บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ

1. การเก็บรวบรวมเชื้อราจากแหล่งต่าง ๆ

จากการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยรวมทั้งจากคลังเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเชื้อราที่แยกได้จากการปนเปื้อนในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวนทั้งสิ้น 17 แหล่ง สามารถแยกเชื้อราบนอาหารวุ้นแข็งตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1 ได้ทั้งสิ้น 240 สายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 6

2. การทดสอบเชื้อราบนอาหารวุ้นแข็งที่มีเดกซ์แทรน

นำเชื้อราที่เก็บรวบรวมได้ในข้อ 1 จำนวนทั้งสิ้น 240 สายพันธุ์ มาทดสอบการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสบนอาหารวุ้นแข็งที่มีเดกซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจุดเชื้อ (spot) บนอาหารวุ้นแข็งบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วเทราดด้วยเอธานอล 95 % พบว่ามีเชื้อราจำนวน 22 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยให้บริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อเหล่านั้นในขณะที่เชื้อไม่ผลิตเอนไซม์นี้จะไม่ให้บริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี ดังตัวอย่างในรูปที่ 1

3. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

เมื่อนำเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนีจากข้อ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเดกซ์แทรน 1% เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีเชื้อรา 5 สายพันธุ์ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูง เมื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมาจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อรา ส่วนเชื้อราที่เหลืออีก 17 สายพันธุ์ ให้ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรน-เนสในระดับต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 7

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สร้างเดกซ์แทรนเนสแล้ว พบว่าเชื้อรา Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 (ลักษณะของเชื้อแสดงในภาคผนวก ง)สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงสุดคือ 42 หน่วย/มล.น้ำเลี้ยงเชื้อ เชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเดกซ์แทรน จึงคัดเลือกเอาราสายพันธุ์นี้มาทำการศึกษารายละเอียดในการผลิตเดกซ์แทรนเนสต่อไป

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนเชื้อราที่แยกมาศึกษาจากราตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ

แหล่งตัวอย่าง	เชื้อราที่แยกได้	เชื้อราที่ย่อยdextran
โรงงานน้ำตาลขอนแก่น	8	-
อำเภอบางพระ, ชลบุรี	1	1
จังหวัดระยอง	4	-
หาดพัทยา - จอมเทียน	3	-
วังตะไคร้ นครนายก	8	-
คณะวิทยาศาสตร์ - จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	10	-
บริษัทบุญรอดบริวเวอร์รี่จำกัด	15	-
จังหวัดกาญจนบุรี	15	-
วนอุทยานผาแดง	9	2
จังหวัดกรุงเทพมหานคร	9	3
ตัวอย่างอาหารสัตว์จังหวัด-ราชบุรี, นครปฐม	27	-
โรงงานน้ำตาลไทย--รุ่งเรืองอุตสาหกรรม	3	3
โรงงานน้ำตาลบ้านโป่ง	29	4
โรงงานน้ำตาลวังขนาย	32	5
บุ๋ยคลุกกากถั่วลิสง	7	-
รวม	218 สายพันธุ์	18 สายพันธุ์

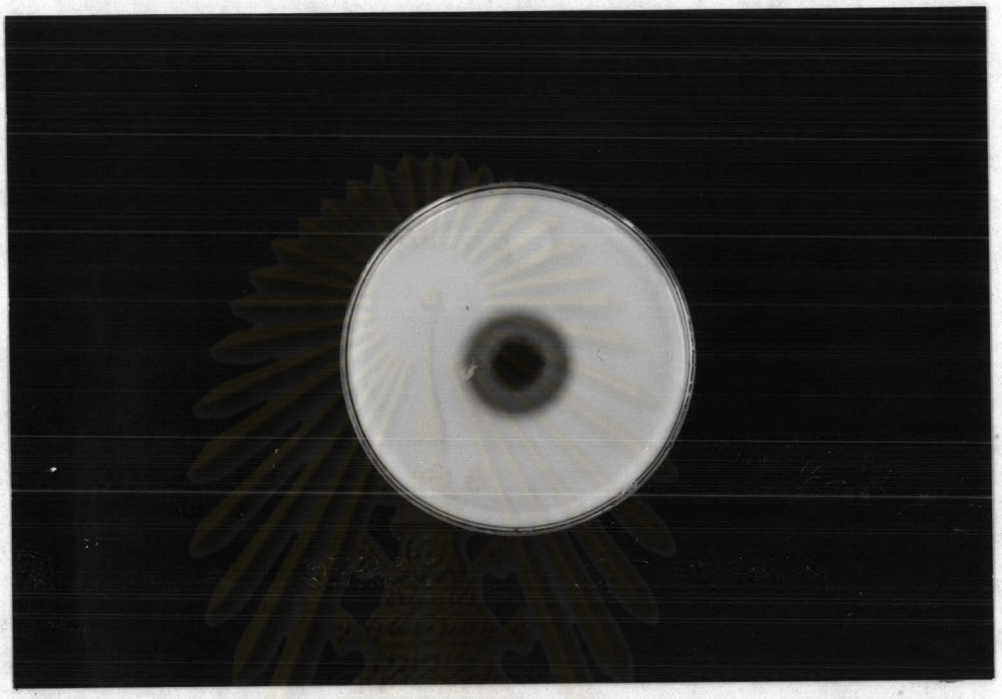
ตารางที่6 (ต่อ) แสดงจำนวนเชื้อราที่มาจากแหล่งอื่น ๆ

แหล่งที่มาของเชื้อรา	จำนวนที่ได้	เชื้อราที่ย่อยdextran
เชื้อราจากการปนเปื้อน	12	3
เชื้อราจากคลังเชื้อของภาควิชา-จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ	10	1
รวม	22	4

รวมเชื้อราทั้งสิ้น 240 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ 22 สายพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็ง เชื้อราที่ย่อยเดกซ์แทรนจะให้บริเวณใส(clear zone)เกิดขึ้นเมื่อราดด้วยเอธานอล 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงแอคติวิตีของเชื้อราที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสในอาหารเหลวสูตรของ Fukumoto ที่มีเดกซ์แทรน(น้ำหนักโมเลกุล 3-50x10^6 , industrial grade) 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บน rotary shaker อัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที นำส่วนน้ำใสไปตรวจสอบแอคติวิตีตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5

เชื้อรา	แหล่งที่พบ	ปริมาณเอนไซม์สูงสุด หน่วย/มล.	ในวันที่
Penicillium sp. No.31	จากการปนเปื้อน	2.4	8
เชื้อหมายเลข " 37	stock ภาควิชา	6.9	8
Penicillium sp. " 42	วนอุทยานผาหลวง	12.5	10
" " 43		4.2	5
" " 61	จากการปนเปื้อน	42.8	6
" " 62		6.0	6
" " 68	บางพระ ชลบุรี	5.4	7
Penicillium sp. 2	กรุงเทพ	4.8	7
เชื้อหมายเลข 6		6.5	7
" 10		5.6	6
" 43	โรงงานไทยรุ่งเรือง -กาญจนบุรี	2.7	5
" 86		4.0	3
" 97		3.6	10
" 100		18.5	3
" 101	โรงงานน้ำตาล- -บ้านโป่ง	11.5	10
" 106		7.8	8
" 115		4.0	7
" 116	โรงงานน้ำตาล- -วังขนาย	17.6	6
" 117		6.5	6
" 118		1.0	4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ) แสดงการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในอาหารเหลว

เชื้อรา	แหล่งที่พบ	ปริมาณเอนไซม์สูงสุด หน่วย/มล.	ในวันที่
Penicillium sp.NO.119	โรงงานน้ำตาล--วังขนาย	7.8	6
" 120		0.8	5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวเมื่อใช้สปอร์จากอาหารที่ต่างชนิดกัน

เมื่อใช้สปอร์ที่เขี่ยมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตรของ Fukumoto (30) มาเลี้ยงเชื้อในอาหารของ Fukumoto พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยใช้สปอร์จากอาหารสูตรของ Fukumoto จะให้เอนไซม์สูงสุด 42 หน่วยต่อ มล. ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตโดยใช้สปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเพียง 12 หน่วยต่อ มล. ในวันที่ 8 ดังแสดงในรูปที่ 2

5. ผลของอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

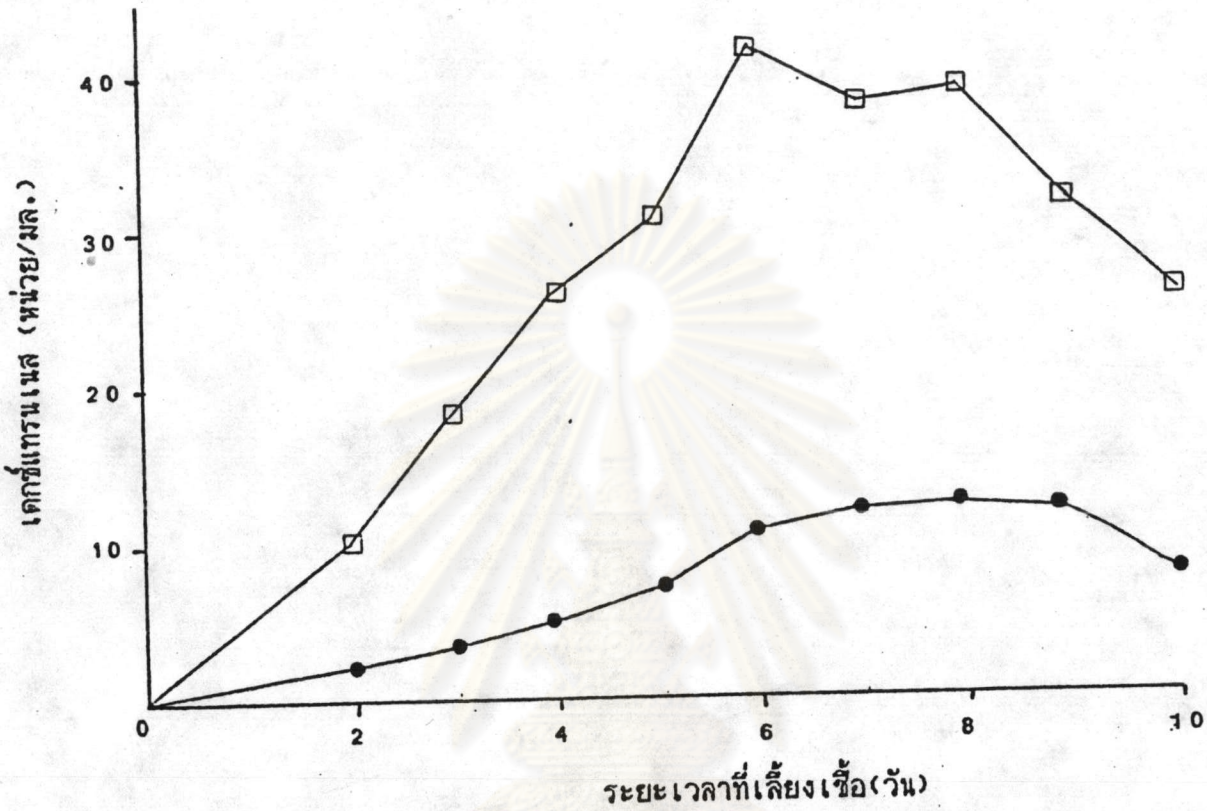
จากรายงานของ Fukumoto (30) และ Simonson (34) ได้ใช้เกลือแร่และสารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบต่างกัน ดังนั้นการศึกษานี้จะทำการทดลองหาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ศึกษาต่อไป เมื่อศึกษาสูตรอาหารทั้งสองจะพบว่า ประกอบด้วยสูตรอาหารสำเร็จรูปและเกลือแร่ต่างๆ ในขณะที่สูตรอาหารของ Hattori (36) ได้มีการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่น เมล็ดฝ้ายปนที่สกัดไขมันออกมาใช้เป็นองค์ประกอบ จึงได้นำ สูตรอาหารของ Hattori มาปรับปรุงโดยใช้กากถั่วเหลืองแทน (เนื่องจากไม่สามารถหาเมล็ดฝ้ายสกัดไขมันออก)

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเหลวทั้งสามสูตร พบว่าสูตรอาหารของ Fukumoto สามารถให้เอนไซม์ในปริมาณสูงสุด ในขณะที่สูตรของ Simonson และ Hattori ให้ปริมาณเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน แต่สูตรอาหารของ Hattori ดัดแปลงต้องใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์สูงสุดนานวันกว่าสูตรของ Simonson ดังแสดงในรูปที่ 3 ฉะนั้นจึงได้เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Fukumoto มาเป็นต้นแบบในการศึกษาต่อไป

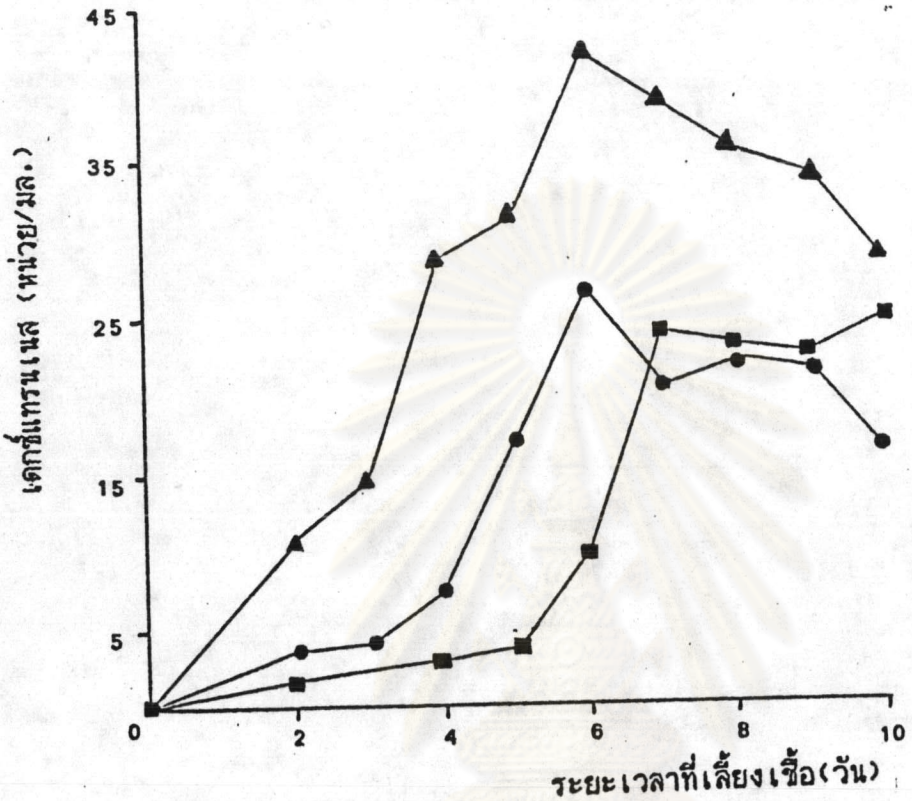
6. ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

6.1 การหาขนาดของเดกซ์แทรนที่เหมาะสม

ทำการทดลองหาขนาดของเดกซ์แทรน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและตัวชักนำ (inducer) การสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเดกซ์แทรนขนาดและน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กันคือ เดกซ์แทรนน้ำหนักโมเลกุล 10,000 40,000 153,000(industrial grade) 200,000 2,000,000 $3\text{-}50\times10^{6}$ (industrial grade) และที่ผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการโดยเชื้อ Leuconostoc mesenteroides เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 1.0 % เมื่อตรวจสอบดูพบว่าปริมาณการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสถูกชักนำได้ดีที่สุดเมื่อใช้เดกซ์แทรน



รูปที่ 2 ผลเปรียบเทียบการใช้สปอร์ที่เขี่ยจาก PDA กับ อาหารแข็งเดกซ์แทรนสูตรของ Fukumoto ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Dextran 1.0%, $NaNO_3$ 0.2%, K_2HPO_4, 0.2%, KCl และ $MgSO_4$ 0.05% , $FeSO_4$ 0.0005% และ Yeast Extract 0.2% โดยใช้สภาวะของการทดลองที่ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 3 ผลของสูตรอาหารชนิดต่างๆที่ทดลองใช้ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 ดังภาคผนวก ก.คือสูตรอาหารของ Hattori ■, สูตรอาหารของ Simonson ● และสูตรอาหารของ Fukumoto ▲ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10วัน ภายใต้การเขย่า 200รอบต่อนาที

น้ำหนักโมเลกุลสูง คือเดกซ์แทรนน้ำหนักโมเลกุล 3-5x10^5 ชนิดคุณภาพอุตสาหกรรม (industrial grade) โดยให้เอนไซม์สูงสุด 42 หน่วยต่อมล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อดังแสดงในรูปที่ 4

6.2 ความเข้มข้นเดกซ์แทรนที่เหมาะสม

เมื่อได้ชนิดของเดกซ์แทรนที่เหมาะสมจากข้อ 1) แล้ว จึงได้ทดลองหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดยการแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 % - 2.0 % พบว่าที่ความเข้มข้นเดกซ์แทรนช่วงระหว่าง 1.5 - 2.0 % ให้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสูงสุดประมาณ 45 หน่วยต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่เดกซ์แทรนความเข้มข้น 1.0 % ให้เอนไซม์สูงสุด 42 หน่วยต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนความเข้มข้นเดกซ์แทรนที่ต่ำกว่า 1.0 % จะให้ปริมาณเอนไซม์ที่ต่ำกว่าความเข้มข้นแรกมาก ดังแสดงในรูปที่ 5

ดังนั้น เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมที่จะใช้เดกซ์แทรนสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแล้ว จึงได้เลือกใช้เดกซ์แทรนน้ำหนักโมเลกุล 3-5x10^5 ชนิดคุณภาพอุตสาหกรรม ความเข้มข้น 1.0 % สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

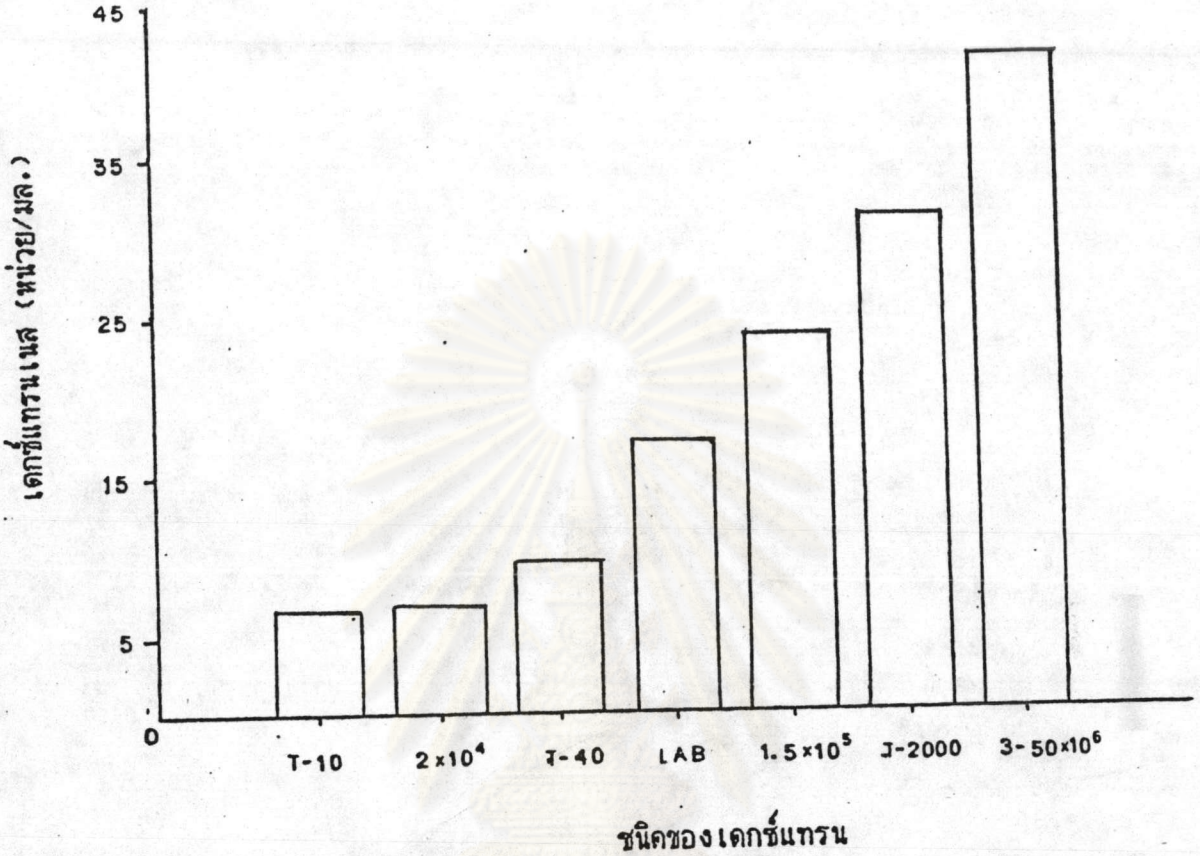
7. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ในการทดลองหาชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจน ทั้งในรูปของสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 พบว่า

7.1 แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

7.1.1 Corn Steep Liquor

เมื่อเติม Corn Steep Liquor ความเข้มข้น 0 - 1.0 % แทน $NaNO_3$ ในสูตรอาหารของ Fukumoto และเมื่อใช้ corn steep liquor ความเข้มข้น 0 - 1.0 % แทนผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ในสูตรอาหารดังกล่าวแล้ว พบว่า corn steep liquor ไม่ได้ช่วยเพิ่มการสร้างเอนไซม์ของเชื้อพันธุ์ 61 ในขณะที่ Hattori ได้รายงานว่า corn steep liquor สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีในการผลิตเอนไซม์ เมื่อใช้สาร corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าให้ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสูงสุดเพียง 5.9 หน่วยต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ ขณะที่สภาวะมาตรฐานของการทดลองสามารถผลิตเอนไซม์ได้ถึง 42 หน่วยต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 6



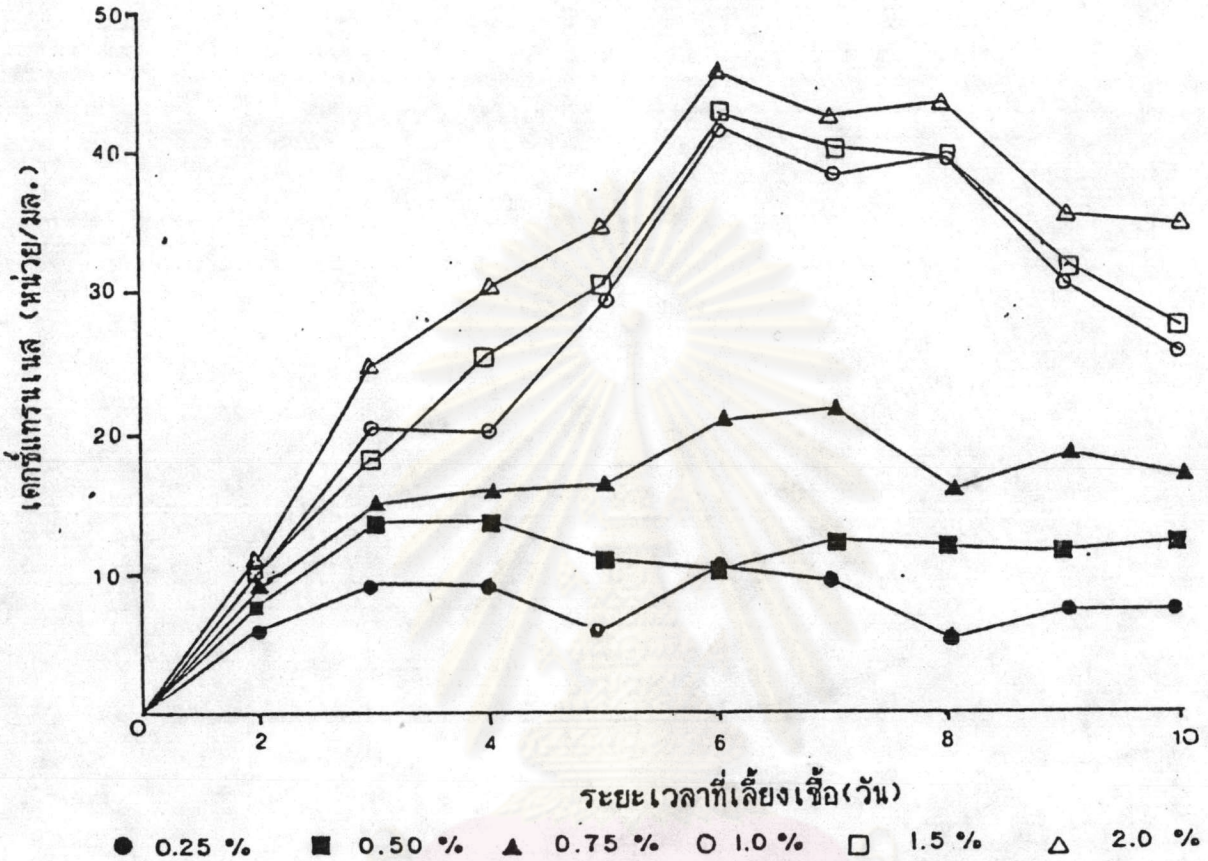
รูปที่ 4 ผลของชนิดเดกซ์แทรนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารของ Fukumoto โดยใช้ความเข้มข้นเดกซ์แทรนเป็น 1.0% ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน เดกซ์แทรนที่ใช้คือ

T-10 น้ำหนักโมเลกุล 10,000

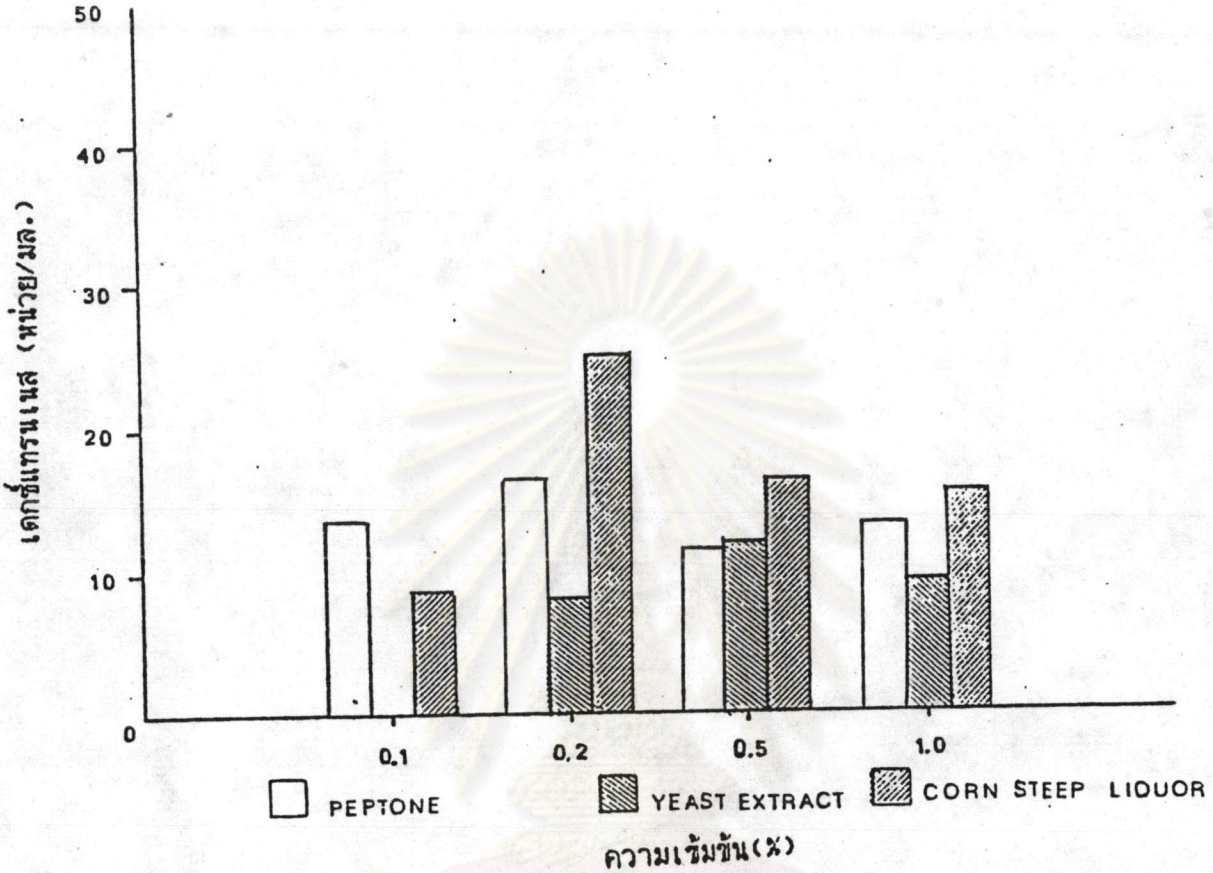
T-40 " 40,000

T-2000 " 2,000,000

ชนิดคุณภาพอุตสาหกรรมน้ำหนักโมเลกุล 20,000 ,153,000 และ3-50,000,000 และที่ผลิตเองในห้องปฏิบัติการ(LAB)



รูปที่ 5 ผลของปริมาณเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย $NaNO_3$ 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, Yeast Extract 0.2%, KCl 0.05% , $MgSO_4$ 0.05%, $FeSO_4$ 0.001%และเดกซ์แทรน 0.25-2.0% ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 จากนั้นเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องภายใต้การเขย่า 200รอบต่อนาที



รูปที่ 6 ผลของแหล่งไนโตรเจนในรูปสารประกอบอินทรีย์ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 5 แต่เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจาก $NaNO_3$ เป็นสาร PEPTONE □, YEAST EXTRACT ▨ และ CORN STEEP LIQUOR ▨ ความเข้มข้นต่างๆดังแสดง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.1.2 เปปโตนและสารสกัดจากยีสต์

เมื่อทดลองใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอื่น อันได้แก่ เปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ในสูตรอาหาร Fukumoto ที่ความเข้มข้น 0.1 - 1.0 % แทน $NaNO_3$ พบว่าสารอินทรีย์เหล่านี้กลับทำให้การผลิตเอนไซม์ต่ำกว่าสภาวะมาตรฐาน โดยปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่ผลิตเมื่อใช้เปปโตน 0.2% เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ 16.42 หน่วยต่อมล. และเมื่อใช้0.5% ของ สารสกัดจากยีสต์ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด 11.9 หน่วยต่อมล.ขณะที่สภาวะมาตรฐานให้เอนไซม์สูงถึง 42 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 6

7.2. แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของเกลือไนเตรท

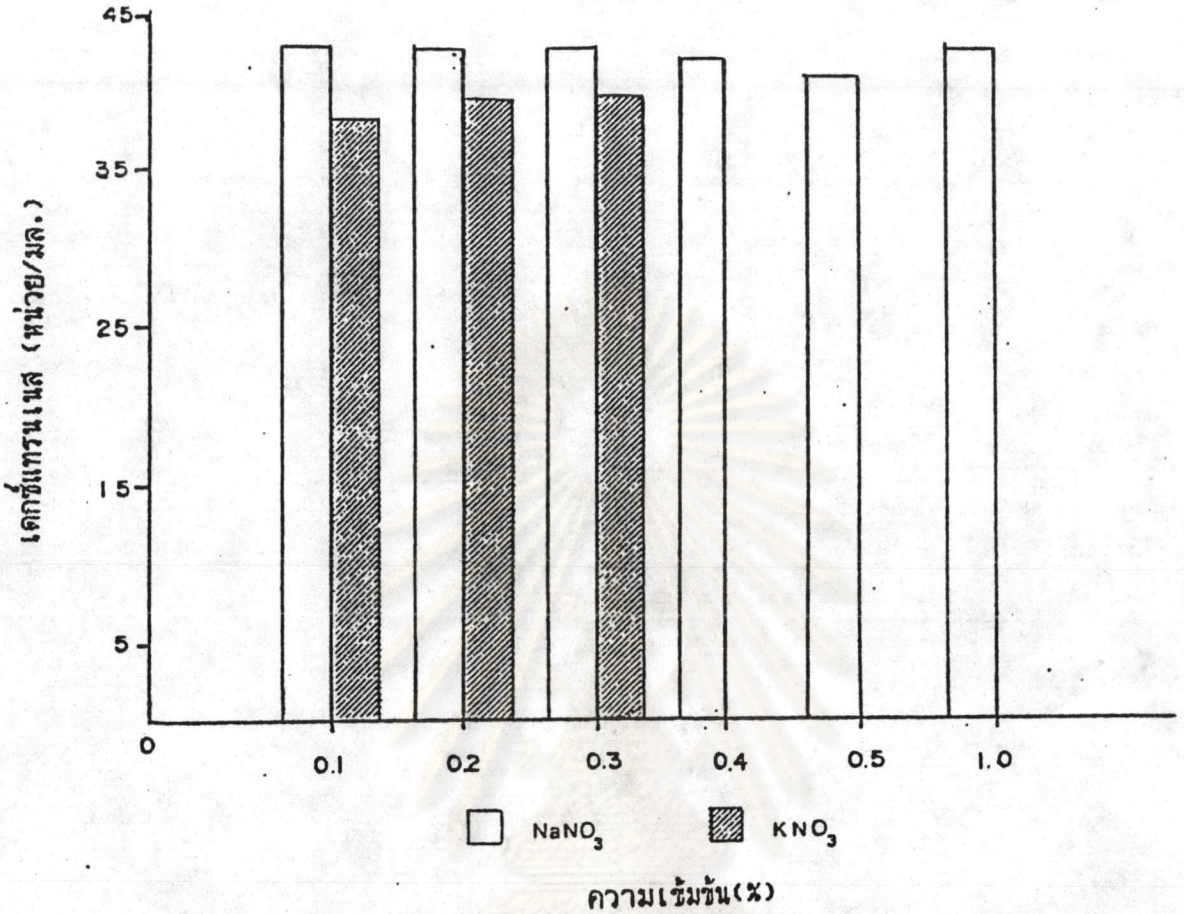
จากการผันแปรชนิดและปริมาณเกลือไนเตรท 2 ชนิด คือ $NaNO_3$และ KNO_3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Fukumoto ดัดแปลง โดยการผันแปรความเข้มข้นในช่วง 0.1 - 1.0 % พบว่า $NaNO_3$ เป็นเกลือแร่ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์สูงที่สุด ส่วน KNO_3 จะให้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำกว่า $NaNO_3$ เล็กน้อยโดยความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ในช่วง 0.1 - 0.3 % จะให้ผลผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงในรูปที่ 7 ดังนั้นจึงเลือก $NaNO_3$ 0.2 % มาใช้ศึกษาในการทดลองต่อ ๆ ไป

7.3 แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของเกลือแอมโมเนียม

จากการทดลอง เกลือแอมโมเนียมต่าง ๆ รวม 4 ชนิด คือ NH_4Cl, NH_4NO_3, $NH_4H_2PO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$ แทน $NaNO_3$ ในสูตรอาหารมาตรฐาน โดยผันแปรความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมในช่วง 0.2 - 1.0 % พบว่าเกลือแอมโมเนียมทุกชนิดที่ได้ทำการทดลองให้การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่ำกว่า $NaNO_3$ ที่ใช้เป็นสภาวะมาตรฐานของการทดลอง โดย NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 0.2 % จะให้ปริมาณเอนไซม์ต่ำสุด 6.1 หน่วยต่อมล. ในขณะที่ $NH_4H_2PO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$ จะให้ปริมาณเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน ประมาณ 25 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 8

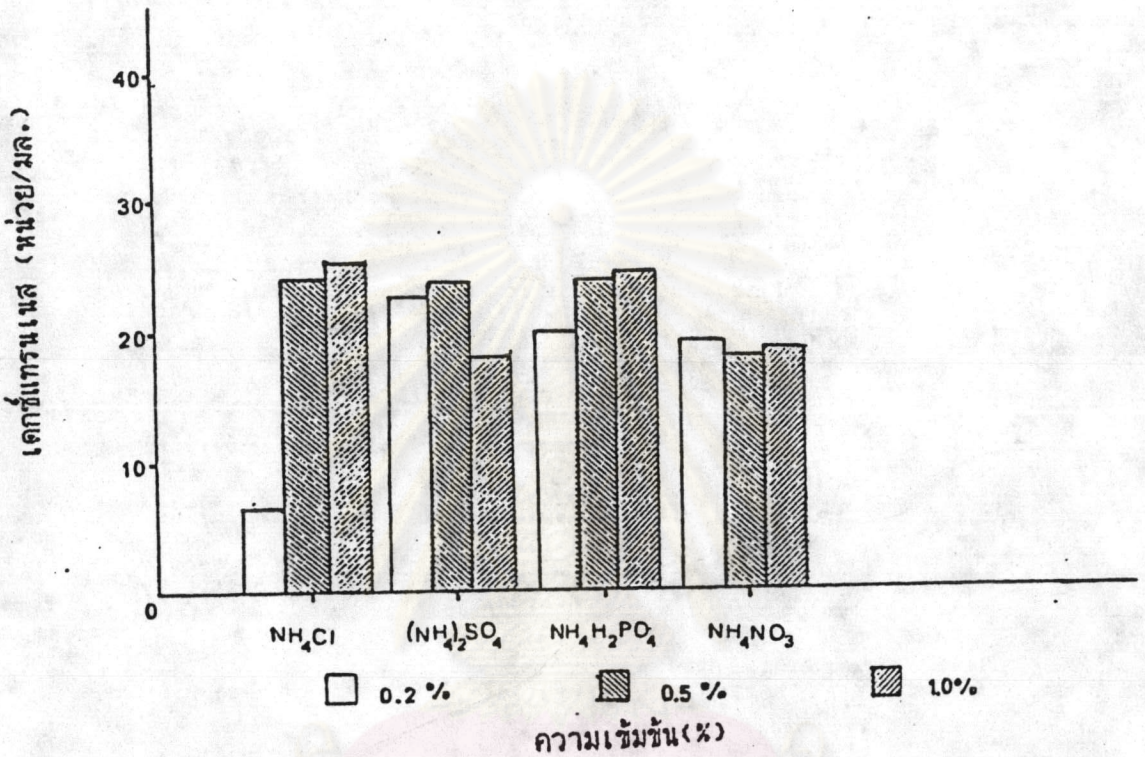
8. ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการที่เกลือแร่ต่าง ๆ มีความสำคัญต่อการเจริญ รวมทั้งการผลิตเอนไซม์ของจุลชีพ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองหาผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 โดยแปรเปลี่ยนชนิดตลอดจนแปรผันปริมาณของเกลือแร่ในสูตรอาหาร เมื่อตรวจดูความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของราPenicillium sp. สายพันธุ์ 61 พบว่า



รูปที่ 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนในรูปของเกลือไนเตรทต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ของเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 5 แต่มีการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นสาร $NaNO_3$ □ และ KNO_3 ▨ ดังแสดง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือแอมโมเนียม ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 5 แต่เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจาก $NaNO_3$ เป็น NH_4Cl, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 -ความเข้มข้นต่างๆดังแสดง

8.1 ผลของ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เมื่อทำการผันแปรความเข้มข้น K_2HPO_4 ตั้งแต่ 0 - 1.0 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน พบว่าการผลิตเอนไซม์จะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้น K_2HPO_4 0.2 % แต่หากความเข้มข้นของ K_2HPO_4 สูงหรือต่ำกว่านี้ จะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดต่ำลง โดยเฉพาะเมื่อไม่เติม K_2HPO_4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดต่ำลงมากเป็น 12 หน่วยต่อมล. เมื่อเทียบกับปริมาณเอนไซม์ 42 หน่วยต่อมล. ในสภาวะมาตรฐาน ดังผลการแสดงในรูปที่ 9

8.2 ผลของ KCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อผันแปรปริมาณ KCl ตั้งแต่ 0 - 1.0 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ใช้ KCl 0.05 % เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าเมื่อมี KCl ในปริมาณต่ำ 0 หรือ 0.1 % แล้วจะทำให้ผลการผลิตเอนไซม์ได้เพียงประมาณ 5 หน่วยต่อมล. เมื่อเทียบกับสภาวะมาตรฐานที่ผลิตได้ 42 หน่วยต่อมล. ดังผลการแสดงในรูปที่ 10

8.3 ผลของ $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

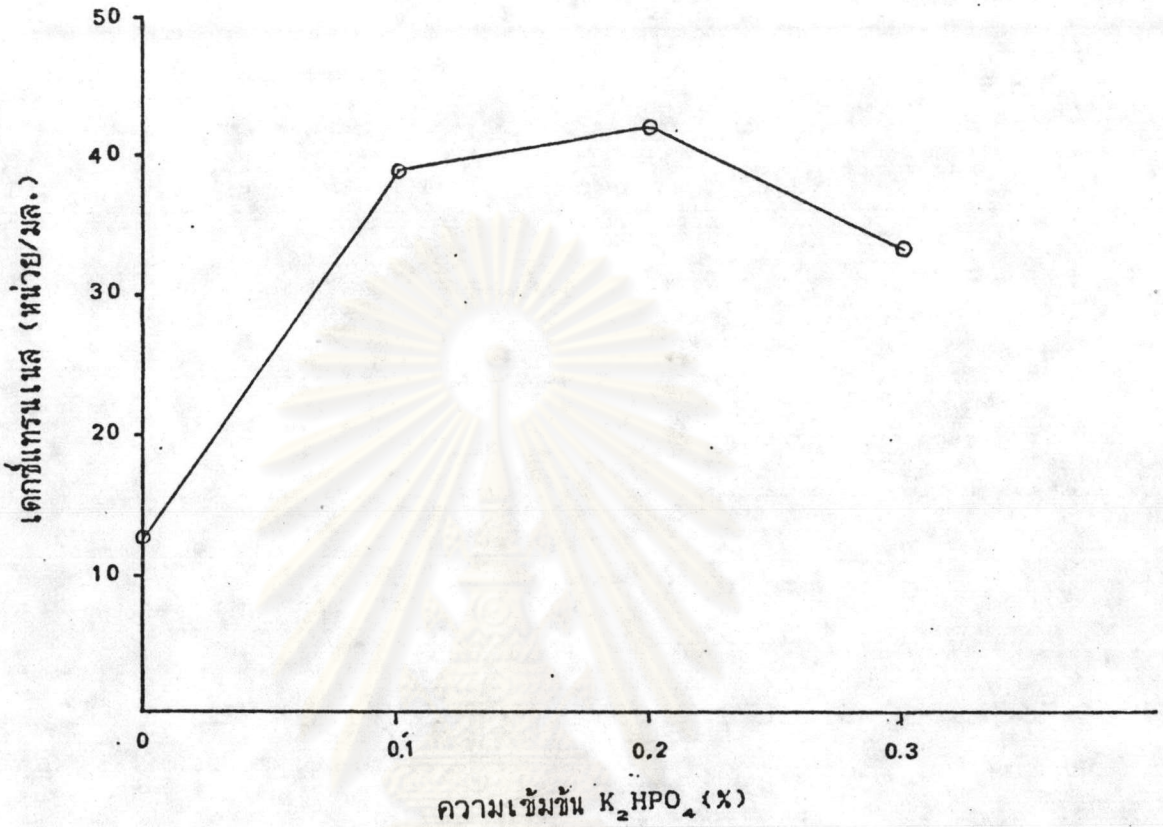
เมื่อผันแปรปริมาณ $MgSO_4$ ในช่วง 0 - 1.0 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ใช้ $MgSO_4$ 0.05 % เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า เมื่อความเข้มข้น $MgSO_4$ ในช่วง 0-0.025 % จะให้ปริมาณเอนไซม์ที่ต่ำกว่าสภาวะมาตรฐาน ในขณะที่ความเข้มข้น $MgSO_4$ เป็น 0.1 % จะให้ปริมาณเอนไซม์ได้ใกล้เคียงสภาวะมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 11

8.4 ผลของ $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อผันแปร $FeSO_4$ ความเข้มข้น 0 - 0.002 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ใช้ $FeSO_4$ 0.001 % เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าปริมาณ $FeSO_4$ 0.0005 % จะให้การผลิตเอนไซม์ได้ดีเช่นเดียวกับสภาวะมาตรฐานโดยให้การผลิตเอนไซม์42 หน่วยต่อมล. เช่นกัน ส่วนการไม่เติม $FeSO_4$ ลงในอาหารจะให้การผลิตเอนไซม์ 16.8 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 12

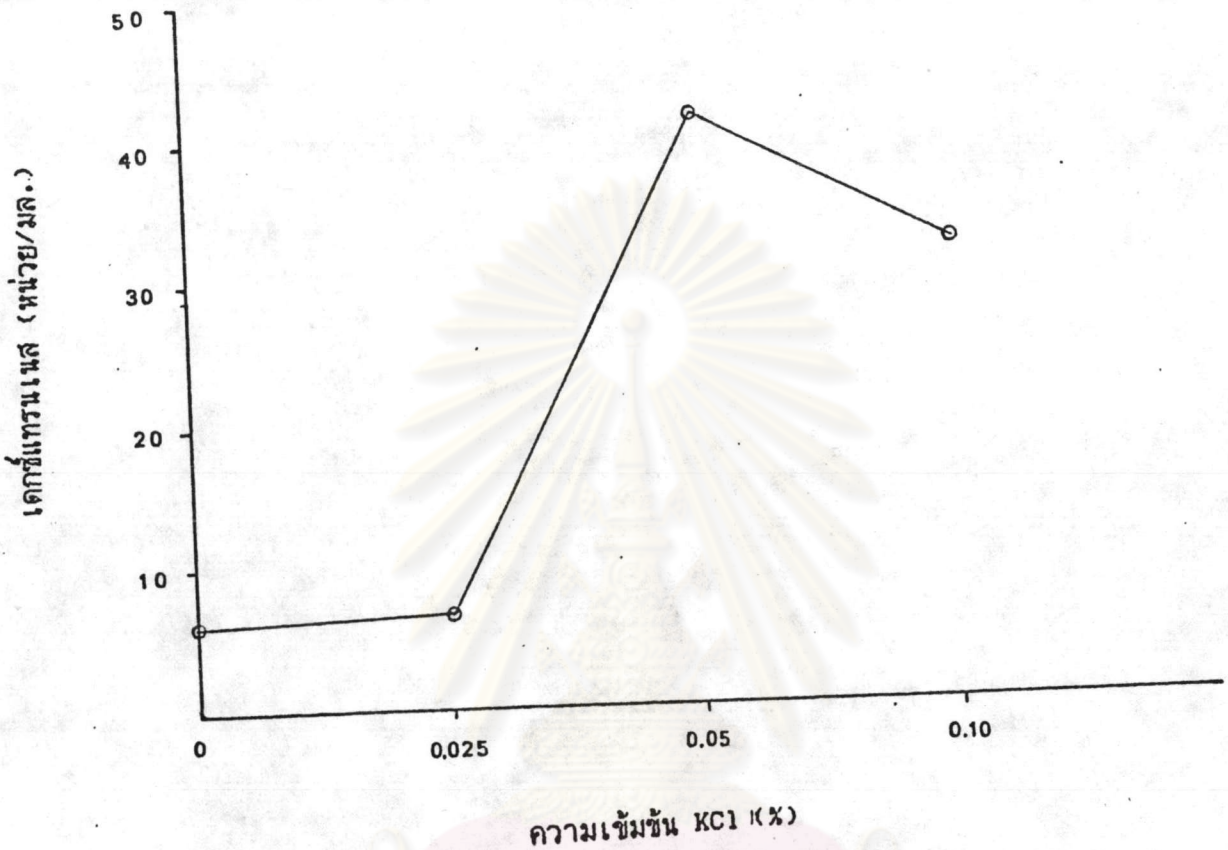
8.5 ผลของแร่ธาตุอื่น ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์

จากผลของการเติมเกลือแร่ชนิดอื่น ๆ ที่เสริมเข้ามาในสูตรอาหารของ Fukumoto ที่ได้ทำการปรับปรุงให้มีความเหมาะสมต่อเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 แล้ว พบว่า $BaCl_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$ และ $MnSO_4$ ความเข้มข้น $1.0 - 2.0 \times 10^{-5}$ โมลาร์ ล้วนแต่มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ลดต่ำลง โดยเฉพาะ $MnSO_4$ ความเข้มข้น 2×10^{-5} โมลาร์ จะมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์มากที่สุดทำให้ได้เอนไซม์เพียง 21.6 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 13



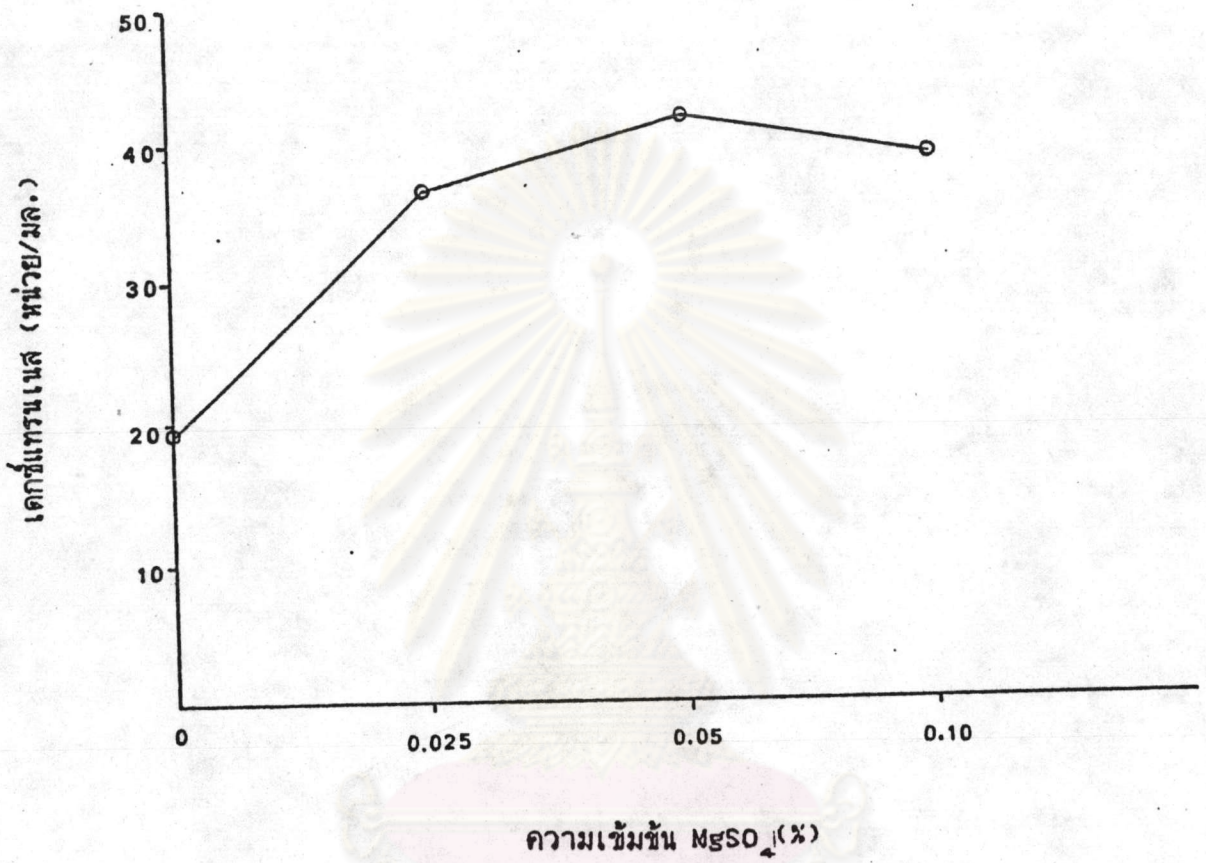
รูปที่ 9 ผลของการเติม K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยผันแปรปริมาณ K_2HPO_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานดังระบุในรูป และปรับความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



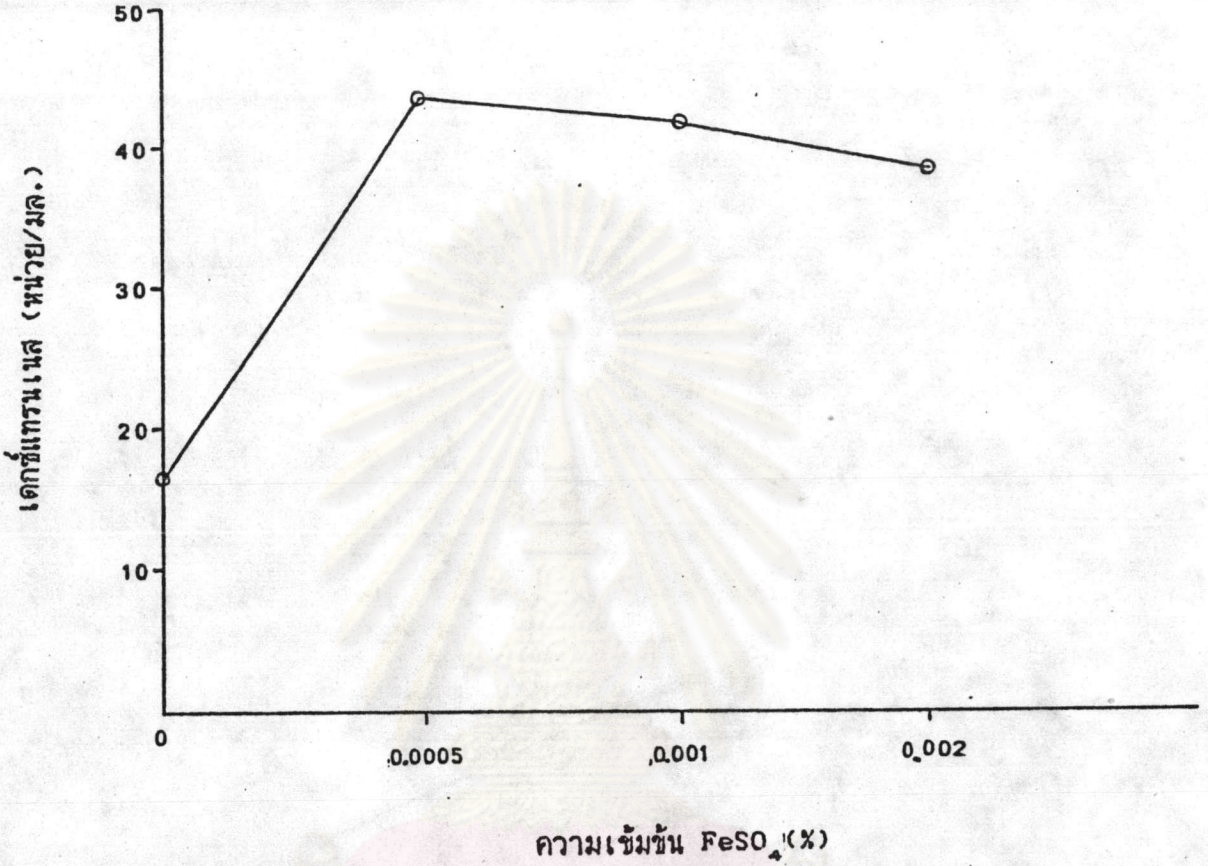
รูปที่ 10 ผลของการเติม KCl ที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยผันแปรปริมาณ KCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานดังระบุในรูป และปรับความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



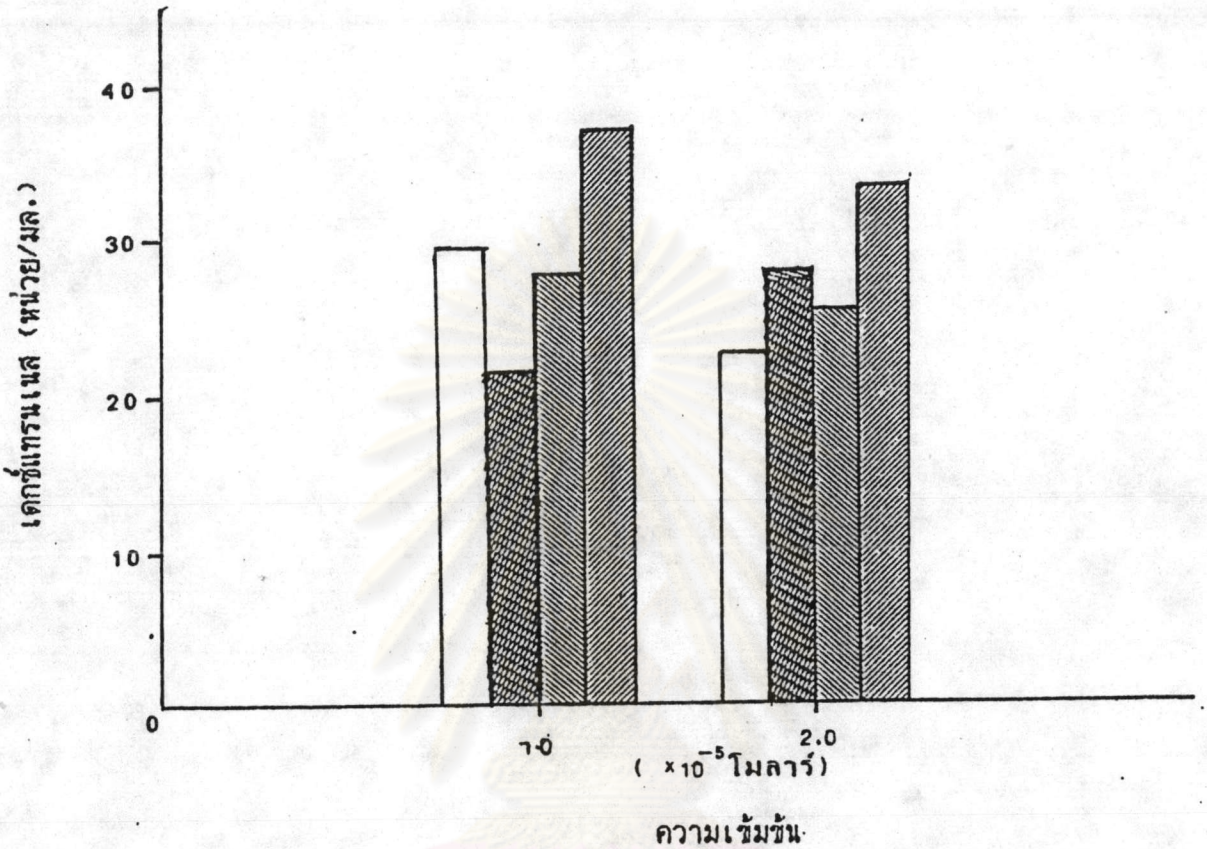
รูปที่ 11 ผลของการเติม $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยผันแปรปริมาณ $MgSO_4$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานดังระบุในรูป และปรับความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 ผลของการเติม $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยผันแปรปริมาณ $FeSO_4$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานดังระบุในรูป และปรับความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ผลของการเติมเกลือแร่เสริมชนิดต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว โดยเติม $CoCl_2$, $BaCl_2$, $MnSO_4$, $CuSO_4$ ที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ ดังระบุในรูป ภายใต้สภาวะเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

□ $BaCl_2$
▩ $CoCl_2$
▩ $MnSO_4$
▨ $CuSO_4$

จากการศึกษาดังกล่าวมานี้ จึงได้ชนิดและความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 8 แสดงสูตรอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้ปรับปรุงแล้ว

สารอาหาร	ความเข้มข้น (%)	
	สูตร FUKUMOTO เดิม	สูตรปรับปรุง
Dextran	1.0	1.0
$NaNO_3$	0.2	0.2
K_2HPO_4	0.2	0.2
KCl	0.05	0.05
$MgSO_4$	0.05	0.05
$FeSO_4$	0.001	0.0005
Yeast Extract	0.2	0.2

ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 6.0

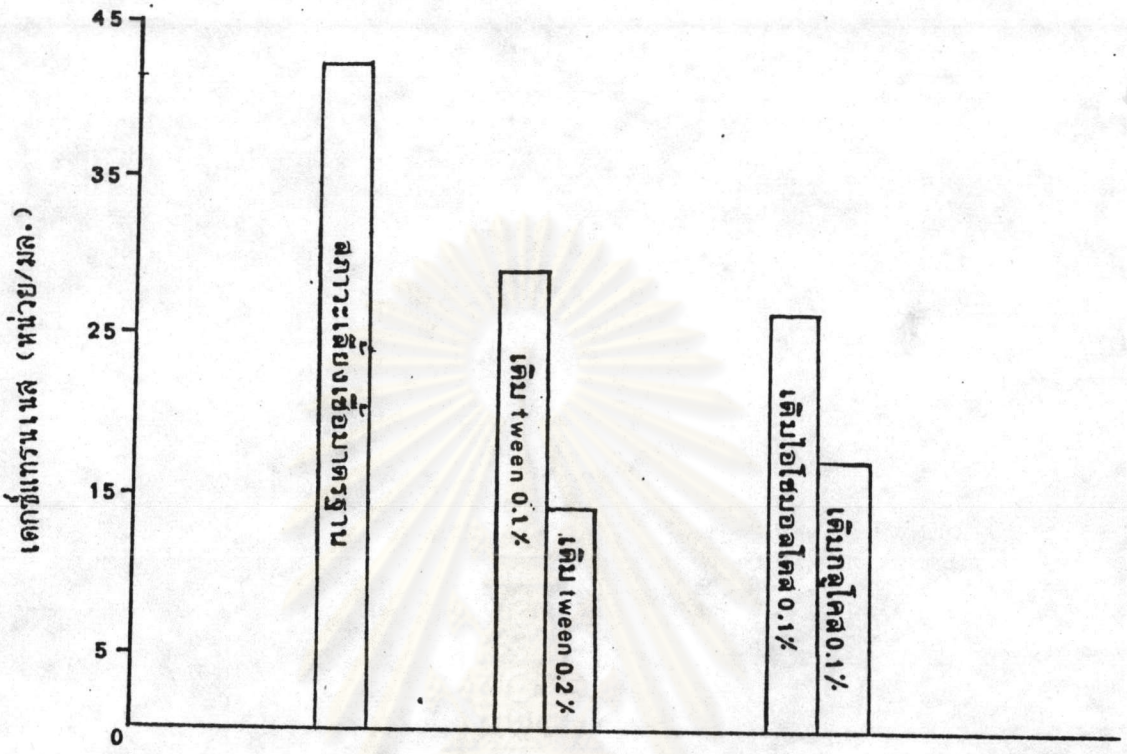
9. ผลของสารอื่น ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

9.1 ผลของสารประกอบจำพวกน้ำตาล

จากการทดลองเติมสารประกอบจำพวกโพลิเมอร์น้ำตาล คือ กลูโคส ไอโซ-มอลโตสและมอลโตไทรโอส ที่ความเข้มข้น 0.1 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้วข้างต้น พบว่าสารจำพวกน้ำตาลกลูโคสเหล่านี้มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่ำลง โดยทำให้การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 27 หน่วยต่อมล. เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ได้ปรับปรุงแล้วเติมไอโซมอลโตส และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เดกซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวที่ให้เอนไซม์ 42 หน่วยต่อ มล.ดังแสดงในรูปที่ 14

9.2 ผลของสารที่เป็น surfactant

เมื่อเติมสาร tween 80(polyoxyethylene sorbitiol monooleate) ในปริมาณ 0.1 % ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ surfactant ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ปรับปรุงแล้ว พบว่าการใช้ tween 80 กลับมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงจากสภาวะปกติ 42 หน่วยต่อมล. เป็น 29 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 ผลของสารอื่นๆ คือ น้ำตาล กลูโคส , ไอโซมอลโตส และ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ที่เสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงแล้ว ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 โดยใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

10. ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อทดลองแปรผันระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในช่วง pH 3.0 - 8.0 พบว่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5 - 6.0 โดยปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อผลิตได้สูงสุดจะใกล้เคียงกันที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในช่วงนี้ ดังแสดงในรูปที่ 15

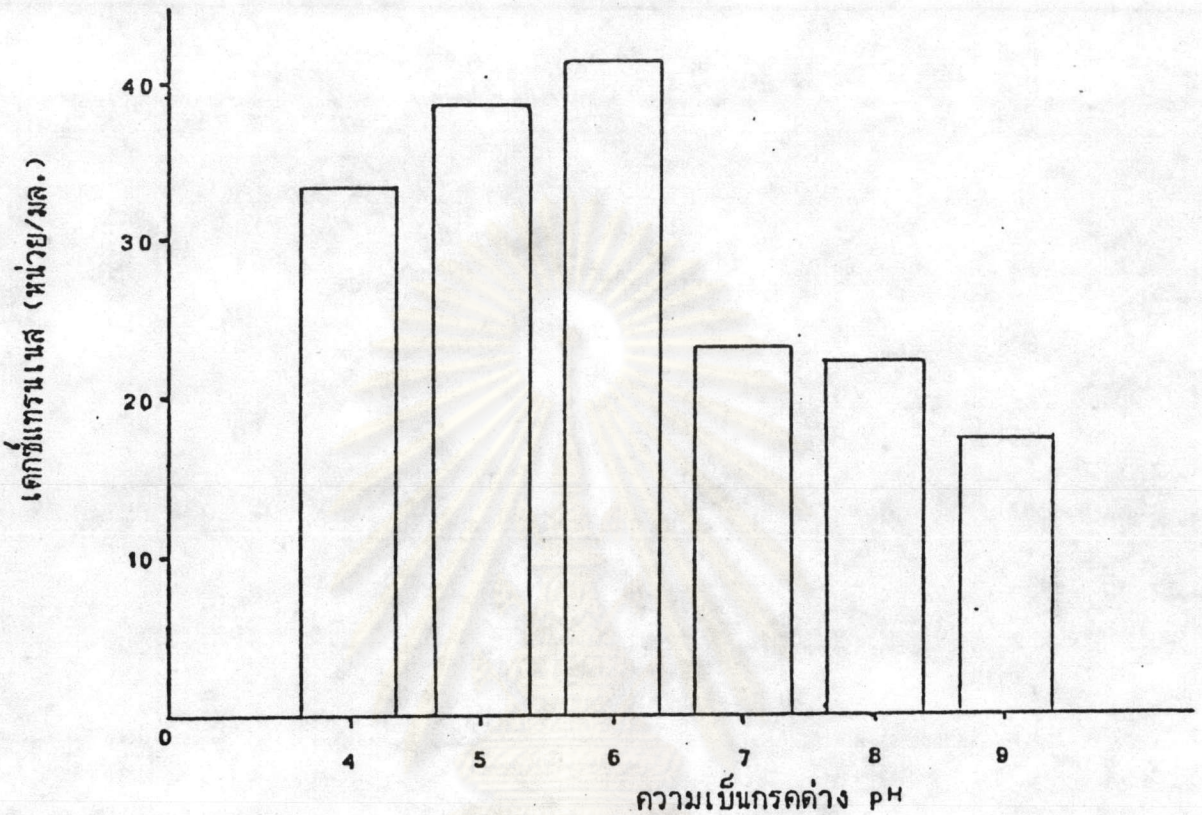
11. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 25-55 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อนี้อยู่ในช่วง 30 - 35 องศาเซลเซียส หรือในช่วงอุณหภูมิห้อง แต่ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินกว่านี้ การผลิตเอนไซม์จะลดลง และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า จะไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นเลย ดังแสดงในรูปที่ 16

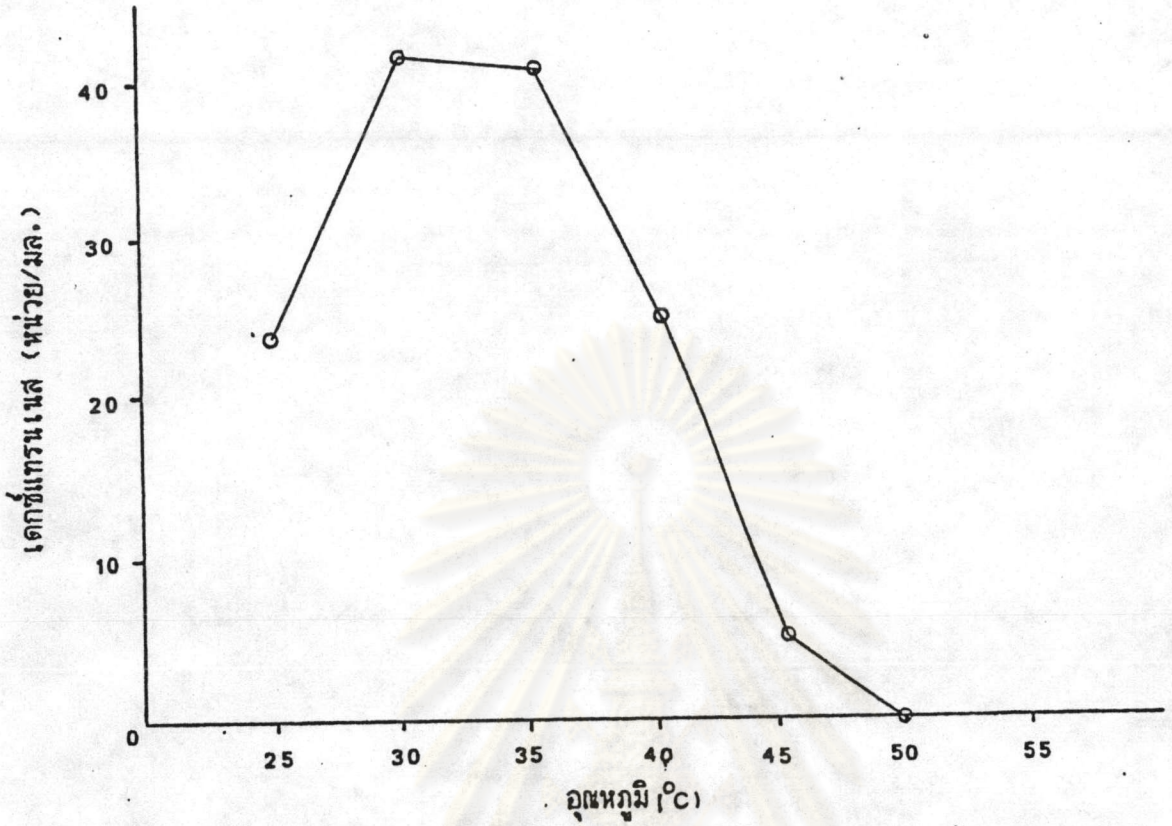
ผลของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

พบว่าในช่วงแรก ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อโดยเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 แต่เชื้อจะมีการเจริญสูงสุดอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 36-40 ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มลดลง ส่วนปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนสูงสุดในวันที่ 6 จากนั้นเริ่มลดลงเล็กน้อย ในช่วงวันที่ 8 - 10 ปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลงอย่างมาก ดังแสดงในรูปที่ 17

สำหรับสภาวะความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ นั้นพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อมากนัก โดย pH จะลดลงเป็น 5.0-5.5 ในช่วง 2-3 วันแรกหลังจากนั้นค่า pH จะเริ่มสูงขึ้นเล็กน้อยเป็น 7.0-7.5 ส่วนปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ นั้น จะสอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ตรวจพบ

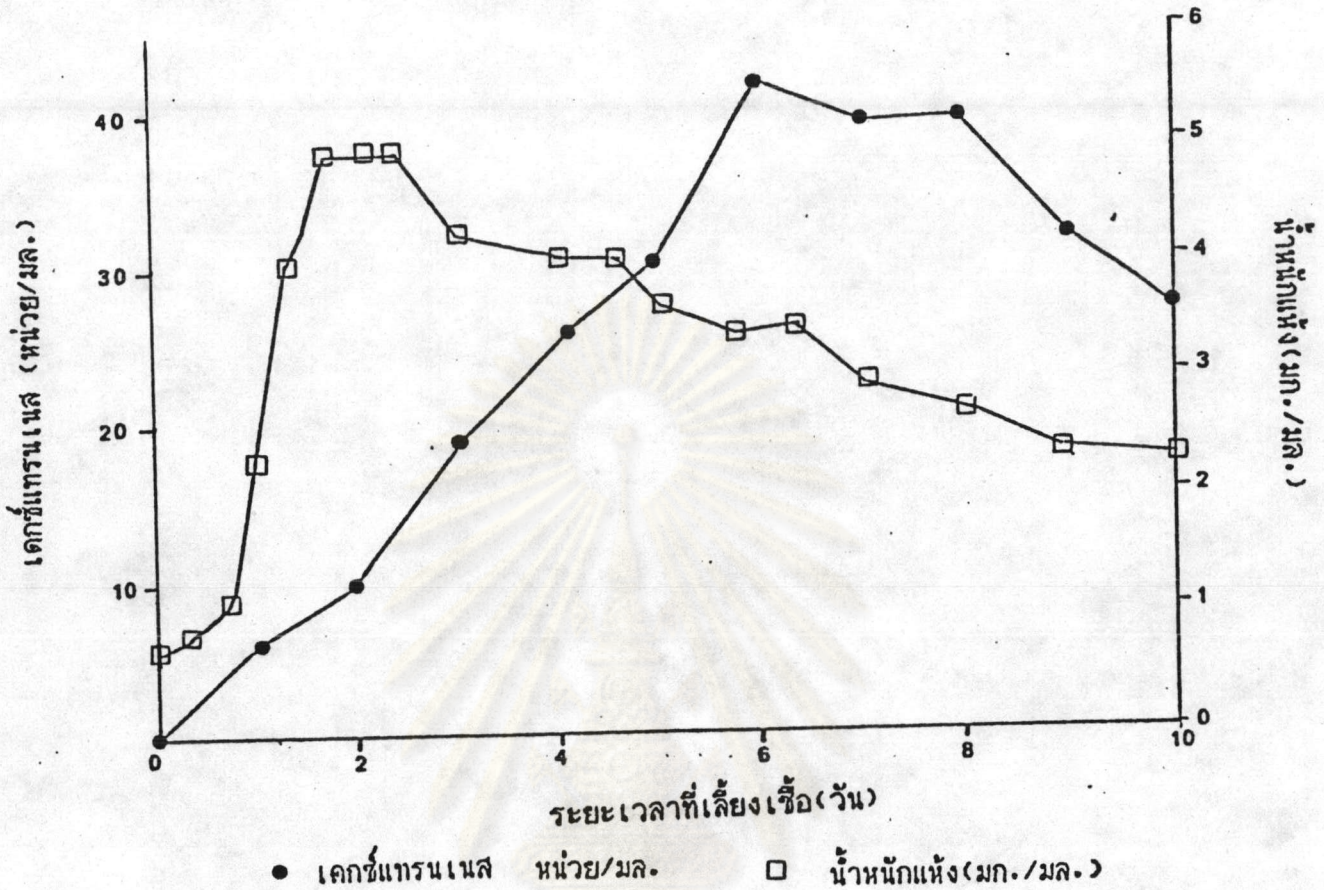


รูปที่ 15 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Dextran 1.0%, $NaNO_3$ 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, KCl และ $MgSO_4$ 0.05%, $FeSO_4$ 0.0005% และYeast Extract 0.2% ปรับสภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 4-9



รูปที่ 16 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 โดยใช้สภาวะที่ทดลองดังเช่นรูป 15 แต่ผันแปรอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อเป็น 25-55 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ผลความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ 61 กับการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ได้ทำการปรับปรุงแล้วซึ่งประกอบด้วย เดกซ์แทรน (industrial grade ,น้ำหนักโมเลกุล $3-50\times10^6$) 1.0%, $NaNO_3$ 0.2% ,K_2HPO_4 0.2% ,KCl 0.05%,$MgSO_4$ 0.05%,$FeSO_4$ 0.0005% และ Yeast Extract 0.2% ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 6.0 ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

1) สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่นำมาศึกษาคุณสมบัตินี้ เป็นเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งได้จากการเตรียมตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4 มีความเข้มข้น 42 หน่วยต่อมล. ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

1.1) การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสารผสมของปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 18 เอนไซม์จะทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง แต่จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และจะสูญเสียแอคติวิตีไปเมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 65 องศาเซลเซียส

1.2) ผลความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

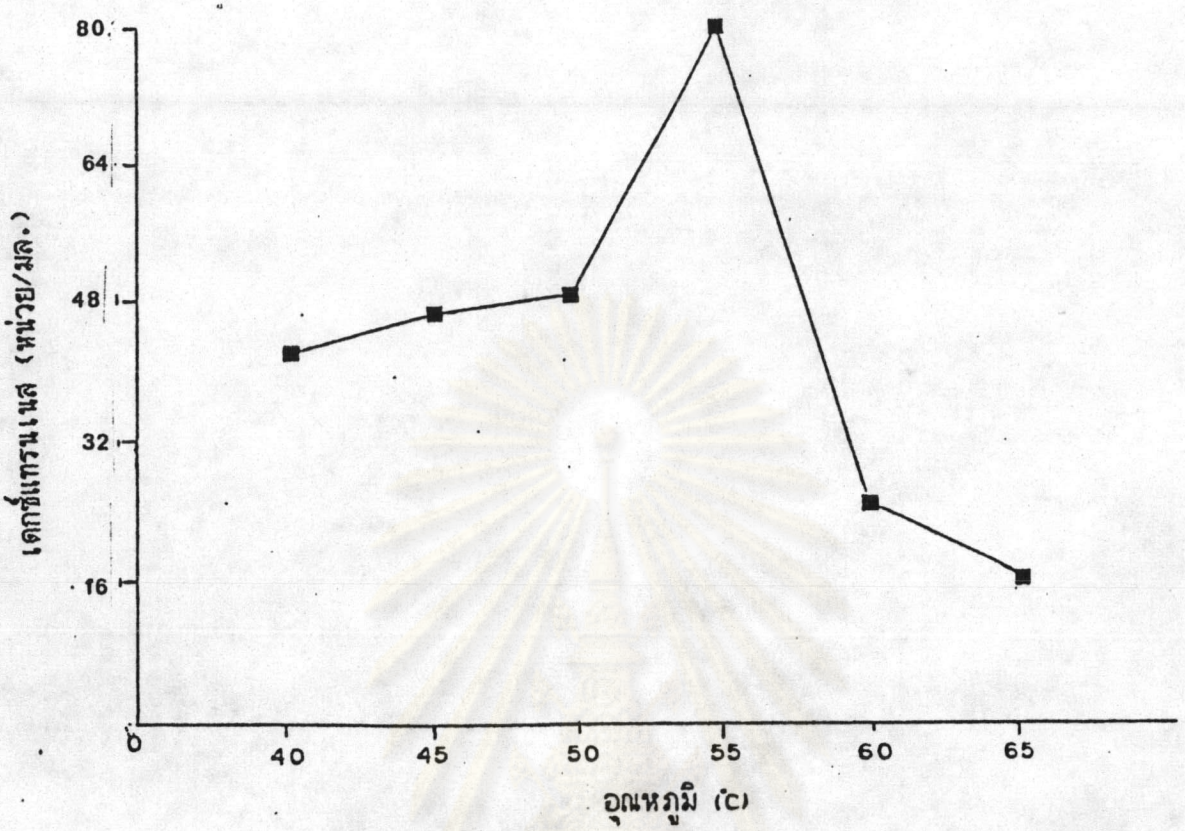
เนื่องจากการทดลองนี้ได้ทำในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้าง จึงจำเป็นต้องใช้บัฟเฟอร์หลายชนิด เพื่อให้ครอบคลุมช่วงความเป็นกรดด่างนี้ได้โดยใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ในช่วง pH 4.0-5.5 ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง pH 4-7 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง pH 5.5-8.0

จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสนี้มีแอคติวิตีดีอยู่ในช่วง pH 4.5-6.0 โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดด่าง 5.0-5.5 ดังผลแสดงในรูปที่ 19

1.3) ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์

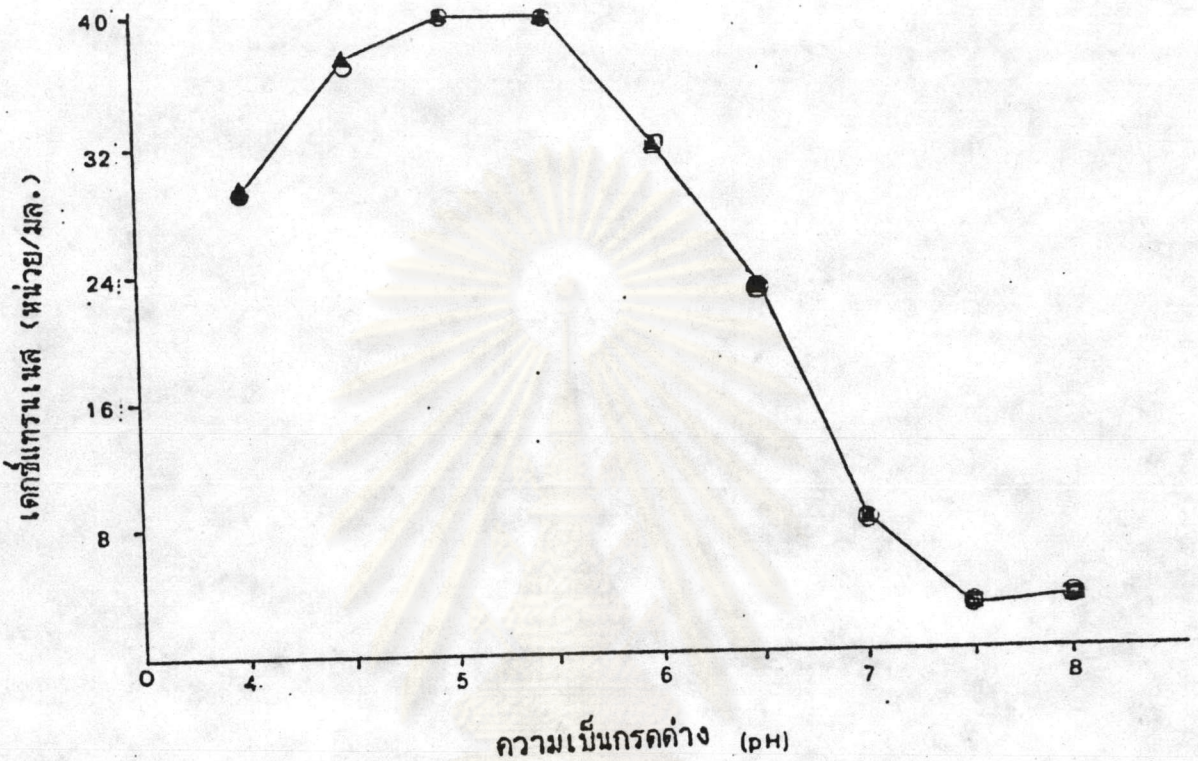
จากผลที่ได้ในข้อ 1.2 ซึ่งพบว่า ช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม คือ ช่วง 5.0-5.5 จึงได้นำมาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ โดยใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ที่ปรับความเป็นกรดด่างไว้ที่ pH 5.5 และแปรเปลี่ยนความเข้มข้นต่าง ๆ ของอะซีเตทบัฟเฟอร์ สำหรับการทดลอง

พบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจะทำงานได้ดีในช่วงความเข้มข้นอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0-0.3 โมลาร์ และเมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นเอนไซม์ไปเป็น 0.45 โมลาร์ เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีไปโดยสิ้นเชิง ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 บ่มเอนไซม์แล้วตรวจหาแอคติวิตีดังวิธีในบทที่ 2 ข้อ 5 โดยบ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆดังรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

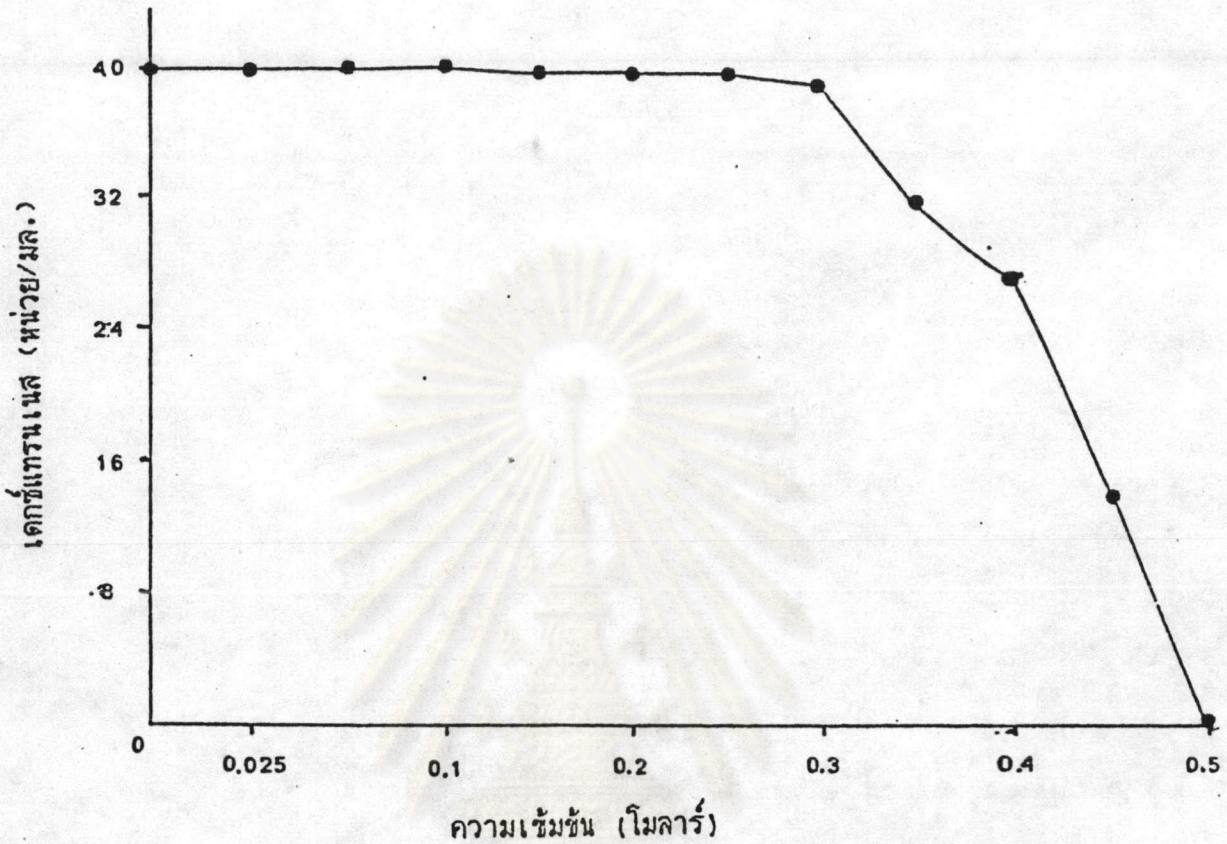


รูปที่ 19 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 โดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆดังระบุในรูป แล้วตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังวิธีในบทที่ 2 ข้อ 5

▲ อะซีเตท บัฟเฟอร์ (4.0-5.5)

■ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (5.5-8.0)

● ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (4.0-7.0)



รูปที่ 20 ผลของความเข้มข้น อะซีเตทบัฟเฟอร์ ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 โดยบ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวในบทที่ 2ข้อ 5 โดยผันแปรความเข้มข้นอะซีเตทบัฟเฟอร์ตั้งแต่ 0-0.5 โมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) ผลของชนิด, ปริมาณของเกลือแร่ และสารบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ผลการทดลองในตารางที่ 9 แสดงว่า ทั้งเมอคิวริคคลอไรด์และซิงค์คลอไรด์เป็นสารที่มีผลอย่างมากต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วนสารที่มีผลปานกลางในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ $CaCO_3$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $FeCl_3$ รวมทั้ง $MgSO_4$ ในขณะที่ NaCl และKCl เป็นเกลือแร่ที่ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วนสารประกอบอินทรีย์บางชนิดที่ได้นำมาทดสอบนั้น p-chloromercurobenzoate เป็นสารที่มีผลปานกลางในการยับยั้งเอนไซม์ ในขณะที่ cysteine-HCl ตามรายงานของ Madhu และ Prabhu (40) นั้นเป็นสารที่มีผลอย่างมากในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่า cysteine-HCl ไม่ปรากฏผลกระตุ้นดังกล่าว นอกจากนี้ SDS และ EDTA ก็ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

3) ความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

3.1) ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

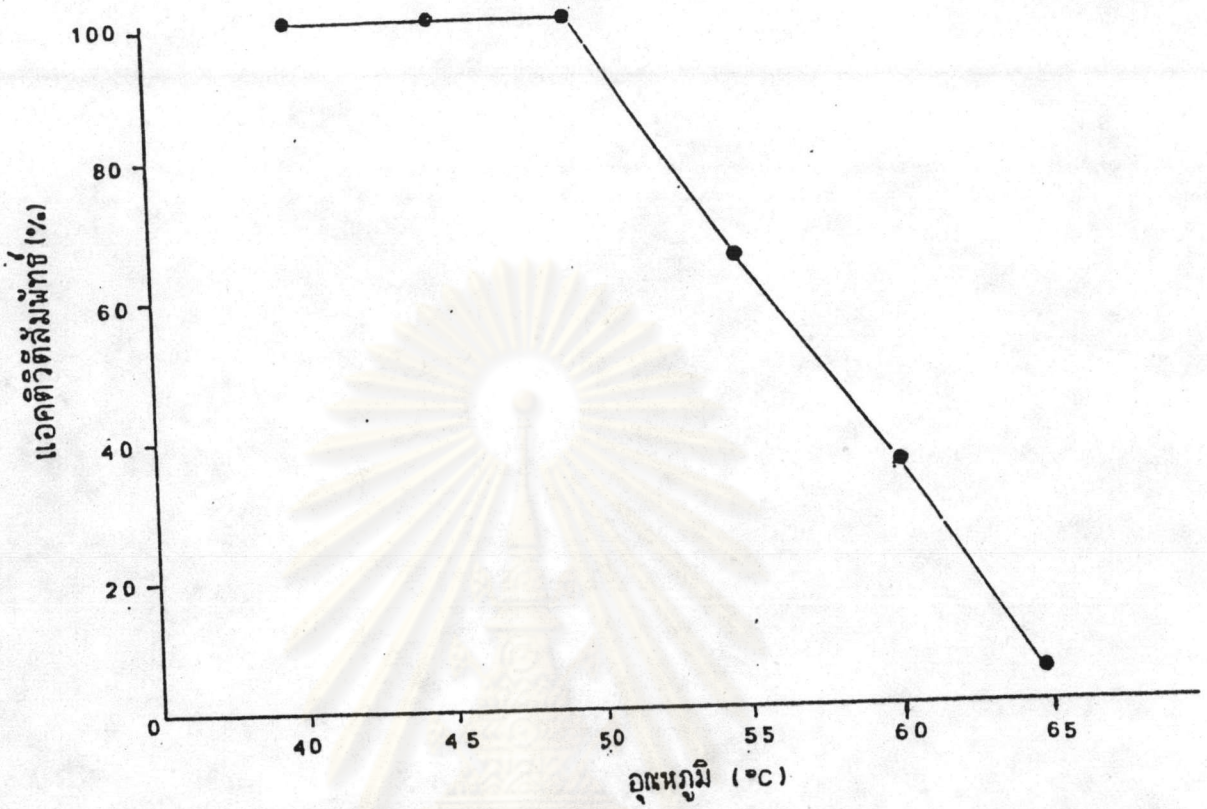
จากการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิโดยการบ่มเอนไซม์ใน 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 21 เป็นเวลานาน 0-120 นาที พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสได้นานกว่า 30 นาที แต่หากอุณหภูมิสูงกว่านี้ ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีไป 50% ภายในเวลา 15 นาที สำหรับกรณีการเก็บในอุณหภูมิห้อง เอนไซม์จะยังคงความเสถียรไว้ได้นานกว่า 24 ชม.

3.2) ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง

เมื่อตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่างด้วย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ ซิเตรท บัฟเฟอร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่างในช่วง 3-8 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 0-120 นาที พบว่าเอนไซม์จะคงความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างได้ดี ในช่วง 5.0-8.0 ดังแสดงในรูปที่ 22 แต่หากความเป็นกรดด่างสูงหรือต่ำกว่านี้แล้วจะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไปอย่างรวดเร็ว

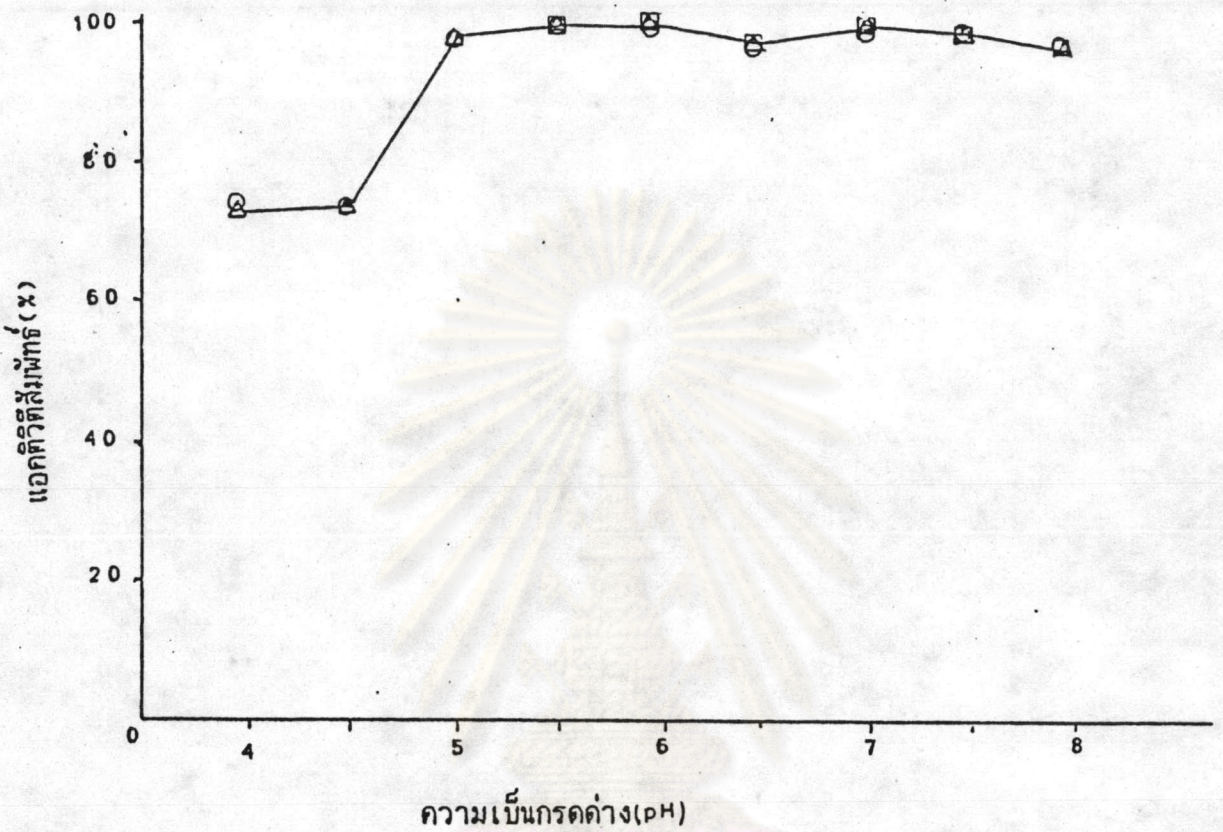
ตารางที่ 9 ผลของชนิดและปริมาณเกลือแร่และสารบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61
การหาแอคติวิตีสัมพัทธ์ กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ดิบที่นำมาตรวจสอบโดยไม่เติมสารใดเป็น 100% การตรวจหาแอคติวิตีทำที่สภาวะมาตรฐานดังเช่นที่บรรยายไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5

ชนิดของเกลือแร่	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)				
	15 mM	10 mM	5 mM	1.5 mM	0.75 mM
CYSTEINE	45.73	100.80	98.60		
CYSTEINE-HCl	100.00	100.00	100.00		
SDS	102.33	103.34	104.62	104.45	104.52
EDTA	69.74	92.10	89.80	101.50	111.35
pCMB	43.77	53.52	54.50		
$MgSO_4$	52.38	89.80	89.40	89.80	100.00
$CaCl_2$	55.16	75.00	88.70		
$FeCl_3$	7.72	16.22	19.11		
$FeSO_4$	0.00	33.24	46.18	50.44	65.00
$CuSO_4$	30.95	32.94	40.80		
$CoCl_2$	39.83	51.54	52.00		
$MnCl_2$	21.18	26.18	36.20		
$HgCl_2$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$CaCO_3$	27.78	31.35	44.84		
K_2HPO_4	12.40	16.00	27.10	64.77	98.20
KCl	93.20	95.00	99.60	99.80	99.80
NaCl	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
$ZnSO_4$	44.14	57.88	65.77		
$ZnCl_2$	7.88	7.88	15.32		



รูปที่ 21 ผลของความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 ต่ออุณหภูมิ โดยใช้วิธีทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 5 เป็นเวลา 30 นาที โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ผลของความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 ต่อความเป็นกรดด่าง โดยใช้วิธีทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 5 เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100%

△ อะซีเตท บัฟเฟอร์ (4.0-5.5)
□ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (5.5-8.0)
○ ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (4.0-7.0)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3) ความเสถียรต่อความเข้มข้นอะซีเตทบัฟเฟอร์

เมื่อตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นอะซีเตทบัฟเฟอร์ในช่วง 0-0.5 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 120 นาทีนั้น พบว่า เอนไซม์จะเสถียรต่อความเข้มข้นอะซีเตทบัฟเฟอร์ในช่วง 0-0.3 โมลาร์ หากความเข้มข้นอะซีเตทบัฟเฟอร์สูงกว่า 0.45 โมลาร์แล้ว จะมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์อย่างมาก ดังแสดงในรูปที่ 23

4) ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

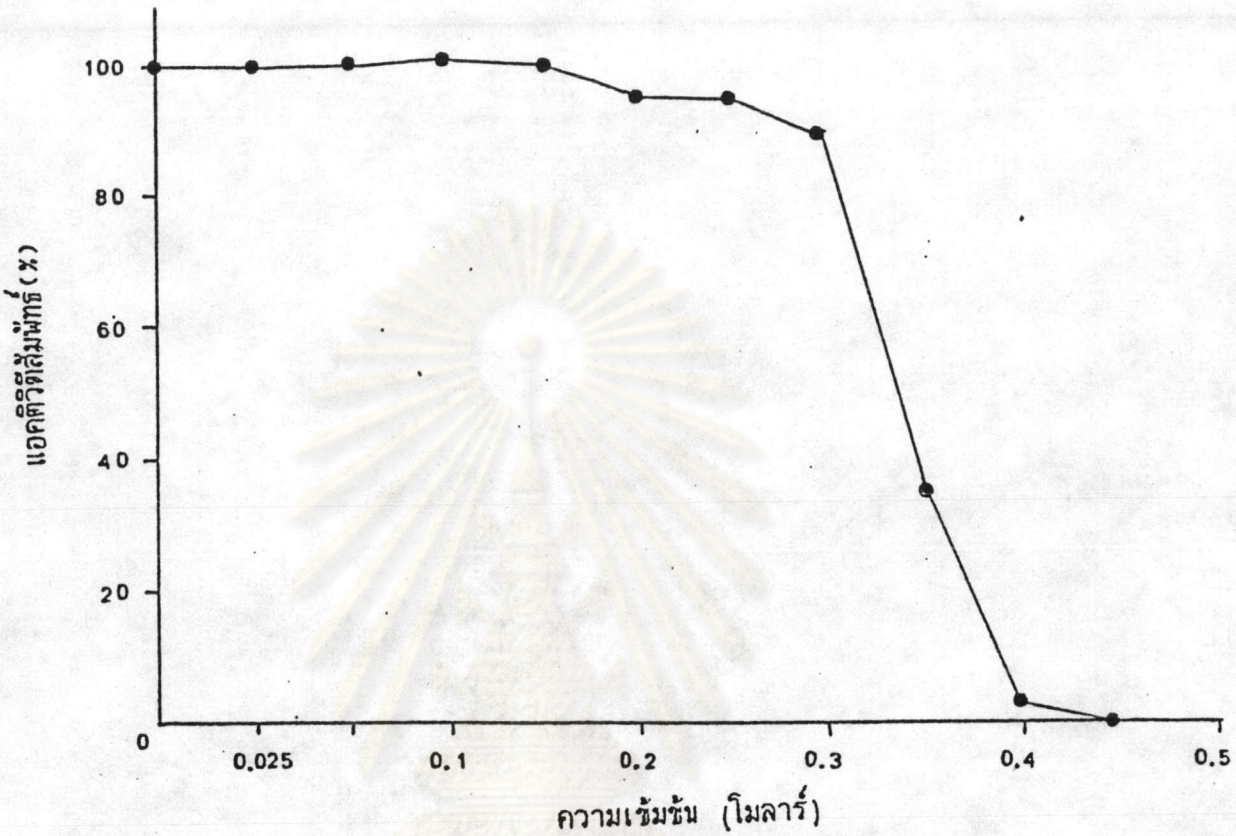
จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 พบว่ามีความจำเพาะต่อสารประกอบเดกซ์แทรน โดยจะไม่ทำการย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะชนิดอื่น ส่วนความจำเพาะต่อความขนาดของเดกซ์แทรนที่ได้ตรวจสอบ พบว่า เอนไซม์สามารถย่อยเดกซ์แทรนขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ดี ในขณะที่การย่อยเดกซ์แทรนคุณภาพอุตสาหกรรมนั้นจะย่อยสลายได้ช้ากว่า นอกจากนี้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสยังสามารถสลายสลายสารประกอบเดกซ์แทรนที่อยู่ในรูปแบบไม่ละลายน้ำ เช่น Sephadex G-100 ได้ดีอีกด้วย ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 10

5) การเตรียมเอนไซม์เข้มข้น

เมื่อเปรียบเทียบผลความเสถียรของเอนไซม์ต่อกรรมวิธีการทำเอนไซม์เข้มข้นโดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และวิธีระเหิดแห้ง พบว่า การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถจะตกตะกอนเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้หมด เมื่อใช้ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2 SO_4$ ในสารละลายเอนไซม์เป็น 45% ส่วนการเตรียมเอนไซม์เข้มข้นด้วยวิธีการระเหิดแห้งนั้น เมื่อใช้เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) ไม่ปรากฏการลดต่ำลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่ประการใด แต่หากเอนไซม์ที่ผ่านกรรมวิธีการทำให้เข้มข้นด้วยวิธีตกตะกอนด้วย แอมโนเนียมซัลเฟตมาก่อนแล้วจะทำให้แอคติวิตีลดลงไปประมาณ 30% ดังผลการแสดงในตารางที่ 11

6) การหาค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เมื่อใช้เอนไซม์ที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้น 40 หน่วยต่อมล. โดยใช้เอนไซม์ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว มาบ่มปฏิกิริยา



รูปที่ 23 ผลของความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 ต่อความเข้มข้นบัฟเฟอร์ โดยใช้วิธีทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 5 เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงความจำเพาะต่อสารประกอบน้ำตาลของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เมื่อบ่มปฏิกิริยา ในสภาวะมาตรฐานแล้วทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

สารประกอบน้ำตาล	ชนิดของพันธะ	การย่อยสลาย
Dextran T-2000	α-1,6	+
Dextran (mw.3-50x10^5)	α-1,6	+
Dextran T-10	α-1,6	+
Dextran T-40	α-1,6	+
Dextran (mw. 20,000)	α-1,6	+
Dextran (mw. 153,000)	α-1,6	+
Dextran จาก Lab	α-1,6	+
Sephadex G-100	α-1,6	+
Dextrin	α-1,4	-
soluble starch	α-1,4	-
α-cellulose	β-1,4	-
Carboxyl Methyl Cellulose	β-1,4	-

หมายเหตุ (+ หมายถึง เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลได้
- หมายถึง เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสารประกอบน้ำตาลได้)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลเปรียบเทียบวิธีการเตรียมเอนไซม์เข้มข้น

แหล่งของเอนไซม์	% แอคติวิตี	
	ก่อนระเหิดแห้ง	หลังระเหิดแห้ง
เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ	100	100
เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอน - ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว	100	70.97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระหว่างเอนไซม์กับเดกซ์แทรน T-2000 ที่ความเข้มข้น 0-5.0% ในสภาวะการทดลองมาตรฐาน แล้วนำผลที่ได้มาเขียนให้อยู่ในรูปไลน์วีเลอร์-เบิร์ก (Linerveaver-Burk Plot) จะได้ค่า Km เฉลี่ยเท่ากับ 1.6×10^{-6} โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 24

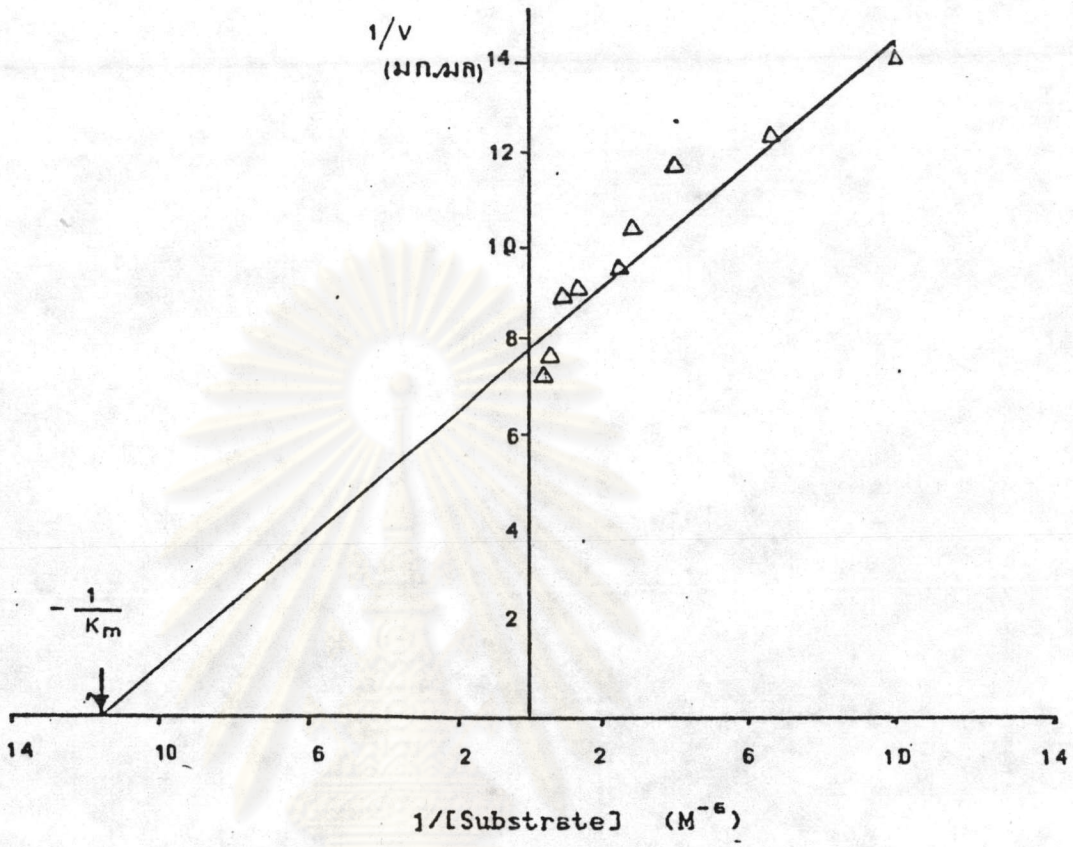
7) ผลการย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลด้วยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากผลการทดลองในตารางที่ 10 แสดงว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,6 กลูแคน เท่านั้นโดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบน้ำตาลกลูโคสที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะชนิดอื่น ๆ เช่นแป้งหรือ เซลลูโลส เป็นต้น

8) การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน

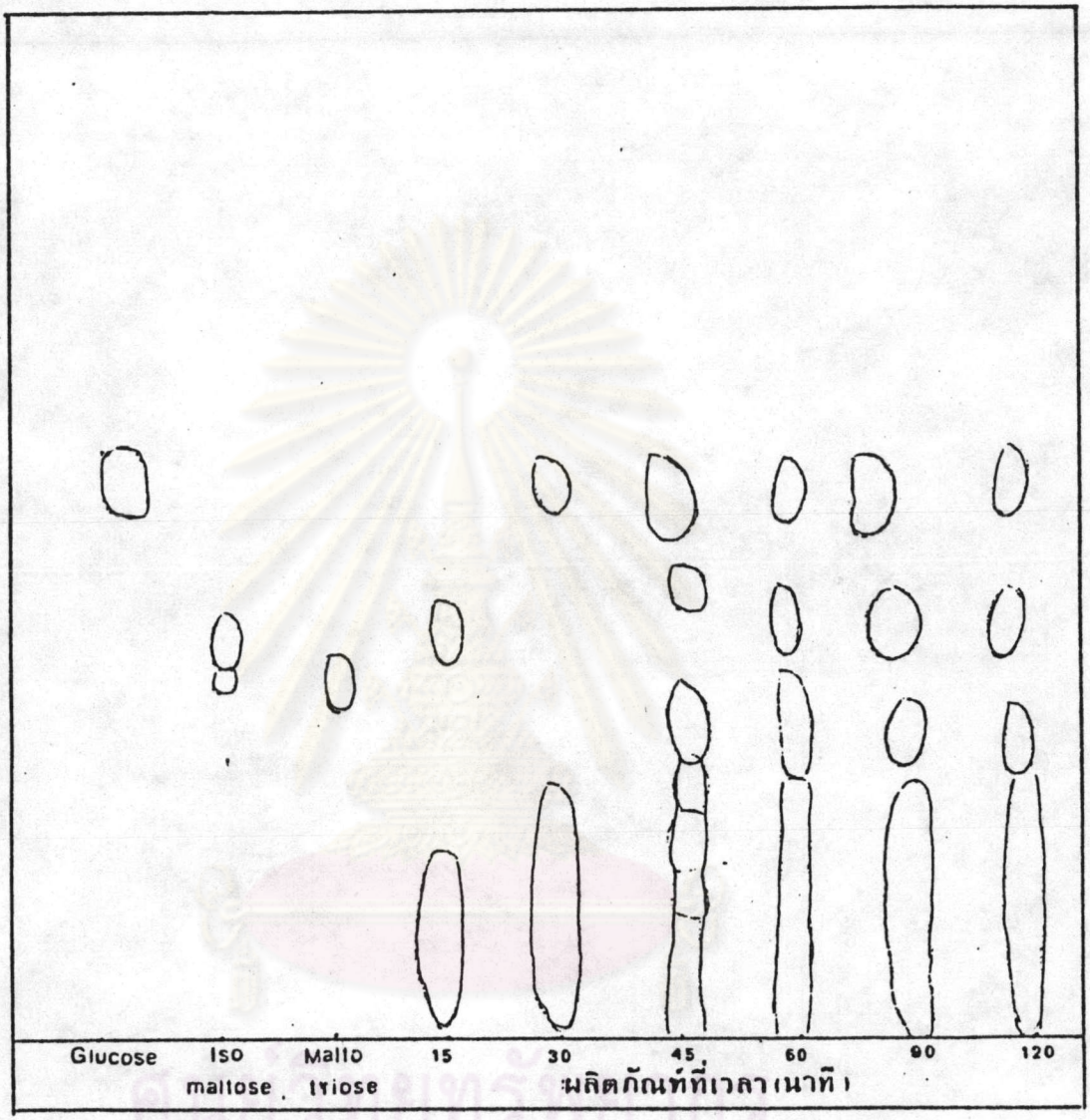
จากผลการทดลอง พบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสามารถย่อยสลายสายเดกซ์แทรนให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลกลูโคสหลายชนิด ทั้งที่เป็นกลูโคสเอง และที่เป็นโอลิโกเมอร์ของกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 25 ดังนั้น เอนไซม์เดกซ์แดรนเนสจากเชื้อ Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 จึงมีการทำงานเป็นแบบ endo.-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 แสดงผลของการหาค่า Km โดยวิธีของ Lineweaver-Burk ทำการบ่มเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 42 หน่วย/มล. ที่สภาวะมาตรฐานแล้วตรวจหาแอคติวิตี โดยผันแปรความเข้มข้นเดกซ์แทรนตั้งแต่ 0-5.0%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 แสดงผลผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000ด้วยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมาตรฐาน เป็นเวลา 15-120 นาที