รายงานการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2546

เรื่อง

การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับเสตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

(UTILIZATION OF JACK FRUIT WASTES AS SUBSTRATE FOR ∝ - AMYLASE PRODUCTION BY *Bacillus subtilis* TISTR 25 IN SOLID STATE FERMENTATION)

โดย

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

RCH
QP
609
.A45
ส๗๒๕

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 58928

วันเดือนปี 17 ก.ย. 2549

b 11419245

i.....

บทคัดย่อภาษาไทย

เนื้อหาวิทยานิพนธ์เล่มนี้นำเสนอถึงการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งพบว่าในเศษเหลือทิ้งของขนุนมีแป้งร้อยละ 19.6 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 47.5 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 4.2 โปรตีนร้อยละ 4.7 ของน้ำหนักแห้ง และมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 0.7 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสพบว่าต้องเติมสารละลายเกลือแร่ แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนลงในเศษเหลือทิ้งของขนุนด้วย จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสพบว่าต้องใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 70 เติมแป้งมันฝรั่งและแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อนุภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร และเมื่อเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักลงในสูตรอาหารมีส่วนช่วยให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น เมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสพบว่าการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นไปพร้อมกับการเจริญของเชื้อและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะคงที่แล้ว ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือที่ 48 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทพบว่าเชื้อสามารถใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน รำข้าวสาลี และรำข้าวเจ้า ในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำให้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-60 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 22.2 เท่า และเมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันพบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 30.2 เท่า จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสพบว่าเอนไซม์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 6.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส คงตัวที่พีเอช 5.0-8.0 นาน 24 ชั่วโมง และคงตัวต่ออุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบพบว่าเอนไซม์สามารถย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบ แป้งมันฝรั่งดิบ และแป้งมันสำปะหลังดิบได้ร้อยละ 26.4, 26.1 และ 24.3 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

The purposes of this thesis were to utilize jack fruit wastes as substrates for α-Amylase production by *Bacillus subtilis* TISTR 25 in solid state fermentation. The results were as follows: fresh unfermented jack fruit waste contained 19.6% starch, 47.5% total sugar, 4.2% reducing sugar, 4.7% protein on a dry weight basis and 0.7% of moisture content. For optimal medium in α-amylase production, it was necessary to add mineral salt, carbon and nitrogen sources. The optimal conditions for maximum production of α -amylase were 10% (v/w) inoculum size, 70% initial moisture content, 1%(w/w) potato starch and ammonium sulphate as carbon and nitrogen sources. The medium was adjusted to pH 7.0, and incubated at 35°C. The particles 500-850 μm Jack fruit and added 1%(w/w) $CaCl_2.2H_2O$ in the medium were found to increase the enzyme production. Typical pattern of α-amylase production showed that enzyme secretion was coupled with active cell multiplication and maximum activity was obtained at stationary phase. The optimal incubation time for obtaining maximum yield of enzyme was 48 hours. Jack fruit waste, wheat bran and rice bran were good substrates for α-amylase production. When α-amylase was partially purified by precipitating with 95% ethanol at 40-60% saturation it was found that the purity of the enzyme was increased to 22.2 folds. After ultra-filtration purification of enzyme was increased to 30.23 folds. The properties of the enzyme were as follows: optimum pH and temperature were 6.0 and 50°C respectively, it would be stable at pH ranges from 5.0-8.0, 24 hours and at the temperature lower than 50°C, 30 mins. It was also found that the enzyme was able to digest various types of raw starches, namely, of rice, potato and cassava, at the percentages of 26.4, 26.1 and 24.3, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่าผลการย่อยแป้งดิบทั้ง 3 ชนิดด้วยเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งดิบชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ชนิดของแป้ง	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งมันฝรั่ง	แป้งข้าวเจ้า
การย่อยแป้งดิบ (ร้อยละ)	24.3_a	26.1_a	26.4_a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

.....

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญรูป X

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์อะมัยเลสชนิดต่าง ๆ 4

2.2 ผลของเอนไซม์อะมัยเลสต่อแป้ง.....5

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....7

2.4 แหล่งของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....9

2.5 การผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากจุลินทรีย์.....10

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยแบคทีเรีย.....11

2.7การศึกษาการย่อยแป้งดิบด้วยเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคเรีย.....13

2.8 การผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....15

2.9 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์.....15

2.10 การเก็บรักษาเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....16

2.11 การนำเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม.....17

2.12 การหากิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลส.....18

2.13 เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25.....18

2.14 ข้อได้เปรียบของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคทีเรียในอุตสาหกรรม.....19

2.15 ขนุน.....19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง.....22

3.2 สารเคมีสำหรับการทดลอง.....22

3.3 วัตถุดิบ.....24

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย.....24

3.5 การศึกษาปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ในเศษเหลือทิ้งของขนุน.....24

3.6 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารสูตรต่าง ๆ 25

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส
ในระดับฟลาสก์โดยใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรท.....25

3.8 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....29

3.9 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....29

3.10 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้.....30

3.11 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบด้วยเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....31

3.12 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....31

3.13 สถานที่ทำการวิจัย.....32

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการหาปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ในเศษเหลือทิ้งของขนุนที่ใช้เป็นสับสเตรท.....33

4.2 ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์
อัลฟาอะมัยเลส.....34

4.3 ผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....37

4.4 ผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....71

4.5 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....73

4.6 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....76

4.7 ผลทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....85

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....88

บรรณานุกรม.....91

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 แหล่งของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในธรรมชาติ.....9

2.2 คุณสมบัติของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคทีเรีย.....10

2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ.....14

2.4 คุณค่าทางโภชนาการของขนุน.....21

4.1 ผลวิเคราะห์ปริมาณสารต่าง ๆ ในเศษเหลือทิ้งของขนุนที่ใช้เป็นสับสเตรท.....33

4.2 การเปรียบเทียบทางสถิติผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 36

4.3 การเปรียบเทียบทางสถิติของกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....39

4.4 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....42

4.5 การเปรียบเทียบทางสถิติชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....46

4.6 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของแป้งมันฝรั่งต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....49

4.7 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....52

4.8 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....55

4.9 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....58

4.10 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....61

4.11 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของอนุภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....64

4.12 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของชนิดของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

4.13 การเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25.....70

4.14 การเปรียบเทียบทางสถิติการเปรียบเทียบผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....75

4.15 ผลการทำให้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน.....77

4.16 การเปรียบเทียบทางสถิติความสามารถในการย่อยแป้งดิบชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25.....87

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1 การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะมัยเลส.....6

4.1 ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....35

4.2 ผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....38

4.3 ผลของความความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....41

4.4 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....45

4.5 ผลความเข้มข้นของแป้งมันฝรั่งต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....48

4.6 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....51

4.7 ผลความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....54

4.8 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....57

4.9 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....60

4.10 ผลของขนาดอนุภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....63

4.11 ผลของชนิดเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....66

4.12 ผลของความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....69

4.13 การเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

4.14 ผลการเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของขนุนกับรำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลีในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง.....74

4.15 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....81

4.16 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส.....81

4.17 ผลของความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่พีเอชต่าง ๆ 84

4.18 ผลของความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆ 84

4.19 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 86

ข 1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโตส.....106

ข 2 กราฟมาตรฐานของอัลบูมิน.....108

ข 3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส.....110

ข 4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส.....112

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส (α-amylase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก ทอผ้าและอื่นๆ เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bonds) ของแป้งที่ตำแหน่ง α-1,4 ในลักษณะตัดสายภายในพอลิเมอร์อย่างสุ่มได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (Glucan) และเด็กซ์ทรินความยาวจำกัด (limit dextrin) ที่มีกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วยและยังคงมีรูปแบบการจัดเรียงตัวเป็นแบบ α-configuration

การผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสามารถผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ได้มีผู้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โดยแยกและเตรียมให้บริสุทธิ์จากแหล่งต่าง ๆ เช่นจากสัตว์ได้แก่ อัลฟาอะมัยเลสจากตับอ่อนของหมู (Caldwell *et. al.* 1952) น้ำลายมนุษย์ (Fischer and Stein. 1961) ตับอ่อนของมนุษย์ (Fischer *et. al.* 1950) และตับอ่อนของหนู (Heatley. 1958) จากพืชได้แก่การสกัดอัลฟาอะมัยเลสจากใบเลี้ยงของถั่วงอก (Swain and Dekker. 1966) มอลท์ของข้าวบาเล่ย์ (Schwimmer and Ball. 1949) และมอลท์ของข้าวฟ่าง (Dube and Tendenz. 1961) โดยที่เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเมื่อสกัดจากพืชและสัตว์นั้นทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน และยังขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตด้วย ปัจจุบันได้มีการศึกษาและวิจัยการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งของอัลฟาอะมัยเลสที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากว่าจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมแล้วจะเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมาได้ดี และมีวิธีการทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ซึ่งก็มีการศึกษาทั้งจากแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* (Stein and Fischer. 1961) *Bacillus stearothermophilus* (Campbell and Cleveland. 1961) ยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 (Saha and Ueda. 1983) และเชื้อรา *Aspergillus oryzae* (Underkofler and Roy. 1951) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบหลักเช่นแป้งมันสำปะหลัง

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมากและได้มีการศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ขนุนจัดเป็นผลไม้เมืองร้อนที่สำคัญชนิดหนึ่งเพราะสามารถปลูกและดูแลได้ง่ายให้เนื้อยวงที่มีรสชาติหอมหวาน นิยมบริโภคทั่วไปในรูปของเนื้อยวงสดหรือนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรม โดยจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าขนุนเป็นผลไม้ที่มีส่วนนำไปรับประทานได้น้อยกว่าส่วนที่เหลือทิ้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำในรูปแบบใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(คิดเป็นน้ำหนักต่อ 1 ผล ส่วนที่กินได้ร้อยละ 36.14 ส่วนที่เหลือทิ้งร้อยละ 63.85 โดยประมาณ) ดังนั้นจึงเกิดแนวความคิดที่จะศึกษาการนำเศษเหลือทิ้งของขนุนมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 อันจะเป็นแนวทางที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมและเป็นการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรให้คุ้มค่าและมีมูลค่ามากขึ้นในเชิงพาณิชย์ด้วย

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งของขนุนในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเศษเหลือทิ้งของขนุนโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
3. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้จากเศษเหลือทิ้งของขนุน
4. ศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งของขนุนในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยวิเคราะห์ปริมาณสารต่าง ๆ และความชื้นเริ่มต้น ในเศษเหลือทิ้งของขนุน ศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อดังกล่าว และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผลิตได้ รวมถึงศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบด้วย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเศษเหลือทิ้งของขนุน
2. ทราบถึงสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมและมีผลในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเศษเหลือทิ้งของขนุนโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับสังเกตุใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเศษเหลือทิ้งของขนุน และการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ที่ผลิตได้เพื่อเป็นแนวทางในการขยายการศึกษาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์อะมัยเลสชนิดต่าง ๆ (ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543)

อัลฟาอะมัยเลส (α-amylase) มีชื่อทางการค้าว่า Termamil มีชื่อสามัญว่าไดแอสเทส (diastase) หรือมีชื่อเรียกว่า α-1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 พบทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ตลอดทั้งในคนโดยพบในน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ และไดแซคคาไรด์ และถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านลำไส้เข้าสู่ร่างกาย อัลฟาอะมัยเลสเป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน และมีแคลเซียมอิออนประจุบวกเป็นโคเอนไซม์ต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล อัลฟาอะมัยเลสถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนอิออนเช่น คลอรีน โบรมีน และฟลูออไรด์ มีค่า pK ของหมู่ที่แตกตัวเป็นอิออนได้ในบริเวณเร่ง (active site) มีค่า 6.5-8.0 ซึ่งอาจเป็นหมู่อิมิดาโซลหรือหมู่อะมิโนอยู่ที่บริเวณเร่ง ลักษณะสำคัญของเอนไซม์ในการย่อยโดยจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะตัดสายภายในพอลิเมอร์อย่างสุ่มโดยได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และเด็กซ์ทรินความยาวจำกัด (limit dextrin) ซึ่งมีกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วยและยังคงรูปแบบการจัดเรียงตัวเป็น α-configuration

เบต้าอะมัยเลส (β-amylase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า α-1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 ซึ่งพบทั่วไปในพืชชั้นสูงเช่นข้าวบาเล่ย์ (ในขณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลท์) ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ โดยทั่วไปมักพบร่วมกับอัลฟาอะมัยเลส เบต้าอะมัยเลสมีมวลโมเลกุลประมาณ 152,000 ดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 5.6 และเมื่อพิจารณาจากกราฟกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ มีลักษณะเป็นรูประฆังคว่ำ มีหมู่ที่แตกอิออนได้ที่บริเวณเร่ง 2 หมู่คือที่ pKa_1 = 1-3.5 และ pKa_2 = 8.0-8.5 นอกจากนี้สารพวกซัลไฟดริล (sulphydryl reagent) เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วย ปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์เบต้าอะมัยเลสจะจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของน้ำตาลมอลโตสหรือทีละ 2 หน่วยของน้ำตาลกลูโคสและจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง α-1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็นกลูแคน และเด็กซ์ทรินความยาวจำกัด และส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลมอลโตสที่มีลักษณะการจัดเรียงตัวแบบ β-configuration

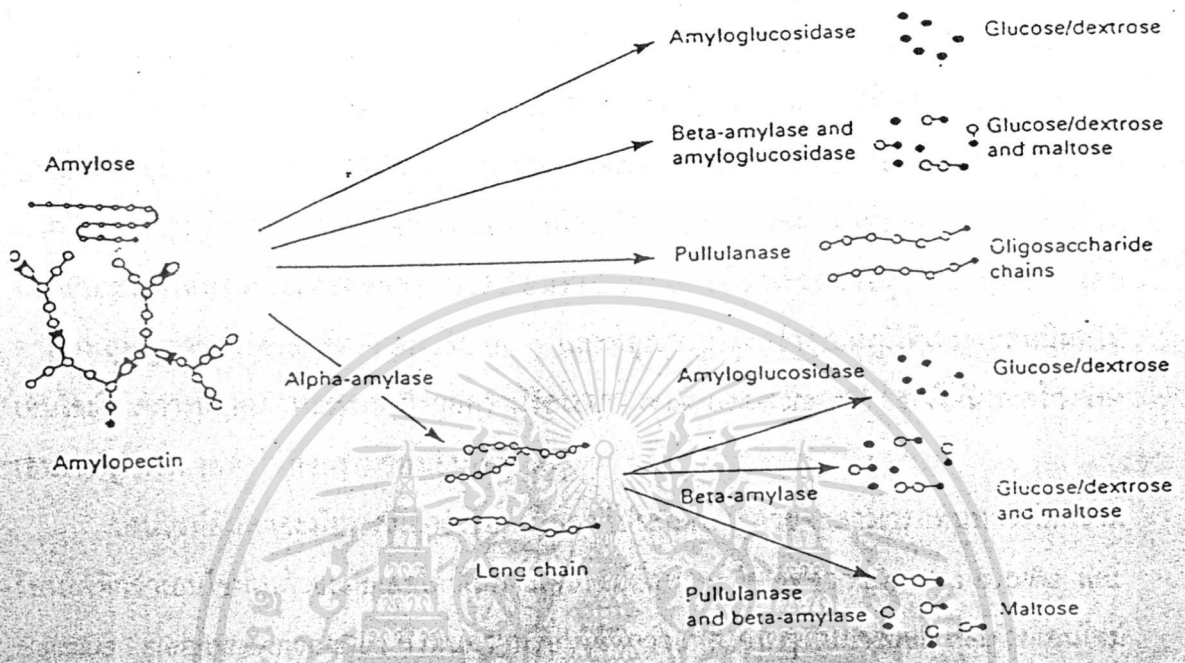
แกมมาอะมัยเลส (γ-amylase) หรือกลูโคอะมัยเลส (glucoamylase) หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucsidase) มีชื่อตามระบบว่า α-1,4 glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ เช่นแบคทีเรีย เชื้อรา พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 4.0-4.4 และมีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา 2 หมู่คือที่ pKa_1 = 2.9 และ pKa_2 = 5.9 รวมทั้งมีค่าเอนธาลปี (enthalpy) ตัวที่ 1 (ΔH^0_1) เป็น 0 และตัวที่ 2 (ΔH^0_2) เป็น 0.8 กิโลแคลลอรี่ต่อโมล จากค่า pK และเอนธาลปีที่ปรากฏนี้คาดว่าน่าจะมีหมู่ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอยู่ 2 หมู่ คือโดยทั้ง 2 หมู่นี้เป็นหมู่คาร์บอกซิลในลักษณะที่หมู่ที่ 1 เป็น COO^- ที่เป็นเกลือ และหมู่ที่ 2 เป็น COOH เป็นกรด ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยคือสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งที่พันธะไกลโคซิดิกที่เป็น α-1,4, α-1,6 และ α-1,3 สำหรับการตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับเอนไซม์เบต้าอะมัยเลสแต่ตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นผลผลิตจากปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีลักษณะการจัดเรียงตัวแบบ β-configuration

2.2 ผลของเอนไซม์อะมัยเลสต่อแป้ง

โมเลกุลของแป้งเป็นโพลี่แซคคาไรด์ประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคตินโดยที่อัตราส่วนขององค์ประกอบของทั้ง 2 ชนิดนี้เปลี่ยนแปลงได้ อะไมโลสประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิกที่ไม่มีการแตกแขนงมีความยาวประมาณ 1,100-4,400 หน่วยกลูโคส มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่สามารถที่จะกระจายตัวอยู่ในน้ำเป็น micelle และสามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน ส่วนอะไมโลเพคตินประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิกที่แตกแขนงทุก ๆ 25 หน่วยกลูโคส ตรงตำแหน่งที่แตกแขนงต่อกันด้วยพันธะ α-1,6 ไกลโคซิดิก นอกจากนั้นยังพบหน่วยของกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,3 ไกลโคซิดิก น้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลเพคตินสูงถึง 1 ล้าน และละลายน้ำอยู่ในรูปคอลลอยด์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำตาล (Reed and Underkofler. 1996)

แป้งดิบมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ (nondispersible) และต้านทานต่อการย่อยของเอนไซม์ แป้งที่อยู่ในรูปกรานูล (granule) หรือแป้งดิบจะไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องให้ความร้อนแก่แป้งเพื่อให้เปลี่ยนมาอยู่ในรูปสารละลายเป็นเจล (gellatinization) เกิดความหนืดเพิ่มขึ้นเนื่องจากกรานูลของแป้งขยายตัวดูดซึมน้ำเข้าไปทำให้สูญเสียลักษณะ birefringence ทำให้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้เร็วขึ้น มีรายงานว่าเอนไซม์อะมัยเลสจากตับอ่อนย่อยสลายแป้งข้าวโพดต้มได้เร็วกว่าแป้งข้าวโพดดิบถึง 22 เท่า ส่วนเอนไซม์อะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ย่อยแป้งสุกได้เร็วกว่าแป้งดิบถึง 323 เท่าและเอนไซม์อะมัยเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae*

ย่อยแป้งในรูปเจลได้เร็วกว่าแป้งดิบถึง 120,000 เท่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Reed and Underkofler. 1996) ซึ่งการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะมัยเลสชนิดต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะมัยเลส (ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ผลของอุณหภูมิ

กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่ออุณหภูมิและสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับโปรตีน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดหนึ่งแล้วจะลดลงและอุณหภูมิที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดเรียกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum temperature) ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสลดลงเนื่องจากสิ่งแวดล้อมที่เย็นจะลดอัตราเร็วของปฏิกิริยาทุกชนิดโดยอาศัยทฤษฎีจลนพลศาสตร์ทางเคมีอธิบาย และที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมมีผลให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน (thermal denaturation) ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลายทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยจะสามารถทนทานต่อความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์เบต้าอะมัยเลสโดยเฉพาะเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจาก *Bacillus subtilis* และ *Bacillus stearothermophillus* ซึ่งทนความร้อนได้ดีกว่าแหล่งอื่น ๆ ในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus stearothermophillus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 55-70 องศาเซลเซียส (Campbell and Cleveland.1961) เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus coagulan* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 85 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จาก *Bacillus licheniformis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 91 องศาเซลเซียส (Medda and Chandra. 1980)

ผลของพีเอช

พีเอชก็มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับอุณหภูมิ พีเอชที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดเรียกว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรม (optimum pH) เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนการเปลี่ยนแปลงพีเอชจะมีผลต่อการแตกตัว (ionize) ของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่บนผิวของโปรตีน ซึ่งจะมีผลต่อบริเวณเร่งและโครงรูปของเอนไซม์ นอกจากนี้พีเอชสูงหรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสม จะทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาด้วย

ความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับ

1. Pka ของหมู่ที่แตกตัวเป็นไอออน (ionizing group) ที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการจับกับสับสเตรท

2. Pka ของหมู่ที่เกี่ยวกับหน้าที่ (functional group) บนโมเลกุลของสับสเตรทที่เกี่ยวข้องกับการจับกับเอนไซม์
3. Pka ของหมู่ที่เกี่ยวกับหน้าที่บนโมเลกุลของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยา
4. Pka ของหมู่อื่น ๆ บนโมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งจะไปมีผลต่อโครงรูปที่จำเพาะของเอนไซม์

เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่นน้ำลายมนุษย์ จากตับอ่อนของมนุษย์ และจากตับอ่อนของหมู พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือ 6.9 (Stein and Fisher. 1960) ในขณะที่เอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus subtilis Aspergillus niger* และจากมอลท์ของข้าวบาเล่ย์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือ 4.0-6.0 (Schwimmer and Balls. 1949)

ผลความเข้มข้นของเอนไซม์

เนื่องจากคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงขึ้นโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินพอ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

ผลความเข้มข้นของสับสเตรท

เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่และเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทจะพบว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรทน้อย ๆ ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วมาก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทไปเรื่อย ๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนกระทั่งถึงความเข้มข้นสับสเตรทจุดหนึ่งที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาคงที่ ความเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเรียกว่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) และที่ความเข้มข้นของสับสเตรทต่าง ๆ บริเวณเร่งของเอนไซม์ยังไม่อิ่มตัวด้วยสับสเตรท ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรทเป็นจลนศาสตร์อันดับ 1 และเมื่อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทบริเวณเร่งของเอนไซม์จะอิ่มตัวด้วยสับสเตรทจนหมดไม่มีบริเวณเหลือสำหรับสับสเตรทที่เหลืออีก ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงสูงสุดและจะไม่เพิ่มขึ้นไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอีกเท่าใดคืออัตราเร็วไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทแล้วเป็นจลนศาสตร์อันดับศูนย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา

2.4 แหล่งของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้ง พบทั่วไปในสิ่งมีชีวิต พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ปริมาณเอนไซม์ที่พบนั้นแตกต่างไปตามชนิดของอวัยวะและชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ในปี ค.ศ 1811 ได้มีการสกัดเอนไซม์ออกมาจากข้าวสาลี และต่อมาได้มีการศึกษาในแหล่งอื่น ๆ เช่น ในข้าวมอลท์ น้ำลาย เลือด และที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* แต่ที่ได้รับความนิยมและสนใจมากในขณะนี้คือเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั้งนี้เพราะเป็นแหล่งที่ไม่มีความจำกัดมากเหมือนพืชและสัตว์ (สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524) แหล่งของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแหล่งต่าง ๆ แสดงตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แหล่งของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในธรรมชาติ (พิเชฐ อิฐกอ. 2528)

แหล่ง	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง	หน่วยการทำงาน
<u>พืช</u>		
ข้าวมอลท์	มอลโตส	350
<u>สัตว์</u>		
น้ำลาย	เด็กซ์ทริน มอลโตส	-
ตับอ่อน	เด็กซ์ทริน มอลโตส	2,500
<u>จุลินทรีย์</u>		
B. subtilis	กลูโคส มอลโตส เด็กทริน	1,800
B. stearothermophilus	เด็กซ์ทริน มอลโตส	-
Rhizopus sp.	กลูโคส	200
A. oryzae	กลูโคส	170
A. niger	กลูโคส	250
Endomycopsis sp.	กลูโคส	20
Oospora sp.	เด็กซ์ทริน	25

กำหนดให้ 1 หน่วยการทำงานคือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักของแหล่งเอนไซม์ 1 กรัม ในเวลา 1 นาที

2.5 การผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา Peltier and Beckord (1954) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแหล่งต่างๆ พบว่าในขนมปังแห้งและวัตถุดิบอื่น ๆ จากพืชเป็นแหล่งที่มีแบคทีเรียที่สามารถย่อยแป้งมากกว่าแหล่งอื่น ๆ และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Bacillus subtilis* ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษากันในแง่การผลิตมากขึ้น (Coleman *et. al.* 1975 ; Tsuchiya *et. al.* 1975 ; Welker *et. al.* 1967)

นอกจากเชื้อ *B. subtilis* แล้วได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อชนิดอื่นๆ ด้วยเช่น *B. licheniformis* (Outrup *et. al.* 1976) *B. coagulan* (Medda and Chandra. 1980) *B. amyloliquefacien* (Shinmyo *et. al.* 1982) *B. stearothermophilus* (Campbel. 1954) คุณสมบัติของอะมัยเลสจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ แสดงไว้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคทีเรีย (พิเชฐ อิฐกอ. 2528)

เชื้อแบคทีเรีย	พีเอช		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
	ค่าที่เหมาะสม	ช่วงความเสถียร	ค่าที่เหมาะสม	ช่วงความเสถียร
B. subtilis	6.3	5.7-6.7	65	-
B. licheniformis CUMC 305	9.5	6.5-10.0	91	10-110
B. Coagulan CUMC 312	8.5	4.5-11	85	10-90
B.licheniformis NCLB 6346	9.0	7.0-10.0	90	40-10
B.licheniformis 584	6.5	6.0-11.0	76	40-90
B. amyloliquefacien F	5.9	5.5-6.5	65	-
B. aciddocaldarius	3.5	1.2-6.5	75	-
B.licheniformis CUMC 305	6.5	5.0-1.0	45	35-50
B. stearothermophilus BS-1	-	6.0-12.0	70	40-70
B. sp. NRRL B-3881	9.2	7.5-10.0	50	-

เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้มีหลายสายพันธุ์และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ได้มีผู้ศึกษาเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

โดยเฉพาะราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. เช่น *Aspergillus niger* (กฤติกานต์. 2523) *A. candidus* *A. oryzae* (Mense *et. al.* 1947 ; Sukhumavasi. 1973) และเชื้อราในกลุ่ม Mucoraceous fungi ได้แก่ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. *M. rouxii* *Monilia* sp. (Mense *et. al.* 1947 ; Wallerstein. 1937)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยแบคทีเรีย

การปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคทีเรียโดยการผันแปรองค์ประกอบของอาหารทั้งชนิดและสัดส่วนโดยการลองผิดลองถูกเพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้มากขึ้นเป็นวิธีที่นักจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมใช้กันมานานแล้วในปี 1943 Fukumoto ได้ทำการศึกษาชีวสังเคราะห์ของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสทำให้วิธีการดังกล่าวเปลี่ยนไปหันมาศึกษาการเจริญของเซลล์ สารอาหารที่แบคทีเรียต้องการและการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ซึ่งเป็นวิธีพัฒนาการผลิตที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในแบคทีเรียบางชนิดการผลิตอัลฟาอะมัยเลสจะสูงสุดภายหลังจากเซลล์เข้าสู่ในช่วงการเจริญคงที่ (stationary phase) แล้ว (Nomura *et. al.* 1956) ซึ่งต่อมาก็มีการพบความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างอัลฟาอะมัยเลสและแนวโน้มในการแตกตัวของเซลล์ (lysis) (Nomura *et. al.* 1956) คือจะมีการกระตุ้นการทำงานของของออโตไลติกเอนไซม์ (autolytic enzyme) ที่บริเวณผนังเซลล์เมื่อมีการเจริญและมีเมตาบอลิซึมให้มีอัตราเร็วลดลงในขณะที่เซลล์เข้าสู่การเจริญคงที่ ซึ่งเป็นการปลดปล่อยเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส แต่มีแบคทีเรียบางชนิดเช่น *B. subtilis* (Coleman and Elliott. 1962) *B. stearithetmophilus* (Welker and Campbell. 1963) สร้างอัลฟาอะมัยเลสในขณะที่เซลล์มีการเจริญทวีคูณ (logarithmic phase) และจะเพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับปริมาณเซลล์ ซึ่งได้มีการอธิบายว่าในกรณีนี้การปลดปล่อยอัลฟาอะมัยเลสและการสร้างออโตไลติกเอนไซม์ไม่เกี่ยวข้องกับภาวะการเจริญ (Lampen. 1965)

แหล่งคาร์บอน (carbon source) เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อแบคทีเรียและได้มีรายงานว่าน้ำตาลแลกโตส (lactose) กาแลกโตส (galactose) สามารถกระตุ้นการสร้างอัลฟาอะมัยเลสได้ ในขณะที่น้ำตาลกลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose) ส่งเสริมอัตราการหายใจแต่ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (Fukumoto. 1965) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาใน *B. licheniformis* CUMC 305 (Chandra *et. al.* 1980) พบว่ากลูโคสความเข้มข้นต่ำมาก ๆ สามารถกระตุ้นการสร้างอัลฟาอะมัยเลสได้ แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการสร้างอย่างสมบูรณ์ แบคทีเรียจะใช้แลกโตสในอัตราที่ต่ำกว่าน้ำตาลหรือกรดอินทรีย์ตัวอื่นๆ ในการหายใจซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีเมแทบอลิซึมต่ำมีผลให้มีการสร้างอัลฟาอะมัยเลสมาก ๆ นักวิทยาศาสตร์กลุ่มหนึ่งพบว่าแหล่งคาร์บอนไม่เพียงแต่จะมีผลต่อ

รูปแบบการสังเคราะห์อัลฟาอะมัยเลสเท่านั้นแต่ยังมีผลต่อความเร็วในการสลายคาร์โบไฮเดรตด้วย ซึ่งความเร็วในการสลายคาร์โบไฮเดรตสูงเท่าใดการยับยั้งการสร้างอัลฟาอะมัยเลสก็สูงมากตามไปด้วย (Windish and Mhatre. 1965) และพบว่าใน *B. stearothemophilus* มีการผลิตอัลฟาอะมัยเลสเป็นส่วนกลับกับการอัตราการเจริญเติบโตสำหรับการเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่ไม่ใช่น้ำตาลมอลโตส ฟรุกโตส และแป้ง (Candra *et. al.* 1980) และใน *B. subtilis* พบว่าการผลิตอัลฟาอะมัยเลสมีแนวโน้มทำนองเดียวกันสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เชื้อมีการเจริญได้ดีแต่มีการผลิตอัลฟาอะมัยเลสได้น้อย (Fukumoto. 1965) ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไกลโคเจน แลกโตส กาแลกโตส เชื้อจะมีการเจริญต่ำแต่ผลิตอัลฟาอะมัยเลสได้มาก

แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตอัลฟาอะมัยเลสขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid) มีรายงานว่าเคซีน (casein) และสารสกัดจากถั่วเหลืองซึ่งได้จากการต้มถั่วเหลืองในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการสร้างอัลฟาอะมัยเลส นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเคซีนที่ปราศจากวิตามินกากถั่วเหลือง เจลาติน (gelatin) และสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และสารสกัดจากเนื้อ (beef extract) สารสกัดจากตับ (bacto-liver) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) สำหรับการผลิตอัลฟาอะมัยเลสในกรณีของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมไนเตรต มีรายงานว่าไม่ได้ช่วยให้การผลิตอัลฟาอะมัยเลสมากขึ้น (Chandra *et. al.* 1980)

เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) นอกจากแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนแล้วเกลืออนินทรีย์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตอัลฟาอะมัยเลสและมีรายงานว่าฟอสเฟตเป็นตัวกระตุ้นการผลิตอัลฟาอะมัยเลสที่สำคัญ (fukumoto *et. al.* 1957) นอกจากนี้ Mn^{2+} Zn^{2+} และ Fe^{2+} ยังกระตุ้นการสร้างอัลฟาอะมัยเลสได้เป็นอย่างดี (Coleman and Elliott. 1962) แต่ในระดับอุตสาหกรรมนั้นไม่จำเป็นที่จะต้องเติมเกลือของอิออนดังกล่าว เพราะว่าจะมีอยู่แล้วในวัตถุดิบที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาใน *B. licheniformis* CUMC 305 พบว่า Ag^{2+} และ Hg^{2+}จะยับยั้งการสร้างอัลฟาอะมัยเลสในขณะที่ Fe^{2+} Mg^{2+} และ Cu^{2+} กระตุ้นการสร้างอัลฟาอะมัยเลส (Coleman and Elliott. 1962) นอกจากอิออนต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว Ca^{2+} เป็นอิออนที่สำคัญมากต่อการผลิตอัลฟาอะมัยเลส เนื่องจากอัลฟาอะมัยเลสเป็นเอนไซม์ประเภทที่มีแคลเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ และจากการศึกษาใน *B. Amyloliquefaciens* (Hamada *et. al.* 1967) พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ทำให้มีการผลิตอัลฟาอะมัยเลสสูงขึ้นแต่ในระดับอุตสาหกรรมถ้าใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนก็ไม่ต้องมีการเติมอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสาร
ในกรณีใดๆทั้งสิ้น

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์มักจะเจริญได้ดีในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดก็ต้องการอุณหภูมิสูงในการเจริญ คือเจริญได้ดีในช่วง 45-65 องศาเซลเซียส (ทนง ภัครัชพันธุ์. 2522) เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสซึ่งมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยจะสามารถทนความร้อนได้ดีกว่าเบต้าอะมัยเลส โดยเฉพาะเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus stearothermopillus*

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคทีเรียต้องคำนึงถึงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

2.7 การศึกษาการย่อยแป้งดิบด้วยเอนไซม์อะมัยเลสจากเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะมัยเลสย่อยแป้งดิบได้แก่เชื้อ *Bacillus subtilis* 65 (Hayashida *et. al.* 1988) เชื้อ *Bacillus stearothermophillus* (Dettori-Campus *et. al.* 1992) *Lactobacillus plantarum* (Giraud *et. al.* 1994) *Bacillus* sp. Ts 23 (Lin *et. al.* 1998) *Bacillus* sp. IMD 370 (Kelly *et. al.* 1995) จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 65 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสย่อยแป้งดิบได้ โดยย่อยแป้งมันฝรั่งดิบและแป้งข้าวโพดดิบได้อย่างรวดเร็วแต่ไม่สามารถดูดซับกับแป้งดิบชนิดใด ๆ ได้ที่พีเอชต่าง ๆ เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ย่อยแป้งดิบได้นี้สามารถย่อยสับสเตรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ ได้ เช่น น้ำตาลมอลโตส เป็นต้น ในขณะที่เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อราไม่สามารถย่อยได้ การย่อยแป้งดิบขึ้นกับแรงผลักดันระหว่างโมเลกุลเอนไซม์กับเม็ดแป้ง ซึ่งแรงผลักดันนี้มีผลทำให้เกิดการย่อยแป้งดิบแบบไม่เจาะจง (Hayashida *et. al.* 1988)

เมื่อทำการย่อยเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสด้วยเอนไซม์โพรติเนสพบว่าเอนไซม์ขาดความสามารถในการย่อยแป้งดิบไปอย่างสมบูรณ์แต่ยังคงมีความสามารถย่อยสับสเตรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ จากผลของการย่อยด้วยเอนไซม์โพรติเนสทำให้มีการปลดปล่อยบริเวณที่มีความสำคัญในการย่อยแป้งดิบออกมาและทำให้โครงสร้างสามมิติเปลี่ยนแปลงไป (Teramoto *et. al.* 1989)

ตำแหน่ง raw-starch affinity site ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสย่อยแป้งดิบโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* 65 พบว่ามีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบคือ serine และ threonine อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งดิบโดยเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเม็ดแป้งเช่นเดียวกับเอนไซม์กลูโคอะมัยเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อรา แต่ตำแหน่ง raw-starch affinity site นี้ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบจึงไม่สามารถดูดซับกับแป้งดิบได้ ซึ่งลักษณะ

ดังกล่าวนี้แตกต่างจากตำแหน่ง raw-starch affinity site ของอัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อราที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบจึงสามารถดูดซับกับแป้งดิบได้

จากการศึกษาพบว่าอัลฟาไซโคลเด็กซ์ทริน (α-cyclodextrin) เป็นตัวยับยั้งแบบจำเพาะของเอนไซม์โดยจะเข้าจับตรงตำแหน่ง raw-starch affinity site ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ ตำแหน่ง raw-starch affinity site จะแยกออกจากบริเวณเร่ง (active site) อย่างชัดเจน (Hayashida *et. al.* 1988)

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ

จุลินทรีย์	ที่มา
Bacillus subtilis 65	Hayashida *et. al.* (1988)
	Teramoto *et. al.* (1989)
Bacillus stearothermophilus	Dettori-Campus *et. al.* (1992)
Lactobacillus plantarum	Giraud *et. al.* (1994)
Bacillus sp. IMD 370	Kelly *et. al.* (1995)
Bacillus sp. TS-23	Lin *et. al.* (1998)
Endomycoppsis fibuligera	Saha and Ueda (1983)
Candida antarctica	De Mot and Verachtert (1987)
Cryptococcus sp. S-2	Lefuji *et. al.* (1994)
Mucor rouxianus	Yamasaki *et. al.* (1977)
Aspergillus awarmori var. *kawachi*	Hayashida and Yoshino (1978)
Aspergillus awarmori NRRL 3112	Ueda *et. al.* (1981)
Aspergillus niger	Park and Rivera (1982)
	Han and Steinberg (1987)
	Stoffer *et. al.* (1993)
Aspergillus oryzae	Medda *et. al.* (1982)
Rhizopus sp.	Matsuoka *et. al.* (1982)
Aspergillus awarmori IFO 4033	Lee *et. al.* (1993)
Corticium rolfsii	Nagasaka *et. al.* (1998)

2.8 การผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

การหมักแบบอาหารแข็ง (solid state Fermentation) หรือเรียกอีกอย่างว่าการหมักแบบอาหารแห้ง หมายถึง ระบบการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาพซึ่งไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) อยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามน้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในสภาพความชื้น (moisture) ที่ถูกดูดซับอยู่กับวัตถุดิบเท่านั้นดังนั้นระบบการหมักแบบอาหารแห้งนี้จึงไม่รวมถึงการหมักของแข็งในอาหารเหลวข้น (slurries : ของเหลวซึ่งมีปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูง) (วราวุฒิ ครูส่ง. 2532)

กระบวนการผลิตเอนไซม์ในระบบการหมักแบบอาหารแข็งนิยมใช้กันในช่วงแรกอาศัยการเตรียมโคจิเพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ซึ่งนิยมทำในถาดหรือภาชนะทรงกระบอกหมุนได้เรียกว่า (rotary drum systen) อย่างไรก็ตามการเลือกใช้ระบบใดขึ้นอยู่กับข้อดีและข้อเสียของระบบเป็นสำคัญ

วัตถุดิบควรอยู่ในรูปแบบที่พร้อมจะให้เชื้อเริ่มต้นแทรกซึมเข้าไปใช้ประโยชน์ได้ วัตถุดิบที่ใช้เลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์อะมัยเลสได้แก่ อาหารรำข้าวสาลี ซึ่งประกอบด้วยรำข้าวสาลี แกลบ และแป้งมันสำปะหลัง ในอัตราส่วน 7 : 2 : 1 (วราวุฒิ ครูส่ง. 2528)

การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งต้องปรับสภาพความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อให้เชื้อเจริญได้ดี และเกิดการพองตัวของอนุภาคอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เข้าไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย (Narahara *et. al.* 1982)

ขนาด รูปร่าง และความชื้นเริ่มต้นของวัตถุดิบจะต้องสัมพันธ์กันในลักษณะที่ทำให้วัตถุดิบมีความพรุนมากพอและสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อหน่วยปริมาตรสูงพอที่จะไม่เกาะติดกันจนทำให้ชั้นหมักทึบเกินไป

ข้อดีของการหมักแบบอาหารแข็ง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมง่าย
2. ต้องการพื้นที่ในติดตั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักไม่มาก
3. เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรมไม่ค่อยยุ่งยาก
4. สภาพการเจริญของจุลินทรีย์มีลักษณะคล้ายคลึงกับธรรมชาติ
5. ผลิตภัณฑ์สามารถสกัดได้โดยตรง และใช้วิธีที่ง่ายกว่าและสะดวก

2.9 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

สารละลายเอนไซม์ที่แยกเอาเซลล์ออกไปแล้วเรียกเอนไซม์สกัดหยาบ (Crude enzyme) สามารถนำมาทำให้เข้มข้นโดยการระเหยหรือนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เมธานอล อะซิโตน และตัวทำละลายอื่น ๆ โดยที่จะต้องทำในที่อุณหภูมิต่ำและนำไป dialysis

จากนั้นทำให้แห้ง เติมสารที่ศึกษาแล้วว่ารักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไว้ได้และเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ในทางการค้าอาจส่งขายในรูปของสารละลาย การทำให้เอนไซม์บริสุทธิส่วนมากมักใช้วิธีการโครมาโตกราฟฟีแบบ molecular sive เช่นใช้ DEAE celluose Sephadex G100 Cm-cellulose เป็นต้น (ดวงพร คันธโชติ. 2530) ซึ่งรายละเอียดที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เอนไซม์ และ ประสบการณ์ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยที่คุณสมบัติและประสิทธิภาพของเอนไซม์ยังคงอยู่และทำให้ได้เอนไซม์ในรูปที่บริสุทธิ์ขึ้น

Buonocore *et. al.* (1976) ได้ศึกษานำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus acidocaldaricus* มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโนเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวร้อยละ 20-70 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออก แล้วละลาย แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 0.02 โมลาร์ พีเอช 3.5 และนำไปไดอะไลซิส และทำ hydroxyapatite column chromatography

Yamane and Maruo (1974) นำเอนไซม์อะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 85 และพีเอช 7.5 กรองผ่าน Celite 545 ละลายส่วนผสมของตะกอนและ Celite 545 ด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์ ที่ผสมด้วยแคลเซียมอะซิเตต เข้มข้น 0.002 โมลาร์ พีเอช 7.5 แล้วไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์เดียวกัน

Takasaki (1979) ศึกษาการตกตะกอนเอนไซม์เบต้าอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus cereus* var. mycoides ด้วยอะซิโตน แล้วนำมาละลายด้วยบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมแล้วนำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยแป้งและใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นตัวชะเอนไซม์ออกมาและจากนั้นเติมอนุมูลของ Na^{+} Co^{++} Zn^{++} Mn^{++} ลงในเบต้าอะมัยเลสที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5.0 องศาเซลเซียส สามารถรักษากิจกรรมให้คงที่ได้ 1-2 เดือน ถ้าไม่เติมอนุมูลสารเหล่านี้เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือร้อยละ 93 ของกิจกรรมเริ่มต้น

Upton and Fogarty (1977) นำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Thermomonospora viridis* มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย n-propyl alcohol แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายและไดอะไลซิสด้วยน้ำประปา และนำไปผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุ $Ca_3(PO_4)$ แล้วชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และนำไปผ่าน Sephadex G-100 ทำให้เอนไซม์อะมัยเลสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 313 เท่า

2.10 การเก็บรักษาเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

การเก็บรักษาอัลฟาอะมัยเลสให้มีกิจกรรมของเอนไซม์คงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อยเกี่ยวข้องทั้งเรื่องความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิต้องให้เหมาะสมมิฉะนั้นแล้วเอนไซม์จะเสียสภาพจากนั้นก็เก็บรักษาไว้ในที่เย็น (ดวงพร คันธโชติ. 2530) วิธีการที่นิยมใช้ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

1. ตู้เย็นธรรมดา อาจมีการเติมอนุมูลสารบางอย่างลงไปเพื่อรักษากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งวิธีนี้สามารถเก็บรักษาไว้ได้ประมาณ 1-2 เดือน
2. การเก็บโดยการแช่แข็งนิยมเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
3. การทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dry) เป็นการระเหิดน้ำออกจากสารละลายเอนไซม์ในสภาพที่เป็นน้ำแข็ง ทำในสภาพสูญญากาศ เมื่อเสร็จแล้วสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องก็ได้
4. การตรึงรูปเอนไซม์ (immobilze enzyme) โดยให้เอนไซม์ยึดติดกับสารที่เป็นตัวพยุงหรือแคปซูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอย่างเช่น polyacrylamide gel หรือแก้วที่มีรูพรุนเป็นต้น

Dwali *et. al.* (1978) รายงานว่าการนำเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* มาทำการตรึงรูปเอนไซม์โดยบรรจุลงในแก้วที่มีรูพรุนและ Silochrome โดยวิธี Glutaraldehyde และเติมอนุมูลแคมเซียมที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ลงไป ที่พีเอชที่ 5.8 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการตรึงรูป และพีเอช 4.7 คือพีเอชทีเหมาะสมต่อการละลายเก็บในสภาพที่ไม่ละลายในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.015 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานถึง 6 เดือน และสามารถใช้ซ้ำได้ 20 ครั้งโดยกิจกรรมไม่เปลี่ยนแปลง

2.11 การนำเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดได้ง่ายดังนั้นก่อนการทอผ้าจึงต้องมีการนำด้ายไปชุบแป้งเพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึงหลังจากทอผ้าเป็นผืนจึงต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสร่วมกับเอนไซม์อะมัยเลสตัวอื่นย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อเป็นการทำลายเอนไซม์ วิธีการที่กล่าวมาใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม

อุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ใช้เอนไซม์ในการทำให้น้ำผลไม้ใสซึ่งโดยปกติดแล้วน้ำผลไม้คั้นจะมีความขุ่นเนื่องจากมีแป้งสูงจึงต้องมีการใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในการช่วยย่อยแป้งซึ่งจะบ่มไว้นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80-90 องศาฟาเรนไฮต์ หลังจากนั้นกรองน้ำตาลออกซึ่งยังสามารถนำน้ำตาลที่ได้ไปทำเป็นเยลลีได้ด้วย

การผลิตแอลกอฮอล์ และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์มีการใช้เป็นครั้งแรกที่ประเทศจีนโดผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นประเทศญี่ปุ่นนำหลักการนี้มาผลิตแอลกอฮอล์เมื่อประมาณ 1700 ปีมาแล้ว ซึ่งแตกต่างจาก ยุโรปและอเมริกาที่จะใช้เอนไซม์จากข้าวมอลท์แต่ปัจจุบันนี้ทั้งยุโรปและอเมริกาก็หันมาใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อราในการผลิตแอลกอฮอล์

58928

การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง ซึ่งระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆ จะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด เกิดจากการย่อยแบบสุ่มจึงได้สารหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส และเตตระแซคคาไรด์ ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบพวกฟูฟิวรอลทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่ไม่ดี ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมากโดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคสเป็นต้น

2.12 การหากิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลส

วิธีที่นิยมในการหากิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลสมีดังนี้

Amyloclassic method เป็นวิธีที่ดูการลดลงของสีไอโอดีนที่ทำปฏิกิริยากับแป้งอะไมโลส เด็กทริน หรือ อะไมโลเด็กซ์ทริน สีที่เกิดขึ้นเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไอโอดีนกับโพลีแซคคาไรด์ที่เหลือจากการย่อยโดยเอนไซม์อะมัยเลส (Mestcky *et. al.* 1969 ; Street. 1974)

วิธีการตรวจน้ำตาลรีดิวซ์ (detection of reducing sugar) เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อะมัยเลสในการย่อยแป้ง อะไมโลส เด็กซ์ทริน หรือ อะไมโลเด็กซ์ทริน สามารถตรวจสอบได้โดยใช้สารเคมี เช่น fericcyanide, halogens แต่วิธีที่สะดวกและนิยมใช้คือการใช้ alkaline copper solution หรือ dinitrosalicylic acid (DNS) (Somogyi. 1952) และ (Bernfeld. 1951)

การติดตามผลผลิตจากการไฮโดรไลซิส (enzymatic determination of hydrolysis product) เป็นวิธีการตรวจสอบผลิตผลที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อะมัยเลสโดยใช้ปฏิกิริยาคู่ของเอนไซม์ (couple enzymatic reaction) กลูโคสเป็นผลผลิตชนิดเดียวที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะมัยเลส สามารถหาปริมาณของกลูโคสได้โดยการใช้ปฏิกิริยาควบคู่ของเอนไซม์ เช่น glucose dehydrogenase, hexokinase กับ glucose 6-p dehydrogenase, glucose oxiidase หรือ glucose oxidase (Paul.1978)

2.13 เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (Tortora Case and Funke.1992)

เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สามารถเคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา เป็นเชื้อที่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ และมีสปอร์ที่ทนความร้อน เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศ ทนต่อพีเอชและความเค็มได้ดี สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้เมื่อเจริญบนอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ

2.14 ข้อได้เปรียบของการใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคทีเรียในอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมโดยการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง แล้วได้ผลิตภัณฑ์น้ำเชื่อมที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ นั้น มีกระบวนการผลิตดังนี้คือกระบวนการเจลลาติไนเซชัน (gelatinization) ลิควิเฟคชัน (liquefaction) และแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) โดยที่ในขั้นตอนแรกแป้งจะถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้เม็ดแป้งพองตัวด้วยน้ำและศกตะกอนโปรตีนที่เกาะติดกับผิวเม็ดแป้ง โดยที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจลาติไนเซชันขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง เช่นถ้าเป็นแป้งข้าวโพดใช้อุณหภูมิประมาณ 105-110 องศาเซลเซียส แป้งที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชันจะมีความหนืดสูงมาก ขั้นตอนต่อไปคือลิควิเฟคชันซึ่งจะมีการเติมธินนิงเอเจนต์ (thinning agent) เพื่อช่วยย่อยสลายแป้งบางส่วนและลดความหนืดลง ธินนิงเอเจนต์ที่ใช้กันคือกรด โดยปรับพีเอชของไซรัปให้ได้ประมาณ 2 และทำให้ร้อนถึง 140-150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งไซรับที่ได้สามารถกรองได้ง่าย อย่างไรก็ตามความไม่จำเพาะของปฏิกิริยาที่ใช้กรดยังผลให้เกิดผลิตภัณฑ์และสีที่ไม่พึงประสงค์ยิ่งไปกว่านั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังมีความเข้มข้นของเกลือยังสูงอีกด้วย เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นได้มีการนำเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมาใช้แทนกรด โดยมีข้อจำกัดคือ อัลฟาอะมัยเลสนั้นต้องมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี เนื่องจากในทางปฏิบัติกระบวนการนี้ต้องเกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 85-95 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาสั้น ซึ่งเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อแบคทีเรียเหมาะสมที่จะใช้เป็นธินนิงเอเจนต์ในกระบวนการลิควิเฟคชัน เนื่องจากมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี (Windish and Mhatre. 1965)

และนอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรมบางประเภทที่ต้องใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสร่วมกับธินนิงเอเจนต์ร่วมกันโดยสภาวะที่ใช้เป็นกรดและด่างสูงจากตารางที่ 2.1 พบว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากแบคทีเรียบางตัวมีความทนตัวต่อกรดและด่างสูงด้วย

2.15 ขนุน (Jack fruit) (นฤชิต แว่วศรีผ่อง. 2529)

ขนุนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artocapus heterophyllus* lank จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae (mulberry) สกุล Artocapus และเป็นชนิด hetrophyllus เป็นไม้ผลขนาดกลางถึงใหญ่ อายุยืน มีน้ำยางสีขาว ทรงพุ่มทึบ ออกดอกและผลตามส่วนของลำต้น และกิ่งแก่ ภายนอกมีหนามถี่ ภายในมียวงสีเหลืองหรือสีจำปา น้ำหนักผลเฉลี่ยประมาณ 18 กิโลกรัม และอาจหนักถึง 50 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตของต้นรวดเร็ว การตกผลจะใช้เวลาประมาณ 3-5 ปีขึ้นอยู่กับชนิดของขนุนเป็นพันธุ์หนักหรือว่าพันธุ์เบา

ผลขนุนเป็นแบบผลรวม (multiple fruit) คือผลที่เกิดจากการมีหลาย ๆ ดอกซึ่งมีรังไข่หลอมตัวกันแน่นอยู่บนช่อดอกเดียวกันหรือรวมเป็นผลเดียวกัน รังไข่แต่ละรังไข่เป็นผลย่อย ๆ หรือผลเดี่ยวหนึ่งผลคือยวงขนุน 1 ยวง ซึ่งประกอบด้วยเนื้อหรือยวงขนุนหุ้มรอบ ๆ เมล็ด เนื้อยวงเกิดจากกลีบดอกชั้นนอกของดอก ปลายสุดกลีบดอกชั้นนอกจะรวมติดกันและเมื่อกลายเป็นผลภายในผลจะเป็นยวงเบียดชิดกันกับซังตลอดทั้งผลหรือไส้และอีกด้านหนึ่งยึดติดกับเปลือก เนื้อยวงมีหลายสีขึ้นกับพันธุ์ขนุนชนิดนั้น ๆ เช่น สีขาว สีเหลือง สีจำปา เนื้อมีรสหวานมีกลิ่นหอม มีลักษณะหนาบ้าง บางบ้าง ยวงขนุนประกอบด้วยเนื้อยวงซึ่งอยู่ด้านนอกหุ้มเมล็ดอยู่หรือผนังรังไข่ซึ่งจะมีลักษณะบางและเหนียวกว่าเนื้อภายในยวงมีเมล็ด ซังขนุนนั้นพัฒนามาจากกลีบเลี้ยงของดอก ซังมีสีเดียวกับยวงหรือสีอ่อนกว่ายวง รังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมเกสรจะลีบดูคล้ายซังขนุนเช่นกัน เนื้อและซังเป็นส่วนของ periath (กลีบดอกและกลีบเลี้ยงรวมกัน) เปลือกผลเป็นแผ่นห่อหุ้มผลเกิดจากยอดเกสรตัวเมีย (stigma) ที่กลายเป็นหนามสั้นทู่ แกนกลางหรือไส้กลางผลขนุน (pith) เป็นก้านชูดอกที่แผ่ออกรอบวงต่าง ๆ ของดอก เมล็ดขนุนมีมากขางครั้งมีถึง 100 กว่าเมล็ดมีขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ขึ้นอยู่กับพันธุ์ เมล็ดขนุนจัดเป็นเมล็ดประเภท recalcitrant และสูญเสียการงอกได้ง่ายเมล็ดมีรูปทรงกลมคล้ายไข่ ด้านป้านอยู่ทางเปลือกบนส่วนด้านแหลมของเมล็ดอยู่ทางแกนกลางของผล ทางด้านป้านของเมล็ดเป็นตำแหน่งที่รากและยอดงอกออกมา จากการวิเคราะห์ทางโภชนาการของขนุนแสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของขนุน (นฤชิต แว่วศรีผ่อง. 2539)

รายการ	ขนุนอ่อน	ขนุนสุก	เมล็ดขนุน	ซังขนุน	หน่วย
แคลลอรี่	210 KJ	3 9 5 - 4 1 0	600 KJ	122	กิโลแคลลอรี่
น้ำ	85.2	KJ	57.6	66.6	กรัม
เส้นใย	2.6	72.2	-	-	กรัม
เก้าถ่าน	0.7	0.8-1.1	34.9-38.4	-	กรัม
โปรตีน	2.0	0.8-1.4	6.6	1.4	กรัม
คาร์โบไฮเดรต	11	1.3-2	34.9-38.4	29.2	มิลลิกรัม
ไขมัน	0.6	18.9-25.4	0.4	-	มิลลิกรัม
แคลเซียม	53	0.1-0.4	50.0	21.0	มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	20.0	22.37	130.0	13.0	มิลลิกรัม
เหล็ก	0.4	18-38	1.2	0.2	มิลลิกรัม
โปแตสเซียม	323	0.4-11	-	-	มิลลิกรัม
โซเดียม	3.0	407	-	-	มิลลิกรัม
ไวตามิน เอ	-	2.0	1.74	-	มิลลิกรัม
ไวตามิน บี 1	-	175-540	-	0.08	มิลลิกรัม
ไวตามิน บี 2	0.1	0.11	-	0.15	มิลลิกรัม
ไทอะมีน	0.12	-	-	0.15	มิลลิกรัม
ไนอะซีน	0.5	0.03-0.09	24	-	มิลลิกรัม
ไวตามิน ซี	12	0.9-4.0	-	-	มิลลิกรัม

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงแสงมองเห็นและอัลตราไวโอเลต
3. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส
4. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ
5. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
6. เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง
8. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
10. เครื่องอังน้ำอุ่น (water bath)
11. เครื่องวัดพีเอช
12. เครื่องหาโปรตีน
13. ฟลาสก์
14. ลวดเขี่ยเชื้อ
15. จานเพาะเชื้อ
16. หลอดทดลอง
17. ไมโครปิเปตต์ (micropipet)
18. ปิเปต (pipet)
19. หลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุล

3.2 สารเคมี

1. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)
2. เปปโตน
3. น้ำกลั่น
4. กลูโคส
5. แป้ง (มันฝรั่ง)

6. น้ำตาลแลกโตส
7. น้ำตาลซูโครส
8. สารสกัดจากยีสต์
9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)
10. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2H_2PO_4.2H_2O$)
11. โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)
12. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)
13. แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$
14. โซเดียมไนเตรต ($NaNo_3$)
15. แคลเซียมคลอไรด์ ($Cacl_2.2H_2O$)
16. เหล็กคลอไรด์ ($FeCl_2.2H_2O$)
17. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
18. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
19. โปแทสเซียมโซเดียมทาเตรท ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$)
20. โซเดียมคาร์โบเนต (Na_2CO_3)
21. โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$)
22. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_45H_2O$)
23. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
24. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
25. สารละลายฟีนอล (C_6H_5OH)
26. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)
27. เมธิลเรด
28. มิธิลีนบลู
29. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
30. โบรโมเคซอลกรีน

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ...ค้า
...กรณีใดๆทั้งสิ้น...

3.3 วัตถุดิบ

ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนพันธุ์ทองสุดใจจากร้านขายขนุนแกะซอยจินดา เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เตรียมวัตถุดิบโดยนำส่วนที่เหลือทิ้งของขนุนมามี 3 ส่วนได้แก่ ซัง แกน และเมล็ด นำส่วนของซังและแกนนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปแผ่บนถาดอลูมิเนียมและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในตู้อบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดด้วยเครื่องบดอัตโนมัติแล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดในช่วง 300–1700 ไมโครเมตร และนำไปเก็บในโหลดูดความชื้น (desicator)

เมล็ดขนุนเตรียมโดยนำไปต้มก่อนเป็นเวลาประมาณ 15 นาทีหลังจากนั้นนำไปลอกเปลือกออกเหลือแต่เนื้อสีขาวแล้วนำไปอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปบดด้วยเครื่องบดอัตโนมัตินำไปร่อนให้มีขนาดในช่วง 300-1700 ไมโครเมตร และเก็บในถุงพลาสติกไว้โหลดูดความชื้น และก่อนทำการทดลองนำเศษเหลือทิ้งของขนุนทั้ง 3 ส่วนมาผสมให้เข้ากัน

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย

ใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 1 ลูป ลาก (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงแล้วปิดด้วยพาราฟิล์มและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อทุก ๆ 2 อาทิตย์

3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ประมาณ 1-2 ลูป แล้วนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส และเขย่าเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูกลืนแสงให้ได้ 0.5

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ในเศษเหลือทิ้งของขนุน

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (protein) แป้ง (starch) ความชื้น (moisture) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ตามวิธีในภาคผนวก ข

3.6 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารสูตรต่าง ๆ

ใช้สูตรอาหารทั้งหมด 5 สูตรดังนี้คือ

สูตร 1 : เศษเหลือทิ้งของขนุน

สูตร 2 : เศษเหลือทิ้งของขนุน + สารละลายเกลือแร่

สูตร 3 : เศษเหลือทิ้งของขนุน + สารละลายเกลือแร่ + แป้ง

สูตร 4 : เศษเหลือทิ้งของขนุน + สารละลายเกลือแร่ + แอมโมเนียมซัลเฟต

สูตร 5 : เศษเหลือทิ้งของขนุน + สารละลายเกลือแร่ +แอมโนเนียนซัลเฟต + แป้ง

ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน (ซัง แกน และเมล็ด) ที่เตรียมไว้ 10 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเติมสารต่าง ๆ ตามสูตรอาหารข้างต้น เติมแป้งและแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน เติมสารละลายเกลือแร่เพื่อปรับความชื้น 25 มิลลิลิตร (ความชื้นประมาณร้อยละ 70) และปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช 7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน (96 ชั่วโมง) นำมาสกัดเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส โดยเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0 ในอัตราส่วนเศษเหลือทิ้งของขนุนต่อบัฟเฟอร์ 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร และหยดโทลูอีน 2-3 หยด นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Bernfeld (1951) ในภาคผนวก ข

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในระดับฟลาสก์โดยใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรท

3.7.1 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลฟาอะมัยเลส

ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมแป้งและแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน เติมสารละลายเกลือแร่ 25 มิลลิลิตร (ความชื้นร้อยละ 70) และปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช 7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณร้อยละ 5 7 10 13 และ 15 ปริมาตรต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน คนให้เข้ากันด้วย

แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามข้อ 3.6

3.7.2 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลฟาอะมัยเลส

ใช้เศษเหลือทิ้งขอขนุนที่เตรียมไว้ 10 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเติมแป้งและแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน เติมสารละลายเกลือแร่เพื่อปรับความชื้นตามสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม สารละลายเกลือแร่ 10 มิลลิลิตร ความชื้นร้อยละ 50

สูตรที่ 2 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม สารละลายเกลือแร่ 15 มิลลิลิตร ความชื้นร้อยละ 60

สูตรที่ 3 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม สารละลายเกลือแร่ 20 มิลลิลิตร ความชื้นร้อยละ 65

สูตรที่ 4 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม สารละลายเกลือแร่ 25 มิลลิลิตร ความชื้นร้อยละ 70

สูตรที่ 5 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม สารละลายเกลือแร่ 30 มิลลิลิตร ความชื้นร้อยละ 75

นำสูตรอาหารทั้ง 5 สูตร มาปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช 7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากกล้าเชื้อเริ่มต้นในปริมาณที่ได้จากข้อ 3.7.1 คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

3.7.3.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารที่ทราบความชื้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2 มาศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ดังนี้ แป้ง น้ำตาลแลกโตส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส เติมปริมาณร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช 7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่

121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ปริมาณที่ได้จาก 3.7.1 คนด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารที่ทราบชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วจากข้อ 3.7.3.1 มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยเติมลงในปริมาณดังนี้ ร้อยละ 1 2 3 และ 4 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน ปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช 7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ปริมาณที่ได้จาก 3.7.1 คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

3.7.4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารที่ทราบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.7.3.2 เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรต เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน ปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช 7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ปริมาณที่ได้จาก 3.7.1 คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารที่ทราบชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.4.1 มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยเติมลงในปริมาณดังนี้ ร้อยละ 1 2 3 และ 4 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน ปรับพีเอชด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช

7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ปริมาณที่ได้จาก 3.7.1 คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.5 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

นำสูตรอาหารที่ทราบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.7.4.2 มาศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมโดยปรับด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้พีเอช 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ปริมาณที่ได้จาก 3.7.1 คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.6 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลฟาอะมัยเลส

นำสูตรอาหารที่ทราบพีเอชที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.7.5 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ปริมาณที่ได้จาก 3.7.1 คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.7 การศึกษาขนาดของเศษเหลือทิ้งของขนุนที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลฟาอะมัยเลส

ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน (ซัง แกน และเมล็ด) 10 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีขนาด ดังนี้คือที่ เล็กกว่า 300, 300-500, 500-850, 850-1700, และ ใหญ่กว่า 1700 ไมโครเมตร ทำการทดลองตามสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.1 - 3.7.6 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.8 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

3.7.8.1 การศึกษาชนิดของเกลือ

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.1-3.7.7 แล้วนำมาเติมเกลือ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) เหล็กคลอไรด์ ($FeCl_2.2H_2O$) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในปริมาณ ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.1-3.7.7 แล้วนำมาเติมเกลือ ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.8.1 ในปริมาณร้อยละ 1 2 3 และ 4 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.8 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.1-3.7.8 จากนั้นนำมาเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อโดยวิธี Total plate count สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.9 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.1-3.7.8 นำมาศึกษาสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสชนิดต่าง ๆ กันดังนี้ คือ เศษเหลือทิ้งของขนุน รำข้าวสาลี และ รำข้าวเจ้า ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำมาสกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามข้อ 3.6

3.10 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้

3.10.1 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน

หมายเหตุ : ทุกขั้นตอนปฏิบัติที่ 4 องศาเซลเซียส

เตรียมตัวอย่างเอนไซม์โดยสกัดตามวิธีจากข้อ 3.6 นำสารละลายเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 0-20 20-40 40-60 60-80 ทิ้งให้ตกตะกอนสมบูรณ์ 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเอนไซม์ที่ 10,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้นโดยนำสารละลายตะกอนเอนไซม์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงสุดมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยหลอดที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ขนาด 10,000 ดาลตัน จากบริษัท VIVA SCIENCE รุ่น VIVA SPIN อีก 10,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนที่อยู่ด้านบนของหลอดมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามวิธีในภาคผนวก ข เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในแต่ละขั้นตอนการเตรียม

3.10.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

เตรียมตัวอย่างเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 3.10.1 ใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 3.0-5.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0-8.0 และไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 9-10 ทดลองเช่นเดียวกับการหากิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามวิธีในภาคผนวก ข แต่เตรียมน้ำแป้ง 1 % โดยใช้บัฟเฟอร์เช่นเดียวกับข้างต้นพีเอช 3-10 และ หากิจกรรมของเอนไซม์และรายงานผลในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

3.10.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

เตรียมเอนไซม์ที่เช่นเดียวกับข้อ 3.10.1 นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในภาคผนวก ข และบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส โดยเตรียมน้ำแป้ง 1 % โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมตามข้อ 3.10.2 หากิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

3.10.4 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่พีเอชต่าง ๆ

เตรียมเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยใช้บัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ 3-10 ตามข้อ 3.10.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำเอนไซม์

อัลฟาอะมัยเลสที่ได้มาปรับพีเอชให้ได้พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อ 3.10.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามวิธีในภาคผนวก ข ในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.10.2 และ 3.10.3 ซึ่งเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

3.10.5 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่อุณภูมิต่าง ๆ

นำสารละลายเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ได้จากการทดลองข้อ 3.10.1 มาบ่มที่อุณหภูมิ 20 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามวิธีในภาคผนวก ข ในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.10.2 และ 3.10.4 ซึ่งเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

3.11 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบจากเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้

ชั่งตัวอย่างแป้งดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า และแป้งมันฝรั่ง ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปอบเพื่อฆ่าเชื้อ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทิ้งไว้ให้เย็น เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่พีเอช 6.0 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้น 50 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท เติมโทลูอีน 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ครั้งละ 2 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที และนำส่วนใสมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีในภาคผนวก ข และนำมาคำนวณหาการย่อยแป้งดิบเป็นร้อยละจากสูตร

$$\text{การย่อยแป้งดิบ (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์}}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรด}} \times 100$$

หมายเหตุ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรด หาได้จากวิธีในภาคผนวก ข

3.12 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely Randomized design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan 'new multiple range test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.13 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการวิเคราะห์สารอาหารและความชื้นในเศษเหลือทิ้งของขนุนที่ใช้เป็นสับสเตรท

จากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณแป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และโปรตีนในเศษเหลือทิ้งของขนุนที่ผ่านการอบและบดแล้ว พบว่าในเศษเหลือทิ้งของขนุนมีแป้งอยู่ร้อยละ 19.6 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 47.5 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 4.2 โปรตีนร้อยละ 4.7 และความชื้นร้อยละ 0.7 แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต่าง ๆ ในเศษเหลือทิ้งของขนุนที่ใช้เป็นสับสเตรท

สารต่าง ๆ	ปริมาณ (ร้อยละ)
แป้ง	19.6
น้ำตาลทั้งหมด	47.5
น้ำตาลรีดิวซ์	4.2
โปรตีน	4.7
ความชื้น	0.7

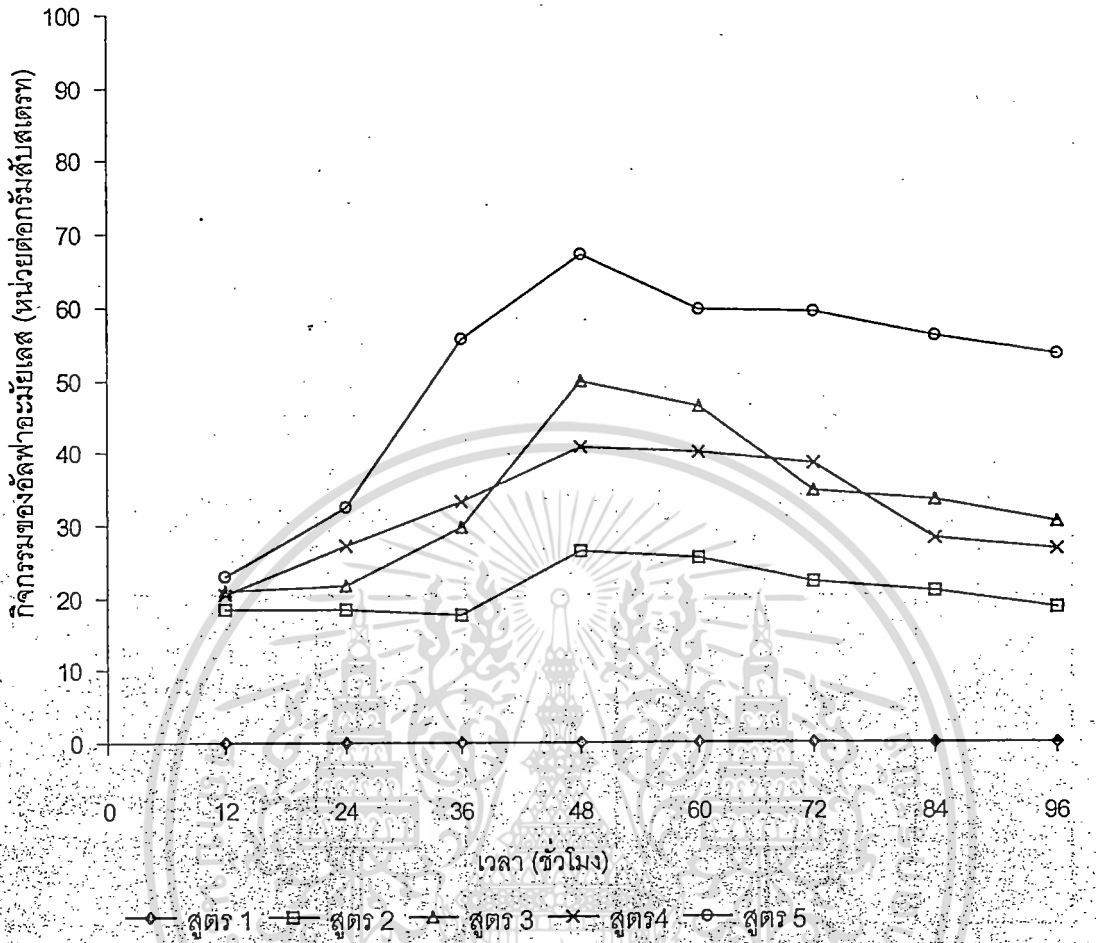
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งแสดงดังรูปที่ 4.1 จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารสูตรที่ 5 เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดมีกิจกรรมของเอนไซม์ 67.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก รองลงมาคือสูตรที่ 3 มีกิจกรรมของเอนไซม์ 47.8 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรที่ 4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ 42.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรที่ 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ 26.3 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และสูตรที่ 1 ซึ่งไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

จากผลการทดลองแสดงว่าเมื่อใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทเพียงอย่างเดียวโดยไม่ได้ปรับความชื้นเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้เลย และเมื่อใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนกับสารละลายเกลือแร่เพียงสองอย่างโดยไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ต่ำกว่าสูตรอาหารที่มีการเติมแป้งและแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างใดอย่างหนึ่ง ส่วนสูตรอาหารที่เติมทั้งแป้งและแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุด

ดังนั้นจะเห็นว่าในการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งของขนุนเพื่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งจำเป็นต้องนำสูตรอาหารมาปรับความชื้นให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อด้วย เนื่องจากความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (วารวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532) และเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นตัวชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส (Fukumoto *et. al.* 1958) และแหล่งไนโตรเจนเพื่อเป็นสารต้นตอ (precursor) สำหรับการผลิตเอนไซม์ (ปราบสยบ ภูมิพาณิชย์ และคณะ. 2543) ลงในเศษเหลือทิ้งของขนุนด้วย



รูปที่ 4.1 แสดงผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 300-1,700 ไมโครเมตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

<u>กำหนดให้</u>

สูตร 1 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม

สูตร 2 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 25 มิลลิลิตร

สูตร 3 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 25 มิลลิลิตร + แป้ง 0.1 กรัม

สูตร 4 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 25 มิลลิลิตร + แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม

สูตร 5 : เศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 25 มิลลิลิตร + แป้ง 0.1 กรัม + แอมโนเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า สูตรอาหารสูตรที่ 5 มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารอื่น ๆ โดยที่สูตรที่ 2 สูตรที่ 3 และ สูตรที่ 4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรที่ 1 ซึ่งไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเลย ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

สูตรอาหาร	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับเสตรท)	ไม่พบ$_{c}$	26.3$_{b}$	47.8$_{b}$	42.6$_{b}$	67.2$_{a}$

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารสูตรที่ 5 ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.3 ผลของสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

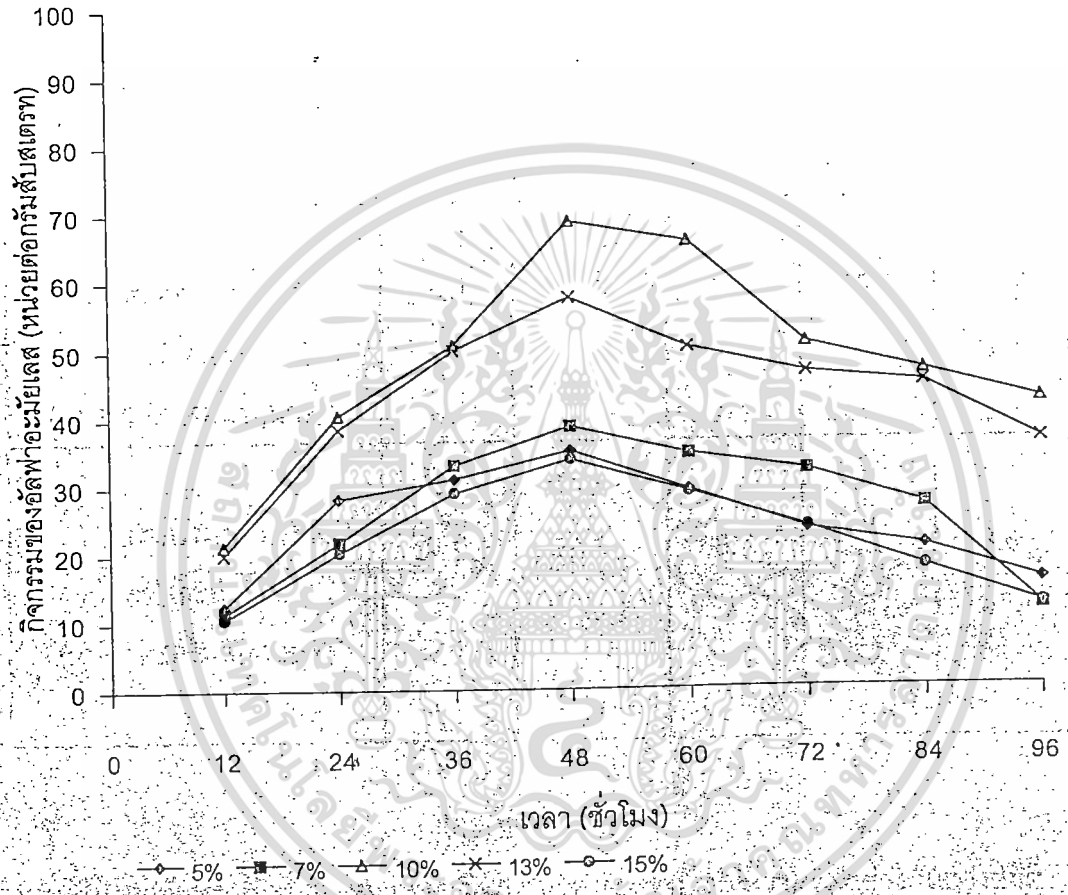
4.3.1 ผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งแสดงดังรูปที่ 4.2 จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุด มีกิจกรรม 68.7 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 13 มีกิจกรรม 57.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 มีกิจกรรม 38.5 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 มีกิจกรรม 34.9 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และเชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้ต่ำสุดในสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 มีกิจกรรม 33.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก

ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Krishna *et. al.* (1995) ทดลองโดยใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* (CBTK106) พบว่าสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นในอัตราส่วนร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ออกมาสูงสุดมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส 5.5×10^6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก

Babu *et. al.* (1995) รายงานว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus coagulan* คือสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก

จากผลการทดลองแสดงว่ากล้าเชื้อเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสถ้าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นไม่เหมาะสมมีผลทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดีและผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้ต่ำ ถ้ากล้าเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณน้อยเกินไปทำให้เชื้ออยู่ในช่วงแลกเฟส (lag phase) นานเกินไปทำให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นน้อยส่งผลให้การเจริญของเชื้อเกิดขึ้นได้ไม่ดีและผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้ต่ำด้วย (Nystom et. al. 1975) และถ้าเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นมากเกินไปก็จะทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อปริมาณมาก สารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและยังทำให้ความชื้นเริ่มต้นมากเกินกว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งด้วย (MunisWaran *et. al.* 1994)



รูปที่ 4.2 แสดงผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟ่าอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน ขนาด 300-1,700 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่าสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 และ 13 ปริมาตรต่อน้ำหนักมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและมีกิจกรรมสูงกว่าที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 7 และ 15 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 7 และ 15 ปริมาตรต่อน้ำหนัก มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (ร้อยละ) (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)	5.0	7.0	10.0	13.0	15.0
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	34.9_{b}	38.5_{b}	68.7_{a}	57.6_{a}	33.6_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุนลงในสูตรอาหาร ซึ่งเป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในการศึกษาสภาวะอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อไป

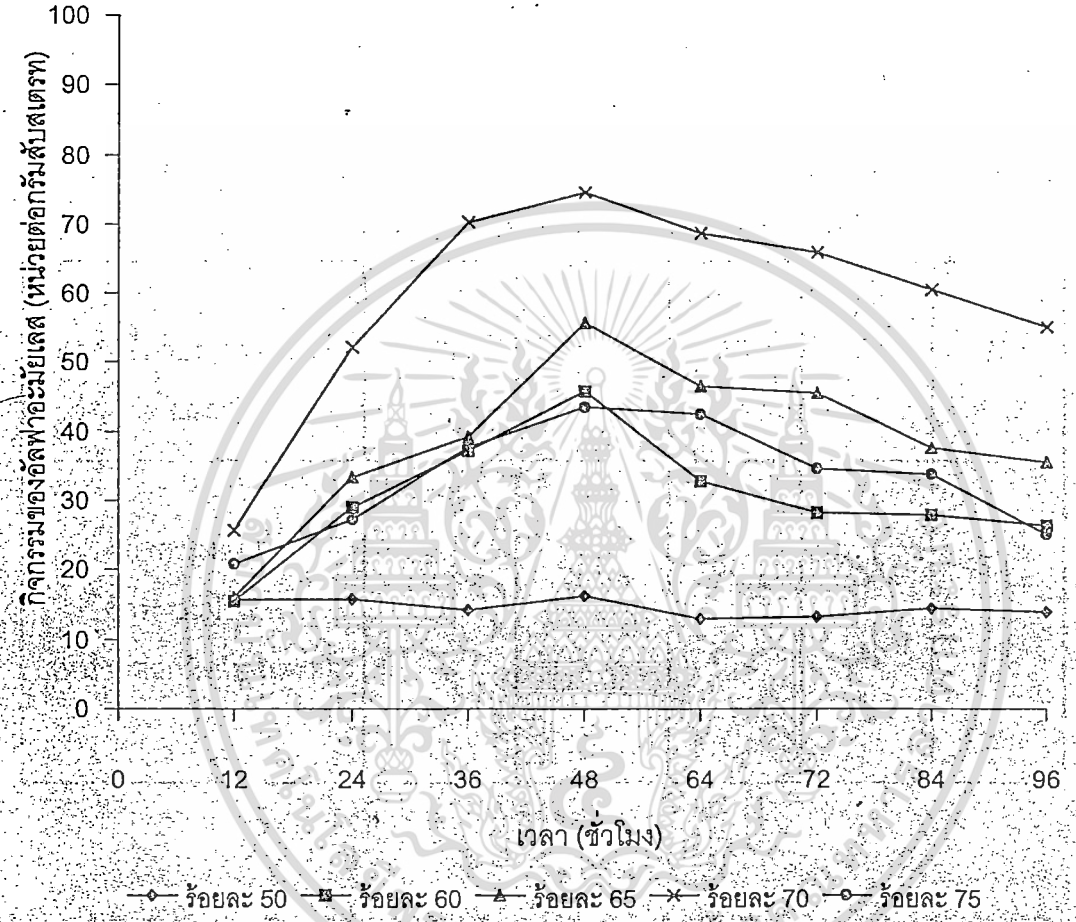
4.3.2 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม

ผลการศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง แสดงดังรูปที่ 4.3 จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดมีกิจกรรม 74.5 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 65 มีกิจกรรม 55.7 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 มีกิจกรรม 45.8 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 75 มีกิจกรรม 43.5 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และ สูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50 มีกิจกรรม 16.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก

จากผลการทดลองแสดงว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดในสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นด้วยสารละลายเกลือแร่เป็นร้อยละ 70 และเมื่อปรับความชื้นเริ่มต้นสูงหรือต่ำกว่าร้อยละ 70 ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสลดลง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Krishna and Chandrasekaran (1995) ซึ่งใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* (CBTK106) พบว่าสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเป็นร้อยละ 70 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อดังกล่าว

เทพนิมิตร มะลิพวง และนครโรจน์ อินทรีย์สังวร (2542) รายงานว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากวัสดุเหลือทิ้งของขนุนโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเป็นร้อยละ 70

จะเห็นได้ว่าความชื้นเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (Budiatman and Losane. 1987) ถ้าความชื้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากเกินไปมีผลต่อชีวสังเคราะห์ของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียโดยทำให้ผลิตเอนไซม์ออกมาได้น้อย เนื่องจากช่องว่างระหว่างอนุภาคของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือน้อยมีผลทำให้การส่งถ่ายออกซิเจนเกิดขึ้นได้ไม่ดี (Nigam. 1990 ; Sandhya and Losane. 1994) และถ้ามีความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไปทำให้การละลายของสารอาหารจากอนุภาคของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นได้ไม่ดีและความชื้นไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย (Losane *et. al.* 1985) นอกจากนี้การพองตัวของอนุภาคอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่าที่ควรและยังเพิ่มแรงดึงผิวของน้ำด้วยทำให้เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้ต่ำเช่นกัน (Zadrazil and Brunnert. 1981)



รูปที่ 4.3 ผลความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน ขนาด 300-1,700 ไมโครเมตร พีเอชเริ่มต้น 7.0 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า สูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 ให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารอื่น ๆ และสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 65 และ 75 ให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสต่ำที่สุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

ความชื้นของสูตรอาหาร (ร้อยละ)	50	60	65	70	75
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	16.2_{c}	45.8_{b}	55.7_{b}	74.5_{a}	43.5_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกปรับความชื้นของสูตรอาหารด้วยสารละลายเกลือแร่เป็นร้อยละ 70 ซึ่งเป็นความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

4.3.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

4.3.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง แสดงดังรูปที่ 4.4 จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดมีกิจกรรม 73.4 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลแลกโตส มีกิจกรรม 49.3 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท น้ำตาลซูโครสมีกิจกรรม 45.8 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และน้ำตาลกลูโคสมีกิจกรรม 43.3 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kelly *et. al.* (1997) พบว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *Bacillus flavothermus* สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุด

การทดลองของ Srivastava and Baruah (1986) พบว่าเชื้อ *Bacillus staerothermophillus* ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ดีเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือ เด็กซ์ทริน ไกลโคเจน เซลลูไบโอส มอลโตเฮกโซส และมอลโตเตตระโอส ตามลำดับ

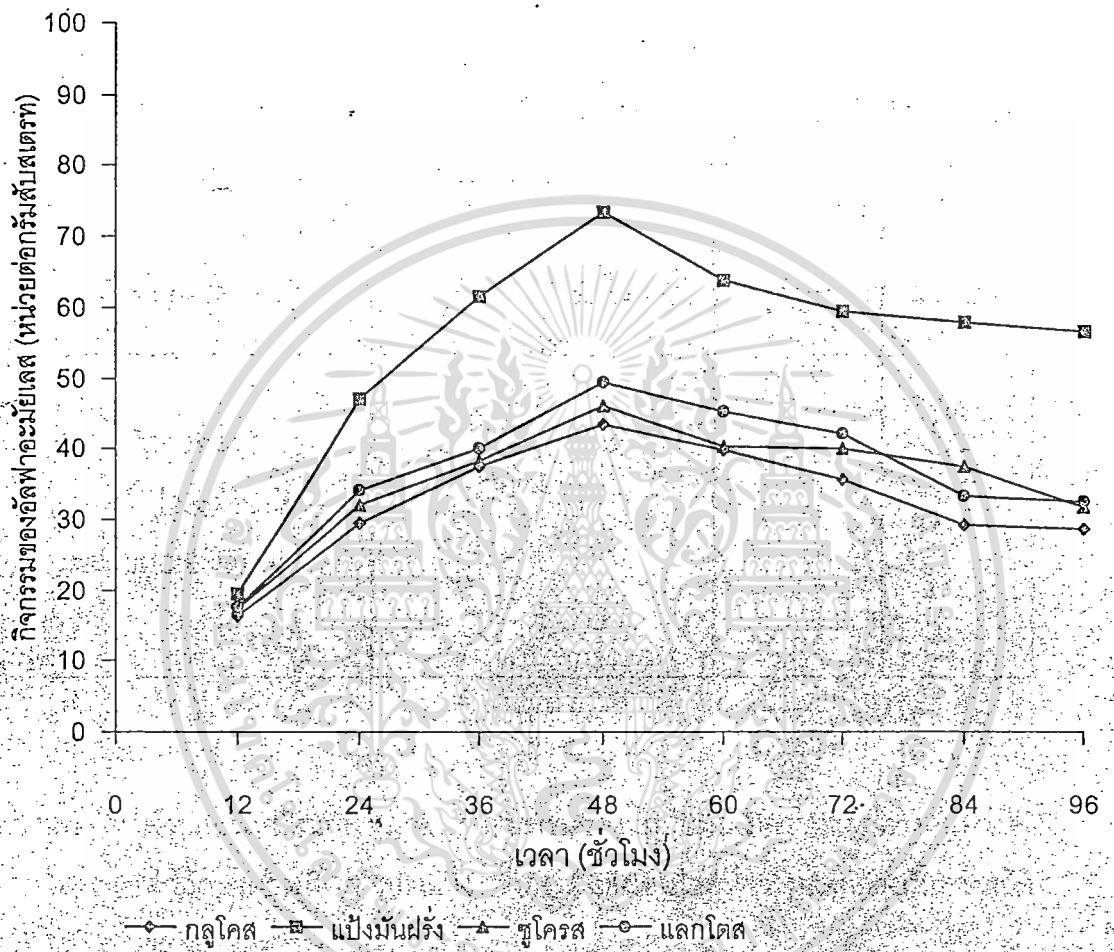
Krishna and Chandrasekaran (1995) ทดลองผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* (CBTK106) โดยใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ แป้ง น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลซูโครส ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก พบว่าสูตรอาหารที่เติมแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดมีกิจกรรม 5.1×10^6 หน่วยต่อมิลลิลิตร และรองลงมาคือน้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ตามลำดับ

Welker and Campbell (1963) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนบางชนิดเช่น แป้ง น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus staerothermophillus*

Kuo and Hartman (1966) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจากเชื้อ *Thermoactinomyces vulgaris* พบว่าแป้งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์อะมัยเลส รองลงมาคือ มอลโตส

จากผลการทดลองเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 4.2 พบว่าเมื่อใช้สูตรอาหารที่มีเศษเหลือทิ้งของขนุนที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้ต่ำกว่าที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนลงในสูตรอาหารซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และยังมีรายงานอีกว่าจำเป็นจะต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นตัวชักนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์อะมัยเลสอีกด้วย (สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524)



รูปที่ 4.4 แสดงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน ขนาด 300-1700 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมแป้งมันฝรั่งลงในสูตรอาหาร เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลกโตส และน้ำตาลซูโครส โดยที่สูตรอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	กลูโคส	แป้งมันฝรั่ง	ซูโครส	แลกโตส
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	43.3_b	73.4_a	45.8_b	49.3_b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกเติมแป้งมันฝรั่งลงในสูตรอาหารเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

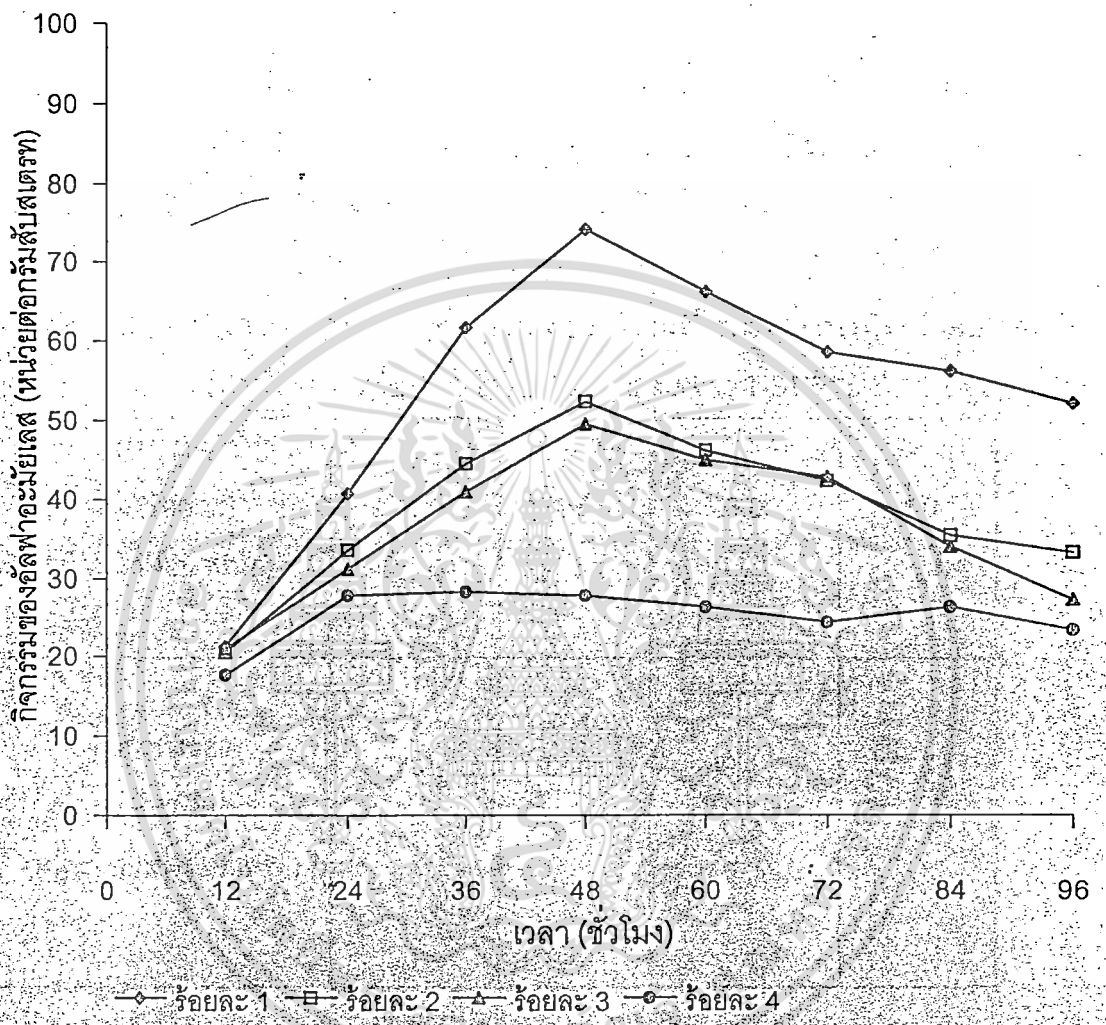
4.3.3.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันฝรั่งที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งแสดงดังรูปที่ 4.5 จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เติมแป้งลงไปในเศษเหลือทิ้งของขนุนร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดมีกิจกรรม 74.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก และรองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งร้อยละ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรม 52.4 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมแป้งร้อยละ 3 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรม 49.4 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติมแป้งร้อยละ 4 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรม 27.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณแป้งมันฝรั่งที่เติมลงในเศษเหลือทิ้งของขนุนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งจะเห็นว่าเมื่อเติมแป้งลงในสูตรอาหารเกินร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีผลทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสลดลงเนื่องจากว่าการเติมแหล่งคาร์บอนมากเกินไปมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อแบคทีเรียได้ (Krishna and Chandrasekaran. 1995 ; Welker and Campbell. 1963)

ผลการทดลองของ Krishna and Chandrasekaran (1995) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณแป้งมีผลในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (CBTK106) โดยใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นสับสเตรทเมื่อแป้งถูกเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายจากเอ็นไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตโดยเชื้อดังกล่าวในระหว่างกระบวนการหมักทำให้เกิดการจับกันของน้ำตาลรีดิวซ์และทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจึงเกิดการยับยั้งสังเคราะห์เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

Fukumoto *et. al.* (1958) รายงานว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำตาลแลกโตส และกาแลกโตส มีส่วนส่งเสริมการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส ส่วนน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสไม่ได้ส่งเสริมการผลิตอัลฟาอะมัยเลส และยังยับยั้งการผลิตเอนไซม์ด้วยถ้ามีความเข้มข้นมากเกินไป



รูปที่ 4.5 แสดงผลของความเข้มข้นของแป้งมันฝรั่งต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 300-1700 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่าการเติมแป้งมันฝรั่งร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ลงในสูตรอาหารมีผลทำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งที่ความเข้มข้นอื่น ๆ และสูตรอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งร้อยละ 2 และ 3 น้ำหนักต่อน้ำหนัก นั้นให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสูตรอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งร้อยละ 4 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ต่ำที่สุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งร้อยละ 1 2 และ 3 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของแป้งมันฝรั่งต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ความเข้มข้นของแป้งมันฝรั่ง (ร้อยละ) (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	1.0	2.0	3.0	4.0
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	74.2_{a}	52.4_{b}	49.4_{b}	27.6_{c}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกเติมแป้งมันฝรั่งในสูตรอาหารความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักเพื่อเป็นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

4.3.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน

4.3.4.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

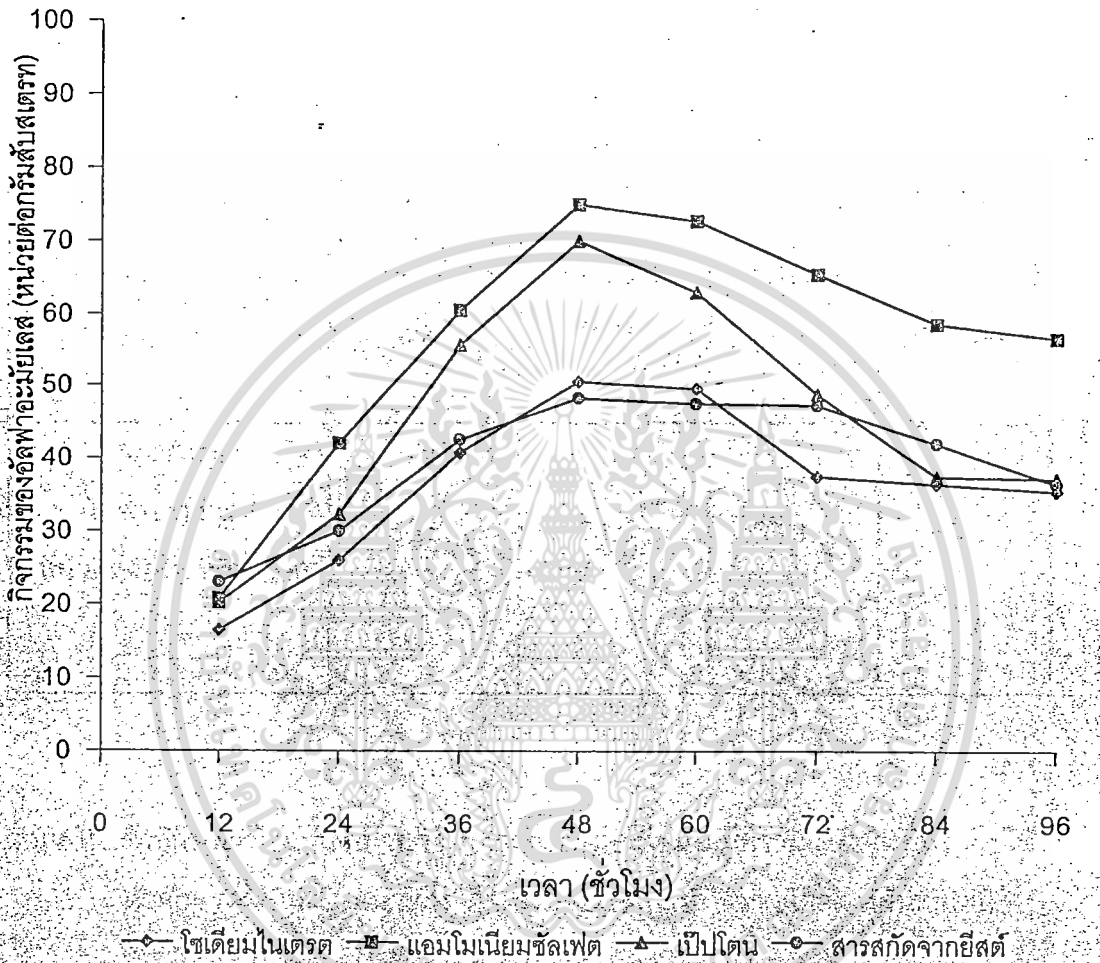
ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง แสดงดังรูปที่ 4.6 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนมีกิจกรรม 74.9 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือ เปปโตน มีกิจกรรม 69.9 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท โซเดียมไนเตรตมีกิจกรรม 50.5 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และสารสกัดจากยีสต์ มีกิจกรรม 48.3 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Krishna and Chandrasekaran (1995) พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตหรือโซเดียมไนเตรตมีส่วนในการช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (CBTK106) โดยการใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

Chandra *et. al.* (1980) รายงานว่า เปปโตน และ แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* CUMC 305 และ Yutani *et. al.* (1973)

Sandhya and Losand (1994) รายงานว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณร้อยละ 1.8 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ลงในซานอ้อยยังไปเพิ่มปริมาณการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยเชื้อราและยังลดระยะเวลาการหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งด้วย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงในสูตรอาหารเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้แตกต่างกัน แหล่งไนโตรเจนไม่ว่าจะเป็นอินทรีย์หรืออนินทรีย์ก็มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยเชื้อจะนำไปใช้สำหรับเป็นสารต้นตอของกรดอะมิโนที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ตลอดทั้งยังมีส่วนทำให้เกิดสภาวะสมดุลในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย (Gome *et. al.* 1992)



รูปที่ 4.6 แสดงผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 300-1700 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสูตรอาหารให้ผลการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมเปปโตนลงในสูตรอาหารและแตกต่างจากสูตรอาหารที่เติมโซเดียมไนเตรตและสารสกัดจากยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ สูตรอาหารที่เติมโซเดียมไนเตรต เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	โซเดียมไนเตรท	แอมโมเนียมซัลเฟต	เปปโตน	สารสกัดจากยีสต์
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	50.5_{b}	74.9_{a}	69.9_{ab}	48.3_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการทดลองเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าแอมโนเนียมซัลเฟตและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เลือกใช้แอมโนเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป เนื่องจากเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญและผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ง่ายกว่าการใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

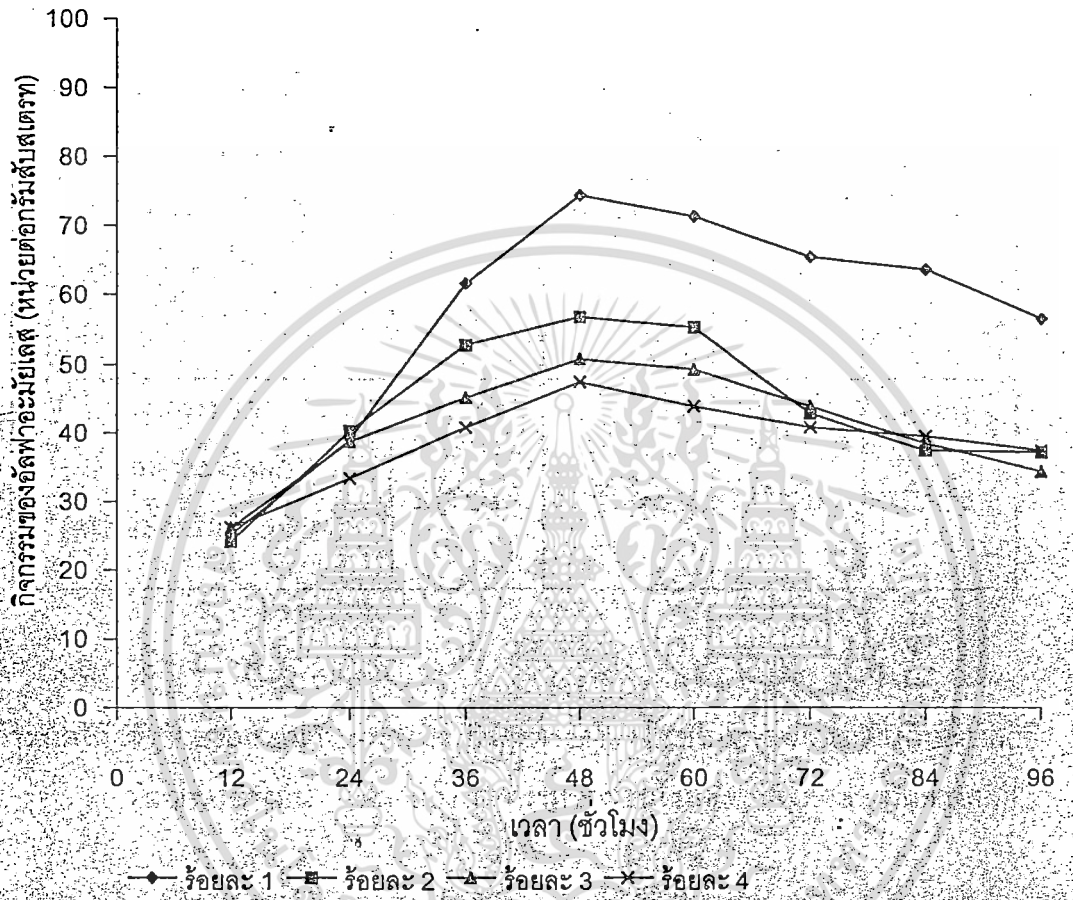
4.3.4.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.7 จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงสุดคือ 74.4 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือเติมร้อยละ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรม 56.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ร้อยละ 3 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรม 50.7 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และที่เติมร้อยละ 4 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรม 47.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก

จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสให้กิจกรรมสูงสุดและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็นร้อยละ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสลดลงไม่มาก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ลดลงซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Krihna and Chandrasekaran (1995) พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตหรือโซเดียมไนเตรต ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เชื้อ *Bacillus subtilis* (CBTK106) ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดและลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

พิเชฐ อิฐกอ (2528) รายงานว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KA 63 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโนเนียมซัลเฟตทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ลดลง

Yutani *et. al.* (1973) รายงานว่าการเติมแอมโมเนียมฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus stearothermophilus*



รูปที่ 4.7 แสดงผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 300-1700 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า สูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 และ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 3 และ 4 ส่วนสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต อัตราส่วนร้อยละ 2 3 และ 4 ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

แอมโมเนียมซัลเฟต (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	ร้อยละ 1	ร้อยละ 2	ร้อยละ 3	ร้อยละ 4
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	74.4_{a}	56.6_{ab}	50.7_{b}	47.2_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือที่ร้อยละ 1 และ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วนร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักเพื่อใช้เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

4.3.5 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

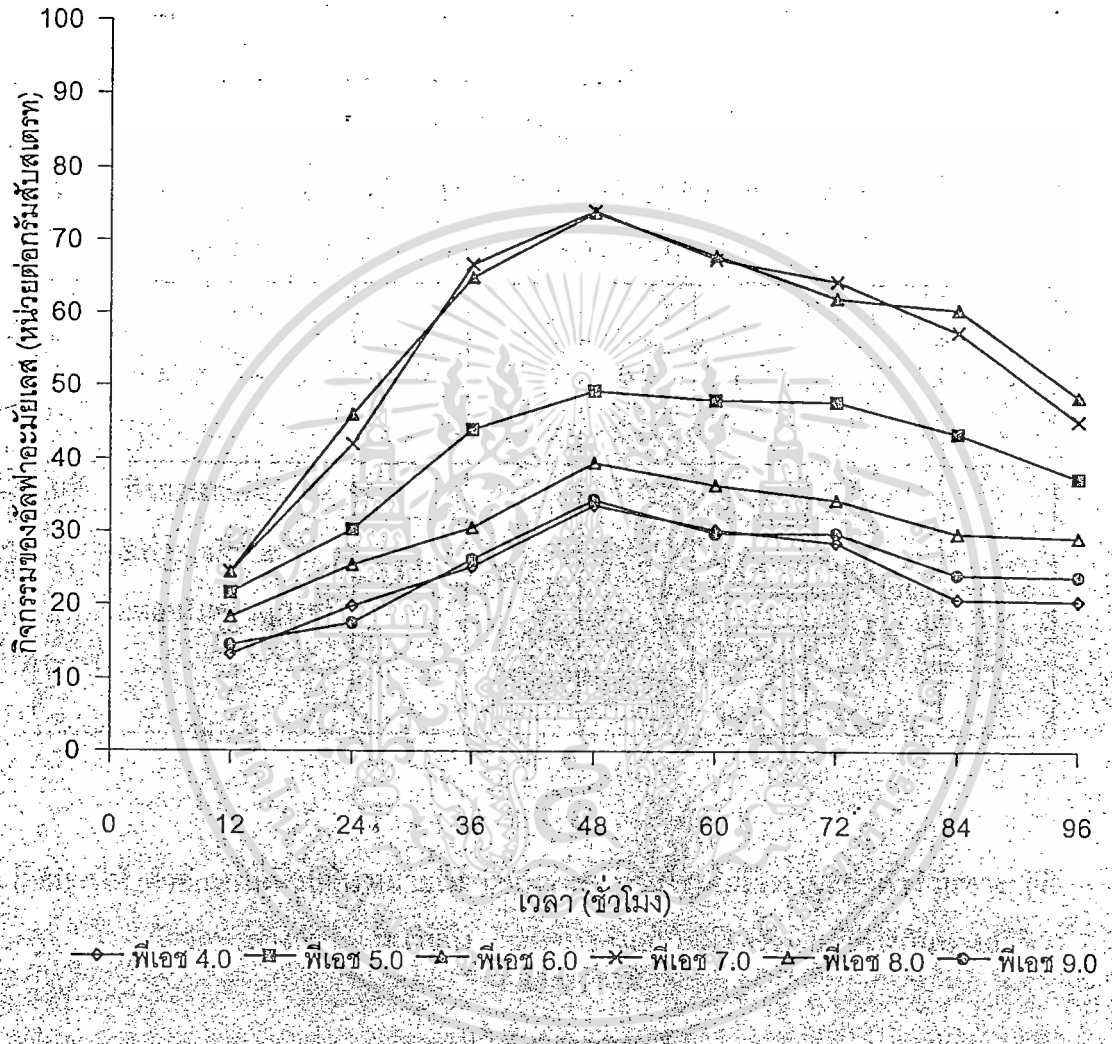
ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.8 จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งมีกิจกรรม 74.1 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 มีกิจกรรม 73.9 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 มีกิจกรรม 49.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 มีกิจกรรม 48.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 มีกิจกรรม 34.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 มีกิจกรรม 33.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากการใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือพีเอชเท่ากับ 6.0-7.0 สอดคล้องกับการทดลองของ Krishna and Chandrasekaran (1995) ทดลองโดยใช้เครือกล้วยเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* (CBTK106) ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงที่สุดมีกิจกรรม 4.5×10^6 หน่วยต่อกรัมมิลลิลิตร ที่ 24 ชั่วโมง

พิเชฐ อิฐกอ (2528) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KA 63 เจริญและผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดเมื่อปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และ 7.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเป็น 130 และ120 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และเมื่อปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 เชื้อผลิตอัลฟาอะมัยเลสได้ลดลง

Remesh and Losane (1987) รายงานว่าเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทเชื้อ *Bacillus megaterium* 16M ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดเมื่อปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

มีรายงานว่าถ้าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงหรือต่ำเกินกว่าที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ผลิตเอนไซม์ออกมาได้ต่ำขึ้นอยู่กับความคงตัวของเอนไซม์ด้วย เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่พีเอชที่เป็นกลางเช่น *Bacillus subtilis* KYA 741 (Tsuchiya *et. al.* 1975) เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* (Ninomiya *et. al.* 1975) และเชื้อ *Bacillus flavothermus* เจริญและผลิตอัลฟาอะมัยเลสได้ดีเมื่อปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 ในการหมักแบบแบท (Kelly *et. al.* 1997)



รูปที่ 4.8 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 300-1700 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 กล้าเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และ 7.0 ให้ผลการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่จะให้ผลแตกต่างจากพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 8.0 และ 9.0 สูตรอาหารที่พีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 9.0 และ 8.0 ให้ผลการการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญและให้ผลแตกต่างกับสูตรอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ส่วนที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และ 8.0 ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ ผลการเปรียบเทียบแสดงตังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

พีเอชเริ่มต้น	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	33.6_{c}	49.2_{b}	73.9_{a}	74.1_{a}	48.2_{bc}	34.2_{c}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จึงต้องมีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดและจากผลการทดลองจึงเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เพื่อใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

4.3.6 ผลของอุณหภูมิ

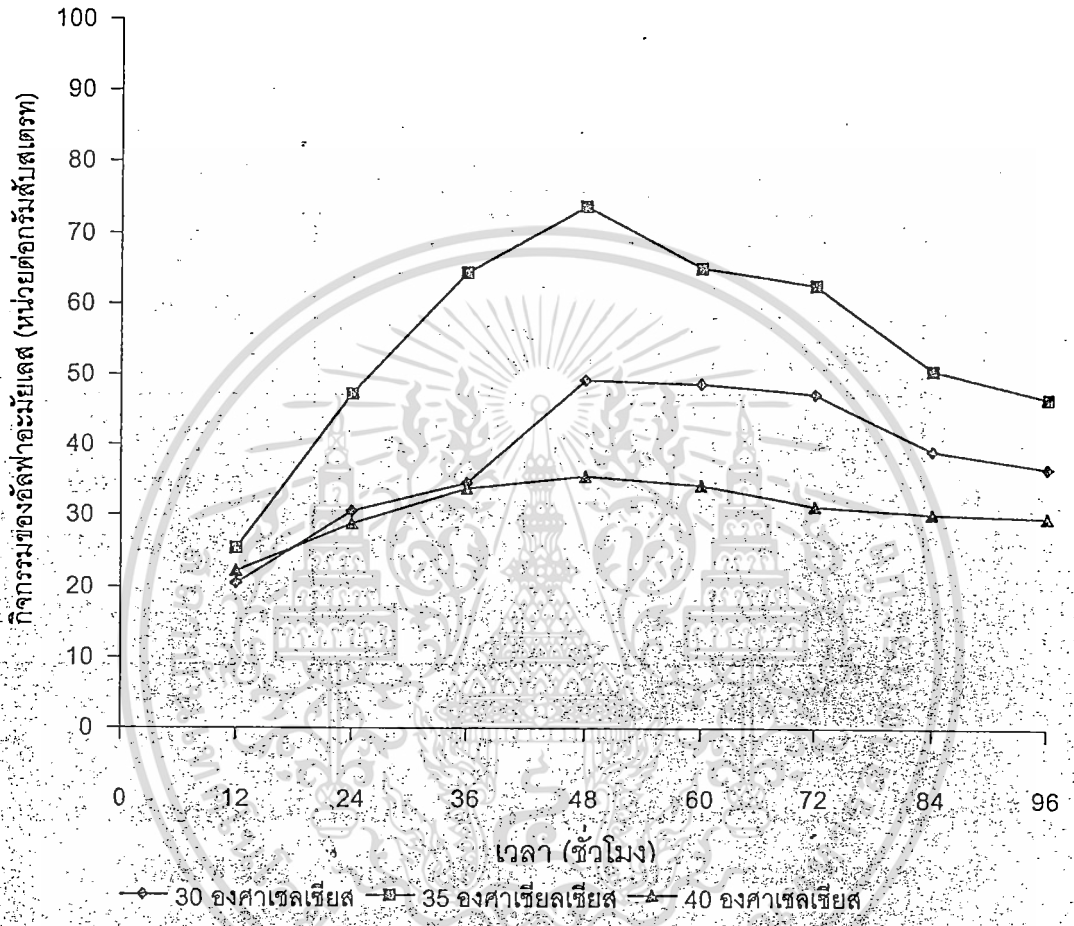
ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.9 พบว่าการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดมีกิจกรรมของเอนไซม์ 73.9 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีกิจกรรม 49.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และเมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส มีกิจกรรม 35.4 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

จากผลการทดลองแสดงว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Krishna and Chandrasekaran (1995) รายงานว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเชื้อ *Bacillus subtilis* (CBTK106) ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 40 25 45 20 50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Remesh and Losane (1987) พบว่าเชื้อ *Bacillus megaterium* 16M ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง รองลงมาคือที่ 30 40 45 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าอุณหภูมิในการหมักมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ถ้าบ่มอุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียสจะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ออกมาได้ต่ำ Saito and Yamamoto (1975) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* เจริญและผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองแตกต่างจากการทดลองของ Bandyopadhyay *et. al.* (1994) ซึ่งพบว่าเชื้อ *Bacillus globisporus* BH-1B มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดเจริญและผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกันขึ้นอยู่กับจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของเชื้อแต่ละชนิด (Remesh and Losane 1985) นอกจากนี้ Remesh and Losane (1987) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสขึ้นอยู่ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ไม่เกี่ยวกับชนิดของสับสเตรท



รูปที่ 4.9 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนอนุภาค 300-1700 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอช 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 พบว่าเมื่อบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการบ่มที่อุณภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมอัลฟาอะมัยเลสต่ำสุดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	35	40
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	49.2_{b}	73.9_{a}	35.4_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

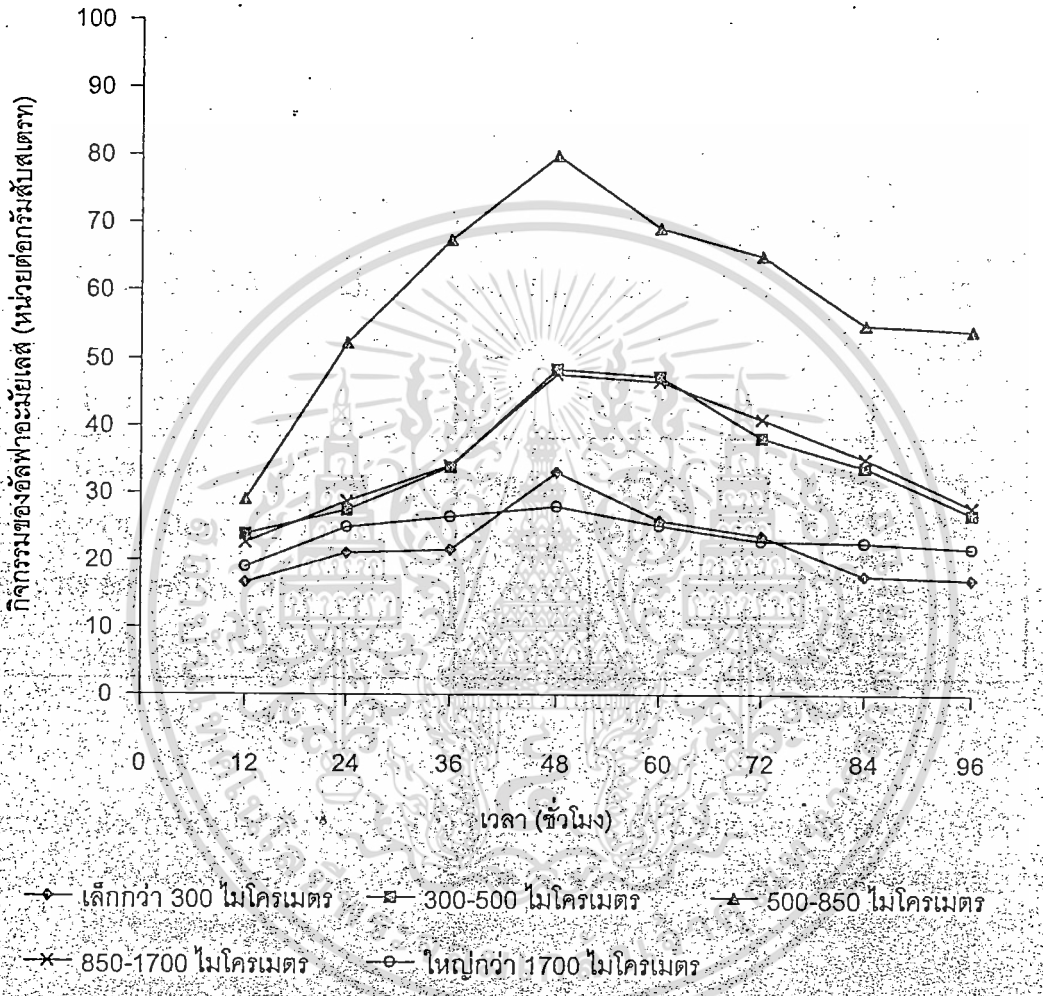
4.3.7 ผลของขนาดอนุภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุน

ผลการศึกษาขนาดอุนภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง แสดงดังรูปที่ 4.10 จากผลการทดลองพบว่าที่การใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุด มีกิจกรรม 80.1 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือเมื่อใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 300-500 ไมโครเมตร มีกิจกรรม 48.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ขนาด 850-1700 ไมโครเมตร มีกิจกรรม 47.4 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ขนาด เล็กกว่า 300 ไมโครเมตร มีกิจกรรม 32.9 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และ ขนาดใหญ่กว่า 1700 ไมโครเมตร มีกิจกรรม 27.9 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

จากผลการทดลองแสดงว่าเศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร เป็นขนาดอนุภาคของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง และเมื่อใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาดเล็กหรือใหญ่กว่า 500-850 ไมโครเมตร เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ต่ำและต่ำมากเมื่อใช้ขนาดของเศษเหลือทิ้งของขนุนที่เล็กหรือใหญ่กว่ามากซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Krishna and Chandrasekaran (1995) รายงานว่าเมื่อใช้เศษเหลือทิ้งของก้านเครือกล้วยขนาด 400 ไมโครเมตร เชื้อ *Bacillus subtilis* (CBTK106) ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดและเมื่อใช้ขนาดที่เล็กและใหญ่กว่า 400 ไมโครเมตร ทำให้ผลิตเอนไซม์ออกมาได้ต่ำ

การทดลองของ Pandey (1991) รายงานว่าขนาดอนุภาคของรำข้าวสาลี 500 ไมโครเมตร เป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis*

ในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งขนาดอนุภาคของสับสเตรทเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมากเนื่องจากว่าถ้าขนาดอนุภาคเล็กจนเกินไปทำให้พื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากแต่ช่องว่างระหว่างอนุภาคมีน้อยการถ่ายเทอากาศเกิดขึ้นได้ไม่ดี และยังทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหนียวมากเกินไปจนมีผลให้เชื้อเจริญได้ไม่ดี ทำให้สังเคราะห์เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้น้อย (Muniswaran and Charyulu. 1994) เมื่อใช้สับสเตรทที่มีขนาดใหญ่เกินไปทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีช่องว่างมากพื้นที่ผิวในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ลดน้อยลง และการละลายของสารอาหารออกมาได้น้อยส่งผลให้เชื้อนำสารอาหารออกมาใช้สำหรับการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ไม่ดีเท่าที่ควร นอกจากนี้ยังทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเกินสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ด้วย (Muniswaran and Charyulu. 1994)



รูปที่ 4.10 แสดงผลของอนุภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุนต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า เมื่อใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่การใช้ขนาดอื่น ๆ และที่ขนาด 300-500 และ 850-1700 ไมโครเมตร ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่ขนาดน้อยกว่า 300 และ มากกว่า 1700 ไมโครเมตร ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตาราง 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลอนุภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

ขนาดของเศษเหลือทิ้งของขนุน (ไมโครเมตร)	เล็กกว่า 300	300-500	500-850	850-1700	ใหญ่กว่า 1700
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	32.9_{c}	48.2_{b}	80.1_{a}	47.4_{b}	27.9_{c}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกใช้ขนาดอนุภาคของเศษเหลือทิ้งของขนุน 500-850 ไมโครเมตร เป็นขนาดอนุภาคที่เหมาะสมต่อไปในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

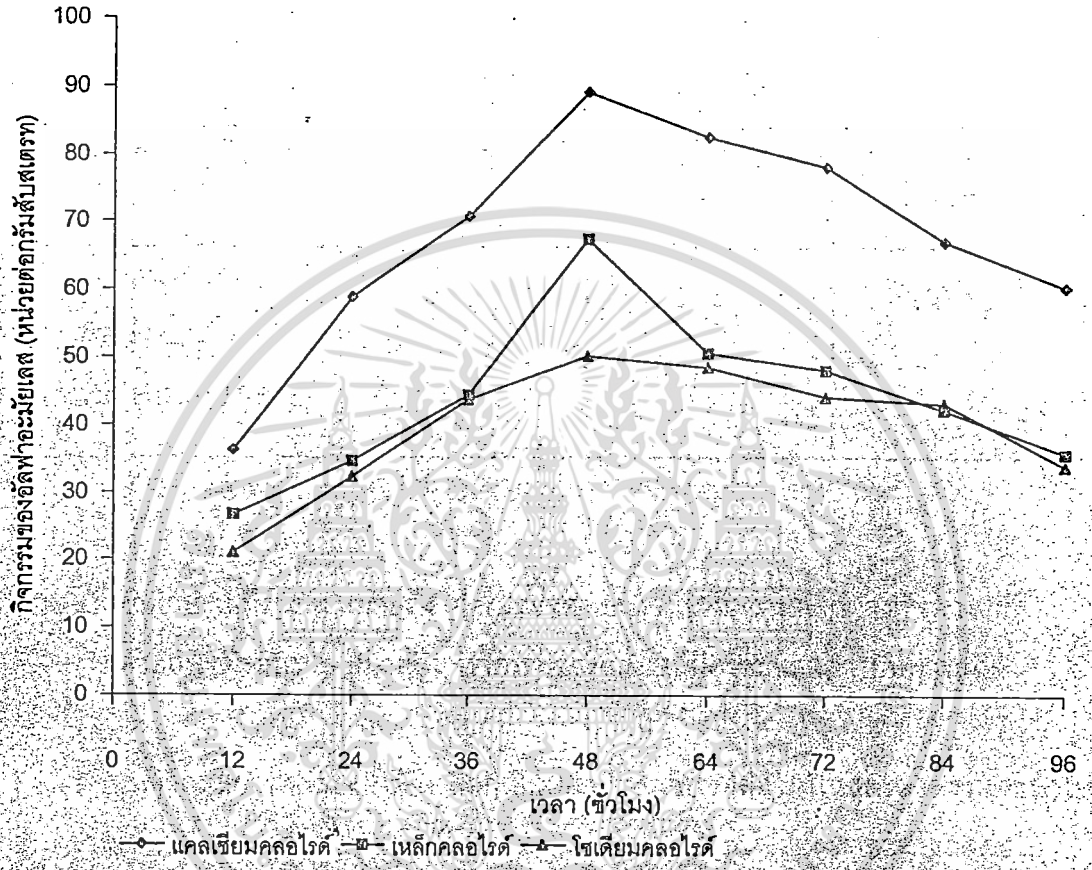
4.3.8 ผลของเกลือ

4.3.8.1 ผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) เหล็กคลอไรด์ ($FeCl_2.2H_2O$) และ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ผลการศึกษาผลของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.11 จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดมีกิจกรรม 89.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมเหล็กคลอไรด์ ($FeCl_2.2H_2O$) มีกิจกรรม 67.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีกิจกรรม 50.1 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ พิเชฐ อิฐกอ (2528) ซึ่งรายงานว่าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KA63 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงขึ้นเมื่อเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) และ โปแตสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว และ Hamada *et. al.* (1967) รายงานว่าการเติมแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงขึ้น

จากผลการทดลองแสดงว่าเกลือแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เนื่องจากเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเป็นเอนไซม์ที่มีแคลเซียมเป็นโคแฟคเตอร์อย่างน้อยที่สุด 1 โมเลกุลซึ่งทำหน้าที่ในการเป็นตัวเร่งและป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติจากสภาวะที่รุนแรงต่าง ๆ (Windish and Mhatre,1965) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์เพื่อให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้มากขึ้น



รูปที่ 4.11 แสดงผลของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่าสูตรอาหารที่มีการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมเกลือเหล็กคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12. แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ชนิดของเกลือ	แคลเซียมคลอไรด์	เหล็กคลอไรด์	โซเดียมคลอไรด์
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	89.2_{a}	67.6_{b}	50.1_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

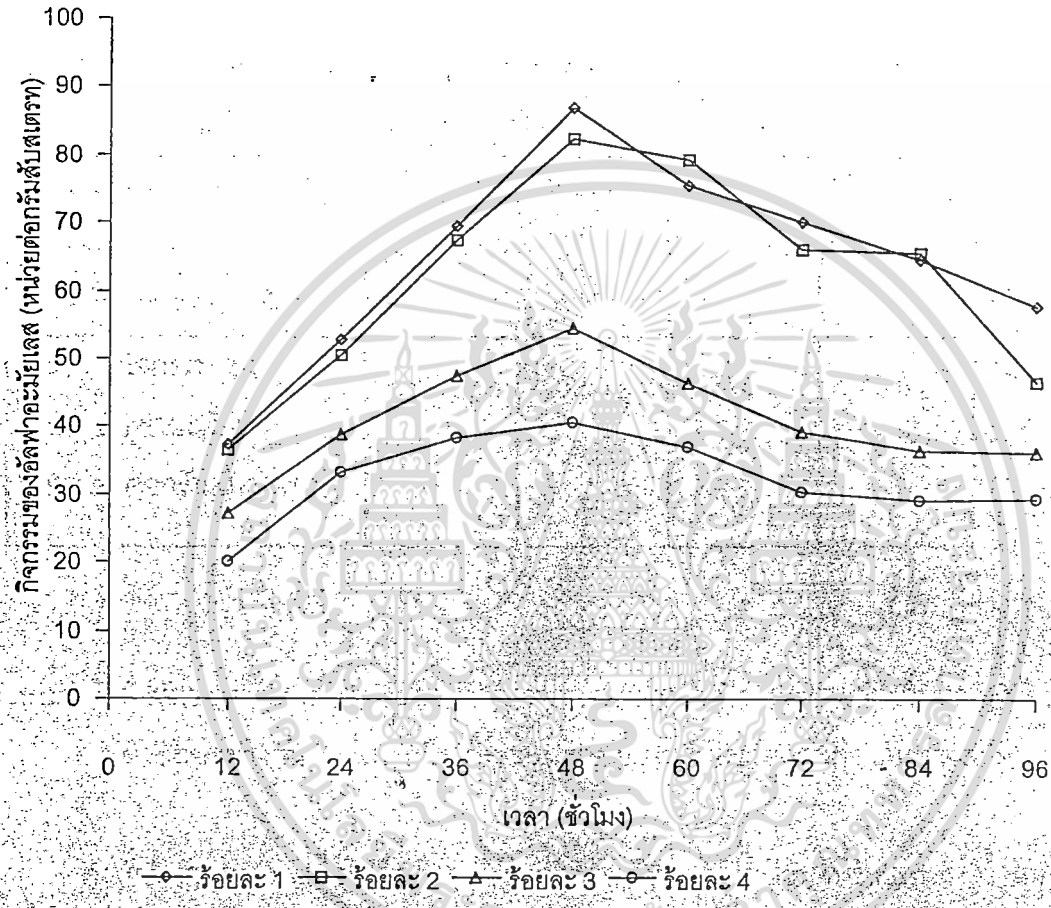
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหารและนำไปศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสต่อไป

4.3.8.2 ผลของความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่าเมื่อเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงสุดภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งมีกิจกรรม 87.1 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก รองลงมาคือที่การเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 2 มีกิจกรรม 82.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท เติมร้อยละ 3 มีกิจกรรม 54.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และเติมร้อยละ 4 มีกิจกรรม 40.5 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีผลให้เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสออกมาได้สูงสุดและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็นร้อยละ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก พบว่ามีกิจกรรมลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นอีกจนถึงร้อยละ 3 และ 4 ส่งผลให้เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ลดลง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของพิเชฐ อิฐกอ (2528) รายงานว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์เกิน 0.2 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KA63 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ลดลง และการทดลองของ Chandra *et. al.* (1980) พบว่าแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* CUMC 305 ได้อย่างสมบูรณ์



รูปที่ 4.12 แสดงผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร ความชื้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า สูตรอาหารที่เติม แคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 1 และ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 3 และ 4 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25

ปริมาณเกลือ แคลเซียมคลอไรด์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	ร้อยละ1	ร้อยละ 2	ร้อยละ 3	ร้อยละ 4
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	87.1_a	82.6_a	54.6_b	40.5_b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในการทดลองต่อไป

4.4 ผลของการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.13 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของกระบวนการหมักจนถึงชั่วโมงการหมักที่ 42 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญสูงสุด มีจำนวนโคโลนี 4.57×10^8 CFU/g และหลังจากนี้เชื้อจะเข้าสู่ช่วงการเจริญที่คงที่ (stationary phase) และเริ่มลดจำนวนลงเรื่อย ๆ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 78 จนเข้าสู่ระยะการเจริญลดลง (date phase)

เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของกระบวนการหมักจนกระทั่งถึงชั่วโมงการหมักที่ 48 ชั่วโมง เชื้อผลิตเอนไซม์ออกมาได้สูงสุด มีกิจกรรม 89.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และหลังจากนี้จะค่อย ๆ ลดลง

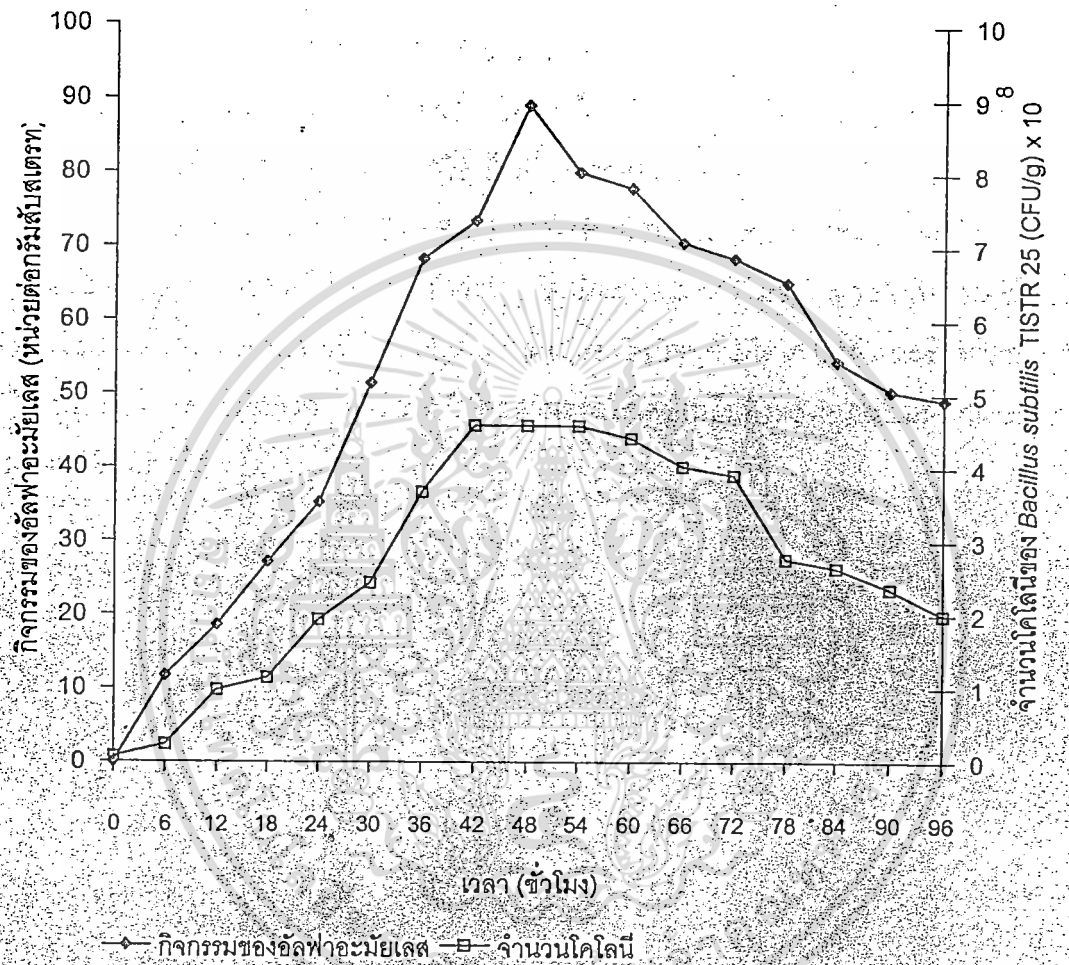
จากความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 พบว่าในช่วงแรกของกระบวนการหมักเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อในช่วงการเจริญเติบโตทวีคูณ (Logarithmic phase) และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ไปจนถึงช่วงที่เชื้อเจริญเติบโตได้สูงสุดและพบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ออกมาได้สูงสุดเมื่อเชื้อเจริญเติบโตในช่วงการเจริญเติบโตคงที่แล้ว สอดคล้องกับการทดลองของ (Welker and Campbell. 1963) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* จะเริ่มผลิตเอนไซม์อะมัยเลสในช่วงการเจริญเติบโตทวีคูณและสร้างมากขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญเติบโตของเซลล์

เชื้อ *Bacillus acidocaldaricus* จะเริ่มสร้างเอนไซม์อะมัยเลสในช่วงการเจริญเติบโตคงที่ตอนต้น ๆ และให้เอนไซม์ออกมาสูงสุดในช่วงการเจริญเติบโตคงที่ซึ่งในระยะนี้เซลล์เริ่มมีการย่อยสลายตัวเองทำให้เซลล์แตกและปล่อยเอนไซม์ออกมามากขึ้น (Buonocore *et. al.* 1976)

การทดลองของ Nomura *et. al.* (1956) และ Fukumoto *et. al.* (1958) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์อะมัยเลสออกมาได้สูงสุดหลังจากที่เซลล์เพิ่มจำนวนได้สูงสุดแล้ว

Colleman and Elliot (1962) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตทวีคูณและสร้างมากขึ้นพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเจริญของเซลล์และมีการผลิตเอนไซม์ออกมาได้สูงสุดในช่วงเซลล์มีการเจริญคงที่ที่ชั่วโมงการหมัก 48 ชั่วโมง

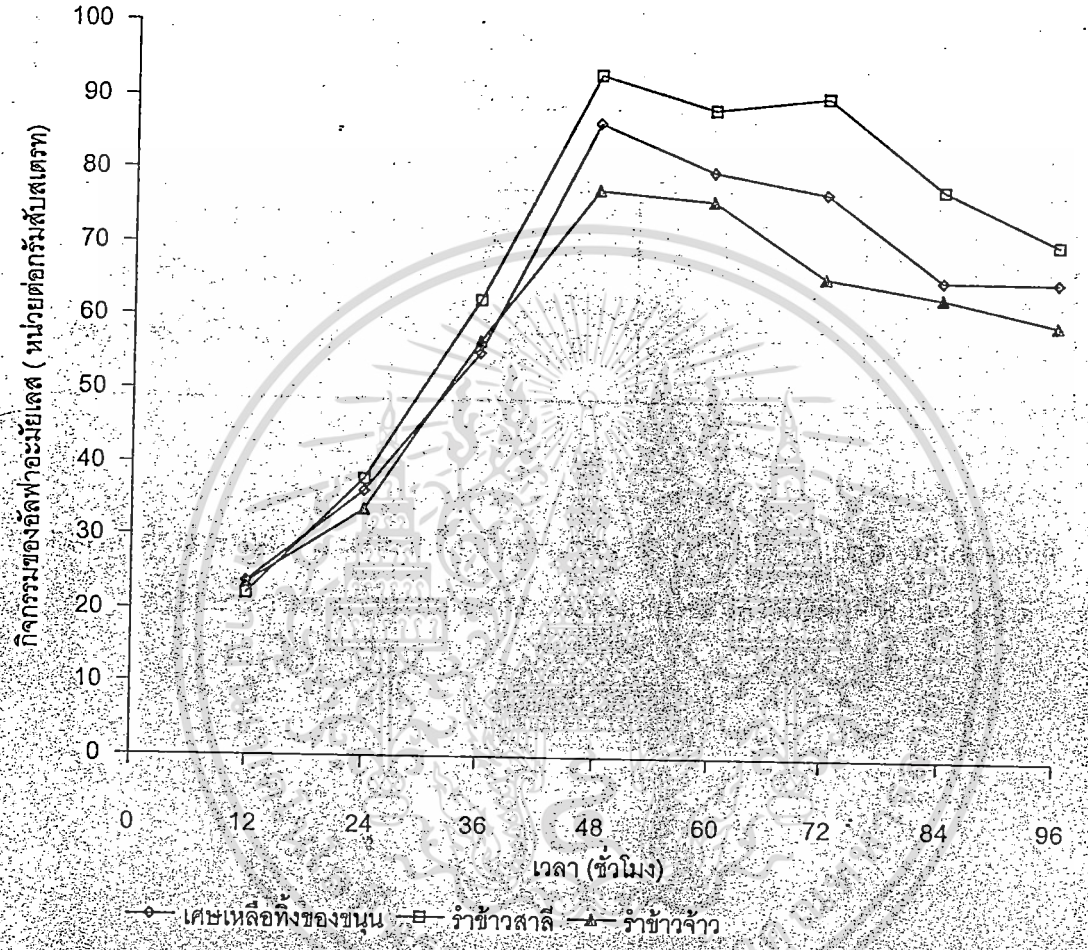


รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุน 500-850 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส)

4.5 ผลการศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ผลการศึกษาการศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทแสดงดังรูปที่ 4.14 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส ออกมาได้สูงสุดเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทมีกิจกรรมของเอนไซม์ 93.3 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และรองลงมาคือเศษเหลือทิ้งของขนุนมีกิจกรรมของเอนไซม์ 86.7 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และรำข้าวเจ้า มีกิจกรรมของเอนไซม์ 77.7 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ที่ 48 ชั่วโมง ของการหมัก

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถที่จะนำเศษเหลือทิ้งของขนุนซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมากตามฤดูกาลมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ดี เนื่องจากว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากรำข้าวสาลี และรำข้าวเจ้า ซึ่งเป็นสับสเตรทที่นิยมนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้แทนรำข้าวสาลีซึ่งปัจจุบันมีราคาแพงและรำข้าวเจ้าก็ยังนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ด้วย จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทแทนสับสเตรทดังกล่าวได้



รูปที่ 4.14 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทระหว่างเศษเหลือทิ้งของขนุนกับรำข้าวและรำข้าวสาลีในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะหมักแบบอาหารแข็ง (ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 7.0 กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก และบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสของสับสเตรททั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงการเปรียบเทียบผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ชนิดของสับสเตรท	เศษเหลือทิ้งของขนุน	รำข้าวสาลี	รำข้าวเจ้า
กิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลส (หน่วยต่อกรัมสับสเตรท)	86.7_{a}	93.3_{a}	77.7_{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.6 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

4.6.1 ผลการเตรียมเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน

ผลการเตรียมเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสให้บริสุทธิ์บางส่วนแสดงดังตารางที่ 4.15 จากการทดลองพบว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่สกัดได้ก่อนมีการตกตะกอนด้วยเอธานอล มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด 12,000 หน่วย โปรตีนทั้งหมด 2542.37 มิลลิกรัม กิจกรรมจำเพาะ 4.72 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 จากการตกตะกอนพบว่าการใช้เอธานอลที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 0-20 พบกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส 1080 หน่วย กิจกรรมจำเพาะ 19.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 4.06 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 9 ที่ระดับความอิ่มตัวของเอธานอลร้อยละ 20-40 พบกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส 2060 หน่วย กิจกรรมจำเพาะ 56.56 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 11.98 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 17.6 ที่ระดับความอิ่มตัวของเอธานอลเป็นร้อยละ 40-60 พบกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส 2459 หน่วย กิจกรรมจำเพาะ 104.77 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 22.20 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 20.49 ที่ระดับความอิ่มตัวของเอธานอลร้อยละ 60-80 พบกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส 1420 หน่วย กิจกรรมจำเพาะ 68.79 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 14.57 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 11.83

นำสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-60 ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิวเตรชันด้วยหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุลขนาด 10,000 ดาลตันหลังจากปั่นเหวี่ยงพบว่ามีกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส 1620 หน่วย มีกิจกรรมจำเพาะ 142.73 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 30.23 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 13.5

สรุปได้ว่าต้องนำเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้มาตกตะกอนด้วยเอธานอลที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-60 ก่อนแล้วจึงนำสารละลายตะกอนที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุล 10,000 ดาลตัน เพื่อทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น ก่อนที่จะนำเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไปศึกษาสมบัติบางประการและทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบ

ตารางที่ 4.15 แสดงผลของการทำให้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน

ขั้นตอน	กิจกรรมทั้งหมด (หน่วย) 1	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) 2	กิจกรรมจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (ร้อยละ)
เอนไซม์สกัด	12000	2542.37	4.72	1	100
ตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ					
0-20	1080	56.25	19.2	4.06	9
20-40	2060	36.42	56.56	11.98	17.16
40-60	2459	23.47	104.77	22.20	20.49
60-80	1420	20.64	68.78	14.57	11.83
สารละลายตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-60 ปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรอง VIVA Spin ขนาด 10,000 ดาลตัน	1620	11.35	142.73	30.23	13.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

จากการทำให้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนแล้วนำมาศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.15 จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือที่พีเอชเท่ากับ 6.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 100 และที่พีเอชต่าง ๆ มีกิจกรรมสัมพัทธ์ลดลงดังนี้คือ ที่พีเอช 7.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 89 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอชเท่ากับ 5.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 82 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 56 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอชเท่ากับ 4.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 52 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอชเท่ากับ 3.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 26 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอชเท่ากับ 9.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 21 ของกิจกรรมสูงสุด และที่พีเอชเท่ากับ 10.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 11 ของกิจกรรมสูงสุด

จากผลการทดลองแสดงว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอช 4.0-8.0 และพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 6.0 และเมื่อพีเอชสูงเกิน 9.0 และต่ำกว่า 4.0 เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเสียสภาพของเอนไซม์จากการที่พีเอชสูงต่ำเกินไป ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Fukomoto (1957) รายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อแบคทีเรียทำงานได้ดีอยู่ในช่วงพีเอชเท่ากับ 3.0-9.5 และพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 6.0 Welker and Cambell (1967) รายงานว่าพีเอชเท่ากับ 6.3 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของอัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* เชื้อ *Bacillus licheniformis* 584 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือ 6.5 (Saito. 1973) *Bacillus amyloliquefaciens* F.มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือพีเอชเท่ากับ 5.9 (Shinmyo *et. al.* 1982) เชื้อ *Bacillus licheniformis* CUMC 305 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือพีเอชเท่ากับ 6.5 (Chandra *et. al.* 1980)

Dey and Agarwai (1999) ศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์อะมัยเลสที่ผลิตได้จาก *Streptomyces megasporus* SD12 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือที่พีเอชเท่ากับ 4.0

นอกจากนี้ยังมีเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชสูง ๆ เช่น *Bacillus* sp NRRL B-3881 ที่พีเอช 9.2 (Boyer and Ingle. 1972) และ *Bacillus acidocaldarius* ที่พีเอช 3.5 (Buonocore *et. al.* 1976) จะเห็นได้ว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์นั้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์

4.6.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสแสดงดังรูปที่ 4.16 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 100 และที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงคือ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 72 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 56 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 39 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 32 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 20 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 17 ของกิจกรรมสูงสุด และที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 15 ของกิจกรรมสูงสุด

จากผลการทดลองแสดงว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Abdelaty and Laila (1996) รายงานว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* และผลการทดลองใกล้เคียงกับการทดลองของ Windish and Mhatre (1965) พบว่าเอนไซม์อะมัยเลสจาก *Ps. stuzeri* มีอุณภูมิที่เหมาะสมที่ 40 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจรรรกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus amylolyquefaciens* KA 63 (พิเชฐ อิฐกอ. 2528) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus globisporus* BH-1b คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

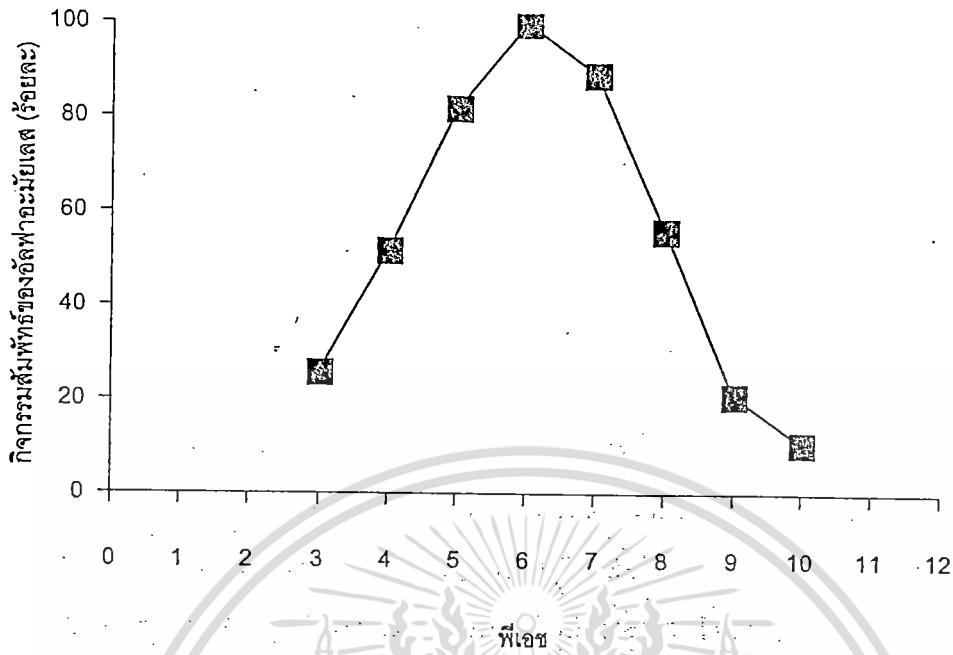
สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. (2524) รายงานว่าเอนไซม์อะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* PR_1 และเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* B_{1512} มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงด้วย

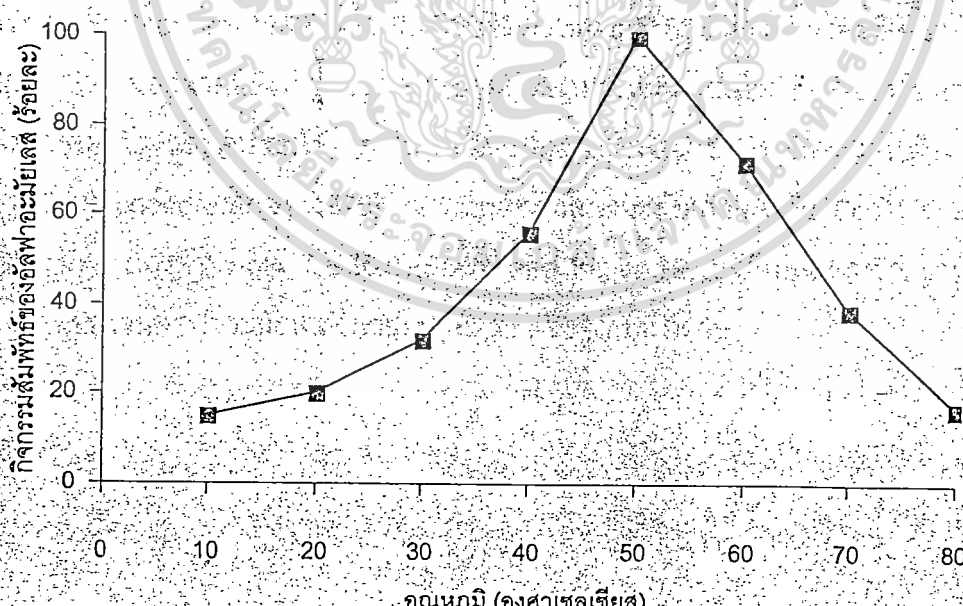
มีรายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus megatrium* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 70 องศาเซลเซียส (Remesh and Lonsane. 1987) เชื้อ *Bacillus licheniformis* M27 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้คือ 90 องศาเซลเซียส (Remesh and Lonsane. 1989) และอัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus coaguland* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 85 องศาเซลเซียส และเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ

Bacillus licheniformis มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 91 องศาเซลเซียส (Medda and Chandra. 1980)

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองกับการวิจัยอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 4.15 แสดงผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส



รูปที่ 4.16 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

4.6.4 ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่พีเอชต่าง ๆ

ผลการทดลองศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่พีเอชต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 4.17 พบว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมีความคงทนที่พีเอช 7.0 ได้ดีที่สุดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 100 ที่พีเอช 6.0 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 94 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 8.0 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 82 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 5.0 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 77 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 4.0 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 31 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 3.0 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 16 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 9.0 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 13 ของกิจกรรมสูงสุด และที่พีเอช 10.0 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 11 ของกิจกรรมสูงสุด

จากผลการทดลองแสดงว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีความคงตัวต่อพีเอชค่อนข้างเป็นกลางคืออยู่ในช่วง 5.0-8.0 และช่วงความคงตัวต่อพีเอชไม่กว้างมากนัก ถ้าพีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้เอนไซม์จะเสียสภาพและทำงานได้ไม่ดี

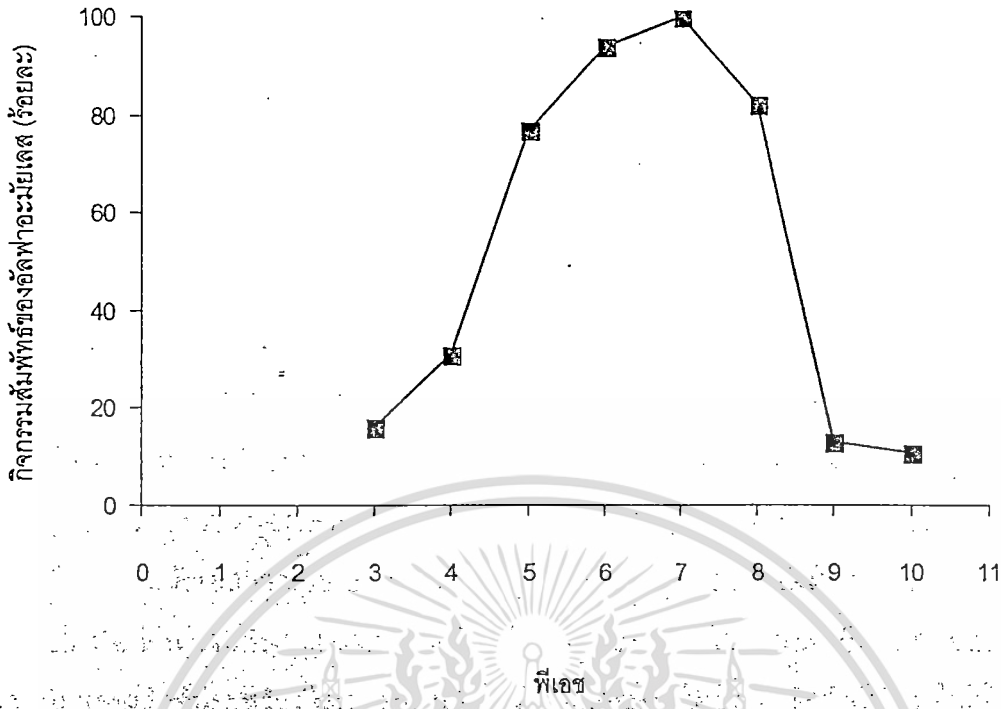
ผลการทดลองใกล้เคียงกับการทดลองของ Welker and Cambell (1967) รายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วง 5.7-6.7 และการทดลองของ Shinmyo (1982) พบว่าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* F มีความคงตัวในช่วงพีเอช 5.5-6.5 ส่วนเชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถที่จะผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างเช่นเชื้อ *Bacillus licheniformis* CUMC 305 มีความคงตัวที่พีเอช 6.5-10.0 (Medda and Chandra .1980) เชื้อ *Bacillus licheniformis* 584 มีความคงตัวที่พีเอช 6.0-11.0 (Saito.1973) นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรียบางตัวที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่มีความคงตัวต่อพีเอชที่สูงและต่ำมากได้ด้วยเช่นเชื้อ *Bacillus acidocaldarius* มีความคงตัวต่อพีเอชต่ำกว่า 4.5 (Buonocore *et. al.* 1976) และเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus* SP. NRRL B-3881 มีความคงตัวที่พีเอช 7.5-10.0 (Boyer and Ingle. 1972) ดังนั้นแสดงว่าความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

4.6.5 ผลความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

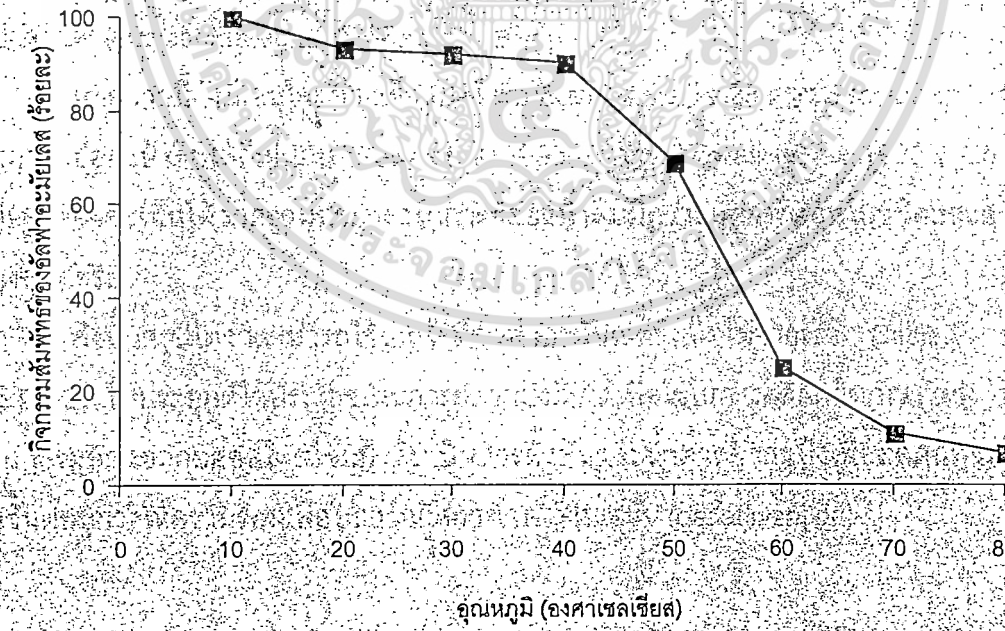
ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 4.18 พบว่าการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงสุด มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ร้อยละ 100 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 93 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 92 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 90 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 69 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 25 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 11 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เพียงร้อยละ 7 ของกิจกรรมสูงสุด

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสมีผลทำให้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสมีความคงตัวลดลงเนื่องจากความร้อนไปทำลายเอนไซม์ทำให้โปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์เสื่อมสภาพได้ ยกเว้นเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียบางตัวที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Remesh and Lonsane. 1981) ผลการทดลองใกล้เคียงกับการทดลองของพิเชฐ อิฐกอ (2528) รายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* มีความคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส

เบญจพร บัวบาน (2542) รายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Saccaromycopsis* sp. มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และไม่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 55-75 องศาเซลเซียส ส่วน Buonocore *et. al.* (1976) รายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus acidocaldarius* มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส Kobayashi และคณะ (1992) ได้ศึกษาถึงความคงตัวของเอนไซม์อะมัยเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Natronococcus* sp. Ah-36 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และสัตถาพร ศรีมหาสงคราม (2524) รายงานว่าเอนไซม์อะมัยเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* PR1 และ Bacillus amyloliquefaciens B_{1512} มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.17 แสดงผลของความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่พีเอชต่าง ๆ



รูปที่ 4.18 แสดงผลของความคงตัวของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

4.7 ผลทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งดิบโดยศึกษา แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวเจ้า โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน

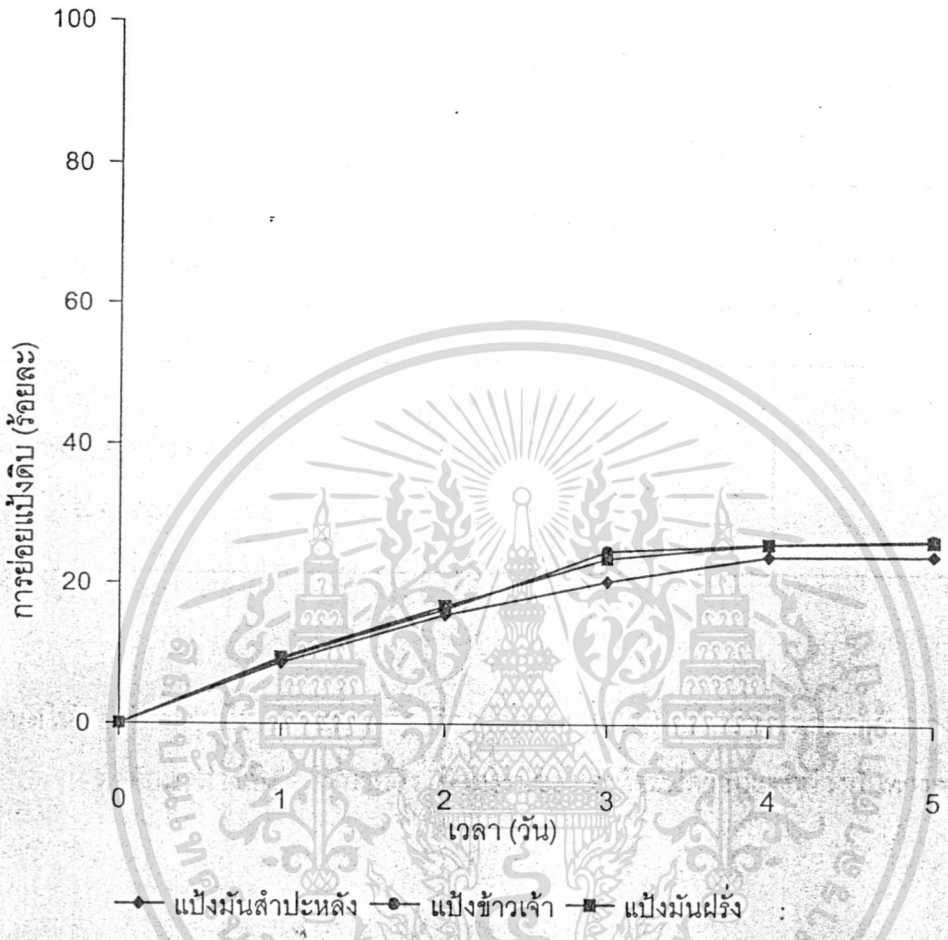
ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งดิบแสดงดังรูปที่ 4.19 จากการทดลองพบว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถย่อยสลายแป้งข้าวเจ้าดิบได้สูงสุดคือร้อยละ 26.4 รองลงมาคือแป้งมันฝรั่งดิบย่อยได้ร้อยละ 26.1 และแป้งมันสำปะหลังดิบย่อยได้ร้อยละ 24.3 ในวันที่ 5 ของการทดลอง

จากผลการทดลองแสดงว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งข้าวเจ้าดิบ แป้งมันฝรั่งดิบ และแป้งมันสำปะหลังดิบได้ใกล้เคียงกัน การทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Hayashida *et. al.* (1988) รายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* 65 สารมารถย่อยแป้งมันฝรั่งดิบ แป้งข้าวโพดดิบ แป้งมันฝรั่งหวานดิบ และแป้งสาลีดิบได้ไม่ถึงร้อยละ 40 ในวันที่ 5 ซึ่งการย่อยแป้งดิบยังขึ้นอยู่กับแรงผลักดันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับเม็ดแป้ง โดยแรงผลักดันนี้มีผลทำให้เกิดการย่อยแป้งดิบแบบไม่เจาะจงด้วย

การทดลองของ เบญจพร บัวบาน (2542) รายงานว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Sacharomycopsis* sp. ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ส่วนเอนไซม์กลูโคอะมัยเลสจากเชื้อดังกล่าวสามารถย่อยแป้งดิบได้ และยังมีรายงานอีกว่าเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อราไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ (Hayashida *et. al.* 1988)

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Ts-23 และ *Bacillus* sp. IMD 370 สามารถย่อยแป้งดิบได้ดีเช่นกัน (Kelly *et. al.*1995 ; Anindyawati *et. al.* 1998 ; Lin *et. al.* 1998) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสามารถในการย่อยแป้งดิบมีความแตกต่างกันในชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ดังนั้นสรุปได้ว่าสามารถใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการย่อยแป้งดิบได้เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ต่อไป เช่นการผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้แป้งดิบเป็นสารตั้งต้นและน้ำตาลจากแป้งเพื่อลดต้นทุนการผลิตในขั้นตอนการให้ความร้อนเพื่อให้แป้งเกิดการเจลาติไนเซชัน (gellatinization)



รูปที่ 4.19 แสงความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (โดยเปรียบเทียบแป้ง 3 ชนิด ปฏิกิริยาประกอบด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 50 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร แป้งดิบชนิดต่าง ๆ 100 มิลลิกรัม และโทลูอีน 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 150 รอบต่อนาที)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.01 พบว่า ผลการย่อยแป้งดิบทั้ง 3 ชนิดด้วยเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งดิบชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ชนิดของแป้ง	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งมันฝรั่ง	แป้งข้าวเจ้า
การย่อยแป้งดิบ (ร้อยละ)	24.3_a	26.1_a	26.4_a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าในเศษเหลือทิ้งของขนุนมีแป้งร้อยละ 19.6 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 47.5 น้ำตาลรีดิวส์ร้อยละ 4.2 และโปรตีนร้อยละ 4.7 มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 0.7

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือสูตรอาหารที่ประกอบด้วยเศษเหลือทิ้งของขนุน 10 กรัม ที่เติมอาหารเกลือแร่ 25 มิลลิลิตร (ความชื้นร้อยละ 70) แป้งและแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน ให้ผลผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงกว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยเศษเหลือทิ้งของขนุนที่เติมอาหารเกลือแร่แล้วเติมแป้ง หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต อย่างใดอย่างหนึ่ง อย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสในสูตรอาหารที่ใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนเพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสพบว่าสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10.0 และ 13.0 ปริมาตรต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุนให้ผลผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงกว่าสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5.0 7.0 และ 15.0 อย่างมีนัยสำคัญ ความชื้นของสูตรอาหารเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 ให้ผลผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงกว่าสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50 60 65 และ 75 อย่างมีนัยสำคัญ สูตรอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงกว่าสูตรอาหารที่เติม น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลแลกโตส อย่างมีนัยสำคัญ และสูตรอาหารที่เติมแป้งร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน พบว่าให้ผลผลิตเอนไซม์สูงกว่าสูตรอาหารที่เติมร้อยละ 2 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญ การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสูตรอาหารให้ผลผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมเปปโตน สูงกว่าการเติมโซเดียมไนเตรท และสารสกัดจากยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนักของเศษเหลือทิ้งของขนุน ให้ผลผลิตของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสไม่แตกต่างอย่างนัยสำคัญจากการเติมร้อยละ 2 และสูงกว่าสูตรอาหารที่เติมร้อยละ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของสูตรอาหารเป็น 6.0 และ 7.0 ให้ผลผลิตของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงกว่าสูตรอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 5.0 8.0 และ 9.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือที่ 35 องศาเซลเซียสซึ่งให้ผลผลิตเอนไซม์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ขนาดของ

เศษเหลือทิ้งของขนุนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสคือ 500-850 ไมโครเมตร โดยให้ผลผลิตเอนไซม์สูงกว่าที่ขนาด เล็กกว่า 300 300-500 850-1700 และ ใหญ่กว่า 1700 ไมโครเมตร อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าเมื่อเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ลงในสูตรอาหารมีส่วนช่วยให้ผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้สูงขึ้น ส่วนเหล็กคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ไม่ได้มีส่วนช่วยในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส ซึ่งแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1 และ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนักให้ผลผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสสูงกว่าที่เติมร้อยละ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 พบว่าเชื้อเจริญได้สูงสุดที่ 42 ชั่วโมงของการหมัก นับโคโลนีได้ 4.57×10^8 CFU/g และให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก มีกิจกรรม 89.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท และยังพบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ และผลิตเอนไซม์ออกมาได้สูงสุดเมื่อเซลล์เข้าสู่การเจริญเติบโตคงที่แล้ว (stationary phase)

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทระหว่างรำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า และเศษเหลือทิ้งของขนุนเชื้อผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้พบว่าการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยตกตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ที่ระดับความอิ่มตัวในช่วงร้อยละ 40-60 ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าที่ระดับ 0-20 20-40 และ 60-80 โดยมีกิจกรรมจำเพาะ 104.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 22.2 เท่า เมื่อนำสารละลายตะกอนของเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเอธานอลในช่วงระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-60 มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันโดยใช้หลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุลขนาด 10,000 ดาลตัน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสเพิ่มขึ้น มีกิจกรรมจำเพาะ 142.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 30.2 เท่า เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 6.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 5.0-8.0 นาน 24 ชั่วโมง และคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที

ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ผลิตได้พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบ แป้งมันฝรั่งดิบ และแป้งมันสำปะหลังดิบได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถย่อยแป้งดิบได้ร้อยละ 26.4 26.1 และ 24.3 ตามลำดับ

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการใช้เศษเหลือทิ้งของขนุนมาใช้ประโยชน์เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสนั้น มีข้อเสนอแนะในการวิจัยคือควรจะมีการนำเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ มาศึกษาใช้เป็นวัตถุดิบในการวิจัยอื่น ๆ ต่อไป เช่น เศษทุเรียน เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วย ควรมีการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนและ

แหล่งไนโตรเจนจากเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูกและควรมีการศึกษาการผลิตในระดับถังหมักเพื่อเป็นพื้นฐานการขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปและเพื่อให้เอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้จำเป็นต้องศึกษาการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพื่อให้สามารถใช้ในอาหารได้และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

บรรณานุกรม

กฤติกานต์ มหาวรรณ. 2523. การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดวงพร คันธโชติ. 2530. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม** . กรุงเทพ ฯ : โอเอส พรินติ้งเฮาส์

ทนง ภัครัชพันธ์. 2522. **เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. คณะเกษตร. กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เทพนิมิตร มะลิพวง และนคโรจน์ อินทรีย์สังวร. 2542." สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ อัลฟาอะมัยเลสจากวัสดุเหลือทิ้งของขนุนโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25". โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นฤชิต แว่วศรีผ่อง. 2529. **การปลูกขนุน**. กรุงเทพ ฯ : พิมพ์สวย หน้า 9-25

บุญเทียม พันธุเพ็ง. 2543. **เอกสารประกอบการสอนวิชาเอนไซม์ทางอาหารขั้นสูง**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เบญจพร บัวบาน. 2542."การผลิตและสมบัติของเอนไซมอะมัยเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Sacharomycopsis* sp." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอนไซม์ทางอาหารตอน 1**. กรุงเทพ ฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปราบสยบ ภูมิพานิชย์ และคณะ. 2543. การผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068. โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบันฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พิเชฐ อิฐกอ. 2528. "การผลิตอัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KA 63." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2528. การย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นน้ำตาลโดยเชื้อ *Aspergillus* และ *Rhizopus* สายพันธุ์พื้นบ้าน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบันฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม**. 2. กรุงเทพ ฯ. โอเอสพรินติงเฮาส์. 25-42

สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524. การผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจากแบคทีเรียเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

A.O.A.C.1990. Official Methods of Analysis by the Association of official Analytical Chemists. 14 th ed. The Assosiation of Official Analytical Chemists, Inc.

Abdelaty and Laila, M. 1996. "Utilization of Potato-industrial wastes forbacterial α-amylase production" Anals-of-Agriculture Science-Caino. 4(2) : 603-616

Anindyawati, T. et. al. 1998. "Three different type of α-amylase from *Aspergillus awarmori* K-11 : Their purifications, properties and specificities." Biosci. Biotecno. Biochem. 62(7) : 1351-1357

Aslam, A.H. et. al. 1974. "Studies on the formation of α-amylase by *Aspergillus niger*." Microbail. Esp. 26 : 189-196

Babu, K.R. and Satyanarayana, T. 1995. "α-amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation." Process. Biochem. 30(45) : 305-309

Bandyopadhyay, A. et. al. 1994. "Extra cellular amylase synthesis by Bacillus globisporus BH-1B." Biotechnol. Acta. 14 : 97-104

Bernfeld, P.1951. Enzyme of Starch degradation and synthesis. Newyork : Academic Press, Inc

Boyer, E.W. and Ingle, M.B.1972. "Extracellular alkaline amylasefrom a *Bacillus* sp."J. Bacteriol. 110(3) : 992-1000

Budaitman, S. and Lonsane, B.K. 1987. "Cassava fibrous waste residue as substitute to wheat bran in solid state fermentation." Biotechnol. Lett. 9: 597-600

Buonocore, I. et. al. 1976. "Stable inducible thermophilic α-amylase by *Bacillus acidocaldaricus*." J. Bacteriol. 128(2) : 515-521

Caldwell, M.L. et. al. 1952. "Crsystalline panceatic amylase. II. Improved method for its preparation from hog pancreas glands and and additional studies of its properties."J. Amer. Chem. Soc. 74 : 4033

Campbell, L.L. 1954. "Purification and Properties of an alpha amylase from facultative thermophilic Bacteria." Arch. Biochim. Biophys. 54:154-161

Campbell, L.L. and Cleveland, P.D. 1961. "Thermostable α-amylase of Bacillus stearothermophillus I. Crystallization and some general properties. J. Biol. Chem. 236-252

Chandra, A.K. et. al. 1980. "Production of extracellular thermostable α-amylase by *Baccillus licheniformis*." J. Ferment. Technol. 58(1) : 1-10

Coleman, G. and Elliott, W.H. 1962. "Studies on alpha amylase formation by *Bacillus subtilis*." J. Biochem. 256-263

Coleman, G. and Grant, M.A.1975. "Characteristics of alpha-amylase formation by *Bacillus subtilis* Nature 211." J. Biochem. 306-307

De mot, R. and Varachtert, H. 1987. "purification and characterization of extracellular α-amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678." Eur. J. Biochem. 164 : 643-654

Dettori-Campus,B.G. et. al. 1992."Hydrolysis of starch granules by the amylase from Bacillus stearothermophlis NCA26." Process. Biochem. 27: 17-21

Dey, S. and Aqarwal, S.O.1999. "Characterization of thermostable α-amylase from a thermophillic Streptomyces megasporus strain SD12." Biochem. Biophys. 36(3) : 150-157

Dube, S.K. and Tandenz, G.T. 1961."Isolation and properties of sorghum α-amylase."Arch. Biochim. Biophys. 94 : 121-127

Dubis, M. et. al. 1956."Coloimetric Method for determination of Sugar and related substance." Anal. Chem. 28:350-356

Dwali, M.S. et. al. 1978. "Imobilization of α-amylase in the porous glass and silochrome." Micro. Abstr. 14(7) : 5

Fischer, E.H. and Stein, E.A. 1961. "α-amylase from human saliva." Biochemical Preparation. 8 : 27.

Fischer, E.H. et. al. 1950. "proprietis de l α-amylase de pancreas humain comparison comparision avcc les autres α-amylase cristallisees. Sou less enzymes amylolytiques X." Helv. Chim. Acta. 33 : 1060

Fukumoto, J. 1943. "Studies on bacteria amylase II Bacteria and Physiological nature." J. Agri. Chem. Soc. Japan. 634-640

Fukumoto, J. et. al. 1957. "Amylase formation and carbon source metabolism of *Bacillus subtilis*." Proc. Insern. Symp. Enzyme Chem. 365-369

Fukumoto, J. et. al. 1958. Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem.

Fukumoto, J. et. al. 1965. Microbial amylase. Advance in applied microbiology. 7 : 288

Giraud, E. et. al. 1994. "Degradation of raw starch by amylolytic strain of Lactobacillus plantarum." Appl. Environ. Microbiol. 60(12) : 4319-4323

Gome, I. et. al. 1992. "Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 8(2) : 137-138

Hamada, N. et. al. 1967. "α-amylase formation and calcium metabolis of *Bacillus subtilis* ." Agri. Biol. Chem. 31 : 1-6

Han, I.Y. and Steinberg, M.P. 1987. "Amylolysis of raw corn by *Aspergillus niger* for simultaneous ethanol fermentation." Biotechnol. Bioeng. 30 : 225-232

Hayashida, S. et. al. 1988. "Production and characteristics of rawpotato-starch-digestingα-amylase from *Bacillus subtilis* 65." Appl. Environ. Microbiol. 54(6) : 1516-1522

HayaShida, S., and Yoshino, E. 1978. "Formation of active derivative of glucoamylase I during the digestion with fungal acid protease and α-mannosidase." Agr. Biol. Chem. 42(5) : 927-933

Heatley, N.G. 1958. "Spontaneous crystallization of amylase from pancreatic juice of the rat." Nature. 181 :1069

Iefuji, H. et. al. 1994. "Isolation and characterization of yeast Cryptococcus sp. S-2 that produce raw starch digesting α-amylase,xylanase and polygalactoturonase." Biosci. Biotechnol. Biochem. 58(12) : 2261-2262

Kanlayakrit, W. 1987. Studies on raw starch digestibility of fungal glucoamylase. Ph.D. Thesis, Kyushu Univ., Japan

Kelly, C.T. et. al. 1995 "the raw starch degrading alkaline amylase of *Bacillus* sp. IMD 370."J. Ind. Microbiol. 15(5) : 61-68

Kelly, C.T. et. al. 1997. "Bi-phatic production of α-amylase of Bacillus flavothermus in batch fermentation." Biotechnol. Lett. 19(7) : 675-677

Krishna, C. and Chandrasekaran, M. 1995. "Banana waste as substrate for α-amylase production by Bacillus subtilis (CBTK106) under solid state fermentation." Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 :106-111

Kuo, M.J. and Hartman, P.A. 1966. "Isolation of amylolytic strain *thermoactinomyces valgaris* and production of thermophilic actinomycete." J. Bacteriol. 92 : 723-726

Narahara, H. et. al. 1982. "Growth and enzyme production in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*." J. ferment. Technol. 60(4) : 311-319

Nigam, P. 1990. "Investigation of some factors important for solid state fermentation of sugar can bygasse for animall feed production." Enzyme. Microb. Technol.12 : 805-811

Ninomiya, Y. et. al. 1975. "Protein synthesis by protoplast membranes *of Bacillus subtilis*." J. Ferment. Technol. 53(4) : 189-198

Nomura, M. et. al.1956. "Studies on amylase formation by *Bacillus subtilis* I Effect of concentration of polyethylene glycol on amylase formation by *Bacillus Subtilis*." J. Biochem. 143-152

Nystorm, J.M. et. al. 1975. "Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulase." Helsinki. 12-14 March : 181-191

Olympia, M.S.D. and Ueda, S. 1980. Alcohol fermentation from raw sweet potato : Improvement and evaluation of the fungal sacharification agent in relation to alcohol yield." Annual Reports of ICME . 3 : 95-106

Outrup, H. et. al. 1976. "Improvements in or relating to the preparation of microbial enzyme." U.S. Pat. 22: 296,839

Pandey, A. 1991. "Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid state fermentation." Biotechnol. Lett. 37: 169-172

Park, Y.K. and Rivera, B.C. 1982. "Alcohol production from various enzyme-converted starch with or without cooking." Biotechnol. Bioeng. 24 : 495-500

Paul, R.M. 1978. An instrumental method of determination glucoamylase activity. Process. Biochem. 13(2):12-13

Peltier, G.I. and Beckord. 1954. "Source of amylase producing bacteria." J. Bacteriol. 50 : 711-714

Press Saito, N.and Yamamoto,K.1975. "Reglatory factors affecting amylase production in *bacillus licheniformis*." J. Bacterriol. 121 : 848-856

Reed, G. and Underkofler, L.A 1966. Enzyme in food processing. New York : Acadermic

Remesh, M.V. and Lonsane, B.K. 1987. "Solid state fermentation for producing of α-amylase by Bacillus megaterium 12M." Biotechnol. Lett. 9 : 323-328