สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การประยุกต์ใช้วิธีซิมเพลกซ์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504

นางสาวปิยาภรณ์ มฤคพันธุ์
นางสาวสุมลรัตน์ ปานทอง

ปค
ว622ร
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72612
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

.b 11770016
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Application of the Sequential Simplex Optimization for Improvement the Glucanase Production by *Bacillus circulans* JMC 2504

Piyaporn Maruekhaphan

Sumolrat Panthong

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การประยุกต์ใช้วิธีซิมเพลกซ์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส จากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504
นักศึกษา	นางสาวปิยาภรณ์ มฤคพันธุ์ รหัสประจำตัว 46050129
	นางสาวสุมลรัตน์ ปานทอง รหัสประจำตัว 46050149
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิดาภา ทิน้อย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ	อาจารย์ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	
กรรมการ	ดร. จิดาภา ทิน้อย	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การประยุกต์ใช้วิธีซิมเพลกซ์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส จากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504
นักศึกษา	นางสาวปิยาภรณ์ มฤคพันธุ์ นางสาวสุมลรัตน์ ปานทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิดาภา ทิน้อย

บทคัดย่อ

จากการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504 โดยใช้วิธีซิมเพลกซ์ พบว่าสภาวะเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสคือ ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.53 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 26.7 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.54 ความเร็วรอบในการเขย่า 205 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 23.4 ชั่วโมง โดยจะต้องศึกษาสภาวะการทดลองทั้งหมด 15 การทดลองโดยวิธีซิมเพลกซ์เพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนส พบว่าที่สภาวะที่เหมาะสมนี้เชื้อ *B. circulans* JMC 2504 สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 0.338 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และปริมาณเซลล์ของ *B. circulans* JMC 2504 เท่ากับ 1.645×10^{17} CFU/mL จากนั้นได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดโดยมีค่า relative activity ของเอนไซม์กลูคาเนสเท่ากับ 106 และ104 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project title	Application of the Sequential Simplex Optimization for Improvement the Glucanase Production by *Bacillus circulans* JMC 2504
Student	Miss Piyaporn Maruekhaphan
	Miss Sumolrat Panthong
Major	Biotechnology
Department	Applied Biology
Academic Year	2006
Special project advisor	Dr. Jidapha Tinoi

Abstract

The optimization of β-glucanase production from *Bacillus circulans* JMC 2504 was carried out by the sequential simplex optimization method. The optimal conditions for β-glucanase production was 0.53 g/100 mL of the bakers' yeast cell wall, agitation rate 205 rpm, initial pH 5.54, temperature 26.7 °C and incubation time 23.4 hr. The total experiments of simplex optimization were 15 experiments. The highest β-glucanase activity was 0.338 U/mL and cell density of *B. circulans* JMC 2504 was 1.645×10^{17} CFU/mL. The characteristics of β-glucanase were also investigated. It was found that the optimal temperature at 45 °C and the optimal pH at 4.5 showed the highest relative β-glucanase activity of 106 % and 104 %, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลุล่วงมิได้ถ้าหากขาดความช่วยเหลือ ความร่วมมือ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่คณะผู้จัดทำจากบุคคลต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ดร.จิดาภา ทิน้อย ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการและกรรมการ ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ช่วยประสิทธิประสาทวิชาความรู้ ให้คำปรึกษา และคอยช่วยเหลือตลอดระยะเวลา 4 ปี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ธุรการ และแม่บ้าน ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในการดำเนินงานโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ชั้นปีที่ 4 ทุกคนที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา และครอบครัว ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ผู้จัดทำจนประสบความสำเร็จในด้านการศึกษา

นอกจากนี้ยังมีบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลืออีกมากมาย ที่มิได้กล่าวถึง ณ ที่นี้ ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ปิยาภรณ์ มฤคพันธุ์
สุมลรัตน์ ปานทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 เอนไซม์กลูคาเนส	4
2.1.1 ชนิดของเอนไซม์กลูคาเนส	4
2.1.2 การจำเพาะของเอนไซม์กลูคาเนสต่อสารตั้งต้น	4
2.1.3 แหล่งที่พบเอนไซม์กลูคาเนส	7
2.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส	9
2.1.5 ประโยชน์ของเอนไซม์กลูคาเนส	11
2.1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส	11
2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีซิมเพลกซ์ (Sequential Simplex Optimization)	13
2.2.1 ทฤษฎีของวิธีซิมเพลกซ์	13
2.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	23
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	23
3.2 สารเคมี	23
3.3 อุปกรณ์	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 วิธีการทดลอง 24

3.4.1 การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 24

3.4.2 การหาปริมาณเซลล์โดยวิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค pour plate 25

3.4.3 การวัดปริมาณและการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 25

3.4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B.circulans* JMC 2504 โดยวิธีซิมเพลกซ์ 27

3.4.5 การศึกษาคุณสมบัติและความเสถียรของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 28

บทที่ 4 ผลการทดลอง 30

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504 โดยใช้วิธีซิมเพลกซ์ 30

4.2 คุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 42

4.2.1 ผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส 42

4.2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส 43

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 45

5.1 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยใช้วิธีซิมเพลกซ์ 45

5.2 คุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 47

เอกสารอ้างอิง 49

ภาคผนวก ก 54

ภาคผนวก ข 55

ภาคผนวก ค 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus circulans* WL-12	5
2	การทำงานของเอนไซม์ endo-β-1,4-D-glucanase I ที่มีต่อสารตั้งต้นในกลุ่ม cellulosic	6
3	ความจำเพาะกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase บริสุทธิ์ที่ผลิตได้จาก *A. brasiliensis* โดยทำการทดสอบกับสารตั้งต้นประเภท β-glucan หลายชนิด	7
4	แสดงสภาวะเริ่มต้นสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* เพื่อเข้าสู่กระบวนการหาสภาวะที่เหมาะสมแบบวิธีซิมเพลกซ์	28
5	แสดงผลการคำนวณและวิเคราะห์เพื่อหาสภาวะใหม่ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากวิธีซิมเพลกซ์	29
6	แผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปที่แสดงสภาวะการทดลองเริ่มต้นในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้	31
7	แสดงแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปเพื่อหาสภาวะการทดลองชุดใหม่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 (แบบปกติ R)	33
8	แสดงแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปเพื่อหาสภาวะการทดลองชุดใหม่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504	34
9	แสดงแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปเพื่อหาสภาวะการทดลองชุดใหม่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504	35
10	สภาวะการทดลองทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยวิธีซิมเพลกซ์	36
11	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	55
12	ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส	56
13	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *B. circulans*	9
2	ลักษณะของเชื้อ *B. circulans*	9
3	ลักษณะของซิมเพลกซ์ในการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัย 2 ชนิด	15
4	ลักษณะซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผัน	15
5	ตรรกการเคลื่อนที่ที่เป็นไปได้สำหรับซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผัน	17
6	แผ่นงานซิมเพลกซ์สำหรับซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผันและ 3 ตัวแปร	19
7	ลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์	19
8	ลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์แบบขนาดคงที่	20
9	ลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผัน	20
10	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* เมื่อทำการทดลองในชุดสภาวะการทดลองโดยใช้วิธีซิมเพลกซ์	37
11	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 เมื่อทำการทดลองในชุดสภาวะการทดลองโดยใช้วิธีซิมเพลกซ์	38
12	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าปริมาณผนังเซลล์เบเกอร์ยีสต์ตามการดำเนินไปของสภาวะการทดลองในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสตามวิธีซิมเพลกซ์	39
13	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิต	40
14	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสตามการดำเนินไปของสภาวะการทดลอง	40
15	แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเร็วรอบในการเขย่าและการดำเนินไปของสภาวะการทดลองที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสที่ได้จากวิธีซิมเพลกซ์	41
16	แสดงการเปลี่ยนแปลงของเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* ตามวิธีของซิมเพลกซ์	42
17	แสดงผลของค่าความเป็นกรดด่างที่มีต่อค่า relative activity ของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504	43
18	แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่า relative activity ของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504	44
19	กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เอนไซม์กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสารตั้งต้น (substrate) จำพวกกลูแคน (glucan) ซึ่งเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของเห็ด รา และยีสต์ให้เป็นสารโมเลกุลเดี่ยว (monomer) เช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) โดยเอนไซม์กลูคาเนสจะย่อยกลูแคนที่บริเวณพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ส่วนชนิดของพันธะที่เอนไซม์กลูคาเนสจะเข้าไปย่อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และพันธะของสารตั้งต้น เอนไซม์กลูคาเนสสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. เอนโดกลูคาเนส (Endo-glucanase) จะย่อยบริเวณพันธะไกลโคซิดิกภายในโมเลกุลของสารตั้งต้นแบบสุ่ม

2. เอ็กโซกลูคาเนส (Exo-glucanase) จะย่อยบริเวณพันธะไกลโคซิดิกภายในโมเลกุลของสารตั้งต้นอย่างเป็นระเบียบ โดยเริ่มย่อยจากปลายสายพอลิเมอร์ของสารตั้งต้น

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์และในพืชชั้นสูง เช่น Citrus Fruit (Sanchez-Ballesta และคณะ, 2006) ในด้านการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสโดยใช้จุลินทรีย์พบว่า เอนไซม์กลูคาเนสสามารถผลิตได้จากในเชื้อรา ยีสต์ สาหร่ายและแบคทีเรีย เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ได้แก่ *Neurospora crassa* (Hiura และคณะ, 1986) และ *Penicillium italicum* (Sanchez และคณะ, 1982) เชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้เช่น *Candida albicans* (Molina และคณะ, 1989) และ *Saccharomyces cerevisiae* (Kuranda และคณะ, 1987) สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากแบคทีเรียพบว่า มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *Clostridium thermocellum* (Schwarz และคณะ, 1988), *Flavobacterium dormitator* (Nagata และคณะ, 1990), *Bacillus circulans* (Watanabe และคณะ, 1989) โดยเฉพาะแบคทีเรีย *B. circulans* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ปริมาณมากที่สุด จากการศึกษาพบว่าการผลิตเอนไซม์จาก *B. circulans* สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางเนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงและในการผลิตเอนไซม์โดย *B. circulans* พบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จะมีการหลั่งออกมานอกเซลล์ ทำให้สะดวกต่อการสกัดและนำไปใช้งาน

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์จะเติมเอนไซม์กลูคาเนสลงไปเพื่อช่วยในการสกัดมอล์ท (malt) และการเติมเอนไซม์กลูคาเนสลงไปในอาหารของสัตว์ปีกจำพวกเป็ดและไก่ เนื่องจากสัตว์ประเภทนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสออกมาย่อยผนังเซลล์ของพืชที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบได้ จึงจำเป็นต้องเติมเอนไซม์นี้ลงไปเพื่อช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการย่อยธัญพืชที่เป็นองค์ประกอบหลักในอาหารสัตว์ (McCarthy และคณะ, 2005) จากคุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์โดยเฉพาะผนังเซลล์ที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบ จากการศึกษาพบว่าผนังเซลล์เชื้อราและยีสต์ประกอบด้วยกลูแคนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นในการย่อยสลายผนังเซลล์เพื่อที่จะสกัดสารออกมานอกเซลล์โดยการใช้เอนไซม์กลูคาเนส ถือว่าเป็นการประยุกต์ใช้เอนไซม์กลูคาเนสไปอีกทางหนึ่งด้วย ยีสต์ที่เคยมีการนำเอนไซม์กลูคาเนสมาใช้ในการย่อยผนังเซลล์ ได้แก่ baker's yeast (Rombouts และคณะ, 1976), *Schizosaccharomyces pombe* (Kopeckà และคณะ, 1995)

สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจาก *B. circulans* สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิต เพราะการผลิตในสภาวะเหมาะสมที่แท้จริงทำให้สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ในปริมาณที่สูงที่สุด ดังนั้นวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งในการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส จากการศึกษาพบว่าได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยวิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้ง (one-factor-at-a-time) พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ แต่เนื่องจากวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เวลาในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมนาน เนื่องจากจำนวนครั้งของการทดลองมีจำนวนมาก และที่สำคัญคือไม่สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการเกิดผลกระทบของตัวแปร (ปัจจัย) หนึ่งต่อตัวแปร (ปัจจัย) อีกชนิดหนึ่ง (factor interaction)ได้ ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่าได้มีการใช้วิธี response surface methodology เพื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมและพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ 251 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Tang และคณะ, 2004) แต่เมื่อทำการศึกษาด้วยวิธีนี้พบว่าต้องมีจำนวนการทดลองที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมจำนวนมาก

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าวิธีซิมเพลกซ์ (simplex) เป็นวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ โดยซิมเพลกซ์เป็นวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการผลักดันให้ซิมเพลกซ์เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่ให้การตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด โดยจะเคลื่อนที่จากบริเวณอื่นไปยังบริเวณที่ให้การตอบสนองที่สูงขึ้นจนสูงที่สุด โดยเคลื่อนที่ไปในทิศทางที่ตรงข้ามกับค่าที่ได้การตอบสนองน้อยที่สุด ขณะเดียวกันตัวแปรทั้งหมดของซิมเพลกซ์จะมีการเคลื่อนที่หรือเปลี่ยนแปลงไปในแนวทางเดียวกันเป็นการแก้ปัญหาการเกิด factor interaction ได้ และการประยุกต์วิธีซิมเพลกซ์มาใช้ค่อนข้างง่าย สะดวกและรวดเร็วในการหาสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากวิธีซิมเพลกซ์เกิดจากการคำนวณทางเรขาคณิตพื้นฐาน และมีรูปแบบหรือแผ่นงานการทดลองที่สำเร็จรูปสามารถนำมาใช้งานได้ การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีซิมเพลกซ์เป็นวิธีที่สามารถลดจำนวนของการทดลองได้ ทำให้เข้าสู่สภาวะที่เหมาะสมได้อย่างรวดเร็วมากขึ้น และได้สภาวะที่เหมาะสมที่แท้จริงของการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส

จากการศึกษาที่ผ่านมางานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* โดยจะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสด้วยวิธีซิมเพลกซ์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่แท้จริงและหาปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้ในสภาวะที่เหมาะสมรวมถึงศึกษาคุณสมบัติและความเสถียรของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่แท้จริงในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504 ด้วยวิธีซิมเพลกซ์
2. ศึกษาคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ประยุกต์ใช้วิธีซิมเพลกซ์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504 และ ศึกษาการเพิ่มการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ลดระยะเวลาและสะดวกในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์
2. หลีกเลี่ยงปัญหาการเกิดผลกระทบของตัวแปรหนึ่งต่อตัวแปรอีกชนิดหนึ่ง (factor interaction)
3. เพิ่มการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504
4. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากวิธี Simplex optimization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เอนไซม์กลูคาเนส (Glucanase)

2.1.1 ชนิดของเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนส (glucanase) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) โดยส่วนใหญ่เอนไซม์กลูคาเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่พบในสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตประเภทกลูแคน (glucan) ซึ่งโครงสร้างของกลูแคนจะมีลักษณะเป็นโมโนแซ็คคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคสจัดเรียงตัวต่อกันเป็นเส้นตรงไม่มีกิ่งก้านเชื่อมต่อด้วยพันธะ 1,3 และ 1,4-β-glucosidic เอนไซม์กลูคาเนสที่พบในปัจจุบันสามารถจำแนกได้หลายชนิด ได้แก่ endo-1,3-β-glucanase (E.C.3.2.1.39) จะย่อยเฉพาะพันธะ 1,3-β-glucosidic ซึ่งเป็นพันธะที่พบในสารตั้งต้น (substrate) ประเภทกลูแคน, exo-1,4-β-glucanase (E.C.3.2.1.74) จะย่อยเฉพาะพันธะ 1,4-β-glucosidic สำหรับ endo-1,3-1,4-β-glucanase (E.C.3.2.1.73) สามารถย่อยทั้งพันธะ 1,3 และ 1,4-β-glucosidic ส่วน endo-1,6-β-glucanase (E.C.3.2.1.75) จัดเป็นเอนไซม์กลูคาเนสที่ย่อยพันธะ 1,6-β-glucosidic ใน pustulan ซึ่งเป็นกลูแคนชนิดหนึ่งที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของไลเคน *Umbilicaria pustulata* นอกจากนี้เอนไซม์ endo-1,2-β-glucanase (E.C.3.2.1.71) สามารถย่อยบริเวณพันธะ 1,2-β-glucosidic ซึ่งเป็นพันธะของสารตั้งต้นที่จัดอยู่ในกลุ่มของกลูแคนและ endo-1,4-β-glucanase (E.C.3.2.1.4) จะย่อยบริเวณพันธะ 1,4-β-glucosidic ใน cellulose

2.1.2 การจำเพาะของเอนไซม์กลูคาเนสต่อสารตั้งต้น

ในการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสพบว่าจะมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อสารตั้งต้นนั้นจะใช้สารตั้งต้นหลายชนิดที่โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่แตกต่างกันไป ดังตัวอย่างในตารางที่ 1

ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ β-1,3-glucanase จะย่อยเฉพาะสารตั้งต้นที่โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3-glucosidic ซึ่งได้แก่ laminarin, bakers' yeast glucan, bakers' yeast cell wall, periodate oxidized laminarin, pachyman และ oat glucan และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้น เช่น สารตั้งต้นที่เป็นลามินารินจะถูกเอนไซม์ย่อยไปเป็น laminarihexose ซึ่งเป็น oligosaccharide จากนั้นเอนไซม์จะย่อยต่อไปได้เป็น laminaritriose, laminaribiose, glucose และ gentiobiose ตามลำดับแต่หากสารตั้งต้นเป็นกลูแคนหรือผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (baker's yeast) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์กลูคาเนสคือ laminaritriose, glucose และ laminaribiose แต่จะไม่เกิด gentiobiose ขึ้นเลย (Rombouts และคณะ, 1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้จาก *B. circulans* WL-12 (Rombouts และคณะ, 1976)

Substrate	Main linkage type	Hydrolysis
Laminarin	β-1,3	+
Laminaritriose	β-1,3	+
Laminaribiose	β-1,3	-
Glucan (*S. cerevisiae*)	β-1,3 : β-1,6	+
Cell walls (*S. cerevisiae*)	β-1,3 : β-1,6	+
Periodate oxidized laminarin	β-1,3	+
Pachyman	β-1,3	+
Oat glucan	β-1,4 : β-1,3	+
Cellulose dextrins	β-1,4	-
Pseudonigeran	α-1,3	-
Dextran	α-1,6	-
Amylose	α-1,4	-
Yeast mannan	α-1,6 : α-1,3 : α-1,2 (mannose)	-
Phosphomannan (*H. holstii*)	α-1,3 : α-1,2 (mannose)	-
Sucrose	-	-
Methyl-β-D-glucoside	-	-
Phenyl-β-D-glucoside	-	-
p- Nitrophenyl-β-D-glucoside	-	-
p- Nitrophenyl-α-D-glucoside	-	-
p- Nitrophenylphosphate	-	-
Azocoll	-	-

ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่าเอนไซม์ β-1,3-glucanase นั้นยังมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นอีกหลายชนิด ซึ่งสารตั้งต้นชนิดใหม่ที่ได้มีการศึกษาแล้วว่ามีความมีจำเพาะกับเอนไซม์ β-1,3-glucanase คือ botryosphaeran ซึ่งเป็น exopolysaccharide ชนิด β-1,3-1,6-D-glucan ผลิตได้จากเชื้อ *Botryosphaesria rhodina* และ *Trichoderma harzianum* Rifai แต่ botryosphaeran ที่ผลิตได้จาก *T. harzianum* นั้นจะถูกเอนไซม์ย่อยได้ดีกว่าที่ผลิตได้จาก *B. rhodina* เล็กน้อย (Giese และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่หากเป็นเอนไซม์กลูคาเนสชนิด β-1,4-glucanase นั้นพบว่าจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกับเอนไซม์ β-1,3-glucanase โดยสารตั้งต้นที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อสารตั้งต้นนั้นเป็นสารตั้งต้นที่อยู่ในกลุ่มของ cellulosic ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ endo-β-1,4-D-glucanase I ที่มีต่อสารตั้งต้นในกลุ่ม cellulosic (Kim, 1995)

Substrate	Enzyme activity (U mg^{-1} protein)
Hydroxyethylcellulose	68.2
CMC (DS = 0.65, DP = 500)	70.5
Filter paper (Whatman no.1)	3.2
Avicel SF	6.9
MN300	6.7
Xylan	92.7
Insoluble cello-oligosaccharide (DP = 20)	3.2
Cellohexaose (DP = 6)	12.2
Cellopentaose (DP = 5)	36.2
Cellotetraose (DP = 4)	40.2
Cellotriose (DP = 3)	<0.001 (ND)
Cellobiose (DP = 2)	<0.001 (ND)
Salicin	<0.001 (ND)
pNPC	0.17
MeUmb$(Glc)_2$	0.12
pNPX	(ND)
pNPG	(ND)

จากการศึกษาเอนไซม์ endo-β-1,4-D-glucanase I ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* พบว่าจะทำงานได้ดีเมื่อทำการย่อยสลายสารตั้งต้นเป็นคาบอกซิเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC), กระดาษกรอง (Whatman No. 1), Avicel, MN300, xylan และ Insoluble cello-oligosaccharide โดยการทำงานของเอนไซม์ endo-β-1,4-D-glucanase I จะทำงานย่อยสลายต่อไซแลน (xylan) ของต้นเบิร์ช (birch) มากกว่าไซแลนที่ได้จากข้าวโอ๊ต (oat) (Kim, 1995) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. brasiliensis* โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ความจำเพาะกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase บริสุทธิ์ที่ผลิตได้จาก *A. brasiliensis* โดยทำการทดสอบกับสารตั้งต้นประเภท β-glucan หลายชนิด (Shu และคณะ, 2006)

Substrate	Main linkage	Relative activity of β-1,3-glucanase (%)
Laminarin	β-1,3	100 ± 0.3
ABPSG	β-1,3 and β-1,6	24.5 ± 1.7
Oat glucan	β-1,3 and β-1,4	15 ± 1.5
Barley glucan	β-1,3 and β-1,4	8 ± 1.1
Lichenan	β-1,3 and β-1,4	0 ± 0.0
Pustulan	β-1,3 and β-1,6	4 ± 1.3
Chitosan	β-1,4	0
Carboxymethylcellulose	β-1,4	0
Amylose	α-1,4	0
p-Nitrophenyl-β-D-glucapyranoside		0

2.1.3 แหล่งที่พบเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น จากพืช สัตว์และจุลินทรีย์ ดังนี้

2.1.3.1 พืช

เอนไซม์กลูคาเนสมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารอาหารสำรองภายในเซลล์ของพืชและเมื่อพืชถูกรุกรานจากการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค พืชจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นภายในเซลล์โดยจะผลิตเอนไซม์กลูคาเนสออกมาเพื่อใช้ป้องกันตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ตัวอย่างพืชที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น ยาสูบ (Benhamou, 1992), พืชตระกูลส้ม (Sanchez-Ballesta และคณะ, 2006)

2.1.3.2 สัตว์

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดจะใช้เอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยสลายสารอาหาร สัตว์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น mollusks (Shallenberger และคณะ, 1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.3 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูคาเนสได้มีหลายชนิดได้แก่ เห็ดรา (fungi) ยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าเห็ดราจะสร้างเอนไซม์กลูคาเนสในระยะที่มีการแบ่งเซลล์หรือระยะแตกหน่อ โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารอาหารสำรองภายในเซลล์ของเห็ดรา เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *Penicillium janthinellum* (Rapp และคณะ, 1981), *Trichoderma longibrachiatum* (Tangarone และคณะ, 1989) และ *Acremonium* sp. (Jayus และคณะ, 2002) นอกจากเชื้อราแล้วยังมีเห็ดบางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *Agaricus brasiliensis* (Shu และคณะ, 2006)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ยีสต์ส่วนใหญ่ผลิตออกมานั้นมีทั้ง exoglucanase และ endoglucanase ตัวอย่างของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Santos และคณะ, 1979) และ *Schizosaccharomyces japonicas* var. *versatilis* (Kopecka และคณะ, 1995)

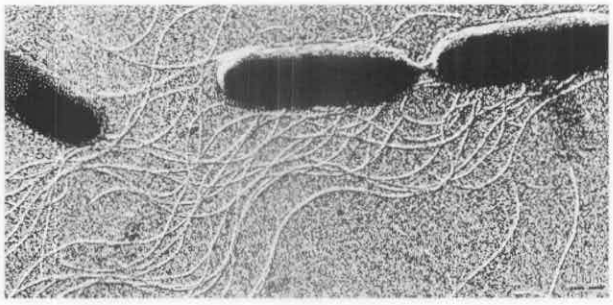
แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสในระดับอุตสาหกรรมนั้นมักนิยมทำการผลิตจากเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้รวดเร็ว การแยกเอาตัวเซลล์ออกจากเอนไซม์สามารถทำได้ง่าย และแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์แล้วปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ จัดเป็น extracellular enzyme ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์เพื่อนำมาใช้งานได้ง่าย แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้มีอยู่หลายชนิดเช่น *Escherichia coli* (Beshay และคณะ, 2003), *Bacillus subtilis* (Leelasuphakul และคณะ, 2006) เป็นต้น นอกจากเชื้อทั้งสองชนิดที่กล่าวมาแล้วนั้นยังมีเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีผู้นิยมนำมาศึกษาในเรื่องของการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสเป็นจำนวนมากคือ *Bacillus circulans* (Aono และคณะ, 1992) เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จะหลั่งเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้ออกมาภายนอกเซลล์ทำให้สะดวกต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ในปริมาณสูงด้วย

Bacillus circulans

เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน มีความกว้างของท่อนประมาณ 0.5-0.7 ไมโครเมตร ความยาวของแต่ละท่อน 2-5 ไมโครเมตร ย้อมติดสีแกรมบวก บางชนิดเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา แบคทีเรียชนิดนี้เป็นพวกออบลิเกทแอโรบิกแบคทีเรีย (obligate aerobic bacteria)

B. circulans ต้องการธาตุอาหารในการเจริญเติบโตแม้ว่าต้องการเพียงปริมาณเล็กน้อยแต่ก็จำเป็น (Proom และคณะ, 1955) เช่น NH_2PO_4, K_2HPO_4, $FeCl_2$ และ $CaCl_2$ อาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *B. circulans* เป็นอาหารพื้นฐาน (basal medium) ได้แก่ Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB) ส่วนสภาวะที่ทำให้เชื้อเจริญคือบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยใช้ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 125 รอบต่อนาที (Heck และคณะ, 2005) ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *B. circulans* ดังรูปที่ 1 และ2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *B. circulans*
ที่มา: http://www.uni-bayreuth.de

รูปที่ 2 ลักษณะของเชื้อ *B. circulans*
ที่มา: http://www.websters-online-dictionary.org

2.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

2.1.4.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง คือประมาณ 40 องศาเซลเซียสขึ้นไป (Tangarone และคณะ, 1989 ; Aono และคณะ, 1992 ; Leelasuphakul และคณะ, 2006) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต ซึ่งพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเห็ด *Agaricus brasiliensis* นั้นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส (Shu และคณะ, 2006) แต่ถ้าเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อราคุณสมบัติของเอนไซม์จะแตกต่างจากเห็ด เช่น เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 55 องศาเซลเซียส ถ้าเป็นเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียโดยเฉพาะจากเชื้อ *B. circulans* นั้น พบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงคือประมาณ 50-70 องศาเซลเซียส (Rombouts และคณะ, 1976 : Aono

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ, 1992) ส่วนเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้นจะมีค่าเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (Leelasuphakul และคณะ, 2005)

2.1.4.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนสจะทำงานได้ดีที่ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนหรือด่างอ่อน โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้นส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4.0-8.0 (Tangarone และคณะ, 1989 ; Aono และคณะ, 1992) ซึ่งลักษณะการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์กลูคาเนสและจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิต ส่วนเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเห็ดรา เช่น เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจาก *A. brasiliensis* จะมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 4.5 (Shu และคณะ, 2006) และเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *T. longibrachiatum* มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันคือ 4.8 (Tangarone และคณะ, 1989) แต่สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* จะมีค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมเท่ากับ 6.5 (Aono และคณะ, 1992) ส่วนเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. subtilis* พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 (Leelasuphakul และคณะ, 2006)

2.1.4.3 ผลของของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส

แหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส เช่น ใช้เป็นแหล่งของสารตั้งต้น มีอยู่หลายชนิดด้วยกันโดยแต่ละชนิดจะอยู่ในรูปที่แตกต่างกัน เช่น monosaccharide, disaccharide และ polysaccharide จากการศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เอนไซม์กลูคาเนสนั้นควรเป็นแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปของ disaccharide ซึ่งได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดต่างๆ เช่น มอลโตส ซูโครส แลคโตส และแมนโนส โดยหากทำการผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli* ควรใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนมากที่สุด เนื่องจากมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์และปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่าสูงขึ้นมากกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (Beshay และคณะ, 2003)

2.1.4.4 ผลของสารกระตุ้นและสารยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

ในการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสนั้นจะถูกกระตุ้นและถูกยับยั้งได้จากสารเคมีและโลหะไอออนบางชนิด จากการศึกษาพบว่าสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสได้ดีที่สุดคือ $HgCl_2$ และ Hg^+ โดยสารประกอบ $HgCl_2$ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสดีกว่าอยู่ในรูปของไอออน Hg^+ เล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีสารเคมีและไอออนอีกหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสได้ ตัวอย่างเช่น Fe^{2+}, Cu^{2+} (Shu และคณะ, 2006), $MnCl_2$, $KMnO_4$ และ *N*-Bromosucinimide (Tangarone และคณะ, 1989) แต่ยังมีสารเคมีและไอออนบางตัวที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นได้ เช่น Ca^+, Zn^{2+} และ K^+ (Shu และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 ประโยชน์ของเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนสได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเช่น อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ โดยการเติมเอนไซม์กลูคาเนสลงไปเพื่อช่วยในการสกัดมอล์ท (malt) และในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ได้มีการนำเอนไซม์กลูคาเนสมาประยุกต์ใช้โดยการเติมลงไปในอาหารของสัตว์ปีกจำพวกเป็ดและไก่ เนื่องจากสัตว์ประเภทนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสออกมาย่อยผนังเซลล์ของพืชที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบได้ จึงจำเป็นต้องเติมเอนไซม์ชนิดนี้ลงไปเพื่อช่วยในการย่อยธัญพืชที่เป็นองค์ประกอบหลักในอาหารสัตว์ (McCarthy และคณะ, 2005)

นอกจากนี้เอนไซม์กลูคาเนสถูกนำมาใช้ในการประยุกต์เพื่อศึกษาโครงสร้างผนังเซลล์และโครงสร้างของ β-glucan ของเห็ดรา และได้นำมาศึกษาโครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ (Manners และคณะ, 1973) อีกทั้งยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *S. pombe* (Kopecka และคณะ, 1995)

นอกจากนี้ยังได้มีผู้นำเอนไซม์กลูคาเนสมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ (Sietsma และคณะ, 1968) และใช้ในการตรวจสอบ taxonomic และความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการเกี่ยวกับยีสต์ (Lachance และคณะ, 1979) รวมทั้งช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช (Mitchell, 1963) เนื่องจากสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคได้

2.1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดโดยเชื้อแต่ละชนิดนั้นจะผลิตเอนไซม์กลูคาเนสต่างชนิดกันรวมทั้งใช้สภาวะในการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *T. longibrachiatum* จะผลิตเอนไซม์ endo-1,3-β-D-glucanase หรือ laminarinase โดยผลิตในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์และเกลือ ในการผลิตนั้นใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้สภาวะต่างๆ ดังนี้คือ ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราเร็วของใบกวน 200 รอบต่อนาที และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน (Tangarone และคณะ, 1989) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราชนิดอื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *P. janthinellum* เชื้อชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์ 1,4-β-glucanase หรือ Avicelase ซึ่งในการผลิตต้องมีการเติมสารชักนำ (inducer) จำพวก Avicel ลงไปด้วยและทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว basal medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน (Rapp และคณะ, 1981) เชื้อรา *Acremonium* sp. จัดเป็นเชื้อราอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ได้มีผู้นำมาศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสโดยสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Acremonium* sp. IMI 383068 เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 2 ชนิด คือ β-1,3-glucanase และ β-1,6-glucanase การผลิตเอนไซม์จะใช้อาหารเหลวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน (Jayus และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้คือยีสต์ โดยมียีสต์หลายชนิดที่ได้มีผู้นำมาศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส เช่น *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอนไซม์ exo-1,3-β-glucanase ในการผลิตจะใช้อาหารเหลว YED medium และเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยในการทดลองจะศึกษาเชื้อ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์ คือ S288C และ A158 แล้วนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *S. cerevisiae* S288C นั้นมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นจำพวกลามินาริน (laminarin) มากกว่าสารตั้งต้นพวกพูสทูแรน (pustulan) แต่เชื้อ *S. cerevisiae* A158 นั้นจำเพาะกับสารตั้งต้นจำพวกลามินารินเพียงชนิดเดียวโดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่เป็นพูสทูแรน (Santos และคณะ, 1979) นอกจากนี้ *S. japonicas* var. *versatilis* สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้โดยผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ 2 ชนิดคือ exo-β-1,3-glucanase และ endo-β-1,3-glucanase (Fleet และคณะ, 1975)

ขณะเดียวกันได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อแบคทีเรียด้วย ซึ่งพบว่าได้มีการศึกษาเป็นจำนวนมากโดยแบคทีเรียที่นำมาศึกษาได้แก่ *E. coli* ที่มีการตัดต่อยีนที่ผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ โดยการเลี้ยงในอาหาร TBG (Terrific broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (Beshay และคณะ, 2003) เชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้คือ *B. subtilis* ได้มีการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นจำนวนมาก โดย Leelasuphakul และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสและการทำให้บริสุทธิ์ รวมถึงด้านคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ร่วมกับสารสกัดต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 ในการผลิตใช้อาหารเหลว nutrient broth โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นนำเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้มาศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวต่างๆ พบว่าค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีค่าอยู่ที่ 7.5 และ 40 องศาเซลเซียส

Guo-qing (2005) ได้ทำการศึกษาถึงการทำเอนไซม์ β-1,3-1,4-glucanase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* ZJF-1A5 และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Aqueous two-phase extraction การผลิตเอนไซม์จะใช้อาหารเหลวและนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการศึกษาในเรื่องของการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส คือ *B. circulans* โดย Kim (1995) ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติและความจำเพาะกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ endo-β-1,4-D-glucanase I หรือ Avicclase I จากเชื้อ *B. circulans* F-2 โดยทำการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คือ 4.5 และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดด่างมีค่าสูงกว่า 4.5 แต่ความเสถียรของเอนไซม์พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงความเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดด่าง 4.0-10.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส และสารตั้งต้นที่นำมาศึกษาได้แก่ เซลโลเด็กซ์ทริน (cellodextrins) Avicel และ ไซแลน (xylan)

Aono และคณะ (1992) ได้ศึกษาถึงการผลิตและคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* IAM1165 ในอาหารเหลวที่มีการเติมสารชักนำ คือ pachyman เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 87 กิโลดาลตัน ซึ่งเอนไซม์ β-1,3-glucanase นี้มีผู้ได้ทำการผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นมาแล้ว แต่เอนไซม์ที่ผลิตได้นั้นมีขนาดมวลโมเลกุลเพียง 28 กิโลดาลตันเท่านั้น (Horikoshi, 1973)

Rombouts และคณะ (1976) ได้ศึกษาถึงการนำเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* WL-12 มาประยุกต์ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ของยีสต์ โดยในการผลิตเอนไซม์นั้นจะใช้อาหารเหลว mineral medium ที่มีการเติม alkali-insoluble baker's yeast glucan ลงไปเพื่อชักนำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น

สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเพราะการผลิตในสภาวะเหมาะสมที่แท้จริงทำให้สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ในปริมาณที่สูงที่สุด ดังนั้นวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งในการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส ซึ่งวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีซิมเพลกซ์ (Sequential simplex optimization)

2.2.1 ทฤษฎีของวิธีซิมเพลกซ์

ในการพัฒนาเพื่อหาวิธีการทดลองแบบใหม่หรือการปรับปรุงวิธีเดิมให้ดีขึ้นต้องอาศัยการทำการทดลองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนมาใช้ในการตรวจสอบผลของตัวแปรที่ต่อเนื่องหลายๆ อย่างเช่น ความเข้มข้นของสารเคมี ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ ซึ่งขึ้นอยู่กับผลที่ได้จากการทดลองที่ตรวจวัดได้ ดังนั้นเพื่อให้ได้มาซึ่งผลที่ดีจึงจำเป็นต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อหาชุดของสภาวะที่ให้ผลดีที่สุด ถ้าหากตัวแปรหลายชนิดไม่มีปฏิกิริยา (interaction) ต่อกัน ตัวแปรแต่ละตัวสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมได้โดยลำพังไม่ขึ้นกับตัวแปรอื่นๆ วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมแบบนี้เรียกว่าวิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้ง (one-factor-at-a-time) แต่โดยทั่วไปตัวแปรหลายชนิดเกิดปฏิกิริยาต่อกันจึงทำให้วิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้งไม่เหมาะสมในการนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดสภาวะที่มีหลายตัวแปรเป็นปัจจัยได้

โดยพบว่าการตอบสนองของตัวแปร 2 ตัวแปรของแต่ละสภาวะจะให้ค่าไม่เท่ากันโดยจะมีบางจุดที่ให้การตอบสนองสูงที่สุด เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ถ้าใช้วิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้งต้องให้ทุกปัจจัยคงที่ ยกเว้นเพียงปัจจัยเดียวคือปัจจัยที่ต้องการจะศึกษาและหาสภาวะที่เหมาะสม ในตัวอย่างนี้อาจให้อุณหภูมิคงที่แล้วแปรค่าความเป็นกรดด่างไปเรื่อยๆ จนกระทั่งได้ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมแล้วจึงยึดค่าความเป็นกรดด่างให้

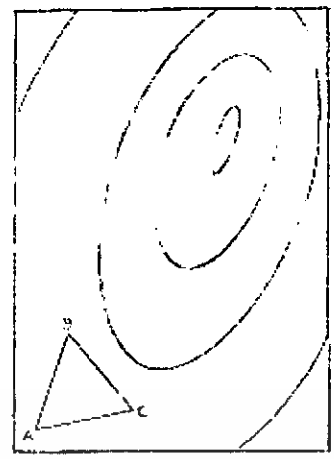
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คงที่ จากนั้นแปรค่าอุณหภูมิไปจนกว่าจะได้อุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการแปรค่าของปัจจัยเพียงรอบเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะได้มาซึ่งสภาวะที่เหมาะสมอาจต้องมีการทำซ้ำอีก การทดสอบแบบหนึ่งตัวแปรตามที่ได้กล่าวมานั้นเป็นวิธีที่นิยมกันทั่วไป แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถรับรองได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ได้นั้นเป็นสภาวะที่แท้จริงและวิธีนี้เหมาะสำหรับการทดลองที่มีจำนวนปัจจัยน้อยชนิด เช่น 2 ปัจจัยเท่านั้น ดังนั้นการทดลองที่มีหลายปัจจัยและแต่ละปัจจัยมีผลกระทบโดยเกิดปฏิกิริยาต่อกันจะไม่สามารถใช้วิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้งในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยในการทดลองได้ ต่อมาจึงได้มีผู้นำวิธี response surface methodology มาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยในการทดลอง โดย Tang และคณะ (2004) ได้ศึกษาถึงส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ β-glucanase จากเชื้อ *B. subtilis* ZJF-1A5 โดยใช้วิธี response surface methodology พบว่าเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส เพราะเอนไซม์ที่ผลิตได้มีการทำงานสูงถึง 131 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่น้ำตาลแลคโตสนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยที่สุดเพราะเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่าการทำงานเพียง 32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องใช้จำนวนการทดลองมาก รวมทั้งเกิดการจำกัดการแปรค่า (vary) ปัจจัยของการทดลองไม่สามารถทำได้ในช่วงที่กว้างได้ จึงได้มีผู้เริ่มสนใจวิธีซิมเพลกซ์มากขึ้นเนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีการหาสภาวะเหมาะสมที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถหาสภาวะเหมาะสมได้อย่างรวดเร็วโดยใช้หลักการคำนวณอย่างง่าย และสามารถนำมาใช้กับการทดลองที่มีหลายตัวแปรซึ่งตัวแปรแต่ละชนิดมีปฏิกิริยาผลกระทบต่อกัน ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่แท้จริง

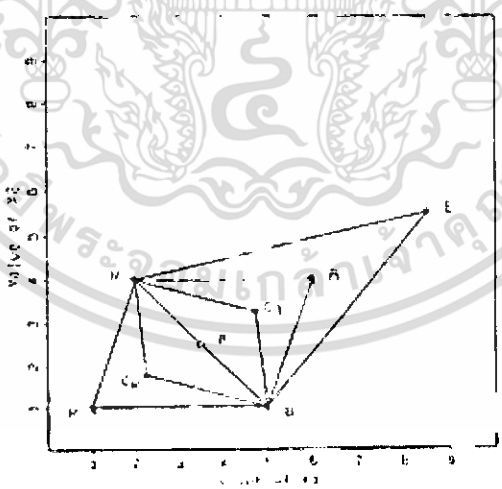
ซิมเพลกซ์คือรูปเรขาคณิตที่มีจำนวนของเหลี่ยมเท่ากับจำนวนที่มากกว่าจำนวนของปัจจัยหรือตัวแปรในการทดลองไปหนึ่ง เช่น หากในการทดลองประกอบด้วยปัจจัย 2 ชนิด เหลี่ยมของซิมเพลกซ์มีค่าเท่ากับ 3 และจำนวนชุดของการทดลองจะมีค่าเท่ากับ 3 ด้วย ดังรูปที่ 3 วัตถุประสงค์ของซิมเพลกซ์คือการผลักดันซิมเพลกซ์ให้เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่ให้การตอบสนองที่เหมาะสม โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่อย่างง่ายคือการเคลื่อนที่เข้าหาทิศทางที่ดีขึ้นและหนีออกจากทิศทางที่ไม่ดี วิธีซิมเพลกซ์นี้ได้ถูกเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกในปี 1962 (Spendley และคณะ, 1962) ซึ่งวิธีที่ถูกเสนอขึ้นนี้มีชื่อว่า ซิมเพลกซ์แบบขนาดคงที่ (fixed size simplex) แต่วิธีนี้มีข้อบกพร่องคือ หากจำนวนเหลี่ยมของซิมเพลกซ์มีมากขึ้นจะทำให้จุดที่เหมาะสมเห็นได้ไม่ชัดเจน เป็นวิธีไม่มีการเร่งทำให้ต้องใช้เวลาในการหาจุดที่เหมาะ สมอย่างหยาบๆ ก่อน แล้วจึงค่อยหาจุดที่เหมาะสมอย่างละเอียดใหม่อีกครั้งหนึ่งและซิมเพลกซ์อาจมีการเคลื่อนที่ไปในทิศทางที่ผิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 ลักษณะของซิมเพลกซ์ในการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัย 2 ชนิด
ที่มา: กรกฎ วิเศษไชยศรี, 2540

ดังนั้นจึงได้มีผู้ศึกษาและปรับปรุงวิธีซิมเพลกซ์แบบเดิมนี้ ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเพิ่มการขยาย (expansion) และการหดเข้ามา (contraction) เรียกวิธีซิมเพลกซ์แบบใหม่ที่ได้รับการปรับปรุงนี้ว่า ซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผัน (variable size simplex หรือ modified simplex) (Nelder และคณะ, 1965) ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ลักษณะซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผัน
ที่มา: กรกฎ วิเศษไชยศรี, 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผันนั้นมีลักษณะการเคลื่อนที่ดังนี้ เมื่อพิจารณาจากรูปซิมเพลกซ์ BNW พบว่าชุดสภาวะการทดลอง B ให้การตอบสนองดีที่สุด (best) W ให้การตอบสนองที่ต่ำที่สุด (worst) และ N ให้การตอบสนองที่ต่ำรองลงมา (next to the worst) ส่วนจุด P เป็นจุดกึ่งกลางของหน้าที่เหลือเมื่อชุดสภาวะการทดลอง ที่ให้การตอบสนองต่ำที่สุดถูกตัดทิ้งไป ดังนั้น P จึงเป็นจุดกึ่งกลางของเส้น BN การสะท้อนของเส้น W ข้ามเส้น BN โดยขยายส่วน WP ต่อจากจุด P ไปด้วยระยะทางเท่ากับ WP จะให้ชุดสภาวะการทดลอง อันใหม่เป็นชุดสภาวะการทดลอง R ซึ่งมีสมการเป็น

$$R = P + (P - W)$$

ซึ่งชุดสภาวะการทดลอง R ที่ได้มีความเป็นไปได้ 3 อย่างที่จะได้การตอบสนองต่อไปนี้

1. การตอบสนองที่ R สูงกว่าการตอบสนองของ B ดังนั้นจึงต้องพยายามขยายส่วน WR ออกไปให้ยาวขึ้นเพราะเกิดจากแนวคิดที่ว่าอาจได้การตอบสนองที่ดีขึ้น จึงได้ชุดสภาวะการทดลองใหม่เป็นชุดสภาวะการทดลอง E (expansion)

$$E = P + \gamma (P - W)$$

โดยที่ γ เป็นสัมประสิทธิ์ของการขยาย ($\gamma > 1$ แต่โดยทั่วไปจะใช้ 2.0) ซึ่งจะบ่งบอกถึงความยาวที่ส่วน PR ขยายไปเป็นกี่เท่าของ PR เดิม ถ้าหากการตอบสนองที่ E สูงกว่าการตอบสนองที่ B จะเอาเข้าไปอยู่ในซิมเพลกซ์ใหม่ BNE แต่ถ้าหากว่า E ไม่ได้สูงกว่า B แสดงว่าการขยายล้มเหลวและจะใช้ BNR เป็นซิมเพลกซ์ใหม่แทน

2. ถ้าการตอบสนองของ R อยู่ระหว่าง B และ N ไม่จำเป็นที่จะต้องทำการขยายหรือการหดแต่ให้ใช้ซิมเพลกซ์ใหม่เป็น BNR เลย

3. ถ้าการตอบสนองของ R ให้ผลต่ำกว่าการตอบสนองของ N แสดงว่าซิมเพลกซ์เคลื่อนที่ไปในทิศทางที่ผิดจึงต้องหดสั้นเข้ามา (contraction) ซึ่งจะได้ซิมเพลกซ์ที่เป็นไปได้ 2 แบบคือ

3.1 ถ้าการตอบสนองของ R ต่ำกว่าของ N แต่ไม่ต่ำกว่า W ซิมเพลกซ์อันใหม่ควรจะใกล้ R มากกว่า W

$$Cr = P + \beta (P - W)$$

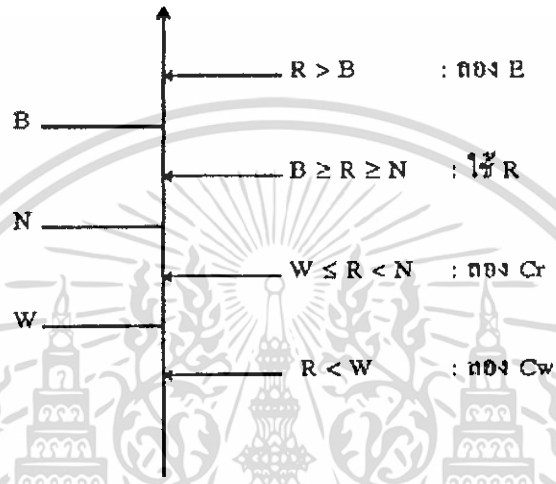
เมื่อ β เป็นสัมประสิทธิ์ของการหด ($0 < \beta < 1$ แต่โดยทั่วไปจะใช้ 0.5) และจะได้ซิมเพลกซ์ใหม่เป็น BNCr

3.2 ถ้าการตอบสนองของ R ต่ำกว่าของ W ซิมเพลกซ์อันใหม่ควรจะใกล้ W มากกว่า Rและจะได้ซิมเพลกซ์อันใหม่เป็น BNCw

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$Cw = P - \beta (P - W)$$

การหดที่ล้มเหลวจะเกิดขึ้นเมื่อ Cr ให้การตอบสนองต่ำกว่า R หรือ Cw ให้การตอบสนองต่ำกว่า W ดังนั้นจึงต้องกลับไปใช้ซิมเพลกซ์ใหม่เป็น BNR ตรรกของการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์ที่เป็นไปได้ในวิธีการซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผันแสดงได้ดังรูปที่ 5 ซิมเพลกซ์จะหยุดเมื่อขนาดการเคลื่อนที่เล็กลงกว่าซิมเพลกซ์ก่อนๆ



รูปที่ 5 ตรรกการเคลื่อนที่ที่เป็นไปได้สำหรับซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผัน
ที่มา: กรกฎ วิเศษไชยศรี, 2540

ลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์

วิธีการซิมเพลกซ์นี้แม้ว่าจะมีผู้เสนอขึ้นมาหลายปีแล้ว แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก เนื่องจากวิธีการหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้งยังคงเป็นที่นิยม อีกทั้งในปัจจุบันได้มีผู้เสนอทฤษฎีการหาสภาวะเหมาะสมใหม่ๆ ขึ้นมาอย่างแพร่หลาย แต่วิธีที่เสนอมานั้นส่วนใหญ่ต้องอาศัยการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์หรือสูตรคำนวณที่ซับซ้อน ในขณะที่วิธีซิมเพลกซ์นั้นใช้เพียงการคำนวณง่ายๆ และใช้ความรู้ทางเรขาคณิตมาใช้ในการอธิบายจึงทำให้สามารถเข้าใจได้ง่ายและคำนวณได้ด้วยมือ นอกจากนี้มีแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปเพื่อช่วยในการคำนวณให้ง่ายขึ้นซึ่งลักษณะของแผ่นงานซิมเพลกซ์แสดงในรูปที่ 6

แผ่นงานซิมเพลกซ์นี้ใช้ได้ง่ายเพียงแค่นำชุดสภาวะการทดลองที่มีจำนวน k+1 ชุด เมื่อ k คือจำนวนตัวแปรและได้กำหนดหมายเลขชุดสภาวะการทดลอง (vertex number) ไว้มาจัดเรียงลำดับตามค่าการตอบสนองจากสูงสุดไปยังต่ำสุด ใส่ชุดสภาวะการทดลองแต่ละชุดที่มีอันดับของการตอบสนองจากที่สูงที่สุด (B) ไปยังต่ำที่สุดรองลงมา (N) ลงไปในช่อง vertexes และใส่ชุดสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72612

การทดลองที่ให้การตอบสนองต่ำสุดจะใส่ลงในช่อง W พร้อมกับใส่การตอบสนองของแต่ละชุดสภาวะการทดลองลงในช่อง Response นำค่าของตัวแปรแต่ละชนิดในทุกๆ ชุดสภาวะการทดลองที่อยู่ในช่อง vertexes (ไม่รวม W) มาหาผลรวมใส่ลงในช่อง $\sum$ แล้วหารด้วยจำนวนการตอบสนอง (k) ซึ่งเท่ากับจำนวนชุดสภาวะการทดลองและเท่ากับจำนวนตัวแปร ใส่ผลลัพธ์ในช่อง P ซึ่งจะเป็นจุดกึ่งกลางของหน้า นำค่า P ไปลบด้วยค่า W ของตัวแปรแต่ละชนิดแล้วใส่ลงในช่อง (P-W) จากนั้นนำไปหาค่า R ซึ่งจะเป็นชุดสภาวะการทดลองอันใหม่เพื่อให้ได้มาซึ่งซิมเพลกซ์ใหม่โดย R = P+(P-W) จากค่า R ที่ได้ถ้าใช้ซิมเพลกซ์แบบแปรผันให้ทำตามกฎดังนี้คือ

1.จัดอับดับของซิมเพลกซ์แรกลงในแผ่นงาน โดยเรียงลำดับการตอบสนองจากสูงที่สุดไปยังต่ำที่สุด ใส่ชุดสภาวะการทดลองที่น้อยที่สุดลงในแถว W

2. คำนวณและประเมินค่า R

2.1 ถ้า $N \leq R \leq B$ ใช้ซิมเพลกซ์ BNR แล้วไปยังข้อ3

2.2 ถ้า $R > B$ คำนวณแล้วหา E

2.2.1 ถ้า $E \geq B$ ใช้ซิมเพลกซ์ BNE แล้วไปยังข้อ 3

2.2.2 ถ้า $E < B$ ใช้ซิมเพลกซ์ BNR แล้วไปยังข้อ 3

2.3 ถ้า $R < N$

2.3.1 ถ้า $R \geq W$ คำนวณและประเมินค่า Cr ใช้ซิมเพลกซ์ BNCr แล้วไปยังข้อ 3

2.3.2 ถ้า $R < W$ คำนวณและประเมินค่า Cw ใช้ซิมเพลกซ์ BNCw แล้วไปยังข้อ3

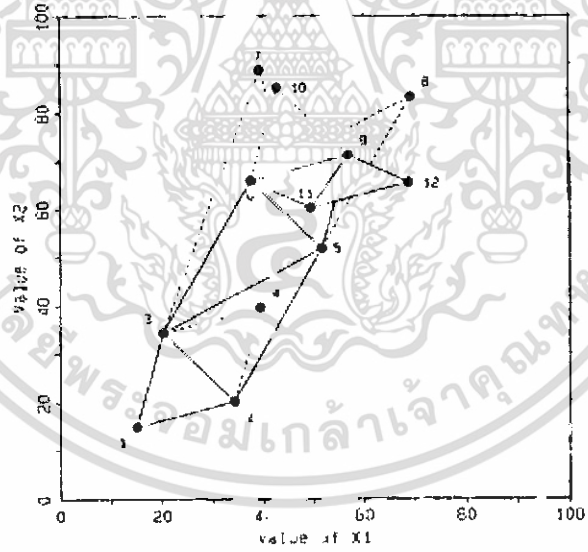
3. จะไม่นำค่าในแถว W ปัจจุบันไปใส่ในแผ่นงานอันถัดไป แต่จะนำแถว N ในแผ่นงานปัจจุบันไปใส่ในแถว W ของแผ่นงานอันถัดไป แล้วจัดอันดับของชุดสภาวะการทดลองตามลำดับการตอบสนองในแผ่นงานอันใหม่ แล้วทำต่อในข้อ 2

โดยจะได้ว่าลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์จะมีรูปลักษณะการเคลื่อนที่ไปในทิศทางต่างๆ กัน รูปที่ 7 แสดงถึงทิศทางการเคลื่อนที่เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมจากวิธีซิมเพลกซ์ ส่วนลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์แบบขนาดคงที่ (BNR) และลักษณะการเคลื่อนที่แบบขนาดแปรผันที่เกิดขึ้น สามารถแสดงทิศทางการเคลื่อนที่ได้ในรูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

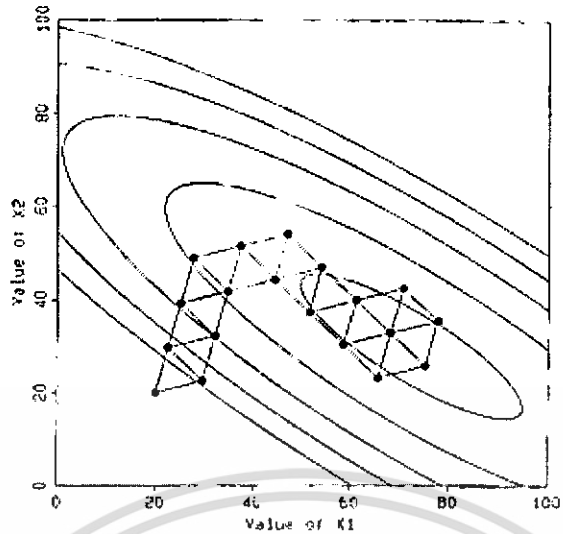
Simplex No.	Factor					
	x_2	x_1	x_3	Response	Rank	Vertex no.
Vertices					B	
					...	
					N	
Σ						
$P = \Sigma_A$						
W					W	
(P - W)						
R = P + (P - W)					R	
(P - W)/2						
Cw = P - (P - W)/2					Cw	
Cr = P + (P - W)/2					Cr	
E = R + (P - W)					E	

รูปที่ 6 แผ่นงานซิมเพลกซ์สำหรับซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผันและ 3 ตัวแปร
ที่มา: กรกฎ วิเศษไชยศรี, 2540



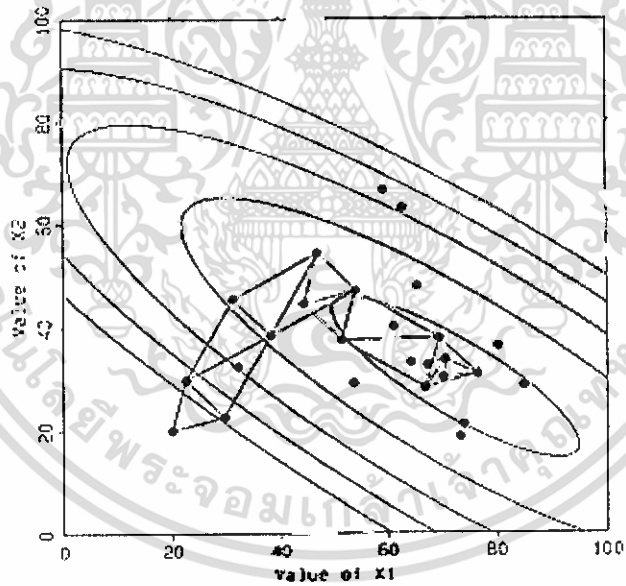
รูปที่ 7 ลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์
ที่มา: Frederick และคณะ, 1991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 ลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์แบบขนาดคงที่

ที่มา: Frederick และคณะ, 1991



รูปที่ 9 ลักษณะการเคลื่อนที่ของซิมเพลกซ์แบบขนาดแปรผัน

ที่มา: Frederick และคณะ, 1991

2.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาพบว่าได้มีผู้นำเอาวิธีซิมเพลกซ์มาประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมกับงานด้านต่างๆ หลายประเภทโดยเฉพาะงานวิจัยทางด้านเคมี สำหรับงานวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาได้เริ่มมีการนำเอาวิธีซิมเพลกซ์มาประยุกต์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lawitts และคณะ (1991) ได้นำวิธีซิมเพลกซ์มาประยุกต์ใช้ในการหาส่วนประกอบที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเอมบริโอของหนูโดยเน้นศึกษาส่วนประกอบ 4 ชนิดคือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ไพรูเวต (pyruvate) โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และกลูโคส (glucose) ซึ่งจากการทดลองพบว่าโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมีส่วนช่วยเพิ่มการพัฒนาของเอมบริโอขึ้นเป็นอย่างมากโดยมีเอมบริโอถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเซลล์มากกว่า 4 เซลล์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงต่อมาในวันที่ 5 พบว่ามีเอมบริโอถึง 53 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการพัฒนาไปเป็นบลาสโทซิส (blastocysts) นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเอมบริโอทั้ง 4 ชนิดที่หาได้จากการนำวิธีซิมเพลกซ์มาประยุกต์ใช้พบว่าอาหาร 3 ชนิดจาก 4 ชนิดนั้นมีผลให้เอมบริโอ 90 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่ามีการเจริญของเซลล์มากกว่า 4 เซลล์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและในวันที่ 5 นั้นมีเอมบริโอประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถพัฒนาไปเป็นบลาสโทซิสได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าวิธีซิมเพลกซ์นี้มีส่วนช่วยในการพัฒนาอาหารเลี้ยงเอมบริโอให้มีประสิทธิภาพมากกว่า ซึ่งส่งผลให้การเลี้ยงเอมบริโอในหลอดทดลองได้รับการพัฒนาตามไปด้วย

Kolossváry (1996) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Rhizopus sp.* โดยการประยุกต์ใช้วิธีซิมเพลกซ์และเปรียบเทียบกับวิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้ง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของ gum arabic และความเข้มข้นของ sodium taurocholate ในการทดลองนี้ใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นพบว่า สภาวะที่เหมาะสมจากการใช้วิธีซิมเพลกซ์คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.3 ความเข้มข้นของ gum arabic เท่ากับ 41.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของ sodium taurocholate เท่ากับ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 17.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้งพบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 ความเข้มข้นของ gum arabic เท่ากับ 26.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของ sodium taurocholate เท่ากับ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าเท่ากับ 8.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จากผลการทดลองพบว่าการหาสภาวะเหมาะสมด้วยวิธีซิมเพลกซ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากกว่าการใช้วิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้ง

Paquette และคณะ (1986) ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* โดยปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสารเคมี 2 ชนิดคือ β-naphthyl caprylate และ sodium taurochoalate แต่การศึกษาของ Paqutte นี้มีลักษณะที่แตกต่างจากผู้อื่นคือได้นำเอา Sharp PC-1500A computer เข้ามาประยุกต์ซึ่งวิธีนี้ถูกเรียกว่า ซูปเปอร์ซิมเพลกซ์ (super simplex) โดยนำเอาผลที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มาเปรียบเทียบกับการคำนวณแบบธรรมดาพบว่าเมื่อใช้วิธีซิมเพลกซ์แบบธรรมดาสามารถหาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ 32.9 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่อคำนวณจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์แล้วพบว่าการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 53 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gough และคณะ (1996) ได้ศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมของสารอาหารที่เติมลงไปในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* IMB3 ได้นำวิธี Nelder และ Mead simplex optimization method เข้ามาประยุกต์ใช้เพิ่มปริมาณที่เหมาะสมของสารอาหาร โดยชนิดของสารอาหารได้แก่ แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียมและน้ำมันลินซีด จากผลการทดลองพบว่าปริมาณที่เหมาะสมของสารอาหารแต่ละชนิดคือ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 0.576 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเท่ากับ 0.288 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำมันลินซีดเท่ากับ 8.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แต่โซเดียมจะไม่มีต่อการผลิตเอทานอล

กรกฎ (2540) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยใช้วิธีซิมเพลกซ์พบว่า สภาวะที่เหมาะสมอยู่ที่เวอร์เทกซ์ที่ 10 ที่ใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.74 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตรของตัวทำละลายผสม 86.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายผสม 41.27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส และเวลา 40 นาที ได้ปริมาณกรดไขมันสูงที่สุด 3.384 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 1 กรัม

Tinoi และคณะ (2005) ได้นำวิธีซิมเพลกซ์มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารคาโรทีนอยด์จาก *Rhodotorula glutinis* โดยใช้สารสกัดจากน้ำทิ้งถั่วเขียวที่ได้จากการผลิตวุ้นเส้นและสารสกัดจากมันเทศเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนตามลำดับ และเปรียบเทียบการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารคาโรทีนอยด์ ด้วยวิธี one-factor-at-a-time (หนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้ง) และวิธีซิมเพลกซ์ (simplex optimization) พบว่าปริมาณสารคาโรทีนอยด์ที่ผลิตภายใต้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากวิธีซิมเพลกซ์นั้นเท่ากับ 3.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าการใช้วิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้งที่ผลิตสารคาโรทีนอยด์ได้ 2.89 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าน้อยกว่าถึง 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้วิธีซิมเพลกซ์จะใช้จำนวนการทดลองน้อยกว่าประมาณ 23 การทดลอง ส่วนวิธีหนึ่งตัวแปรต่อหนึ่งครั้งจะใช้จำนวนการทดลองมากกว่าถึง 62 การทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเชื้อ *B. circulans* ถูกเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 3 สัปดาห์

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัท
เบเกอร์ยีสต์	เอส.เอ.เลซาฟ
Nutrient agar	Scharlau
Nutrient broth	Scharlau
Yeast nitrogen base	Difco Laboratories

3.2.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัท
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	J.T Baker
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	Carlu erba reagenti
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Carlu erba reagenti
โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_3)	Carlu erba reagenti
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	VWR Internation. Ltd
น้ำตาลกลูโคส	Carlu erba reagenti
โปแตสเซียมทาร์เทรต	Carlu erba reagenti
ฟีนอล	Carlu erba reagenti
ลามินาริน (laminarin)	Fluka

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัท
กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง	Olympus optical
เครื่องเขย่าผสม	Scientific industries, Inc.
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Scientific Promotion
เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Mettler-Todedo, Thailand
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง	United Instrument
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Shimadzu
เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น	Hermle Labortech
ตู้บ่ม	Memmert
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply
ตู้อบลมร้อน	Sheldon Manufacturing, Inc
ไมโครปิเปต	Brand
หม้อนึ่งความดัน	Tomy-seiko
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	United Instrument
เครื่องแก้ว	Pyrex

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

3.4.1.1 การเตรียมอาหารสำหรับหัวเชื้อ

อาหารสำหรับหัวเชื้อสามารถเตรียมได้โดยชั่ง Nutrient broth สำเร็จรูป 1.3 กรัม และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลายให้เข้ากัน และตวงใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด แล้วนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ (pre-culture)

เมื่อเตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงตามข้อ 3.4.1.1 ทำการเขี่ยเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ที่ได้ในอาหารวุ้นเอียง 1 ลูปเต็ม (1 loop full) ลงอาหาร Nutrient broth แล้วจึงนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4.1.3 การเตรียมผนังเซลล์ยีสต์ (Preparation of baker's yeast cell wall) (Fleet และคณะ, 1974)

นำผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์มาบดด้วยเครื่องโฮโมจีไนส์ (Homogenize) จากนั้นนำผนังเซลล์ยีสต์ที่บดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อล้างผนังเซลล์ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความบริสุทธิ์ แล้วนำไปทำให้อยู่ในรูปของไลโอฟิไลซ์ (lyophilize) และนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

3.4.1.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนส สามารถเตรียมได้โดยชั่ง Yeast nitrogen base ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นเติมผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ที่เตรียมไว้ (Baker's yeast cell wall) ละลายให้เข้ากัน จากนั้นใส่อาหารลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด แล้วนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2 การหาปริมาณเซลล์โดยวิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค pour plate

เตรียมสารละลายเชื้อ (cell suspension) ที่ความเจือจางช่วง 10^{-1} – 10^{-7} โดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 ไมโครลิตร เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9,990 ไมโครลิตรแล้วทำการเจือจางไปจนถึงความเจือจางช่วง 10^{-7} ปิเปตสารละลายเชื้อที่มีความเจือจางช่วง 10^{-4} – 10^{-7} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ปริมาตรจานละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทอาหาร nutrient agar ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อแล้วหมุนวนจานเพาะเชื้อไปมาเพื่อให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง ต่อมาจึงคว่ำจานเพาะเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ในจานที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี บันทึกผลการทดลอง และคำนวณโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

การคำนวณหาจำนวนโคโลนีของเชื้อ มีหน่วยเป็น CFU/mL โดยที่

จำนวนโคโลนีของเชื้อ (CFU/mL) = จำนวนโคโลนี x ส่วนกลับของ dilution factor

3.4.3 การวัดปริมาณและการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

3.4.3.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (Miller, 1959)

สารละลายลามินาริน ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์

ละลายลามินาริน 10 กรัม ในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0 เตรียมได้โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม stock solutions

สารละลาย A สารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

เตรียมโดยปิเปตสารละลายกรดซิตริกเข้มข้นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

สารละลาย B สารละลายโซเดียมอะซิเตรทเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

เตรียมได้โดยการชั่งโซเดียมอะซิเตรท 29.41 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรท

เตรียมโดยตวง stock สาร A ปริมาตร 20.5 มิลลิลิตรด้วยกระบอกตวงใส่ลงในบีกเกอร์ที่เตรียมไว้จากนั้นตวง stock สาร B ปริมาตร 29.5 เทใส่ลงไปในบีกเกอร์ที่มี stock สาร A อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0

สารละลาย 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5 dinitrosalicylic acid)

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 1,500 มิลลิลิตร) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆ เติมโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต 200 กรัม เติมฟีนอล 0.2 กรัม และโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_3) 0.5 กรัม (Miller,1959) โดยค่อยๆ ละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงค่อยเติมสารเคมีตัวต่อไปตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยอบน้ำตาลกลูโคสที่ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร ซึ่งสารละลายนี้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.3.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (Leelasuphakul และคณะ, 2005)

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี 0.45 มิลลิลิตรของสารละลายลามินาริน (laminalin) 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0 จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นปิเปตสารละลาย 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที และปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเขย่าให้กัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วไปหาค่าน้ำตาลกลูโคสเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยวัดเป็นอัตราการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์นี้ ซึ่งวิธีการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ คือ วิธี dinitrosalicylic (DNS) (Miller,1959)

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ มีหน่วยเป็น ยูนิต โดยที่

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส} \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ (มล)}}$$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาของการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

3.4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยวิธีซิมเพลกซ์

3.4.4.1 การกำหนดขอบเขตของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส

จากการทดลองได้วางแผนการทดลองโดยกำหนดปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 คือ ปริมาณของผนังเซลล์เบเกอร์ยีสต์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเร็วรอบในการเขย่า และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และได้กำหนดค่าในการตรวจวัดผลที่เกิดขึ้นจากการทดลอง คือการหาปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 และการหาปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ในสภาวะที่แตกต่างกัน ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีซิมเพลกซ์จึงได้กำหนดขอบเขตของสภาวะการทดลองสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยสภาวะการทดลองได้กำหนดไว้ดังนี้ ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์อยู่ในช่วง 0-72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 23-50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างมีค่าในช่วง 4-10 ความเร็วรอบในการเขย่า 100-230 รอบต่อนาที และปริมาณของผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (Baker's yeast cell wall) อยู่ในช่วง 0.10-0.21 กรัมต่อ 30 มิลลิลิตร (0.33-0.66 เปอร์เซ็นต์) สามารถวางแผนการทดลองได้ ดังแสดงในตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงสภาวะเริ่มต้นสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 เพื่อเข้าสู่กระบวนการหาสภาวะที่เหมาะสมแบบวิธีซิมเพลกซ์

ชุดสภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (g)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการเลี้ยง (ชม.)	ปริมาณของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)
1	0.14	33	4.0	170	12		
2	0.13	40	4.5	110	30		
3	0.10	35	6.0	150	50		
4	0.17	25	6.5	165	24		
5	0.15	37	7.0	210	48		
6	0.20	30	5.0	120	36		

จากตารางที่ 4 เมื่อทำการทดลองตามการทดลองเริ่มต้น 6 การทดลอง ตามที่ได้วางแผนในตารางที่ 4 ผลการทดลองที่เกิดขึ้นจะนำไปคำนวณหาและวิเคราะห์ เพื่อหาสภาวะใหม่ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ต่อไป ซึ่งสภาวะใหม่ที่เกิดขึ้นจากการคำนวณจะแสดงในแผ่นงานซิมเพลกซ์ ดังแสดงในตารางที่ 5

3.4.5 การศึกษาคุณสมบัติและความเสถียรของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

3.4.5.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

ในการศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์กลูคาเนสลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายลามินารินในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างกัน คือ 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 และ 8.0 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น

3.4.5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส ทำการนำสารสกัดเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นอย่างเหมาะสมทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการวิเคราะห์ที่กล่าวไว้ข้างต้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลการคำนวณและวิเคราะห์เพื่อหาสภาวะใหม่ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากวิธีซิมเพลกซ์

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ .....

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (g)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการเลี้ยง(hr.)	ปริมาณของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
	0.14	33	4.0	170	12				
	0.13	40	4.5	110	30				
	0.10	35	6.0	150	50				
	0.17	25	6.5	165	24				
	0.15	37	7.0	210	48				
	0.20	30	5.0	120	36				
Σ									
$P = \Sigma/k$									
W									
(P-W)									
R = P + (P-W)									
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504 โดยใช้วิธีซิมเพลกซ์

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส (glucanase) จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยใช้วิธีซิมเพลกซ์ (Simplex optimization) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสให้มากที่สุด โดยได้มีการกำหนดตัวแปรที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส 5 ตัวแปรคือ ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (Baker's yeast cell wall) อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ความเร็วรอบในการเขย่า และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และศึกษาค่าการตอบสนองของตัวแปรคือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (glucanase activity) หรือปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้และปริมาณเซลล์ของ *B. circulans* JMC 2504 และทำการทดลองตามสภาวะที่กำหนดเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสให้ได้มากที่สุด โดยการคำนวณหาสภาวะการทดลองจะเป็นไปตามหลักการของซิมเพลกซ์คือ จากหลักการของวิธีซิมเพลกซ์ เมื่อนำชุดสภาวะการทดลองใหม่ที่ได้ไปทำการเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 เพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนส จากนั้นหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้แล้วนำค่าที่ได้ไปพิจารณาตามหลักการของวิธีซิมเพลกซ์ดังนี้ คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีค่าอยู่ระหว่างค่าการทำงานของเอนไซม์ที่สูงที่สุด (อันดับB) กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่รองจากค่าที่ต่ำที่สุด (อันดับ N) สามารถนำมาใช้เป็นสภาวะการทดลองพื้นฐานเพื่อคำนวณหาค่าสภาวะการทดลองชุดใหม่ และทำการจัดเรียงลำดับสภาวะการทดลองในแผ่นงานซิมเพลกซ์ใหม่ โดยซิมเพลกซ์ใหม่ที่คำนวณได้จะเป็นซิมเพลกซ์แบบปกติเรียกว่า R ดังแสดงในแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูป และเมื่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีค่ามากกว่าค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์กลูคาเนส (อันดับ B) พบว่ามีการตอบสนองต่อสภาวะการทดลองที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสไปในทิศทางที่ดีขึ้น ดังนั้นสามารถคำนวณหาค่าสภาวะการทดลองใหม่โดยใช้เป็นสภาวะการทดลองที่เป็นแบบขยายเรียกว่า E (Expansion) ได้ ส่วนซิมเพลกซ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์หรือค่าการตอบสนองเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่าการตอบ สนองของอันดับ N (ค่าตอบสนองรองจากค่าที่ต่ำที่สุด) แต่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุด (อันดับ W) พบว่าสภาวะการทดลองใหม่จะเป็นแบบ C_r ซึ่งเป็นลักษณะของซิมเพลกซ์ที่หดสั้นเข้าครึ่งหนึ่งของซิมเพลกซ์ปกติ และเป็นซิมเพลกซ์ที่จัดว่าเข้าใกล้ค่าซิมเพลกซ์ปกติ (R) และถ้าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสให้ค่าที่ต่ำกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุด แสดงว่าซิมเพลกซ์ที่เกิดขึ้นจะเข้าใกล้ซิมเพลกซ์แบบ C_w และจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากหลักการของวิธีซิมเพลกซ์จะได้ว่า สภาวะการทดลองเริ่มต้นในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส ที่มีการกำหนดตัวแปรทั้งหมด 5 ตัวแปร จะได้สภาวะสำหรับการทดลองเริ่มต้นของวิธีซิมเพลกซ์ ทั้งหมด 6 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5 และเมื่อได้ทำการทดลองเริ่มต้นตามสภาวะดังกล่าวแล้ว พบว่าแต่ละสภาวะการทดลองให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องทำการเรียงลำดับสภาวะการทดลองตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสจากค่ามากที่สุดไปค่าน้อยที่สุด เพื่อความสะดวกในการนำค่าต่างๆ ที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูป ดังแสดงในตารางที่6

ตารางที่ 6 แผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปที่แสดงสภาวะการทดลองเริ่มต้นในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	B	6
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	...	4
	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	...	3
	0.13	40	4.5	110	30	9.17×10^{16}	0.048	N	2
Σ									
P = Σ/k									
W	0.14	33	4.0	170	12	8.25×10^{16}	0.021	W	1
(P-W)									
R = P + (P-W)									
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

จากตารางที่ 6 แสดงถึงสภาวะการทดลองเริ่มต้นและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 พบว่า สภาวะการทดลองหรือเวอร์เทกซ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ ชุดสภาวะการทดลองที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.161 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสรองลงมาคือ ชุดสภาวะการทดลองที่ 5, 4, 3 และ 2 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสเท่ากับ 0.118, 0.107, 0.091 และ 0.048 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ชุดสภาวะการทดลองที่ 1พบว่ามีค่าต่ำสุดคือ 0.021 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับปริมาณของเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 พบว่าชุดสภาวะการทดลองที่ 6 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.48×10^{17} CFU/mL และสภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสรองลงมาคือ ชุดสภาวะการทดลองที่ 5, 4, 3 และ 2 จะมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.32×10^{17}, 1.12×10^{17}, 9.50×10^{16} และ 9.17×10^{16} CFU/mL ส่วนที่สภาวะการทดลองซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุดจะมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.25×10^{16} CFU/mL

จากแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูป (ตารางที่ 6) ได้ทำการคำนวณตามวิธีการคำนวณดังแสดงในแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูป เพื่อหาค่าสภาวะการทดลองชุดต่อไป โดยพบว่าสภาวะการทดลองใหม่ที่ต้องทำการทดลอง คือสภาวะสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสที่อุณหภูมิ 33.8 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 7.6 ความเร็วรอบในการเขย่า 130 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 63.2 ชั่วโมง และปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ที่ใช้เท่ากับ 0.16 กรัมต่ออาหาร 30 มิลลิลิตร (0.53 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งได้แสดงในตารางที่ 7 จากนั้นได้ทำการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ตามสภาวะดังกล่าวและนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.073 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ได้นี้มีค่าน้อยกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสในชุดสภาวะการทดลองที่ 6 หรืออันดับ B (0.161 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสในชุดสภาวะการทดลองที่ 2 หรืออันดับ N ซึ่งเป็นค่าที่รองจากค่าที่ต่ำที่สุด (0.048 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากหลักการของวิธีซิมเพลกซ์จะได้ว่าค่าสภาวะการทดลองใหม่สามารถนำมาใช้เป็นค่าพื้นฐานในการคำนวณหาค่าสภาวะการทดลองใหม่ซึ่งเป็นแบบปกติ (R) ดังนั้นจึงได้นำมาแทนที่โดยได้จัดให้อยู่ในอันดับ N (ค่าตอบสนองรองจากค่าที่ต่ำที่สุด) และทำการเรียงลำดับสภาวะการทดลองในแผ่นงานซิมเพลกซ์ใหม่ ดังแสดงในตารางที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปเพื่อหาสภาวะการทดลองชุดใหม่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 (แบบปกติ R)

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	B	6
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	...	4
	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	...	3
	0.13	40	4.5	110	30	9.17×10^{16}	0.048	N	2
Σ	0.75	167	29	750	188				
$P = \Sigma/k$	0.15	33.4	5.80	150	37.6				
W	0.14	33	4.0	170	12	8.25×10^{16}	0.021	W	1
(P-W)	0.01	0.4	1.80	-20	25.6				
R = P + (P-W)	0.16	33.8	7.6	130	63.2	1.79×10^{17}	0.073	R	7
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

ในแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปดังแสดงในตารางที่ 8 เมื่อจัดอันดับของสภาวะการทดลองตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสแล้ว จากนั้นทำการคำนวณตามวิธีการคำนวณในแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูป เพื่อหาค่าสภาวะการทดลองชุดต่อไป โดยพบว่าสภาวะการทดลองใหม่ที่ต้องศึกษาคือ อุณหภูมิ 24.3 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 8.34 ความเร็วรอบในการเขย่า 198 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 58.4 ชั่วโมง และปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์เท่ากับ 0.19 กรัมต่ออาหาร 30 มิลลิลิตร เมื่อทำการทดลองตามสภาวะดังกล่าว แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปวัดหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.119 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ได้นี้ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสอยู่ในระหว่างค่าในอันดับ B (ค่ามากที่สุด) (0.161 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในอันดับ N (ค่ารองจากค่าที่ต่ำที่สุด) (0.048 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ตามหลักการของซิมเพลกซ์สามารถแทนที่สภาวะเดิมด้วยสภาวะการทดลองใหม่ และทำการเรียงลำดับสภาวะการทดลองในแผ่นงานซิมเพลกซ์ใหม่ เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าสภาวะการทดลองใหม่ต่อไปได้ ดังแสดงในตารางที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปเพื่อหาสภาวะการทดลองชุดใหม่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	B	6
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	...	4
	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	...	3
	0.16	33.8	7.6	130	63.2	1.79×10^{17}	0.073	N	7
Σ	0.78	160.8	32.1	770	221.2				
$P = \Sigma/k$	0.16	32.2	6.42	154	44.2				
W	0.13	40	4.5	110	30	9.17×10^{16}	0.048	W	2
(P-W)	0.03	-7.8	1.92	44	14.2				
R = P + (P-W)	0.19	24.3	8.34	198	58.4	1.87×10^{17}	0.119	R	8
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

จากนั้นทำการคำนวณตามวิธีการคำนวณในแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูป เพื่อหาค่าสภาวะการทดลองชุดต่อไปจนกว่าจะได้ค่าการตอบสนองหรือค่ากิจกรรมของไซม์กลูคาเนสที่สูงที่สุดและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสคงที่ ซึ่งจากตารางซิมเพลกซ์สำเร็จรูปพบว่า สภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงสุดคือ ชุดสภาวะการทดลองที่ 9 และเมื่อทำการทดลองต่อไปเรื่อยๆ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสนั้นไม่มีการเพิ่มขึ้นแต่จะเริ่มมีความใกล้เคียงกันมากขึ้น จึงสามารถยุติการใช้ซิมเพลกซ์ได้ ซึ่งตารางซิมเพลกซ์สำเร็จรูปทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนั้น ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ค. (แสดงแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปที่ 1-9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงแผ่นงานซิมเพลกซ์สำเร็จรูปเพื่อหาสภาวะการทดลองชุดใหม่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (hr.)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	B	6
	0.19	24.3	8.34	198	58.4	1.87×10^{17}	0.119	...	8
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	...	4
	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	N	3
Σ	0.81	151.32	32.84	838	216.48				
$P = \Sigma/k$	0.16	30.3	6.57	168	43.30				
W	0.16	33.8	7.6	130	63.2	1.79×10^{17}	0.073	W	7
(P-W)	0	-3.5	-1.03	38	-19.9				
R = P + (P-W)	0.16	26.7	5.54	205	23.4	1.645×10^{17}	0.338	R	9
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)	0.16	23.2	4.51	243	3.5		-	E	-

จากการคำนวณหาสภาวะการทดลองในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยวิธีซิมเพลกซ์ พบว่าชุดสภาวะการทดลองที่ได้มีทั้งหมด 15 ชุดสภาวะการทดลอง (ดังแสดงในภาคผนวก ค.) จากนั้นได้ทำการรวบรวมชุดสภาวะการทดลองทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการคำนวณโดยวิธีซิมเพลกซ์มาไว้ในตารางที่ 10 ซึ่งเป็นตารางที่แสดงถึงค่าแปรผันของตัวแปรต่างๆ 5 ตัวแปร ตามสภาวะการทดลองที่คำนวณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 สภาวะการทดลองทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยวิธีซิมเพลกซ์

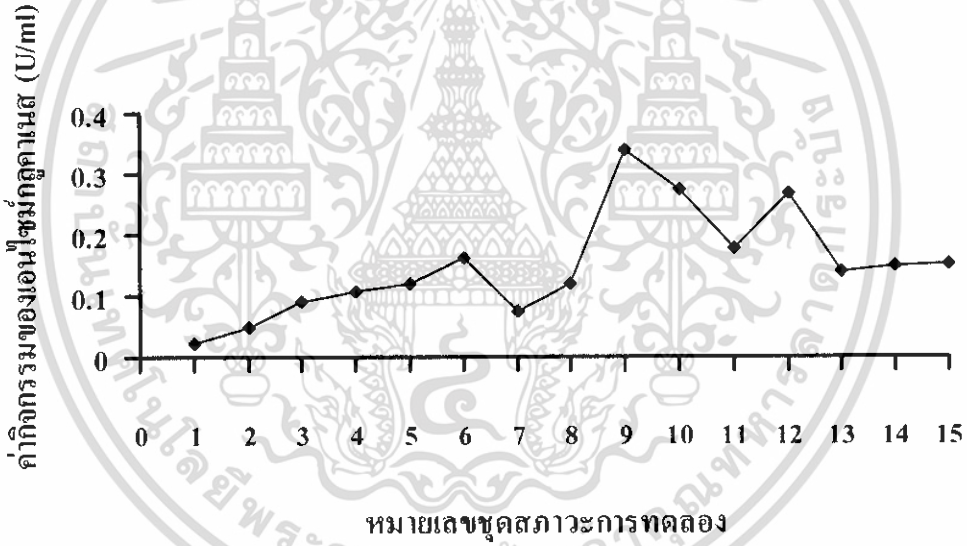
ชุดสภาวะการทดลอง	อันดับ	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (g)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (hr.)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)
1	I	0.14	33	4.0	170	12	0.021	8.25×10^{16}
2	I	0.13	40	4.5	110	30	0.048	9.17×10^{16}
3	I	0.10	35	6.0	150	50	0.091	9.50×10^{16}
4	I	0.17	25	6.5	160	24	0.107	1.12×10^{17}
5	I	0.15	37	7.0	210	48	0.118	1.32×10^{17}
6	I	0.20	30	5.0	120	36	0.161	1.48×10^{17}
7	R	0.16	33.8	7.6	130	63.2	0.073	1.79×10^{17}
8	R	0.19	24.3	8.34	198	58.4	0.119	1.87×10^{17}
9	R	0.16	26.7	5.54	205	23.4	0.338	1.645×10^{17}
10	Cr	0.20	25.4	6.72	193	31.9	0.274	2.38×10^{17}
11	R	0.19	32.4	6.54	210	55.1	0.177	9.50×10^{19}
12	Cr	0.21	23.1	6.14	173	37.4	0.268	2.08×10^{17}
13	R	0.19	30.7	3.64	162	15.1	0.140	1.54×10^{17}
14	R	0.17	35	4.84	183	27.2	0.150	4.8×10^{17}
15	Cw	0.185	30.3	4.68	172	24.9	0.152	2.3×10^{17}

หมายเหตุ ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์มีหน่วยเป็นกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มิลลิลิตร

จากตารางที่10 แสดงชุดสภาวะการทดลองทั้งหมดในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504โดยวิธีซิมเพลกซ์ จะเห็นได้ว่าชุดสภาวะการทดลองเริ่มต้นที่กำหนด 1-6 ให้การตอบสนองที่แตกต่างกัน โดยพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูคาเนสมีค่าอยู่ในช่วง 0.021-0.161 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองในสภาวะการทดลองที่ 7 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูคาเนสมีค่าน้อยลงแต่ไม่ต่ำกว่า 0.021 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงถือว่าอยู่ในหลักการของซิมเพลกซ์และพบว่าเมื่อทำการทดลองตามชุดสภาวะการทดลองที่ 9 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงที่สุด เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.338 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยต้องใช้ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ 0.16 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 26.7 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.54 ความเร็วรอบในการเขย่า 205 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 23.4 ชั่วโมง จากนั้นจะมีการเข้าสู่สภาวะสมดุลมีการเปลี่ยนแปลงของซิมเพลกซ์ลดลง โดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่คงที่และจะได้ว่าชุดสภาวะการทดลองที่ 9-12 พบว่าค่าตัวแปรมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือ ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ 0.16-0.21 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มิลลิลิตร อุณหภูมิอยู่ในช่วง 23-30°C ความเป็นกรดด่าง 5.0-6.7 ความเร็วรอบในการเขย่า 120-205 rpm ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 23-37 ชั่วโมง ส่วนปริมาณเชื้อที่เกิดขึ้นมีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาดังรูปที่ 11 โดยพบว่าบางชุดสภาวะการทดลองเชื้อมีการเจริญเติบโตมาก คือ พบปริมาณเซลล์สูงแต่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสน้อย เนื่องจากเป็นสภาวะที่เชื้อ *B. circulans* JMC 2504 มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้น และจากตารางที่ 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในชุดสภาวะการทดลองที่โดยวิธีซิมเพลกซ์สามารถแสดงไว้ดังรูปที่ 10

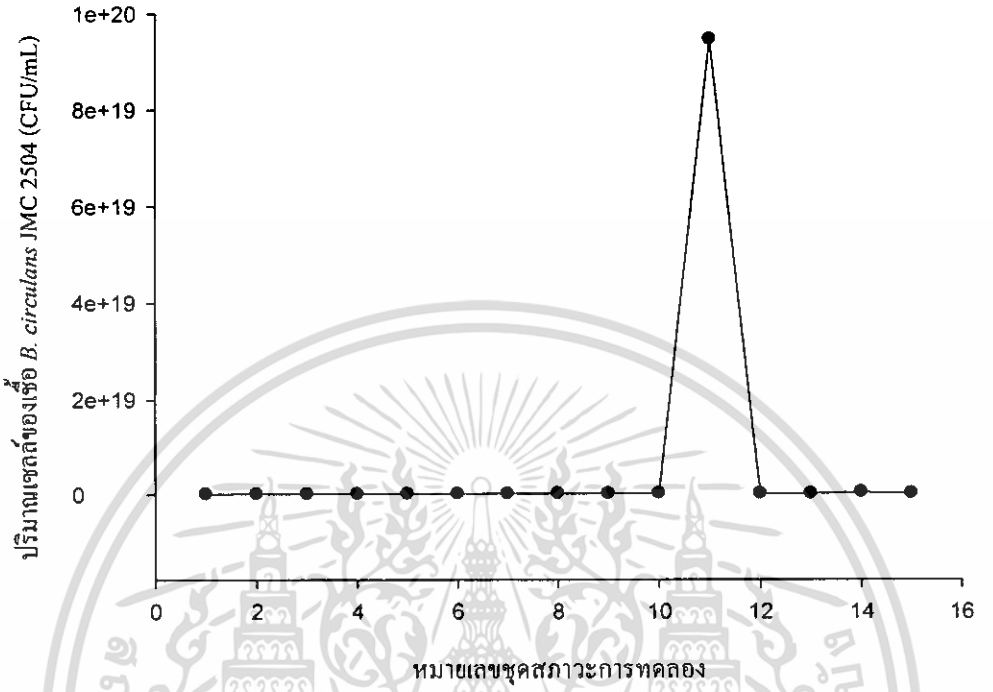


รูปที่ 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 เมื่อทำการทดลองในชุดสภาวะการทดลองโดยใช้วิธีซิมเพลกซ์

จากรูปที่ 10 จะเห็นว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อมีการดำเนินไปของซิมเพลกซ์ ชุดสภาวะการทดลองเพิ่มขึ้นจนถึงช่วงชุดสภาวะการทดลองที่ 7 ค่าที่ได้มีการลดลงหลังจากนั้น พบว่าการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.338 U/mL เมื่อดำเนินไปจนถึงชุดสภาวะการทดลองที่ 9 และจากวิธีการดำเนินงานไปของซิมเพลกซ์จะได้ว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสมีการเพิ่มขึ้นและลดลงเล็กน้อยเข้าสู่สภาวะคงที่ของซิมเพลกซ์ โดยในช่วงสุดท้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ชุดสภาวะการทดลองที่ 13-15) พบว่า การทำงานของซิมเพลกซ์มีค่าคงที่ เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่วัดได้มีค่าไม่ต่างกัน คือ 0.140, 0.150 และ0.152 ตามลำดับ

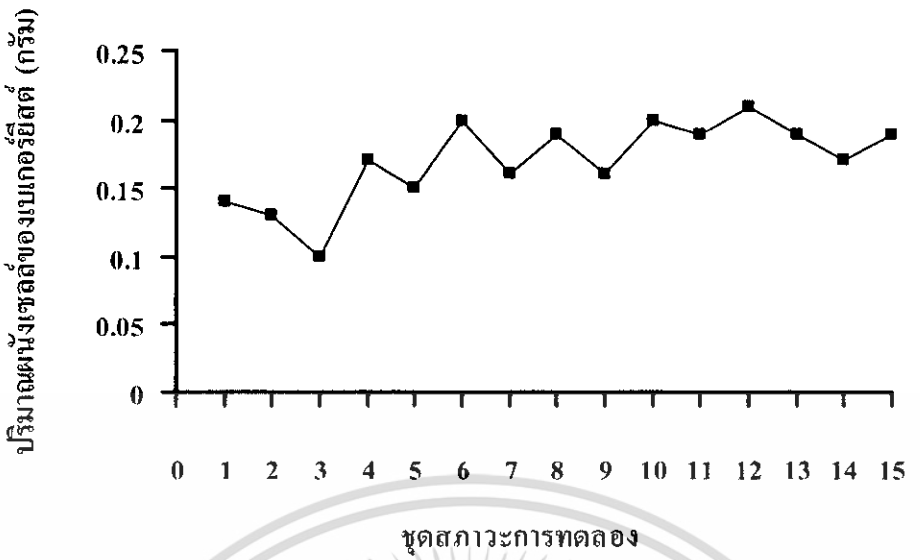


รูปที่ 11 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 เมื่อทำการทดลองในชุดสภาวะการทดลองโดยใช้วิธีซิมเพลกซ์

ขณะเดียวกันปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างใกล้เคียงกัน (ชุดสภาวะการทดลองที่ 1-8) ดังรูปที่ 11 เมื่อชุดสภาวะการทดลองมากขึ้นและมีปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 สูงสุดที่ชุดสภาวะการทดลองที่ 11 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.50×10^{19} CFU/mL โดยต้องใช้ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ 0.19 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 32.4 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.54 ความเร็วรอบในการเขย่า 210 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 55.1 ชั่วโมง และค่าการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส เท่ากับ 0.177 U/mL ซึ่งไม่ใช่ค่าการตอบสนองที่สูงสุด หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อจุลินทรีย์ใช้สารตั้งต้นแล้วมีการเจริญเติบโตและจะผลิตเอนไซม์ออกมาด้วย แต่ไม่จำเป็นว่าถ้ามีปริมาณเซลล์มากจะผลิตเอนไซม์ได้มากตามไปด้วย

จากตารางที่ 10 พบว่าตัวแปรต่างๆ ทั้ง 5 ตัวแปรที่ได้ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส จะได้ว่าแต่ละตัวแปรมีการแปรผันเกิดขึ้นได้ในรูปแบบที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงได้นำตัวแปรต่างๆ มาแสดงถึงการดำเนินไปของการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

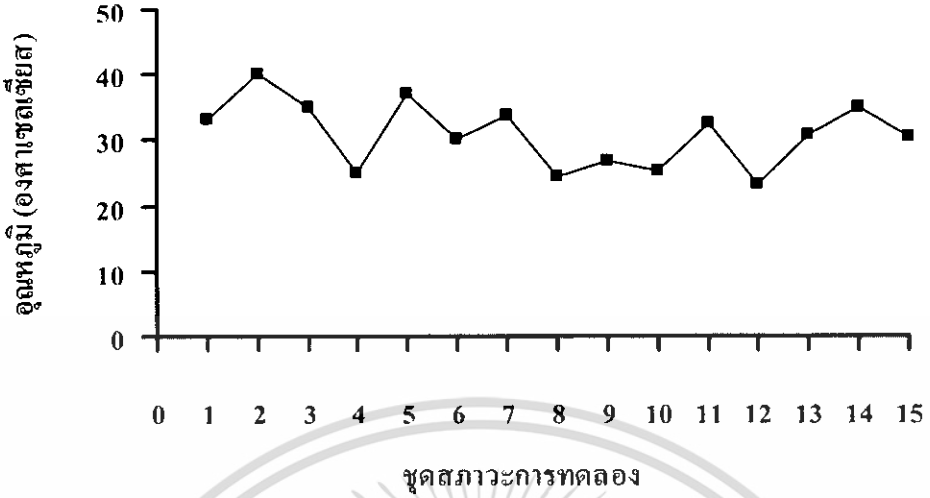


รูปที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าปริมาณผนังเซลล์เบเกอร์ยีสต์ตามการดำเนินไปของชุดสภาวะการทดลองในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสตามวิธีซิมเพลกซ์

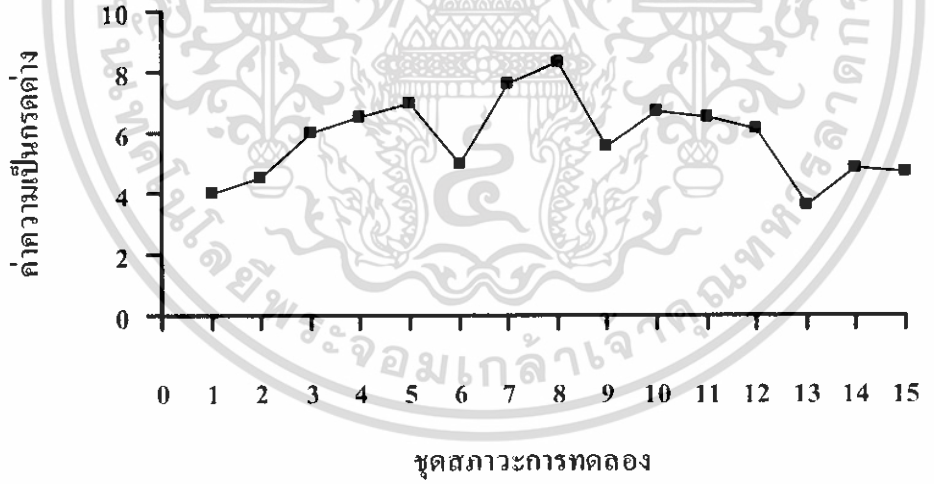
จากรูปที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ในแต่ละชุดสภาวะการทดลองในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส ในช่วงแรกปริมาณของผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ที่ใช้จะมีค่าเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และในชุดสภาวะการทดลองที่ 10 ปริมาณของผนังเซลล์เบเกอร์ยีสต์ที่ใช้ในแต่ละชุดสภาวะการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงน้อยลง โดยพบว่าปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์มีค่าใกล้เคียงกัน โดยชุดสภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงจะใช้ปริมาณของผนังเซลล์เบเกอร์ยีสต์ประมาณ 0.16-0.21 กรัม

ต่อมาได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสพบว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละชุดสภาวะการทดลองมีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละชุดสภาวะการทดลองนั้นจะมีค่าที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยจะมีการเพิ่มขึ้นและลดลงของอุณหภูมิตลอดเวลาในแต่ละชุดสภาวะการทดลอง ซึ่งชุดสภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูง จะใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 23-35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



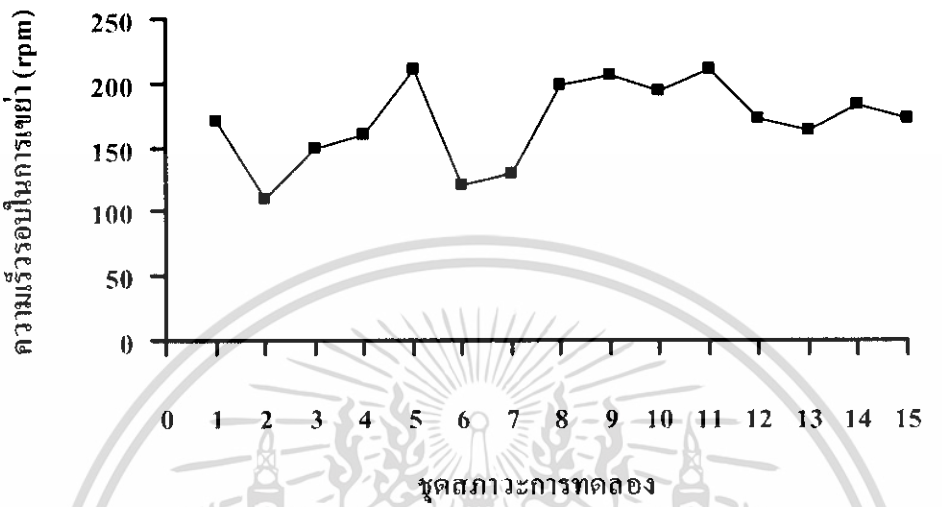
รูปที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชุดสภาวะการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิต



รูปที่ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสตามการดำเนินไปของชุดสภาวะการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 14 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนส มีค่าที่แตกต่างมาก ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้จะเพิ่มขึ้นและลดลงไม่สม่ำเสมอ โดยชุดสภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงๆ นั้นจะใช้ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 4.8-6.7

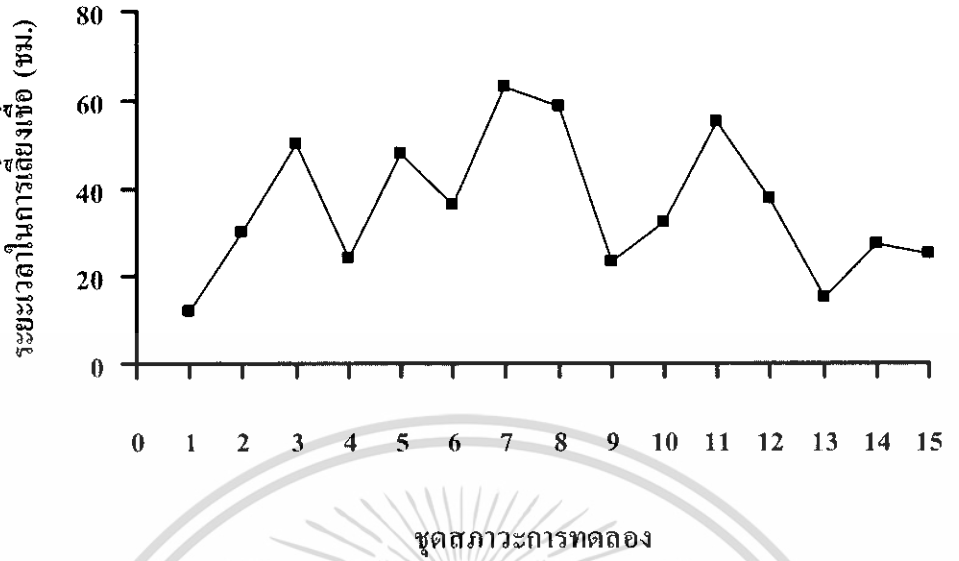


รูปที่ 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเร็วรอบในการเขย่าและการดำเนินไปของชุดสภาวะการทดลองที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสที่ได้จากวิธีซิมเพลกซ์

ค่าความเร็วรอบที่ใช้ในแต่ละชุดสภาวะการทดลองนั้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าความเร็วรอบที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส ในช่วงชุดสภาวะการทดลองที่ 8 ถึง 15 พบว่าค่าความเร็วรอบมีค่าที่ใกล้เคียงกันหรือมีการเปลี่ยนแปลงที่น้อยมาก โดยพบว่าชุดสภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงๆ นั้นจะใช้ความเร็วรอบในการทดลองประมาณ 160-210 รอบต่อนาที (รูปที่ 15)

ส่วนระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อของแต่ละชุดสภาวะการทดลองนั้นจะมีค่าแตกต่างกันเป็นอย่างมาก โดยระยะเวลาที่ใช้ของแต่ละชุดสภาวะการทดลองตั้งแต่ชุดสภาวะการทดลองที่ 1 ถึงชุดสภาวะการทดลองที่ 15 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงตลอดเวลา โดยอาจมีค่าใกล้เคียงกันในชุดสภาวะการทดลองที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 16) ซึ่งชุดสภาวะการทดลองที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงๆ นั้นจะใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อประมาณ 23-38 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ตามวิธีของซิมเพลกซ์

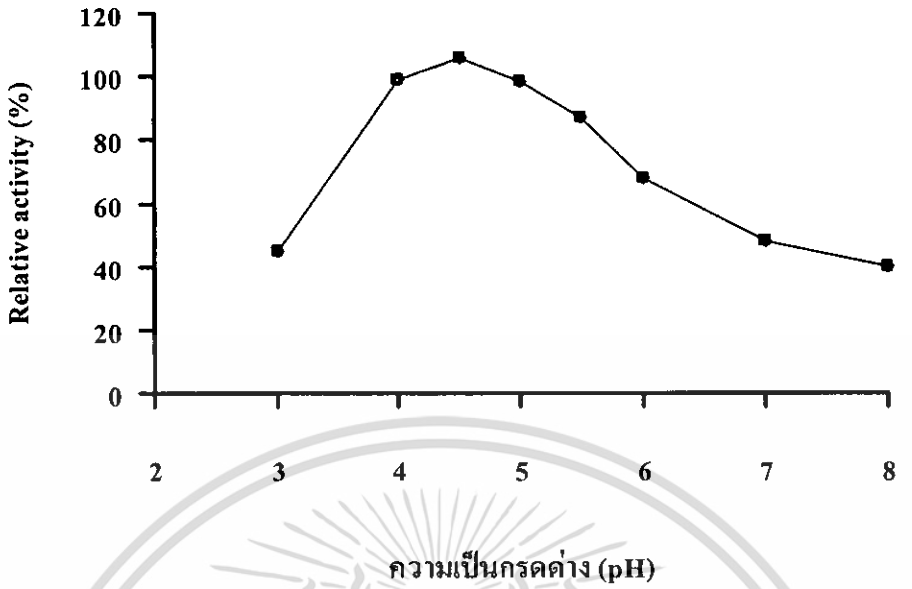
4.2 คุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

4.2.1 ผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

ในการศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จาก *B. circulans* JMC 2504 นั้นได้ทำการศึกษาที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ กัน คือ 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 และ 8.0

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังรูปที่ 17 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดคือ 4.5 ซึ่งมีค่า relative activity เท่ากับ 106 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่าในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 4.0-5.0 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์กลูคาเนสสามารถทำงานได้โดยมีค่า relative activity เท่ากับ 99 และ 98 ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 นี้มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-5.0 จะได้ว่าประสิทธิภาพของการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ที่ค่าความเป็นกรดด่างสูง (7.0-8.0) และค่าความเป็นกรดด่างต่ำ (3.0) มีการลดลง โดยพบว่ามีค่า relative activity ลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



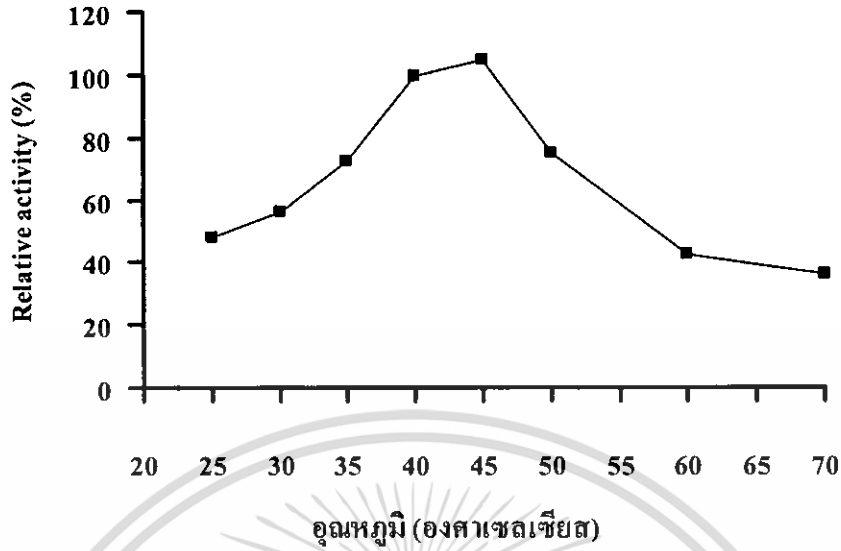
รูปที่ 17 แสดงผลของค่าความเป็นกรดด่างที่มีต่อค่า relative activity ของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

4.2.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้ทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 18

จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยมีค่า relative activity สูงสุดเท่ากับ 104 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีค่า relative activity เท่ากับ 72, 99 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิ 25, 30 และ 60 องศาเซลเซียส ค่า relative activity ของเอนไซม์จะลดลงโดยมีค่าเท่ากับ 48, 56 และ 42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะไม่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดเนื่องจากมีค่า relative activity เพียง 36 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่า relative activity ของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยใช้วิธีซิมเพลกซ์

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 โดยใช้วิธีซิมเพลกซ์ พบว่าสภาวะเหมาะสมที่เชื้อ *B. circulans* JMC 2504 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงสุด คือ ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.16 กรัมต่ออาหาร 30 มิลลิลิตร (0.53 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิ 26.7 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.54 ความเร็วรอบในการเขย่า 205 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 23.4 ชั่วโมง โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.338 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสภาวะในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจะขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ ดังนั้นในการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ออกมาให้ได้มากที่สุด จึงทำให้สภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสแตกต่างกัน ซึ่งจากการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* IAM 1165 สภาวะที่ใช้ในการผลิตคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 14,700 ยูนิต (Aono และคณะ, 1992) Leelasuphakul และคณะ (2006) ได้ผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* NBRS 89-24 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 170 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 5 วัน ซึ่งเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จะมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 127 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเห็ดรา Tangarone และคณะ (1989) ได้ทำการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจาก *Trichoderma longibrachiatum* โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3,753 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Jayus และคณะ (2002) ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Acremonium* sp. IMI 383068 ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง Shu และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเห็ด *Agaricus brasiliensis* จะได้ว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.2 อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสให้ได้มากที่สุด โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จะมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 145.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ได้ประยุกต์ใช้วิธีซิมเพลกซ์ (Simplex optimization) ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสให้ได้มากที่สุด พบว่าที่สภาวะหมาะสมที่ได้จากวิธีซิมเพลกซ์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.338 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีซิมเพลกซ์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ โดยวิธีซิมเพลกซ์เป็นวิธีที่ช่วยลดปัญหาของปฏิกิริยาผลกระทบ (factor interaction) ระหว่างตัวแปรที่ศึกษา นอกจากนี้พบว่าจำนวนชุดการทดลอง (จำนวนครั้ง) ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสมีจำนวนน้อย ทำให้เวลาที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสั้นลง จึงเข้าสู่การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตได้รวดเร็วมากขึ้น นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสให้มากขึ้น โดยมีการประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสอย่างกว้างขวาง จากการศึกษาของ Tang และคณะ (2004) ได้ศึกษาปริมาณอาหารที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. subtilis* ZJF-1A5 โดยใช้วิธี response surface methodology พบว่าสภาวะและปริมาณอาหารที่เหมาะสมซึ่งทำให้ผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงสุดคือ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ZJF-1A5 ในอาหารเหลวซึ่งมีส่วนประกอบของแป้งบาร์เลย์ แป้งข้าวโพด KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CaCl_2$ โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมการทำงานเท่ากับ 251 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Théodore และคณะ (1995) ได้นำวิธี response surface methodology มาประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *T. harzianum* ด้วยพบว่าที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสมีค่าเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสและ 4.7 ตามลำดับ ซึ่งที่สภาวะนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ 0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. subtilis* ZJF-1A5 ยังได้นำวิธี Half factional factorial design (HFFD) มาประยุกต์ใช้พบว่าสภาวะเหมาะสมที่ได้คือ ปริมาณอาหารเหลวในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 30 มิลลิลิตร (ประกอบด้วยแป้งบาร์เล่ย์, แป้งข้าวโพด, KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CaCl_2$) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 210 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 285.45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Guo-qing และคณะ, 2002)

จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส พบว่าในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์อา หารและสารเหนี่ยวนำที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส ดังจะเห็นได้ว่าจากการทดลองเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast nitrogen base และใช้ผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์เป็นสารเหนี่ยวนำในสภาวะที่เหมาะสม พบว่ามีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.338 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาของ Rombouts และคณะ (1976) ได้ผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* WL-12 โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร liquid mineral medium ที่มี alkaline – insoluble

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bakers' yeast glucan เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสของเชื้อ *B. circulans* WL-12 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.043 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Giese และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาถึงชนิดของสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *T. harzianum* Rifai พบว่าลามินารินเป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ โดยเมื่อใช้ลามินารินเป็นสารตั้งต้นเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จะมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Leelasuphakul และคณะ (2006) ได้ผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* NBRS 89-24 โดยใช้อาหาร nutrient broth ที่มีการเติมไคติน (chitin) และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 127 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาพบว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส จะได้สภาวะที่เหมาะสมและค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสที่แตกต่างกันโดยทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งสารเหนี่ยวนำที่ใช้ นอกจากนี้วิธีที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลด้วยเช่นกัน

5.2 คุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

เมื่อนำเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์กลูคาเนสสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-5.5 โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสมีค่าเท่ากับ 4.5 และเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 35-50 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสมีค่าเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส จากคุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 พบว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเห็ด *A. brasiliensis* พบว่าค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสมีค่าเท่ากับ 4.5 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเอนไซม์มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.5-6.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Shu และคณะ, 2006) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจาก *B. circulans* IAM 1165 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 6.5 และ 70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่างในช่วง 4-9 (Aono และคณะ, 1992) สำหรับเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* WL-12 จะมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.5 (Rombouts และคณะ, 1976) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ที่มีการตัดต่อยีนพบว่าจะมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในช่วง 6.8-7.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานมีค่าเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส (Aida และคณะ, 1995) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* ZJF-1A5 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานเท่ากับ 7.5 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิเหมาะสมของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 (Leelasuphakul และคณะ, 2006) ส่วนเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. longibrachiatum* จะมีค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานเท่ากับ 4.8 และ 55 องศาเซลเซียส (Tangarone และคณะ, 1989) จะได้ว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติในการทำงานที่แตกต่างกันตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรกฎ วิเศษไชยศรี. 2540. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยวิธีซิมเพลกซ์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. กรุงเทพ: สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2547. เทคโนโลยีของเอนไซม์. กรุงเทพ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Walter F. H., Parker Jr. L. R., Morgan S. L., Deming S. N. 1991. Sequential simplex optimization. Library of congress.

Aida K., Okada T., Kasahara N., Nikaidou N., Tanaka H., Watanabe T. 1995. Comperative studies of β-1,3-Glucanase A1 and B of *Bacillus circulans* WL-12 purifications and enzymatic properties. J. Ferment. Bioeng. 80 : 283-286.

Aono R., Sato M., Yamamoto M., Horikoshi K. 1992. Isolation and partial characterization of an 87-kilodalton β-1,3-glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 520-524.

Benhamou N. 1992. Ultrastructural detection of β-1,3-glucans in tobacco root tissues infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* using a gold-complexed tobacco β-1,3-glucanase. Physio. Molec. Plant Pathology. 41: 351- 370.

Beshay U., El-Enshay H., Ismail I. M. K., Moawad H., Wojciechowska E., Abd-El-Ghany S. 2003. β-glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli* : effect of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor. Process Biochem. 39 : 307-313.

Bocchini D.A., Alves-Prado H.E., L.c., Roberto I.C., Gomes E., Da Silva R. 2002. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. Process Biochem. 38 : 727- 731.

De Souza C.F.V., Flôres S.H., Ayub M.A.Z. 2006. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. Process Biochem. 41 : 1-7.

Fleet G. H., Phaff H. J. 1974. Lysis of yeast cell walls : glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. J. Bacteriol. 119 : 207-219.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fleet G. H., Phaff H. J. 1975. Glucanases in *Schizosaccharomyces*. Isolation and properties of an exo-β-glucanase from the cell extracts and culture fluid of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*. Biochem. Biophys. Acta. 401 : 318-332.

Giese E. C., Covizzi L. G., Borsato D., Dekker R. F. H., Silva M. L. C., Barbosa A. M. 2005. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β-1,3-glucanase by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. Process Biochem. 40 : 3783-3788.

Gough S., Flynn O., Hack C.J., Marochant R. 1996. Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3 : simplex optimization of media supplements. Microbiol. Biotechnol. 46 : 187-190.

Guo-qing H., Xing-jun T., Ali M. A. M., Qi-he C. 2002. Optimization of cultural conditions for thermostable β-1,3-1,4-D-glucanase production by *Bacillus subtilis* ZJFG-1A5. J. Zhejiang Univ. Sci. 4 : 719-726.

Guo-qing H. Xiu-yan Z., Xing-jun T., Qi-he C., Hui R. 2005. Partitioning and purification of extracellular β –1,3-1,4-glucanases in aqueous two-phase systems. J. Zhejiang. Univ. Sci. 8 : 825-831.

Heck J. X., Flôres S.H., Hertz P.F., Ayub M.A.Z. 2005. Statistical optimization of thermotolerant xylanase activity from amezon isolate *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. Bioresource Technol. 97 : 1-5.

Hiura N., Kobayashi M., Nakajima T., Matsuda K. 1986. Purification and some properties of two wall-associated (β-1,3) glucanase from *Neurospora crassa* cells. Agric. Biol. Chem. 50. 2461-2468.

Horikoshi K. 1973. Comparative studies on β-1,3-glucanases of microorganisms. In J. R. Villanueva, 1. Garcia-Acha, S. Gasc6n, and F. Uruburu (ed.), Yeast, mould and plant protoplasts. Academic Press, London. 25-32.

Jayus, Barbara M., Mcdougall, Seviour R.J. 2002. Factors affecting the synthesis of (1→3) and (1→6) β-glucanase by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 grown in batch culture. Enzyme Microb. Technol. 31: 289-299.

Kim C. H. 1995. Characterization and substrate specificity of an endo-β-1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 959-965.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim C. H., Kim D. S. 1995. Purification and specificity of a specific endo-β-1,4-D-glucanase (Avicelase II) resembling exo-cellobiohydrolase from *Bacillus circulans*. Enzyme Microb. Technol. 17 : 248-254.

Kolossvàry G.J. 1996. Optimization of lipase activity form *Rhizopus* sp. in triglyceride hydrolysis using a modified simplex method. Process Biochem. 31 : 595-600.

Kopeckà M., Fleet H. G., Phaff H.J. 1995. Ultrastructure of the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe* following treatment with various glucanases. J. Structur. Biolo. 114 : 140-152.

Kuranda M. J., Robbins P. W. 1987. Cloning and heterologous expression of glycosidic genes form *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 2585-2589.

Lachance M., Phaff H. J. 1979. Comparative study of molecular size and structure of exo-β-glucanases from *Kluyveromyces* and other yeast genera : evolutionary and taxonomic implications. Int. J. Syst. Bacteriol. 29 : 70-78.

Lawitts J. A., Biggers J. D. 1991. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. J. Reprod. Fert. 91 : 543-556.

Leelasuphakul W., Sivanunsakul P., Phongpaichit S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β –1,3-glucanases and antibiotic extract from an antagonictic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enzyme Microb. Technol. 38 : 990-997.

Manner D. J., Masson A. J., Patterson J. C. 1973. The structure of a β - (1,3) - D- glucan from yeast cell walls. Biochem. J. 135 : 19-30.

McCarthy T., Hanniffy O., McCarthy T., Hanniffy O., Lalor E., Savage A.V., Tuoh M.G. 2005. Evaluation of three thermostable fungal endo-β-glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications. Process Biochem. 40 : 1741-1748.

Mitchell. 1963. Addition of fungal cell-wall components to soil for biological disease control. Phytopathology. 53 : 1068-1071.

Molina M., Cenamor R., Sanchez M., Nombela C. 1989. Purification and some properties of *Candida albicans* exo-1,3- β-glucanase. J. Gen. Microbiol. 135 : 309-314.

Nagata S., Sawatani M., Kuriyama M., Misono H., Nagasagi S. 1990. Purification and characterization of nonlytic endo-β-glucanase I from *Flavobacterium dormitator* var glucanolyticae. Agric. Biol. Chem. 54 : 2107-2114.

Nelder J. A., Mead R. 1965. A simplex method for function minimization. Comput. J. 7 : 308-313.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paquette G. J., McKellar R. C. 1986. Optimization of extracellular lipase activity from *Pseudomonas fluorescens* using a super-simplex optimization program.. J. Food Sci. 51 : 655-658.

Proom H., Knight B. C. 1955. The minimal nutritional requirements of some species in the genus Bacillus. J. Gen. Microbiol. 13 : 474–480.

Rapp P., Grote E., Wagner F. 1981. Formation and location of 1,4- β-glucanase and 1,4- β-glucosidases from *Penicillium janthinellum*. Appl. Environ. Microbiol. 41 : 857-866.

Rombouts F.M., Phaff H.J. 1976. Lytic β-(1→3)-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. Eur. J. Biochem. 63 : 121-130.

Sanchez-Ballesta M. T., Gosalbes M. J., Rodrigo M. J., Granell A., Zacarias L., Lafuente M. T. 2006. Characterization of a β-1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. Pos. Biolo. Technol. 40 :133–140.

Sanchez M., Nombela C., Villanueva J. R., Santos T. 1982. Purification and partial characterization of a developmentally regulated 1,3-β -D-glucanase from *Penicillium italicum*. J. Gen. microbial. 128 : 2047-2053.

Santos T., Rey F. D., Conde J., Villanueva J. R., Nombela C. 1979. *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in exo-1,3- β-glucanase production. J. Bacteriol. 139 : 333-338.

Schwarz W.H., Schimming S., Staudenbauer W.L. 1988. Isolation of a *Clostridium thermocellum* gene encoding a thermostable β-1,3-glucanase (laminarinase). Biotechnol. Lett. 10: 225-230.

Spendley W., Hext G. R., Himsworth F. R. 1962. Sequential application of simplex designs in optimization and evolutionary. Technomatrics. 4 : 441-461.

Shallenberger R. S., Searles C., Lewis B. 1974. Laminarinase activity in the crystalline style of the surf clam (*Spissula solidissima*). Experientia. 30 : 597-598.

Shu C.H., Xu C.J., Lin E.S. 2006. Production, purification and partial characterization of a novel endo-β- 1,3-glucanases from *Agaricus brasiliensis*. Process Biochem. 41 : 1229-1233

Sietsma J. H., Eveleigh D. E., Haskins R. H. 1968. The purification of cellulose and exolaminarinase and their role in the formation of *Pythium* species protoplasts. J. Microbiol. Serol. 34 : 331-340.

Tang X. J., He G. Q., Chen Q.H., Zhang X.Y., Mokhtar A.M. Ali. 2004. Medium optimization for the production of thermal stable β–glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. Bioresource Technol. 93 : 175-181.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tangarone B., Royer R.C., Nakas J.P. 1989. Purification and characterization of an endo-(1,3)-β-D-glucanases from *Trichoderma longibrachiatum*. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 177-184.

Tinoi J., Rakariyatham N., Deming R.L. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process Biochem. 40 : 2551-2557.

Watanabe T., Yahata N., Nakamura Y., Muramoto Y., Suzuki K., Kamimiya S., Tanaka H. 1989. Expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus circulans* WL-12 structural gene for β-1,3-glucanase. Agric. Biol. Chem. 53 : 1759-1767.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Nutrient broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยอบน้ำตาลกลูโคสที่ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร ซึ่งสารละลายนี้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

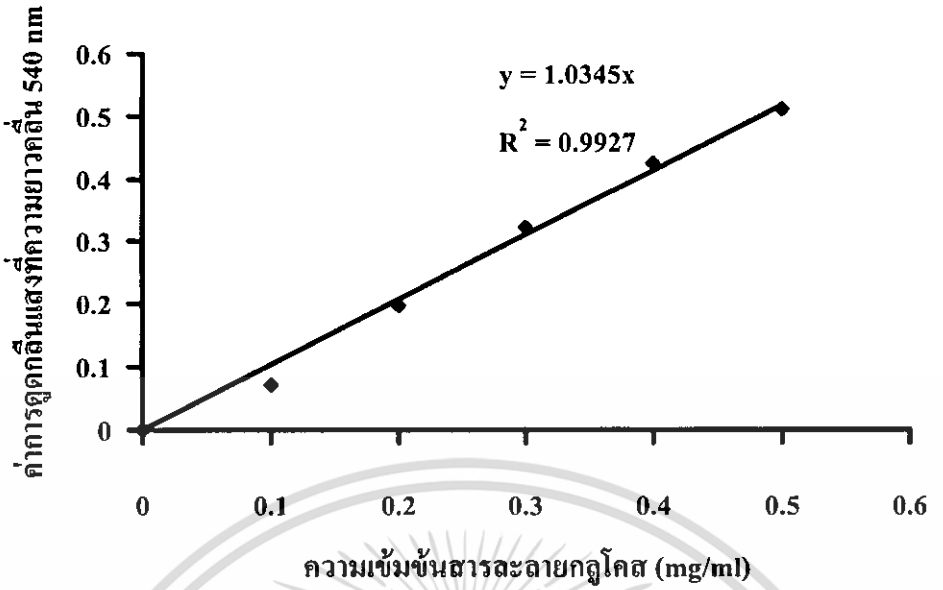
การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

ปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเติมสารละลายกรด 3,5- ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำก๊อกให้เย็น เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในรูปของสารละลายกลูโคส ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นสารละลายกลูโคส (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm
0	0
0.1	0.071
0.2	0.197
0.3	0.322
0.4	0.426
0.5	0.511

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

2. ผลการทดสอบคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus circulans* JMC 2504

ตารางที่ 12 ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	การทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	Relative activity (%)
3.0	0.147	44.82
4.0	0.325	99.09
4.5	0.349	106.40
5.0	0.322	98.17
5.5	0.285	86.89
6.0	0.224	68.29
7.0	0.157	47.87
8.0	0.131	39.94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

อุณหภูมิ (°C)	การทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	Relative activity (%)
25	0.157	47.87
30	0.185	56.40
35	0.236	71.95
40	0.324	98.78
45	0.341	103.96
50	0.247	75.30
60	0.138	42.07
70	0.119	36.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

แผ่นงานซิมเพลกซ์

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 1

สภาวะการทดลอง I-2	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (g)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	B	6
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	...	4
	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	...	3
	0.13	40	4.5	110	30	9.17×10^{16}	0.048	N	2
Σ	0.75	167	29	750	188				
$P = \Sigma/k$	0.15	33.40	5.80	150	37.60				
W	0.14	33	4.0	170	12	8.25×10^{16}	0.021	W	1
(P-W)	0.01	0.40	1.80	-20	25.6				
R = P + (P-W)	0.16	33.8	7.6	130	63.2	1.79×10^{17}	0.073	R	7
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 2

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
2-3	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	B	6
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	...	4
	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	...	3
	0.16	33.8	7.6	130	63.2	1.79×10^{17}	0.073	N	7
Σ	0.78	160.8	32.1	770	221.2				
$P = \Sigma/k$	0.16	32.2	6.42	154	44.2				
W	0.13	40	4.5	110	30	9.17×10^{16}	0.048	W	2
(P-W)	0.03	-7.8	1.92	44	14.2				
R = P + (P-W)	0.19	24.3	8.34	198	58.4	1.87×10^{17}	0.119	R	8
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 3

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
3-4	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	B	6
	0.19	24.3	8.34	198	58.4	1.87×10^{17}	0.119	...	8
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	...	4
	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	N	3
Σ	0.81	151.32	32.84	838	216.48				
$P = \Sigma/k$	0.16	30.3	6.57	168	43.30				
W	0.16	33.8	7.6	130	63.2	1.79×10^{17}	0.073	W	7
(P-W)	0	-3.5	-1.03	38	-19.9				
R = P + (P-W)	0.16	26.7	5.54	205	23.4	1.645×10^{17}	0.338	R	9
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)	0.16	23.2	4.51	243	3.5	-	-	E	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 4

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
4-5	0.16	26.7	5.54	205	23.4	1.645×10^{17}	0.338	B	9
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	...	6
	0.19	24.3	8.34	198	58.48	1.87×10^{17}	0.119	...	8
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	...	5
	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	N	4
Σ	0.87	143	32.38	893	189.8				
$P = \Sigma/k$	0.17	28.6	6.48	179	38				
W	0.10	35	6.0	150	50	9.50×10^{16}	0.091	W	3
(P-W)	0.07	-6.4	0.48	29	-12				
R = P + (P-W)	0.24	22.2	6.96	207	25.9	-	-	R	-
(P-W) / 2	0.03	-3.2	0.24	14	-6				
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2	0.20	25.4	6.72	193	31.9	2.38×10^{17}	0.274	Cr	10
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 5

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเทอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
5-6	0.16	26.7	5.54	205.20	23.4	1.645×10^{17}	0.338	B	9
	0.20	25.4	6.72	193	31.9	2.38×10^{17}	0.274	...	10
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	...	6
	0.19	24.3	8.34	198	58.4	1.87×10^{17}	0.119	...	8
	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	N	5
Σ	0.90	143.4	32.60	926	197.7				
$P = \Sigma/k$	0.18	28.7	6.52	185	39.5				
W	0.17	25	6.5	160	24	1.12×10^{17}	0.107	W	4
(P-W)	0.01	3.7	0.02	25	16				
R = P + (P-W)	0.19	32.4	6.54	210	55.1	9.50×10^{19}	0.177	R	11
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 6

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
6-7	0.16	26.7	5.54	205	23.4	1.645×10^{17}	0.338	B	9
	0.20	25.4	6.72	193	31.9	2.38×10^{17}	0.274	...	10
	0.19	32.4	6.54	210	55.1	9.50×10^{19}	0.177	...	11
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	...	6
	0.19	24.3	8.34	198	58.4	1.87×10^{17}	0.119	N	8
Σ	0.94	138.8	32.14	926	204.8				
$P = \Sigma/k$	0.19	27.8	6.43	185	41				
W	0.15	37	7.0	210	48	1.32×10^{17}	0.118	W	5
(P-W)	0.04	-9.2	-0.57	-25	-7.00				
R = P + (P-W)	0.23	18.5	5.86	160	33.9	-	-	R	-
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2	0.21	23.1	6.14	173	37.4	2.08×10^{17}	0.124	Cr	12
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 7

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
7-8	0.16	26.7	5.54	205	23.4	1.645×10^{17}	0.338	B	9
	0.20	25.4	6.72	193	31.9	2.38×10^{17}	0.274	...	10
	0.19	32.4	6.54	210	55.1	9.50×10^{19}	0.177	...	11
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	...	6
	0.21	23.1	6.14	173	37.4	2.08×10^{17}	0.124	N	12
Σ	0.96	137.6	29.94	901	183.8				
$P = \Sigma/k$	0.19	27.5	5.99	180	36.8				
W	0.19	24.3	8.34	198	58.4	1.87×10^{17}	0.119	W	8
(P-W)	0	3.2	-2.35	-18	-22				
R = P + (P-W)	0.19	30.7	3.64	162	15.1	1.54×10^{17}	0.140	R	13
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 8

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
8-9	0.16	26.7	5.54	205	23.4	1.645×10^{17}	0.338	B	9
	0.20	25.4	6.72	193	31.9	2.38×10^{17}	0.274	...	10
	0.19	32.4	6.54	210	55.1	9.50×10^{19}	0.177	...	11
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	...	6
	0.19	30.7	3.64	162	15.1	1.54×10^{17}	0.140	N	13
Σ	0.94	145.2	27.44	890	161.5				
$P = \Sigma/k$	0.19	29.0	5.49	178	32.3				
W	0.21	23.1	6.14	173	37.4	2.08×10^{17}	0.124	W	12
(P-W)	-0.02	5.9	-0.65	5	-5				
R = P + (P-W)	0.17	35	4.84	183	27.2	4.8×10^{17}	0.150	R	14
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2									
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นงานซิมเพลกซ์ที่ 9

สภาวะการทดลอง	ปริมาณผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (กรัม)	อุณหภูมิ (°C)	ความเป็นกรดด่าง	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	ระยะเวลาในการบ่ม (hr.)	ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *B. circulans* (CFU/mL)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (U/mL)	อันดับ	ชุดสภาวะการทดลอง
9-10	0.16	26.7	5.54	205	23.4	1.645×10^{17}	0.338	B	9
	0.20	25.4	6.72	193	31.9	2.38×10^{17}	0.274	...	10
	0.19	32.4	6.54	210	55.1	9.50×10^{19}	0.177	...	11
	0.20	30	5.0	120	36	1.48×10^{17}	0.161	...	6
	0.17	35	4.84	183	27.2	4.8×10^{17}	0.150	N	14
Σ	0.92	149.5	28.64	911	173.6				
P = Σ/k	0.18	29.90	5.73	182	34.7				
W	0.19	30.7	3.64	162	15.1	1.54×10^{17}	0.140	W	13
(P-W)	-0.01	-0.8	2.09	20	20				
R = P + (P-W)	0.17	29.1	7.82	202	54.3	2.3×10^{17}	0.032	R	15
(P-W) / 2									
Cw = P – (P-W) / 2	0.19	30.3	4.68	172	24.9	2.3×10^{17}	0.152	Cw	15
Cr = P+ (P-W) / 2									
E = R + (P-W)									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้