หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์ CGTase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไซโคลเดกซ์ทริน กลไกการทำงานของเอนไซม์มี 3 แบบคือ cyclization, coupling และ disproportionation แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แบซิลลัสที่เป็น neutrophilic (Pongsawasdi และ Yakisawa, 1987) และ alkalophilic bacteria (Horikoshi และคณะ, 1981 ; Nomoto และคณะ, 1986) แบคทีเรียเหล่านี้จะผลิตเอนไซม์ CGTase เมื่อมีแป้งเป็นส่วนประกอบในน้ำเลี้ยงเชื้อ การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase มีหลายวิธี ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธี starch dextrinizing activity เป็นการวัดการไฮโดรไลซ์พันธะ α-1,4-glucosidic โดยใช้ amylose เป็นสับสเตรต (Nakamura และ Horishoki, 1975) เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่เป็นวิธีที่ไม่จำเพาะต่อ CGTase เนื่องจากเอนไซม์หลายชนิด เช่น amylase และ amylolytic enzyme อื่นสามารถไฮโดรไลส์พันธะ α-1,4-glucosidic เช่นเดียวกัน จึงต้องวัดโดยวิธี CD-forming activity ซึ่งเป็นการวัด CD ที่เกิดขึ้นโดยตรงแต่ต้องใช้เวลานาน 24 ชม. และตะกอนที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากสารอื่นที่ไม่ใช่ CD ก็ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบตะกอนที่เกิดขึ้นด้วย อาจใช้วิธี TLC หรือ HPLC การแยกชนิดของ CD โดยวิธี TLC โดยใช้ micro crystalline cellulose สามารถแยก CD ชนิด α-,β- และ γ- ออกจากกันได้ดี แต่วิธีดังกล่าวใช้สำหรับตรวจหากลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส ไม่ได้ เนื่องจากสารละลายไอโอดีนไม่ให้สีกับสารเหล่านี้ วิธี HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้แยกชนิดและหาปริมาณ CD Szilasi และคณะ (1981) ได้ทำการแยก CD ออกจากกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้คอลัมน์ U Bondapak - carbohydrate โดยใช้สารละลายผสม acetonitrile:water=80:20 (โดยปริมาตร) พบว่าสามารถแยกกลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส และ มอลโตเตตระโอส ออกจากคอลัมน์ได้ก่อน α-,β- และ γ-CD ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี TLC แยกชนิดของ CD ออก

จากกันได้ดี (รูปที่ 3) และใช้ HPLC หาชนิดและปริมาณของ CD โดยใช้คอลัมน์ Supelco-NH_2 และตัวทำละลายผสม acetonitrile:water = 67:33 (โดยปริมาตร) จากการทดลอง (รูปที่ 4) พบว่าสามารถแยกชนิดต่าง ๆ ของ CD ออกจากกันได้ดี และแยกกลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส ออกจากกันได้ แต่พีคของกลูโคสแยกจากมอลโตสได้น้อย

จากการตรวจหาสายพันธุ์บาซิลลัสที่ผลิตเอนไซม์ CGTase และการสังเคราะห์ CD จากบาซิลลัส สายพันธุ์ TISTR ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย จำนวน 57 สายพันธุ์ และ Bacillus A11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I pH 7.2 อุณหภูมิ 30°ซ. แสดงในตารางที่ 1 พบว่าบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR 14 สายพันธุ์ และ Bacillus A11 มี dextrinizing activity และให้ตะกอนขุ่นขาวจากการวัดด้วยวิธี CD-TCE activity ในงานวิจัยนี้วัดแอกติวิตี้ของเอนไซม์ CGTase ทั้งสองวิธี เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษายังไม่มีการตรวจสอบว่ามีเอนไซม์อื่นซึ่งสามารถไฮโดรไลส์พันธะ α-1,4-glycosidic หรือไม่ จึงต้องวัดแอกติวิตีด้วยวิธี CD-TCE ด้วย เมื่อนำตะกอนที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณของ CD โดยวิธี TLC และ HPLC พบว่าตะกอนขุ่นขาวจากบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR ทั้ง 14 สายพันธุ์ ไม่ปรากฏจุดใดๆ บนแผ่น TLC และให้พีคของกลูโคส มอลโตส และมอลโตไตรโอส แต่ไม่มีพีคของ CD ทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี HPLC แสดงว่าตะกอนขุ่นขาวที่เกิดจากใช้ CD และบาซิลลัสสายพันธุ์ TISTR ไม่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ การที่มี dextrinizing activity อาจเป็นแอคติวิตีของเอนไซม์ amylase หรือ amylolytic enzyme อื่น อาจเนื่องมาจากสภาวะการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม ทำให้ไม่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase การปรับสภาวะต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจช่วยเหนี่ยวนำเอนไซม์ให้มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ (Starnes, 1990) จากการทดลองพบว่า Bacillus A11 ปรากฏจุดสีเหลืองใน TLC และให้พีคซึ่งตรงกับ β-CD แสดงว่า Bacillus A11 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวในการวิจัยนี้ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ที่ให้ผลิตภัณฑ์ β-CD จึงใช้ Bacillus A11 ในการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ CGTase

เมื่อทำการศึกษาหาการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ Bacillus A11 พบว่ามีการผลิต

เอนไซม์เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญสูงสุด (early stationary phase) และจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 72-120 ชม. ที่ทำการทดลองซึ่งเป็นระยะปลายของการเจริญสูงสุด (late stationary phase) โดยแอคติวิตีของเอนไซม์จะไม่ลดลงซึ่งแตกต่างจาก Bacillus circulans ซึ่ง Bergma และคณะ (1988) ได้รายงานไว้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์ CGTase ในระยะต้นของการเจริญแบบทวีคูณ (early exponential phase) และจะผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงสุดในระยะปลายของการเจริญแบบทวีคูณ หลังจากนั้น เมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดพบว่าเอนไซม์ CGTase ลดลงอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องจากมีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทดลองเติมแป้ง 0-5 กรัมเปอร์เซนต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II พบว่าเมื่อไม่มีแป้งเป็นส่วนประกอบจะมี dextrinizing activity น้อยมากหรือไม่มีเลย (รูปที่ 8) แสดงว่าเอนไซม์ CGTase เป็น inducible enzyme ผลนี้เหมือนกับที่ Bender (1981) ได้รายงานว่าแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ CGTase เมื่อมีแป้งเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และ soluble starch สามารถเหนี่ยวนำให้สร้าง CGTase และ ได้ผลิตภัณฑ์ β-CD ได้ดีกว่าแป้งข้าวเหนียว แป้งมัน-สำปะหลัง และแป้งสาลี ซึ่งแป้งต่างชนิดกัน จะมีส่วนประกอบ ของ amylose, amylopectin ในโมเลกุลต่างกัน (ตารางที่ 11) พบว่าเปอร์เซนต์ amylose และ amylopectin ไม่มีผลต่อการสร้าง CD แต่เมื่อเสริมด้วยแป้งปริมาณ 2% พบว่ามีแอคติวิตีของ CGTase สูงสุด และการเสริมแป้งสูงกว่า 2% จะไม่ทำให้แอคติวิตีสูงขึ้น เมื่อเติมแป้ง 4-5 % ทำให้ dextrinizing activity ของเอนไซม์ลดลง เช่นเดียวกับที่ Makela และคณะ (1989) ได้รายงานไว้ว่าการเติมแป้งปริมาณ 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้มีการผลิตเอนไซม์สูงสุด ถ้าเติมแป้งมากกว่า 1% จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากปริมาณแป้งที่สูงขึ้น ทำให้มี reducing sugars เกิดขึ้นซึ่งจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ลดลง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase (รูปที่ 11) พบว่า dextrinizing activity มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 60°ซ. แต่แอคติวิตีของ CGTase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40-50°ซ. ซึ่งมีรูปแบบการทำงานของเอนไซม์คล้ายกับที่ Nomoto และคณะ (1986) ได้รายงานไว้ว่า อาจเนื่องมาจากเกิดปฏิกิริยา cyclizing อย่างรวดเร็ว หรืออาจมีการ

ตารางที่ 11 สมบัติของแป้งชนิดต่าง ๆ

Starch	Type	Moisture (% by wt.)	Size(diameter) range (μm)	Amylose %(w/w)	Amylopectin %(w/w)
แป้งข้าวเจ้า (rice)	cereal	12	3-8	17	83
แป้งข้าวโพด (corn)	cereal	16	3-26	28	72
แป้งข้าวเหนียว (waxy maize)	cereal	20	3-26	0	100
แป้งมันสำปะหลัง (tapioca)	root	66	4-35	17	83
แป้งสาลี (wheat)	cereal	14	2-35	28	72

ทำงานของเอนไซม์ amylase หรือ amylolytic enzyme ทำให้มี dextrinizing activity สูง และจากการศึกษาของ Bender (1988) พบว่าโมเลกุลของเอนไซม์ CGTase เป็น subsite ที่ทำหน้าที่ cyclization และ disproportionation จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างกัน

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเริ่มจากการดูดซับโดยแป้ง พบว่าทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 11 เท่า จึงเป็นขั้นตอนที่ช่วยทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ เช่นเดียวกับที่ Lloyed และคณะ (1984) ได้รายงานว่า วิธีดูดซับเอนไซม์โดยแป้งทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์ขึ้นมาก เมื่อใช้แป้งปริมาณ 1 กรัมต่อปริมาณเอนไซม์ 10 มิลลิกรัม ที่ pH 5-9 อุณหภูมิ 0-5°ซ. แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวเจ้า สามารถดูดซับเอนไซม์ได้ดีกว่าแป้งชนิดอื่น

เมื่อนำเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนมาแยกโดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส พบว่า มีแถบปรากฏชัดเจนเพียงแถบเดียว (รูปที่ 23,lane 8) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 72,000 ดาลตัน แต่เมื่อแยกโดยดิสค์ โพลีอะไคร-ลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส เมื่อย้อมแถบโปรตีนด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R250 จะปรากฏแถบชัดเจน 2 แถบ ซึ่งตรงกับแถบเมื่อย้อมสี dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase ซึ่งเหมือนกับที่ Kitahara และคณะ (1974) ได้รายงานไว้ว่าโปรตีนทั้ง 2 แถบที่ปรากฏนี้ ซึ่งมีประจุหรือค่า pI ต่างกัน พบว่ามีแอคติวิตีของ CGTase และสามารถให้ผลิตภัณฑ์ CD

จากการแยกด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส พบว่าโปรตีนจากคอลัมน์ DEAE - cellulose ปรากฏแถบชัดเจน 2 แถบ หลังจากผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 จะปรากฏโปรตีนแถบบนเพียงแถบเดียว ส่วนแถบล่างหายไปซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตรงกับ α-amylase มาตราฐาน (MW = 57,000) (รูปที่ 24) และจากผลการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน (ตารางที่ 9) พบว่าในขั้นตอนเซฟาเด็กซ์ จี-100 dextrinizing activity และโปรตีนลดลงมาก แต่ CD-forming activity ยังสูง อาจเป็นได้ว่าการผ่านคอลัมน์นี้

สามารถแยก amylase ออกได้

จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 พบว่ามีรูปแบบของแอคติวิตีของเอนไซม์คล้ายกับการทำงานของเอนไซม์ CGTase ก่อนทำให้บริสุทธิ์ คือ มีทั้ง dextrinizing activity และ CGTase activity มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-8 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ CGTase คือ 40-50 °ซ. และ amylase คือ 60°ซ. เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่ pH 6.9 ที่ pH 4 และ 11 ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ซึ่งเหมือนกับรายงานของ Nakamura และคณะ (1974;1976) พบว่า Bacillus ATCC 21783 มีรูปแบบแอคติวิตีของ crude enzyme เหมือนกับเอนไซม์บริสุทธิ์ การเติมแคลเซียมคลอไรด์ จะช่วยทำให้ CGTase มีความเสถียรมากขึ้นเฉพาะที่ pH 5 โดยแอคติวิตีของ CGTase ที่ pH 5 จะเพิ่มจาก 60% เป็น 90% สำหรับ dextrinizing activity การเติมแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ จะช่วยให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มจาก 10% เป็น 80% และช่วยให้แอคติวิตีของเอ็นไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เพิ่มจาก 60% เป็น 85% แสดงว่า Ca^{2+} สามารถ stabilize เอนไซม์ CGTase เช่นเดียวกับรายงานของ Nakamura และ Korikoshi (1976)

จากการใช้แป้งต่างชนิดเป็นสับสเตรตของเอนไซม์ CGTase (ตารางที่ 10) พบว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์ เมื่อใช้แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และ soluble starch จะมีแอคติวิตีของ CGTase สูงกว่าแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งสาลี สำหรับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อใช้แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และ soluble starch จะให้แอคติวิตีของ CGTase สูงกว่าแป้งข้าวเจ้า และแป้งสาลี

สรุปผลการทดลอง

1. ในการตรวจหาสายพันธุ์บาซิลลัสที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ในจำนวนทั้งหมด 58 สายพันธุ์ พบว่า Bacillus A11 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้

2. การเติมแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1- 5 กรัมเปอร์เซนต์ จะเหนี่ยวนำให้ Bacillus A11 ผลิตเอนไซม์ CGTase

3. การใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว ในการเพาะเลี้ยงเชื้อทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ β-CD สูงใกล้เคียงกับ soluble starch โดยที่แป้งเหล่านี้มีส่วนประกอบเป็น amylopectin สูงกว่า amylose คือมี amylose เท่ากับ 0-28 % และ amylopectin เท่ากับ 72 - 100 %

4. สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ Bacillus A11 ให้ผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ medium II pH 9.0 อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 72 ชม.

5. จากการวิเคราะห์ชนิดของ CD ที่ได้จาก Bacillus A11โดยวิธี TLC และ HPLC พบว่าเป็น β-CD ชนิดเดียว

6. pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอคติวิตี CGTase คือ 6.0 ส่วน dextrinizing activity จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ CGTase คือ 40-50 °ซ. ส่วน dextrinizing activity จะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °ซ.

7. เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ CGTase มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการดูดซับโดยแป้ง ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80% คอลัมน์ DEAE - cellulose และคอลัมน์ sephadex G - 100 พบว่าหลังการผ่านคอลัมน์ sephadex G - 100 ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 59 เท่า yeild เท่ากับ 18 %

8. เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วนที่แยกได้เป็นโพลีเปปไตด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล

72,000 ดาลตัน โดยวิธีของเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส

9. เอนไซม์ CGTase ที่แยกได้น่าจะเป็นไอโซเอนไซม์ที่มีค่า pI ต่างกัน เมื่อทำการแยกโดยวิธีดิสค์ โพลีอะไคร์ลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส

10. เมื่อใช้แป้งข้าวเหนียว และ แป้งมันสำปะหลัง เป็นสับสเตรตของเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจะมีแอคติวิตีใกล้เคียงกับเมื่อใช้ soluble starch และสูงกว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์

11. เอนไซม์ CGTase มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง ที่pH 6-9 และอุณหภูมิต่ำกว่า 50°ซ.

12. สามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์