บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase จากตัวอย่างเศษอาหารสัตว์จากโรงเลี้ยงไก่, โรงเลี้ยงสุกรและตัวอย่างดินในแปลงเกษตรเพื่อทำการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II สำหรับการตรวจสอบเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินเชิงคุณภาพ ผลการทดลองพบว่าเชื้อที่คัดแยกจากโรงเลี้ยงไก่, โรงเลี้ยงสุกรและตัวอย่างดินในแปลงเกษตรที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ มี 8, 12 และ 56 ไอโซเลต ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการผลิตเอนไซม์ CGTase ในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูง มีจำนวน 33 ไอโซเลต จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดเพียง 10 ไอโซเลต พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II แต่เชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ มี 3 ไอโซเลต คือ เชื้อ C7, C26 และ C28 ซึ่งเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก และคงที่หลัง 24 ชั่วโมง ส่วนค่าพีเอชลดลงในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเริ่มคงที่ และมีการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อไอโซเลต C26 สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงกว่าเชื้อ C7 และ C28 จึงคัดเลือกเชื้อ C26 มาทำการศึกษาผลผลิตของเอนไซม์ที่ผลิตได้ต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ C26 มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ไปพร้อมกับการเจริญ (Growth associate)

การบ่งชี้ผลผลิตของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตจากเชื้อ C26 โดยวิธีโครมาโทกราฟี กระดาษ (Paper chromatography) พบว่าสารเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินและสารละลายตัวอย่างจากเชื้อ C26 มีระยะการเคลื่อนที่ของสารน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษได้ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่า peak ของสารละลายตัวอย่างจากเชื้อ C26 ตรงกับสารละลายมาตรฐานเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน แสดงว่าเชื้อ C26 มีการผลิตเอนไซม์ CGTase เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลของแป้งเป็นสารไซโคลเด็กซ์ตริน

เมื่อนำเชื้อ C26 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่าเมื่อทำการย้อมแกรม เชื้อ C26 มีรูปร่างแบบแท่ง, ติดสีแกรมบวก และเมื่อทำการย้อมสีเอนโดสปอร์ (endospore) เชื้อมีการสร้างเอนโดสปอร์, การสร้างเอนไซม์แคทาเลส และจากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต C26 คือ เชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งมีความเหมือน (identities) เท่ากับ 99

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ที่คัดเลือกได้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase คือ แป้งสาคูร้อยละ 1 และยีสต์สกัดร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 10.0 และทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะดังกล่าวเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มีอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 0.193 ต่อชั่วโมง และ 5.94 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อนำเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. C26 มาทำบริสุทธิ์เพียงบางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase พบว่ากิจกรรมการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์ CGTase คือ พีเอช 6.0 และ 8.5 และในช่วงอุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ CGTase พบว่าเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวที่พีเอช 7.0-9.0 และมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน พบว่าสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน คือ แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 6 และผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ปริมาณเอนไซม์เข้มข้น 48 ยูนิตต่อกรัมแป้งบ่มที่พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนี้สามารถผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินได้ 40 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 66 ของสับสเตรทเริ่มต้น โดยเอนไซม์ CGTase มีสัดส่วนการผลิตแอลฟ่า, เบต้า และแกมมาไซโคลเด็กซ์ตรินเท่ากับ 0.35:0.65:0 ตามลำดับ ในเวลา 12 ชั่วโมง