บทที่ 4

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสส่วนมากจะถูกชักนำโดยน้ำตาลไซโลส จากการตรวจหาเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยเชื้อ Streptomyces ซึ่งแยกได้จากดินตัวอย่างในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่ามีเชื้อ Streptomyces หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ โดยใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าวเป็นสารแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เพราะฟางข้าวเป็นวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ นอกจากนั้นยังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก หาได้ง่ายกว่าไซโลสซึ่งมีราคาแพง ในบรรดาเชื้อ Streptomyces sp. เหล่านี้ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 เป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงสุด เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ ที่แยกได้

จากการศึกษาลักษณะสำคัญต่าง ๆ ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีของ Shirling และ Gottlieb (67) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ S. arenae (70) คือเป็นเชื้อ Streptomyces sp. ที่จัดอยู่ในพวกที่สร้างสปอร์สีเทา สายสปอร์บิดเป็นเกลียว (spirales) และผิวสปอร์มีหนาม (spiny) เชื้อนี้จะสร้างเมลานอยด์พิกเมนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด ซึ่งสีของพิกเมนต์จะเข้มหรือจางขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหาร เช่น ถ้าใช้เปปโตนเป็นสารแหล่งไนโตรเจน สีจะเข้มกว่าเมื่อใช้มอลท์ เอกซแทรก และถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีโคบอลท์คลอไรด์สีจะเข้มกว่าเมื่อมีแมกนีเซียมซัลเฟต เป็นต้น

เนื่องจากเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและถูกเก็บไว้ในเซล ประกอบกับเป็นเอนไซม์ที่ทนต่อความร้อน (74) การตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลจะสามารถประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และสะดวกต่อการใช้งานด้วย จากการทดลองตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อน (45) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ทั้งนี้ดูจากการที่เซลดังกล่าวให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงกว่าเมื่อตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส การตรึงเอนไซม์นี้ทำในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ซึ่งต้องผ่านขบวนการหลายขั้นตอน ได้แก่การกรอง, การล้างเซล และการตรึงเอนไซม์เมื่อเซลอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ขั้นตอนดังกล่าวนี้อาจจะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไปบ้าง มีรายงาน

ว่า ถ้าตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีน้อยลง และยังเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วอีกด้วย (44) แต่ในการวิจัยนี้ไม่ได้ตรึงเอนไซม์ภายในเซลที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เพราะมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งถ้าทำการตรึงเอนไซม์เมื่อเซลอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลที่ได้จะไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบได้ เนื่องจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน ทำให้สภาวะในการตรึงเอนไซม์ต่างกันด้วย การตรึงเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะทำได้ต่อเมื่อทราบองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้ว

จากการศึกษาสภาวะและปัจจัยในการทำงานของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซลของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นประมาณ 100-200 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7.0 ส่วนในทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0-9.0 เอนไซม์แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามการเพิ่มของ pH โดยที่ pH 9.0 เอนไซม์จะมีแอคติวิตีต่ำกว่าที่ pH 7.0ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงเล็กน้อย ซึ่งต่างกับเอนไซม์ของ S. phaeochromogenes (35) ที่แอคติวิตีของเอนไซม์ในทริสบัฟเฟอร์ (pH 7.5-9.0) สูงกว่าที่ pH 7.0 ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่อย่างไรก็ตาม pH 7.0 ย่อมเหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์มากกว่า เพราะในสภาพที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง จะทำให้เกิดพไซโคสและสารอื่นที่ไม่ต้องการได้ (7)

มีรายงานหลายฉบับกล่าวว่า เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสต้องการ Mg^{2+} หรือ Co^{2+} ในการทำงาน และยังพบว่าถ้ามีทั้ง Mg^{2+} และ Co^{2+} รวมกันเอนไซม์จะทำงานได้ดีขึ้น Tsumura และ Sato (1) ได้รายงานว่า Co^{2+} จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จาก S. phaeochromogenes เมื่อมี Mg^{2+} อยู่ด้วย และ Co^{2+} จะช่วยให้เอนไซม์ทนความร้อนได้ดีขึ้น สำหรับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 นี้ พบว่าต้องการทั้ง Mg^{2+} และ Co^{2+} ในการทำงาน โดยจะเห็นว่าเอนไซม์แอคติวิตีมีค่าต่ำเมื่อมี Mg^{2+} หรือ Co^{2+} เพียงอย่างเดียว แต่ถ้ามีทั้ง Mg^{2+} และ Co^{2+} ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงขึ้น

เอนไซม์ของ Streptomyces sp.สายพันธุ์ 190-1 สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสด้วยอัตราเร็วสูงสุด เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จาก Streptomyces sp. (27), S. albus NRRL B-5778

(30), S. phaeochromogenes NRRL B- 3559 (35) และ S. albus YT-5 (47) เป็นต้น ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิสูงจะช่วยป้องกันการปะปนจากเชื้ออื่น แต่ก็ทำให้เกิดสีและความคงทนของเอนไซม์ต่ำลง (75) ดังนั้นถ้าจะนำเอนไซม์นี้ไปใช้ผลิตน้ำเชื่อมฟรุคโตส คงจะต้องศึกษาหาอุณหภูมิและวิธีการที่เหมาะสมในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส โดยไม่ทำให้เกิดสีและสารที่ไม่ต้องการเสียก่อน

การตรวจสอบความคงทนของเอนไซม์ต่อความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ส่วนมากจะทดสอบภายในเวลา 10 นาที (1,30,47) แต่มีรายงานบางฉบับที่ทดสอบภายในเวลา 30 นาที (42) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงใช้เวลาในการทดสอบนาน 30 นาที ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซล ไม่ได้สกัดแยกออกมาจากเซลเหมือนในรายงานฉบับอื่น ๆ จากการวิจัยพบว่า เอนไซม์ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่มีซับสเตรทและเกลือแร่ ส่วนที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีเกือบหมด

ในการปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์นั้น พบว่าสารแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์มาก ดังได้กล่าวมาแล้วว่าไซโลสบริสุทธิ์ซึ่งใช้ในการชักนำให้สร้างเอนไซม์มีราคาแพงและหายาก ในปี 1979 Chen และคณะ (32) ได้รายงานว่า S. flavogriseus สามารถสร้างเอนไซม์ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว ในการวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรต่าง ๆ เช่น ฟางข้าว, เปลือกข้าวโพด, ซังข้าวโพด และแกลบ พบว่าสารละลายดังกล่าวสามารถชักนำให้เซลสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ดี นอกจากนั้นยังพบว่า 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด สามารถชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในปริมาณค่อนข้างสูงกว่า เมื่อใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว, ซังข้าวโพด และแกลบ สำหรับปริมาณไซโลสในสารละลายเหล่านี้ควรจะต้องมีการตรวจสอบต่อไป

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าเปปโตน, โพลีเปปโตน และมอลท์ เอกซแทรก ให้การผลิตเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากมอลท์ เอกซแทรก มีราคาถูกกว่าและให้ปริมาณเซลที่มากกว่า จึงใช้ 1 % มอลท์ เอกซแทรกเป็นสารแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้ยีสต์ เอกซแทรก 0.3 % จะช่วยในการเจริญของเซลด้วย มีรายงานหลายฉบับ (21,29,31,32,43) ได้ใช้คอร์นสตีพลิเกอร์ในการผลิตเอนไซม์ ซึ่ง

ให้ผลดีมาก ทั้งนี้เพราะคอร์นสตีพลิเกอร์เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจนและพลังงาน รวมทั้งยังมีเกลือแร่บางชนิดปนอยู่ด้วย แต่ในประเทศไทยนั้นหาได้ยาก ซึ่งผู้วิจัยคิดว่าในการศึกษาต่อไปน่าจะได้มีการนำสารแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกมาทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ดูบ้าง

ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 สามารถสร้างเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $CoCl_2.6H_2O$ 0.01 % แต่การเจริญของเชื้อต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $MgSO_4$ หรือ $MnSO_4$ แสดงว่า Co^{2+} มีส่วนในการช่วยเพิ่มเอนไซม์แอคติวิตี แต่ไม่ได้ช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่า ถ้าใช้ $CoCl_2$ ปริมาณสูงถึง 0.02 % การเจริญของเชื้อจะถูกยับยั้ง จากตารางที่ 10 ในบทที่ 3 จะเห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติม Co^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} เชื้อก็สามารถผลิตเอนไซม์ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อมี Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} อยู่ในปริมาณที่เพียงพอต่อการสร้างเอนไซม์ หรือไอออนเหล่านี้ไม่จำเป็นต่อการสร้างเอนไซม์ นอกจากนั้นยังพบว่า เมื่อเติม Co^{2+} ในปริมาณที่เหมาะสมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเกือบ 3 เท่า แสดงว่าโคบอลท์มีความสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในสายพันธุ์ 190-1 Tsumura และคณะ (76) ได้รายงานไว้ว่า เซลที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มี Co^{2+} จะมีแอคติวิตีสูงกว่าเซลที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี Co^{2+} ซึ่งเขาคิดว่า Co^{2+} คงจะไปทำให้เอนไซม์ทนต่อความร้อนได้สูงขึ้น นอกจากนั้นเขายังพบว่าถ้าเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเอียงซึ่งมี Co^{2+} $5x10^{-4}$ โมลาร์ จะทำให้เชื้อดังกล่าวสามารถต่อต้าน Co^{2+} ในการยับยั้งการเจริญของเซลเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี Co^{2+} 10^{-3} โมลาร์ได้ โดยจะได้ปริมาณเซลเท่ากับเมื่อไม่ได้ใส่ Co^{2+}

จากการศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงสุด พบว่าที่ pH 8.0 เชื้อจะสร้างเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีสูงกว่าที่ pH 7.0 ประมาณ 44 % และสูงกว่าที่ pH 9.0 ประมาณ 34 % ดังนั้นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงสุด จึงประกอบด้วย 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, 1 % มอลท์ เอกซแทรก, 0.3 % ยีสต์ เอกซแทรก และ 0.01 % $CoCl_2.6H_2O$ (pH 8.0) เอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีแอคติวิตีอยู่ในช่วง 171-299 หน่วย/กรัม น.น. เซลแห้ง

จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารสูตรปรับปรุงนี้ในถังหมัก พบว่าเชื้อจะสร้างเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นช่วงที่เซลกำลังอยู่ในช่วงของการเจริญเติบโต (log phase) หลังจากชั่วโมงที่ 15 เอนไซม์แอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้อาจจะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารก็ได้ ในที่นี้ได้ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของ

เปลือกข้าวโพดเป็นสารแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองแสดงว่า อัตราเร็วในการสร้างเอนไซม์สูงกว่าการเจริญของเซล จึงทำให้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่การเจริญของเซลยังคงมีต่อไปเรื่อย ๆ (รูปที่ 20) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากสารประกอบบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเป็นต่อการสร้างเอนไซม์มีปริมาณลดลง ลักษณะเช่นนี้สามารถพบได้ในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ S. bambergiensis ATCC 13879 (71) และ S. flavovirens TKK 1 (36) ซึ่งเหตุผลอันแท้จริงน่าจะได้มีการศึกษากันต่อไป

จากการตรึงเซลโดยใช้โซเดียมอัลจิเนทนั้น ต้องใช้แคลเซียมคลอไรด์ในการทำให้เจลแข็งตัว ซึ่งแคลเซียมไอออนจะไปจับกับฟอสเฟตไอออนทำให้ตกตะกอนและยังยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อีกด้วย (72) ดังนั้นจึงใช้ทริสบัฟเฟอร์แทนโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากการศึกษาพบว่า ความต้องการ Mg^{2+} ในการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท ที่ pH 7.0 นั้น สูงกว่าที่ pH 9.0 แสดงว่าความต้องการ Mg^{2+} นั้นขึ้นอยู่กับ pH ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Barker (73) ที่รายงานไว้ว่า ที่ pH ต่ำกว่า 8.0 เอนไซม์ต้องการ Mg^{2+} ความเข้มข้น $8x10^{-3}$ โมลาร์ในการทำงานในขณะที่ pH สูงกว่า 8.0 เอนไซม์ต้องการ Mg^{2+} ในปริมาณที่ต่ำกว่า คือ $4x10^{-4}$ โมลาร์ นอกจากนี้จากการวิจัยยังพบว่า Mg^{2+}ที่ความเข้มข้นประมาณ 40 มิลลิโมลาร์ สามารถต่อต้านการยับยั้งของแคลเซียมไอออนที่มีต่อเอนไซม์แอคติวิตีได้

จากการเปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท, ไคโตแซน และเซลที่ถูกตรึงเอนไซม์โดยใช้ความร้อน พบว่าแอคติวิตีของเซลที่ถูกตรึงด้วยไคโตแซนนั้นสูงกว่าเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท แต่ต่ำกว่าเซลที่ถูกตรึงเอนไซม์โดยใช้ความร้อน เนื่องจากการวิจัยนี้ได้ศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตสแบบไม่ต่อเนื่อง คือศึกษาภายในหลอดทดลองเท่านั้นไม่ได้บรรจุลงคอลัมน์และศึกษาแบบต่อเนื่อง จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าวิธีการตรึงเซลวิธีไหนจะให้ผลดีที่สุด การวิจัยนี้เป็นเพียงแนวทางที่จะนำไปศึกษาต่อเท่านั้น

จากการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 กับรายงานของสายพันธุ์ต่างประเทศ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 กับจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม และจุลินทรีย์ที่แยกได้ในห้องทดลอง

Microorganism	Enzyme Activity (unit/g.dry cells)	Reference
Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1	171-299	-
Bacillus coagulans (Novo Industri A/S)	500	36
Actinoplanes missouriensis (Gist-Brocades NV)	1,295	36
Streptomyces albus (Miles Kali-Chemie KG)	278	36
Streptomyces flavovirens TKK 1 (Helsinki University of Technology, Finland)	1,070	36
Streptomyces flavovirens IFO 3197 (Helsinki University of Technology, Finland)	275	36
Streptomyces phaeochromogenes (Godo Shusei Co.Ltd., Tokyo, Japan)	131.8	77

จากตารางที่ 13 พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ไม่ต่ำกว่าสายพันธุ์ของต่างประเทศบางสายพันธุ์มากนัก แต่ถ้าเปรียบเทียบกับบางสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น Bacillus coagulans, Actinoplanes missouriensis และ S. flavovirens TKK 1 แล้ว ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ 190-1ยังจัดว่าค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามถ้าได้มีการนำ

สายพันธุ์ดังกล่าวนี้ไปปรับปรุงทางขบวนการกลายพันธุ์ (mutation; 78) หรือทางวิศวกรรม-พันธุศาสตร์ (Genetic Engineering; 79) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ก็อาจมีโอกาสที่จะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ดังกล่าวได้อีกหลายเท่าตัว ซึ่งสามารถที่จะนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมของประเทศไทยได้ในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย