บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

1. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็ง

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็งจากแหล่งดินและกากมันตัวอย่างต่าง ๆ ในจังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา และนครราชสีมาทั้งหมด 20 แหล่ง โดยตัวอย่างได้ผ่านการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารแข็งโดยการเทสารละลายไอโอดีนลงไปในจานทดลองคัดเลือกจุลินทรีย์ถ้าเกิดบริเวณใส (Clear Zone) แสดงว่า จุลินทรีย์นั้นสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) เนื่องจากดินเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ดี จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ได้ เมื่อสังเกตจากลักษณะสัณฐานโคโลนีเบื้องต้น พบว่า ไอโซเลตที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย (111 ไอโซเลต) เนื่องจาก แบคทีเรียมักพบเป็นแซโพรไฟต์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากที่สุดในดิน (Burrows, 1973) สำหรับราและแอคติโนมัยซีตีสนั้นพบจำนวนน้อย คือ 5 และ 4 ไอโซเลต ตามลำดับ คาดว่าเนื่องจากเซลล์และสปอร์ของราและแอคติโนมัยซีตีสไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสในขั้นตอนของการคัดแยกได้ ทำให้มีโอกาสในการรอดชีวิตต่ำ สำหรับยีสต์นั้นไม่สามารถคัดแยกได้ เนื่องจาก ยีสต์ไม่สามารถทนต่อความร้อนอุณหภูมิสูงในขั้นตอนของการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีการนำตัวอย่างดินมาให้ความร้อนได้ อีกทั้งปริมาณของยีสต์ในดินมีต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น (สมศักดิ์ วังใน, 2528)

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งบนอาหารแข็งเป็นเพียงการทดสอบแบบหยาบไม่สามารถบอกชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ แต่มีข้อดี คือ สามารถทำได้ง่าย สะดวก การทดสอบใช้เวลาน้อย ไม่ต้องการเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีจำนวนมาก Ten et al. (2004) ศึกษาการใช้เทคนิคการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ซับสเตรทที่มีส่วนประกอบของสีย้อมต่าง ๆ พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ไซแลนเนส เซลลูเลสหรือเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกันจากดินและแหล่งอื่น ๆ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ถ้าต้องการหาปริมาณของเอนไซม์จำเป็นต้องวัดในอาหารเหลว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว พบว่า แบคทีเรีย (ไอโซเลตที่ 19 21 93 97 และ108) รา (ไอโซเลตที่ 88 และ 90) และแอคติโนมัยซีตีส (ไอโซเลตที่ 69 และ 87) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง โดยจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาคัดแยกได้จากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทยที่มีการปลูกและแปรรูปมันสำปะหลัง ได้แก่ การผลิตแป้งมันสำปะหลัง มันเส้นและมันอัดเม็ด โดยแหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่างดินบางแหล่ง พบว่าเป็นบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่อาจมีการปนเปื้อนของแป้งมันสำปะหลังจากกระบวนการผลิตที่เป็นตัวชักนำให้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินสร้างเอนไซม์ออกมาเพื่อนำสารอินทรีย์นั้นมาใช้ในกิจกรรมของเซลล์ อย่างไรก็ตาม ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีค่าที่ไม่สูงมากนัก เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อาจไม่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่คัดเลือกได้ ใช้ระบบการจัดจำแนกเชื้อ API (API 50CHB) ที่มักมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย (Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986) พบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตเป็น *Bacillus* ทั้งหมด Pandey et al. (2000) รายงานว่า *Bacillus* เป็นแหล่งจุลินทรีย์สำคัญที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส การที่พบ *Bacillus* ในงานวิจัยนี้น่าจะเนื่องมาจากเทคนิคที่ใช้ในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีการนำตัวอย่างดินมาให้ความร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10-20 นาที ทำให้หลงเหลือแต่เพียงสปอร์ที่สามารถทนความร้อนได้ของ *Bacillus* (Alexander, 1961) ทำให้เพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตสูง อิสยา จันทร์วิทยานุชิต (2547) รายงานการคัดแยกได้ *Bacillus* ssp. BA 1 และ BA 2 ที่ผลิตแอลฟาอะไมเลสจากการนำตัวอย่างดินมาต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และ Santos, & Martins (2003) ที่สามารถคัดแยก *Bacillus* sp. ได้จากการนำตัวอย่างดินมาให้ความร้อนเช่นกัน การที่พบว่า *Bacillus* เหล่านี้ที่แยกได้จากดินผลิตแอลฟาอะไมเลสได้นั้น สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ เช่น Sonenshein, Hoch, and Losick (1993) รายงานว่า *B. cereus*, *B..licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* มักเป็นจุลินทรีย์ที่พบในดินและสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ Haq, Ashraf, Ali, & Qadeer, (1997) พบว่า *B. licheniformis* ผลิตแอลฟาอะไมเลสได้ นอกจากนั้น Haq, Ashraf, Zahara, & Qadeer (1998) รายงานว่า *Bacillus subtilis* GCB-12 สามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสได้เช่นกัน

สำหรับราที่คัดเลือกได้ พบว่าเป็นราที่อยู่ในสกุล *Aspergillus* ที่มีการคัดแยกพบในดินได้บ่อย (Alexander, 1961) และเป็นสกุลที่มีรายงานว่า ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ Uguru et al. (1997) รายงาน การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจาก *A. niger* ที่คัดแยกได้จากหัวมันเทศ และ

Planchot, and Colonna (1995) คัดแยกพบ *A. fumugatus* ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ สำหรับผลการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ ได้แก่ ไอโซเลตที่ 69 (*Streptomyces* sp. LK69) และไอโซเลตที่ 87 (*Streptomyces* sp. LK87) พบว่า แอคติโนมัยซีตีสทั้งสองไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Steptomyces* เป็นสมาชิกที่พบมากในดินที่มีสภาพเป็นกลาง ทนความแห้งแล้งได้ ส่วนใหญ่เป็นพวกแซโพรไฟต์ ไม่ทำอันตราย สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ เช่น แป้งในดิน (นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539) และมักผลิตเอนไซม์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์หรือแป้งได้ (Tortora et al., 1989) Ammar, Matsubara, Ito, Iizuka, Limpaseni, Pongsawasdi, & Minamiura (2002) พบว่า *Streptomyces* sp สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ และ Mc Mahon, Kelly, & Fogarty (1997) ที่รายงานว่า *Streptomyces* sp. IMD 2679 ผลิตแอลฟาอะไมเลสได้เช่นกัน

2. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

2.1 การย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมดสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีส ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ของการทดสอบ เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสามารถทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากราที่มักมีการเสียสภาพจากความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (Miller & Litsky, 1976) และเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีส โดยพบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK108 สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด Konsula, and Liakopoulou-Kyriakides (2004) รายงานว่า เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *B. subtilis* สามารถย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้ดี สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B.subtilis* LK97 ย่อยแป้งได้ค่อนข้างดีที่สภาวะที่ทดสอบ ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. pumilus* ย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้น้อยที่สุด เนื่องจาก เอนไซม์อาจมีการเสียสภาพธรรมชาติ หรือมีความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรท (Substrate Specificity) น้อยต่อแป้งมันสำปะหลัง ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจากราที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK90 รองลงมา ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในส่วนของเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีส พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK69 ตามลำดับ สมศักดิ์ วังใน (2528) กล่าวว่าแบคทีเรีย เช่น กลุ่ม *Bacillus* รา เช่น กลุ่ม *Aspergillus* และแอคติโนมัยซีตีส เช่น กลุ่ม *Streptomyces* สามารถย่อยแป้งได้ Sonenshein et al. (1993) รายงานว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มักเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการการทำให้ใสของแป้ง Nigam and Singh (1995) กล่าวว่า กระบวนการย่อยแป้งเพื่อผลิตน้ำเชื่อมต่าง ๆ และเครื่องดื่มมักใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *B. licheniformis B. amyloliquefaciens* และ *A. oryzae*

2.2 ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

2.2.1 เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย

จากผลการวิจัยที่ได้พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ *B. pumilus B licheniformis B.subtilis* LK87 และ *B.subtilis* LK108 มีความเสถียรต่อทุกอุณหภูมิและพีเอชที่ทำการทดสอบ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงในทุกอุณหภูมิและพีเอชที่ทำการทดสอบ เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียมักทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสหรือมากกว่านั้น (Miller & Litsky, 1976) ซึ่งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิสูงสุดที่ทำการทดสอบ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 มีความเสถียรต่อพีเอชระหว่าง 4.5-5.5 ได้ดี เปรียบเทียบกับรายงานของ Gupta et al. (2003) ที่กล่าวว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* มีความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* 65 ที่มีความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอช 6.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยนี้มีความเสถียรต่อพีเอช 5.5 ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น พบว่า ความเสถียรของแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ขึ้นกับสายพันธุ์และปัจจัยอื่น (Brock, 1986) โดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* NCIB 6346 มีความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอช 7.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที (Morgan, & Priest, 1981) เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มีความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอช 6.0-11.0 ที่อุณหภูมิน้อยกว่า 60 องศาเซลเซียส (Saito, 1973) เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* CUMC 305 มีความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอช 7.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง (เติม Soluble Starch) (Krishnan, & Chandra , 1983) และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* M27 มีความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส (Ramesh, & Lonsane, 1990) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ในเวลาอันสั้น โดยความเสถียรของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับการมีแคลเซียมและความเข้มข้นของซับสเตรทที่ใช้ (Brock, 1986)

2.2.2 เอนไซม์ที่ผลิตจากรา

เอนไซม์ที่ผลิตจากรามักสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส (Miller & Litsky, 1976) สอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่สุด เปรียบเทียบกับกลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 5.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30นาที เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* M13 มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 5.0-9.0 อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส (Yabuki, Ono, Hoshino, & Fukui, 1977) และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 6.0-8.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Perevozchenko, & Tsyperovish, 1972) กลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. flavus* ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. flavus* LINK มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 6.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Khoo, Amirul, Kamaruzaman, Nazalan, & Azizan, 1994) และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. flavus* มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 5.0-8.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Perevozchenko, & Tsyperovish, 1972) กลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. niger* ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. niger* ATCC 13469 มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 4.0-6.0 ที่อุณหภูมิน้อยกว่า 60 องศาเซลเซียส (Bhumibhamon, 1983) และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. niger* มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 50% ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Uguru et al., 1997) กลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. fumigatus* ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. fumigatus* มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที (Domingues, Peralta, 1993) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *A. fumigatus* มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Planchot, & Colonna, 1995) กลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. awamori* ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. awamori* มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 6.0-7.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Perevozchenko, & Tsyperovish, 1972)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. awamorii* ATCC 22342 มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่พีเอช 3.5-6.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Bhella, & Altosaar, 1985) นอกจากนั้นยังมีกลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* อื่น ๆ ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. foetidus* ATCC 10254 มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที (Michelena, & Castillo, 1984) เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. chevalieri* NSPRI 105 มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (Olutiola, 1982) และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. hennebergi* Blochweitz มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (Alazard, & Baldensperger, 1982)

2.2.3 เอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีส

จากผลการวิจัยที่ได้ พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิสูงสุดที่ทำการทดสอบ ที่พีเอช 6.0 ได้ดีที่สุด Mc Mahon, Kelly, & Fogarty (1997) รายงานว่า เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. IMD2679 มีความเสถียรดีต่ออุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส Dey, & Agarwal (1999) พบว่า เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *Streptomyces megasporus* SD12 มีความเสถียรดีต่อพีเอชระหว่าง 5.5-8.5 นอกจากนั้น Fairbairn, Priest, and Stark (1986) รายงานถึง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *Streptomyces limnosus* ไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส

ความเสถียรของเอนไซม์เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับแป้ง (Burhan et al., 2003) จากการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ พบว่า เมื่อให้อุณหภูมิสูงขึ้นแก่เอนไซม์ที่ทำการทดสอบ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน อุณหภูมิที่สูงเกินไปจึงช่วยเพิ่มอัตราเร็วของการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533) ทำให้พันธะนอนโควาเลนต์ต่าง ๆ ของโครงรูปสามมิติของเอนไซม์ถูกทำลายไป มีผลทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูญเสียไป เนื่องจากโครงสร้างที่บริเวณเร่ง (Active Site) เปลี่ยนไป โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จะมีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์มากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ พีเอช Ionic Strength หรือการมีลิแกนด์จับอยู่ด้วยหรือไม่ โดยพบว่าซับสเตรทสามารถป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการเพิ่มอุณหภูมิได้ อีกทั้งเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเพียงหน่วยเดียวที่มีพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลจะทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ (พัชรา วีระกะลัส, 2541) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระหว่างกระบวนการทำให้ใส ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา พีเอช ปริมาณซับสเตรท และปริมาณแคลเซียม (Nagodawithana & Reed, 1993)

เอนไซม์จะไม่เสถียรที่พีเอชสูงหรือต่ำเกินไป เพราะเอนไซม์อาจเกิดการตกตะกอน (Eisenthal, & Danson, 1992) และไม่สามารถทำงานได้อย่างถาวรได้ (Irreversible Inactivation) (พัชรา วีระกะลัส, 2541) เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการแตกไอออน (Ionization) ของ Prototropic Group ที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติ เกิดการเบี่ยงเบนในการจับกับซับสเตรทหรือการเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้ผลผลิตต่ำ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533) และทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าลง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) โดยปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนในระดับทุติยภูมิ ตติยภูมิและ/ หรือจตุรภูมิเปลี่ยนไปต่อระดับพีเอชขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ Ionic Strength ชนิดของสารเคมีในบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารกันเสีย (Preservative) เช่น กลีเซอรอล ความเข้มข้นของสารปนเปื้อนพวกไอออนโลหะ ความเข้มข้นของซับสเตรท ความเข้มข้นของตัวร่วมกิจกรรมของเอนไซม์ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคลเซียมที่เติมลงไปในรูปของคลอไรด์หรือออกไซด์เพื่อใช้เป็นตัวร่วมกิจกรรมของเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงดีขึ้น เช่น การเติมแคลเซียมปริมาตร 100-200 ppm ร่วมกับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* การเติมแคลเซียมปริมาตรสูง 300 ppm ร่วมกับเอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* (Nagodawithana & Reed, 1993) และการเติมแคลเซียม (0.01M) ร่วมกับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* (Bose, 1996) เนื่องจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็น Melloenzyme ที่ต้องมีแคลเซียมไอออนอย่างน้อย 1 ตัว (Gupta et al., 2003) ที่จะช่วยป้องกันการเสียสภาพโดยความร้อนของเอนไซม์ได้ (Reed, 1975) และความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต่ำ เอนไซม์ที่ประกอบด้วยมากกว่าหนึ่งหน่วยย่อยจะเกิดการแตกตัวของหน่วยย่อยจากกันแล้วกลายเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเพียงหน่วยเดียวทำให้มีความเสถียรของเอนไซม์น้อยลง (พัชรา วีระกะลัส, 2541)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยที่ได้ สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังและมีความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ ได้ดี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. licheniformis* ที่มีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง คือ 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5.5 *B. subtilis* LK97 ที่มีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พีเอชระหว่าง 4.5-5.5 *Aspergillus* sp. LK88 ที่มีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 และ *Streptomyces* sp. LK87 ที่มีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 โดยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจจากการวิจัยในครั้งนี้ คือ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 ที่มีความเสถียรของเอนไซม์ดีที่อุณหภูมิสูง คือ 80 องศาเซลเซียส ที่ควรมีการศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่ากับเอนไซม์ทางการค้า เพื่อพัฒนาศักยภาพของจุลินทรีย์สายพันธุ์ในประเทศไทยและลดการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศได้

ข้อเสนอแนะ

ทำเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานและคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University