บทคัดย่อ

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมหลากหลาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตกรดแล็กติกจากวัตถุดิบประเภทแป้ง เอนไซม์อะไมเลสสามารถใช้ลดปัญหาความหนืดจากวัตถุดิบที่มีความเข้มข้นของแป้งสูง แบคทีเรียกลุ่มแล็กติกผลิตกรดแอล-แล็กติกได้โดยตรงจากกลูโคสซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยแป้ง พบว่า *Streptococcus* sp. SUT 513 เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพดังกล่าว ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตอะไมเลสสำหรับสายพันธุ์นี้ยังไม่ชัดเจน วัตถุประสงค์ในงานวิจัยครั้งนี้คือ การผลิต การทำบริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียแล็กติก *Streptococcus* sp. SUT 513 จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสหรือ deRAM มีส่วนประกอบสำหรับปริมาตร 1 ลิตร ดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง 45.0 กรัม สารสกัดยีสต์ชนิด FP101 1.0 กรัม ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 6.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต 0.03 กรัม การเลี้ยงเชื้อด้วยสูตรอาหารนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ pH เริ่มต้น 8.5 พบปริมาณโปรตีนเท่ากับ 50.4±0.0 กรัมต่อลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง 9.6±0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ที่แป้งละลายน้ำเป็นสารตั้งต้น) เมื่อเปรียบเทียบ deRAM กับสูตรมาตรฐาน De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สามารถลดต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อลงได้ 11.7 เท่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพปริมาตร 3 ลิตร *Streptococcus* sp. SUT 513 แสดงศักยภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้ง (Amylolytic activity) ณ เวลา 16 ถึง 22 ชั่วโมง ที่ 17.6±1.91 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากคุณลักษณะทางชีวเคมี เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% และโครมาโทกราฟีแบบการแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchange) พบเอนไซม์อะไมเลสและพูลูลาเนสที่บริสุทธิ์สูงขึ้น 2.08 และ 0.71 เท่า ตามลำดับ กิจกรรมของอะไมเลสและพูลูลาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 300 และ 160% ที่ ค่า pH เหมาะสมคือ 9.0 (ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะไมเลสคือ 40 ถึง 55 และ 75 องศาเซลเซียส ในขณะที่พูลูลาเนสทำงานได้ดีในช่วง 25 ถึง 75 องศาเซลเซียส เฟอร์รัสไอออนมีศักยภาพในการกระตุ้นกิจกรรมของอะไมเลสและพูลูลาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 9 และ 6 เท่า ตามลำดับ แต่ทว่า แคลเซียม แมกนีเซียม และเอทิลีนไดอามีนเตตราแอซิติก (EDTA) เปิดเผยผลของการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง โดยเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้ พบมวลโมเลกุล (Mw) 31.7, 33.4 และ 68.9 กิโลดาลตัน เอนไซม์สกัดหยาบที่ได้สามารถย่อยหัวมันและกากมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพที่จะเป็นเอนไซม์ทดแทนเอนไซม์ย่อยแป้งทางการค้า นอกจากนี้ ตะกอนเหลือทิ้งจากการผลิตเอนไซม์มีปริมาณแป้ง 90.27% พร้อมแสดงคุณลักษณะพิเศษที่ยังสามารถคงสภาพความเป็นเจลแป้งได้ภายใต้สภาวะน้ำเดือด ซึ่งเหมือนจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากการคืนตัวของเด็กซ์ตริน (Dextrin retrogradation) อย่างไรก็ตาม คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวควรจะได้รับการศึกษาเพิ่มเติม

Abstract

Amylases are important enzymes used in various industries, especially lactic acid production from starchy materials. The problem of viscosity in raw materials containing high starch contents can be alleviated by amylases. Lactic acid bacteria directly produce *L*-lactic acid from glucose resulted from starch digestion. *Streptococcus* sp. SUT 513 has been found to be a potential strain for starch digestion and lactic acid production. Information about amylase produced by this strain is limited. This study was aimed at investigating production, purification, and biochemical characterization of amylases produced by *Streptococcus* sp. SUT 513. The suitable culture medium or deRAM components for high amylase production on 1 liter included 45 g cassava starch, 1 g yeast extract FP101, 6 g di-potassium phosphate, 0.025 g magnesium sulfate, and 0.03 g ferrous sulfate. The initial pH of 8.5 and culture time of 24 h resulted in 50.4±0.0 g/L of protein content and 9.6±0.60 units/mL of amylolytic activity based on soluble starch assay. The cost of culture medium was cheaper by about 11.7 folds when compared to the standard De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium. The highest of amylolytic activity of 17.6±1.91 units/mL was obtained when culturing in a 3- L bioreactor for 16-22 h, based on soluble starch assay. Purification by ammonium sulfate precipitation and anion exchange chromatography increased both amylase and pullulanase purity by 2.08 and 0.70-folds, respectively. Both amylase and pullulanase activity increased by 300 and 160% at pH 9.0 (25 mM Tris-HCl buffer). Moreover, the optimum temperature of amylase activity was 40-55 and 75°C, whereas a wide range of 25-75°C was found in pullulanase activity. Ferrous activated both amylase and pullulanase activities by 9 and 6-folds, respectively. Nevertheless, calcium, magnesium, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) showed inhibitory effect. Molecular mass of amylolytic enzymes was estimated to be 31.7, 33.4, and 68.9 kDa. Crude enzymes effectively hydrolyzed cassava tubers and cassava pulp, demonstrating its potential to be an alternative amylolytic enzymes to the commercial enzyme. In addition, residues starch obtained after enzyme production exhibited a unique characteristic that was not gelatinized under boiling water with 90.27% starch content. It was likely to be a product of dextrin retrogradation. However, further characterization is needed.