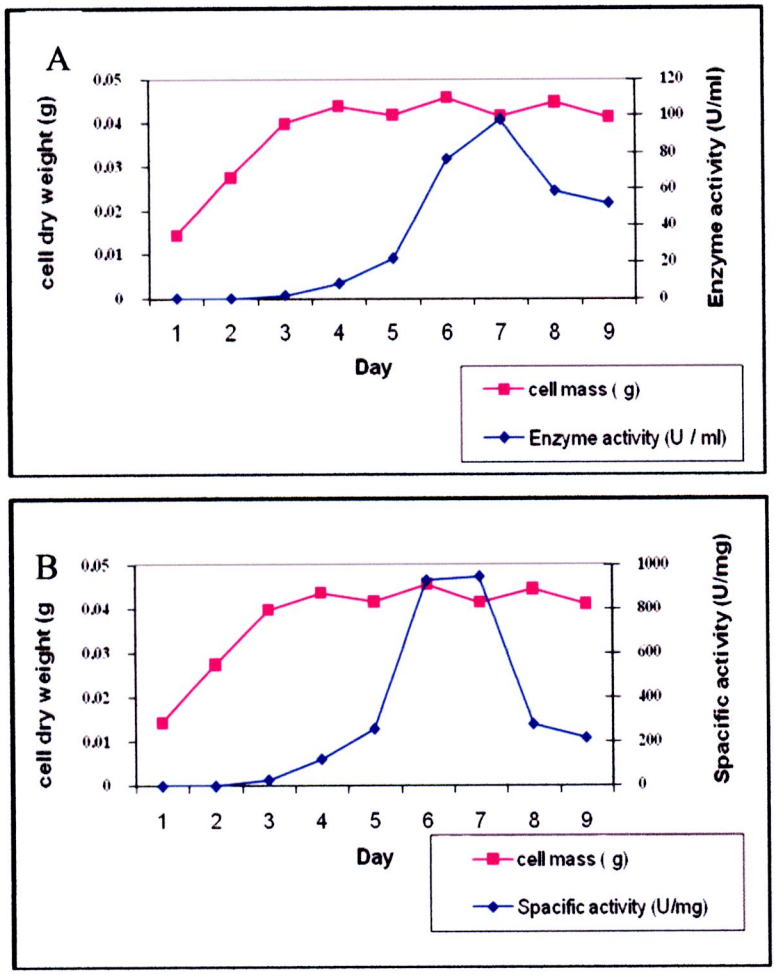
บทที่ 3
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การศึกษาลักษณะการผลิต extracellular dextranase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26

การศึกษาลักษณะการผลิต extracellular dextranase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto medium ซึ่งมี 2% dextran T2000 เป็นแหล่งต้นต่อคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30° C พบว่าวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเป็นช่วงเวลาที่เชื้อรา *Aspergillus sp.*X26 สามารถผลิต เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (dextranase)ได้สูงที่สุดคือ 110.73 U/ml มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.0455 g ต่อปริมาตร 50 ml (คิดเป็น 0.091% dried weight/volume) คิดเป็นผลผลิต 4.5% จากปริมาณ dextran ที่ใช้ (2% T 2000) ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.11 mg/ml และมี Specific activity เท่ากับ 1006.64 U/mg ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลักษณะการผลิต extracellular dextranase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto medium ซึ่งมี 2% dextran T2000 เป็นแหล่งต้นต่อคาร์บอนบ่มที่ 125 รอบ/นาที 30° C ที่เวลาต่างๆ กัน A: แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง cell mass และenzyme activity B: แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง cell mass และ specific activity ของเอนไซม์

3.2 การแยกบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากส่วนสารละลายอาหารซึ่งเป็นชนิด extracellular dextranase โดยใช้ Sephacryl S-300 ตามวิธีของ Wynter (1997) เพียงขั้นตอนเดียว ให้ค่า Specific activity เท่ากับ 3437.00 U/mg ค่า Purification fold เท่ากับ 6.07 เท่า และมีค่า recovery เท่ากับ 43.46 % ส่วนการแยกบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$ แล้วตามด้วย Sephacryl S-300 ให้ค่า Specific activity เท่ากับ 2385.34 U/mg ค่า Purification fold เท่ากับ 3.97 เท่า และมีค่า recovery เท่ากับ 32.11 % ตามลำดับดังตารางที่ 1 ซึ่งแสดงว่าการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากโดยใช้ Sephacryl S-300 ตามวิธีของ Wynter (1997) เพียงขั้นตอนเดียว ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulphate แล้วตามด้วย Sephacryl S-300 ทั้งความบริสุทธิ์และ % recovery เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Wynter (1997) ในการทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ทนร้อนจากเชื้อ *anaerobic thermophilic bacterium* Rt364 โดยใช้การดูดซับเอนไซม์บน Sephacryl S-300 แล้วชะเอนไซม์ออกด้วยสารตั้งต้น 2% dextran T10 ได้มีปริมาณเอนไซม์ 47% recovery ซึ่งมีความใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้ แต่ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto medium ซึ่งมี 2% dextran T2000 มีความบริสุทธิ์ 6 เท่า ซึ่งน้อยกว่าการแยกบริสุทธิ์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *anaerobic thermophilic bacterium* Rt364 โดยใช้ Sephacryl S-300 ซึ่งให้ความบริสุทธิ์ถึง 25 เท่า ทั้งนี้อาจเกิดจากชนิดของ จุลินทรีย์และอาหารที่ต่างกัน

ตารางที่1 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้ Sephacryl S-300

No.	Volume (ml)	Enzyme activity (U/ml)	Total unit	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification fold (fold)
1	40	107.63±5.1	4305.20±205	0.19±0.3	8.20±2.0	570.79±58	100	1
2	18.15±0.6	103.13±5.4	1872.56±160	0.03±0	0.58±0.07	3437.00±181	43.46±1.66	6.07±0.93
3	20	78.00±9.1	1560.00±182	0.11±0	2.10±0.14	747.48±137	36.17±2.50	1.33±0.34
4	19.34±0.25	71.56±8.0	1384.60±171	0.03±0	0.58±0.01	2385.34±265	32.11±2.45	3.97±0.53

หมายเหตุ : No. 1 คือ crude enzyme

No. 2 คือ แยกบริสุทธิ์โดย Sephacryl S-300 ขั้นตอนดียว

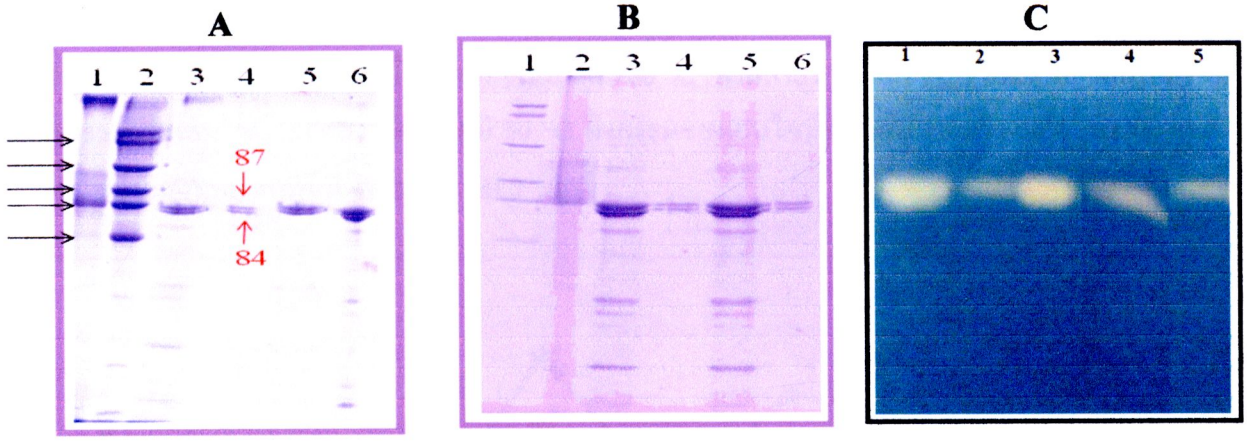
No. 3 คือ 80% $(NH_4)_2SO_4$ precipitated fraction

No. 4 คือ แยกบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ ตามด้วย Sephacryl S-300

การแยกบริสุทธิ์ โดย Sephacryl S-300 ขั้นตอนดียวนั้นใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าและผ่านขั้นตอนต่างๆ น้อยกว่าจึงยังคงทำให้กิจกรรมของ enzyme ไม่ลดลงมากนัก นอกจากนี้แล้วพบว่า enzyme dextranase ที่แยกได้จากเชื้อรา *Aspergillus sp.* X26 นั้นมีค่า specific activity มากกว่า ที่แยกได้จาก เชื้อรา *Fusarium moniliforme* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2778 U/mg (Llod,1976) Sephacryl S-300 มีโครงสร้างเป็น modified dextran จึงมีคุณสมบัติเป็น affinity chromatograghy ซึ่งทำให้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสามารถจับได้

3.3 การศึกษาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เมื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ในแต่ละวิธีและขั้นตอนต่างๆ โดยใช้ 10 % SDS-PAGE (รูปที่ 2A) และ 10% Native-PAGE (รูปที่ 2B) พบว่า การแยกบริสุทธิ์โปรตีนทุกวิธี จะปรากฏแถบโปรตีนที่เด่นชัด 2 แถบมีขนาดโมเลกุล 84 และ 87 kDa การแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Sephacryl S-300 เพียงขั้นตอนเดียวจะปรากฏแถบโปรตีนอื่นๆ น้อยกว่า การแยกด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ อย่างชัดเจน เมื่อตรวจสอบโดย Activity gel staining พบแถบกิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ที่ขนาดโมเลกุล 84-87 kDa ซึ่งไม่สามารถแยกแถบกิจกรรมออกจากกันได้ ได้ทดสอบการแยกแถบโปรตีนโดยใช้ 15% SDS-PAGE และ Activity gel staining ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน (มิได้แสดง)



รูปที่ 2 รูปแบบโปรตีนจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบบต่าง ๆ เมื่อแยกโดย 10 % SDS-PAGE , Native PAGE และ Activity gel stainning

A : SDS –PAGE : Lane1 คือ dextranase standard ; Lane 2 คือ Protein Marker ; Lane 3 คือ crude enzyme; Lane 4 คือ แยกบริสุทธิ์โดย Sephacryl S-300 ขั้นตอนดียว; Lane 5 คือ 80% $(NH_4)_2SO_4$ precipited fraction; Lane 6 คือ แยกบริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ ตามด้วย Sephacryl S-300

B : Native-PAGE: lane 1 คือ Marker; lane 2 คือ dextranase standard; lane 3 คือ crude enzyme; lane 4 คือ แยกบริสุทธิ์โดย Sephacryl S-300 ขั้นตอนเดียว ; lane 5 คือ 80% $(NH_4)_2SO_4$ precipited fraction ; lane 6 คือ แยกบริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ ตามด้วย Sephacryl S-300

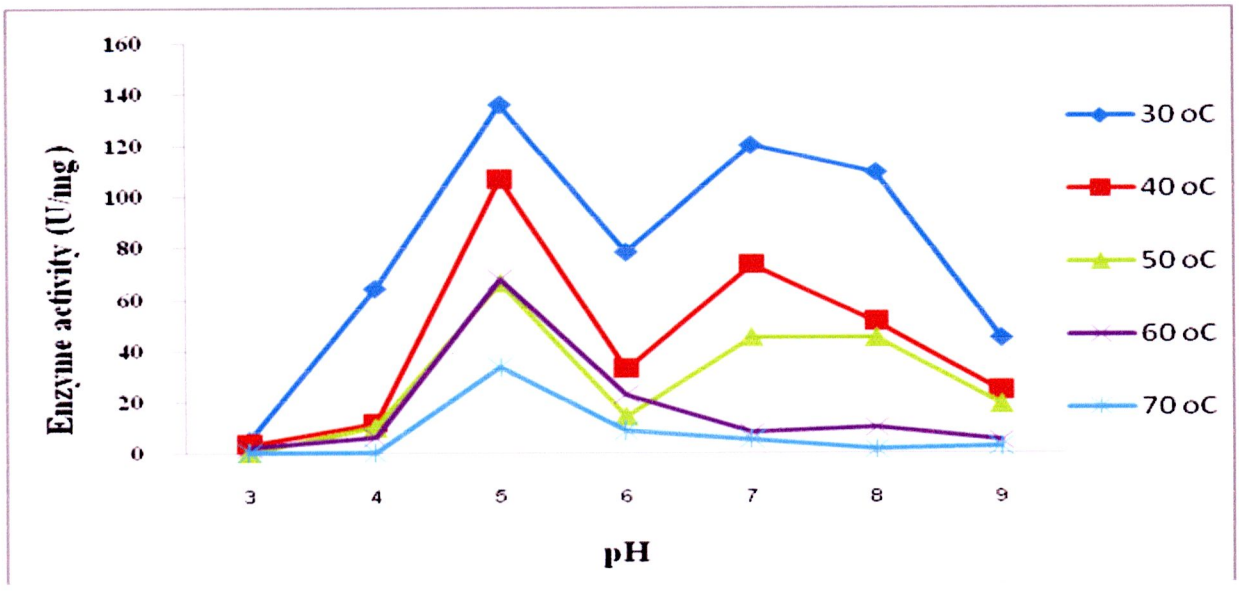
C : Activity gel staining: Lane 1 คือ dextranase standard; Lane 2 คือ crude enzyme; Lane 3 คือ แยกบริสุทธิ์โดย Sephacryl S-300 ขั้นตอนดียว; Lane 4 คือ 80% $(NH_4)_2SO_4$ precipited fraction; Lane 5 คือ แยกบริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ ตามด้วย Sephacryl S-300

ผลการทดลองบ่งชี้ว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Aspergillus sp.* X26 มี 2 isoform ขนาด 84 และ 87 kDa ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่น เช่น *Penicillium lilacinum* (Dipak, 1996) มีขนาด 26.5 kDa *Fusarium moniliforme* (Lloyd,1975) มีขนาด 39 kDa และ *Sporothrix schenckii* (Wilfred และคณะ, 1998) มีขนาด 70 kDa เป็นต้น

3.4 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

3.4.1 การศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

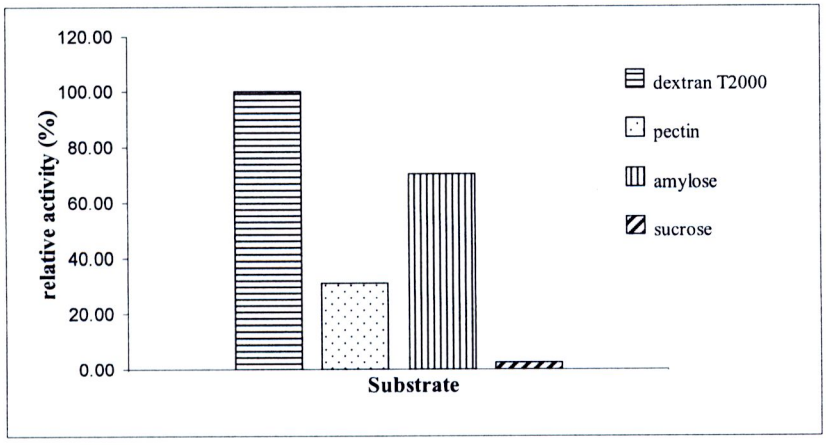
ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์สกัดหยาบ (crude dextranase) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันได้แก่ 30- 70°C ใน 0.05 M acetate buffer pH 3 -9 ผลการทดลองพบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ pH 5 และ 30 °C ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3 ที่อุณหภูมิสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ที่อุณหภูมิ 50 °C กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงมากกว่า 50% กิจกรรมของเอนไซม์จะสูงทุกอุณหภูมิที่ pH 5 และ pH 7



รูปที่ 3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสใน 0.05M Acetate buffer ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ

3.4.2 การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น

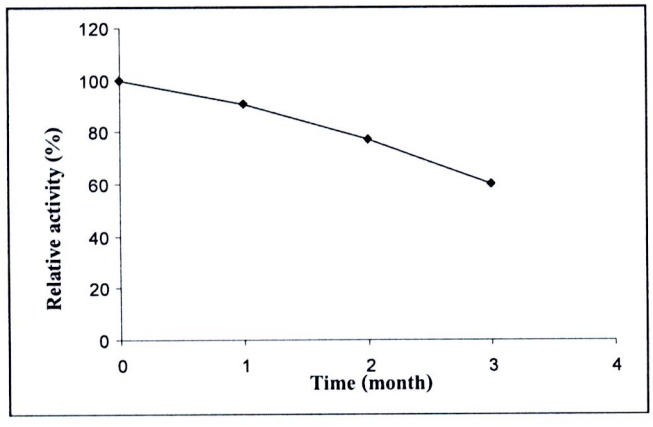
การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นใช้เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Sephacryl S-300 เพียงขั้นตอนเดียว ตามข้อ 2.4.1 ในการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ได้แก่ dextran T 2000, pectin, amylose และ sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.625% (w/v) ใน 0.05M acetate buffer pH 5 ผลการศึกษาพบว่าสามารถย่อยสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.078, 0.024, 0.055 และ 0.002 μmole/min ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 100, 31.19, 70.00 และ 2.58% relative activity ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์สามารถย่อย dextran T 2000 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นโดยตรงได้ดีที่สุด และสามารถย่อย amylose ได้ดีรองลงมา และย่อย pectin ได้พอสมควร ซึ่งเป็นผลดีในการนำไปใช้ย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยซึ่งมีแป้งและ pectin ปนอยู่ แต่ก็พบว่าสามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้เล็กน้อย คือ 0.002 μmole reducing sugar/min โดยซูโครสจะหายไปประมาณ 0.02% ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อผลผลิตน้ำตาล แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม



รูปที่ 4 แสดงความจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อสารตั้งต้นชนิดต่าง

3.4.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

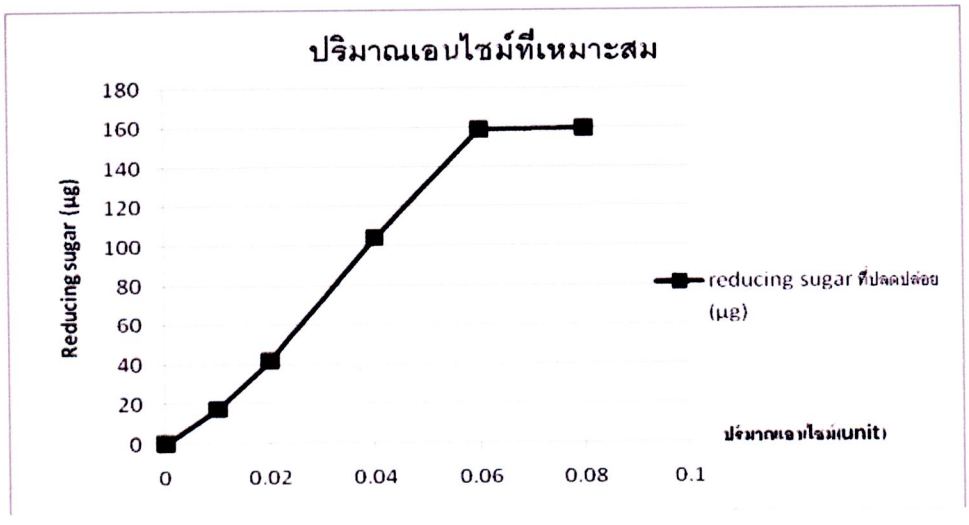
ได้ทำการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสซึ่งเป็น crude enzyme ซึ่งได้จากสารละลายในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาการเก็บที่ 4° C พบว่าการเก็บในรูปของเหลวเป็นเวลา 1, 2 และ 3 เดือน เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือ 91, 77 และ 60% ตามลำดับ ดังรูปที่ 5 ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ในรูปของเหลวค่อนข้างมีความเสถียร ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป



รูปที่ 5 แสดงความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในรูปสารละลาย crude enzyme ที่ 4° C ที่เวลาต่าง ๆ

3.5 การศึกษาการย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยโดยสารละลายเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบ (crude dextranase)

ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยโดยสารละลายเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบ (crude enzyme) ในสภาวะที่เลียนแบบในโรงงานน้ำตาลในเครือมิตรผล ในช่วงฤดูหีบสกัดอ้อยของโรงงานน้ำตาลจะพบปริมาณเดกซ์แทรนสูงสุดประมาณ 3000 ppm ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในการย่อยเดกซ์แทรน 3000 ppm ในสารละลายบัพเฟอร์ พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 0.06 unit ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 9 ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการย่อยเดกซ์แทรน เข้มข้น 3,000 ppm

ได้ทำการทดสอบการย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย โดยใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบ (crude enzyme) โดยวัดปริมาณเดกซ์แทรนที่เหลือในน้ำอ้อยที่ได้จาก Mixed juice ของกระบวนการหีบสกัดน้ำอ้อยของโรงงานน้ำตาลมิตรผล พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทนเนสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ปริมาณ 500 ppm สามารถย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยที่ 45°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้ลดปริมาณเดกซ์แทรนได้ถึง 49.98 % ในขณะที่เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (commercial dextranase) ปริมาณ 1000 ppm ของบริษัท มิตซูบิชิ สามารถลดปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยได้เพียง 23.08 % ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบสกัดหยาบในการลดปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ (ppm)	ปริมาณเดกซ์แทรนที่ตรวจพบในน้ำอ้อยตัวอย่าง (mg/100 ml)		เปอร์เซ็นต์เดกซ์แทรนที่ลดลง
	ก่อนเติมเอนไซม์	หลังเติมเอนไซม์	
Commercial dextranase (1000)	927	713	23.08
เอนไซม์จากเชื้อราไอโซเลต X26 (100)	2541	2033	19.99
เอนไซม์จากเชื้อราไอโซเลต X26 (500)	2541	1271	49.98