บทที่ 4

การอภิปรายผลการวิจัย และสรุป

แหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์แบซิลลัส เพื่อผลิตแอลฟาอะไมเลส ดังนั้นเพื่อความเป็นไปได้ในแง่อุตสาหกรรม แหล่งของคาร์บอน และไนโตรเจนที่ใช้ควรจะมีราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรมสามารถผลิตวัตถุดิบประเภทแป้งจากธัญญพืช และพืชหัวจำนวนมาก เช่น แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีปริมาณคาร์บอนสูง นอกจากนั้นในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันจากพืช เช่น ถั่วเหลือง ก็จะมีกากถั่วเหลืองซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนสูงเป็นผลพลอยได้จากโรงงาน ดังนั้นทั้งแป้งมันสำปะหลังและกากถั่วเหลืองจึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ ในบรรดาแบซิลลัสต่าง ๆ 9 สายพันธุ์ที่นำมาเลี้ยงเพื่อผลิตแอลฟาอะไมเลสในสูตรอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ B. amyloliquefaciens KA 63 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งที่มีการทำงานสูงสุด ดังนั้นจึงได้เลือกแบซิลลัสสายพันธุ์นี้ ใช้ศึกษาเพื่อผลิตแอลฟาอะไมเลสในวิทยานิพนธ์นี้

1. การตรวจสอบประเภทของเอนไซม์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63

จากการตรวจสอบประเภทของเอนไซม์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 โดยวิธีของ Robyt และ French (40) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์มีทั้งกลูโคส มอลโตส และมอลโตไตรโอส จากการติดตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ระยะต่าง ๆ พบว่าเกิดมอลโตสขึ้นก่อนกลูโคส ซึ่งย่อมแสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่กลูโคอะไมเลส เพราะกลูโคอะไมเลสจะย่อยสลายโมเลกุลของแป้งจากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวส์ที่ละหนึ่งหน่วยกลูโคส ผลิตภัณฑ์ชนิดแรกที่ได้ควรจะเป็นกลูโคส และเมื่อการย่อยสมบูรณ์จะได้กลูโคสเพียงอย่างเดียว (1) และจากผลการวิจัย พบว่าเมื่อใช้เวลามากขึ้นจะสามารถตรวจพบกลูโคส แสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่เบตาอะไมเลส เพราะเบตาอะไมเลสจะย่อยสลายโมเลกุลของแป้งจากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวส์ที่ละหนึ่งหน่วยมอลโตส ดังนั้น ไม่ควรจะตรวจพบโมเลกุลของกลูโคสเลย (1) นอกจากนั้นยังตรวจพบโมเลกุลของมอลโตไตรโอสที่ทุกจุดของเวลาอีกด้วย ซึ่งเป็นข้อยืนยันได้ว่าเอนไซม์นี้เป็นแอลฟาอะไมเลส เพราะแอลฟาอะไมเลสจะไม่ว่องไวในการย่อยสลายโมเลกุลของมอลโตไตรโอสเลย (46) นอกจากนี้จากการสำรวจของ Priest G. Fergus (47) พบว่า

เอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์แบซิลลัส ส่วนใหญ่เป็นแอลฟาอะไมเลส

2. การศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการทำงานของแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63

แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียจะว่องไวในการทำงานเมื่อค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.0 ถึง 9.5 และมีค่าพีเอชเหมาะสมสำหรับการทำงานที่ 6.0 (1) ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ที่มีค่าพีเอชเหมาะสมในช่วงที่เป็นด่าง เช่น Bacillus No. A-40-2(18) มีค่าพีเอชเหมาะสมที่ 10.5 และบางชนิดมีค่าพีเอชเหมาะสมในช่วงที่เป็นกรด เช่น B. acidocaldarius (15) มีค่าพีเอชเหมาะสมที่ 3.5 สำหรับแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในงานวิจัยนี้มีค่าพีเอชเหมาะสมสำหรับการทำงานที่ 6.0 ซึ่งไม่เพียงแต่ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เท่านั้น ชนิดของบัฟเฟอร์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยจากผลการวิจัยพบว่าที่ค่าพีเอชเดียวกัน เอนไซม์มีการทำงานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ได้ดีกว่าสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานใดกล่าวถึงอิทธิพลของชนิดบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส และจากผลการวิจัย พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีอิทธิพลอย่างมากต่อการทำงานของเอนไซม์ และความเข้มข้นเหมาะสม คือ 20 มิลลิโมลาร์

แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่สูงนักเมื่อเทียบกับแบซิลลัสสายพันธุ์อื่น ถ้าจะมีการนำสายพันธุ์นี้ไปผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป น่าจะมีการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ เพราะในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ต้องใช้แอลฟาอะไมเลสทำงานที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส (48)

3. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตแอลฟาอะไมเลสของ B. amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมัก

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตแอลฟาอะไมเลสของ B. amyloliquefaciens KA 63 พบว่า เซลเข้าสู่การเจริญคงที่ที่ชั่วโมงที่ 21 ในขณะที่การผลิตเอนไซม์กำลังเข้าสู่ระยะทวีคูณ และจะคงที่ที่ชั่วโมงที่ 39 ซึ่งช้ากว่าการเจริญถึง 18 ชั่วโมง โดยทั่วไปการสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลสจะเกิดขึ้นตลอดเวลา (constitutive enzyme) แต่จะถูกควบคุมโดยสับสเตรท เช่น แป้ง (48) ได้มีการทดลองพบว่าสารที่จะควบ

คุมการสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลส์นั้นจริง ๆ แล้วไม่ใช่แป้ง แต่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง (8) จึงเป็นไปได้ที่การผลิตแอลฟาอะไมเลส์จะเป็นแบบทวีคูณ เมื่อเซลหยุดการเจริญแล้ว ซึ่งในขณะนั้นจะมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการใช้แป้งในปริมาณที่มากพอ อย่างไรก็ตามมีรายงานหลายฉบับที่สนับสนุนผลการวิจัยนี้ คือ แบคทีเรียจะผลิตแอลฟาอะไมเลส์เมื่อเซลเข้าสู่การเจริญคงที่แล้ว (1, 48) และได้มีการตั้งสมมติฐานไว้หลายข้อ เพื่อจะอธิบายผลการทดลอง ดังนี้ 1) การสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลส์อาจถูกยับยั้งโดยกระบวนการยับยั้งคะตะบอไลต์ (catabolite repression) ในช่วงที่เซลเจริญแบบทวีคูณ แต่เมื่อเซลหยุดการเจริญ สารยับยั้งเหล่านั้นถูกปลดปล่อยออกนอกเซล เป็นการเริ่มต้นการสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลส์ 2) เมสเซนเจอร์อาร์-เอ็นเอ (messenger RNA) สำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลส์มีเสถียรภาพดีกว่าเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ สำหรับสร้างองค์ประกอบของเซล 3) เป็นไปได้ว่าแอลฟาอะไมเลส์ถูกผลิตออกมาอยู่ในรูปที่ไม่ว่องไวในการทำงาน (proenzyme) และจะถูกเปลี่ยนเป็นรูปที่ว่องไวต่อการทำงานเมื่อเซลเข้าสู่การเจริญคงที่แล้ว หรือ 4) แอลฟาอะไมเลส์ถูกสร้างขึ้น และเก็บไว้ในเซล เมื่อเซลเข้าสู่การเจริญคงที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เมมเบรนของเซล ให้ปลดปล่อยแอลฟาอะไมเลส์ออกนอกเซล

ในกรณีของ B. amyloliquefaciens KA 63 นั้นจะเป็นไปตามสมมติฐานดังกล่าวข้อใดหรือไม่ ควรจะมีการศึกษาต่อไป

4. การศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลส์ โดย B. amyloliquefaciens KA 63

จากการศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลส์โดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในขวดแก้วทรงกรวย พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารในช่วง 6-8 ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ และอาหารจะมีค่าพีเอชสุดท้ายใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 8.0 - 8.5 ซึ่งสอดคล้องกับ B. licheniformis CUMC 305 (16) คือ ไม่มีความแตกต่างของการผลิตเอนไซม์เมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.5-8.0 และค่าพีเอชสุดท้ายของอาหารเท่ากัน คือ ประมาณ 8.0 อย่างไรก็ตามแบซิลส์ส่วนใหญ่จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 (12,14)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 เพื่อผลิตแอลฟาอะไมเลส์ในขวดแก้วทรงกรวย พบว่าอุณหภูมิเหมาะสม คือ 30 องศาเซลเซียส

โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการผลิตเอนไซม์จะลดลง แบซิลลัสชนิดต่าง ๆ จะสามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน โดยทั่วไปแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงจะผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงด้วย เช่น B. stearothermophilus BS-1 (17) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศา-เซลเซียส ผลิตแอลฟาอะไมเลสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลส โดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยผันแปรอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ พบว่าเมื่ออัตราการกวนเพิ่มขึ้นจะทำให้มีการเจริญ และการผลิตแอล-ฟาอะไมเลสเร็วขึ้น โดยที่อัตราการกวน 300 รอบ/นาที แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุด ในขณะที่อัตราการกวน 400 รอบ/นาที แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ได้เร็วขึ้น 8 ชั่วโมง แต่การทำงานต่ำกว่าที่อัตราการกวน 300 รอบ/นาที ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร พบว่าที่อัตราการกวน 400 รอบ/นาที จะมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารสูงสุด แสดงว่าเมื่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารสูงขึ้น จะส่งเสริมการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เร็วขึ้น แต่ไม่มีผลให้การทำงานของเอนไซม์ที่ได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามถ้าพิจารณาเวลาที่ใช้ในการหมัก และค่าใช้จ่าย อัตราการกวน 400 รอบ/นาที น่าจะเหมาะสมมากกว่าอัตราการกวน 300 รอบ/นาที เมื่อผันแปรอัตราการให้อากาศ พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ และเมื่อพิจารณาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร พบว่าไม่แตกต่างกัน แสดงว่าอัตราการกวนมีผลต่อการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารที่มีประสิทธิ-ภาพสูงกว่าอัตราการให้อากาศ

การใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท ไธโอยูเรีย (thiourea) เป็นต้น มักจะทำให้มีการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะไมเลสค่อนข้างต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีได้แก่ โพลีเปปโตน สารละลายย่อยด้วยกรดของเคซีน และถั่วเหลือง (24) ซึ่งถ้าพิจารณาในแง่ของราคาแล้ว ถั่วเหลืองน่าจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ได้มีการใช้ถั่วเหลืองในรูปแบบต่าง ๆ กัน เช่น สารสกัดจากถั่วเหลือง โดยการต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (29,49) แป้งถั่วเหลือง (5) และกากถั่วเหลืองบดละเอียด (8) จากการศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสในขวดแก้วทรงกรวย โดย B. amyloliquefaciens KA 63 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองบด และผ่านตะแกรงร่อนขนาด 20 เมช (mesh) สามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสที่มีการทำงานสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับกากรำข้าวบด และสารละลายย่อยด้วย

กรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง และกากรำข้าวเมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากัน (โดยน้ำหนัก) จากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ โดยวิธีของ Kjeldahl (45) พบว่า กากถั่วเหลืองมีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่ารำข้าวประมาณ 2 เท่า นอกจากนั้นในกากถั่วเหลืองยังมีแคลเซียมอยู่ในปริมาณมากพอสมควร (1) ซึ่งแคลเซียมมีหน้าที่ช่วยรักษาเสถียรภาพของแอลฟาอะไมเลส จากการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase)(50) และการที่เชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองในรูปผง ผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าในรูปสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันนั้น อาจเป็นไปได้ว่าการย่อยด้วยกรดกำมะถันภายใต้สภาวะรุนแรงอาจทำให้เกิดสารยับยั้งการสร้างและการทำงานของเอนไซม์

นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดย B. amyloliquefaciens KA 63 จากผลการวิจัยในขวดแก้วทรงกรวยพบว่า ปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมคือร้อยละ 4 ซึ่งเมื่อศึกษาในถังหมักขนาด 5 ลิตร ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอชของอาหารและเวลา จะเห็นว่าเมื่อมีปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 5 ค่าพีเอชสุดท้ายของอาหารจะสูงมากซึ่งอาจเป็นผลมาจากใช้ไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองนั่นเอง มีผลทำให้เซลมีการเจริญไม่ดีและในช่วงท้ายจะเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจจะแก้ไขได้โดยการเติมระบบบัฟเฟอร์ในอาหารเพื่อรักษาค่าพีเอช ซึ่งจะกล่าวต่อไป

มีรายงานว่าแป้งและไกลโคเจนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับคาร์โบไฮเดรทโมเลกุลเล็กสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตแอลฟาอะโมเลส (1,15) โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส แรมโนส (rhamnose) และมอลโตส เป็นต้น จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นระดับหนึ่ง (16) ดังนั้นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสในประเทศไทยมากที่สุด คือ แป้งมันสำปะหลัง จากการผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อของ B. amyloliquefaciens KA 63 เมื่อผลิตแอลฟาอะไมเลสในขวดแก้วทรงกรวย พบว่าการผลิตเอนไซม์เมื่อมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3 ถึงร้อยละ 9 ไม่แตกต่างกัน แต่มีการทำงานสูงกว่าเมื่อมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 1 และ 2 ซึ่งเมื่อศึกษาในถังหมักขนาด 5 ลิตรก็ได้ผลทำนองเดียวกัน เมื่อพิจารณาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือในอาหาร พบว่าจะมีปริมาณคงที่เมื่อเซลหยุดการเจริญ ในอาหารที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ

4 จะมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเหลืออยู่ในปริมาณสูงกว่าเมื่อเริ่มต้นด้วยปริมาณร้อยละ 3 ซึ่งแสดงว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3 มากเกินพอสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดย B. amyloliquefaciens KA 63

แอลฟาอะไมเลสไม่มีโคเอนไซม์ (coenzyme) แต่มีแคลเซียมทำหน้าที่เป็นโคเฟคเตอร์ในรูปของเมตัลโลโปรตีน (metalloprotein) ซึ่งอย่างน้อยที่สุดใน 1 โมเลกุลของแอลฟาอะไมเลสจะมีแคลเซียมทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง และป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติจากสภาวะรุนแรงต่าง ๆ เช่น ความร้อน กรด และเอนไซม์ย่อยโปรตีนอย่างน้อย 1 อะตอม (1,2) ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของแอลฟาอะไมเลสที่ปราศจากแคลเซียม พบว่าถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (50) นอกจากนั้นยังมีแมกนีเซียมซึ่งเป็นอิออนที่กระตุ้นการสร้างแอลฟาอะไมเลสได้เป็นอย่างดี (16) ยิ่งไปกว่านั้นอาจทำหน้าที่แทนแคลเซียมในการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ได้อีกด้วย (2) จากการศึกษาปริมาณเหมาะสมของแคลเซียมในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตแอลฟาอะไมเลสโดย B. amyloliquefaciens KA 63 พบว่าปริมาณแคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตที่ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุดคือ 0.1 และ 0.2 กรัม/ลิตรตามลำดับ โดยปกติการเติมแคลเซียมปริมาณมากน้อยนั้น น่าจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้มากกว่านี้ แต่จากผลการวิจัยพบว่าใกล้เคียงกัน เมื่อเติมแคลเซียมปริมาณน้อย ที่เป็นเช่นนี้เพราะแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือกากถั่วเหลือง ซึ่งมีแคลเซียมในปริมาณมากพอแล้ว (51) แต่เมื่อเติมแคลเซียมมากขึ้น การทำงานของเอนไซม์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับ B. licheniformis CUMC 305 (16) โดยปริมาณแคลเซียม 12.5 มก./ลิตร สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์

มีรายงานว่าฟอสเฟตเป็นอนุมูลที่กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ (1,16,28) ซึ่งจากการวิจัยนี้พบว่า ปริมาณฟอสเฟตที่เติมลงในอาหารในรูปของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต มีผลอย่างมากต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในขวดแก้วทรงกรวย โดยปริมาณเหมาะสมคือ 1.5 - 2.0 กรัม/ลิตร และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น การผลิตเอนไซม์จะลดลง

เนื่องจากค่าพีเอชของอาหารในช่วงหลังของการหมัก B. amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักมีค่าสูง และจะสูงมากขึ้นเมื่อปริมาณกากถั่วเหลืองในอาหารสูงขึ้น ในขณะเดียวกันการทำงานของเอนไซม์มีค่าลดลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่ำในสภาวะดังกล่าว

จึงได้ทดลองเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงไปในอาหาร โดยผันแปรความเข้มข้นเป็น 0 0.1 และ 0.5 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 6.0 พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ เอนไซม์จะมีการทำงานสูงสุด และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารอยู่ในช่วงแคบลง เมื่อมีสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์มีการทำงานสูงขึ้น เนื่องจากมีเสถียรภาพสูงในสารละลายบัฟเฟอร์ แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สูงขึ้น เอนไซม์จะมีการทำงานลดลง ซึ่งเมื่อพิจารณาการเจริญจะเห็นว่า การเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาณ 0.01 โมลาร์ทำให้เซลมีการเจริญต่ำกว่าที่เติมเฉพาะโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตชนิดเดียว (ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 0 โมลาร์) หรือเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ในขณะที่ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงกว่า เป็นไปได้ว่าเชื้อสามารถใช้ฟอสเฟตในรูปของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตสำหรับการเจริญได้ดีกว่าในรูปของไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แต่การเจริญสูงขึ้นไม่ได้มีผลให้ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงขึ้นด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้สนับสนุนข้อสรุปของ Windish และ Mhatre (1) ซึ่งกล่าวว่า ไม่มีความสัมพันธ์แน่นอนระหว่างการเจริญของเซลและการผลิตแอลฟาอะไมเลส สารบางชนิดกระตุ้นการเจริญได้ดี แต่การผลิตแอลฟาอะไมเลสอยู่ในอัตราต่ำมาก แต่สารบางชนิดกระตุ้นทั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์

จากการผันแปรค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ในอาหารสำหรับผลิตแอลฟาอะไมเลส โดย B. amyloliquefaciens KA 63 พบว่า ไม่แตกต่างกันระหว่างค่าพีเอชของอาหารเป็น 6 และ 7 แต่อย่างไรก็ตามสำหรับฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้ว ที่ค่าพีเอช 7.0 จะมีความเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) สูงกว่า ดังนั้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ดูจะเหมาะสมกว่าที่ค่าพีเอช 6.0 ในการเติมลงในอาหาร

5. การศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์

เป็นที่ทราบกันดีว่า แคลเซียมทำให้แอลฟาอะไมเลสมีความคงทนต่อค่าพีเอช และอุณหภูมิในช่วงกว้างกว่าเอนไซม์ที่ปราศจากแคลเซียม (2,46,52) จากการศึกษาความคงทนของแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ต่อค่าพีเอชพบว่า เอนไซม์จะไม่สูญเสียการทำงานเลย เมื่ออยู่ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.5 และมีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนั้นแคลเซียมความเข้มข้นนี้ยังช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ เมื่ออยู่ในอะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช

4.0 ซึ่งถ้าไม่มีแคลเซียมเลยเอนไซม์จะสูญเสียการทำงานเกือบทั้งหมด ในทำนองเดียวกัน เมื่อศึกษาความคงทนต่ออุณหภูมิพบว่า เอนไซม์ที่มีแคลเซียม 5 มิลลิโมลาร์ ยังคงมีการทำงานเหลืออยู่ร้อยละ 94 เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที โดยไม่มีสารละลายลับสเตรทในขณะที่เอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มีแคลเซียมสูญเสียการทำงานทั้งหมด เมื่อบ่มที่สภาวะเดียวกัน

จากการศึกษาการเตรียมแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในรูปต่าง ๆ และตรวจสอบการทำงานเมื่อเก็บไว้ 1 เดือนที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์ผงที่เตรียมโดยการตกตะกอนและเอนไซม์ระเหิดแห้งมีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพของเหลวเข้มข้นที่เตรียมโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้เข้มข้นโดยอุลตราฟิลเตรชัน อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมนั้น ขั้นตอนของอุลตราฟิลเตรชันจำเป็นมากในช่วงต้นของการผลิตด้วยวัตถุประสงค์หลายประการ คือ 1) ทำให้สารละลายเอนไซม์เข้มข้นขึ้น สะดวกสำหรับการตกตะกอนโดยตัวทำละลายอินทรีย์ และสำหรับการทำให้แห้งโดยการสเปรย์ (spray dry) 2) แยกสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เกลือ ออกจากสารละลายเอนไซม์ แต่ขั้นตอนนี้ต้องมีการพัฒนาเทคนิคเพื่อป้องกันการเกิดโพลาไรเซชัน (polarization) ที่ผิวของเมมเบรนด้วย (53)

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อาศัยหลักการซอลท์ติงเอาท์ (salting out) ของโปรตีน เป็นวิธีที่ทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น มีข้อได้เปรียบขึ้น คือ ราคาถูกละลายง่าย และช่วยป้องกันการสูญเสียธรรมชาติของโปรตีน ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นไปได้ทั้งในห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรม (53)

การตกตะกอนด้วยตัวทำลายอินทรีย์ อาศัยหลักการลดค่าคงที่ไดอิเลกตริก (dielectric constant) ซึ่งมีผลให้เอนไซม์ละลายได้น้อยลง มีข้อเสียเปรียบคือ ตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในอุตสาหกรรมที่ใช้เทคนิคนี้ ต้องลันเปลืองค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิขณะตกตะกอน นอกจากนั้นการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในโรงงานต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ เช่น เมธานอล เอธิลอีเทอร์ ไอโซโพรพานอล อะซีโตน เป็นสารไวไฟทั้งสิ้น (53)

อย่างไรก็ตามยังมีเทคนิคในการเตรียมเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมอีกมากมาย เช่น การทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporation) การทำให้แห้งบนลูกกลิ้ง (roller drying) การทำให้แห้งโดยการสเปรย์ หรือใช้เทคนิคดูดซับบนตัวดูดซับ (adsorbent) ชนิด

ต่าง ๆ เช่น อลูมินา (alumina) เซลลูโลส หรือเดกซ์ตรินที่มีประจุ หรืออาจใช้หลายเทคนิคในกระบวนการเดียวกันขึ้นอยู่กับชนิด และรูปของเอนไซม์ที่ต้องการ (53) สำหรับแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ควรจะต้องมีการศึกษาถึงเทคนิคที่เหมาะสมในการแยก และเตรียมเอนไซม์ในแง่อุตสาหกรรมต่อไป

6. สรุปและข้อเสนอแนะ

B. amyloliquefaciens KA 63 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งที่มีการทำงานสูงสุดเมื่อเทียบแบบซิลลัสต่าง ๆ 9 สายพันธุ์ และเอนไซม์ที่ผลิตได้ คือ แอลฟาอะไมเลส ซึ่งจะทำงานได้ดีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สูตรอาหารเหมาะสมสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลส โดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในขวดแก้วทรงกรวยใน 1 ลิตร ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัม, กากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมัน 40 กรัม, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 72 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้สูตรอาหารเหมือนกับการผลิตในขวดแก้วทรงกรวย แต่เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ลงไปด้วย และใช้อัตราการกวน 300 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาทีนาน 42 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เอนไซม์ที่มีการทำงาน 465.2 หน่วย/มล. เมื่อวัดความสามารถในการเพิ่มน้ำตาลรีดิวส์ และ 646.6 หน่วย/มล. เมื่อวัดความสามารถในการเดกซ์ตรินไนส์แป้ง ซึ่งสูงกว่าสภาวะที่ยังไม่ได้ปรับปรุง 9 เท่า

แอลฟาอะไมเลสที่ได้จะมีความคงทนต่อค่าพีเอช 4.0 - 8.5 โดยจะมีความคงทนสูงสุดในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์พีเอช 8.5 ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และจะมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 30 - 60 องศาเซลเซียสที่สภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 โมลาร์

แอลฟาอะไมเลสที่อยู่ในสภาวะผงและระเหิดแห้งจะมีเสถียรภาพดีกว่าที่อยู่ในสภาพของเหลวเข้มข้น โดยจะไม่สูญเสียการทำงานเลย เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 เดือน

ในขณะที่แอลฟาอะไมเลส์ที่อยู่ในสภาพของเหลวเข้มข้นมีการทำงานเหลือเพียงร้อยละ 40

อย่างไรก็ตามการผลิตแอลฟาอะไมเลส์จาก B. amyloliquefaciens KA 63 ในวิทยานิพนธ์นี้ น่าจะมีการศึกษาต่อไปเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียนี้ และปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ให้ทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงขึ้น ได้มีการใช้เทคนิคทางวิศวกรรม-พันธุศาสตร์ (genetic engineering) และการทำให้กลายพันธุ์ (mutation) เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว เช่น การฉายแสงอุลตราไวโอเลตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ B. subtilis 168 (48) ได้มิวแตนท์ (mutant) ที่สามารถผลิตแอลฟาอะไมเลส์สูงขึ้น 4 เท่า และยังผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนลดลง 4 เท่าด้วย ซึ่งก็เป็นผลดีต่อเสถียรภาพของแอล-ฟาอะไมเลส์ นอกจากการใช้แสงอุลตราไวโอเลตแล้วได้มีการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น ทูนิคามัยซิน (tunicamycin) (54) หรืออาจใช้สาร-เคมีบางชนิด เช่น เอนทีจี (N-methyl-N -nitrosoguanidine) (48,55) ได้มีการใช้เอนทีจีกับ B. subtilis ซึ่งทำให้ได้มิวแตนท์ที่มีการทำงานสูงขึ้นถึง 1,500 เท่า (48)

สำหรับการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ให้ทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นนั้น อาจใช้เทคนิคการทรานซ์ฟอร์ม (transformation) ได้มีการทรานซ์ฟอร์มยีนของ Thermophile V_2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตแอลฟาอะไมเลส์ที่ทนความร้อนได้ดี เข้าไปใน B. subtilis ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสูง แต่เอนไซม์ที่ได้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิไม่สูงนัก ทรานซ์ฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่ได้จะมีความสามารถในการผลิตสูง และเอนไซม์ที่ได้ทนความร้อนได้ดี

เทคนิคต่าง ๆ ดังกล่าวอาจนำมาใช้ B. amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเพิ่มความสามารถในการผลิต และปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ให้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงขึ้น เหมาะสมที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป