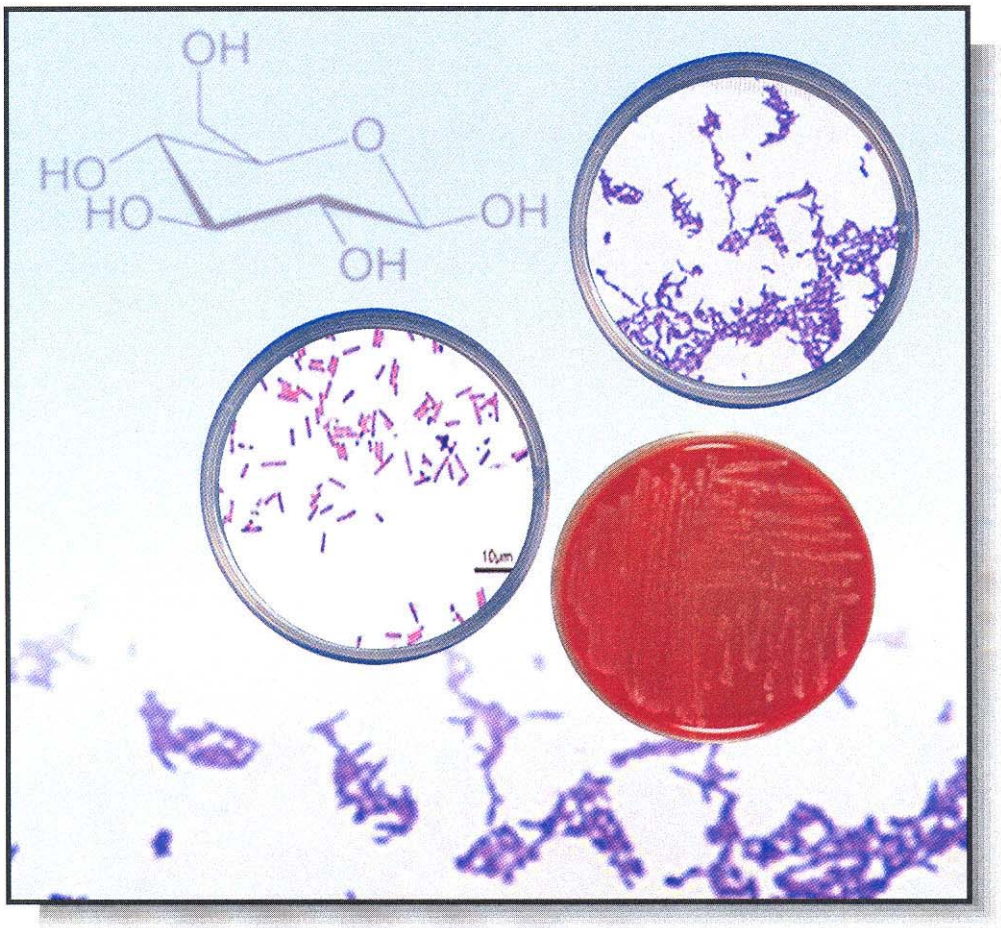
วว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 52-06 / ย. 5 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การวิจัยและพัฒนาการผลิต แอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล เพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 52- 06
การวิจัยและพัฒนาการผลิตแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล
เพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย

โครงการย่อยที่ 5
การวิจัยและพัฒนาการผลิตแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล
เพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การวิจัยและพัฒนาการผลิตแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล
เพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย

โดย

ศิริธรรม สิงห์โต **ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์**
สยาม สินสวัสดิ์ **ประธาน โพธิสวัสดิ์**
อัจฉรา ไชยองค์การ **เปรมสุดา สมาน**

บรรณาธิการ วว., กรุงเทพฯ 2555
ลิขิต หาญจางสิทธิ์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
พิสุทธิ์ พลับสวาท

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นายยงวุฒิ เสาวพฤกษ์)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลเพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและสำนักงบประมาณ โดยได้ดำเนินการตั้งแต่ปีงบประมาณ 2553 – 2554 เป็นระยะเวลา 2 ปี ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณในการสนับสนุนจากหน่วยงานดังกล่าว รวมถึงสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่เป็นหน่วยงานต้นสังกัดของคณะผู้วิจัย นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่งจากเกษตรกรในทุกพื้นที่ ทุกจังหวัด รวมถึงเจ้าหน้าที่ของรัฐทั้งส่วนภูมิภาค และส่วนท้องถิ่นที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานภาคสนาม. ในการนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ ผู้บังคับบัญชาที่เป็นทั้งที่ปรึกษาและผู้ให้ความสนับสนุน ให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี รวมถึงนักวิชาการ พนักงานปฏิบัติการ ลูกจ้าง วว. และนักศึกษาฝึกงานจากหลายสถาบันอุดมศึกษา ที่มีส่วนร่วมสนับสนุนให้เกิดความสำเร็จในการดำเนินงาน.

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจอันสำคัญอย่างยิ่งที่ทำให้คณะผู้วิจัยสามารถปฏิบัติงานได้อย่างไม่เหน็ดเหนื่อยหรือย่อท้อต่ออุปสรรคต่างๆ ตลอดระยะเวลาการดำเนินงานที่ผ่านมา ซึ่งนับว่าเป็นปัจจัยหลักประการหนึ่งในการทำงานของนักวิจัยทุกคน.

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ง
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. ข้อมูลพื้นฐาน	7
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	38
4. ผลการวิจัย	67
5. สรุปและวิจารณ์ผล	79
6. ข้อเสนอแนะ	82
7. เอกสารอ้างอิง	83
8. ภาคผนวก	84
- ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	84
- ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	86
- ภาคผนวก ค สารเคมี	89
- ภาคผนวก ง วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	99
- ภาคผนวก จ วิธีการย้อมแกรม	117
- ภาคผนวก ฉ ข้อมูล OD และกราฟมาตรฐาน	120
- ภาคผนวก ช ตารางผลการทดลอง	125

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ผลของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อพลังงานกระตุ้นและอัตราเร็วของปฏิกิริยา 10

ตารางที่ 2.2 CGTase จากแบคทีเรียต่างชนิด 14

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นโดย CGTase และ α – glucosidase 23

ตารางที่ 2.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α – amylase 24

ตารางที่ 2.5 การจำแนกทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส 25

ตารางที่ 2.6 การจำแนกทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *Bacillus circulans* 27

ตารางที่ 2.7 ปริมาณ amylose และ ปริมาณ amylopectin ที่พบในแป้งแต่ละชนิด 31

ตารางที่ 2.8 เอนไซม์ : แหล่งของจุลินทรีย์และคุณสมบัติบางประการ 35

ตารางที่ 3.1 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของ α-glucosyl glycerol 66

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase ในการสร้าง Cyclodextrin 74

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ α-glucosyl glycerol 78

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	การเปลี่ยนแปลงพลังงานในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนซับสเตรต A และ B เป็น ผลิตภัณฑ์ AB	11
รูปที่ 2.2	การจับระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต	12
รูปที่ 2.3	ปฏิกิริยาที่เร่งโดย CGTase แต่ละวงกลมแทนหน่วยกลูโคส วงกลมโปร่ง คือ น้ำตาลที่ปลายรีดิวซ์	15
รูปที่ 2.4	การเปรียบเทียบปริมาณ O - α - D - glucosyl glycerol (GlcGL)	21
รูปที่ 2.5	ผลกระทบของระดับความเข้มข้น glycerol ในกระบวนการ transglycosylation	22
รูปที่ 2.6	เชื้อแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส	25
รูปที่ 2.7	เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans*	26
รูปที่ 2.8	การแสดงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	28
รูปที่ 2.9	การต่อของกลูโคสใน amylose	29
รูปที่ 2.10	การต่อของกลูโคสใน amylopectin	30
รูปที่ 2.11	โครงสร้างของ glucose	32
รูปที่ 2.12	โครงสร้างอะไมโลส	33
รูปที่ 2.13	โครงสร้างอะไมโลเพคติน	33
รูปที่ 2.14	การแสดงปฏิกิริยาการเกิดแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล	36
รูปที่ 3.1	สรุปขั้นตอนการทดลอง	41
รูปที่ 3.2	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	41
รูปที่ 3.3	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS	42
รูปที่ 3.4	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB	43
รูปที่ 3.5	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM	44
รูปที่ 3.6	สรุปขั้นตอนการเตรียม Starter	45
รูปที่ 3.7	การเตรียม Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS	46
รูปที่ 3.8	การเตรียม Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB	48
รูปที่ 3.9	การเตรียม Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM	50
รูปที่ 3.10	สรุปขั้นตอนการถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อ	51

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 3.11	การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS	52
รูปที่ 3.12	การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB	53
รูปที่ 3.13	การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM	54
รูปที่ 3.14	สรุปขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง	55
รูปที่ 3.15	การวัดค่าการเจริญเติบโต	56
รูปที่ 3.16	การวัดค่าการเจริญเติบโตของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS	57
รูปที่ 3.17	สูตรการคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	58
รูปที่ 3.18	การวัดปริมาณเอนไซม์และค่าความเป็นกรด – เบส (pH)	58
รูปที่ 3.19	การวัดปริมาณ CGTase และค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS	59
รูปที่ 3.20	สรุปกระบวนการผลิตเอนไซม์ CGTase	62
รูปที่ 3.21	การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อที่ถูกคัดเลือก 1,400 มล.	63
รูปที่ 4.1	การเจริญของ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	67
รูปที่ 4.2	การเจริญของ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	68
รูปที่ 4.3	ปริมาณ CGTase ของ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	69
รูปที่ 4.4	ปริมาณ CG Tase ของ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	70
รูปที่ 4.5	ค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	71

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.6	ค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	72
รูปที่ 4.7	ปริมาณ CGTase เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	73
รูปที่ 4.8	กราฟมาตรฐาน Cyclodextrin	74

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF ALPHA GLUCOSYL GLYCEROL PRODUCTION FOR SAFETY LOSING WEIGHT

Siritham Singhtho, Rachain Visutthipat, Sayam Sinsawad

Phathan Photisawat, Achara chaiongkarn and Premsuda Saman

ABSTRACT

This research and development was aimed at production of alpha glocosyl glycerol (AGG) which was formed between glycerol and glucose molecules using cyclodextrin glucanotransferrase (CGTase). AGG reaction with saliva amylase and sugar digestion in small intestine result in the lower efficiency of sugar digestion and absorption. As a consequence, the sugar level in blood reduces as well as less amount of excessive energy obtained by the body. This treatment is suitable for either over-weighted person or obesity patients. In addition, AGG can also be used for weight-controlled people.

In general, CGTase is used for low calorie sweetener production. In this study, medium cultivation conditions, temperature, and optimal time for CGTase production were investigated. Cultivations of *Bacillus circulans* TISTR 1923 and *Bacillus sp.* TISTR 908 at various conditions with three different types of media such as Horikoshi medium (HS); Nutrient Broth (NB) and Nutrient Broth Modified (NBM) were performed on temperature-controlled shaker at 30 and 37°C. The experimental results showed that Bacillus sp. TISTR 908 cultured with NBM at 37°C for 24 hrs produced the highest amount of CGTase of 0.87 unit/ml. These optimal cultivation conditions of Bacillus sp. TISTR 908 were applied for CGTase production for preliminary tests of AGG production which the amount of AGG produced could be determined from the amount of glycerol consumed in the reaction. As a result, the amount of 104.70 mg/ml of AGG was found.

การวิจัยและพัฒนาการผลิตแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล เพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย

ศิริธรรม สิงห์โต[1], ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์[1], สยาม สินสวัสดิ์[1]
ประธาน โพธิสวัสดิ์[1], อัจฉรา ไชยองค์การ[1] และ เปรมสุดา สมาน[1]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทำการวิจัยและพัฒนาการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล ซึ่งเกิดขึ้นจากการก่อพันธะระหว่างกลีเซอรอลกับน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ตริน กลูคาโนทรานส์เฟอเรส (CGTase) มีคุณสมบัติสามารถจับกับเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลาย และการย่อยน้ำตาลในลำไส้เล็ก ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยและดูดซึมน้ำตาลลดลง, ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ทำให้ร่างกายได้รับพลังงานส่วนเกินลดลง จึงเป็นผลดีต่อผู้ที่มีน้ำหนักเกินและผู้ป่วยโรคอ้วน, นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้กับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก.

เอนไซม์ CGTase ถูกใช้ในการผลิตสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus sp.* TISTR 908 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Horikoshi medium (HS); Nutrient Broth (NB) and Nutrient Broth Modified (NBM) ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า Bacillus sp. TISTR 908 ที่เพาะเลี้ยงด้วย Nutrient Broth Modified (NBM) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดที่ 0.87 หน่วย/มล. ซึ่งการเพาะเลี้ยง Bacillus sp. TISTR 908 ที่สภาวะดังกล่าวนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase เพื่อใช้ในการทดสอบเบื้องต้นสำหรับการผลิตสารให้ความหวานแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล โดยปริมาณสารให้ความหวานที่ผลิตได้นี้ คำนวณได้จากปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยา ซึ่งผลที่ได้พบว่ามีสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลอยู่ 104.70 มก./มล. โดยประมาณ.

---

[1] ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1. บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศผู้ผลิตน้ำตาลรายใหญ่เป็นอันดับ 5 ของโลก รองจากประเทศบราซิล อินเดีย สหภาพยุโรป จีน และสหรัฐอเมริกา ซึ่งในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำตาลได้มากถึง 7.58 ล้านตันต่อปี ซึ่งในจำนวนนี้ถูกใช้เพื่อบริโภคภายในประเทศมากถึง 1.92 ล้านตัน (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2548) คิดเป็นสัดส่วนการบริโภคน้ำตาล 29.5 กิโลกรัมต่อคนต่อปี แสดงให้เห็นว่าคนไทยส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารและเครื่องดื่มที่มีรสหวาน ส่งผลให้เกิดปัญหาสุขภาพเพิ่มมากขึ้นซึ่งเห็นได้จากจำนวนผู้ป่วยเบาหวานที่เข้ารับการรักษาในสถานพยาบาลของรัฐเพิ่มขึ้นจาก 179,946 คน ในปีพ.ศ. 2539 เป็น 643,522 คน ในปี พ.ศ. 2549 ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 463,576 คนในระยะเวลา 10 ปี (กรมควบคุมโรค, 2550). นอกจากนี้การบริโภคน้ำตาลในปริมาณเกินความต้องการของร่างกายยังส่งผลให้เกิดภาวะน้ำหนักเกินนำไปสู่โรคอ้วน จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่าปัจจุบันประชากรโลกประมาณ 1,000 ล้านคน มีภาวะน้ำหนักเกิน ซึ่ง 300 ล้านคน ในจำนวนนี้ป่วยเป็นโรคอ้วน และยังคาดการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2015 จะมีประชากร 1,500 ล้านคนที่มีภาวะน้ำหนักเกิน องค์การอนามัยโลกยังได้จัดอันดับประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิกที่มีคนภาวะน้ำหนักเกินต่อสัดส่วนประชากร พบว่าประเทศไทยถูกจัดอยู่ในอันดับที่ 5 รองจาก ออสเตรเลียม, มองโกเลีย, วานูอาตู และฮ่องกง และจากการสำรวจประชากรตั้งแต่อายุ 15 ปี ขึ้นไป เฉพาะเขตเมืองของประเทศไทยโดยสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข พบว่า คนไทยมีภาวะน้ำหนักเกินเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 25.5 ของประชากรทั้งประเทศในปี พ.ศ. 2547 เป็นร้อยละ 28.5 ในปี พ.ศ. 2549 จากความตระหนักถึงปัญหาสุขภาพดังที่กล่าวมา จึงได้มีการนำเอาสารให้ความหวานมาใช้ทดแทนน้ำตาล.

สารให้ความหวานที่นำมาใช้ทดแทนน้ำตาลนั้น มีจุดประสงค์เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับรสชาติหวานเช่นเดิมแต่ได้รับพลังงานลดลง ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดการเปลี่ยนรูปจากน้ำตาลเป็นไขมันสะสม รวมถึงการใช้กับผู้ป่วยบางโรค, ซึ่งสารให้ความหวานตัวอย่าง เช่น แอสปาแตม, ไซลิทอล, ซอร์บิทอล, สตีวิโอไซด์. บางชนิดผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี บางชนิดเป็นสารธรรมชาติที่ได้จากการสกัด โดยสารให้ความหวานต่างๆ เหล่านี้ต้องถูกทดสอบความปลอดภัยในการบริโภค การกำหนดปริมาณการบริโภคต่อวัน รวมถึงข้อจำกัดของผู้ป่วยบางโรคที่ไม่สามารถบริโภคได้. สารเหล่านี้ส่วนใหญ่มีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ป่วยเบาหวานที่มีรายได้น้อยและประชาชนทั่วไปไม่สามารถนำเอาสารให้ความหวานมาใช้ทดแทนน้ำ

ตาลในชีวิตประจำวันได้ รวมถึงภาคอุตสาหกรรมที่ผลิตอาหารและเครื่องดื่มที่จำเป็นต้องใช้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบ. ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาการผลิตสารให้ความหวานที่ใช้วัตถุดิบภายในประเทศและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมถึงมีความเป็นไปได้ในการผลิตเชิงพาณิชย์สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร และการนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลในชีวิตประจำวันของคนทั่วไป จึงเป็นแนวทางที่จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวนี้ได้.

จากที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาดังกล่าว จึงได้จัดทำโครงการ “การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลเพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย” โดยดำเนินการวิจัยและพัฒนาการผลิตสารแอลฟากลู โคซิลกลีเซอรอล, ซึ่งเกิดขึ้นจากการก่อพันธะระหว่างกลีเซอรอลกับน้ำตาลกลูโคส มีความหวานต่ำกว่าน้ำตาลทราย 50% ละลายน้ำได้ดี และไม่ให้พลังงาน ยิ่งไปกว่านั้นยังมีคุณสมบัติสามารถจับกับเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลาย และการย่อยน้ำตาลในลำไส้เล็ก ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยและดูดซึมน้ำตาลลดลง, ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง, ซึ่งเป็นผลดีอย่างยิ่งต่อผู้ป่วยเบาหวาน รวมถึง ทำให้ร่างกายได้รับพลังงานส่วนเกินลดลงจึงเป็นผลดีต่อผู้ที่มีน้ำหนักเกินและผู้ป่วยโรคอ้วน. นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้กับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก, ซึ่งเมื่อนำสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องดื่ม หรือนำไปใช้ทดแทนน้ำตาลในการปรุงแต่งรสชาติจะช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดีขึ้นได้อย่างปลอดภัย.

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตสารแอลฟากลู โคซิลกลีเซอรอล ซึ่งผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม สามารถนำไปใช้ทดแทนน้ำตาลเพื่อการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัย.

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- ศึกษาข้อมูลและเก็บตัวอย่าง ธัญพืชเศรษฐกิจในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย.
- วิจัยและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอ็นไซม์เพื่อใช้ผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลในระดับห้องปฏิบัติการ.
- วิจัยและพัฒนาการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล.
- ทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการย่อยแป้ง และน้ำตาลของสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล.

1.4 แนวทางการดำเนินการวิจัย

1) ศึกษาข้อมูล และเก็บตัวอย่างธัญพืชเศรษฐกิจในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย
   - ศึกษา และเก็บรวบรวมข้อมูลของธัญพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในพื้นที่ต่าง ๆ.
   - เก็บตัวอย่างธัญพืชเศรษฐกิจในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย.
   - วิเคราะห์และเปรียบเทียบการใช้ธัญพืชเศรษฐกิจชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นวัตถุดิบ.
   - ออกแบบกระบวนการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลโดยใช้ธัญพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูง.
2) วิจัยและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอ็นไซม์เพื่อใช้ผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลในระดับห้องปฏิบัติการ.
   - ศึกษากรรมวิธี และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์.
   - ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Cyclodextrin glucanotransferase.
   - ความสามารถในการสร้างสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล.
3) วิจัยและพัฒนาการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล.
   - ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล.
   - พัฒนากระบวนการผลิตด้วยเทคโนโลยีการหมัก.
4) ทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการย่อยแป้ง และน้ำตาล โดยแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล.
5) ติดตามประเมินผล จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์.

1.5 ระยะเวลาทำการวิจัย ระยะเวลา 2 ปี (ปีงบประมาณ 2553 – 2554)

กิจกรรม	ปี 2553				ปี 2554			
ไตรมาสที่	1	2	3	4	1	2	3	4
1. ศึกษาข้อมูล และเก็บตัวอย่างธัญพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในพื้นที่ต่าง ๆ	**X**	**X**						
2. วิจัยและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอ็นไซม์			**X**	**X**	**X**			
3. วิจัยและพัฒนาการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล โดยใช้ธัญพืชที่คัดเลือก และกลีเซอรอลจากการผลิตไบโอดีเซลเป็นวัตถุดิบหลัก				**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
4. ทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการย่อยแป้ง และน้ำตาล โดยแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล					**X**	**X**	**X**	
5. จัดทำรายงานความก้าวหน้า และรายงานฉบับสมบูรณ์	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับ

ผลผลิต (output)

1) กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอ็นไซม์เพื่อใช้ผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล อย่างน้อย 1 กระบวนการ.
2) กระบวนการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลในระดับห้องปฏิบัติการ อย่างน้อย 1 กระบวนการ.
3) รายงานฉบับสมบูรณ์ที่บรรจุด้วยข้อมูลและองค์ความรู้ของงานวิจัยทั้งหมด.

ผลลัพธ์ (outcome)

1) สารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล ช่วยลดประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต เป็นผลดีต่อสุขภาพสำหรับผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ที่ต้องการลดน้ำหนัก.
2) กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ และกระบวนการผลิตสารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล สามารถนำไปขยายการผลิตเป็นระดับโรงงานต้นแบบได้.
3) ผลิตภัณฑ์สารแอลฟากลู โคซิลกลีเซอรอล สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารและเครื่องดื่ม ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ของผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ.

1.7 นิยามคำศัพท์ / คำจำกัดความ

- Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase) คือ เอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย มีความสามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสร้างพันธะระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นน้ำตาลเชิงซ้อนที่มีโครงสร้างเป็นสายยาวหรือเป็นวง.
- α - glucosyl glycerol คือ น้ำตาลเชิงซ้อนที่มีโครงสร้างเป็นสาย เชื่อมต่อพันธะกันระหว่างกลีเซอรอล 1โมเลกุล กับน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปโดยมีเอนไซม์ CGTase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.

2. ข้อมูลพื้นฐาน

2.1 เอนไซม์

2.1.1 คำจำกัดความของเอนไซม์

สมบัติหลักสำคัญที่แสดงถึงการมีชีวิต คือ สามารถจำลองแบบตนเอง (self replicate) สามารถจัดหาและเปลี่ยนรูปพลังงาน (energy acquisition and transformation) ซึ่งรวมถึงการสามารถสังเคราะห์และสลายสารชีวโมเลกุลเพื่อดำเนินกิจกรรมของชีวิต ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด เช่น การเปลี่ยนรูปพลังงานแสงเป็นพลังงานอิเล็กตรอนในโมเลกุลของกลูโคสในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช การสังเคราะห์มหโมเลกุลทั้งหลาย อันได้แก่ ดีเอ็นเอ (DNA), อาร์เอ็นเอ (RNA), โปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, และการย่อยสารอาหารเพื่อให้เกิดพลังงาน เป็นต้น. กระบวนการเหล่านี้จะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยหลายร้อยปฏิกิริยาเคมี ซึ่งใช้ “เอนไซม์ (enzyme)” เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งนั้น. เอนไซม์จึงนับได้ว่าเป็นศูนย์กลางของกระบวนการชีวเคมีในเซลล์สิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปของสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ซึ่งเรียกว่า เมทาบอลิซึม (metabolism) และโดยการควบคุมเอนไซม์ สิ่งมีชีวิตสามารถปรับวิถีเมทาบอลิซึมให้เหมาะกับสภาวะหรือกิจกรรมที่แตกต่างกันทำให้ชีวิตดำรงอยู่ได้.

นอกจากเอนไซม์จะมีความสำคัญสำหรับเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยการเร่งปฏิกิริยาในเซลล์หรือในสิ่งมีชีวิตดังกล่าวแล้ว มนุษย์ยังได้รับประโยชน์อย่างยิ่งยวดจากการที่เอนไซม์สามารถทำงานได้นอกเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งมีสภาวะบางประการคล้ายกับสภาวะในเซลล์ ตัวอย่างเช่น การบ่มแป้งและเอนไซม์ย่อยแป้งในสภาวะเหมาะสม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาดต่างๆ รวมถึงน้ำตาลมอลโทส, ซูโครส และกลูโคส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากมายหลายประเภท, การเติมเอนไซม์ย่อยสิ่งสกปรกทำให้ผลิตภัณฑ์สารซักฟอกมีคุณภาพดีขึ้น, การตรึงเอนไซม์ตรวจวัดกลูโคสบนวัสดุสังเคราะห์ทำให้เราสามารถตรวจสอบปริมาณกลูโคสในเลือดได้ ตัวอย่างเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตของมนุษย์.

เอนไซม์ คือ ชีวโมเลกุลที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบชีวภาพ สามารถเปลี่ยนแปลงซับสเทรตให้เป็นผลิตภัณฑ์ในสภาวะที่ไม่รุนแรงโดยปริมาณเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง, เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนลักษณะก้อนกลม (globular proteins) ผลิตจากเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยการแสดงออกของยีน(gene) ที่กำหนดรหัสของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยเอนไซม์มีลักษณะเด่นซึ่งตัวเร่งสังเคราะห์

หรือตัวเร่งอนินทรีย์ไม่มี คือ มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูง, เอนไซม์บางชนิดทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้นหลายล้านเท่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเทรตสูง เอนไซม์ถูกควบคุมการทำงานให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ และเอนไซม์ทำงานในสภาวะที่ไม่รุนแรง.

เอนไซม์ส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีน ในปี ค.ศ.1993 มีการค้นพบว่าโมเลกุลของอาร์เอ็นเอบางชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เช่น ปฏิกิริยาการตัดต่อเบสบางส่วนบน mRNA ซึ่งเรียกว่า การตัดตัวเอง (self-splicing) ทำให้เกิดโมเลกุลของอาร์เอ็นเอที่พร้อมทำหน้าที่ (mature RNA) ซึ่งเป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงว่า อาร์เอ็นเอบางชนิดก็สามารถทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ได้ จึงเรียกอาร์เอ็นเอกลุ่มนี้ว่า ไรโบไซม์ (ribozyme).

2.1.2 ประวัติการค้นพบเอนไซม์

มีหลักฐานว่าผู้ค้นพบการทำงานโดยเอนไซม์เป็นคนแรก คือ นักวิทยาศาสตร์ชาวอิตาลีในปี ค.ศ. 1783 ชื่อ Spallanzani โดยรายงานว่า น้ำย่อยจากกระเพาะอาหารของนกสามารถย่อยเนื้อสัตว์นอกเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ.1836 Schwan ได้ตั้งชื่อสารจากน้ำย่อยนี้ว่า เพปซิน (pepsin) ในช่วงต้นคริสต์ศตวรรษที่ 18 มีผู้ศึกษาการทำงานโดยเอนไซม์อีกหลายชนิดโดยยังไม่รู้จักธรรมชาติของสารดังกล่าว ยกตัวอย่างเช่น การสังเกตพบฟองอากาศในเลือดเมื่อเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (การทำงานของเอนไซม์แคทาเลส, catalase) และการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยสารในข้าวบาร์เลย์ (การทำงานของเอนไซม์ไดเอสเทส, diastase).

คำว่า “เอนไซม์” ถูกบัญญัติขึ้นในปี ค.ศ.1876 โดย W.F. Kuhne ชาวเยอรมัน เอนไซม์มาจากภาษากรีก หมายถึง “ในยีสต์” การตั้งชื่อดังกล่าวเนื่องจากมีผู้ศึกษาเรื่องการหมักของยีสต์กันมากในช่วงนั้น โดยเฉพาะ Liebig และ Pasteur ในปี ค.ศ.1857, ซึ่งเชื่อว่า การหมักจะเกิดได้ในเซลล์ยีสต์เท่านั้น แต่ต่อมาในปี ค.ศ. 1897 Buchner พบว่า การผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำตาลเกิดขึ้นได้ในสภาวะปลอดเซลล์ โดยใช้สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ การค้นพบเหล่านี้เป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ทำงานนอกเซลล์ได้.

Fischer (1894) พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะและมีธรรมชาติเป็นโปรตีน ในปี ค.ศ. 1926 J.B. Sumner เป็นผู้เสนอว่า เอนไซม์ คือ โปรตีนอย่างง่ายโดยการสกัดและตกผลึกเอนไซม์ยูเรเอส (urease) จากถั่วแขก ผลงานของ Northrop และ Kunitz เกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดโดยเฉพาะเพปซิน ยืนยันว่าเอนไซม์เป็นโปรตีน, เอนไซม์ตัวแรกที่มีการศึกษาลำดับ. กรดอะมิโน

และโครงสร้างสามมิติโดยการศึกษาผลึกด้วยรังสีเอกซ์ในช่วงปี ค.ศ. 1960-1966 คือ ไลโซไซม์ (lysozyme) จากไข่ขาวของไก่ การค้นพบเอนไซม์เป็นงานที่ท้าทายนักวิทยาศาสตร์เสมอมา ในปี ค.ศ. 2003 มีทะเบียนรายชื่อเอนไซม์จำนวนกว่า 4,000 ชนิด รวบรวมไว้โดยสมาพันธ์ชีวเคมีนานาชาติ (International Union of Biochemistry).

2.1.3 ความสำคัญของเอนไซม์ในการเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ

เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ซึ่งลักษณะนี้เองที่ทำให้เอนไซม์เหมาะที่จะเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ, เนื่องจากโปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีการเรียงลำดับ กรดอะมิโนที่แตกต่างได้มากมายและมีความหลากหลายของกลุ่มฟังก์ชัน, โปรตีนต่างชนิดสามารถจับอย่างจำเพาะและเกิดอันตรกิริยากับสารซับสเตรตต่างประเภทได้, จึงทำให้เกิดเอนไซม์หลากหลายชนิดซึ่งเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ กัน ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงหลักการที่อธิบายว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้อย่างไรและเหตุใดจึงมีความสำคัญในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.

2.1.3.1 เอนไซม์เพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยการลดพลังงานกระตุ้น

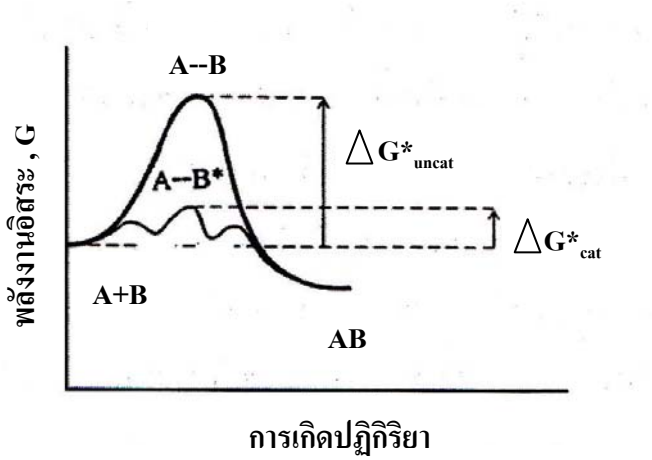
ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นถึง 10^5-10^{17} เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่เกิดโดยไม่มีตัวเร่งหรือเกิดโดยตัวเร่งอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์แคทาเลส เปลี่ยนซับสเทรต H_2O_2 ให้เป็น H_2O และ O_2 ได้เร็วขึ้น 3.5×10^8 เท่า และ 1.7×10^5 เท่าของปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่งและปฏิกิริยาที่ใช้ I^- เป็นตัวเร่งตามลำดับ. โดยเอนไซม์สามารถลดพลังงานกระตุ้น ซึ่งก็คือพลังงานที่ใช้ในการเปลี่ยนซับสเทรตให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้ถึง 3 เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่ง (ดังตารางที่ 2.1).

ตารางที่ 2.1 ผลของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อพลังงานกระตุ้นและอัตราเร็วของปฏิกิริยา

ซับสเทรต	ตัวเร่ง	พลังงานกระตุ้น (Ea) (kcal/mol)	อัตราเร็วของปฏิกิริยา เมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา 1 โมลาร์ ที่ 25 °ซ.
H_2O_2	ไม่มี	18.0	1.00
	I^-	13.5	2.07×10^3
	แคทาเลส	6.4	3.47×10^8
ซูโครส	H^+	25.6	1.00
	อินเวอร์เทส	11.0	5.58×10^{10}
ยูเรีย	H^+	24.5	1.00
	ยูรีเอส	8.7	4.25×10^{11}

ที่มา : ดัดแปลงจาก Whitaker, 2003

การเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาเกิดจากการที่เอนไซม์สามารถลดพลังงานกระตุ้นของสารตัวกลางที่เกิดในสถานะแทรนซิชัน (transition state intermediate) ในระหว่างปฏิกิริยาได้ โดยทฤษฎีของสถานะแทรนซิชัน กล่าวว่า เมื่อซับสเทรต A ชนกับ B จะเกิดสถานะแทรนซิชัน A--B ซึ่งมีพลังงานที่เกิดจากโมเลกุลชนกัน เรียกว่า พลังงานกระตุ้น (ΔG^*) (ภาพที่ 2 - 1) แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนสถานะ แทรนซิชันเป็นผลิตภัณฑ์ AB ในกรณีที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (A--B*) เกิดได้เร็วกว่ากรณีที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (A--B). เนื่องจากความแตกต่างของพลังงานอิสระระหว่างสถานะ แทรนซิชันกับซับสเทรตมีค่าน้อยกว่าโดยที่พลังงานสุทธิของปฏิกิริยา (ความแตกต่างระหว่างพลังงานอิสระของซับสเทรตกับผลิตภัณฑ์) ไม่แตกต่างกัน.



รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงพลังงานในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนซับสเทรต A และ B เป็นผลิตภัณฑ์ AB เมื่อไม่มี ( ) และมี (--)เอนไซม์เป็นตัวเร่ง.

ที่มา : Nelson & Cox, 2000.

พลังงานกระตุ้นขึ้นกับอุณหภูมิและธรรมชาติของตัวกระตุ้นดังสมการ

$$n'/n = -Ea/RT$$

ในเมื่อ n' = จำนวนโมเลกุลที่มีพลังงานสะสมเท่ากับหรือมากกว่าพลังงานกระตุ้นต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร

n = จำนวนโมเลกุลทั้งหมดต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร

Ea = พลังงานกระตุ้น

R = ค่าคงที่ของแก๊ส

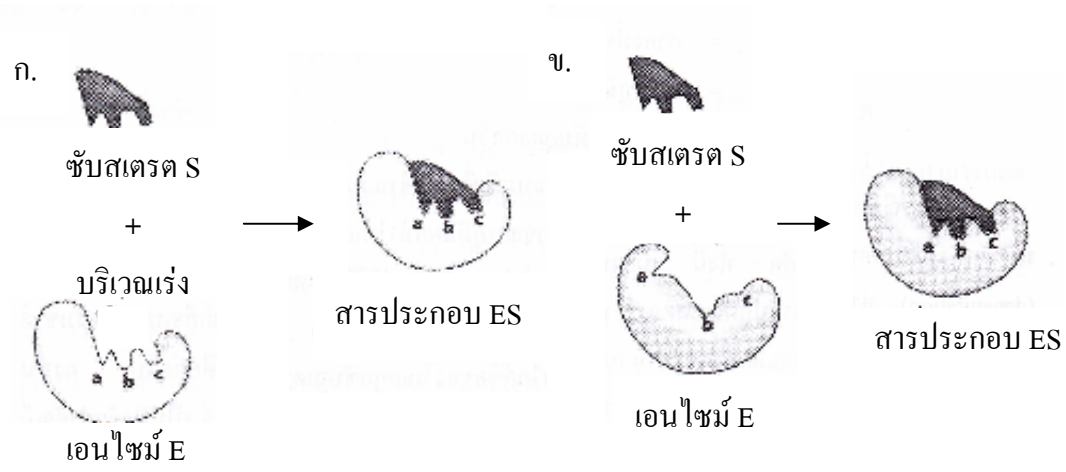
T = อุณหภูมิในหน่วยเคลวิน

ในกรณีของเอนไซม์ทั่วไป การเพิ่มอุณหภูมิเพื่อเพิ่มจำนวนโมเลกุลที่มีพลังงานสะสมมากมักทำได้ในขอบเขตจำกัด ทั้งนี้ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติทำให้การเร่งปฏิกิริยาลดลง หรือไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีกต่อไป. ดังนั้นธรรมชาติของตัวกระตุ้นซึ่งจะมีผลทำให้จำนวนโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น, จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เอนไซม์ลดพลังงานกระตุ้นได้ สมบัติความใกล้ชิดของโมเลกุลซับสเทรตโดยเอนไซม์เป็นตัวนำให้มาจับกับบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ความจำเพาะและแรงยึดระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรต, การชักนำเอนไซม์ปรับตำแหน่งและทิศทาง โดยเฉพาะของหมู่ฟังก์ชันที่จะเข้าร่วมในการทำปฏิกิริยา. สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นธรรมชาติที่สำคัญของเอนไซม์ที่มีผลทำให้จำนวนโมเลกุลซับสเทรตที่ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้พลังงานกระตุ้นลดลง.

2.1.3.2 เอนไซม์มีความจำเพาะสูงต่อซับสเทรต

ดังนั้น ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเทรตเป็นธรรมชาติสำคัญประการหนึ่งของเอนไซม์ที่ทำให้เอนไซม์ลดพลังงานกระตุ้นในการเร่งปฏิกิริยาได้ ในปี ค.ศ. 1894 Emil Fischer ได้ตั้งสมมุติฐานว่า การจับระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรตเหมือนการจับระหว่างกุญแจและลูกกุญแจ ทั้งสองโมเลกุลมีรูปร่างคงที่และเหมาะสมพอเหมาะพอดีที่จะจับกันได้ (ดังรูปที่ 2 – 2), ต่อมาสมมุติฐานนี้ได้ถูกปรับปรุงโดย Koshland ซึ่งเสนอโมเดลการชักนำให้เข้ารูป (Induced fit Model), ซึ่งอธิบายว่า การจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรตจะชักนำให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปของเอนไซม์ อันได้แก่ การเปลี่ยนตำแหน่งและทิศทางของหมู่ฟังก์ชันที่จะร่วมในการเร่งปฏิกิริยา, ซึ่งมีผลให้เกิดสถานะแทรนซิชันที่จำเพาะในปฏิกิริยานั้นๆ โมเดลที่เสนอโดย Koshland นี้สื่อให้เห็นว่าเอนไซม์เป็นโมเลกุลที่มีความยืดหยุ่นได้.

ความจำเพาะต่อซับสเทรตสูงของเอนไซม์ เป็นสมบัติสำคัญในการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากส่งผลให้เกิด ข้อดีสำคัญ 2 ประการ คือ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ในปริมาณเพิ่มขึ้น และลดการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่น ที่ไม่ต้องการ.



รูปที่ 2. 2 การจับระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรต.

ก. สมมติฐานกุญแจและลูกกุญแจ

ข. โมเดลการชักนำให้เข้ารูป

ที่มา: Berg *et al.* 2002.

2.2 ไซโคลเด็กซ์ทริน กลูคาโนทรานส์เฟอเรส (Cyclodextrin Glucanotransferase , CGTase)

Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase) ซึ่งเป็นเอนไซม์คาร์โบไฮเดรตในกลุ่มแทรนส์เฟอเรสชนิดเดียว ที่มีการผลิตในปริมาณมากเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรม โดยจัดรวมอยู่ในกลุ่ม bulk enzyme ไซโคลเด็กซ์ทริน กลูคาโนทรานส์เฟอเรส ต่างจากคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ที่ใช้มากในอุตสาหกรรมตรงที่ส่วนใหญ่เอนไซม์ CGTase ไม่ได้ถูกใช้งานโดยตรงในกระบวนการอุตสาหกรรมแต่เป็นการใช้ผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อาหาร ยาและเครื่องสำอางค์ โดยผลิตภัณฑ์ของ CGTase คือ ไซโคลเด็กซ์ทริน (CD), ซึ่งเป็นกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์วงปิดที่มีศักยภาพใช้งานหลายด้าน ได้แก่ เป็นสารเพิ่มความเสถียร, เพิ่มการละลาย, เพิ่มความคงอยู่ทางชีวภาพ (bioavailability), และใช้กำจัดสารที่ไม่ต้องการออกจากระบบ เป็นต้น. เริ่มต้นไซโคลเด็กซ์ทริน กลูคาโนแทรนส์เฟอเรส มีชื่อตามระบบว่า 1,4 - α - D - glucan 4 -α - D - (1,4 - α - D - glucano) - transferase (cyclizing) หรือเรียกโดยทั่วไปว่า cyclodextrin glucano-transferase (CGTase).

2.2.1 ลักษณะและสมบัติเฉพาะ

2.2.1.1 แหล่งและสมบัติของเอนไซม์

CGTase เป็นเอนไซม์นอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบในจุลินทรีย์หลายชนิดส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* และมีการพบใน *Clostridium ,Klebsiella, Micrococcus, Thermoanaerobacter* และ *Thermoanaerobacterium* ในปี 1999 Tachibana *et.al.* รายงานการพบเอนไซม์ในกลุ่มอาร์เคีย (archaeon) จีนัส *Thermococcus* ซึ่งเป็นการพบเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่แบคทีเรียเป็นครั้งแรก.

ลักษณะสมบัติของ CGTase ดังตารางที่ 2.2 ส่วนใหญ่เป็นพอลิเพปไทด์สายเดียวมีขนาดประมาณ 70 kDa ส่วนใหญ่ต้องการ Ca^{+2} ทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0-7.0 (ยกเว้น CGTase ทนด่าง) และอุณหภูมิ 50-60 °ซ. (ยกเว้น CGTase ทนร้อน).

ตารางที่ 2.2 CGTase จากแบคทีเรียต่างชนิด

แบคทีเรีย	ชนิด CGTase	ขนาด (kDa)	pH ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ.)
B. macerans IAM1243	α	145 (ไดเมอร์)	5.5-7.5	60
B. macerans	α	79	5.0-6.0	
B. megaterium No.5	β	75	5.0-6.2	55
B. ohbensis	β	80	5.0-5.5	50-55
alk. B. circulans sp. 38-2 (ATCC 21783)	β	88	4.6,7.0,9.5	45-50
B. stearothermophilus	α/ β	68	6	
B. firmus 290-3	γ/ β	75	6.0-8.0	50
B. clarkii 7384	γ	68	10.5-11.0	60
Paenibacillus sp. A11	β	72	5.0-6.0	40
Paenibacillus sp. RB01	β	65	6.5-7.0	60-70
T.thermosulfurigenes EM1	α/ β	68	4.5-7.0	80-85
Thermococcus sp. B.1011*	α		5-5.5	90-100

* archeon

ที่มา : Fogarty & Kelly , 1990 ; Wind *et.al* , 1995 ; Tonkova ,1998Tachibana *et.al*,1999 ; Rojtinnakorn, *et.al*, 2001 ; Takada *et.al* , 2003 ; Yenpetch *et.al*, 2004.

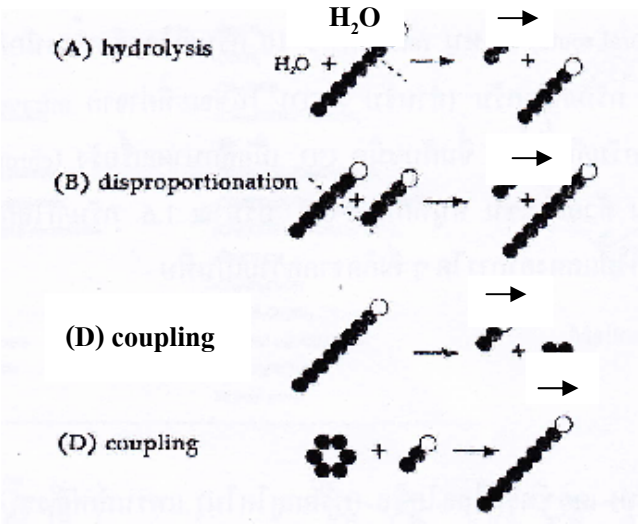
2.2.1.2 การเร่งปฏิกิริยา

CGTase เป็นเอนไซม์ในสกุลแอลฟา – อะไมเลสที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซับสเทรตแป้งให้เป็นไซโคลเด็กซ์ทริน (CD) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเนื่องจากเอนไซม์มีกลไกการตัดพันธะแบบ α-1,4 ในสาย จึงไม่ตัดบริเวณโซ่กิ่งทำให้เหลือลิมิตเด็กซ์ทริน บริเวณแตกกิ่ง และมีโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรง เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงของปฏิกิริยาด้วย.

ปฏิกิริยาหลักของ CGTase คือ การโยกย้ายหมู่กลูโคซิลหรือแทรนส์กลูโคซิเลชัน ในสายแซ็กคาไรด์เดียวกันหรือระหว่างสาย (intra- or intermolecular transglucosylation) โดยเอนไซม์เร่งปฏิกิริยานี้ได้ 3 แบบ คือ:

แบบที่ 1 ปฏิกิริยา disproportionation คือ การโยกย้ายหมู่กลูโคซิลในระหว่างโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรงจากตัวให้ไปยังตัวรับ ตามปฏิกิริยา G(n) + G(m) →G(n-x) + G(m+x), G = กลูโคส n ,m คือ จำนวนหมู่กลูโคซิลของซับสเทรต และ x คือ จำนวนหมู่ที่ถูกโยกย้าย

ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีเมื่อซับสเทรตมีขนาดความยาวมากกว่า 100 หน่วยกลูโคส แต่ปฏิกิริยานี้ไม่จำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase.



รูปที่ 2. 3 ปฏิกิริยาที่เร่งโดย CGTase แต่ละวงกลมแทนหน่วยกลูโคส วงกลมโปร่ง คือ น้ำตาลที่ปลายรีดิวซ์.

ที่มา: van der Veen *et al*. 2000.

แบบที่ 2 ปฏิกิริยา cyclization เป็นปฏิกิริยาที่ตัวให้ซึ่งถูกตัดหมู่กลูโคซิลออกไปทำหน้าที่เป็นตัวรับด้วย คือ การโยกย้ายกลูโคซิลเกิดภายในสายแซ็กคาไรด์เดียวกัน โดยนำปลายรีดิวซ์ของส่วนที่ถูกตัดมาต่อกับปลายไม่รีดิวซ์ในส่วนเดียวกัน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ลักษณะวงปิด CD. ดังปฏิกิริยา G(n) → cyclic Gx + G(n-x) โดย x = 6-8 ปฏิกิริยานี้จำเพาะเฉพาะ CGTase และเกิดได้ดีเมื่อซับสเทรตมีขนาดความยาว 16-80 หน่วยกลูโคส.

แบบที่ 3 ปฏิกิริยา coupling เป็นปฏิกิริยาผันกลับของ cyclization โดย CD เป็นตัวให้หมู่กลูโคซิล และตัวรับเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น, ดังปฏิกิริยา cyclicGx+G(n) G(x-m) + G(n+m) ปฏิกิริยานี้ที่จริงแล้วก็เป็นปฏิกิริยา disproportionation แต่เป็นชนิดพิเศษที่มีความจำเพาะต่อ CGTase และเกิดได้ดีเมื่อซับสเทรตตัวรับมีขนาดเล็กประมาณ 2-4 หน่วยกลูโคส .นอกจากโอลิโกแซ็กคาไรด์แล้ว ตัวรับอาจเป็นสารโมเลกุลเล็กชนิดอื่นที่มีหมู่ไฮดรอกซิล โดยอาจเป็นโมเลกุลสายตรงหรือเป็นวงก็ได้ ตัวอย่างเช่น แอลกอฮอล์, ไฮโดรควิโนน, ฟลาโวนอยด์, ปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคซิลมายังโมเลกุลเหล่านี้ ทำให้เกิดสารประกอบกลูโคไซด์ที่มีประโยชน์.

นอกจากปฏิกิริยาหลักในการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลแล้ว CGTase ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้ง (hydrolysis) ได้ ซึ่งอาจมองได้ว่าเป็นการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลไปยังโมเลกุลของน้ำ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับ ทำให้เกิด $G(n) + H_2O \rightarrow G(n-x) + Gx$ (ดังรูปที่ 2 - 3) โดยเอนไซม์ CGTase เร่งปฏิกิริยานี้ได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลส ด้วยเหตุที่ CGTase เร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบ จึงจัดเป็นเอนไซม์หลายหน้าที่ (multifunctional enzyme).

ผลิตภัณฑ์ CD ที่เกิดจากเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่มี 3 รูปแบบ คือ แอลฟา (α,CD6) เบต้า (β,CD7) และแกมมา (γ,CD8) โดยสัดส่วนของ CD ทั้ง 3 รูปแบบขึ้นกับชนิดและแหล่งของเอนไซม์ รวมทั้งสภาวะในการผลิต.

2.2.1.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยา

CGTase เร่งปฏิกิริยาแทรนส์กลูโคซิเลชันมากกว่าไฮโดรไลซิส อย่างไรก็ตาม ทั้งสองปฏิกิริยาใช้กลไลทางเคมีในการเร่งปฏิกิริยาเหมือนกัน และเหมือนกับแอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์อื่นๆ ในสกุลนี้ คือ ใช้ปฏิกิริยาการแทนที่นิวคลีโอฟิลิกแบบสองขั้นตอน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีการคงโครงแบบ (retention) โดยมีกรดอะมิโนคาร์บอกซิลิกสำคัญ 3 ตัว ในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับแอลฟา-อะไมเลส คือ Glu 257 Asp 229 และ Asp 328 (ตำแหน่งกรดอะมิโนใน CGTase จาก *B. circulans*). ในขั้นตอนแรก Glu 257 จะทำหน้าที่ให้โปรตอนแก่ไกลโคซิดิกออกซิเจนของซับสเทรตตรงตำแหน่งที่พันธะจะถูกตัด (โดยมี Asp 328 ช่วยทำให้ Glu 257 อยู่ในสภาวะ protonated) พร้อมกับการเข้าจับของนิวคลีโอไทล์ Asp 229 ที่ C-1 ทำให้พันธะไกลโคซิดิกถูกตัด เกิดเป็นสารตัวกลางกลูโคซิล-เอนไซม์ที่จับกันด้วยพันธะโคเวเลนต์. ในขั้นตอนที่สอง สารตัวกลางจะถูกตัวรับหมู่กลูโคซิลเข้ามาจับ ในกรณีแทรนส์กลูโคซิเลชันตัวรับก็คือโอลิโกแซ็กคาไรด์ภายในสายเดียวกัน หรือต่างสาย โดย C4-OH ที่ปลายไม่รีดิวซ์เป็นหมู่เข้ามาจับ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ CD หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรง หากเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ตัวรับก็คือโมเลกุลของน้ำ ทั้งนี้ Glu 257 ในสภาวะ deprotonated จะเป็นตัวช่วยในการดึงโปรตอนออกจากตัวรับ เพื่อกระตุ้นให้เข้าจับกับสารตัวกลางได้.

2.2.1.4 ตัวยับยั้ง

ตัวยับยั้งเอนไซม์ CGTase ที่นิยมใช้ในการศึกษาเอนไซม์คือ อะคาร์โบส ซึ่งยับยั้งแอลฟา -อะไมเลสเช่นกัน เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล 4 หน่วย. นอกจากนี้โอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรง เช่น G3-G9 เป็นตัวรับหมู่กลูโคซิลที่ดี จึงมักกระตุ้นปฏิกิริยา coupling ทำให้การ

เกิด CD ลดลง, จึงนับเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา cyclization ของ CGTase ได้ด้วย ตัวยับยั้งเหล่านี้มีประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติ และในการศึกษาแอกทีวีตีของเอนไซม์.

2.2.1.5 วิธีวัด Dextrinizing activity

เป็นการวัดความสามารถในการย่อยแป้ง โดยติดตามวัดปริมาณแป้งที่ลดลงด้วยสารไอโอดีน วิธีนี้ไม่จำเพาะต่อ CGTase และเป็นการวัดแอกทีวิตีโดยรวมของ CGTase โดยในช่วงต้น ปฏิกิริยาหลักจะเป็น disproportionation เนื่องจากซับสเทรตมีขนาดใหญ่ รวมทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อบ่มนานขึ้นทำให้สับสเตรตมีขนาดเล็กลง ก็จะเกิดปฏิกิริยา cyclization และ coupling ตามลำดับ เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย เร็ว และราคาถูก จึงเหมาะที่จะใช้ในการตรวจวัดขั้นต้น หรือใช้ตรวจติดตามเอนไซม์แบบคร่าว ๆ.

2.2.1.6 การประยุกต์ใช้ CGTase ในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์และกลูโคไซด์

เอนไซม์ CGTase ใช้ในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรงและอนุพันธ์กลูโคไซด์โดยปฏิกิริยา coupling และ disproportionation ของเอนไซม์. สำหรับการผลิตในอุตสาหกรรมในประเทศญี่ปุ่น บริษัท Hayashibara ใช้ CGTase ตรึงรูป ในการผลิตมอลโตโอลิโกซิลซูโครส (maltooligosylsucrose , MOS) หรือ coupling sugar จากไฮโดรไลเสตของแป้งและน้ำตาลซูโครส MOS นี้เป็นฟังก์ชันนัลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีสมบัติดีกว่าซูโครส เนื่องจากเป็นสารหวานที่ถึงแม้ความหวานจะมีเพียง 60 % ของซูโครส แต่ไม่ทำให้เกิดโรคฟันผุ เนื่องจากไม่ถูกย่อยโดยแบคทีเรียในปาก (โรคฟันผุเกิดจากซูโครสถูกย่อยโดยแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ได้กลูแคน ซึ่งจะเกาะอยู่กับแบคทีเรียเป็นคราบเคลือบผิวฟัน).

CGTase สามารถโยกย้ายหมู่กลูโคซิลไปยังตัวรับอื่นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต ทำให้เกิดอนุพันธ์กลูโคไซด์ที่มีสมบัติดีขึ้น ตัวรับที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ พวกฟลาโวนอยด์ เนื่องด้วยสารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ เช่น เป็นสารต้านไวรัส, ต้านแบคทีเรีย และต้านการเกิดมะเร็ง. โดยอาจเกิดจากการต้านอนุมูลอิสระ แต่ปัญหาของสารฟลาโวนอยด์อยู่ที่การละลายน้ำ ซึ่งต่ำมาก การเติมหมู่กลูโคซิลน่าจะทำให้การละลายน้ำสูงขึ้นได้ ตัวอย่างที่มีการผลิตเชิงพาณิชย์ เช่น stevioside glucoside ซึ่งใช้เป็นสารให้ความหวานในอาหาร, กลูโคสไซด์นี้มีการละลายน้ำที่ดีขึ้น และความขมลดลงมาก แต่ความหวานใกล้เคียงกันกับสารตั้งต้น stevioside, ซึ่งสกัดได้จากใบพืช *stevia rebaudiana* Bertoni (ความหวานประมาณ 143 เท่าของซูโครสที่ความเข้มข้น 0.025%). นอกจากนี้ ได้มีการสังเคราะห์กลูโคสไซด์ของฟลาโวนอยด์และวิตามิน อีก

หลายชนิด ซึ่งมีสมบัติดีขึ้น แต่อาจไม่คุ้มค่าในการผลิตเชิงพาณิชย์ หรือยังอยู่ในระหว่างความพยายามปรับปรุงขั้นตอนเพื่อลดต้นทุนในการผลิต.

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

2.2.2.1 ผลกระทบของแหล่งคาร์บอน

ผลกระทบของคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของแบคทีเรีย ถูกทดสอบโดยใช้กลูโคส , α-ไซโคลเดกซ์ทริน , β-ไซโคลเดกซ์ทริน, xylose และ มอลโตส เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งไม่สามารถทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดี เมื่อเทียบกับแป้งซึ่งแตกต่างจากรายงานอื่นๆ *B. stearothermophilus* สามารถใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นได้อย่างเหมาะสม ในขณะที่ไซโรสและกลูโคสเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดสำหรับ *B.cereus* โดยต้องเติมแป้งลงไปร่วมด้วย.

ผลการทดสอบแป้งชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอนไซม์ โดยวัดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น ซึ่งมีผลแตกต่างกันไปตามโครงสร้างทางกายภาพของแป้งและสายพันธุ์ของบาซิลลัส ซึ่งเป็นไปตามรายงานต่างๆ ดังนี้ Gawande พบว่า CGTase ผลิตได้มากที่สุดด้วยแป้งข้าวโพด โดยใช้เชื้อ *B. firmus* Jin Bong รายงานว่าแป้งมันฝรั่งให้ผลผลิต CGTase ได้ดีโดยใช้เชื้อ *B.stearothermophilus*. ในขณะที่ Sreenivasan รายงานถึงการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase ว่าแป้งมันสำปะหลังเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของ *B.macerans* สำหรับ *B.circulans* DF R9 สามารถผลิต CGTase ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวเจ้า.

2.2.2.2 ผลกระทบของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ถูกทดสอบ เพื่อศึกษาผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอนไซม์, ซึ่งพบว่าเกลือแอมโมเนียมทำให้ CGTase เพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ เช่น Tryptone หรือ น้ำข้าวโพด จะทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น แต่ผลผลิต CGTase กลับลดลง, ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการใช้ยูเรียหรือ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน. ดังนั้นเกลือแอมโมเนียมจึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.

2.2.2.3 ผลกระทบของไอออนบวก

แมกนีเซียม พบว่า เป็นสารสำคัญที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเหล็กมีความจำเป็นต่อการผลิต CGTase ธาตุประจุบวกตัวอื่นๆ เช่น Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} หรือ Co^{2+} ไม่มีผลกระทบไม่ว่าต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรือการทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนของเอนไซม์.

การใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Mg^{2+} และ Fe^{2+} ชี้วัดว่าถึงแม้ว่าจะสำคัญ แต่การเพิ่มความเข้มข้นมากเกินกว่า 0.02 ก./ล. ไม่มีผลทำให้เพิ่มการเจริญเติบโตและการเพิ่มผลผลิต CGTase แต่อย่างใด.

2.2.2.4 ผลกระทบของค่า pH เริ่มต้น

ค่า pH ระหว่าง 7.3 – 8.8 ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ ในขณะที่การสร้าง CGTase จะมีปริมาณมากที่สุด เมื่อค่า pH เริ่มต้นอยู่ที่ 8.3.

2.2.2.5 ผลกระทบของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B.circulans* ใช้อุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างตั้งแต่ 32–42 °ซ. การเติบโตของเซลล์และปฏิกิริยาการเกิด CGTase มีค่ามากที่สุดที่ 37°ซ. อย่างไรก็ตาม ที่ 40 °ซ. ปฏิกิริยาการเกิดเอนไซม์ยังอยู่ที่ 80% ของค่าเริ่มต้น ในขณะที่การเจริญเติบโตลดลงประมาณ 60% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CGTase มีความเสถียรอยู่ในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว.

2.2.2.6 ผลกระทบของการให้อากาศ

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพูขนาด 250 มล. และเขย่าด้วยความเร็วคงที่ พบว่าการเจริญและการผลิต CGTase สูงกว่าขวดที่มีปริมาตรเกินกว่า 50 มล. ดังนั้นการให้อากาศปริมาณมากเพียงพอจึงมีผลดีต่อการเจริญและการผลิต CGTase.

2.3 การสังเคราะห์ไกลโคซิลกลีเซอรอล (Glc-GL)

2.3.1 วัตถุดิบที่ใช้ผลิต Glc-GL

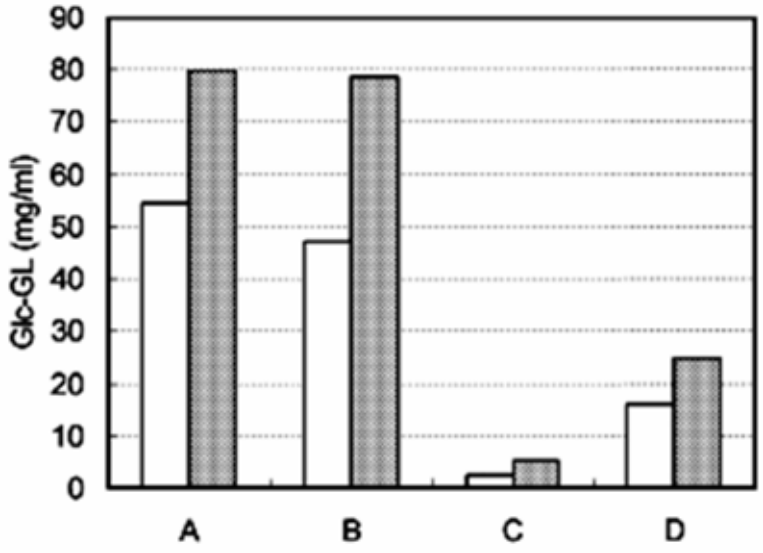
- สารละลายแป้ง (จากแป้งมันสำปะหลัง) (Kanto Chemicals,Tokyo).
- เอนไซม์ CGTase ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Geobacillus stearothermophilus* และ *Bacillus circulans* (Hayashibara Biochemicals, Okayama).

- เอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Thermoanaerobacter* sp. และ *B.macerans* (Novo Nordisk , Denmark and Amano Enzyme, Nagoya).
- เอนไซม์ α- glucosidase จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีของ Kita จากกระบวนการ transglucosidase (Seikagaku Kogyo, Tokyo).
- เอนไซม์ glucoamylase จากเชื้อรา *Rhizopus niveus* (Seikagaku Kogyo, Tokyo).
- เอนไซม์ α – amylase ตับอ่อนหมู (Seikagaku, Kogyo).

2.3.2 ผลที่ได้จากการผลิต Glc-GL

กระบวนการ Transglycosylation ของ Glycerol โดยใช้เอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เอนไซม์ CGTase ทำหน้าที่สังเคราะห์ cyclodextrins ที่มีอยู่ในแป้งโดยกระบวนการ Transglycosylation ภายในโมเลกุลซึ่งจะมี maltooligosyl ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาถูกเคลื่อนที่ไปยังตัวรับที่เหมาะสม โดยจะมีความสัมพันธ์กันกับโมเลกุลของตัวรับ วงของน้ำตาล pyranose ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับมีตำแหน่งของคาร์บอน C2-,C3-,C4- ที่อยู่ใน OH group เหมือนกันกับน้ำตาล D – glucopyranose. อย่างไรก็ตาม สารประกอบพวก lactose, ascorbic acid, catechin และ trimethylolpropane สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับได้เช่นเดียวกัน.

เมื่อเริ่มการศึกษาวิจัยเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ถูกนำมาใช้เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จากกระบวนการTransglycosylationโดย maltooligosaccharide และ Glucose จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ glycoamylase แต่เนื่องจากเอนไซม์ glycoamylase ไม่สามารถย่อย O - α - D - glucosyl glycerol (Glc-GL) ดังนั้นส่วนที่เหลืออยู่ก็จะเป็น O - α - D - glucosyl glycerol (Glc-GL) ดังแสดงในรูปที่ 2.4.



รูปที่ 2. 4 การเปรียบเทียบปริมาณ O - α - D - glucosyl glycerol (Glc-GL).

กราฟเปรียบเทียบปริมาณ O - α - D - glucosyl glycerol (Glc-GL) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ Transglycosylation โดย Glycerol ที่ใช้เอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆและที่ความเข้มข้นของ glycerol ต่างกัน โดยที่แบ่งเป็น 2 แบบ คือ:

1. ความเข้มข้นของ 10% (w/v) glycerol.
2. ความเข้มข้นของ 20% (w/v) glycerol โดยเชื้อแต่ละชนิดจะประกอบด้วย

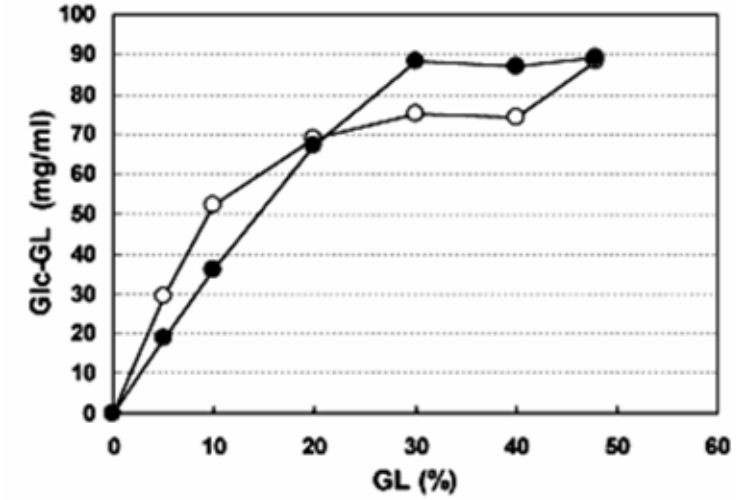
A คือ *G. stearothermophilus* B คือ *Thermoanaerobacter* sp.

C คือ *B. circulans* D คือ *B. macerans*

การทดลองนี้ทำในภาชนะที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา 2.0 ml มีส่วนผสม คือ 10 % (w/v) น้ำแป้ง, 50 mM acetate buffer (pH 6.0) และ Enzyme 20 units/ml จากนั้นก็นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที ส่วนผสมหลังจากทำปฏิกิริยาแล้วจะถูกนำมา Treated โดยเอนไซม์ glycoamylase และนำมาวิเคราะห์โดย HPLC ภายใต้ condition A.

จากผลการทดลองสรุปว่าผลผลิตที่ได้จากเชื้อในกลุ่ม *G.stearothermophilus* และ *Thermoanaerobacter* sp. ให้ผลผลิตดีกว่าเชื้อ *B. circulans* และ *B. macerans* ดังนั้นเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *G. stearothermophilus* และ *Thermoanaerobacter* sp. จะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป.

2.3.3 ผลกระทบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Glycosyl glycerols



รูปที่ 2. 5 ผลกระทบของระดับความเข้มข้น glycerol ในกระบวนการ transglycosylation.

จากกราฟข้างต้นแสดงให้เห็นถึง ผลกระทบของระดับความเข้มข้นของ glycerol ในกระบวนการ transglycosylation ส่วนผสมของการเกิดปฏิกิริยา 12.5 มล. ประกอบด้วย 5 %-48% (w/v) glycerol ,10% (w/v) น้ำแป้ง , 50 mM acetate buffer (pH 6.0) และเอนไซม์ (20 หน่วย / ml) โดยให้ความร้อนที่ 50 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากปฏิกิริยาผสมกันแล้ว นำไปต้ม 10 นาที , Treats กับ glucoamylase และวิเคราะห์โดย HPLC ภายใต้ condition A โดยในการทดลองจะแปรผันปริมาณ glycerol และเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียต่างชนิดกัน.

การใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 30% ทำให้ได้ปริมาณของ O-α-D - glucosyl glycerol (Glc-GL) ในระดับสูง เช่นเดียวกันกับการใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นมากกว่า 30% เอนไซม์ CGTase จาก *G. stearothermophilus* จะผลิต O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) ได้สูงกว่า *Thermoanaerobacter* sp. ในระดับกลีเซอรอลที่ 5% - 20% ในทางกลับกับเอนไซม์ CGTase จาก *Thermoanaerobacter* sp. จะผลิต O - α - D - glucosyl glycerol (Glc-G) ได้สูงกว่าในระดับความเข้มข้น 30% - 50% กลีเซอรอล แต่ที่ความเข้มข้น 20% และ 50% กลีเซอรอล เชื้อทั้ง 2 ตัว จะผลิต O - α - D - glucosyl glycerol (Glc-GL) ได้เท่ากัน.

จากการทดสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกันพบว่าเอนไซม์ CGTase จาก *G.stearothermophilus* สามารถผลิต O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) ได้เพิ่มขึ้นจาก 19 เป็น

31 มก./ล. เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30°ซ. เป็น 60°ซ. และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70°ซ. ก็ยังสามารถผลิต O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) ได้ถึง 28 มก./ล. เห็นได้ว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการผลิต O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) ก็ไม่ได้น้อยลงไปมาก.

2.3.4 การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นโดยเอนไซม์ CGTase และ α – glucosidase

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นโดย CGTase และ α – glucosidase

Component	Saccharide (mg/ml)	
	CGTase	α-Glucosidase
Glc-GL	69.1	75.6
Glc_2-GL	36.6	7.8
Glc_3-GL	13.7	0
Glc_4-GL	3.7	0
Glc	2.4	128
Maltose	1.1	18.6
Unknown[a]	61.3	4.7
Total	188	235

[a] Non-separable or unidentified saccharides upon HPLC analysis expressed as mg Glc per ml.

ส่วนประกอบของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากของผสมถูกเปรียบเทียบด้วยวิธีการสังเคราะห์ 2 วิธี

1. วิธีการใช้เอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Thermoanaerobacter* sp.

2. วิธีการใช้เอนไซม์ α – glucosidase จากเชื้อ *Aspergillus niger* โดยวิธีที่ใช้

เอนไซม์ CGTase จะใช้ น้ำแป้ง 20% กับ กลีเซอรอล 25 % ส่วนวิธีการใช้เอนไซม์ α – glucosidase ใช้ มอลโตส 20% และ กลีเซอรอล 25%, ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ในตารางข้างต้น ผลผลิตที่ได้จากวิธีการใช้เอนไซม์ CGTase ไม่ได้น้อยไปกว่าการใช้เอนไซม์ α – glucosidase ภายใต้ condition การทำปฏิกิริยาเดียวกัน. ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการเป็นตัวกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase, ซึ่งสามารถทำให้เกิดทั้งกระบวนการ transglycosylation และ hydrolysis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ. สำหรับผลผลิต maltooligosyl glycerol จากวิธีใช้เอนไซม์ α – glucosidase มีค่าสูงกว่าวิธีใช้เอนไซม์ CGTase ซึ่งมีส่วนสำคัญในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α – amylase.

นอกจากนี้วิธีใช้เอนไซม์ CGTase ยังทำให้ได้ผลผลิตจำพวก reducing sugar และน้ำตาลกลูโคสต่ำกว่าวิธีการใช้เอนไซม์ α – glucosidase เนื่องจากเอนไซม์ α – glucosidase สามารถแยก glucose ออกจาก O-α-D - glucosyl glycerol (Glc-GL)ได้ ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสมากขึ้น, ซึ่งการที่ได้น้ำตาลเหล่านี้ในปริมาณที่ต่ำเป็นข้อได้เปรียบที่ทำให้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ดีขึ้น ทั้งในแง่การลดอาการฟันผุ สีที่เกิดจากการใช้ความร้อน และความสามารถในการย่อยที่ต่ำ.

2.3.5 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α – amylase ของตับอ่อนโดยใช้ Glc –GL

ตารางที่ 2. 4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α – amylase

Concentration that caused 50% inhibition (IC_{50}) were measured as described in Materials and Method

หมายเหตุ: Glc-1-GL คือ กลูโคส 1 โมเลกุลก่อพันธะกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของกลีเซอรอล

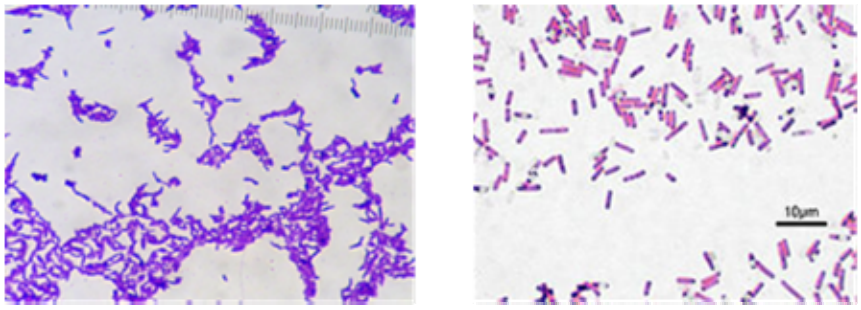
Saccharide	**IC_{50} (mM)**
Glc-1-GL	26.4
Glc_2 – GL	0.245
Glc_3 – GL	0.065

Glc_2 – GL คือ กลูโคส 2 โมเลกุลก่อพันธะกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล

Glc_3 – GL คือ กลูโคส 3 โมเลกุลก่อพันธะกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล

Glc-1-GL ที่ถูกรายงานว่ายับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ในลำไส้หนูได้โดยทั่วไป น้ำตาลกลุ่ม Glc -1-GL จะถูกดูดซึมได้ต่ำและยับยั้งการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของกลูโคสในกระแสเลือด,หลังจากการย่อยอาหาร Glc-1-GL จึงเหมาะสมกับผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน มีการวัดความสามารถในการยั้งยับการทำงานของเอนไซม์ α – amylase จากตับอ่อนของหมูโดยใช้ Glc-1-GL ,Glc_2 – GL และ Glc_3–GL ซึ่งคาดว่าจะได้ผลไปในทางเดียวกันกับการศึกษาผลกระทบทางด้านสรีระวิทยา หลังจากการกินอาหารจำพวกแป้ง.

2.4 แบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus* sp.)



รูปที่ 2.6 เชื้อแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส.

2.4.1 การจำแนกทางวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 2. 5 การจำแนกทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส

Domain	Bacteria
Division	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Bacillaceae
Genus	*Bacillus*

บาซิลลัส คือ สกุลของแบคทีเรียแกรมบวก (กลุ่มแบคทีเรียที่เปื้อนสีม่วง) หรือแบคทีเรียรูปร่างทรงกระบอกและเป็นสมาชิกในกลุ่ม Firmicates (กลุ่มแบคทีเรียที่มีโครงสร้างผนังเซลล์แข็งแรง). ในธรรมชาติบาซิลลัสประกอบไปด้วยพวกที่อยู่อย่างอิสระและสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อโรค ภายใต้ภาวะกดดันทางธรรมชาติที่สูง, เซลล์ผลิตเนื้อเยื่อรอบๆตัวที่อยู่นิ่งๆ ทนทานและไม่สร้างโครงสร้างซับซ้อน ซึ่งสามารถหยุดอยู่นิ่งๆ เพื่อยืดอายุของตนเองได้, ลักษณะพิเศษนี้ได้ถูกนิยามให้เป็นอีกตระกูลหนึ่งตามธรรมชาติ แต่ไม่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับหลายๆ สายพันธุ์และโดยมากจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสกุลอื่น.

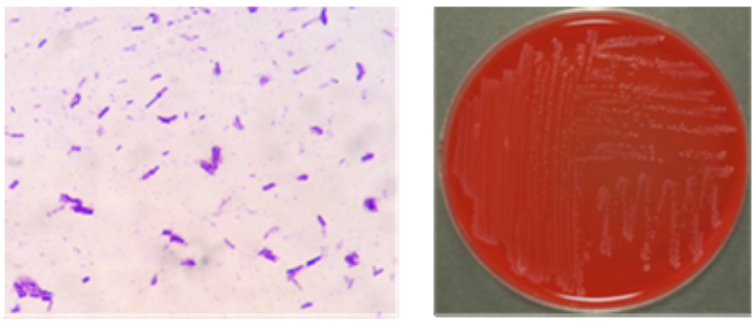
2.4.2 ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของบาซิลลัสเป็นโครงสร้างภายนอกเซลล์ ที่ก่อให้เกิดผนังป้องกันชั้นที่ 2 ระหว่าง แบคทีเรียและสภาพแวดล้อม, ในขณะเดียวกันมันยังคงรักษารูปร่างสี่เหลี่ยมไว้ได้และต้านทานความดันที่เกิดจากการบวมของเซลล์. ผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบของแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ก่อตัวขึ้นมาแบบโครงสร้าง phosphodiester และกรด teichuronic บาซิลลัสชนิดนี้เป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่ทำหน้าที่คล้ายๆ peptidoglycan (พอลิเมอร์ ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาล , กรดอะมิโน ที่ก่อตัวภายนอกคล้ายกับเยื่อพลาสมา) การสังเคราะห์ของมันได้ถูกระบุว่าเป็นกลุ่มของ peptidoglycan ทั้งหมดที่ใช้น้ำย่อยในการสังเคราะห์และยังถูกระบุตำแหน่งแล้วเช่นกัน การสวมบทบาทเป็นตัวก่อกำเนิดรูปแบบของเนื้อเยื่อกระดูกและการบำรุงรักษานั้นมีความสำคัญมาก.

2.4.3 ความสำคัญทางอุตสาหกรรม

บาซิลลัสหลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้จำนวนมาก *Bacillus amyloliquefaciens* คือ สายพันธุ์ของบาซิลลัสซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนปฏิชีวนะตามธรรมชาติ เช่น Alpha amylase , Barnase ซึ่งถูกใช้ใน Starch Hydrolysis และการวิจัยทางพันธุกรรม (DNA) เป็นต้น ในส่วนโครโมโซม *Bacillus thuringiensis* ได้ถูกตัดต่อเข้ากับ ข้าวโพด ,ข้าวสาลี ผลคือ GMOs ซึ่งเป็นเหตุผลว่าทำไมพืช GMO จึงสามารถทนต่อแมลงศัตรูพืชได้.

2.5 *Bacillus circulans*



รูปที่ 2.7 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans.*

ลักษณะทั่วไป : เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งยาว เคลื่อนที่ได้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง < 0.9 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูง, ทำให้สามารถใช้ในกระบวนการหมักได้, ซึ่งอาจพบได้ในกระบวนการหมักแป้งในธัญพืช โดยการหมักพวกอาหาร

บรรจุกระป๋อง เช่น ข้าวโพดกระป๋อง, ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะโปร่งใส, มีขนาดโคโลนีหลากหลาย เจริญเติบโตดีที่สุดที่ 30 °ซ. สามารถทนความร้อนได้ถึง 45 – 50 °ซ.

ตารางที่ 2. 6 การจำแนกทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *Bacillus circulans*

BioHazard Level	1
Growth Temperature	30°C
Appropriate growth media	nutrient agar, nutrient broth
Genomic sources for restriction enzymes	BciVI
Gram Stain	Gram stain positive
Respiration	aerobic
Motility	*Bacillus circulans* is variably motile
Human health and disease	Although not a major pathogen, *Bacillus circulans* has been reported to cause infections

2.6 สารประกอบกลีเซอไรด์

สารประกอบกลีเซอไรด์เป็นลิปิดที่กรดไขมันจับกับกลีเซอรอลด้วยพันธะเอสเตอร์ เรียกแอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol), โดยส่วนของกรดไขมันเรียกว่าหมู่เอซิล (acyl group, R-COO-) แบ่งได้ตามจำนวนกรดไขมันที่มีอยู่ในโมเลกุล แบ่งเป็น ดังนี้:

1) โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) จะมีหมู่ acyl 1 หมู่ที่จับกับกลีเซอรอลที่คาร์บอตำแหน่ง 1 หรือ 2 อย่างใดอย่างหนึ่งจะได้ 1-monoglyceride หรือ 2-monoglyceride.
2) ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) จะมีหมู่ acyl 2 หมู่ จับอยู่กับกลีเซอรอลที่คาร์บอนตำแหน่ง 1 และ 3 หรือ ตำแหน่ง 1 และ 2 ของกลีเซอรอล.
3) ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เป็นสารประกอบกลีเซอไรด์ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นเอสเตอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 3 ตัว โดยกรดไขมันทั้ง 3 ตัว อาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน.

ไขมันทุกชนิดมีส่วนประกอบสำคัญ 2 ส่วนคือกลีเซอรอล (Glycerol) + กรดไขมัน (Fatty acid)

1) กลีเซอรอล (Glycerol) มีสูตรโมเลกุล $C_3H_8O_3$ และมีสูตรโครงสร้าง.
2) กรดไขมัน (Fatty acid) มีสูตรทั่วไป คือ $CH_3(CH_2)_n$ – RCOOH.
โดยที่ R คือ หมู่ไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วย C กับ H

กลีเซอรอลสามารถรวมกับกรดไขมันได้ตั้งแต่ 1 ถึง 3 โมเลกุล, การสร้างไขมันโดยใช้, กลีเซอรอลกับกรดไขมัน จะมีน้ำเกิดขึ้น 1 โมเลกุล ต่อหนึ่งพันธะเรียกปฏิกิริยานี้ว่า ดีไฮเดรชั่น (Dehydration) ดังนั้น ไตรกลีเซอไรด์ จึงมีน้ำเกิดขึ้น 3 โมเลกุล.

ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นกระบวนการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันหรือไขมันพืช ให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (monoalkyl ester) โดยการทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์และมีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้, การใช้แอลกอฮอล์มากเกินพอจะช่วยให้สมดุลเลื่อนไปทางด้านผลิตภัณฑ์มากขึ้น ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเกิดขึ้นดังสมการ ดังนี้:

ไตรกลีเซอไรด์ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ กลีเซอรอล

รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน.

2.7 สารประกอบคาร์โบไฮเดรต

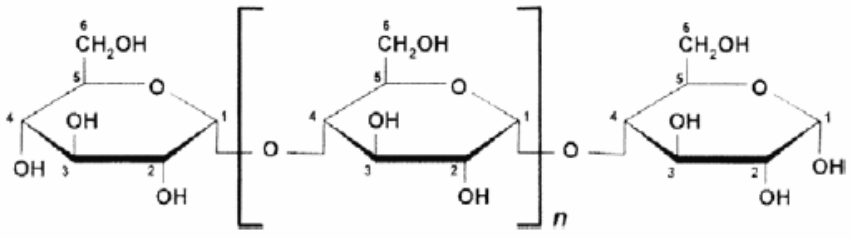
2.7.1 ต้นกำเนิดของแป้ง

แป้งเป็น homopolysaccharide ชนิดหนึ่งที่พบมากในพืช และเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง พืชเก็บสะสมแป้งไว้ตามส่วนต่างๆ เช่น หัว, ราก, เมล็ด, ลำต้นและผล. โดยรวมตัวกันอยู่เป็นเม็ดแป้ง (starch granule) แป้งส่วนใหญ่ได้มาจากเมล็ดของธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า, ข้าวโพด, ข้าวสาลี, ข้าวฟ่าง และบางส่วนได้มาจากหัวและรากของพืช เช่น มันเทศ, มันฝรั่ง, และมันสำปะหลัง. แป้งที่ได้จากพืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะ คือ มีโครงสร้างทางเคมีในโมเลกุลแตกต่างกันและเม็ดแป้งจะมีขนาดรูปร่างและสมบัติทางกายภาพแตกต่างกันด้วย โดยเฉพาะรูปร่างที่ต่างกันของเม็ดแป้งที่มาจากพืชแต่ละชนิด. แป้งในการผลิตนั้น หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ มีสิ่งเจือปน เช่น โปรตีน, ไขมันและเกลือแร่น้อยมาก. ส่วนแป้งที่ผลิตโดยทั่วไปที่ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อยู่มาก จะเรียกว่า flour เช่น แป้งข้าวโพด, แป้งข้าวสาลี, แป้งข้าวเจ้า. แต่

เมื่อสิ่งเจือปนอื่นๆ ถูกสกัดออกไปจนเหลือแป้งบริสุทธิ์เป็นส่วนใหญ่ เรียกว่าแป้งสตาร์ช แป้งสตาร์ชมีความบริสุทธิ์สูงจึงถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในรูปของสารเคมีโดยนำไปทำปฏิกิริยาเคมีต่างๆ มากมาย แป้งที่มีการนำมาใช้มากที่สุด คือ แป้งข้าวเจ้า, แป้งข้าวสาลีและแป้งมันฝรั่ง.

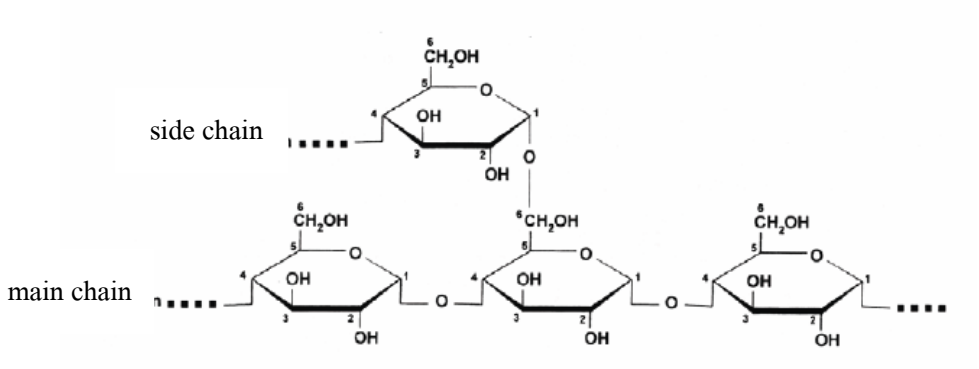
2.7.2 ลักษณะโครงสร้างภายในโมเลกุลและคุณสมบัติของแป้ง

แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วย anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ซึ่งแป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (amylose), และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (amylopectin), วางตัวในแนวรัศมี amylose ประกอบด้วยกลูโคส 250-300 โมเลกุล ซึ่งต่อกันเป็นโซ่ยาวแบบไม่มีกิ่งแต่โซ่จะมีลักษณะขดเป็นเกลียว (helix) amylose มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 500,000 Da เป็นโมเลกุลเส้นยาว. ส่วนใหญ่ประกอบด้วย α-1,4- glucosidic bonds และส่วนน้อยเป็น α-1,6- glucosidic bonds แป้งจากธัญพืช เช่น แป้งข้าวโพด, แป้งสาลี, แป้งข้าวฟ่าง มีปริมาณ amylose สูงประมาณ 28 %, แป้งจากรากและหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง, แป้งมันฝรั่งและ แป้งสาคูมีปริมาณ amylose ต่ำ ประมาณ 20 % waxy starch ไม่มีปริมาณ amylose เลย และแป้งจาก amylomaize มี amylose สูงมากถึง 80 % ตำแหน่งของ amylose ภายในเม็ดแป้งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแป้ง amylose บางส่วนอยู่ในกลุ่มของ amylopectin บางส่วนกระจายอยู่ทั้งในส่วน amorphous และส่วนผลึก crystalline amyloseไม่ละลายน้ำแต่เมื่อเติมน้ำลงไป amylase จะเกาะตัวกันเป็นตะกอนที่ไม่ละลาย และเนื่องจากโมเลกุลของ amylose เป็นสายยาวจึงมีโอกาสที่จะจับคู่กับ amylose อีกโมเลกุลหนึ่ง เป็นสายยาวคู่ขนานเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจนกลายเป็นตาข่ายมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำลดลงและตกตะกอนได้ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า retrogradation แต่ waxy starch ซึ่งไม่มี amylase เลยหรือมี amylose เป็นองค์ประกอบน้อยมากจะไม่เกิด retrogradation



รูปที่ 2. 9 การต่อของกลูโคสใน amylase.

amylopectin เป็นโฮโมโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในเม็ดแป้งประมาณ 70-100% มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีสายแขนงแยกออกมาซึ่งแต่ละแขนงจะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 20-35 หน่วย ดังนั้นในโมเลกุลของ amylopectin จึงมีทั้งพันธะ $\alpha(1 \rightarrow 4)$ และ $\alpha(1 \rightarrow 6)$ โดยปกติ amylopectin มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า amylose มาก มีน้ำหนักโมเลกุลขั้นต่ำประมาณ 1 ล้าน amylopectin มีพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า amylase และมีความคงตัวมากกว่า ยังคงสภาพเหลว มีความหนืด, ยืดหยุ่น. สำหรับ amylopectin ของแป้งข้าวเจ้า, ข้าวเหนียว, มันสำปะหลังและมันฝรั่ง สายส่วนใหญ่ประมาณ 80-90 % ประกอบด้วยกลุ่มเดี่ยวๆ และสายที่เหลืออีก 10-20 % จะเป็นส่วนเชื่อมต่อของแต่ละกลุ่ม ในแต่ละกลุ่มประกอบไปด้วยสายประมาณ 22-25 สาย ทำให้เกิดเป็นส่วนผลึกของเม็ดแป้ง ในการจับกันเป็นกลุ่มของ amylopectin ทำให้เกิดเป็นเกลียวคู่ (double helix) การเกิดเกลียวคู่ของ amylopectin ต้องใช้พันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ในการเชื่อมต่อกัน กิ่ง amylopectin ภายในเม็ดแป้งสามารถเกิดเป็นผลึกได้ ทั้งกิ่งที่อยู่ใกล้กันในกลุ่มเดียวกันหรือเกิดขึ้นระหว่างกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน.



รูปที่ 2.10 การต่อของกลูโคสใน amylopectin.

โครงสร้างเม็ดแป้ง เม็ดแป้งนอกจากจะประกอบด้วย α– glucan สองส่วนใหญ่ๆที่เรียกว่า amylase และ amylopectin คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 85-90 % โดยน้ำหนัก น้ำประมาณ10-15 % ไขมันประมาณ 1% และโปรตีนในระดับที่ต่ำ (<0.5 %) น้ำที่อยู่ในเม็ดแป้งมีอยู่ 3 รูปแบบ คือ น้ำในผลึกน้ำในรูป bound water และน้ำในรูปอิสระ โดยมีการจับกับแป้งได้แน่น ตามลำดับ. น้ำสามารถแพร่และผ่านเข้าไปในเม็ดแป้งได้อย่างอิสระ เม็ดแป้งประกอบด้วยรูพรุนจำนวนมากซึ่งทำหน้าที่เป็น molecular sieve แป้งดิบจะไม่ละลายในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเจลาติไนซ์ (gelatinization temperature) เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลแป้งที่อยู่ใกล้ๆ กันหรือ water bridges แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นสูงกว่า อุณหภูมิเจลาติไนซ์พันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย โมเลกุลของน้ำจะเข้ามาจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระ เม็ดแป้งเกิดการ

พองตัว ทำให้สมบัติการละลาย ความหนืดและความใสเพิ่มขึ้น เมื่อแป้งได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลาติไนเซชันแล้วให้ความร้อนต่อไป จะทำให้เม็ดแป้งพองตัวเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่พองตัวเต็มที่และแตกออก โมเลกุลของ amylose ขนาดเล็กจะกระจัดกระจายออกมาทำให้ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยให้เย็นตัว โมเลกุล amylose ที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล เกิดเป็นร่างแหสามมิติโครงสร้างใหม่ที่สามารถอุ้มน้ำและไม่มีการดูดซึมน้ำเข้ามาอีก มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดลักษณะเจลเหนียวคล้ายฟิล์มหรือผลึก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการเกิด retrogradation เมื่อทำให้อุณหภูมิต่ำลงไปอีกลักษณะการเรียงตัวของโครงสร้างจะแน่นมากขึ้นโมเลกุลอิสระของน้ำที่อยู่ภายในจะถูกบีบออกมา.

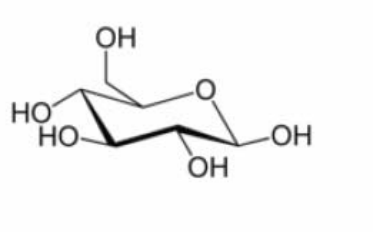
ตารางที่ 2. 7 ปริมาณ amylose และ ปริมาณ amylopectin ที่พบในแป้งแต่ละชนิด

ชนิดของแป้ง	% amylose	% amylopectin
แป้งข้าวเจ้า	17	83
แป้งข้าวเหนียว	0 - 2	98 - 100
แป้งมันสำปะหลัง	15	85
แป้งมันฝรั่ง	20	80
แป้งข้าวสาลี	28	72

2.7.3 คุณสมบัติและโครงสร้างของกลูโคส

กลูโคสเป็นสารประเภท monosaccharide หรือ simple sugar เป็นหนึ่งในสารประเภท carbohydrates ที่สำคัญในทางชีววิทยา ซึ่งเราสามารถพบกลูโคสในธรรมชาติได้จากหลายๆ ที่เช่น ในเซลล์ของเม็ดเลือด ในพืชสีเขียวที่เกิดจากการสังเคราะห์แสง โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และแสงแดด และมี chlorophyll ส่วนในด้านทางเคมี glucose สามารถสังเคราะห์ได้จากการนำแป้งมาย่อยด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้กรด เป็นต้น โครงสร้างของ glucose จะประกอบไปด้วยคาร์บอนอะตอมทั้งหมด 6 ตัวและหมู่ aldehyde รวมเรียกว่า aldohexose มี chemical formula คือ $C_6H_{12}O_6$ สามารถมีโครงสร้างได้ทั้งแบบ open chain (acyclic) และ ring (cyclic) form โดย ring form จะเป็นผลมาจากการเกิด intramolecular reaction ขึ้นระหว่างคาร์บอนอะตอมในหมู่ aldehyde กับคาร์บอนอะตอมตัวที่ 5 ของหมู่ hydroxyl เราจะพบโครงสร้างของ glucose ทั้ง 2 รูปแบบ อยู่ในสภาวะสมดุลกัน ในน้ำตาลพวก aldohexose จะมี 4 optical centers ทำให้เกิด 24 = 16 optical stereoisomers ซึ่งจะแบ่งเป็นกลุ่มได้ 2 กลุ่มคือ L และ D อย่างละ 8 isomers ซึ่งมี isomer ที่พบมากในชีวิตประจำวันคือ D-glucose (Glu) ,D-galactose (Gal) และ D-manose (Man) โดยในส่วนของ

D isomers เมื่อพิจารณาใน carbonatom ตัวที่ 1 พบว่าเมื่อเกิดเป็น cyclic form จะทำให้เกิดรูปแบบของวงแหวน 2 ชนิด ซึ่งเรียกว่าanomers แบ่งเป็น α–D-glucose และ β–D-glucose ทั้งสองโครงสร้างนี้มีความแตกต่างกันตรงการจัดเรียงตัวของหมู่ hydroxyl ที่ต่อกับคาร์บอนอะตอมตัวที่ 1 ในวงแหวน.



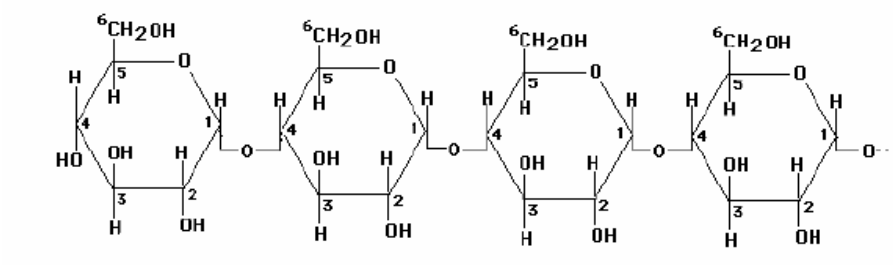
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของ glucose.

2.7.4 กลไกการย่อยแป้ง

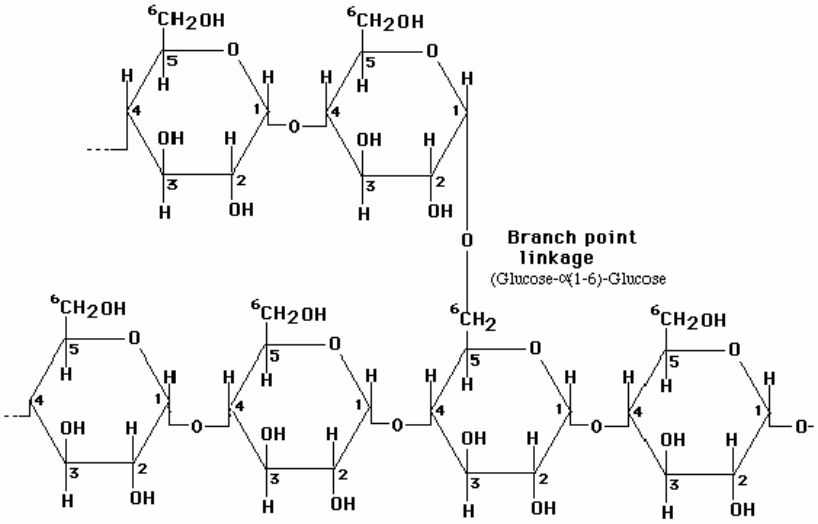
การย่อยแป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้:

1. การเจลาติไนเซชั่น (Gelatinization) เป็นขั้นตอนที่ทำให้เม็ดแป้งพองตัว โดยเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำขณะที่ได้รับความร้อนทำให้เม็ดแป้งพองตัว เรียกอุณหภูมิช่วงนี้ว่า อุณหภูมิการเกิดเจล (gelatinization temperature).

2. การเกิดลิเคอแฟคชัน (Liquefaction) เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจลโดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของลูกโซ่กลูโคส ทำให้แยกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีความหนืดลดลง กว่า 30 ปีที่ผ่านมามีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแทนการใช้กรดย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า.



รูปที่ 2.12 โครงสร้างอะไมโลส.



รูปที่ 2.13 โครงสร้างอะไมโลเพกติน.

3. การเกิดแซ็กคาริฟิเคชัน (Saccharification) เป็นขั้นตอนการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ภายหลังการย่อยจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว, น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่า ผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส, มอลโตส หรือมอลโตไตรโอส.

2.7.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง

แหล่งของเอนไซม์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดด้วยกัน แบ่งออกได้ 4 กลุ่ม ดังนี้:

1. endoamylase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลแป้ง จะตัดพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิกระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของแอลฟาอะไมเลส คือ oligosaccharide และ α-limit-dextrins.

2. exoamylase เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ กลูโคอะไมเลส เบต้าอะไมเลส และแอลฟากลูโคซิเดส ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุลกลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากกลูโคสเพียงอย่างเดียวเมื่อใช้กลูโคอะไมเลส และแอลฟากลูโคซิเดส หรือได้มอลโตสและ β-limit-dextrin เมื่อใช้บีต้าอะไมเลส.

3. debranching enzyme เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ α-1,6 กลูโคซิดิก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซอะไมเลสและพูลูแลนเนส การทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้โดยการย่อยพันธะกิ่งของอะไมโลเพคติน หรือการย่อยพันธะ α-1,6 กลูโคซิดิก ในพูลูแลน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นโพลิแซ็กคาไรด์.

4. transferase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับ α-1,4 กลูโคซิดิก ของ donor molecule และเปลี่ยนส่วนของ donor เพื่อเป็น glycosidic acceptor ซึ่งเป็นการสร้างพันธะกลูโคซิดิกใหม่ เอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ amylomaltase และ Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase) ซึ่งจะใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน โดยการสร้าง cyclic oligosaccharide ที่มีกลูโคส 7-8 หน่วย.

ตารางที่ 2. 8 เอนไซม์ : แหล่งของจุลินทรีย์และคุณสมบัติบางประการ

Microbial sources	Molecular weight	Optimum temp. (^{0}C)
α-amylase		
Bacillus subtilis	41,000	
B. amyloliquefaciens	49,000	70
B. licheniformis	62,000	90
β-amylase		
B. cereus	35,000	50
B. circulans	53-63,000	60
Pseudomonas sp. BQ 6	37,000	45-55
Glucoamylase		
Aspergillus awamori	83,700-88,000	60
A. niger I	99,000	
A. oryzae I	76,000	60
A. oryzae II	38,000	40
Penicillum oxalicum I	84,000	55-60
Rhizopus delemar	100,000	40
Pullulanases		
Aerobacter aerogenes	114,300	50
B. polymyxa	48,000	60
Streptomyces sp. no. 280		5

ที่มา: Nigam and Singh , 1195

2.8 แอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล (α - glucosyl glycerol : Glc - GL)

สารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล เกิดขึ้นจากการก่อพันธะระหว่างกลีเซอรอล 1 โมเลกุลกับน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไป โดยใช้เอนไซม์ Cyclomaltodextrin glucanotransferase จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สารชนิดนี้มีคุณสมบัติสามารถจับกับเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลาย ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยและดูดซึมน้ำตาลลดลง มีความหวานต่ำกว่าน้ำตาลทราย 50% ละลายน้ำได้ดี ไม่ให้พลังงาน มีความคงตัวสูง สามารถทนความร้อนขณะประกอบอาหารได้โดยไม่เสียสภาพ ไม่มีผลต่อโรคกระดูกผุ (carcinogenicity) ปฏิกิริยาการเกิดแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอลเป็นดังนี้:

Maltose **Alpha - Glucosyl**

glycerol

[Glucose – Glucose] + Glycerol ⇨ Glucose – Glucose – Glycerol]

Cyclomaltodextrin glucanotransferas

รูปที่ 2.14 ปฏิกิริยาการเกิดแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล.

ตัวอย่างการสังเคราะห์ Glc-GL โดยใช้เอนไซม์ CGTase มีดังนี้

Nakano *et.al.* (2003). ได้ทำการศึกษาวิจัยถึงการสังเคราะห์ไกลโคซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินกลูคาโนแทรนส์เฟอเรส (Cyclodextrin Glucanotransferases : CGTase) โดยมีรายละเอียด ดังนี้:

Glycerol จะถูก transglycosylate โดยเอนไซม์ CGTase ใช้แป้งเป็นสารตั้งต้นและใช้เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Geobacillus stearothermophilus* และ*Thermoanaerobacter* sp. ซึ่งเหมาะที่จะใช้ในกระบวนการ transglycosylation ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีหลายตัว โดยที่โครงสร้างทั่วไปของแต่ละตัวจะประกอบด้วย กลูโคสต่อกันด้วยพันธะ α -1 , 4 - linked maltooligosyl. ส่วนโมเลกุลของกลูโคสที่เหลืออยู่จะยึดเกาะกับกลีเซอรอลจับกันด้วย O-α-D -glucosyl - (1→ 1) - glycerol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักและ O–α–D-glucosy -(1 → 2)-glycerol ซึ่งเป็นองค์ประกอบรอง. สำหรับกระบวนการนี้น้ำตาลรีดิวซ์จะผลิตขึ้นน้อยมาก อุณหภูมิที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *G.stearothermophilus* และ *Thermoanaerobacter* sp. อยู่ที่ประมาณ 60°ซ. และ 80°ซ. ตามลำดับ. ใช้การทำปฏิกิริยาด้วย 30% (w/v) glycerol และ 20% (w/v). น้ำแป้ง ที่เหมาะสำหรับกระบวนการ transglycosylation นอกจากนี้ maltosyl และ maltotriosyl glycerols ยังยับยั้งเอนไซม์ α- amylase จากตับอ่อน.

เมื่อไม่นานมานี้ O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) ถูกพบในอาหารหมักดั้งเดิมของญี่ปุ่นเช่น เหล้าสาเก, เต้าเจี้ยว, เหล้ามิริน ตัวอย่างของ O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) ที่พบในเหล้าสาเกมีความเข้มข้นประมาณ 0.5%, ซึ่งช่วยในเรื่องของรสชาติอาหารให้มีรสชาติดีขึ้น เป็นชนิด non reducing glucoside โดยมีจะหวานเป็นครึ่งหนึ่งของน้ำตาลซูโครส มีความเสถียรสูง เกิดสีที่ความร้อนต่ำและมีการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่ำ, การดูดความชื้นต่ำ มีความสามารถในการยึดจับกับน้ำสูง ไม่ทำให้เกิดฟันผุและย่อยได้น้อย. ในการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase จากลำไส้หนู ซึ่ง O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) นี้ จะถูกนำไปใช้งานในอาหาร

ทั่วไป เช่น พวกเครื่องดื่ม เครื่องสำอางบางอย่าง. นอกจากนี้ O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL), สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ในลำไส้ของหนู ดังนั้น O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) จึงถูกนำไปใช้เป็นสารให้ความหวานที่มีแคลอรีต่ำ.

การสังเคราะห์ O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) โดยใช้ *Candida tropicalis* ในช่วงแรกจะเปลี่ยนโครงสร้างหลักของแป้งและเด็กซ์ทรินไปยังตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 ของกลีเซอรอล และ O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) พบในอาหารหมักที่มีคุณภาพดี เช่น Koji – mold ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ transglycosylation ส่วนกลีเซอรอลและมอลโตสถูกสังเคราะห์ได้โดยใช้เอนไซม์ α-glucosidase ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* เพื่อศึกษาเอนไซม์ cyclodextrin glucanotransferases (CGTases) ในกระบวนการ transglycosylation โดยใช้กลีเซอรอลและแป้งเพื่อสังเคราะห์ O-α-D-glucosyl glycerol (Glc-GL) และยังได้ผลิตภัณฑ์จำพวก maltooligosaccharide อีกด้วย และศึกษาถึงปฏิกิริยาจากกระบวนการนี้ว่าจะทำให้เกิด reducing sugar ต่ำกว่ากระบวนการเดิมที่ใช้เอนไซม์ α-glucosidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหรือไม่. นอกจากนี้ยังศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α- amylase จากตับอ่อนโดย glucosylated glycerol.

3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- *Bacillus circulans* TISTR 1923.
- *Bacillus* sp. TISTR 908.

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient Agar (NA) ยี่ห้อ HIMEDIA.
- Nutrient Broth (NB) ยี่ห้อ HIMEDIA.
- อาหาร Horikoshi medium (HS).
- อาหาร Nutrient Broth Modified (NBM).

3.3 สารเคมี

- 0.5 M sodium hydroxide (NaOH) .
- Amylose.
- 0.5 M glycine – sodium hydroxide buffer [pH 9].
- 0.5 M acetic acid.
- Iodine reagent.
- 50 mM acetate buffer (pH 6).
- Soluble starch.
- Yeast extract.
- Peptone.
- K_2HPO_4
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.
- NaCl.
- Glycerol 87%.
- Ethanol 95%.
- 50 mM TEAH (Tetraethylammonium hydroxide).
- 0.1 M HCl.

- Hexane .
- $NaIO_4$
- Ammonium acetate.
- Acetylacetone.
- Isopropanol.
- โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI).
- Iodine (I_2).

3.4 เครื่องมือ

- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture) รุ่น KMC – 1300V.
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น CTL 101.
- เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Seriker II.
- Hot plate stirrer รุ่น HTS – 1003.
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ memmert รุ่น UNB.
- ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Scientific รุ่น Series 2000.
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น series 2000.
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) รุ่น VS – 8480SPN.
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ Yamato รุ่น SP 300.
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Colony counter) รุ่น 8502-2092.
- เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) รุ่น 1539931.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ FX – 2000i.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius A 200S.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงระบบทำความเย็น รุ่น Suprema 25.
- เครื่องวัดค่าการหักเหของแสง (Spectrophotometer) รุ่น UVIKON 2.
- ตู้ดูดควัน (Hood).
- Magnetic stirrer.
- เครื่องกลั่น ระเหยแห้ง (Evaporator).
- เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น HP 0021-45.

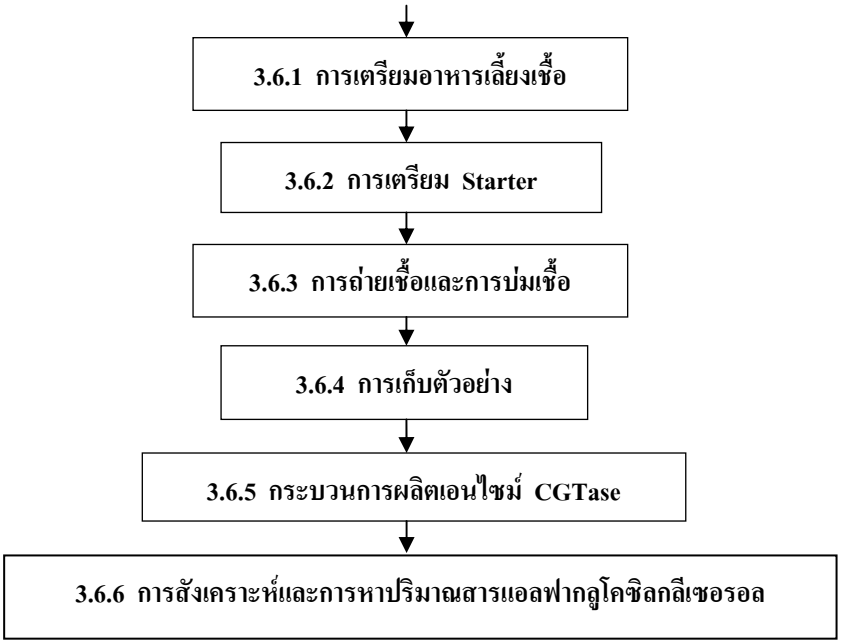
3.5 วัสดุและอุปกรณ์

- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50 100 250 500 1000 มล.
- จานเลี้ยงเชื้อ (Plate) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.
- ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 200 500 มล.
- หลอดทดลองฝาเกลียว (Test tube) ขนาด 20 มล.
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 25 100 150 250 4,000 5,000 มล.
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 150 200 250 500 1,000 มล.
- ขวดแก้วปากกว้างฝาเกลียว ขนาด 500 1,000 มล.
- หลอดเก็บตัวอย่าง Appendrop ขนาด 2 มล.
- ขวดน้ำกลั่น.
- ไมโครปิเปต (Micropipette).
- ตะเกียงแอลกอฮอล์.
- ฟอยละอลูมิเนียม.
- เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop).
- กระดาษกรอง เบอร์ 2.
- กระบอกฉีดพ่นแอลกอฮอล์ (Foggy).
- นาฬิกาจับเวลา.
- แท่งแก้วกวนสาร.

3.6 วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองสำหรับการศึกษาในครั้งนี้เป็นไปตามแผนผังดังต่อไปนี้:

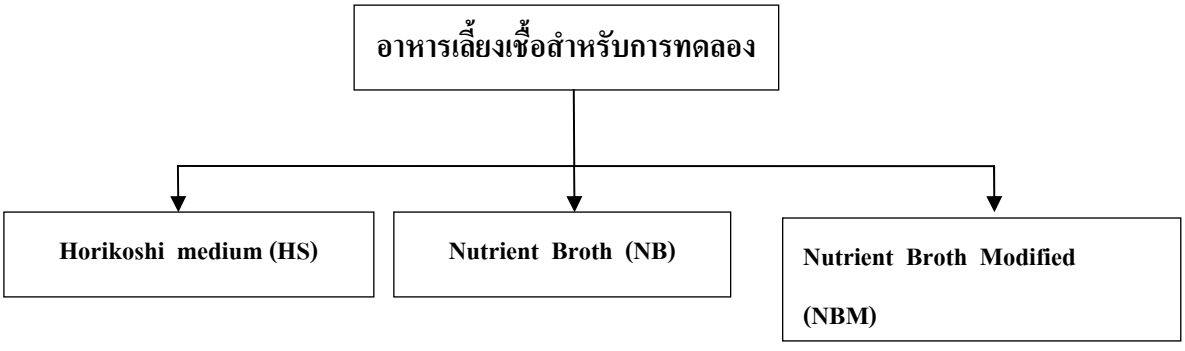
แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์	(*Bacillus circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908)
อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด	(Horikoshi medium (HS) Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Broth Modified (NBM))
อุณหภูมิ 2 ค่า	(30 °ซ. และ 37 °ซ.)



รูปที่ 3. 1 สรุปขั้นตอนการทดลอง.

3.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาในครั้งนี้เป็นไปตามแผนผังดังต่อไปนี้

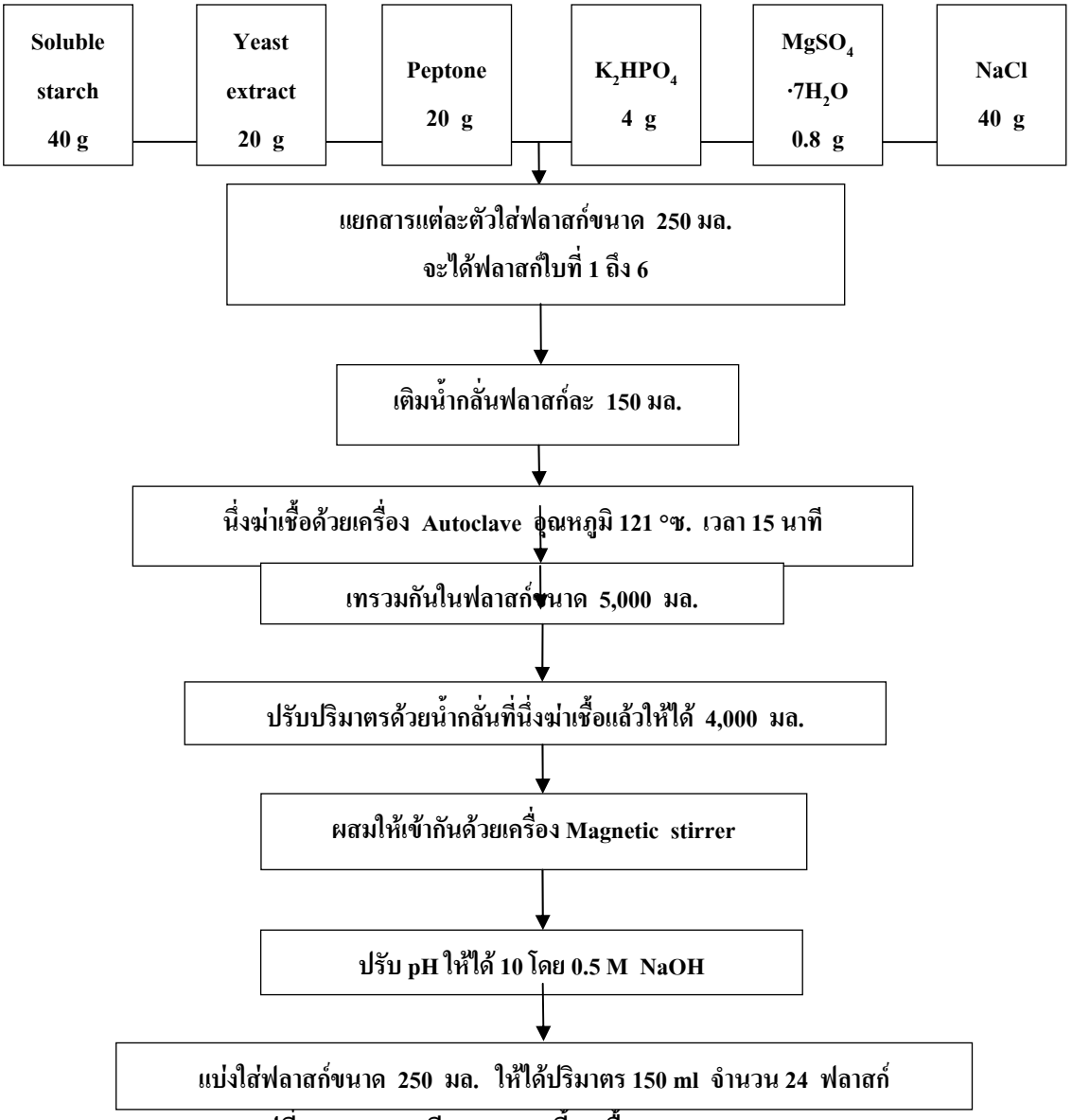


รูปที่ 3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.

3.6.1.1 การทดสอบการเจริญเติบโตและการสร้าง CGTase ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS)

1. ชั่งสารดังต่อไปนี้ Soluble starch 40 g, Yeast extract 20 g, Peptone 20 g, K_2HPO_4 4 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8 g, NaCl 40 g โดยแยกสารแต่ละตัวใส่ฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มล. , จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในแต่ละฟลาสก์ ปริมาตร 150 มล. จะได้ทั้งหมด 6 ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำสารดังกล่าวมาผสมกันในฟลาสก์ขนาด 5,000 มล. และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตร 4,000 มล. กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer.

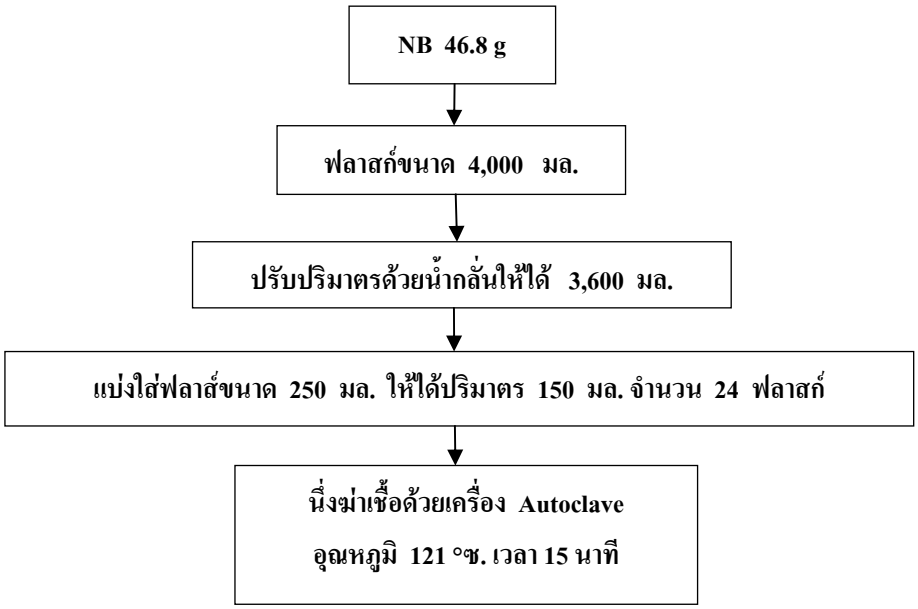
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS มาปรับ pH ให้ได้ 10 โดยใช้ 0.5 M NaOH เมื่อได้ pH 10 แล้วแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้ได้ปริมาตร 150 มล. จำนวน 24 ฟลาสก์.



รูปที่ 3. 3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS.

3.6.1.2 การทดสอบการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient Broth (NB)

เตรียมอาหาร NB ปริมาตร 3,600 มล. แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้ได้ปริมาตร 150 มล. จำนวน 24 ฟลาสก์ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น จะได้ค่า pH ที่ 7.45.

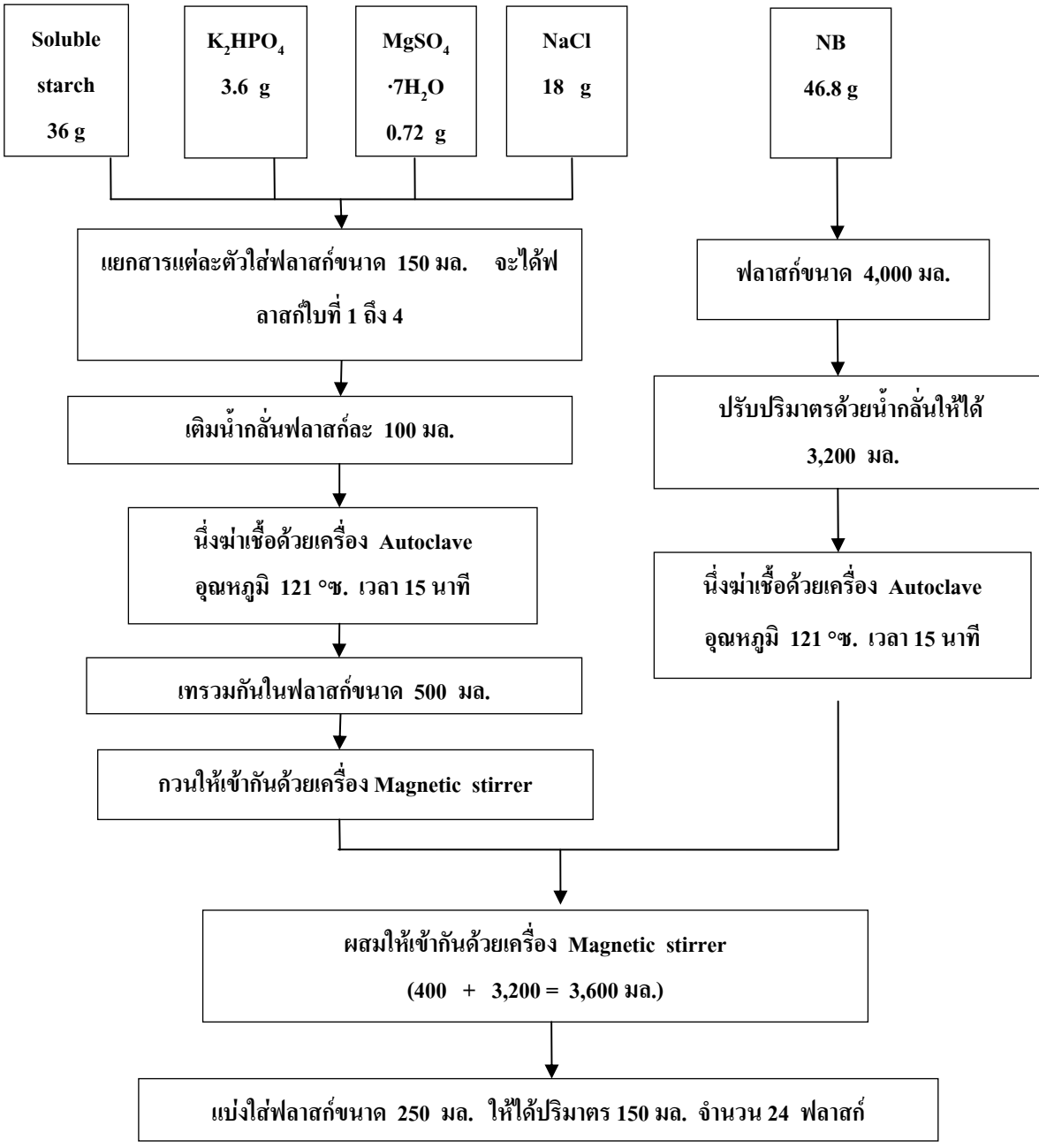


รูปที่ 3. 4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB.

3.6.1.3 การทดสอบการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient Broth Modified (NBM)

1. ชั่งสารดังต่อไปนี้ Soluble starch 36 g, K_2HPO_4 3.6 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.72 g, NaCl 18 g โดยแยกสารแต่ละตัวใส่ฟลาสก์ขนาด 150 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในแต่ละ ฟลาสก์ปริมาตร 100 มล. จะได้ทั้งหมด 4 ฟลาสก์, นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave อุณหภูมิ 121° ซ. เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น. จากนั้นนำสารดังกล่าวมาผสมกันในฟลาสก์ขนาด 500 มล. กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer แล้วนำไปเทผสมลงในฟลาสก์อาหาร NB ซึ่งเตรียมด้วยวิธีดังข้อที่ 2.

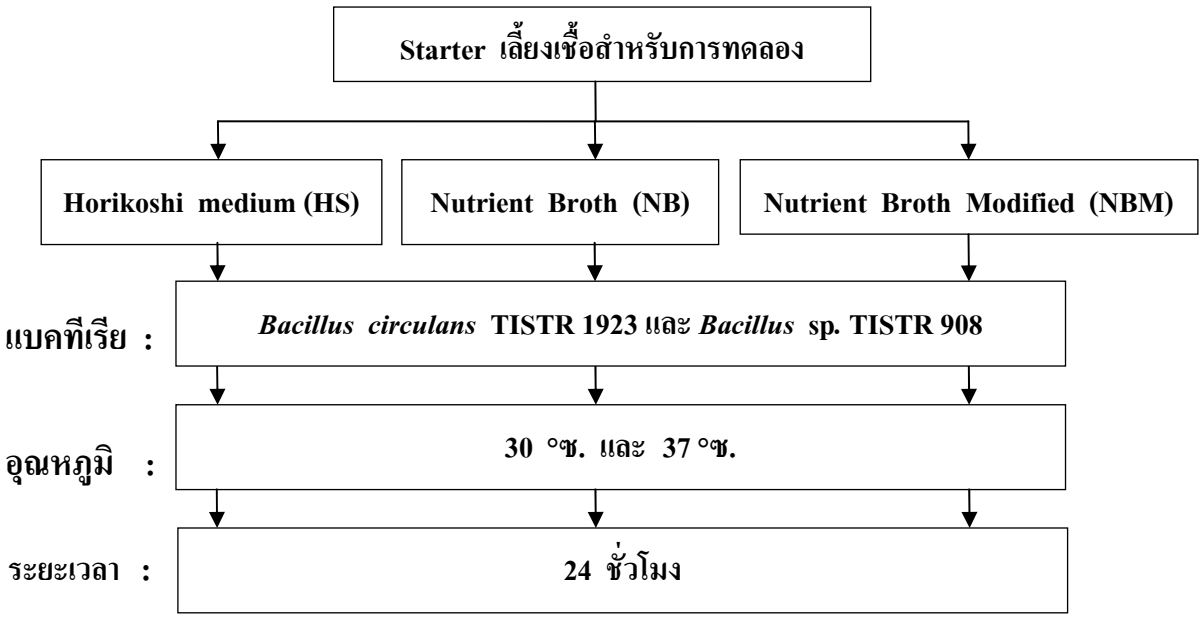
2. เตรียมอาหาร NB ปริมาตร 3,600 ml แต่ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 3,200 มล. ใส่ในฟลาสก์ขนาด 4,000 มล., จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที, เมื่อครบเวลาแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น. จากนั้นนำสารที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 มาเทผสม กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer แล้วแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้ได้ปริมาตร 150 ml จำนวน 24 ฟลาสก์.



รูปที่ 3. 5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM.

3.6.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย (Starter)

การเตรียม Starter สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามแผนผังดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.6 สรุปขั้นตอนการเตรียม Starter.

3.6.2.1 Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS)

1. ชั่งสารดังต่อไปนี้ Soluble starch 4 g, Yeast extract 2 g, Peptone 2 g, K_2HPO_4 0.4 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08 g, NaCl 4 g. โดยแยกสารแต่ละตัวใส่ฟลาสก์ขนาด 150 มล. จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในแต่ละฟลาสก์ ปริมาตร 60 มล. จะได้ทั้งหมด 6 ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำสารดังกล่าวมาผสมกันในฟลาสก์ขนาด 1,000 มล. และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตร 400 มล.กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer.

2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS มาปรับ pH ให้ได้ 10 โดยใช้ 0.5 M NaOH เมื่อได้ pH 10 แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 20 มล. ให้ได้ปริมาตร 15 มล. จำนวน 24 หลอด.

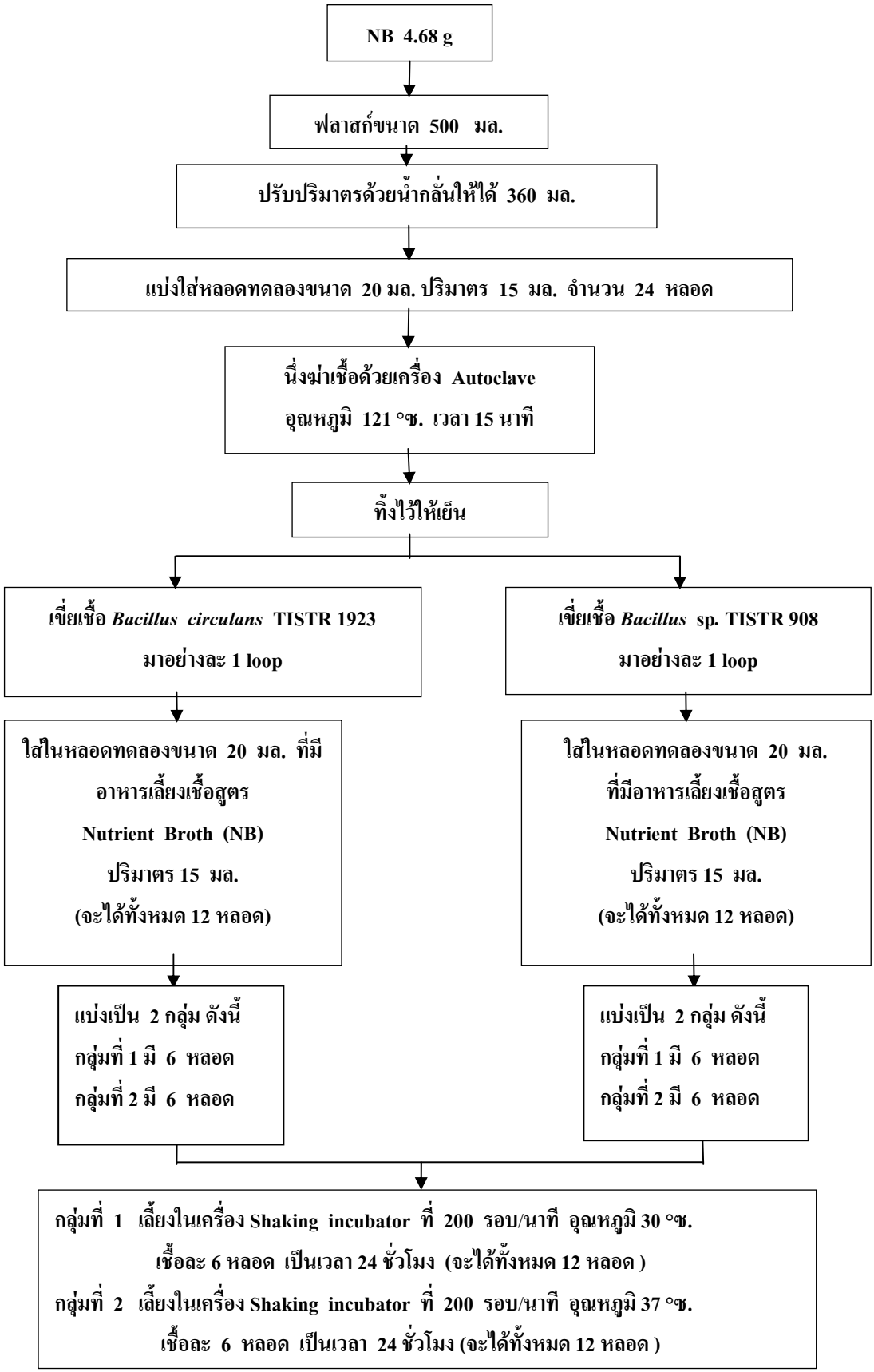
3. เขี่ยเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 มาอย่างละ 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS ที่ใส่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 20 มล. ปริมาตร 15 มล. จำนวน 12 หลอด แล้วแยกเลี้ยงในเครื่อง Shaking incubator ที่ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 หลอด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ให้ทำเช่นเดียวกัน.

รูปที่ 3.7 การเตรียม Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS.

3.6.2.2 Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB

1. เตรียมอาหาร NB ปริมาตร 360 มล. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 20 มล. ให้ได้ปริมาตร 15 มล. จำนวน 24 หลอด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น จะได้ค่า pH 7.45.

2. เขี่ยเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 มาอย่างละ 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB ที่ใส่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 20 มล. ปริมาตร 15 มล. จำนวน 12 หลอด แล้วแยกเลี้ยงในเครื่อง Shaking incubator ที่ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 หลอด เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ให้ทำเช่นเดียวกัน.



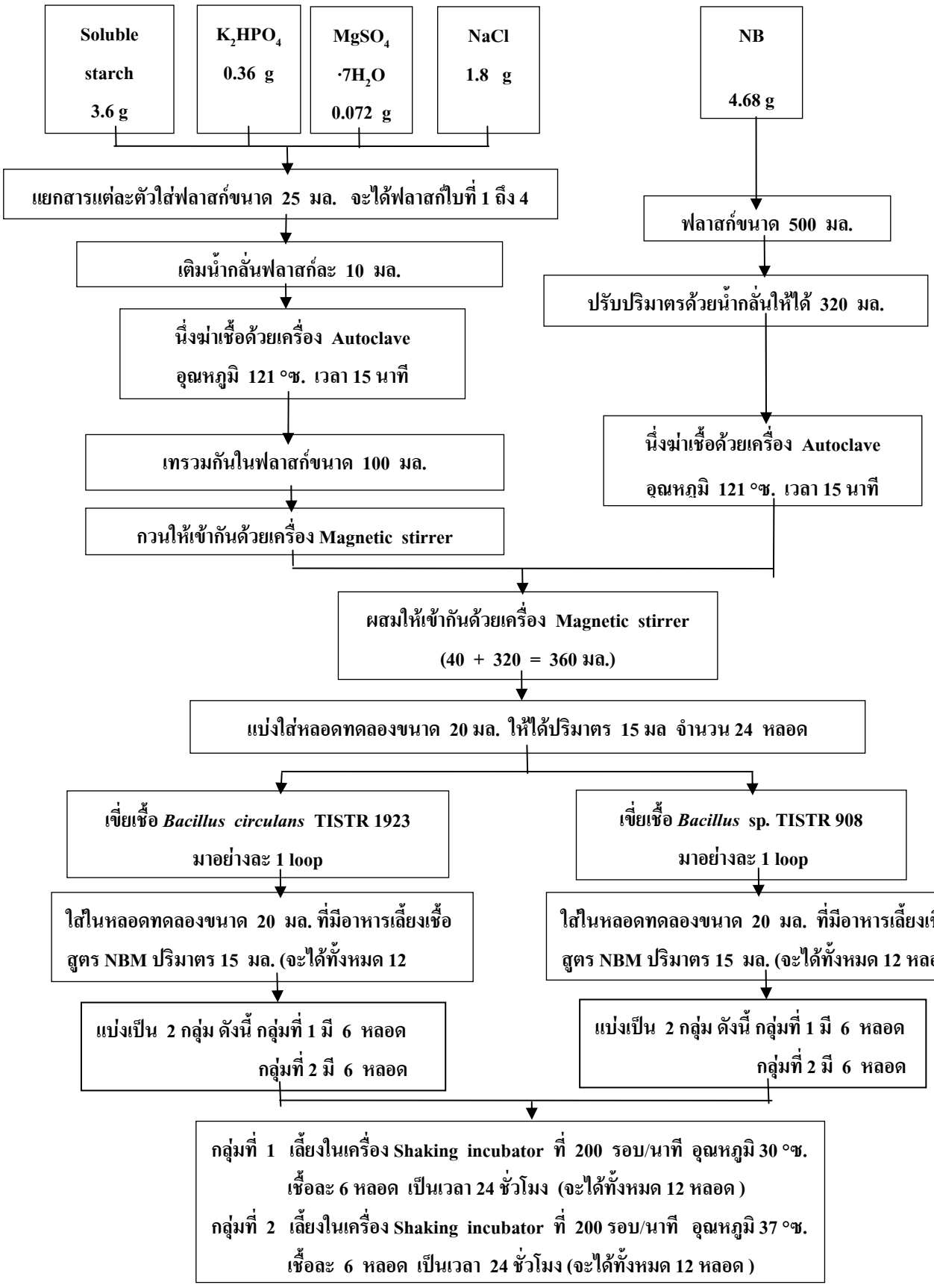
รูปที่ 3.8 การเตรียม Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB.

3.6.2.3 Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient Broth Modified (NBM)

1. ชั่งสารดังต่อไปนี้ Soluble starch 3.6 g, K_2HPO_4 0.36 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.072 g, NaCl 1.8 g. โดยแยกสารแต่ละตัวใส่ฟลาสก์ขนาด 25 มล. จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในแต่ละฟลาสก์ ปริมาตร 10 มล. จะได้ทั้งหมด 4 ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น. จากนั้นนำสารดังกล่าวมาผสมกันในฟลาสก์ขนาด 100 มล. กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer แล้วนำไปเทผสมลงในฟลาสก์อาหาร NB ซึ่งเตรียมด้วยวิธีดังข้อที่ 2.

2. เตรียมอาหาร NB ปริมาตร 360 มล. แต่ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 320 มล. ใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น. จากนั้นนำสารที่เตรียมในข้อที่ 1 มาเทผสม กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 20 มล. ให้ได้ปริมาตร 15 มล. จำนวน 24 หลอด.

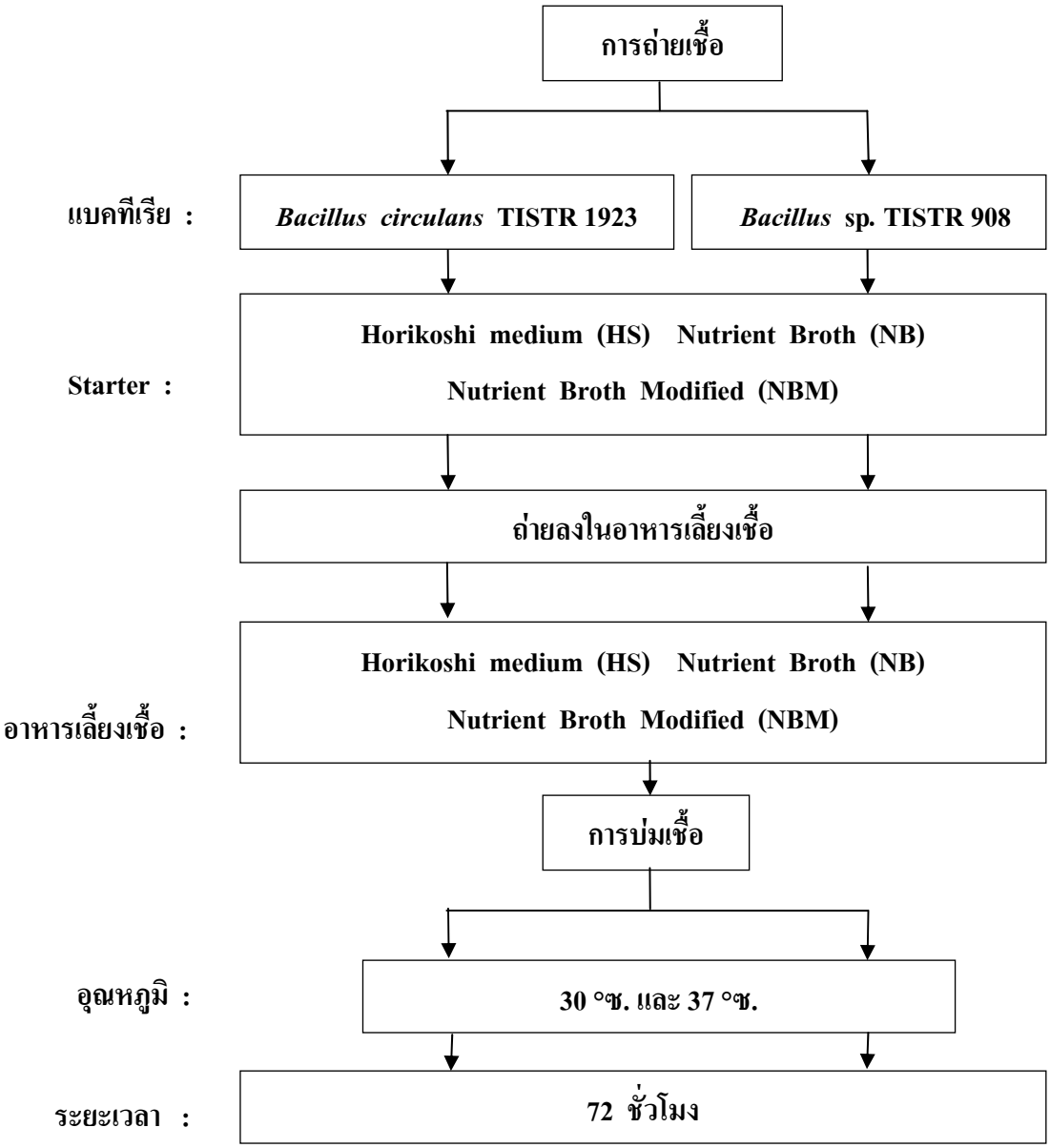
3. เขี่ยเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 มาอย่างละ 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM ที่ใส่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 20 มล. ปริมาตร 15 มล. จำนวน 12 หลอด แล้วแยกเลี้ยงในเครื่อง Shaking incubator ที่ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 หลอด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ให้ทำเช่นเดียวกัน.



รูปที่ 3. 9 การเตรียม Starter อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM.

3.6.3 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อ

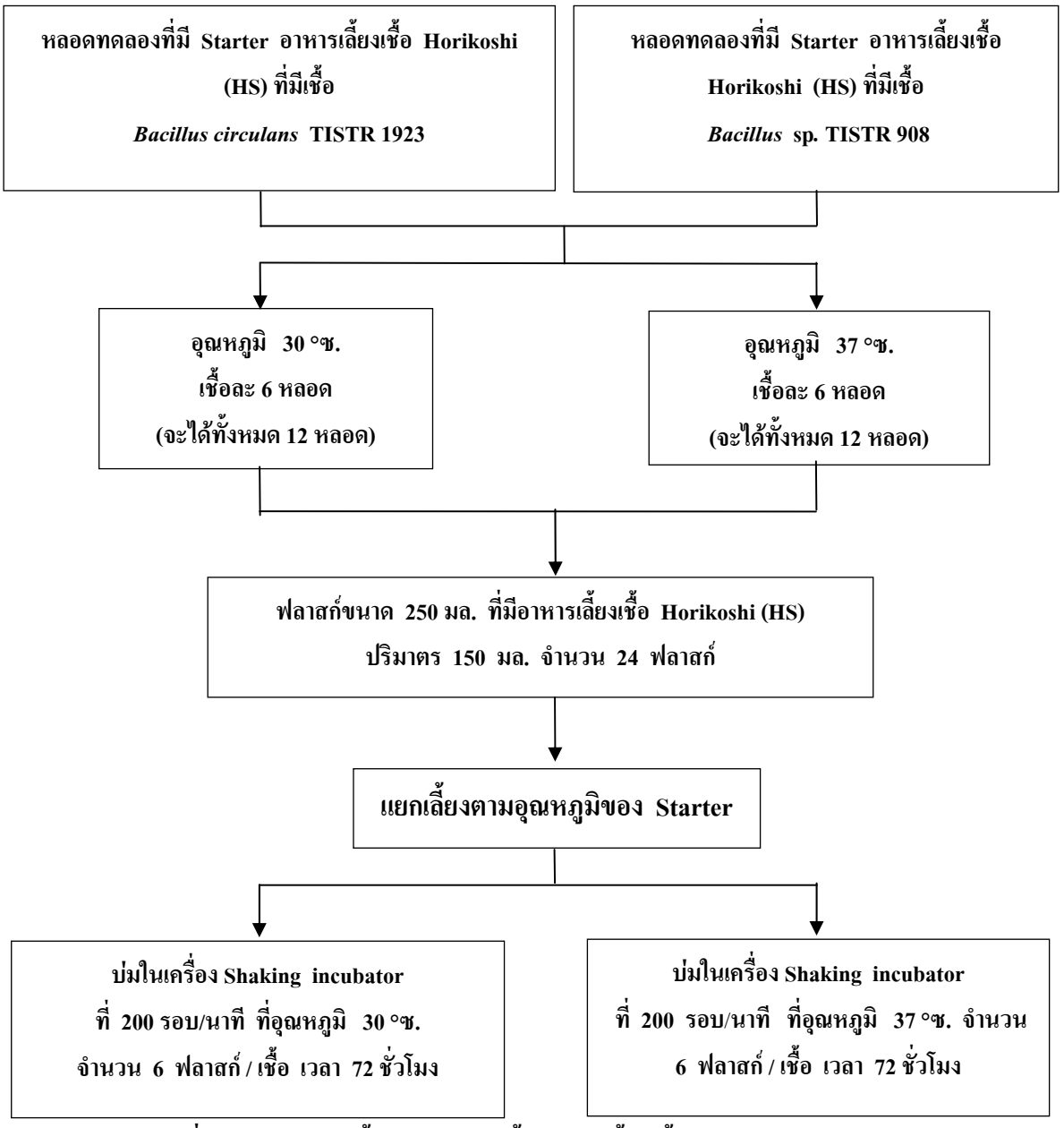
การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อสำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามแผนผังดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.10 สรุปขั้นตอนการถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อ.

3.6.3.1 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS)

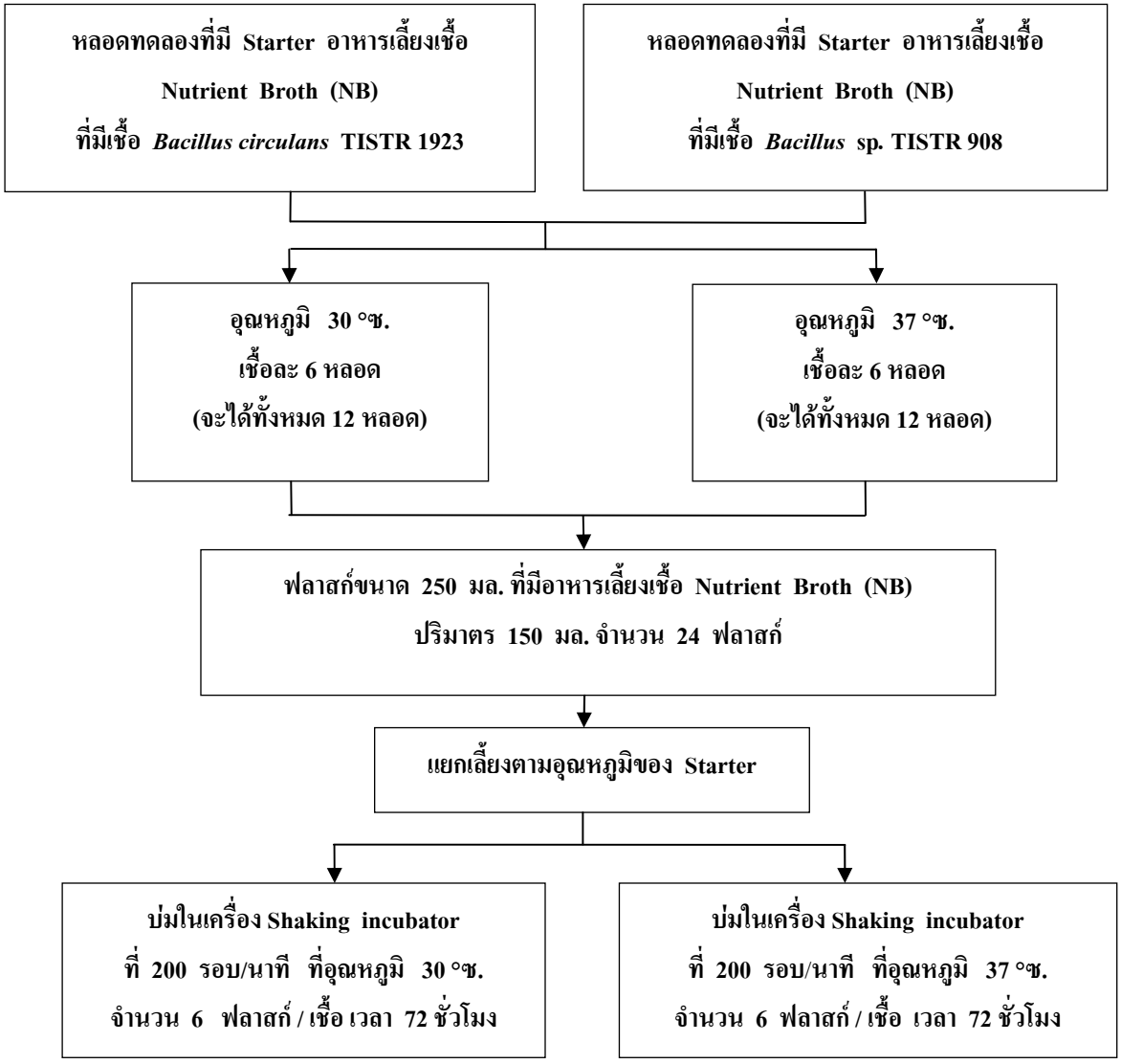
นำหลอดทดลองที่มี Starter อาหารเลี้ยงเชื้อ HS ที่มีเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 จำนวน 12 หลอด ที่แยกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 หลอด, มาถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงสูตร HS ปริมาตร 150 ml จำนวน 12 ฟลาสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 ฟลาสก์ โดยแยกเลี้ยงในเครื่อง Shaking incubator ที่ 200 รอบ/นาที ตามอุณหภูมิของ Starter ที่ใส่ลงไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับหลอดทดลองที่มี Starter อาหารเลี้ยงเชื้อ HS ที่มีเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ให้ทำเช่นเดียวกัน.



รูปที่ 3. 11 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS.

3.6.3.2 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB

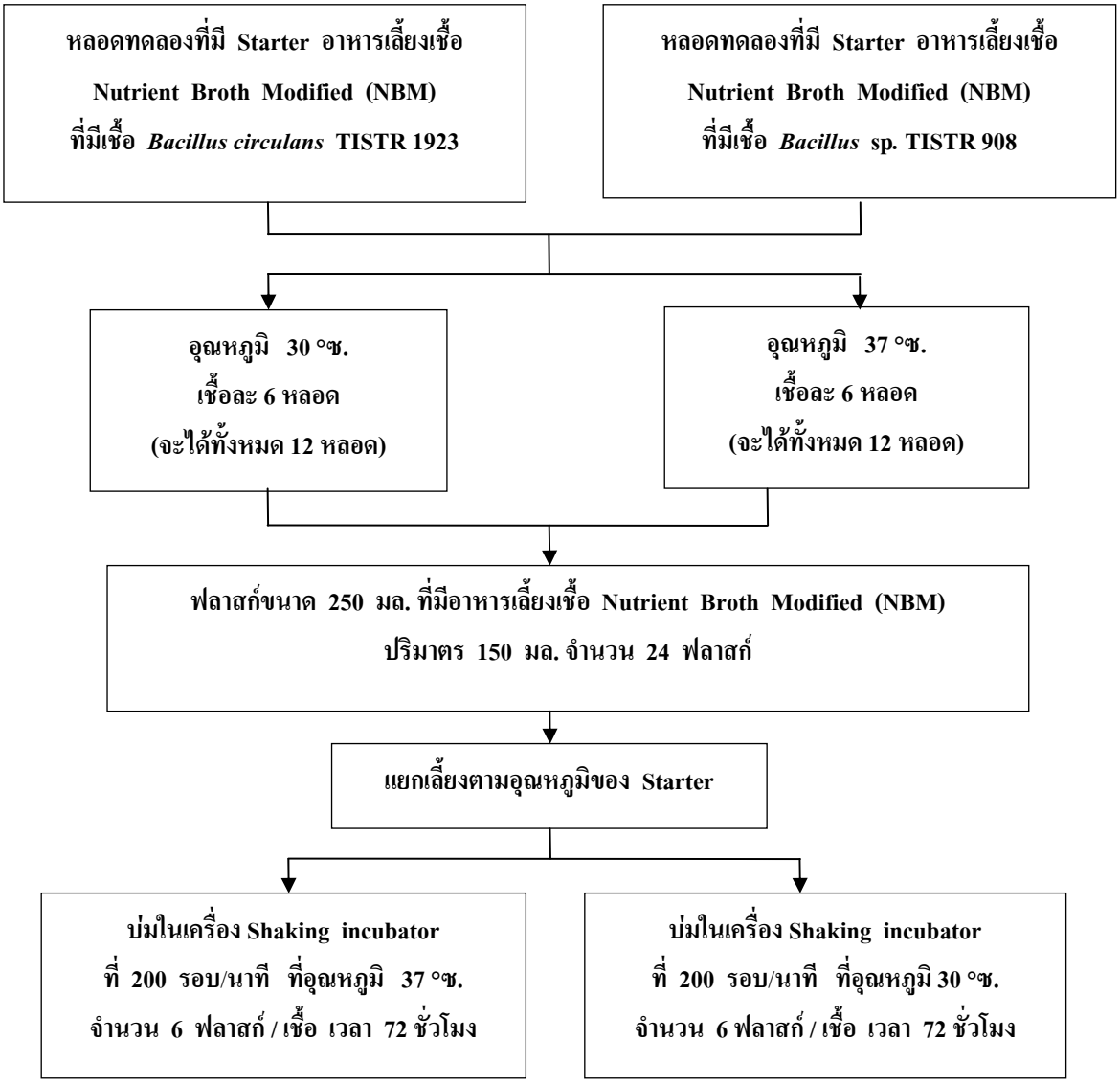
นำหลอดทดลองที่มี Starter อาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 จำนวน 12 หลอด ที่แยกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 หลอด, มาถ่ายใส่ ฟลาสก์ขนาด 250 มล., ที่บรรจุอาหารเลี้ยงสูตร NB ปริมาตร 150 มล. จำนวน 12 ฟลาสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 ฟลาสก์. โดยแยกเลี้ยงในเครื่อง Shaking incubator ที่ 200 รอบ/นาที ตามอุณหภูมิของ Starter ที่ใส่ลงไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง. สำหรับหลอดทดลองที่มี Starter อาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ให้ทำเช่นเดียวกัน.



รูปที่ 3. 12 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB.

3.6.3.3 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM

นำหลอดทดลองที่มี Starter อาหารเลี้ยงเชื้อ NBM ที่มีเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 จำนวน 12 หลอด ที่แยกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37°ซ. อย่างละ 6 หลอด มาถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหารเลี้ยงสูตร NBM ปริมาตร 150 ml จำนวน 12 ฟลาสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. อย่างละ 6 ฟลาสก์ โดยแยกเลี้ยงในเครื่อง Shaking incubator ที่ 200 รอบ/นาที ตามอุณหภูมิของ Starter ที่ใส่ลงไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับหลอดทดลองที่มี Starter อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth Modified (NBM) ที่มีเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ให้ทำเช่นเดียวกัน.



รูปที่ 3. 13 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NBM.

3.6.4 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างสำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามแผนผังดังต่อไปนี้

รูปที่ 3. 14 สรุปขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง.

การเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS)

- เชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. มีทั้งหมด 6 ฟลาสก์ โดยแบ่งออกเป็น 2 ซ้ำ (3 ฟลาสก์ x 2 ซ้ำ) โดยทำการเก็บตัวอย่างดังนี้

- **ฟลาสก์ที่ 1** เก็บตัวอย่างมาวัดค่าการเจริญเติบโต ชั่วโมงที่ 0 3 6 12 24
  เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอนไซม์และค่า pH ชั่วโมงที่ 0 12 24
- **ฟลาสก์ที่ 2** เก็บตัวอย่างมาวัดค่าการเจริญเติบโต ชั่วโมงที่ 36 48
  เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอนไซม์และค่า pH ชั่วโมงที่ 36 48
- **ฟลาสก์ที่ 3** เก็บตัวอย่างมาวัดค่าการเจริญเติบโต ชั่วโมงที่ 60 72
  เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอนไซม์และค่า pH ชั่วโมงที่ 60 72

- เชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS) ที่อุณหภูมิ 30 **°ซ.** ทั้งหมด 6 ฟลาสก์ โดยแบ่งออกเป็น 2 ซ้ำ (3 ฟลาสก์ x 2 ซ้ำ) โดยทำการเก็บตัวอย่างดังนี้:

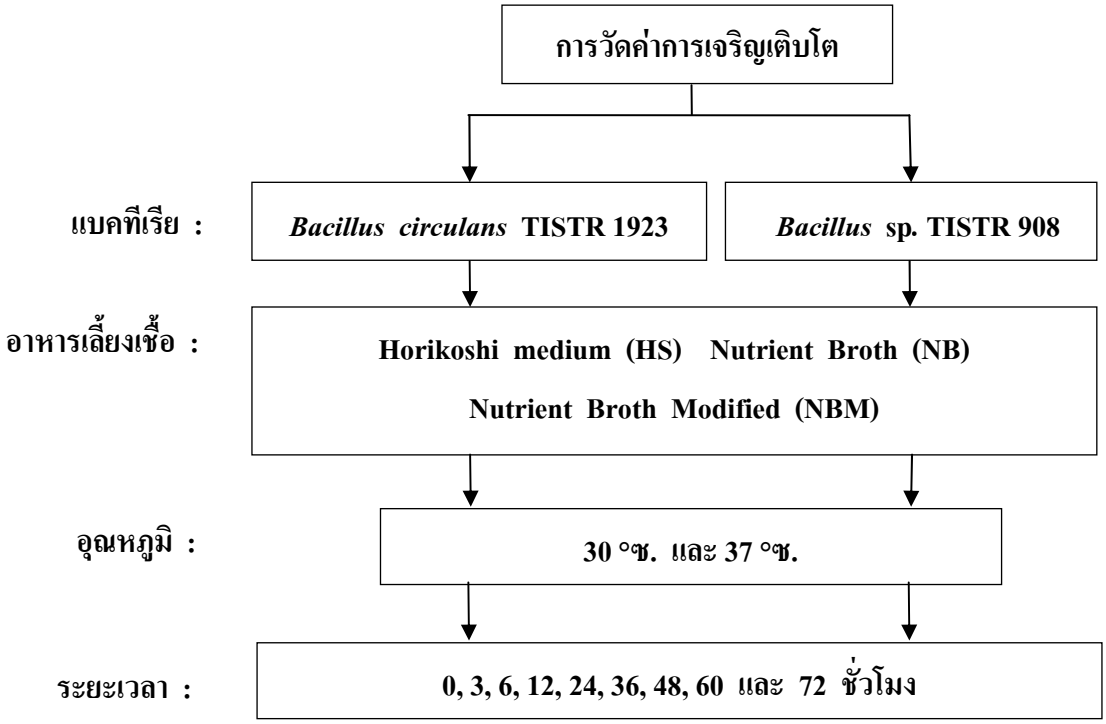
- **ฟลาสก์ที่ 1** เก็บตัวอย่างมาวัดค่าการเจริญเติบโต ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12 และ24
  เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอนไซม์และค่า pH ชั่วโมงที่ 0, 12 และ 24
- **ฟลาสก์ที่ 2** เก็บตัวอย่างมาวัดค่าการเจริญเติบโต ชั่วโมงที่ 36 และ 48
  เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอนไซม์และค่า pH ชั่วโมงที่ 36 และ 48
- **ฟลาสก์ที่ 3** เก็บตัวอย่างมาวัดค่าการเจริญเติบโต ชั่วโมงที่ 60 และ 72

เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณเอนไซม์และค่า pH ชั่วโมงที่ 60 และ 72

หมายเหตุ: อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS ที่มีเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 และเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ให้ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น
สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB และ NBM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มีจำนวน ฟลาสก์เท่ากัน ทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกัน.

3.6.4.1 วิธีวัดค่าการเจริญเติบโต

วิธีวัดค่าการเจริญเติบโตสำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามแผนผังดังต่อไปนี้

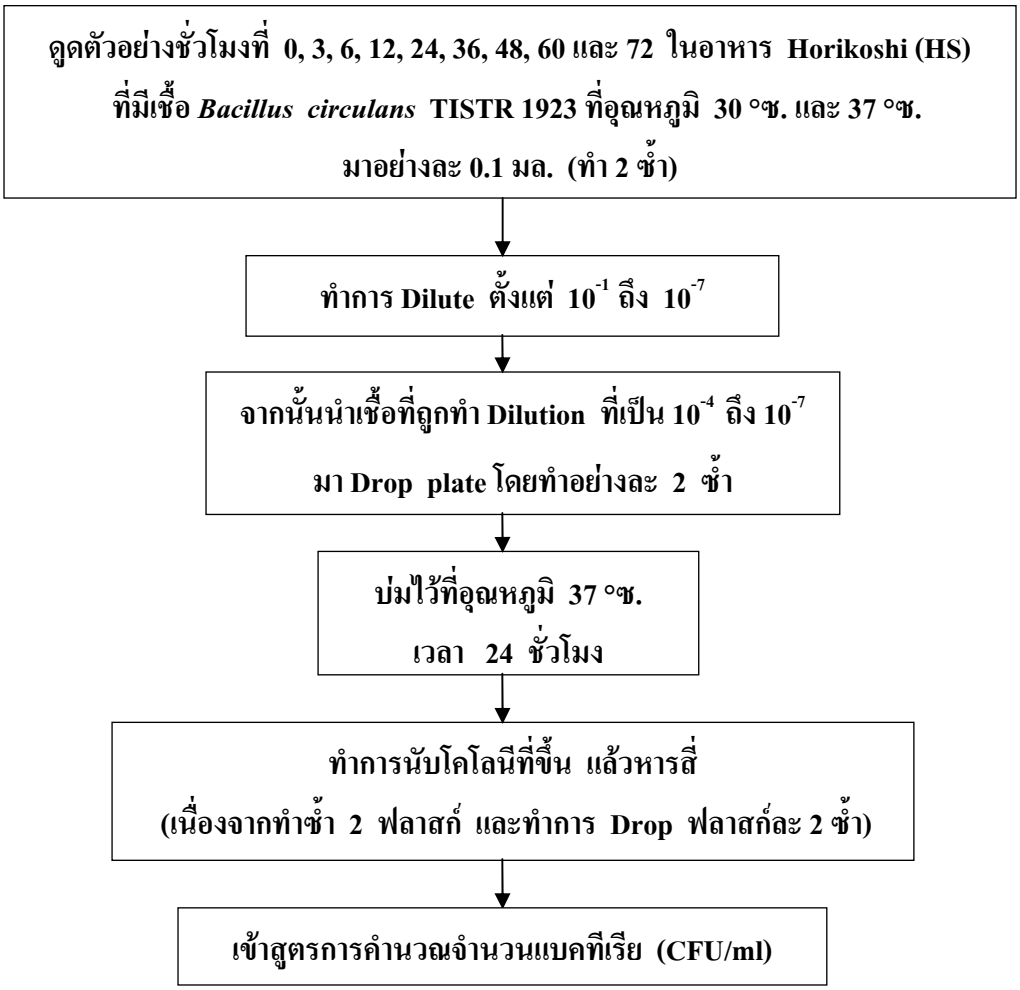


รูปที่ 3.15 การวัดค่าการเจริญเติบโต.

การวัดค่าการเจริญเติบโตของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS)

ดูดตัวอย่าง ณ ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS ที่ใส่เชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มาปริมาตรครั้งละ 0.1 มล. ทำการเจือจางโดยการเติมน้ำกลั่น 0.9 มล. ใส่ลงในหลอด Appendrop ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixture จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^{-1}. จากนั้นดูดเชื้อจากหลอด 10^{-1} มา 0.1 มล.

แล้วเติมน้ำกลั่น 0.9 มล., ใส่ลงในหลอด Appendrop, ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixture จะได้เชื้อที่ 10^{-2} ทำแบบนี้ซ้ำกันอีก 5 ครั้ง. ก็จะได้เชื้อที่ถูกทำ Dilution ให้เป็น 10^{-7}. จากนั้นนำเชื้อที่ 10^{-7} มาทำการ Drop plate โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการนับโคโลนีที่ขึ้นแล้วหารสี่ (เนื่องจากทำซ้ำ 2 ฟลาสก์ และทำการ Drop ฟลาสก์ละ 2 ซ้ำ) จากนั้นนำมาเข้าสูตรการคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml).



รูปที่ 3.16 การวัดค่าการเจริญเติบโตของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS.

สูตรการคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)

จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) = <u>จำนวนโคโลนีต่อจาน (ค่าเฉลี่ย) x Dilution factor</u>
ปริมาตรของตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหาร

รูปที่ 3.17 สูตรการคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml).

ซึ่ง Dilution factor = 1 / Dilution

โดย ค่าการเจือจาง (Dilution) = <u>ปริมาตรที่เติมลงไป</u>
ปริมาตรรวมทั้งหมด

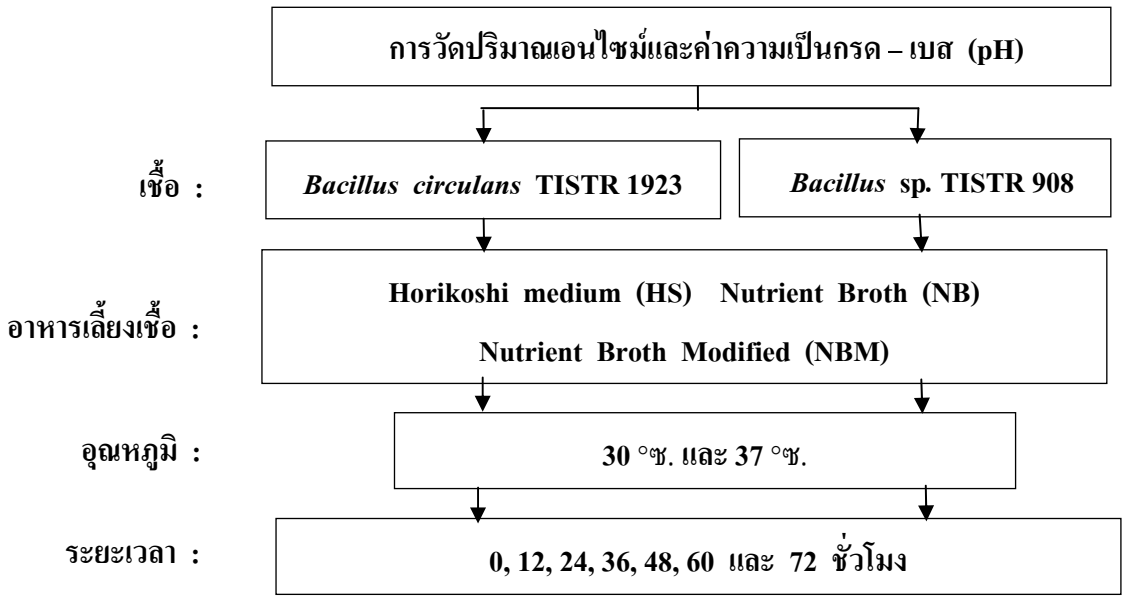
เมื่อได้โคโลนีประมาณ 10^8 ขึ้นไปถือว่าเชื้อ Active

หมายเหตุ: การวัดค่าการเจริญเติบโตของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS ที่มีเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ในชั่วโมงที่ 0, 3, 6,12, 24,36, 48, 60 และ 72 ให้ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น.

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB และ NBM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มีจำนวนฟลาสก์เท่ากัน ให้ทำการวัดค่าการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน.

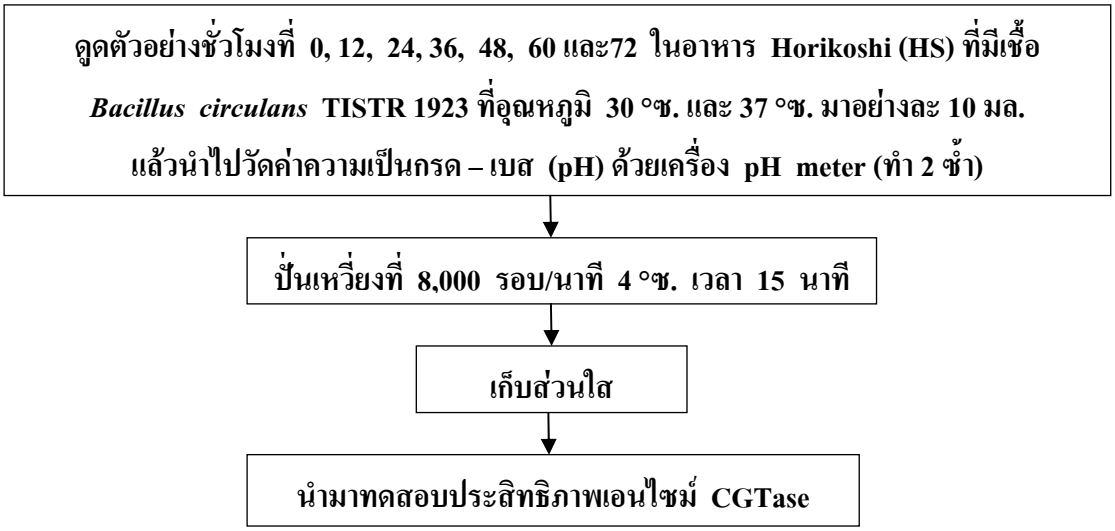
3.6.4.2 วิธีวัดปริมาณเอนไซม์และค่าความเป็นกรด – เบส (pH)

วิธีวัดปริมาณเอนไซม์และค่าความเป็นกรด – เบส (pH) สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามแผนผัง ดังต่อไปนี้:



รูปที่ 3.18 การวัดปริมาณเอนไซม์และค่าความเป็นกรด – เบส (pH).

การวัดปริมาณเอนไซม์และค่าความเป็นกรด–ด่าง (pH)ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS) ดูดตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HS ที่มีเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มาปริมาตร 10 มล. แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ด้วยเครื่อง pH meter ทำ 2 ซ้ำ, จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที 4 °ซ. เวลา 15 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงระบบทำความเย็น แล้วดูดเอาส่วนใสด้านบนมาทำการทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase.



รูปที่ 3.19 การวัดปริมาณ CGTaseและค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของอาหาเลี้ยงเชื้อสูตร HS.

3.6.5 การทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase

3.6.5.1 การทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase ในการย่อย Amylose

ก. การเตรียม Reaction mixture

Reaction Mixture ประกอบด้วย

1. Supernatant (Crude enzyme) 0.1 มล.
2. Substrate (Amylose) 0.5 มล. ซึ่งมีวิธีเตรียมดังนี้

Amylose 2 mg ละลายใน 0.05 M glycine – sodium hydroxide buffer (pH 9.0) ปริมาตร 0.5 มล. จากนั้นจึงนำมาบ่มที่ 37 °ซ. 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 0.5 N acetic acid 1 มล. แล้วจึงเติม Iodine reagent 500 µl ซึ่งประกอบด้วย KI 2 ก./ล. และ I_2 0.2 ก./ล.

ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 5 มล. ด้วยน้ำกลั่น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer.

ข. การเตรียม Blank

1. น้ำกลั่น 0.1 มล. (แทน enzyme)
2. Substrate 0.5 มล. Incubate 37 °ซ. 10 นาที
3. 0.5 N acetic acid 1 มล.
4. Iodine reagent 500 µl

ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 5 มล.

ค. ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ทำดังนี้

1. ใส่น้ำกลั่นลงใน Cuvette ที่ 1 และ 2 ในช่อง R (Reference) และ S (Sample) ตามลำดับ.
2. Set auto zero แล้วเอา Cuvette น้ำกลั่นในช่อง S (Sample) ออก จากนั้นใส่ Blank ลงไปแทน.
3. วัดค่า OD ของ Blank ที่ 700 nm แล้วบันทึกค่าไว้ (สมมติ = 0.98).
4. ใส่ Reaction mixture จากการทดลองต่างๆ ลงไปแทนใน S (Sample).
5. วัดค่า OD ที่ 700 nm แล้วบันทึกค่าไว้ (สมมติ = 0.24).

ง. การเทียบ % การลดลงของสี

ตัวอย่างการคำนวณ 0.98 – 0.24 = 0.74 คือ ค่า OD ที่ลดลงเมื่อเทียบกับ Blank คิดเป็น % ดังนี้ (0.74 / 0.98) x 100 = 75 % ที่ลดลงของปริมาณ Amylose

จ. การคำนวณ Enzyme unit

1 Unit คือ ปริมาตรเอนไซม์ (มล.) ที่สามารถทำให้ปริมาณ Amylose ลดลง 10 % โดยน้ำหนัก (มก.) ต่อระยะเวลาทำปฏิกิริยา 1 นาที

ดังนั้นคิดเป็น 75 % ต่อ 10 นาที = 0.75 unit ซึ่งคำนวณจาก

10 % ใน 1 นาที = 1 unit

ถ้า 75% ใน 1 นาที จะได้ 75% / 10% = 7.5 unit

75% ใน 1 นาที = 7.5 unit

ถ้า 75% ใน 10 นาที จะได้ 7.5 / 10 = 0.75 unit

หมายเหตุ: การวัดปริมาณเอนไซม์และค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi (HS) ที่มีเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ให้ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น.

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Broth Modified (NBM) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มีจำนวนฟลาสก์เท่ากัน ให้ทำการวัดปริมาณเอนไซม์และค่าความเป็นกรด – เบส (pH) เช่นเดียวกัน.

การวัดปริมาณเอนไซม์ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของสภาวะที่ถูกเลือก

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมทั้งชนิดของแบคทีเรีย, อาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิ และระยะเวลาแล้ว ให้ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สภาวะดังกล่าวอีกครั้ง. โดยให้ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณเอนไซม์ในช่วงระยะเวลาก่อน และหลังระยะเวลาที่คัดเลือก ช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นรายชั่วโมง เช่น หากระยะเวลาที่คัดเลือกได้ คือ 24 ชั่วโมง ให้เก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง 36 โดยเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมง สำหรับวิธีวัดปริมาณเอนไซม์ให้ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.6.4.2.

3.6.5.2 การทดสอบประสิทธภาพเอนไซม์ CGTase ในการสร้าง Cyclodextrin

ก. การเตรียม Substrate

ชั่ง Potato starch 1 กรัม ด้วยบีกเกอร์ ละลาย โดยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติม 2 N NaOH 5 มิลลิลิตร, ทำให้ละลายในน้ำร้อน หลังจากนั้นเติม 2 N CH_3COOH 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็นกลางด้วย 0.1 N CH_3COOH แล้วปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ให้ได้ 100 มิลลิลิตร จนได้เป็นสารละลาย Substrate.

ข. การเตรียม Reaction mixture

ใช้ไมโครปิเปต ดูดน้ำกลั่น 60 ไมโครลิตร ผสมกับ Substrate 600 ไมโครลิตร

ค. การวิเคราะห์ด้วยวิธี Methyl orange method

ประกอบด้วย:

1. สารละลาย Reaction mixture 50 ไมโครลิตร.
2. 6 N HCl 7.5 ไมโครลิตร.
3. สารละลาย 52.5 ไมโครโมล ของ methyl orange 100 ไมโครลิตร.

บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD.) ที่ 505 นาโนเมตร.

ง. การทำกราฟมาตรฐาน

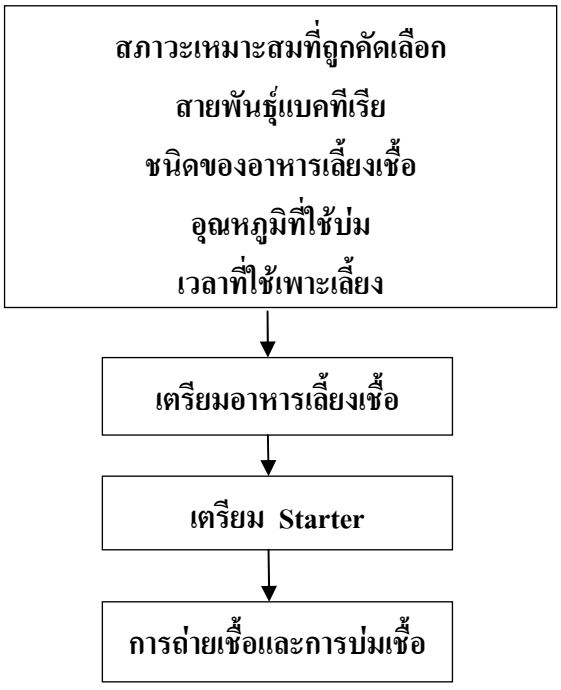
1. ชั่ง Cyclodextrin 0.2 กรัม ด้วยบีกเกอร์ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วต้มบน Hot plate stirrer จนละลายทั้งหมดแล้วปรับปริมาตรด้วย Volumetric flask ให้ได้ 200 มิลลิลิตร.

2. เจือจางสารละลาย Cyclodextrin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยน้ำกลั่น ดังนี้:

สารละลายcyclodextrin (มล.)	50	40	30	20	10	0
สารละลาย Substrate (มล.)	0	10	20	30	20	50

3. ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Methyl orange โดยใช้สารละลายความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้แทน Reaction mixture.

3.6.6 กระบวนการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin Glucanotransferases (CGTase)



รูปที่ 3.20 สรุปกระบวนการผลิตเอนไซม์ CGTase.

3.6.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกคัดเลือก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกคัดเลือกแล้วให้ได้ปริมาตร 1,400 ml ตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น แล้วใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 3,000 มล., จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น.

หมายเหตุ: ทำ 4 ซ้ำ

3.6.6.2 Starter อาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกคัดเลือก

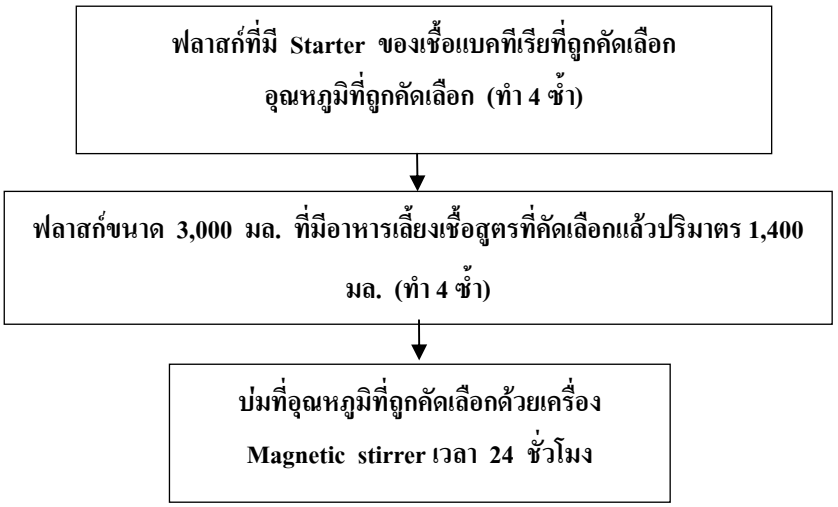
1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกคัดเลือกแล้วให้ได้ปริมาตร 70 ml ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121°ซ. เวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น.

2. เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วมา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกคัดเลือก ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตร 70 มล. แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่อง Shaking incubator ที่ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.

หมายเหตุ: ทำ 4 ซ้ำ

3.6.6.3 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มี Starter ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ถูกคัดเลือกแล้ว ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้ว จำนวน 4 ฟลาสก์ ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิที่ถูกคัดเลือก มาถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 3,000 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงสูตรดังกล่าว ปริมาตร 1,400 มล. จำนวน 4 ฟลาสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิดังกล่าว ด้วยเครื่อง Magnetic stirrer เวลา 24 ชั่วโมง.



รูปที่ 3. 21 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อที่ถูกคัดเลือก 1,400 มล.

3.6.7 การสังเคราะห์สารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล

ขั้นตอนการสังเคราะห์สารแอลฟากลูโคซิลกลีเซอรอล

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกคัดเลือกที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก ที่บ่มไว้ ณ อุณหภูมิที่ถูกคัดเลือก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1.4 ลิตร (ทำ 4 ซ้ำ) มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 แล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 15 นาที.

2. แยกส่วนใสแล้วนำมาทดสอบประสิทธิ์ภาพเอนไซม์ CGTase ในข้อ 3.6.4.2.

3. ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาตรคงเหลือ 50 มล. โดยใช้เครื่องกลั่น ระเหยแห้ง (Evaporator) ที่อุณหภูมิ 55°ซ. ความดันลด 600 มิลลิเมตรปรอท จากความดันบรรยากาศปกติ.

4. ทำปฏิกิริยาในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มี 50 mM acetate buffer (pH 6.0) ปริมาตร 25 มล. ซึ่งประกอบด้วย ดังนี้:

- กลีเซอรอล 10 %.
- Soluble starch 10 %.
- เอนไซม์เข้มข้น 25 units.

5. บ่มในเครื่อง Shaking Incubator ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เวลา 72 ชั่วโมง.

6. เติมเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 100 มล. แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วนใสออกมา.

7. ส่วนที่เหลือในหลอด ปั่นเหวี่ยงจะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Glycerol ที่เหลืออยู่จากขั้นตอน ☆

8. นำส่วนใสที่ได้มาทำการระเหยเอทานอลออก โดยใช้เครื่องกลั่น ระเหยแห้ง (Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. ความดันลด 600 มิลลิเมตรปรอท จากความดันบรรยากาศปกติ.

9. ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ Glycerol หลังทำปฏิกิริยาจะถูกนำไปคำนวณเทียบกับปริมาณ Glycerol ก่อนทำปฏิกิริยา ซึ่งจะได้ปริมาณ Glycerol ที่ถูกใช้ไปในการสังเคราะห์ α-glucosyl glycerol. จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ α-glucosyl glycerol โดยประมาณ.

หมายเหตุ ☆ ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอล

ก. ขั้นตอน Glycerol hydrolysis

1. ใส่ตัวอย่าง 40 µl ลงในหลอดแก้ว.
2. เติม 50 mM TEAH (Tetraethylammonium hydroxide) ปริมาตร 0.1 มล.
3. อุ่นใน Water bath 60 °ซ. นาน 30 นาที.
4. เติม 0.1 M HCl ปริมาตร 0.1 มล. แล้วเขย่าให้เข้ากัน.

5. เติม Hexane ปริมาตร 2 มล. แล้วเขย่าให้เข้ากัน.

6. แยกส่วนสารละลายด้านบนออกแล้วเอาส่วนด้านล่างไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณ Glycerol ต่อไป.

ข. การวัดปริมาณ Glycerol ด้วยวิธี Colorimetric

1. การเตรียม Periodate reagent (PD reagent)

- ละลาย $NaIO_4$ 65 มก. ในน้ำกลั่น 90 มล. แล้วเติม 0.5 M acetic acid 10 มล. และ Ammonium acetate 7.7 ก. แล้วผสมให้เข้ากัน.

2. การเตรียม Acetylacetone reagent (AA reagent)

- เติม Acetylacetone 2.5 มล., ลงใน Isopropanol 247.5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในที่มืด.

3. การทำปฏิกิริยาเพื่อวัดปริมาณ Glycerol

- เติม PD reagent 1 มล., ลงในหลอดที่มี Sample ที่เตรียมไว้ แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 5 นาที.
- เติม AA reagent 2.5 มล., ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน อุ่นใน Water bath ที่ 50 °ซ. นาน 20 นาที.
- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 nm เทียบกับ Blank ซึ่งเตรียมเช่นเดียวกันกับขั้นตอน ก และ ข แต่เปลี่ยนจากตัวอย่างเป็นน้ำกลั่น โดยใส่ Blank ลงใน Cuvette ที่ 1 และ 2 ในช่อง R (Reference) และ S (Sample) ตามลำดับ จากนั้น Set auto zero แล้วเอา Cuvette Blank ในช่อง S (Sample) ออก แล้วใส่ตัวอย่างลงไปแทน.
- ค่า OD ที่ได้ นำไปคำนวณเทียบกับ Standard ของ Glycerol 87%

4. วิธีทำ Standard

- เตรียม Glycerol ที่ปริมาณ 0 1 2 4 6 8 และ 10 g โดยใช้สารละลาย Glycerol 87% (D = 1.23 กก./ล.) ดังนั้นจะใช้ Glycerol ปริมาตร 0 0.813 1.626 3.252 4.878 6.504 และ 8.130 มล./ล.
- ทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน ก และ ข โดยใช้กลีเซอรอลปริมาตรต่างๆ แล้วจะได้กราฟมาตรฐานของ Glycerol เป็นเส้น Linear จากนั้นจึงหาสมการเส้นตรง $y = (mx + c)\ R^2$ โดยที่

y = ความเข้มข้นของ Glycerol m = ค่าความชันของกราฟ c = ค่าจุดตัดแกน x = ค่า OD ที่วัดได้ R^2 = ค่าเบี่ยงเบน

3.6.8 การทดสอบประสิทธิภาพของ α-glucosyl glycerol ในการยับยั้งการย่อย Amylase ด้วยเอนไซม์ α-amylase

ทำการวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาการย่อย Amylose ด้วยเอนไซม์ α- amylase โดยมี α-glucosyl glycerol เป็นตัวยับยั้ง ซึ่งประกอบด้วย ดังนี้:

1. ตัวยับยั้งคือ Crude α-glucosyl glycerol 100, 200, 300 และ 500 ไมโครลิตร.
2. Substrate คือ Amylose ปริมาตร 500 ไมโครลิตร วิธีการเตรียม คือ ชั่ง Amylose 2 มก. ละลายใน 0.05 M glycine – sodium hydroxide buffer (pH 9.0) จากนั้นจึงนำมาบ่มที่ 37 °ซ. 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 0.5 N acetic acid 1 ml แล้วจึงเติม Iodine reagent 500 µl ซึ่งประกอบด้วย KI 2 ก./ล. และ I_2 0.2 ก./ล.
3. เอนไซม์คือ porcine pancreatic α-amylase

ปฏิกิริยาเริ่มโดยการเติมสารละลาย porcine pancreatic α-amylase (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50 mM phosphate buffer, pH 7) 5.0 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร สำหรับกรรมวิธีต่างๆ ในการทำปฏิกิริยามี ดังนี้:

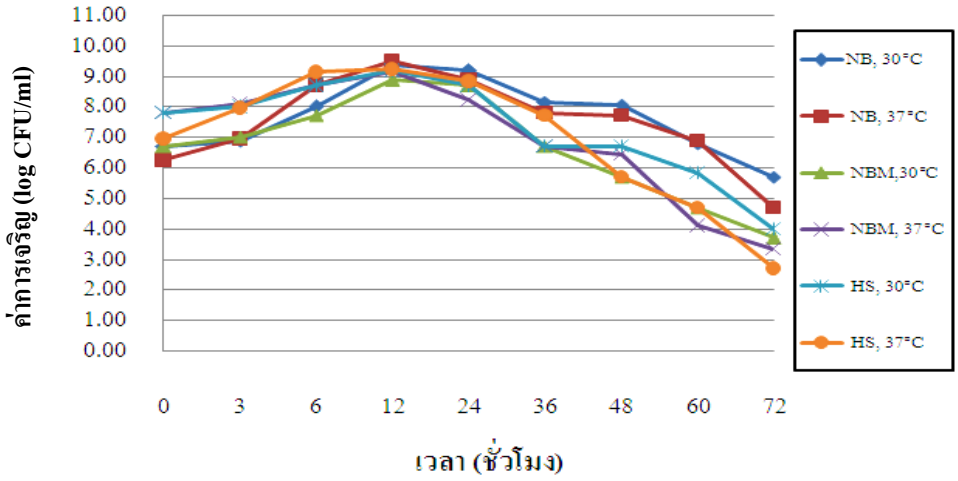
ตารางที่ 3.1 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของ α-glucosyl glycerol

กรรมวิธี	ส่วนประกอบ		
1	น้ำกลั่น 100µl	Amylose 500 µl	α-amylase 5 µl
2	Crude GG 100 µl	Amylose 500 µl	α-amylase 5 µl
3	Crude GG 200 µl	Amylose 500 µl	α-amylase 5 µl
4	Crude GG 300 µl	Amylose 500 µl	α-amylase 5 µl
5	Crude GG 400 µl	Amylose 500 µl	α-amylase 5 µl
6	Crude GG500 µl	Amylose 500 µl	α-amylase 5 µl
7	Crude GG 100 µl	Amylose 500 µl	น้ำกลั่น 5 µl

4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆที่สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ

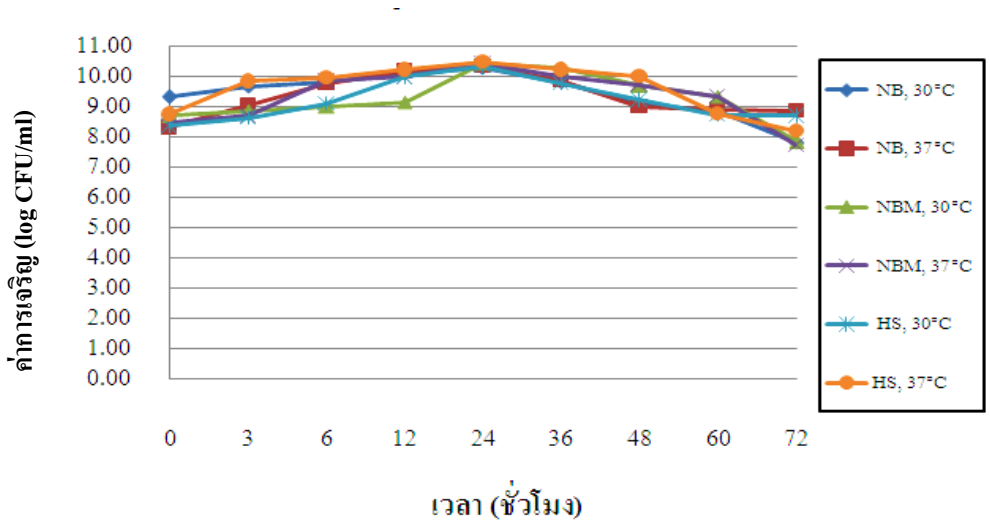
จากการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.6.4.1 โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ Horikoshi medium (HS) Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Broth Modified (NBM) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้



รูปที่ 4. 1 การเจริญของ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, N และ NBM โดยเลี้ยงที่ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

จากผลการทดลองในรูปที่ 4-1 ทำให้ทราบว่าชั่วโมงที่ 12 เชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 สามารถเจริญได้ดีที่สุด โดยมีค่าการเจริญตั้งแต่ 8.88 – 9.48 log CFU/ml โดยสังเกตได้จากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยเชื้อจะเจริญในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ได้ดีที่สุด รองลงมาคืออาหาร NB ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ HS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ตามลำดับ. โดยมีค่าการเจริญเติบโตที่ 9.48 9.38และ 9.21 log CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าชั่วโมงที่ 72 เชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 เจริญได้น้อยที่สุด เพราะแบคทีเรียบางส่วนเริ่มตายเนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เริ่มลดน้อยลง เพราะมีแบคทีเรียเจริญเติบโตมากขึ้นและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้ใช้สารอาหารเหล่านั้นในกระบวนการ metabolism จน

หมด จึงทำให้เกิดการแย่งอาหารกัน โดยเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 สามารถเจริญเติบโตได้น้อยที่สุดใน HS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. รองลงมาคือ อาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. และอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ตามลำดับ โดยมีค่าการเจริญที่ 2.70, 3.33 และ 3.70 log CFU/ml ตามลำดับ.



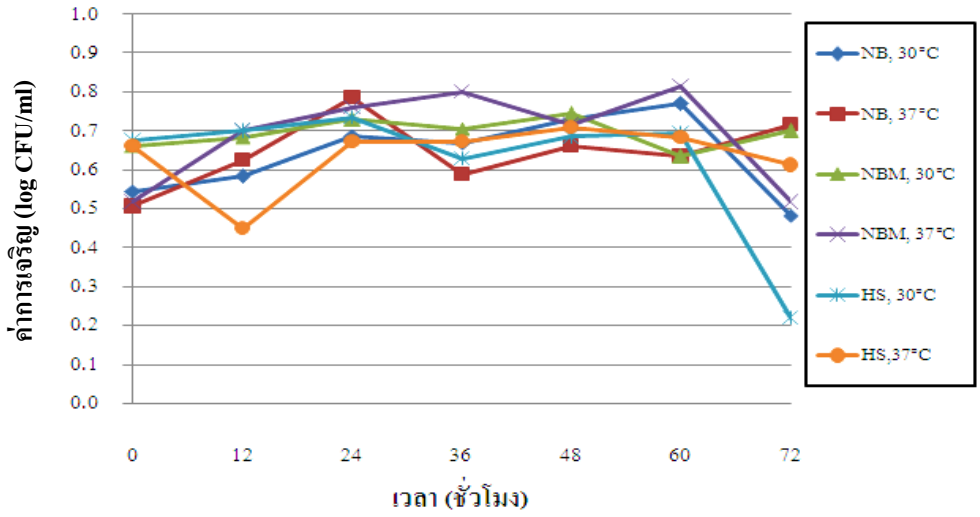
รูปที่ 4. 2 การเจริญของ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

จากผลการทดลองในรูปที่ 4-2 ทำให้ทราบว่าชั่วโมงที่ 24 เชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 สามารถเจริญได้ดีที่สุด โดยมีค่าการเจริญตั้งแต่ 10.28 – 10.45 log CFU/ml สาเหตุเพราะแบคทีเรียมีการเจริญอย่างเต็มที่ ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแบคทีเรียขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเจริญใน HS ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ได้ดีที่สุด (10.45 log CFU/ml) รองลงมาคืออาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. (10.43 log CFU/ml) และ NBM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. (10.41 log CFU/ml) ตามลำดับ. นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าชั่วโมงที่ 72 เชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 สามารถเจริญได้น้อยที่สุด เนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ถูกใช้ไปในกระบวนการ metabolism ทำให้มีแบคทีเรียเจริญมากขึ้นและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เกิดการแย่งอาหารกัน ทำให้อาหารลดลงและเริ่มหมดไป, เมื่อไม่มีอาหารแบคทีเรียบางส่วนก็จะเริ่มตาย โดยเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 สามารถเจริญได้น้อยที่สุดในอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. (7.70 log CFU/ml) รองลงมาคือ

อาหาร NB ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. (7.79 log CFU/ml) และ NBM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. (7.82 log CFU/ml) ตามลำดับ.

4.2 ผลการศึกษาปริมาณ CGTase ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

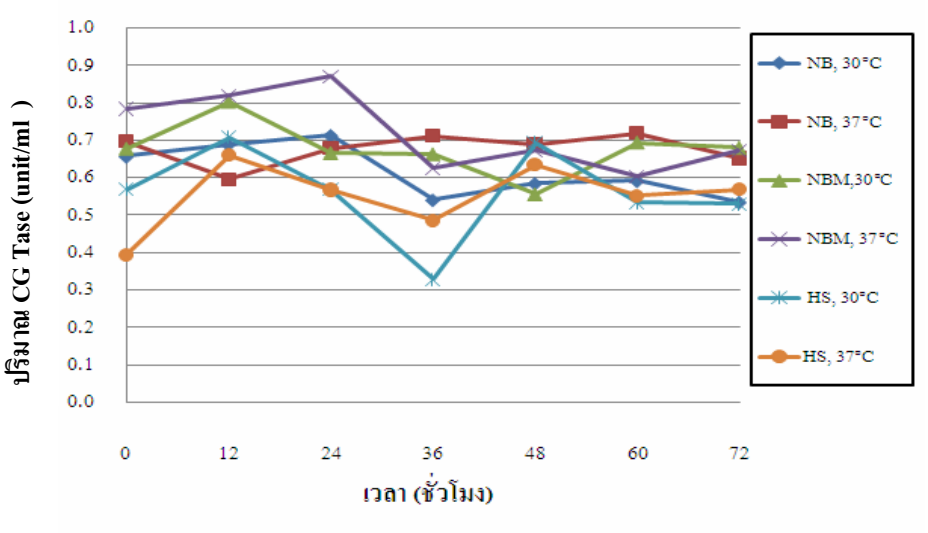
จากการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.6.4.2 โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *B. circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ HS NB และ NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้



รูปที่ 4. 3 ปริมาณ CGTase ของ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.3 ทำให้ทราบว่าเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 สามารถผลิต CGTase เฉลี่ยได้ดีที่สุดในอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. โดยได้ปริมาณ CGTase เฉลี่ย 0.70 unit/ml รองลงมาคือ NB ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. โดยได้ปริมาณ CGTase เฉลี่ย 0.65 unit/ml และ NB ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. กับ HS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. โดยได้ปริมาณ CGTase เฉลี่ย 0.64 unit/ml ตามลำดับ.

สำหรับ *B. circulans* TISTR 1923 นั้นมีปริมาณ CGTase สูงสุดที่ 0.82 unit/ml ในสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วย NBM ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ชั่วโมงที่ 60.



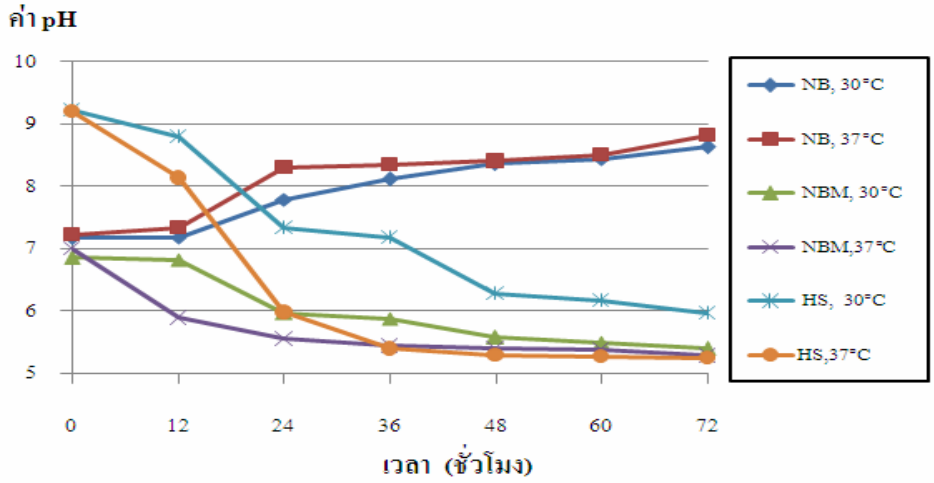
รูปที่ 4. 4 ปริมาณ CG Tase ของ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

จากผลการทดลองในรูปที่ 4-4 ทำให้ทราบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 สามารถผลิต CG Tase เฉลี่ยได้ดีที่สุดในอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. โดยได้ปริมาณ CG Tase เฉลี่ย 0.72 unit/ml รองลงมาคือ NB ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. กับ NBM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. โดยมีปริมาณ CG Tase เฉลี่ย 0.68 unit/ml และ NB ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. โดยมีปริมาณ CG Tase เฉลี่ย 0.62 unit/ml ตามลำดับ.

สำหรับ *Bacillus* sp. TISTR 908 นั้น มีปริมาณ CG Tase สูงที่สุดในสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วย NBM ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ณ ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณเอนไซม์เฉลี่ย 0.870 unit/ml.

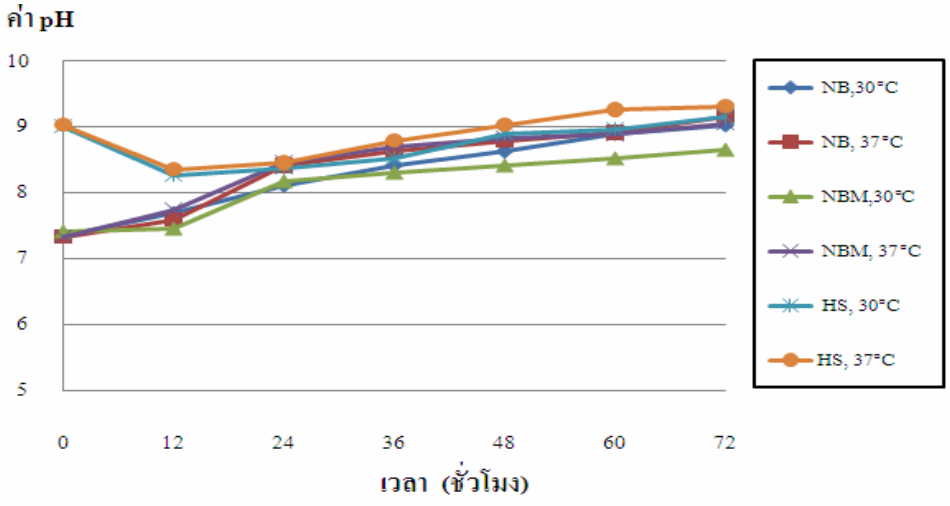
4.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ

จากการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.6.4.2 โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *B. circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ HS NB และ NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้



รูปที่ 4.5 ค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

จากผลการทดลองในรูปที่ 4-5 ทำให้ทราบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ใน HS ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกันตั้งแต่ pH 9.22 และ 9.21 ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงจนถึง pH 5.97 และ 5.26 ในชั่วโมงที่ 72 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ตามลำดับ และมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ลดลงอย่างชัดเจนตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 โดยมีค่า pH ลดลงจาก 8.80 จนถึง 7.34 และชั่วโมงที่ 36 ถึง 48 โดยมีค่า pH ลดลงจาก 7.19 ถึง 6.28 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 จาก pH 8.14 ลดลงเหลือ 5.98 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ., ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสอดคล้องกันตั้งแต่ pH 7.17 และ 7.23 ในชั่วโมงที่ 0 เพิ่มขึ้นจนถึง pH 8.63 และ 8.83 ในชั่วโมงที่ 72 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ตามลำดับ. และมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 โดยมีค่า pH 7.18 และ 7.35 เพิ่มขึ้นจนถึง pH 7.79 และ 8.30 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ตามลำดับ. สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. มีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกันตั้งแต่ pH 6.86 และ 7.01 ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงจนถึง pH 5.40 และ 5.29 ในชั่วโมงที่ 72 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ตามลำดับ. และมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ลดลงอย่างชัดเจนตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 โดยมีค่า pH ลดลงจาก 6.83 จนถึง 5.97 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ ชั่วโมงที่ 0 ถึง 12 โดยมีค่า pH ลดลงจาก 7.01 จนถึง 5.89 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ.



รูปที่ 4. 6 ค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS, NB และ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.

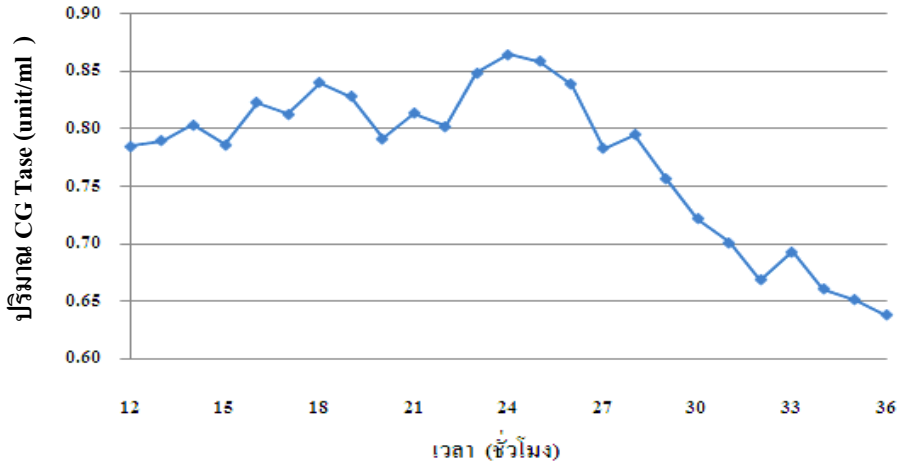
จากผลการทดลองในรูปที่ 4-6 ทำให้ทราบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ใน HS มีแนวโน้มค่า pH ลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 12 โดยมีค่า pH ลดลงจาก 9.01 ถึง 8.26 และ 9.03 ถึง 8.36, จากนั้นจึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง 72 โดยมีค่า pH เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 8.26 ถึง 9.15 และ 8.36 ถึง 9.32 ซึ่งสอดคล้องกันทั้งที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และ 37 °ซ. ตามลำดับ. สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหาร NB และ NBM มีแนวโน้มค่า pH เพิ่มขึ้นโดยตลอดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 72 โดยมีค่า pH เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 7.35 ถึง 9.03 และ 7.41 ถึง 8.67 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และมีค่า pH เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 7.34 ถึง 9.16 และ 7.33 ถึง 9.05 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. โดยสังเกตได้ชัดเจนที่ค่า pH ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 มีค่า pH เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 7.71 ถึง 8.12 และ 7.46 ถึง 8.18 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. และมีค่า pH เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 7.59 ถึง 8.41 และ 7.74 ถึง 8.46 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ.

จากผลการทดลองข้อ 4.1 – 4.3 ทำให้ทราบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต CGTase เป็นดังต่อไปนี้:

สายพันธุ์แบคทีเรีย : *Bacillus* sp. TISTR 908
ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ : Nutrient Broth Modified (NBM)
อุณหภูมิที่ใช้บ่ม : 37 °ซ.
เวลาเพาะเลี้ยง : 24 ชั่วโมง

4.4 ผลการศึกษาปริมาณ CGTase ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกที่สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิที่คัดเลือก ณ ระยะเวลาต่างๆ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBM ที่อุณหภูมิ 37°ซ. โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 - 36 ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้



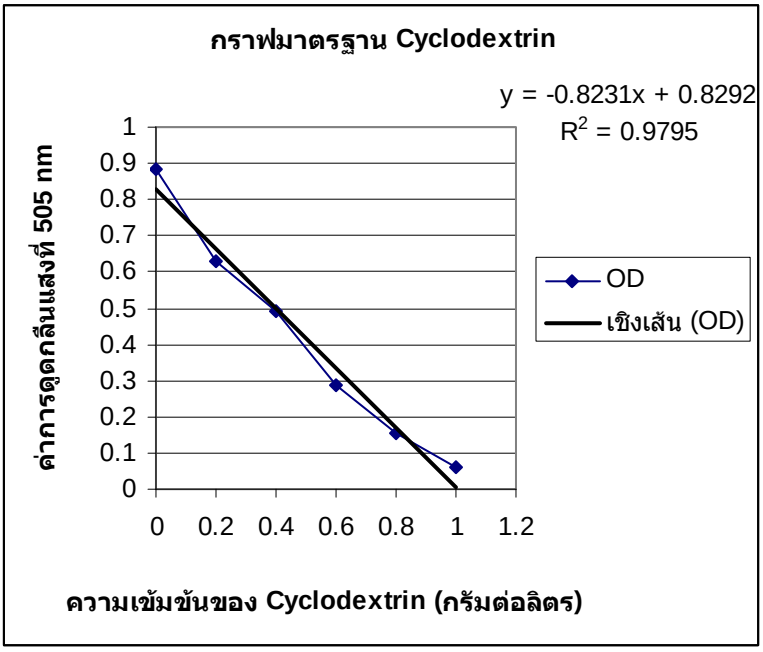
รูปที่ 4. 7 ปริมาณ CGTase เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBM โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 36 ชั่วโมง.

จากผลการทดลองในรูปที่ 4-7 แสดงให้เห็นว่าในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นชั่วโมงเริ่มต้นในการวัดปริมาณ CGTase พบว่ามีปริมาณ CGTase 0.79 unit/ml จากนั้นจึงมีปริมาณ CGTase เพิ่มขึ้นสูงสุด 0.87 unit/ml ณ ชั่วโมงที่ 24 และค่อยๆ ลดลงจนถึง 0.64 unit/ml ที่ 36 ชั่วโมง. สำหรับปริมาณ CGTase ที่เพิ่มขึ้นและลดลงสลับกันในบางชั่วโมงนั้นอาจเกิดขึ้นเนื่องจาก CGTase บางส่วนที่ผลิตขึ้นถูกใช้ไปในการย่อย Soluble starch ในอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ.

4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase ในการสร้าง Cyclodextrin

1. กราฟมาตรฐาน Cyclodextrin

ความเข้มข้นของ cyclodextrin (กรัม/ลิตร)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
ค่า OD. ที่ 505 nm	0.884	0.631	0.493	0.285	0.153	0.06



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐาน Cyclodextrin.

2. การทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase ในการสร้าง Cyclodextrin

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase ในการสร้าง Cyclodextrin

Flask	OD. At (nm)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ Cyclodextrin (กรัมต่อลิตร)
1	505	0.379	0.398	0.389	0.496
2	505	0.325	0.308	0.317	0.557
3	505	0.349	0.355	0.352	0.528
				เฉลี่ย	0.528

4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CGTase เพื่อใช้สังเคราะห์ Crude α-glucosyl glycerol

จากการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.6.7 โดยเลี้ยง *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBM ปริมาณ 1.4 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, นำสารละลายเชื้อที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 แล้ว, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 15 นาที แยกส่วนใส แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพ CGTase ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้:

การคำนวณปริมาณ CGTase

Flask 1 มีปริมาณ CGTase เข้มข้น 0.63 unit / ml ที่ปริมาตร 1,400 ml

ถ้าปริมาตร 50 ml คำนวณปริมาตร CGTase ดังนี้

จาก C1V1 = C2V2

โดย C1 = ความเข้มข้นของ CGTase ตั้งต้น

V1 = ปริมาตรตั้งต้น

C2 = ความเข้มข้นของ CGTase ที่ต้องการ

V2 = ปริมาตรที่ต้องการ

จากสูตร C1V1 = C2V2

(0.63 unit/ml)(1400ml) = C2 (50 ml)

ดังนั้น C2 = 17.64 unit/ml

ต้องการใช้ Enzyme ปริมาณ CGTase เข้มข้น 25 unit/ml

ถ้าต้องการปริมาณ CGTase เข้มข้น 25 unit ต้องใช้ปริมาตร 1 มล.

ดังนั้นเมื่อ CGTase เข้มข้นเพียง 17.64 unit ต้องใช้ปริมาตร 25/17.64 = 1.42 มล.

ดังนั้น Flask 1 2 3 และ 4 ต้องใช้ CGTase ปริมาตร 1.42 1.79 2.35 และ 1.79 มล. ตามลำดับ.

4.7 ผลการศึกษาเบื้องต้นในการผลิต Crude α - glucosyl glycerol โดยใช้ CGTase ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามสภาวะที่ถูกคัดเลือก

จากการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.6.7 โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBM ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1.4 ลิตร โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้:

Glycerol ที่ใช้อยู่ในรูปของเหลวที่ความเข้มข้น 87% มีความหนาแน่น 1.23 กก./ล เมื่อต้องการใช้ Glycerol 10% ละลายใน Buffer 25 มล. จะต้องใช้ Glycerol 2.87 มล. ซึ่งคำนวณเป็นมวล (กรัม) ของ Glycerol จะได้ค่า m = DV = 1.23 x 2.87 = 3.53ก.

Glycerol มีสูตรโครงสร้างคือ $C_3H_5[OH]_3$ เมื่อคำนวณมวลโมเลกุลแล้วจะได้ 92.09 ก./mol ซึ่ง Glycerol 1 ก., มีค่า 0.0109 mol, ดังนั้นปริมาณ Glycerol ที่ใช้คือ 3.53 x 0.0109 = 0.0385 mol เมื่อคำนวณเป็นจำนวนโมเลกุลของ Glycerol ที่ใช้ เริ่มต้นจะได้ค่า 0.0385 x 6.02 x 10^{23} = 2.316 x 10^{22} โมเลกุล.

สำหรับ Glucose ที่เกิดจากการสลายพันธะของ Polysaccharide ใน Soluble Starch มีสูตรโครงสร้างคือ $C_6H_{12}O_6$ เมื่อคำนวณมวลโมเลกุลแล้วจะได้ 180.156 ก./mol ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ Glycerol โดยมี CGTase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วจะได้เป็นสารให้ความหวานชื่อ α-glucosyl glycerol ซึ่งประกอบด้วย Glycerol 1 โมเลกุล ก่อพันธะกับ Glucose ตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไป ซึ่งการสังเคราะห์ Crude α-glucosyl glycerol จากเอนไซม์จะได้เป็นผลิตภัณฑ์หลายตัวโดยมีสัดส่วน ดังนี้:

Glc - GL	ประมาณ	37%
Glc_2 - GL	ประมาณ	20%
Glc_3 - GL	ประมาณ	7%
Glc_4 - GL	ประมาณ	2%
Glc	ประมาณ	1%
Maltose	ประมาณ	1%
Unknow	ประมาณ	32%
รวมทั้งหมด		**100 %**

หมายเหตุ: อ้างอิงจากผลการวิจัยจากข้อ 2.3.4 การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นโดย CGTase และ α-glucosidase

Glc - GL คือ กลูโคส 1 โมเลกุลก่อพันธะกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล
Glc_2 - GL คือ กลูโคส 2 โมเลกุลก่อพันธะกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล
Glc_3 - GL คือ กลูโคส 3 โมเลกุลก่อพันธะกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล
Glc_4 - GL คือ กลูโคส 4 โมเลกุลก่อพันธะกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล

ดังนั้นมวลโมเลกุลของ α-glucosyl glycerol จึงมีค่าดังนี้

1) Glc - GL มวลโมเลกุลคือ 92.09+(180.156) = 272.25 ก./mol คิดเป็น 0.0037 mol/ก.
คิดเป็น $0.0037 \times 6.02 \times 10^{23}$ = **2.23×10^{21}** โมเลกุล /ก.

2) Glc_2 - GL มวลโมเลกุลคือ 92.09+(180.156x2) = 452.40 g/mol คิดเป็น 0.0022 mol/ก.
คิดเป็น $0.0022 \times 6.02 \times 10^{23}$ = **1.33×10^{21}** โมเลกุล /ก.

3) Glc_3 - GL มวลโมเลกุลคือ 92.09+(180.156x3) = 632.56 g/mol คิดเป็น 0.0016 mol/ก.
คิดเป็น $0.0016 \times 6.02 \times 10^{23}$ = **9.63×10^{20}** โมเลกุล /ก.

4) Glc_4 - GL มวลโมเลกุลคือ 92.09+(180.156x4) = 812.71 g/mol คิดเป็น 0.0012 mol/ก.
คิดเป็น $0.0012 \times 6.02 \times 10^{23}$ = **7.22×10^{20}** โมเลกุล /ก.

จากข้อมูลการสังเคราะห์ Crude α-glucosyl glycerol ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ α-glucosyl glycerol ทั้งหมด 4 ตัว Glc - GL ,Glc_2 - GL ,Glc_3 - GL และ Glc_4 - GL คิดเป็น 66% จากผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้น เมื่อพิจารณาจากปริมาณกลีเซอรอลที่ใช้ไปซึ่งคิดเป็น 100% และ α-glucosyl glycerol แต่ละตัวจะเกิดขึ้นโดยใช้กลีเซอรอลในปริมาณที่ต่างกันตามสัดส่วนของการเกิด α-glucosyl glycerol แต่ละตัวดังนี้:

ขวดทดลองที่ 1 จะมีผลิตภัณฑ์ α-glucosyl glycerol ทั้งหมด 66%ใช้กลีเซอรอล 100%=4.56×10^{21} โมเลกุล

Glc - GL	37% ใช้กลีเซอรอล 56%=2.55×10^{21}โมเลกุล
Glc_2 - GL	20% ใช้กลีเซอรอล 30%=1.37×10^{21}โมเลกุล
Glc_3 - GL	7 % ใช้กลีเซอรอล 11%=5.02×10^{20} โมเลกุล
Glc_4 - GL	2 % ใช้กลีเซอรอล 3% =1.37×10^{21}โมเลกุล

หมายเหตุ: ขวดทดลองที่ 2 ถึง 4 คำนวณเช่นเดียวกันกับ ขวดที่ 1

4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ α-glucosyl glycerol ในการยับยั้งการย่อย Amylose ด้วยเอนไซม์ α-amylase

ตาราง 4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ α-glucosyl glycerol

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ย OD. ที่ 700 nm	% การยับยั้ง
1	0.082	0.00
2	0.134	14.00
3	0.204	21.32
4	0.276	28.84
5	0.280	29.26
6	0.289	30.20
7	0.957	100.00

จากผลการทดลอง พบว่า Crude α-glucosyl glycerol (Crude α-GG) มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-Amylase ซึ่งทำให้ amylase ถูกย่อยได้น้อยลง เมื่อเพิ่มปริมาณ (Crude α-GG) จาก 100 ไมโครลิตร เป็น 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตร ทำให้ยับยั้งการย่อย amylase ได้ 14.00% 21.32% 28.84% 29.26% และ 30.20% ตามลำดับ, ซึ่งสังเกตได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ(Crude α-GG) จนถึง 300 400 และ 500 ไมโครลิตร, แล้วค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า (Crude α-GG) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ได้ประมาณ 30%, ซึ่งหากสามารถทำให้ (Crude α-GG) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ก็จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ได้มากขึ้นด้วย และยังสามารถนำ α-GG ไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในสารให้ความหวานหรือผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มต่าง ๆ เพื่อช่วยลดการย่อยแป้งซึ่งส่งผลให้ช่วยในการควบคุมน้ำหนักด้วย.

5. สรุปและวิจารณ์ผล

5.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *B. circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ HS, NB และ NBM ที่ อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *B. circulans* TISTR 1923 เจริญได้ดีที่สุดในสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วย NB ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ณ ชั่วโมงที่ 12 โดยมีค่าการเจริญที่ 9.48 log CFU/ml สำหรับ *Bacillus* sp. TISTR 908 นั้นมีค่าการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ที่ 10.45 log CFU/ml ในสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วย HS ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ณ ชั่วโมงที่ 24. ทั้งนี้เนื่องจาก *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Mesophilic ที่เจริญได้ดีในสภาวะตั้งแต่อุณหภูมิห้องจนถึงไม่เกิน 40°ซ., อีกทั้งอาหาร NB ยังเหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียทั่วไป และ HS เป็นสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียเช่นเดียวกัน. นอกจากนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีอัตราการเจริญที่สูงในช่วงเวลา 12 – 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วง log phase ของการเจริญ.

5.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CGTase ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองการวัดปริมาณเอนไซม์จากแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *B. circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ HS, NB และ NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *B. circulans* TISTR 1923 นั้นมีปริมาณ CGTase สูงที่สุด 0.82 unit/ml ในสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วย NBM ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ณ ชั่วโมงที่ 60 สำหรับ *Bacillus* sp. TISTR 908 มีปริมาณ CGTase สูงที่สุดในสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วย NBM ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ณ ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณ CGTase สูงที่สุด 0.87 unit/ml ทั้งนี้อาหาร NB เหมาะกับการเจริญของเชื้อทั่วไป เมื่อเติม Soluble starch ลงไปในสูตรอาหาร ทำให้เชื้อจำเป็นจะต้องสร้าง CGTase มาเพื่อย่อยแป้ง อีกทั้งสารประกอบเกลือต่างๆ อาทิเช่น $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl และ K_2HPO_4 ที่เติมลงไปนั้นมีส่วนกระตุ้นให้เกิดการสร้าง CGTase ซึ่งสอดคล้องกับที่ระบุไว้ในบทที่ 2 เรื่องปัจจัยของ Carbon sources และ Cation ในการสร้าง CGTase.

5.3 ผลของความเป็นกรด - เบส (pH) ต่อการเจริญ และการสร้าง CGTase ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองวัดค่า pH ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *B.circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ HS, NB และ NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *B. circulans* TISTR 1923 ที่เพาะเลี้ยงใน HS และในอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน คือ ค่า pH จะแปรผกผันกับระยะเวลา โดยการเพาะเลี้ยงใน HS ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เริ่มจากชั่วโมงที่ 0 มีค่า pH 9.22 และ 9.21 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 ค่า pH ลดลงเหลือ 5.97 และ 5.26 ตามลำดับ และมีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วจากค่า pH 8.80 และ 8.14 ในชั่วโมงที่ 12 เหลือค่า pH 7.34 และ 5.98 ในชั่วโมงที่ 24 ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ตามลำดับ. ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เริ่มจากชั่วโมงที่ 0 มีค่า pH 6.86 และ 7.01 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 ค่า pH ลดลงเหลือ 5.40 และ 5.29 ตามลำดับ สำหรับ *B. circulans* TISTR 1923 ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. จะมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่า pH ตรงข้ามกับ HS และ NBM คือ ค่า pH จะแปรผันตามระยะเวลา โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 0 มีค่า pH 7.17 และ 7.23 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 ค่า pH เพิ่มขึ้นเป็น 8.63 และ 8.83 ตามลำดับ.

ช่วง pH 5.89 ถึง 8.80 เป็นช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B.circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ระยะเวลา 72 ชั่วโมง. สำหรับช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ได้ปริมาณมากที่สุดของเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. คือ 5.30 ถึง 8.45.

ส่วน *Bacillus* sp. TISTR 908 ที่เลี้ยงในอาหาร NB และอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน คือ ค่า pH จะแปรผันตามระยะเวลา โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. เริ่มจากชั่งโมงที่ 0 มีค่า pH 7.35 และ7.34 เมื่อเข้าชั่วโมงที่ 72 ค่า pH เพิ่มขึ้นเป็น 9.03 และ 9.16 ตามลำดับ. ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหาร NBM ค่า pH จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากค่า pH 7.41 และ 7.33 ในชั่วโมงที่ 0 ไปจนถึง 8.67 และ 9.05 ในชั่วโมงที่ 72 ตามลำดับ. สำหรับ *Bacillus* sp. TISTR 908 ที่เลี้ยงใน HS ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. พบว่าค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 0 ถึง 12 โดยมีค่า pH จาก 9.01 และ 9.03 ลดลงเหลือ 8.26 และ 8.36 ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ตามลำดับ, และค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง 72 จนมีค่า pH อยู่ที่ 9.15 และ 9.32 ตามลำดับ.

ช่วง pH 8.12 ถึง 8.46 เป็นช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการสร้าง CGTase ได้ปริมาณมากที่สุดของเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. คือ 7.46 ถึง 8.91.

แนวโน้มการเปลี่ยนแปลง pH ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับแนวโน้มของการเจริญและการสร้างเอนไซม์ CGTase ของทั้งเชื้อ *Bacillus circulans* TISTR 1923 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 แต่ค่า pH มีความสัมพันธ์กันกับแนวโน้มการเจริญและการสร้างเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันไป อาทิเช่น การเจริญของเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ใน HS ที่อุณหภูมิ 30°ซ. จะเจริญได้ดีที่สุดในช่วง pH 8.80 , แต่เมื่อ pH ลดต่ำลงจนอยู่ในช่วง 5.97 การเจริญก็ลดลงตามไปด้วย ในทางกลับกันการเจริญของเชื้อ *B. circulans* TISTR 1923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 30°ซ. จะเจริญได้ดีที่สุด ในช่วง pH 7.18 แต่เมื่อ pH เพิ่มสูงขึ้นจนอยู่ในช่วง 8.63 การเจริญก็ลดลงตามไปด้วย.

5.4 การผลิต Crude α-glucosyl glycerol โดยใช้ Crude CGTase

5.4.1 การผลิต Crude CGTase จากสภาวะที่ได้เหมาะสม

จากผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต CGTase มีสภาวะที่เลี้ยง *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหาร NBM ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสามารถผลิต CGTase ได้ 0.38 - 0.63 unit/ml

5.4.2 การสังเคราะห์ Crude α-glucosyl glycerol

CGTase ที่ผลิตได้ถูกนำมาใช้สังเคราะห์ Crude α-glucosyl glycerol ตามกระบวนการ ซึ่งปริมาณ α-glucosyl glycerol ที่ได้จะถูกวัดโดยค่า Glycerol ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยา คำนวณเทียบเป็นจำนวนโมเลกุลโดยประมาณของ Crude α-glucosyl glycerol แล้วคำนวณให้ได้ค่าเป็น mg/ml ของ Crude α-glucosyl glycerol โดยมีค่าอยู่ในช่วง 86.80 – 122.00 mg/ml.

5.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์ CGTase ในการสร้าง Cyclodextrin

จากผลการทดลอง พบว่า มีปริมาณของ Cyclodextrin เกิดขึ้น ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TISTR 908 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth Modified (NBM) สามารถสังเคราะห์ Cyclodextrin ได้ ซึ่งหมายถึงเอนไซม์ชนิดนี้คือ เอนไซม์ CGTase.

6. ข้อเสนอแนะ

1. ผลิตภัณฑ์ α-glucosyl glycerol ที่ผลิตได้ควรมีการทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร α-glucosyl glycerol ที่เกิดขึ้น.

2. ควรทดสอบ *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *B. macerans B.megateaium B.ohbensis* กับ แบคทีเรีย Genus อื่นๆ เช่น *Micrococcus sp.* หรือ *Klebsiella pneumoniae.*

3. ควรศึกษาวิธีการผลิต CGTase และ α-glucosyl glycerol ให้มีความบริสุทธิ์

4. ทดลองใช้เทคนิคขั้นสูงขึ้นในการวิเคราะห์ เช่น ใช้ TLC HPLC และ GC-MS ในการวิเคราะห์เอนไซม์ CGTase รวมถึงองค์ประกอบและปริมาณสารต่างๆ ที่อยู่ใน Crude α-glucosyl glycerol หรือให้ได้ผลที่ละเอียดและแม่นยำยิ่งขึ้น.

7. เอกสารอ้างอิง

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์.

Hirofumi, N. *et.al.* 2003. Synthesis of Glycosy Glycerol by CyclodextrinGlucatransferases. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* Osaka , Japan. **95**(6): 583 - 588.

Nisanart Charoenlap. 2003. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresource Technology*, 92 : 49–54.

Yoshihisa Tachibana, et.al. 1999. Purification and Characterizationof an Extremely Thermostable Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from a Newly Isolated Hyperthermophilic Archaeon, a *Thermococcus* sp. Appl Environ Microbiol. *American Society for Microbiology*, **65**(5): 1991–1997.

Determination of Glycerol in Acylgycerols. http://www.cyberlipid.org/ ACYLGLYT/ acyl0002.htm.

http://www.chemtrack.org/Board-Detail.asp?TID=0&ID=963

http://www.atriumtech.com/cgi-bin/hilightcgi?Home=/home/InterWeb2000&File=/home2/searchdata/Forums2/http/www.pantip.com/cafe/wahkor/topic/X6002590/X6002590.html

http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2391/3/223354_app4.pdf

www.msu.edu/user/eisthen/lab/methods/anatomy/recipes/acebuff.html

www.angelfire.com/falcon/practical_x_2/Subject/Chemistry/Q8/Q8.html

http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus.

www.thelabrat.com/restriction/sources/Bacilluscirculans.shtml.

www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorf.asp?articleid=20

www.thaifoodscience.com/การย้อมสีแกรม.html.

www.thapra.lib.su.ac.th/objects/thesis/fulltext/snamcn/Natthaporn_Suraphat/Chapter2.pdf

http://home.kku.ac.th/uac/journal/year%20_11_4_2546/07_11_4_2546.pdf

www.ocsb.go.th

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

Peptic digest of animal tissue	5.00	g / l
Beef extract	1.50	g / l
Yeast extract	1.50	g / l
Sodium chloride	5.00	g / l
Agar	15.00	g / l

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

Peptic digest of animal tissue	5.00	g / l
Sodium chloride	5.00	g / l
Beef extract	1.50	g / l
Yeast extract	1.50	g / l

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi (HS)

Soluble starch	10.00	g / l
Yeast extract	5.00	g / l
Peptone	5.00	g / l
K_2HPO_4	1.00	g / l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20	g / l
NaCl	10.00	g / l

แยกสารแต่ละตัวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 1 ล. ปรับ pH ให้ได้ 10 โดย 0.5 M NaOH.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth Modify (NBM)

Peptic digest of animal tissue	5.00	g / l
Sodium chloride	10.00	g / l
Beef extract	1.50	g / l
Yeast extract	1.50	g / l
Soluble starch	10.00	g / l
K_2HPO_4	1.00	g / l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20	g / l

แยกสารแต่ละตัวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. เวลา 15 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 1 ล .

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.5 M NaOH ปริมาตร 300 มล.

NaOH (Na = 23 , O = 16 , H = 1) มวลโมเลกุล = 40

Mole เท่ากับ Normal

สูตร N = มวลโมเลกุล x นอร์มัลที่ต้องการ x ปริมาตรที่ต้องการ (ล.)

ภาพที่ ข – 1 สูตรคำนวณนอร์มอล

N = 40 x 0.5 x 0.3 = 6 g.

การเตรียม Iodine reagent ปริมาตร 1 ล.

ชั่ง KI 2 g

และ ชั่ง I_2 0.2 g ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรโดย Volumetric ให้ได้ 1 ล.

การเตรียม 0.5 N acetic acid ปริมาตร 500 มล.

วิธีการเตรียม 0.5 N = 0.5 M

Acetic acid มี Density = 1,050/1,000 ml = 1.05 กก./ล.

Acetic acid มี Density = 1,050/60.05 = 17.49 M และมีเนื้อสาร 99.8 %

หมายความว่าที่ปริมาตร 100 ml มี Acetic acid 99.8 ml

จากสูตร

M1V1 = M2V2

ภาพที่ ข - 2 สูตรการคำนวณ 0.5 N acetic acid

(17.49) V1 = (0.5)(500)

V1 = 14.2938 ประมาณ 14.30 มล.

ดังนั้น ดูด Acetic acid 14.30 มล. ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มล. โดยน้ำกลั่น (เทกรดลงน้ำ)

การเตรียม Amylose 2 ก./ล. ละลายใน 0.05 M glycine – sodium hydroxide buffer (pH 9.0)

Amylose 2 g (2,000 mg) ⟶ Glycine – sodium hydroxide 1 L (1,000 ml)

มี Amylose อยู่ 52 mg ⟶ ต้องใช้ Glycine – sodium hydroxide = 26.0 ml

ดังนั้น ชั่ง Amylose 52 mg ละลายใน Glycine – sodium hydroxide 26.0 ml

การเตรียมไกลซีน – โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (Glycine-NaOH buffer) ตามวิธีของ Gomori (1995 อ้างโดย Perrin and Dempsey , 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 25 มล. และสารละลาย B x ml เพื่อให้ได้ pH ตามต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M glycine (Glycine 3.75 ก. ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ล.)

สารละลาย B : 0.05 M NaOH (NaOH 2.00 ก. ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ล.)

พีเอช	B (ml)
8.6	2.0
8.10	3.0
9.0	4.4
9.2	6.0
9.4	8.4
9.6	11.2
9.8	13.6
10.0	16.0
10.4	19.3
10.6	22.75

ตารางที่ ข - 1 ค่าความเป็นกรด - เบส (pH)

การเตรียม 0.05 M acetate buffer pH 6

ใช้ Sodium acetate anhydrous 4.1 g / L

Acetate acid , Glacial ประมาณ 150 µl

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 L pH = 6

การเตรียม 0.1 M HCl ปริมาตร 50 มล.

นั่นคือ กรด 100 g มี HCl อยู่ 32 g หรือ 32 / (1 + 35.5) = 32/36.5 = 0.877 mol

จากค่าความหนาแน่นสามารถคำนวณปริมาตรของกรด 100 ก. ได้จาก 100 ก. / 1.16 ก./มล. = 86.2 มล. หรือคิดเป็นโมลต่อลิตรได้ 0.877 mol / 0.0862 L = 10.2 M ถ้าต้องการเตรียมกรด 0.1 M HCl ปริมาตร 50 มล. สามารถคำนวณจากสูตร

สูตร C1V1 = C2V2

ภาพที่ ข - 3 สูตรการคำนวณ 0.1 M HCl

C1 = 10.2 M

V1 = ? ml

C2 = 0.1 M

V2 = 50 ml

ดังนั้น V1 = 0.1 x 50 / 10.2 = 0.49 ml

ดูด HCl 0.49 ml ใส่ลงไปใน Beaker ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 ml พร้อมทั้งกวน ตลอดเวลา ทิ้งไว้ให้เย็น

การเตรียม 50 mM TEAH (Tetraethylammonium hydroxide) ปริมาตร 50 ml

50 mM TEAH (Tetraethylammonium hydroxide) ปริมาตร 1 ล.

สูตรเคมี C_8 - H_{20} - N. OH

มวลโมเลกุล = (12x8) + (1x20) + 14 + 16 +1 = 147.26

สูตรคำนวณ mol = g / MW

50 mM = 50×10^{-3}

ดังนั้น 50×10^{-3} M = g / MW

g = (50×10^{-3}) (147.26) = 7.363 g/l

แสดงว่า ในน้ำ 1,000 ml จะมี TEAH 7.363 g

ถ้า 50 ml จะมี TEAH = (7.363 x 50)/1,000 = 0.368 g

ภาคผนวก ค

สารเคมี

Nutrient Broth ยี่ห้อ HIMEDIA

รูปที่ ค - 1 Nutrient Broth ยี่ห้อ HIMEDIA.

Nutrient Agar ยี่ห้อ HIMEDIA

รูปที่ ค - 2 Nutrient Agar ยี่ห้อ HIMEDIA.

Soluble starch

รูปที่ ค - 3 Soluble starch.

Yeast extract

รูปที่ ค - 4 Yeast extract.

Peptone

รูปที่ ค - 5 Peptone.

K_2HPO_4

รูปที่ ค - 6 K_2HPO_4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

รูปที่ ค - 7 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

NaCl

รูปที่ ค - 8 NaCl.

Sodium hydroxide (NaOH)

รูปที่ ค - 9 Sodium hydroxide (NaOH).

Amylose

รูปที่ ค - 10 Amylose.

Glycine

รูปที่ ค - 11 Glycine.

Acetic acid , Glacial

รูปที่ ค - 12 Acetic acid , Glacial.

Iodine (I_2)

รูปที่ ค - 13 Iodine (I_2).

โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)

รูปที่ ค - 14 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI).

Glycerol 87%

รูปที่ ค - 15 Glycerol 87%.

Ethanol 95%

รูปที่ ค - 16 Ethanol 95%.

Isopropanol

รูปที่ ค - 17 Isopropanol.

Hexane

รูปที่ ค - 18 Hexane.

Acetylacetone

รูปที่ ค - 19 Acetylacetone.

Ammonium acetate

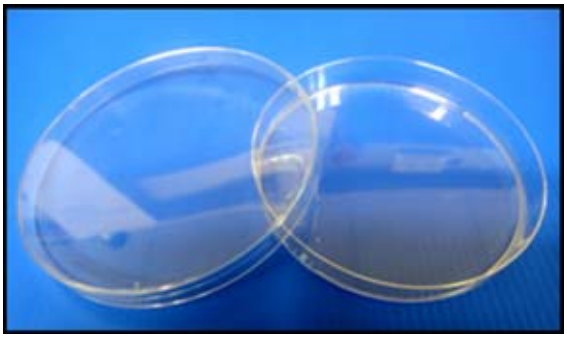
รูปที่ ค - 20 Ammonium acetate.

ภาคผนวก ง
วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

กระบอกตวง (Cylinder)

รูปที่ ง - 1 กระบอกตวง (Cylinder).

จานเลี้ยงเชื้อ (Plate) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 cm



รูปที่ ง - 2 จานเลี้ยงเชื้อ (Plate) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm.

ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)

รูปที่ ง – 3 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask).

หลอดทดลองฝาเกลียว (Test tube)

รูปที่ ง - 4 หลอดทดลองฝาเกลียว (Test tube).

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

รูปที่ ง - 5 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask).

บีกเกอร์ (Beaker)

รูปที่ ง - 6 บีกเกอร์ (Beaker).

ขวดแก้วปากกว้างฝาเกลียว

รูปที่ ง - 7 ขวดแก้วปากกว้างฝาเกลียว.

Appendrop

รูปที่ ง - 8 Appendrop.

ขวดน้ำกลั่น

รูปที่ ง - 9 ขวดน้ำกลั่น.

ไมโครปิเปต (Micropipette)

รูปที่ ง - 10 ไมโครปิเปต (Micropipette).

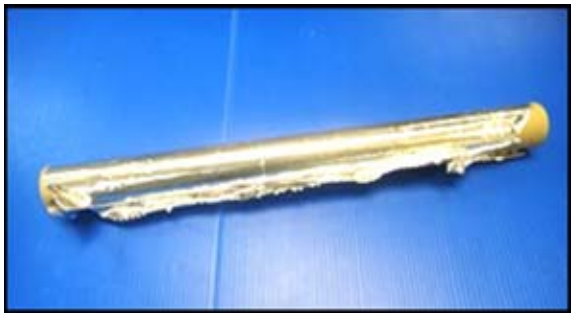
ตะเกียงแอลกอฮอล์

รูปที่ ง - 11 ตะเกียงแอลกอฮอล์.

Magnetic

รูปที่ ง - 12 Magnetic.

ฟอยล์อะลูมิเนียม



รูปที่ ง - 13 ฟอยล์อะลูมิเนียม.

Loop

รูปที่ ง - 14 Loop.

กระดาษกรอง เบอร์ 2

รูปที่ ง - 15 กระดาษกรอง เบอร์ 2.

กระบอกฉีดพ่นแอลกอฮอล์ (Foggy)

รูปที่ ง - 16 กระบอกฉีดพ่นแอลกอฮอล์ (Foggy).

นาฬิกาจับเวลา

รูปที่ ง - 17 นาฬิกาจับเวลา.

แท่งแก้วกวนสาร

รูปที่ ง - 18 แท่งแก้วกวนสาร.

Vortex mixture รุ่น KMC – 1300V

รูปที่ ง - 19 Vortex mixture รุ่น KMC – 1300V.

ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น CTL 101

รูปที่ ง - 20 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น CTL 101.

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Seriker II

รูปที่ง - 21 เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Seriker II.

Hot plate stirrer รุ่น HTS – 1003

รูปที่ ง - 22 Hot plate stirrer รุ่น HTS – 1003.

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ memmert รุ่น UNB

รูปที่ ง - 23 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ memmert รุ่น UNB.

ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Scientific รุ่น Series 2000

รูปที่ ง - 24 ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Scientific รุ่น Series 2000.

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น series 2000

รูปที่ ง - 25 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น series 2000.

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) รุ่น VS – 8480SPN

รูปที่ ง - 26 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) รุ่น VS – 8480SPN.

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ Yamato รุ่น SP 300

รูปที่ ง - 27 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ Yamato รุ่น SP 300.

เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Colony counter) รุ่น 8502-2092

รูปที่ ง - 28 เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Colony counter) รุ่น 8502-2092.

เครื่องวัดความเป็นกรด - เบส (pH meter) รุ่น 1539931

รูปที่ ง - 29 เครื่องวัดความเป็นกรด - เบส (pH meter) รุ่น 1539931.

เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ FX – 2000i

รูปที่ ง - 30 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ FX – 2000i.

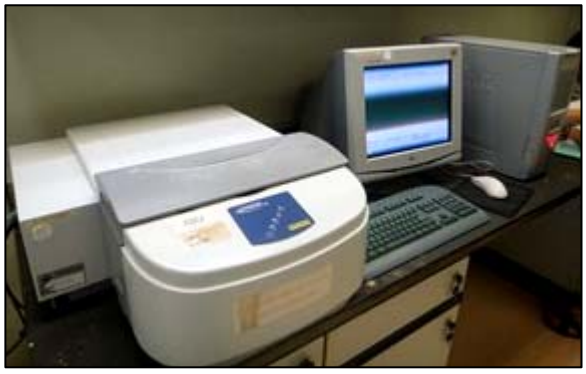
เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius A 200S

รูปที่ ง – 31 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius A 200S.

เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงระบบทำความเย็น รุ่น Suprema 25

รูปที่ ง - 32 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงระบบทำความเย็น รุ่น Suprema 25.

เครื่องวัดค่าการหักเหของแสง (Spectrophotometer) รุ่น UVIKON 2



รูปที่ ง - 33 เครื่องวัดค่าการหักเหของแสง (Spectrophotometer) รุ่น UVIKON 2.

ตู้ดูดควัน (Hood)

รูปที่ ง - 34 ตู้ดูดควัน (Hood).

เครื่องกลั่น ระเหยแห้ง (Evaporator)

รูปที่ ง – 35 เครื่องกลั่น ระเหยแห้ง (Evaporator).

เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น HP 0021 - 45

รูปที่ ง - 36 เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น HP 0021 – 45.

ภาคผนวก จ
วิธีการย้อมแกรม

การย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

การย้อมแกรมเป็นเทคนิคในการศึกษาจุลินทรีย์ โดยดูสีที่ย้อมติดกับตัวจุลินทรีย์ลักษณะการย้อมติดที่ตัวเซลล์เป็นแบบ differential strain ซึ่งเป็นการใช้สีย้อมมากกว่าหนึ่งชนิด สีจะติดตามไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้.

1. การย้อมสีแกรม

ผู้ที่คิดค้นการย้อมสีวิธีนี้คือ Hans Christian Gram ในปี ค.ศ. 1884 ผลของการย้อมสีแกรมทำให้จำแนกแบคทีเรียออกได้ 2 กลุ่ม คือ

1. แกรมบวก (Gram Positive) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีน้ำเงินม่วง.
2. แกรมลบ (Gram Negative) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแดง.

2. สีและสารละลายที่ใช้ทั้งหมด

1. Crystal violet.
2. สารละลายไอโอดีน.
3. เอท ธิลแอลกอฮอล์ 95%.
4. Safranin.
5. น้ำกลั่น.

3. วิธีการย้อมแกรม

1. smear เชื้อที่ต้องการย้อมลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง จากนั้นตรึงตัวเซลล์ด้วยการผ่านเปลว ไฟ (ระวังเซลล์จะแตกตายก่อนด้วย) การตรึงเซลล์จะช่วยให้เซลล์แห้งติดกับแผ่นกระจกสไลด์.
2. หยด Ammonium oxalate crystal violet บนเชื้อที่ smear นานประมาณ 1 - 2 นาที แล้วเทสีทิ้ง.

3. หยดสารละลายไอโอดีนตามลงไปนานประมาณ 2 นาทีแล้วเททิ้ง สารละลายไอโอดีนจะช่วยให้เซลล์ย้อมติดสีได้ดีขึ้น.
4. ขั้นตอนนี้เรียกว่า Decolorized โดยการล้างสีด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที แล้วจึงตามด้วยน้ำกลั่น.
5. หยดสี Safranin บนเชื้อนานประมาณ 15-30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำ แล้วจึงมองเซลล์ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์.

4. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงระหว่างการย้อมแกรมของแบคทีเรีย

ตารางที่ จ – 1 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงระหว่างการย้อมแกรมของแบคทีเรีย

สีและสารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
1. Ammonium oxalate crystal violet	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2. สารละลายไอโอดีน	สารละลายไอโอดีนรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง	สารละลายไอโอดีนรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง
3. เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	ไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์สูญเสียน้ำ จึงเกิดการเหี่ยวหดตัว ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดเล็กสารประกอบของสีซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายออกมาได้ เซลล์จึงติดสีม่วง	สารพวกลิปิดที่ผนังเซลล์ถูกละลายออกไป ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น สารละลายของสีจึงสามารถละลายออกจากเซลล์ได้ เซลล์ไม่ติดสี
4. Safranin	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีนี้ เซลล์ติดสีม่วงตามเดิม	เซลล์ติดสีแดงของ Safranin

5. หลักเกณฑ์ในการย้อมแกรม

1. เซลล์ปกติ (vegetative cell) เท่านั้นที่ติดสีแกรมบวกหรือแกรมลบ แต่ถ้าเซลล์เกิดแตกขึ้นมาจะ ติดสีเฉพาะแกรมลบเท่านั้น.
2. การย้อมแกรมต้องใช้ crystal violet และสารละลายไอโอดีนเสมอ.

3. แบคทีเรียเท่านั้นที่ให้ผลต่างกันในการย้อมแกรม แต่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จะติดสีย้อมแกรมอย่าง ใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เช่น เซลล์ยีสต์จะติดสีแกรมบวก.
4. การย้อมสีแกรมสามารถเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแกรมลบได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยน แบคทีเรียแกรมลบไปเป็นแกรมบวกได้.
5. ไซโตพลาสซึมติดสีแกรมลบเท่านั้น.
6. แบคทีเรียแกรมบวกถูกล้างสียากกว่าแกรมลบ.
7. สปอร์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature endospore) จะติดสีแกรมบวก ส่วนสปอร์ที่เจริญเต็มที่ (mature endospore) ไม่ติดสีแกรม.

6. การเตรียมสีในการย้อมแกรม

6.1 Ammonium oxalate crystal violet

เตรียมสารละลาย Gram's crystal violet และAmmonium oxalate ผสมเข้าด้วยกัน วิธีการเตรียมทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

6.1.1 เตรียม Gram's crystal violet

- Crystal violet 2.0 กรัม
- เอทธิลแอลกอฮอล์ 20.0 มิลลิลิตร ให้ทำการละลาย Crystal violet ในเอทธิลแอลกอฮอล์.

6.1.2 เตรียม Ammonium oxalate

- Ammonium oxalate , C.P 0.8 กรัม
- น้ำกลั่น 80.0 มิลลิลิตร ละลาย Ammonium oxalate ในน้ำกลั่น.

เมื่อได้ทั้ง Gram's crystal violet และ Ammonium oxalate แล้ว จากนั้นให้ผสมสารละลาย
ทั้งสองเข้าด้วยกันและคนให้เข้ากัน.

6.2 สารละลายไอโอดีน

- Iodine , C.P 1.0 กรัม.
- Potassium Iodide, C.P (KI) 2.0 กรัม.
- น้ำกลั่น 300.0 มิลลิลิตร.

ผสม Iodine และ Potassium Iodide ในโกร่ง ใช้สากบดให้ละเอียด แล้วจึงค่อยๆ เติมน้ำกลั่น
ลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับน้ำน้ำกลั่น.

6.3 Safranin

- Safranin 0.25 กรัม

- เอทิลแอลกอฮอล์ 10.00 มิลลิลิตร.

- น้ำกลั่น 100.00 มิลลิลิตร.

ละลาย Safranin ในเอทธิลแอลกอฮอล์ แล้วจึงเติมน้ำกลั่น และทำการคนให้เข้ากัน จากนั้น
จึงกรองผ่านกระดาษกรองเอาแต่ส่วนที่เป็นของเหลวสีแดงไปใช้.

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูล OD และกราฟมาตรฐาน

การวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) สำหรับการหาปริมาณเอนไซม์ CGTase

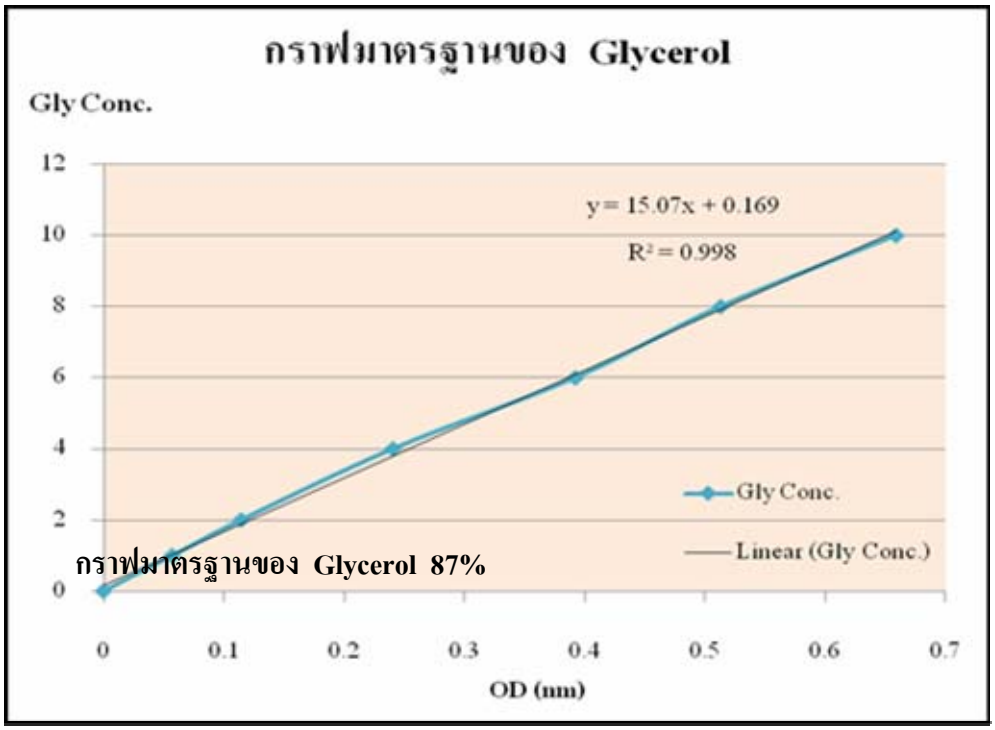
1. ใส่น้ำกลั่นลงใน Cuvette ที่ 1 และ 2 ในช่อง R (Reference) และ S (Sample) ตามลำดับ.
2. Set auto zero แล้วเอา Cuvette น้ำกลั่นในช่อง S (Sample) ออก จากนั้นใส่ Blank ลงไปแทน.
3. วัดค่า OD ของ Blank ที่ 700 nm แล้วบันทึกค่าที่ได้เท่ากับ 0.08.
4. ใส่ Reaction mixture จากการทดลองต่างๆ ลงไปแทนใน Cuvett Blank
5. วัดค่า OD ที่ 700 nm แล้วบันทึกค่าไว้.

ตารางที่ ฉ – 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm ของเชื้อ *Bacillus circulans* TISTR 1923

เชื้อ / อาหารเลี้ยงเชื้อ / อุณหภูมิ	ชั่วโมงที่	ค่า OD ที่ 700 nm	% การลดลงของสี	ปริมาณเอนไซม์		
Bacillus circulans TISTR 1923 NB 30 °C	0 hr	0.034	54.36	0.544	**Average**	0.638
	12 hr	0.031	58.33	0.583	**SD**	0.104
	24 hr	0.023	68.71	0.687	**Average+SD**	0.742
	36 hr	0.025	66.91	0.669	**Average-SD**	0.534
	48 hr	0.020	73.08	0.731		
	60 hr	0.017	77.00	0.770		
	72 hr	0.039	48.30	0.483		
Bacillus circulans TISTR 1923 NB 37 °C	0 hr	0.037	50.72	0.507	**Average**	0.646
	12 hr	0.028	62.49	0.625	**SD**	0.089
	24 hr	0.016	78.68	0.787	**Average+SD**	0.736
	36 hr	0.031	59.04	0.590	**Average-SD**	0.557
	48 hr	0.025	66.32	0.663		
	60 hr	0.027	63.57	0.636		
	72 hr	0.021	71.67	0.717		
Bacillus circulans TISTR1923 NBM 30°C	0 hr	0.025	66.11	0.661	**Average**	0.695
	12 hr	0.024	68.48	0.685	**SD**	0.038
	24 hr	0.020	72.99	0.730	**Average+SD**	0.733
	36 hr	0.022	70.74	0.707	**Average-SD**	0.657
	48 hr	0.019	74.42	0.744		
	60 hr	0.027	63.52	0.635		
	72 hr	0.022	70.15	0.701		
Bacillus circulans TISTR 1923 NBM 37 °C	0 hr	0.036	51.67	0.517	**Average**	0.690
	12 hr	0.022	70.34	0.703	**SD**	0.126
	24 hr	0.0180	76.08	0.761	**Average+SD**	0.816
	36 hr	0.015	80.25	0.802	**Average-SD**	0.565
	48 hr	0.021	71.60	0.716		
	60 hr	0.014	81.63	0.816		
	72 hr	0.036	51.65	0.517		
Bacillus circulans TISTR 1923 HS 30°C	hr	0.024	67.65	0.676	**Average**	0.620
	12 hr	0.022	70.02	0.700	**SD**	0.179
	24 hr	0.020	73.47	0.735	**Average+SD**	0.800
	36 hr	0.028	63.02	0.630	**Average-SD**	0.441
	48 hr	0.024	68.63	0.686		
	60 hr	0.023	69.56	0.696		
	72 hr	0.058	22.00	0.220		
Bacillus circulans TISTR 1923 HS 37 °C	0 hr	0.025	66.28	0.663	**Average**	0.638
	12 hr	0.041	44.86	0.449	**SD**	0.088
	24 hr	0.024	67.38	0.674	**Average+SD**	0.726
	36 hr	0.024	67.42	0.674	**Average-SD**	0.550
	48 hr	0.022	71.00	0.710		
	60 hr	0.024	68.32	0.683		
	72 hr	0.029	61.35	0.613		

ตารางที่ ฉ – 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm ของเชื้อ *Bacillus* sp. TISTR 908

เชื้อ / อาหารเลี้ยงเชื้อ / อุณหภูมิ	ชั่วโมงที่	ค่า OD ที่ 700 nm	% การลดลงของสี	ปริมาณเอนไซม์		
***Bacillus* sp. TISTR 908 NB 30 °C**	0 hr	0.026	65.67	0.657	**Average**	0.616
	12 hr	0.023	68.89	0.689	**SD**	0.071
	24 hr	0.022	71.26	0.713	**Average+SD**	0.687
	36 hr	0.034	54.05	0.541	**Average-SD**	0.545
	48 hr	0.031	58.45	0.585		
	60 hr	0.031	59.21	0.592		
	72 hr	0.035	53.48	0.535		
***Bacillus* sp. TISTR 908 NB 37 °C**	0 hr	0.023	69.77	0.698	**Average**	0.678
	12 hr	0.030	59.71	0.597	**SD**	0.042
	24 hr	0.024	67.93	0.679	**Average+SD**	0.720
	36 hr	0.022	71.22	0.712	**Average-SD**	0.636
	48 hr	0.023	69.14	0.691		
	60 hr	0.021	71.86	0.719		
	72 hr	0.026	65.24	0.652		
***Bacillus* sp. TISTR 908 NBM 30°C**	0 hr	0.024	67.77	0.678	**Average**	0.677
	12 hr	0.015	80.31	0.803	**SD**	0.072
	24 hr	0.025	66.60	0.666	**Average+SD**	0.749
	36 hr	0.025	66.30	0.663	**Average-SD**	0.605
	48 hr	0.033	55.59	0.556		
	60 hr	0.023	69.40	0.694		
	72 hr	0.024	67.95	0.680		
***Bacillus* sp. TISTR 908 NBM 37 °C**	0 hr	0.016	78.40	0.784	**Average**	0.711
	12 hr	0.014	81.95	0.819	**SD**	0.108
	24 hr	0.010	86.96	0.870	**Average+SD**	0.819
	36 hr	0.028	62.61	0.626	**Average-SD**	0.603
	48 hr	0.024	67.43	0.674		
	60 hr	0.030	60.43	0.604		
	72 hr	0.024	67.44	0.674		
***Bacillus* sp. TISTR 908 HS 30°C**	hr	0.032	57.02	0.570	**Average**	0.562
	12 hr	0.022	70.77	0.708	**SD**	0.126
	24 hr	0.032	56.95	0.569	**Average+SD**	0.688
	36 hr	0.050	32.87	0.329	**Average-SD**	0.436
	48 hr	0.023	69.37	0.694		
	60 hr	0.035	53.54	0.535		
	72 hr	0.035	52.96	0.530		
***Bacillus* sp. TISTR908 HS 37 °C**	0 hr	0.045	39.56	0.396	**Average**	**0.552**
	12 hr	0.025	66.03	0.660	**SD**	**0.089**
	24 hr	0.032	56.82	0.568	**Average+SD**	0.642
	36 hr	0.039	48.57	0.486	**Average-SD**	0.463
	48 hr	0.027	63.47	0.635		
	60 hr	0.034	55.15	0.552		
	72 hr	0.032	56.98	0.570		



กราฟมาตรฐาน Glycerol 87 %

OD ที่ 410 nm	Gly Conc.
0	0
0.0571	1
0.1146	2
0.2408	4
0.3925	6
0.5134	8
0.6592	10

รูปที่ ฉ - 1 กราฟมาตรฐานของ Glycerol 87%.

ตารางที่ ฉ - 3 ค่า OD ที่ 410 nm ของ Glycerol 87%

ผลจากการหาปริมาณ Glycerol หลังทำปฏิกิริยา

Flask	OD ที่ 410 nm	Gly Conc.
1	0.1770	2.8324
2	0.1883	3.0031
3	0.1743	2.7913
4	0.1854	2.9585

ภาคผนวก ช

ตารางผลการทดลอง

- **หน่วย : log CFU/ml**

ตารางที่ ช - 1 ค่าการเจริญของ *Bacillus circulans* TISTR 1923

อาหาร ,อุณหภูมิ	เวลา (ชั่วโมง)								
	0	**3**	**6**	**12**	**24**	**36**	**48**	**60**	**72**
NB, 30°C	9.30	9.67	9.77	10.09	10.28	9.80	9.10	8.85	7.79
NB, 37°C	8.30	9.05	9.76	10.15	10.31	9.86	9.00	8.90	8.85
NBM, 30°C	8.69	8.85	9.00	9.13	10.41	10.29	9.68	9.32	7.82
NBM, 37°C	8.48	8.68	9.82	9.97	10.43	9.97	9.71	9.32	7.70
HS, 30°C	8.35	8.62	9.10	9.97	10.33	9.75	9.21	8.70	8.68
HS, 37°C	8.73	9.83	9.96	10.21	10.45	10.21	10.01	8.76	8.18

- หน่วย : log CFU/ml

ตารางที่ ช - 2 ค่าการเจริญของ *Bacillus* sp. TISTR 908

อาหาร , อุณหภูมิ	เวลา (ชั่วโมง)							ค่าเฉลี่ย (Average)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
	0	12	24	36	48	60	72		
NB, 30°C	0.54	0.58	0.69	0.67	0.73	0.77	0.49	0.64	0.10
NB, 37°C	0.51	0.63	0.79	0.59	0.66	0.64	0.72	0.65	0.09
NBM, 30°C	0.66	0.69	0.73	0.71	0.74	0.64	0.70	0.70	0.04
NBM, 37°C	0.52	0.70	0.76	0.80	0.72	0.82	0.52	0.70	0.13
HS, 30°C	0.68	0.70	0.74	0.63	0.69	0.70	0.22	0.62	0.18
HS, 37°C	0.66	0.45	0.67	0.67	0.71	0.68	0.61	0.64	0.09

*** หน่วย : unit/ml**

ตารางที่ ช - 3 ค่าการวัดปริมาณ CGTase ของ *Bacillus circulans* TISTR 1923

อาหาร , อุณหภูมิ	เวลา (ชั่วโมง)							ค่าเฉลี่ย (Average)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
	0	12	24	36	48	60	72		
NB, 30 °C	0.66	0.69	0.71	0.54	0.59	0.59	0.54	0.62	0.07
NB, 37 °C	0.70	0.60	0.68	0.71	0.69	0.72	0.65	0.68	0.04
NBM, 30 °C	0.68	0.80	0.67	0.66	0.56	0.69	0.68	0.68	0.07
NBM, 37 °C	0.78	0.82	0.87	0.63	0.67	0.60	0.67	0.72	0.10
HS, 30 °C	0.57	0.71	0.57	0.33	0.69	0.54	0.53	0.56	0.13
HS, 37 °C	0.40	0.66	0.57	0.49	0.64	0.55	0.57	0.55	0.09

- **หน่วย : unit/ml**

ตารางที่ ช - 4 ค่าการวัดปริมาณ CGTase ของ *Bacillus* sp. TISTR 908

ชั่วโมง	อาหาร	ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)					
		30 °ซ.			37 °ซ.		
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ค่าเฉลี่ย	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ค่าเฉลี่ย
0	NB	7.16	7.18	7.17	7.21	7.24	7.23
	NBM	6.94	6.78	6.86	7.01	7.01	7.01
	HS	9.14	9.3	9.22	9.39	9.03	9.21
12	NB	7.17	7.19	7.18	7.32	7.37	7.35
	NBM	6.88	6.77	6.83	5.96	5.82	5.89
	HS	8.90	8.70	8.80	8.20	8.08	8.14
24	NB	7.95	7.63	7.79	8.32	8.28	8.30
	NBM	6.04	5.89	5.97	5.57	5.54	5.56
	HS	7.67	7.00	7.34	6.24	5.72	5.98
36	NB	8.16	8.07	8.12	8.35	8.35	8.35
	NBM	5.91	5.86	5.89	5.46	5.42	5.44
	HS	7.55	6.82	7.19	5.42	5.38	5.40
48	NB	8.53	8.20	8.37	8.42	8.40	8.41
	NBM	5.58	5.58	5.58	5.42	5.37	5.40
	HS	6.63	5.92	6.28	5.32	5.27	5.30
60	NB	8.54	8.35	8.45	8.47	8.55	8.51
	NBM	5.50	5.51	5.51	5.42	5.34	5.38
	HS	6.94	5.36	6.15	5.29	5.25	5.27
72	NB	8.62	8.64	8.63	8.85	8.80	8.83
	NBM	5.33	5.46	5.40	5.32	5.25	5.29
	HS	6.32	5.62	5.97	5.27	5.24	5.26

ตารางที่ ช – 5 ค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของ *Bacillus circulans* TISTR 1923

ชั่วโมง	อาหาร	ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)					
		30 °C			37 °C		
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ค่าเฉลี่ย	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ค่าเฉลี่ย
0	NB	7.39	7.31	7.35	7.31	7.36	7.34
	NBM	7.37	7.45	7.41	7.33	7.32	7.33
	HS	8.89	9.13	9.01	9.05	9.01	9.03
12	NB	7.60	7.81	7.71	7.57	7.61	7.59
	NBM	7.43	7.48	7.46	7.81	7.66	7.74
	HS	8.22	8.30	8.26	8.37	8.35	8.36
24	NB	8.11	8.13	8.12	8.33	8.48	8.41
	NBM	8.05	8.30	8.18	8.39	8.53	8.46
	HS	8.35	8.39	8.37	8.51	8.39	8.45
36	NB	8.35	8.48	8.42	8.61	8.64	8.63
	NBM	8.20	8.43	8.32	8.70	8.68	8.69
	HS	8.56	8.51	8.54	8.84	8.75	8.80
48	NB	8.67	8.58	8.63	8.84	8.73	8.79
	NBM	8.06	8.78	8.42	8.86	8.80	8.83
	HS	8.94	8.85	8.90	9.04	9.03	9.04
60	NB	8.94	8.87	8.91	8.87	8.95	8.91
	NBM	8.24	8.83	8.54	8.98	8.80	8.89
	HS	9.04	8.90	8.97	9.38	9.14	9.26
72	NB	9.11	8.95	9.03	9.30	9.01	9.16
	NBM	8.48	8.85	8.67	9.07	9.02	9.05
	HS	9.13	9.17	9.15	9.44	9.20	9.32

ตารางที่ ช – 6 ค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ของ *Bacillus* sp. TISTR 908

Bacillus sp. TISTR 908 อาหาร Nutrient Broth Modified (NBM) อุณหภูมิ 37 °C					
ชั่วโมง	**ปริมาณเอนไซม์**	**ชั่วโมง**	**ปริมาณเอนไซม์**	**ชั่วโมง**	**ปริมาณเอนไซม์**
12	0.79	**21**	0.81	**29**	0.76
13	0.79	**22**	0.80	**30**	0.72
14	0.80	**23**	0.85	**31**	0.70
15	0.79	**24**	0.87	**32**	0.67
16	0.82	**25**	0.86	**33**	0.69
17	0.81	**26**	0.84	**34**	0.66
18	0.84	**27**	0.78	**35**	0.65
19	0.83	**28**	0.80	**36**	0.64
20	0.79				

- **หน่วย : unit/ml**

ตารางที่ ช – 7 ปริมาณ CGTase ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือก

Flask	**OD ที่ 700 nm**		**ค่าเฉลี่ย**	**% การลดลงของสี**	**ปริมาณเอนไซม์ (unit/ml)**
	ซ้ำ 1	**ซ้ำ 2**			
1	0.03	0.03	0.03	62.50	0.63
2	0.04	0.03	0.04	50.00	0.50
3	0.05	0.04	0.05	37.50	0.38
4	0.04	0.04	0.04	50.00	0.50

ตารางที่ ช – 8 ปริมาณ CGTase เพื่อใช้สังเคราะห์ Crude α-glucosyl glycerol

Flask	ก่อนทำปฏิกิริยา (g)	หลังทำปฏิกิริยา (g)	Glycerol ที่ถูกใช้ (g)	จำนวนโมเลกุล Glycerol	ผลิตภัณฑ์ α-glucosyl glycerol	สัดส่วน α-glucosyl glycerol	จำนวนโมเลกุล Glycerol ที่ใช้สร้าง α-glucosyl glycerol	ปริมาณ α-glucosyl glycerol	
								(g/25ml)	(mg/ml)
1	3.5300	2.8324	0.6976	4.56×10^{21}	Glc - GL	56 %	2.55×10^{21}	1.14	45.60
					Glc_2 - GL	30 %	1.37×10^{21}	1.03	41.20
					Glc_3 - GL	11 %	5.02×10^{20}	0.52	20.80
					Glc_4 - GL	3 %	1.37×10^{20}	0.19	7.60
					รวม	**100 %**	**4.56×10^{21}**	**2.88**	**115.20**
2	3.5300	3.0031	0.5269	3.44×10^{21}	Glc - GL	56 %	1.93×10^{21}	0.87	34.80
					Glc_2 - GL	30 %	1.03×10^{21}	0.77	30.80
					Glc_3 - GL	11 %	3.78×10^{20}	0.39	15.60
					Glc_4 - GL	3 %	1.03×10^{20}	0.14	5.60
					รวม	**100 %**	**3.44×10^{21}**	**2.17**	**86.80**
3	3.5300	2.7913	0.7387	4.83×10^{21}	Glc - GL	56 %	2.70×10^{21}	1.21	48.40
					Glc_2 - GL	30 %	1.45×10^{21}	1.09	43.60
					Glc_3 - GL	11 %	5.31×10^{20}	0.55	22.00
					Glc_4 - GL	3 %	1.45×10^{20}	0.20	8.00
					รวม	**100 %**	4.83×10^{21}	**3.05**	**122.00**
4	3.5300	2.9585	0.5715	3.74×10^{21}	Glc - GL	56 %	2.09×10^{21}	0.94	37.60
					Glc_2 - GL	30 %	1.12×10^{21}	0.84	33.60
					Glc_3 - GL	11 %	4.11×10^{20}	0.43	17.20
					Glc_4 - GL	3 %	1.12×10^{20}	0.16	6.40
					รวม	**100 %**	**3.74×10^{21}**	**2.37**	**94.80**
					ปริมาณ α-Glucosyl Glycerol เฉลี่ยทั้ง 4 Flask			**104.70 mg/ml**	