หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ ในการผลิตเอนไซม์

5.1.1 อิทธิพลของอาหารเสริมและปริมาณที่ใช้ พิจารณาจากตารางที่ 9 จะเห็นว่า เมื่อใส่อาหารเสริมคือ K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4$ ทั้ง 4 ตัว เชื้อจะมีการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าใส่ KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4$ หรือ K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4$ อย่างใดอย่างหนึ่ง มากกว่าใส่เฉพาะ KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ หรือ K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ หรือ K_2HPO_4 หรือ KH_2PO_4 เพียงอย่างเดียว และมากกว่าไม่ใส่อาหารเสริมชนิดใดเลย ทั้งนี้ตรงกับผลการทดลองของ Kundu (25) และ Park (33) ดังนั้นจึงต้องใช้อาหารเสริมทั้ง 4 ร่วมกัน เพราะจะให้ค่า α-amylase activity สูงกว่าใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง

พิจารณาจากตารางที่ 10 จะเห็นว่า เมื่อเพิ่มปริมาณอาหารเสริมทั้ง 3 (ยกเว้น) $FeSO_4$ (ไม่ได้ทำการแปรค่า เพราะปริมาณที่ใส่น้อยมาก คือ 0.001% ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Park (33) และ Kundu (25) รายงานว่าโลหะ Fe^{++}, Mn^{++} และ Mo^{++} ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากนัก) โดยแปรค่า K_2HPO_4 จาก 0.025-0.1%, KH_2PO_4 0.025-0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ จาก 0.025-0.05% พบว่า เมื่ออาหารเสริมเป็น 0.1% K_2HPO_4 0.1% KH_2PO_4 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001% $FeSO_4$ เชื้อจะผลิตเอนไซม์ให้ค่า α-amylase activity มากที่สุดคือ 56.0 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งปริมาณที่ใช้ตรงกับผลการทดลองของ Kundu (25) และ Park(33)

5.1.2 เปรียบเทียบแหล่งของไนโตรเจนระหว่างยีสต์สกัด (yeast extract) กับยีสต์แห้ง พิจารณาจากตารางที่ 11 จะเห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบแหล่งของไนโตรเจนระหว่างยีสต์แห้งกับยีสต์สกัดโดยสภาวะอย่างอื่นเหมือนกัน พบว่าค่า α-amylase activity ของยีสต์แห้งจะให้ค่ามากที่สุดในเวลาเพียง 2 วัน และค่าจะลดลง โดยมีอาหารเสริมเป็น 0.1% K_2HPO_4, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $FeSO_4$ ส่วนกรณีของยีสต์สกัดพบว่าค่า α-amylase activity

จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ และจะให้ค่าสูงสุดเมื่อ 6 วันผ่านไป โดยจะให้ค่าเป็น 5 เท่าของยีสต์แห้ง การที่เป็นเช่นนี้เพราะปริมาณ soluble protein ในยีสต์ทั้ง 2 แตกต่างกัน โดยจากตารางที่ 12 พบว่ายีสต์สกัดมีปริมาณ soluble protein เป็น 4 เท่าของยีสต์แห้ง ในขณะที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่า ๆ กัน ซึ่งเชื้อราสามารถนำเอาโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำได้ไปสร้างเอนไซม์เท่านั้น ดังนั้นเราจึงเพิ่มปริมาณของยีสต์แห้งให้เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าของปริมาณเดิมที่ใช้ เพื่อให้มีปริมาณ soluble protein เท่ากัน

5.1.3 <u>อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน</u> พิจารณาจากตารางที่ 13 จะเห็นว่าเมื่อปริมาณของแป้งมันที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนเพิ่มขึ้นจาก 2-28% (นน. เปียก) โดยปริมาณของยีสต์แห้งคงที่ (4%) ค่า α-amylase activity จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะมีค่าใกล้เคียงกันเมื่อปริมาณแป้งเป็น 20-28% โดยช่วง 24-28% ค่า α-amylase activity จะไม่เพิ่มขึ้น ระยะเวลาที่เอนไซม์มีค่ามากที่สุดจะอยู่ในช่วง 4 วัน ซึ่งนานกว่าข้อ 5.1.2 เนื่องจากปริมาณแป้งมีค่ามากขึ้น เชื้อก็สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้มากขึ้น จึงอยู่ในช่วง logarithmic นานก่อนจะเข้า stationary phase โดยปริมาณแป้งที่มีค่าเหมาะสมที่สุดเป็น 20% (นน. เปียก) ในขณะที่ปริมาณยีสต์แห้งเป็น 4% (นน. เปียก) K_2HPO_4 0.1% (w/v), KH_2PO_4 0.1% (w/v), $MgHO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% (w/v), และ $FeSO_4$ 0.001% (w/v)

การที่ปริมาณแป้งมากขึ้น แล้ว α-amylase activity ไม่เพิ่มขึ้นหรือลดลงนั้น เพราะเมื่อแป้งมีมาก ๆ จะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้ในการทำให้เชื้อเจริญเติบโต น้ำตาลนี้จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ทำให้ค่า α-amylase activity ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hockenhull (22)

5.2 <u>การศึกษาอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในการผลิตเอนไซม์</u>

5.2.1 <u>ระยะเวลาการหมักที่ให้ α-amylase activity ดีที่สุด</u> พิจารณารูปที่ 11 จะเห็นว่า เมื่อนำอาหารที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด จากข้อ 3.4.1 มาทำการหมัก พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อจะเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ และมีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น และจะให้ค่า α-amylase activity

activity มากที่สุด เมื่ออยู่ในช่วง 64-68 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ค่ามากที่สุดเมื่อ 68 ชั่วโมง แต่ช่วงนี้ก็ไม่แตกต่างกันมากนัก อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับการทดลองของ Ghieldyal (17) ฉะนั้นจึงใช้เวลาเป็นหลัก ในการดึงตัวอย่างมาหา α-amylase activity ในการศึกษาสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ต่อไป

5.2.2 อิทธิพลของการกวน พิจารณารูปที่ 12 จะเห็นว่าเมื่อความเร็วของเครื่องกวนเป็น 700 รอบ/นาที จะให้ค่า α-amylase activity มากที่สุด เนื่องจากน้ำหมักที่ใช้มีความเข้มข้นสูง ถ้ากวนด้วยความเร็วต่ำ ๆ จะทำให้อากาศเข้าไปผสมกับน้ำหมักในถังหมักได้น้อย จึงจำเป็นต้องเพิ่มความเร็วของเครื่องกวนเพื่อให้ผสมได้ดียิ่งขึ้น (49) และพบว่าเมื่ออัตราการกวนสูงกว่า 700 รอบ/นาที แล้วค่า α-amylase activity จะลดลง เพราะการกวนด้วยอัตราที่เร็วเกินไป จะมีผลทำให้เซลล์แตก (autolysis) ได้ง่าย ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ลดลง (5,32,49)

5.2.3 อิทธิพลของอุณหภูมิ พิจารณารูปที่ 13 จะเห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเป็น 35 องศาเซลเซียส จะให้ค่า α-amylase activity ดีที่สุด คือ 151.5 หน่วย/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 68 ส่วน 37 และ 30 องศาเซลเซียส มีค่า 145.5 และ 141.0 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้นี้เหมือนกับของ Kundu (25) เพราะเมื่อเชื้อเจริญเติบโตขึ้นในน้ำหมัก จะผลิตเอนไซม์และให้พลังงานความร้อนออกมาในช่วงวันที่ 1-3 ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น จึงจำเป็นต้องใช้น้ำผ่านเข้าและออก ช่วยเป็นตัวทำให้เย็น และในวันที่ 3-4 ของการหมักก็ยังให้ความร้อนออกมาเล็กน้อย ถึงจะมีการให้ความร้อนแก่น้ำหมักเพื่อรักษาอุณหภูมิให้คงที่บ้าง แต่ก็ไม่มากนัก และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ยังทำให้แป้งมันสามารถถูกย่อยได้เร็ว ซึ่งเชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น ทำให้มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดี เหมือนกับการทดลองของ Ghieldyal(17)

5.2.4 อิทธิพลของการให้อากาศ พิจารณารูปที่ 14 จะเห็นว่า เมื่ออัตราการให้อากาศเป็น 1.0 VVM เชื้อจะให้ค่า α-amylase activity สูงสุด คือ 192.0 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าอัตราการให้อากาศ 0.75, 1.25, 1.50 VVM ซึ่งมีค่า α-amylase activity เป็น 157.5, 191.5, 190.5 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับในระยะเวลาเท่ากัน แสดงว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1.0-1.5 VVM และค่าที่ดีที่สุดคือ 1.0 VVM ซึ่งตรงกับผลการทดลอง

ของ Ghieldyal et al.(17) และ Le. Mense et al.(26)

5.2.5 อิทธิพลของปริมาตรหัวเชื้อที่ใช้ พิจารณารูปที่ 15 จะเห็นว่าเมื่อเราเพิ่มปริมาตรหัวเชื้อลงไป จะไปเพิ่มค่า α-amylase activity ด้วย เมื่อเพิ่มปริมาตรหัวเชื้อจาก 2.5% เป็น 5.0% ของปริมาตรน้ำหมัก เชื้อจะผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่า α-amylase activity 157.5 และ 292.0 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับในเวลา 68 ชั่วโมง

5.3 การศึกษาการเตรียมเอนไซม์ที่ผลิตได้

5.3.1 เอนไซม์เข้มข้น

5.3.1.1 อิทธิพลของอุณหภูมิในการระเหย

เอนไซม์เข้มข้นที่ได้ซึ่งมีความเข้มข้น 35 องศาบริกซ์ มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลอ่อน ไม่จับกันเป็นก้อน และไม่มีตะกอนตกลงมา จากการพิจารณาตารางที่ 14 จะเห็นว่าเมื่อทำการระเหยเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส สารละลายเข้มข้นสุดท้ายจะมีค่า α-amylase activity ใกล้เคียงกัน คือ 593.07 และ 600.4 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส α-amylase activity ของสารละลายสุดท้ายจะลดลงมากจนเหลือ 304.3 หน่วย/มิลลิลิตร โดยค่า Recovery efficiency (%) ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส จะใกล้เคียงกัน คือประมาณ 70% ส่วนที่ 70 องศาเซลเซียส จะมีค่าน้อยคือประมาณ 36.0% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม เพราะว่าเอนไซม์จะสูญเสีย activity น้อย และอุณหภูมิที่ดีที่สุดคือ 60 องศาเซลเซียส เพราะใช้เวลาในการระเหยน้ำน้อยกว่า 50 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนั้น เอนไซม์จะถูกทำลายไปมาก ทำให้ค่า activity ลดลง

5.3.1.2 เสถียรภาพของเอนไซม์เข้มข้นที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส)

พิจารณาจากตารางที่ 15 จะเห็นว่า เมื่อทำการเก็บเอนไซม์เข้มข้นที่มีความเข้มข้น 35 องศาบริกซ์ ไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส โดยบรรจุในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน พบว่าค่า α-amylase activity จะไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม

มากนัก แสดงว่าเอนไซม์เข้มข้นที่ผลิตได้มีเสถียรภาพและอายุการเก็บที่ดี เนื่องจากใส่โปแตสเซี่ยมซอเบท เป็นยากันเสียและเป็นตัว Stabilizer ลงไปด้วย (39)

พิจารณาจากตารางที่ 17 จะเห็นว่าเมื่อนำเอนไซม์เข้มข้นที่ผลิตได้ที่ผลิตได้มาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ของ NOVO หรือเอนไซม์จากการวิจัยอื่น ๆ พบว่า α-amylase activity (หน่วย/มิลลิลิตร) ที่ได้ใกล้เคียงกับของ กนิษฐา (1) และมากกว่าของ Ghieldyal (17) ตามลำดับ แต่น้อยกว่าของ NOVO ซึ่งผลิตขึ้นเป็นการค้านั้นมาก และในกรณีของค่า specific activity (หน่วย/กรัม soluble protein) เอนไซม์ที่ผลิตได้นี้จะมีค่าน้อยกว่าของ NOVO เช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก NOVO ได้ทำการตกตะกอนเอนไซม์ที่ได้ก่อนทำให้เข้มข้น เพราะเมื่อเอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้นจะมีค่า specific activity มากขึ้นด้วย (15, 30) นอกจากนี้คุณสมบัติอื่น ๆ ของเอนไซม์ที่ได้มีดังนี้คือ ค่าสมมูลย์เด็กซ์โตรสเป็น 27.68% ในขณะที่ NOVO เป็น 75.43% (โดยมีสภาวะเหมือนกันดังภาคผนวก ข) ซึ่งจะเห็นว่าเป็นค่าที่มากพอสมควร นอกจากนี้มีโปรตีน 2.45% ส่วนของ NOVO จะมีค่ามากกว่าเพราะได้ทำการตกตะกอนโปรตีนก่อนทำเป็นสารละลายเข้มข้น เอนไซม์เข้มข้นที่ได้มี yield (หน่วย/กรัมของแป้ง) เท่ากับ 506.59

5.3.2 <u>เอนไซม์ผง</u> พิจารณาจากตารางที่ 16 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำเอนไซม์เข้มข้นไปเข้าเครื่อง spray dryer โดยใช้สภาวะเหมือนข้อ 3.5.2 จะได้เอนไซม์ออกมา 2 อย่างคือ ชนิดไม่เติมเด็กซ์ทรินก่อนทำให้แห้ง (35 องศาบริกซ์) กับเติมเด็กซ์ทรินก่อนทำให้แห้ง (40 องศาบริกซ์) ในกรณีเติมเด็กซ์ทรินจะมีทั้งที่ออกจากขวดเก็บ (collector) และจากใน chamber เมื่อพิจารณาลักษณะของผง พบว่าขนาดของผงทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน แต่ชนิดที่เป็น 40 องศาบริกซ์ตัวอย่างที่เก็บจากขวดเก็บตัวอย่างจะละเอียดที่สุด สีของผงจะใกล้เคียงกันคือ จากน้ำตาลอ่อนถึงเหลืองอ่อน สำหรับเนื้อสัมผัสพบว่า ถ้าเป็น 40 องศาบริกซ์ ที่เก็บจากขวดเก็บตัวอย่าง จับแล้วรู้สึกลื่นมือส่วนอีก 2 อย่างจับแล้วจะเยิ้มเหนียวติดมือ เนื่องจากมีคุณสมบัติ hygroscopic มากกว่า

พิจารณาจากตารางที่ 16 พบว่า specific activity จะเรียงลำดับดังนี้คือ 35 องศาบริกซ์, 40 องศาบริกซ์ (เก็บจากขวดเก็บตัวอย่าง) และ 40 องศาบริกซ์ (เก็บจากใน chamber โดยมีค่า specific activity เป็น 7.2×10^3, 6.35×10^3, 6.04×10^3

หน่วย/กรัม soluble protein ตามลำดับ เมื่อทำการเก็บไว้ในถุงอะลูมิเนียมเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าค่าจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก คือมีค่า 7.18×10^3, 6.34×10^3 และ 6.02×10^3 หน่วย/กรัม soluble protein ตามลำดับ โดยลักษณะของเอนไซม์ผงที่มองเห็นและสัมผัสหลังการเก็บจะเหมือนเดิมทุกประการ แสดงว่าถุงอะลูมิเนียมเหมาะสำหรับการเก็บเอนไซม์ผงได้ดีโดยไม่มีการเยิ้มเหนียวติดกันเป็นก้อน

พิจารณาจากตารางที่ 17 จะเห็นว่าเอนไซม์ผงที่ได้ทั้ง 3 ชนิด คือ 35 องศาบริกซ์, 40 องศาบริกซ์ (เก็บจากขวดเก็บตัวอย่าง), 40 องศาบริกซ์ (เก็บจาก chamber) จะมี yield (หน่วย/กรัมของแป้ง) เป็น 39.76, 93.64 และ 479.51 โดยมีค่า specific activity เป็น 7.2×10^3, 6.35×10^3, 6.04×10^3 หน่วย/กรัม soluble protein ค่าสมมูลย์เด็กซ์โตรสเป็น 24.99, 23.60, 22.90%, โปรตีนเป็น 1.84, 1.42, 0.98% และความชื้นเป็น 2.36, 2.38, 2.13% ตามลำดับ และในกรณีของ NOVO จะมีค่า specific activity เป็น 141.34×10^3 หน่วย/กรัม soluble protein, สมมูลย์เด็กซ์โตรส 68.52, โปรตีน 14.26%, ความชื้น 13.17% การที่ค่า specific activity ของเอนไซม์ผงที่ผลิตได้ต่ำกว่าของ NOVO ประมาณ 20-30 เท่า เป็นเพราะเหตุผลคล้ายข้อ 5.1.2 นอกจากนี้เนื่องมาจากบริษัท NOVO ได้ผลิตเอนไซม์เป็นการค้ามานาน จึงได้ทำการค้นคว้าวิจัยเรื่องการเลือกสายพันธุ์ที่ดี ตลอดจนมีเครื่องมือที่ทันสมัยทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีค่า activity และปริมาณที่สูงด้วย