21086

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

หองสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

การคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส

(Screening of Microorganisms from Natural Source for Protease Amylase and Cellulase Production)

T096487

นางสาวธันยธรณ์ ปิยชัยเศรษฐ์ รหัส 45040793

นายเอกรัตน์ อุ่มบางตลาด รหัส 45040826

ปท.
ป4411
2548

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 96487

วัน,เดือน,ปี 30 JUN 2009

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส

(Screening of Microorganisms from Natural Source for Protease Amylase and Cellulase Production)

จัดทำโดย

นางสาวธันยธรณ์ ปิยชัยเศรษฐ์ รหัส 45040793

นายเอกรัตน์ อุ่มบางตลาด รหัส 45040826

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(อ. สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

29 / 3 / 2549

วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธันยธรณ์ ปิยชัยเศรษฐ์ และเอกรัตน์ อุ่มบางตลาด, 2548 : การการคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์อดิศร เสวตวิวัฒน์

การศึกษาการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าว โดยคัดเลือกจากเชื้อที่สามารถให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส(clear zone) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดสูงที่สุด 5 อันดับแรก จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ รหัส B4 , B8 , B11 , B18 และ B21 ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส คือ รหัส B6 , B7 , B12 , B17 และ B43 เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสทั้ง 5 isolates มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ B7 มีค่าเท่ากับ 0.92 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด คือ B17 มีค่าเท่ากับ 14.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ธันยธรณ์ ปิยชัยเศรษฐ์ .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

นาย ธันยธรณ์ อุ่มบางตลาด .....

ลายมือชื่อนักศึกษา

.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

29/3/2549

วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความกรุณาจาก อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ที่ได้ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมซึ่งได้กรุณาให้คำปรึกษา ตลอดจนความรู้ด้านต่างๆอันมีค่า ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสมบูรณ์ คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเพื่อนๆอุตสาหกรรมเกษตรทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือตลอดมาไม่ว่าจะด้านใดๆก็ตาม อีกทั้งกำลังใจและความมีน้ำใจที่มีให้กัน โดยตลอดโดยเฉพาะเพื่อนๆเทคโนโลยีการหมักรุ่นที่ 9 ทุกคน

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ๆ น้องๆ สมาชิกในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านโดยเฉพาะกำลังทรัพย์และกำลังใจ ทำให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธันยธรณ์ ปิยชัยเศรษฐ์
เอกรัตน์ อุ่มบางตลาด

28 มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาคผนวก	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
- วัตถุประสงค์ของการทดลอง	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
- ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์	2
- ชนิดของเอนไซม์	3
- เอนไซม์โปรติเอส	3
- เอนไซม์อะไมเลส	5
- เอนไซม์เซลลูเลส	6
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
- เชื้อจุลินทรีย์	10
- อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง	10
- อาหารเลี้ยงเชื้อ	11
- สารเคมี	11
- วิธีการทดลอง	12
- การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์	13
- สถานที่ดำเนินการ	13
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	14
- ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารโปรตีน แป้ง และเซลลูโลส	14
- ผลการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียรหัส B4 , B8 และ B11	18
2	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียรหัส B18 และ B21	19
3	ผลทดสอบการย่อยสลายแป้งของเชื้อแบคทีเรีย	20
4	ผลทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย	21
5	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์	22

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ	14
2	ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ	15
3	ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ	16
4	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของเอนไซม์ อะไมเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่ง ธรรมชาติ	23
5	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ได้จากแหล่งธรรมชาติ	24
6	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของเอนไซม์ เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่ง ธรรมชาติ	25
7	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ได้จากแหล่งธรรมชาติ	25
8	ความสัมพันธ์ระหว่าง บริเวณใส กับ ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวก		หน้า
ก	อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	32
ข	วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	35
ค	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสและการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันไม่ว่าจะในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารหรือตามแหล่งชุมชนต่างๆนั้นย่อมมีเศษอาหารและขยะต่างๆ เศษเหลือเหล่านี้มักจะเน่าเสียได้ง่ายโดยเฉพาะจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเพราะในเศษอาหารเหล่านี้มีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารอาหาร เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดปัญหาขึ้นกับสภาพแวดล้อม ดังนั้นเพื่อเป็นการจัดการสภาพแวดล้อมจึงมีการใช้เอนไซม์หลายชนิดในการย่อยสลายเศษอาหารและขยะต่างๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และเซลลูเลส ซึ่งมีบทบาทสำคัญอีกทั้งยังสามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้อีกด้วย โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถผลิตขึ้นได้โดยเชื้อจุลินทรีย์

ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและเซลลูเลสได้จึงเป็นที่น่าสนใจและได้รับความนิยมในการศึกษาโดยทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ เพื่อที่จะได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบดังกล่าว

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและเซลลูเลสโดยแยกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ
2. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์

ปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์สิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นการสังเคราะห์ (anabolism) หรือการสลาย (catabolism) สารชีวโมเลกุลเพื่อให้เกิดพลังงานสำหรับกิจกรรมต่างๆของเซลล์เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้ในสิ่งแวดล้อมภายในเซลล์ที่ไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงและมีพีเอชที่เป็นกลาง ทั้งนี้เพราะภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตมีตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่เรียกว่าเอนไซม์ (enzyme) ช่วยเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้กระบวนการต่างๆของชีวิตดำเนินไปตามปกติ ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น พบว่าเอนไซม์สามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ถึง 10^{8}-10^{14} เท่าของปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่ง (พัชรา,2541) เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานกระตุ้น (activation energy) ปฏิกิริยาจึงเข้าสู่สภาวะสมดุล (equilibrium position) ได้เร็วขึ้น โดยที่เอนไซม์ไม่ได้เปลี่ยนแปลงสภาวะสมดุล

เอนไซม์เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีการขดตัวหรือโครงรูปที่จำเพาะซึ่งโครงรูปธรรมชาติของเอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกกำหนดโดยการเรียงลำดับกรดอะมิโนในสายโพลิเปปไทด์ที่เป็นโครงสร้างของเอนไซม์มักจะอยู่ในรูปที่พันกัน (folding) เป็นก้อนมีผลทำให้หมู่แขนงข้างของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเข้ามาอยู่ใกล้กันเกิดเป็นบริเวณแอคทีฟซึ่งมีลักษณะเป็นแอ่งหรือร่องประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สามารถจับกับสับสเตรทได้ด้วยแรงต่างๆเช่นแรงไฮโดรโฟบิก แรงดึงดูดระหว่างขั้วหรือแรงดึงดูดระหว่างประจุ บริเวณแอคทีฟประกอบด้วย 2 ส่วน คือ บริเวณจับ (substrate binding site) ทำหน้าที่จับกับสับสเตรทมีความสำคัญในการยึดกับสับสเตรทให้อยู่กับที่ขณะที่มีการเร่งปฏิกิริยาและบริเวณเร่ง (catalytic site) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการจับกับสับสเตรทแล้วมีผลให้เกิดปฏิกิริยาสร้างหรือแตกออกของพันธะกลายเป็นผลที่เกิดขึ้น การสลายและการเกิดพันธะถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นโดย catalytic group ของเอนไซม์ซึ่ง catalytic group ของเอนไซม์ นี้ได้จากสาร 2 ประเภท คือ polar side chain ของกรดอะมิโน เช่น สายข้างของกรดอะมิโน serine , csysteine , aspartate , glutamate และ lysine เป็นต้น ซึ่งอยู่ที่บริเวณแอคทีฟและมีความว่องไวต่อปฏิกิริยามากและอีกสารหนึ่งคือ โคแฟกเตอร์ (cofactor) เป็นโมเลกุลของสารส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนแต่จำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่มีโคแฟกเตอร์รวมอยู่ด้วยนั้นเรียกว่าโฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) สำหรับส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เรียกว่าอะโพเอนไซม์ (apoenzyme)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ชนิดของเอนไซม์

เอนไซม์ของแบคทีเรียจำแนกออกเป็นชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

2.2.1 แบ่งตามลักษณะการสร้างเอนไซม์

2.2.1.1 เอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น (inductive enzyme , induced enzyme หรือ adaptive enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีสารอาหารหรือสับสเตรทเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างเอนไซม์ ซึ่งถ้าไม่มีสับสเตรทชนิดนี้เซลล์จะไม่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวและจะเรียกสับสเตรทนี้ว่าตัวเหนี่ยวนำ (inducer)

2.2.1.2 เอนไซม์ที่มีอยู่ประจำ (constitutive enzyme) เป็นเอนไซม์ที่เซลล์สร้างขึ้นได้เองเป็นประจำโดยไม่ขึ้นกับสารอาหารหรือสับสเตรท

2.2.2 แบ่งตามแหล่งที่เอนไซม์ทำงาน

2.2.2.1 เอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์และถูกขับออกมาทำงานนอกเซลล์เรียกว่า เอกซ์ตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular enzyme) หรือเอกซ์โซเอนไซม์ (exoenzyme) เมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรท แล้วทำให้โมเลกุลของสับสเตรทเล็กลงจนเข้าสู่เซลล์ได้ ตัวอย่างเช่น โปรติเอส อะไมเลส และ เซลลูเลส เป็นต้น

2.2.2.2 เอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์และทำงานภายในเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรทภายในเซลล์ เรียกว่า อินตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (intracellular enzyme) หรือ เอนโดเอนไซม์ (endoenzyme) ตัวอย่าง เช่น ไฮโดรเลส ออกซิเดส เป็นต้น(นงลักษณ์ และ ปรีชา,2541)

2.3 เอนไซม์โปรติเอส (Protease) (ปราณี,2535)

2.3.1 เอนไซม์โปรติเอสแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.3.1.1 The serine proteases เอนไซม์ในกลุ่ม serine proteases ทั้งหมดเป็น endopeptidases โดยมีหมู่ immidazole และ seryl residue ในบริเวณเร่ง ถูกยับยั้งได้โดย diisopropyl phosphofluoridate (DEP) สำหรับ ค่า pH ที่เหมาะสม ของเอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ในช่วง 6.7-9 จัดเป็น alkaline protease

2.3.1.2 The sulfhydryl proteases เป็นเอนไซม์ โปรติเอสทีมีหมู่ sulfhydryl หรือหมู่ thiol (-SH) ในบริเวณเร่ง ซึ่งอาจมีมากกว่า 1หมู่ และถูกยับยั้งโดยสารประกอบที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ sulfhydryl ได้เช่น ไอออนของโลหะหนักหรืออนุพันธ์ของโลหะหนัก alkylating agent และ oxidizing agent เป็นต้น

เอกสารนี้มีไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.3 The metal containing proteases เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ประกอบด้วยไอออนของโลหะเช่น Zn^{2+},Mn^{2+},Pb^{2+},CO^{2+} เป็นต้น อยู่ในบริเวณเร่งโปรติเอส ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็น exopeptidases และถูกยับยั้งโดย metal – chelating agent เช่น EDTA,1,10-phenanthroline

2.3.1.4 The acid proteases เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะกรด และบริเวณเร่งจะมีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ pepsin และ rennin เป็นต้น

2.3.2 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมนั้นมักใช้ในการย่อยโปรตีนบางส่วน หรือการย่อยแบบไม่สมบูรณ์เพื่อเพิ่มการละลาย ได้แก่

2.3.2.1 อุตสาหกรรมผงซักฟอก จะใช้เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส เป็นตัวขจัดคราบความสกปรกต่างๆ เช่น โปรตีน แป้ง และไขมันให้หลุดออกไปจากเสื้อผ้าซึ่งเอนไซม์โปรติเอส ที่ใช้ในผงซักฟอกที่มีการผลิตมากกว่าเอนไซม์อื่นๆ คือ มีการผลิตสูงคิดเป็นร้อยละ 35 บริษัทที่ผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก มี 2 บริษัท คือ 1) บริษัท novo industry A/S จะผลิตเอนไซม์โปรติเอส 3 ชนิด คือ อัลคาร์เลส(Alcalase) จาก *Bacillus licheniformis* , เอสเพอเรส(Esperase) จาก *B. licheniformis* และซาวีเนส (Savinase)จาก *B.amyloliquefaciens* ที่ชอบด่าง และ 2) บริษัทแม็กซาเทส (Maxatase) จาก *Bacillus licheniformis* (ดุษฎี,2537)

2.3.2.2 อุตสาหกรรมอาหาร เช่น ในการผลิตเนยแข็ง จะใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก เชื้อรา และแบคทีเรีย โดยใช้แทนเรนเนตในการผลิตเนยแข็งและยังใช้ประโยชน์ในการแยกโปรตีนออกจากส่วนต่างๆ เช่นกระดูกที่นำมาป่นและย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ส่วนที่เป็นของเหลวสามารถนำมาใช้ทำเนื้อกระป๋อง และซุปกระป๋องได้ โดยเอนไซม์นี้ยังสามารถใช้ปรับปรุงกลิ่น รส ลักษณะเนื้อสัมผัสของปลาทูน่าบรรจุกระป๋องได้ (Callahan and Herz,1989) นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการทำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และน้ำผลไม้ให้ใส

2.3.2.3 อุตสาหกรรมหนังสัตว์และขนสัตว์ มีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอส ในอุสาหกรรมประเภทนี้คือ โปรติเอสที่เป็นด่างจะใช้ในการกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ก่อนที่จะนำไปเป็นผลิตภัณฑ์ โดยใช้ในปริมาณค่อยข้างมาก คือร้อยละ 0.1-1.0 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังใช้ป้องกันการหดตัวของขนสัตว์ได้อีกด้วย (ดุษฎี,2537)

2.3.2.4 เพิ่มคุณค่าของเหลือทิ้ง เอนไซม์โปรติเอสสามารถนำมาใช้กำจัดของเสียหรือใช้ในการเพิ่มคุณค่าของเหลือทิ้งประเภทโปรตีนให้เกิดประโยชน์ เช่น เอนไซม์สามารถย่อย เขาสัตว์ ขนสัตว์ ผม และเล็บ ได้เป็นกรดอะมิโน โปรตีนหรือชีวมวลที่มีประโยชน์ ซึ่งขนของสัตว์ปีกจัดว่าเป็นแหล่งโปรตีนสูงแหล่งหนึ่งที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์นำมาเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์สามารถย่อยโครงสร้างที่แข็งแรงของเคราตินซึ่งเป็นโปรตีนของขนสัตว์ปีกได้อย่างสมบูรณ์ (Anwar and Saleemuddin ,1998)

2.4 เอนไซม์อะไมเลส (Amylases) (ปราณี,2535)

เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ α-1,4 glycosidic ในโมเลกุลแป้ง ไกลโครเจน และพอลิแซคคาร์ไรด์ที่เกี่ยวข้อง โดยไม่สามารถย่อยพันธะ α-1,6 glycosidic หรือบางชนิดย่อยได้แต่ช้ามาก

2.4.1 อะไมเลสแบ่งได้สองกลุ่ม 2 กลุ่มคือ

2.4.1.1 Endo-amylase ได้แก่ α-amylase ซึ่งย่อยสลายพันธะ α-1,4glycosidic ในโมเลกุลของสับสเตรทแบบสุ่ม (random)

2.4.1.2 Exo-amylase มี 2 ชนิดคือ

ก. ß-amylase ย่อยสลายพันธะ α-1,4glycosidic จากปลาย non-reducing ได้มอลโตสครั้งละ 1โมเลกุล

ข. glucoamylase ย่อยสลายพันธะ α-1,4 glycosidic จากปลาย non-reducing ได้กลูโคสครั้งละ 1 โมเลกุลและสามารถย่อยสลายพันธะ α-1,6 glycosidic ได้ในอัตราที่ช้ามาก

2.4.2 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์อะไมเลสในอุตสาหกรรม

2.4.2.1 อุตสาหกรรมทอผ้า กรรมวิธีในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ดังนั้นจะทำให้ด้ายดิบขาดง่าย ฉะนั้นก่อนที่จะนำด้ายมาทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้งเพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนแล้วต้องนำเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยนำไปย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส แล้วจึงนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีนี้ใช้ได้กับการทอผ้าฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม (Windish and Mhatre ,1965)

2.4.2.2 การทำให้น้ำผลไม้ใส โดยปกติน้ำผลไม้คั้นจะมีลักษณะขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่เอนไซม์อะไมเลส บ่มไว้ที่ 80-90 องศาฟาเรนไฮต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองน้ำตาลที่ได้นำไปทำเยลลี่ต่อไป (Windish and Mhatre ,1965)

2.4.2.3 อุตสาหกรรมการทำขนมปัง ปกติจะเติมเอนไซม์ชนิด dextrinogenic enzyme ลงไปในแป้งที่ใช่ทำขนมปังเพื่อทำให้โมเลกุลแป้งขนาดใหญ่ลดลงได้ และเติมชนิด saccharogenic enzyme เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลบางส่วน (Windish and Mhatre ,1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

2.5.1 เอนไซม์เซลลูเลส แบ่งออกได้ 3 ชนิด ซึ่งมีกิจกรรมแตกต่างกันดังนี้ (Bhat,1997)

2.5.1.1 endo-ß – glucanase หรือ 1,4-ß-D-glucan glucanohydrolase หรือ CMCase ตัดพันธะ ß-1,4-glycosidic ภายในสายเซลลูโลสอย่างสุ่มได้กลูโคสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ทำให้ลดความยาวของโพลิเมอร์ลงอย่างรวดเร็ว แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์จะเพิ่มขึ้นช้า

2.5.1.2 exo-ß- glucanaseหรือ1,4-ß-D-glucan cellobiohydrolaseหรือ avicelase ตัดสายเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducing ได้กลูโคส ทำให้น้ำตาลรีดิวส์เพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็ว แต่ความยาวของโพลิเมอร์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

2.5.1.3 ß-glycosidase หรือ cellobiase ย่อยเซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกแซคคาไรด์เป็นกลูโคส

ดังนั้น crystalline cellulose จะย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ส่วนสับสเตรทที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียวคือ acid-swollen cellulose , carboxymethyl – cellulose (CMC) , cellulose azure และ trinitrophenyl carboxymethyl – cellulose ซึ่งจะถูกย่อยโดย endogluconase ส่วนสับสเตรทที่ถูกย่อยด้วย exoglucanase ได้แก่ MUC (methlyumbelliferyl-ß-D-glucopyranoside) และ pNPC(p-nitrophynyl-ß-D-cellobioside) ส่วน MUG (methlyumbelliferyl-ß-D-glycopyranoside) และ pNPC (p-nitrophynyl-ß-D- glycopyranoside) ถูกย่อยโดย ß-glucosidases นอกจากนี้สับสเตรทที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์สองชนิดร่วมกันได้แก่ filter paper และ avicel ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase (Han *et al.*,1995) โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ รา แบคทีเรีย และแอคติโนไมสีท โดยเฉพาะราสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ แต่เอนไซม์จากราเกิดกิจกรรมได้ดีที่สภาวะที่เป็นกรด ส่วนเอนไซม์จากแบคทีเรียนั้นมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูง และ ทนความเป็นด่างได้ดีทำให้สามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง

2.5.2 ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลส

จากความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและคุณสมบัติที่คงทนต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในสภาพแวดล้อมทำให้สามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในอุสาหกรรมต่างๆ (Bhat *et al.*, 1997)

2.5.2.1 อุตสาหกรรมอาหาร เอนไซม์เซลลูเลสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิต เช่น ในการสกัดน้ำผลไม้ และน้ำมันจากเมล็ดพืช ใช้ในการแยกโปรตีนจากถั่วเหลืองและมะพร้าว หรือแยกแป้งจากข้าวโพดหรือมันฝรั่ง สกัดวุ้นจากสาหร่าย

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทะเล เป็นต้น รวมทั้งการเพิ่มคุณภาพของผลผลิต เช่น การทำให้น้ำผลไม้ใส การกำจัดเปลือกของถั่วเหลืองในการหมักเพื่อผลิตซอสถั่วเหลือง การกำจัดผนังเซลล์ซึ่งช่วยให้มีการปล่อยกลิ่นรส เอนไซม์ โพลีแซคคาไรด์ และโปรตีน หรืออาจใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการปรับปรุงคุณภาพของอาหารหมัก หรือการผลิต เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ กลูโคส และน้ำตาลที่ละลายได้อื่นๆ จากวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นเซลลูโลส

2.5.2.2 อุตสาหกรรมผลิตเบียร์และไวน์ เอนไซม์เซลลูเลสนำมาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพเบียร์ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อย ß 1-3 และ ß 1-4 glucan ซึ่งพบในข้าวบาร์เลย์คุณภาพต่ำ และช่วยในการกรองเบียร์ รวมทั้งเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์

2.5.2.3 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการตัดย่อยวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส กำจัดเปลือกธัญพืช และการผลิตหญ้าหมัก เพื่อทำให้สัตว์เคี้ยวเอื้องย่อยอาหารได้ง่ายขึ้น

2.5.2.4 อุตสาหกรรมสิ่งทอ เอนไซม์เซลลูเลส มีประโยชน์ในการกำจัดสีส่วนเกินบนเนื้อผ้า หรือเพื่อกำจัดเส้นใยเล็กที่เกิดขึ้นหลังจากการซักหลายๆครั้งเพื่อทำให้เนื้อผ้าฝ้ายนุ่มขึ้นและมีสีสดขึ้น

นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมยา การผลิตโปรโตพลาสต์ รวมทั้งการจัดการของเสียและสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hakamada *et al.* (1997) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ชนิด endo 1,4-ß-glucanase ของ *Bacillus sp.* KSM-S237 โดยทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal คือ EGNTREDNFKHLGDNVKR โดยเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 86 กิโลดาลตัน และค่า pI เท่ากับ 3.8 และพบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการทำงานในช่วง pH 8.6-9.0 ได้ดี และเกิดกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยมีความคงตัวได้เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 30 % หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส pH 9.0 เป็นเวลา 10 นาที

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนนั้น จะเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารประเภทโปรตีนชนิดต่างๆ โดยเกิดจากเอนไซม์โปรติเอสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนจะแตกต่างกันตามความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนชนิดต่างๆเช่น บางชนิดสามารถย่อยโปรตีนจากหางนม บางชนิดสามารถย่อยโปรตีนจากไข่ขาวผงและบางชนิดสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้ง 2 ชนิดทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับแหล่งโปรตีนที่นำมาทดสอบ (Maxcy and Sikes ,1979)

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบในขยะและน้ำเสียต่างๆ ได้แก่เอนไซม์เซลลูเลส เป็นextracellular ,hydrolytic enzyme พบได้ในเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergilus spp.* , *Chaetomium spp.* ,*Penicillium spp.* , *Fusarium spp.* ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Cellulomonas spp.* , *Bacillus spp.* , *Pseudomonas spp.* และ ในแอคติโนมัยสิท เช่น *Streptomyces spp.* , *Thermomonospora spp.* (Bellamy,1977) เอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วย endo 1,4-ß-glucanases , exo 1,4-ß-glucanasesและ1,4-ß-glucosidaseซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะรวมกันย่อยเซลลูโลสได้กลูโคส (Bhat and Maheshwari ,1987 ; Eriksson , Blanchette and Ander , 1990)

เอนไซม์อะไมเลส เป็น extracellular enzyme ซึ่งประกอบด้วย exoamylase และ endoamylase (Ingle and Erickson , 1978) สามารถย่อยแป้งได้กลูโคส พบในแบคทีเรีย *Bacillus spp.* , *Pseudomonas spp.* และ ในแอคติโนมัยสิท เช่น *Streptomyces spp.* , *Actinomyces spp.* ,*Thermomonospora spp* (Upton and Forgaty , 1977) และในเชื้อราเช่น *Mucor spp.* , *Rhizopus spp.* , *Aspergillus spp.* อะไมเลสในแบคทีเรียมักเป็น α- amylase ซึ่งเป็น endoamylase ย่อยแป้งได้กลูโคสและมอลโตส เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ดี (Medda and Chandra , 1980) อะไมเลสอีกประเภทหนึ่งคือ exoamylase ได้แก่ ß-amylase ซึ่งจะย่อยแป้งได้มอลโตสและเดกซ์ทริน , glucoamylase ย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ คือ ให้ผลเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว

จากรายงานของ ขจีนาฏและคณะ (2541) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยจากการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น Soluble starch วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 20.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร แหล่งไนโตรเจนเป็น Peptone วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 44.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณ 0.1 และ 0.3 กรัม/ลิตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 65.21และ 72.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร แปรผันปริมาณของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 3 กรัม/ลิตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 87.70 หน่วยต่อมิลลิลิตร แปรผันปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 91.89 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากรายงานของ ธนาสิน และ สุภาพรรณ (2543)ได้นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี CMC1.0% เป็นแหล่งคาร์บอน เก็บตัวอย่างส่วนใสโดยใช้ระยะเวลา 1 วัน เพื่อใช้เป็น crude enzyme เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูเลส พบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 2 และ 5 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ระยะเวลา 1 วันมีค่าเท่ากับ 0.444 และ1.998 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากรายงานของ สุมาลี สมใจ และขจีนาฐ (2541) ได้ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำเสียและดินจากแหล่งต่างๆที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ skim milk , tributyrin , starch , xylan และ carboxy methyl cellulose ได้จำนวน 259 isolates และได้คัดเลือกเชื้อที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบทั้ง 5 ชนิดไว้จำนวน 20 isolates และคัดเลือกเชื้อมาใช้ในการบำบัดขยะ พบว่าการเติมเชื้อเพิ่มเติมจากเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ทำให้การย่อยสารประกอบเกิดขึ้นได้ในอัตราที่รวดเร็วกว่าขยะชุดควบคุม (ขยะที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์) และทำให้น้ำหนักของขยะลดลงได้มากกว่าขยะชุดควบคุมถึง 2 เท่า และในปีเดียวกัน สุมาลี สมใจ และขจีนาฐ ได้คัดเลือกเชื้อมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศ พบว่า การเติมเชื้อสามารถลดค่า BOD ในน้ำเสียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ได้ดีกว่าชุดควบคุมถึง 70.86 % และแบบให้อากาศโดยการเขย่าการเติมเชื้อสามารถลดค่า BOD ในน้ำเสียได้ดีกว่าชุดควบคุมถึง 30.48%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง

1. ขวดรูปชมพูขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
2. ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 ,100 และ 1,000 มิลลิลิตร
3. ปิเปตขนาด 1 , 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. จานเพาะเชื้อ
5. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
6. หลอดทดลองขนาด 16X150
7. บีกเกอร์ขนาด 100 , 150 , 250 , 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
8. กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
9. ลูปเขี่ยเชื้อ
10. กรวยแก้ว
11. เทอร์โมมิเตอร์
12. ลูกแก้ว
13. แท่งแก้ว
14. ช้อนตักสาร
15. ขวดสีชา
16. ขวดพลาสติก
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์
18. สำลี
19. กระดาษทิชชู่
20. หม้อ
21. เตาแก๊ส
22. เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ GFL รุ่น 3017
23. เครื่อง Centifuge ยี่ห้อ Jouan รุ่น Gr4-11
24. ตู้เพาะเชื้อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (Incubator) ยี่ห้อ Heraeus รุ่น B6420
25. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแบบไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26. ตู้เขี่ยเชื้อ ยี่ห้อ Microflow รุ่น ABS 1200
27. ตู้เขย่าบ่มที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (Incubator Shaker)
28. เครื่องชั่งสาร ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP3100s
29. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น M00
30. Vortex mixer ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น Vortex-2 -Genie

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (SMA)
2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)
3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)
4. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Starch agar
5. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ CMC
6. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Production medium
7. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Inoculum medium

3.4 สารเคมี

1. 70% alcohol
2. 95% alcohol
3. Iodine
4. NaCl
5. congo red 0.5%
6. Tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.1M
7. HCl 0.1 M
8. $NaH_2PO_4.2H_2O$
9. $Na_2HPO_4.7H_2O$
10. DNSA
11. NaOH
12. K,Na-Tartrate
13. $CuSO_4.5\ H_2O$
14. Na_2HPO_4
15. Na_2SO_4 anhydrous
16. $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. $Na_2HaSO_4.7H_2O$

18. Sodium Potassium Tartate

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารโปรตีน แป้ง และเซลลูโลส ได้

โปรตีน (วิชชุลดา,2544)

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีน (proteolytic activity)สูง โดยการเพาะเลี้ยงแบบการปลูกถ่าย (point-inoculate) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (SMA) (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน โดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) กับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอัตราส่วนดังกล่าวสูงสุด 5 อันดับแรก

แป้ง

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร NA (ภาคผนวก ก) มาเลี้ยงด้วยอาหาร NB (ภาคผนวก ก) จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญปริมาตร 10 µl มาหยดลงบนอาหาร starch agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังจากมีการเจริญของเชื้อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงไปบริเวณที่มีการย่อยสลายแป้งจะไม่เกิดปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจึงเกิดเป็นบริเวณใสขึ้นรอบโคโลนีตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส กับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอัตราส่วนดังกล่าวสูงสุด 5 อันดับแรก

เซลลูโลส

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร NA (ภาคผนวก ก) มาเลี้ยงด้วยอาหาร NB (ภาคผนวก ก)จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารที่มี CMC เป็นส่วนประกอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากมีการเจริญของเชื้อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยการหยดสารละลาย congo red 0.5 % เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างสี (destrain) ด้วยสารละลาย NaCl 1 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที บริเวณที่มีการย่อยสลายเซลลูโลสจะเกิดเป็นบริเวณใสขึ้นรอบโคโลนี ตรวจสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส โดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส กับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอัตราส่วนดังกล่าวสูงสุด 5 อันดับแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

การผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ขจีนาฏและคณะ,2540)

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาใส่ลงในอาหารเหลว inoculum medium (ภาคผนวก ก) และบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร production medium (ภาคผนวก ก) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์โดยใช้ refrigerated centrifugeที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (รุจิกาญจน์,2546)

เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว nutrient broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นดูดกล้าเชื้อใส่ในอาหารเหลว CMC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์โดยใช้ refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.6 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีการของขจีนาฏและคณะ (2540)
2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีการของรุจิกาญจน์ (2546)

3.7 สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์ ห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร และห้องปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารโปรตีน แป้ง และเซลลูโลส

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (SMA) , Starch Agar และอาหารที่มี CMC เป็นส่วนประกอบตามลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบการปลูกถ่าย (point-inoculate) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าผลิตเอนไซม์โปรติเอสนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส และเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี แล้วนำมาคิดเป็นอัตราส่วนจะได้ผลดังตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ

สายพันธุ์ที่	อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี
B1	2.437
B4	3.112
B5	2.535
B6	2.198
B7	2.059
B8	3.225
B10	2.705
B11	2.864
B12	2.157
B14	2.859
B17	1.824
B18	2.919
B20	2.858
B21	3.056
B22	2.290

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ที่	อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี
B23	2.053
B24	2.673
B32	1.866
B33	2.088
B34	2.169

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า เชื้อแบคทีเรียหมายเลข B4 , B8 , B11 , B18 และ B21 สามารถย่อยสลายโปรตีนเป็นอย่างดี เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในหมายเลขอื่น โดยดูจากผลของอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี จากรายงานของสุมาลีและคณะ (2541) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดิน และน้ำเสียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Skim Milk Agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่ให้อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี มีค่ามากกว่า 25 ขึ้นไปจำนวน 12 isolates แล้วมีเชื้อแบคทีเรียรหัส Sk10 ให้ค่าสูงสุดถึง 44 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้ จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีน้อยกว่ารายงานดังกล่าวมาก

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ

สายพันธุ์ที่	อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี
B4	1.07
B6	1.08
B7	1.08
B10	1.07
B12	1.08
B14	1.08
B17	1.08
B24	1.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สายพันธุ์ที่	อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี
B42	1.07
B43	1.07
B44	1.08
B45	1.08
B46	1.08
B47	1.07
B48	1.08
B49	1.08
B50	1.07

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ

สายพันธุ์ที่	อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี
B1	1.50
B5	1.30
B6	1.18
B7	1.16
B8	1.59
B11	1.28
B12	1.11
B17	1.33
B18	1.03
B20	1.13
B21	1.22
B22	1.24
B23	1.10
B34	1.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

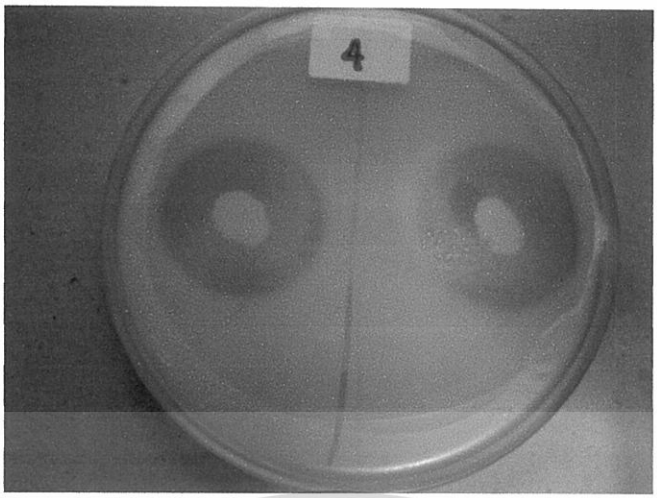
สายพันธุ์ที่	อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนี
B37	1.14
B39	1.29
B41	1.14
B43	1.15

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 พบว่า เชื้อแบคทีเรียหมายเลข B6 , B7 , B12 , B17 และ B43 สามารถย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในหมายเลขอื่น โดยดูจากผลของอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีกับขนาดโคโลนีของเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียหมายเลขดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสในการทดลองขั้นต่อไป

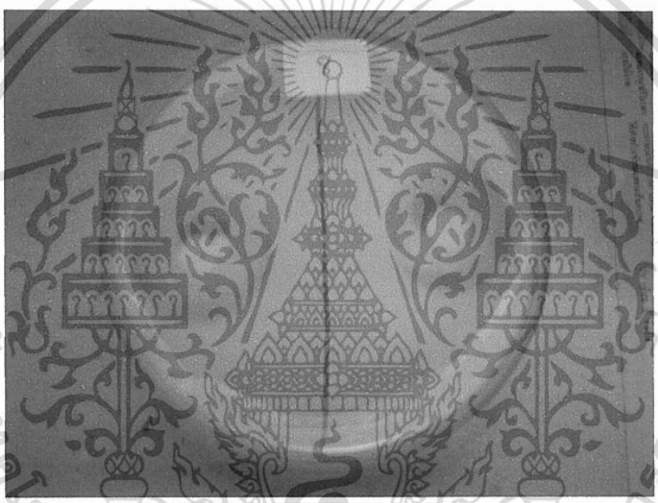
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

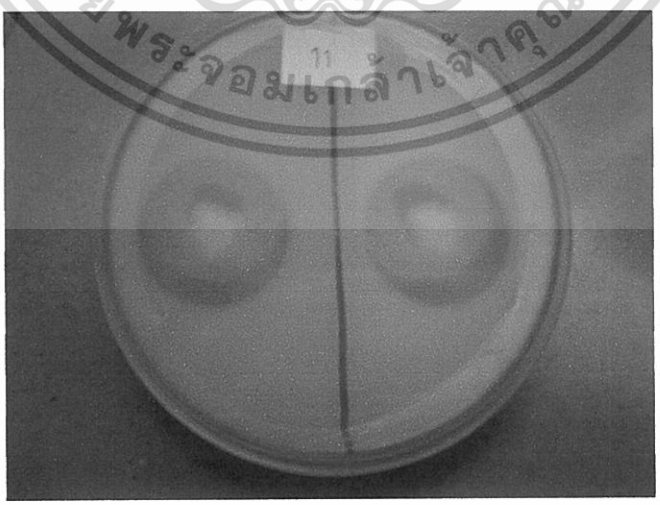
96487



ก.



ข.



ค.

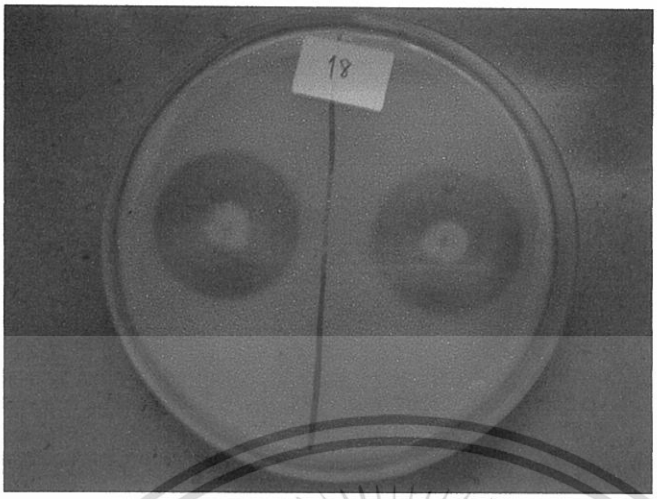
ภาพที่ 1 ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนี

ก. เชื้อแบคทีเรียรหัส B4

ข. เชื้อแบคทีเรียรหัส B8

ค. เชื้อแบคทีเรียรหัส B11

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

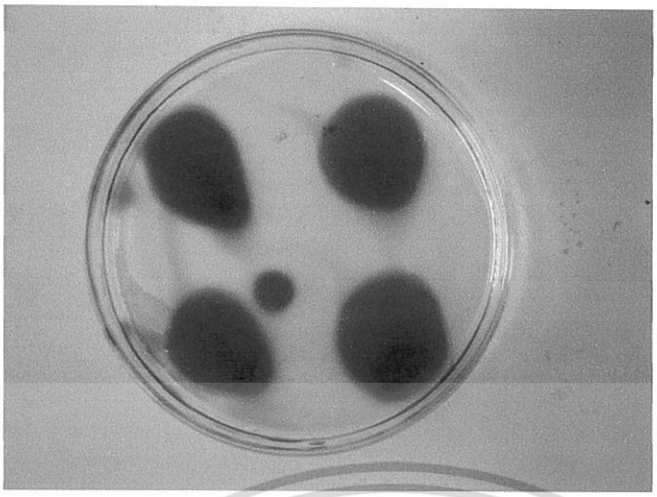
ข.

<u>ภาพที่ 2</u> ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนี

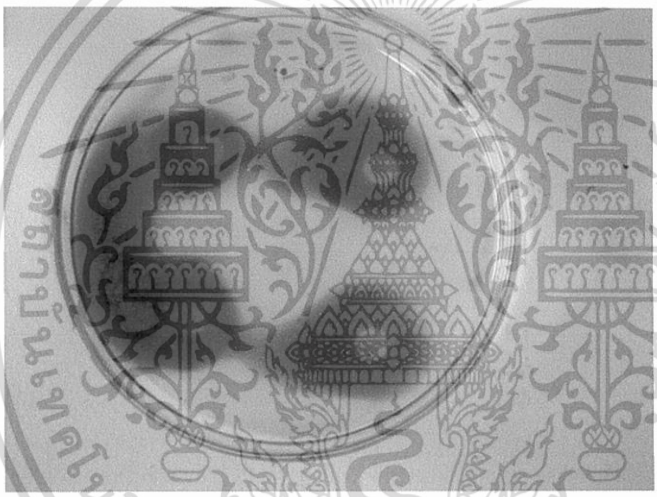
ก. เชื้อแบคทีเรียรหัส B18

ข. เชื้อแบคทีเรียรหัส B21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.



ข.

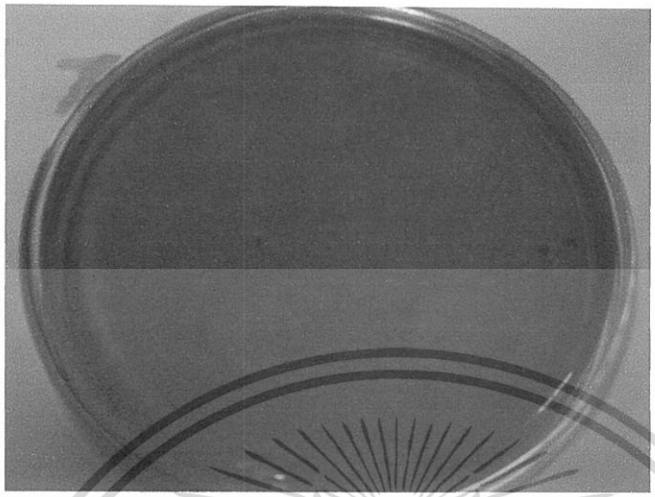
<u>ภาพที่ 3</u> ผลทดสอบการย่อยสลายแป้งของเชื้อแบคทีเรีย

ก. แสดงผลการไม่ย่อยสลายแป้ง

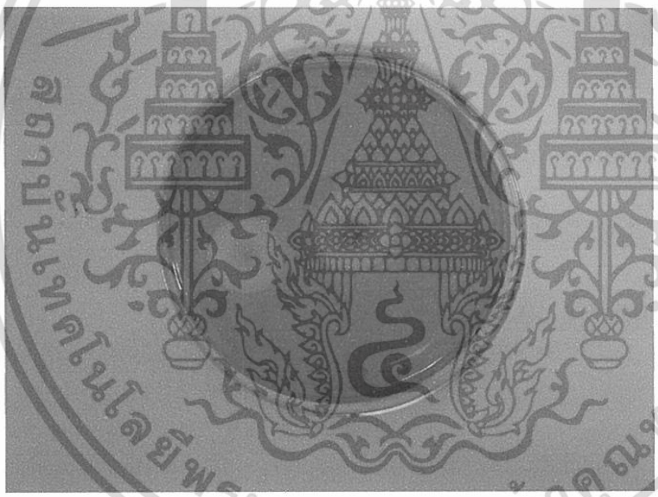
ข. แสดงผลการย่อยสลายแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21086



ก.



ข.

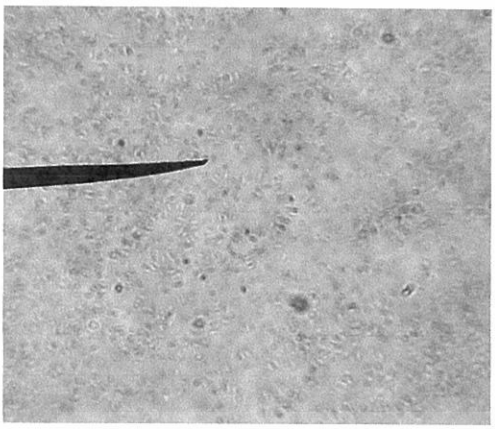
<u>ภาพที่ 4</u> ผลทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย

ก. แสดงผลการไม่ย่อยสลายเซลลูโลส

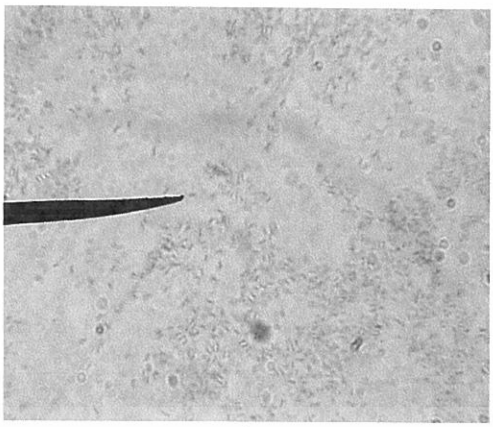
ข. แสดงผลการย่อยสลายเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หองสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง



ก.



ข.

ค.

ง.

<u>ภาพที่ 5</u> ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์

ก. เชื้อแบคทีเรียรหัส B6

ข. เชื้อแบคทีเรียรหัส B7

ค. เชื้อแบคทีเรียรหัส B12

ง. เชื้อแบคทีเรียรหัส B17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายแป้ง และเซลลูโลส คือ เชื้อแบคทีเรียหมายเลข B6 , B7 , B12 , B17 และ B43 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาใส่ลงในอาหารเหลว inoculum medium และบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 10 % โดยปริมาตรลงในอาหาร production medium นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ เก็บส่วนน้ำใส ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งผลการทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้ดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของเอนไซม์อะไมเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ

เชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
B6/1	0.216	0.227	0.265	0.236
B6/2	0.228	0.361	0.396	0.328
B7/1	0.354	0.396	0.466	0.405
B7/2	0.343	0.306	0.304	0.318
B12/1	0.303	0.321	0.304	0.309
B12/2	0.296	0.252	0.214	0.254
B17/1	0.259	0.273	0.44	0.259
B17/2	0.300	0.287	0.287	0.291
B43/1	0.344	0.306	0.305	0.318
B43/2	0.391	0.319	0.307	0.339

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ

เชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
B6/1	0.5498	0.69
B6/2	0.8350	
B7/1	1.0310	0.92
B7/2	0.8096	
B12/1	0.7867	0.72
B12/2	0.6466	
B17/1	0.6594	0.70
B17/2	0.7408	
B43/1	0.8096	0.84
B43/2	0.8630	

1 หน่วยของเอนไซม์ = ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคสภายใน 1 นาที ที่ pH 6.9 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายแป้ง และเซลลูโลส คือ เชื้อแบคทีเรียหมายเลข B6 , B7 , B12 , B17 และ B43 เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นดูดหัวเชื้อใส่ในอาหารเหลว CMC บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ เก็บส่วนน้ำใส ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งผลการทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้ดังตารางที่ 6-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ

ชนิด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
B6/1	-	0.092	0.117	0.104
B6/2	0.084	0.081	0.087	0.084
B7/1	0.083	0.071	0.086	0.080
B7/2	0.079	-	0.038	0.058
B12/1	0.242	0.203	0.230	0.225
B12/2	0.179	0.172	0.232	0.194
B17/1	0.345	0.379	-	0.362
B17/2	0.202	-	0.240	0.221
B43/1	-	0.154	0.150	0.152
B43/2	-	-	0.119	0.119

ตารางที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติ

ชนิด	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
B6/1	5.200	4.70
B6/2	4.200	
B7/1	4.000	3.45
B7/2	2.900	
B12/1	11.250	10.48
B12/2	9.700	
B17/1	18.100	14.58
B17/2	11.050	
B43/1	7.600	6.78
B43/2	5.950	

1 หน่วยของเอนไซม์ = ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคสภายใน 1 นาที ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายแป้งและซลลูโลสได้สูงมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิต crude enzyme จากนั้นนำ crude enzyme ที่ได้ไปศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียหมายเลข B17 ให้ กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 14.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียหมายเลข B12 , B43 ,B6 และ B7 ให้กิจกรรมรองลงมาตามลำดับ จากรายงานของ ธนาสิน และสุภาพรรณ (2543) ได้นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี CMC1.0% เป็นแหล่งคาร์บอนเก็บตัวอย่างส่วนใสโดยใช้ระยะเวลา 1 วัน เพื่อใช้เป็น crude enzyme เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 2 และ 5 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ระยะเวลา 1 วันมีค่าเท่ากับ 0.444 และ1.998 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากรายงานของรุจิกาญจน์ (2546) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูง โดยวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเหลวโดยใช้ CMC เป็นสารตั้งต้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่า 0.0017 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้13 isolates พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส CC41ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่ารายงานดังกล่าว สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสนั้น พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมเอนไซม์ชนิดนี้สูงที่สุดคือ หมายเลข B7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.92 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรียหมายเลข B43 , B6 , B12 และ B17 ให้กิจกรรมรองลงมาตามลำดับ และจากรายงานของขจีนาฐและคณะ (2540) โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียรหัส A ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 10.94 หน่วยต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 และ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำขนาดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข B6 , B7 , B12 , B17 และ B43 ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลสมาเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 8 ดังนี้

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง บริเวณใส กับ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เชื้อ	เอนไซม์อะไมเลส		เชื้อ	เอนไซม์เซลลูเลส	
	บริเวณใส	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์		บริเวณใส	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์
B6	1.08	0.69	B6	1.18	4.70
B7	1.08	0.92	B7	1.16	3.45
B12	1.08	0.72	B12	1.11	10.48
B17	1.08	0.70	B17	1.33	14.58
B43	1.07	0.84	B43	1.15	6.78

จากผลการทดลองทั้งเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย ผลคือ ความกว้างของบริเวณใส ไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ซึ่งจะเห็นได้ว่าความกว้างของบริเวณใสที่สูง ไม่ได้แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะต้องสูงตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเบื้องต้นในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโปรตีน แป้งและเซลลูโลสจากแหล่งธรรมชาติโดยอาศัยความสามารถในการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง 3 ชนิดคือ Skim Milk Agar , Starch Agar และอาหารที่มี CMC เป็นส่วนประกอบตามลำดับ โดยเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนี โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สามารถให้อัตราส่วนของขนาดบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีสูง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีอัตราส่วนของขนาดบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีสูง 5 isolates คือ เชื้อแบคทีเรียหมายเลข B4 ,B8 ,B11 , B18 และ B21

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลสไปส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกัน จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียมา 5 isolates คือ เชื้อแบคทีเรียหมายเลข B6 , B7 , B12 , B17 และ B43 จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส B7 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่ค่าเท่ากับ 0.92 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CMC จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส B17 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่ค่าเท่ากับ 14.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาทำให้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง และเซลลูโลสจากแหล่งธรรมชาติ โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และเป็นแนวทางในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการบำบัดน้ำเสีย และการกำจัดขยะต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาต่อไปว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่าอย่างไร
2. ควรมีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อที่คัดเลือกเพิ่มเติม
3. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพิ่มเติม เช่น ชนิด,ปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pH และอุณหภูมิ ที่ระดับต่างๆ เป็นต้น
4. ควรศึกษาถึงผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล,สุมาลี เหลืองสกุลและสมใจ ศิริโภค. 2540.**รายงานการวิจัย เรื่องการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล,สุมาลี เหลืองสกุลและสมใจ ศิริโภค. 2541.**รายงานการวิจัย เรื่องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

ธนาสิน ธนะอนันต์โชค และ สุภาพรรณ โรจน์อัมพร. 2543. ปัญหาพิเศษ เรื่องการศึกษาเบื้องต้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง , กรุงเทพฯ.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ . 2537 . จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม . ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ , คณะวิทยาศาสตร์ ,สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบังฯ,กรุงเทพฯ.409น .

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ.2541.**จุลชีววิทยาทั่วไป** .พิมพ์ครั้งที่ 2 .สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์,กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง . 2535. **เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1.**จุฬาลงกรณ์มหาลัย, กรุงเทพฯ.หน้า140-143

รุจิกาญจน์ นาสนิท . 2546. **วิทยานิพนธ์ เรื่องการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและยีนที่เกี่ยวข้องจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิชชุลดา ช่วยฉิม . 2544. **วิทยานิพนธ์ เรื่องการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับย่อยเศษหัวกุ้ง.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สัตถาพร ศรีมหาสงคราม . 2528 . **วิทยานิพนธ์ เรื่องการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากบักเตรีเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมาลี เหลืองสกุล,สมใจ ศิริโภคและขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ . 2541. **รายงานการวิจัย เรื่องการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

สุดธิดา แสงยนต์ . 2548 . **วิทยานิพนธ์ เรื่องสมบัติของอัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Anwar,A and M. Saleemuddin .1998. Alkaline protease : a review. **Bioresource Technol** .64: 175-183.

Bellamy, W.D. 1977. Cellulose and lignocellulose digestion by thermophile Actinomycetes for SCP production. **Dev. Microbiol** . 18 :249-254.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bernfeld, P. 1995. Amylase α - and ß- In Methods in Enzymology. **(S. P.Colowick and M.O. Kaplan, eds.)** vol. 1 : 149, New York : Academic Press.

Bhat S.1997.Cellulase degrading enzymes and their potential industrial applications.**Biotechol.Adv**.15:583-620

Bhat , K.M. and Maheshwari , R. 1987. *Sporotrichum thermophile* growth , cellulose degradation, and cellulose activity . **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 53, No.9: 2175-2182.

Callahan , T and J. Herz .1989. **Flavor and Texture Improved Canned Animal Flesh and Process** . U.S. Patent 3,310,413.

Eriksson, K-E.L., Blanchette , R.A. and Ander , P. 1990.**Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer-Verlag Berlin Heilberg, Newyork.

Hagihara, B.,H. Matsubara, M. Nakai and K. Okunuki.1958. **Biochem.**(Tokyu) 45:185

Hakamada , Y., K. Kenzo ., Y.Tadashi., M.Hajime., K.Tohru and I.Susumu. 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, Bacillus sp. KSM-S237. **Extremophiles.** 1:151-156

Han,S.K., Y.J. Yoo and H.S. Kang.1995. Characterization of a bifunctional cellulose and its structural gene:The *cel* gene of Bacillus sp. D04 has exo – and endoglucanase activity. **J.Biol.Chem**.270:26012-26019

Ingle , M.B. and Erickson .1978 . Bacterial α – amylase . Advances in Applied Mocrobiology. 24:257-278

Kembhavi A.A., A. Kulharni and A.A. Pant, Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. **Applied. Biochem. Biotechnol. 38** (1993), pp. 83–92.

Maxcy, R.B. and A.Sikes . 1979 . Differentiation of food spoilage bacteria on the basis of their ability to utilize different proteins . **J.Food Sci.** 44 : 1228-1231 .

Medda, S. and Chandra, A.K.1980. New Strain of *B.licheniformis* and *B. coagulans* producing thermostable α – amylase active at alkaline . **J. of Applied Bacteriology**. 48:47-58.

Upton, M.E. and Forgaty, W.M. 1977. Production and purification of the thermostable amylase and protease of *Thermomonospora viridis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 33: 59-64.

Windish , W.W. and N.S. Mhatre. 1965 . Microbial amylases. **Advances in applied Microbiology** . 7:273-283

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (SMA)

agar	15	กรัม
skim milk	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

Inoculum medium

Soluble starch	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร, pH 7.0

Production medium

Soluble Starch	10	กรัม
Casamino acid	5	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร, pH 7.0

3. Nutrient broth (NB)

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

4. อาหารเหลว CMC

$NH_4H_2PO_4$	2.0	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
K_2HPO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
CMC	5.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	1	ลิตร

5. Nutrient agar (NA)

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

6. Tris HCl buffer

นำสารละลายTris(hydroxymethyl)aminomethane 0.1 Mและ HCl 0.1 Mผสมกันจนได้ ค่า pH เท่ากับ 9.0

7. Phosphate buffer (Deutscher,1990)

สารละลาย A : 0.2M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

ตารางผนวกที่ 1ก แสดงอัตราส่วนในการผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

A(มิลลิลิตร)	B(มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1ก (ต่อ)

A(มิลลิลิตร)	B(มิลลิลิตร)	พีเอช
56.5	46.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

นำ crude enzyme ซึ่งได้เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH6.9 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสับสเทรต 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีของ Bernfeld,1995 ซึ่งทำโดยการเติมสารละลาย DNSA 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส และแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งให้น้ำตาลรีดิวส์ 1 มิลลิกรัมในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

หมายเหตุ

2.1 สับสเทรต : 2% Soluble starch ใน 0.02 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.9

2.2 สารละลาย DNSA (Dinitrosalicylic acid)

DNSA	1	กรัม
2M.NaOH	20	มิลลิลิตร
K,Na-Tartrate	30	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1	ลิตร

2.3 เตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส

2.3.1เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0 , 0.25 , 0.5 , 0.75 , 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.2 เติมสารละลาย DNSA 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.3.3 นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

2.3.4 เขย่าให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย CMC ความเข้มข้น 0.5% ที่ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาจากนั้นนำมาหาน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นตามวิธีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Samogyi method (Nelson,1944)และสำหรับหลอดควบคุมใช้สารละลายเอนไซม์ซึ่งนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ในการหากิจกรรมของเอนไซม์นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสารตั้งต้นได้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

หมายเหตุ

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Samogyi-Nelson

1. การเตรียม reagent

- Somogyi

1. $CuSO_4.5\ H_2O$ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
2. ชั่ง Na_2HPO_4 28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium Potassium Tartate 120 กรัม คนให้ละลายจนหมดแล้วเติมสารละลาย NaOH 1 M 100 มิลลิลิตร เติม Na_2SO_4 anhydrous 120 กรัมเมื่อละลายจนหมดปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตรตั้งที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
3. ผสม ข้อ 1 และ ข้อ 2 ก่อนใช่

Nelson

1. ละลาย Ammoniummolybdate $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 25 กรัมในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ละลาย Disodium Arsenate ($Na_2HASO_4.7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกันเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันแล้วนำมาเก็บไว้ในขวดสีชา

2. การวิเคราะห์น้ำตาล

- เตรียมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 0 25 50 75 และ100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น

- เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลไม่เกิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- ปีเปตตัวอย่าง ที่เจือจางแล้ว(หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน) 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำยา Somogyi 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

- นำมาเติมน้ำยา Nelson 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

- อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ได้

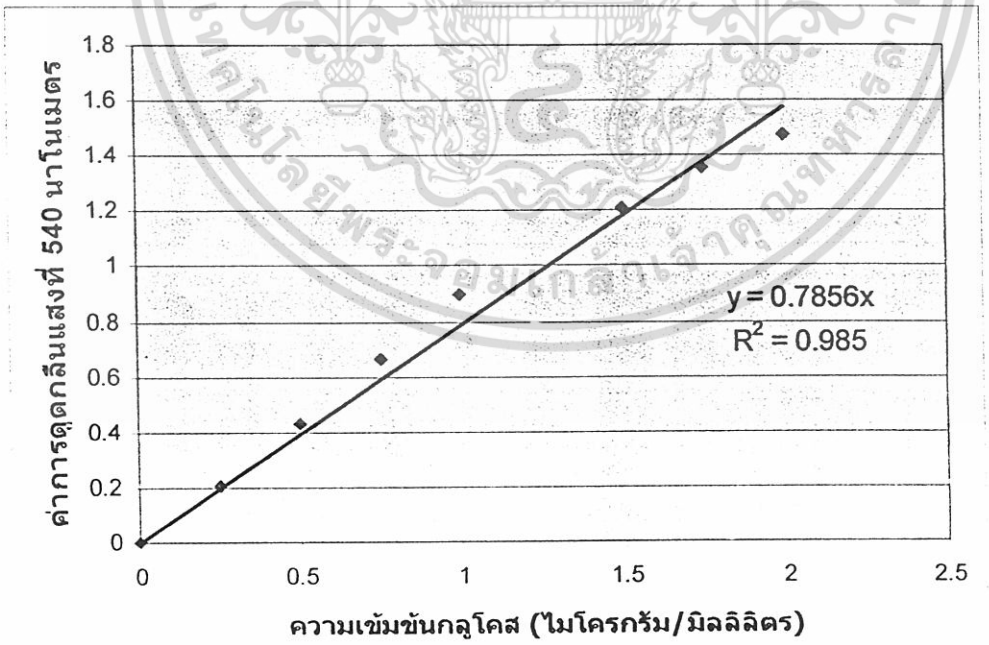
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ตารางผนวกที่ 1ค ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

กลูโคส (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.25	0.236	0.195	0.193	0.208
0.50	0.440	0.437	0.409	0.429
0.75	0.681	0.660	0.650	0.666
1.0	0.865	0.890	0.943	0.899
1.5	1.205	1.230	1.190	1.208
1.75	1.340	1.368	1.349	1.352
2.0	1.474	1.481	1.464	1.473

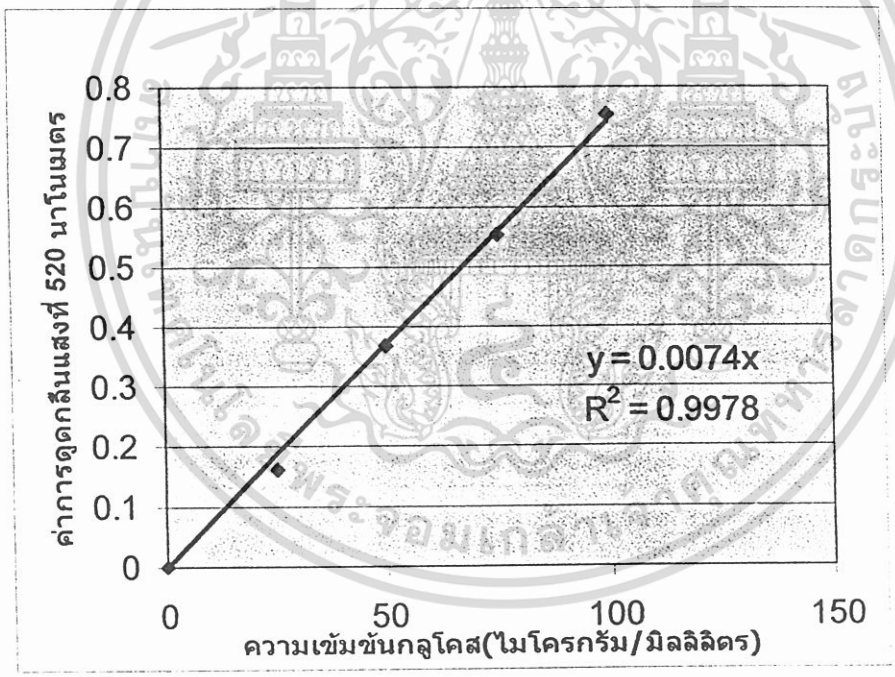


ภาพผนวกที่ 1ค กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2ค ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
25	0.224	0.227	0.243	0.1604
50	0.444	0.439	0.431	0.3674
75	0.631	0.592	0.646	0.5524
100	0.835	0.829	0.790	0.7534



ภาพผนวกที่ 2ค กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

2.1 เอนไซม์อะไมเลส

ตัวอย่างการคำนวณ unit enzyme

จาก standard curve ได้ Y = 0.7856X

Reaction time = 5 นาที

Dilution factor = 5 เท่า

ปริมาตรสารละลายที่ปิเปตมา = 0.5 มิลลิลิตร

สมมติว่า A540 = Y ซึ่งคำนวณจาก standard curve จากสมการ Y = 0.7856X

B6/1 ครั้งที่ 1 แทนค่า 0.216 = 0.7856X

X = 0.2749 มิลลิกรัม

Dilution factor 5 เท่า = 0.2749x 5 = 1.3745 มิลลิกรัม

เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที เพราะฉะนั้น ถ้า 1 นาที = 1.3745 /5 มิลลิกรัม

= 0.2749 มิลลิกรัม

เพราะฉะนั้น actitvity ของเอนไซม์ที่ได้ = 0.2749 units/0.5ml

= 0.5498 units/ml

2.2 เอนไซม์เซลลูเลส

ตัวอย่างการคำนวณ unit enzyme

1 unit enzyme = 1 µmole ของซับสเทรตที่ถูกย่อยใน1นาที

= 1 µmole ของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1นาที

= 180 ไมโครกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1นาที

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที = 1 unit enzyme

1.000 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 30 นาที = 1/(0.180*30)

= 0.185

จากกราฟมาตรฐานกลูโคส ได้สมการ คือ Y = 0.0074X

B6/1 ครั้งที่ 2 แทนค่า 0.092 = 0.0074X

X = 12.43

โ คย X คือ ปริมาณกลูโคสที่ได้ในเวลา 30 นาที

แทนค่า = X *(0.185) units enzyme

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5มิลลิลิตร= 12.43*(0.185)unit enzyme

1 มิลลิลิตร= 12.43 *(0.185) /0.5units/มิลลิลิตร

= 4.5991 units/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้