การผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase โดยเชื้อ Bacillus sp.

อรุณี ตรีศิริโรจน์[1] มรกต ตันติเจริญ[2] และ ดุษฎี อุตภาพ[3]
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) จากเชื้อ *Bacillus sp.* คือ *Bacillus circulans* (ATCC 9995), Alkalophilic *Bacillus sp.* (ATCC 21783) และ *Bacillus* B 95 ที่คัดเลือกได้จากดิน จากผลการทดลองพบว่า ATCC 9995 และ ATCC 21783 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้ง (soluble starch) ร้อยละ 1 และ corn steep liquor ร้อยละ 5 เป็นสับเสตรทหลัก จะผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงกว่าเชื้อ B 95 และเมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไซโคลเด็กซ์ทริน ที่ความเข้มข้นแป้งร้อยละ 5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า ATCC 9995 ให้yield เท่ากับร้อยละ 56 ในขณะที่เชื้อ ATCC 21783 ให้ yield น้อยกว่าร้อยละ 40

ในการศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อ 9995 พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 8.0 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสโดยมีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงและเร็วกว่าแป้งมันฝรั่ง, แป้งสาลี แต่ใกล้เคียงกับแป้งข้าวโพด และ soluble satrch ในแป้งสาลีถึงแม้ว่าจะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด แต่ต้องใช้ระยะเวลาถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบกับแป้งมันสำปะหลังใช้เวลาเพียง 24 ชั่วโมง ในการศึกษาในถังปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลิตร พบว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen; D.O.) มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ คือ เมื่อมีการควบคุม D.O. เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 2254 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และระบบที่ไม่มีการควบคุม D.O. เชื้อผลิตเอนไซม์ได้เพียง 700 ยูนิตต่อ มิลลิลิตร

[1] *นักศึกษาปริญญาโท คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*
[2] *รองศาสตราจารย์ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*
[3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase from Bacillus *sp.*

Arunee Trisiriroj[1], Morakot Tanticharoen[2], and Dudsadee Uttapap[3]

King Mongkut's Institute of Technology Thonburi

Abstract

The aim of this work is to study the production of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from Bacillus sp. The microorganisms were Bacillus circulans (ATCC 9995), Alkalophilic Bacillus sp.(ATCC 21783) and Bacillus sp. B 95 isolated from soil. The major substrate was 1% of soluble starch and 5% of corn steep liquor. The study shows that enzyme production was higher in ATCC 9995 and ATCC 2 17 8 3 than B 95. The conversion yield of 5%. of soluble starch to cyclodextrin was 56% within 3 hours, at 40°C with a CGTase from ATCC 9995. From this result, ATCC 9995 was selected to further study on the optimum conditions for enzyme production.

Various starches could be used as a substrate for enzyme production. However, enzyme production was faster with tapioca starch as same as corn and soluble starch. Though wheat starch gave the highest enzyme production, the peak was at 72 hours. The optimum initial pH and temperature for enzyme production were 8.0 and 35°C respectively. In 2.5 litre reactor, dissolved oxygen was critical for enzyme production. Under controlled condition CGTase production was 2250 units/ml in comparison with 700 units/ml of oxygen limitation.

[1] Graduate *Student,* School of Bioresources *and* Technology

[2] Associate Professor, *School of Bioresources and* Technology

[3] Assistant *Professor, School of Bioresources and* Technology

บทนำ

ไซโคลเด็กซ์ทริน (Cyclodextrin; CDs) เป็นสารประกอบประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferases (CGTases) โครงสร้างของ CDs ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นวงกลมด้วยพันธะ 1,4-α-D glucosidic โดย CDs หลัก มี 3 ชนิด คือ α-CD (Cyclohexaamylose), β-CD (Cycloheptaamylose) และ γ-CD (Cyclooctaamylose) สารประกอบไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 100 ปีแล้ว และได้รับความสนใจอย่างมากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา [1] คุณสมบัติที่ดึงดูดความสนใจของนักวิทยาศาสตร์ คือ ความสามารถในการรับสารอินทรีย์ภายนอก (guest molecule) ที่มีขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมเข้าไปในช่องว่างระหว่างโมเลกุลหรือโพรงโมเลกุล (cavity) ของตน ทำให้เกิดสารประกอบรวม (Inclusion complex) CDs เป็นสารประกอบที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค [2] จึงเหมาะที่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการใช้ CDs อย่างแพร่หลาย อาทิเช่น ในเครื่องสำอางค์, เวชภัณฑ์, อาหาร, การเกษตร และงานวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้ในการตรึงกลิ่น, รส, สีของอาหาร

ประเทศไทยยังไม่มีรายงานการนำเข้า CDs บริสุทธิ์ สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมใดๆ แต่พบว่าอาจมีการนำเข้าในลักษณะสารที่ผ่านกระบวนการทำปฏิกิริยากับ CDs เช่น สารแต่งกลิ่นรสในหัวน้ำเชื้อ, เครื่องดื่ม, เครื่องสำอางค์ ประเทศที่มีการผลิตและการใช้ CDs ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ประเทศอเมริกา (บริษัท American Maize-Production Co.Ltd. (Amaizo), บริษัท Corn Processing Div., บริษัท Hammond,Ind.), ฝรั่งเศส, เนเธอร์แลนด์, เบลเยี่ยม, ฮังการีลักซ์เซมเบอร์ก, เยอรมันและญี่ปุ่น โดยญี่ปุ่นได้ผลิต CDs เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาตั้งแต่ปี 1970 [3]

เนื่องจาก CDs ผลิตได้จากการทำงานของเอนไซม์ CGTases ดังนั้นการเพิ่มปริมาณหรือกิจกรรมเอนไซม์ CGTases จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและช่วยลดต้นทุนการผลิต CDs ลงได้ ในการเพิ่มปริมาณหรือกิจกรรมของเอนไซม์นอกจากจะใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ การปรับที่กระบวนการผลิต เช่น สภาวะในการหมัก, สารอาหาร ก็เป็นอีกทางหนึ่ง ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น สำหรับงานวิจัยนี้จะมุ่งศึกษาถึงสภาวะในการหมัก คือ ชนิดของสารอาหาร, ชนิดของแป้ง, อุณหภูมิ, พีเอช, และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อที่คัดเลือกได้จากดินและจากศูนย์เก็บเชื้อ

การดำเนินงานวิจัย

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จาก American Type Culture Collection สองสายพันธุ์ คือ *Bacillus circulans* (ATCC 9995) และ Alkalophilic *Bacillus sp.* (ATCC 21783) ซึ่งมีรายงานว่าสายพันธุ์ทั้งสองจะให้ปริมาณเอนไซม์ CGTases สูง และสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้เองจากดิน (B95)

อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อการทดสอบการผลิตเอนไซม์ มีด้วยกัน 4 ชนิด คือ

ชนิดที่ 1 ประกอบด้วยแป้ง (soluble starch) ร้อยละ 2, yeast extract ร้อยละ 0.5, polypeptone ร้อยละ 0.5, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ร้อยละ 0.1 และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 0.02

ชนิดที่ 2 ประกอบด้วยแป้ง (Soluble Starch) ร้อยละ1, yeast extract ร้อยละ 0.2, polypeptone ร้อยละ 1, beef extract ร้อยละ 0.5 และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.2

ชนิดที่ 3 ประกอบด้วยแป้งร้อยละ 1, corn steep liquor ร้อยละ 5, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ร้อยละ 0.1 และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 0.02

ชนิดที่ 4 ประกอบด้วยแป้งร้อยละ 1, corn steep liquor ร้อยละ 5, แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 0.5 และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ร้อยละ 0.5

การเลี้ยงเชื้อระบบกะในถังปฏิกรณ์

ก. ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์และการเจริญเติบโตของเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ pH 8 ควบคุมอัตราการกวนให้อยู่ในช่วง 250-350 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเติมเชื้อตั้งต้นปริมาณ 24 มิลลิลิตร หรือ 3 เปอร์เซนต์ โดยถังหมักหนึ่งมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (D.O.) โดยทำการปรับอัตราการให้อากาศตลอดระยะเวลาการหมักเพื่อควบคุม D.O. ส่วนอีกถังหนึ่งควบคุมอัตราการให้อากาศคงที่คือ 1 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรการหมักต่อนาที (vvm) ตลอดระยะเวลาการหมัก เมื่อมีฟองเกิดขึ้นมากจะเติม antifoam (silicone) ลงไป เพื่อลดปริมาณฟองที่เกิดขึ้นเป็นระยะ ๆ ในการเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์นั้นใน 36 ชั่วโมงแรกจะทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ที่ได้ และกิจกรรมเอนไซม์เป็นระยะ ๆ หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างอีกที่ 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยถังหมักทั้งสอง จะทำการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 7-8 ด้วย โซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 20

ข. ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์และการเจริญเติบโตของเชื้อ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ ก. โดยถังหมักหนึ่งมีการควบคุมพีเอชด้วยโซเดียมคาร์บอเนตให้อยู่ในช่วง pH 7-8 ส่วนอีกถังหมักหนึ่งไม่ควบคุมพีเอช โดยถังหมักทั้ง 2 มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 และถังหมักทั้งสองมีการควบคุมปริมาณ D.O.

ศึกษาการสร้าง CDs โดยเอนไซม์ CGTase

นำเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 500, 1000 และ 1500 ยูนิตเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร มาทำการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 5 ที่เวลาต่างๆ กัน โดยการนำเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 200 ไมโครลิตร เติมลงไปในแป้งที่เตรียมเป็นสับสเตรท (แป้ง 7.5 กรัม ละลายใน 0.2 M. K_2HPO_4-NaOH บัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร) 400 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 1, 3, และ 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นนำไปตกตะกอนโปรตีน แล้วนำมาวิเคราะห์น้ำตาลด้วย HPLC

การวิเคราะห์

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ CGTases โดยวิธีดัดแปลงจาก Fuwa [4,5]

ดูดอะไมโลสร้อยละ 0.2 ใน 0.2 M. K_2HPO_4 - NaOH บัฟเฟอร์ ลงในหลอดขนาด 16x100 มม. ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณเอนไซม์ที่จะ reduce สีของไอโอดีนร้อยละ 10-20) บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 โมลาร์ของกรดอะซิติก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีด้วยสารประกอบของไอโอดีนร้อยละ 0.1 ต่อ โปแตสเซียมไอโอไดด์ร้อยละ 0.01 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร 1 ยูนิตเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ reduce สีของไอโอดีนไปร้อยละ 10

การวิคราะห์น้ำตาลและไซโคลเด็กซ์ทรินด้วย High pressure liquid chromatography

การเตรียมตัวอย่าง : นำ crude enzyme 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีสับสเตรท 400 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ กัน และหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติม absolute ethanol 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอน และนำส่วนใสที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดจนแห้ง เติมน้ำกลั่นลงไป 600 ไมโครลิตร เพื่อละลายน้ำตาลที่ได้ จากนั้นนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อกรอง particle ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

อุปกรณ์ -คอลัมน์ μ-Bondapak carbohydrate (บริษัท Waters Associate)

High pressure liquid chromatography (บริษัท Waters Associate)

Acetonitrile : น้ำ = 70 : 30 เป็น mobile phase อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

-Refractive index detector

วิธีการวิเคราะห์ : ฉีดตัวอย่างที่เตรียมได้ 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC คำนวณหาปริมาณ CDs และน้ำตาลตัวอื่นๆ โดยเทียบกับ peak area ของ CDs มาตรฐานที่ฉีดเข้าไป ผลที่ได้ถูกบันทึกโดยเครื่องบันทึกของ Shimadzu model C-R6A

ผลการทดลองและวิจารณ์

1 การคัดเลือกเชื้อ

1.1 กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase

นำเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ B 95, ATCC 9995 และ ATCC 21783 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรายงานในการนำไปเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTases โดยมี 4 ชนิด (ดูรายละเอียดในหัวข้อการดำเนินการวิจัย)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในแต่ละวันมาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ได้ผลดังตารางที่ 1

เชื้อ ATCC 9995 จะผลิตเอนไซม์ได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่สามและสี่ ซึ่งมี corn steep liquor เป็นองค์ประกอบ เมื่อพิจารณากิจกรรมเอนไซม์เปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่สามและสี่นั้น พบว่าอาหารชนิดที่สี่ จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าและจะให้กิจกรรม

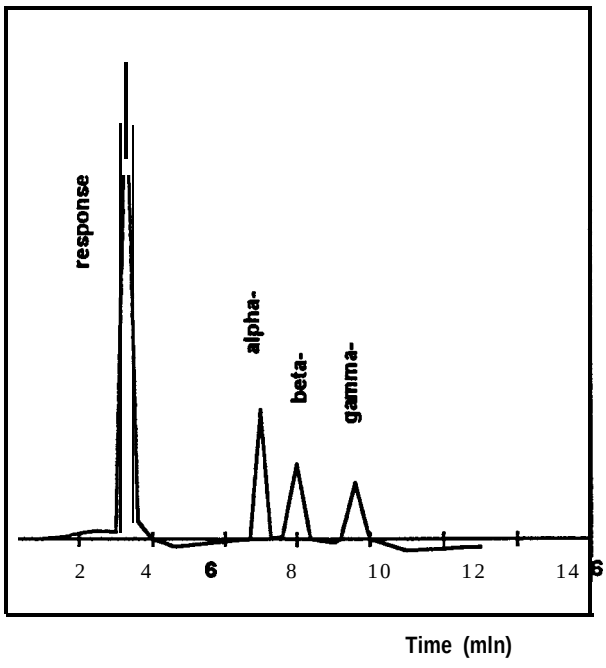
ตารางที่ 1 Dextrinizing Activity ของเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

จุลินทรีย์	วัน	Activity (units/ml)			
		ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	ชนิดที่ 3	ชนิดที่ 4
B 95	2	141.6	64.0	185.8	27.2
	3	61.9	82.0	168.1	18.2
	4	88.5	82.0	168.1	27.2
ATCC 9995	2	no growth	195.0	573.8	667.8
	3	"	195.0	688.5	1125
	4	"	414.6	688.5	1328
ATCC 21783	2	129.5	36.1	1285	91
	3	138.4	45.4	1357	182.2
	4	107.1	45.4	1010	182.2

สูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่หนึ่งนั้น พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยมากและไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ และสำหรับเชื้อ ATCC 21783 จะผลิตเอนไซม์ได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่สาม แต่กลับผลิตได้ต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่สี่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารไม่มีสารอนินทรีย์ที่ต้องการ หรืออาจเนื่องจากปริมาณคาร์บอเนตที่มากเกินพอ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่สามนี้มี $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเมื่อเติม $NaCO_3$ ลงไปอีกร้อยละ 1 เพื่อปรับพีเอชให้เป็นด่าง จึงทำให้มีปริมาณคาร์บอเนตสูงขึ้นอีก สำหรับเชื้อ B 95 ที่คัดเลือกได้จากดินนั้น ให้ผลิตผลของเอนไซม์ต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่สอง ส่วนใหญ่เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ อาจเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีปริมาณ NaCl อยู่ ซึ่งเชื้อที่สามารถทนเกลือได้ก็จะเจริญได้ ดังนั้นเชื้อทั้งสามอาจไม่ใช่เชื้อที่ทนเกลือได้สูง หรืออาจเนื่องจากปริมาณไนโตรเจนที่สูง โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งในการสร้างเอนไซม์เมื่อมีปริมาณไนโตรเจนสูงในสารอาหาร จึงเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ

ATCC 21783 และ ATCC 9995 มี Dextrinizing activity ใกล้เคียงกัน (Dextrinizing activity เป็นค่าแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง) ซึ่งข้อมูลนี้ไม่เพียงพอที่จะตัดสินได้ว่าควรจะเลือกเชื้อตัวใดในการศึกษาต่อไป ในการจะคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์และมีคุณสมบัติที่ต้องการจะต้องทำการศึกษาและพิจารณาเพิ่มเติมในด้านต่าง ๆ ดังนี้

- เปอร์เซนต์ yield ของ CDs
- สัดส่วนของ CD แต่ละชนิด
- อัตราเร็วในการทำงานของเอนไซม์

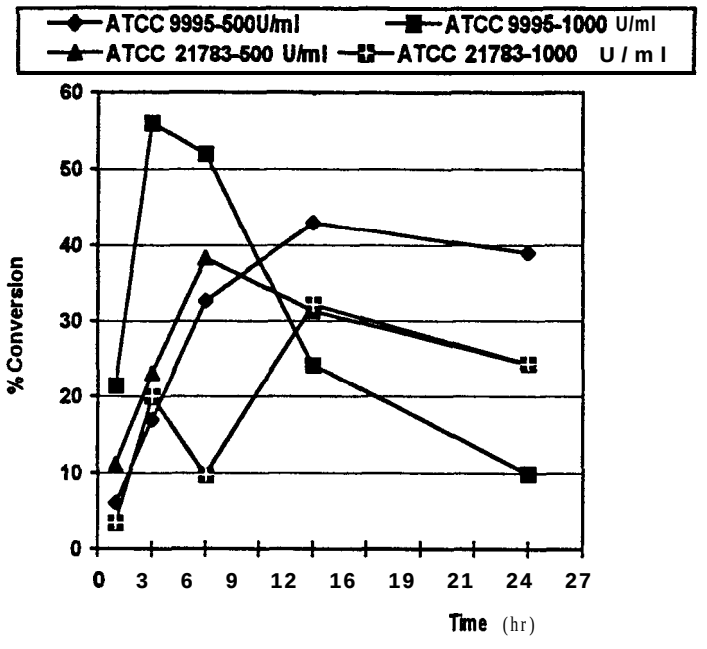


รูปที่ 1 โครมาโตแกรมแสดงพีคของ α-, β-, และ γ- CD แยกโดย Bondapak-Carbohydrate Column

1.2 ศึกษา CDs ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ CGTase ของเชื้อที่คัดเลือก

จากผลตาราง 1 ได้ทำการคัดเลือกเอนไซม์ CGTases จากเชื้อ ATCC 21783 และ ATCC 9995 มาทำการย่อยสลายแป้ง (soluble starch) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ในเวลาต่างๆ กัน ปริมาณ CD แต่ละชนิดได้จากการนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 1

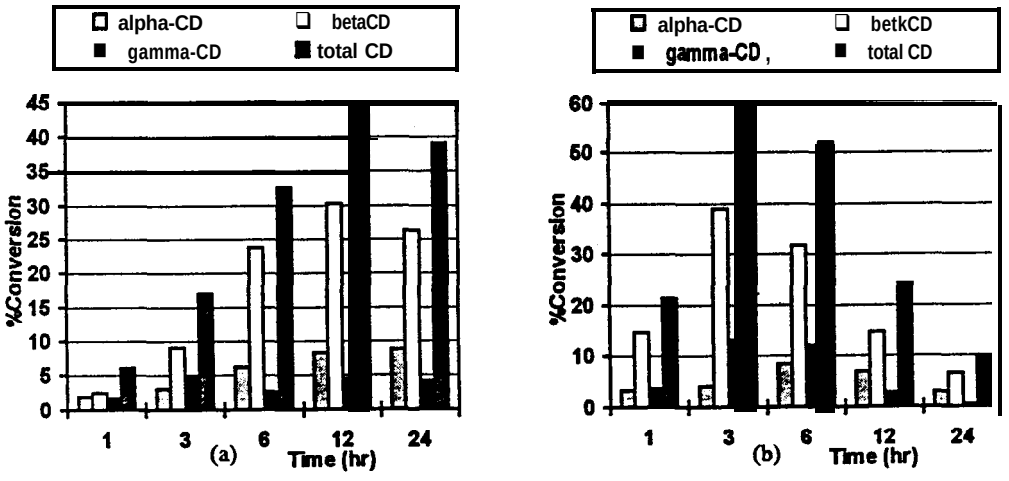
จากรูปที่ 1 เมื่อทำการฉีดตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เพื่อทำการวิเคราะห์นั้น คอลัมน์จะแยก α-CD ออกที่เวลาประมาณ 7 นาที β-CD ที่เวลา 8 นาที และ γ-CD ที่เวลา 9.6 นาที Zsadon และคณะ [6] ทำการวิเคราะห์ CDs ได้เวลา (retention time) ต่างกัน คือ α-CD ถูกแยกออกที่เวลา 8 นาที β-CD ที่เวลา 10.5 นาที γ-CD ที่เวลา 14 นาที ปริมาณ CDs ที่วิเคราะห์ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์ CGTases จากเชื้อ ATCC 9995 และ ATCC 21783 นำไปคิดเป็น yield จากสับสเตรท และนำมาแสดงได้ดังรูปที่ 2 พบว่า เอนไซม์จากเชื้อ ATCC 9995 ที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะให้ปริมาณ CDs รวมสูงกว่าเอนไซม์จากเชื้อ ATCC 21783



รูปที่ 2 เปรียบเทียบผลผลิต **Cds** โดยเอนไซม์จากเชื้อ **ATCC 9995** และ **ATCC 21783**

เมื่อพิจารณาเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ ATCC 9995 ที่ความเข้มข้น 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เปอร์เซนต์ที่แป้งจะถูกเปลี่ยนเป็น CDs เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆ ลดลง แต่สำหรับที่ความเข้มข้น 1000 ยูนิตเอนไซม์นั้นค่า conversion จะสูง สุด และสูงถึงร้อยละ 56 ที่เวลา 3 ชั่วโมง สำหรับเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ ATCC 21783 ทั้งที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า conversion ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์จากเชื้อ ATCC 9995 ที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน

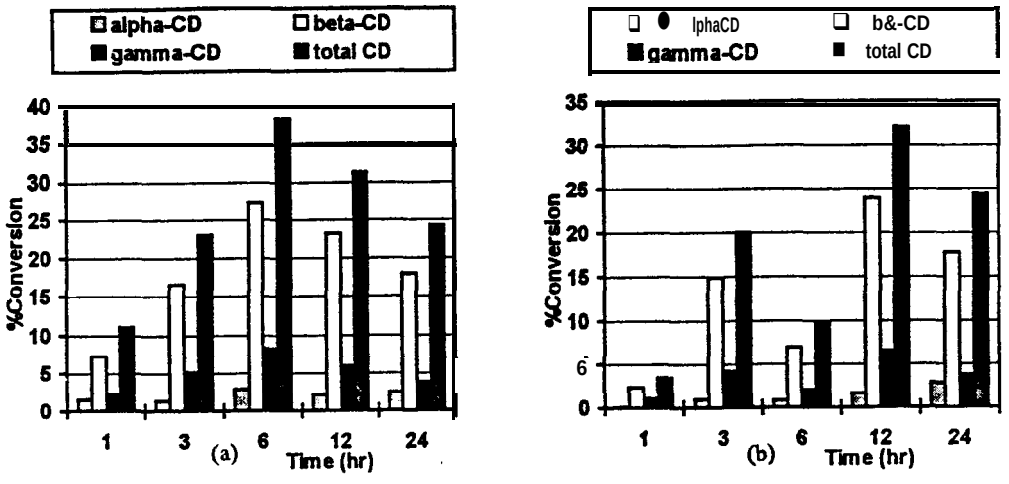
รูปที่ 3 และ 4 แสดงอัตราส่วนของ CD แต่ละชนิดที่เวลาการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ กัน เพื่อนำมาพิจารณาในการเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อไป จากผลของอัตราส่วนของ CD แต่ละชนิดที่ได้จากการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์ของเชื้อ ATCC 9995 เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงจะได้อัตราส่วนของ CDs ใกล้เคียงกันคือ $\alpha : \beta : \gamma$ เท่ากับ 1 : 3.8 : 0.5 โดยที่ 12 ชั่วโมง จะได้ค่า conversion สูงสุดคือ ร้อยละ 44 และที่ความเข้มข้น 1000 ยูนิต พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมงจะได้อัตราส่วนของ CDs เท่ากับ 1 : 9.8 : 3.2 และค่า conversion สูงสุดเท่ากับร้อยละ 58



รูปที่ 3 อัตราส่วนของ CD แต่ละชนิด จากการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อ ATCC 9995

a) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 500 U/ml

b) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 1000 U/ml



รูปที่ 4 อัตราส่วนของ CD แต่ละชนิด จากการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อ ATCC 21783

a) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 500 U/ml

b) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 1000 U/ml

สำหรับเชื้อ ATCC 21783 พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 500 และ 1000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นั้นอัตราส่วนของ $\alpha : \beta : \gamma$ จะใกล้เคียงกันในแต่ละเวลา แต่ค่า conversion จะแตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 500 ยูนิต ที่เวลา 6 ชั่วโมงจะได้ค่า conversion สูงสุดคือร้อยละ 38 อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 9.6 : 2.9 แต่ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 1000 ยูนิต ค่า conversion สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 14.4 : 4 ดังนั้นอัตราส่วนของชนิดของ CDs และค่า conversion ของ CD จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการดำเนินปฏิกิริยา

จากผลการทดลองที่กล่าวมา จึงได้เลือกเชื้อ ATCC 9995 โดยพิจารณาจากค่า conversion และระยะเวลาที่ใช้เพื่อให้ได้ Yield สูงสุด ถึงแม้ว่าโดยเฉลี่ยแล้วอัตราส่วนของ β-CD ของเชื้อ ATCC 9995 จะต่ำกว่า ATCC 21783 เล็กน้อย

สำหรับการศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase นั้น ในขั้นต้นได้ทำการศึกษาในระดับฟลาสก์เพื่อศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์, อุณหภูมิ, พีเอช, ชนิดของแป้งที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ จากนั้นจะนำสภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ในระดับฟลาสก์ไปศึกษาต่อในระดับถังปฏิกรณ์ ซึ่งจะศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และการควบคุมความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์

2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ในระดับฟลาสก์

2.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการ สร้างเอนไซม์

จากผลการทดลองในข้อ 1 ได้ทำการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 4 มาทดสอบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ ATCC 9995 โดยทำการปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นในอาหารด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก โดยเลือกช่วงพีเอชที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง pH 5-9 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์โดยวิธี plate-count ที่ระยะเวลาต่างๆ พร้อมทั้งศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7-8 จะให้ปริมาณเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันและสูงกว่าที่พีเอชอื่น สำหรับที่ pH 6 และ 9 พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำและมีระยะ lag phase ยาว เนื่องจากเชื้อต้องใช้เวลาในการปรับตัว จากสภาวะพีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยที่ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 9 สูงกว่าที่ pH 6 สำหรับที่ pH 5 พบว่าภายใน 24 ชั่วโมงการเจริญเติบโตของเชื้อไม่เพิ่มขึ้น จากการทดลองนี้ทำให้ทราบค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ ATCC 9995 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 4 คือที่ช่วง pH 7-8

สำหรับการผลิตเอนไซม์ พบว่าเชื้อจะเริ่มผลิตเอนไซม์ชั่วโมงที่ 12 และหลังจาก 24 ชั่วโมง เชื้อยังมีการผลิตเอนไซม์ CGTase ต่อไป ในการพิจารณากิจกรรมเอนไซม์ CGTase ที่เชื้อผลิตที่ pH 7 และ 8 เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงใกล้เคียงกัน และสูงกว่าที่พีเอชอื่นๆ โดยที่ 48 ชั่วโมงจะได้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1224 และ 1252 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ pH 9 เชื้อจะเริ่มผลิตเอนไซม์มากขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง โดยที่ 48 ชั่วโมง จะให้กิจกรรมเอนไซม์ 718 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่ pH เริ่มต้น 5 และ 6 เชื้อจะให้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำมาก แสดงว่าที่ช่วงของความเป็นกรด ความสามารถของเชื้อในการผลิตเอนไซม์ต่ำ

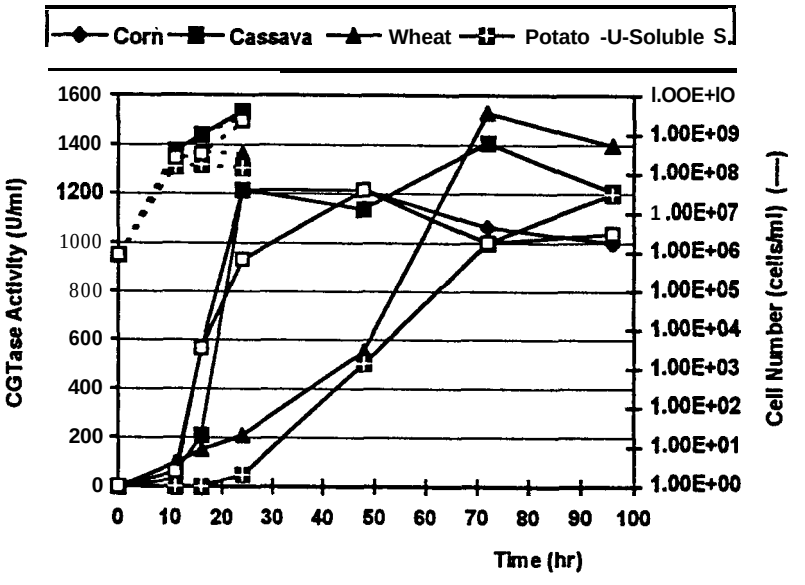
2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิ ได้เลือกทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิทั้งสองใกล้เคียงกัน แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์นั้น เมื่อพิจารณาตั้งแต่เชื้อเริ่มมีการผลิตเอนไซม์จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยได้กิจกรรมเอนไซม์ 1000 และ 785 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3 ชนิดของแป้งที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์

ในการทดลองนี้แป้งที่นำมาใช้ศึกษา คือ แป้งสาลี, แป้งข้าวโพด, แป้งมันสำปะหลัง, แป้งมันฝรั่งและ soluble starch โดยแป้งที่เลือกใช้เป็นแป้งที่มีการใช้กันมากในประเทศยกเว้นแป้งมันฝรั่ง แต่เนื่องจากมีรายงานการนำแป้งมันฝรั่งไปใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้ดีกว่าแป้งชนิดอื่น [7] จึงนำมาศึกษาเปรียบเทียบเพื่อดูผลการผลิตเอนไซม์ของเชื้อในแป้งแต่ละชนิด จากรูปที่ 5 ปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในแป้งข้าวโพด, แป้งมันสำปะหลัง และ soluble starch ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่สำหรับในแป้งสาลีและแป้งมันฝรั่งปริมาณเซลล์ที่ได้ต่ำกว่า ในการพิจารณากิจกรรมเอนไซม์ที่เชื้อผลิตนั้น จะสูงสุดเมื่อใช้แป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ที่ช้ากว่าเมื่อเทียบกับแป้งข้าวโพด, แป้งมันสำปะหลังหรือ soluble starch คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์ในแป้งสาลีมีเพียง 208.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพด จะให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากันคือ 1214 ยูนิต และใน soluble starch จะให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 930 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับแป้งมันฝรั่งพบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ช้าเช่นเดียวกัน แต่กิจกรรมเอนไซม์สุดท้ายที่เวลา 96 ชั่วโมง จะเท่ากับ 1198 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อต่อไป เนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตได้ดีและให้กิจกรรมเอนไซม์สูงและแป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งที่มีราคาถูกและมีการผลิตมากในประเทศไทย สำหรับแป้งสาลีนั้นให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด



รูปที่ 5 ผลของชนิดของแป้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ CGTase

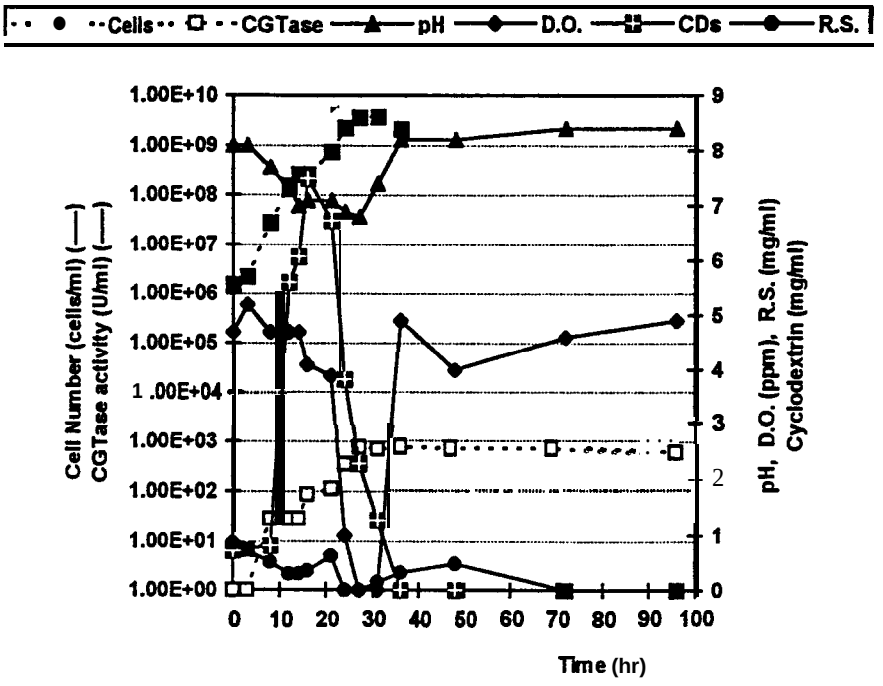
แต่ต้องใช้เวลาเก็บเกี่ยวนานถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งนานกว่าการเลี้ยงในแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งจะให้กิจกรรมเอนไซม์ 1214 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลาเพียง 24 ชั่วโมงเท่านั้น

3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ในระบบกะ

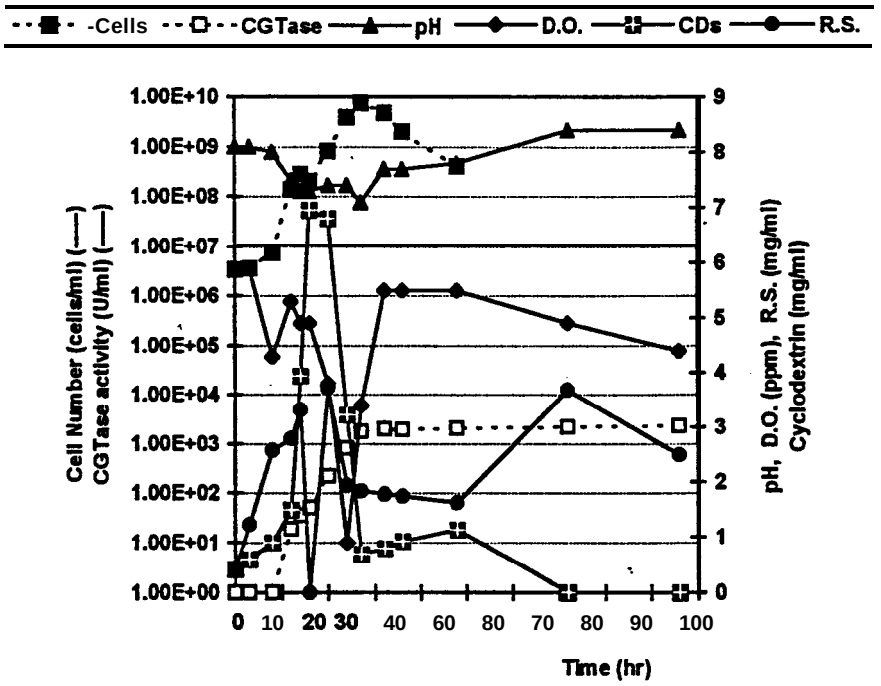
3.1 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

การทดลองทำในถังปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่สี่ แต่ลดปริมาณของ corn steep liquor (CSL) เหลือร้อยละ 3 เนื่องจาก CSL ทำให้เกิดฟองมาก และใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการกวนอยู่ในช่วง 200-350 รอบต่อนาที โดยใช้เชื้อตั้งต้นร้อยละ 3 (v/v) ทำการเปรียบเทียบโดยถังปฏิกรณ์หนึ่งมีอัตราการให้อากาศคงที่คือ 1.0 vvm ส่วนอีกถังหนึ่งจะควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำโดยการปรับอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวน ในระบบทั้ง 2 จะมีการควบคุมพีเอชในการหมักให้อยู่ในช่วง pH 7-8 ในช่วง 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 6 และ 7 แสดงผลการทดลองเมื่อไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ และมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ตามลำดับ รูปแบบของการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นแบบ diauxic ทั้งสองการทดลอง โดยการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงแรกเนื่องจากการใช้สารอาหาร (reducing sugar) ใน corn steep liquor หรือมาจากการที่เชื้อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลตัวอื่นที่นอกเหนือไปจาก CDs ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้จะใช้ได้ง่ายกว่า CDs และจะถูกใช้ไปก่อน จนกระทั่งน้ำตาลเหล่านี้หมด CDs จึงจะถูกนำมาใช้เป็นสับสเตรท ทำให้การเจริญเติบโตเป็นแบบ diauxic โดยพิจารณาจากปริมาณ CDs ที่เกิดขึ้น เมื่อถึงชั่วโมงที่ 16



รูปที่ 6 ปริมาณเซล, กิจกรรมเอนไซม์ CGTase, การเปลี่ยนแปลง pH, D.O., น้ำตาลรีดิวส์ และ Cyclodextrin ในระบบที่ควบคุม pH แต่ไม่ได้ควบคุม D.O.



รูปที่ 7 ปริมาณเซล, กิจกรรมเอนไซม์ CGTase, การเปลี่ยนแปลง pH, D.O., น้ำตาลรีดิวส์ และ Cyclodextrin ในระบบที่ควบคุมทั้ง D.O. และ pH

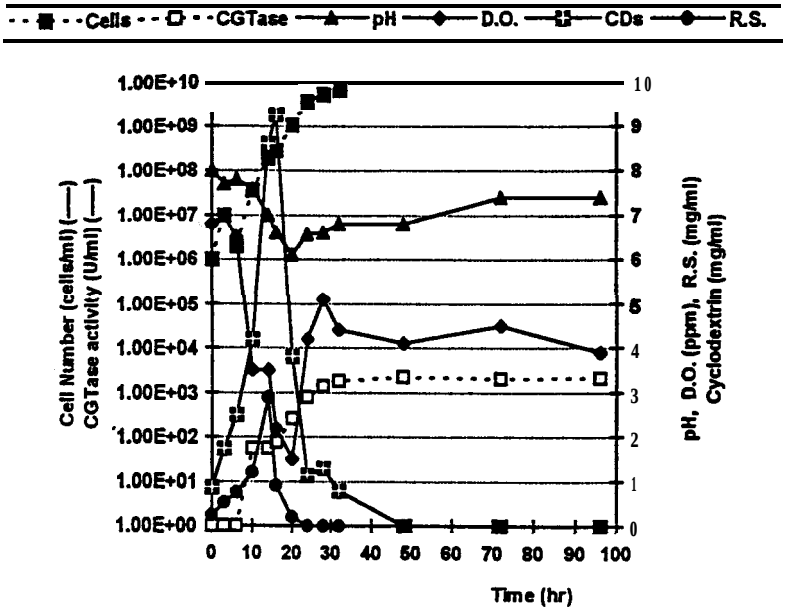
การเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มเข้าสู่ช่วงคงที่ จากนั้นเชื้อจะเริ่มมีการใช้ CDs เพื่อการเจริญเติบโตในอีกช่วงหนึ่ง ปริมาณ CDs จึงลดลง สำหรับในระบบที่ให้อากาศคงที่ พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำจะค่อยๆ ลดต่ำลงจนถึง 0 ppm ในชั่วโมงที่ 26-30 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตในช่วงที่ 2 มีผลให้ปริมาณเซลล์ของเชื้อต่ำกว่าในระบบที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำอยู่เล็กน้อย สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ เชื้อจะผลิตเอนไซม์สูง กว่าในระบบที่ไม่ควบคุม

จากกราฟจะเห็นได้ว่าในระบบที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ เชื้อผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 26 คือประมาณ 700 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่จุดนี้พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ เริ่มมีค่าเป็น 0 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 30 ปริมาณเอนไซม์หลังจากชั่วโมงที่ 26 มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย การที่ปริมาณเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นนั้น คาดว่าเกิดจากการช๊อคของจุลินทรีย์ เนื่องจากสภาวะของการขาดออกซิเจน ทำให้เชื้อหยุดการสร้างเอนไซม์ สำหรับในระบบที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ อัตราการผลิตเอนไซม์จะสูงมากในช่วงชั่วโมงที่ 20 ถึง 30 โดยกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วง 2000-2300 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับปริมาณออกซิเจนละลายน้ำนั้น ยังไม่สามารถควบคุมให้คงที่ได้ เนื่องจากการเกิดฟองอย่างมาก ทำให้ไม่สามารถเพิ่มรอบการกวน หรือการให้อากาศมากขึ้นได้ แต่จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมีผลเป็นอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ

3.2 ความเป็นกรด-ด่าง

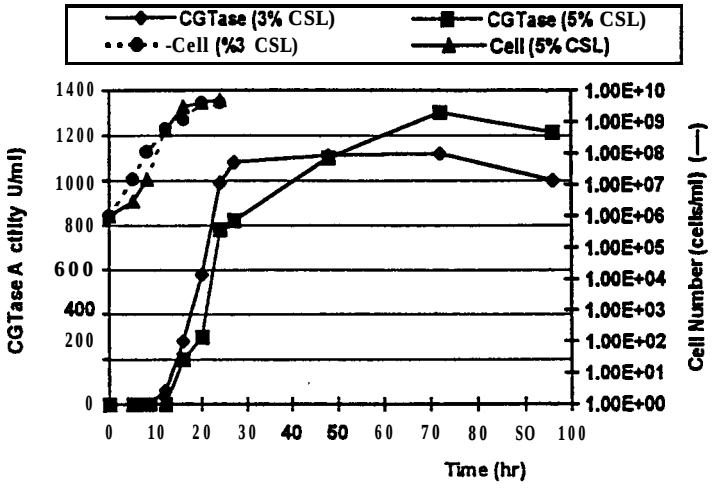
โดยทำการทดลองเปรียบเทียบในระบบที่มีการควบคุมพีเอชของระบบให้คงที่ ให้อยู่ในช่วง pH 7-8 ด้วยโซเดียมคาร์บอเนตและอีกระบบหนึ่งที่ไม่มีการควบคุมพีเอช โดยทั้งสองระบบนี้จะมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ความเร็วรอบของการกวน 200-350 รอบต่อนาที อุณหภูมิของระบบ 35 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 7 และ 8 รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อในระบบและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันทั้งที่มีการควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอช โดยมีรูปแบบการเจริญเป็นแบบ diauxic โดยในระบบที่ไม่มีการควบคุมพีเอชนั้น ระดับพีเอชจะค่อยๆ เริ่มลดลงจากชั่วโมงที่ 8 จนถึงชั่วโมงที่ 21 การลดลงของพีเอชอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อทำให้เกิดกรดขึ้น ซึ่งพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงในช่วงที่พีเอชลดลงเช่นเดียวกัน โดยพีเอชลดลงเหลือ 6.0 และเมื่อน้ำตาลรีดิวซ์หมดไป พีเอชของระบบจะค่อยๆ ปรับตัวขึ้นเองอย่างช้าๆ การปรับตัวของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจากองค์ประกอบของอาหารประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งจะควบคุมการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และในช่วงที่มีการปรับตัวของพีเอชให้สูงขึ้นก็เป็นช่วงที่เชื้อมีการสร้างเอนไซม์อย่างรวดเร็วด้วย เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่เวลา 96 ชั่วโมง วัดพีเอชได้ 7.4



รูปที่ 8 ปริมาณเซล, กิจกรรมเอนไซม์ CGTase, การเปลี่ยนแปลง pH, D.O., น้ำตาลรีดิวส์ และ Cyolodextrin ในระบบที่ควบคุม D.O. แต่ไม่ได้ควบคุม pH

เนื่องจากในการทดลองนี้จำเป็นต้องลดปริมาณ corn steep liquor (CSL) ลงเหลือร้อยละ 3 เพราะปริมาณ CSL สูง มีผลทำให้เกิดฟองมาก แต่เนื่องจากในระดับฟลาสก์ได้ใช้ความเข้มข้นของ CSL เท่ากับร้อยละ 5 ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ CSL ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ ATCC 9995 ในระดับฟลาสก์ เปรียบเทียบกันที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 ได้ผลดังรูปที่ 9 ความเข้มข้นของ CSL มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ ATCC 9995 โดยที่ความเข้มข้นของ CSL ร้อยละ 5 เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยที่เวลา 96 ชั่วโมง จะได้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1212.7 และ 1000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 9 ผลของความเข้มข้นของ CSL ที่ 3% และ 5% ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ CGTase, ของเชื้อ ATCC 9995

สรุป

Bacillus sp. ที่แยกได้เองจากดินมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ CGTase ต่ำกว่าสายพันธุ์ ATCC 9995 และ ATCC 21783 และพบว่าสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาการผลิต CGTase ต่อไปคือ ATCC 9995 โดยพิจารณาจากปริมาณการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ ATCC 9995 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เป็นอย่างมากคือ ปริมาณ Dissolved Oxygen นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์ยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วยคือ ชนิดของแป้งที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน, pH เริ่มต้นของสารอาหาร และอุณหภูมิในการหมัก

เอกสารอ้างอิง

1. Bender, H., 1986, ***Advances in Biotechnological Processes, New*** York, Acadamic Press, pp. 31-71.
2. Szejtili, J. and Sebestyen, G., 197 6, "Resorption Metabolism and Toxicity Studies on the Peroral Application of β-Cyclodextrin," ***American Journal of Pathology,*** Vol. 83, pp. 367- 371.
3. ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535, *เอนไซม์ทางอาหาร* เล่ม 2, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 184-212.
4. โชติรส พิทยาภรณ์ และมาลี เจริญวิทย์วรกุล, 2531, *การเปลี่ยนแป้งให้เป็นไซโคลเด็กซ์ทริน*, ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 1- 13.
5. อรุณี ตรีศิริโรจน์, 2537, "การผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase จากเชื้อ Bacillus sp.," วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
6. Zsadon, B., Otta, K.H. and Tudos, F., 1979, "Seperation of Cyclodextrins by Highperformance Liquid Chromatography," Journal ***of Chromatography,*** Vol. 172, pp. 490-492.
7. Lee, Y. and Kim, H., 1991, "Enzymatic Production of Cyclodextrins from Unliquefied Corn Starch in an Attrition Bioreactor," ***Biotechnology and Bioengineering,*** Vol. 37, No. 8, pp. 795-801.