สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจากรา

นางสาว กนกวรรณ ยศบรรดาศักดิ์
นางสาว กิ่งแก้ว วงศ์ฉายา
นางสาว จุฑามาศ มณีวงศ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2541

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33523
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dextranase Production from Fungi

Miss Kanokwan Yotbandasak

Miss Kingkaew Wongchaya

Miss Chuthamas Maneewong

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจากรา
โดย	นางสาว กนกวรรณ ยศบรรดาศักดิ์
	นางสาว กิ่งแก้ว วงศ์ฉายา
	นางสาว จุฑามาศ มณีวงศ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึ กษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ.ดร. พรรณี ธูตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ

(ผศ. อรไท สุขเจริญ)

---------- กรรมการ

(อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ)

---------- กรรมการ

(ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจากเชื้อรา	
โดย	นางสาวกนกวรรณ	ยศบรรดาศักดิ์
	นางสาวกิ่งแก้ว	วงศ์ฉายา
	นางสาวจุฑามาศ	มณีวงศ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
เสนอ	ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
ปีการศึกษา	2541	

บทคัดย่อ

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้สูงสุด ในอาหารเหลว ที่ประกอบไปด้วย เด็กซ์แทรน 10.0 กรัม , ยีสต์สกัด 3.0 กรัม , KH_2PO_4 1.0 กรัม , $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.5 กรัม และ KCl 0.5 กรัม พีเอชเท่ากับ 5 เมื่อศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย เด็กซ์แทรน 7.5 กรัม , $NaNO_3$ 3.0 กรัม , KH_2PO_4 0.5 กรัม , $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.5 กรัม และ KCl 0.5 กรัม ที่พีเอชเท่ากับ 5 โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด เท่ากับ 1,135 หน่วย / มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title Dextranase Production from Fungi

Student Miss Kanokwan Yotbandasak

Miss Kingkaew Wongchaya

Miss Chuthamas Maneewong

Department Applied Biotechnology

Special Project Advisor Asst.Prof. Dr. Nuanphan Naranong

Academic year 1998

Abstract

Penicillium pinophilum TISTR 3386 was the most potential of dextranase production in the liquid medium containing (g/l) ; dextran , 10.0 ; yeast extract 3.0 ; KH_2PO_4 , 1.0 ; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0.5 ; KCl , 0.5 with an initial pH of 5.0 . The optimization of medium , for dextranase production by *P.pinophilum* , containing (g/l) ; dextran , 7.5 ; $NaNO_3$ 3.0 ; KH_2PO_4 , 1.0 ; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0.5 ; KCl , 0.5 . The initial pH was adjust to 5.0 . The maximum dextranase activity was 1135 unit/ml. on day 5 , when the culturing was carried out in a rotary shaker with the shaking speed of 200 rpm. at 30 $^{\circ}C$.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถทำเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งท่านได้ช่วยเอาใจใส่ ให้ข้อแนะนำด้วยดีเสมอมาและกรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา และอาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ กรรมการพิจารณาโครงการพิเศษที่ช่วยให้คำปรึกษาในการทดลอง ทั้งนี้ยังขอขอบคุณ คุณวิทยา เขียวเขิน เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่ช่วยกรุณาให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมี และเจ้าหน้าที่ธุรการด้วย ที่ทำให้การทำการทดลองเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่ช่วยเหลือ และให้ยืมอุปกรณ์ให้การทำโครงงานพิเศษนี้บรรลุไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ โครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อ โครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์	36
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	39
ภาคผนวก ค การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer	42
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานไอโซมอลโตส	43
ภาคผนวก จ แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของเด็กซ์แทรนที่ขนาดต่างๆ	5
ตารางที่ จ1	แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส จากเชื้อราชนิดต่างๆ	44
ตารางที่ จ2	แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส จากแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ	45
ตารางที่ จ3	แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส จากแหล่ง ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ	46
ตารางที่ จ4	แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส ในสภาวะพีเอชต่างๆ	47
ตารางที่ จ5	แสดงจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อทำการเลี้ยง *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ในอาหารที่มีเด็กซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอน และ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	สูตรโครงสร้างของเด็กซ์แทรน	3
รูปที่ 2.2	แสดงการจัดเรียงตัวของเด็กซ์แทรนโดยจะยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน , แรงวัลเดอร์วาล์ , หรืออาจยึดเกาะด้วยพันธะไอออนิก	4
รูปที่ 2.3	แสดงโครงสร้างของเด็กซ์แทรนที่ใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งมักจะมีบริเวณที่เป็นของเหลวสำหรับยึดจับสับเทรต	4
รูปที่ 3.1	รูปเชื้อ *Paecilomyces* TISTR 3306 ที่อยู่ในอาหารเอียง	12
รูปที่ 3.2	รูปเชื้อ *Paecilomyces* TISTR 3307 ที่อยู่ในอาหารเอียง	13
รูปที่ 3.3	รูปเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ที่อยู่ในอาหารเอียง	14
รูปที่ 3.4	*Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ในอาหาร PDA	20
รูปที่ 3.5	*Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ Shrief	20
รูปที่ 4.1	กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Paecilomyces* sp . TISTR 3306 , เชื้อ เชื้อ *Paecilomyces* sp . TISTR 3307 และเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386	22
รูปที่ 4.2	กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ	24
รูปที่ 4.3	กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	26
รูปที่ 4.4	กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะพีเอชต่างๆ	28
รูปที่ 4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอช , น้ำตาลรีดิวซ์ , กิจกรรมของเอนไซม์และน้ำหนักเซลล์แห้ง	30
รูปที่ ง	กราฟมาตรฐานไอโซทอลโทส	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1.

บทนำ

เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส (Dextranase) หรือ [endo–(1,6)–alpha–D-glucan–6–gluconohydrolase EC 3.2.1.11] เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเด็กซ์แทรนซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโพลิแซคคาไรด์ ผลิตได้จากเซลล์พืช (Heyer , 1970) , เซลล์สัตว์ (Dohiqvist , 1963) , แบคทีเรีย , ยีสต์ และรา ซึ่งโดยส่วนใหญ่ที่เราพบและนำมาใช้ประโยชน์ได้มาจากเชื้อราได้แก่พวก *Paecilomyces lilacinus* , *Penicillium pinophilum* , *Penicillium funiculosum* , *Penicillium notatum* ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นได้แก่ เด็กซ์แทรน ไปเป็นน้ำตาลไอโซมอลโตส (Isomaltose) และ ไอโซมอลโทริโอส (Isomaltoriose) (Pleszczynska และคณะ,1997) ใช้ประโยชน์ในทางด้านอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ (Kubik และคณะ,1994) , อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล (Godfrey และRuchelt,1983) และทางด้านการแพทย์เช่น นำมาใช้ในการป้องกันฟันผุโดยไปย่อยคราบหินปูน (Dental plaque) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทเด็กซ์แทรน (Fitzgerald , 1968)

เด็กซ์แทรน(Dextran)เป็นสารประกอบประเภทโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $1.5 \times 10^4 - 2 \times 10^7$ (Fitzgerald , 1968) ซึ่งถูกค้นพบมาแล้วกว่า 50 ปี พบว่าเป็นสารปลอมปน (impurity) ในน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) เด็กซ์แทรนมีความสำคัญคือเป็นส่วนประกอบใน chromatographic media หลายๆ ชนิดและมีคุณสมบัติที่ดีในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ และอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการถ่ายรูป(Photographic) และยังมีการวิจัยทางด้านโครงงานทางอุตสาหกรรมในประเทศสวีเดนโดย Bjorn Ingelman จากมหาวิทยาลัย Uppsala University พบว่าสิ่งเจือปนในน้ำตาลจากหัวบีท ได้มาจากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในซูโครสซึ่งมีอยู่ในน้ำตาลจากหัวบีท หลังจากนั้นได้มีการร่วมมือกันเพื่อนำมาวิจัยและประยุกต์ใช้เด็กซ์แทรนในงานทางด้านวิทยาศาสตร์ทางยา และนำไปสู่การไฮโดรไลซ์เด็กซ์แทรนเพื่อใช้ในการขยายปริมาตรของเลือด การคิดค้นนี้ได้ถูกจดลิขสิทธิ์โดย pharmacta ในกรุง Stockholm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันยังพบว่าได้มีการใช้เด็กซ์แทรนอย่างแพร่หลายรวมทั้งด้านการถ่ายรูป , การถนอมดวงตา เพื่อบ่งชี้โรค บริษัทถ่ายรูปส่วนใหญ่ใช้เด็กซ์แทรนและอนุพันธุ์ของเด็กซ์แทรนที่มีคุณภาพสูง และยังใช้เด็กซ์แทรนในการถนอมดวงตา และใช้ในครีมและโลชั่นสำหรับบำรุงผิว ผลิตภัณฑ์อย่างหนึ่งก็คือ Silicone cream ซึ่งประสบความสำเร็จในการปกป้องผิวแห้งแตกในเด็ก นอกจากนยังใช้ในการบ่งชี้โรค เช่น ใช้เด็กซ์แทรนใน Magnetic Resonance Imaging (MRI) เป็นต้น (Ingelman , 1998)

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. คัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้สูง
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมบางประการเพื่อผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้สูงสุด
3. ผลที่ได้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตในถังหมักต่อไป

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

คัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้สูงสุด และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์ในฟลาสก์แบบเขย่า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในปริมาณสูง และทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส เพื่อขยายการผลิตต่อไป

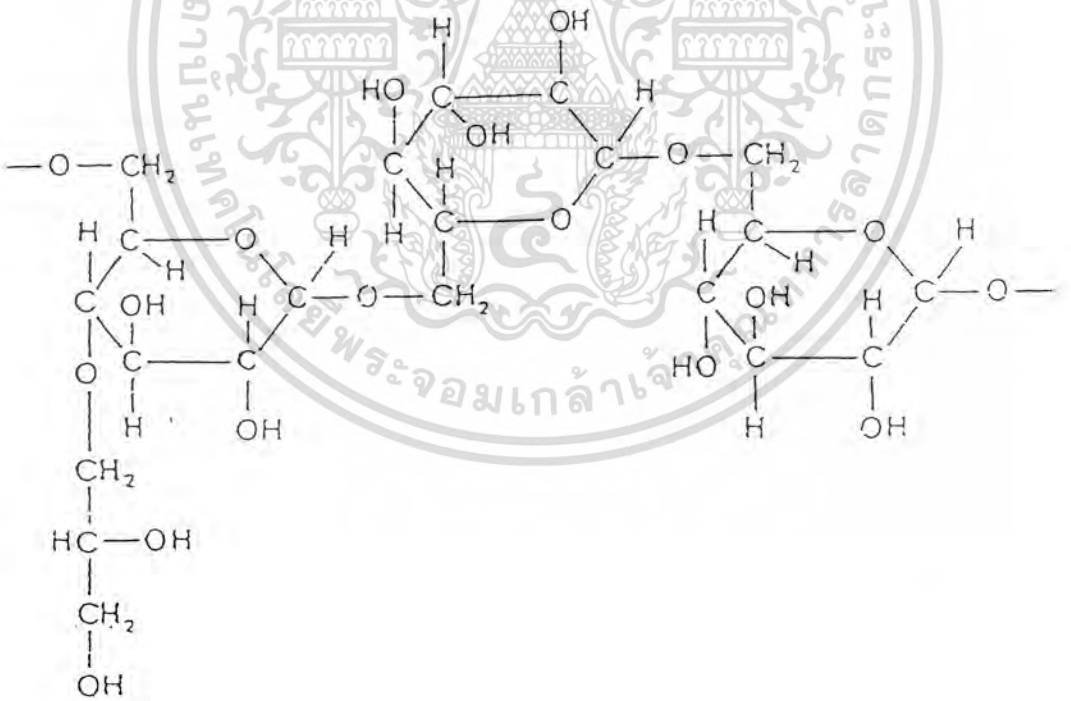
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2.

ตรวจเอกสาร

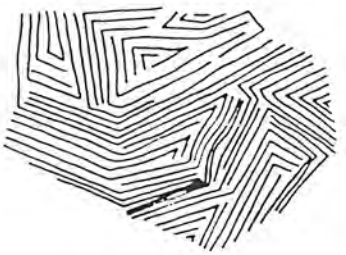
1. เด็กซ์แทรน (Dextran)

เด็กซ์แทรนเป็นสารประกอบโฮโมพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 1.5 x 10^4 - 2 x 10^7 ซึ่งจุลินทรีย์สามารถผลิตเด็กซ์แทรนออกมาได้ภายนอกเซลล์ (Extracellular polysaccharide) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตได้ เช่น *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc dextranicum* (Fitzgerald, 1968) เด็กซ์แทรนประกอบด้วย α - กลูโคสสายหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α 1-6 และประกอบด้วยกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะ α 1-2 , α 1-3 หรือ α 1-4 แต่โดยมากมักพบในตำแหน่ง α 1-4 (1 , 4 linkages) เด็กซ์แทรนพบในแบคทีเรียหลายชนิด และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และ ยีสต์ที่ผลิตเด็กซ์แทรน (Hames และคณะ , 1998)



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างเด็กซ์แทรน (Gemeiner , 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.2.2 แสดงการจัดเรียงตัวของเด็กซ์แทรนโดยจะยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน , แรงวัลเดอร์วาล์ , หรืออาจยึดเกาะกันด้วยพันธะไอออนิก (Gemeiner ,1992)

2.2.3 แสดงโครงสร้างของผลึกเด็กซ์แทรนที่ใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งจะมีบริเวณที่เป็นของเหลวสำหรับยึดจับกับสับเทรต(Gemeiner ,1992)

เด็กซ์แทรนจะถูกย่อยพันธะด้วยเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส โดยเอนไซม์จะย่อยแล้วได้ผลผลิตเป็นโมเลกุลของน้ำตาลซูโครส , ฟรุกโทสอิสระ และการเติมกลูโคสที่ตำแหน่งปลายสุดของเด็กซ์แทรน ซึ่งสามารถแสดงได้ดังสมการ

$$\text{Sucrose} + (\text{Glucose})_n \xrightarrow{\text{dextransucrase}} (\text{Glucose})_{n+1} + \text{Fructose}$$ (Weil , 1990)

พันธะไกลโคซิดิก(Glycosidic) ระหว่างกลูโคส และฟรุกโทสในน้ำตาลไดแซคคาไรด์จะมีรูปแบบเป็น α (1 , 6) โพลิเมอร์ของกลูโคสแสดงได้ตามสมการนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dextransucrase

***n* Sucrose** ——————— **Dextran + *n* Fructose**

เด็กซ์แทรนถูกสร้างโดยแบคทีเรียที่เจริญอยู่ตามผิวฟัน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของคราบหินปูนที่เกาะอยู่ตามเนื้อฟัน (Emil และคณะ,1964)

เด็กซ์แทรนจะถูกใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับแยกสารต่างๆให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Gel filtration ซึ่งในวิธีนี้มักใช้พอลิแซคคาไรด์จากธรรมชาติโดยมากนิยมใช้เด็กซ์แทรน ซึ่งผลิตโดยบริษัท pharmacia -LKB ภายใต้ชื่อ Sephadex (Rodney,1993)

คุณสมบัติทางกายภาพของเด็กซ์แทรนที่ขนาดต่างๆ แสดงดังตาราง (Rodney, 1993)

ตารางที่ 1 แสดง คุณสมบัติทางกายภาพของเด็กซ์แทรนที่ขนาดต่างๆ

Name	Fractionation Range for Proteins (daltons)	Water Regain (mL/g dry gel)	Bed Volume (mL/g dry gel)
Dextran (Sephadex)[1]			
G-10	0–700	1.0 ± 0.1	2–3
G-15	0–1500	1.5 ± 0.2	2.5–3.5
G-25	1000–5000	2.5 ± 0.2	4–6
G-50	1500–30,000	5.0 ± 0.3	9–11
G-75	3000–80,000	7.5 ± 0.5	12–15
G-100	4000–150,000	10 ± 1.0	15–20
G-150	5000–300,000	15 ± 1.5	20–30
G-200	5000–600,000	20 ± 2.0	30–40

ที่มา Rodney (1993)

ตัวเลขที่แสดงในตารางแสดงความสามารถในการดูดซับน้ำ ซึ่ง Sephadex นี้เราสามารถนำไปใช้ได้หลายๆขนาด Dextran - based gels ไม่สามารถผลิตเกิน 600,000 ดาลตัน เนื่องจากการเชื่อมกัน (Crosslink) ที่มีขนาดเล็กไม่พอเพียงที่จะป้องกันการซ้อนทับกันของอนุภาค ถ้าเด็กซ์แทรนที่เชื่อมกับ *N, N'*- methylenebisacrylamide ซึ่งใช้ในการแยกสารที่ให้ประสิทธิภาพดี (Rodney,1993)

เด็กแตรนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50,000-100,000 ใช้ในการรักษาโดยการใช้แทนน้ำเลือด (Blood Plasma) (Weil , 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เด็กซ์แทรนพบได้ในกระบวนการผลิตน้ำตาลโดยเด็กซ์แทรนถูกสร้างมาจากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ทำให้น้ำตาลที่ได้มีคุณภาพต่ำ สีของน้ำตาลที่ได้ไม่ใส เกิดปัญหาด้านความหนืดในสารละลายน้ำตาล ทำให้ระเหยน้ำออกจากสารละลายน้ำตาลได้ช้า และขั้นตอนการทำให้กากน้ำตาลเข้มข้นมีประสิทธิภาพต่ำลง เมื่อมีปริมาณเด็กซ์แทรน อยู่ 1000 ส่วนในล้านส่วนของเกล็ดน้ำตาล (Godfrey และReichelt,1983)

ประโยชน์

เมื่อใช้สารละลายเด็กซ์แทรนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในเลือด เพื่อเป็น blood plasma extender เนื่องจากเด็กซ์แทรนมีคุณสมบัติในการเพิ่มการดูดซับเลือด ในกรณีที่ผู้ป่วยช็อคเนื่องมาจากการสูญเสียเลือด อีกทั้งเด็กซ์แทรนไม่ทำให้เกิดพิษต่อเนื้อเยื่อคนและสัตว์ จึงใช้ในการผลิตยา และยังมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำโปรตีน (Fitzgerald , 1968)

การรักษาโรคลำไส้บวม (Colitis) มีการป้องกันการบวมของลำไส้โดยการใช้ฮอร์โมนกลูโคติคอยด์ (glucoticoid) ซึ่งพบในช่องปาก และลำไส้ เพื่อช่วยทำให้ยาที่ใช้ในการรักษามีความเข้มข้นขึ้นและมีประสิทธิภาพที่ดี และยังค้นพบอีกว่าการใช้ฮอร์โมนกลูโคติคอยด์ เชื่อมกับเด็กซ์แทรน สามารถรักษาโรคลำไส้บวมได้เป็นอย่างดี โดยทำการทดลองในหนู โดยเด็กซ์แทรนจะทำให้การหลั่งของฮอร์โมนกลูโคติคอยด์สูงขึ้น ดังนั้นการหลั่งกลูโคติคอยด์สูงขึ้นก็จะทำให้ประสิทธิภาพของยาที่ใช้รักษาโรคลำไส้บวมมีประสิทธิภาพในการรักษาได้ดียิ่งขึ้น (Tozer , 1992)

พบว่าความเสื่อมลงของโครงสร้างที่ยึดติดกันของเลือด ทำให้เลือดไม่สามารถยึดจับกันได้ซึ่งจะมีผลต่อระบบหมุนเวียน และกระบวนการต่างๆภายในร่างกาย จึงมีการคิดค้นหาสภาวะที่จะไปเป็นตัวยึดจับพันธะของเม็ดเลือดเอาไว้ โดยใช้สารจำพวก Oligopoptideterminated polyethylene glycol (Oligopeptide – PEG) และ เด็กซ์แทรน เป็นตัวจับ ซึ่ง Oligopeptide – PEG และ เด็กซ์แทรน นี้จะมีการสร้างโครงสร้างร่วมกันเรียกว่า interpinetrating polymer network (IPN) ทำให้เลือดมีการยึดเหนี่ยวต่อกัน ซึ่งใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่กระบวนการภายในร่างกายล้มเหลว (fail – safe mechanism) ที่เกิดจากความเสื่อมทางชีวภาพในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษานี้เป็นวิธีทางการแพทย์แนวใหม่ที่จะนำไปใช้ต่อไป ในการออกแบบในการใช้สารช่วยยึดเกาะดังกล่าวจะต้องคำนึงถึงลักษณะทางกายภาพในร่างกายของมนุษย์ อันได้แก่อุณหภูมิ , ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง การปล่อยเอนไซม์จากเซลล์เมื่อได้รับสารเหล่านี้ด้วย (Rogalski และคณะ, 1998)

กระบวนการผลิตเด็กซ์แทรน

ในปี คศ. 1990 Roger และคณะทำการผลิตเด็กซ์แทรนจาก *Leuconostoc mesenteroides* พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตเด็กซ์แทรนได้ในปริมาณมาก เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เด็กซ์แทรนที่ได้มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 15,000 – 20,000,000 จากนั้นทำการแยกขนาดของเด็กซ์แทรนโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ Gel filtration

นอกจากนั้นยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้ ได้แก่ แบคทีเรียยีนัส Pseudomonas ซึ่งสามารถผลิตเด็กซ์แทรนที่มีคุณภาพดี และสามารถนำไป ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น น้ำสลัด , ไอศกรีม และน้ำแข็ง เป็นต้น (Roger และคณะ , 1990)

ในปี คศ. 1993 Kim และคณะได้ทำการผลิตเด็กซ์แทรนเพื่อใช้สำหรับงานทางด้านการแพทย์โดยเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054 และ *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10830 โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) และ เด็กซ์แทรนเนส (dextranase) ทำให้ได้เด็กซ์แทรนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่เหมาะสมในการนำไปใช้งาน

ในปี คศ. 1996 Kim และคณะ พบว่าเชื้อผสมระหว่าง *Leuconostoc mesenteroides* สามารถผลิตเด็กซ์แทรนได้สองชนิดคือ ชนิด L สามารถตกผลึกในเอทานอล 30 เปอร์เซ็นต์ และชนิด S สามารถตกผลึกในเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์

ในปี คศ. 1993 Kim และคณะ ได้ทำการทดลองโดยใช้เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 10830 = NRRLB - 512) และ *Lipomyces starkeyi* (ATCC 74054) ผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรน มวลโมเลกุล 50,000 – 100,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เด็กซ์แทรนเนส (Dextranase)

เด็กซ์แทรนเนส (dextranase) มีชื่อเรียกตามระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ว่า α - 1 , 6 - glucan -6 – glucanohydrolase , E.C. 3.2.1.11 เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเด็กซ์แทรนซึ่งเป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อการสลายพันธะ α- 1,6 และ พันธะ α - 1,3 ที่เชื่อมหน่วยย่อยของสายเด็กซ์แทรน โดยเอนไซม์ เด็กซ์แทรนเนสนี้อาจมีการย่อยสลายพันธะแบบ Exo - หรือ Endo - ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ที่ผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

ในปี คศ. 1960 Fischer และStein ได้ทำการศึกษาตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส พบว่าโลหะ Co^{2+} , Mn^{2+} และ Cu^{2+} เร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง α - 1 , 6 linkage ของเด็กซ์แทรน และพบว่า Hg^{2+} , Ag^{2+} , N - Bromosuccinimide และ I_2 จะยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส และมีความคงตัวของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ พีเอช 6 ขึ้นไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส(Sugiuraและคณะ, 1973)

ในปี คศ. 1970 Heyer ทำการศึกษาพบเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในพืช

ในปี คศ. 1973 Sugiura และคณะ ทำการศึกษาพบว่า *Penicillium* sp. สามารถผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส โดยใช้เด็กแทรนเป็นสับเทรต จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไอโซมอลโตส ที่สภาวะ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6.0

ประโยชน์

ในปี คศ. 1983 Godfrey และReichelt พบการปนเปื้อนจากเด็กซ์แทรน และ แป้ง ทำให้น้ำตาลที่ได้ จากขบวนการตกผลึกนั้นไม่ใส จึงได้มีการนำเอาเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส มาย่อยเด็กซ์แทรน และ แป้ง โดยนำมาจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *Penicillium lilacinus* ซึ่งโดยปกติแล้วเด็กซ์แทรนจะไม่ใช่โครงสร้างหลักของน้ำตาล แต่ทำให้กระบวนการผลิตเกิดความล่าช้า โดยจะทำให้น้ำตาลนั้นมีความหนืดสูงขึ้น จึงต้องมีการใช้เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสลดปัญหาในขั้นตอนการผลิต

ในปี คศ. 1993 Bartelt ได้พบว่าเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพในช่องปาก พบว่าเด็กซ์แทรนเป็นส่วนประกอบของคราบฟัน (Dental plaque) จะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจาก *Lipomyces starkeyi* ตำแหน่งที่ α - 1 , 6 glucosidic linkage

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี คศ. 1994 Kubik และคณะได้นำเอาเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจาก *Penicillium funiculosum* มาช่วยลดความหนืดในขบวนการการผลิตน้ำผลไม้ จากเครื่อง diffuser ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ โดยใช้เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจาก *Penicillium funiculosum* ผสมลงในน้ำผลไม้ที่มีความเข้มข้น 5000 p.p.m. ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถทำให้ความหนืดของน้ำผลไม้ลดลงจาก 4.3 เหลือเพียง 2.0 ภายในเวลา 30 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ปี กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงจาก 5000 U/mg เป็น 4680 U/mg

ในปี คศ. 1994 Lewis และคณะ ได้ทำการศึกษาปัญหาของขบวนการผลิตน้ำตาลที่มีเด็กซ์แทรนปนอยู่ในปริมาณสูง โดยทำการศึกษาจากโรงงาน Jamaican sugar เพื่อที่จะลดปริมาณเด็กซ์แทรนในน้ำตาลทรายเพื่อการส่งออก ซึ่งได้ศึกษาถึงผลกระทบของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส กับเด็กซ์แทรนโดยทดสอบในน้ำผลไม้และน้ำเชื่อม โดยใช้แบบจำลองที่มีสารละลายซูโครสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณของเด็กซ์แทรนลดลงต่ำสุด ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส พีเอช5 เมื่อความเข้มข้นของซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นซูโครสที่ 60 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณของเด็กซ์แทรนต่ำสุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 5 - 6 ซึ่งจากการทดสอบดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกวัตถุดิบเพื่อป้อนโรงงานน้ำตาล และการหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตน้ำตาลเพื่อให้มีความบริสุทธิ์เป็นต้น

ในปี คศ. 1997 Pleszczynska และคณะได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส เช่น น้ำหนักโมเลกุลของสับสเทรต, อุณหภูมิ , พีเอช ความเข้มข้นของเอนไซม์และสับสเทรต และเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเทรต พบว่าเด็กซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 110 kDa เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้สมบูรณ์ภายใน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอชของสารละลายเท่ากับ 5.0 และพบว่าถ้ามีน้ำตาลซูโครส 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ปนอยู่ในสารละลายของเอนไซม์และเด็กซ์แทรนไม่มีผลกระทบต่อการย่อยเด็กซ์แทรน เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสของ *P. notatum* เป็นพวกเอนโดเอนไซม์ ผลผลิตจากการย่อยเด็กซ์แทรน คือ ไอโซมอลโตส และ ไอโซมอลตริโอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช (Heyer , 1970) และ จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เชื้อราที่พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส ได้แก่ *Penicillium lilacinus* (Godfrey และReichelt,1983) , *Penicillium funiculosum* (Zinghenko , 1993) *Penicillium* sp (Pleszczynska , 1997) สำหรับเชื้อยีสต์เช่น *Lipomyces konomenkoae* (Zinghenko , 1993) , *Lipomycete starkeyi* (ATCC 74054) (Kim และคณะ , 1996) , *Pichia pastoris* (Rodriquez , 1997) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus licheniformis* (Godfrey และReichelt , 1983)

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อันได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเทรต , ความเข้มข้นของเอนไซม์ , อุณหภูมิ, พีเอช , อัตราการกวน , การให้อากาศ และ อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน , แหล่งไนโตรเจน ทั้งจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เป็นต้น

ในปี คศ. 1994 Kubik และคณะ ได้ทำการศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เด็กซ์แตรนเนสจาก *Penicillium funiculosum* ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้จะพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสอยู่ระหว่าง 5.4-5.8

ในปี คศ. 1996 Kim และคณะ ศึกษาการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในอาหารเหลวเมื่อใช้ซูโครส ความเข้มข้น 20 – 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้สูงจากเชื้อ *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054 ที่ พีเอช 5.2

ในปี คศ. 1996 Janson และPorath ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสโดยใช้เชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* และใช้เด็กซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจะสูงสุดในเวลา 22 ชั่วโมง และกิจกรรมจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี คศ. 1997 Rodriguez และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของเมทานอลที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส โดยใช้เชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* และใช้น้ำตาลจากอ้อยความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงในเครื่องเขย่า จากนั้นทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ให้อากาศ 1 vvm พบว่า พีเอช ของอาหารลดลงจาก 5.5 ไปเป็น 5.2 และเมื่อเพิ่มอัตราการกวน จาก 250 ไปเป็น 750 rpm เติมเมทานอลลงไปในถังหมักพบว่ามีมวลชีวภาพ 56.2 กรัมต่อลิตร และ การหลั่งของเอนไซม์ 5.14 กรัม ต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 127 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ , เครื่องมือ และ วิธีการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3306
2. เชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3307
3. เชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386

ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

รูปที่ 3.1 รูปเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3306 ที่อยู่ในอาหารเอียง (slant)

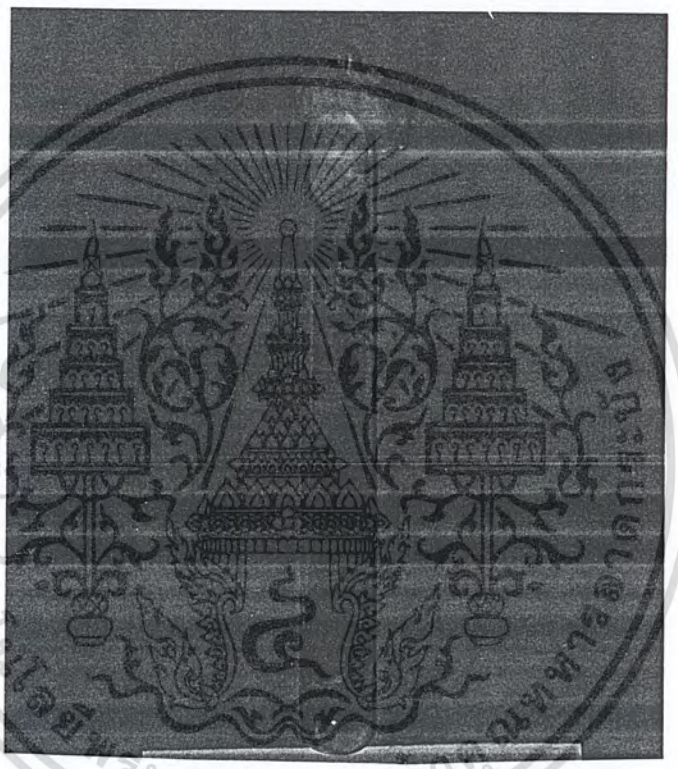
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.2 รูปเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3307 ที่อยู่ในอาหารเอียง (slant)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.2 รูปเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3307 ที่อยู่ในอาหารเอียง (slant)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 รูปเชื้อ *Penicillium pinophillum* TISTR 3386 ที่อยู่ในอาหารเอียง (slant)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. จานเพาะเชื้อ
4. ลูปเขี่ยเชื้อ
5. cuvette
6. เข็มเขี่ยเชื้อ
7. บีกเกอร์ขนาด 1000 , 500 , 250 , 100 มิลลิลิตร
8. กรวยแก้ว
9. แท่งแก้วคน
10. ช้อนตักสาร
11. สำลี
12. Aluminium Foil
13. กระดาษกรอง whatman no. 1
14. ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุสารเคมี
15. ขวดแก้วสำหรับบรรจุสารเคมี
16. ลูกแก้ว
17. Haemacytometer
18. tip ขนาด 1 มิลลิลิตร
19. ขวดพลาสติกในการเก็บตัวอย่างเอนไซม์
20. ไฟแช็ค
21. กระดาษชั่งสาร
22. ขวดก้นกลมขนาด 100 , 1000 มิลลิลิตร
23. Spatula
24. rack
25. คีมหนีบ
26. กระบอกตวง
27. กระบอกน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28. ถุงมือ

29. forcep

เครื่องมือ

1. เครื่องกรองระบบสุญญากาศ
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง
3. ตู้บ่มเชื้อพร้อมshaker
4. ตู้อบลมร้อน
5. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยระบบไฟฟ้า
6. ไมโครปิเปตต์
7. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
8. เครื่องชั่งละเอียด
9. กล้องจุลทรรศน์
10. water bath
11. laminar air flow
12. ตู้ไมโครเวฟ
13. เคชิเคเตอร์

สารเคมี

1. สารละลายน้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose)
2. กลูโคส (glucose)
3. อาหาร PDA
4. ยีสต์สกัด (yeast extract)
5. น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor)
6. สารละลายเปปโตน (peptone)
7. แอมโมเนียมโมลิบเดท (Ammoniummolybdate)
8. กรดกำมะถัน (sulfuric acid)
9. tween 80

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

10. โซเดียม โพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
11. ไดโซเดียมอาร์ซีเนต [Disodium Arsenate ($Na_2HAsO_4 . 7H_2O$)]
12. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
13. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
14. เด็กซ์แทรน (Dextran)
15. ซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Citrate Phosphate Buffer)
16. คอปเปอร์ซัลเฟต($CuSO_4 5H_2O$)
17. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4(Anhydrous)]
18. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 12H_2O$)
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
20. โซเดียมซัลเฟต [Na_2SO_4 (Anhydrous)]
21. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)
22. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
23. แอมโมเนียมซัลเฟต[$(NH_4)_2 SO_4$]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33523

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมกล้าสปอร์ของเชื้อรา

เขี่ยเชื้อราอายุ 7 วัน ลงใน PDA (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ราสร้างสปอร์ ทำสารแขวนลอยของสปอร์ โดยเติมน้ำกลั่นที่มีทวีน 80 (tween 80) 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในฟลาสก์ใช้ช้อนตักสาร (spatula) ขูดสปอร์ให้หลุดจากเส้นใย นำไปกรองเส้นใยออกโดยผ่านสำลีที่วางบนกรวยแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจนับจำนวนสปอร์ให้มีปริมาตร 10^{8} สปอร์ / มิลลิลิตร โดยใช้ Haemacytometer ซึ่งสารแขวนลอยของสปอร์ใช้ในการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้

อาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส คือ อาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ Shrief และคณะ (1991) โดยในอาหารเหลว 1 ลิตรจะประกอบด้วย เด็กซ์แทรน 10.0 กรัม , ยีสต์สกัด 3.0 กรัม , KH_2PO_4 1.0 กรัม , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl 0.5 กรัม ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 นำอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็น เติมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Paecilomyces sp* TISTR 3306 , *Paecilomyces sp* TISTR 3307 และ *Penicilliium pinophilum* TISTR 3386 จำนวน 1 มิลลิลิตร ต่อฟลาสก์ (โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อละ 5 ฟลาสก์) จะได้จำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^{6} สปอร์ / มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส , พีเอช , น้ำตาลรีดิวซ์ ทุกวัน นำเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดไปศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

นำเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดจากข้อที่ 2 มาศึกษาหาความเข้มข้นของเด็กซ์แทรนที่เหมาะสมโดยใช้สูตรอาหารเหลวจากข้อ2 มาเติมเด็กซ์แทรนความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0.5 , 0.75 , 1.0 , 1.25 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2 เลือกความเข้มข้นของเด็กซ์แทรนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดไปศึกษาต่อไป

4. ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

นำสูตรอาหารเหลวที่ให้เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดจากข้อ 3 มาเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กันดังนี้ คือ ยีสต์สกัด (Yeast Extract), เปปโตน (Peptone) , น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) , $NaNO_3$, NH_4Cl และ (NH_4)$_2SO_2$ โดยเติมชนิดละ 3.0 กรัม / ลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2 เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดไปศึกษาต่อไป

5. ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

นำสูตรอาหารเหลวที่ใช้เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดจากข้อ 4 มาศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส โดยปรับค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ดังนี้คือ 3 ,4 , 5 , 6 , 7 ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2

6. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในฟลาสก์แบบเขย่า

นำสูตรอาหารที่ให้ปริมาณเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดจากข้อ 5 มาเลี้ยงเชื้อ *P. pinophilum* ปรับความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นในอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเท่ากับ 2×10^6 สปอร์ / มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง , กิจกรรมเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส , น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.4 ***Penicillium pinophilum*** **TISTR 3386 ในอาหาร PDA**

รูปที่ 3.5 ***Penicillium pinophilum*** **TISTR 3386 ในอาหาร เหลว**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

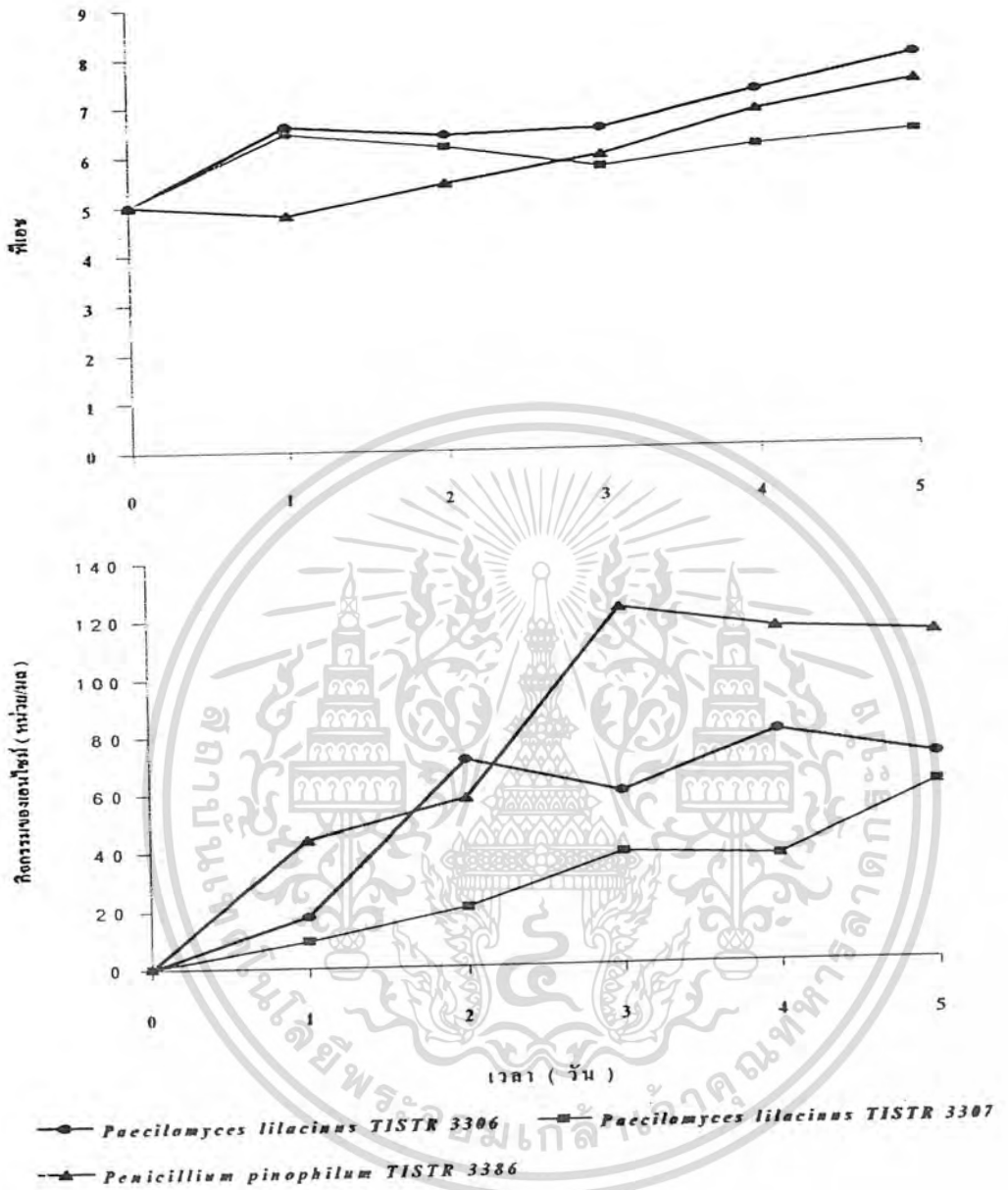
ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสได้กิจกรรมสูงสุด

ผลการทดลองเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3306 , เชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3307 และเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 โดยใช้สปอร์เริ่มต้นเชื้อละ 2 x 10^6 สปอร์ / มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงของ Shrief แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 113.10 หน่วย / มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3306 ให้กิจกรรมของเอนไซม์คือ 70.63 หน่วย / มิลลิลิตร และ *Paecilomyces* sp. TISTR 3306 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสน้อยที่สุด คือ 61.01หน่วย / มิลลิลิตร ดังรูป 4.1

ดังนั้นจึงเลือกเชื้อรา *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ใช้ศึกษาในการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เค็กซ์แทรนเนส เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3306 , เชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3307 และเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

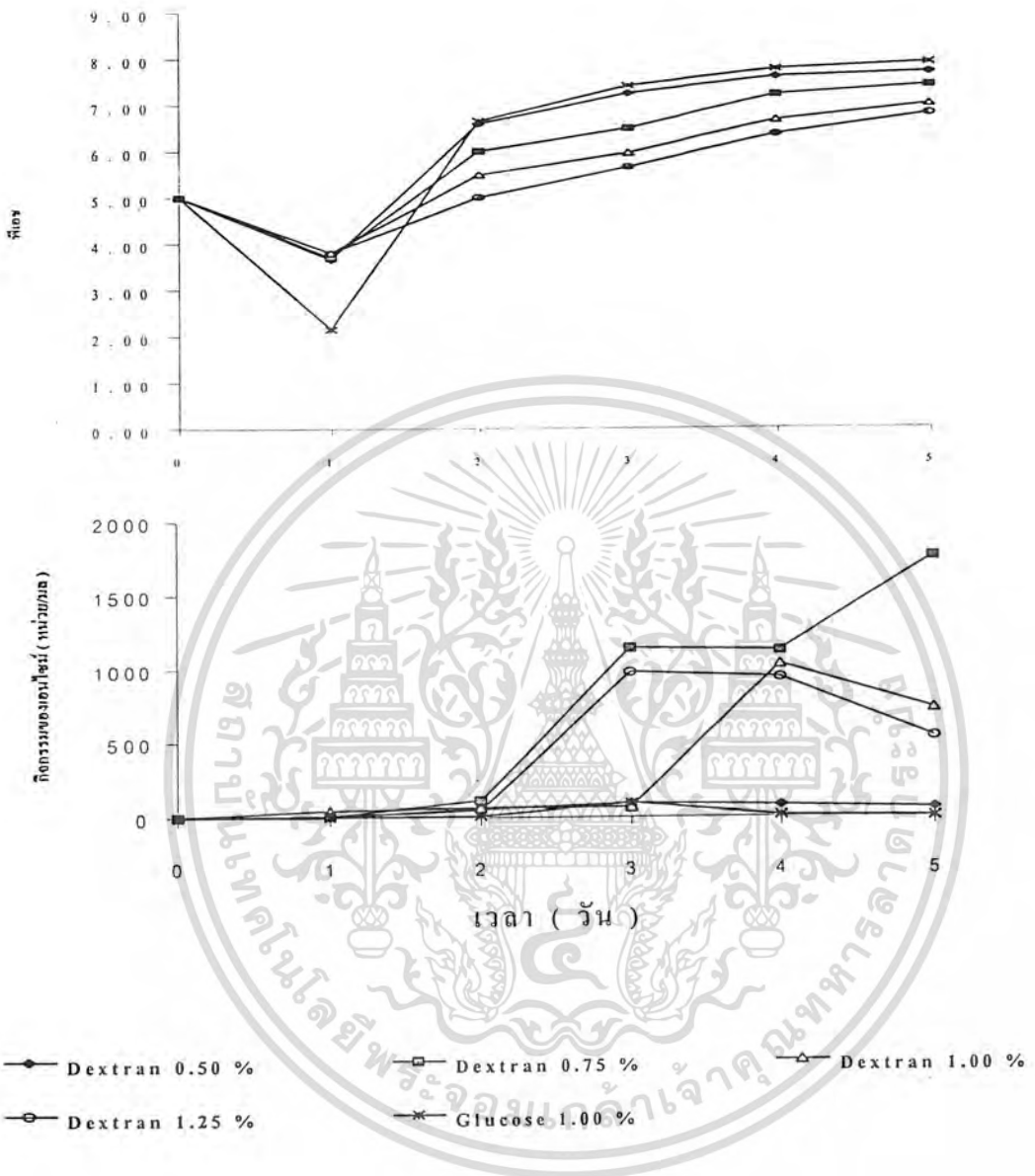
นำเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงของ Shrief และคณะ (1991) โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างๆแล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความ เร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูป 4.2

อาหารเหลวเติมเด็กซ์แทรน 0.75 เปอร์เซ็นต์จะให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดเท่ากับ 1759.49 หน่วย/มิลลิลิตร ในวันที่5 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเด็กซ์แทรน 1.00 เปอร์เซ็นต์ และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเท่ากับ 728.48 หน่วย/มิลลิลิตร และ 539.24 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเหลวที่เติมเด็กซ์แทรน 0.50 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเพียง 58.73 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส 1.00 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเลย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสของ *P. pinophilum* เป็นชนิด inducible enzyme

ดังนั้นจึงใช้แหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์แทรนในความเข้มข้นเท่ากับ0.75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

เมื่อนำเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเด็กซ์แตรน 0.75 % เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในปริมาณ 3 กรัม/ ลิตร แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความ เร็วรอบ 200 รอบ / นาที เป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองแสดงในรูป 4.3

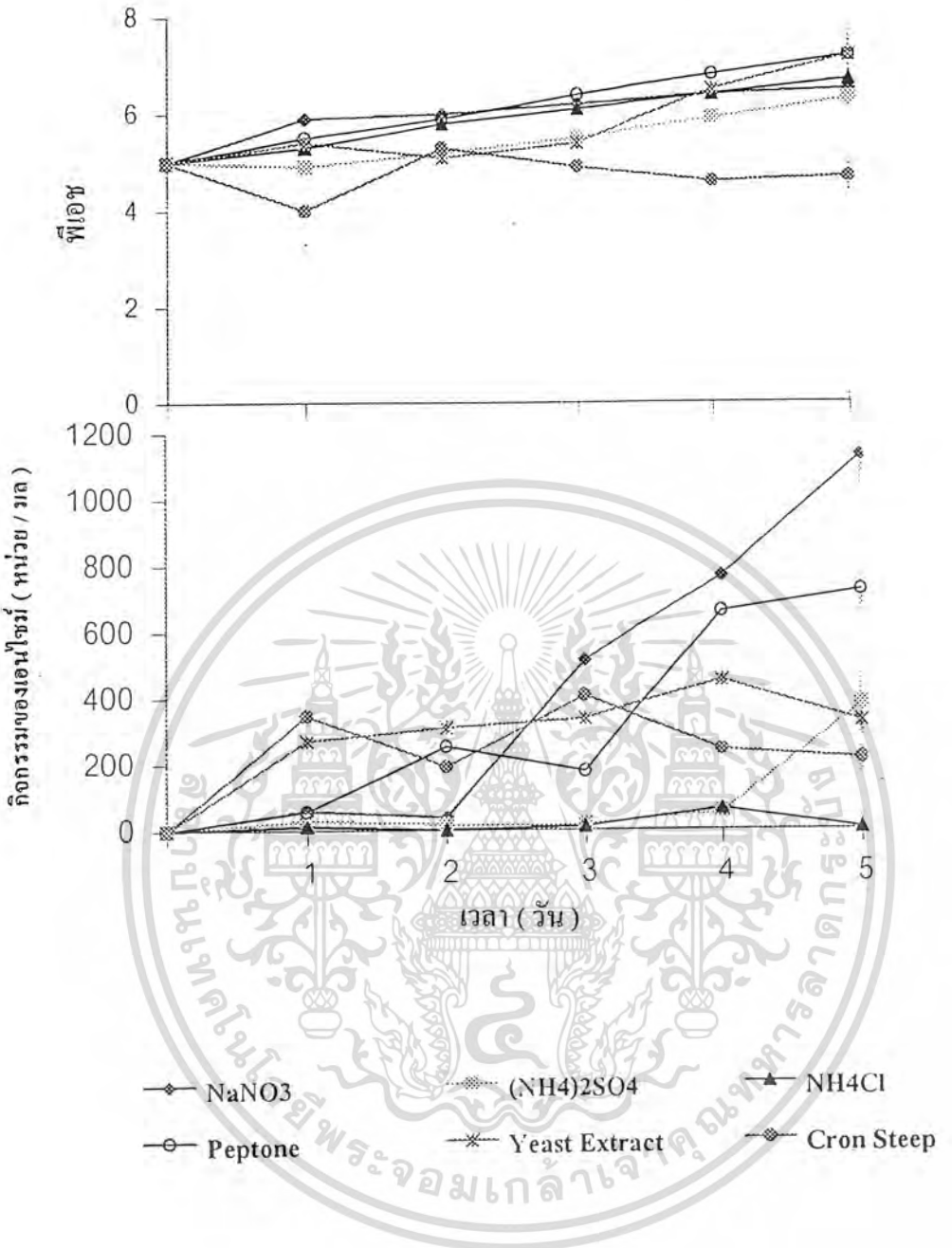
อาหารเหลวที่เติม $NaNO_3$ จะให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดเท่ากับ 1131.65 หน่วย/มิลลิลิตร ในวันที่5 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน จะให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเท่ากับ 723.42 หน่วย/มิลลิลิตร ส่วน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $(NH_4)_2SO_4$, ยีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด ให้กิจกรรมของ

เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส เท่ากับ 377.85 หน่วย/มิลลิลิตร, 327.53 หน่วย/มิลลิลิตร และ 214.56 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับในขณะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม NH_4Cl ไม่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเลย

เมื่อเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ พบว่าเปปโตนจะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงกว่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์พบว่า $NaNO_3$ จะให้ผลผลิตของเอนไซม์สูงกว่า $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4Cl

ดังนั้นจึงใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$ ในความเข้มข้น 3 กรัม/ลิตร เพื่อใช้ศึกษาในการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



4.3 กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการเปรียบเทียบค่าพีเอชที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

เมื่อนำเชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเด็กซ์แตรน 0.75 % เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณ 3 กรัม / ลิตร ทำการทดลองที่สภาวะพีเอชต่างๆ แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความ เร็วรอบ 200 รอบ / นาที เป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4

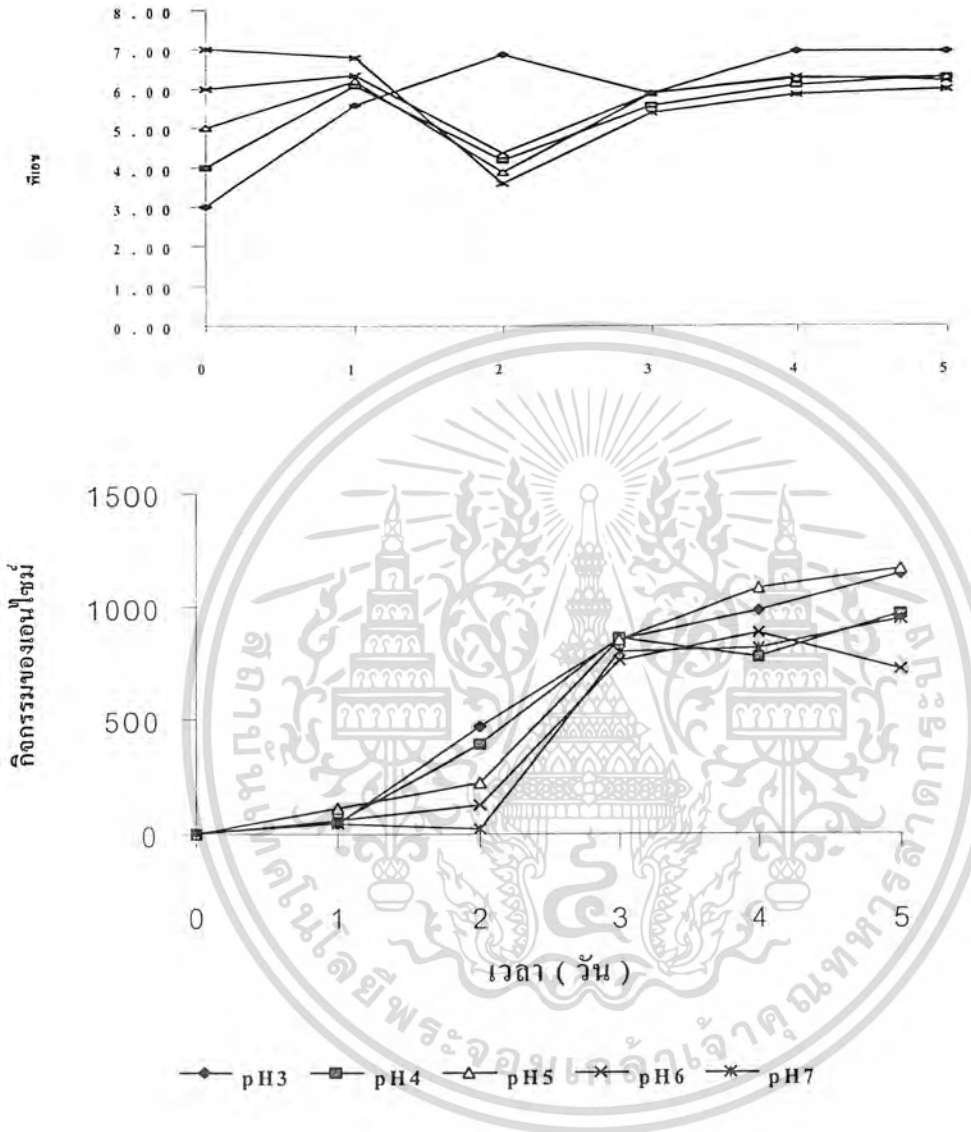
อาหารเหลวที่ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะพีเอชเท่ากับ 5 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงสุดเท่ากับ 1167.08 หน่วย/มิลลิลิตร และ ที่สภาวะที่พีเอชเท่ากับ 3 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1143.67 หน่วย/มิลลิลิตร ส่วนที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 4 , 7 และ 6 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเท่ากับ 965.19 หน่วย/มิลลิลิตร , 946.20 หน่วย/มิลลิลิตร และ 724.05 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการทดลองที่สภาวะพีเอช เท่ากับ 5 เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจะให้กิจกรรมสูงสุด แต่ที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 3 และพีเอชเท่ากับ 5 จะให้ค่าที่ไม่ต่างกันมากนัก

Janson และคณะ (1966) พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 5.0 – 6.5

Tony และคณะ (1996) พบว่า *Penicillium* sp.สามารถผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการย่อยสลายที่พีเอชเท่ากับ 5.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะพีเอชต่างๆ

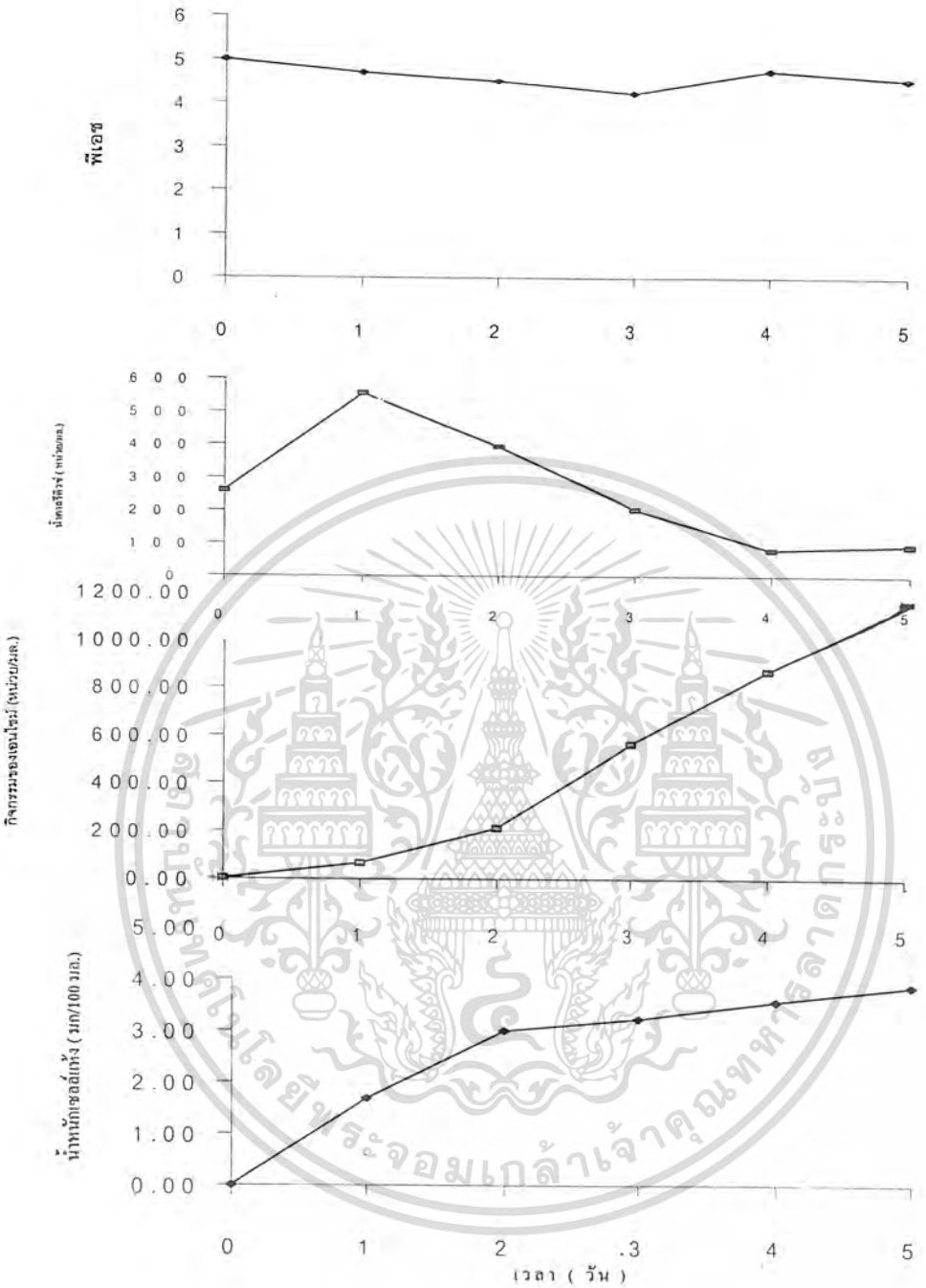
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในฟลาสก์แบบเขย่า

เมื่อนำเชื้อ *Penicillium pinophilllum* TISTR 3386 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเด็กซ์แตรน 0.75 % เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณ 3 กรัม / ลิตร ทำการทดลองที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 5 แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความ เร็วรอบ 200 รอบ / นาที เป็นเวลา 5 วันแสดงดังรูป 4.5

กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจะสูงสุดเท่ากับ 1135.78 หน่วย/มิลลิลิตร ในวันที่5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ , กิจกรรมของเอนไซม์ และ น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในขณะที่ น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง แสดงว่าเชื้อรามีการย่อยน้ำตาล และพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้น แสดงว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตพร้อมกับการสร้างเอนไซม์ ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.85 กรัม/100 มิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในวันที่5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอช ,น้ำตาลรีดิวซ์ ,กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสและน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Penicillium pinophilum* TISTR 3386ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3306 และเชื้อ *Paecilomyces* sp. TISTR 3307 เมื่อทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่ให้กิจกรรมสูงสุดพบว่า เด็กซ์แทรน 0.75 % เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และ$NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เมื่อทำการหาสภาวะในการเลี้ยงเชื้อพบว่าที่พีเอชเท่ากับ 5 จะให้กิจกรรมสูงที่สุด เมื่อทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ / นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 5 เท่ากับ 1135.78 หน่วย / มิลลิลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.85 กรัม / 100 มิลลิลิตร

สูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส จาก *P. pinophillum* ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบดังนี้ เด็กซ์แทรน 7.5 กรัม , $NaNO_3$ 3.0 กรัม , KH_2PO_4 1.0 กรัม , $MgSO_4 . 7H_2O$, KCl 0.5 กรัม ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นวลพรรณ ณ ระนอง . ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา . **ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง .** (2540) : 39.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล . จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร . **คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ , สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ .** (2539) : 237.

Bartelt , D. Purification and Characterization of Extracellular Dextranase from *Lipomyces starkeyi* . **Biology** . (1993) : 145 .

Carneiro , S. , J. , Silva , R.G. , Carneiro . Evaluation of four storage methods on the survival of *Paecilomyces lilacinus* an arthrobotrysoligospora . **Nematologia Brasileira** . 2 (20) . (1996) : 63-67.

Chaiet , L. , A.J. , Kemf Harman , R. , Kaczka , E. ,Weston , R. , Nollstadt , K.F. , Wolf . Isolation of a Pure Dextranase from *Penicillium funiculosum* . **Applied Microbiology** . 20 . (1970) : 421.

Elizabeth , F. **Methods in Enzymology Complex Carbohydrate** . Victor Ginburg . (1966) : 615 – 621.

Emil , L. L, Robert. I , Hill. J, Robert. **Principle of Biochemistry General Aspect** . (1964) : 96 – 97 .

Fischer , E.H. and E.A., Stein. **The Enzymes** . Academic Press , New York . 4 . (1960) : 340.

Gemeiner , P. **Enzyme engineering immobilized** . Institute of chemistry , slovak academy of sciences , bratislava , CSFR . (1992) : 36 – 45.

Godfrey , T. and J. , Reichelt . **Industrial enzymology** . (1983) : 422-423.

Godfrey , T. and S. , West . **Industrial enzymology** . (1996) : 595.

Gupta , S.C. , T.D. , Leathers , D.T. , Wicklow . Hydrolytic enzymes secreted by *Paecilomyces lilacinus* cultured on sclerotia of *Aspergillus flavus* . **Applied Microbiology and Biotechnology** . 1 (39) . (1993) : 99-103.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hames , B.D. , N.M. , Hooper , J.D. , Houghton . Instant Notes In Biochemistry. **Department of Biochemistry and Molecular Biology , University of Leeds , Leeds , UK** . (1998) : 225 – 226 .

Ingelman , B. **50 Years Dextran .** Amersham Pharmacia Biotech . (1998) : 1-4 .

Janson , J.C. and J.A. , Porath . **Bacterial Dextranase in Methods in Enzymology** . Academic Press , New York . 7 . (1966) : 625.

Kane , K . **Biochemistry 3 rd edition** . Win C Brown Communication , Inc. (1993) : 592.

Kim , D. A Novel process for the production of clinical dextran (Lipomyces starkeyi , Leuconostoc mesenteroides) . **Biology , Microbiology(0410) , Chemistry , Biochemistry(0487) , Health sciences , Dentistry(0567) .** (1993) : 2449.

Kim , D. , S. , Hyunchang , D.F. , Day , H.C. , Seo . Dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* in the presence of a dextranase producing yeast,*Lipomyces starkeyi* . **Biotechnology Techiques** . 4 (10) . (1996) : 227-232.

Kubik , C. , E. , Galas , B. , Sikora . Dextranase from *Penicilium funiculosum* 72-properties deciding the possibilities for its use in the sugar industry . **Gazeta Cukrownicza** . 6 (102) . (1994) : 102-105.

Lewis , D. , E.V. , Roberts , L. , Brown . Controlling the effects of dextran in the manufactor of raw sugar . **Processing of the West India Sugar Technology XXV Conference , Belize** . 18 (21) . (1994) : 299-308.

Lee, M. and F., Fox. Purification and Characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase . **Enzyme Microbial Technology .** 7 . (1985):573 – 577.

Mikkelsen , L. Effect of sucrose intake on numbers of bacteria in plaque expressing extracellular carbohydrate metabolizing enzymes . **Caries Research** . 30(1) . (1996) : 65-70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neujeld , F. E. and V. , Ginsburg . **Methods in enzymology** . 8 . (1996) : 615 – 621.

Pleszczynska , M. , J. , Szczodrak , J. , Rogalski , J. , Fiedurek. Hydrolysis of dextran by *Penicilium notatum* dextranase and identification of final digestionproducts . **Mycological Research** . 1 (101) . (1997) : 69-72.

Rodney, F. **Modern Experimental Biochemistry Second edition** . Benjamin / Cummings Publishing Coorporation . (1993) : 83 – 84 , 133 .

Rodriguez , J . E. , K . , Sanchez , H . , Roca , J . M . , Delgado . Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase . **Biotechnology Techniques** . 7 (11) . (1997) : 461 – 466.

Rogalski , J. J. , G. , Szczodrak , M. , Glowiak , Z. , Pleszczynska , A. , Szczodrak Wiater . **Acta Biotechnological .** 1 (18). (1998) : 453 .

Rojer ,Y. , J.L. , Ingraham , M.L. , Wheelis , P.R. , Painter.**The Microbial Word.** Principle Hall of India Private Limited , New Delhi 110001 . (1990) : 662 – 663 .

Sherief.A.A, M.M.A.El sawah and M.A. Add El – Naby 1991 . Some properties of Chitinase produced by a potent *Aspergillus* caneus strain. **Applied Microbiological and Biotechnology**.1 (35): (1991) : 228 – 230.

Smith , E.L. , H.L. , Robert , I. , Robert , J. , Lefkowitz , P. , Handler , A. , White . **Principle of Biochemistry general aspects** . Mcgraw Hill , inc . (1964) : 96 – 97 , 487 .

Sontirat , S. Production factors of *Paecilomyces lilacinus* a nematode parasite fungus in culturbroth . **Kasetsart Journal Natural Scienses** . 1 (30) . (1996) : 13-26.

Sontirat , S . Relationship between infection efficiency and enzymatic activity of *Paecilomyces lilacinus* . **Kasetsart Journal Natural Sciences** . 2 (30) . (1996) : 175-184..

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sugiura , M. , A. , Ito , T. , Ogiso , K. , Kato , H. , Asano . Studies on Dextranase. Purification of Dextranase from *Penicillium funiculosum* and Its Enzymatic Properties . **Biochemistry Biophysical Acta** . (1973) : 357,3094

Wainwright , M . **An introduction of fungal biotechnology** . (1992) : 2-3.

Weil , J.H . **General Biochemistry** . Masson , Paris . (1990) : 35 – 36 , 159 , 207.

Wynter , C.V.A. , M. , Chang , J.D. , Jersey , B.I. , Patel , P.A. , Hamilton , S.D. , Jersey. Isolation and characterization of thermostable dextranase . **Enzyme and Microbial Technology** . 20 (4) . (1997) : 242-247.

Wynter , C.V.A. ,C.F. , Galea , L.M. , Cox , M.W. , Dawson , Patel, B.K. , S. , Hamilton , J.D. , Jersey , P.A. , Inkerman . Thermostable dextranase screening detection and preliminary characterization . **Journal of Applied Bacteriology**. 79 (2) . (1995) : 203-212.

Zinchenko , O.N. , O.V. , Krivosheeva , A.G. , Lobanok . Selection of a mutant strain of *Lipomyces konoenkoe* with dextranase synthesis resistant to catabolite repression .**World Journal of Microbiology and Biotechnology** . 2 (9) . (1993) : 153-155.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1.อาหารเลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์

1.1 สูตรอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง(รูปอินฟิวชัน)	200	กรัม
เด็กซ์โตรส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ก่อนทำให้อุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช เป็น 3.5 โดยใช้กรดทาร์ทาริก ที่ปราศจากเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อ

1.2 การเตรียมซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Citrate phosphate buffer)

(1) เตรียมสารละลายกรดซิตริก 1 โมลาร์ โดยละลายกรดซิตริก 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร(สารละลาย A)

(2) เตรียมสารละลาย dibasic sodium phosphate โดยละลาย $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ$Na_2HPO_4 . 12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร(สารละลาย B)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร X มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร Y มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

X(มิลลิลิตร)	Y(มิลลิลิตร)	พีเอช
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

X(มิลลิลิตร)	Y(มิลลิลิตร)	พีเอช
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

2. สารเคมีที่ใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

2.1 สารละลายซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (citrate phosphate buffer)

2.2 สารละลายเด็กซ์แทรน 1 เปอร์เซ็นต์

ละลายเด็กซ์แทรน 1.0 กรัมในสารละลายซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 1 โมลาร์พีเอช 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้ละลาย หลังจากนั้นปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน

2.3 สารละลาย Somogyi reagent ประกอบด้วย

- Copper reagent เตรียมโดย

10 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4$ $5H_2O$ 100 มิลลิลิตร (10 กรัม / 100 มิลลิลิตร)

- Phosphate -Tartrate solution เตรียมโดย

ชั่ง Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4 12H_2O$ กรัม) ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartrate (Tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N NaOH 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Na_2SO_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วให้ ได้ปริมาตร 900 มิลลิลิตร

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษ Whatman number 4

ผสมสารละลายในข้อ Copper reagent (100 มิลลิลิตร) และ Phosphate -Tartrate solution (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน จะเรียกสารละลายนี้ว่า Copper reagent

2.4 สารละลายNelson's Arsenomolybdate Copper reagent ประกอบด้วย

-ชั่ง Disodium Arsenate ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$) 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

-เตรียมสารละลาย Ammoniummolybdate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\ 4\ H_2O$] ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน เข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. แล้ว จึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องและควรเก็บในขวดสีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไอโซมอลโทส (Isomaltose)

1.1 ใส่สารละลายน้ำตาลไอโซมอลโทส ที่ความเจือจางต่างๆ 0, 40 , 60 , 80 , 100 , 120 , 140 , 160 และ 200 จำนวน 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองทุกหลอด

1.2 แบลงค์(Blank) ทำเช่นเดียวกับสารละลายน้ำตาลไอโซมอลโตสแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลไอโซมอลโทส

1.3 เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร

1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ จากนั้นทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำ

1.5 เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีจะเห็นเป็นสีเขียว หรือน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล

1.6 เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรลงไป (ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดี

1.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาว คลื่น 520 นาโนเมตร

1.8 ทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไอโซมอลโทส ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของน้ำตาลไอโซมอล โทส ทำการหาความชันของกราฟเพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐาน

2. วิธีการหากิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

2.1 ใส่สารละลายตัวอย่าง (เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส) ที่มีความเจือจางเหมาะสม 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

2.2 นำสารละลาย เด็กซ์แทรนความเข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์ (ละลายในสับสเทรต)ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ในข้อ 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ45^{o}C เป็นเวลา 10 นาที

2.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปต้มน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ทำแบลงค์(Blank) ทำเช่นเดียวกับเอนไซม์แต่ใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์

2.5 นำไปวิเคราะห์หาค่าน้ำตาล Reducing sugar โดยวิธีการ Somogyi Nelson 's method (ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไอโซมอลโตส)

2.6 นำไปหาค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.7 ทำหลอดคุม (Control) โดยใส่สารละลายเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อน โดยนำไปต้มน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ 2

2.8 คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จาก

กิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x ปริมาตรทั้งหมด x ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน x เวลา}}$$

3. การวัดปริมาณ Reducing sugar (Reducing sugar measurement)

3.1 เติมสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว

3.2 เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร

3.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ จากนั้นทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำ

3.4 เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีจะเห็นเป็นสีเขียว หรือน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล

3.5 เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรลงไป (ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดี

3.6 นำไปวัดค่า การดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

3.7 ทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไอโซมอลโทส ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของน้ำตาลไอโซมอลโทส ทำการหาความชันของกราฟเพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การหาน้ำหนักแห้ง

4.1 นำตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละวันมาตวงให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.2 กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์4 ที่ผ่านการอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยใช้ชุดกรองชนิดสุญญากาศ

4.3 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

4.4 ใช้ช้อนตักสาร (spatula) นำกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.5 ทิ้งไว้ในเดซิเคเตอร์ 1 วัน

4.6 นำกระดาษกรองที่มีเซลล์แห้งนำมาชั่งน้ำหนัก และบันทึกผลการทดลอง โดยเทียบผลที่ได้เป็น กรัม/100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ค

การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

1. ทำความสะอาดสไลด์ และ แผ่นปิดสไลด์ (Cover slip) ของHaemacytometer วาง แผ่นปิดสไลด์ให้อยู่กึ่งกลางสไลด์ ปิเปตสารละลายสปอร์ แตะที่ขอบแผ่นปิดสไลด์ ให้สารละลายสปอร์ลอยแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างแผ่นปิดสไลด์ และ สไลด์จนเต็ม
2. นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับสปอร์ที่อยู่ใน แต่ละช่องเล็ก ที่ตำแหน่งบนซ้าย , บนขวา , ล่างซ้าย , ล่างขวา และตรงกลางของช่อง ใหญ่ รวม 5 ช่องของHaemacytometer
3. คำนวณจำนวนสปอร์

ความลึกของ Haemacytometer ที่ใช้ = 0.1 มิลลิเมตร

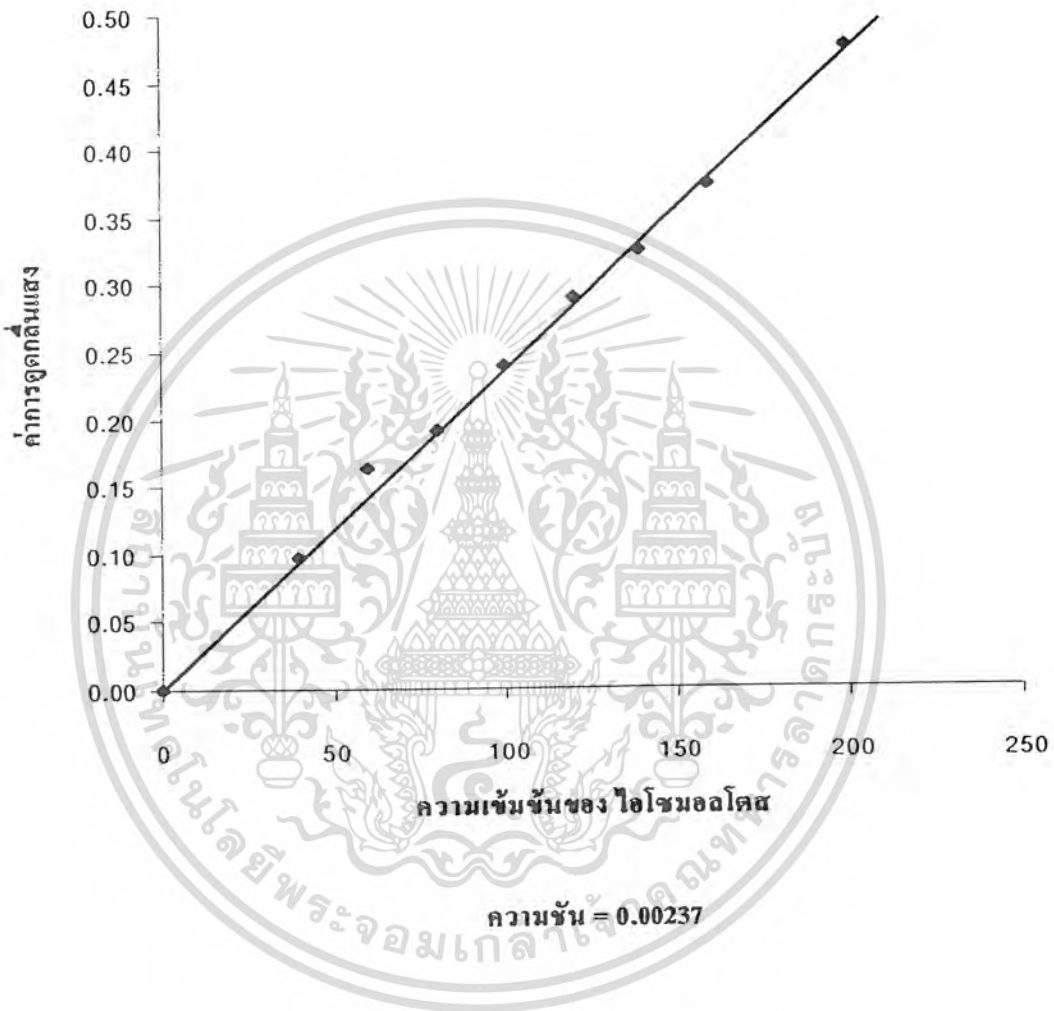
ขนาดพื้นที่ของช่องเล็ก = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

ดังนั้นปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก = 0.00025 ลูกบาศก์เมตร

จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร = สปอร์เฉลี่ย x $4x10^5$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ง



รูปที่ ง กราฟมาตรฐานไอโซมอลโทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ1 แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจากเชื้อราชนิดต่างๆ

เชื้อ	ค่าพีเอช	กิจกรรม (หน่วย / มิลลิลิตร)
Paecilomyces sp TISTR 3306		
0	5.0	0.00
1	6.6	17.22
2	6.4	71.13
3	6.5	58.98
4	7.2	79.68
5	7.9	70.63
Paecilomyces sp TISTR 3307		
0	5.0	0.00
1	6.5	9.36
2	6.2	20.19
3	5.7	38.48
4	6.1	36.51
5	3.3	61.03
Penicillium pinophillum TISTR 3386		
0	5.0	0.00
1	4.8	44.24
2	5.4	57.84
3	5.9	122.72
4	6.8	115.19
5	7.3	113.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ2 แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจากแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ

อาหาร	วันที่	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์(หน่วย / มล.)
เด็กซ์แทรน 0.50 %	0	5.0	0.000
	1	3.7	7.911
	2	6.6	52.025
	3	7.3	88.481
	4	7.6	71.772
	5	7.7	58.734
เด็กซ์แทรน 0.75 %	0	5.0	0.000
	1	3.7	7.658
	2	6.0	114.051
	3*	6.5	1143.671
	4*	7.2	1124.051
	5*	7.4	1759.494
เด็กซ์แทรน 1.00 %	0	5.0	0.000
	1	3.8	49.494
	2	5.5	63.481
	3*	6.0	63.290
	4*	6.7	1033.544
	5*	7.0	728.481
เด็กซ์แทรน 1.25%	0	5.0	0.000
	1	3.8	4.873
	2	5.0	48.924
	3*	5.7	978.481
	4*	6.4	939.241
	5*	6.8	539.241
กลูโคส 1.00%	0	5.0	0.000
	1	2.2	1.076
	2	6.7	9.620
	3	7.4	88.608
	4	7.8	9.684
	5	7.9	4.367

* ทำที่ความเจือจาง 10 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ3 แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสจากแหล่งไนโตรเจนต่างๆ

อาหาร	วันที่	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์(หน่วย / มล.)
NaNO3	0	5.0	0.00
	1	5.9	58.86
	2	6.0	39.87
	3	6.0	514.56
	4	6.4	768.99
	5	6.5	1131.65
(NH4)2SO4	0	5.0	0.00
	1	4.9	30.38
	2	5.2	18.99
	3	5.5	17.09
	4	5.9	51.27
	5	6.3	377.85
NH4Cl	0	5.0	0.00
	1	5.3	13.29
	2	5.8	1.90
	3	6.1	11.39
	4	6.4	62.66
	5	6.7	5.70
Peptone	0	5.0	0.00
	1	5.5	56.96
	2	5.9	253.86
	3	6.4	178.48
	4	6.8	660.76
	5	7.2	723.42
Yeast extract	0	5.0	0.00
	1	5.4	270.57
	2	5.1	311.96
	3	5.4	337.41
	4	6.5	451.14
	5	7.2	327.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Corn steep	0	5.0	0.00
	1	4.0	345.76
	2	5.3	192.72
	3	4.9	407.09
	4	4.6	240.76
	5	4.7	214.56

ทำที่ความเจือจาง 10 เท่า

ตารางที่ จ4 แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสในสภาวะพีเอชต่างๆ

สภาวะ	วันที่	PH	กิจกรรมของเอนไซม์
pH3	0	3.0	0.000
	1	5.6	45.570
	2	6.9	469.620
	3	5.9	850.000
	4	6.9	980.380
	5	6.9	1143.671
pH4	0	4.0	0.000
	1	6.1	53.165
	2	4.2	398.734
	3	5.6	860.127
	4	6.1	774.684
	5	6.3	965.190
pH5	0	5.0	0.000
	1	6.2	115.823
	2	3.9	229.114
	3	5.9	854.430
	4	6.2	1082.911
	5	6.3	1167.089

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH6	0	6.0	0.000
	1	6.3	62.025
	2	4.4	132.911
	3	5.9	764.557
	4	6.3	886.076
	5	6.2	724.051
pH7	0	7.0	0.000
	1	6.8	48.734
	2	3.6	22.152
	3	5.4	803.165
	4	5.8	812.025
	5	6.0	946.203

ทำที่ความเจือจาง 10 เท่า

ตารางที่ จ5 แสดงจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ เมื่อทำการเลี้ยง *Penicillium pinophilum* TISTR 3386 ในอาหารที่มีเด็กซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอน และ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

วันที่	พีเอช	กิจกรรม หน่วย / มล.	น้ำตาลรีดิวซ์ หน่วย / มล.	น้ำหนักเซลล์แห้ง กรัม / มล.
0	5	0.00	260.97	0.0000
1	4.7	64.66	557.38	1.6876
2	4.5	209.07	393.46	2.9891
3	4.25	563.38	202.74	3.2364
4	4.75	868.92	79.96	3.5648
5	4.55	1135.78	94.94	3.8530

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้