บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกชนิดของแป้งที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1

จากการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 โดยใช้อาหาร Basal medium ที่มีแป้งชนิดต่างๆ ร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 3 วัน โดยแป้งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้แก่ แป้งละลายน้ำ (soluble starch) แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวสาลี จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง มาตรวจหาปริมาณกิจกรรมอะไมเลสโดยใช้แป้งละลายน้ำร้อยละ 1 ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ผลของปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าแป้งข้าวเจ้าให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด โดยให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 45.30 U/g protein ดังนั้นจึงเลือกแป้งข้าวเจ้าในการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 สำหรับผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.1 ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ด้วยแป้งชนิดต่างๆ

Starch	Total amylase activity (U)	Total protein (mg)	Specific amylase activity (U/g protein)
Rice starch	1.127	24.88	45.30
Wheat starch	1.091	34.46	31.66
Soluble starch	1.100	38.30	28.72
Potato starch	0.212	8.65	24.52
Cassava starch	0.128	5.73	22.33

การที่แป้งแต่ละชนิดสามารถที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกันนั้นน่าจะเกิดจากลักษณะของเม็ดแป้งที่แตกต่างๆ กัน ซึ่งแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวสาลีเป็นแป้งที่มีขนาดเม็ดแป้งเล็กโดยเฉพาะแป้งข้าวเจ้ามีขนาดเล็กที่สุด (3-5 ไมโครเมตร) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ศรียะ

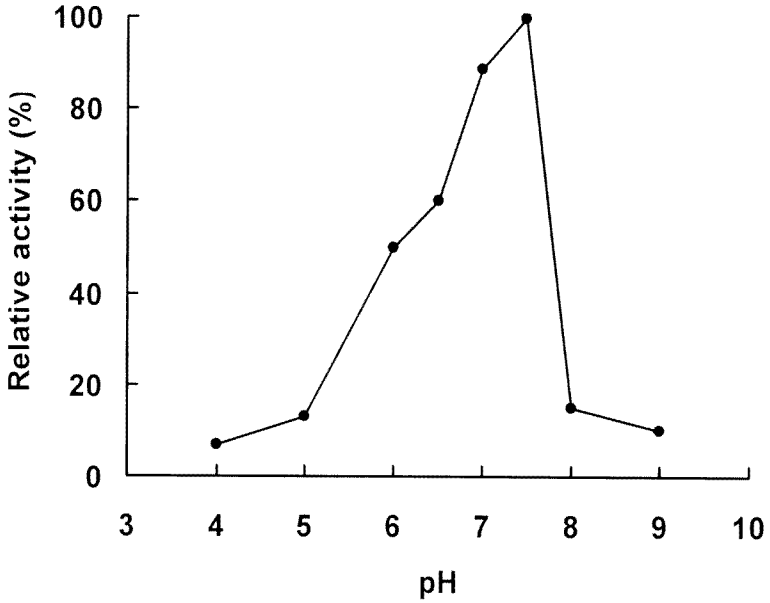
จอมขวัญ, 2546) ซึ่งมีพื้นที่ผิวในการที่จุลินทรีย์จะสามารถย่อยได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งอีก 4 ชนิด (Sujka และ Jamroz, 2007) ทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยแป้งแล้วนำไปใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดี ในขณะแป้งมันฝรั่งและแป้งมันสำปะหลังจะมีขนาดของเม็ดแป้งที่ใหญ่กว่า ในส่วนของแป้งละลายน้ำ (soluble starch) ซึ่งมีโครงสร้างที่ละลายน้ำและไม่แข็งแรงเท่ากับแป้งดิบซึ่งแบคทีเรียน่าจะสามารถย่อยและนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายกว่า แต่ปรากฏว่าใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่าน่าจะมาจากสับสเตรทซึ่งเป็นแป้งดิบสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าแป้งที่ละลายน้ำ (Chiou และ Jeang, 1995) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวสาลีมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันแต่เมื่อดูจากกิจกรรมจำเพาะพบว่ามีค่าที่สูงกว่า นอกจากนี้แป้งข้าวเจ้ายังมีราคาถูกกว่าแป้งสาลี ดังนั้นแป้งข้าวเจ้าจึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสของเชื้อ NOI-1

4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ในการศึกษานี้จะทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยทำการศึกษาพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ ปริมาณแป้งที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

4.2.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตอะไมเลส

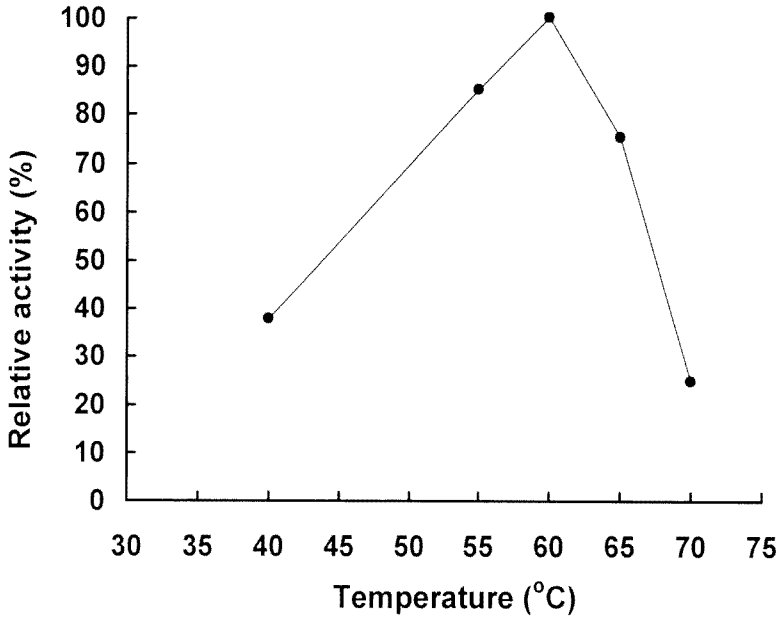
การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพีเอช 4.0-9.0 เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากรูปที่ 4.1 พบว่าพีเอช 7.5 เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตอะไมเลส โดยค่ากิจกรรมทั้งหมดของอะไมเลสที่พีเอช 7.5 เท่ากับ 0.586 U มากกว่าที่พีเอชอื่นๆ พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 สอดคล้องกับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนบางชนิดที่สามารถผลิตอะไมเลสได้ดีในช่วงพีเอช 6.0-7.0 ดังงานวิจัยของ Swamy และคณะ (1996) พบว่า *Clostridium thermosulfurogenes* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่พีเอช 7.0 และ Liu และคณะ (2003) พบว่า *Thermoanaerobacterium* sp. มีสภาวะที่เหมาะสมที่พีเอช 6.5



รูปที่ 4.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตอะไมเลสของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 (โดยที่ 100 % relative activity เท่ากับ 0.586 U)

4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอะไมเลส

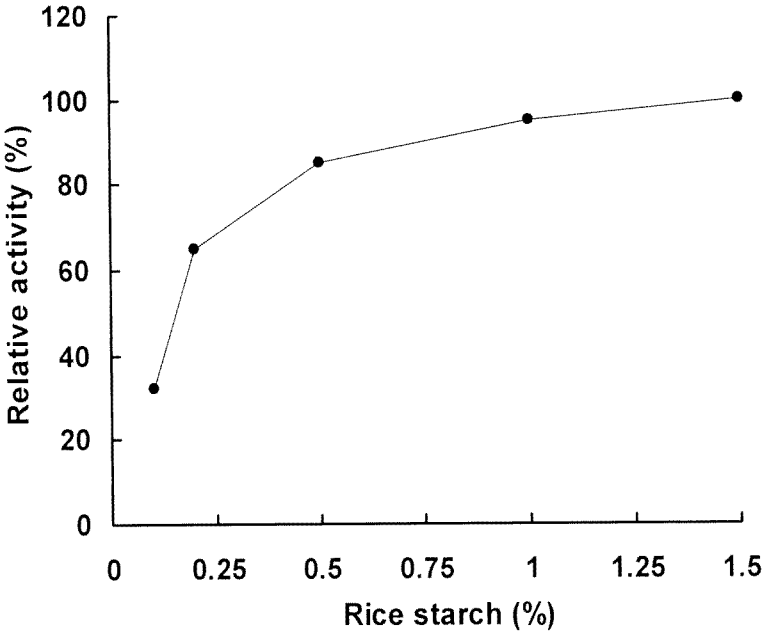
การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 40 – 70 องศาเซลเซียส เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 เป็นเวลา 3 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 คือ 60 องศาเซลเซียส (รูป 4.2) โดยมีค่ากิจกรรมทั้งหมดของอะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 0.527 U ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนชนิดอื่นที่มีรายงานซึ่งอยู่ในช่วง 55-68 องศาเซลเซียส ดังในงานวิจัยของ Hoster และคณะ (2001) พบว่า *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ผลิตเอนไซม์เด็กติเนส โดยมีสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส Swamy และคณะ (1996) รายงานว่า *Clostridium thermosulfurogenes* ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอะไมเลสของ *Thermoanaerobacterium* sp.สายพันธุ์ NOI-1 (โดยที่ 100 % relative activity เท่ากับ 0.527 U)

4.2.3 ผลของความเข้มข้นของแป้งข้าวเจ้าต่อการผลิตอะไมเลส

ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ NOI-1 ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าร้อยละ 1.5 เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเหนี่ยวนำการผลิตอะไมเลสได้สูงสุด เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่วันที่ 3 (รูปที่ 4.3) โดยกิจกรรมทั้งหมดของอะไมเลสจะเริ่มคงที่ที่ปริมาณแป้งข้าวเจ้าร้อยละ 1.0 โดยการที่ปริมาณกิจกรรมของอะไมเลสเพิ่มสูงขึ้นไม่มากเมื่อเพิ่มปริมาณแป้งมากขึ้น อาจจะมีสาเหตุมาจากปริมาณแป้งที่เพิ่มขึ้นไปส่งผลต่อการแพร่กระจายของสารต่างๆภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ หรืออาจเกิดจาก catabolite repression โดยน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งที่ความเข้มข้นแป้งสูงไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ (Lin และคณะ, 1998) จากผลการทดลองดังกล่าวปริมาณของแป้งข้าวเจ้าที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp.สายพันธุ์ NOI-1 คือ ร้อยละ 1.5 แต่ในการนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเลือกใช้แป้งข้าวเจ้าที่ปริมาณร้อยละ 0.5 เพราะถึงแม้ว่าที่ปริมาณร้อยละ 1.5 จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่สุด แต่เมื่อเทียบปริมาณแป้งข้าวเจ้าที่ใช้แล้วพบว่า ที่ปริมาณแป้งร้อยละ 1.5 ซึ่งมากกว่าที่ร้อยละ 0.5 ถึง 3 เท่า กลับให้กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อะไมเลสมากว่าเพียงประมาณร้อยละ 12 เท่านั้น

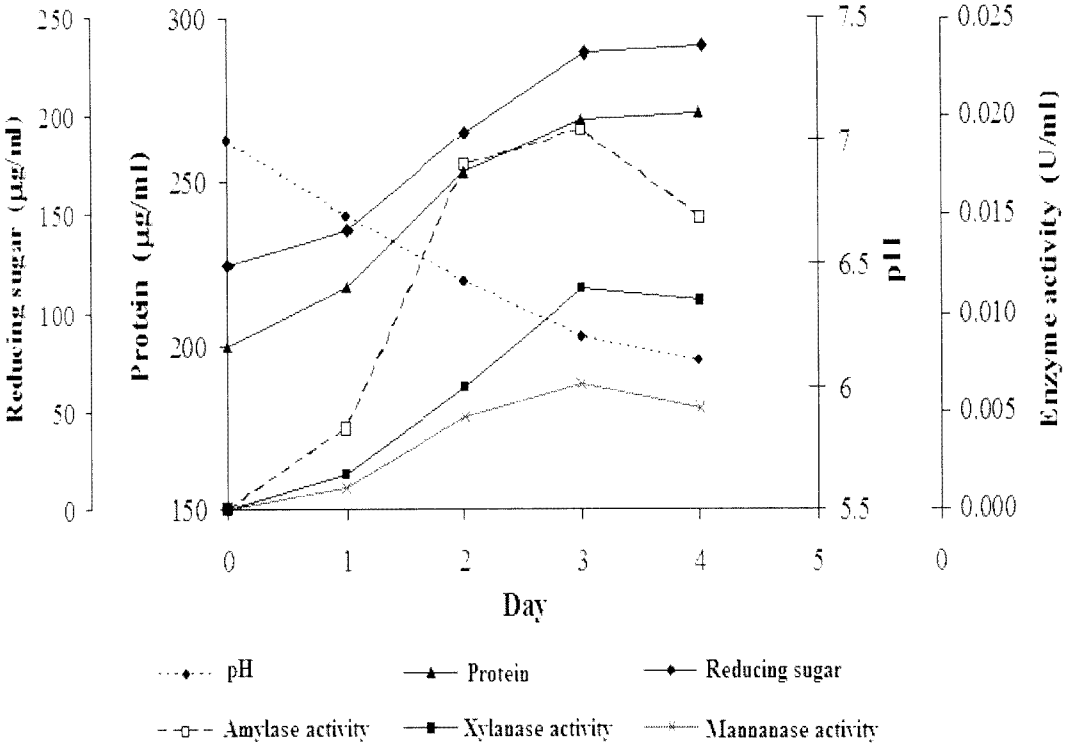


รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของแป้งข้าวเจ้าต่อการผลิตอะไมเลส ของ *Thermoanaerobacterium* sp.สายพันธุ์ NOI-1 ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (โดยที่ 100 % relative activity เท่ากับ 0.601 U)

4.2.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลส

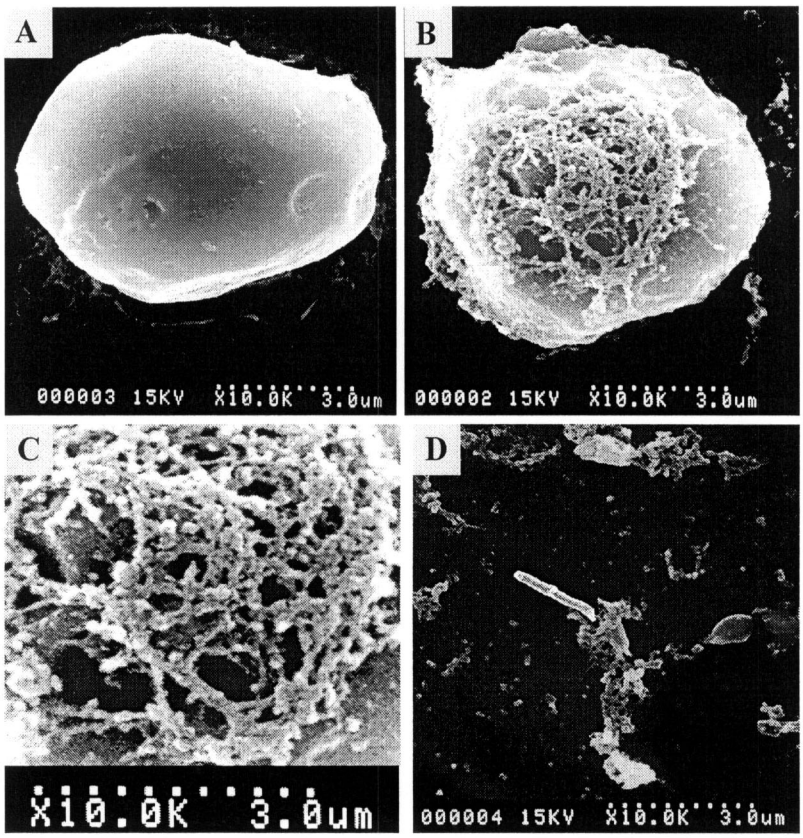
เมื่อเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้แป้งข้าวเจ้าดิบร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 4 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆหนึ่งวัน ตั้งแต่เวลา 0 ถึง 4 วัน โดยวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในรูปของโปรตีน (Sanchez และคณะ, 1999) พบว่าในช่วงวันแรกจุลินทรีย์จะอยู่ในช่วง lag phase ซึ่งมีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้าเนื่องจากอยู่ในสภาวะปรับตัวในอาหาร และเตรียมพร้อมที่จะแบ่งเซลล์ สังเกตได้จากปริมาณโปรตีนที่ค่อยๆมีการผลิตเพิ่มมากขึ้น ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จะสอดคล้องกับปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ไซลาเนส แมนนาเนส เนื่องจากในช่วง lag phase เชื้อผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อใช้ย่อยสับสเตรทในปริมาณไม่มากนัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จึงเพิ่มขึ้นไม่มาก หลังจากนั้นในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง log phase (รูปที่ 4.4) โดยมีการผลิตเอนไซม์ทั้งสามชนิดในอัตราที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เพื่อไปย่อยสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลเข้าสู่เซลล์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง log phase โดยอัตราการผลิตน้ำตาลโดยเอนไซม์มากกว่าอัตราการใช้น้ำตาลของเซลล์ เนื่องจากแป้งเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ จุลินทรีย์จึงผลิตเอนไซม์ออกมา เพื่อย่อยสลายแป้งให้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ และหลังจากวันที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆจะเริ่มค่อยๆลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะ stationary phase และ death phase จึงมีการผลิตเอนไซม์ที่

ลดลง ซึ่งจะสอดคล้องกับปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เริ่มคงที่ การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดนี้น่าจะเป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตที่สอดคล้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ (growth -associated enzyme)



รูปที่ 4.4 การเจริญของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ค่าพีเอช ปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ไซลาเนส แมนนาเนส และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นอกจากนี้ในระหว่างที่มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์พบว่าค่าพีเอชลดลงจากเริ่มต้นที่พีเอช 7.0 เป็น พีเอช 6.1 ในวันที่ 4 ซึ่งการที่ค่าพีเอชลดลงในระหว่างการเจริญของจุลินทรีน์นั้นเนื่องมาจากในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์มีการผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นมา เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทิริก เป็นต้น จึงทำให้ค่าพีเอชลดลง จากการศึกษาการจะเจริญเติบโตและย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบด้วย scanning electrol microscrobe (SEM) พบว่าแบคทีเรีย NOI-1 เจริญและย่อยแป้งดิบโดยยึดเกาะอยู่บนผิวแป้งดิบ โดยในชั่วโมงที่ 12 ในช่วง lag phase พบว่าเม็ดแป้งยังคงมีลักษณะที่สมบูรณ์อยู่ ดังแสดงในรูปที่ 4.5A เมื่อเวลา 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงซึ่งอยู่ในช่วง log phase แบคทีเรียจะเข้าไปยึดเกาะบริเวณผิวของเม็ดแป้งข้าวเจ้าเป็นจำนวนมากดังแสดงในรูปที่ 4.5B และ 4.5C และที่เวลา 96 ชั่วโมงเข้าสู่ death phase พบว่าแบคทีเรียย่อยเม็ดแป้งข้าวเจ้าจนหมดและพบเซลล์แบคทีเรียที่หลุดออกมาจากเม็ดแป้ง (รูปที่ 4.5D)



รูปที่ 4.5 การยึดเกาะเม็ดแป้งข้าวเจ้าเมื่อถ่ายภาพด้วย scanning electrol microscrobe (SEM)
โดยที่ A คือ เม็ดแป้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในช่วง lag phase
B คือ เม็ดแป้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในช่วง log phase
C คือ เซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะบนผิวเม็ดแป้ง
D คือ เซลล์แบคทีเรียในช่วง death phase

4.3 การตรวจสอบคุณสมบัติการยึดเกาะของอะไมเลสกับแป้งที่ไม่ละลายน้ำ

จากการตรวจสอบคุณสมบัติการยึดเกาะของอะไมเลสกับแป้งดิบโดยผสม crude enzyme กับแป้งดิบใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และ 0.1 โมลาร์ NaCl เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนที่ชะจากแป้งดิบด้วยสารละลายน้ำตาลมอลโตส (ร้อยละ 3) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนเริ่มต้นพบว่า crude enzyme จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 สามารถยึดเกาะกับแป้งดิบชนิดต่างๆ ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะกับแป้งดิบใน crude enzyme และ % binding ของโปรตีน

Raw starch	Total protein (mg protein)		% Binding
	Crude enzyme	Bound protein	
Rice starch	769.17	215.00	27.95
Wheat starch	769.17	203.00	26.39
Cassava starch	769.17	185.00	24.05
Potato starch	769.17	167.00	21.71

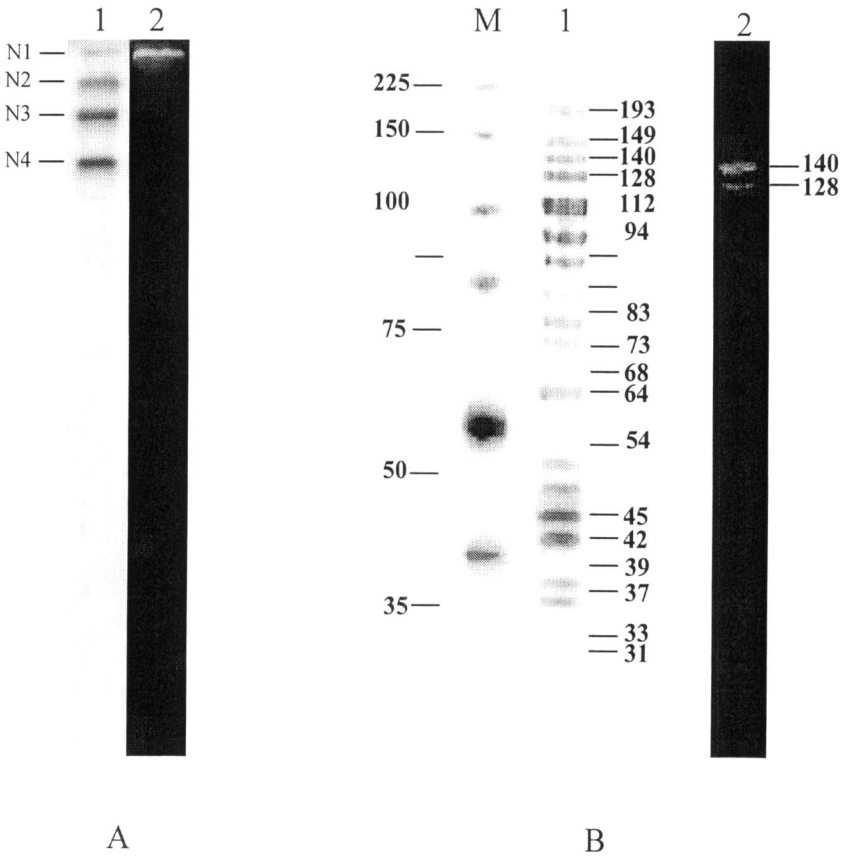
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่สามารถยึดเกาะกับแป้งดิบชนิดต่างๆ พบว่า crude enzyme สามารถยึดเกาะกับแป้งข้าวเจ้าดิบได้ดีที่สุดโดยมี % binding เท่ากับ 27.95 ซึ่งการที่ crude enzyme สามารถยึดเกาะกับแป้งดิบต่างๆได้นั้นเอนไซม์น่าที่จะมีบริเวณที่สามารถยึดเกาะกับแป้งได้ (starch-binding domain) ซึ่งบริเวณที่สามารถยึดเกาะกับแป้งดิบที่ไม่ละลายน้ำได้ จะช่วยในการจับกับบริเวณพื้นผิวของเม็ดแป้งดิบที่ไม่ละลายน้ำและเพิ่มความใกล้ชิดของ active site ของเอนไซม์กับแป้งดิบทำให้เอนไซม์สามารถย่อยแป้งดิบซึ่งเป็นสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำได้ดีขึ้น (Rodríguez-Sanoja และคณะ, 2005) ตัวอย่างการยึดเกาะระหว่างอะไมเลสและแป้งดิบ เช่น Goto และคณะ (1994) พบว่าเอนไซม์ glucoamylase จาก *Aspergillus awamori* var *kawachi* มีความสามารถในการจับกับแป้งดิบด้วย starch-binding domain และในการศึกษาของ Sorimachi และคณะ (1997) พบว่าเอนไซม์ glucoamylase จาก *Aspergillus niger* สามารถจับกับ β-cyclodextrin ได้ที่บริเวณ starch-binding domain

4.4 การศึกษารูปแบบของโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1

4.4.1 รูปแบบของโปรตีนใน crude enzyme ที่ได้จาก Thermoanaerobacterium sp. สายพันธุ์ NOI-1

จากการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนและเอนไซม์ใน crude enzyme ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 โดยวิธี native-PAGE SDS-PAGE และ active-PAGE (zymogram) พบว่า native-PAGE ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 4 แถบ (N1 N2 N3 และ N4) โดยที่แถบบนสุด (N1) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (รูปที่ 4.6A) ซึ่งคาดว่าน่าจะมีขนาดใหญ่ ขณะที่เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนใน crude enzyme อย่างน้อย 17 โปรตีน ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 31 kDa ถึง 193 kDa (รูปที่ 4.6B) โดยพบว่าโปรตีนขนาด 128 kDa และ 140 kDa แสดงกิจกรรมของอะไมเลส ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของอะไมเลส

น่าจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มในสภาพธรรมชาติ และแตกออกมาเมื่อผ่านการทำ SDS-PAGE ซึ่งให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นdenaturant (sodium dodecly sulfate และ β-mercaptoethanol) ทำให้โปรตีนหน่วยย่อยแยกตัวออกจากโปรตีนก้อนใหญ่



รูปที่ 4.6 รูปแบบโปรตีนและอะไมเลสของ crude enzyme จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 (A) คือ native-PAGE และ (B) คือ SDS-PAGE โดยที่แถวที่ 1 คือ แถบโปรตีนที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 แถวที่ 2 คือ zymogram ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และ แถว M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล

4.4.2 การตรวจสอบกิจกรรมของ crude enzyme ที่ผลิตจาก Thermoanaerobacterium sp. สายพันธุ์ NOI-1 โดยใช้แป้งข้าวเจ้าดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับไซแลน

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ในอาหารที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆใน crude enzyme พบว่านอกจากอะไมเลสแล้วยังตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ อีก ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยแป้งข้าวเจ้าและไซแลน

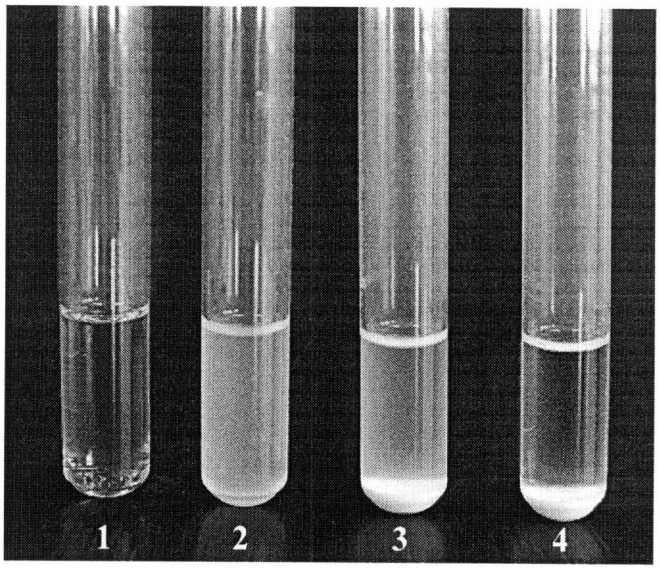
Enzymes	Specific activity (U/g protein)	
	Raw rice starch	Xylan
Amylolytic enzyme		
Amylase	46.18	900
Glucoamylase	ND	ND
α-Glucosidase	ND	ND
Xylanolytic enzyme		
Xylanase	15.19	2,550
β-Xylosidase	1.38	2,000
α-L-Arabinofuranosidase	7.69	2,440
Acetyl asterase	ND	10
Cellulolytic enzyme		
β-Glucosidase	2.37	490
Cellobiohydrolase	1.68	390
Carboxymatalycellulase	ND	ND
Dextranase	2.00	ND
Mannanase	7.38	210
Pectinase	ND	ND

ND: could not detect under the assay condition

จากผลการทดลองพบว่านอกจาก amylolytic enzyme ซึ่งได้แก่ อะไมเลส แล้วนั้น *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แป้งข้าวเจ้าดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ยังผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม xylanolytic ได้แก่ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส และอะราบิโนฟูราโนซิเดส และเอนไซม์ในกลุ่ม cellulolytic ได้แก่ เบต้ากลูโคซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส และรวมถึงเอนไซม์เด็กตราเนส และแมนนาเนส ด้วย ดังนั้น crude enzyme ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 น่าจะมีความสามารถย่อยสับสเตรทที่มีองค์ประกอบเป็นพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดร่วมกัน เช่น กากมันสำปะหลังได้ดี ซึ่งกากมันเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณมากและราคาถูก และจากการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวเจ้าดิบกับไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเอนไซม์ที่

ผลิตได้เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าดิบเป็นแหล่งคาร์บอนผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆเหมือนกับที่พบเมื่อเลี้ยงในไซแลน แต่ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ ที่พบเมื่อเลี้ยงในไซแลนจะได้ปริมาณที่สูงกว่าที่เลี้ยงในแป้งข้าวเจ้าดิบ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าในอาหารที่ใช้แป้งข้าวเจ้าดิบเป็นแหล่งคาร์บอน และเนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตเป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตที่สอดคล้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ (growth-associated enzyme) จึงทำให้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณเอนไซม์ชนิดต่างๆสูงกว่าที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แป้งข้าวเจ้าดิบเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนจะพบเอนไซม์อื่นเพิ่มเติมได้แก่ อะเซททิลเอสเตอเรส อย่างไรก็ตามพบเอนไซม์เด็กตราเนสเฉพาะเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวเจ้าดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น จากตารางที่ 4.2 เห็นได้ว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้ยังมีปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอะไมเลสแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีแป้งข้าวเจ้าดิบเป็นแหล่งคาร์บอนก็ตาม เช่นเดียวกับเอนไซม์อะไมเลสสามารถผลิตได้แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อะไมเลส และไซลาเนสที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในแป้งดิบน่าจะเป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตจากเซลล์จุลินทรีย์โดยไม่ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (constitutive enzyme)

นอกจากนี้ยังตรวจสอบคุณสมบัติการยึดเกาะของเซลล์ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 กับแป้งข้าวเจ้าดิบ โดยใช้เซลล์จากการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ในอาหารที่มีแป้งละลายน้ำเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 1 วัน แล้วปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 0.1 โมลาร์ NaCl ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แล้วนำไปยึดเกาะกับแป้งข้าวเจ้าดิบใน 0.1 โมลาร์ NaCl ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 โดยเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์และแป้งข้าวเจ้าดิบในสารละลายบัฟเฟอร์ ผลการทดลองแสดง ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 กับแป้งข้าวเจ้าดิบ หลอดที่ 1 คือ 0.1 M SPB buffer กับ 0.1 M NaCl หลอดที่ 2 คือ เซลล์ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 หลอดที่ 3 เซลล์ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 กับสารแขวนลอยแป้งข้าวเจ้าดิบ และหลอดที่ 4 แป้งข้าวเจ้าดิบใน 0.1 M SPB buffer กับ 0.1 M NaCl

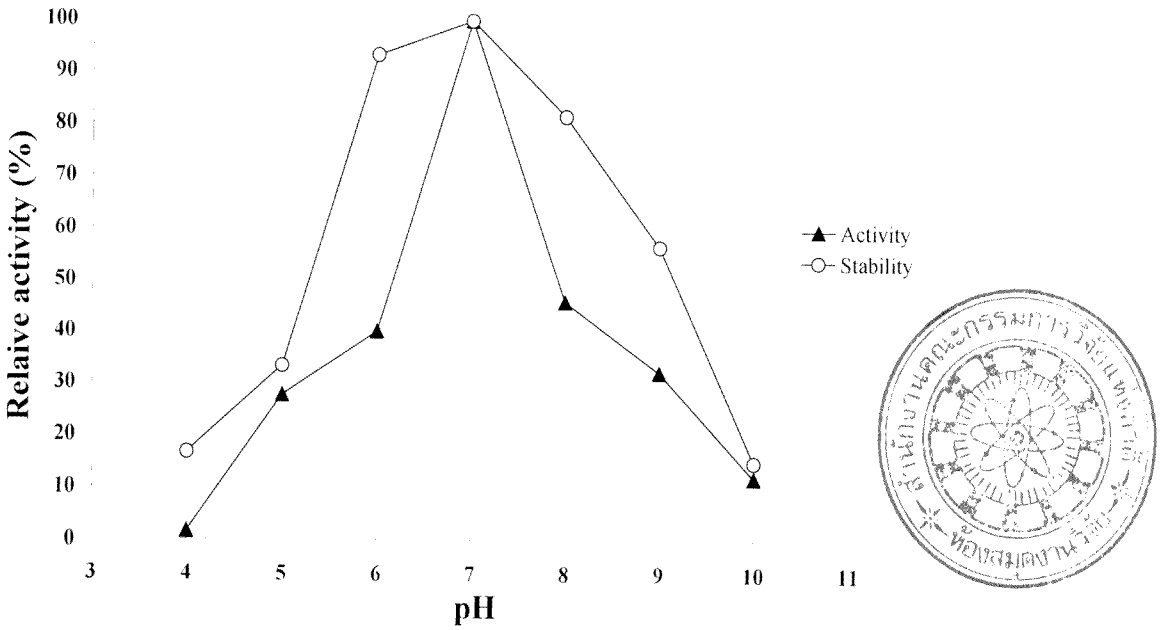
เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์กับแป้งข้าวดิบ โดยใช้เซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์และแป้งข้าวเจ้าดิบในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวเปรียบเทียบพบว่าเซลล์สายพันธุ์ NOI-1 สามารถยึดเกาะกับแป้งข้าวเจ้าดิบ 38.75% ซึ่งการที่เซลล์มีความสามารถในการยึดเกาะกับแป้งข้าวเจ้าดิบนั้นน่าจะมาจากการที่เซลล์มีส่วนที่สามารถทำหน้าที่จับกับแป้งดิบได้ ซึ่งการที่เซลล์สามารถจับกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำได้นั้นจะช่วยเพิ่มความใกล้ชิดกันระหว่างเซลล์กับสับสเตรทและเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จะไปย่อยสับสเตรทบริเวณผิวของสับสเตรท (Bayer และคณะ, 1998)

4.5 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการทำงาน และเสถียรภาพของเอนไซม์อะไมเลส

4.5.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของอะไมเลส

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของอะไมเลสในช่วงพีเอช 4.0-10.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของ crude amylase จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 คือที่พีเอช 7.0 (รูปที่ 4.8) ในขณะที่พีเอชที่มากกว่าและน้อยกว่าพีเอช 7.0 ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่พีเอช 7.0 ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงว่าอะไมเลสนี้ทำงานได้ดีในพีเอชที่เป็นกลางในขณะที่การศึกษาผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของอะไมเลสโดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่พีเอชในช่วง 4.0-10.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมา

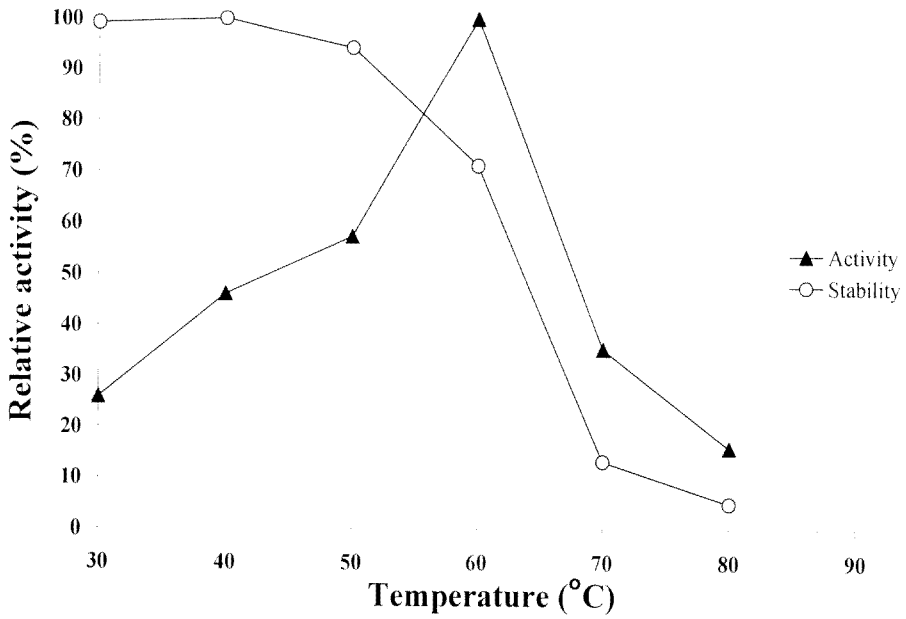
ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า crude amylase ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 มีเสถียรภาพสูงในช่วงพีเอช 6.0-8.0 (รูปที่ 4.8) โดยมีกิจกรรมที่เหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 80



รูปที่ 4.8 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของ crude amylase ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1

4.5.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของอะไมเลส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะไมเลสในช่วงอุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของ crude amylase จากเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 คือที่ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.9) ในขณะที่อุณหภูมิที่มากกว่าและน้อยกว่า 60 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 60 เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่ 60 องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ เมื่อนำเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิในช่วง 30 – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจวัดกิจกรรมของอะไมเลส พบว่า crude amylase ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 มีเสถียรภาพสูงในช่วงอุณหภูมิ 30 – 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.9) โดยมีกิจกรรมที่เหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 70 ในขณะอุณหภูมิที่ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่เท่ากับร้อยละ 13.22 และ 4.95 ตามลำดับ

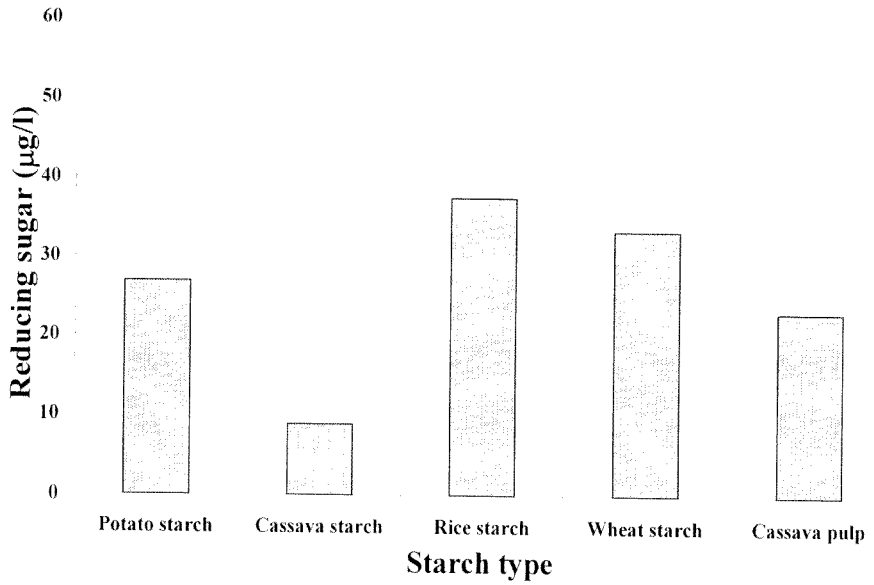


รูปที่ 4.9 ผลของอุณหภูมิต่อเถียรภาพของ crude amylase ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1

4.6 การย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ และกากมันสำปะหลังโดยอะไมเลส

จากการศึกษาการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง แป้งสาลี และแป้งข้าวเจ้า และกากมันสำปะหลัง ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน sodium phosphate buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วย crude enzyme จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 พบว่า crude enzyme สามารถย่อยแป้งข้าวเจ้าได้ดีที่สุด รองลงมาคือ แป้งข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และแป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ (รูปที่ 4.10) การที่ crude enzyme สามารถย่อยแป้งดิบต่างๆและกากมันสำปะหลังได้ อาจเนื่องจากใน crude enzyme มีอะไมเลสที่มี starch-binding domain เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองข้อ 4.4 ซึ่งช่วยในการยึดจับกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำได้ และการที่อะไมเลสย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ ได้ดีไม่เท่ากันอาจเป็นเพราะสมบัติของแป้งชนิดต่างๆ ไม่เหมือนกันทั้งทางด้านกายภาพ เช่น ขนาดของเม็ดแป้ง เนื่องจากเมื่อดูขนาดของเม็ดแป้งทั้ง 4 ชนิดจะพบว่า แป้งข้าวเจ้ามีขนาดเม็ดแป้งเล็กที่สุดคือ 3-5 ไมโครเมตร ส่วนแป้งข้าวสาลี แป้งมันสำปะหลัง และแป้งมันฝรั่งมีขนาดใหญ่ขึ้น ตามลำดับ (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ศรียะจอมขวัญ, 2546) จึงทำให้เม็ดแป้งข้าวเจ้ามีพื้นที่ผิวสูงที่สุดในแป้งทั้ง 4 ชนิด ซึ่งพื้นที่ผิวมีผลต่อการย่อยของเอนไซม์เพราะว่าเอนไซม์จะย่อยเม็ดแป้งดิบจากบริเวณพื้นผิว (Sujka และ Jamroz, 2007) นอกจากนี้มีรายงานว่าแป้งมันฝรั่งและแป้งมันสำปะหลังจะทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากกว่าแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวสาลี (Kimura และ Robyt, 1995 ; Planchot และคณะ, 1995) และจากผลการทดลองในรูปที่ 4.10 พบว่ากากมันสำปะหลังให้

ปริมาณน้ำตาลที่สูงกว่าแป้งมันสำปะหลังซึ่งอาจจะเป็นเพราะ กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งได้ผ่านกระบวนการปรับสภาพต่างๆมาจึงทำให้เม็ดแป้งมันสำปะหลังที่มีอยู่ในกากมันสำปะหลังโดนทำลายโครงสร้างและมีความแข็งแรงน้อยลงจึงสามารถย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น และนอกจากนี้ใน crude enzyme มี cellulolytic และ xylanolytic enzymes และแมนนาเนสรวมอยู่ด้วยซึ่งสามารถย่อย เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในกากมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาล นอกเหนือจากการย่อยแป้งด้วยอะไมเลสแต่เพียงอย่างเดียว

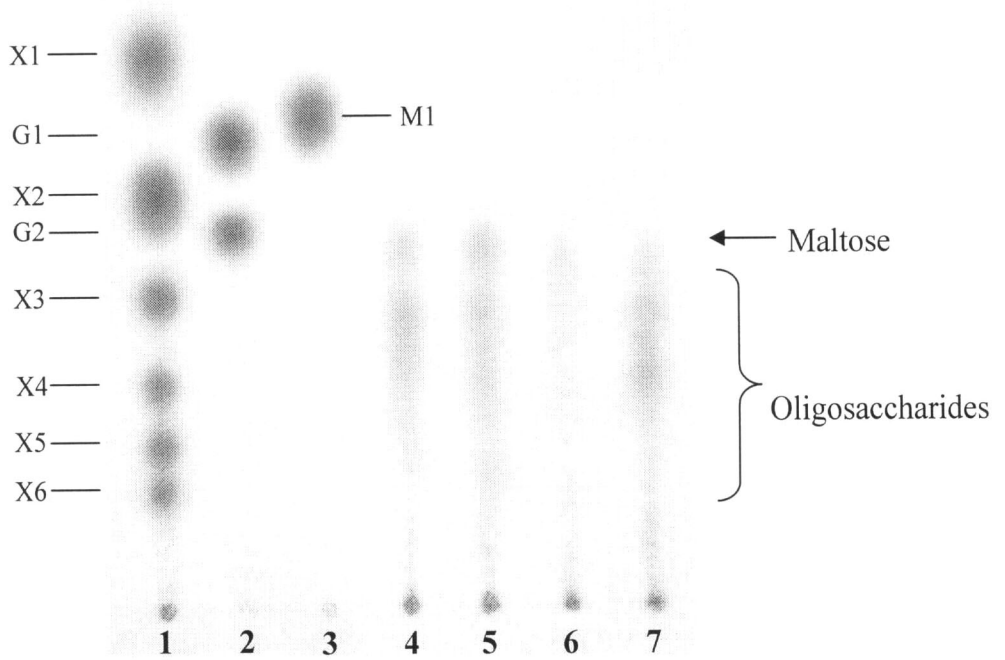


รูปที่ 4.10 การย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆและกากมันสำปะหลัง โดย crude enzyme จากเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1

4.7 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลจากการย่อยสับสเตรทต่างๆด้วย crude enzyme

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นการศึกษาความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 โดยจะตรวจหาชนิดของน้ำตาลต่างๆ ที่เกิดขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายวัสดุให้ได้น้ำตาลตามที่ต้องการ การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลด้วยวิธี TLC โดยนำ crude enzyme ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ NOI-1 มาย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบ กากมันสำปะหลัง ไซแลน และโลคัสบีนกัม แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำการทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐานต่างๆ (รูปที่ 4.11 แถวที่ 1-3) จากผลการย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบ และกากมันสำปะหลัง ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลขนาดเล็กที่สุดคือน้ำตาลมอลโตสและยังพบโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆอีกด้วย (รูปที่ 4.11 แถวที่ 4-5) ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไซแลน จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดอยู่ระหว่างน้ำตาลไซโลไบโอสกับไซโลไตรโอสและโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ (รูปที่ 4.11 แถวที่ 6) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโลคัสบีมกัมได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเป็นน้ำตาลแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ จากผลดังกล่าวแสดงว่า crude enzyme จาก

Thermoanaerobacterium sp. สายพันธุ์ NOI-1 น่าจะมีความจำเพาะต่อการย่อยโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์สายสั้นๆได้ต่ำ จึงพบผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และโอลิโกแซกคาร์ไรด์สายสั้นๆเหลืออยู่



รูปที่ 4.11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ ด้วย crude amylase จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1จากการทำ TLC

แถวที่ 1 = Standardไซโลโอลิโกแซกคาร์ไรด์ที่ได้จากการย่อย Birchwood xylan ด้วย crude enzyme จาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 (Ratanakhanokchai และคณะ, 1999)

แถวที่ 2 = มอลโตส และกลูโคส

แถวที่ 3 = แมนโนส

แถวที่ 4 = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบ

แถวที่ 5 = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยกากมันสำปะหลัง

แถวที่ 6 = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยไซแลน

แถวที่ 7 = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยโลคัสบีนกัม