บทที่ 3

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

1. การแยกคัดเชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ลินามาเรส

จากการนำหัวมันสำปะหลังสด ที่สับและหมักในสภาวะกึ่งไร้อากาศ เป็นเวลา 1-3 วัน แล้วนำมาแยกยีสต์บริสุทธิ์ได้ 131 สายพันธุ์ ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์จากมันสำปะหลังหมัก เนื่องจากในมันสำปะหลังจะมีสารไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ลินามาริน ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ลินามาเรส เชื้อที่สามารถเจริญได้บนมันสำปะหลัง จึงอาจจะมีการสร้างเอนไซม์ลินามาเรส และสามารถทนสภาวะที่มีไซยาไนด์สูงได้ แต่อย่างไรก็ตาม มีสภาวะอีกหลายอย่างที่สนับสนุนให้ยีสต์เจริญได้โดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์ลินามาเรส เนราะเชื้อที่ขึ้นบนมันหมักนั้นจะเป็นจุลชีนหลายชนิดขึ้นปนกัน (mixed culture) (Okafor และคณะ,1985) ผลผลิตบางอย่างจากจุลชีพบางชนิดอาจมีผลต่อการเจริญของยีสต์บางสายพันธุ์ได้

เนื่องจากลินามาเรสเป็นเบต้า-กลูโคซิเดสชนิดหนึ่ง จึงทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเบต้า-กลูโคซิเดสก่อน โดยใช้ 1% PNPG ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 2 PNPG เป็นสับสเตรทสังเคราะห์ที่มีพาราไนโตรฟีนอล เกาะกับกลูโคสด้วยพันธะเบต้า เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่เชื้อผลิตขึ้น จะย่อยพันธะเบต้า ทำให้กลูโคสหลุดออก และได้พาราไนโตรฟีนอลอิสระ ซึ่งจะให้สีเหลืองรอบโคโลนียีสต์ ดังรูปที่ 1 จากการทดลองคัดเลือกเชื้อยีสต์ทั้ง 131 สายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อที่ผลิตเบต้า-กลูโคซิเดส 101 สายพันธุ์

จากรายงานของ Oke (1966), Okafor (1977) และ Ejiofor & okafor, 1981 พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสจากจุลชีพจะถูกผลิตได้ เมื่อมีการชักนำด้วยลินามาริน ดังนั้นจึงทดลองเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแล้วว่ามีการสร้าง เบต้า-กลูโคซิเดสทั้ง 101 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวซาเพคคอกซ์ที่มีการเติมลินามารินสกัด 0.05% เทียบกับเมื่อไม่มีการเติมลินามาริน แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ปรากฏว่าไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่เมื่อนำเซลยีสต์ไปทำให้แตกโดยใช้เครื่องคลื่นเสียงสูง (Sonicator) จึงพบแอคติวิตีของลินามาเรสจากเชื้อบางสายพันธุ์ แสดงว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์นี้เป็นเอนไซม์ที่สร้างอยู่ภายในเซล หรืออาจเป็นเอนไซม์ที่เกาะติดอยู่กับเซลเมมเบรนของเชื้อซึ่งต่างจากลินามาเรสในเชื้อรา F. equiseti และ A. sydowi (Ikediobi และ

รูปที่ 1 แสดงการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส บนอาหารแข็งที่ฉาบด้วย 1% PNPG สีเหลืองที่เกิดขึ้นรอบโคโลนียีสต์ คือสารพาราไนโตรฟีนอลที่ถูกย่อยออกมาจาก PNPG โดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากยีสต์

คณะ,1985 และ Ikediobi และคณะ,1987) และในแบคทีเรีย L. mesenteroides (Okafor และEjoifor, 1985) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ขับออกมาภายนอกเซล (extracellular enzyme)

จากการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตลินามาเรส ในอาหารเหลวซาเนคดอกซ์ที่มีการเติมและไม่เติมลินามาริน ได้ผลดังตารางที่ 1 พบว่ามีเชื้อยีสต์ 42 สายพันธุ์ ซึ่งสร้างลินามาเรส ได้เมื่อกระตุ้นด้วยลินามาริน ซึ่งในจำนวนนี้มี 12 สายพันธุ์ที่สร้างลินามาเรสได้โดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยลินามาริน แสดงว่าเชื้อยีสต์มีการสร้างเอนไซม์นี้อยู่แล้ว แต่แอคติวิตีที่ได้ จะต่ำกว่าเมื่อกระตุ้นด้วยลินามาริน แสดงว่าลินามารินมีผลในการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ให้สูงขึ้นได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Ikediobi และคณะ (1985), Padmaja & Balagopal, (1985)และ Abalaka & Garba (1989) ยกเว้นเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ซึ่งให้แอคติวิตี ของเอนไซม์ในสภาวะที่มีและไม่มีลินามารินใกล้เคียงกันแสดงว่าเอนไซม์จากยีสต์สายพันธุ์นี้อาจเป็น Constitutive enzyme แต่ควรมีการทดลองเพื่อสนับสนุนให้มากกว่านี้

เนื่องจากลินามารินเป็นสารที่มีราคาแพง จึงต้องการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างลินามาเรสได้ในสภาวะที่ไม่ต้องมีลินามารินกระตุ้น โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง 12 สายพันธุ์ ที่สร้างลินามาเรสในสภาวะที่ไม่มีลินามารินกระตุ้น ในอาหารเหลวซาเนคดอกซ์ เทียบกับอาหารเหลว YM ที่ไม่มีการเติมลินามาริน แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่าเชื้อยีสต์ทุกตัวที่ทำการศึกษาจะมีการสร้างลินามาเรสใน YM ได้สูงกว่าซาเนคดอกซ์ ทั้งที่มีการเติม และไม่เติมลินามาริน โดยที่เชื้อ B-1-14 จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด จึงเลือกอาหารเหลว YM ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงสายพันธุ์ยีสต์ ที่มีการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสในอาหารเหลวซาเบคดอกซ์ ที่มีการเติมและไม่เติมลินามาริน 0.05% เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลินามารินสกัดที่ทำให้บริสุทธิขึ้น(ภาคผนวก ค ข้อ 2) เป็นสับสเตรทในการวัดแอคติวิตี

เชื้อ	ลินามาเรสแอคติวิตี ($x10^{-2}$ หน่วยต่อกรัมเซลเปียก) +ลินามาริน	-ลินามาริน	เชื้อ	ลินามาเรสแอคติวิตี ($x10^{-2}$ หน่วยต่อกรัมเซลเปียก) +ลินามาริน	-ลินามาริน
B-1-12	9.8	1.1	S-1-7	0.4	0
B-1-14	16.7	15	S-1-9	2.4	0
B-1-16	11.5	0	S-1-19	7.8	0
B-1-17	10.6	2.5	S-2-1	2.4	2.6
B-1-18	2.1	0	S-2-2	12.1	0
B-1-22	12.1	2.8	S-2-6	5.0	0
B-1-36	4.0	0	S-2-7	4.0	1.0
B-1-37	8.0	0	S-2-8	7.8	2.5
B-1-41	8.7	0	S-2-9	5.0	0
B-2-1	23.8	0	S-2-10	4.0	0
B-2-2	4.0	0	S-2-16	4.2	1.8
B-2-4	29.4	2.2	S-2-18	15.0	0
B-2-5	5.0	0	S-2-19	7.5	0
B-2-6	12.1	0	S-3-4	12.3	0.9
F.52	7.5	0	S-3-15	11.8	0
F.55	3.0	0	S-3-16	12.3	0
S-4-14	2.0	0	S-3-18	10.3	7.2
S-4-16	2.0	0	S-4-1	6.0	0.7
S-4-18	2.0	0	S-4-4	3.0	0
S-4-22	4.0	0	S-4-9	3.0	0
S-4-27	3.0	0	S-4-13	2.7	0

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ลินามาเรสในอาหารเหลว 2 ชนิด คือ YM และซาเพคดอกซ์ที่ไม่มีลินามาริน เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ลินามารินสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น (ภาคผนวก ค ข้อ 2) เป็นสับสเตรทในการวัดแอคติวิตี

เชื้อ	ลินามาเรสแอคติวิตี ($x10^{-2}$ หน่วยต่อกรัมเซลเปียก)	
	YM	ซาเพคดอกซ์
B-1-12	37	1.1
B-1-14	48	15
B-1-17	34	2.5
B-1-22	20	2.8
B-2-4	33	2.2
S-2-1	37	2.6
S-2-7	40	1.0
S-2-8	10	2.5
S-2-16	36	1.8
S-3-4	5	0.9
S-3-18	18	7.2
S-4-1	23	0.7

I 10311A5b

2. ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 เพื่อผลิตเอนไซม์ลินามาเรส

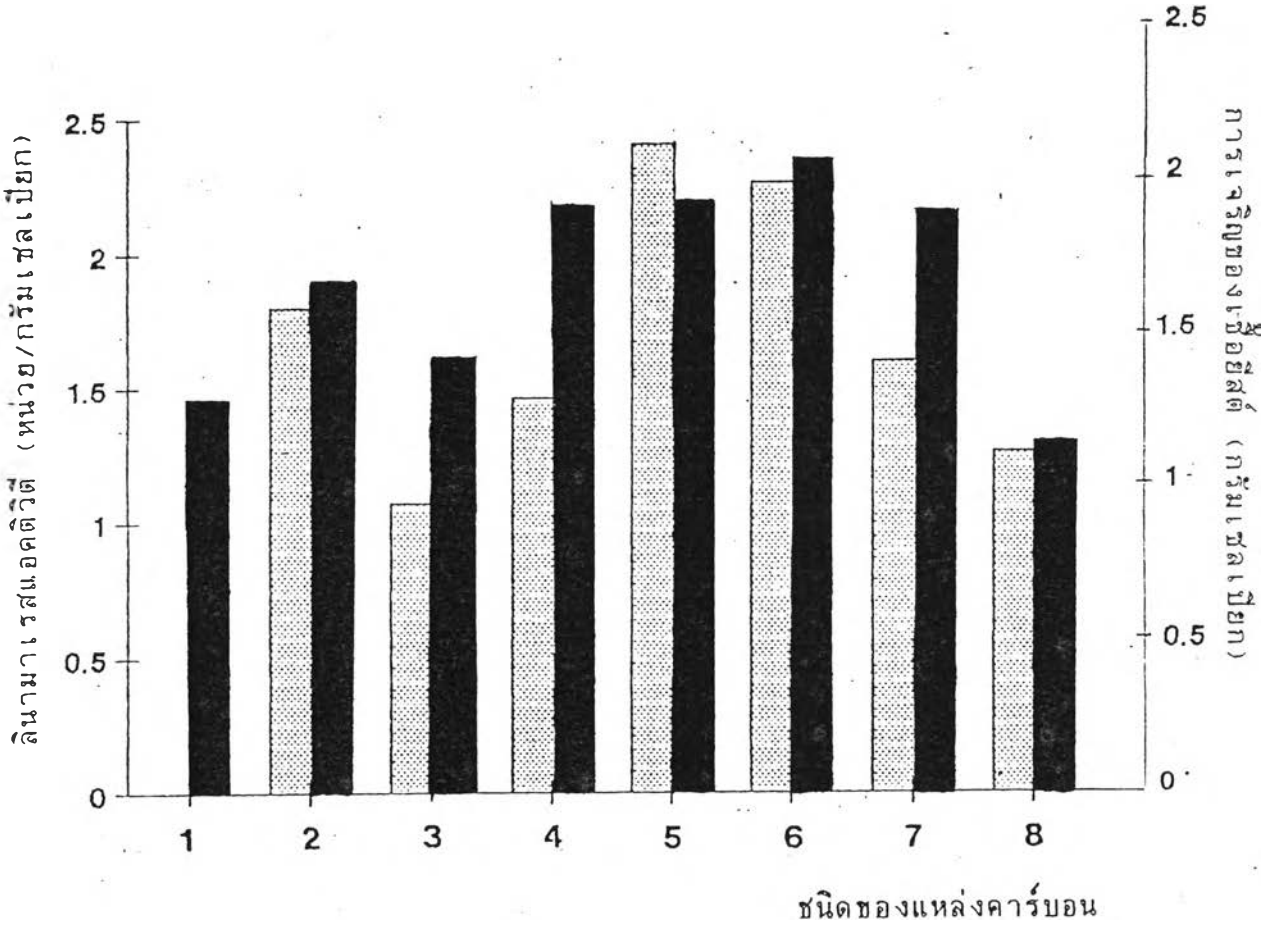
2.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากการนำสายพันธุ์ยีสต์ B-1-14 ที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีการแปรผัน 1% ของแหล่งคาร์บอนต่างชนิด คือกาแลคโตส มอลโตส แลคโตส ซูโครส กลูโคส เซลโลไบโอส และฟรุกโตส พบว่าวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังผลการทดลองในรูปที่ 2 รองลงมาคือเซลโลไบโอส และเมื่อใช้กาแลคโตสเป็นแหล่งของคาร์บอน จะตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ ทั้ง ๆ ที่พบว่าเชื้อมีการเจริญ แสดงว่ากาเลคโตสอาจมีผลยับยั้งการสร้างลินามาเรส ในขณะที่เมื่อไม่มีแหล่งของคาร์บอน ก็ยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้องค์ประกอบชนิดอื่น ๆ ในอาหารเหลว YM เช่นผงสกัดมอลต์ ผงสกัดยีสต์ หรือเปปโตน ในการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ B-1-14 มีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ได้ไม่ดีเท่ากลูโคส จึงเลือกใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนเพื่อศึกษาต่อไป

เมื่อนำกลูโคสมาแปรผันความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 0 - 5% พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส จะสูงสุดที่กลูโคสความเข้มข้น 0.5% ดังผลการทดลองในรูปที่ 3 และยังพบว่าเมื่อกลูโคสมีความเข้มข้นสูงขึ้น จะยิ่งทำให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของยีสต์ B-1-14 ลดลงทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลูโคสส่วนใหญ่ถูกใช้ในการเจริญของยีสต์แต่ไม่ถูกใช้ในการสร้างลินามาเรสที่มีแอคติวิตีสูง

2.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0-1% โดยมีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ แบคโตเปปโตน แอมโมเนียมซิเตรทและยูเรีย และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท พบว่าเมื่อไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนใด ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำมาก และแบคโตเปปโตนจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.5% ส่วนแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่า ดังผลการทดลองในรูปที่ 4 แสดงว่าเชื้อยีสต์นี้ต้องการแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มเอนไซม์ลินามาเรสในจุลินทรีย์ชนิดอื่น มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย L. mesenteroides (Okafor & Ejiofor,1985) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

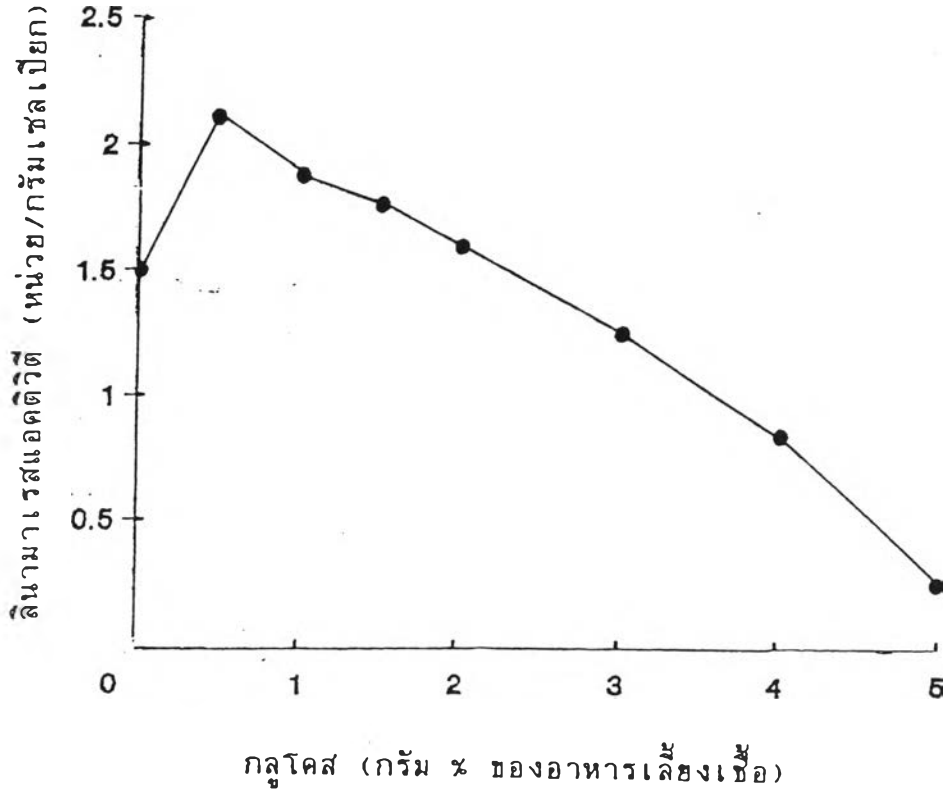


รูปที่ 2 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ B-1-14 ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการแปรผันแหล่งของคาร์บอนเข้มข้น 1% ดังนี้

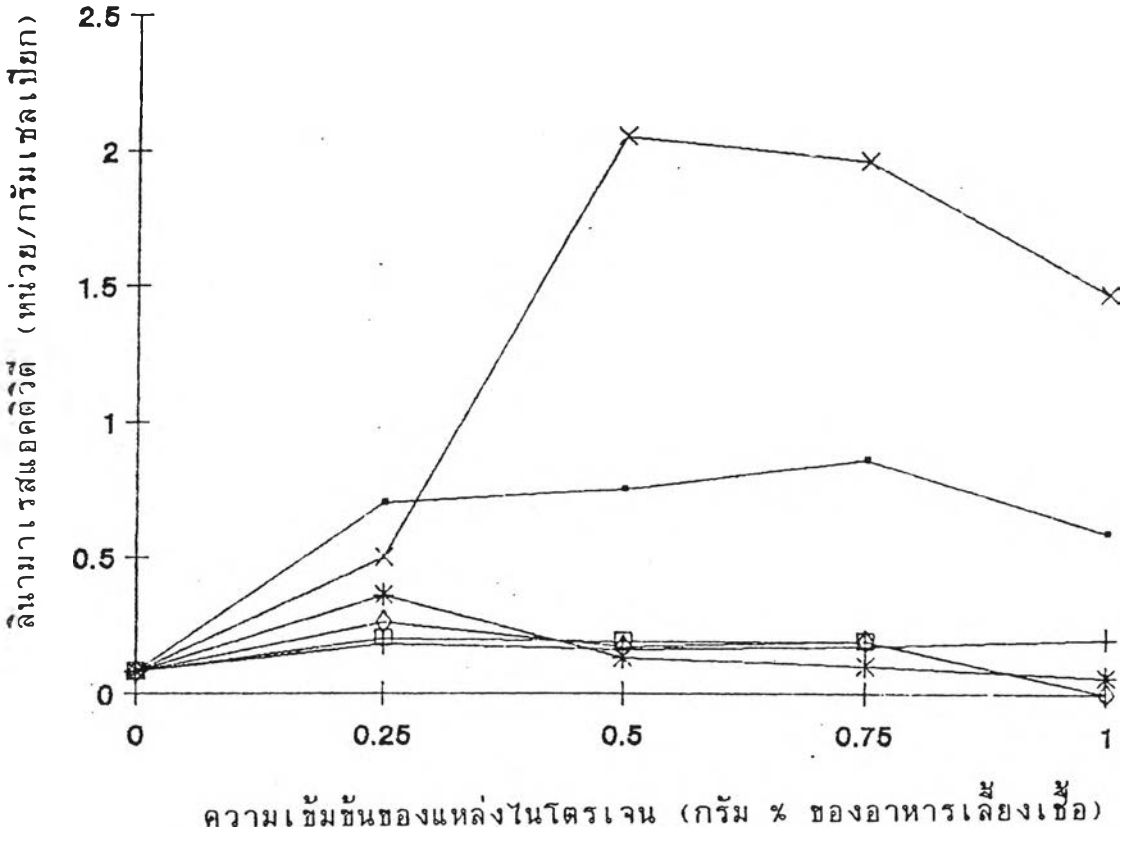
1. หมายถึง กาแลคโตส
2. หมายถึง มอลโตส
3. หมายถึง แลคโตส
4. หมายถึง ซูโครส
5. หมายถึง กลูโคส
6. หมายถึง เซลโลไบโอส
7. หมายถึง ฟรุกโตส
8. หมายถึง ไม่มีการเติมแหล่งของคาร์บอน

แสดงถึง ลินามาเรสแอคติวิตี (หน่วย/กรัมเซลเปียก)

แสดงถึง การเจริญของเชื้อยีสต์ (กรัมเซลเปียก)



รูปที่ 3 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส 0-5% ในอาหารเหลว YM ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสโดยยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4 แสดงผลการแปรชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนจาก 0-1.0 % ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสของเชื้อ B-1-14 ในอาหารเหลว YM ที่มีกลูโคส 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

แหล่งของไนโตรเจนอินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่

- แบคโตเปปโตน (—×—)
- แอมโมเนียมซิเตรท (—*—)
- ยูเรีย (—◇—)

แหล่งของไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่

- แอมโมเนียมซัลเฟต (—•—)
- แอมโมเนียมไนเตรท (—+—)
- โซเดียมไนเตรท (—□—)

ผลจากการตรวจในรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่า การใช้แบคโตเปปโตน ที่ความเข้มข้น 0.5% จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น จึงเลือกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการศึกษาต่อไป

2.3 ความเข้มข้นของผงสกัดมอลท์

ในการแปรความเข้มข้นของผงสกัดมอลท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงความเข้มข้น 0-1.0% ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 9.3 พบว่าการใช้ผงสกัดมอลท์เข้มข้น 0.3% จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสสูง และจะค่อย ๆ ลดลงมาเมื่อมีความเข้มข้นของผงสกัดมอลท์สูงหรือต่ำกว่านี้ เมื่อไม่มีการเติมผงสกัดมอลท์ก็จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำมาก ดังผลการทดลองในรูปที่ 5

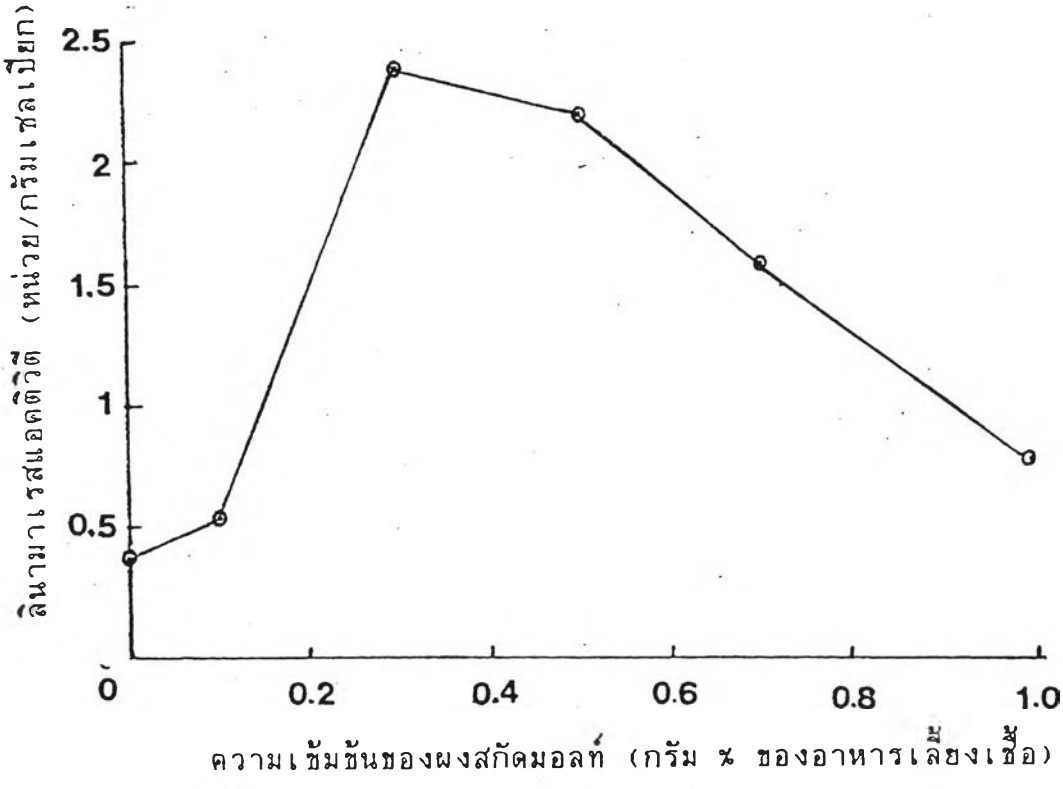
จากรายงานของ Abalaka และ Garba (1989) ซึ่งได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อรา 5 ชนิด พบว่าในอาหารเหลวมอลท์สกัดที่มีผงสกัดมอลท์เป็นองค์ประกอบ 0.6% จะกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสใน A. sydowi และ F. equiseti ได้ แสดงว่าผงสกัดมอลท์มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส จากราสายใยและยีสต์ เพื่อให้ได้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น

จากผลการทดลองที่ได้ จึงเลือกใช้ผงสกัดมอลท์ ที่ความเข้มข้น 0.3% เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อในการทำการทดลองต่อไป

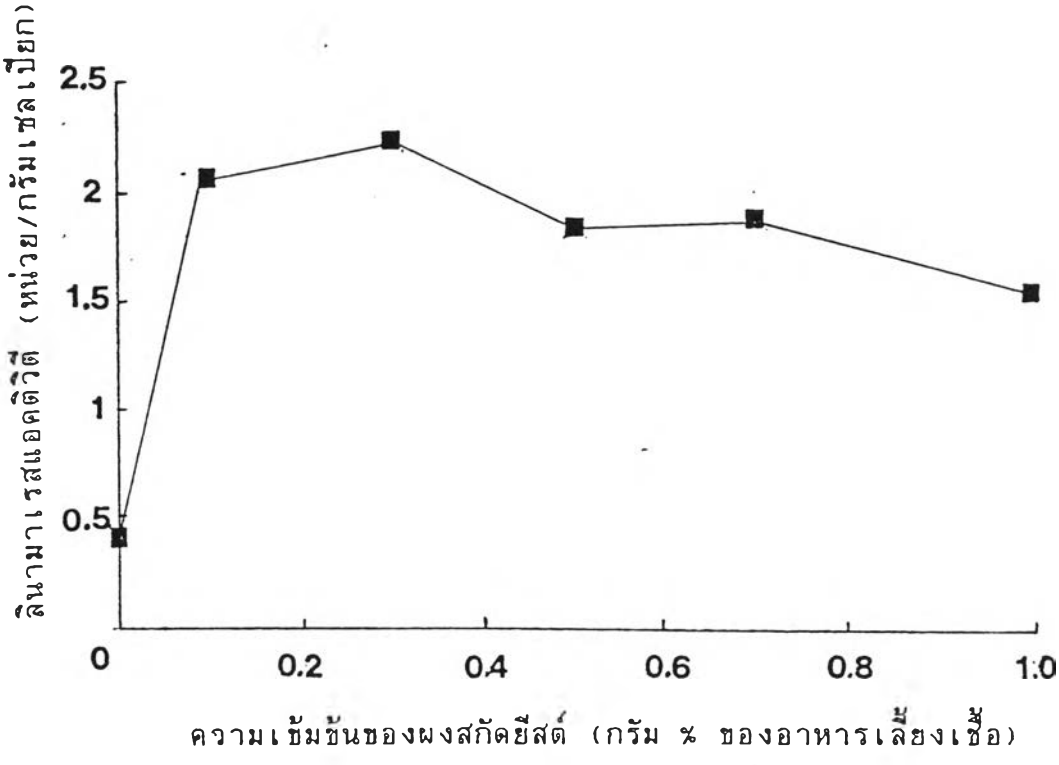
2.4 ความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์

ในการแปรความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์ จาก 0-1.0% ในอาหารเหลว พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสจะสูงเมื่อใช้ผงสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.1-0.3% และจะมีแอคติวิตีสูงที่ 0.3% ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ก็ไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 0.3% มากนัก ผลการทดลองดังรูปที่ 6เมื่อไม่เติมผงสกัดยีสต์แอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำกว่าเมื่อเติมผงสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนั้นผงสกัดยีสต์จึงมีความจำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส ที่ได้จากเชื้อยีสต์ B-1-14

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการเติมผงสกัดยีสต์ในการศึกษาเอนไซม์ลินามาเรส แต่ก็มีรายงานบางฉบับ ที่แสดงถึงอิทธิพลของผงสกัดยีสต์ต่อการสร้างเอนไซม์บางชนิดในยีสต์ ได้แก่ การศึกษาเอนไซม์ Fructose-1,6-bisphosphatase (Wills และคณะ,1985) ซึ่งเป็นเอนไซม์อยู่ในเซลยีสต์ พบว่าการเติมผงสกัดยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลให้มีการสร้างเอนไซม์นี้สูงขึ้นมาได้ และจากผลการทดลองของ Somerlate และคณะ (1985) ที่ทำการศึกษาเอนไซม์ β-D-galactosidase จากยีสต์ K. lactis พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3% และผงสกัดยีสต์ 0.1% จะกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น



รูปที่ 5 แสดงผลของการแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดมอลท์จาก 0-1.0 % ต่อลินามาเรสแอคติวิตีของยีสต์ B-1-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.5 % แบคโตเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 6 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์ 0-1.0 % ต่อลินามาเรสแอคติวิตีของยีสต์ B-1-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มี 0.5% กลูโคส, 0.5% แบคโตเปปโตน และ 0.3% ผงสกัดมอลท์ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกใช้ผงสกัดยีสต์เข้มข้น 0.3% เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.5 ผลของการเติมเกลือแร่บางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

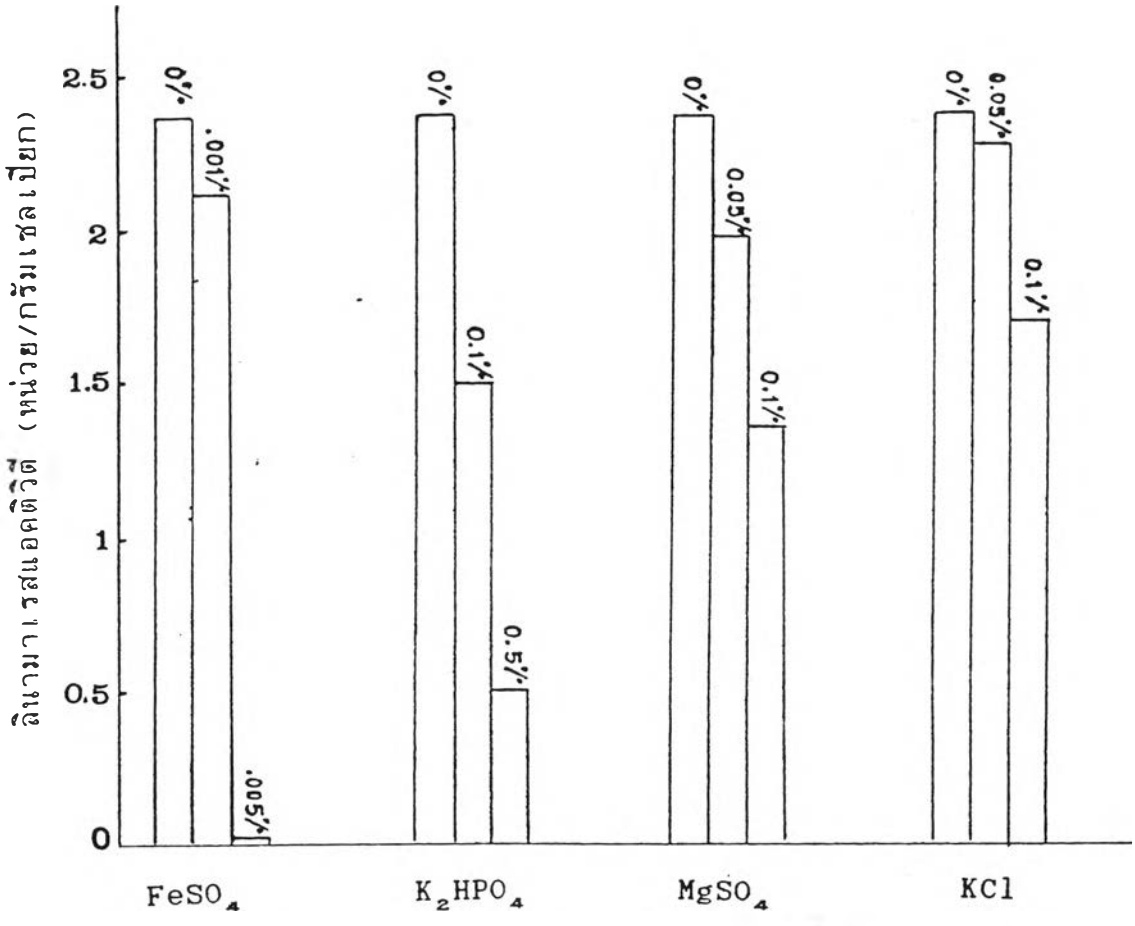
ผลการทดลองเติมเกลือแร่บางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ดังวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 6.5 คือ $FeSO_4$, K_2HPO_4, $MgSO_4$ และ KCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เทียบกับไม่มีการเติมเกลือแร่ใด ๆ ลงในอาหารพบว่าการเติมเกลือแร่เหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น ในทางตรงข้าม ถ้าเติมเกลือแร่เหล่านี้ในปริมาณที่สูงขึ้น จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง โดยเฉพาะเมื่อเติม 0.005% $FeSO_4$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ ดังรูปที่ 7 แสดงว่าเกลือแร่ที่นำมาทดลองนี้ไม่มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีเอนไซม์ลินามาเรสในยีสต์ B-1-14 และ $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ด้วย แต่จากรายงานที่ผ่านมายังไม่พบว่ามีผู้ทำการศึกษาผลของเกลือแร่บางชนิดต่อการสร้างลินามาเรส

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อยีสต์ สรุปได้ว่าการใช้กลูโคส 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน แบคโตเปปโตน 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน ผงสกัดยีสต์ 0.3% และผงสกัดมอลท์ 0.3% เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อยีสต์ B-1-14 มีความสามารถผลิตเอนไซม์ลินามาเรสได้สูง จึงใช้อาหารสูตรนี้เลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเอนไซม์ปริมาณมากสำหรับการสกัดต่อไป

2.6 ผลของการแปรผัน pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

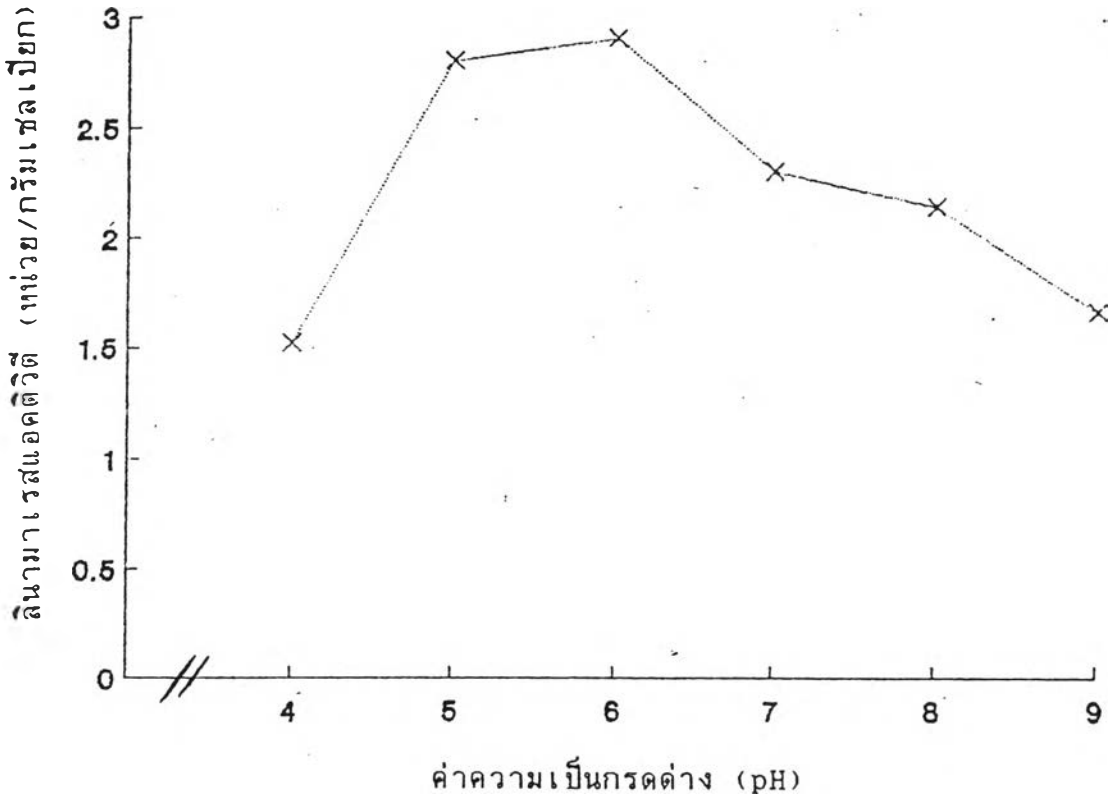
จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวที่เหมาะสมแล้ว แปรผัน pH เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 4.0-9.0 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงอยู่ในช่วง pH 5.0 - 6.0 แต่อย่างไรก็ตามที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้ก็ยังสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 8 แสดงว่าเชื้อยีสต์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ลินามาเรสได้ในช่วงของ pH ที่ค่อนข้างกว้างคือ 4.0-9.0

เมื่อเทียบกับผลการทดลองของ Ikediobi และ Ogundu (1985) ที่ทำการศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสจาก A. sydowi และ F. equiseti พบว่าจะผลิตได้ดีในช่วง pH 4.5-6.0 ขณะที่ Okafor และ Ejiofor (1985) พบว่าการผลิตลินามาเรสจากแบคทีเรีย L. mesenteroides จะให้แอคติวิตีสูงสุดที่ pH 6.5 ซึ่งใกล้เคียงกับช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์ B-1-14



ชนิดของแหล่งเกลือแร่ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 7 แสดงผลของการเติมแหล่งเกลือแร่บางชนิดลงในอาหารเหลวที่มี 0.5% กลูโคส, 0.5% แบคโตเปปโตน, 0.3% ผงสกัดมอลท์ และ 0.3% ผงสกัดยีสต์ ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสของเชื้อ B-1-14 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 8 แสดงอิทธิพลของ pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสของยีสต์ B-1-14 ในอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้วที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

2.7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส

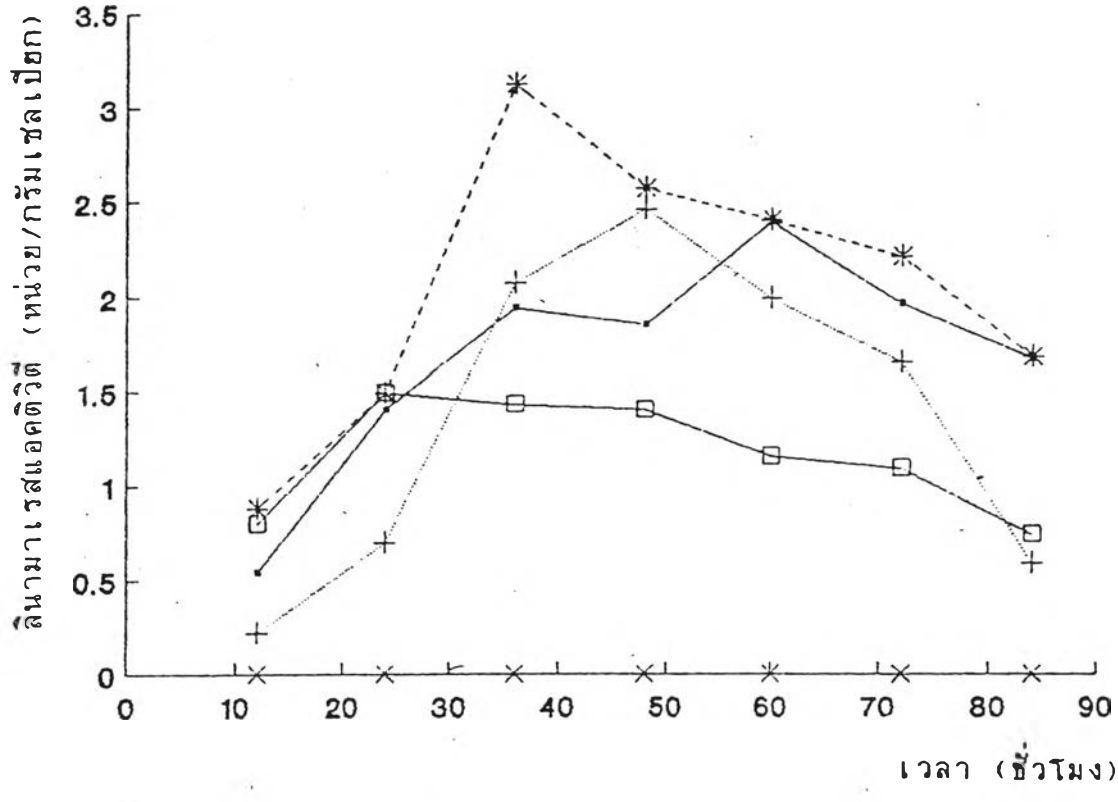
จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวที่ทำการปรับสูตรแล้ว และปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 25 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส), 35 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดแอคติวิตีที่เวลาต่าง ๆ ได้ผลดังแสดงใน รูปที่ 9 ลินามาเรสแอคติวิตีจะสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 36 ส่วนที่อุณหภูมิห้อง และ 25 องศาเซลเซียส จะให้แอคติวิตีใกล้เคียงกัน แต่สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่ 40 องศาเซลเซียส ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย

ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Okafor และ Ejiofor (1985) ที่ผลิตลินามาเรสจาก L. mesenteroides ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

2.8 ผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 ในอาหารเหลว และนำไปเขย่าเพื่อเพิ่มอากาศที่ความเร็วรอบต่างกัน คือ 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที (rpm) ได้ผลดังรูปที่ 10 พบว่าที่ความเร็ว 150 rpm จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 12 สูงกว่าที่ความเร็วอื่น ๆ และจะให้แอคติวิตีสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งสูงกว่าความเร็วอื่น ๆ ด้วย แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการเลี้ยงที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีจะให้แอคติวิตีในชั่วโมงที่ 48 สูงกว่าชั่วโมงที่ 12 ประมาณ 1.3 หน่วยต่อกรัม เซลเปียก ขณะที่การเลี้ยงด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที จะให้แอคติวิตีที่ชั่วโมงที่ 36 สูงกว่าชั่วโมง ที่ 12 เพียง 0.7 หน่วยต่อกรัมเซลเปียก แสดงว่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีนี้ ก็น่าจะมีผลในการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสได้สูง แต่ใช้เวลาในการสร้างนานกว่าที่ 150 rpm เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็วสูงขึ้นคือ 200 และ 250 rpm พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำลง โดยเฉพาะที่ 250 rpm เชื้อจะมีการสร้างเอนไซม์ได้ต่ำที่สุด จึงเลือกความเร็ว 150 รอบต่อนาทีในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ต่อไป(ยกเว้นการทดลองเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ (รูปที่ 11) และสารลดแรงตึงผิว (ตารางที่ 3) ที่ใช้ความเร็ว 200 rpm)

จากผลการทดลองนี้อาจแสดงว่า เชื้อยีสต์ต้องการอากาศไม่มากนัก ในการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์เป็นเชื้อพวก Facultative anaerobe สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน ดังนั้นการที่มีออกซิเจนมาก อาจทำให้เชื้อมีการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลได้ดี แต่มีการสร้างลินามาเรสได้น้อย เมื่อเทียบกับในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า เชื้อจะมีการเจริญต่ำกว่า แต่มีการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสได้มากขึ้น



รูปที่ 9 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสของเชื้อ B-1-14 ในอาหารเหลวที่ปรับสูตรแล้ว ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

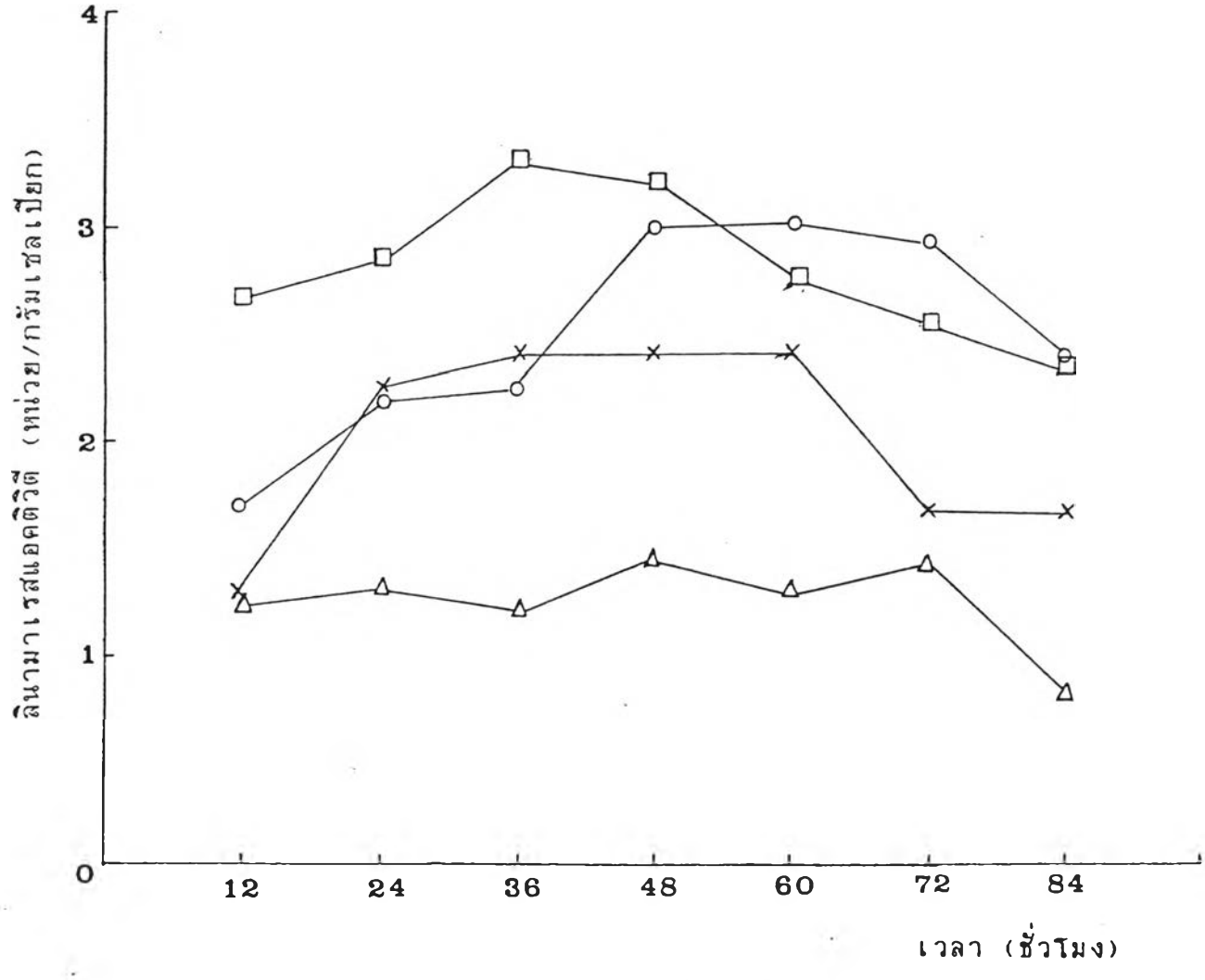
กำหนดให้ —•— แสดงถึง อุณหภูมิห้อง 32±1 องศาเซลเซียส

--+-- " อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

---*-- " อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

—□— " อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

—×— " อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 10 แสดงผลของความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อเลี้ยงเชื้อ B-1-14 ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส ในอาหารเหลวที่ปรับสูตรแล้ว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

กำหนดให้ o—o แสดงถึงความเร็ว 100 รอบต่อนาที

□—□ แสดงถึงความเร็ว 150 รอบต่อนาที

×—× แสดงถึงความเร็ว 200 รอบต่อนาที

△—△ แสดงถึงความเร็ว 250 รอบต่อนาที

จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 เพื่อผลิตเอนไซม์ลินามาเรส จะประกอบไปด้วยส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 0.5% กลูโคส, 0.5% แบคโตเปปโตน, 0.3% ผงสกัดมอลท์ 0.3% ผงสกัดยีสต์ pH 6.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.9 ผลของการเติมสารบางชนิดต่อการสร้างเอนไซม์ลินามาเรส

2.9.1 โปแตสเซียมไซยาไนด์

จากการศึกษาผลของการใช้โปแตสเซียมไซยาไนด์ที่เติมลงในอาหารที่ปรับสูตรแล้ว เพื่อให้มีการกระตุ้น การสร้างเอนไซม์ลินามาเรส โดยการแปรความเข้มข้นจาก 0-250 ส่วนในล้านส่วน (ppm) พบว่า KCN ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ในช่วง 10-40 ppm จะมีผลในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ให้สูงขึ้นดังรูปที่ 11 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Padmaja และ Balagopal (1985) ที่ทำการศึกษาลินามาเรสที่ได้จาก Rhizopus oryzae และพบว่าการกระตุ้นด้วย KCN และลินามาริน จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ KCN ให้มากขึ้นจะมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ จากรูปที่ 11 พบว่า KCN ที่ความเข้มข้น 40 ppm จะมีแอคติวิตีสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น จึงเลือกไว้เพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แอคติวิตีสูงขึ้น

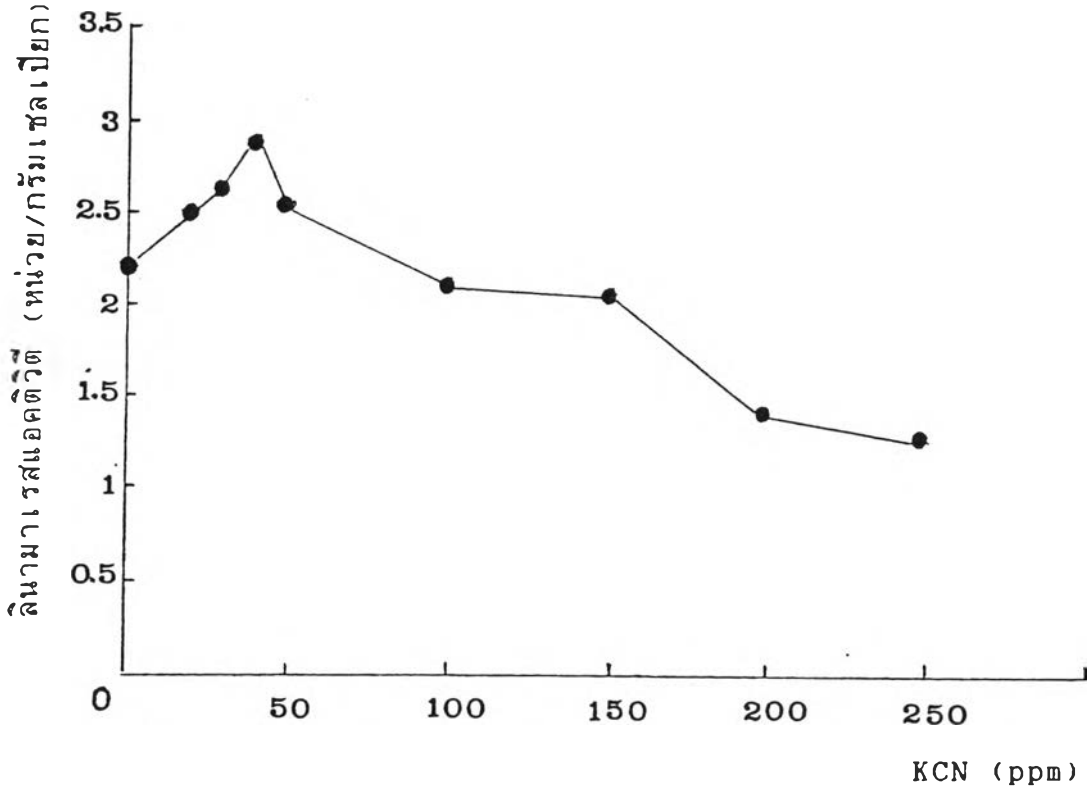
2.9.2 ผลของสารลดแรงตึงผิว

2.9.2.1 Tween-80

จากการเติม Tween-80 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดแรงตึงผิวของเซลยีสต์จะทำให้เอนไซม์ไหลออกสู่ภายนอกเซลได้ โดยที่ Tween-80 เข้มข้น 0.1% จะช่วยให้มีการปล่อยเอนไซม์ออกภายนอกได้มากกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ที่ทำการทดลอง ผลดังแสดงในตารางที่ 3 แต่ถ้ามีความเข้มข้นสูงขึ้น จะทำให้มีการปล่อยเอนไซม์ได้น้อยลง แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการเติม Tween-80 ลงไปจะทำให้มีการปลดปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอก ได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดภายในเซล และแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลจะน้อยลงตามลำดับเมื่อความเข้มข้นของ Tween-80 สูงขึ้น แสดงว่า Tween-80 ที่ความเข้มข้น ที่ใช้ทดลองไม่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยเอนไซม์จากภายในเซล และอาจมีผลบางอย่างต่อ การผลิตเอนไซม์ลินามาเรสในเซลของยีสต์ด้วย

2.9.2.2 Triton X-100

จากการศึกษาผลของ Triton X-100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวของเซลโดยการแปรความเข้มข้นของ Triton X-100 จาก 0 - 5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส ทั้งภายในและภายนอกเซล แสดงว่า



รูปที่ 11 แสดงผลของโปแตสเซียมไซยาไนด์ที่ความเข้มข้น 0-250 ppm ต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส โดยเชื้อ B-1-14 ในอาหารเหลวที่ปรับสูตรแล้วที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 แสดงผลของ Tween-80 ที่ความเข้มข้น 0-1.0% และ Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 0-5% ต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ลินามาเรสจากเซลยีสต์ B-1-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงแล้ว เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สารลดแรงตึงผิว	ความเข้มข้น (%)	น้ำหนักเซลเปียก (กรัม)	เอนไซม์ทั้งหมดที่พบในเซล (หน่วย)	เอนไซม์ทั้งหมดที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (หน่วย)	% เอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเทียบกับเอนไซม์ในเซล
Tween-80	0	1.35	4.0	0	0
	0.1	1.26	3.67	0.083	2.26
	0.5	1.22	3.49	0.075	2.15
	1.0	1.35	3.22	0.050	1.55
Triton X-100	0	1.27	3.76	0	0
	1	1.14	0	0	0
	2	1.1	0	0	0
	3	1.05	0	0	0
	4	1.03	0	0	0
	5	1.07	0	0	0

Triton X-100 อาจมีผลบางอย่างต่อการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์

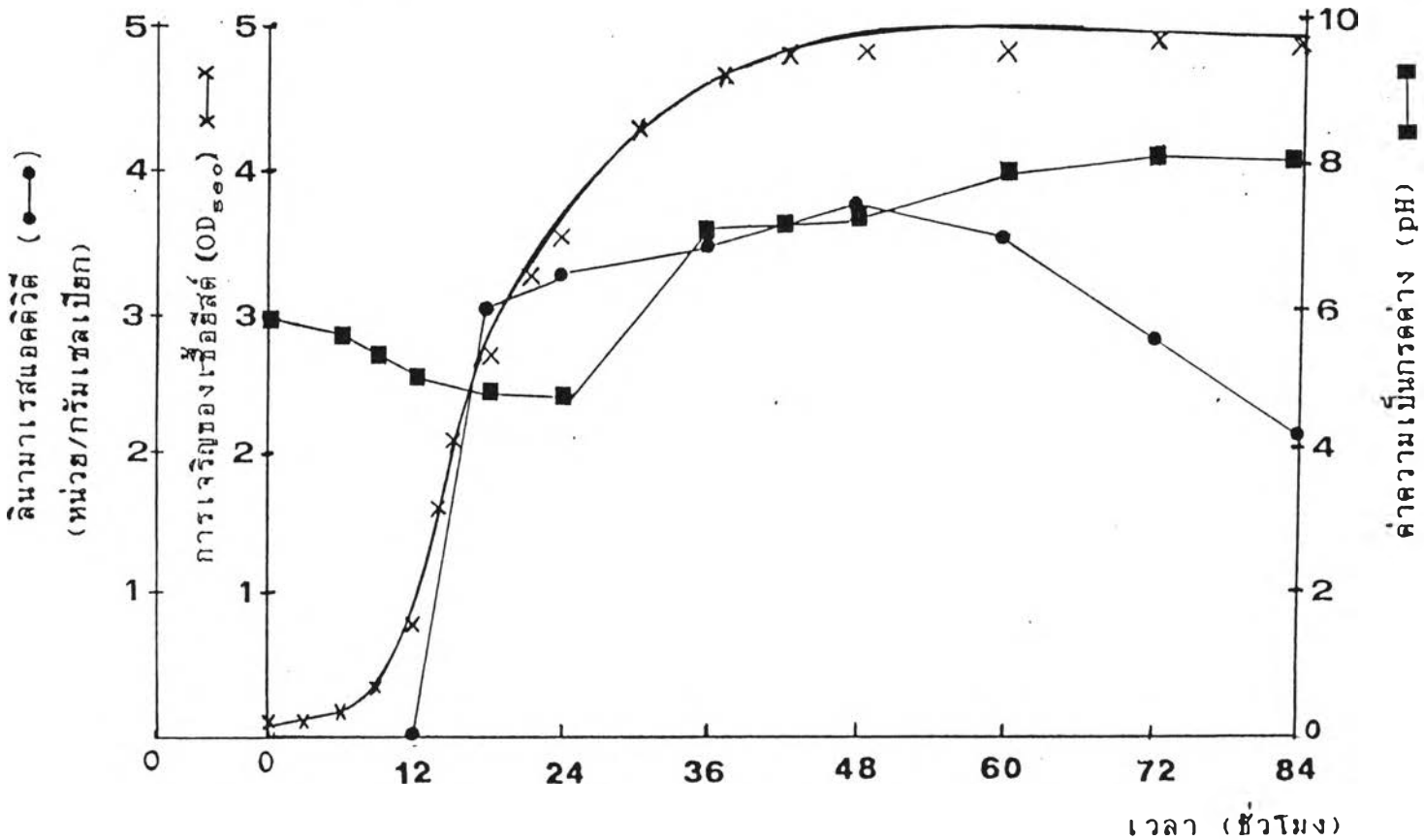
จากผลการทดลองที่ได้ ต่างจากการทดลองของ Abalaka และ Garba (1989) ที่ทำการทดลองเติม 1% Triton X-100 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะเวลาเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อจะมีผลยับยั้งการสร้างลินาม่าเรส ในเชื้อราที่ทำการศึกษา และถ้าเติม Triton X-100 ลงในอาหาร หลังจากเชื้อมีการเจริญไปได้ 12 วัน แล้ว พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงขึ้น ขณะที่ Ikediobi และคณะ (1985) พบว่าการใช้ Triton X-100 1% และ 5% จะมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสใน A. sydowi และ F. equiseti สูงขึ้นได้

จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ไม่มีผลในการกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ลินามาเรสจากในเซลยีสต์ โดยเฉพาะ Triton X-100 จะมีผลยับยั้งการสร้างลินามาเรสภายในเซลยีสต์ด้วย ดังนั้นจึงไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์

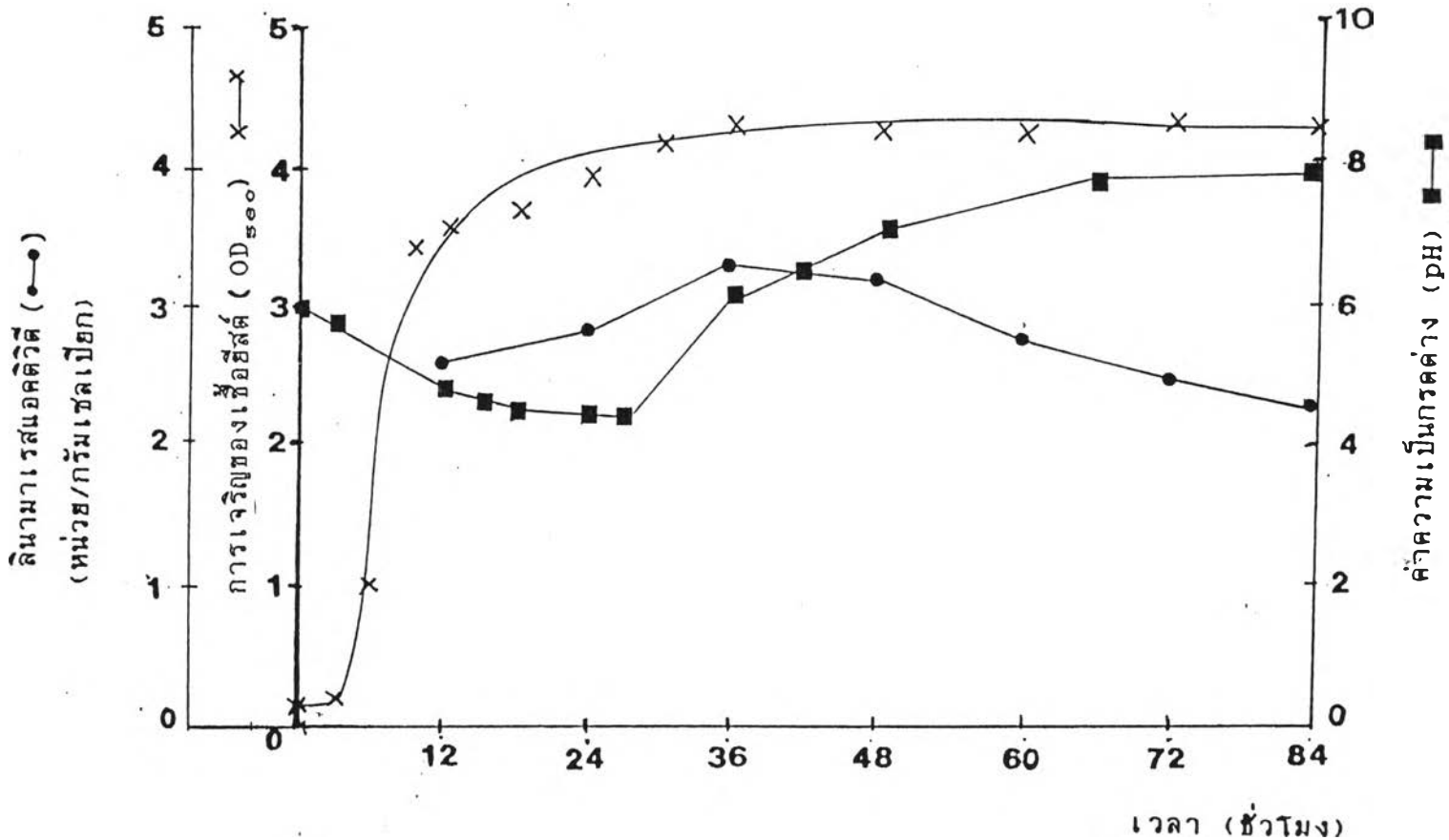
3. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อยีสต์ B-1-14 กับการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสในสภาวะเหมาะสมที่ปรับปรุงแล้ว

จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 ในสภาวะที่ได้ปรับสภาพเหมาะสม เปรียบเทียบกันระหว่างการเติม KCN 40 ppm ลงในอาหารเหลวและไม่มีการเติม KCN พบว่าการเจริญของยีสต์ ในอาหารที่มี KCN จะช้ากว่าเมื่อไม่มีการเติม KCN คือในระยะ lag phase จะใช้เวลานานประมาณ 10 ชม. ก่อนเข้าสู่ exponential phase และมีการเจริญในช่วงนี้นานไปจนถึงชั่วโมงที่ 30 จึงจะเข้าสู่ stationary phase (รูป 12 ก) ขณะที่การเจริญของยีสต์ในอาหารที่ไม่เติม KCN จะมีช่วง lag phase ที่สั้นกว่าคือประมาณ 3-5 ชั่วโมง และมีการเจริญในช่วง exponential phase ไปจนถึง ชั่วโมงที่ 12 แล้วจึงเริ่มเข้าสู่ stationary phase (รูป 12 ข) การเจริญของเชื้อที่ช้าลงเมื่อมีการเติม KCN ลงไป อาจเป็นเพราะไซยาไนด์เป็นตัวยับยั้งการหายใจแบบใช้ออกซิเจนของสิ่งมีชีวิต โดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Lehninger,1982) แต่ยีสต์เป็นเชื้อที่สามารถดำรงชีวิตแบบ Facultative คือใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ ดังนั้นเมื่อมี KCN ในสภาวะแวดล้อม ยีสต์จึงต้องมีการปรับตัวเพื่อให้ทนอยู่ในสภาวะที่มีไซยาไนด์ได้ก่อนที่จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จึงทำให้การเจริญของเชื้อช้าลง

แต่เมื่อเทียบแอคติวิตีของลินามาเรสในสภาวะทั้งสองซึ่งเริ่มวัดแอคติวิตีของเอนไซ์ใน ชม. 12 พบว่าแอคติวิตีของลินามาเรสจากเมื่อเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มี KCN จะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม KCN รูป 12 ก. แสดงให้เห็นว่ายีสต์ มีการสร้างเอนไซม์ในช่วง ชั่วโมงที่ 18 - 48 และมีแอคติวิตีสูงสุดที่ ชั่วโมงที่ 48 ประมาณ 3.75 หน่วย/กรัม



รูปที่ 12 ก แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และการเจริญกับการสร้างเอนไซม์ลินามาเรส ของเชื้อยีสต์ B-1-14 ในอาหารเหลวปรับสูตร ที่มีการเติม KCN 40 ppm. เลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 12 ข แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และการเจริญ กับการสร้างเอนไซม์ลินามาเรส ของเชื้อยีสต์ B-1-14 ในอาหารเหลวปรับสูตรที่ไม่มีการเติม KCN เลี้ยงเชื้อที่ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

เซลเปียก และหลังจากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะเริ่มลดลงอย่างช้าๆ เทียบกับเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มี KCN (รูปที่ 12 ข) จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วง ชั่วโมงที่ 12-48 และมีแอคติวิตีสูงสุดที่ ชั่วโมงที่ 36 คือประมาณ 3.25 หน่วย/กรัมเซลเปียก ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เติม KCN

สำหรับการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ pH 6.0 พบว่าในช่วง 24ชั่วโมงแรก pH จะลดลงมาเรื่อยๆ จนถึงประมาณ pH 4.5 ซึ่งในช่วงนี้เริ่มจากพบแอคติวิตีของเอนไซม์แต่เมื่อเวลาผ่านไป pH จะเริ่มสูงขึ้นจนเป็น 7.5 และ 8.0 และจะคงที่อยู่ในช่วงนี้ ขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มลดลง รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่มีผลต่อเอนไซม์แอคติวิตีระหว่างที่มีการเจริญของเชื้อจะเหมือนกันทั้งสภาวะที่เติมและไม่เติม KCN (รูป 12ก,12 ข) จึงคาดว่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไปอาจมีผลต่อลินามาเรสแอคติวิตีด้วย ทั้งนี้เพราะมีรายงานของ Ikediobi และ Onyike,1982 b พบว่า pH ในอาหารมันหมักการิที่เปลี่ยนไปจะทำให้แอคติวิตีของลินามาเรสลดลง

4. <u>การทำเอนไซม์ลินามาเรสให้บริสุทธิ์</u>

4.1 การสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซลยีสต์

เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ในอาหารเหลวที่ปรับสภาพแล้วปริมาตร 5 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกเซลยีสต์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเครื่องเหวี่ยงแรงสูงดังรายละเอียดในข้อ 4 บทที่ 2 และชั่งน้ำหนักเซลเปียกได้ 89.02 กรัม ละลายตะกอนที่ได้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 250 มล. นำเซลไปทำให้แตกโดยวิธีทางกายภาพด้วยเครื่อง French Pressure cell ที่ความดัน 8,000 psi เซนตริฟิวจ์แยกกากเซลทิ้งไป ส่วนน้ำใสที่ได้จะเป็นเอนไซม์สกัดเริ่มต้น (Crude enzyme) ปริมาตร 210 มล. แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ 0.97 หน่วย/มล. คิดเป็น 2.29 หน่วยเอนไซม์ ต่อ 1 กรัมเซลเปียก วัดแอคติวิตีจำเพาะได้ 0.3 หน่วย/มก.โปรตีน เก็บเอนไซม์นี้ไว้ทดลองต่อไป

4.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 30%-60% ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์ลินามาเรสสามารถตกตะกอนออกมาได้สูงสุด ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 10 ผลจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30%-60% นี้สามารถกำจัดโปรตีนบางชนิดออกไปได้และเหลือเอนไซม์อยู่ 68% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น และวัดแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ พบว่าเพิ่มขึ้นเป็น 1.4 หน่วย/มก.โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4

จากรายงานที่ผ่านมา ในการศึกษาการทำเอนไซม์ลินามาเรสจากแหล่งอื่นให้บริสุทธิ์ขึ้นได้แก่ Cooke (1978) ซึ่งทำการศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง พบว่าจะทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60% ขณะที่ Ikediobi และคณะ (1987) ซึ่งศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อรา F. equiseti จะมีการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 50-90%

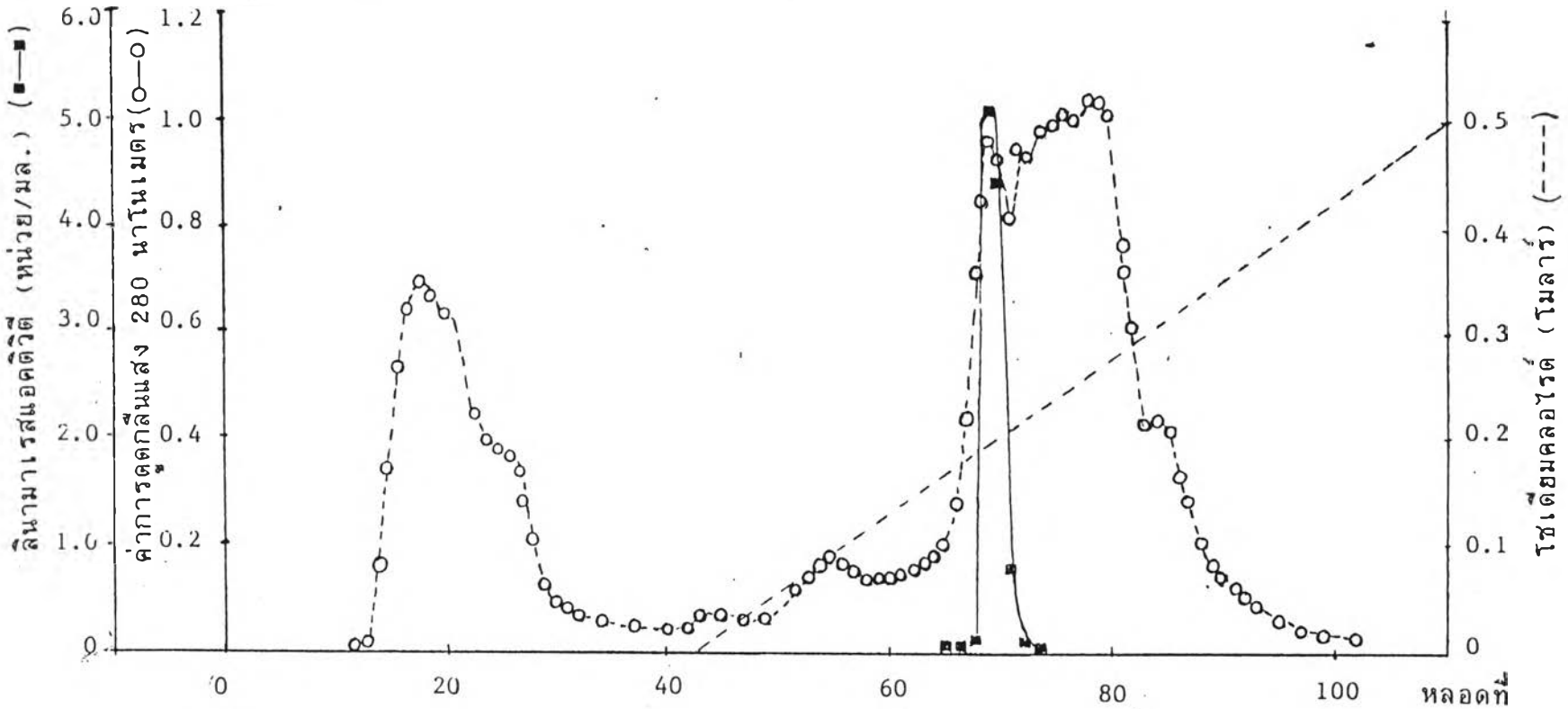
4.3 การทำโครมาโตกราฟีแบบไอออนเอกซเชนจ์

การทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นที่มีประจุตรงข้ามกับโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ออกไป และยังสามารถกำจัดโปรตีนบางชนิด ที่มีความแรงของประจุแตกต่างกับเอนไซม์มากๆ ออกไปอีกด้วย จากการชะโปรตีนที่จับอยู่กับเรซินของดีอีเออี-ไอออนเอกซเชนเจอร์ ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกัน

จากการนำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30-60% มาผ่านคอลัมน์ DEAE-Ion exchange (TOYOPEARL-650 M) ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 8 ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 13 พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสจะผ่านคอลัมน์ออกมาในช่วงหลอดที่ 58-71 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.19-0.21 โมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์ลินามาเรสเป็นโปรตีนที่มีประจุลบ ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์ลินามาเรส ที่ได้จากแหล่งอื่น ๆ คือมันสำปะหลัง (Cooke, 1978), white clover (Hughes, 1968) และเอนไซม์ลินามาเรสจากแบคทีเรีย L. mesenteroides (Okafor และ Ejiofor, 1985)

จากการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-TOYOPEARL 650 M พบว่าจะได้เอนไซม์แอคติวิตีออกมาเพียง peak เดียวเช่นเดียวกับลินามาเรส ที่ได้จากต้น linseed (Butler, 1965) และเชื้อรา F. equiseti (Ikediobi และคณะ, 1987) ซึ่งแตกต่างจากลินามาเรสที่ได้จากมันสำปะหลัง (Cooke, 1978) และแบคทีเรีย L. mesenteroides (Okafor และ Ejiofor, 1985) ที่พบว่าจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ออกมา 2 peaks จากการศึกษาต่อมาพบว่า แอคติวิตีที่แท้จริง (Major peak) จะอยู่ที่ peak ที่ 2

เมื่อรวมสารละลายโปรตีนที่ได้จากคอลัมน์ DEAE ในหลอดที่ 69 - 71 ซึ่งมีแอคติวิตีสูงเข้าด้วยกัน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จะได้เท่ากับ 6.8 หน่วย/มล.และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 29.8 เท่า มีแอคติวิตีจำเพาะ 8.6 หน่วย/มก.โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4



รูปที่ 13 แสดงโครมาโตกราฟีของเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 ในคอลัมน์ของ DEAE-TOYOPEARL 650 M โดยผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ขนาด 58 x 1.6 ซม. ชะเอนไซม์ออกด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แบบแกรเดียนท์เส้นตรง(0-0.5 โมลาร์) เก็บสารละลายเอนไซม์หลอดละ 7 มล. ที่อัตราการไหล 28 มล./ชม.

4.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน

การทดลองขั้นตอนนี้ เพื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ โดยการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างจากเอนไซม์ออกไปโดยการผ่านคอลัมน์ เจลฟิลเตรชั่น TOYOPEARL HW-55

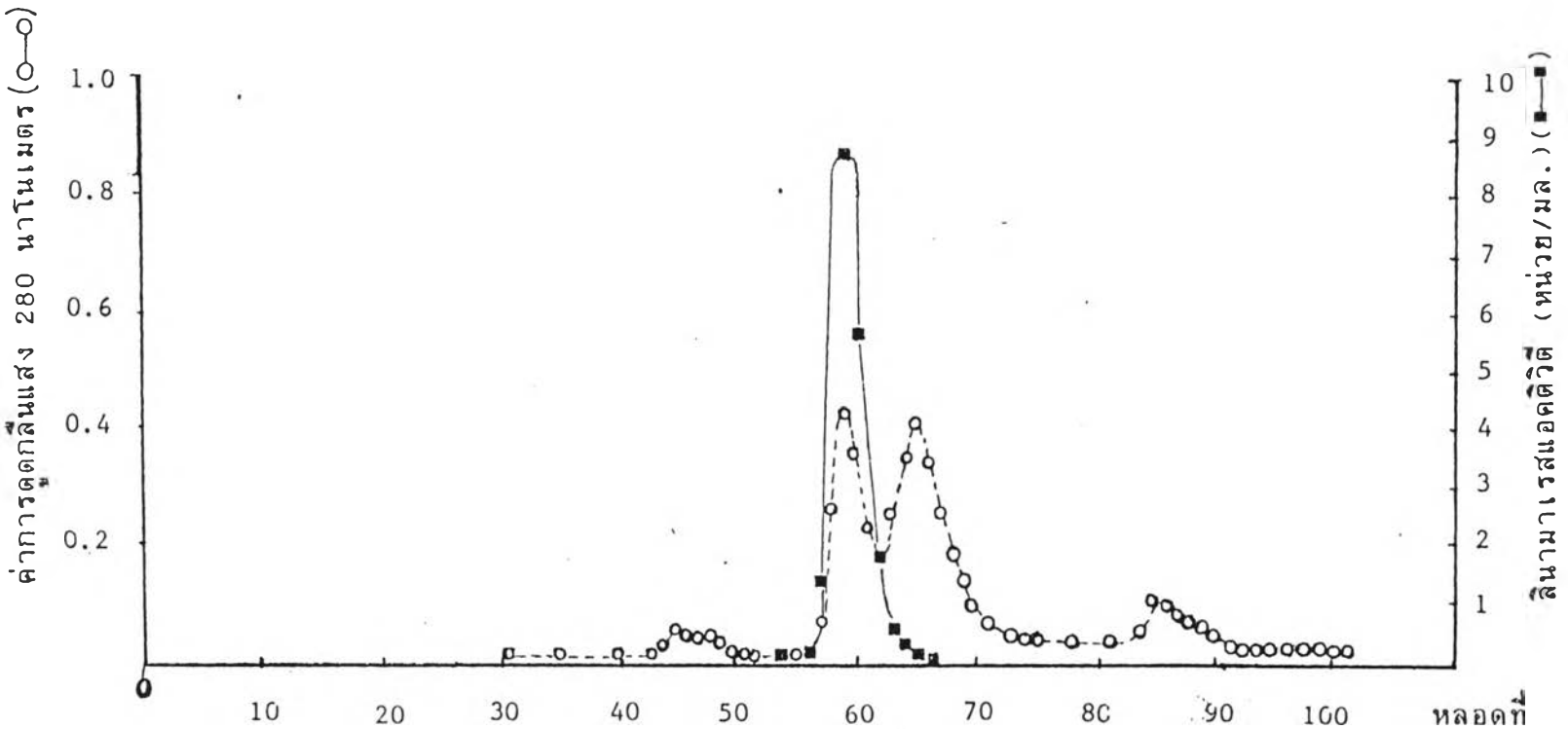
ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 9 จะพบแอคติวิตีของเอนไซม์ ในช่วงหลอดที่ 55-65 ดังรูปที่ 14 รวมโปรตีนในหลอดที่ 57-62 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ 5.1 หน่วย/มล. แอคติวิตีจำเพาะ 17.8 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 61.5 เท่า

จากการทดลองของ Cooke (1978) ในการผ่านเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังลงในคอลัมน์เจลฟิลเตรชันชนิด Sephadex G-150 และ G-200 พบว่าเอนไซม์จะออกมาในช่วงแรก (excluded volume) เช่นเดียวกับการทดลองของ Ikediobi และคณะ (1987) ที่ผ่านเอนไซม์ลินามาเรสจากรา F. equiseti ลงในคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน Sephadex G-150 เอนไซม์จะออกมาในช่วงแรก คือหลอดที่ 4-8 แสดงว่าเอนไซม์จากทั้ง 2 แหล่ง มีขนาดใหญ่มาก คือ 600,000 ดาลตัน โดยประมาณ

จากขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่ 4.1 - 4.4 ในการทำให้เอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 บริสุทธิ์ขึ้น ได้แสดงไว้ตังตารางที่ 4 และพบว่าในขั้นตอนสุดท้ายจะทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 61.5 เท่า

5. การทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรสด้วยวิธีโพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส

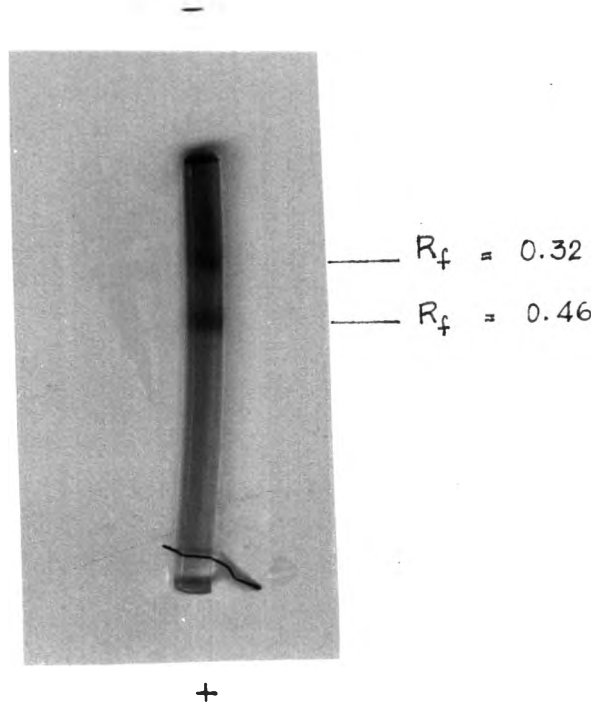
จากการทำ Disc. Polyacrylamide Gel Electrophoresis ของเอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์ ดังรายละเอียดของการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 11 พบโปรตีน 2 แถบ บนแท่งเจลและวัดค่า R_f ได้ 0.32 และ 0.46 ตามลำดับ ดังรูปที่ 15 แต่ตรวจไม่พบแอคติวิตีของลินามาเรสจากทั้ง 2 แถบ ที่เป็นเช่นนี้อาจสันนิษฐานว่าเกิดจากทริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์ ในการทดลอง ซึ่งมีค่าความเป็นด่างสูงถึง 8.3 ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 6.3 ของการวิจัยครั้งนี้ ที่พบว่าทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 - 9.0 ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ หรืออาจเกิดจากอุณหภูมิในระหว่างที่ทำอิเลคโทรโนริซิสทำที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอาจมีความร้อนเกิดขึ้นสูง จึงอาจทำให้เอนไซม์ สูญเสียสภาพ ทำให้ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ จากแถบของโปรตีนทั้ง 2 แถบ ที่ย้อมได้อาจแสดงได้ว่าเอนไซม์ลินามาเรสนี้ยังไม่บริสุทธิ์พอ หรืออาจมี 2 ไอโซไซม์ก็ได้ ซึ่งจะต้องศึกษาวิธีที่จะวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ให้ได้เพื่อยืนยันสมมุติฐานต่อไป



รูปที่ 14 แสดงโครมาโตกราฟีของเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อ B-1-14 บนคอลัมน์เจล ฟิลเตรชัน TOYOPEARL HW-55 ขนาด 70 x 2.5 ซม. ชะเอนไซม์ออกโดยใช้ 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เก็บสารละลายเอนไซม์หลอดละ 3 มล. ที่อัตราการไหล 12 มล./ชม.

ตารางที่ 4 ลำดับขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดจากเชื้อยีสต์ B-1-14 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	ปริมาตรเอนไซม์ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
เอนไซม์ที่เริ่มสกัด	210	203.7	687.1	0.3	100	1
ตกตะกอนด้วย$(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 30-60%	46	138.5	100.1	1.4	68	4.8
Ion-exchange chomatography on DEAE-TOYOPEARL	19	128.6	14.9	8.6	63.1	29.8
Gel filtration chromatography on TOYOPEARL HW-55	16.6	83.9	4.7	17.8	41.2	61.5



รูปที่ 15 แสดงผลการทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซีสของเอนไซม์ลินามาเรส
จากเชื้อยีสต์ B-1-14 ดังรายละเอียดของการทดลองตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 11

6. สมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรส

นำเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 ที่ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วย 30-60% แอมโมเนียมซัลเฟต และไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟีผ่านคอลัมน์ DEAE-TOYOPEARL และเจลฟิลเตรชัน ผ่านคอลัมน์ TOYOPEARL HW-55 มาทำการศึกษาสมบัติบางประการได้แก่

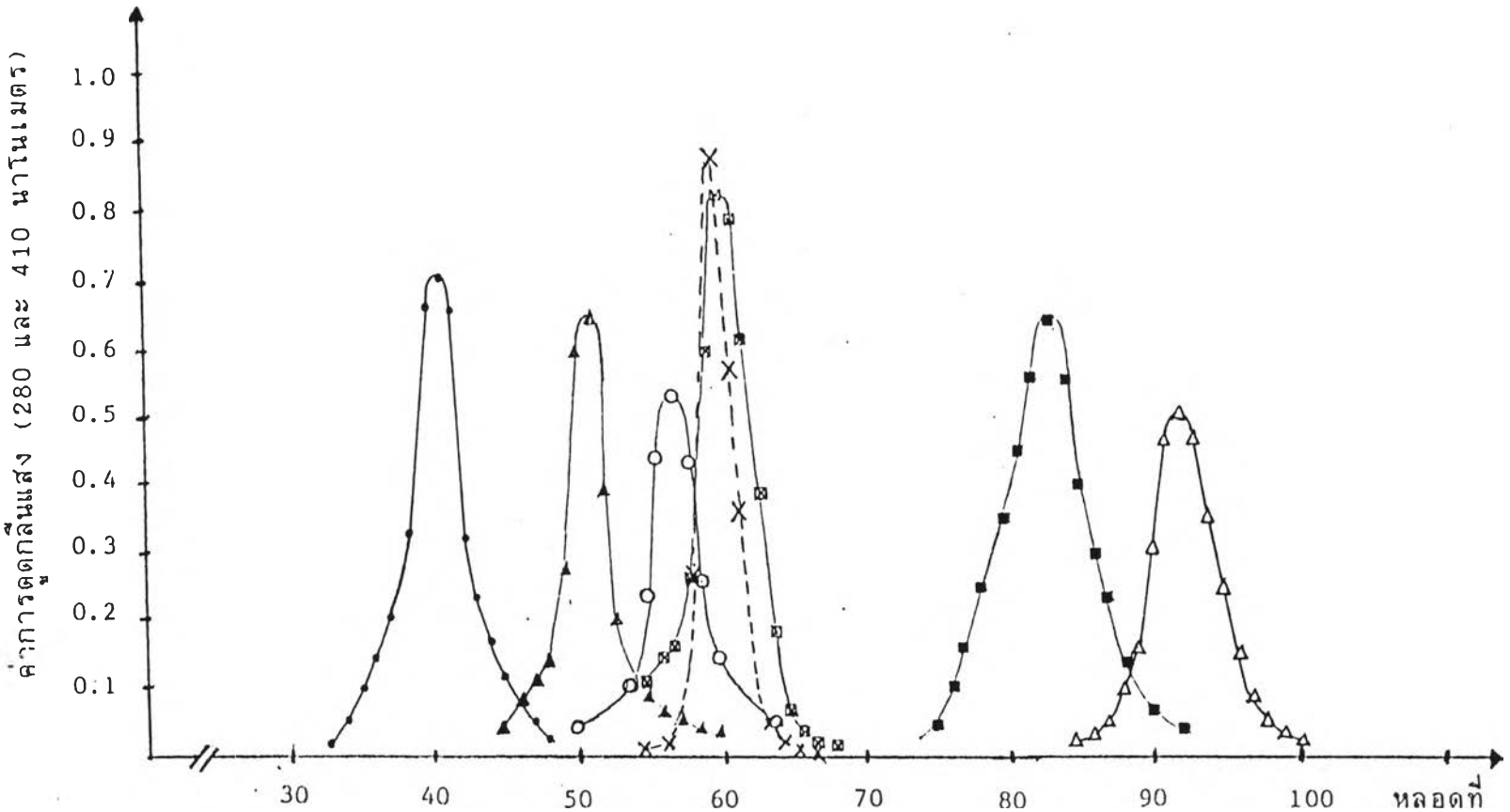
6.1 น้ำหนักโมเลกุล

จากการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ TOYOPEARL HW-55 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12.1 ได้ผลดังรูปที่ 16 และหลังจากคำนวณค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างค่า ลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า K_{av} ได้ผลดังรูปที่ 17

จากผลการทดลองผ่านเอนไซม์ลินามาเรสลงในคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน คำนวณหาค่า K_{av} ของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.36 เมื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานรูปที่ 17 จะได้น้ำหนักโมเลกุล ของเอนไซม์เป็น 110,000 ดาลตัน โดยประมาณ

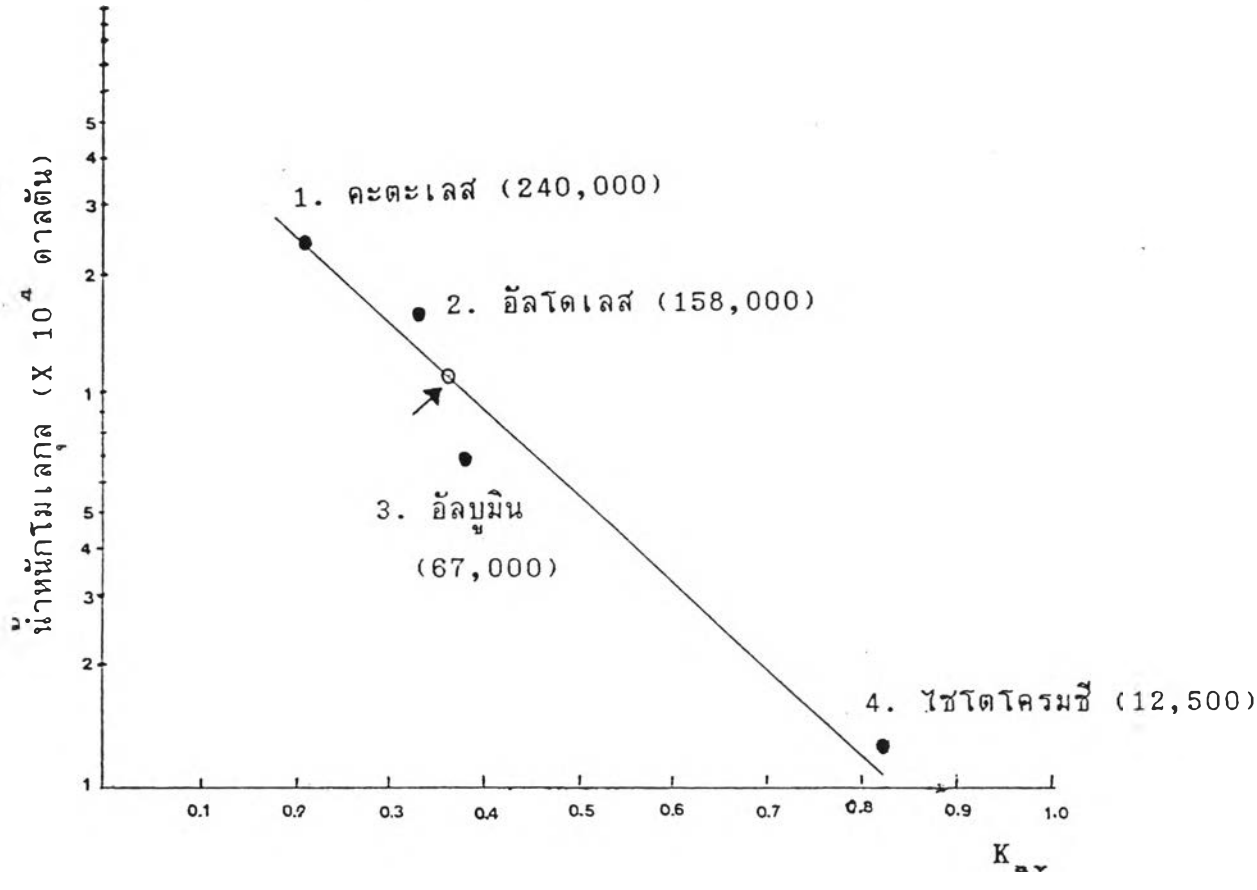
เป็นที่น่าสังเกตว่าจากรูปที่ 16 เอนไซม์ลินามาเรสน่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับอัลบูมิน (67,000) มากกว่าอัลโดเลส (158,000) เพราะเอนไซม์จะออกมาจากคอลัมน์ก่อนอัลบูมินเล็กน้อย นั่นคือน้ำหนักโมเลกุลน่าจะน้อยกว่า 110,000 ดาลตัน แต่กราฟมาตรฐานรูปที่ 17 เป็นค่าที่ได้จากการเฉลี่ยจึงทำให้ค่าของน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ประมาณโดยใช้ค่า K_{av} อาจมีค่าคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง แต่อย่างไรก็ตามการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเทียบค่า K_{av} กับกราฟมาตรฐาน K_{av} กับลอการิทึม ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานก็เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป (Andrew, 1964) ดังนั้นเราก็ยังถือว่าเอนไซม์ลินามาเรส มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 110,000 ดาลตัน โดยประมาณ

จากรายงานที่ผ่านมา Okafor และ Ejiofor (1985) พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากแบคทีเรีย L. mesenteroides มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 145,000 ดาลตัน โดยใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์ G - 200 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ แต่ต่างจากลินามาเรสของเชื้อรา F. equiseti (Ikediobi และคณะ, 1987) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600,000 ดาลตัน เช่นเดียวกับลินามาเรสจากมันสำปะหลัง



รูปที่ 16 แสดงเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ที่ทำให้บริสุทธิ์ส่วนหนึ่งแล้ว บนคอลัมน์ TOYOPEARL HW-55 ขนาด 70x2.5 ซม. เก็บสารละลายโปรตีน หลอดละ 3 มล. ที่อัตราการไหล 12 มล./ชม.

- อัลโดเลส
- คะตะเลส
- ไซโตโครมซี
- อัลบูมิน
- เอนไซม์ลินามาเรส
- บลูเดกซ์แตรน
- โปแตสเซียมไดโครเมต



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล และค่า K_{av} เมื่อประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุล ของเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 โดยปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

6.2 การหาค่า K_m ของเอนไซม์ต่อสับสเตรท

ในการทดลองหาค่า K_m ของเอนไซม์ลินามาเรสต่อสับสเตรทจะใช้สับสเตรท 2 ชนิดคือ ลินามาริน และPNPG

6.2.1 การหาค่า K_m เมื่อใช้ลินามารินเป็นสับสเตรท

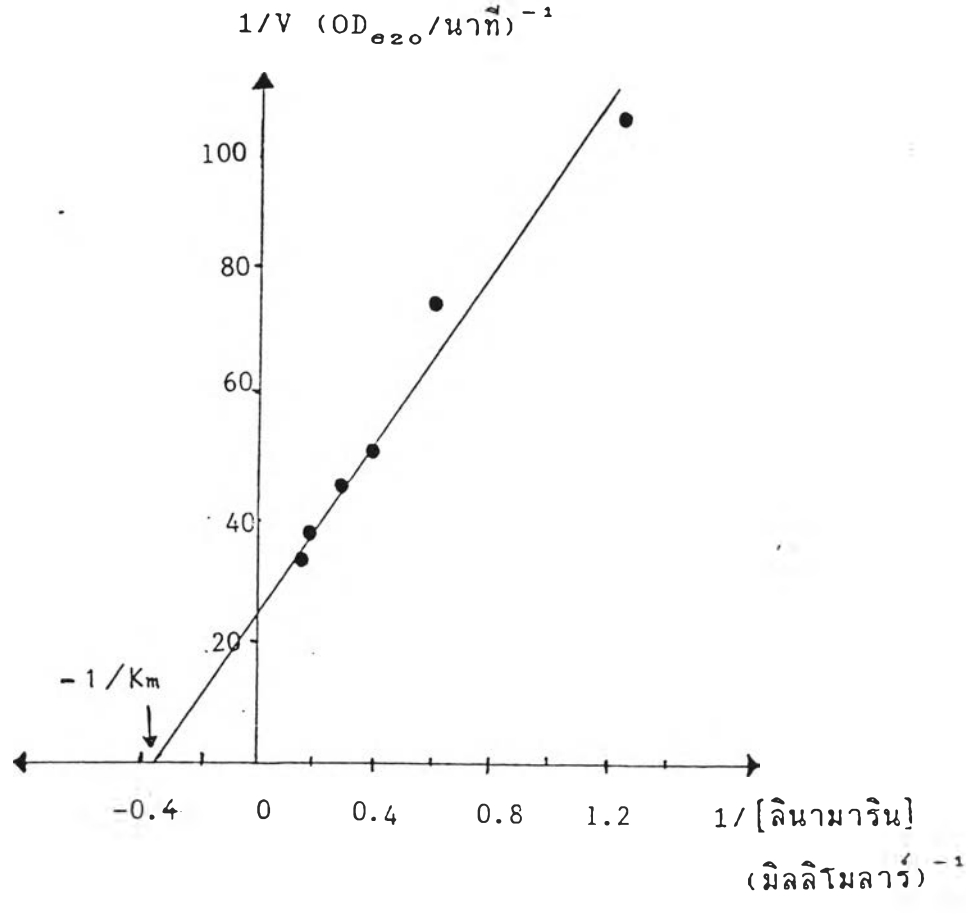
นำเอนไซม์ลินามาเรสความเข้มข้นพอเหมาะ ทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามาริน ความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 0.1-1.4 มก./มล.และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างกัน ตั้งแต่ 0 - 40 นาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟในรูปของ ไลน์-วีเวอร์เบิร์ก ระหว่าง $1/v$ และ $1/[s]$ ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12.2.1 ได้ผลดังรูปที่ 18 พบว่าเอนไซม์ลินามาเรส มีค่า K_m เท่ากับ 2.94 มิลลิโมลาร์

เมื่อเปรียบเทียบค่า K_m ของลินามาเรสจากยีสต์ กับลินามาเรสจากแหล่งอื่น พบว่าค่า K_m จะสูงกว่าลินามาเรสจากมันสำปะหลังที่มีค่า K_m = 1.45 (Cooke, 1987) และสูงกว่าลินามาเรสจาก F. equiseti ซึ่งมีค่า K_m = 0.51 มิลลิโมลาร์ (Ikediobi และคณะ, 1987)

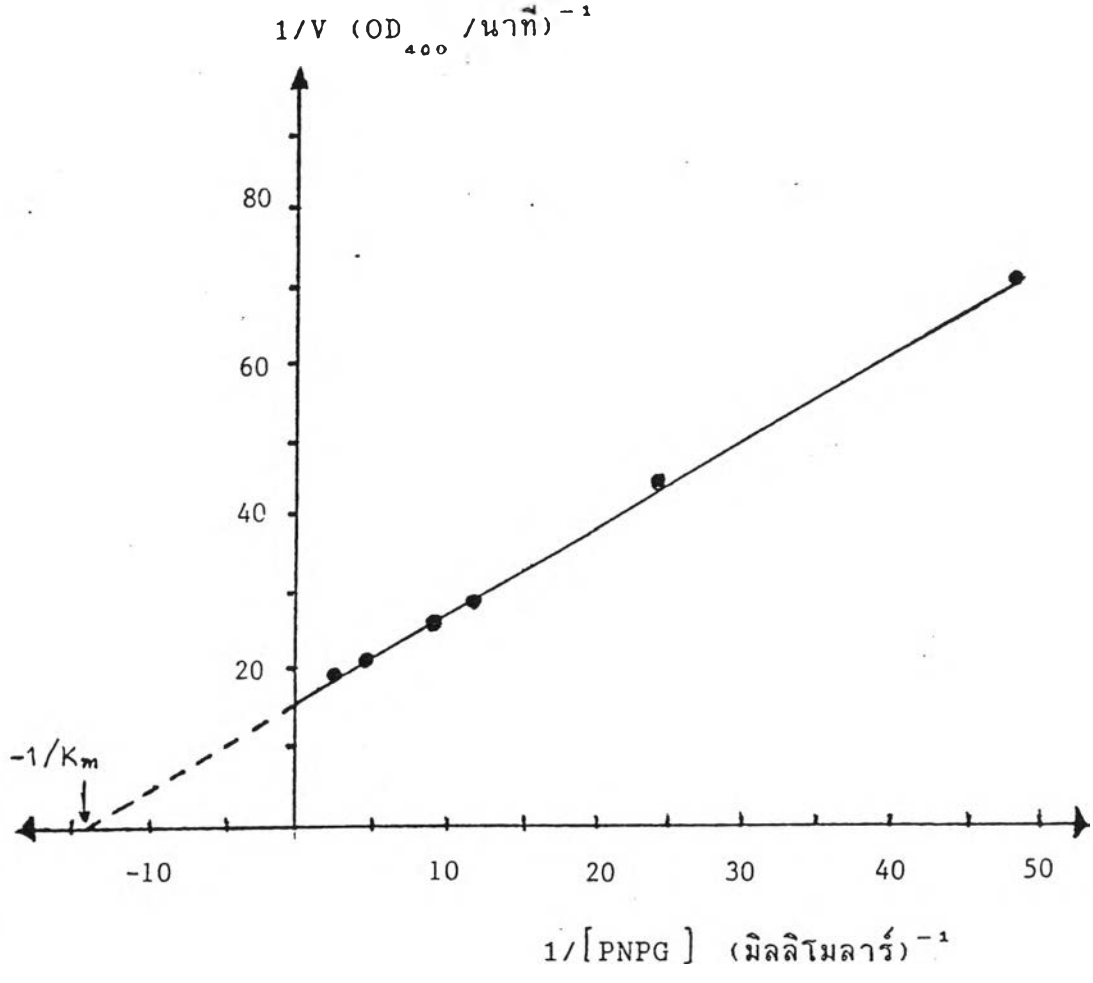
6.2.2 การหาค่า K_m เมื่อใช้ PNPG เป็นสับสเตรท

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ความเข้มข้นพอเหมาะ 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลาย PNPG 1 มล.ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.41 มิลลิโมลาร์ ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12.2.2 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟไลน์-วีเวอร์เบิร์ก ได้ผลดังรูป 19 จากรูปพบว่า เอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ มีค่า K_m = 0.07 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าลินามาเรสจากแหล่งอื่น ๆ คือ จากมันสำปะหลังมีค่า K_m ต่อ PNPG เท่ากับ 0.46 มิลลิโมลาร์ (Cooke, 1978) ลินามาเรสจาก F. equiseti มีค่า K_m เท่ากับ 0.36 มิลลิโมลาร์ (Ikediobi และคณะ, 1987) และลินามาเรสที่ได้จากพืชยางพารา ซึ่งมีค่า K_m ต่อ PNPG เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ (Sehnar และคณะ, 1987)

จากรายงานข้างต้น พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสจะมีค่า K_m ต่อสับสเตรทลินามารินสูงกว่า PNPG แสดงว่าเอนไซม์ลินามาเรสค่อนข้างจะมีแอฟฟินิตี (affinity) ต่อ PNPG ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์มากกว่าลินามาริน ซึ่งเป็นสับสเตรทจากธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์นี้ยังไม่บริสุทธิ์พอ คืออาจมี β-glucosidase ชนิดอื่นปะปนอยู่ด้วย เมื่อทำปฏิกิริยากับ PNPG จึงเกิดการย่อยสลายได้เร็วกว่า ลินามาริน หรืออาจเกิดจากตัวเอนไซม์ลินามาเรสเองมีตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทชนิดต่าง ๆ หลายตำแหน่ง ซึ่งแสดงว่าเป็นเอนไซม์ที่มีแอฟฟินิตีต่อสับสเตรทลินามารินต่ำ แต่จะมีแอฟฟินิตีต่อ PNPG สูงกว่า จึงทำให้ค่า K_m ต่อ PNPG ต่ำกว่าลินามาริน



รูปที่ 18 แสดงการหาค่า K_m โดยไลน์-วิเวอร์เบิร์กพลอต ของเอนไซม์ลินามาเรสจากเชื้อยีสต์ B-1-14 เมื่อใช้ลินามารินเป็นสับสเตรท



รูปที่ 19 แสดงการหาค่า K_m โดยไลน์-วิเวอร์เบิร์กพลอต ของเอนไซม์ฉินามาเรสจากเชื้อยีสต์ B-1-14 เมื่อใช้ PNPG เป็นสับสเตรท

ค่า K_m ของลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 เมื่อใช้ลินามารินเป็นสับสเตรท มีค่าค่อนข้างสูงคือ 2.94 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์นี้มีแอฟฟินิตีต่อสับสเตรทลินามาริน ค่อนข้างต่ำกว่าเอนไซม์จากแหล่งอื่น คือ F. equiseti และมันสำปะหลัง แต่เมื่อเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสจากยางพารา ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะจะมีค่า K_m ต่อ ลินามารินถึง 7.6 มิลลิโมลาร์

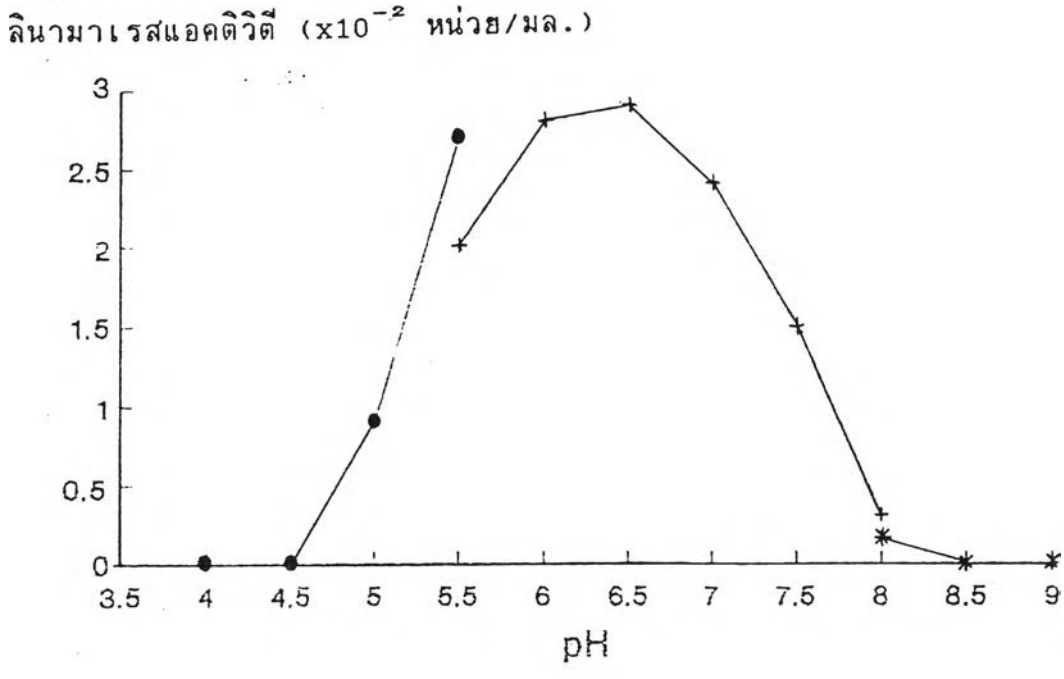
6.3 ผลของ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ลินามาเรส 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามารินที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีช่วงของ pH ต่างกันตั้งแต่ 4.0 - 9.5 ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังรูปที่ 20

จากรูปที่ 20 จะพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงอยู่ในช่วง pH 5.5-7.0 ของอะซิเตตและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.5 ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เมื่อ pH สูงขึ้นหรือต่ำลงกว่านี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง โดยที่ pH 4.0-4.5 ของอะซิเตตบัฟเฟอร์จะไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์

pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของลินามาเรสจากยีสต์ คือ pH 6.5 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกันกับเอนไซม์ลินามาเรสจากแหล่งอื่น ๆ ที่มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 5.0 - 6.5 ซึ่งสรุปได้ดังนี้

แหล่งของเอนไซม์	pHที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรส	เอกสารอ้างอิง
มันสำปะหลัง	6.0	McIlvaine (1921)
White clover	5.0	Maher (1971)
Butter bean	5.1-6.0	Itoh-Nashida และคณะ (1987)
F. equiseti	6.0	Ikediobi และคณะ (1987)
L. mesenteroides	6.0-6.5	Okafor และ Ejiofor (1985)
A. sydowi และ F. equiseti	5.0	Ikediobi และคณะ (1985)



รูปที่ 20 แสดงผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรสโดยการตรวจสอบแอคติวิตีในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

●—● แสดงถึง 0.1 โมลาร์อะซิเตดบัฟเฟอร์ pH 4.0-5.5

+—+ แสดงถึง 0.1 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.5-8.0

— แสดงถึง 0.1 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0-9.0

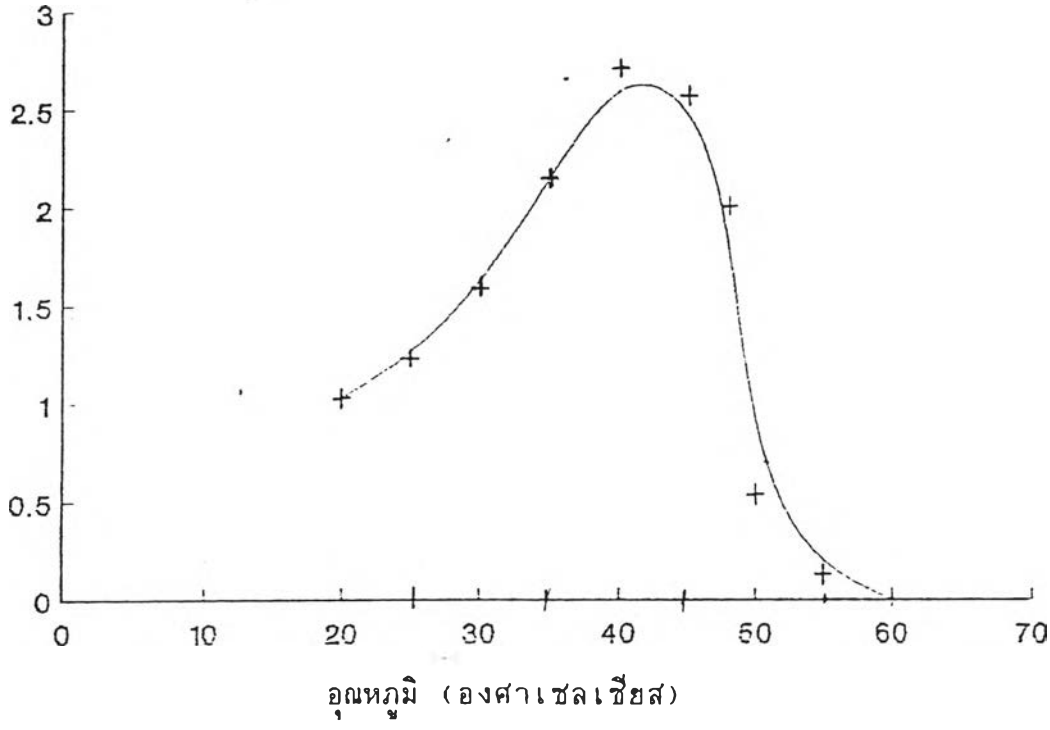
6.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นพอเหมาะ 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามารินใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองบทที่ 2 ข้อ 12.4 ได้ผลดังรูปที่ 21 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่ลินามาเรสจากแหล่งอื่นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ได้แก่ เอนไซม์จากมันสำปะหลัง ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Cooke, 1978) ลินามาเรสจากแบคทีเรีย L. mesenteroides ทำงานได้ดีที่ อุณหภูมิ 29 ± 2 องศาเซลเซียส (Okafor และ Ejiofor, 1985) ลินามาเรสจากเชื้อรา ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Ikediobi และคณะ,1987) และเอนไซม์จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดรวมกัน คือ A. sydowi และ F. equiseti จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Ikediobi และคณะ, 1985)

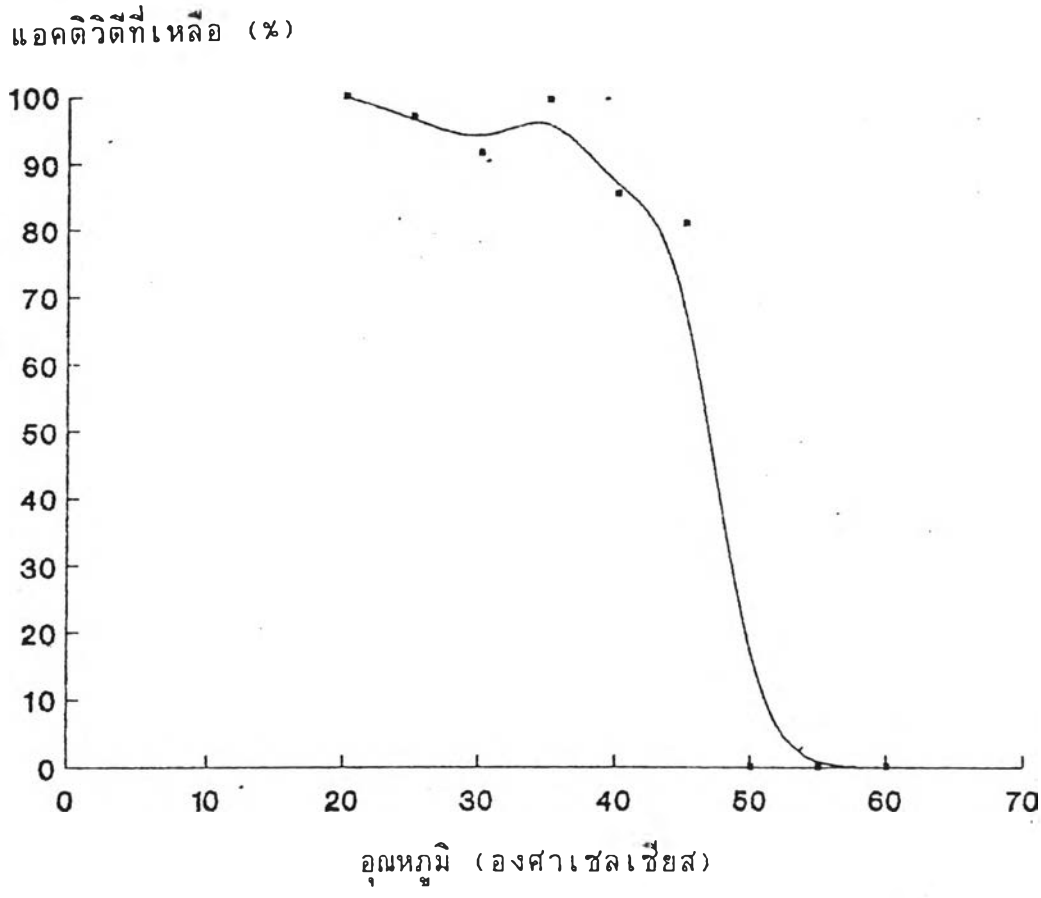
เนื่องจากเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์ สามารถทำงานได้ดีในช่วงของอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงคือ 40-45 องศาเซลเซียส จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการลดพิษไซยาไนด์ในมันสำปะหลังหมัก ซึ่งพบว่าจะมีอุณหภูมิสูงขึ้นระหว่างการหมัก (Akinrele,1964)

6.5 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน

บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 20-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้นก่อนนำไปบ่มดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12.5 ได้ผลดังรูปที่ 22 พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ ขณะที่ช่วง 25 - 45 องศาเซลเซียส ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่มากกว่า 80% และที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จะไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เหลืออยู่ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จาก F. equiseti จะมีความเสถียรถึง 45 องศาเซลเซียส (Ikediobi, 1987) และ L. mesenteroides จะสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 55 และ 60 องศาเซลเซียส ภายใน 32 และ 18 นาที ตามลำดับ (Okafor และ Ejiofor, 1985)



รูปที่ 21 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรสใน 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 20-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 22 แสดงความเสถียรของเอนไซม์ลินามาเรสที่แยกจากยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อบ่มเอนไซม์ลินามาเรสใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และตรวจวัดแอคติวิตีที่เหลือ

7. ผลการศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ B-1-14

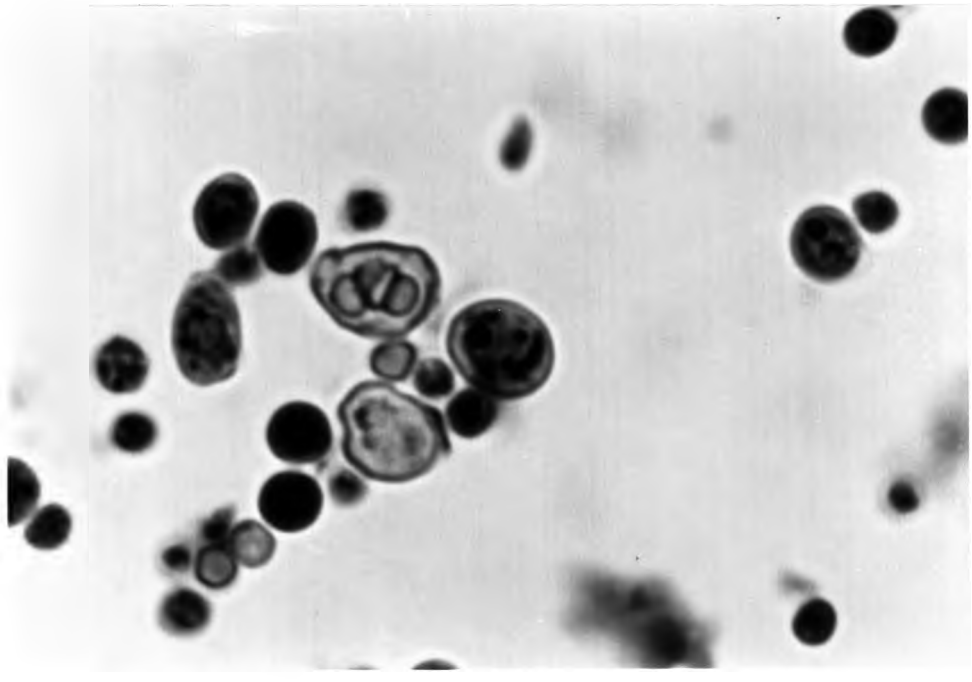
7.1 ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา (Morphological Studies)

ยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 มีรูปร่างกลมรี มีขนาดของเซล 60.0 x 90.0 µm. โดยเฉลี่ย หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 48 ชม. การแตกหน่อเป็นแบบแตกออกจากหลายจุด (Multipolar budding) และเชื้อยีสต์นี้สามารถตกตะกอนได้ดี มีฝ้าเกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเหลว เมื่อศึกษาการขยายพันธุ์แบบใช้เพศโดยกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ในอาหารแข็งโกรอดคาวา (Gorodkawa) และโปตัสเซียมอะซิเตต (Potassium acetate) พบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปร่างแบบหมวก (Hat-shaped)ดังรูปที่ 23 จำนวน 1-4 อัน อยู่ในแอสคัส

7.2 ผลการทดสอบทางสรีระวิทยา (Physiological test)

จากการทดสอบการเจริญของเชื้อยีสต์ B-1-14ในอาหารชนิดต่าง ๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

จากผลการใช้ Key และผลการทดลองทั้งหมดดังรายงานข้างต้นเมื่อนำไปศึกษาตามวิธีการจำแนกเชื้อยีสต์ของLodder (1970) พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ที่ได้น่าจะเป็น Hansenula anomala



รูปที่ 23 แสดงแอสโคสปอร์รูปหมวก (Hat-shaped) ในแอสคัสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 (Objective 100 x) เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งโปแตสเซียมอะซิเตตบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบทางสรีรวิทยาของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ

	กลูโคส	กาแลคโตส	ซูโครส	มอลโตส	แลคโตส	เมลิไบโอส	ราฟิโนส	อินโนซิทอล	อินุลิน	แรมโนส
การหมักน้ำตาล (Fermentation)	+ᵃ	0ᵃ	+ᵃ	+ᵃ	0ᵃ	0ᵃ	+ᵃ	0ᵃ	-	-
การใช้น้ำตาล (Assimilation)	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
การใช้ไนโตรเจน (NO_3 assimilation)		+								
การเจริญในอาหารที่ไม่มีวิตะมิน (Vitamin-free medium)		+								

\+ หมายถึงมีการเจริญของเชื้อดีมาก

0 หมายถึงไม่มีการเจริญของเชื้อ

+ᵃ หมายถึงมีแก๊สเกิดขึ้น

0ᵃ หมายถึงไม่มีแก๊สเกิดขึ้น