# บทที่ 4

## การอภิปรายผล

ในการแยกเชื้ออะไมโลไมซีสจากลูกแป้งสุราและลูกแป้งข้าวหมากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้ออะไมโลไมซีสได้ทั้งสิ้น 18 สายพันธุ์คือ 13 สายพันธุ์จากลูกแป้งข้าวหมาก และอีก 5 สายพันธ์จากลูกแป้งสุรา เมื่อนำเชื้ออะไมโลไมซีสทั้ง 18 สายพันธุ์นี้ไปคัดเลือกเชื้อโดยวิธีการปลูกเชื้อบนดิสค์ พบว่าเชื้ออะไมโลไมซีสทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จะผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีย่อยแป้งดิบได้มากน้อยแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 21 โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราของจังหวัดชัยภูมิ สามารถผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็งรำหยาบได้สูงถึง 33.1 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 3) จากการคัดเชื้อโดยใช้แป้งดิบเป็นสับสเตรทนี้ทำให้สรุปได้ว่าเอนไซม์ที่เชื้ออะไมโลไมซีสสร้างออกมามีความสามารถย่อยแป้งดิบ

ผลการทดลองเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของรำหยาบกับแกลบ (50:1) และอาหารที่มีรำละเอียดกับแกลบ (50:1) พบว่าการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งรำหยาบสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีกับแป้งดิบได้ 38 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อบนรำละเอียด เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีต่ำเพียง 7 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้รำหยาบเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเหมาะสมมากกว่ารำละเอียดนี้ พอจะอธิบายได้ว่า ขนาดของรำหยาบ (particle size) ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความแน่นของเนื้ออาหาร (texture) พอที่จะให้เชื้อราแทงสายใยเจริญได้ทั่ว และมีปริมาณอากาศในอาหารพอเหมาะ ทั้งนี้เพราะเชื้ออะไมโลไมซีสเป็นราจำพวกต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เมื่อได้ทดลองผสมแกลบในอาหารแข็งเพื่อเพิ่มปริมาณอากาศ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบลดลงดังแสดงในรูปที่ 7 การผสมแกลบอาจทำให้เนื้ออาหารไม่แน่นพอ เมื่อสายใยราเจริญ อาจแตกขาดได้ง่าย และอีกประการหนึ่งจากรายงานของ Narahara และคณะ (1982) แสดงให้เห็นว่า กาซคาร์บอนไดออกไซด์ 2% จะเพิ่มการผลิตอะไมเลส จึงอาจอธิบายได้ว่าการผสมแกลบจะทำให้ช่องว่างระหว่างชิ้นอาหารกว้างขึ้นจนกาซคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการหายใจเจือจางลง เป็นผลให้ตรวจ

พบแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงด้วย

Raimbualt และ Alazard (1980) ได้รายงานว่า ปริมาณของน้ำในอาหารแข็งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีต่อการเจริญและการนำอาหารเข้าเซลของจุลินทรีย์ จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนรำหยาบที่ปรับความชื้นเป็น 30 40 50 และ 60 % พบว่าความชื้นของอาหารมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 5 ที่ความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 % เชื้อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้ 79 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ ในเวลา 48 ชั่วโมง แต่ความชื้นที่สูงหรือต่ำกว่า 50 % คือ 40 60 และ 30 % มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงตามลำดับ ฉะนั้น ความชื้นที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบคือ 50 % ซึ่งแตกต่างไปจากรายงานการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ Rhizopus oryzae กลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae และเชื้อ Aspergillus niger ซึ่งเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความชื้น 40 % (ไกรฤกษ์, 2526; Pichyangkura และคณะ, 1981; Vongsuvanlert, 1983) แสดงว่าความชื้นในอาหารมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์และปริมาณของน้ำในอาหารมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารและสายพันธุ์ของเชื้อ

ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อปรับปรุงสูตรของอาหารแข็ง พบว่าการเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนรำหยาบผสมแป้งดิบที่อบฆ่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีกับแป้งดิบ ( 37.1 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ) สูงกว่าแอคติวิตีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนรำหยาบผสมแป้งแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ( 23.2 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ฉะนั้นจึงได้ทดลองผสมแป้งข้าวเจ้าดิบซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนลงในอาหารแข็งรำหยาบในอัตราส่วนต่างๆ ในรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าเป็น 3:2 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ โดยที่เอนไซม์มีแอคติวิตี 38 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อเลี้ยงบนรำหยาบอย่างเดียว ( 23 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ) และสูงกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อเลี้ยงเชื้อบนแป้งข้าวเจ้าดิบอย่างเดียว ( 21 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ) จากรายงานฉบับอื่นๆซึ่งได้เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งผสมแป้งแล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ทำให้แป้งสุก ต่างก็มีสูตรอาหารแตกต่างกันไป ไกรฤกษ์ (2526) ได้ผลิตกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Rhizopus oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำหยาบและปลายข้าวเจ้าในอัตราส่วน 1:5 Vongsuvanlert และคณะ (1983) ได้รายงานว่าเชื้อ Aspergillus niger จะผลิตกลูโคอะไมเลสได้สูงในอาหารที่ประกอบด้วยรำ แกลบ

และแป้งมันสำปะหลังอัตราส่วน 5:1:5 จึงสรุปได้ว่า ชนิดและอัตราส่วนของแป้งในอาหารตลอดจนสภาพของแป้งที่ผ่านกรรมวิธีในการฆ่าเชื้อต่างกันจะมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้

จากการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ผสมลงในอาหารแข็งรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าในตารางที่ 4 เมื่อผสมไนโตรเจนที่มาจากแหล่งสารอินทรีย์ ได้แก่ ผงยีสต์สกัด เปปโตน และกากถั่วเหลือง พบว่า การผสมกากถั่วเหลือง 7 % มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ สามารถผลิตได้ 351 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการผสมไนโตรเจนที่มาจากสารอินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซิเตรทและแอมโมเนียมทาร์เตรท พบว่าการผสมแอมโมเนียมซิเตรท 9 % มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 427 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ การผสมแหล่งไนโตรเจนที่มาจากแอมโมเนียมซิเตรทส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ของเชื้ออะไมโลไมซีสได้ดีกว่าการผสมกากถั่วเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Rhizopus oryzae ซึ่งไกรฤกษ์ (2526) ได้รายงานว่า แอมโมเนียมทาร์เตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกว่าโพลีเปปโตน และให้ผลทำนองเดียวกับการทดลองของ Bartons และคณะ (1972) ที่รายงานว่า ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมคลอไรด์จะส่งเสริมการผลิตกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus niger ได้สูงกว่าไนโตรเจนจากผงยีสต์สกัด อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองผสมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นกากถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซิเตรทร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 5) พบว่าการผสมกากถั่วเหลือง 5 % และแอมโมเนียมซิเตรท 0.5 % ในอาหารแข็งจะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจนมีแอคติวิตีถึง 545 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าการเติมกากถั่วเหลืองหรือแอมโมเนียมซิเตรทเพียงอย่างเดียว จึงสรุปได้ว่าการผสมแหล่งไนโตรเจนที่มาจากกากถั่วเหลืองร่วมกับแอมโมเนียมซิเตรทในอาหารแข็งสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้มาก

สำหรับเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีส พบว่าการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตในปริมาณ 0.15 และ 0.1 % ตามลำดับ จะมีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 120 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 11) ไกรฤกษ์ (2526) รายงานว่าโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15 % และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 % มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้ดี ส่วนการผลิตกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus niger

(Vongsuvanlert และคณะ, 1983) พบว่าโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 % มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ แสดงว่า โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ แต่ปริมาณที่ราจะใช้นั้นมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์

ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งที่เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบในรูปที่ 8 พบว่า พีเอชเริ่มต้น 3.5 จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ ( 128 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งแตกต่างไปจากการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Rhizopus oryzae (ไกรฤกษ์, 2526) และของเชื้อ Aspergillus niger (Vongsuvanlert และคณะ, 1983) ที่ต้องการพีเอชเริ่มต้น 4.0 และ 3.0 ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่า เชื้อแต่ละสายพันธุ์ต้องการพีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน

McIntosh และ Meyrath (1963) ได้รายงานว่า ปริมาณของเชื้อที่ปลูกในอาหารมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานดังกล่าวดังแสดงในรูปที่ 9 ปริมาณเชื้ออะไมโลไมซีสที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบคือ $5x10^5$ สปอร์/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นเอนไซม์แอคติวิตี 200 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ การเพิ่มปริมาณของเชื้อเริ่มต้นจาก $5x10^5$ สปอร์เป็น $1x10^7$ สปอร์/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ลดลงตามลำดับ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ สปอร์ การผลิตเอนไซม์จะลดลงเหลือ 75 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้สนับสนุนโดยรายงานของ Pichyangkura และคณะ (1980) ซึ่งพบว่าแอคติวิตีของกลูโคอะไมเลสจะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจาก $2.5x10^5$ สปอร์เป็น $2.5x10^7$ สปอร์/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ Raimbualt และ Alazard (1980) อธิบายว่า ปริมาณของเชื้อ Aspergillus niger ที่มีปริมาณสปอร์ $4x10^6$ ถึง $4x10^7$ สปอร์/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถงอกเป็นเส้นใยได้หมด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อเริ่มต้นเป็น $4x10^8$ สปอร์แล้ว จะพบอัตราการเจริญสูงในระยะแรกเท่านั้น และมีสปอร์ที่ไม่งอกเหลืออยู่มาก

ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อต่อการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ พบว่าเชื้ออะไมโลไมซีสจะ ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้สูงสุด 200 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 10) แต่เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35 °ซ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 132 หน่วย/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ และไม่สามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ สำหรับการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 °ซ จะตรวจวัดแอคติวิตีได้ภายหลังชั่วโมงที่ 36 แล้ว ไกรฤกษ์ (2526) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ Rhizopus oryzae เพื่อผลิตกลูโคอะไมเลสคือ 35 °ซ และไม่สามารถตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคอะไมเลสเมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เช่นกัน ส่วนการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้อ Aspergillus niger มีอุณหภูมิเหมาะสมที่ 32 °ซ (Vongsuvanlert, 1983) สามารถกล่าวได้ว่า เชื้อแต่ละสายพันธุ์ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์กับการเจริญเติบโตของเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งซึ่งแสดงในรูปที่ 11 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตในระยะเอกซโพเนนเชียล (exponential phase) จนชั่วโมงที่ 36 ของของการเลี้ยงเชื้อ ภายหลังจากชั่วโมงที่ 36 แล้ว แอคติวิตีเริ่มคงที่ แสดงว่าเชื้ออะไมโลไมซีสสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบในกระบวนการเมตาบอลิสมแบบปฐมภูมิ (primary metabolism) จากการทดลองพบว่า ความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 55 % ในระหว่างที่มีการสร้างเอนไซม์ และพีเอชของอาหารที่เริ่มต้นจาก 4.5 จะเพิ่มขึ้นเป็น 5.5 แต่ Alazard และ Raimbualt (1981) รายงานว่า ในขณะที่เชื้อ Aspergillus oryzae มีการสร้างเอนไซม์ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจาก 4.5 เหลือ 3.0 เท่านั้น อาจอธิบายได้ว่า ผลจากกระบวนการเมตาบอลิสมของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกันไป

เมื่อนำแป้งเชื้อมาสกัดเอนไซม์ย่อยแป้งดิบโดยการแช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.5 แล้วนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 40-80 % เอนไซม์จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.1 เท่าของเอนไซม์ที่สกัดได้ และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 67.5 % เมื่อกรองเอนไซม์ผ่านคอลัมน์ของซีเอม-เซฟาเดกซ์ ซี-50 แล้วชะออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.22 โมลาร์ มีผลให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 19.2 เท่าของเอนไซม์ที่สกัดได้ คิดเป็นเอนไซม์ 8.5 %

ของแอคติวีตีเริ่มต้น ภายหลังการผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ของ ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 แล้วพบว่า แอคติวีตีของเอนไซม์เหลืออยู่ 2.2 % และมีความบริสุทธิ์สูงกว่าเอนไซม์สกัดได้ 23.7 เท่า เมื่อนำเอนไซม์ย่อยแป้งดิบที่ผ่านขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์ไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ (รูปที่ 15) แถบโปรตีนที่มีค่าอาร์ เอฟ 0.261 แสดงคุณสมบัติของกลูโคอะไมเลสที่ย่อยแป้งดิบ แต่แถบโปรตีนที่มีค่าอาร์ เอฟ 0.304 ไม่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบแต่ยังคงคุณสมบัติในการย่อยแป้งสุก (รูปที่ 16) แสดงว่ากลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสนอกจากประกอบด้วยกลูโคอะไมเลสIซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบแล้ว ยังมีกลูโคอะไมเลสII ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบด้วย อย่างไรก็ตาม วิธีการที่ใช้ตรวจสอบแอคติวีตีกับแป้งดิบมีความจำเพาะกับกลูโคอะไมเลสI และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ด้วยการใช้แป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้มีการสร้างกลูโคอะไมเลสI สูง อาจกล่าวได้ว่า กลูโคอะไมเลสI สามารถชักนำด้วยสารอาหารซึ่งสอดคล้องกับผลงานของ Hayashida (1975) ซึ่งใช้สารอาหารมาควบคุมการผลิตกลูโคอะไมเลสI,II และIII แต่วิธีการชักนำการสร้างเอนไซม์ของ Hayashida ดังกล่าวไม่ได้ใช้แป้งดิบ ฉะนั้น ผลการทดลองนี้จึงเป็นที่น่าสนใจ

ผลการศึกษาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบโดยการทำโครมาโตกราฟบนกระดาษ (รูปที่ 28) พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวสาลี แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลังให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส สำหรับการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งสุกและไกลโคเจนจะได้น้ำตาลกลูโคสเช่นเดียวกัน ผลการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกของเอนไซม์จากเชื้ออะไมโลไมซีสได้ผลิตภัณฑ์กลูโคสนี้แสดงว่า เอนไซม์ย่อยแป้งดิบนี้คือกลูโคอะไมเลส

กลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44,000 ดาลตัน (รูปที่ 18) แต่จากรายงานของ Yoshino และ Hayashida (1979) พบว่ากลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus awamori var. kawachi มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90,000 ดาลตัน Miah และ Ueda (1979) รายงานว่า กลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae มีขนาด 76,000 ดาลตัน ในขณะที่กลูโคอะไมเลสIและII ของเชื้อ Mucor rouxianus มีน้ำหนักโมเลกุล 59,000 และ 49,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Yamasakiและคณะ, 1977c) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบของ

ราสายพันธุ์ต่างๆแล้ว พบว่ากลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีสมีขนาดเล็ก อย่างไรก็ตาม กลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสมีขนาดใหญ่กว่ากลูโคอะไมเลสที่สกัดได้จากยีสต์ Endomycopsis fibuligera ซึ่งมีขนาดประมาณ 40,000 ดาลตัน (Ueda และ Saha, 1983)

กลูโคอะไมเลสที่สกัดได้จากเชื้ออะไมโลไมซีส มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบในพีเอชช่วงเดียวกันคือ 4.5-5.5 (รูปที่ 19) แต่จากรายงานของ Ueda และ Saha (1983) พบว่ากลูโคอะไมเลสของยีสต์ Endomycopsis fibuligera มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบแตกต่างกัน คือมีแอคติวิตีในการย่อยแป้งสุกสูงที่พีเอช 5.5 และย่อยแป้งดิบที่พีเอช 4.5 นอกจากนี้ กลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus มีพีเอชเหมาะสมในการย่อยแป้งสุกที่ 3.4 แต่มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบที่4.5 (Medda และคณะ, 1983) อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆดังแสดงในรูปที่ 25 พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงในการย่อยแป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวสาลี แป้งข้าวเจ้า และแป้งมันสำปะหลังที่พีเอชระหว่าง 4.5-5.5 แต่การย่อยแป้งข้าวโพดนั้นเอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงที่พีเอช 3.0 สามารถกล่าวได้ว่า พีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบของกลูโคอะไมเลสนอกจากมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของราแล้ว ยังขึ้นกับชนิดของแป้งดิบที่เอนไซม์ย่อยอีกด้วย

กลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสุกที่ 45 °ซ (รูปที่ 20) คุณสมบัตินี้แตกต่างไปจากกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae และกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Pennicillium oxalicum ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 60 °ซ (Saha และ Ueda, 1979; Yamasaki และคณะ, 1977a) สำหรับกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Mucor rouxianus และกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Rhizopus oryzae มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสุกที่ 55 และ 50 °ซ ตามลำดับ (Yamasaki และคณะ, 1977c; ไกรฤกษ์, 2526) แสดงว่ากลูโคอะไมเลสที่สกัดได้จากราสายพันธุ์ต่างๆมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสุกต่างกัน และเมื่อศึกษาถึงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการย่อยแป้งดิบ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาจนถึง 55 °ซ แต่จากรายงานของ Ciacco (1977) พบว่า แป้งมันสำปะหลังจะเริ่มเจลาติไนซ์ที่อุณหภูมิ 49 °ซ ฉะนั้น การย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 50-55 °ซ จึงเป็นการย่อย

แป้งกึ่งสุก (partial gelatinized starch) ทำให้แอคติวิตีของกลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ของเชื้ออะไมโลไมซีสมีแอคติวิตีดีในการย่อยแป้งกึ่งสุกที่อุณหภูมิ 50-55 °ซ

เอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีสมีความเสถียรที่พีเอช 5.0-7.0 และที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า 35 °ซ (รูปที่ 21 และ 22) กลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสมีความคงตัวในสภาวะที่ใกล้เคียงกับกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae คือมีเสถียรภาพที่พีเอชระหว่าง 5.5-7.0 และที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า 40 °ซ ดังรายงานของ Saha และ Ueda (1979) แต่กลูโคอะไมเลสของเชื้อ Mucor rouxianus มีความเสถียรที่พีเอช 4.0-8.0 และอุณหภูมิไม่เกิน 50 °ซ (Yamasaki และคณะ, 1977c) สำหรับกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus niger มีความเสถียรที่พีเอชต่ำ (4.0-5.0) และอุณหภูมิไม่สูงกว่า 40 °ซ (Medda และคณะ, 1982)

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อ การดูดซับกลูโคอะไมเลสจากเชื้ออะไมโลไมซีสกับแป้งดิบชนิดต่างๆแสดงในรูปที่ 24 พบว่าแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดสามารถดูดซับเอนไซม์ได้ 100 % ที่พีเอช 3.0 แต่อัตราการดูดซับจะลดลงตามลำดับเมื่อระดับพีเอชเพิ่มขึ้น โดยอัตราการดูดซับแป้งมันสำปะหลังจะเหลืออยู่ 22 % เมื่อพีเอชเพิ่มเป็น 8.0 และที่พีเอช 8.0 นี้อัตราการดูดซับแป้งข้าวโพดเหลือเพียง 4 % ส่วนพีเอช 4.0-6.0 มีความเหมาะสมกับการดูดซับแป้งข้าวเจ้า (35-40 %) แต่ไม่พบการดูดซับของเอนไซม์บนแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวสาลีที่พีเอช 3.0-8.0 สรุปได้ว่า อัตราการดูดซับแป้งดิบของเอนไซม์น่าจะเป็นคุณสมบัติจำเพาะระหว่างแป้งกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่พีเอชต่างๆ

ในปี 1982 Hayashida และคณะได้เสนอแบบจำลองโมเลกุลกลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบของเชื้อ Aspergillus awamori ว่าประกอบด้วยตำแหน่งดูดซับ (adsorption site) และตำแหน่งย่อยแป้งดิบ (active site) ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยตำแหน่งดูดซับมีโครงสร้างที่จะยึดจับกับโมเลกุลของแป้งอยู่ติดกับตำแหน่งย่อยสลาย เมื่อมีการดูดซับจะเกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุลแป้ง ทำให้โมเลกุลของแป้งคลี่ออก สายโมเลกุลของแป้งจะเคลื่อนต่อไปยังตำแหน่งย่อยสลายและจะถูกย่อยเป็นโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส อาจกล่าวได้ว่า ตามสมมติฐานของ Hayashida และคณะนั้น หากมีการดูดซับระหว่างเอนไซม์กับโมเลกุลของแป้งดิบสูงแล้ว น่าจะมีโอกาสของการย่อยสลายสูงด้วย ทำ

ให้ปริมาณกลูโคสควรจะเกิดมากขึ้นด้วย ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องกันตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองการย่อยสลายและการดูดซับแป้งดิบของกลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสกับแป้งดิบชนิดต่างๆดังแสดงในรูปที่ 24 และ 25 พบว่า กลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสมีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบและพีเอชที่เหมาะสมในการดูดซับแป้งดิบแตกต่างกัน ดูเหมือนว่าบนโมเลกุลของกลูโคอะไมเลสมีตำแหน่งของการดูดซับและตำแหน่งของการย่อยแป้งดิบที่แยกจากกัน อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับและการย่อยแป้งดิบยังมีความซับซ้อน ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ เช่น โครงสร้างของเม็ดแป้ง โมเลกุลของเอนไซม์ อุณหภูมิ ตลอดจนระยะเวลาที่เหมาะสม เกี่ยวข้องอยู่ด้วย จึงเป็นเรื่องที่น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสมีสมบัติในการย่อยแป้งสุกได้ 81 % ในเวลา 6 ชั่วโมง และย่อยไกลโคเจนได้ถึง 93 % ในเวลาเพียง 4 ชั่วโมง (รูปที่ 27) จากรายงานของ Medda และคณะ (1982) พบว่ากลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus จะย่อยแป้งสุกและไกลโคเจนได้ 75 และ 95 % ในเวลา 9 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่กลูโคอะไมเลสของเชื้อ Mucor rouxianus จะย่อยแป้งสุกและไกลโคเจนได้สมบูรณ์โดยใช้เวลา 28 ชั่วโมง (Yamasaki และคณะ, 1977c) ส่วนกลูโคอะไมเลสของเชื้อ Aspergillus oryzae มีรายงานว่าย่อยแป้งสุกได้ 61 % ในเวลา 6 ชั่วโมง (Mitsue และคณะ, 1979) ฉะนั้นกล่าวได้ว่ากลูโคอะไมเลสของเชื้ออะไมโลไมซีสมีคุณสมบัติที่ดีในการย่อยแป้งสุกและไกลโคเจน เนื่องจากเอนไซม์สามารถย่อยแป้งได้สูงในระยะเวลาอันสั้น

Ueda และ Saha (1980) รายงานว่า เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะย่อยสลายแป้งดิบชนิดแวกซีได้ดีกว่าแป้งชนิดอื่น ซึ่งแป้งชนิดแวกซีนี้มีส่วนประกอบของอะไมโลเพคตินสูงกว่าอะไมโลส นอกจากนี้ Forgarty (1979) ยังได้รายงานว่าแป้งข้าวเหนียวประกอบด้วยอะไมโลเพคตินในปริมาณสูงกว่าแป้งข้าวสาลี แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้าและแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งการย่อยแป้งดิบของกลูโคอะไมเลสจากเชื้ออะไมโลไมซีสให้ผลสนับสนุนรายงานข้างต้นดังแสดงไว้ในรูปที่ 26 พบว่า กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยแป้งข้าวเหนียวดิบได้ถึง 82 % ในเวลา 72 ชั่วโมง และสามารถย่อยแป้งข้าวสาลี แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพดได้ 44 30 และ 22 % ตามลำดับ ในเวลา 96 ชั่วโมง ส่วนแป้งมันสำปะหลัง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งเป็นแป้งจากรากหัวของพืช จะย่อยได้เพียง 16 % แสดงว่าเอนไซม์นี้มีสัมพรรคภาพ (affinity) กับแป้งมันสำปะหลังต่ำ โดยแสดงให้เห็นด้วยค่า $K_m$ ของแป้งมันสำปะหลังดิบที่มีค่าสูงถึง 12.5 มก./มล. ในรูปที่ 23 (ข)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย