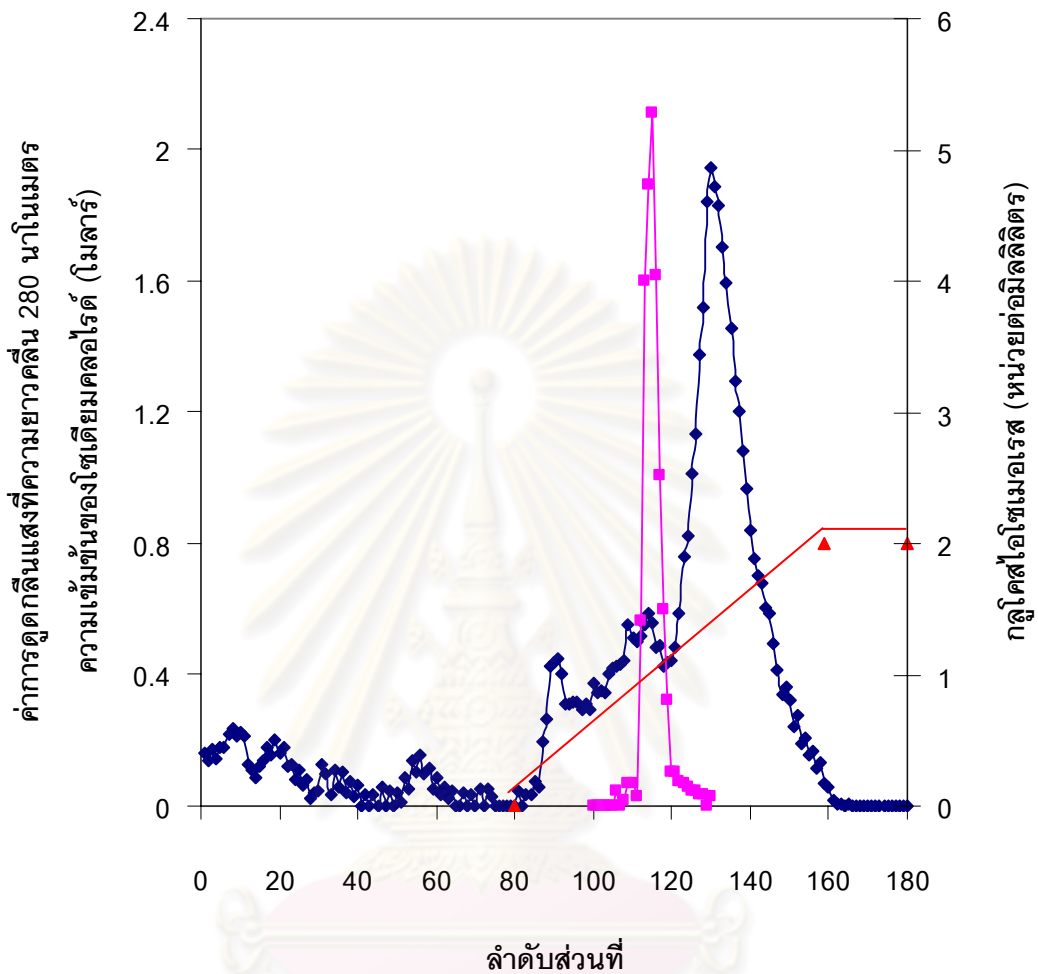
ในการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 และ CH7 ให้บริสุทธิ์นั้น ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ได้ใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนของสารบางชนิด เช่น ลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบในวัสดุทางการเกษตร โดยเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต เป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 โดยขยายขนาดให้ได้ปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร ปั่นแยกไมซีเลียมแล้วนำมาสกัดแยกกลูโคสไอโซเมอเรสโดยการบดเซลล์ตามวิธีในข้อ 3.3.11.1 ผลการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีแอกติวิตีทั้งหมด 68.60 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 29.20 มิลลิกรัม และมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.35 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีแอกติวิตีทั้งหมด 92.82 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 34.22 มิลลิกรัม และมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.71 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

#### 4.6.2 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

##### 4.6.2.1 โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์แมคโคร-เพรบ คีอีเออี

นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.6.1 ปริมาณโปรตีน 29.20 มิลลิกรัม สำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 และ 34.22 มิลลิกรัม สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพרב คีอีเออี ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) ตามวิธีการในข้อ 3.3.11.2.1 และชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 – 0.8 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 และ 4.11 พบว่าเอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ถูกชะออกจากคอลัมน์ในลักษณะคล้ายกัน โดยสามารถจับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ ดังนั้นจึงสามารถจำกัดโปรตีนอื่นๆที่มีประจุตรงข้ามออกไปได้ โดยกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.3-0.4 โมลาร์ จึงรวมลำดับส่วนที่ 112-119 เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอกติวิตีทั้งหมด 28.31 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1.15 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 24.53 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.44 เท่า และยังมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 41.27 เปอร์เซ็นต์

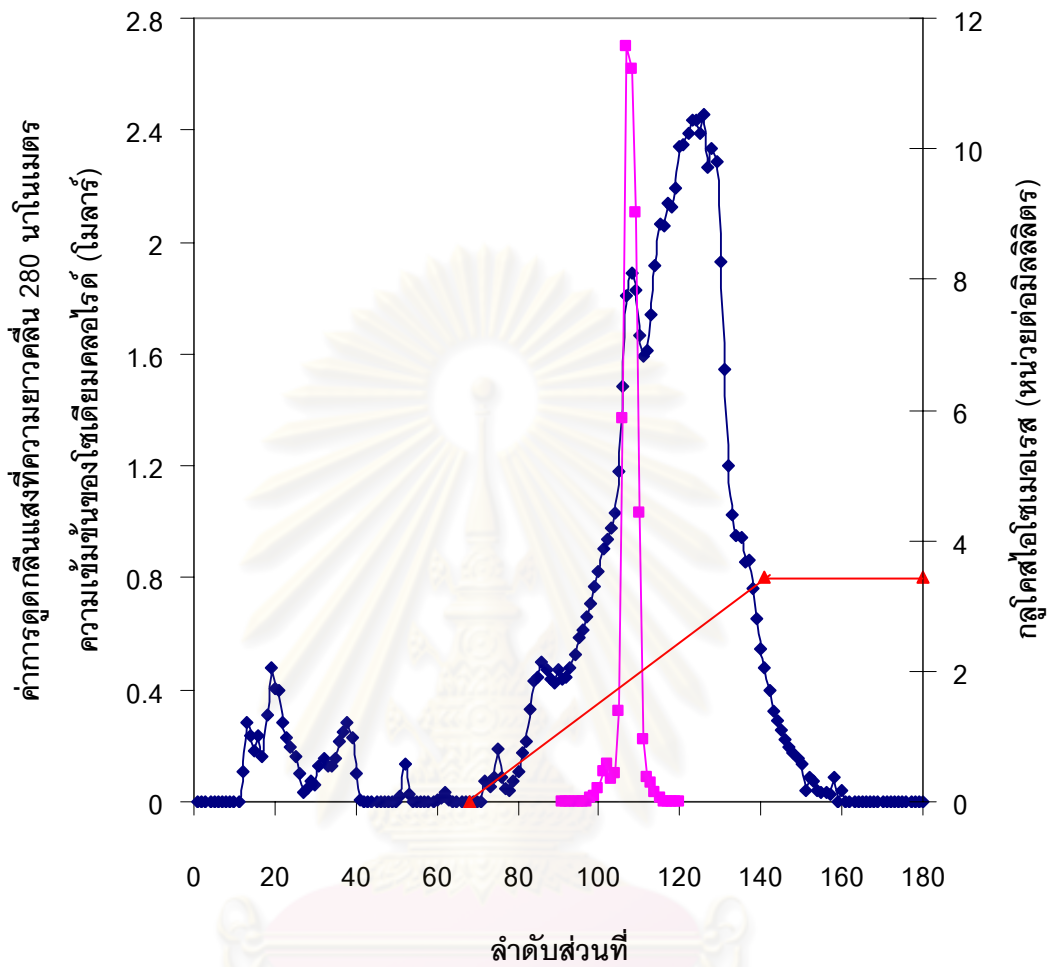
ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.4-0.5 โมลาร์ จึงรวมลำดับส่วนที่ 105-111 เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอกติวิตีทั้งหมด 71.62 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 2.19 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 32.73 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 12.07 เท่า และยังมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 77.15 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.10 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.PC22 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ซีโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของไซเดียมคลอไรด์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

- ◆— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส
- ▲— ความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์





รูปที่ 4.11 การทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี เซโพรตินด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนต์เส้นตรงของไซเดียมคลอไรด์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

- ◆ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส
- ▲ ความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์

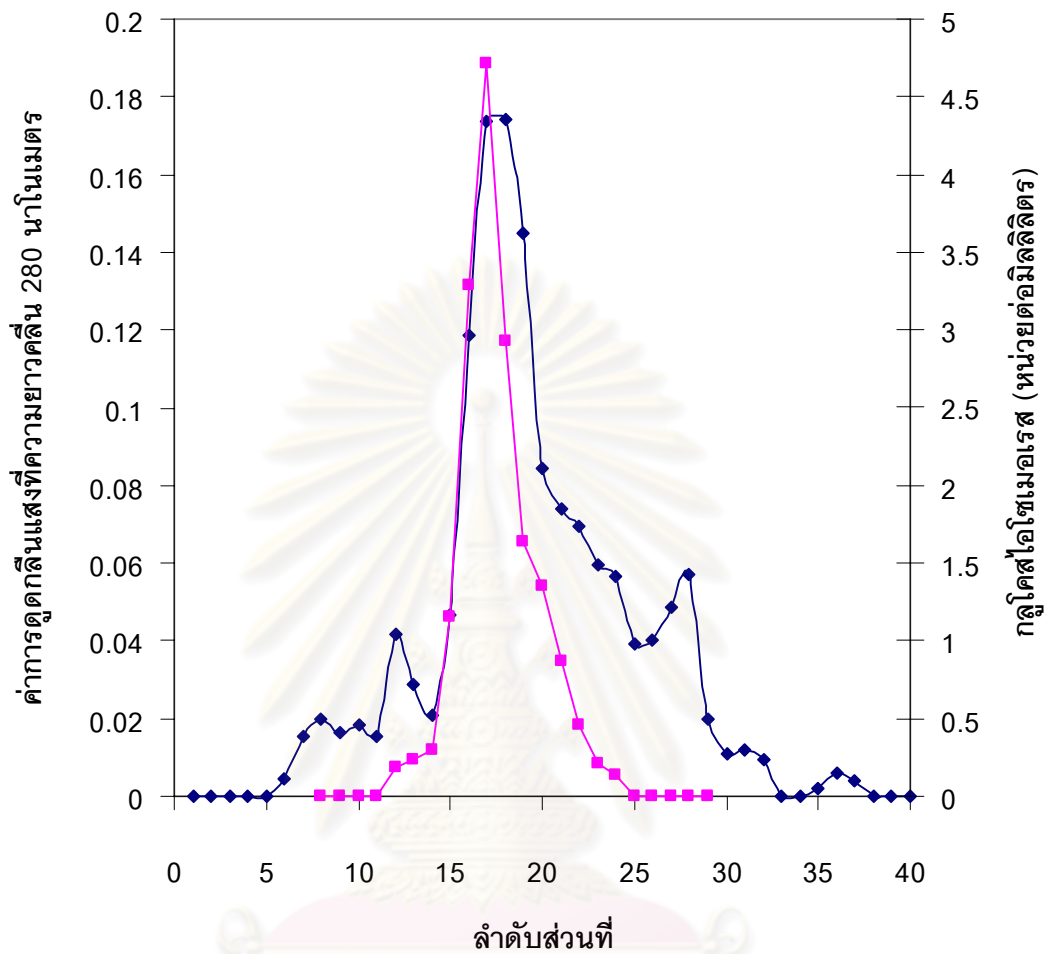
#### 4.6.2.2 โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.6.2.1 ปริมาณโปรตีน 1.15 มิลลิกรัม สำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 และ 2.19 มิลลิกรัม สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ของเซฟาคริล เอส-300 ตามวิธีการในข้อ 3.3.11.2.2 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12 และ 4.13 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 15-20 เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้น พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอกติวิตีทั้งหมด 26.50 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.57 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 46.30 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 19.71 เท่า และยังมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 38.63 เปอร์เซ็นต์

ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 15-21 เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้น พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอกติวิตีทั้งหมด 59.93 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1.36 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 44.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 16.24 เท่า และยังมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 64.56 เปอร์เซ็นต์

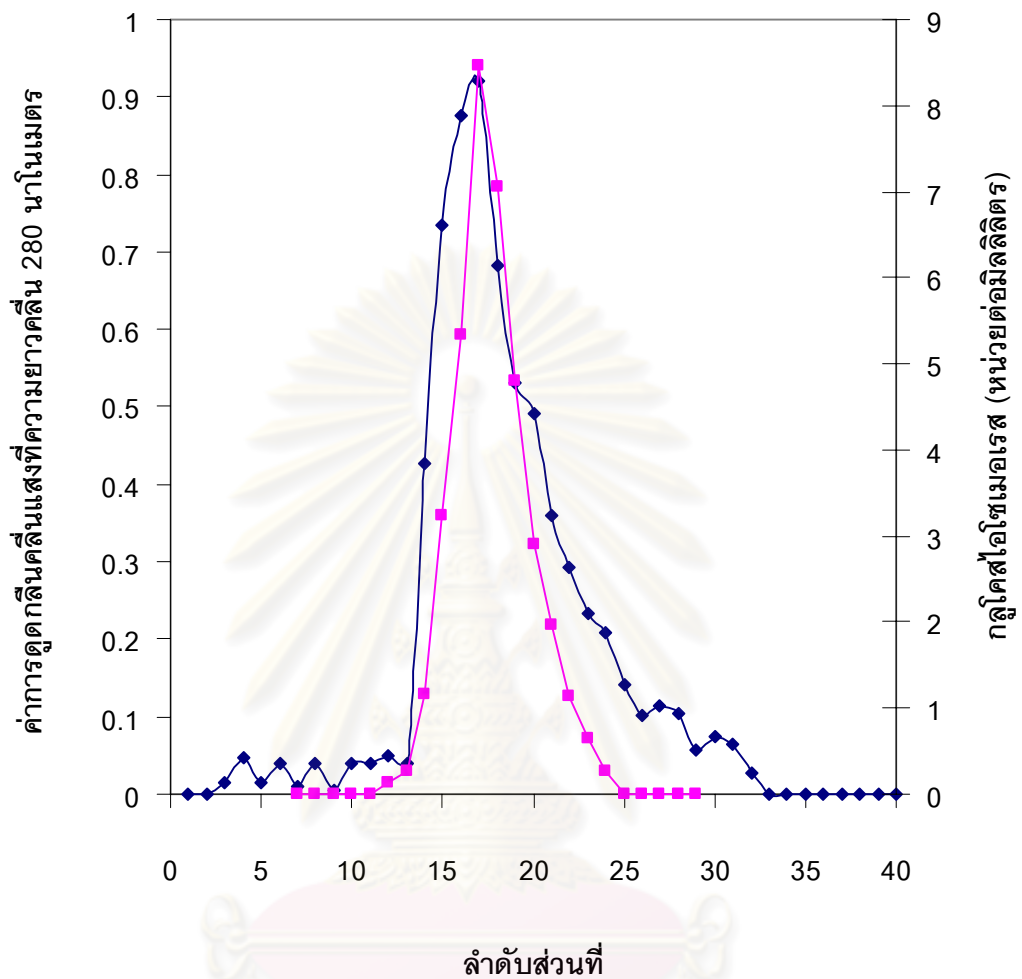
ขั้นตอนการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.4 และ 4.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 การทำกณูโคสไฮโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาคริล เอส-300 ซะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

- ◆ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของกณูโคสไฮโซเมอเรส



**รูปที่ 4.13** การทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.CH7 ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาคริล เอส-300 ซะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

- ◆— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

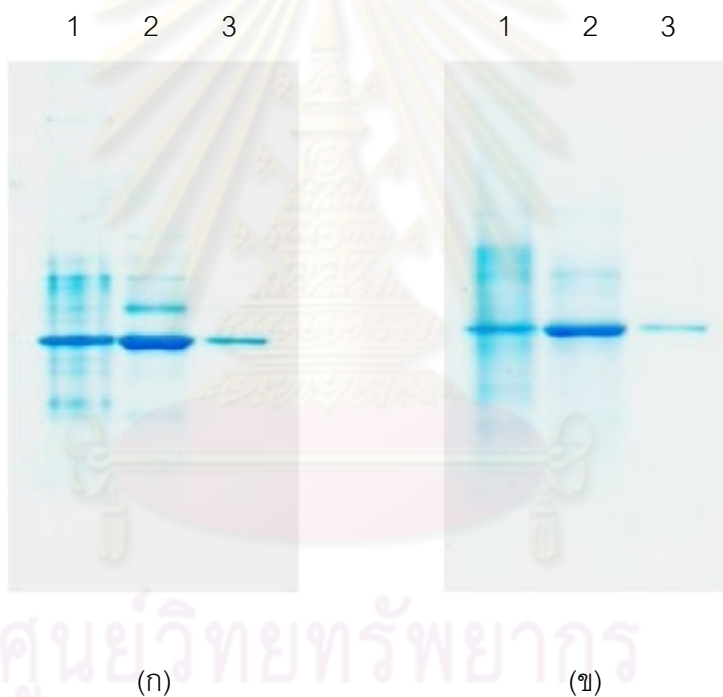
ลำดับขั้นตอน การทำให้ บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอกติวิตี ทั้งหมด ของกลูโคส ไอโซเม เรส (หน่วย)	โปรตีน ทั้งหมด (มก.)	แอกติวิตี จำเพาะของ กลูโคสไอโซ เมอเรส (หน่วยต่อมก. โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์ แอกติวิตี ของกลูโคส ไอโซเม เรส	ความ บริสุทธิ์ของ กลูโคสไอ โซเมอเรส (เท่า)
1. เอนไซม์จาก การบดเซลล์	15.00	68.60	29.20	2.35	100.00	1.00
2. แมคโคร- เพรบ ดีอีเออี	2.19	28.31	1.15	24.53	41.27	10.44
3. เซฟาคริล เอส-300	1.75	26.50	0.57	46.30	38.63	19.71

ตารางที่ 4.5 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอน การทำให้ บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอกติวิตี ทั้งหมด ของกลูโคส ไอโซเม เรส (หน่วย)	โปรตีน ทั้งหมด (มก.)	แอกติวิตี จำเพาะของ กลูโคสไอโซ เมอเรส (หน่วยต่อมก. โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์ แอกติวิตี ของกลูโคส ไอโซเม เรส	ความ บริสุทธิ์ของ กลูโคสไอ โซเมอเรส (เท่า)
1. เอนไซม์จาก การบดเซลล์	15.00	92.82	34.22	2.71	100.00	1.00
2. แมคโคร- เพרב ดีอีเออี	2.35	71.62	2.19	32.73	77.15	12.07
3. เซฟาคริล เอส-300	2.51	59.93	1.36	44.05	64.56	16.24

#### 4.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำเอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำให้พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดแผ่นแล้วย้อมโปรตีนด้วยสีคูแมสซี บลู ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.14 พบว่าจำนวนแถบโปรตีนที่ผ่านการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 จากทั้งสองสายพันธุ์มีน้อยกว่าในส่วนที่ผ่านการทำโครมาโทกราฟีบน แมคโครเพรบ-ดีอีเออีเล็กน้อย และมีน้อยกว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาก ซึ่งสอดคล้องกับแอกติวิตีจำเพาะที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5



**รูปที่ 4.14** การทำให้พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (น) และ CH7 (ข) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ

แถวที่ 1 เอนไซม์ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์แมคโคร-เพרב ดีอีเออี

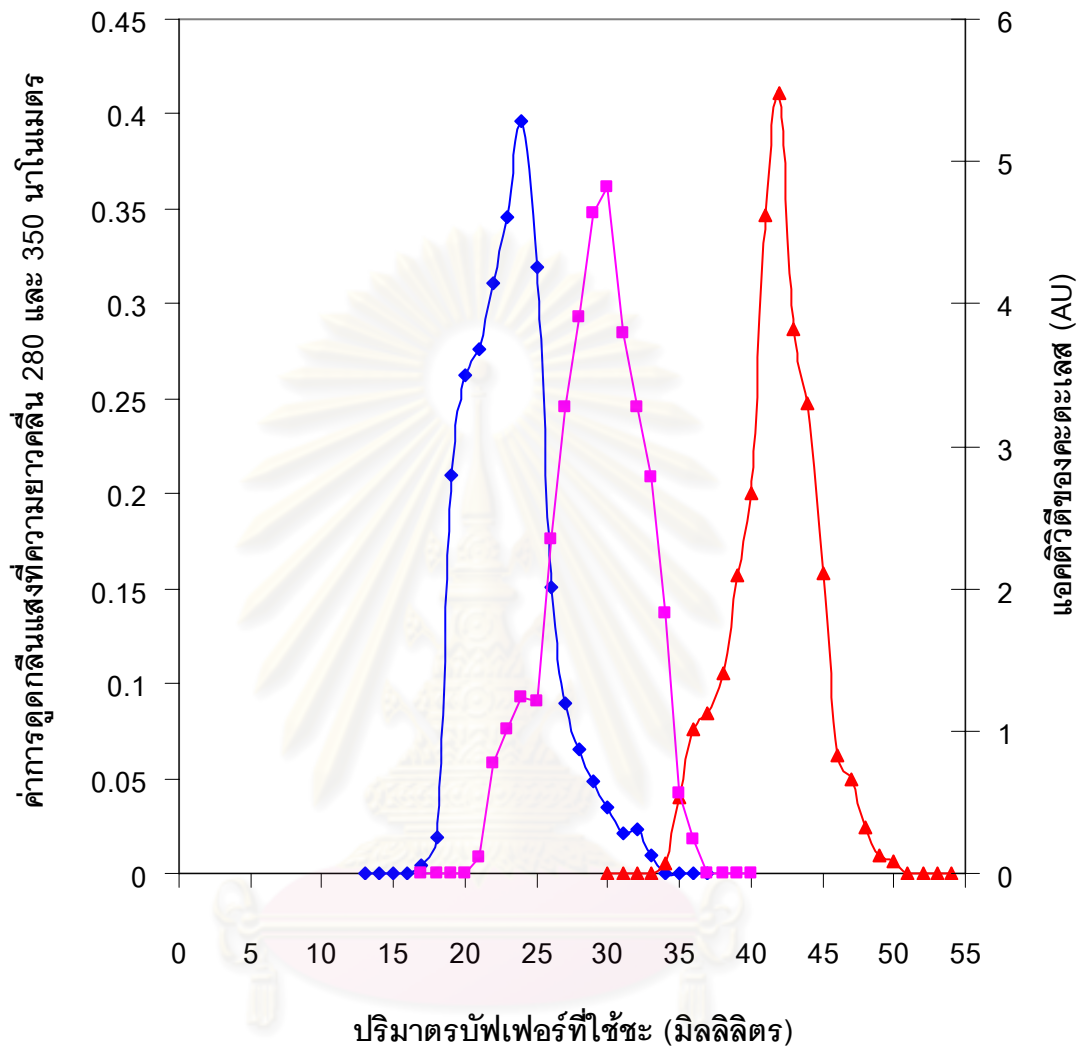
แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

(ทุกตัวอย่างใช้ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

#### 4.8 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรส

4.8.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยการทำให้เจลฟิวเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

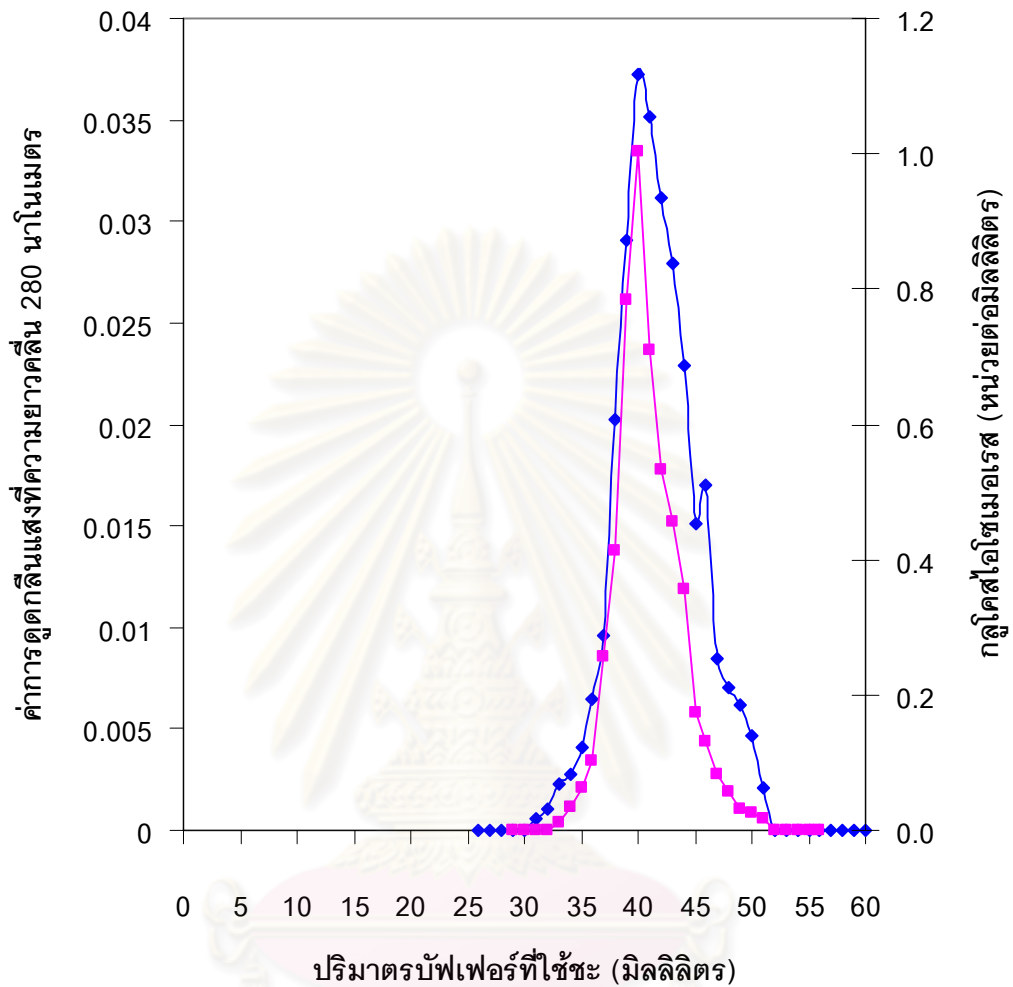
การทดลองนี้ได้หาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 โดยการทำให้เจลฟิวเตรชัน โดยใช้โปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ได้แก่ เพอร์ริติน 450,000 ดาลตัน, คะตะเลส 250,000 ดาลตัน และกลอบบูลิน 150,000 ดาลตัน ตามลำดับ เป็นโปรตีนมาตรฐาน ทำการผ่านโปรตีนเหล่านี้ลงบนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกันและอยู่ภายใต้ภาวะเดียวกันกับที่ใช้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรส แล้วติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร สำหรับเพอร์ริติน และ 280 นาโนเมตร สำหรับกลอบบูลิน ส่วนการติดตามแอกติวิตีของกะตะเลสทำโดยการหยุด 3 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในแต่ละลำดับส่วน แล้วตรวจหาฟองอากาศที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.15, 4.16 และ 4.17 เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.18 โดยพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันประมาณ 170,000 ดาลตัน



รูปที่ 4.15 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 ของโปรตีนมาตรฐาน

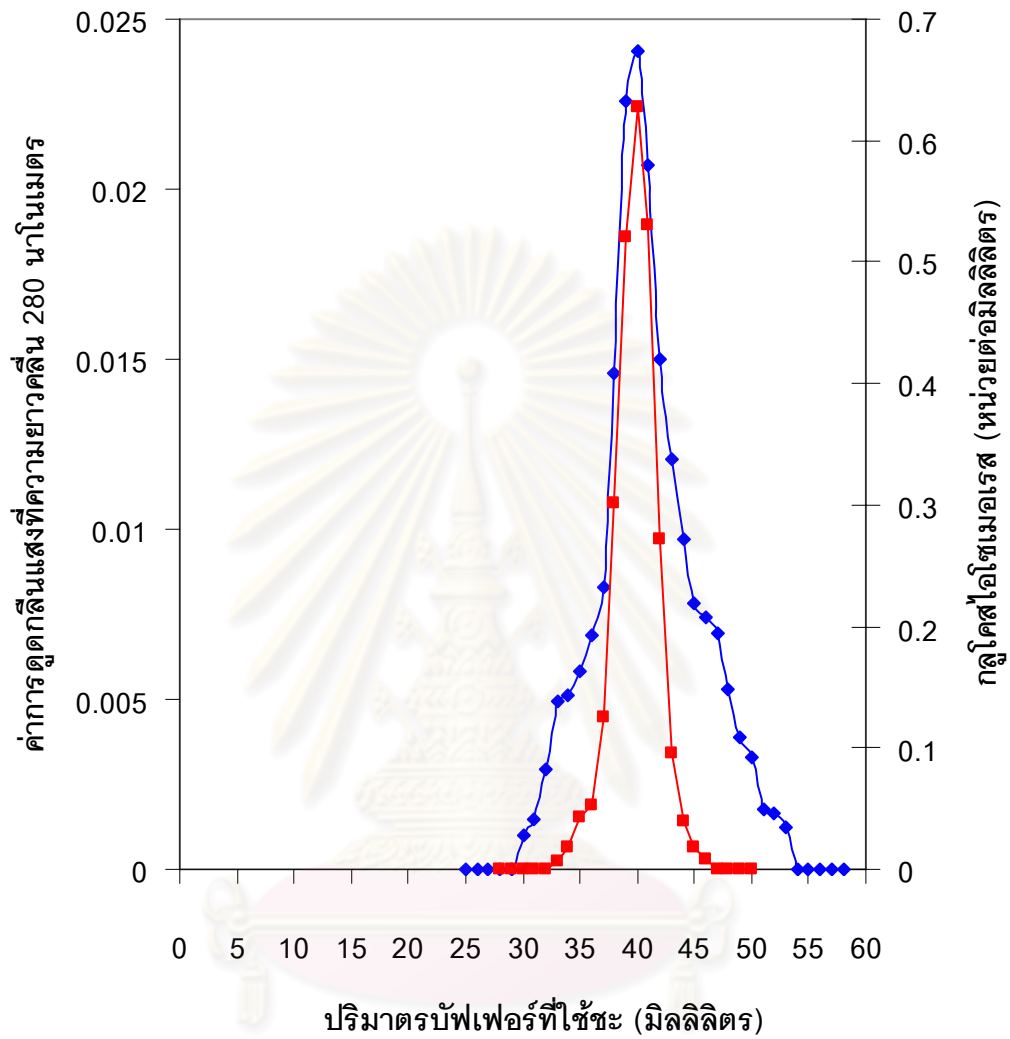
- |            |                               |
|------------|-------------------------------|
| ◆ เฟอริติน | น้ำหนักโมเลกุล 450,000 ดาลตัน |
| ■ คะตะเลส  | น้ำหนักโมเลกุล 250,000 ดาลตัน |
| ▲ กลอบูลิน | น้ำหนักโมเลกุล 150,000 ดาลตัน |





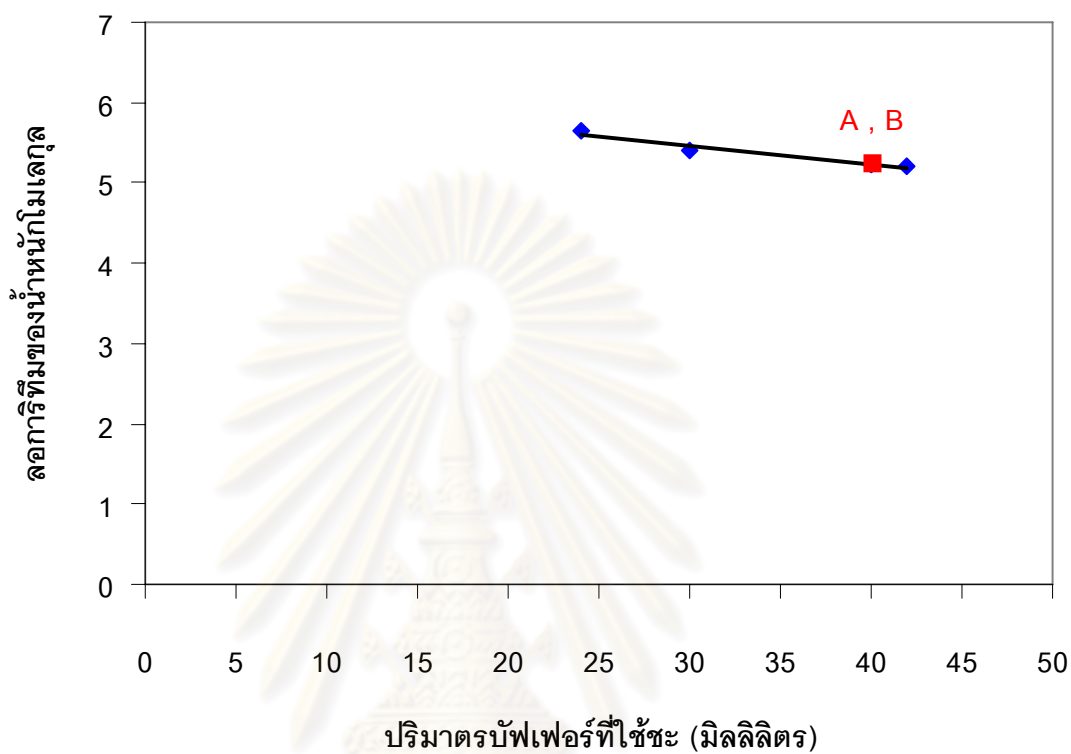
รูปที่ 4.16 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 ของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

- ◆ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส



รูปที่ 4.17 การทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 ของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7

- ◆ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส

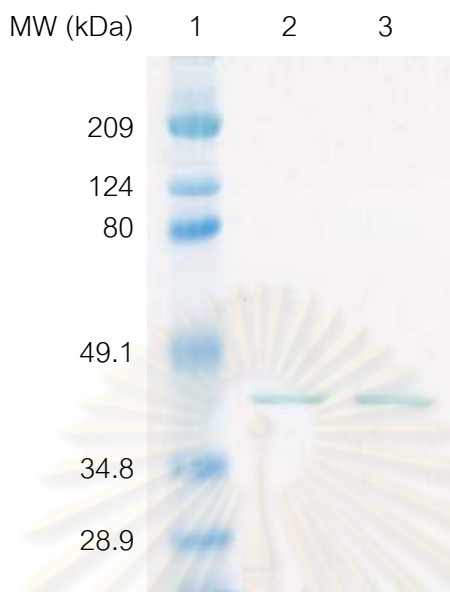


รูปที่ 4.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการที่ของน้ำนักโมเลกุลกับปริมาณของน้ำที่ใส่  
 ไซโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

- |                                |                              |
|--------------------------------|------------------------------|
| 1. เฟอริติน                    | น้ำนักโมเลกุล 450,000 ดาลตัน |
| 2. คะตะเลส                     | น้ำนักโมเลกุล 250,000 ดาลตัน |
| 3. กลอบูลิน                    | น้ำนักโมเลกุล 150,000 ดาลตัน |
| A คือ กลูโคสไอโซเมอเรสจาก PC22 | น้ำนักโมเลกุล 170,000 ดาลตัน |
| B คือ กลูโคสไอโซเมอเรสจาก CH7  | น้ำนักโมเลกุล 170,000 ดาลตัน |

#### 4.8.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (SDS-PAGE)

การทดลองนี้ทำโดยนำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 4.6.2.2 มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่นและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ให้โปรตีนแถบเดี่ยวเคลื่อนที่ได้ในระยะทางเท่ากัน จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ดังแสดงในรูปที่ 4.20 พบว่าแถบโปรตีนของทั้ง 2 สายพันธุ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43,600 ดาลตัน และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าน้ำหนักโมเลกุลจากวิธีเจลฟิวเตรชันที่มีค่าประมาณ 170,000 ดาลตัน ดังนั้นจึงคาดว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 43,600 ดาลตัน ซึ่งจะให้น้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 174,000 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยวิธีเจลฟิวเตรชัน



**รูปที่ 4.19** การหาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล

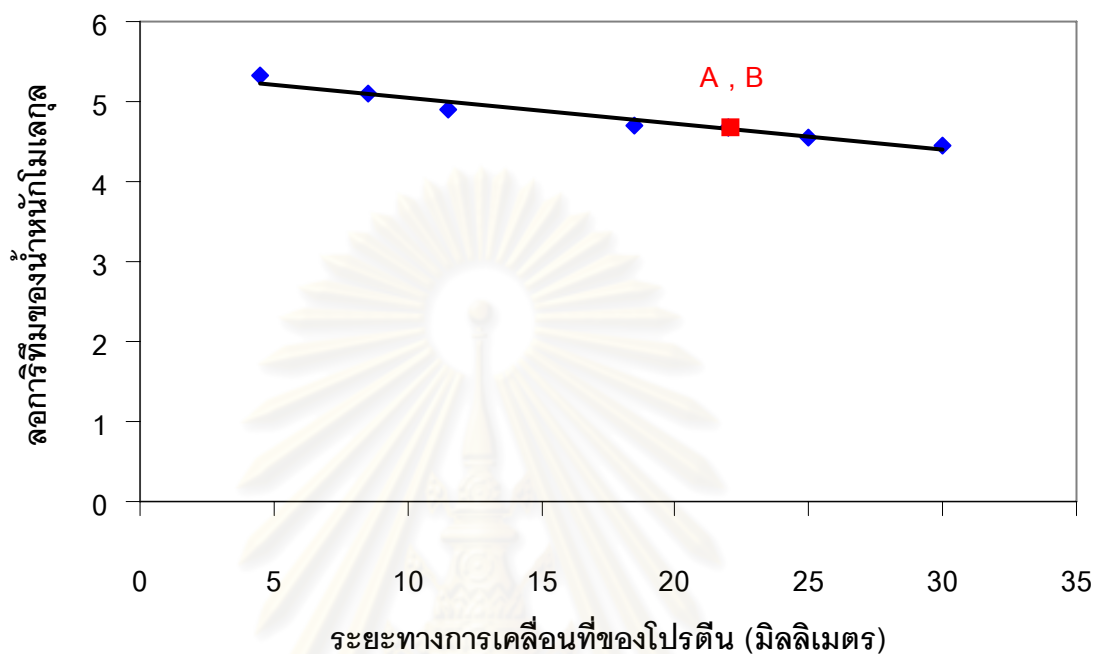
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (1.4 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (1.4 ไมโครกรัม)

โปรตีนมาตรฐานได้แก่

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| 1. ไมโอซิน (Myosin)  | น้ำหนักโมเลกุล 209 กิโลดาลตัน  |
| 2. บีตา-กาแลคโตไซด์ (β-galactosidase)                      | น้ำหนักโมเลกุล 124 กิโลดาลตัน  |
| 3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)               | น้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน   |
| 4. โอวัลบูมิน (Ovalbumin)                                  | น้ำหนักโมเลกุล 49.1 กิโลดาลตัน |
| 5. คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)                | น้ำหนักโมเลกุล 34.8 กิโลดาลตัน |
| 6. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) | น้ำหนักโมเลกุล 28.9 กิโลดาลตัน |



รูปที่ 4.20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนไซโตเดียมโตเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| 1. ไมโอซิน (Myosin)  | น้ำหนักโมเลกุล 209 กิโลดาลตัน  |
| 2. บีตา-กาแลคโตไซด์ (β-galactosidase)                      | น้ำหนักโมเลกุล 124 กิโลดาลตัน  |
| 3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)               | น้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน   |
| 4. โอวัลบูมิน (Ovalbumin)                                  | น้ำหนักโมเลกุล 49.1 กิโลดาลตัน |
| 5. คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)                | น้ำหนักโมเลกุล 34.8 กิโลดาลตัน |
| 6. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) | น้ำหนักโมเลกุล 28.9 กิโลดาลตัน |
| <b>A</b> คือ กลูโคสไอโซเมอเรสจาก PC22                      | น้ำหนักโมเลกุล 43.6 กิโลดาลตัน |
| <b>B</b> คือ กลูโคสไอโซเมอเรสจาก CH7                       | น้ำหนักโมเลกุล 43.6 กิโลดาลตัน |

#### 4.9 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่างๆดังนี้

##### 4.9.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณเท่าๆกัน มาหาแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 40-90 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.21 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ทำงานได้ดีที่สุดที่ 80 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูง 85-90 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังทำงานได้สูงสุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีสูงสุด ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูงเช่นเดียวกันและเอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดที่ 85 องศาเซลเซียส

##### 4.9.2 ผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้แล้วปริมาณเท่าๆกัน มาหาแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการทำการปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.22 และ 4.23 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่างที่เป็นกลาง (6.5-7.5) เช่นเดียวกัน และเอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0

##### 4.9.3 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสต่ออุณหภูมิ

นำกลูโคสไอโซเมอเรสมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรผันอุณหภูมิในช่วง 35-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลืออยู่โดยการทำการปฏิกิริยาภายใต้สภาวะเหมาะสมของเอนไซม์จากข้อ 3.3.14.3 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.24 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และที่ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอกติวิตีลดลงเหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส

ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 พบว่ามีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และที่ 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอกติวิตีลดลงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส

#### 4.9.4 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสต่อความเป็นกรดต่าง

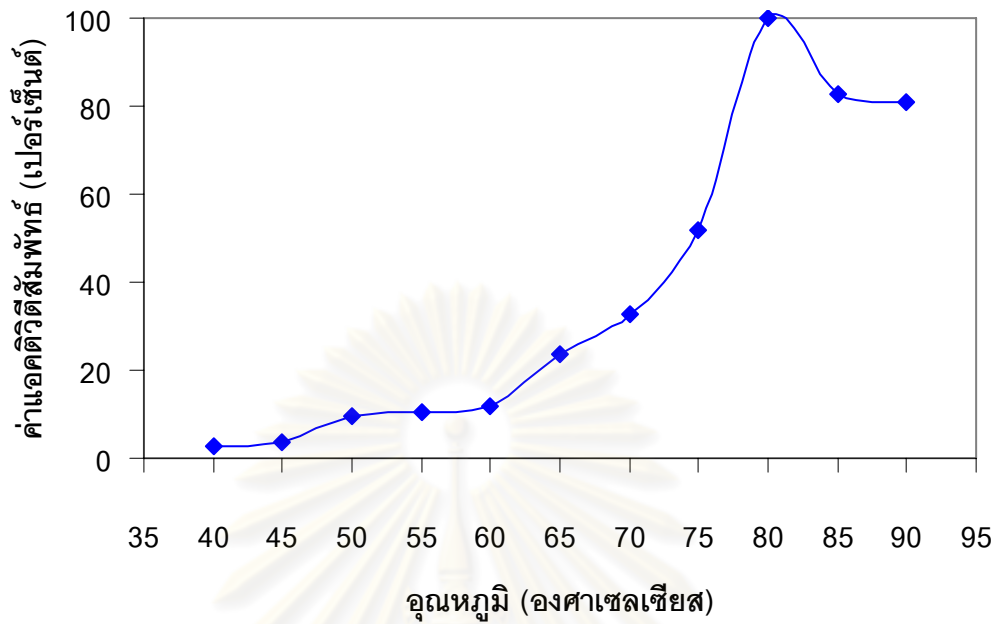
นำกลูโคสไอโซเมอเรสมาในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่แปรผันค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0- 9.0 ปั่นที่อุณหภูมิเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลืออยู่โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังในรูปที่ 4.25 และ 4.26 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0-8.0 โดยยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 5.5 ลงมาเอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วจนเหลือประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.0

ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 พบว่ามีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงเป็นกลางตั้งแต่ 6.0 -7.0 โดยมีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 แต่ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 5.5 ลงมาเอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วจนเหลือประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 7.5 ขึ้นไป เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วเช่นกันจนเหลือประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

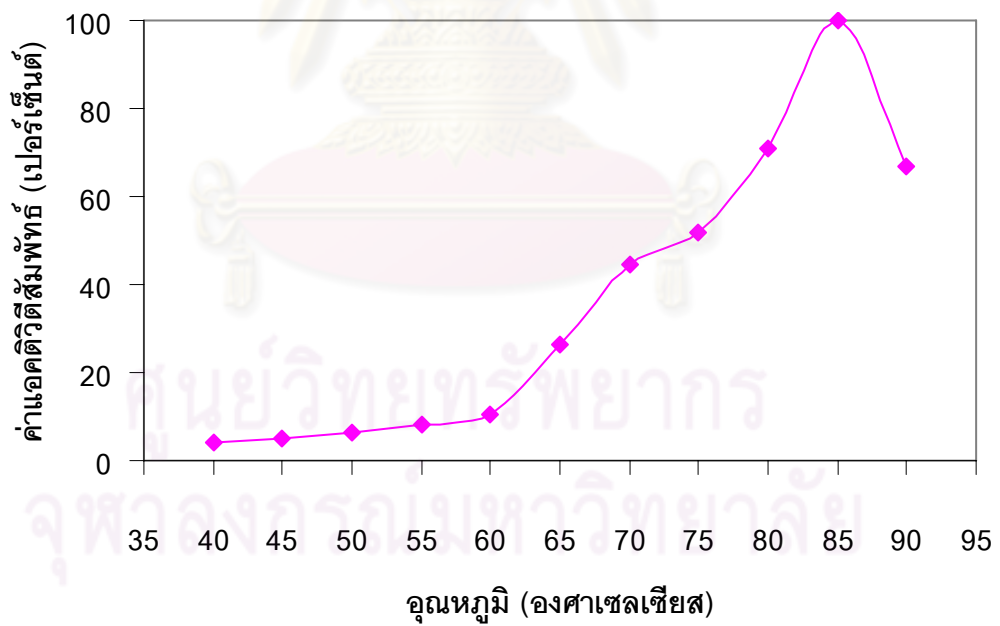
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก)

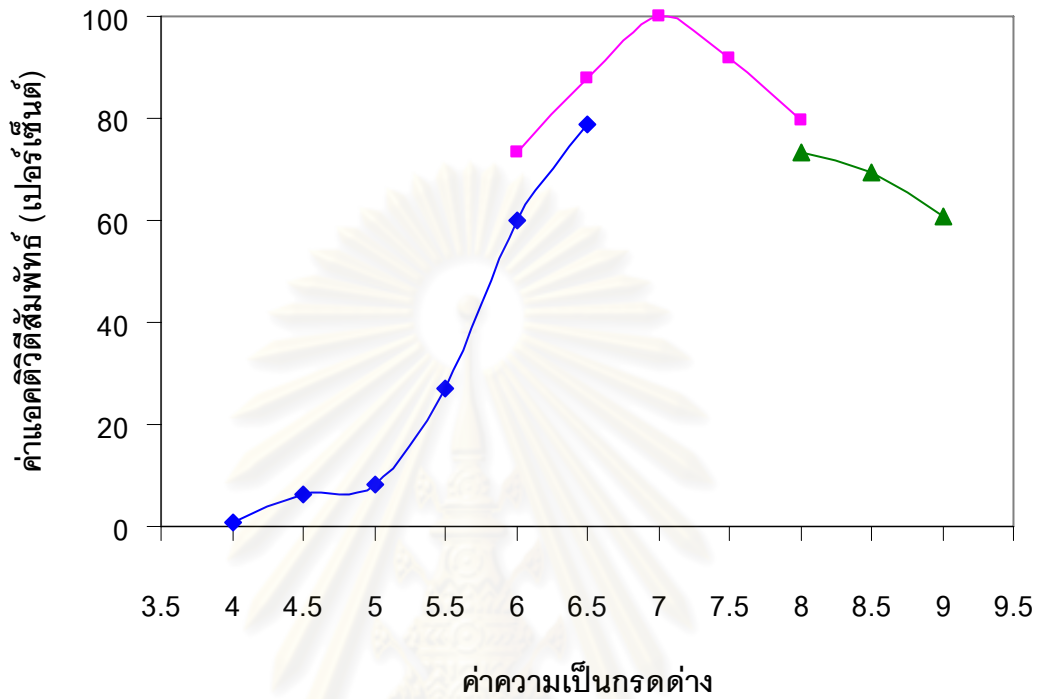


(ข)



รูปที่ 4.21 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข)

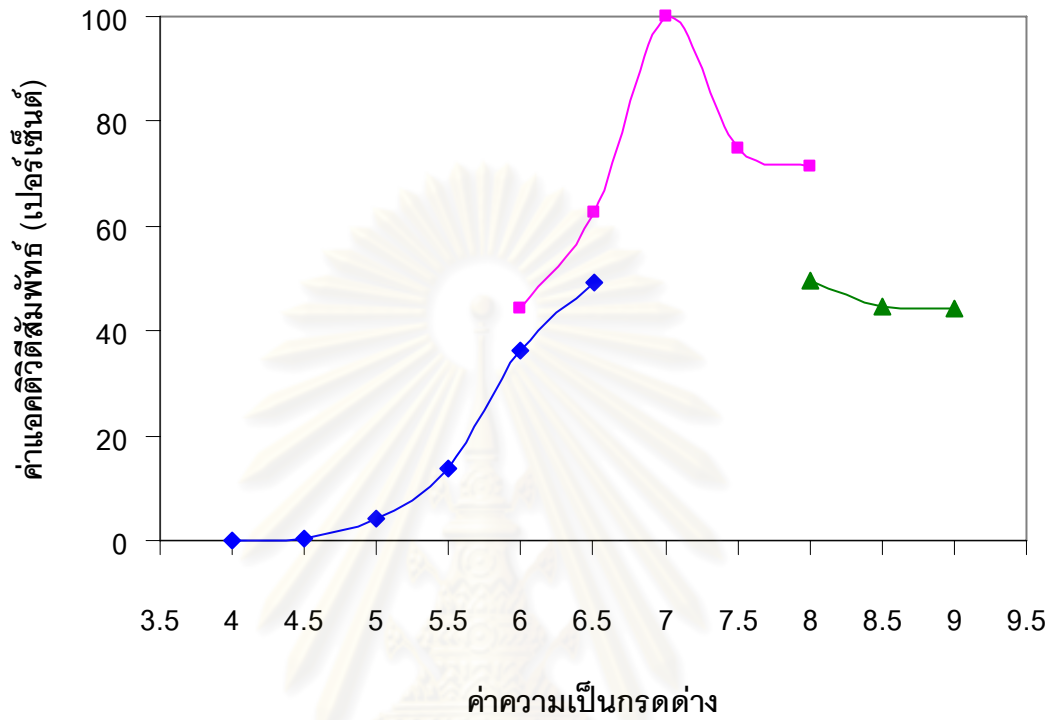
กำหนดให้แอดติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.22 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

- ◆— อะซีเตท บัฟเฟอร์      pH 4.0-6.5
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์      pH 6.0-8.0
- ▲— ทริส บัฟเฟอร์      pH 8.0-9.0

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

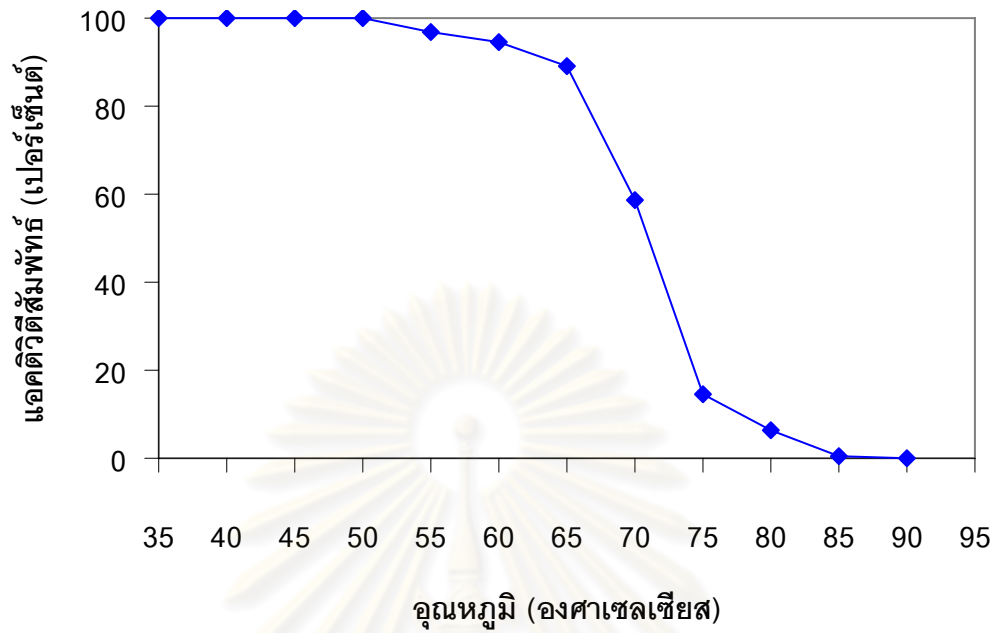


รูปที่ 4.23 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7

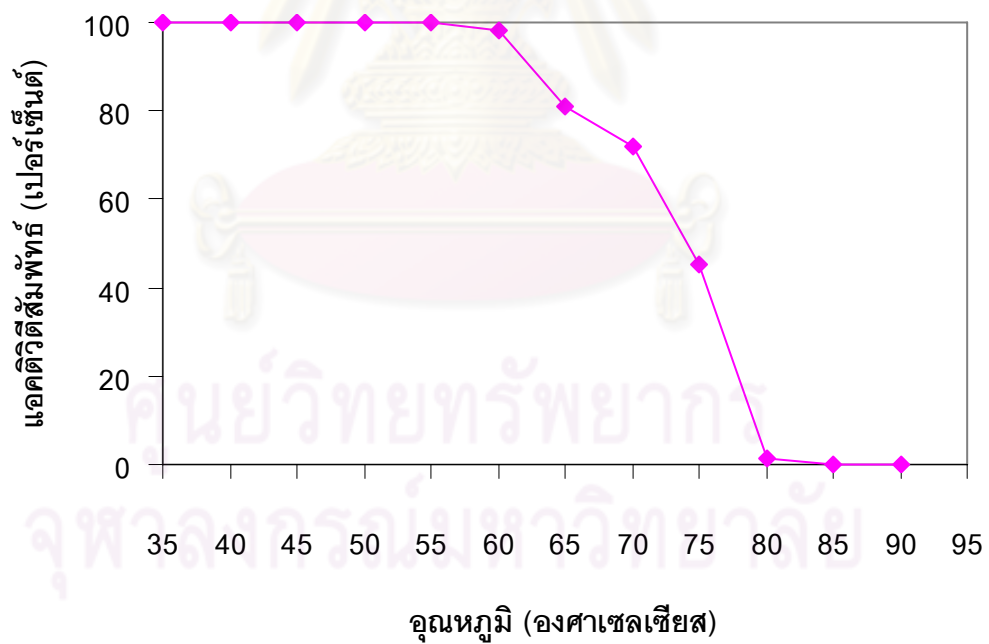
- ◆— อะซีเตท บัฟเฟอร์      pH 4.0-6.5
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์      pH 6.0-8.0
- ▲— ทริส บัฟเฟอร์      pH 8.0-9.0

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

(ก)

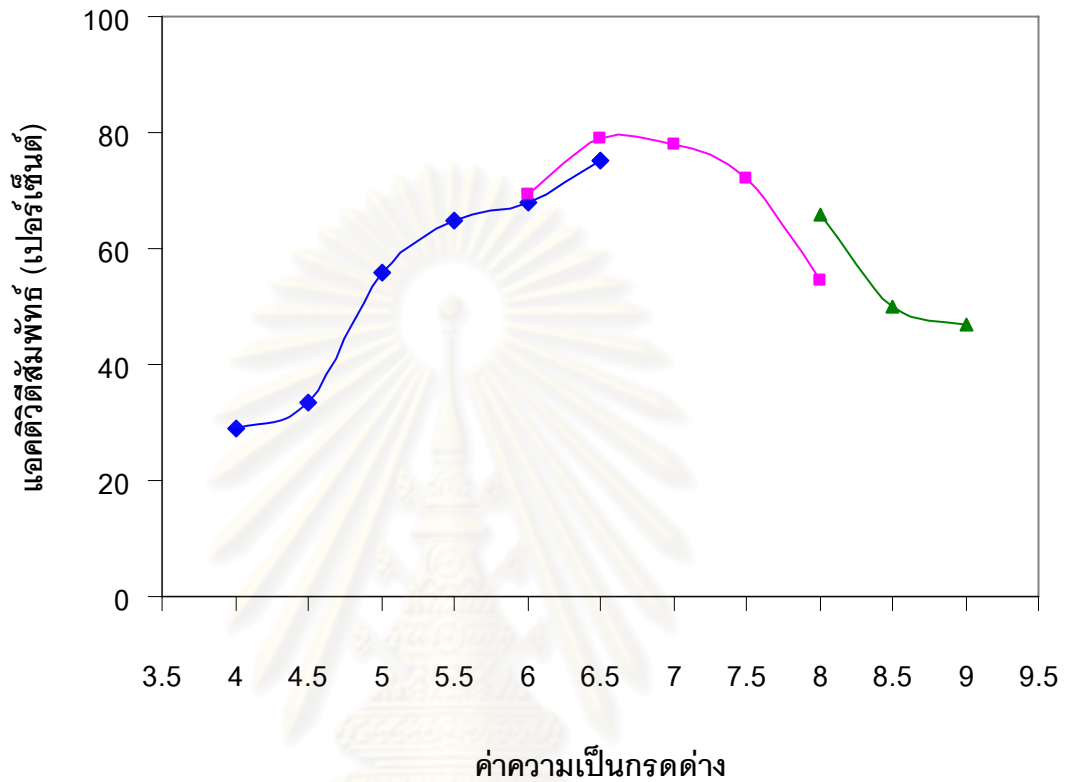


(ข)






รูปที่ 4.24 ความเสถียรของกอลลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข) ต่ออุณหภูมิ

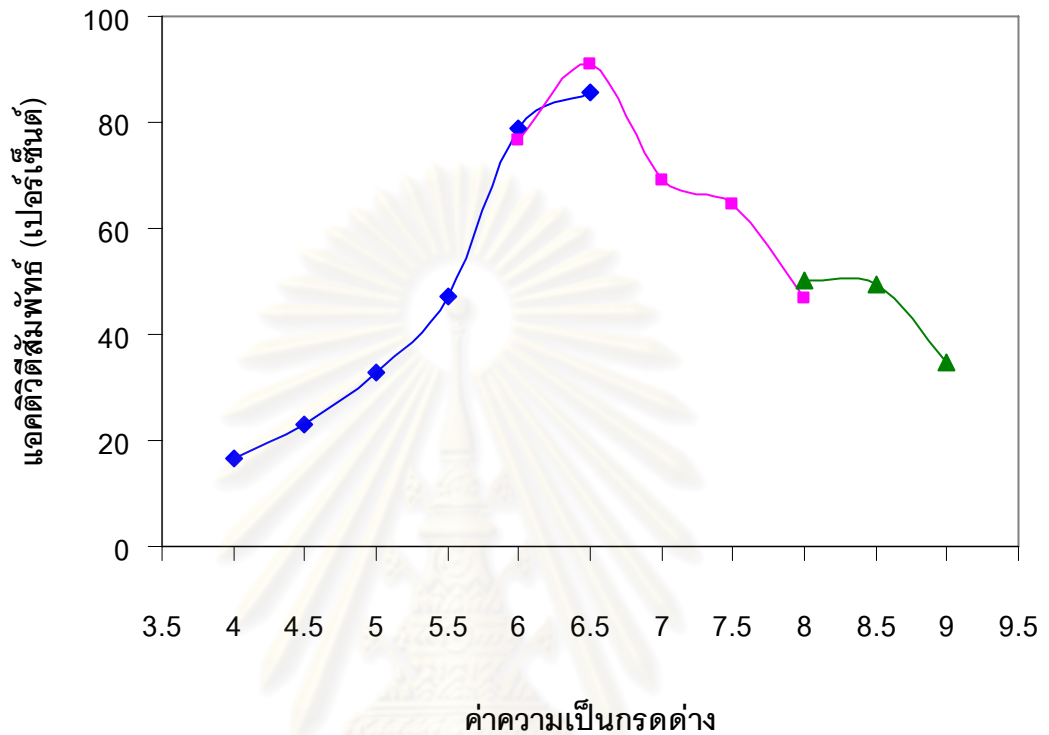
กำหนดให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์






รูปที่ 4.25 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ต่อความเป็นกรดต่าง เมื่อปมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- |   |                  |            |
|---|------------------|------------|
|  | อะซีเตท บัฟเฟอร์ | pH 4.0-6.5 |
|  | ฟอสเฟต บัฟเฟอร์  | pH 6.0-8.0 |
|  | ทริส บัฟเฟอร์    | pH 8.0-9.0 |

กำหนดให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.26 ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ต่อค่าความเป็นกรดต่างเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- |   |                  |            |
|---|------------------|------------|
|  | อะซีเตท บัฟเฟอร์ | pH 4.0-6.5 |
|  | ฟอสเฟต บัฟเฟอร์  | pH 6.0-8.0 |
|  | ทริส บัฟเฟอร์    | pH 8.0-9.0 |

กำหนดให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

#### 4.9.5 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity) ของกลูโคสไอโซเมอเรส

การทดลองนี้ได้นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบแอกติวิตีจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ โดยวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 3.3.14.5 ได้ผลดังตารางที่ 4.6 พบว่า เอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีความจำเพาะต่อไซโลสสูงสุดเช่นเดียวกัน โดยมีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 90.6 และ 72.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีแอกติวิตีจำเพาะต่อกลูโคสเท่ากับ 42.9 และ 41.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่ไม่พบว่ามีแอกติวิตีต่อ *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside เช่นเดียวกัน

**ตารางที่ 4.6** การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity) ของกลูโคสไอโซเมอเรส

สับสเตรท	PC22		CH7	
	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
กลูโคส	42.9	47.3	41.8	57.6
ไซโลส	90.6	100.0	72.5	100.0
<i>p</i> -nitrophenyl $\beta$ -D-xylopyranoside	0	0	0	0

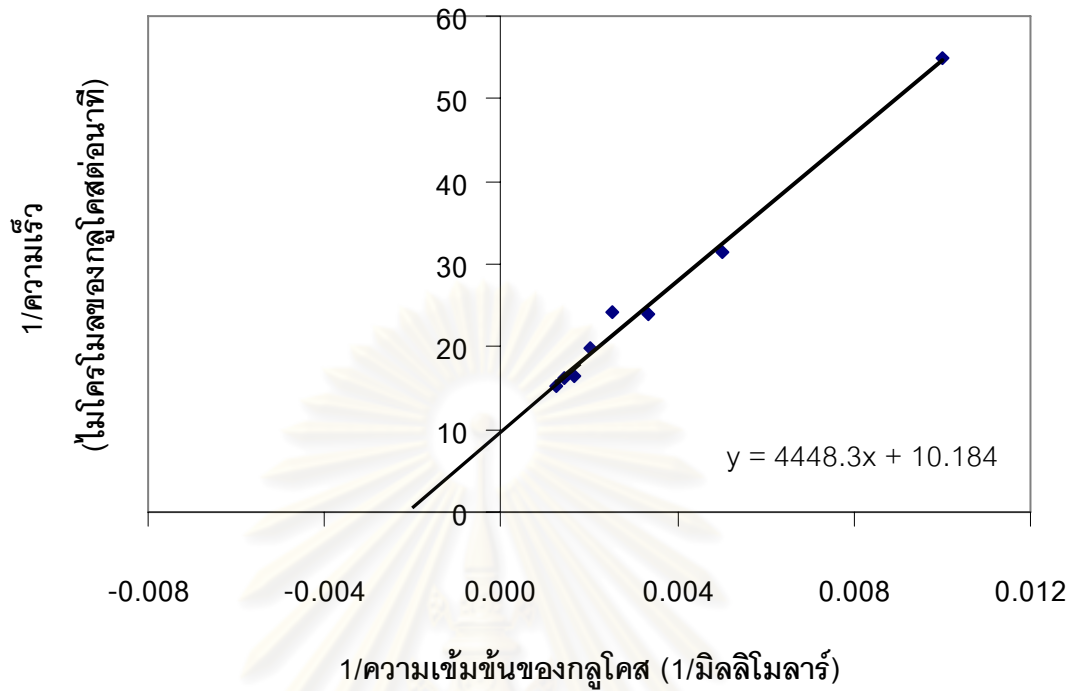
#### 4.9.5 การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรท ( $K_m$ ) ของกลูโคสไอโซเมอเรส

การทดลองนี้ศึกษาความจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรสต่อซับสเตรท 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคสและไซโลส โดยแปรความเข้มข้นของซับสเตรทในช่วง 100 - 800 มิลลิโมลาร์ สำหรับ กลูโคสและ 20 - 160 มิลลิโมลาร์สำหรับไซโลส ผลการทดลองแสดงโดยกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังรูปที่ 4.27 และ 4.28 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 435.93 และ 177.28 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 258.96 และ 82.77 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีค่า  $V_{max}$  ของเอนไซม์ต่อกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 29.97 และ 70.47 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน สำหรับ PC22 และเท่ากับ 32.42 และ 63.64 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน สำหรับ CH7 (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1) และค่า  $K_{cat}$  ของเอนไซม์ต่อกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 84.91 และ 199.66 ต่อวินาที สำหรับ PC22 และเท่ากับ 91.86 และ 180.31 ต่อวินาที สำหรับ CH7 (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 2)

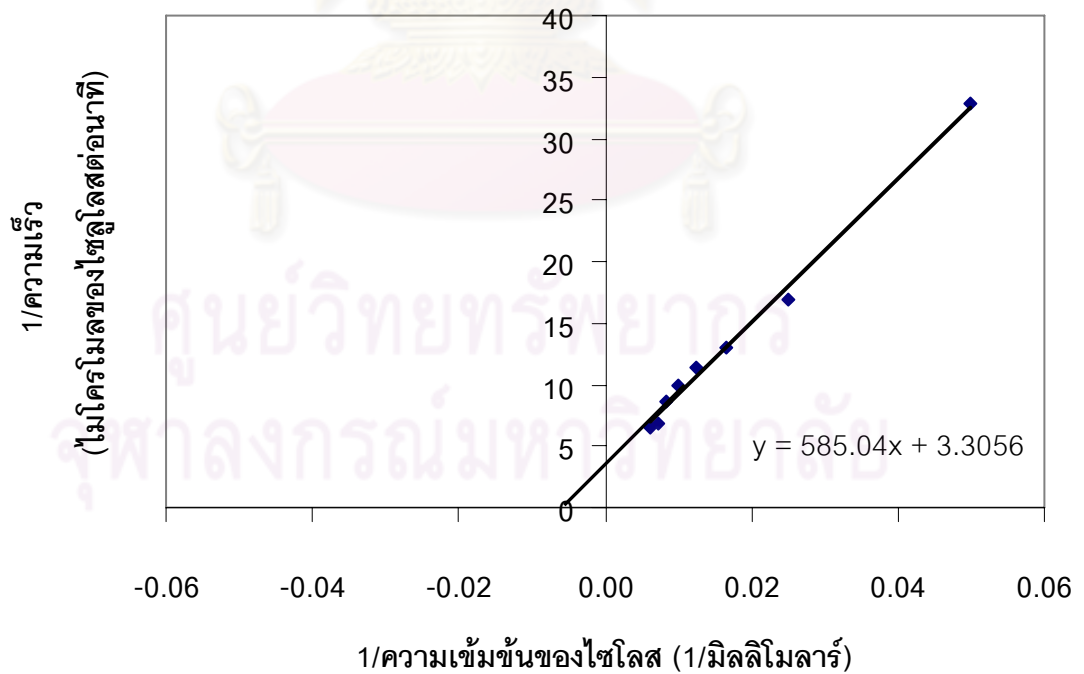
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก)

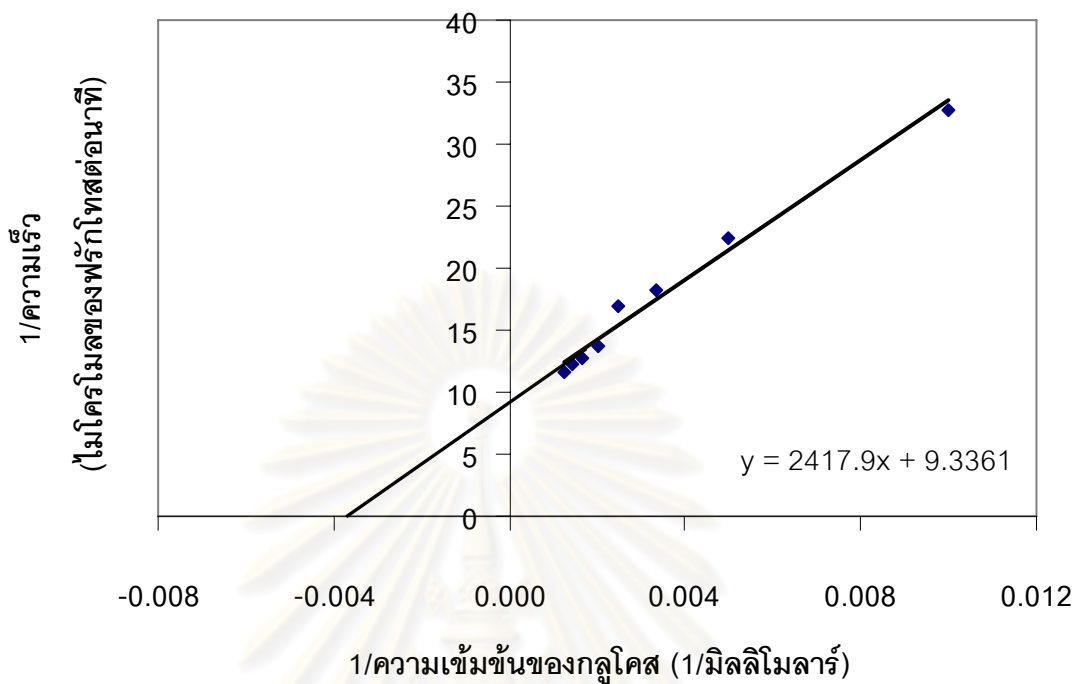


(ข)

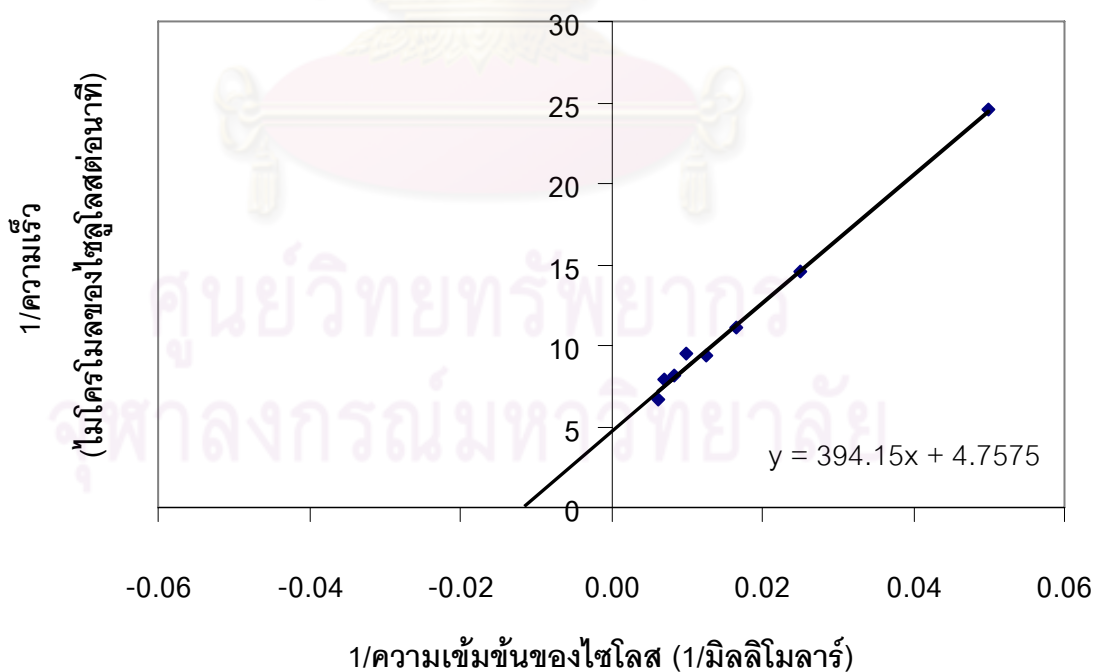


รูปที่ 4.27 โลว์ไวเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า  $K_m$  กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ต่อกลูโคส (ก) และไซโลส (ข)

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.28 โลนวีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า  $K_m$  กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ต่อกลูโคส (ก) และไซลิตอล (ข)

#### 4.9.6 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอิออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 โดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสด้วย 100 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอเพื่อกำจัดอิออนออกจากโมเลกุลก่อน มาบ่มกับอิออนของโลหะชนิดต่างๆให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ และ 0.1 มิลลิโมลาร์ สำหรับโคบอลต์อิออน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าอิออนของโลหะทุกชนิดมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เล็กน้อย ยกเว้น  $Fe^{2+}$  มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์จาก CH7 และยับยั้งโดยสมบูรณ์ใน PC22 และพบว่า  $Mg^{2+}$  ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ  $Co^{2+}$  ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุด นอกจากนั้นยังทำการแปรผันอิออนโลหะทุกชนิดความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ  $Co^{2+}$  ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พบว่าปฏิกิริยาที่มี  $Mg^{2+}$  ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ และ  $Co^{2+}$  ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งได้เท่ากับ 20.14 และ 28.17 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ

จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $Mg^{2+}$  และ  $Co^{2+}$  ต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 โดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสด้วย 100 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ มาบ่มกับอิออนของ  $Mg^{2+}$  ที่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาที่มี  $Co^{2+}$  ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.29 พบว่า  $Mg^{2+}$  ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 98 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ PC22 ส่วนเอนไซม์จาก CH7 พบว่า  $Mg^{2+}$  ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 200 เปอร์เซ็นต์

สำหรับผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $Co^{2+}$  ต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 โดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสด้วย 100 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ มาบ่มกับอิออนของ  $Co^{2+}$  ที่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.50 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาที่มี  $Mg^{2+}$  ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ สำหรับ PC22 และ CH7 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.30 พบว่า  $Co^{2+}$  ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 108 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ PC22 ส่วนเอนไซม์จาก CH7 พบว่า  $Co^{2+}$  ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 205 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส

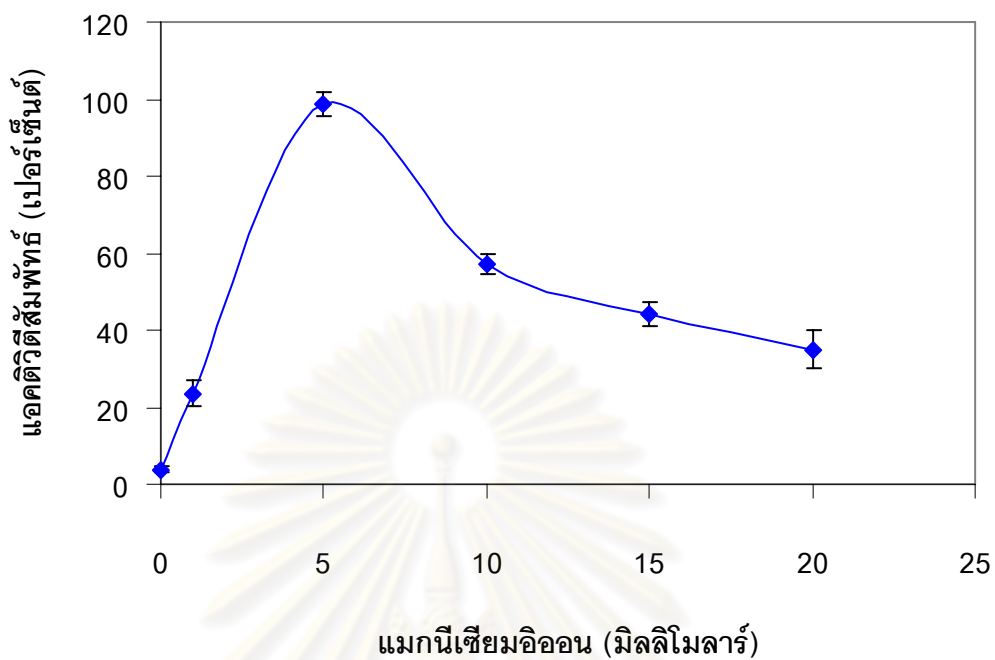
ชนิดของอิออนโลหะ (ความเข้มข้นสุดท้าย)	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	PC22	CH7
Control	100.00	100.00
None	3.69	4.57
Mg <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์)	15.19	16.37
Mn <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์)	6.90	12.80
Ca <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์)	8.86	11.35
Fe <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์)	0	0.52
Co <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์)	6.79	9.52
Co <sup>2+</sup> (0.1 มิลลิโมลาร์)	11.05	20.22
Mg <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์) + Co <sup>2+</sup> (0.1 มิลลิโมลาร์)	20.14	28.17
Mn <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์) + Co <sup>2+</sup> (0.1 มิลลิโมลาร์)	11.85	10.27
Ca <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์) + Co <sup>2+</sup> (0.1 มิลลิโมลาร์)	7.82	11.15
Fe <sup>2+</sup> (1.0 มิลลิโมลาร์) + Co <sup>2+</sup> (0.1 มิลลิโมลาร์)	0.35	6.29

Control คือ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ไม่ผ่านการไดอะไลส์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ซีดี้ทีเอ และวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีมาตรฐานซึ่งมี Mg<sup>2+</sup> 5.0 มิลลิโมลาร์และ Co<sup>2+</sup> 0.1 มิลลิโมลาร์

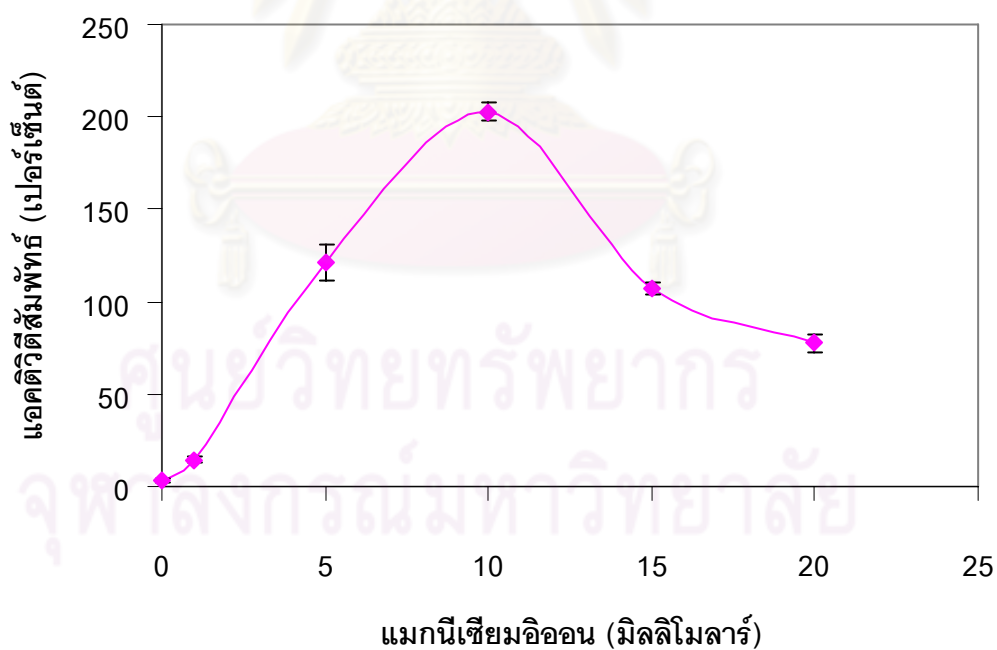
None คือ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านการไดอะไลส์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ซีดี้ทีเอ และวิเคราะห์แอกติวิตีโดยไม่เติมอิออนโลหะใดๆในปฏิกิริยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)

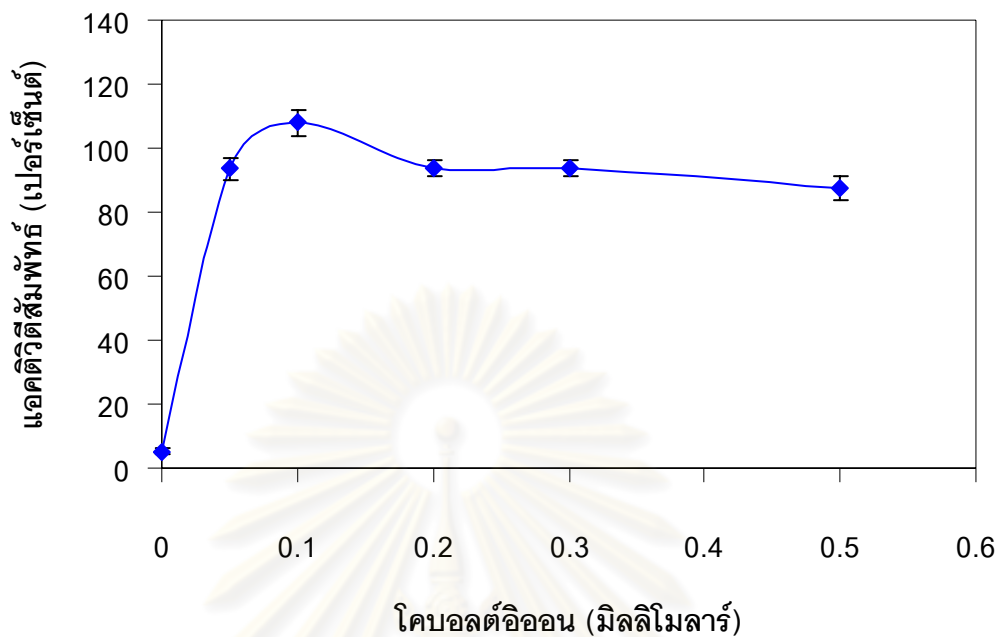


(ข)

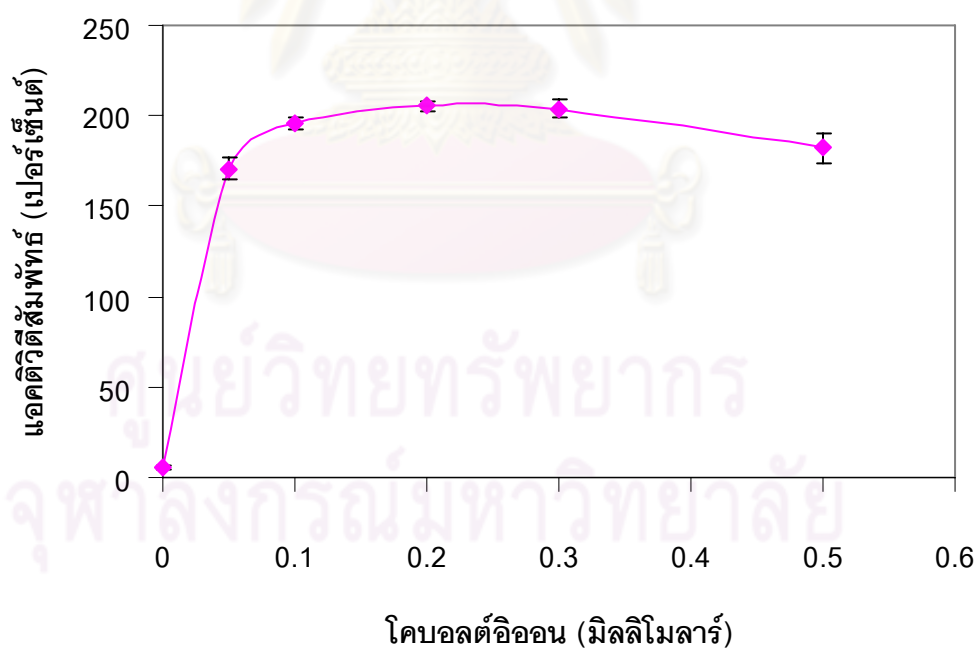


รูปที่ 4.29 ผลของความเข้มข้นของแมกนีเซียมออกไซด์ต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข) ในปฏิกิริยาที่มีโคบอลต์ไอออนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.30 ผลของความเข้มข้นของโคบอลต์ไอออนต่อแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข) ในปฏิกิริยาที่มีแมกนีเซียมไอออนความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ สำหรับ PC22 และ CH7

#### 4.10 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินนูลิเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อมีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนเบื้องต้น

นอกจากกลูโคสไอโซเมอเรสซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตฟรักโทสจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งแล้ว ปัจจุบันยังพบว่าเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ อินนูลิเนส (inulinase) ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจสูงเพื่อนำมาใช้ผลิตฟรักโทสโดยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินนูลิน (Sharma และ Gill, 2007) ดังนั้นงานวิจัยต่อไปจึงต้องการตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินนูลิเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เบื้องต้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลินสกัดจากพืชที่เป็นแหล่งสะสมอินนูลิน ได้แก่ หัวแก่นตะวัน เป็นแหล่งคาร์บอน (Lingyun และคณะ, 2007)

##### 4.10.1 การสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน

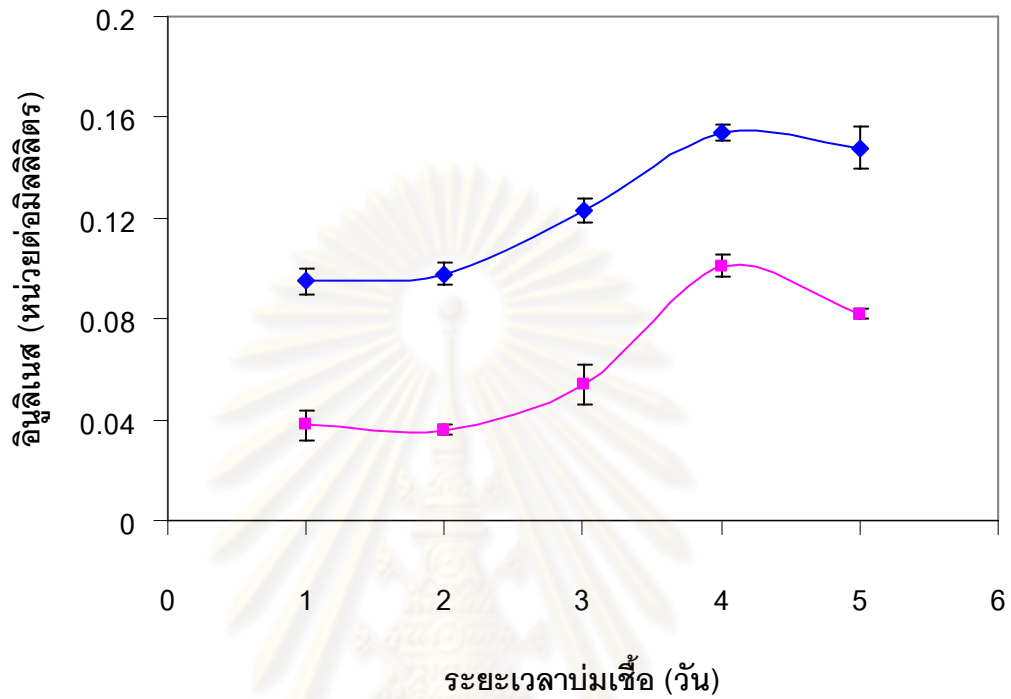
จากการเตรียมอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตามวิธีในข้อ 3.3.15.1.2 เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตอินนูลิเนส ผลการทดลองพบว่าอินนูลินในสารสกัดจากหัวแก่นตะวันตามวิธีของ Lingyun และคณะ (2007) และ Dische และ Borenfreund (1951) พบว่าได้ปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมีค่าประมาณ 16.3 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ

4.10.2 ผลของความเข้มข้นอินนูลินและระยะเวลาเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตอินนูลิเนสของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 เมื่อมีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน

##### 4.10.2.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตอินนูลิเนส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในอาหารที่มีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันที่มีความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.31 พบว่าทั้ง *Streptomyces* PC22 และ CH7 สามารถผลิตอินนูลิเนสได้สูงสุดในวันที่ 4 เช่นเดียวกัน โดย *Streptomyces* sp. PC22 ผลิตอินนูลิเนสได้ประมาณ 0.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ *Streptomyces* sp. CH7 สามารถผลิตอินนูลิเนสได้ประมาณ 0.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตอินนูลิเนสได้เพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาผลของความเข้มข้นของอินนูลินต่อการผลิตอินนูลิเนสของเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

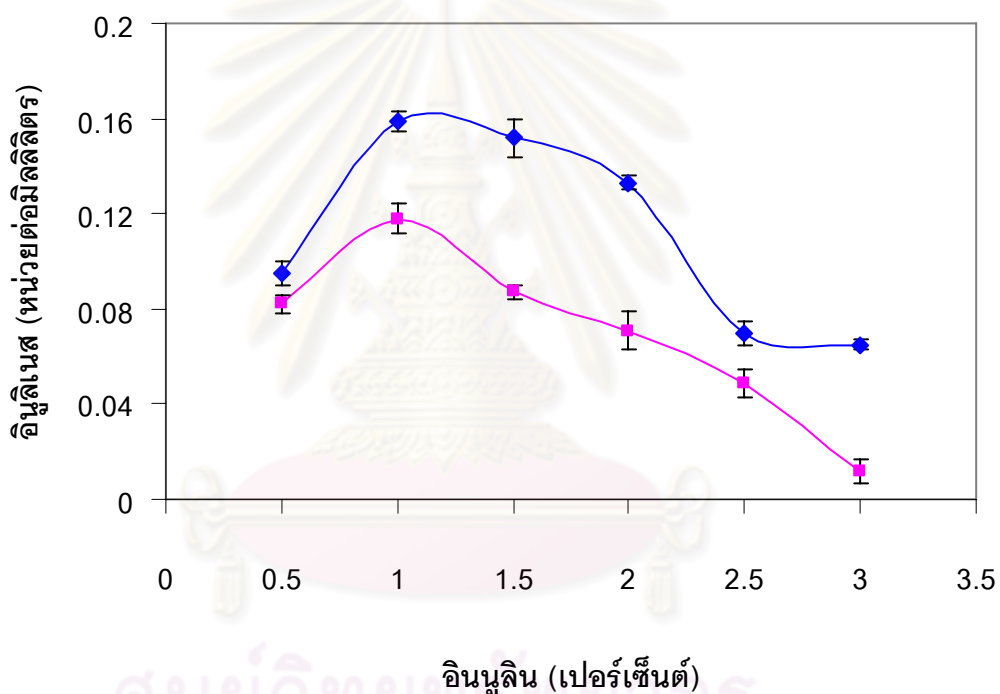


รูปที่ 4.31 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลินสจาก *Streptomyces* PC22 (◆) และ CH7 (■)



#### 4.10.2.2 ความเข้มข้นของอินนูลินที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลิเนส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในอาหารที่มีอินนูลินสกัดจากหัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 4 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.32 พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 ผลิตอินนูลิเนสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลินสกัดความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกัน โดย *Streptomyces* PC22 และ CH7 ผลิตอินนูลิเนสได้ประมาณ 0.16 และ 0.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.32 ผลของความเข้มข้นอินนูลินต่อการผลิตอินนูลิเนสจาก *Streptomyces* PC22 (◆) และ CH7 (■)

#### 4.10.3 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7

นำเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะเหมาะสมดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่างๆ ดังนี้

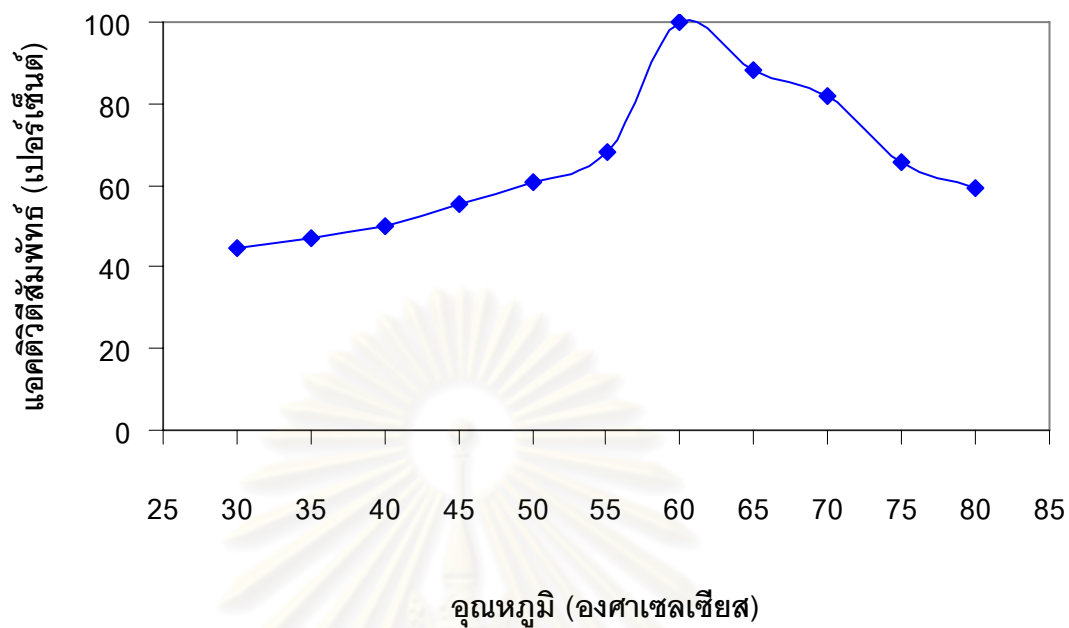
##### 4.10.3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอินูลิเนส

จากการนำเอนไซม์ปริมาณเท่าๆกัน มาหาแอกติวิตีของอินูลิเนส โดยการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.32 พบว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุด และอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส

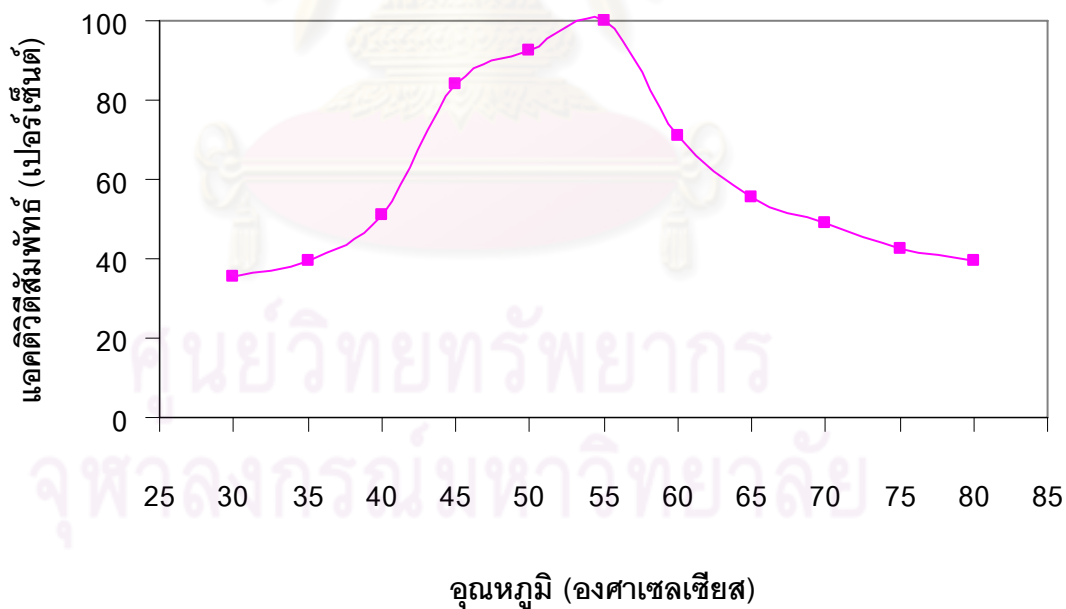
##### 4.10.3.2 ผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของอินูลิเนส

จากการนำเอนไซม์ปริมาณเท่าๆกัน มาหาแอกติวิตีของอินูลิเนส โดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.33 และ 4.34 พบว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่างที่เป็นกลาง (6.0-7.0) โดยเอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 ส่วน *Streptomyces* sp. CH7 ทำงานได้ดีในปฏิกิริยาที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยเอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดในที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0

(ก)

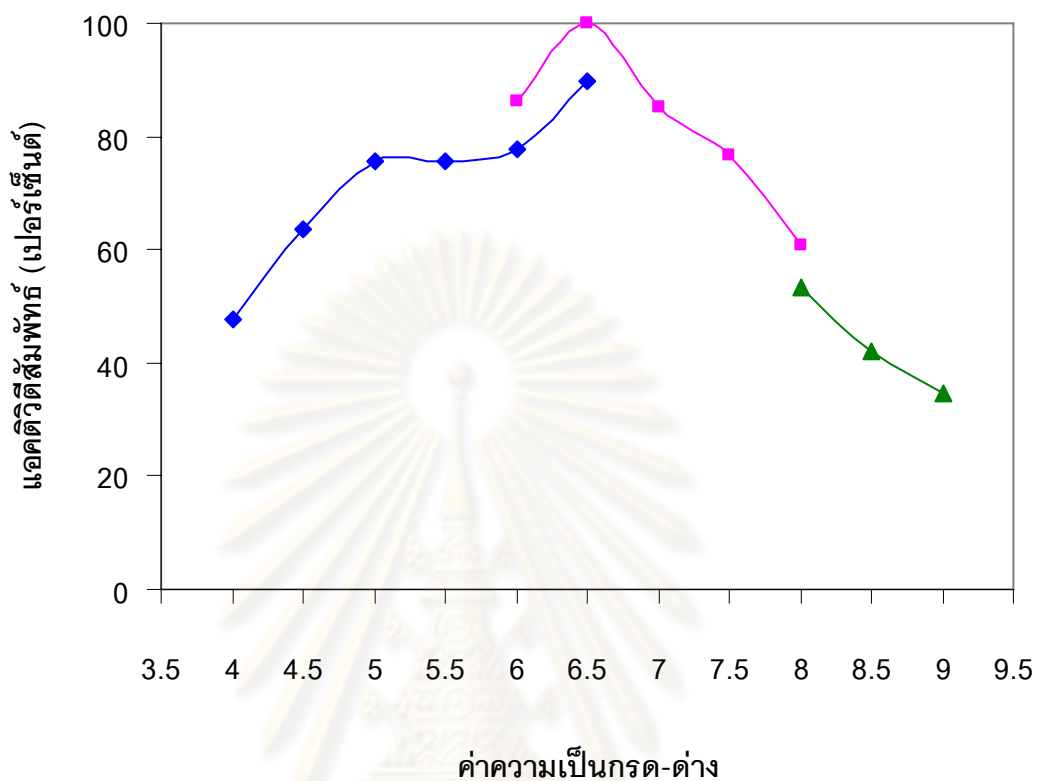


(ข)



รูปที่ 4.33 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอนุลินเนสจาก *Streptomyces* PC22 (ก) และ CH7 (ข)

กำหนดให้แอดติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



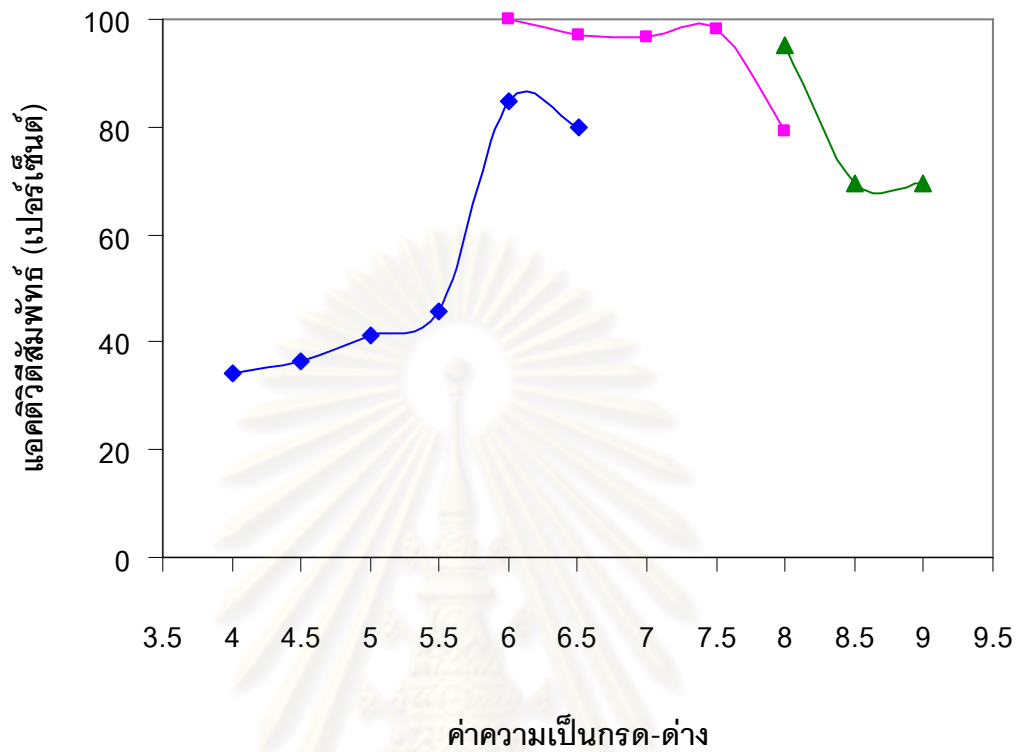
รูปที่ 4.34 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

—◆— อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 4.0-6.5

—■— ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0-8.0

—▲— ทริส บัฟเฟอร์ pH 8.0-9.0

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.35 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CH7

- ◆— อะซีเตท บัฟเฟอร์      pH 4.0-6.5
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์      pH 6.0-8.0
- ▲— ทริส บัฟเฟอร์      pH 8.0-9.0

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

กลูโคสไอโซเมอเรส เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรม การผลิตน้ำเชื่อมฟรุคโทส (high fructose syrup) เนื่องจากเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้เปลี่ยนกลูโคสที่ ได้จากการย่อยสลายแป้งให้เป็นฟรุคโทส (Kochhar และคณะ, 1997) มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลาย ชนิดผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้ แต่กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* มีสมบัติที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เป็นกลาง ซึ่งป้องกันการเกิด สิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการในปฏิบัติการการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโทสได้ นอกจากนี้ยังมีความคงทน ต่อความร้อน (heat stability) สูง ทำให้ป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ (Bucke, 1977)

*Streptomyces* PC22 และ CH7 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยที่ สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนได้ (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถเจริญได้ดีที่ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไซแลเนส นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สร้างเอนไซม์ย่อยสลายกิ่งของไซแลนที่มีแอกติวิตีสูงได้แก่ แอซีติลเอสเทอเรส (Lauruengtana และ Pinphanichakarn, 2006) และ แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนซิเดส (Chungool และคณะ, 2008) สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 สามารถเจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด ต่าง 7.0 และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตบีตา-ไซโลลิเดส (Pinphanichakarn และคณะ, 2004)

การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต้องถูกชักนำด้วยไซโลสและเนื่องจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 สร้างเอนไซม์ในกลุ่มการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีจึงน่าจะ ย่อยไซแลนหรือวัสดุการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบให้เป็นไซโลสแล้วนำไปชักนำการสร้าง กลูโคสไอโซเมอเรสได้ งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 โดยในขั้นแรกได้ตรวจสอบการชักนำการสร้างเอนไซม์ด้วยไซโลสเปรียบเทียบกับเมื่อมี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซโลส จุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิต กลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงกว่าอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงว่าการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์นี้ต้องการไซโลสเป็นสารชักนำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lama และคณะ (2001) เมื่อแปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆในการเลี้ยงเชื้อและพบว่าไซโลสเป็นคาร์บอนที่ดีที่สุด สำหรับการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Bacillus thermoantarcticus* ขั้นตอนต่อมาได้ศึกษาการ ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 โดยแปรผันความเข้มข้นของไซโลส

พบว่า *Streptomyces* spp. PC22 และ CH7 ผลิตกลูโคสไฮโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 1.2 และ 1.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อในไฮโดสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 วัน เช่นเดียวกัน และพบว่าแอกติวิตีที่ได้สูงกว่ากลูโคสไฮโซเมอเรสจาก *Streptomyces thermonitrificans* ที่ผลิตได้ประมาณ 0.40 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไฮโดส 1 เปอร์เซ็นต์ และ ซอบิทอล 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน (Deshmukh และคณะ, 1994) และพบว่าการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ทั้งสองจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของไฮโดสเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.4) ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของไฮโดสที่เพิ่มขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในทิศทางเดียวกันดังรายงานของ Prabhakar และ Raju (1993)

ในขั้นตอนต่อมาได้ศึกษาการผลิตกลูโคสไฮโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์โดยมีไฮแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Sigma, USA) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 ผลิตกลูโคสไฮโซเมอเรสได้สูงสุดประมาณ 3.5 และ 5.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไฮแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 และ 3 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มการย่อยสลายไฮแลน ได้แก่ ปีตา-ไฮโดลลิเดสและไฮแลเนส (รูปที่ 4.6) พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 มีแอกติวิตีของไฮแลเนสสูงกว่าปีตา-ไฮโดลลิเดส สอดคล้องกับรายงานของ Ungchaithum และ Pinphanichakarn (1998) ส่วน *Streptomyces* sp. CH7 มีแอกติวิตีของปีตา-ไฮโดลลิเดสสูงกว่าไฮแลเนส สอดคล้องกับรายงานของ Pinphanichakarn และคณะ (2004)

เนื่องจากไฮแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ผลิตขายทางการค้ามีราคาแพง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทดลองใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆที่มีไฮแลนเป็นองค์ประกอบ (Takasaki, 1966) ได้แก่ กากเมล็ดฝ้าย ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ และยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เป็นประโยชน์ จากตารางที่ 4.2 พบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตกลูโคสไฮโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 และพบว่ามีแอกติวิตีของไฮแลเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์ข้างต้น สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 พบว่าเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตกลูโคสไฮโซเมอเรสและพบว่ามีแอกติวิตีของปีตา-ไฮโดลลิเดสสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบปริมาณไซแลนที่มีในวัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ พบว่าเปลือกข้าวโพดมีปริมาณไซแลนสูงสุด จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ในขณะที่รำข้าวสาลีปริมาณไซแลนต่ำกว่าเปลือกข้าวโพดและซังข้าวโพดแต่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เนื่องจากรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างไซแลเนสของจุลินทรีย์ ดังรายงานของเนริสา คุณประทุม (2543) เมื่อเปรียบเทียบวัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ พบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตไซแลเนสจาก *Trichoderma reesei* และสอดคล้องกับ Gawande และ Kamat (2000) ที่รายงานว่า *Aspergillus niger* ผลิตไซแลเนสได้สูงถึง 26.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลี 1.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าในรำข้าวสาลีมีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจน เกือบแรมและวิตามินบีสูง ซึ่งทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดี

ตารางที่ 5.1 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตร

วัสดุทางการเกษตร	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			เอกสารอ้างอิง
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	
เปลือกข้าวโพด (corn husk)	38.2	44.5	6.6	Barl และคณะ (1991)
ซังข้าวโพด (corn cob)	35	34.8	12.8	Yang และคณะ (2005)
รำข้าวเจ้า (rice bran)	8.3	17.58	2.38	เนริสา คุณประทุม (2543)
รำข้าวสาลี (wheat bran)	9.07	26.10	2.74	เนริสา คุณประทุม (2543)
กากเมล็ดฝ้าย (cottonseed husk)	64.7	18.5	31.5	Pandey และ Gurjar, 1987

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมพบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสสูงสุด 2.23 และ 3.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 และเปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 จากผลการวิจัยในขั้นตอนนี้พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่าการเลี้ยงในไซแลนจากเปลือกข้าวโพด ทั้งนี้อาจเนื่องจากไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบในวัสดุทางการเกษตรที่ใช้มีความเข้มข้นต่ำกว่าไซแลนบริสุทธิ์ และในวัสดุทางการเกษตรยังมีสารประกอบอื่นๆ เช่น ลิกนิน ที่สามารถยับยั้งการผลิต



เอนไซม์ได้ ในขณะที่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของวัสดุการเกษตรให้มากขึ้นจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดมากขึ้น ส่งผลให้การส่งผ่านของอากาศสู่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ทั่วถึง ดังนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จึงลดลง อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้พบว่าการใช้วัสดุการเกษตรที่เหมาะสมเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถให้แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในไซโลสซึ่งมีราคาแพง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Calik และคณะ (2009) ที่พบว่าเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซโลส *Bacillus thermoantarcticus* สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงกว่า 3.5 เท่า ดังนั้นจึงสามารถใช้วัสดุการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces* PC22 และ CH7 ได้ จากตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 กับจุลินทรีย์อื่นๆ พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ ทั้งยังสามารถใช้วัสดุการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ได้



คุนยวิทย์ทรพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็น กรด-ด่าง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	แอกติวิตี (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. PC22	ไซโลส (2%)	45	9.0	1	1.20	งานวิจัยนี้
	ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (1%)	45	9.0	2	3.50	
	รำข้าวสาลี (2%)	45	9.0	2	2.23	
<i>Streptomyces</i> sp. CH7	ไซโลส (2%)	40	7.0	1	1.80	งานวิจัยนี้
	ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (1%)	40	7.0	3	5.00	
	เปลือกข้าวโพด (2.5%)	40	7.0	3	3.12	
<i>Arthrobacter</i> sp. NCIM 2934	ไซโลส (1%)	35	7.0	42 (ชม.)	0.76 (หน่วยต่อมล.)	Prabhakar และ Raju, 1993
<i>Arthrobacter</i> <i>nicotianae</i>	ไซโลส (1%)	28-30	6.8	1	0.47	Sapunova และคณะ, 2006
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	ไซโลส (1%)	50	10.0	16 (ชม.)	0.75	Chauthawale และ Rao, 1994
<i>Bacillus</i> <i>thermoantarcticus</i>	ไซแลนจากไม้เบิร์ช (1.06%)	55	-	1	1.63 (หน่วยต่อมล.)	Calik และคณะ, 2009

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็น กรด-ด่าง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	แอกติวิตี (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	เอกสารอ้างอิง
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	ไซโลส (1%)	28-30	6.8	1	0.71	Sapunova และคณะ, 2006
<i>Escherichia coli</i>	ไซโลส (1%)	28-30	6.8	1	0.46	Sapunova และคณะ, 2006
<i>Lactobacillus</i> <i>bifermentans</i>	ไซโลส (1%)	37	7.5	-	3.93 (หน่วยต่อมล.)	Givry และ Duchiron, 2008
<i>Streptomyces</i> sp. EC10	ไซโลส (0.2%)	-	-	2	6.65	Belfaquih และ Penninckx, 2000
	ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (0.2%)	-	-	2	5.20	
<i>Streptomyces</i> <i>fusant</i> D3	ไซโลส (0.5%)	30	7.5	-	1.60 (หน่วยต่อมล.)	Teeradakorn และคณะ, 1998
	ไซแลน (1%)	30	7.5	-	0.88 (หน่วยต่อมล.)	

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็น กรด-ด่าง	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	แอกติวิตี (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	ไซโลส (1.5%)	30	7.0	2	1.25	Chen และคณะ, 1979
	ไซแลน (2%)	30	7.0	2	1.59	
	เฮมิเซลลูโลส ที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (3%)	30	7.0	2	2.00	
<i>Streptomyces thermonitrificans</i>	ไซโลส (1%) + ซอบิทอล (2%)	50	8.0	16 (ชม.)	0.40	Deshmukh และคณะ, 1994

งานวิจัยนี้ยังได้ทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์ไปใช้งาน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ในขั้นตอนแรกเพื่อให้ได้เอนไซม์เข้มข้น การสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์จึงทำโดยวิธีการบดด้วยผงอะลูมินา แทนการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์ด้วยสารละลาย CTAB (ตามข้อ 3.3.1.3) ซึ่งได้เอนไซม์ที่ค่อนข้างเจือจาง พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสเท่ากับ 2.02 และ 2.22 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่าต่ำกว่าที่รายงานไว้ในขั้นตอนการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์โดยวิธีการบดอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียแอกติวิตีได้เนื่องจากแรงกลและความร้อนที่เกิดขึ้นขณะบด

ในขั้นตอนการทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออนลบ พบว่าเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ จับกับตัวกลางในคอลัมน์ โดยกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ถูกชะออกจากตัวกลางด้วยไซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.3-0.4 โมลาร์ ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ถูกชะออกจากตัวกลางด้วยไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4-0.5 โมลาร์ หลังจากการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนดังกล่าวแล้ว พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.44 และ 12.07 เท่าตามลำดับ และเหลือแอกติวิตีอยู่ 41.27 และ 77.15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถกำจัดบีตา-ไซโลลิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ออกไปได้บ้างดังรายงานของ Pinphanichakarn และคณะ (2004) ที่พบว่าบีตาไซโลลิดีสถูกชะออกจากตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.63-0.75 โมลาร์ และในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ คือ นำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 19.71 และ 16.24 เท่าตามลำดับ และเหลือแอกติวิตีอยู่ 38.63 และ 64.56 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5 และเมื่อพิจารณาในแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้มากในแต่ละขั้นตอนซึ่งสอดคล้องกับค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น มีรายงานการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ให้บริสุทธิ์โดยวิธีต่างๆ เช่น กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Arthrobacter* sp. NRRL B-3728 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนดีอี-เซฟาคริล (DEAE-Sephacel) และเจลฟิวเตรชัน (gel filtration) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 19.8 เท่า และมีแอกติวิตีคงเหลือ 50.0 เปอร์เซ็นต์ (Smith และคณะ, 1991), กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces*

*olivochromogenes* E86 ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนตัวกลางต่างๆถึง 4 ขั้นตอน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.5 เท่า และมีแอกติวิตีคิงเหลือ 33.2 เปอร์เซ็นต์ (Kaneko และคณะ, 2000) และกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. SK ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ความร้อน ตกตะกอนด้วยเกลืออมโมเนียมและโครมาโทกราฟีชนิด FPLC (Fast-performance liquid chromatography) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 21.25 เท่า และมีแอกติวิตีคิงเหลือ 17.6 เปอร์เซ็นต์ (Borgi และคณะ, 2004)

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์ที่ได้โดยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-300 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีขนาดเท่ากันคือมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 170,000 ดาลตัน และจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ประกอบไปด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 43,600 ดาลตัน จากตารางที่ 5.3 ซึ่งเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีขนาดตั้งแต่ 160,000 – 200,000 ดาลตัน ที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 อย่างไรก็ตามพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus* sp. NCIM 59 (Chauthaiwale และ Rao, 1994) และ *Bacillus* sp. TX-3 (Kitada และคณะ, 1989) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160,000 และ 140,000 ดาลตัน ตามลำดับ ที่ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน

ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน) (เจล ฟิวเรชั่น)	จำนวน หน่วยย่อย และ น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. PC22	170,000	(4), 43,600	งานวิจัยนี้
<i>Streptomyces</i> sp. CH7	170,000	(4), 43,600	งานวิจัยนี้
<i>Arthobacter</i> sp. NRRL B3728	185,000	(4), 47,000	Smith และคณะ, 1991
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	160,000	(3), 50,000	Chauthaiwale และ Rao, 1994
<i>Bacillus</i> sp. TX-3	140,000	(3), 45,000	Kitada และคณะ, 1989
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	200,000	(4), 47,000	Lama และคณะ, 2001
<i>Streptomyces</i> sp. PLC	183,000	(4), 46,000	Inyang และคณะ, 1995
<i>Streptomyces</i> sp. SK	180,000	(4), 43,000	Borgi และคณะ, 2004
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.B6A	200,000	(4), 50,000	Lee และ Zeikus, 1991
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS-489	200,000	(4), 50,000	Liu และคณะ, 1996

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงจำนวนหน่วยย่อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในขั้นแรกศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูงถึง 80-90 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. PC22 คือ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับกับกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces olivaceoviridis* E86 (Kaneko และคณะ, 2000) และ *Thermoanaerobacterium* sp. JW/SL YS-489 (Liu และคณะ, 1996) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. CH7 คือ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับกับกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus* sp. NCIM 59 (Chauthawale และ Rao, 1994) และ *Streptomyces thermovulgaris* 127 (Raykovska และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกันไปดังตารางที่ 5.4

ผลของความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่าเอนไซม์ *Streptomyces* sp. PC22 ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 6.0-8.0 โดยที่ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานคือ 7.0 ซึ่งเท่ากับกับ *Streptomyces* sp. CH7 และจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus thermoantarcticus* (Lama และคณะ, 2001) และ *Streptomyces* sp. EC10 (Belfaquih และ Penninckx, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกันไปดังตารางที่ 5.4

ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ต่ออุณหภูมิ พบว่าเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. PC22 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และที่ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอกติวิตีลดลงเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. CH7 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. EC10 ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส (Belfaquih และ Penninckx, 2000) แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ดังแสดงในตารางที่ 5.4



ความเสถียรของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 ต่อความเป็นกรดต่าง พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0-8.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับกับความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. EC10 (Belfaquih และ Penninckx, 2000) ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 พบว่ามีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงเป็นกลางตั้งแต่ 6.0 -7.0 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. EC10 เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ความเสถียรของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อความเป็นกรดต่างยังมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 5.4

การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ (substrate specificity) ของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่าเอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีความจำเพาะต่อไซโลสสูงสุดเช่นเดียวกัน โดยมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 90.6 และ 72.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีแอคติวิตีจำเพาะต่อกลูโคสเท่ากับ 42.9 และ 41.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่ไม่พบว่ามีแอคติวิตีต่อ *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-xylopyranoside เช่นเดียวกัน แสดงว่าเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีสมบัติเป็น bifunctional enzyme ซึ่งแตกต่างกับกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. EC10 ที่มีทั้งแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสและบีตา-ไซโลลิเดส (Belfaquih และ Penninckx, 2000)

ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคสและไซโลสของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 435.93 และ 177.28 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. PLC ที่มีค่าเท่ากับ 400 มิลลิโมลาร์ (Inyang และคณะ, 1995) ส่วนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. CH7 มีค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 258.96 และ 82.77 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Arthobacter* sp. NRRL B3728 ที่มีค่าเท่ากับ 255 มิลลิโมลาร์ (Smith และคณะ, 1991) และกลูโคสของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Thermotoga maritime* ที่มีค่าเท่ากับ 74 มิลลิโมลาร์ (Brown และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 มีค่า  $V_{max}$  ของเอนไซม์ต่อกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 29.97 และ 70.47 ไมโครโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน สำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 และเท่ากับ 32.42 และ 63.64 ไมโครโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 และค่า  $K_{cat}$  ของเอนไซม์ต่อกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 84.91 และ 199.66

ต่อวินาที สำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 และเท่ากับ 91.86 และ 180.31 ต่อวินาที สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งนับว่าเป็นค่าที่สูงเมื่อเทียบกับค่า  $V_{max}$  และ  $K_{cat}$  ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 5.5 อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสและไซโลสของเอนไซม์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 จะสูงแต่ยังมีข้อดีคือมีค่า  $V_{max}$  สูงจึงจัดว่ามีความไวในการทำปฏิกิริยาดีกว่าเอนไซม์จากจุลินทรีย์อื่นๆ

การศึกษาผลของอิออนโลหะชนิดต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่า  $Fe^{2+}$  มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. CH7 และยับยั้งโดยสมบูรณ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ในขณะที่  $Mg^{2+}$  และ  $Co^{2+}$  มีผลในการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Bacillus coagulans* (Marg และ Clark, 1990), *Bacillus thermoantarcticus* (Lama และคณะ, 2001) และ *Streptomyces* sp. NCIM 2730 (Sushama และคณะ, 1992) ที่พบว่า  $Mg^{2+}$  และ  $Co^{2+}$  มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ โดย  $Mg^{2+}$  มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่  $Co^{2+}$  ช่วยป้องกันการทำให้ถูกเสียดสภาพด้วยความร้อน (Kasumi และคณะ, 1982) ขั้นตอนต่อมาศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $Mg^{2+}$  และ  $Co^{2+}$  ต่อการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่า  $Mg^{2+}$  5 มิลลิโมลาร์ และ  $Co^{2+}$  0.1 มิลลิโมลาร์ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 108 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 ส่วนเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. CH7 พบว่า  $Mg^{2+}$  10 มิลลิโมลาร์ และ  $Co^{2+}$  0.2 มิลลิโมลาร์ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 205 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยในส่วนนี้สรุปได้ว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสที่มีสมบัติทัดเทียมกับเอนไซม์นี้จากจุลินทรีย์อื่นๆที่มีผู้รายงานไว้ และพบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ทั้งสองมีข้อดีคือใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า โดยสามารถใช้วัสดุทางการเกษตร ได้แก่ รำข้าวสาลี สำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 และเปลือกข้าวโพด สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 เป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรงโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปรับปรุงด้วยวิธีเคมี (chemical pretreatment) และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ค่อนข้างสูงกว่าที่มีผู้อื่นรายงานไว้

ตารางที่ 5.4 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่อความ เป็นกรด-ด่าง	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. PC22	80	7.0	50-65 (30 min)	5.0-8.0	งานวิจัยนี้
<i>Streptomyces</i> sp. CH7	85	7.0	60-65 (30 min)	6.0-7.0	งานวิจัยนี้
<i>Arthrobacter</i> sp. NRRL B3728	60	8.0-9.0	-	-	Smith และคณะ, 1991
<i>Arthrobacter nicotiana</i> e	70	7.5	70 (2 hr.)	7.0-8.0	Sapunova และคณะ, 2006
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	85	8.0	-	8.0	Chauthawale และ Rao, 1994
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	90	7.0	90 (30 min)	-	Lama และคณะ, 2001
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	75	8.0	70 (2 hr.)	7.0-8.0	Sapunova และคณะ, 2006
<i>Escherichia coli</i>	70	7.5	70 (2 hr.)	7.0-8.0	Sapunova และคณะ, 2006
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E86	80	11.0	70 (3 hr.)	5.0-12.0	Kaneko และคณะ, 2000

ตารางที่ 5.4 (ต่อ)

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่อความ เป็นกรด-ด่าง	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. EC10	70	7.0	50 (1 hr.)	5.0-8.0	Belfaquih และ Penninckx, 2000
<i>Streptomyces</i> sp. SK	95	6.5	80 (5 hr.)	-	Borgi และคณะ, 2004
<i>Streptomyces thermovulgaris</i> 127	60-85	7.2	-	-	Raykovska และคณะ, 2001
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS-489	80	6.8	80 (1hr.)	-	Liu และคณะ, 1996

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.5 เปรียบเทียบค่า  $K_m$ ,  $V_{max}$  และ  $K_{cat}$  ของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	ชนิดของ สับสเตรท	$K_m$ (มิลลิโมลาร์)	$V_{max}$ (ไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีน)	$K_{cat}$ (ต่อวินาที)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. PC22	ดี-กลูโคส	435.93	29.97	84.91	งานวิจัยนี้
	ดี-ไซโลส	177.28	70.47	199.66	
<i>Streptomyces</i> sp. CH7	ดี-กลูโคส	258.96	32.42	91.81	งานวิจัยนี้
	ดี-ไซโลส	82.77	63.64	180.31	
<i>Arthobacter</i> sp. NRRL B3728	ดี-กลูโคส	225	27.40	533	Smith และคณะ, 1991
	ดี-ไซโลส	3.3	12.25	1,192	
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	ดี-กลูโคส	142	-	50	Chauthaiwale และ Rao, 1994
	ดี-ไซโลส	6.66	-	230	
<i>Bacillus</i> sp. TX-3	ดี-กลูโคส	290	1.6	-	Kitada และคณะ, 1996
	ดี-ไซโลส	100	28.6	-	
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	ดี-กลูโคส	167	6.3	-	Lama และคณะ, 2001
	ดี-ไซโลส	33	57	-	

ตารางที่ 5.5 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ชนิดของ สับสเตรท	$K_m$ (มิลลิโมลาร์)	$V_{max}$ (ไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีน)	$K_{cat}$ (ต่อวินาที)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptomyces</i> sp. PLC	ดี-กลูโคส	400	-	-	Inyang และคณะ, 1995
	ดี-ไซโลส	35	-	-	
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	ดี-กลูโคส	55.5	-	-	Raykovska และคณะ, 2001
	ดี-ไซโลส	4.4	-	-	
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS-489	ดี-กลูโคส	130	6	-	Liu และคณะ, 1996
	ดี-ไซโลส	19	16	-	
<i>Thermotoga maritima</i>	ดี-กลูโคส	118	16.2	-	Brown และคณะ, 1993
	ดี-ไซโลส	74	68	-	

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากกลูโคสไอโซเมอเรสซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตฟรักโทสจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งแล้ว ปัจจุบันยังพบว่าเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ อินนูลิเนส (inulinase) ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจสูงเพื่อนำมาใช้ผลิตฟรักโทสโดยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินนูลิน (Sharma และ Gill, 2007) และมีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตอินนูลิเนสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินนูลินเป็นองค์ประกอบรวมถึงจุลินทรีย์กลุ่ม *Streptomyces* ด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงตรวจสอบเบื้องต้นถึงความสามารถของ *Streptomyces* PC22 และ CH7 ในการสร้างอินนูลิเนสเพื่อเป็นอีกด้านหนึ่งของการนำจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มาใช้ประโยชน์ในการผลิตฟรักโทส โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลินสกัดจากหัวแก่แค้นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Streptomyces* PC22 และ CH7 สามารถผลิตอินนูลิเนสได้เพียง 0.16 และ 0.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลินสกัดจากหัวแก่แค้นตะวันความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งจัดว่ามีแอกติวิตีค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* ด้วยกัน เช่น *Streptomyces* sp. GNDU1 สามารถผลิตอินนูลิเนสได้ 0.552 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน (Gill และคณะ, 2003) และ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณปมรากต้นรักเร่ สามารถผลิตอินนูลิเนสได้ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Sharma และคณะ, 2006) ทั้งนี้เนื่องจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ถูกคัดแยกมาจากดินบริเวณที่มีการสะสมของอินนูลิน จึงทำให้มีแอกติวิตีของอินนูลิเนสต่ำนอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่สามารถผลิตอินนูลิเนสได้สูง เช่น *Kluyveromyces marxianus* YS-1 ผลิตอินนูลิเนสได้ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้สารสกัดจากรากหน่อไม้ฝรั่งซึ่งมีอินนูลิน 3.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน (Singh และคณะ, 2006) และ *Cryptococcus aureus* G7a ผลิตอินนูลิเนสได้ 85 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยอินนูลิน 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน (Sheng และคณะ, 2007)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอินนูลิเนสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่าอินนูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับอินนูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. GNDU 1 (Gill และคณะ, 2003), *Pichia guilliermondii* (Gong และคณะ, 2007) และ *Penicillium janczewskii* (Pessoni, 2007) ในขณะที่อินนูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่าเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับอินนูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* (Kushi และคณะ, 2000)

ผลของความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7 พบว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่างที่ค่อนข้างเป็นกลาง โดยค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 6.5 ในขณะที่อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดต่างในช่วงกว้าง ตั้งแต่ 6.0-8.0 โดยค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 6.0 ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. (Sharma และคณะ, 2006) และ *Pichia guilliermondii* (Gong และคณะ, 2007) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 6.0 และอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. GNDU 1 (Gill และคณะ, 2003) และ *Rhizopus* sp. TN-96 (Ohta และคณะ, 2002) ขณะที่อินูลิเนสจากจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างค่อนข้างเป็นกรด เช่น *Kluyveromyces* sp. Y-85 (Singh และคณะ, 2007) และ *Aspergillus candidus* (Kochhar และคณะ, 1997) และ *Bacillus Smithii* T7 (Gao และคณะ, 2009) และ *Cryptococcus aureus* G7a (Sheng และคณะ, 2008) ตามลำดับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

นิมิตร วรสุตร และ สนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน : สารสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน แก่น  
เกษตร 34(2):85-91.

เนริสา คุณประทุม. 2543. การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จาก  
การเกษตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชา  
พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

Amira, M.A., Yousif, A., and Shatha, H.A. 1987. Isomerization of glucose to fructose:  
production and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces*  
sp.strain C<sub>7</sub>. Enzyme Microb. Technol. 9:632-634.

Amore, R., and Hollenberg, C.P. 1989. Xylose isomerase from *Actinoplanes*  
*missouriensis* : primary structure of the gene and the protein. Nucleic acids Res.  
17:7515.

Andres, C. 1987. Fructose sweetener of choice. Food Processing. 12:27-28.

Anil, K.G., Arvind, G. and Narinder, K. 1998. A HgCl<sub>2</sub> insensitive and thermally stable  
inulinase from *Aspergillus oryzae*. Phytochemistry. 49(1):55-58.

Barl, B., Biliaderis, G. C., Murray, E. D., and Macgregor, A. W. 1991. Combined  
chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. J. Sci. Food Agric.  
56(2): 195–214.

Belfaqui, N. and Penninckx, M.J. 2000. A bifunctional  $\beta$ -xylosidase-xylose isomerase  
from *Streptomyces* sp. EC10. Enzyme Microb. Technol. 27:114-121.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol. 3(11):286-290.

Bok, S.H., Seidman, M. and Wopat, P.W. 1984. Selective isolation of acidophilic  
streptomyces strains for glucose isomerase production. Appl. Environ. Microbiol.  
47:1213-1215.

- Borgi, M.A., Srih-Belguith, K., Ali, M.B. Mezghani, M., Tranier, S., Haser, R. and Bejar, S. 2004. Glucose isomerase of the *Streptomyces* sp. SK strain : purification, sequence analysis and implication of alanine 103 residue in the enzyme thermostability and acidotolerance. Biochimie. 86:561-568.
- Brown, S.H., Sjolholm, C. and Kelly, R.M. 1993. Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. Biotechnol. Bioeng. 41:878-886.
- Bucke, C. 1977. Industrial glucose isomerase. In Wiseman, A. (ed.), Topics in enzyme and fermentation biotechnology, p. 147-171. United Kingdom: Ellis Horwood Ltd.
- Calik, P., Angardi, V., Haykir, N.I. and Boyaci, H. 2009. Glucose isomerase production on a xylan based medium by *Bacillus thermoantarcticus*. Biochem. Eng. J. 43:8-15.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Van Opstal, O. and De Bruyne, C.K. 1986. Catalytic properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. Enzyme Microb. Technol. 8:696-700.
- Carrell, H.L., Rubin, B.H., Hurley, T.J. and Glusker, J.P. 1984. X-ray crystal structure of D-xylose isomerase at 4 Å resolution. J. Biol. Chem. 259:3230-3236.
- Cazetta, M.L., Martins, P.M.M., Monti, R. and Contiero, J. 2005. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. J. Food Eng. 66:301-305.
- Chauthaiwale, J. and Rao, M. 1994. Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp. Appl. Environ. Microbiol. 60:4495-4499.
- Chen, G., Son, Z., Wang, Y. and Qian, X. 1997. Purification and properties of inulase from *Aspergillus niger*. Wei Sheng Wu Xue Bao. 37(5):362-367.
- Chen, W.P. 1980. Glucose isomerase (a review). Process Biochem. 15 June-July:30-35.
- Chen, W.P. and Anderson, A.W. 1979. Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. Appl. Environ. Microbiol. 38:1111-1119.
- Chen, W.P., Anderson, A.W. and Han, Y.W. 1979. Production of glucose isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. Appl. Environ. Microbiol. 37:324-331.

- Chungool, W., Thongkam, W., Raweesri, P., Thamchaipenet, A. and Pinphanichakarn, P. 2008. Production, purification, and characterization of acetyl esterase from *Streptomyces* sp. PC22 and its action in cooperation with xylanolytic enzymes on xylan degradation. World. J. Microbiol. Biotechnol. 24:549-556.
- Degrassi, G., Vindigni, A., and Venturi, V. 2003. A thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*: purification and characterization. J. Biotechnol. 101:69-79.
- Dekker, K., Yamakata, H., Sakaguchi, K. and Udaka, S. 1991. Xylose(glucose) isomerase gene from the thermophile *Thermus thermophilus* : cloning, sequencing and comparison with other thermostable xylose isomerases. J. Bacteriol. 173:3078-3083.
- Dekker, R. F. H., and Richards, G. N. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Biochem. 32:277-352.
- Deshmukh, S.S., Deshpande, M.V. and Shankar, V. 1994. Medium optimization for the production of glucose isomerase from thermophilic *Streptomyces thermonitrificans*. World. J. Microbiol. Biotechnol. 10:264-267.
- Dische, Z., and Borenfreund, E. 1951. A new spectrophotometric method for the detection of keto sugar trioses. J. Biol. Chem. 192:583-587.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
- Ebringerova, A., and Heinze, T. 2000. Xylan and xylan derivatives biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. Macromol. Rapid Commun. 21:542-556.
- Gao, W., Bao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J. and An, L. 2009. Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. Appl. Biochem. Biotechnol. 157:498-506.
- Gawande, P.V. and Kamat, M.Y. 2000. Production of xylanase by immobilized *Aspergillus* sp. using lignocellulosic waste. World. J. Microbiol. Biotechnol. 16:111-112.

- Ghatge, M., Mawal, Y., Gaikwad, S. and Deshpande, V. 1991. Immunaffinity purification of glucose/xylose isomerase devoid of D-glucose isomerase from *Chainia* sp. Appl. Biochem. Biotechnol. 31:11-20.
- Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. 139:187-194.
- Gill, P.K., Manhas, R.K. and Singh, P. 2006. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. Bioresour. Technol. 97:894-902.
- Gill, P.K., Sharma, A.D., Harchand, R.K. and Singh, P. 2003. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. Bioresour. Technol. 87:359-362.
- Givry, S. and Duchiron, F. 2007. Optimization of culture medium and growth conditions for production of L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase by *Lactobacillus bif fermentans*. Microbiology. 77(3):281-287.
- Glasfeld, A., Farber, G.K., Ringe, D., Marcel, T., Drocourt, D., Tiraby, G. and Petsko, G.A. 1988. Characterization of crystals of xylose isomerase from *Streptomyces violaceoniger*. J. Biol. Chem. 263:14612-14613.
- Gong, C.S., Chen, L.F. and Tsao, G.T. 1980. Purification and properties of glucose isomerase of *Actinoplanes missouriensis*. Biotechnol. Bioeng. 22:833-845.
- Gong, C.S., Chen, L.F., Flickinger, M.C., Chiang, L.C. and Tsao, G.T. 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 41:430-436.
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z. and Li, J. 2007. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34:179-185.
- Guiraud, J.P. and Galzy, P. 1981. Enzymatic hydrolysis of plant extract containing inulin. Enzyme Microb. Technol. 3:305-308.
- Hess, J.M., Tchernajenko, V., Vielle, C., Zeikus, J.G. and Kelly, R.M. 1998. *Thermotoga neapolitana* homotetrameric xylose isomerase is expressed as a catalytically active and thermostable dimer in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 64:2357-2360.

- Inyang, C.U., Gebhart, U., Obi, S.K.C. and Bisswanger, H. 1995. Isolation and characterization of a D-glucose/xylose isomerase from a new thermophilic strain *Streptomyces* sp. PLC. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:632-638.
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N. and Tisler, V. 2002. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. Enzyme Microb. Technol. 31:986-991.
- Johnson, K. G., Fontana, J. D., and MacKenzie, C. R. 1988. Measurement of acetyl xylan esterase in *Streptomyces*. Methods Enzymol. 160:551-560.
- Kaneko, T., Takahashi, S. and Saito, K. 2000. Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces* sp., and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener (HFCS) production. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(5):940-947.
- Kang, S.I., Chang, Y.J., Oh, S.J., and Kim, S.I. 1998. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. Biotechnol. Lett. 20: 983-986.
- Kango, N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. J. Food Eng. 85:473-478.
- Kasumi, T., Hayashi, K. and Tsumura, N. 1982. Role of cobalt in stabilizing the molecular structure of glucose isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41. Agric. Biol. Chem. 46:21-30.
- Kim, K.Y., Nascimento, A.S., Goulubey, A.M., Polikarpov, I., Kim C.S., Kang, S.I. and Kim, S.I. 2008. Catalytic mechanism of inulinase from *Arthrobacter* sp. S37. Biochem. Biophys. Res. Commun. 371:600-605.
- Kitada, M., Dobashi, Y. and Horikoshi, K. 1989. Enzymatic properties of D-xylose isomerase from a thermophilic alkaliphile, *Bacillus* sp. TX-3. Agric. Biol. Chem. 53:1461-1468.
- Khire, J.M., Lachke, A.H., Srinivasan, M.C. and Vartak, H.G. 1990. Characterization of the purified extracellular D-xylose isomerase devoid of D-glucose isomerase from *Chainia* sp. Appl. Biochem. Biotechnol. 16:41-52.
- Kochhar, A., Kaur, N. and Gupta, A.K. 1997. Inulinase from *Aspergillus versicolor* a potent enzyme for producing fructose from inulin. J. Sci. Ind. Res. 56:721-726.

- Kolida, S., Tuohy, K. And Gibson, G.R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. Br. J. Nutr. 87:193-197.
- Kormelink, F. J. M., Lefebvre, B., Strozyk, F., and Voragen, A. G. J. 1993. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. J. Biotechnol. 27:267-282.
- Kristo, P., Sarelainen, R., Fagerstr, R., Aho, S. and Korhola, M. 1996. Protein purification, and cloning and characterization of the cDNA and gene for xylose isomerase of barley. Eur. J. Biochem. 237:240-246.
- Kumiko, K., Toshihiro, A. and Tea, K. 1999. Purification and properties of thermostable inulinase ( $\beta$ -D-fructan fructanohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP 1289. Starch. 51:253-258.
- Kushi, R.T., Monti, R. and Contiero. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus var.bulgaricus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25:63-69.
- Kuyper, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. 2004. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. FEMS. Yeast. Res. 4:655-664.
- Kwon, H., Kitada, M. and Horikoshi, K. 1987. Purification and characterization of D-xylose isomerase from alkalophilic *Bacillus* No.KX-6. Agric. Biol. Chem. 51(7):1983-1989.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
- Lama, L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Romano, I., Basile, R. and Gambacorta, A. 2001. Purification and characterization of thermostable xylose(glucose) isomerase from *Bacillus thermoantarcticus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27:234-240.
- Lauruengtana, V. and Pinphanichakarn. 2006. Optimization of culture medium and conditions for  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase production by *Streptomyces* sp. PC22. J. Sci. Res. Chula. Univ. 31(1):57-65.
- Lee, C.Y. and Zeikus, J.G. 1991. Purification and characterization of thermostable glucose isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes* and *Thermoamaerobacter* strain B6A. Biochem. J. 273:565-571.

- Lenmacher, A. and Bisswanger, H. 1990. Isolation and characterization of an extremely thermostable D-xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB8. J. Gen. Microbiol. 136:379-386.
- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F., and Fan, Z. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from jerusalem artichoke tubers. J. Food. Eng. 79:1087-1093.
- Liu, S.Y., Wiegel, J. and Gherardine, F.C. 1996. Purification and cloning of a thermostable xylose(glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* sp. JW/SL-YS 489. J. Bacteriol. 178:5938-5945.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:267-275.
- Manhas, R.K. and Bala, S. 2004. Thermostable glucose isomerase production by some bacteria and Streptomyces. Indian J. Microbiol. 44:129-132.
- Marg, G.A. and Clark, D.S. 1990. Activation of glucose isomerase by divalent cation : evidence for two distinct metal-binding sites. Enzyme Microb. Technol. 12:367-373.
- Marshall, R.O. and Kooi, E.R. 1957. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Science. 125:648-649.
- Meng, M., Bagdasarian, M. and Gregory, Z.J. 1993. Thermal stabilization of xylose isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigen*s. Bio/technology. 11:1157-1161.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.
- Nagem, R. A. P., Rojas, A. L., Golubev A. M., Korneeva, O. S., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Neustroev, K. N. and Polikarpov, I. 2004. Crystal Structure of Exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The Enzyme Fold and Structural Determinants of Substrate Recognition. J. Mol. Biol. 344:471–480.
- Nakajima, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Kainuma, K., and Matsuda, K. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 62(3):269-276.

- Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M. and Ohta, K. 1997. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. J. Ferment. Bioeng. 84:313-318.
- Nakanishi, K., Yokotsuka, K., and Yasui, T. 1987. Induction of membrane bound xylosidase in a *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 65: 1-6.
- Natake, M. And Yoshimura, S. 1964. Studies on glucose isomerase of bacteria. III. The mode of action of glucose isomerase from *Escherichia intermedia* strain HN-500. Agric. Biol. Chem. 28:510-516.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153:375-380.
- Ohta, K., Suetsugu, N. and Nakamura, T. 2002. Purification and properties of extracellular inulinase from *Rhizopus* sp. strain TN-96. J. Biosci. Bioeng. 94:78-80.
- Pandey, S.N. and Gurjar, R.M. 1987. Effect of flame retardants on the properties of particle boards prepared from cottonseed hulls. Biol. Wastes 19:197-203.
- Pandey, A., Soccol C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N. and Fontana, J.D. 1999. Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. Appl. Biochem. Biotechnol. 81:35-52.
- Park, J.H. and Batt, C.A. 2004. Restoration of a defective *Lactococcus lactis* xylose isomerase. Appl. Environ. Microbiol. 70:4318-4325.
- Pastinen, O., Visuri, K., Schoemaker, H.E. and Leisola, M. 1999. Novel reactions of xylose isomerase from *Streptomyces rubiginosus*. Enzyme Microb. Technol. 25:695-700.
- Paula, F.C., Cazetta, M.L., Monti, R. and Contiero, J. 2008. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Food Chem. 111:691–695.
- Pessoni, A.B.P. 2007. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. Mycologia. 99(4):493-503.



- Pinphanichakarn, P., Tangsakul, T., Thongnumwon, T., Talawanich, Y. and Thamchaipenet, A. 2004. Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis. World. J. Microbiol. Biotechnol. 20:727-733.
- Prabhakar, G. and Raju, D.C. 1993. Media optimization studies for glucose isomerase production by arthrobacter species. Bioprocess Engineering. 8:283-286.
- Puls, J., and Schuseil, J. 1993. Chemistry of hemicellulose: relationship between hemicellulose structure and hemicellulase. pp. 1-27. London: Portland.
- Raykovska, V., Dolashka-Angelova, P., Paskaleva, D., Stoeva, S., Abashev, J., Kirkov, L. and Voelter, W. 2001. Isolation and characterization of a xylose-glucose isomerase from a new strain *Streptomyces thermovulgaris* 127, var. 7-86. Biochem. Cell Biol. 79(2): 195–205.
- Roberfroid, M.B. 1999. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. J. Nutr. 129:1398-1401.
- Robinson, J.W. and Food Technical Service Staff. 1975. Will high fructose corn syrup sweeten your future?. Food. Eng. 47(5):57-61.
- Rocha, J.R., Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S. and Fernandes, P. 2006. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chem. 95:77-82.
- Roubroeks, J.P., Andersson, R., Mastromauro, D.I., Christensen, B.E. and Åman, P. 2001. Molecular weight, structure and shape of oat (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)-b-D-glucan fractions obtained by enzymatic degradation with (1 $\rightarrow$ 4)-b-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Trichoderma reesei*. Carbohydr. Polym. 46:275-285.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30(5):279-291.
- Sapunova, L.I., Lobanok, A.G., Kazakevich, I.O., Shlyakhotko, E.A. and Evtushenkov, A.N. 2006. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42(3):246-251.
- Schyns, P. J. Y. M. J., de Frankrijker, J., Zehnder, A. J. B., and Stams, A. J. M. 1994. Production, purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacteroides xylanolyticus* X5-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:548-554.

- Sharma, A.D., Gill, P.K. 2007. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. J. Food Eng. 79:1172-1178.
- Sharma, A.D., Kainth, S. and Gill, P.K. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. J. Food Eng. 77:486-491.
- Shehalata, H., Bhosale, M.B.R. and Vasanti, V.D. 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. Microbiol. Reviews. 60(20):280-300.
- Sheng, J., Chi, Z., Li, J., Gao, L. and Gong, F. 2007. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. Process Biochem. 42:805-811.
- Sheng, J., Chi, Z., Gong, F. and Li, J. 2008. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7 and inulin hydrolysis by the purified inulinase. Appl. Biochem. Biotechnol. 144:111-121.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R. and Puri, M. 2006. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. Process Biochem. 41:1703-1707.
- Singh, R.S., Sooch, B.S. and Puri, M. 2007. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresour. Technol. 98:2518-2525.
- Skowronek, M. and Fiedurek, J. 2006. Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*. Enzyme Microb. Technol. 38 :162-167.
- Smith, A., Rangarajan, M. and Hartley, B.S. 1991. D-xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain NRRL B3728. Biochem. J. 277:255-261.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195:19-23.
- Speck, J.C. 1958. The lobry de bruyn-alberda van ekenstein transformation. Adv. Carbohydr. Chem. 13:63-103.
- Suekane, M., Tamura, M. and Tomimura, C. 1978. Physicochemical and enzymatic properties of purified glucose isomerase from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*. Agric. Biol. Chem. 42:909-917.

- Sushama, M.G., Rao, M.B. and Deshpande, V.V. 1992. D-Glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*: Differential roles of magnesium and cobalt ions. Enzyme Microb. Technol. 14:317-320.
- Takasaki, Y and Tanabe, O. 1962. Formation of fructose from glucose by bacteria. I. Properties of glucose isomerase. *Kogyo Gijutsu-in Hakko Kyokaiishi.* 20:449-455.
- Takasaki, Y and Tanabe, O. 1964. NAD-linked D-glucose isomerizing and D- mannose isomerizing enzyme from *Paracolobacterium aerogenoides*. Agric Biol Chem. 30:220-225.
- Takasaki, Y and Tanabe, O. 1966. Studies on sugar isomerization enzyme, production and utilization of glucose isomerase from *Streptomyces* spp. Agric. Biol. Chem. 30:1247-1253.
- Teeradakorn, S., Kishimoto, M., Seki, T., Pinphanichakarn, P. and Yoshida, T. 1998. Process development and simulation of glucose isomerase production from birchwood xylan by a Streptomyces fusant. Biochem. Eng. J. 1:159-168.
- Teleman, A., Larsson, P. T., and Iversen, T. 2001. On the accessibility and structure of xylan in birch kraft pulp. Cellulose. 8(3):209-215.
- Tsao, G. T., and Chaing, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology. In Berry, S. D. R., and Kristiansen, B. (eds.). The filamentous fungi: Fungal Technology. pp. 296-326. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Tsumura, N. and Sato, T. 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part VI. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenes*. Agric Biol Chem. 29:1129-1134.
- Ungchaithum, S. and Pinphanichakarn, P. 1998. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. PC22 growing on agricultural residues. J. Sci. Res. Chula Univ. 23(1):45-50.
- Vandamme, E.J. and Derycke, D.G. 1983. Microbial inulinase; fermentation process, properties and applications. Adv. Appl. Microbiol. 29:136-176.
- Vielle, C., Hess, J.M., Kelly, R.M. and Zeikus, J.G. 1995. *xylA* cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. Appl. Environ. Microbiol. 61:1867-1875.

- Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. 1988. Purification and characterization of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose. Agric. Biol. Chem. 52:1818-1824.
- Vranesic, D., Kurtanjek, Z., Santos, A.M.P. and Maugeri, F. 2002. Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. Food Technol. Biotechnol. 40 :67–73.
- Walker, G. M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. pp. 228-231. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Wanker, E., Huber, A. and Schwab, H. 1995. Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichai coli*. Appl. Environ. Microbiol. 61(5):1953-1958.
- Weber, P. 1974. Glucose isomerase from *Streptomyces glaucescens*. Ger. Pat. 2,408,708, Sept. 5.
- Wenling, W., Huiying, W., Le, W. And Shiyuan, W. 1999. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using Immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. Process Biochem. 34:643–646.
- Wiseman, A. (ed.). 1975. Handbook of enzyme biotechnology. United Kingdom: Ellis Horwood Ltd.
- Xiong, C., Jinhua,W. and Dongsheng, L. 2007. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. Biochem. Eng. J. 34 :179–184.
- Yang, R., Xu, S., Wang, Z., and Yang, W. 2005. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 38: 677-682.
- Yoshimura, S., Danno, G. and Nakata, M. 1966. Studies on D-glucose isomerizing activity of D-xylose grown cells from *Bacillus coagulans* strain HN-68. Agric. Biol. Chem. 30:1015-1023.
- Younas, O., Chughtai, M.I.D. and Oadeer, M.A. 1982. Biosynthesis of glucose isomerase by locally isolated *Streptomyces albus* in shake flasks. Pak. J. Sci. Ind. Res. 25(4):126-133.

Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y. and Wang, Y. 2004. Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger*AF10 expressed in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 35:272-275.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งข้าวไรย์ (Rye Agar Medium)

เกล็ดข้าวไรย์บด (Rye)	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ )	30.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	20.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	18.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. CH 7 เท่ากับ 7.0

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 เท่ากับ 9.0

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

## 2. อาหารเชื้อสำหรับผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส (Production medium)

ไซโลส (xylose)	1.0	เปอร์เซ็นต์
เพปโตน (peptone)	1.0	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.3	เปอร์เซ็นต์
โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.01	เปอร์เซ็นต์

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. CH 7 เท่ากับ 7.0

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 เท่ากับ 9.0

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

## 3. ไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตไซแลเนส ปีตา-ไซโลลิเดส

ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan)	0.75	เปอร์เซ็นต์
พอลิเพปไทด์ (Polypeptone)	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.4	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.002	เปอร์เซ็นต์
ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ <i>Streptomyces</i> sp. CH 7 เท่ากับ 7.0		
ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ <i>Streptomyces</i> sp. PC22 เท่ากับ 9.0		
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที		

## 4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตอินูลิน (Basal Medium)

อินูลินสกัดจากหัวแก่นตะวัน	1.0	เปอร์เซ็นต์
โซเดียมไนเตรต ( $NaNO_3$ )	3.0	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.1	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.05	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.001	เปอร์เซ็นต์
ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับเท่ากับ 7.0		
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที		



## ภาคผนวก ข

### สารเคมี

#### 1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

##### 1.1 สารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper reagent)

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโตเดกซะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71 กรัม และเกลือของโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ปริมาณ 180 กรัม ละลายให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

##### 1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซีเนต ( $\text{NaHASO}_4$ ) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

##### 1.3 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เติมกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 10.0 กรัม ผสมจนละลายหมด แล้วค่อยๆเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 300.0 กรัม ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

## 2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

## 2.1 Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3.0	ลิตร

## 2.2 Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	5.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	ลิตร

## 2.3 Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

## 2.4 Lowry D

สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารละลายโซเดียมแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายโซเดียมแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ ได้แก่ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 โดยละลายโซเดียมแอสซีเตต 1.21 2.91 5.07 6.94 และ 7.76 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างตามต้องการด้วยกรดแอสซีติก และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายโซเดียมแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.87 4.60 8.55 11.74 และ 13.34 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.42 8.11 4.77 2.46 และ 0.85 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 8.5 และ 9.0 โดยละลายทริส-เบส 12.1 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

## 4. สารละลายสำหรับใช้ในการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอ์เลคโทรไฟริซีส

## 4.1 สารละลายทริสไกลซีนอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.3	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600.0	มิลลิลิตร

## 4.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ทริส

ทริส	6.0	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 4.3 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ทริส

ทริส	24.2	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 4.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	18.15	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 4.5 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
Bis (N,N,-Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.00	มิลลิลิตร

## 4.6 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร

## 4.7 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

## 4.8 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล 10 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	4.20	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	3.33	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

## 4.9 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.20	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

## 4.10 สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี 250	0.1	เปอร์เซ็นต์
เมทานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10	เปอร์เซ็นต์

## 4.11 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เมทานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10	เปอร์เซ็นต์

## 5. สารละลายที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

## 5.1 สารละลายทริสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.3	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600.0	มิลลิลิตร

## 5.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทริส	6.0	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 5.3 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ทริส

ทริส	24.2	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 5.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	18.15	กรัม
ความเป็นกรดต่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 5.5 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

## 5.6 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 20 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 5.7 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
Bis (N,N,-Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.00	มิลลิลิตร

## 5.8 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์	3.2	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
2-ปีตา-เมอแคบโทเอทานอล	1.6	มิลลิลิตร
สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู	0.2	มิลลิลิตร

## 5.9 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

## 5.10 สารละลายผสมของเซฟเวเรตเจด 12 เปอร์เซ็นต์เจด

น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.00	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร



## 5.11 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.10	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

## 5.12 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี 250	0.1	เปอร์เซ็นต์
เมทานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10	เปอร์เซ็นต์

## 5.13 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เมทานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10	เปอร์เซ็นต์

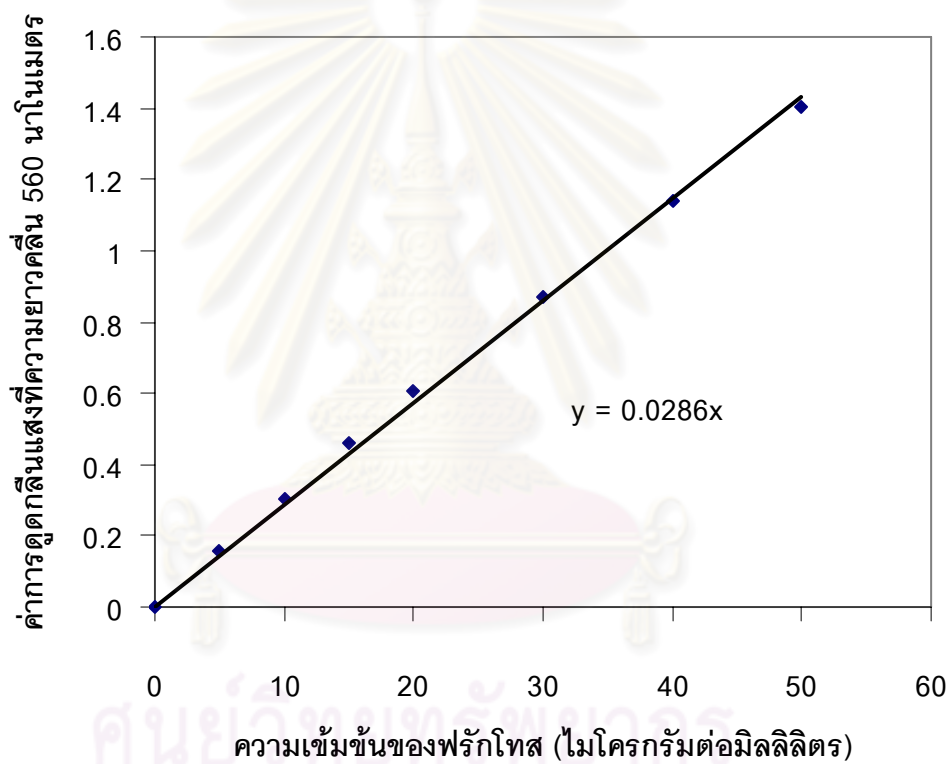
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

## กราฟมาตรฐาน

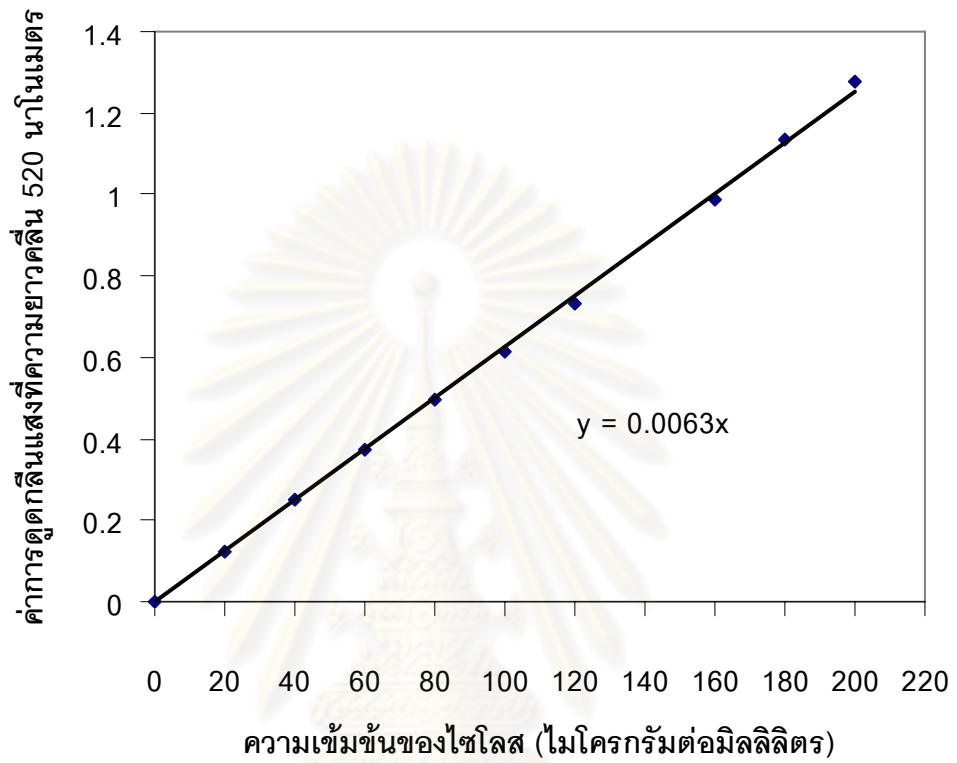
## 1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาล

1.1 กราฟมาตรฐานของฟรักโทส ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์ แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส



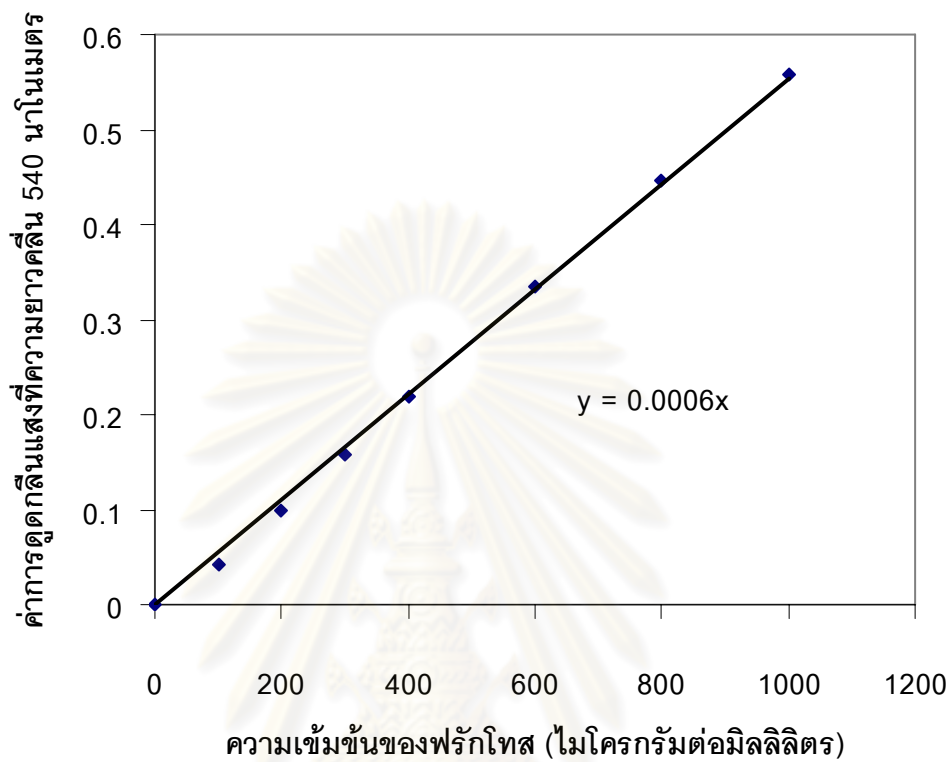
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 กราฟมาตรฐานของไซโลส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์ แอคติวิตีของไซแลเนส



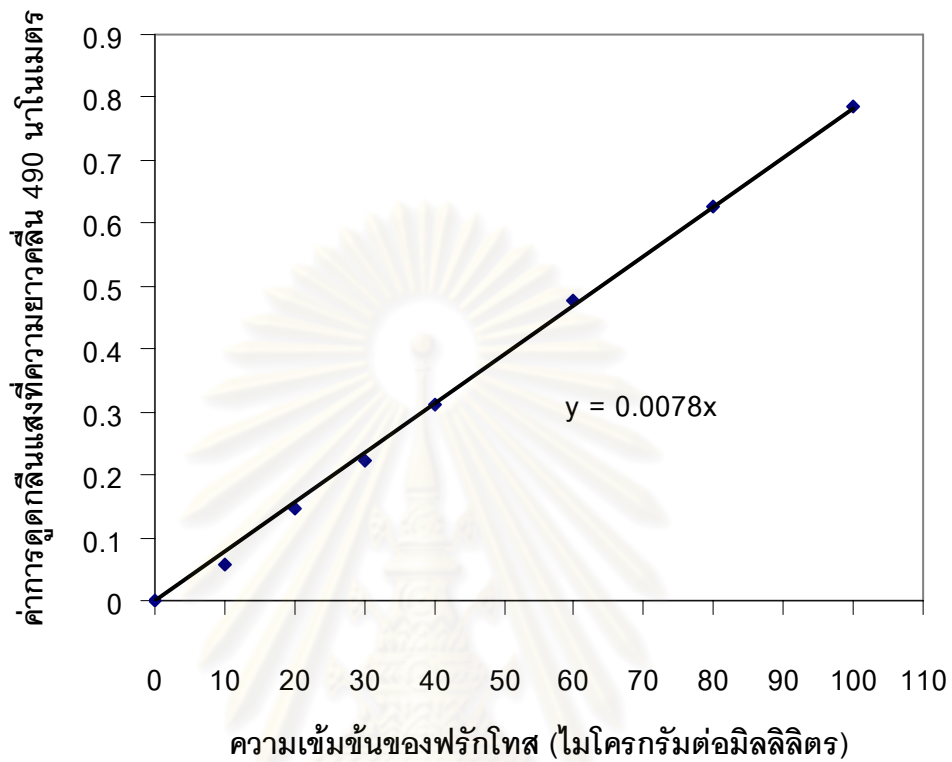
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 กราฟมาตรฐานของฟรักโทส ความเข้มข้น 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์แอกติวิตีของอินูลินอส



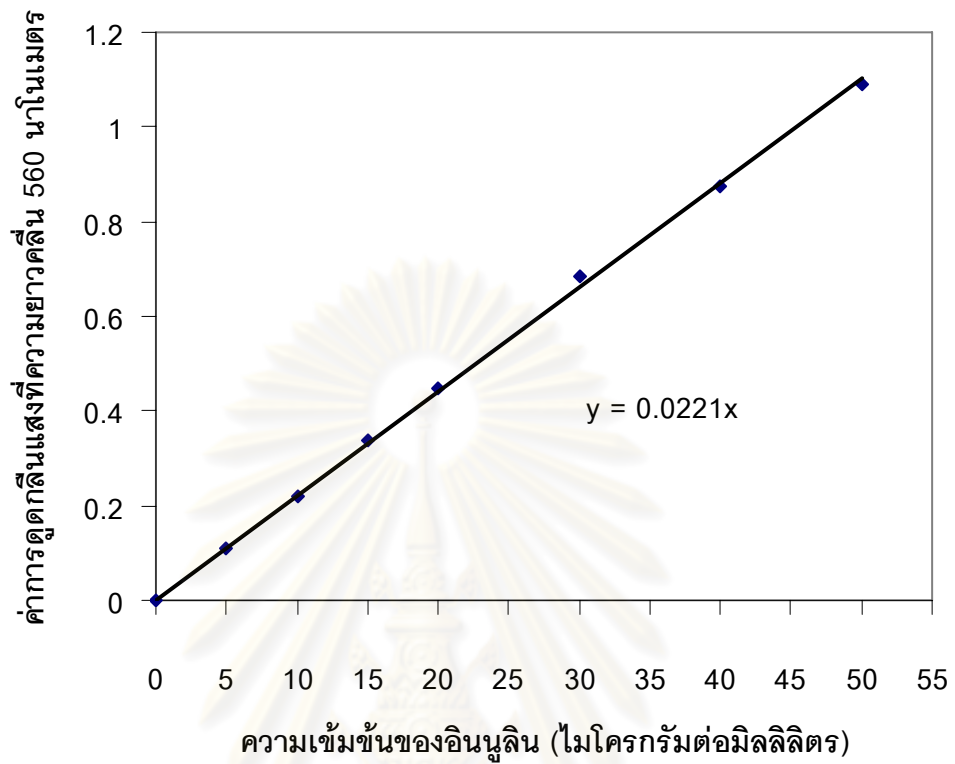
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 กราฟมาตรฐานของฟรักโทส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

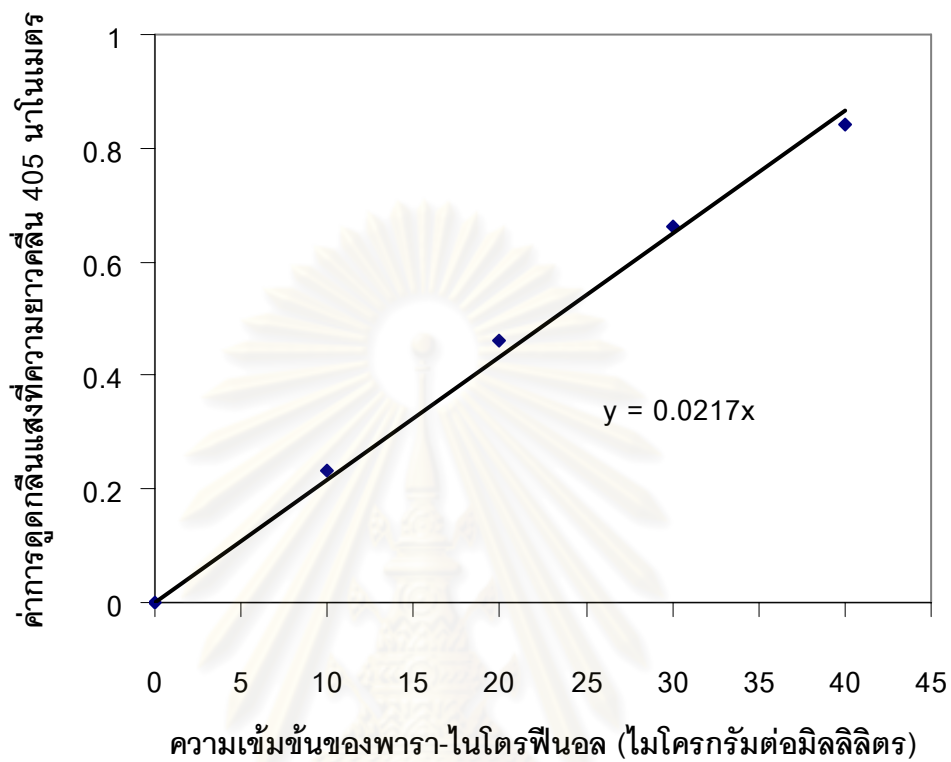


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 กราฟมาตรฐานของอินนูลิน ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



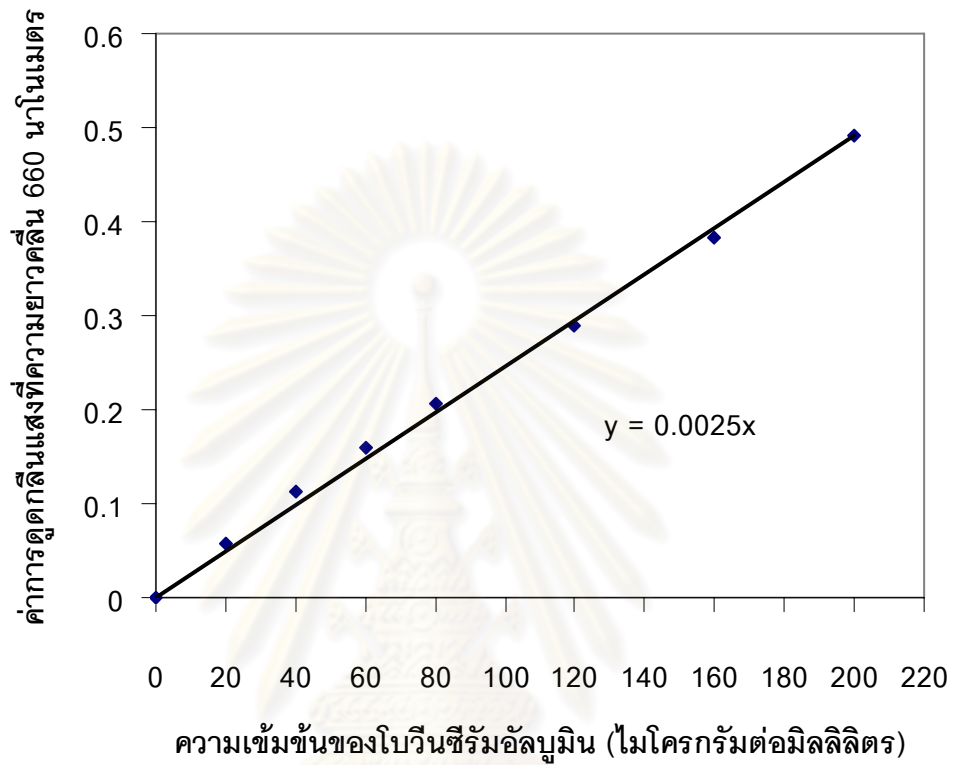
2. กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์แอกติวิตีของปีตา-ไซโลไซด์



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ง

### วิธีคำนวณ

#### 1. วิธีการคำนวณค่า $V_{\max}$

จากรูปที่ 4.27 พบว่ามีค่า  $K_m$  สำหรับกลูโคสเท่ากับ 435.93 มิลลิโมลาร์ เพราะฉะนั้นค่า  $V_{\max}$  จากกราฟเท่ากับ 0.098 ไมโครโมลต่อนาที

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry ดังแสดงในข้อ 3.3.4 พบว่าเอนไซม์มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.066 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร

ในปฏิกิริยาใช้เอนไซม์เจือจาง 2 เท่า เพราะฉะนั้นจะมีโปรตีนเท่ากับ 0.033 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร

แต่ในปฏิกิริยาใช้เอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นจะมีโปรตีนเหลือเท่ากับ 0.0033 มิลลิกรัมโปรตีน

ดังนั้นสรุปได้ว่า

ในปฏิกิริยามีโปรตีน 0.0033 มิลลิกรัม จะมีค่า  $V_{\max}$  เท่ากับ 0.098 ไมโครโมลต่อนาที เพราะฉะนั้นโปรตีน 1 มิลลิกรัม จะมีค่า  $V_{\max}$  เท่ากับ 29.97 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วิธีการคำนวณค่า  $k_{cat}$  (Turnover number)

$$\text{สูตรคำนวณ ; } k_{cat} = V_{max} / [E_0]$$

เอนไซม์ที่ได้จากการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 (Sephacryl S-300) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 170,000 ดาลตัน (ผลจากรูปที่ 4.18)

ค่า  $[E_0]$  ;

1 โมลของเอนไซม์ เท่ากับ 170,000 กรัมของเอนไซม์

เพราะฉะนั้น 1 ไมโครโมลของเอนไซม์ เท่ากับ 170,000 ไมโครกรัมของเอนไซม์ เช่นกัน

แทนค่าในสูตร  $k_{cat} = V_{max} / [E_0]$

$$= \frac{29.97 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}}{1 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{pr}}$$

$$\frac{29.97 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}}{170,000}$$

เปลี่ยน  $\mu\text{g}$  เป็น  $\text{mg}$  ด้วยการหาร 1,000

$$= \frac{29.97 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}}{1,000 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{pr}}$$

$$\frac{29.97 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}}{170,000}$$

$$= 5,094.9 \text{ min}^{-1}$$

เพราะฉะนั้นมีค่า  $k_{cat}$  เท่ากับ 84.91 ต่อวินาที

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกัลกียา ชนิตรนันต์ เกิดเมื่อวันศุกร์ที่ 21 กันยายน พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดพิจิตร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2548 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 633/4 หมู่ 9 ตำบลทับคล้อ อำเภอทับคล้อ จังหวัดพิจิตร 66150

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. Kankiya Chanitnun and Pairoh Pinphanichakarn. Simultaneous production of xylanase,  $\alpha$ -xylosidase and D-glucose/xylose isomerase by *Streptomyces* spp. PC22 and CH7 grown on xylan. Proceedimngs in the 20<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology (TSB). October 14-17, 2008, Mahasarakham University, Mahasarakarm, Thailand. p.169-175. (poster presentation) (Full text in CD-ROM)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย