บทที่ 1

บทนำ

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรทที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ซึ่งได้จากการสังเคราะห์แสงที่พืชสะสมไว้ คาร์โบไฮเดรทจะต้องถูกย่อยให้อยู่ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ ที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลนี้อาจกระทำได้โดยการใช้กรดหรือเอนไซม์ การแซคคาริฟาย (saccharification) แป้งด้วยกรดนั้น จะไม่สามารถควบคุมหรือผันแปรชนิดของน้ำตาลให้ได้ตามความต้องการ แต่การนำเอนไซม์มาใช้จะทำให้สามารถควบคุมกรรมวิธีการผลิตชนิดของน้ำตาลได้ตามวัตถุประสงค์ เอนไซม์ที่ใช้กันในอุตสาหกรรมนี้ได้จากแหล่งต่างๆ กัน คือ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การผลิตเอนไซม์จากพืชและสัตว์โดยตรงมีปัญหาหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ และ ต้นทุนการผลิต จึงหันมาผลิตเอนไซม์จากแหล่งจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถผลิตได้ในปริมาณไม่จำกัด อย่างไรก็ตาม ในขบวนการแซคคาริฟายนั้น ต้องใช้ความร้อนสูง หากสามารถหลีกเลี่ยงการใช้ความร้อนในการทำให้แป้งสุก จะสามารถลดต้นทุนการผลิตลงไปได้อย่างมาก ฉะนั้น การใช้เอนไซม์ที่สามารถแซคคาริฟายแป้งได้โดยไม่ต้องใช้ความร้อน จะเป็นหนทางในการคลี่คลายปัญหานี้ได้

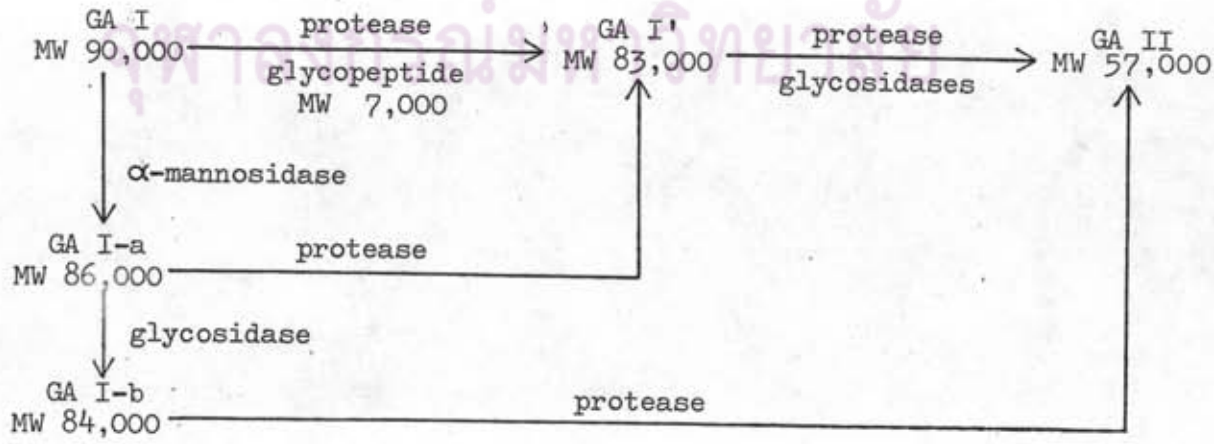
อะไมเลส (amylase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการแซคคาริฟายแป้ง สามารถย่อยโมเลกุลแป้งให้ได้เดกซ์ตริน (dextrin) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligo - saccharide) และ โมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) α-อะไมเลส (α-amylase) จะย่อยสลายแป้งที่พันธะ α-1,4 แบบสุ่ม (random) แต่จะไม่สามารถย่อยสลายที่พันธะ α-1,6 ในขณะที่ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และ พูลลูแลนเนส (pullulanase) จะย่อยสลายได้เฉพาะตำแหน่งพันธะ α-1,6 เท่านั้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ต่างๆ β-อะไมเลส (β-amylase) จะย่อยสลายพันธะ α-1,4 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) ให้ได้มอลโตส (maltose) สำหรับกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จะย่อยแป้งที่พันธะ α-1,3 1,4 และ 1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์เข้าไปทีละโมเลกุล ผลการย่อยจะได้กลูโคส (glucose) แม้ว่าอะไมเลสจะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ก็ตาม แต่ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ทุกชนิดในกลุ่มนี้จะย่อยแป้ง-

ดิบได้ ทั้งนี้เพราะการย่อยเม็ดแป้งจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีสารจำพวกเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ไขมัน (fat) อะไมโลเพคติน (amylopectin) และ โปรตีน (protein) ห่อหุ้มเม็ดแป้งไว้ (Ball และ Schwimmer, 1944) Stamberg และ Bailey (1939) รายงานว่า α-อะไมเลส สามารถย่อยแป้งสาลีดิบได้ 4-10 % ขณะที่ β-อะไมเลส ไม่มีบทบาทในการย่อยแป้งดิบ α-อะไมเลสที่สกัดจากตับอ่อนจะมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งดิบสูงกว่าที่สกัดได้จากเชื้อราถึง 20 เท่า (Sandstedt และ Gates, 1954) และ เมื่อใช้เอนไซม์สกัดจากตับอ่อนร่วมกับเอนไซม์มอลเตสซึ่งได้จากแป้งเชื้อ Aspergillus oryzae (mold bran) พบว่า การย่อยแป้งดิบเกือบจะสมบูรณ์ ได้น้ำตาลกลูโคส และ มอลโตส (Ball และ Schwimmer, 1944; Schwimmer, 1945) ในปี 1957 Ueda รายงานว่า เอนไซม์อะไมเลสจากแป้งเชื้อราดำ Aspergillus awamori var. kawachi จะมีคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบสูงกว่าอะไมเลสจากแป้งเชื้อ Aspergillus oryzae และ อะไมเลสจากข้าวมอลต์ (malt) เมื่อศึกษาเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งเชื้อราดำนี้แล้ว พบว่ามีอะไมเลสทั้งชนิดที่เป็น α-อะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส เฉพาะกลูโคอะไมเลสเท่านั้นที่ย่อยแป้งดิบแล้ว ให้กลูโคสอย่างสมบูรณ์ ส่วน α-อะไมเลสที่แยกได้จะมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบต่ำ แต่เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้รวมกันในการย่อยแป้งดิบ พบว่าแอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นกว่า 3 เท่าของผลรวมแอคติวิตีของแต่ละเอนไซม์

Hayashida (1965) รายงานว่า กลูโคอะไมเลสของแป้งเชื้อราดำ Aspergillus awamori มีอยู่ 2 รูป คือ กลูโคอะไมเลส I และ กลูโคอะไมเลส II สำหรับกลูโคอะไมเลส I จะมีคุณสมบัติในการดูดซับและย่อยแป้งดิบได้ แต่กลูโคอะไมเลส II จะขาดคุณสมบัติดังกล่าว นอกจากนี้ กลูโคอะไมเลส I ยังสามารถย่อยสลาย β-ลิมิตเดกซ์ตรินจากไกลโคเจน (β-limit dextrin from glycogen) อย่างสมบูรณ์ ได้น้ำตาลกลูโคส แสดงว่า มีค่าแอคติวิตีในการยอยพันธะ α-1,6 สูง แต่กลูโคอะไมเลส II จะมีค่าการย่อยพันธะ α-1,6 ต่ำ ค่าแอคติวิตีการย่อยพันธะ α-1,6 (debranching activity) แสดงถึงอัตราส่วนการย่อยพันธะ α-1,6 ต่อการย่อยพันธะ α-1,4 เมื่อศึกษากลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลี (Miah และ Ueda, 1977) ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยรำข้าวสาลี (Saha และ คณะ, 1979) และบนอาหารข้าวนึ่ง (Mitsue และ คณะ, 1979) ปรากฏว่า กลูโคอะไมเลส I ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวนึ่ง กลูโคอะไมเลส II และ III จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 วิธี มีแอคติวิตีกับแป้งดิบและย่อย

พันธะ α-1,6 ได้ต่ำ แต่กลูโคอะไมเลส I จากการเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวสาลีและในอาหารเหลวจะมีแอคติวิตีกับแป้งดิบ และ มีแอคติวิตีในการย่อยพันธะ α-1,6 สูง ระบบกลูโคอะ-ไมเลสของเชื้อ Rhizopus sp. (Ueda และ Kano, 1975) ประกอบด้วย กลูโคอะไมเลส I ซึ่งมีแอคติวิตีในการย่อยพันธะ α-1,6 และ มีแอคติวิตีกับแป้งดิบสูง แต่จะไม่พบคุณสมบัติเหล่านี้ในกลูโคอะไมเลส II แสดงให้เห็นว่า การย่อยแป้งดิบของกลูโคอะไมเลสไม่ได้ขึ้นกับแอคติวิตีของเอนไซม์เพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นกับคุณสมบัติการย่อยพันธะ α-1,6 อีกด้วย (Miah และ Ueda, 1977b; Ueda และ Saha, 1981)

การที่กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรามีหลายรูปแบบและมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบ เนื่องจากอิทธิพลขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ในเรื่องนี้ Hayashida (1975) ได้ประสบความสำเร็จในการสร้างอาหารเลี้ยงเชื้อ Aspergillus awamori var. kawachi ให้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเฉพาะรูปแบบ คือ กลูโคอะไมเลส I, I' และ II กลูโค-อะไมเลสทั้ง 3 ชนิดนี้ มีความแตกต่างกันในขนาดของโมเลกุล และ แอคติวิตีกับแป้งดิบไกลโคเจน และ แป้งมันฝรั่งที่ผ่านขบวนการเจลาติไนซ์ (Hayashida และ คณะ, 1976) เมื่อนำกลูโคอะไมเลส ตัดย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (proteases) และ ไกลโคซิเดส (glycosidases) จะได้กลูโคอะไมเลสแบบต่างๆ (I' และ II) ซึ่งมีแอคติวิตีกับแป้งมันฝรั่งที่ผ่านขบวนการเจลาติไนซ์ และ ไกลโคเจน แต่ไม่พบแอคติวิตีกับแป้งดิบ (Hayashida และ Yoshino, 1978) ต่อมา Yoshino และ Hayashida (1978) ได้เสนอกลไกการเกิดรูปแบบต่างๆ ของกลูโคอะไมเลสไว้ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนผังการเกิดรูปแบบต่างๆ ของกลูโคอะไมเลส

Kurishima และ คณะ (1974) สามารถแยกกลูโคอะไมเลสได้ 2 แบบ จากเชื้อ Aspergillus cinnamomeus กลูโคอะไมเลสแบบหนึ่งมีแอคติวิตีกับแป้งดิบ นอกจากนี้พบว่า กลูโคอะไมเลสของเชื้อ Mucor rouxianus ทั้ง 2 รูปแบบ มีแอคติวิตีกับแป้งดิบ แต่แบบหนึ่งมีแอคติวิตีสูงกว่าอีกแบบหนึ่งถึง 3 เท่า (Yamasaki และ คณะ, 1977)

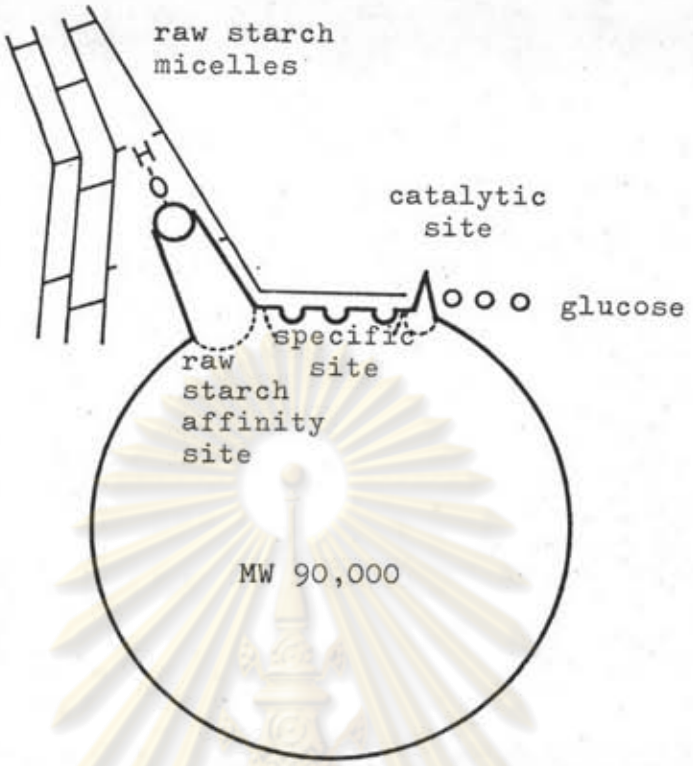
การย่อยสลายแป้งดิบของเอนไซม์อะไมเลสจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถของเอนไซม์ในการดูดซับกับเม็ดแป้งด้วย Walker และ Hope (1963) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการย่อยแป้งดิบและการดูดซับกับเม็ดแป้งของ α-อะไมเลส จะต้องเกิดขึ้นร่วมกัน α-อะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae จะย่อยแป้งดิบ และมีการดูดซับแป้งดิบได้ต่ำ แต่ α-อะไมเลสจากตับอ่อนจะย่อยและดูดซับกับแป้งดิบได้สูง (Sandstedt และ Ueda, 1969) นอกจากนี้ กลูโคอะไมเลส I ของเชื้อ Aspergillus awamori และ กลูโคอะไมเลส I ของเชื้อ Aspergillus oryzae มีแอคติวิตีกับแป้งดิบและสามารถดูดซับแป้งดิบได้ดี (Ueda และ คณะ, 1974; Miah และ Ueda, 1977b) เช่นเดียวกันกับกลูโคอะไมเลส I ของเชื้อ Rhizopus sp. และของเชื้อ Aspergillus niger ซึ่งมีแอคติวิตีกับแป้งดิบสูง ต่างก็มีความสามารถในการดูดซับกับแป้งดิบได้ดี (Ueda และ Kano, 1975; Saha และ Ueda, 1981) แต่กลูโคอะไมเลส II และ III นอกจากจะย่อยแป้งดิบได้ต่ำแล้ว ยังดูดซับกับแป้งดิบได้ต่ำเช่นกัน สำหรับ β-อะไมเลสจากบักเตรีสามารถดูดซับกับแป้งดิบได้ จึงมีการย่อยแป้งดิบได้ดี (Ueda และ Marshall, 1980) แต่ β-อะไมเลสจากพืช เนื่องจากไม่สามารถดูดซับกับแป้งดิบทำให้ขาดคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบด้วย (Sandstedt และ Ueda, 1969) ความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายและการดูดซับแป้งดิบนี้ยังซับซ้อนและไม่กระจ่างชัด แต่พอสรุปได้ว่า เอนไซม์อะไมเลสสามารถจะย่อยแป้งดิบได้ ถ้ามีการดูดซับกับเม็ดแป้ง (Ueda และ Saha, 1981; Ueda, 1981)

การใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์ย่อยแป้งอื่นๆ จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบได้สูงขึ้น Ueda และ คณะ (1974) พบว่า ในการย่อยแป้งข้าวโพดดิบชนิดแวกซี (waxy corn starch) ด้วยกลูโคอะไมเลส I หรือ II จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยให้สูงขึ้นเมื่อร่วมกับไอโซอะไมเลสของเชื้อ Pseudomonas sp. ได้ นอกจากนี้ α-อะไมเลสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบของกลูโคอะไมเลส I และ II ของเชื้อ Rhizopus sp. ได้เช่นกัน กลูโคอะไมเลส I ของ Rhizopus sp. นี้ ยังเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบได้เมื่อใช้ร่วมกับพูลลูแลนเนสของเชื้อ Aerobacter aerogenes (Ueda

และ Ohba, 1976)

กลไกการย่อยสลายแป้งดิบนั้นยังไม่เป็นที่กระจ่าง Schwimmer (1945) รายงานว่า จุดแรกที่เอนไซม์จะเข้าเกาะและย่อยสลาย คือ ไฮลัม (hilum) เพราะเป็นส่วนที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบมากที่สุด Leach และ Schoch (1961) รายงานว่า การยอมรับ (susceptibility) ของเอนไซม์กับผลึกแป้ง จะไม่มีความสัมพันธ์กับแบบเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (x-ray diffraction pattern) ของแป้งเลย ปี 1974 Shetty และคณะ ได้ศึกษาการย่อยเม็ดแป้งสาลีดิบด้วยกลูโคอะไมเลสของ Aspergillus niger และของ Rhizopus niveus ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เอนไซม์ทั้งสองแหล่งนี้จะย่อยเม็ดแป้งแตกต่างกัน โดยจะเริ่มเกาะและย่อยตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดแป้งก่อน ทำให้เกิดร่องที่กลางเม็ดขึ้น (equatorial groove) จากนั้น เอนไซม์ของ Aspergillus niger จะย่อยเม็ดแป้งเป็นหลุมลึกกระจายอยู่ทั่วเม็ดแป้ง และย่อยเข้าไปเป็นโพรงตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางเม็ด ส่วนเอนไซม์ของ Rhizopus niveus จะย่อยสลายเม็ดแป้งเป็นหลุมเล็กละเอียดคล้ายผิวฟองน้ำไปทั้งเม็ด การทดลองต่อมาของ Smith และ Linback (1976) ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน Hayashida และคณะ (1982) ได้เสนอว่า บนโมเลกุลของกลูโคอะไมเลสจะประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญในการย่อยแป้งดิบ ซึ่งจะขาดส่วนใดส่วนหนึ่งไม่ได้ คือ ส่วนดูดซับกับแป้งดิบ (adsorbtion site) และ ส่วนที่ทำหน้าที่ย่อยแป้ง (catalytic site) โดยมีแบบจำลองของกลูโคอะไมเลส ดังแสดงในรูปที่ 2

ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์นั้น มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่หลายประการ ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะทางเคมีฟิสิกัลที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และ คุณสมบัติของจุลินทรีย์นั้นๆ (Fenniksova, 1957) การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเหมาะสมที่จะใช้กับการผลิตเอนไซม์ (Hesseltine, 1977) เนื่องจากสภาวะในการเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์เจริญไปตามสภาพที่ควรจะเป็นในธรรมชาติ นอกจากนี้ ผลิตผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร สามารถจะนำมาเป็นแหล่งอาหารได้ Nagai (1979) กล่าวว่า การควบคุมขนาด รูปร่างของอนุภาคสารอาหาร และ ความชื้นเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อ นี้จะมีความสำคัญเป็นอันดับต้นในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ปัจจัยสำคัญที่ต้องควบคุมในอันดับต่อมา คือ ความชื้นและอุณหภูมิของอากาศที่ให้ การกวนหรือการพลิกกลับ ตลอดจนปริมาณเชื้อที่ปลูกลงไป สำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตอะไมเลสนั้น อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตต้องประกอบด้วย



รูปที่ 2 แบบจำลองแสดงกลไกการย่อยแป้งดิบของกลูโคอะไมเลส I (Flor, 1983)

ชาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ สารที่เป็นตัวนำในการสังเคราะห์เอนไซม์ ความสมดุลของชาตุอาหาร ระดับพีเอชที่เอื้ออำนวยต่อการผลิตเอนไซม์ และ มีสารที่เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์ด้วย (Hockenhull, 1967) ในปี 1975 Hayashida ใช้สารอาหารทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และ เกลือแร่ มาควบคุมการผลิตกลูโคอะไมเลสแบบต่างๆ เช่นเดียวกับ การเลี้ยงเชื้อ Aspergillus oryzae บนรำข้าวสาลี (Miah และ Ueda, 1977) และบนข้าวนึ่ง (Mitsue และ คณะ, 1979) ซึ่งไม่เพียงแต่จะผลิตกลูโคอะไมเลสที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งแตกต่างกันเท่านั้น คุณสมบัติอื่นๆ ของเอนไซม์ก็แตกต่างออกไปอีกอย่างสิ้นเชิง Pichyangkura และ คณะ (1981) ผลิต α-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสจากการเลี้ยงเชื้อ Aspergillus oryzae บนเมล็ดข้าวไทยชนิดต่างๆ พบว่า การแช่ข้าวก่อนการหมักและการคัดเลือกพันธุ์ข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ Raimbault และ Alazard (1980) รายงานว่า ความชื้น 40-50%

มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างแล้วจะขับออกนอกเซล ดังนั้นในการเตรียมเอนไซม์จึงต้องมีขั้นตอนในการสกัดแยกเอาเซลหรือเส้นใยออกจากส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ แต่สำหรับการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งแล้ว การสกัดเอนไซม์ออกโดยการแช่แป้งเชื้อในน้ำหรือบัฟเฟอร์ที่พีเอช 3.0-5.5 จะรักษาคุณสมบัติของเอนไซม์ และ ป้องกันการเน่าเสียเนื่องจากบักเตรีและราที่เกิดขึ้น (Hockenhull, 1967) การทำกลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์ อาจทำโดยนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Phillips และ Caldwell, 1951; Vongsuvanlert, 1983) อะซิโตนที่อุณหภูมิต่ำๆ (Krzechowska และ Urbanek 1975) หรือ รีวานอล (rivanol; Miah และ Ueda, 1977) แล้วนำไปกรองผ่านคอลัมน์ของโครมาโตกราฟีชนิดต่างๆ ซึ่งขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นี้จะแตกต่างกันไป Medda และ คณะ (1982) ได้ตกตะกอนกลูโคอะไมเลสของราดำ Aspergillus ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 80% และตกตะกอนซ้ำด้วยเอธานอล ก่อนที่จะผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส เมื่อชะเอนไซม์ออกด้วยบัฟเฟอร์ที่ปรับพีเอชเป็น 4.2 แล้วนำเอนไซม์ไปทำไอโซอิเล็กทริคโฟกัสซิง (isoelectric focusing) แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-200 อีก 2 ครั้ง กลูโคอะไมเลสที่ได้เป็นชนิดที่ I มีความบริสุทธิ์สูงกว่า 4 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้น คิดเป็นเอนไซม์ 7.4 % เอนไซม์อยู่ในภาวะเอกพันธ์ Miah และ Ueda (1977) ได้ทำกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 80% รีวานอล และ เอธานอล แล้วผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-25 ชะออกด้วยบัฟเฟอร์ที่เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ และผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-25 อีกครั้งหนึ่ง จะได้กลูโคอะไมเลส 3 ชนิด นำกลูโคอะไมเลส I ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ของไฮดรอกซีอะเพไทต์ (hydroxyapetite) แล้วชะออกด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แบบเส้นตรงที่ 0.01-0.05 โมลาร์ ผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-200 อีก 2 ครั้ง ส่วนกลูโคอะไมเลส II และ III นำไปผ่านคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-200 จำนวน 2 ครั้ง กลูโคอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดจะมีความบริสุทธิ์เป็น 10, 30 และ 32 เท่าตามลำดับ คิดเป็นเอนไซม์ที่เหลืออยู่ 0.49, 1.56 และ 2.91 % ตามลำดับ ผลจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel electrophoresis) ได้โปรตีน

แถบเดียว เช่นเดียวกับกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Rhizopus oryzae (ไกรฤกษ์,2526) ซึ่งตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 40-80% แล้วผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ของซีเอม-เซฟาเดกซ์ ซี-50 ชะเอนไซม์ออกด้วยโซเดียมคลอไรด์แบบเกรเดียนท์เส้นตรง 0-0.5 โมลาร์ และผ่านลงในคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-200 สามารถแยกกลูโคอะไมเลส I, II และ III ซึ่งมีค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) เพิ่มขึ้น 254, 204 และ 205 เท่าของเอนไซม์ที่เตรียมได้ตามลำดับ คิดเป็นเอนไซม์ 10.3, 5.9 และ 7.0 % ตามลำดับ ส่วน Ueda และ คณะ (1974) ได้ทำกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus awamori ให้บริสุทธิ์ด้วยการปรับพีเอชให้เป็น 2.2 เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °ซ เพื่อกำจัด α-อะไมเลส แล้วนำเอนไซม์ไปกวนให้ดูดซับกับแป้งดิบ ซึ่งชะออกด้วยบัฟเฟอร์ที่ปรับพีเอชให้เป็นกลาง (7.6) กับ อีกส่วนที่ไม่มีการดูดซับ ผ่านเอนไซม์ที่ดูดซับกับแป้งดิบลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส ชะเอนไซม์ออกด้วยบัฟเฟอร์ที่เปลี่ยนแปลงพีเอช 8.2-4.2 จะได้กลูโคอะไมเลส ที่มีแอคติวิตีกับแป้งดิบ และ มีแอคติวิตีในการย่อยพันธะ α-1,6 สูง ส่วนเอนไซม์ที่ไม่ดูดซับกับแป้งดิบ เมื่อผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลสและชะออกด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 8.2 จะเป็นกลูโคอะไมเลส II กลูโคอะไมเลส I และ II จะมีความบริสุทธิ์กว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้ 87.7 และ 42.9 เท่าตามลำดับ คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหลือ 0.29 และ 0.36 % ตามลำดับ Hayashida (1975) ได้อาศัยการปรับพีเอชของเอนไซม์ที่เตรียมได้เป็น 2.4 ทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมงที่ 4 °ซ แล้วปรับพีเอชเป็น 9.0 ในเวลาและอุณหภูมิเดียวกัน เพื่อกำจัด α-อะไมเลสและโปรติเอสก่อนจะดำเนินขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์อื่นต่อไป

กลูโคอะไมเลสจากเชื้อราชนิดต่างๆ จะแสดงคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป ดังรวบรวมแสดงไว้ในตารางที่ 1 ความแตกต่างนี้จะปรากฏทั้งในระดับวงศ์และชนิด ซึ่งอิทธิพลของการเลี้ยงเชื้อจะเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่จะกำหนดรูปแบบและคุณสมบัติของเอนไซม์ได้ กลูโคอะไมเลสมีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งอยู่ในช่วงกรด (พีเอช 4.5-5.0) และมีเสถียรภาพในพีเอชที่เป็นกรดจนถึงพีเอชที่เป็นกลาง เสถียรภาพนี้จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาพพีเอชต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน (Reilly,1979) นอกจากนี้ ยังมีรายงานหลายฉบับแสดงว่า พีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งละลายน้ำสุก (boiled soluble starch) และ แป้งดิบของกลูโคอะไมเลสจะแตกต่างกัน (Medda และ คณะ, 1982; Saha และ Ueda,1983; Ueda และ Saha,1983) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสม

จุลินทรีย์	รูปแบบของกลูโคอะไมเลส	น้ำหนักโมเลกุล	พีเอชที่เหมาะสม	พีเอชที่มีเสถียรภาพ	อุณหภูมิที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่มีเสถียรภาพ	จุดไอโซอิเล็กทริก	K_m มก./มล.	เอกลักษณ์ในการย่อยพันธะ α-1,6	การย่อยแป้งดิบ	เอกสารอ้างอิง
A.awamori	I	88,000	4.5	5.0-9.0	60	50	3.7			+	Yamasaki และ คณะ, 1977
A.awamori	I	90,000	3.8	2.0-10.0		60	3.55			+	Yoshino และ Hayashida, 1978
var. kawachi	II	83,000	3.8	2.5-8.5			3.45			-	
	III	57,000	4.0	4.0-7.0			3.28			-	
A.oryzae	I	87,000	5.0-6.0	5.5-7.0	60	40	3.6	0.9	0.60	+	Saha และ คณะ, 1979
A.oryzae	I	90,000	4.5	5.0-6.0	60	40	3.6	0.5	0.23	-	Mitsue และคณะ, 1979
	II	67,000	4.5	5.0-6.0	50	40	3.5	0.48	0.23	-	
	III	54,000	4.5	5.0-6.0	50	40	3.5	0.48	0.28	-	
A.oryzae	I	76,000	4.5	4.0-7.0	60	40	5.6	13.3	0.80	+	Miah และ Ueda, 1977
	II	38,000	4.5	4.0-7.0	50	40	5.6	6.25	0.43	-	
	III	38,000	4.5	4.0-7.0	40	50	5.6	1.1	0.32	-	
A.niger			4.5	4.0-5.0	60	40	3.4		0.56	+	Medda และ คณะ, 1982
C.charticola		69,000	5.4		60						Krzechowska และ Urbanek, 1975
P.oxalicum	I	84,000	5.0	3.0-6.5	55-60	55	7.0			+	Yamasaki และ คณะ, 1977
	II	86,000	4.5	3.0-6.5	60	55	7.45			+	
R.oryzae	I		5.5	3.5-6.0	50	50		0.37			ไกรฤกษ์, 2526
	II		5.5	4.0-6.0	50	50		3.33			
	III		4.5	4.0-4.5	50	50		1.43			
M.rouxianus	I	59,000	4.6	4.0-8.0	55	50	8.4			+	Yamasaki และ คณะ, 1977
	II	49,000	5.0	4.0-7.5	55	50	8.4			+	
E.fibuligera	I	40,000	5.5				6.5	20.0	0.63	+	Ueda และ Saha, 1983

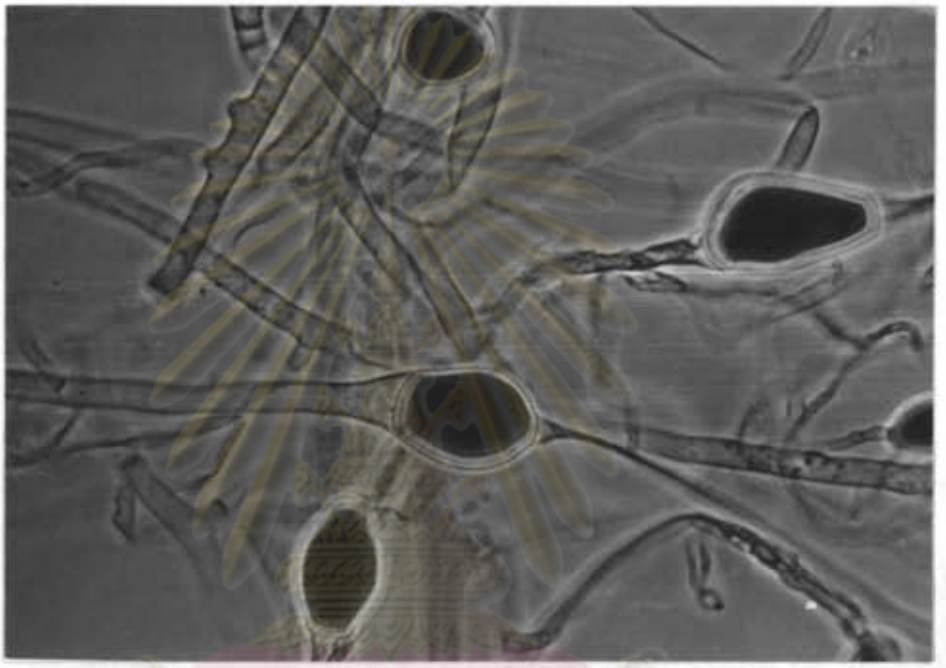
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของกลูโคอะไมเลสของจุลินทรีย์แหล่งต่างๆ

ในการย่อยแป้งของกลูโคอะไมเลสอยู่ในระหว่าง 40-60 °ซ และเอนไซม์จะมีเสถียรภาพดีเมื่ออุณหภูมิไม่เกิน 40 °ซ กลูโคอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 26,850-120,000 เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรทเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 5-20 % พบน้ำตาลแมนโนส (mannose) กลูโคส และ กาแลคโตส (galactose) เป็นส่วนใหญ่ อาจพบที่เป็นกลูโคซามีน (glucosamine) บ้าง (Pazur และ Okada, 1967; Yamasaki และ คณะ, 1977) มักจะพบกรดอะมิโนชนิดซีรีน (serine) ธรีโอนีน (threonine) กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) และ อะลานีน (alanine) เป็นองค์ประกอบอยู่มาก (Reilly, 1979)

การศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งดิบนี้ มีผู้ศึกษาและตีพิมพ์ผลงานไม่มากนัก กลูโคอะไมเลสจากแหล่งจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ Aspergillus awamori(Yamasaki และ คณะ, 1977b) Aspergillus oryzae (Mish และ Ueda, 1977b) Penicillium oxalicum (Yamasaki และ คณะ, 1977a) Cephalosporium charticola Lindau (Krzechowska และ Urbanek, 1975) Rhizopus sp. (Ueda และ Kano, 1975) Mucor rouxianus (Yamasaki และ คณะ, 1977c) และ Endomycopsis fibuligera (Ueda และ Saha, 1983) มีรายงานว่า สามารถดูดซับและย่อยแป้งดิบได้ แต่กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา Amylomyces sp. นี้ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาการย่อยแป้งดิบมาก่อน ฉะนั้น ในการศึกษานี้ได้คัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีส สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้สูง จากลูกแป้งที่ใช้ในประเทศไทย แล้วนำมาศึกษาสภาพการเจริญเติบโตของราบนอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว ตลอดจนสกัดแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อศึกษาคุณสมบัติต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 เชื้อ Amylomyces sp. (400x) แสดงให้เห็น chlamydospore ขนาดใหญ่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย