บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกเชื้อยีสต์ 131 สายพันธุ์ จากมันสำปะหลังสดหมัก เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส โดยการคัดเลือกเบื้องต้น โดยใช้ PNPG เป็นสับสเตรท พบว่ามี 101 สายพันธุ์ ที่ให้แอคติวิตี ของเบต้า-กลูโคซิเดส และเมื่อนำมาคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สร้างลินามาเรส โดยเลี้ยงในอาหารเหลวซาเพคดอกซ์ ที่มีลินามาริน พบว่ามี 42 สายพันธุ์ ที่ให้แอคติวิตีของลินามาเรส ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันที่ไม่มีลินามารินจะมี 12 สายพันธุ์ ใน 42 สายพันธุ์ดังกล่าว ที่ให้แอคติวิตีของลินามาเรส แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จากยีสต์ส่วนใหญ่ในสภาวะที่มีลินามารินจะสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีลินามาริน ยกเว้นในยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์สายพันธุ์นี้ เป็น Constitutive enzyme เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ทั้ง 12 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่ไม่มีลินามาริน 2 ชนิด คือซาเพคดอกซ์และYM พบว่าเชื้อยีสต์ที่ทำการทดลองให้ลินามาเรสแอคติวิตีในอาหาร YM สูงกว่าในซาเพคดอกซ์ โดยที่ยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ลินามาเรสแอคติวิตีสูงกว่าอีก 11 สายพันธุ์ ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงเลือกศึกษา การผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ในอาหารเหลว YM ต่อไป

ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ทั้งหมด พบว่าลินามาเรสที่ได้จากยีสต์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล ต้องทำการสกัดออกจากเซลด้วยวิธีทางกายภาพ โดยใช้เครื่องคลื่นเสียงสูง ก่อนวัดแอคติวิตี

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 เพื่อผลิตเอนไซม์ลินามาเรสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปรับสูตรซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน, แบคโตเปปโตน 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน, ผงสกัดมอลท์ 0.3% และผงสกัดยีสต์ 0.3% เป็นแหล่งของวิตามิน จะทำให้มีการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสได้สูง นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมแหล่งของเกลือแร่บางชนิดได้แก่ $FeSO_4$, K_2HPO_4, $MgSO_4$ และ KCl ไม่มีผลในการเพิ่ม แอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส เช่นเดียวกับการเติมสารลดแรงตึงผิวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติม Tween-80 ในอาหารเหลวจะช่วยให้มีการหลั่งของเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลได้เล็กน้อย แต่แอคติวิตีภายในเซลจะลดต่ำลง ในขณะที่การเติม Triton X-100 เข้มข้น 1-5% ในอาหารเหลว จะมีผลยับยั้งลินามาเรสแอคติวิตีจาก

ยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงไม่มีการเติมแหล่งของเกลือแร่และสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้สภาวะอื่นๆที่มีผลต่อการผลิตลินามาเรสจากยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 ได้แก่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 5.0-6.0 และเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้แอคติวิตีของลินามาเรสได้สูงที่สุด

จากการทดลองเติม KCN ที่ความเข้มข้น 10-250 ppm ลงในอาหารเหลวปรับสูตรพบว่า KCN ที่ความเข้มข้น 40 ppm จะกระตุ้นให้มีการสร้างลินามาเรสสูงขึ้นกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ B-1-14 ในอาหารปรับสูตรที่มีการเติม KCN 40 ppm เทียบกับเมื่อไม่มีการเติม KCN พบว่าเชื้อจะสามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มี KCN ได้เร็วกว่าในสภาวะที่มี KCN เพราะ KCN จะเป็นตัวยับยั้งกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนทำให้ยีสต์ต้องมีการปรับตัวเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอด ดังนั้นการเจริญของยีสต์ในอาหารเหลวที่มี KCN จึงช้ากว่า แต่จะพบว่ายีสต์มีการสร้างลินามาเรสในสภาวะที่มี KCN ได้สูงกว่าสภาวะที่ไม่มี KCN เล็กน้อยในชั่วโมงที่ 48

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงได้ทำการผลิตเอนไซม์จากลินามาเรสจากยีสต์ B-1-14 ในระดับขยายส่วนเพื่อนำมาศึกษาการทำเอนไซม์ลินามาเรสให้บริสุทธิ์ โดยมีขั้นตอนคือ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในช่วง 30-60% การผ่านคอลัมน์ DEAE-TOYOPEARL 650 M และคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน TOYOPEARL HW-55 ตามลำดับ จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ดังกล่าวจะทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 61.5 เท่า โดยที่มีปริมาณเอนไซม์เหลืออยู่ 41.2 % ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น และมีแอคติวิตีจำเพาะ 17.84 หน่วยต่อมก.โปรตีน เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส นั้นพบว่าสามารถแยกแถบโปรตีนออกได้ 2 แถบ ซึ่งวัดค่า R_f ได้เท่ากับ 0.32 และ 0.46 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ซึ่งอาจเกิดจากระบบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ไม่เหมาะสมกับเอนไซม์ หรือความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระแสไฟฟ้าอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไป

จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 110,000 ดาลตัน โดยคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน TOYOPEARL HW-55 มีค่า K_m ต่อสับสเตรทลินามารินและ PNPG เท่ากับ 2.94 และ 0.07 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 20-45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ pH 6.5

ในการศึกษาทางอนุกรมวิธาน เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ สายพันธุ์ B-1-14 ตามวิธีของ Lodder (1970) พบว่าเป็นเซลที่มีรูปร่างรี มีขนาดประมาณ 60.0x90.0 μm. สร้างแอสโคสปอร์ รูปหมวก (Hat shaped) เมื่อเลี้ยงในอาหารโปแตสเซียมอะซิเตด เชื้อนี้อาจเป็น Hansenula anomala

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองศึกษาผลของการให้อากาศเพื่อเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วต่ำจะให้เอนไซม์แอคติวิตีสูงกว่าการเลี้ยงที่ความเร็วสูง จึงน่าจะทดลอง ศึกษาการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) และในสภาวะกึ่งไร้อากาศ ซึ่งสามารถวัดปริมาณอากาศได้เพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์

2. จากการทำอิเลคโตรโฟริซิสของเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งสามารถวัดแถบของโปรตีนได้ 2 แถบ แต่ไม่สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ จึงน่าจะศึกษาวิธีการอื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

3. เนื่องจากเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์เป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล ดังนั้นในการนำไปใช้งานเพื่อลดนิษในมันสำปะหลังหมัก เพื่อทำเป็นอาหารสัตว์ จึงเหมาะที่จะนำยีสต์ทั้งเซลปนลงไปในมันหมัก ซึ่งนอกจากจะลดนิษไซยาไนด์ได้แล้ว ยังเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลังได้อีกด้วย

4. ควรจะมีการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ในระดับขยายส่วน เพื่อเป็นการค้า