การศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท

STUDIES ON α-AMYLASE PRODUCED BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL USING DURAIN SEEDS AS SUBSTRATE

อรอุมา สวัสดิ์กิจ

ON-UMA SAWATKIJ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-025-7

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท

STUDIES ON α-AMYLASE PRODUCED BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL USING DURAIN SEEDS AS SUBSTRATE

อรอุมา สวัสดิ์กิจ

ON-UMA SAWATKIJ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-925-7

หมู่.....
ทะเบียน 48940
, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2547

b.....
i.....

STUDIES ON α-AMYLASE PRODUCED BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL USING DURAIN SEEDS AS SUBSTRATE

ON-UMA SAWATKIJ

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2003

ISBN 974-324-925-7

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท

STUDIES ON α-AMYLASE PRODUCED BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL USING DURIAN SEEDS AS SUBSTRATE

ชื่อนักศึกษา นางสาวอรอุมา สวัสดิ์กิจ

รหัสประจำตัว 44065203

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชิต	
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
ผศ.อารี	ฤทธิบูรณ์	
ดร.บุญเทียม	พันธุ์เพ็ง	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 17 พฤศจิกายน 2546 เวลา 9.30-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 422

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญรัตน์ อัตชู)

รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 15 **เดือน** ธันวาคม **พ.ศ.** 2546

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท
นักศึกษา	นางสาวอรอุมา สวัสดิ์กิจ
รหัสประจำตัว	44065203
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

เนื้อหาวิทยานิพนธ์เล่มนี้นำเสนอถึงการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียจากดินที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 230 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาคัดเลือกซ้ำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวขั้นต่ำที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ E90 มาใช้ในงานวิจัย และผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยระบบเอ พี ไอ พบว่าเชื้อ E90 จัดเป็น *Bacillus cereus*

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียนที่ใช้ปั่นสับสเตรท พบว่ามีแป้งร้อยละ 25.73 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.55 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.81 โปรตีนร้อยละ 1.12 ของน้ำหนักแห้ง และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 11.52 โดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 101.24 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เมื่อใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 โดยเติมสารละลายเกลือแร่ เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งคาร์บอน เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทพบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 100.43 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เมื่อใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท และพบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักเดียวกัน โดยการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของ *Bacillus cereus* E90 และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60-80 จากนั้นนำสารละลายตะกอนไปปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรอง Centricon Plus-20 ที่มี Molecular Weight Cut off 30,000 ดาลตัน พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเท่ากับ 193.70 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.62 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 2.17 โดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์คงตัวที่ช่วงพีเอชเท่ากับ 4.0-8.0 และคงตัวที่ช่วงอุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส

Thesis Title	Studied on α-Amylase Produced by Bacteria Isolated from Soil Using Durian Seeds as Substrate
Student	Miss On-uma Sawatkij
Student ID	44065203
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Sookjai Choojun

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study about α-amylase produced by bacteria isolated from soil using durian seeds as substrate. The results were as follows : the α-amylase organisms were isolated from soil by using a selective medium as starch agar at 37 ^{0}C that 230 isolates were obtained. The α-amylase-producing bacterial strains were isolated and confirmed for α-amylase activity in minimal medium by quantitative assay. Among them strain E90 showed the highest α-amylase activity at 37, 45 and 50 ^{0}C. So strain E90 was selected for studies on α-amylase production. The strain E90 was further identified with the method of API 50 CHB test and designated as *Bacillus cereus.*

It was from the study found that fresh unfermented durian seeds contained 25.73% starch, 1.55% total sugar, 0.81% reducing sugar, 1.12% protein on a dry weight basis and 11.52% initial moisture content. A maximal α-amylase activity produced by *Bacillus cereus* E90 was 101.24 U/g at 48 hours of fermentation when using durian seed 75-150 μm as substrate, 15% (w/v) inoculum size, 70% initial moisture content by adding mineral salt solution , 1% (w/w) soluble starch as additional carbon source and 1% (w/w) yeast extract as additional nitrogen source. The medium was adjusted to a initial pH of 8.0 and incubated at 37 ^{0}C. The results of substrates comparison were as follows : a maximal α-amylase activity produced by *Bacillus cereus* E90 was 100.43 U/g at 48 hours of fermentation when durian seeds was used as substrate. *Bacillus cereus* E90 showed higher α-amylase activity than *Bacillus subtilis* TISTR 25 under solid state fermentation. The α-amylase production was coupled with growth of *Bacillus cereus* E90 and became the maximal value in the late exponential growth phase at 48 hours of fermentation.

A study of some properties of α-amylase by precipitating with 95% ethanol at 60-80% saturation was performed. The precipitate was centrifuged by Centricon Plus-20 Molecular Weight Cut off 30,000 Da. The enzyme was purified up to 3.62 folds of initial activity. The specific activity and yield of α-amylase were 193.70 U mg^{-1} protein and 2.17% respectively. The optimal pH and temperature of this enzyme were 8.0 and 70 ^{0}C respectively, the stable pH range was 4.0-8.0 and stable temperature range was 20-70 ^{0}C.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ทั้งด้านความรู้และคำแนะนำจาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง และ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ ซึ่งได้ให้ความรู้และคำปรึกษาแนะนำต่างๆ ตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอบพระคุณในความอนุเคราะห์ของท่านเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ. ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการตรวจรูปเล่มและให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณป้า และคุณแม่ ที่คอยสนับสนุน ให้กำลังใจ และเฝ้าดูความสำเร็จของลูกอย่างสุดซึ้ง และขอบคุณ พี่ น้อง และญาติทุกคนที่คอยให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย เจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ รวมทั้ง คุณพิษณุ พันธ์เกตุ คุณสายพิณ บุญเกิด คุณปรางประไพ รอดบำเรอ พี่ เพื่อน และน้องภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

อรอุมา สวัสดิ์กิจ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....XII

สารบัญรูป.....XVI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง.....4

2.1.1 เอนไซม์เอนโด-อะไมเลส.....4

2.1.2 เอนไซม์เอ็กโซ-อะไมเลส.....5

2.1.3 เอนไซม์ดีบรานชิงค์.....6

2.2 ผลของเอนไซม์อะไมเลสต่อการย่อยแป้ง..... 7

2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....8

2.3.1 อิทธิพลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์.....8

2.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์.....10

2.3.3 อิทธิพลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์.....13

2.3.4 ความเข้มข้นของสับสเตรท.....15

2.4 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....17

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....19

2.5.1 ช่วงการเจริญ.....19

2.5.2 แหล่งคาร์บอน.....19

2.5.3 แหล่งไนโตรเจน.....22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.4 เกลืออนินทรีย์.....23
2.5.5 อุณหภูมิ.....24
2.5.6 พีเอช.....25
2.6 วิธีที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากจุลินทรีย์.....26
2.6.1 การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง.....26
2.6.2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว.....26
2.7 การทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์.....27
2.8 การเก็บรักษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....28
2.9 การนำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม.....29
2.10 ทุเรียน.....33

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....35
3.1 อุปกรณ์การทดลอง.....35
3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....36
3.3 วัตถุดิบ.....37
3.4 การแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้จากดิน.....37
3.4.1 การเก็บตัวอย่าง.....37
3.4.2 การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียขั้นต้น.....38
3.4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ได้ปริมาณสูงในอาหารเหลว.....38
3.4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากดิน.....39
3.4.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....39
3.4.6 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น.....39
3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆในเมล็ดทุเรียน.....39
3.6 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด.....39
3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด..... 40

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7.1 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....40
3.7.2 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....41
3.7.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....41
3.7.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....42
3.7.5 การศึกษาขนาดของเมล็ดทุเรียนที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....43
3.7.6 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....44
3.7.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....45
3.7.8 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....45
3.7.9 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....45
3.7.10 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย
แบคทีเรียที่แยกได้จากดินกับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25
โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท.....45
3.7.11 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน
กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....46
3.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....46
3.8.1 การทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....46
3.8.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ
เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....47

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....47

3.8.4 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่พีเอชต่างๆ.....47

3.8.5 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ.....48

3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....48

3.10 สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....49

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....50

4.1 การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียขั้นต้นจากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส.....50

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ปริมาณสูงในอาหารเหลว.....50

4.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากดิน.....51

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียน.....56

4.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด.....57

4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด.....60

4.6.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....60

4.6.2 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....62

4.6.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....65

4.6.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....71

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.6.5 ผลของขนาดของเมล็ดทุเรียนที่เหมาะสม
ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....77
4.6.6 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม
ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....79
4.6.7 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต
เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....82
4.6.8 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต
เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....84
4.6.9 ผลการเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสม
ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส.....87
4.6.10 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
โดย *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25
โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท.....89
4.6.11 ผลของการเจริญของ *Bacillus cereus* E90
กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....91
4.7 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....94
4.7.1 ผลการเตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....94
4.7.2 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....97
4.7.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....97
4.7.4 ผลของความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่พีเอชต่างๆ.....100
4.7.5 ผลของความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ.....101

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....103

บรรณานุกรม.....105

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาเคมี.....117
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์.....121

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค ข้อมูล.....136

ประวัติผู้เขียน.....149

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สมบัติของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย.....17

2.2 สมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์.....18

2.3 คุณค่าทางโภชนาการของทุเรียน ต่อ 100 กรัมของส่วนที่รับประทานได้.....34

4.1 จำนวนไอโซเลตแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ บนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....53

4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และบริเวณใสของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินสูงสุด 10 ลำดับแรก เปรียบเทียบกับของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 บนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....54

4.3 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....55

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียนที่ใช้เป็นสับสเตรท.....56

4.5 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....60

4.6 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....62

4.7 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....65

4.8 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....68

4.9 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของ soluble starch ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....71

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.10 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของแหล่งไนโตรเจนต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90
โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....74

4.11 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์
ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90
โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....76

4.12 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของขนาดเมล็ดทุเรียนต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90
ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....79

4.13 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของเกลืออนินทรีย์ต่อ
การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90
โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....82

4.14 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ
ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90
โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....84

4.15 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์
แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียน
เป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....87

4.16 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-
อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....89

4.17 ผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย
Bacillus cereus E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เมล็ดทุเรียน
เป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก.....91

4.18 ผลของการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90
โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน.....96

ข 1 ปริมาณเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ)
ที่ใช้ตกตะกอนเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....135

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค 1 ผลของรายละเอียดการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียสายพันธุ์ E90 โดยระบบจัดจำแนกจุลินทรีย์เอ พี ไอ จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.....136

(ต่อ).....137

(ต่อ).....138

ค 2 ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....138

ค 3 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....139

ค 4 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....139

ค 5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....140

ค 6 ผลของความเข้มข้นของ soluble starch ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....140

ง 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....141

ค 8 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....141

ค 9 ผลของขนาดเมล็ดทุเรียนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....142

ค 10 ผลของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....142

ค 11 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....143

ค 12 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....143

ค 13 ผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....144

ค 14 ผลของการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25.....144

ค 15 ผลของการเจริญของ *Bacillus cereus* E90 กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....145

ค 16 ผลของร้อยละความชื้นของเมล็ดทุเรียน.....145

(ต่อ).....146

ค 17 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....146

ค 18 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....147

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค 19 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....148

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 การทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการย่อยแป้ง.....4

2.2 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์พลูลูลาเนสและเอนไซม์ไอโซอะไมเลส.....7

2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์.....12

2.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยตัวยับยั้ง.....16

2.5 ขั้นตอนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยใช้
เอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้อง 32

4.1 (ก) สัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียสายพันธุ์ E90 ซึ่งเพาะเลี้ยงบน
อาหารแข็ง nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....56
(ข) สัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ E90
(x 100 objective, phase-contrast microscope).....56

4.2 ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
โดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท
ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้น
ร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....59

4.3 ผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย
Bacillus cereus E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้
เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมมอลโตสร้อยละ 1
(น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)
ลงในสูตรอาหาร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0
และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....61

4.4 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย
Bacillus cereus E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้
เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมมอลโตสร้อยละ 1
(น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)
ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) พีเอชเริ่มต้น
เท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....64

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....67

4.6 ผลของความเข้มข้นของ soluble starch ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....70

4.7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....73

4.8 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....75

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.9 ผลของขนาดอนุภาคของเมล็ดทุเรียนที่ใช้เป็นสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....78

4.10 ผลของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....81

4.11 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0.....83

4.12 ผลของพีเอชเริ่มต้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....86

4.13 ผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....88

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.14 ผลของการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....90

4.15 แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญของ *Bacillus cereus* E90 กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....93

4.16 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที.....99

4.17 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท.....100

4.18 ผลของความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่บริสุทธิ์บางส่วนที่พีเอชต่างๆ.....102

4.19 ผลความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่บริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิต่างๆ.....102

ค 1 กราฟมาตรฐานมอลโตสที่ความเข้มข้น 0.5-5.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร.....124

ค 2 กราฟมาตรฐานอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0-250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 127

ค 3 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....130

ค 4 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....132

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

เอนไซม์แอลฟา–อะไมเลส (α–amylase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์แป้งแบบสุ่ม (random hydrolysis) ที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิก (α–1,4 glycosidic linkage) ไปเป็นน้ำตาลหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส มอลโตโอลิโกแซคคาได์ (maltooligosaccharides) และเด็กซ์ตริน (dextrin) เป็นต้น ปัจจุบันการผลิตเอนไซม์และการใช้เอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสในระดับอุตสาหกรรมมีความสำคัญมาก เพราะการใช้เอนไซม์จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตและสามารถควบคุมกรรมวิธีการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น จึงได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสและกลูโคสไซรัป (glucose syrup) การทำกระดาษ การทอผ้า การผลิตขนมปัง การผลิตเบียร์ และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น (สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524) แหล่งของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันนิยมผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพราะเป็นแหล่งที่มีปริมาณเอนไซม์ไม่จำกัด และใช้เวลาในการผลิตสั้น (กฤติกานต์ มหวรรณ. 2523) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว ต้องการอาหารที่ไม่ซับซ้อน อีกทั้งยังสะดวกในการเก็บรักษาเชื้อได้หลายเดือนโดยไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อบ่อย (subculture) และมีการแปรผันทางพันธุกรรม (mutation) ของสายพันธุ์เชื้อในการผลิตเอนไซม์น้อยกว่าเชื้อรา จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสผลิตได้จากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. acidocaldarius*, *B. brevis*, *B. thermoamyloliquefaciens, B. subtilis*, *B. cereus* NY-14, *B. dipsosauri* DD1, *Lactobacillus plantarum* A6, *L. amylovorus* ATCC 33620, *L. amylophilus* NRRLB-4437, *L. cellobiosos* D-39, *Pseudomonas* sp. IMD 353, *P. stutzeri* F1, *P. stutzeri* F2, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoactinomyces alluvius*, *Thermoactinomyces lanuginosus* ATCC 34626 และ *Streptomyces griseus* เป็นต้น (Campbell. 1954 ; Deucth. 2002 ; Fogarty and Kelly. 1990 ; Fogarty *et. al.* 1994 ; Giraud *et. al.* 1991 ; Nguyen *et. al.* 2002 ; Pompeyo *et. al.* 1993 ; Sribir and Chakrabar. 1986.)

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาและนำเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทุเรียนจัดเป็นราชาของผลไม้เมืองร้อน ซึ่งมีลักษณะภายนอกที่แปลก สี กลิ่น รสดี และมีราคาแพง นิยมบริโภคทั่วไปในรูปของเนื้อทุเรียนสดและทุเรียนแปรรูป เช่น ทุเรียนทอด ทุเรียนกวน ขนม

หวานรสทุเรียน และลูกอมรสทุเรียน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการส่งออกทุเรียนในรูปของทุเรียนแช่แข็ง โดยในปี พ.ศ. 2544 มูลค่าการส่งออกทุเรียนแช่แข็งไปยังประเทศต่างๆทั่วโลก คิดเป็นเงินประมาณ 2.6 ล้านบาท (Durian Snapshot. 2003. [Online]. www.Foodmarketexchang.com) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าทุเรียนเป็นผลไม้ซึ่งมีส่วนที่กินได้น้อยกว่าส่วนที่เป็นเศษเหลือทิ้ง (โดยคิดเป็นน้ำหนักต่อ 1 ผล ส่วนที่กินได้ร้อยละ 35.5 ส่วนที่เหลือทิ้งร้อยละ 64.5 โดยประมาณ) ทุเรียนเป็นผลไม้ที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมันในปริมาณที่สูง และอุดมไปด้วยวิตามินและเกลือแร่หลายชนิดจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และในปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตทุเรียนได้ตลอดปีในปริมาณมากและสม่ำเสมอ จึงสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในงานวิจัยได้อย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดังนั้นจึงเกิดแนวความคิดที่จะศึกษาการนำเมล็ดทุเรียนซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินอันจะเป็นแนวทางในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรในเชิงพานิชย์อีกด้วย

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อแยกแบคทีเรียจากดินที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

2.เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากเมล็ดทุเรียนโดยใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

3.เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

4. เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทำการแยกจุลินทรีย์จากดินตามสถานที่ต่างๆ ที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส วิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียนที่ใช้เป็นสับสเตรท ศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ กล้าเชื้อเริ่มต้น ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดของเมล็ดทุเรียน อุณหภูมิ พีเอช ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และเกลืออนินทรีย์ เปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ รวมทั้งเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินกับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท นอกจากนี้ยังศึกษาการเจริญของ

แบคทีเรียที่แยกได้จากดินกับการผลิตเอนไซม์ ทำการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้ โดยการนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งค่าความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิและพีเอช

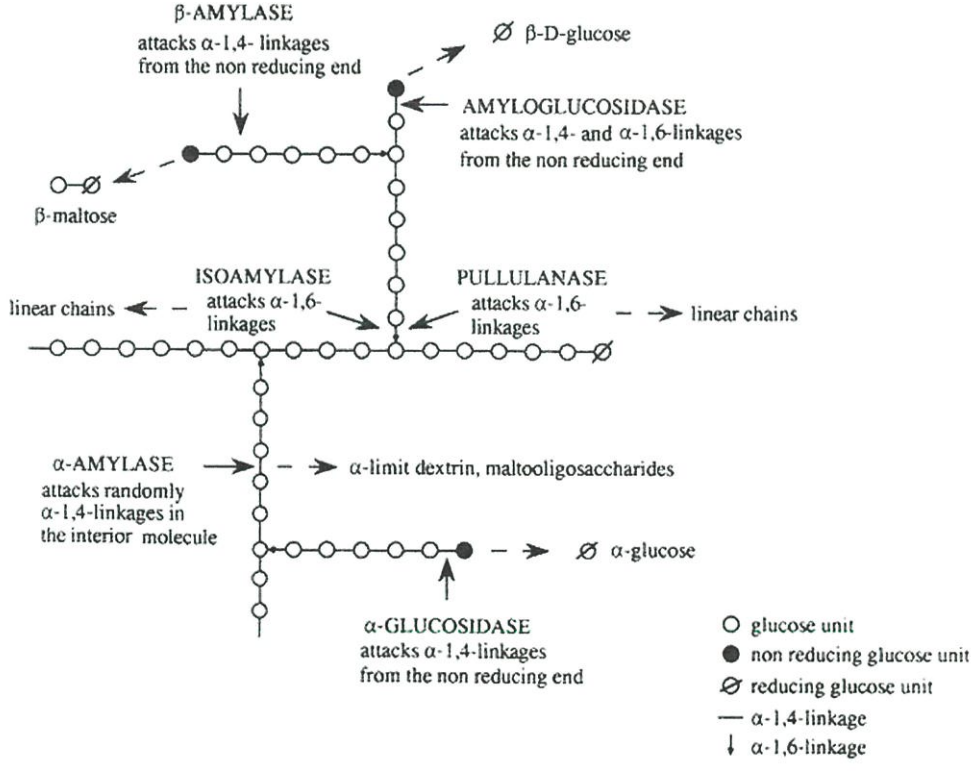
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
2. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
3. สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
4. ทราบถึงสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้อันจะเป็นแนวทางในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง

เอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการย่อยแป้งมี 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เอนโด–อะไมเลส (endo–amylase) เอนไซม์เอ็กโซ–อะไมเลส (exo–amylase) และเอนไซม์ดีบรานซิงค์ (debraching enzyme) (Lam and Malikin. 1994 ; Saha and Zeikus. 1989) การทำงานของเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการย่อยแป้ง
ที่มา : Lam and Malikin. (1994)

2.1.1 เอนไซม์เอนโด-อะไมเลส (endo–amylase) หรือ เอนไซม์แอลฟา–อะไมเลส

<u>เอนไซม์แอลฟา–อะไมเลส</u> (α–amylase หรือ amylo (1–4) dextrinase หรือ 1,4–α–D– glucan–gluconohydrolase EC 3.2.1.1) จัดเป็น extracellular enzyme คือเอนไซม์ที่

ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแล้วถูกขับออกมานอกเซลล์ พบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ถ้าแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสจัดเป็น endo–acting enzyme ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิก (α–1,4 glycosidic linkages) ภายในโมเลกุลของแป้งอย่างรวดเร็ว ทำให้ขนาดของแป้งลดลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้แตกต่างกันตามความยาวของสายโซ่ เอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลส (amylose) ได้ดีเมื่อย่อยต่อเนื่องในเวลาที่เพียงพอจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นมอลโตส (maltose) และมอลโตไตรโอส (maltotriose) มอลโตไตรโอสจัดเป็นสับเตรทที่ไม่ดีสำหรับเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลส และขั้นสุดท้ายเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสจะย่อยมอลโตไตรโอสเป็นมอลโตส และกลูโคสอย่างช้าๆ แต่เอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิก (α–1,6 glycosidic linkages) ที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ ดังนั้นแอลฟา-ลิมิทเด็กซ์ตริน (α–limit dextrins) จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลส (วชิราพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์. 2543) การย่อยโมเลกุลของแป้งในขั้นที่สองเกิดขึ้นอย่างช้าๆเหมือนกับการย่อยอะไมโลส แต่เป็นการย่อยพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิกที่ติดกับพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิกของแอลฟา–ลิมิทเด็กซ์ตริน (Kenendy *et. al.* 1987 ; Leloup *et. al.* 1994)

2.1.2 เอนไซม์เอ็กโซ–อะไมเลส (exo–amylase) ประกอบด้วย เอนไซม์เบต้า–อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

<u>เอนไซม์เบต้า–อะไมเลส</u> (β–amylase หรือ 1,4–α–D–glucan maltohydrolase EC 3.2.1.2) พบมากในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวสาลี มันฝรั่งหวาน และถั่วเหลือง เป็นต้น และเป็น extracellular enzyme ในเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus cereus* และ *B. polymyxa* เป็นต้น เอนไซม์เบต้า–อะไมเลสจัดเป็น exo–acting enzyme โดยย่อยพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิกของแป้งจากตำแหน่ง non–reducing end ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการย่อยคือเบต้า–มอลโตส (β–maltose) เอนไซม์เบต้า–อะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลสเป็นมอลโตสได้เกือบสมบูรณ์ และสามารถย่อยอะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นมอลโตสได้ร้อยละ 50–60 แต่เอนไซม์เบต้า–อะไมเลสไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ ดังนั้นจึงยังคงเหลือเบต้า–ลิมิทเด็กซ์ตริน (β–limit dextrins) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

<u>เอนไซม์กลูโคอะไมเลส</u> (glucoamylase หรือ 1,4–α–D–glucan glucohydrolase หรือ glucamylase หรือ amyloglucosidase หรือ γ–amylase EC 3.2.1.3) สามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในสกุล *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* นอกจากนั้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถผลิตได้จากยีสต์ *Saccharomyces diastaticus* และแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจัดเป็น exo–acting enzyme โดยย่อยพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิกและพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิกจากตำแหน่ง non–reducing end ของแป้งทีละ

หน่วยเป็นกลูโคส อย่างไรก็ตามอัตราการย่อยขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลและโครงสร้างของสับสเตรท โดยอัตราการย่อยพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิกมากกว่าพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิก ประมาณ 15-30 เท่า ดังนั้นการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงมีการนำเอนไซม์ดีบรานชิงค์ (debranching enzyme) ซึ่งย่อยสามารถพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิก มาใช้ร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อให้สามารถย่อยแป้งได้สมบูรณ์เร็วขึ้น และพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบางชนิดสามารถย่อยแป้งดิบได้ (Kenendy *et. al.* 1987 ; Leloup *et. al.* 1994)

2.1.3 เอนไซม์ดีบรานชิงค์ (debrancing enzyme) ประกอบด้วย เอนไซม์ไอโซอะไมเลส และเอนไซม์พลูลูลาเนส

เอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase หรือ glucogen–6–glucanohydrolase EC 3.2.1.68) และเอนไซม์พลูลูลาเนส (pullulanase หรือ pullulan 6–glucanohydrolase EC 3.2.1.41) เอนไซม์ไอโซอะไมเลสสามารถย่อยพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคติน ไกลโคเจน เด็กซ์ตรินที่มีกิ่งก้านและสารโอลิโกแซคคาไรด์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา–1,6ไกลโคซิดิกของพลูลูแลนและเบต้า–ลิมิทเด็กซ์ตรินได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ไอโซอะไมเลสมีความสามารถในการจับกับสายโซ่ที่สั้นต่ำ โดยที่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *Pseudomonas amyloderamosa* สามารถย่อยโมเลกุลที่ประกอบด้วยกลูโคสอย่างน้อยที่สุดสามหน่วยในสายโซ่ที่เป็นกิ่งก้าน มีการเสนอว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลสย่อยแบบ exofasion proceeding จากตำแหน่ง non–reducing end ในการตัดกิ่งก้านของแป้งในการผลิตกลูโคสและมอลโตส ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไอโซอะไมเลสได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Cytophaga* sp., *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350, *Lipomyces kononenkoae*, *Flavobacterium* sp., และ *Pseudomonas amyloderamosa* SB–15 เป็นต้น (Vihinen and Mantsala. 1989)

เอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พลูลูลาเนสสามารถย่อยพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิกของแป้งได้เป็นสายโซ่ของสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีความยาวต่างๆ (Saha and Zeikus. 1989) โดยที่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พลูลูลาเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน กล่าวคือเอนไซม์พลูลูลาเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีโมเลกุลเล็กที่สุดคือมอลโตส แต่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีโมเลกุลเล็กที่สุดคือมอลโตไตรโอส และมอลโตเตตระโอส (maltotetraose) (Allen and Dawson. 1975) แสดงดังรูปที่ 2.2 แต่มีบางรายงานกล่าวว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีสายโซ่ที่สั้นที่ประกอบด้วยกลูโคส 2-3 หน่วย แต่สับสเตรทที่ดีที่สุดคือสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Kennedy *et. al.* 1987) เอนไซม์พลูลูลาเนสและเอนไซม์ไอโซอะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลเพคติน แป้งและไกลโคเจนได้ แต่มีรายงานว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลสเป็นเอนไซม์ดีบรานชิงค์เพียงชนิดเดียวที่

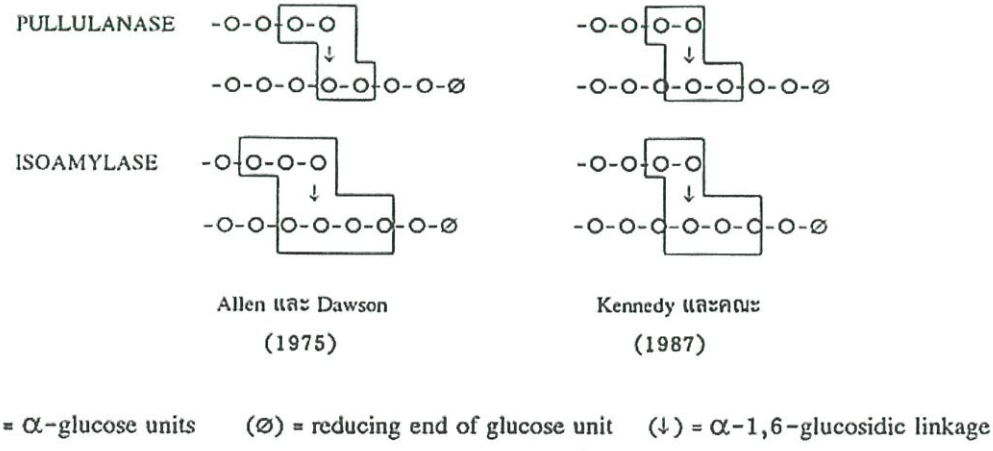
สามารถย่อยไกลโคเจนได้ทั้งหมด และเอนไซม์พลูลูลาเนสสามารถย่อยพลูลูแลนเป็นมอลโตไตรโอสได้ แต่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสไม่สามารถย่อยพลูลูแลนได้ (Allen and Dawson. 1975)

2.2 ผลของเอนไซม์อะไมเลสต่อการย่อยแป้ง

แป้งเป็นสารคาร์โบไฮเดรตพวกโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) โดยอะไมโลสประกอบด้วยหน่วยกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วยพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิก ไม่มีการแตกแขนง ประกอบด้วยกลูโคส ประมาณ 1,100-4,400 โมเลกุล คุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่กระจายตัวอยู่ในน้ำในลักษณะ micelle และทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน ส่วนอะไมโลเพคตินเกิดจากกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิก แตกแขนงทุกๆ 25 หน่วยกลูโคส ตรงตำแหน่งที่แตกแขนงต่อกันด้วยพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิก นอกจากนี้พบว่าหน่วยของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา–1,3 ไกลโคซิดิก (α–1,3 glycosidic linkages) โดยน้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลเพคตินสูงถึง 1 ล้าน ละลายน้ำอยู่ในรูปคอลลอยด์ และทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำตาล (Reed and Underkofller. 1996)

Bernfeld (1951) พบว่าเมื่อแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังนี้

1. มีความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) สูงขึ้น
2. การให้สีกับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป
3. ความหนืดลดลง
4. ความสามารถในการเบี่ยงเบนแสง (optical rotation) ลดลง



รูปที่ 2.2 แสดงความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์พลูลูลาเนสและเอนไซม์ไอโซอะไมเลส
ที่มา : Allen and Dawson. (1975) ; Kennedy *et. al.* (1987)

2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

Totora *et. al.* (1991) พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์หรือกิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของสับสเตรท และตัวยับยั้ง (inhibitor)

2.3.1 อิทธิพลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับพีเอชของโซ่ข้างของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง (active site) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชโซ่ข้างดังกล่าวจะได้รับหรือสูญเสียโปรตรอนไป ทั้งนี้ขึ้นกับค่า pK_a ของกรดอะมิโนแต่ละตัว การที่โปรตรอนหลุดออกไปหรือเพิ่มเข้ามาจะมีอิทธิพลต่อเอนไซม์โดยตรง ดังนั้นความเร็วของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนแปลงไปตามพีเอช กราฟที่ได้มีลักษณะคล้ายระฆังคว่ำ แสดงดังรูปที่ 2.3 ข นอกจากนี้พบว่าพีเอชมีผลกระทบโดยตรงต่อประจุไฟฟ้าในโมเลกุลของเอนไซม์และสับสเตรทซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (denature) ได้เช่นกัน กิจกรรมของเอนไซม์จะสูงสุดที่ค่าพีเอชค่าหนึ่ง เรียกพีเอชนี้ว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH) ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด ส่วนมากมีค่าพีเอชระหว่าง 5.0-9.0 แต่เอนไซม์บางชนิดอาจมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานต่ำหรือสูงมาก เช่น เอนไซม์เปปซิน (pepsin) ทำงานได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 1.5 เป็นต้น

Goldberg and Edwards (1990) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Streptomycete thermoviolaceus* subsp. apingens มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 7.2 สำหรับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น จากน้ำลายมนุษย์ ตับอ่อนของมนุษย์ และตับอ่อนของหมูมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 6.9 (Stein and Fisher. 1960) ในขณะที่เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* และจากมอลท์ของข้าวบาร์เลย์มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-10.0 ส่วนเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรียทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 3.0-9.5 แต่พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่พีเอชเท่ากับ 6.0 (Fukumoto. 1958)

Vihinen and Mantsala (1990) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. stearothermophilus* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ช่วงพีเอชระหว่าง 4.5-8.0 โดยการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในทางการค้าจะใช้ในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-7.0 Paquest *et. al.* (1991) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 คือที่พีเอชเท่ากับ 5.6 Kobayashi *et. al.* (1992) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือ (salt–tolerant α–amylase) ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Natronococcus* sp. Ah-36 คือที่พีเอชเท่ากับ 8.7 และเอนไซม์คงตัวที่ช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-8.6 Wikelman (1992) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูง (thermostable α–amylase) ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *B. licheniformis*

คือที่ช่วงพีเอชระหว่าง 7.0-9.0 Giraud *et. al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* A6 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 5.5 Ivanova *et. al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตโดยเชื้อ *B. licheniformis* 44MB82 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-6.5 สำหรับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *B. licheniformis* CUMC 305 และ *B. coagulans* CUMC 512 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ช่วงพีเอชระหว่าง 7.5-8.5 (Medda and Chandra. 1980)

Pompeyo *et. al.* (1993) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสซึ่งผลิตโดย *L. amylovorus* ATCC 33620 และ *L. amylophilus* NRRLB-4437 คือพีเอชเท่ากับ 5.5 และ 5.0 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Iman *et. al.* (1991) ที่ศึกษาลักษณะของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสที่ผลิตโดย *L. amylovorus* พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 5.5 Fogarty *et. al.* (1994) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. IMD 353 พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 7.0 Khire (1994) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Micrococcus* sp. 4 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 7.5 Wind *et. al.* (1994) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. stearothermophilus* MFF4 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชระหว่าง 5.5-6.0 โดยที่การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในทางการค้าอยู่ที่ช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-7.0 Bolton *et. al.* (1997) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. flavothermus* DSM 2641 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ช่วงพีเอชระหว่าง 5.5-6.0 Lee *et. al.* (1997) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bifidobacterium adolescentis* Int-57 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 5.5 Uguru *et. al.* (1997) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *A. niger* โดยใช้เปลือกแยม (yam peel) เป็นสับสเตรท คือที่พีเอชเท่ากับ 5.5

Mamo and Gessesse (1999) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งสองชนิด คือ Amy I และ Amy II ซึ่งผลิตโดย *Bacillus* sp. WN11 มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบที่พีเอชเท่ากับ 5.5 โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดคงตัวที่พีเอชเท่ากับ 5.5 และ 8.0 ตามลำดับ Hamilton *et. al.* (1999) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. IMD 434 มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบที่พีเอชเท่ากับ 6.0 Aguilar *et. al.* (2000) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *L. manihotivorans* LMG 18010^{T} มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอชเท่ากับ 5.5 เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-6.0 โดยเอนไซม์มีความคงตัวสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 5.5 Narang and Satyanarayana (2001) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *B. thermooreovorans* NP54 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อ

การทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 Nguyen *et. al.* (2002) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตโดย *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 คือที่ช่วงพีเอชระหว่าง 4.6-6.6

2.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่ออุณหภูมิของระบบการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้นจะมีผลต่อปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์อยู่ 2 ประการ คือ

1. อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะสูงขึ้นเช่นเดียวกับปฏิกิริยาเคมีทั่วๆไป ในการศึกษาการเพิ่มขึ้นของอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นนั้น นิยมเรียกว่าสัมประสิทธิ์ของอุณหภูมิ (temperature coefficient, Q10) ซึ่งหมายถึงค่าที่เพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทุก 10 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปแล้วค่า Q10 ของปฏิกิริยาเอนไซม์ส่วนใหญ่มักจะมีค่าเท่ากับ 2 ซึ่งหมายความว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาใดๆจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าโดยประมาณ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น 10 องศาเซลเซียส (พจน์ ศรีบุญเรือง และคณะ. 2543)

2. อัตราเร็วของการทำงานของเอนไซม์จะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะไม่ทำงานแต่ยังคงสภาพธรรมชาติเดิมอยู่ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะเริ่มทำงาน โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีการทำงานดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 0-40 องศาเซลเซียส และการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 40-60 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึงจุดๆ หนึ่งเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดเรียกว่า optimum temperature ซึ่งหมายถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจากจุดนี้แล้วอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์จะเริ่มลดลงตามลำดับ แสดงรูปที่ 2.3 ก ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นมากเกินไปนี้จะไปทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนทำให้สูญเสียสภาพทางธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างระดับทุติยภูมิ ตติยภูมิ หรือจตุรภูมิ ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างสิ้นเชิง เอนไซม์ก็จะหยุดทำงานในที่สุด อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์บางชนิดที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง (thermostable enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) เช่น แบคทีเรียที่เจริญบริเวณบ่อน้ำพุร้อน เป็นต้น

Campbell and Clevelland (1961a) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจาก *B. stearothermophilus* มีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งที่อุณหภูมิระหว่าง 55-70 องศาเซลเซียส Campbell and Clevelland (1961b) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งโดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตจาก *B. stearothermophilus* คือที่อุณหภูมิระหว่าง 55-70 องศาเซลเซียส Madeson *et. al.* (1973) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรียสามารถย่อยแป้งได้แม้ว่าอุณหภูมิจะสูงกว่า 110 องศาเซลเซียส จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย

มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้ดีที่สุดในบรรดาเอนไซม์อะไมเลสทั้งหมดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Fukumoto. 1958) Onishi and Sonoda (1979) พบว่าเชื้อ *Micrococcus halobius* ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส แต่การทำงานของเอนไซม์จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น

Goldberg and Edwards (1990) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Saccharomyces thermoviolaceus* subsp. apingens คือ 55 องศาเซลเซียส และพบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยจะสามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์เบต้า-อะไมเลส โดยเฉพาะเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อ *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* เป็นเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่สามารถทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแหล่งอื่นๆ Vihinen and Mantsala (1990) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *B. stearothermophilus* MFF4 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิระหว่าง 70-80 องศาเซลเซียส Iman *et. al.* (1991) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. amylovorus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส Paquest *et. al.* (1991) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 45 องศาเซลเซียส

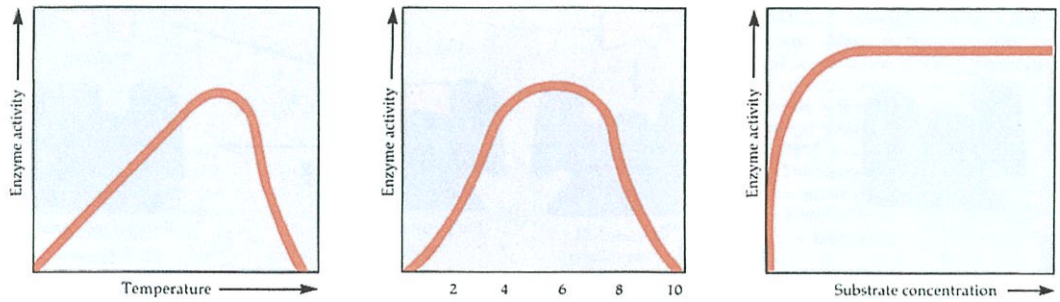
Kobayashi *et. al.* (1992) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและอุณหภูมิที่คงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Natronococcus* sp. Ah-36 คือที่อุณหภูมิ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Giraud *et. al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *L. plantarum* A6 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส Ivanova *et. al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตโดยเชื้อ *B. licheniformis* 44MB82 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 90 องศาเซลเซียส สำหรับ *B. licheniformis* CUMC 305 และ *B. coagulans* CUMC 512 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 91 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Medda and Chandra. 1980)

Kelly *et. al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora melanospora* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 40 องศาเซลเซียส Pompeyo *et. al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. amylovorus* ATCC 33620 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส และคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. amylophilus* NRRLB-4437 คงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Fogarty *et. al.* (1994) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. IMD 353 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส Khire (1994) พบว่าเชื้อ *Micrococus* sp. 4 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส Bose and

Das (1996) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตโดยเชื้อ *B. licheniformis* NRRLB 14368 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 76 องศาเซลเซียส Bolton *et. al.* (1997) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *B. flavothermus* DMS 2641 พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส

Lee *et. al.* (1997) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bifidobacterium adolescentis* Int-57 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส Uguru *et. al.* (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจาก *A. niger* โดยใช้เปลือกแยมเป็นสับสเตรท พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 70 องศาเซลเซียส Mamo and Gessesse (1999) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งสองชนิด คือเอนไซม์ Amy I และ Amy II ที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus* sp. WN11 มีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบที่อุณหภูมิระหว่าง 75-80 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดคงตัวที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส Aguilar *et. al.* (2000) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. manihotivorans* LMG 18010^T มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส และเอนไซม์คงตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 30-50 องศาเซลเซียส

Coronado *et. al.* (2000) พบว่าเชื้อ *Halomonas meridiana* ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส Narang and Satyanarayana (2001) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. thermooreovorans* NP54 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 100 องศาเซลเซียส Deucth (2002) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือซึ่งผลิตโดย *B. dipsosauri* DD1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 2.3 แสดงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์

(ก) อุณหภูมิ (ข) พีเอช (ค) ความเข้มข้นของสับสเตรท

ที่มา : Totora *et. al.* 1991)

2.3.3 อิทธิพลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถจะถูกทำให้ช้าลงหรือหยุดลงได้โดยใช้ตัวยับยั้ง ซึ่งตัวยับยั้งจะจับกับหมู่ที่ทำปฏิกิริยาในบริเวณเร่งหรือบริเวณอื่นๆ การยับยั้งเอนไซม์มี 2 ประเภท คือ การยับยั้งแบบไม่ผันกลับ (irreversible inhibition) และการยับยั้งแบบผันกลับ (reversible inhibition)

1. <u>การยับยั้งแบบไม่ผันกลับ</u>

การยับยั้งแบบนี้ตัวยับยั้งจะจับและยึดกับโมเลกุลของเอนไซม์อย่างเหนียวแน่น โดยสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ฟังชั่นของกรดอะมิโน ทำให้การแยกตัวระหว่างโมเลกุลของตัวยับยั้งกับเอนไซม์เป็นไปได้น้อยมาก เมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งมากกว่าเอนไซม์แล้วจะสามารถยับยั้งหรือหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งหมดได้ ตัวอย่างเช่น สารไอโอโดอะซิเตท (iodoacetate) ไอโอโดอะซิทาไมด์ (iodoacetamide) และคลอโรอะซีโตฟีโนน (chloroacetophenone) เป็นต้น

2. <u>การยับยั้งแบบผันกลับ</u>

การยับยั้งแบบนี้ตัวยับยั้งสามารถจับรวมตัวได้กับโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ทำให้สามารถแยกตัวยับยั้งออกจากเอนไซม์ได้ง่าย เมื่อตัวยับยั้งถูกกำจัดออกไปแล้วเอนไซม์จะกลับมีประสิทธิภาพดังเดิม แบ่งการยับยั้งแบบนี้ได้ 3 แบบย่อย คือ การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibiton) การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non–competitive inhibition) และการยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันโดยตรง (uncompetitive inhibiton)

<u>การยับยั้งแบบแข่งขัน</u> ตัวยับยั้งมีคุณสมบัติเด่นชัดอยู่ประการหนึ่ง คือโครงสร้างทางเคมีของตัวยับยั้งจะมีส่วนคล้ายคลึงกับสับสเตรท บางทีเรียกสารพวกนี้ว่า substrate analoque ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ตัวยับยั้งจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ตรงบริเวณเร่งได้ แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้ง (enzyme–inhibitor complex) ทำให้สับสเตรทไม่สามารถจับรวมกับเอนไซม์ได้ จึงเกิดการแข่งขันระหว่างสับสเตรทกับตัวยับยั้งเพื่อแย่งจับกับเอนไซม์ แสดงดังรูปที่ 2.4 ก ในกรณีที่ความเข้มข้นของตัวยับยั้งมากกว่าสับเตรทจะทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์มีอัตราเร็วลดลงหรือหยุดทำงานได้ แต่ในทางตรงข้ามเมื่อมีการเพิ่มปริมาณสับสเตรทในระบบมากขึ้นความสามารถในการยับยั้งจะลดลงและเอนไซม์จะสามารถทำงานได้ตามปกติ ตัวอย่างที่สำคัญของตัวยับยั้งแบบแข่งขัน ได้แก่ มาโลเนท (malonate) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซักซิเนทดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ทั้งนี้เนื่องจากมาโลเนทมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับซักซิเนท (succinate) ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ เป็นต้น

<u>การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน</u> เป็นการยับยั้งที่ตัวยับยั้งมีโครงสร้างไม่เหมือนกับสับสเตรทจึงเข้าจับกับเอนไซม์คนละบริเวณกับที่สับสเตรทเข้าจับ แสดงดังรูปที่ 2.4 ง ตัวอย่างที่สำคัญของตัวยับยั้ง ได้แก่ ไอออนของโลหะหนักต่างๆ เช่น Ag^{+}, Pb^{2+} และ Hg^{2+} ไอออนเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่ –SH ของซิสเตอีนที่บริเวณเร่งทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการเร่งปฏิกิริยา

แก้ไขโดยการเติมสารคีเลติง (chelating agent) ซึ่งสามารถจับไอออนของโลหะหนักได้ เช่น ethylenediaminetetraacetate acid (EDTA) สารออกซิไดซิงเอเจนต์ต่างๆ ซึ่งจะออกซิไดส์หมู่ -SH ของซิสเตอีน และสารพวกฟลูออไรด์ซึ่งจะรวมตัวกับแคทไอออนที่มีประจุบวกสอง เช่น ไอออนของ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ดังนั้นเอนไซม์ที่ต้องการแคทไอออนดังกล่าวเป็นปัจจัยร่วมในการทำงานจะถูกยับยั้งด้วย

<u>การยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันโดยตรง</u> การยับยั้งแบบนี้ต่างจากสองแบบแรก คือจะเกิดขึ้นหลังจากที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทเกิดเป็นเอนไซม์–สับสเตรท คอมเพล็กซ์ (enzyme–substrate complex) แล้วเท่านั้น ซึ่งตัวยับยั้งยังสามารถเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ได้อีกด้วย แสดงดังรูปที่ 2.4 ค

Goldberg and Edwards (1990) พบว่าไอออนของ Ca^{2+} ส่งเสริมการทำงานและเพิ่มความคงตัวที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสซึ่งผลิตโดย *Saccharomyces thermoviolaceus* subsp. apingens ในขณะที่ EDTA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส Khire and Plant (1992) พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงและทนเกลือได้ (thermostable salt–tolerant) แต่การทำงานของเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยไอออนของ Zn^{2+} Kobayashi *et. al.* (1992) พบว่า $ZnCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ *N*–bromosuccinimide (NBS) เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Natronococcus* sp. Ah-36 Giraud *et. al.* (1993) พบว่าไอออนของ Hg^{2+} ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร NBS และไอโอดีนความเข้มข้น 10^{-3} โมลต่อลิตร ยับยั้งการทำงานเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* A6 ในขณะที่ไอออนของ Fe^{3+} ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด Ivanova *et. al.* (1993) พบว่าไอออนของ Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, NBS และ EDTA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตจากเชื้อ *B. licheniformis* 44MB82 Fogarty *et. al.* (1994) พบว่าไอออนของ Co^{2+} และ Mn^{2+} ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. IMD 353

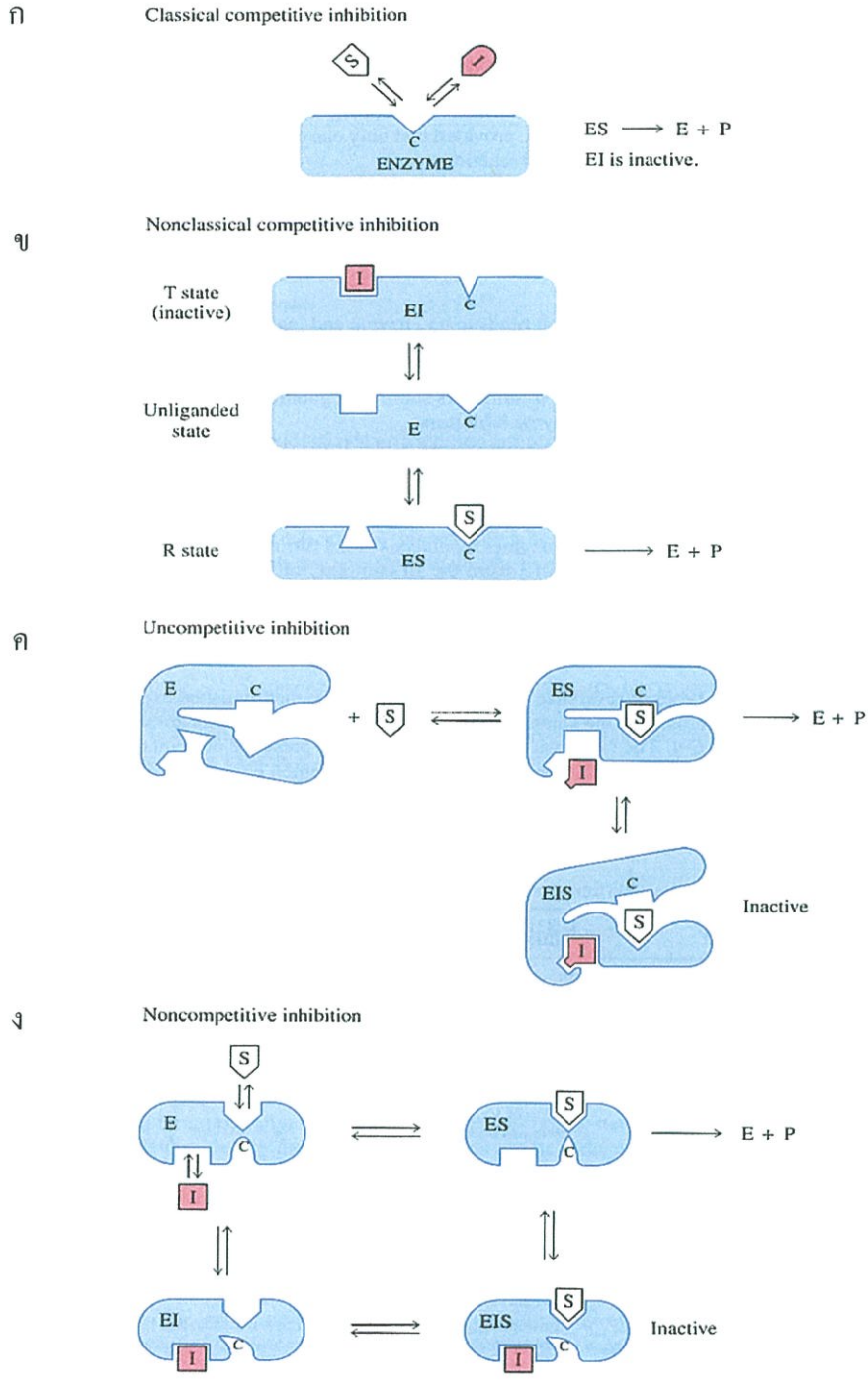
Pompeyo *et. al.* (1993) พบว่าไอออนของ Ca^{2+} และ Ba^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. amylophilus* NRRLB-4437 แต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. amylovorus* ATCC 33620 สำหรับไอออนของ Hg^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *L. amylovorus* ATCC 33620 และ *L. amylophilus* NRRLB-4437 Bose and Das (1996) พบว่าไอออนของ Ca^{2+} ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ ช่วยให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *B. licheniformis* NRRLB 14368 คงตัวที่อุณหภูมิสูง Lee *et. al.* (1997) พบว่าการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bifidobacterium adolescenti*

Int-57 ถูกยับยั้งโดยกลูโคสและมอลโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) Cu^{2+}, Zn^{2+}, NBS และ EDTA ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลต่อลิตร และไอโอดีน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร ในขณะที่ β–mercaptoethanol ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

Lin *et. al.* (1998) พบว่าไอออนของ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 ในขณะที่ไอออนของ Hg^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ EDTA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Mamo and Gessesse (1999) พบว่าไอออนของ Fe^{3+}, Hg^{2+} และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งสองชนิด ได้แก่ เอนไซม์ AmyI และ AmyII ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. WN11 Aguilar *et. al.* (2000) พบว่าไอออนของ Al^{3+}, Fe^{3+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *L. manihotivorans* LMG 18010^{T} อย่างสมบูรณ์ Narang and Satyanarayana (2001) พบว่ากลีเซอรอล โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) และโพลีไวนิลเอทธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *B. thermooreovorans* NP54 Deutch (2002) พบว่าไอออนของ Cd^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลต่อลิตร ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือซึ่งผลิตโดยเชื้อ *B. dipsosauri* DD1 Nguyen *et. al.* (2002) พบว่าไอออนของ Zn^{2+} ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 ในขณะที่ไอออนของ Ca^{2+} และ Ba^{2+} กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

2.3.4 ความเข้มข้นของสับสเตรท

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการทำงานของปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยการควบคุมให้ปริมาณเอนไซม์คงที่และให้ปริมาณของสับสเตรทมากเกินพอ แต่ค่อยๆ เพิ่มปริมาณของสับสเตรท วัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา แล้วนำมาเขียนกราฟ พบว่าในช่วงแรกอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับปริมาณของสับสเตรท แสดงว่ามีการรวมตัวระหว่างโมเลกุลของสับสเตรทบนบริเวณเร่งของเอนไซม์ เป็นเอนไซม์–สับสเตรท คอมเพล็กซ์ จนกระทั่งเอนไซม์จับกับสับสเตรทจนหมดหรือไม่มีบริเวณเร่งตรงโมเลกุลของเอนไซม์เหลืออยู่เลย หลังจากนั้นการเพิ่มปริมาณของสับสเตรทจะไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาอีก แสดงดังรูปที่ 2.3 ค



รูปที่ 2.4 แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยตัวยับยั้ง

(ก) competitive inhibition (ข) nonclassical competitive inhibition

(ค) uncompetitive inhibition (ง) noncompetitive inhibition

ที่มา : Morgan *et. al.* (1994)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสผลิตได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ การสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นในเซลล์จากนั้นจะขับออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยแป้งต่อไป ซึ่งอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งอุณหภูมิและพีเอชที่คงตัวของเอนไซม์จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต แสดงดังตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2

Ingle and Erickson (1978) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และจัดแบ่งเอนไซม์อะไมเลสตามอุณหภูมิและพีเอชออกเป็นสามกลุ่ม ได้แก่ (1) thermophilic amylases (2) alkaline amylases (3) acidic amylases แบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงมักจะผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงด้วย

Peltier and Beckord (1945) ทำการแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแหล่งต่างๆ พบว่าพืชเป็นแหล่งที่มีแบคทีเรียที่สามารถย่อยแป้งมากกว่าแหล่งอื่นๆ และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *B. subtilis* นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้ออื่นๆ เช่น *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefacien* (Shinmyo *et. al.* 1982) เป็นต้น ทางการค้ามีการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เช่น *B. acidocaldarius*, *B. stearothermmophilus*, *B. thermoamyliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. brevis* และ *B. caldolytics* เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 แสดงสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	พีเอช		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
	ค่าที่เหมาะสม	ช่วงความคงตัว	ค่าที่เหมาะสม	ช่วงความคงตัว
Bacillus licheniformis NCLB 6346	9.0	7.0-10.0	90	40-100
Bacillus licheniformis 584	6.5	6.0-11.0	76	40-90
Bacillus coagulan CUMC 312	8.5	4.5-11.0	85	10-90
Bacillus stearothermophilus BS-1	-	6.0-12.0	70	40-70
Bacillus amyloliquefacien F	5.9	5.5-6.5	65	-
Bacillus acidocaldarius	3.5	1.2-6.5	75	-
Bacillus sp. NRRLB-3881	9.2	7.5-10.0	50	-

ที่มา : พิเชฐ อิฐกอ. (2528)

48940

ตารางที่ 2.2 แสดงสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	ไอโซอิเล็คตริกพอยท์
Bacillus megaterium	5.5	75	55,000	9.5
Bacillus licheniformis CUMC305	9.0	90	28,000	-
Bacillus subtilis	6.0-7.0	-	93,000	5.0
Bacillus acidocaldarius A-2	3.5	70	66,000	-
*Bacillus acidocaldarius Agnano*101	3.5	75	68,000	-
Bacillus stearothermophilus	5.3	60-70	70,000	8.5
Bacillus circulans	7.0	50	45,000	-
Bacillus cereus NY-14	6.0	55	55,000	6.13
Lactobacillus cellobiosos D-39	7.3	50	22,500	-
Thermoactinomyces sp.	7.0	50	22,500	-
Schwanniomyces alluvius	6.3	40	62,000	-
Candida antarctica	4.2	62	50,000	10.3
Filobasidium capsuligenum	5.6	50	64,000	-
Thermomyces lanuginosus	4.6	-	54,000-57,000	3.4
Streptomyces griseus	5.6-6.0	45	-	-
Pseudomonas stutzeri F1	8.0	45	55,000	5.6
Pseudomonas stutzeri F2	8.0	45	55,000	5.3
Klebsiella pneumoniae	7.0	52	65,000	7.2-7.8
Aspergillus kawachii I	4.0-5.0	70	104,000	4.25
Aspergillus kawachii II	5.0	70	66,000	4.2
Aspergillus awamori	4.8-5.0	50	54,000	4.2
Aspergillus oryzae	4.7	55	56,000	3.6
Penicillium expansum	4.5	60	69,000	3.9
Penicillium amagasakiense	4.5	50	63,000	-

ที่มา : Fogarty and Kelly. (1990)

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

การผลิตเอนไซม์อะไมเลสขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ช่วงการเจริญ (growth phase) แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลืออนินทรีย์ พีเอช และอุณหภูมิในขณะที่เลี้ยงเชื้อ

2.5.1 ช่วงการเจริญ

Nomura *et. al.* (1956) ; Fukumoto *et. al.* (1958) พบว่าการสร้างเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดหลังจากเซลล์แบคทีเรียเพิ่มจำนวนได้สูงสุด Welker and Campbell (1963) ศึกษาเชื้อ *B. stearothermophilus* รายงานว่าเอนไซม์อะไมเลสจะเริ่มสร้างในระหว่าง logarithmic phase จะสร้างมากขึ้นพร้อมๆ กับการเพิ่มจำนวนเซลล์ Lampen (1965) ได้กล่าวว่าการกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลสจะไม่เกิดจนกระทั่งถึงระยะ stationary phase และแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมดไป Buonocore *et. al.* (1976) ศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของ *B. acidocaldarius* พบว่าเชื้อสร้างเอนไซม์สูงสุดในช่วง stationary phase ซึ่งในระยะนี้เซลล์จะเริ่มย่อยสลายตัวเอง ทำให้เซลล์แตกปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์มากขึ้น Sani *et. al.* (1992) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท พบว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะ stationary phase ของการเจริญ Giraud *et. al.* (1994) พบว่า *L. plantarum* A6 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงถึง 60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 6.0 ในระยะ stationary phase ของการเจริญ Khire (1994) พบว่า *Micrococcus* sp. 4 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุด ณ. ชั่วโมงที่ 96 หลังจากการเพาะเลี้ยง Uguru *et. al.* (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเปลือกแยมโดยเชื้อรา *A. niger* พบว่ามีการผลิตเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะ stationary phase ของการเจริญ Malhotra *et. al.* (2000) พบว่าเชื้อ *B. thermooreovorans* NP54 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงสุด ณ. ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะ stationary phase ของการเจริญ Deutch (2002) พบว่าเชื้อ *B. dipsosauri* DD1 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือ (salt–tolerant α–amylase) ได้สูงสุดในระยะ stationary phase ของการเจริญ ที่ความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ 2 โมลต่อลิตร

2.5.2 แหล่งคาร์บอน

Fukumoto *et. al.* (1958) พบว่าแลคโตสและกาแลคโตสเป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญที่สุดในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ส่วนกลูโคสและฟรุคโตสไม่ได้ส่งเสริมให้มีการสร้างเอนไซม์ทั้งยังยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลสถ้าใช้ความเข้มข้นสูงๆ นอกจากนั้นแหล่งคาร์บอนไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเท่านั้นยังเกี่ยวข้องกับความเร็วในการสลายคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ ถ้าความเร็วในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตสูงจะยับยั้งการสร้าง

เอนไซม์อะไมเลส Welker and Campbell (1963) รายงานถึงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อ *B. stearothermophilus* พบว่าแหล่งคาร์บอนบางชนิดทำให้เซลล์เจริญดีแต่สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้น้อย ยกเว้นมอลโตส แป้ง และฟรุคโตส Windish and Mhatre (1965) ศึกษา *B. subtilis* พบว่าการใช้กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เซลล์มีการเจริญดี แต่การสร้างเอนไซม์อะไมเลสลดลง ในขณะเดียวกันการใช้ไกลโคเจน แลคโตส กาแลคโตส ราฟฟิโนส และซูโครส ส่งเสริมการสร้างเอนไซม์อะไมเลสแต่มีการเจริญของเซลล์ไม่ดี Kuo and Hartman (1966) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Thermoactinomyces vulgaris* ในแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ เซลโลไบโอส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส อินนูลิน แลคโตส แมนนิทอล แมนโนส ซอร์บิทอล แป้ง และซูโครส พบว่าใช้แป้งผลิตเอนไซม์อะไมเลสให้ประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือมอลโตส นอกนั้นให้เอนไซม์อะไมเลสที่มีประสิทธิภาพต่ำสุด

Meers (1972) พบว่าแป้งส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *B. licheniformis* โดยความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมคือร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถ้าความเข้มข้นของแป้งมากกว่านี้จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นและความหนืดสูงขึ้นทำให้การส่งผ่านออกซิเจนในน้ำหมักไม่ดีมีผลต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย (Rukhaiyar and Srivastava. 1995) Buonocore *et. al.* (1976) ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนของ *B. acidocaldarius* โดยใช้กลีเซอรอล กลูโคส แลคโตส ซูโครส ทรีอาโลส เซลโลไบโอส มอลโตส ไกลโคเจน มอลโตไตรโอส มอลโตเตตราโอส และแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ปรากฏว่าไกลโคเจนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือแป้ง Sani *et. al.* (1992) พบว่า *A. flavus* และ *A. niger* ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี soluble starch หรือแป้งที่ผลิตจากเปลือกมันสำปะหลัง ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน Fogarty *et. al.* (1994) พบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. IMD353 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

Khire (1994) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือโดยเชื้อ *Micrococcus* sp. 4 ได้แก่ แป้ง เด็กซ์ตริน มอลโตส ซูโครส แลคโตส และจมูกข้าวสาลี พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ดีที่สุดคือจมูกข้าวสาลี รองลงมาคือเด็กซ์ตริน และแป้ง ตามลำดับ Giraud *et. al.* (1991) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชและความเข้มข้นของกรดแลคติคต่อการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* A6 พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญ (growth rate) สูงสุด 0.57 ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีกรดแลคติคเป็นส่วนประกอบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 Giraud *et. al.* (1993) ทำการคัดแยกและศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ *L. plantarum* A6 พบว่า *L. plantarum* A6 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยง

บนอาหารที่มีแป้งความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบ โดยมีอัตราการเจริญของเชื้อ 0.45 ต่อชั่วโมง ผลได้ของชีวมวล (biomass yield, $Y_{x/s}$) 0.23 กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง และผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yield, $Y_{p/x}$) 0.75 กรัมกรดแลคติคต่อกรัมเซลล์ Pompeyo *et. al.* (1993) พบว่าเชื้อ *L. amylovorus* ATCC 33620 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และ *L. amylophilus* NRRLB-4437 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน Khire (1994) พบว่าเชื้อ *Micrococcus* sp. 4 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุดเมื่อใช้จมูกข้าวสาลี แป้ง และเด็กซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

Tigue *et. al.* (1994) พบว่า soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต alkaline amylase จาก *B. alcalophilus* subsp. halodurans ATCC 21591, *Bacillus* sp. NCIB 11203 และ *Bacillus* sp. IMD 370 Wind *et. al.* (1994) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *B. stearothermophilus* MFF4 ที่อุณหภูมิ 50 และ 65 องศาเซลเซียส พบว่าแป้งและอะไมโลเพคตินเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ Chiou and Jeang (1995) พบว่า *Cytophaga* sp. ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดดิบ (raw corn starch) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน Bose and Das (1996) พบว่ามอลโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดยเชื้อ *B. licheniformis* NRRLB 14368 Lin *et. al.* (1998) พบว่า soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 ในขณะเดียวกันมอลโตสและอะไมโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อใช้ในการเจริญ

Mamo and Gessesse (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *Bacillus* sp. WN11 พบว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือมอลโตส เมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนอื่นๆ (undefined carbon source) พบว่าแป้งที่ทำจากข้าวบาร์เล่ย์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ รองลงมาคือแป้งข้าวโพดและมีการผลิตต่ำสุดเมื่อใช้แป้งสาลี Narang and Satyanarayana (2001) พบว่าแป้ง แลคโตส มอลโตเด็กซ์ตริน และมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อ *B. thermooleovorans* NP54 โดยความเข้มข้นของแป้งที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ คือร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Malhotra *et. al.* 2000) และพบว่าไซโลส ฟรุคโตส ซอร์บิทอล และราฟฟีโนสส่งเสริมให้มีการผลิตเอนไซม์ในระดับต่ำ สำหรับซูโครส โพลิไวนิลแอลกอฮอล์ และโพลิเอททิลีนไกลคอลไม่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์

2.5.3 แหล่งไนโตรเจน

Windish and Mhatre (1965) พบว่าเคซีนกากถั่วเหลือง เยลาตินผสมกับสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส Kuo and Hartman (1966) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Thermoactinomyces valgaris* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ดังนี้ เปปโตน (peptone) N–Z case ไฟโตน (phytone) โพลีเปปโตน ไทโอโตน ทริฟติเคส โปแตสเซียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต พบว่า N–Z case เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์มากที่สุด รองลงมาคือเปปโตน Shinke *et. al.* (1977) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนของ *B. cereus* ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ แอสพาราจีน โปแตสเซียมไนเตรต ยูเรีย เคซีน โพลีเปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมอะซีเตรต สารสกัดจากเนื้อวัว และโพลีเปปโตนผสมสารสกัดจากเนื้อวัว พบว่าแหล่งที่ให้เอนไซม์ดีที่สุดคือโพลีเปปโตนผสมสารสกัดจากเนื้อวัว ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรียสารไม่ได้ช่วยในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเลย นอกจากนี้พบว่ายูเรียสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ Chandra *et. al.* (1980) พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* และ *B. stearothermophilus* (Davies *et. al.* 1980) ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงสุดในอาหารที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน Kelly *et. al.* (1993) ศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora melanosporea* NCIM12881 ในถังหมัก 5.0-L พบว่ามีการผลิตเอนไซม์สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 40 ของการหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน Tigue *et. al.* (1994) พบว่า yeatex เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิต alkaline amylase จากเชื้อ *B. alcalophilus* subsp. halodurans ATCC2 1591, *Bacillus* sp. NCIB 11203 และ *Bacillus* sp. IMD 370

Chiou and Jeang (1995) พบว่า *Cytophaga* sp. ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโพลีเปปโตน–เอส (potypeptone–s) และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ Lin *et. al.* (1998) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน Mamo and Gessesse (1999) พบว่าทริปโตน และโปรติโอสเปปโตน (proteose peptone) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการการเจริญ และการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *Bacillus* sp. WN11 และพบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเลยเมื่อใช้ไนเตรตไอออน (NO_3^+) แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน สอดคล้องกับรายงานการเจริญของเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงว่าต้องการกรดอะมิโนบางชนิดในการเจริญ (Baker *et. al.* 1960 ; Lee *et. al.* 1982 ; Amartery *et. al.* 1991) Narang and Satyanarayana (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่

ทนอุณหภูมิสูงโดย *B. thermooleovorans* NP54 พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรียสาร ได้แก่ ทริปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Malhota *et. al.* 2000) ส่งเสริมการเจริญและการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากมอลท์ และเปปโตน ตามลำดับ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรียสาร ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ส่งเสริมการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ในขณะที่แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_3$) ไม่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์และการผลิตเอนไซม์

2.5.4 เกลืออนินทรีย์

Wallerstein (1939) ; Fukumoto *et. al.* (1958) พบว่าฟอสเฟตเป็นสารกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟอสเฟตสำหรับสร้างเอนไซม์อะไมเลสของ *B. amyloliquefaciens* คือที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นขนาดนี้มากเกินพอสำหรับการเจริญ นอกจากนี้ไอออนของ Mn^{2+}, Zn^{2+} และ Fe^{2+} ยังกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้เป็นอย่างดี แต่ในระดับอุตสาหกรรมนั้นไม่จำเป็นที่จะต้องเติมเกลือไอออนดังกล่าว เพราะว่าจะมีอยู่แล้วในวัตถุดิบที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษา *B. licheniformis* CUMC 305 พบว่าไอออนของ Ag^{2+} และ Hg^{2+} ยับยั้งการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ในขณะที่ไอออนของ Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Cu^{2+} กระตุ้นการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Medda and Chandra. 1980) นอกจากไอออนต่างๆดังกล่าวมาแล้วพบว่า Ca^{2+} เป็นไอออนที่สำคัญมากต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เนื่องจากเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ประเภทที่มีแคลเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ ดังนั้นสรุปหน้าที่ของ Ca^{2+} เมื่ออยู่กับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส คือ (1) เป็นตัวคล้าย stabilizer ในการป้องกันสภาวะที่รุนแรงต่างๆ เช่น ความร้อน พีเอช และ proteolysis (2) ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ที่มีความจำเป็นต่อ amylolytic activity โดยที่แคลเซียมไม่เฉพาะจะเกาะอยู่ที่ active site เท่านั้น แต่ยังมีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดย stabilize โครงสร้างทุติยภูมิ ตติยภูมิของเอนไซม์ และทำให้โปรตีนมี configuration ที่เหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biological activity) (Vallee *et. al.* 1959 ; Yamanaka *et. al.* 1957) Good and Hartman (1970) พบว่าเชื้อ *Halobacterium halobium* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้ โดยการทำงานของเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น Onishi and Sonoda (1979) พบว่าเชื้อ *Micrococcus halobius* ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้ แต่การทำงานของเอนไซม์จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นเช่นกัน

Medda and Chandra (1980) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อ *B. licheniformis* CUMC 305 พบว่าไอออนของ Ag^{2+} และ Hg^{2+} ยับยั้งการสร้างเอนไซม์แอลฟา-

อะไมเลส ในขณะที่ Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Cu^{2+} ช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ Mahon *et al.* (1997) ศึกษาอิทธิพลของอัตราการเจริญต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Streptomyces* sp. IMD 2679 พบว่าการผลิตเอนไซม์เป็นสัดส่วนผกผันกับการเจริญของเชื้อ และธาตุโคบอลต์มีผลต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ โดยมีผลได้ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (product yield) สูงสุดที่อัตราการเจริญของเชื้อ (growth rate) ต่ำสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโคบอลต์ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากโคบอลต์เป็นโลหะที่เพิ่มการเจริญของเชื้อ (metal enhancement of growth) แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นโลหะที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต Coronado *et. al.* (2000) พบว่าเชื้อ *Halomomas meridiana* ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุด ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยการทำงานของเอนไซม์ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส Malhotra *et. al.* (2000) พบว่าไอออนของ Ca^{2+} ไม่มีผลส่งเสริมหรือยับยั้งการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดยเชื้อ *B. thermooreovorans* NP54 และ *Bacillus* sp. WN11 (Mamo *et. al.* 1999) Deutch (2002) พบว่าเชื้อ *B. dipsosauri* DD1 จะผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ 2 โมลต่อลิตร

2.5.5 อุณหภูมิ

Champ *et. al.* (1983) พบว่า *L. acidophilus* LEM 220, *L. acidophilus* LEM 207 และ *L. vitelinus* LEM 202 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 55, 40 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Amund and Ogunsina (1987) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสจากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* CS202, *B. licheniformis* CS203 และ *B. cereus* CS201 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30, 50 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Sani *et. al.* (1992) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส Chiou and Jeang (1995) พบว่าเชื้อ *Cytophaga* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส Lin *et. al.* (1998) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส Mamo and Gessesse (1999) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดยเชื้อ *Bacillus* sp. WN11 พบว่าเชื้อมีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในขณะที่มีการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเชื้อ *B. licheniformis* (Saito and Yamamoto. 1975) และ *B. stearothermophilus* (Wind *et. al.* 1994) Malhotra *et. al.* (2000) พบว่าเชื้อ *B. thermooleovorans* NP54 มีการเจริญและการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทน

อุณหภูมิสูงได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในถังหมักและในการเลี้ยงแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า (shake flasks) อยู่ที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Malhotra *et. al.* 2000) Wind *et. al.* (1994) พบว่าเชื้อ *B. stearothermophilus* MFF4 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยเชื้อผลิตเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 50-70 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 70-80 องศาเซลเซียส (Vihinen and Mantsala. 1990) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้ออยู่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

2.5.6 พีเอช

Champ *et. al.* (1983) พบว่าเชื้อ *L. acidophilus* LEM 220, *L. acidophilus* LEM 207 และ *L. vitelinus* LEM 202 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่พีเอช 5.5, 6.7 และ 5.0 ตามลำดับ Amund and Ogunsina (1987) พบว่า *B. sustilis* CS202, *B. licheniformis* CS203 และ *B. cereus* CS201 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่พีเอช 7.0, 5.5 และ 7.5 ตามลำดับ Sani *et. al.* (1992) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่พีเอช 7.0 Deutch (1994) พบว่าเชื้อ *B. dipsosauri* DD1 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุดที่พีเอช 6.5 และมีรายงานว่า *B. stearothermophilus* ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่ช่วงพีเอชระหว่าง 4.5-8.0 (Vihinen and Mantsala. 1990) Tigue *et. al.* (1994) พบว่าเชื้อ *B. alcalophilus* subsp. halodurans ATCC 21591, *Bacillus* sp. NCIB 11203 และ *Bacillus* sp. IMD 370 ผลิต alkaline amylase ได้สูงสุดที่พีเอช 10.0 Chiou and Jeang (1995) พบว่า *Cytophaga* sp. ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่พีเอช 6.5 ณ ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง Lin *et. al.* (1998) พบว่า *Bacillus* sp. TS-23 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่พีเอช 8.5 Mamo and Gessesse (1999) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. WN11 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงสุดที่พีเอช 5.0 และ 6.0 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเซียมไอออนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นส่วนประกอบ พบว่ามีการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 5.5 และเชื้อไม่มีการเจริญเลยที่พีเอช 4.0 และ 9.0 Malhotra *et. al.* (2000) พบว่าเชื้อ *B. thermooleovorans* NP54 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงสุดที่พีเอช 8.0

2.6 วิธีที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากจุลินทรีย์

2.6.1 การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง (solid state fermentation)

การผลิตบนอาหารแข็ง หรือเรียกอีกอย่างว่าการหมักแบบอาหารแห้ง หมายถึง ระบบการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารในสภาพที่ไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) อยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามน้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในสภาพความชื้น (moisture) ที่ถูกดูดซับกับวัตถุดิบเท่านั้น ดังนั้นระบบการหมักแบบอาหารแข็งนี้จึงไม่รวมถึงการหมักของแข็งในอาหารข้นเหลว (slurries หมายถึง ของเหลวซึ่งมีปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูง) (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532) การหมักบนอาหารแข็งนิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรามากกว่าเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อราที่มีความสำคัญในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และมีการศึกษากันมาก คือเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในทางการค้า (ณัฐดา ชวศิริ. 2525) โดยจะใช้รำข้าวสาลี หรือรำข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบ ในบางครั้งอาจเสริมอาหารพวกโปรตีน และเกลือแร่ที่จำเป็น (ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2534) ในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งต้องทำการปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม เพื่อให้เชื้อเจริญได้ดีและเกิดการพองตัวของอนุภาคอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย นอกจากนี้ขนาด รูปร่าง และความชื้นเริ่มต้นของวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรทต้องสัมพันธ์กัน โดยที่วัตถุดิบต้องมีความพรุนมากพอกับสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อหน่วยปริมาตร ไม่เกาะติดกันจนเป็นชั้นหนาทึบ และมีการถ่ายเทของน้ำและออกซิเจนได้ดี

<u>ข้อดีของการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง</u>

1. สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด
2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณสูงและคงที่
3. ผลิตภัณฑ์สามารถสกัดได้โดยตรง ใช้วิธีที่ง่ายและสะดวก
4. สภาพการเจริญของจุลินทรีย์มีลักษณะใกล้เคียงกับธรรมชาติ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ง่าย และต้องการพื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือน้อย
6. อาหารมีปริมาณความชื้นต่ำ ลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

<u>ข้อเสียของการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง</u>

1. มีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าการหมักในอาหารเหลว
2. ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นมาก ดังนั้นการเตรียมสปอร์ต้องใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ

2.6.2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว (submerged fermentation)

การหมักในอาหารเหลวนิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา โดยทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้เลี้ยงจะนำไปฆ่าเชื้อด้วยการให้ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์

ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที โดยมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ประมาณร้อยละ 3-5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะต้องควบคุมการให้อากาศและการกวน

Underkofler and Hickey (1954) พบว่าเชื้อราในสกุล *Aspergillus* มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยการหมักในอาหารเหลว ได้แก่ *A. niger*, *A. oryzae*, *A wentii*, *A. foetidus* และ *A. alliaceus* เป็นต้น Le Mens *et. al.* (1947) พบว่าเชื้อรา *A. niger* มีหลายสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสสูงกว่าเชื้อรา *A. oryzae* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ข้อดีของการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

1. ใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิต
2. ควบคุมสภาวะในการผลิตได้ง่าย

ข้อเสียของการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

1. มีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย
2. ประสิทธิภาพของหัวเชื้อเริ่มต้นจะลดลง จึงจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงๆ อยู่เสมอ

2.7 การทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์

สารละลายเอนไซม์ที่แยกเอาเซลล์ออกไป เช่น crude enzyme จะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหย หรือนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เอทานอล อะซิโตน และตัวทำละลายอื่นๆ โดยที่จะต้องทำในที่อุณหภูมิต่ำ แล้วนำไปไดอะไลซิส (dialysis) จากนั้นทำให้แห้งเติมสารที่ศึกษาแล้วว่ารักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไว้ได้ และเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำ ในทางการค้าอาจส่งเอนไซม์ขายในรูปของสารละลาย การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ส่วนมากนิยมใช้วิธีการโครมาโตกราฟฟีแบบ molecular sieve เช่น DEAE-cellulose และ Sephadex G100 CM-cellulose เป็นต้น ซึ่งรายละเอียดที่จะใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ เชื้อจุลินทรีย์ และประสบการณ์ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยที่สมบัติและประสิทธิภาพของเอนไซม์ยังคงอยู่ ทำให้ได้เอนไซม์ในรูปที่บริสุทธิ์ขึ้น (ดวงพร คันธโชติ. 2530)

Yamane and Maruo (1974) ศึกษาขั้นตอนการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* ให้บริสุทธิ์ โดยการนำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 85 ที่พีเอช 7.5 กรองผ่าน Celite 545 จากนั้นละลายส่วนผสมของตะกอนและ Celite 545 ด้วยทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ที่ผสมด้วยแคลเซียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ พีเอช 7.5 แล้วไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์เดียวกัน

Giraud *et. al.* (1993) ศึกษาการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *L. plantarum* A6 ให้บริสุทธิ์ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง MRS medium ซึ่งมี soluble starch ที่ความ

เข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการนำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำไปทำอัลตร้าฟิวเตรชั่น และผ่าน DEAE-cellulose chromatography พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีความบริสุทธิ์และมีกิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็น 19.5 เท่า และ 12,484 ยูนิต ตามลำดับ

Aguilar *et. al.* (2000) ศึกษาการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *L. manihotivorans* LMG 18010^T ให้บริสุทธิ์ โดยนำ crude enzyme มาทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่น นำไปไดอะไลซิส แล้วผ่าน DEAE-cellulose chromatography และ Sephadex G-200 gel filtration พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีความบริสุทธิ์และมีกิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็น 28.3 เท่า และ 1,432 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

Deutch (2002) ศึกษาการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *B. dipsosauri* DD1 ให้บริสุทธิ์ โดยนำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วยเอทานอล และ desalted ethanol จากนั้นนำมาผ่าน DEAE-cellulose chromatography พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีความบริสุทธิ์และมีกิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็น 367 เท่า และ 2,240 มิลลิโมลต่อนาที ตามลำดับ

2.8 การเก็บรักษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

การเก็บรักษาเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลสให้มีกิจกรรมคงที่ หรือลดลงเพียงเล็กน้อย ต้องคำนึงถึงพีเอชและอุณหภูมิ ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีพีเอชและอุณหภูมิที่คงตัวแตกต่างกัน ดังนั้นต้องเลือกพีเอชและอุณหภูมิในการเก็บรักษาให้เหมาะสม มิฉะนั้นเอนไซม์อาจเสียสภาพได้ โดยอาจเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ได้แก่

1. ตู้เย็นธรรมดา (อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส) อาจมีการเติมอนุมูลสารบางอย่างลงไปเพื่อรักษากิจกรรมของเอนไซม์ เก็บได้นาน ประมาณ 1-2 เดือน

2. แช่แข็ง นิยมใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 0-20 องศาเซลเซียส

3. ทำ freeze dry หรือ lyophilized เป็นการระเหิดน้ำออกจากสารละลายเอนไซม์ในสภาพที่เป็นน้ำแข็ง ทำในสภาพสุญญากาศ เมื่อเสร็จแล้วสามารถเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิต่ำๆ ก็ได้

4. ทำเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) โดยให้เอนไซม์เกาะกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น แก้วที่มีรูพรุน และ polyacrylamide gel เป็นต้น

2.9 การนำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

1. อุตสาหกรรมทอผ้า กรรมวิธีในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ดังนั้นจะทำให้ด้ายดิบขาดง่าย ฉะนั้นก่อนที่จะนำมาทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้งเพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงตึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนแล้วใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งที่ติดอยู่บนผ้าทอแล้วจึงนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีนี้ใช้ได้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม (Windish and Mhatre. 1965)

2. อุตสาหกรรมทำขนมปัง โดยแป้งที่นำมาใช้ในการทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิดเด็กทริโนจีนิก เอนไซม์ (dextrinogenic enzyme) ลงไปเพื่อย่อยโมเลกุลของแป้งที่ใหญ่ให้เล็กลง แล้วเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิดแซคคาโรจีนิก เอนไซม์ (saccharogenic enzyme) ลงไปเพื่อเปลี่ยนแป้งบางส่วนให้เป็นน้ำตาล ช่วยให้ขนมปังนุ่มและไม่มีรูพรุนของอากาศ

3. การทำน้ำผลไม้ให้ใส ใช้จำกัด cloudiness คือของแข็งที่มีลักษณะเป็นก้อนที่เกิดจากแป้ง ปกตินำผลไม้ที่คั้นมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงใส่เอนไซม์อะไมเลสลงไป บ่มไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาฟาเรนไฮต์ หลังจากนั้นก็กรองเอาน้ำตาลออกซึ่งสามารถนำไปทำเยลลี่ได้

4. การผลิตแอลกอฮอล์ ในอดีตประเทศจีนเป็นประเทศแรกที่ผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ส่วนในยุโรปและอเมริกาใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากข้าวมอลท์ในระยะแรกของการผลิตแอลกอฮอล์ แต่ในปัจจุบันได้ใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อราแทน

5. การผลิตกลูโคสและไซรัปจากแป้ง ระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆจะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรดทำให้ได้น้ำตาลหลายชนิด แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดี ปัจจุบันการผลิตไซรัปจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและกลูโคสไซรัป รวมถึงมอลโตสไซรัป (maltose syrup) และฟรุคโตสไซรัป (fructose syrup) ทั้งนี้เนื่องจากไซรัปจากแป้งเหล่านี้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมผลิตขนมปัง อุตสาหกรรมผลิตลูกอม ลูกกวาด และขนมหวาน เป็นต้น โดยกระบวนการย่อยแป้งไปเป็นน้ำตาลประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1. liquefaction เป็นขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่ gelatinize แล้ว โดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (random hydrolysis) ของโซ่กลูโคส เมื่อการไฮโดรไลซ์เกิดขึ้นจะทำให้โมเลกุลของแป้งแยกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดเล็กลงและความหนืดลดลงด้วย

2. saccharification เป็นการไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ดังนั้นหลังการย่อยแล้วจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าบ้างเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นกลูโคส หรือมอลโตส หรือมอลโตไตรโอส

การผลิตกลูโคสไซรัปโดยใช้เอนไซม์

กลูโคสไซรัปได้จากการย่อยแป้ง เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง เป็นต้น โดยใช้เอนไซม์ หรือใช้กรด หรือใช้กรดและเอนไซม์ร่วมกัน ในประเทศสหรัฐอเมริกา กลูโคสไซรัปผลิตจากแป้งข้าวโพด ทวีปยุโรปกลูโคสไซรัปผลิตจากแป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่ง ส่วนใหญ่ในประเทศญี่ปุ่นกลูโคสไซรัปผลิตจากแป้งมันเทศ (Kooi. 1965) สำหรับประเทศไทย นั้นแป้งที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการผลิตกลูโคสไซรัปคือแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ. 2543)

กลูโคสไซรัปเป็นสารละลายใสเข้มข้นแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง โดยทั่วไป กลูโคสไซรัปต้องมีปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 และมีค่า dextrose equivalent (DE) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20 ในกลูโคสไซรัปมีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส และโอลิโกแซคคาร์ไรด์อื่นๆ ที่ได้จากการย่อยสลายแป้งด้วยกรด หรือ เอนไซม์ หรือโดยการใช้กรดและเอนไซม์ร่วมกัน (สมลักษณ์ เนาวรัตน์พนมมาศ. 2538) ถ้าแป้ง ถูกย่อยโดยสมบูรณ์องค์ประกอบของน้ำตาลจะเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต กลูโคสไซรัปในระยะแรกคือแป้งข้าวโพด ดังนั้นกลูโคสไซรัปจากแป้งข้าวโพดจึงเรียกอีกอย่าง หนึ่งว่าคอร์นไซรัป (corn syrup) (Shallenberger and Birch. 1975) แป้งที่ใช้ในการบริโภค ส่วนใหญ่ เช่น แป้งมันฝรั่ง แป้งสาลี และแป้งข้าวเจ้า สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต กลูโคสไซรัปได้เช่นกัน และได้รับความสนใจในการผลิตทางการค้าอีกด้วย (กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2532 ; Birch *et. al.* 1970)

ระดับการย่อยของกลูโคสไซรัปแสดงเป็นค่า dextrose equivalent (DE) ซึ่งเป็นค่าของ น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในไซรัปที่แสดงในรูปของเด็กซ์โตรสหรือกลูโคส คำนวณเป็นร้อยละของ คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Knight. 1969 ; Birch and Shallenberger. 1977)

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งในทางการค้า แบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ตามระดับ DE คือมอลโตเด็กซ์ตริน มีระดับ DE ต่ำกว่า 20 และกลูโคสไซรัปหรือคอร์นไซรัป มีระดับ DE สูง กว่า 20 (Roy *et. al.* 1984) โดยปกติคอร์นไซรัปมี DE อยู่ในช่วง 20-70 (Beynum and Roels. 1985) หรืออาจแบ่งกลูโคสไซรัปเป็น 4 ชนิด (Nicholus. 1975) ได้แก่

1. ไซรัปที่มีระดับการย่อยต่ำ (low conversion syrup) มีค่า DE อยู่ในช่วง 28-38
2. ไซรัปที่มีระดับการย่อยปกติ (regular conversion syrup) มีค่า DE อยู่ในช่วง 38-48
3. ไซรัปที่มีระดับการย่อยปานกลาง (intermediate conversion syrup) มีค่า DE 48-56
4. ไซรัปที่มีระดับการย่อยสูงมาก (extra high conversion syrup) มีค่า DE สูงกว่า 68

การผลิตกลูโคสไซรัปโดยใช้เอนไซม์ เป็นการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จนกระทั่งได้ไซรัปที่ มีค่า DE สูงตามต้องการ (Knight. 1969) เอนไซม์ที่ใช้ ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งไซรัปที่มีค่า DE สูงมักเตรียมโดยวิธีนี้ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต

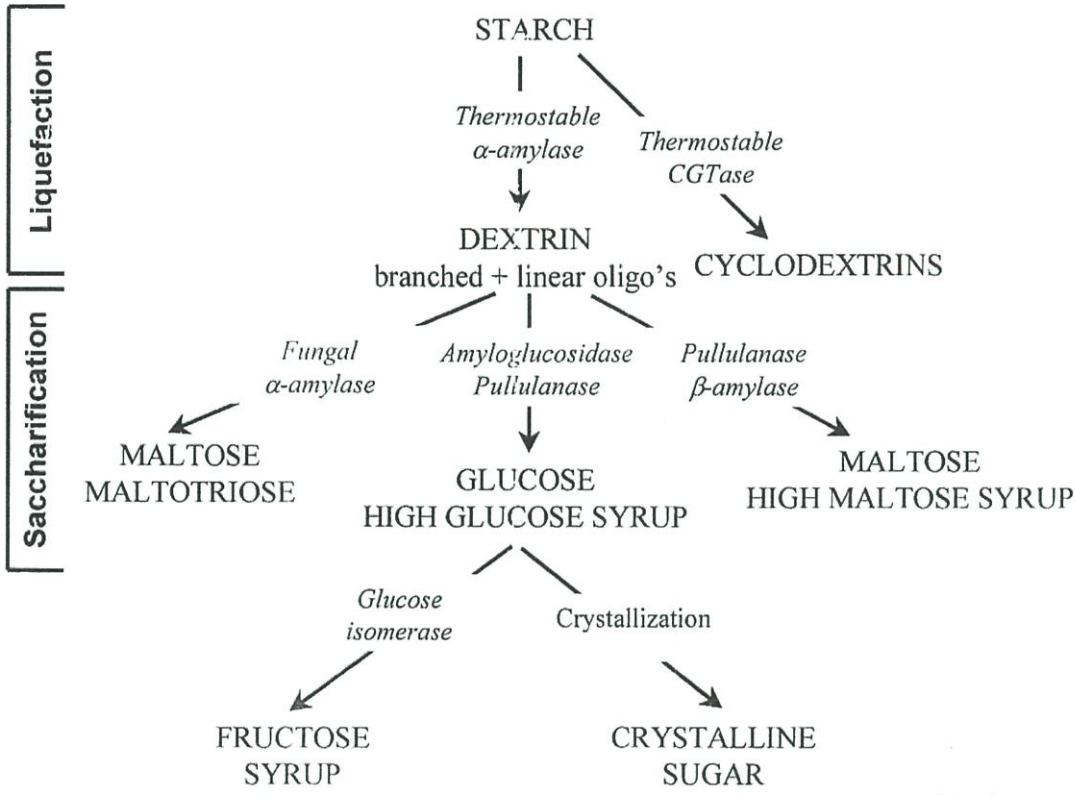
กลูโคสไซรัปในระยะแรกคือเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* หรือจากเชื้อรา เช่น *Aspergillus oryzae* เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจะย่อยสลายแป้งให้ได้โมเลกุลเล็กลงเป็นเด็กซ์ตรินและโอลิโกแซคคาไรด์ โดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจะย่อยโมเลกุลของแป้งที่พันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิก ในระยะหลังจะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสหรือเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสจาก *A. niger* แทน โดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะย่อยแป้งต่อให้ได้เป็นกลูโคส โดยย่อยโมเลกุลของแป้งที่พันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิกและพันธะแอลฟา–1,6 ไกลโคซิดิก โดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยพันธะแอลฟา–1,4 ไกลโคซิดิกได้เร็วกว่า (Junk *et. al.* 1973) ปัจจุบันการผลิตกลูโคสไซรัปจะใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งผลิตได้จากจากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic micro–organism) โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เช่น *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* เป็นต้น (Kelly *et. al.* 1990) และจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic micro–organism) เช่น *B. stearothermophilus* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 110 องศาเซลเซียส

การผลิตกลูโคสไซรัปโดยการใช้เอนไซม์เริ่มตั้งแต่การเตรียมสารละลายแป้งให้มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 40 ผ่านขั้นตอนการทำ liquefaction โดยใช้ความร้อนร่วมกับเอนไซม์ ซึ่งนิยมใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทำให้สารละลายแป้งมีความหนืดลดลงโดยการตัดโมเลกุลของแป้งให้เล็กลง จากนั้นผ่านเข้าสู่ขั้นตอน saccharification ซึ่งเป็นการย่อยแป้งที่พองตัวและผ่านการย่อยสลายไปบางส่วนแล้วให้กลายเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ตามระดับการย่อยที่ต้องการ โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส แสดงดังรูปที่ 2.5 จากนั้นกรองสารละลายใสที่ได้ และทำให้บริสุทธิ์โดยการไหลผ่านผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) และเรซินชนิดแลกเปลี่ยนไอออน แล้วทำให้เข้มข้นจนได้ไซรัปที่มีปริมาณของแข็งประมาณร้อยละ 50 นอกจากนี้สามารถทำการผลิตไซรัปที่มีปริมาณมอลโตสสูงได้โดยผ่านขั้นตอนการทำ liquefaction จากนั้นลดอุณหภูมิของสารละลายใสที่ได้อย่างรวดเร็วให้เหลืออุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจาก *A. oryzae* ลงไปย่อย กรอง ทำให้บริสุทธิ์ และทำให้เข้มข้นขึ้น จะได้ไซรัปที่ได้มีค่า DE ประมาณ 44 และมีมอลโตสอยู่ในปริมาณสูง (Birch *et. al.* 1981 ; Chaplin and Bucke. 1990)

<u>ข้อดีของการผลิตกลูโคสไซรัปโดยใช้เอนไซม์</u> (ณัฐดา ชวศิริ. 2525)

1. สีของไซรัปจะใสขึ้น
2. ทำได้ในสภาพธรรมดาไม่ต้องทำภายใต้ความดันสูงๆ
3. ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือทนกรดสูงๆ ซึ่งมีราคาแพง
4. มีการตกผลึกของกลูโคสได้ดีกว่า เพราะมีสารแปลกปลอมที่มีผลต่อการตกผลึกน้อย
5. สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งโดยวิธีที่ใช้กรด ซึ่งธรรมดาจะได้กลูโคสเพียงร้อยละ 87 แต่เมื่อใช้เอนไซม์จะได้กลูโคสถึงร้อยละ 96

Lages and Tannenbaum (1978) ได้ใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรีย และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อราผลิตน้ำตาลจากแป้งมันสำปะหลัง ปรากฏว่าสามารถให้กลูโคสได้ถึง 100 กรัมต่อวัตถุดิบที่ใช้เริ่มต้น 100 กรัม ภายในเวลา 12-24 ชั่วโมง สำหรับแป้งมัน และในเวลา 24-26 ชั่วโมง สำหรับมันสำปะหลัง



รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้อง
ที่มา : Van der Maarel *et. al.* (2002)

2.10 ทุเรียน (*Durio zibethinus*)

ทุเรียนจัดเป็นผลไม้เมืองร้อน และเป็นราชาแห่งผลไม้ จัดอยู่ในลำดับ *Mavales* วงศ์ *Bombaceae* มีถิ่นกำเนิดในแถบร้อนทางตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย พม่า และไทย เป็นต้น ผลมีลักษณะแปลก คือมีหนามแหลมเห็นได้ชัด เป็นผลไม้ที่มีรสดี และมีราคาแพง เนื้อผลมีสีขาว เหลือง จำปา และอื่นๆ ซึ่งน่ารับประทาน นอกจากนี้ยังมีกลิ่นหอมและหวานมันอีกด้วย ชอบอากาศร้อนชื้น ปกติเจริญได้ดีในสภาพอากาศที่มีความชื้นในอากาศร้อยละ 75-80 มีฝนตกสม่ำเสมอ อุณหภูมิเฉลี่ย 24-30 องศาเซลเซียส ชอบดินร่วนซุยที่มีน้ำระบายดี พีเอชของดินประมาณ 5.0-6.5 (สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคตะวันออก. 2534) ลำต้นเป็นเปลือกแข็งสีเทาแก่ เป็นสะเก็ดขรุขระมีรอยแตกเป็นทางยาว เป็นไม้เนื้ออ่อนที่มีกิ่งก้านของลำต้นโดยรอบสลับทิศทาง ลักษณะของกิ่งจะจะเหยียดตรงหรือโค้งงอขึ้นอยู่กับลักษณะประจำพันธุ์ ทุเรียนจัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดใบกว้าง โดยใบเป็นแบบใบเดี่ยว (simple leaf) ปลายใบแหลม ก้านใบสีน้ำตาลยาวประมาณ 1 นิ้ว ใบแตกจากตาของกิ่งในลักษณะทแยงตรงข้ามกับกิ่ง การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับ (alternate leaf) ดอกทุเรียนจัดเป็นดอกสมบูรณ์ (complete flower) และเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) คือ มีส่วนประกอบครบ มีเกสรตัวผู้ (stamen) และเกสรตัวเมีย (pistil) อยู่ในดอกเดียวกัน ดอกทุเรียนจะผลิออกมาจากกิ่งที่แตกจากต้นและจะออกเป็นช่อๆ หนึ่ง ประมาณ 5-30 ดอก ก้านดอกกลม โคนโตปลายเรียวเล็ก มีเกล็ดเล็กๆ สีน้ำตาล หรือสีทองคลุมอยู่เต็ม ดอกตูมมีลักษณะกลม หรือรูปไข่ ส่วนผลของทุเรียนเป็นแบบ aril fruit ชนิดเดี่ยว มีเปลือกเต็มไปด้วยหนามรูปปิรามิด ผลหนึ่งมีรังไข่ 5 ช่อง ทำให้เกิดเป็น 5 พู มีบางพูที่มีเมล็ดลีบ หรือเมล็ดตาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ เนื้อมีสีต่าง ๆ ตั้งแต่สีขาว เหลือง เหลืองอ่อน จนถึงสีจำปา ซึ่งหลังดอกบานแล้ว 4 สัปดาห์ จะเริ่มเห็นเนื้อเกิดขึ้นชัดเจนเป็นแผ่นแข็งกรอบสีขาวจะค่อยๆเคลื่อนออกสองด้านขยายห่อหุ้มเมล็ดไว้ หลังจากนั้นเนื้อทุเรียนจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน สีเหลือง หรือสีจำปาตามแต่ชนิดของพันธุ์ ดังนั้นจึงจัดทุเรียนเป็นผลไม้ที่เชิดหน้าชูตาของคนไทย ทั้งนี้เพราะมีความแปลกทั้งรูปร่าง กลิ่น และรส ทั้งยังเป็นที่ยอมรับของคนทั่วโลก ดังจะเห็นได้จากปัจจุบันมีการส่งออกทุเรียนไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศทั้งทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย นอกจากนี้เนื้อทุเรียนยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ให้ทั้งพลังงาน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน ไฟเบอร์ และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของทุเรียน ต่อ 100 กรัมของส่วนที่รับประทานได้

รายการ	คุณค่าทางโภชนาการ
องค์ประกอบทั่วๆไป	
น้ำ	64.99 กรัม
พลังงาน	147.00 กิโลแคลลอรี (615 กิโลจูล)
โปรตีน	1.47 กรัม
ไขมัน	5.33 กรัม
คาร์โบไฮเดรต	27.09 กรัม
ไฟเบอร์	3.80 กรัม
แร่ธาตุ	
แคลเซียม	6.00 มิลลิกรัม
เหล็ก	0.430 มิลลิกรัม
แมกนีเซียม	30.00 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	38.00 มิลลิกรัม
โปแตสเซียม	436.00 มิลลิกรัม
โซเดียม	1.00 มิลลิกรัม
สังกะสี	0.28 มิลลิกรัม
คอปเปอร์	0.207 มิลลิกรัม
แมงกานีส	0.324 มิลลิกรัม
วิตามิน	
วิตามินซี (กรดแอสคอร์บิค)	19.70 มิลลิกรัม
ไทอะมีน	0.374 มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน	0.20 มิลลิกรัม
ไนอะซิน	1.074 มิลลิกรัม
กรดแพนโททีนิค	0.23 มิลลิกรัม
วิตามินบี-6	0.316 มิลลิกรัม
วิตามินเอ	45.00 หน่วย
วิตามินเอ (เรตินอล)	5.00 ไมโครกรัม

ที่มา : Durian Snapshot. 2003. [Online]. www.Foodmarketexchang.com

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ของบริษัท Olympus รุ่น CHS3
2. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของบริษัท HACA รุ่น DR/4000V
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert รุ่น BE600
4. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท WTB binder รุ่น ED53
5. เครื่องบ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ของบริษัท GALLENKAMP
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Hermle รุ่น z 383 k
7. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท HIRAYAMA รุ่น HA-300 MIV
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-4000 H
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 s
10. เครื่องอังน้ำอุ่น (water bath) ของบริษัท Clifton รุ่น unstirred bath
11. หลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ขนาด 30,000 ดาลตัน (Centrifugal Filter Devices Molecular Weight Cut off 30,000 Da ชื่อทางการค้า Centricon Plus-20 ยี่ห้อ MILLIPORE)
12. Hot plate stirrer ของบริษัท BARNSTAD/THERMOLYNE รุ่น SP46920-26
13. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215
14. ถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด ปริมาตร 8.8 x 31.5 x 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร
15. เครื่องผสมสาร (vortex) ของบริษัท IKA® รุ่น MS 1 Minishaker
16. ไมโครปิเปต (micropipet) ของบริษัท GIBTHAI
17. ตู้เขี่ยเชื้อ ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123
18. ตู้ดูดควัน ของบริษัท ASTEC รุ่น Astecair 5000 E
19. เครื่องร่อนคัดขนาด (sieve test)
20. จานเพาะเชื้อ (plate) ของบริษัท Pyrex
21. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท Pyrex
22. ฟลาสก์ (flask) ของบริษัท Pyrex
23. ปิเปต (pipet) ของบริษัท Pyrex
24. โถดูดความชื้น (desiccator)
26. คอขวด

3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract) ของบริษัท Scharlau
2. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Scharlau
3. soluble starch ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
4. เปปโตน (peptone) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
5. แป้งมันสำปะหลัง ตราปลามังกร ของโรงงานแป้งมัน ไทยทำ ชลบุรี
6. แป้งมันฝรั่ง ของบริษัท Sigma
7. แป้งข้าวโพด ตราคนอร์ ของบริษัทยูนิลีเวอร์ เบสท์ฟู้ดส์ (ประเทศไทย) จำกัด
8. มอลโตส ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
9. กลูโคส ของบริษัท Fluka
10. ไซโลส ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
11. รำข้าวเจ้า (ข้าวหอมมะลิ) ตราก๊อตซิล่า
12. น้ำกลั่น
13. วุ้น (agar) ของบริษัท Scharlau
14. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) ของบริษัท Fluka
15. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต($Na_2HPO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck
16. โปแตสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
17. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
18. เกลือแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) ของบริษัท Sigma
19. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
20. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
21. ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
22. แมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO_4.2H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
23. คอปเปอร์ซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($CuSO_4.H_2O$) ของบริษัท Scharlau
24. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
25. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
26. แอมโมเนียมคลอไรด์ ($(NH_4)_2Cl_2$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
27. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
28. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
29. ไดโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
30. สารละลายฟีนอล (C_2H_5OH) ของบริษัท Sigma

31. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
32. โปแตสเซียมไอโอไดร์ (KI) ของบริษัท Sigma
33. กรดไฮโดรคลอริค (HCl) ของบริษัท J.T. Baker
34. กรดซัลฟิวริค (H_2SO_4) ของบริษัท J.T. Baker
35. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
36. โทลูอีน ของบริษัท J.T. Baker
37. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก ของบริษัท Sigma
38. สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ของบริษัท Fluka
39. สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ของบริษัท Fluka
40. เอทานอล ร้อยละ 95 ขององค์การสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัดฉะเชิงเทรา
41. คาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์
42. ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์
43. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.3 วัตถุดิบ

ใช้เมล็ดทุเรียนดิบพันธุ์หมอนทองจากสวนทุเรียนของคุณสนั่น จินตกานนท์ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี และจากตลาดผลไม้ตะพง อำเภอแกลง จังหวัดระยอง

เตรียมวัตถุดิบโดยนำเมล็ดทุเรียนดิบไปต้มในน้ำ เป็นเวลา 20 นาที นำไปทำให้สะเด็ดน้ำ แล้วลอกเปลือกออกให้เหลือแต่ส่วนที่เป็นเนื้อสีขาว นำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาแผ่บนถาดอลูมิเนียม นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเมล็ดทุเรียนที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบดอัตโนมัติ จากนั้นนำไปร่อนด้วยเครื่อง sieve test เพื่อทำการคัดขนาดโดยให้มีขนาดของเมล็ดทุเรียนที่ขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร และนำใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ในโถดูดความชื้น

3.4 การแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากดิน

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้อาศัยอยู่ จากสถานที่ดังต่อไปนี้ โรงงานผลิตขนมจีนแป้งสด โรงงานผลิตขนมจีนแป้งหมัก โรงงานผลิตขนมลอดช่อง โรงงานผลิตขนมเทียน จากจังหวัดกรุงเทพมหานคร ฉะเชิงเทรา นครปฐม และสุพรรณบุรี โดยนำดินใส่ถุงพลาสติกแล้วนำมาแยกสายพันธุ์แบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

3.4.2 การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียขั้นต้น

ชั่งตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ในข้อ 3.4.1 จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างดินกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูด suspension ของตัวอย่างดินมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลางแล้วเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9.0 มิลลิลิตร ผสม suspension ของตัวอย่างดินให้เข้ากัน นำไปเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารแข็ง starch agar (ภาคผนวก ก) โดยใช้เทคนิค spread plate ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมงอจุ่มแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เผาไฟเกลี่ยสารละลายเชื้อให้ทั่วอาหารอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยหยดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ก) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนี ถ้าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้จะสร้างบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน และสร้างบริเวณใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร มาแยกจนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค streak plate และเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง nutrient agar (ภาคผนวก ก)

นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสซ้ำอีกครั้ง โดยทำการเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารแข็ง starch agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดบริเวณใสของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินกับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการรายงานผลว่าสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ (ชัยอนันต์ นามงาม. 2545) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่สร้างบริเวณใสสูงสุด 10 ลำดับแรก มาทำการคัดเลือกการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสซ้ำอีกครั้งในอาหารเหลว

3.4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ปริมาณสูงในอาหารเหลว

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.2 ทั้ง 10 ไอโซเลต และเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในอาหารเหลวขั้นต่ำ (minimal medium) โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1-2 ลูป ลงในอาหารเหลวขั้นต่ำ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักไปปั่นแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสตามวิธีของ Bernfeld (1951) ในภาคผนวก ข และคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดไว้ศึกษาต่อไป

3.4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากดิน

ทำการศึกษาและวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3 อย่างคร่าวๆ โดยการย้อมสีแกรม (Gram 's stain) เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะและการติดสีแกรม แล้วนำไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยระบบเอ พี ไอ (Analytical Profile Index : API 50 CHB test) (ในภาคผนวก ข) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

ใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3 และ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ประมาณ 1-2 ลูป มาลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก 2 สัปดาห์

3.4.6 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เขี่ยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3 ประมาณ 1-2 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเท่ากับ 0.5

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆ ในเมล็ดทุเรียน

นำเมล็ดทุเรียนมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ความชื้น น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และแป้ง ตามวิธีในภาคผนวก ข

3.6 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด

ใช้สูตรอาหาร 5 สูตร ดังนี้ คือ

สูตรที่ 1 : soluble starch เติมมอลโตส เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 2 : เมล็ดทุเรียน เติมน้ำกลั่น

สูตรที่ 3 : เมล็ดทุเรียน เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 4 : เมล็ดทุเรียน เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 5 : เมล็ดทุเรียน เติมมอลโตส เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 6 : เมล็ดทุเรียน เติมมอลโตส เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เติมสารละลายเกลือแร่

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด จากนั้นเติมสารอาหารต่างๆ ตามสูตรข้างต้น โดยใช้มอลโตสร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) เป็นแหล่งไนโตรเจน เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารให้ได้ร้อยละ 70 และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 2 นอร์มอล แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.6 ในปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน (72 ชั่วโมง) สกัดเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 8.0 (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วนเมล็ดทุเรียนต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 น้ำหนักเมล็ดทุเรียนต่อปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หยดโทลูอีน 2-3 หยด นำไปบ่มบนเครื่องบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสตามวิธีของ Bernfeld (1951) ในภาคผนวก ข

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด

3.7.1 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมมอลโตสร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) และแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารให้ได้ร้อยละ 70 แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.6 โดยการแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นตามสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน)

สูตรที่ 2 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 9.25 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 15 ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน)

สูตรที่ 3 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 20 ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน)

สูตรที่ 4 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 8.75 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 25 ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน)

ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.2 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมมอลโตสร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) และแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) เติมสารละลายเกลือแร่เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 4.25 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50)

สูตรที่ 2 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 6.75 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60)

สูตรที่ 3 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 9.25 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70)

สูตรที่ 4 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ปริมาตร 16.75 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80)

นำอาหารทั้ง 4 สูตร มาปรับพีเอชเริ่มต้นให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริค แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

3.7.3.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) และเติมแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนตามสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติม soluble starch 0.05 กรัม

สูตรที่ 2 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมมอลโตส 0.05 กรัม

สูตรที่ 3 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมกลูโคส 0.05 กรัม

สูตรที่ 4 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมไซโลส 0.05 กรัม

ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารทั้ง 4 สูตร ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) และเติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในปริมาณร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) แล้วปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

3.7.4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 และเติมแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนตามสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมเปปโตน 0.05 กรัม

สูตรที่ 2 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.05 กรัม

สูตรที่ 3 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 กรัม

สูตรที่ 4 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 กรัม

ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารทั้ง 4 สูตร ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 และเติมแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในปริมาณร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) แล้วปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.5 การศึกษาขนาดของเมล็ดทุเรียนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 และเติมแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 โดยมีขนาดของเมล็ดทุเรียน ดังนี้ เล็กกว่า 75 ไมโครเมตร 75-150 ไมโครเมตร 150-500 ไมโครเมตร และ 500-850 ไมโครเมตร จากนั้นปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.6 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

3.7.6.1 การศึกษาชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม โดยมีขนาดของเมล็ดทุเรียนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 และเติมเกลืออนินทรีย์ในปริมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) โดยแปรผันชนิดของเกลืออนินทรีย์ตามสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 กรัม

สูตรที่ 2 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมเฟอรัสซัลเฟต 0.05 กรัม

สูตรที่ 3 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.05 กรัม

สูตรที่ 4 : เมล็ดทุเรียน 5 กรัม ไม่เติมเกลืออนินทรีย์

จากนั้นปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ กรดไฮโดรคลอริค นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม โดยมีขนาดของเมล็ดทุเรียนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 และเติมเกลืออนินทรีย์ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.6.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ในปริมาณร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) จากนั้นปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 แล้วปรับพีเอชของอาหารให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม โดยมีขนาดของเมล็ดทุเรียนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 และเติมเกลืออนินทรีย์ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.6 จากนั้นปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่า 8.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 37, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.8 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ชั่งเมล็ดทุเรียน 5 กรัม โดยมีขนาดของเมล็ดทุเรียนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 และเติมเกลืออนินทรีย์ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.6 จากนั้นปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่า 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริค นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.7 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.9 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1–3.7.8 นำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยแปรผันชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ดังนี้ เมล็ดทุเรียน รำข้าวเจ้า แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.10 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินกับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1–3.7.8 นำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินเปรียบเทียบกับเชื้อ

Bacillus subtilis TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.7.11 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินกับการผลิตเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลส

ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1–3.7.8 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินด้วยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อโดยวิธี total plate count โดยใช้เทคนิค pour plate เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน

3.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

3.8.1 การทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอนที่ 1 : การตกตะกอนเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสด้วยเอทานอลร้อยละ 95

เตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6 (ผลิตเอนไซม์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1–3.7.8) แล้วนำสารละลายเอนไซม์ (เอนไซม์สกัด) มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 และ 80-90 (ภาคผนวก ค) ทิ้งให้ตกตะกอนสมบูรณ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเอนไซม์ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสตามวิธีของ Bernfeld (1951) และปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry *et. al.* 1951) ภาคผนวก ข

ขั้นตอนที่ 2 : การทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น

นำสารละลายตะกอนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยหลอดที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ขนาด 30,000 ดาลตัน ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนที่อยู่ด้านบนของหลอดมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนตามวิธีในภาคผนวก ข เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในแต่ละขั้นตอนการเตรียม

หมายเหตุ : ทุกขั้นตอนปฏิบัติที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.8.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

เตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.8.1 แล้วนำสารละลายเอนไซม์ (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ดังนี้ ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 3.0-5.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0-8.0 และคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 9.0-10.0 (ภาคผนวก ก) ผสมสารละลายเอนไซม์ให้เข้ากันทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีของ Bernfeld (1951) (ภาคผนวก ข) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานมอลโตส คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ

3.8.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

เตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.8.1 แล้วนำสารละลายเอนไซม์ (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH) ตามผลการทดลองจากข้อ 3.8.2 ผสมให้เข้ากันทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีของ Bernfeld (1951) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานมอลโตส คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

3.8.4 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่พีเอชต่างๆ

เตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.8.1 จากนั้นนำเอนไซม์ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ที่พีเอช 3.0-10.0 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายเอนไซม์ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาปรับพีเอชให้ได้ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานตามผลการทดลองจากข้อ 3.8.2 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) มาเติมน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซึ่งมีค่า

พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานตามผลการทดลองจากข้อ 3.8.2 ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimum temperature) ตามผลการทดลองจากข้อ 3.8.3 เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตามวิธีของ Bernfeld (1951) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานมอลโตส ทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการบ่มที่พีเอชต่างๆ โดยรายงานผลในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

3.8.5 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ

เตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.8.1 จากนั้นนำเอนไซม์ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตามผลการทดลองจากข้อ 3.8.2 ผสมสารละลายเอนไซม์ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายเอนไซม์มาทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) มาเติมน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซึ่งมีค่าพีเอชตามผลการทดลองจากข้อ 3.8.2 ผสมให้เข้ากันทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตาม ผลการทดลองจากข้อ 3.8.3 เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตามวิธีของ Bernfeld (1951) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานมอลโตส เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยรายงานผลในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ONE-WAY ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.10 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ณ อาคารปฏิบัติการ 5 ชั้น คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียขั้นต้นจากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ผลการนำตัวอย่างดินทั้ง 14 แหล่ง มาทำการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ทั้งหมด 230 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4.1 โดยแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสสูงสุด 10 อันดับแรก ได้แก่เชื้อ H24, M17, J19, J102, E90, M19, K122, G22, E141 และ C26 ตามลำดับ และเปรียบเทียบขนาดบริเวณใสของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถสร้างบริเวณใสซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่าของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (เชื้อเปรียบเทียบ) แสดงดังตารางที่ 4.2

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ (2541) ได้ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยนำตัวอย่างดิน น้ำทิ้งจากโรงอาหาร และอาหารบูด มาคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสได้ บนอาหารแข็ง starch agar, skim milk agar และ tributyrin agar ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่าแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 104 ไอโซเลต และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 47 ไอโซเลต โดยแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 63 และ 47 ไอโซเลต ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 82 และ 27 ไอโซเลต ตามลำดับ

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ปริมาณสูงในอาหารเหลว

ผลของการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่สร้างขึ้นและคัดเลือกเชื้อที่สร้างบริเวณใสสูงสุด 10 อันดับแรก ได้แก่เชื้อ H24, M17, J19, J102, E90, M19, K122, G22, E141, C26 และ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาคัดเลือกซ้ำอีกครั้งโดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวขั้นต่ำ ทำการบ่มบนเครื่องบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสตามวิธีของ Bernfeld (1951) พบว่าที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ E90 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 10.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 8.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวขั้นต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า E90 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 6.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ M17 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวขั้นต่ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า E90 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเชื้อ M17 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมักเช่นกัน แสดงดังตารางที่ 4.3 และตารางที่ ค 17, 18 และ 19 ในภาคผนวก ค

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ (2541) ได้ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยนำสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบการผลิตเอนไซม์ซ้ำอีกครั้ง โดยการเพาะเชื้อแบบ point inoculation บนอาหารแข็ง selective medium ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคัดเลือกเก็บเฉพาะเชื้อที่สร้างบริเวณใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงซ้ำในอาหารเหลว พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ A ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งบริเวณโรงอาหารของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 10.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เชื้อ BS ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารกระป๋องเสีย ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 7.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

4.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากดิน

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ปริมาณสูงในอาหารเหลวขั้นต่ำที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ E90 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตขนมจีนแป้งหมัก อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ E90 มาใช้ในงานวิจัย โดยนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท จากนั้นนำเชื้อ E90 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เทคนิค streak plate และทำการย้อมสีแกรมเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อขั้นต้น พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ E90 มีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) สร้างสปอร์ และติดสีแกรมบวก โดยมีโคโลนีเป็นสีขาว แสดงดังรูปที่ 4.1 และนำไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยระบบเอ พี ไอ แสดงผลการทดสอบและวิเคราะห์

ดังตารางที่ ค 1 (ภาคผนวก ค) แล้วนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ พบว่าเชื้อ E90 จัดเป็น *Bacillus cereus* ดังนั้นในผลทดลองต่อไปจึงเรียกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ว่า *Bacillus cereus* E90

ดวงพร คันธโชติ (2537ข) ; Bergey 's Manual (1986) รายงานว่า *Bacillus cereus* จัดอยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* รูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic bacteria) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic bacteria) เคลื่อนที่ได้โดยใช้ lateral หรือ peritrichous flagella สร้างเอนโดสปอร์ที่ทนความร้อนและสารเคมี 1 อัน ต่อ 1 เซลล์ สร้างกรดแลคติก เอทานอล อะซิโตน และกรดอะซิติก ทนเกลือได้น้อยกว่าร้อยละ 2-25 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มักพบปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการโดยปนเปื้อนมากับสิ่งตรวจและนำมาสู่การปนเปื้อนของเครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ (ปรีชา สุวรรณพินิจ และนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2541) และเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537)

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล (2541) คัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยนำสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการย้อมสีแกรม และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมีรูปร่างเป็นท่อน มีขนาดต่างๆกัน สร้างเอนโดสปอร์ และติดสีแกรมบวก จากนั้นนำข้อมูลมาจัดจำแนกตาม Bergey 's Manual (1986) จึงสรุปว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* แต่ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นสายพันธุ์ใด

Amund and Ogunsina (1987) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำหมักมันสำปะหลัง (cassava fermented liquor bacteria) โดยแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ CS203, CS201 และ CS202 พบว่าเชื้อ CS201 มีสัณฐานวิทยาเป็นท่อนสั้น เรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์เป็นรูปไข่อยู่กลางเซลล์ เคลื่อนที่ได้ ให้ผลบวกกับเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase-positive) และเอนไซม์แคตาเลส (catalase-positive) เจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน สามารถหมักกลูโคส แมนโนส และกาแลคโตสไปเป็นกรดและแก๊สได้ เจริญที่พีเอชเท่ากับ 5.7 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 7 ให้ผลลบกับเอนไซม์ยูรีเอส (urease-negative) และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้ จึงสรุปว่าเชื้อ CS201 จัดเป็น *Bacillus cereus*

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนไอโซเลตแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้บนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แหล่งของแบคทีเรีย (ตัวอย่างดิน)	รหัสเชื้อ	จำนวนไอโซเลต
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งสด อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม	A	28
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งหมัก อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม	B	24
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งสด อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	C	25
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งสด อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	D	16
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งหมัก อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม	E	18
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งหมัก อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี	F	10
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งสด อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี	G	21
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งสด อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี	H	17
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งหมัก อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี	I	9
โรงงานผลิตขนมลอดช่อง อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม	J	6
โรงงานผลิตขนมลอดช่อง อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม	K	10
โรงงานผลิตขนมเทียน เขตบางกะปิ จังหวัดกรุงเทพมหานคร	L	8
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งสด เขตมีนบุรี จังหวัดกรุงเทพมหานคร	M	16
โรงงานผลิตขนมจีนแป้งหมัก อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา	N	14

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และบริเวณใสของแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน สูงสุด 10 ลำดับแรก เปรียบเทียบกับของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 บนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		
	โคโลนี	บริเวณใส	ประสิทธิภาพ
C26	7.5	14.4	1.92_{h}
E90	6.6	19.4	2.94_{d}
E141	7.8	19.0	2.44_{fg}
G22	2.8	14.8	5.29_{b}
H24	4.8	28.0	5.83_{a}
J19	9.0	23.0	2.56_{b}
J102	9.5	22.8	2.40_{g}
K122	7.6	20.0	2.63_{e}
M17	6.0	22.0	3.67_{c}
M19	8.5	21.0	2.47_{f}
Bacillus subtilis TISTR 25 (เชื้อเปรียบเทียบ)	13.4	18.0	1.34_{i}

กำหนดให้

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสมีความแตกต่างกันทางสถิติ

ประสิทธิภาพ คำนวณจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสหารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

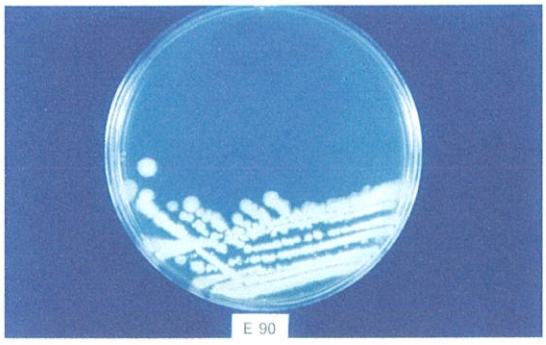
หมายเหตุ ทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ONE-WAY ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	37	45	50
รหัสเชื้อ			
C26	4.96_{i}	2.51_{k}	3.59_{o}
E90	10.33_{a}	6.84_{j}	5.24_{l}
E141	5.79_{e}	3.83_{k}	3.27_{q}
G22	5.66_{f}	3.96_{k}	3.21_{r}
H24	7.61_{c}	4.20_{k}	3.21_{r}
J19	5.42_{g}	3.21_{k}	3.01_{s}
J102	5.39_{g}	2.74_{k}	3.61_{o}
K122	6.91_{d}	3.63_{k}	3.52_{p}
M17	5.21_{h}	4.95_{jk}	4.11_{m}
M19	5.21_{h}	4.87_{jk}	4.09_{m}
Bacillus subtilis TISTR25 (เชื้อเปรียบเทียบ)	8.04_{b}	4.59_{k}	3.76_{n}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ ทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ONE-WAY ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



(ก) (ข)

รูปที่ 4.1 (ก) แสดงสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียสายพันธุ์ E90 ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
(ข) แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ E90
(x 100 objective, phase-contrast microscope)

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียน

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียนที่ใช้เป็นสับสเตรท โดยนำเมล็ดทุเรียนที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดอัตโนมัติให้มีขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร พบว่ามีปริมาณแป้งร้อยละ 25.73 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.55 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.81 โปรตีนร้อยละ 1.12 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 11.52 แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียนที่ใช้เป็นสับสเตรท

สารอาหาร	ปริมาณ (ร้อยละ)	วิธีวิเคราะห์
แป้ง	25.73	AOAC. (1975)
น้ำตาลทั้งหมด	1.55	Dubois *et. al.* (1956)
น้ำตาลรีดิวซ์	0.81	Nelson (1994)
โปรตีน	1.12	Lowry *et. al.* (1951)
ความชื้นเริ่มต้น	11.52	Jame (1995)

4.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด

ผลการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 แสดงดังรูปที่ 4.2 จากการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 76.01 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท เติมมอลโตสร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 โดยเติมสารละลายเกลือแร่ รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 1 ซึ่งใช้ soluble starch เป็นสับสเตรท โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 70.02 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 5, สูตรที่ 4, สูตรที่ 3 และสูตรที่ 2 ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมเท่ากับ 59.74, 54.41, 40.00 และ 30.63 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ซึ่งอาหารสูตรที่ 2 ที่ใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 โดยใช้น้ำกลั่น พบว่า *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ต้องเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนลงในสูตรอาหารในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้มากขึ้น

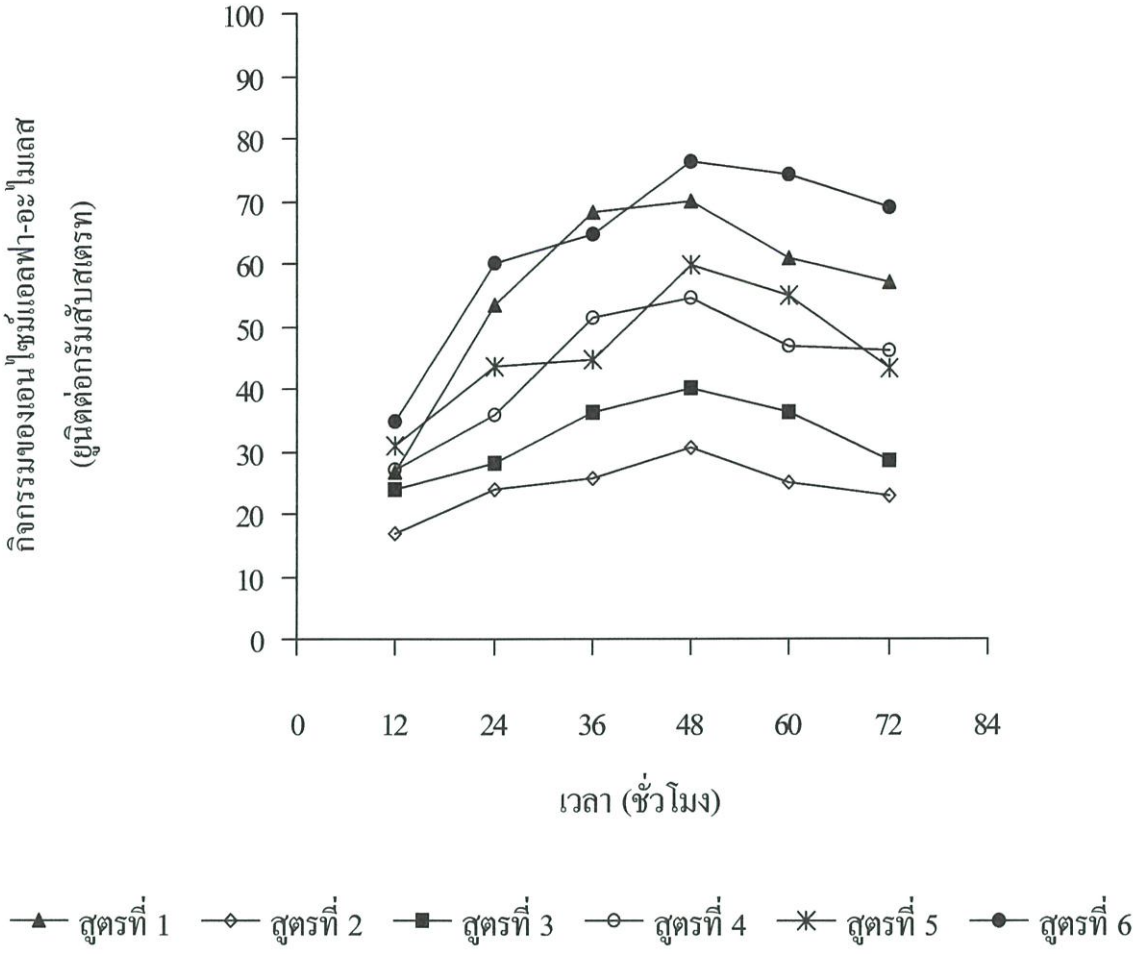
จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของชัยอนันต์ นามงาม (2545) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งขนุนเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยแปรผันองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์ พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยเศษเหลือทิ้งขนุน เติมแป้งมันฝรั่งร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเศษเหลือทิ้งขนุน) เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเศษเหลือทิ้งขนุน) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับความชื้นเริ่มต้นให้ได้ร้อยละ 70 โดยเติมสารละลายเกลือแร่ โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 67.2 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จึงกล่าวได้ว่าในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทจำเป็นต้องเติมทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนลงในสูตรอาหาร ดังจะเห็นจากผลการทดลองในอาหารสูตรที่ 4 ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว และอาหารสูตรที่ 5 ที่เติมมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสน้อยกว่าในอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งเติมทั้งมอลโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งแหล่งคาร์บอนจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์

แอลฟา-อะไมเลส (Fukumoto *et. al.* 1958) ส่วนแหล่งไนโตรเจนทำหน้าที่เป็นสารต้นตอ (precursor) ในการสังเคราะห์เอนไซม์ และพบว่าการปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ร้อยละ 70 โดยเติมสารละลายเกลือแร่ *Bacillus cereus* E90 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้น้ำกลั่น สอดคล้องกับรายงานของ Narang and Satyanarayana (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *Bacillus thermooleovorans* โดยแปรผันส่วนประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ พบว่า *Bacillus thermooleovorans* สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมแป้งและทริปโตน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 17.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์และทริปโตน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 16.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Sani *et. al.* (1992) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท โดยแปรผันองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* มีการเจริญและให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยอาหารพื้นฐาน (basal medium) และเติมเปลือกมันสำปะหลังร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 120.1±3 และ 81.8±0.2 มิลลิลิตรของการไฮโดรไลซ์แป้งต่อนาทีต่อมิลลิลิตรของโปรตีน ตามลำดับ

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดในอาหารสูตรที่ 6 และพบว่าอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งใช้ soluble starch เป็นสับสเตรท (ชุดควบคุม) และอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 6 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับอาหารสูตรที่ 4 และสูตรที่ 5 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงกว่าอาหารสูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับอาหารสูตรที่ 3 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารสูตรที่ 2 และพบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ต่ำสุดในอาหารสูตรที่ 2 ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.2 แสดงผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

กำหนดให้

สูตรที่ 1 : soluble starch เติมมอลโตส เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 2 : เมล็ดทุเรียน เติมน้ำกลั่น

สูตรที่ 3 : เมล็ดทุเรียน เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 4 : เมล็ดทุเรียน เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 5 : เมล็ดทุเรียน เติมมอลโตส เติมสารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 6 : เมล็ดทุเรียน เติมมอลโตส เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เติมสารละลายเกลือแร่

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

สูตรอาหาร	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	70.02_a	30.63_d	40.00_c	54.41_b	59.74_b	76.01_a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสูตรที่ 6 ซึ่งประกอบด้วยเมล็ดทุเรียน เติมมอลโตสร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) เป็นแหล่งคาร์บอน เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารให้ได้ร้อยละ 70 โดยเติมสารละลายเกลือแร่ ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด

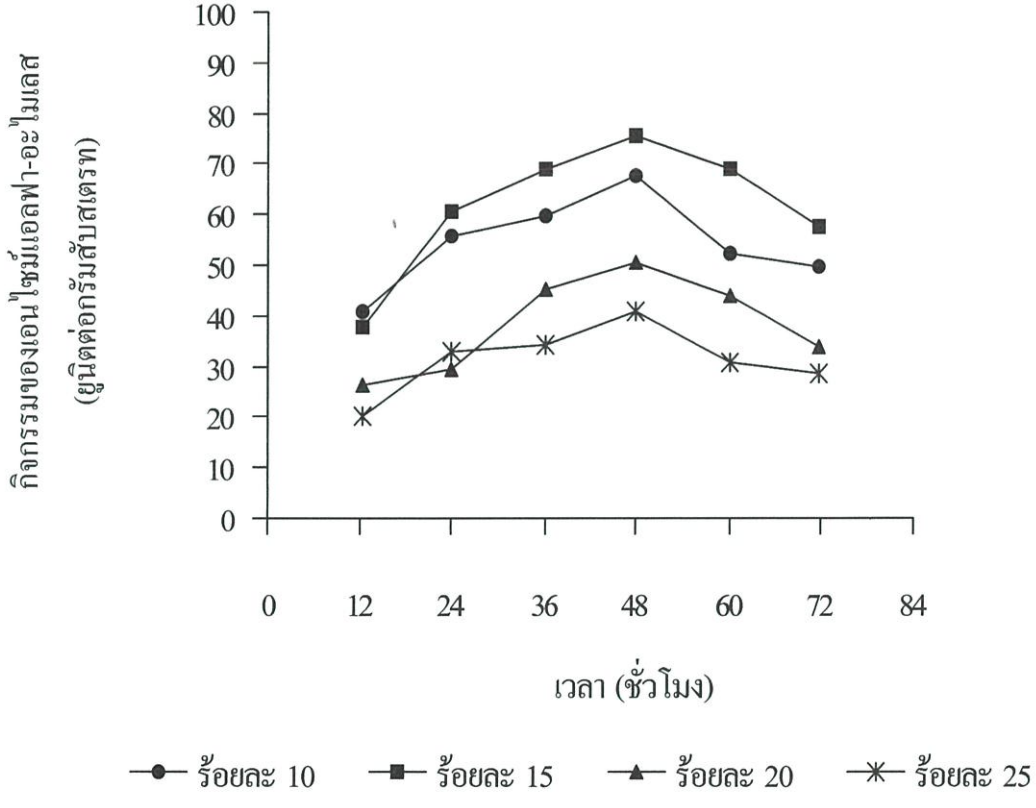
4.6.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ผลการศึกษากล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.3 จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 75.61 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 67.70 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 20 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 50.32 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 41.03 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ชัยอนันต์ นามงาม (2545) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดในสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10

(ปริมาตรต่อน้ำหนักเศษเหลือทิ้งขนุน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 68.7 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

Krishna and Chandrasekaran (1996) ศึกษาการใช้เศษเหลือทิ้งของกล้วยเป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* CBTK 106 ภายใต้สภาวะการหมักบนอาหารแข็ง โดยแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 5-40 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) พบว่า *Bacillus subtilis* CBTK 106 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดในสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)



รูปที่ 4.3 แสดงผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมมอลโตสร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ในสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10, 15, 20 และ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และสูตรอาหารที่เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน)	ร้อยละ 10	ร้อยละ 15	ร้อยละ 20	ร้อยละ 25
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	67.70_{b}	75.61_{a}	50.32_{c}	41.03_{d}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ลงในสูตรอาหาร ซึ่งเป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.2 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ผลการศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.4 จากการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 76.00 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 66.72 ยูนิต

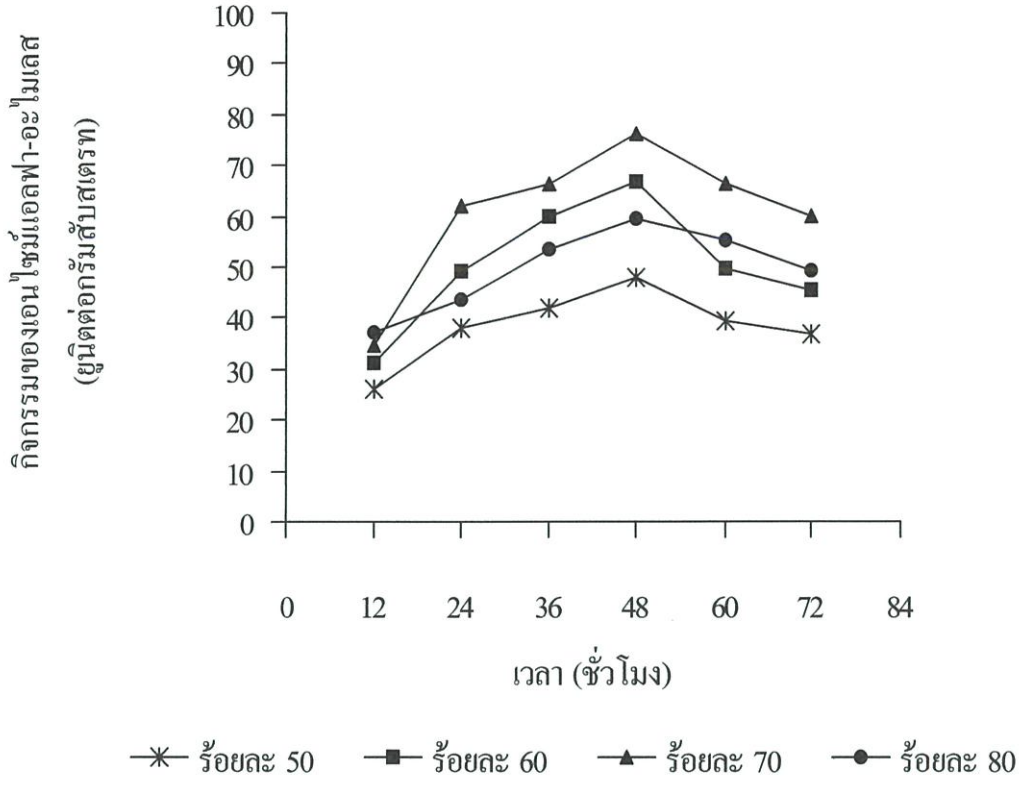
ต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 80 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 59.63 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเป็นร้อยละ 50 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 48.01 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ ชัยอนันต์ นามงาม (2545) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากวัสดุเหลือทิ้งของขนุนโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 74.5 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

Krishna and Chandrasekaran (1996) ศึกษาการใช้เศษเหลือทิ้งของกล้วยเป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* CBTK 106 ภายใต้สภาวะการหมักบนอาหารแข็ง พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* CBTK 106 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดในสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70

ในการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง จุลินทรีย์จะอาศัยน้ำซึ่งอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับกับวัตถุดิบหรือสับสเตรทเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องทำการปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม เพื่อให้เชื้อสามารถเจริญได้ดี และเกิดการพองตัวของอนุภาคสับสเตรทที่เหมาะสม ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถนำสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ในสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และสูตรอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.4 แสดงผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมมอลโตสร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ความชื้นเริ่มต้น	ร้อยละ 50	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ 80
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	48.01_{d}	66.72_{b}	76.00_{a}	59.63_{c}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเติมสารละลายเกลือแร่ให้ได้ร้อยละ 70 ซึ่งเป็นความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

4.6.3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.5 จากการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 77.63 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในอาหารสูตรที่เติม soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมมอลโตส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 64.30 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมไซโลส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 59.84 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 50.42 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับ Krishna and Chandrasekaran (1996) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* CBTK 106 โดยใช้เศษเหลือทิ้งกล้วยเป็นสับสเตรท ได้แก่ กลูโคส มอลโตส แป้ง และซูโครส พบว่าแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตแอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด รองลงมาคือ มอลโตส และกลูโคส หรือซูโครส ตามลำดับ และสอดคล้องกับการทดลองของ Tigue *et. al.* (1994) พบ

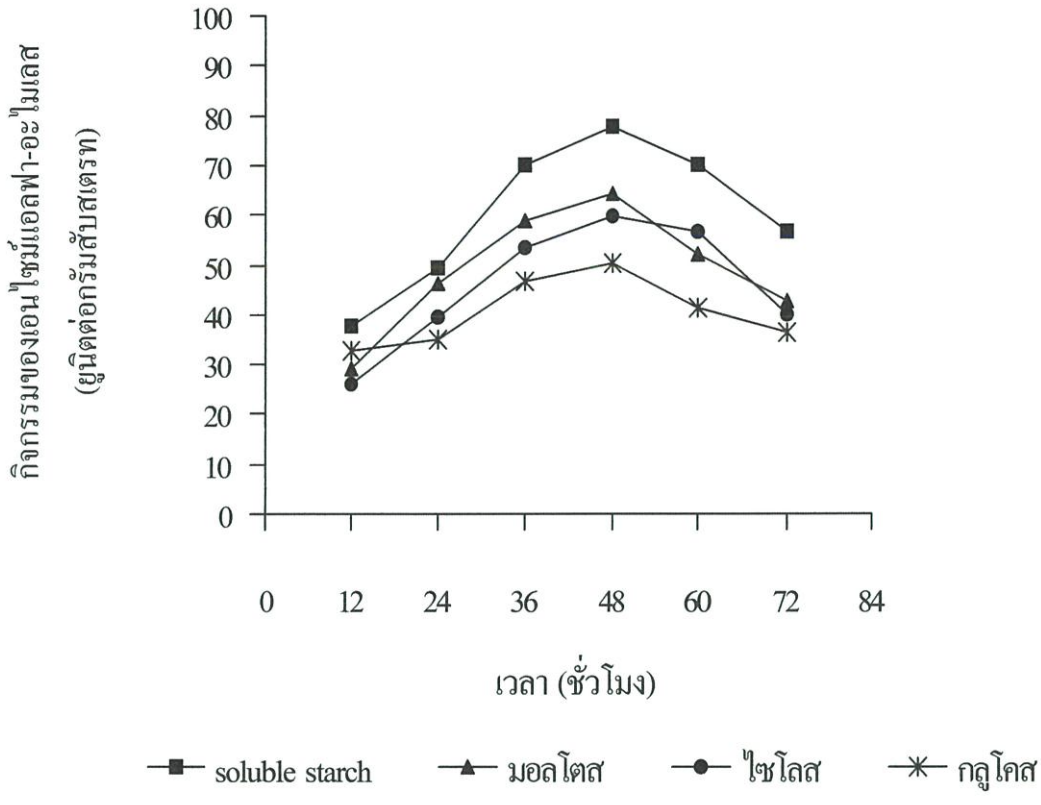
ว่า soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต alkaline amylase จากเชื้อ *Bacillus alcalophilus* subsp. halodurans ATCC 21591, *Bacillus* sp. NCIB 11203 และ *Bacillus* sp. IMD 370

Lin *et. al.* (1998) พบว่า soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus* sp.TS-23 ในขณะเดียวกันมอลโตสและอะไมโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อใช้ในการเจริญ Narang and Satyanarayana (2001) พบว่าแป้ง แลคโตส มอลโตเด็กซ์ตริน และมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงจาก *Bacillus thermooleovorans* NP54

Mamo and Gessesse (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดยเชื้อ *Bacillus* sp. WN11 พบว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือมอลโตส เมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนอื่นๆ (undefined carbon source) พบว่าแป้งที่ทำจากข้าวบาร์เล่ย์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ รองลงมาได้แก่แป้งข้าวโพด และมีการผลิตต่ำสุดเมื่อใช้แป้งสาลี

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ต้องการตัวเหนี่ยวนำ (inducible enzyme) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเพื่อใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยทั่วไปนิยมใช้แป้งหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้ง เช่น มอลโตส เด็กซ์ตริน และกลูโคส เป็นต้น (Lachmund *et. al.* 1993 ; Mørkeberg *et. al.* 1995)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าเมื่อเติม soluble starch ลงในสูตรอาหาร เชื้อ *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมมอลโตส ไซโลส และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสูตรอาหารที่เติมมอลโตส และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา- อะไมเลสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.5 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

แหล่งคาร์บอน ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	soluble starch	มอลโตส	ไซโลส	กลูโคส
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	77.63_a	64.30_b	59.84_b	50.42_c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกเติม soluble starch ลงในสูตรอาหาร ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.3.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาความเข้มข้นของ soluble starch ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.6 จากการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 82.84 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในสูตรอาหารที่เติม soluble starch ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม soluble starch ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 72.40 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติม soluble starch ร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 66.01 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติม soluble starch ร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 53.03 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Wind *et. al.* (1994) พบว่า *Bacillus stearothermophilus* สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูง

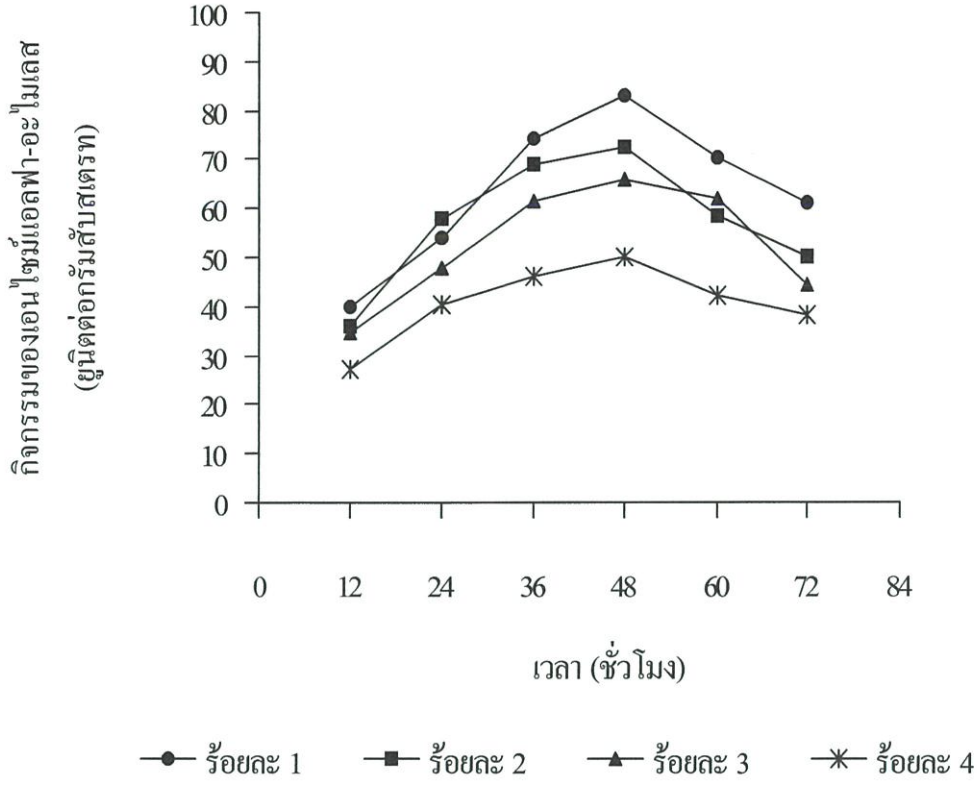
ได้สูงสุดเมื่อใช้แป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 44.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ชัยอนันต์ นามงาม (2545) พบว่าแป้งมันฝรั่งที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เศษเหลือทิ้งขนุนเป็นสับสเตรท โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 74.2 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สอดคล้องกับ Sani *et. al.* (1992) พบว่า *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี soluble starch หรือแป้งที่ผลิตจากเปลือกมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

Giraud *et. al.* (1993) พบว่า *Lactobacillus plantarum* A6 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบ Chiou and Jeang (1995) พบว่า *Cytophaga* sp. ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดดิบ (raw corn starch) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน *Bacillus thermoolevorans* NP54 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงสุด เมื่อใช้แป้งร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Malnotra *et. al.* 2000)

Meers (1972) พบว่าแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* และความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมคือร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถ้าความเข้มข้นของแป้งมากกว่านี้จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นและความหนืดสูงขึ้นทำให้การส่งผ่านออกซิเจนในน้ำหมักไม่ดีมีผลต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย (Rukhaiyar and Srivastava. 1995)

จากผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ทั้งนี้เนื่องจากถ้ามีปริมาณของแหล่งคาร์บอนไม่เหมาะสมคือมากจนเกินไปจะทำให้เกิดการกดดันการสลายคาร์บอน (carbon catabolite repression) โดยจะไปจับที่บริเวณสนับสนุน (promoter) ทำให้ไม่สามารถถอดรหัสและแปรรหัสเป็นเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ จึงมีผลทำให้อัตราการผลิตลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Agger *et. al.* 2001 ; Agger *et. al.* 2002)



รูปที่ 4.6 แสดงผลของความเข้มข้นของ soluble starch ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ในสูตรอาหารที่เติม soluble starch ร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยสูตรอาหารที่เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และสูตรอาหารที่เติม soluble starch ร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของ soluble starch ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ความเข้มข้นของแป้ง (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	ร้อยละ 1	ร้อยละ 2	ร้อยละ 3	ร้อยละ 4
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	82.84_a	72.40_b	66.01_c	55.03_d

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกเติม soluble starch ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ลงในสูตรอาหาร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

4.6.4.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.7 จากการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 90.02 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในอาหารสูตรที่เติมสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 77.51 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 71.44 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติมเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 58.60 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

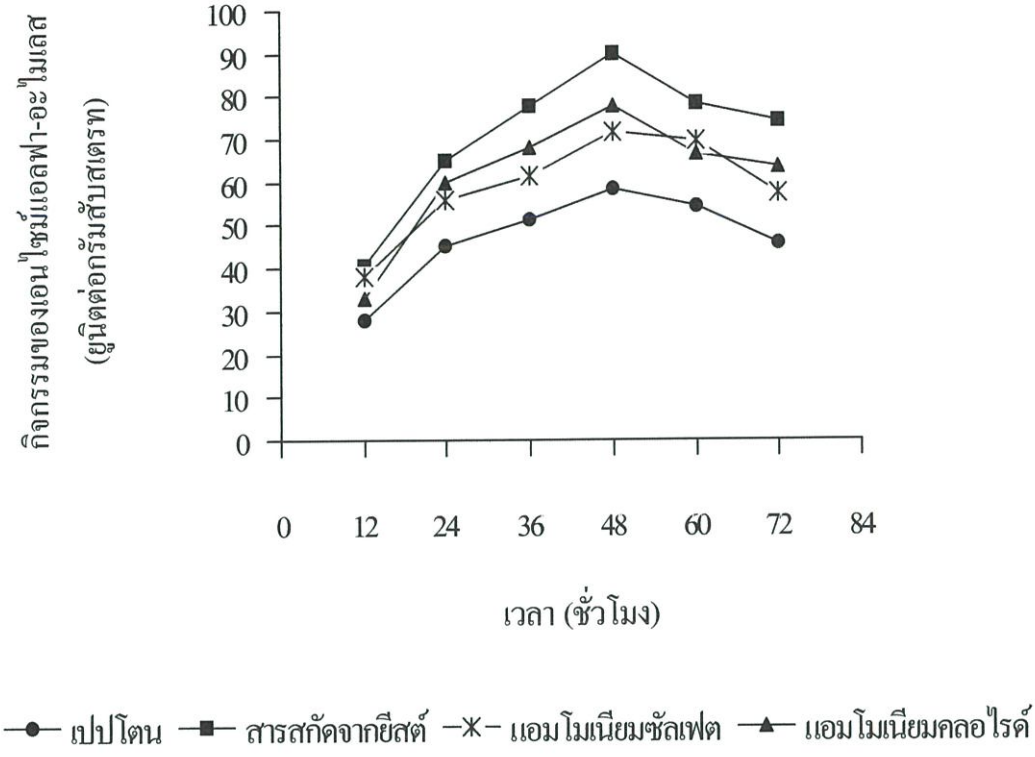
จากผลการทดลองสอดคล้องกับ Imai *et. al.* (1993) พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้ผลผลิตของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus oryzae* เพิ่มขึ้นร้อยละ 110-156 ซึ่งสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Pedersen and Nielsen. 2000)

Kelly *et. al.* (1993) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora melanosporea* NCIM 12881 ในถังหมัก 5.0-L พบว่ามีการผลิตเอนไซม์สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 40 ของการหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน

Mamo and Gessesse (1999) พบว่าทริปโตน และโปรติโอสเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการการเจริญ และการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *Bacillus* sp. WN11 และพบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเลยเมื่อใช้ไนเตรตไอออน (NO_3^+) แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องเลือกเติมชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้งที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต (organic nitrogen source) หรือจากสิ่งไม่มีชีวิต (inorganic nitrogen source) ให้เหมาะสม ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนจะไปทำหน้าที่เป็นสารต้นตอในการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสูตรอาหารที่เติมเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และสูตรอาหารที่เติมเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.10



รูปที่ 4.7 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

แหล่งไนโตรเจน ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	เปปโตน	สารสกัดจากยีสต์	แอมโมเนียมซัลเฟต	แอมโมเนียมคลอไรด์
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	58.60_{d}	90.02_{a}	71.44_{c}	77.51_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกเติมสารสกัดจากยีสต์ลงในสูตรอาหาร ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.4.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

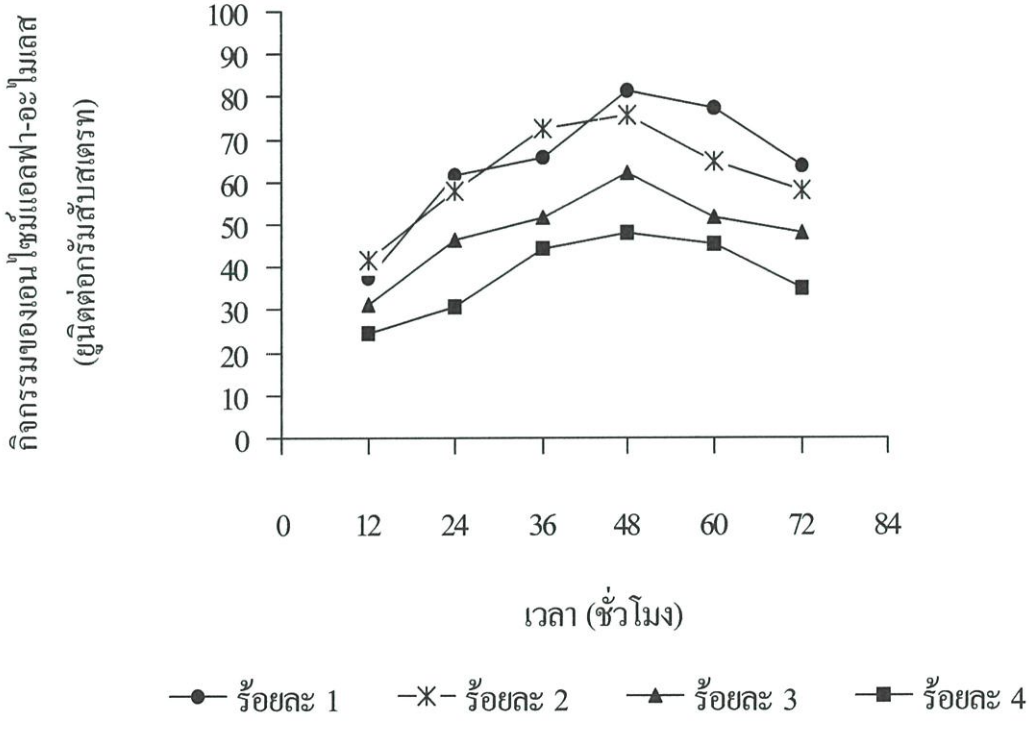
ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.8 จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 81.32 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) เป็นแหล่งไนโตรเจน ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 75.02 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 61.80 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) และสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 48.14 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

Kelly *et. al.* (1993) ทำการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Micromonospora melanosporea* NCIM 12881 ในถังหมัก 5.0-L พบว่ามี

การผลิตเอนไซม์สูงสุด ณ. ชั่วโมงที่ 40 ของการหมัก เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน

Chiou and Jeang (1995) พบว่า *Cytophaga* sp. ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโพลีเปปโตนเอส และสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ

Narang and Satyanarayana (2001) พบว่าทริปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Malhota *et. al.* 2000) ส่งเสริมการเจริญและการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *Bacillus thermooleovorans* NP54 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากมอลท์ และเปปโตน ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 แสดงผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) โดยสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 และ 2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 3 และ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) สำหรับสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	ร้อยละ 1	ร้อยละ 2	ร้อยละ 3	ร้อยละ 4
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	81.32_a	75.62_a	61.80_b	48.14_c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 คือร้อยละ 1 และ 2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ดังนั้นจึงเลือกเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักเมล็ดทุเรียน) ลงในสูตรอาหารเพื่อใช้ในการทดลองหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

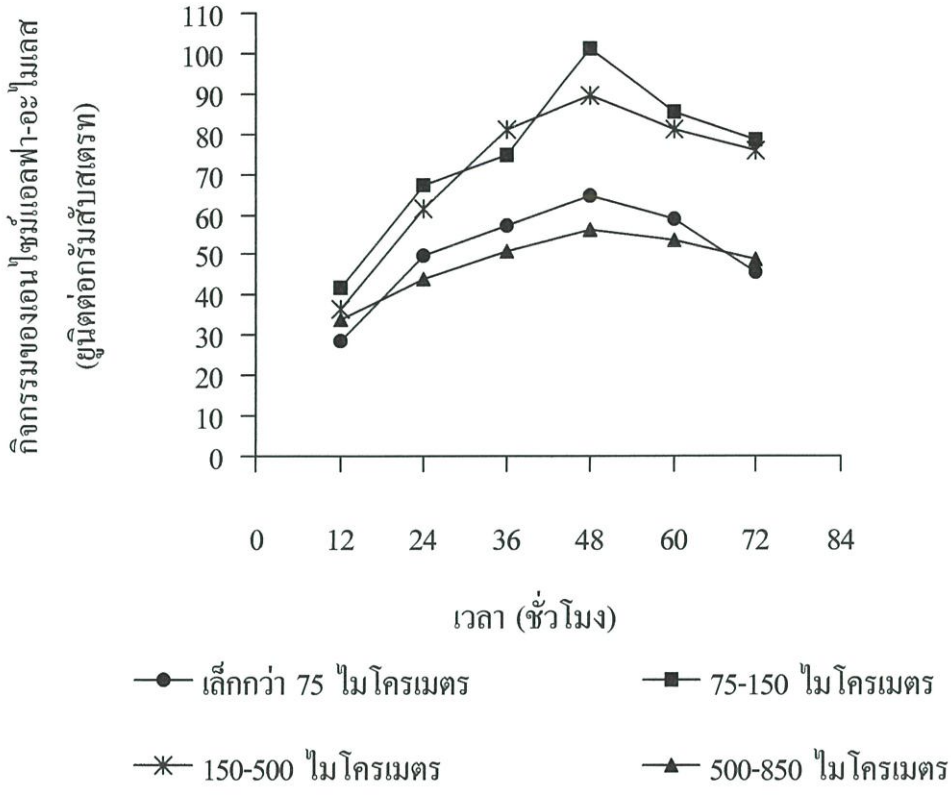
4.6.5 ผลของขนาดของเมล็ดทุเรียนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ผลการศึกษาขนาดเมล็ดทุเรียนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดย *Bacillus cereus* E90 แสดงดังรูปที่ 4.9 จากการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 101.04 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาเมื่อใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 150-500 ไมโครเมตร มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 89.50 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 75 ไมโครเมตร มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 64.43 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และเมื่อใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 500-850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเท่ากับ 56.31 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Krishna and Chandrasekaran (1996) พบว่าขนาดของเศษเหลือทิ้งกล้วยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* CBTK 106 คือขนาด 400 ไมโครเมตร โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.1×10^6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมต่อนาที ในขณะที่ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 80.1 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อใช้เศษเหลือทิ้งขนุนขนาด 500-850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (ชัยอนันต์ นามงาม. 2545)

ซึ่งขนาด รูปร่าง และความชื้นเริ่มต้นของวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรทต้องสัมพันธ์กัน โดยวัตถุดิบหรือสับสเตรทต้องมีความพรุนมากพอกับสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตร นอกจากนี้ต้องไม่เกาะติดกันเป็นชั้นหนาทึบ และมีการถ่ายเทของน้ำและออกซิเจนได้ดี (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในอาหารที่ใช้เมล็ดทุเรียนขนาดเล็กกว่า 75, 75-150, 150-500 และ 500-850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท โดยอาหารที่ใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และอาหารที่ใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 500-850 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.12



รูปที่ 4.9 แสดงผลของขนาดอนุภาคของเมล็ดทุเรียนที่ใช้เป็นสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของขนาดเมล็ดทุเรียนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ขนาดของเมล็ดทุเรียน (ไมโครเมตร)	เล็กกว่า 75	75-150	150-500	500-850
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	64.43_c	101.04_a	89.50_b	56.31_d

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.6 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

4.6.6.1 ผลของชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ผลการศึกษาชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.10 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 98.60 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในสูตรอาหารที่ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมเฟอรัสซัลเฟต มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 90.53 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 75.63 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติมคอปเปอร์ซัลเฟต โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 52.44 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

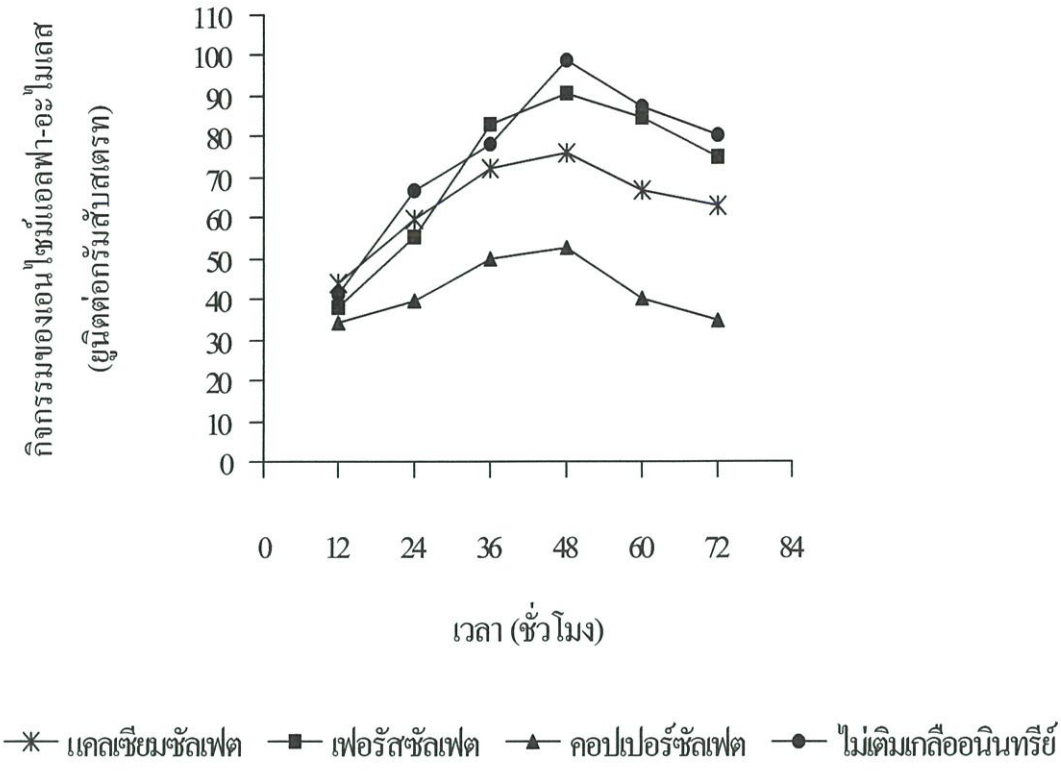
จากการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ Wallerstein (1939) ; Fukumoto *et. al.* (1958) พบว่าฟอสเฟตเป็นสารกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟอสเฟตสำหรับสร้างเอนไซม์อะไมเลสของ *Bacillus amyloliquefaciens* คือความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นขนาดนี้มากเกินพอสำหรับการเจริญ นอกจากนี้ไอออน

ของ Mn^{2+}, Zn^{2+} และ Fe^{2+} ยังกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้เป็นอย่างดี แต่ในระดับอุตสาหกรรมนั้นไม่จำเป็นที่จะต้องเติมเกลือไอออนดังกล่าวเพราะว่าจะมีอยู่แล้วในวัตถุดิบที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเมล็ดทุเรียนที่นำมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อาจมีปริมาณเกลืออนินทรีย์ที่เพียงพอกับการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90

Wu *et. al.* (1999) พบว่าเมื่อมีไอออนของ Mg^{2+} เพียงตัวเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อไอออนดังกล่าวจะแสดงบทบาทที่สำคัญในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus* sp. CRP และทำให้ผลผลิตลดลงร้อยละ 50 ในขณะเดียวกันไอออนของ Na^{+} จะช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อดังกล่าว

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไอออนของโลหะต่างๆ และเกลืออนินทรีย์อาจทำหน้าที่ในการส่งเสริมหรือยับยั้งการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อจุลินทรีย์ก็ได้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสูตรอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ เฟอรัสซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต และไม่เติมเกลืออนินทรีย์ โดยสูตรอาหารที่ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และสูตรอาหารที่เติมคอปเปอร์ซัลเฟตให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.13



รูปที่ 4.10 แสดงผลของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 150-500 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ชนิดของเกลืออนินทรีย์	แคลเซียมคลอไรด์	เฟอรัสซัลเฟต	คอปเปอร์ซัลเฟต	ไม่เติมเกลืออนินทรีย์
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	75.63_{c}	90.53_{b}	52.44_{d}	98.60_{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

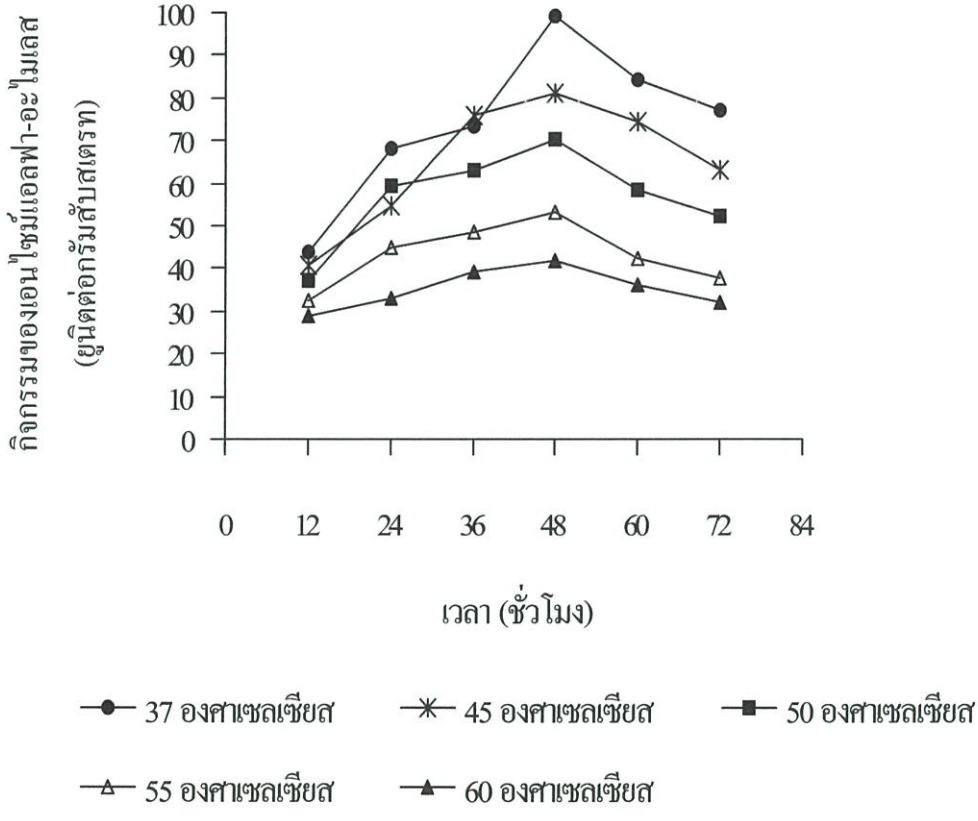
ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท จึงไม่ต้องเติมเกลืออนินทรีย์ลงในสูตรอาหาร ด้วยเหตุนี้จึงไม่ต้องทำการศึกษาความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

4.6.7 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.11 จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 99.22 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาคือบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 81.14 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 70.00 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 53.31 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และเมื่อบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 41.51 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Amund and Ogunsina (1987) พบว่า *Bacillus subtilis* CS202, *Bacillus cereus* CS201 และ *Bacillus licheniformis* CS203 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Chiou and Jeang (1995) พบว่า *Cytophaga* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จึงกล่าวได้ว่าผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจะเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic microorganism) คือที่ช่วงอุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว



รูปที่ 4.11 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	37	45	50	55	60
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	99.22_a	81.14_b	70.00_c	53.31_d	41.51_e

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.8 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

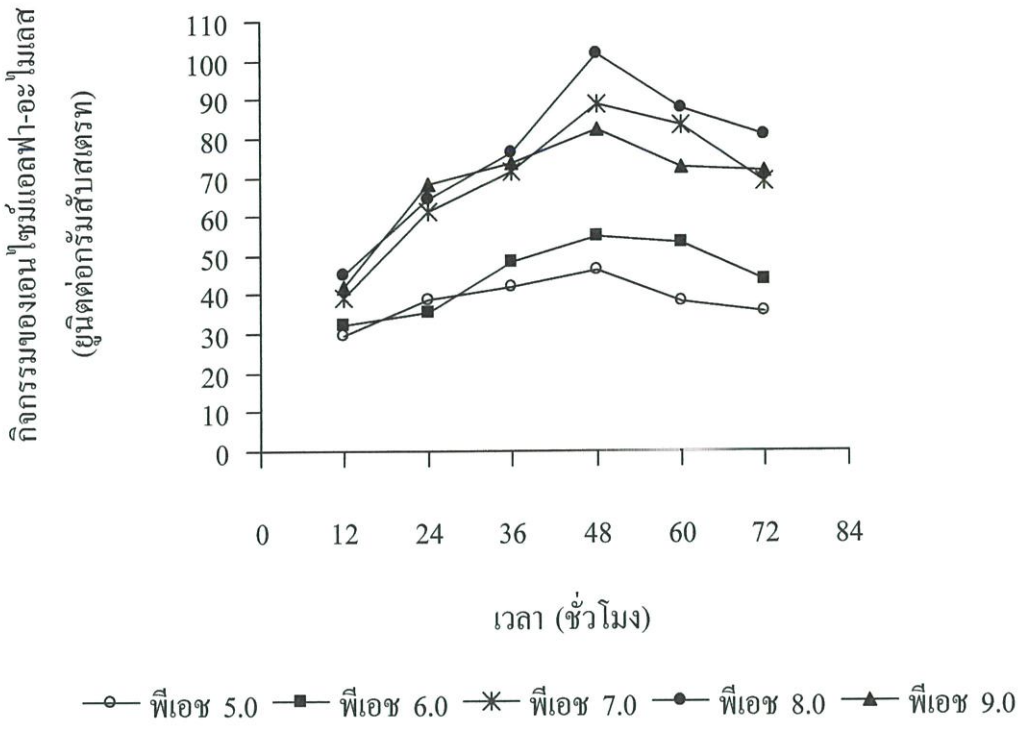
ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.12 จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 101.24 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 7.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 88.82 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่พีเอชเท่ากับ 9.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 82.20 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่พีเอชเท่ากับ 6.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ

54.83 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และที่พีเอชเท่ากับ 5.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 46.31 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Malhotra *et. al.* (2000) พบว่า *Bacillus thermooleovorans* NP54 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 8.0 Lin *et. al.* (1998) พบว่า *Bacillus* sp. TS-23 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 8.5 สำหรับ *Bacillus stearothermophilus* ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงสุดที่ช่วงพีเอชระหว่าง 4.5-8.0 (Vihinen and Mantsala. 1990)

จึงกล่าวได้ว่าพีเอชเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคือพีเอชจะมีผลในการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของจุลินทรีย์และการหลั่งเอนไซม์ พบว่าถ้าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะมีผลทำให้เชื้อหลั่งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสออกมานอกเซลล์ได้ลดลง (Gupta *et. al.* 2003)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.15



รูปที่ 4.12 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหาร กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.15 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

พีเอชเริ่มต้น	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	46.31_{e}	54.83_{d}	88.82_{b}	101.24_{a}	82.20_{c}

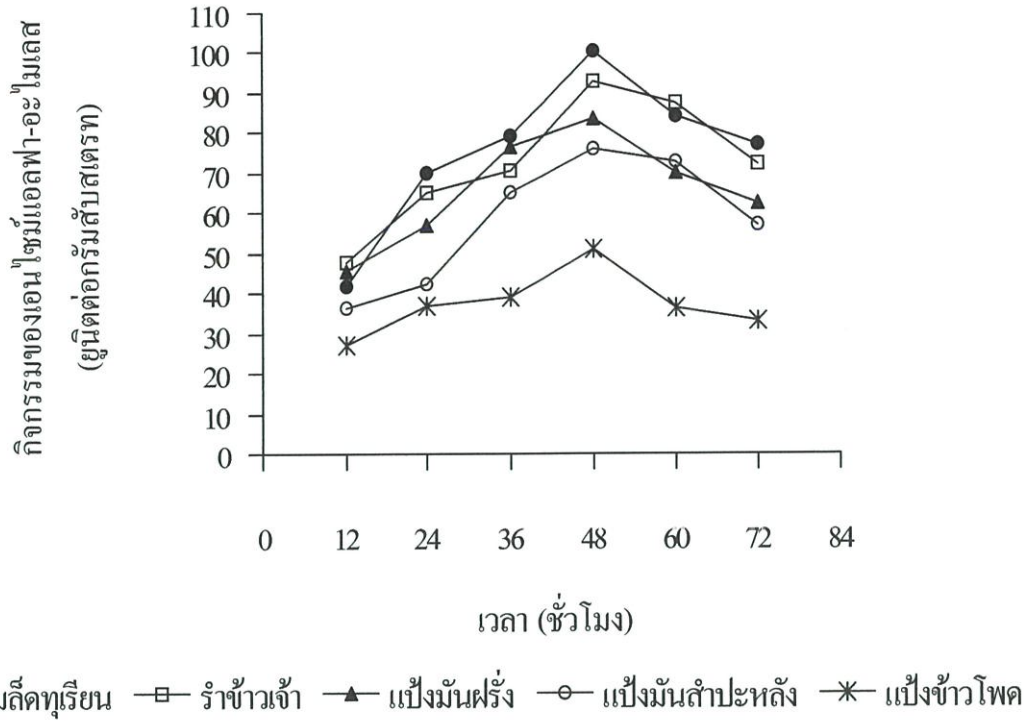
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.6.9 ผลการเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ผลของการศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 แสดงดังรูปที่ 4.13 จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 100.43 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในอาหารสูตรที่ใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก รองลงมาเมื่อใช้รำข้าวเจ้าเป็นสับสเตรท มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 92.71 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อใช้แป้งมันฝรั่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 83.60 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 76.02 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นสับสเตรท โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 50.84 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

Krishna and Chandrasekaran (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจาก *Bacillus subtilis* CBTK 106 โดยใช้เศษเหลือทิ้งกล้วยและจมูกข้าวสาลีเป็นสับสเตรท พบว่าเศษเหลือทิ้งกล้วยเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดย *Bacillus subtilis* CBTK 106



รูปที่ 4.13 แสดงผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหารกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในอาหารสูตรที่ใช้เมล็ดทุเรียน รำข้าวเจ้า แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด เป็นสับสเตรท โดยอาหารสูตรที่ใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด และใช้แป้งข้าวโพดเป็นสับสเตรทให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่ำสุด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

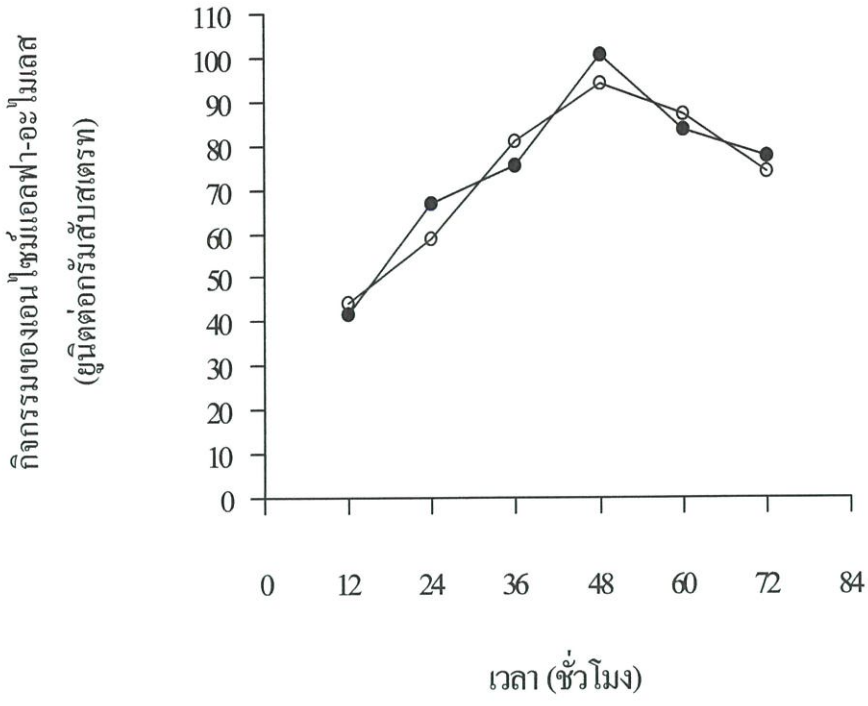
ชนิดของสับสเตรท	เมล็ดทุเรียน	รำข้าวเจ้า	แป้งมันฝรั่ง	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวโพด
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	100.43_a	92.71_b	83.60_c	76.02_d	50.84_e

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการทดลองพบว่าเมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 ดังนั้นอาจนำเมล็ดทุเรียนซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งหาได้ง่าย มีปริมาณมาก และสม่ำเสมอตลอดทั้งปี มาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง แทนการใช้รำข้าวเจ้า หรือรำข้าวสาลี ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีราคาแพง อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของเมล็ดทุเรียนในเชิงพานิชย์อีกด้วย

4.6.10 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท

ผลการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.14 จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 100.31 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ในขณะที่ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 94.00 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมักเช่นกัน



● *Bacillus cereus* E90 ○ *Bacillus subtilis* TISTR 25

รูปที่ 4.14 แสดงผลของการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสูตรอาหารกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 และ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ในสภาวะที่ทำการทดลอง แสดงผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติผลของการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

สายพันธุ์แบคทีเรีย	*Bacillus cereus* E90	*Bacillus subtilis* TISTR 25
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	100.31_a	94.00_b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* E90 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

4.6.11 ผลของการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* E90 กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

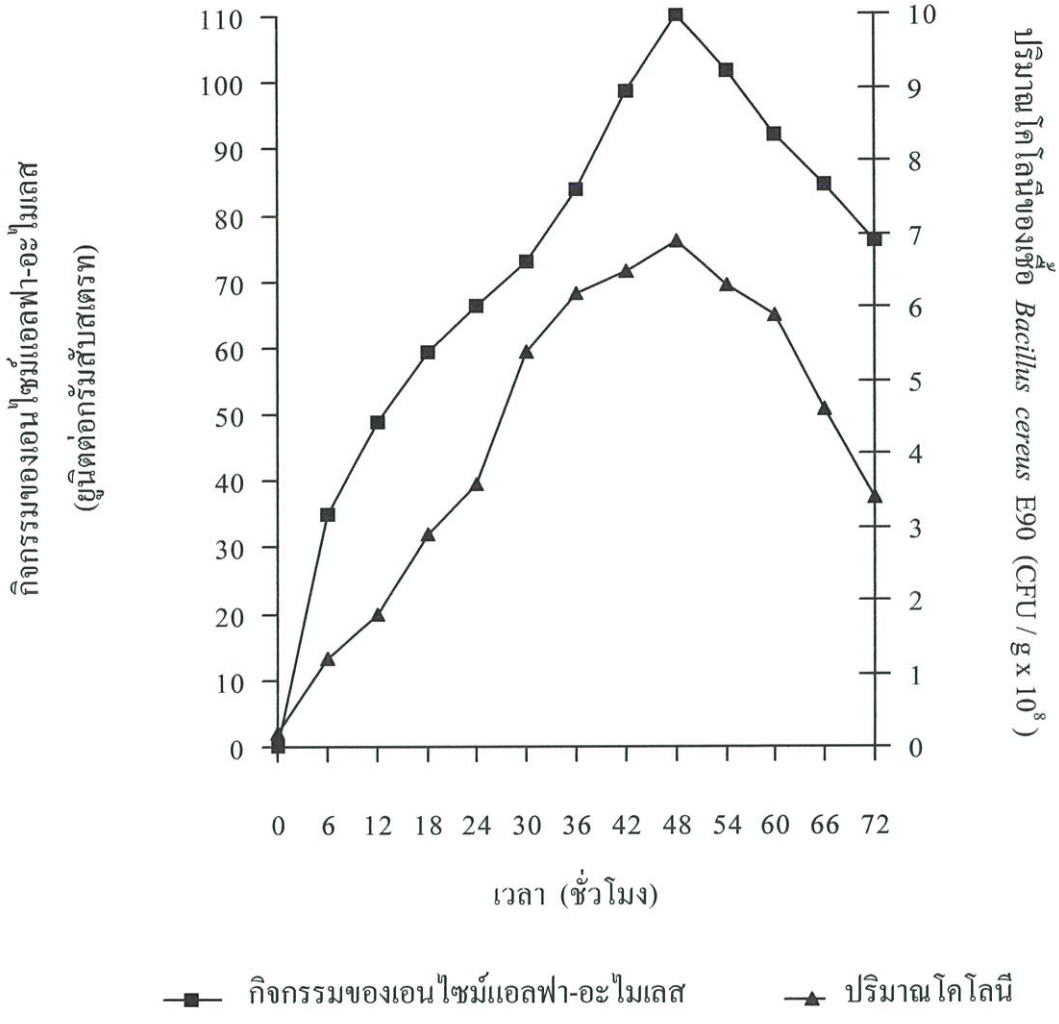
ผลการศึกษาการเจริญของ *Bacillus cereus* E90 กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส แสดงดังรูปที่ 4.15 จากผลการทดลองพบว่าในชั่วโมงแรกๆของการหมัก *Bacillus cereus* E90 มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (lag phase) และเพิ่มจำนวนโคโลนีสูงสุดจนถึงชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก (log phase) โดยมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 6.9 CFU/g x 10^8 หลังจากนั้นจำนวนโคโลนีจะคงที่ (stationary phase) และลดจำนวนลงเรื่อย ๆจนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อมีการเจริญลดลง สัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก และหลังจากนั้นการผลิตจะค่อย ๆ ลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Welker and Campbell (1963) ศึกษาเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* รายงานว่าเอนไซม์อะไมเลสจะเริ่มสร้างในระหว่าง logarithmic phase จะสร้างมากขึ้นพร้อมๆ กับการเพิ่มจำนวนเซลล์ สำหรับ *Bacillus dipsosauri* DD1 ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุดในระยะ stationary phase ของการเจริญ ที่ความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ 2 โมลต่อลิตร (Deutch 2002)

Wind *et. al.* (1994) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *Bacillus stearothermophilus* พบว่าเชื้อดังกล่าวเริ่มผลิตเอนไซม์ในช่วงต้นของระยะ exponential

phase ของการเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 5.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.44 ต่อชั่วโมง และพบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการเจริญของเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* (growth-associated)

Hamilton *et. al.* (1999) ศึกษาการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์และลักษณะบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. IMD 434 พบว่า *Bacillus* sp. IMD 434 เริ่มผลิตเอนไซม์ในช่วงต้นของระยะ exponential phase ของการเจริญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 61 ของการเจริญ ซึ่งเป็นระยะ stationary phase ของการเจริญ หลังจากชั่วโมงที่ 80 ของการเจริญ พบว่าการผลิตมวลชีวภาพ (biomass) และการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเริ่มลดลง

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *Bacillus cereus* E90 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเจริญและการเพิ่มจำนวนโคโลนีของเชื้อ โดยผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้สูงสุดในช่วงที่เชื้อมีการเจริญคงที่ในระยะ stationary phase ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก



รูปที่ 4.15 แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* E90 กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

4.7 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

4.7.1 ผลการเตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน

ผลการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วนแสดงดังตารางที่ 4.18 เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่สกัดได้ก่อนนำไปตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 2,411.81 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 45.88 มิลลิกรัม และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 53.57 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำเอนไซม์สกัดมาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0-20 พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 468.56 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 39.29 มิลลิกรัม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 11.93 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 0.22 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 19.43 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20-40 พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 422.94 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 14.37 มิลลิกรัม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 29.43 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 0.55 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 17.54 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40-60 พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 568.42 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 9.70 มิลลิกรัม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 58.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.09 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 23.57 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60-80 พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 1,185.21 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 9.64 มิลลิกรัม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 122.95 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.30 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 49.13 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80-90 พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 428.47 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 8.83 มิลลิกรัม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.91 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 0.91 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 17.76

ดังนั้นจึงนำสารละลายตะกอนเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60-80 ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรอง Centricon Plus-20 Molecular Weight Cut off 30,000 ดาลตัน หลังจากปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรอง พบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 52.30 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.27 มิลลิกรัม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 193.70 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.26 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 2.17

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าต้องนำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60-80 ก่อนแล้วจึงนำสารละลายตะกอนเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยหลอดที่มีเยื่อกรองตามขนาดโมเลกุล 30,000 ดาลตัน เพื่อให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นก่อนนำไปศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

Hamilton *et. al.* (1999) ศึกษาการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์และลักษณะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. IMD 434 โดยนำเอนไซม์สกัด (crude α-amylase) มาทำให้บริสุทธิ์ โดยนำมาตกตะกอนด้วยอะซิโตน ผ่านโครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออน แล้วนำไปผ่าน Phenyl-sepharose chromatography พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1,440 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 266 เท่า

Aguilar *et. al.* (2000) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และลักษณะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^{T} โดยนำเอนไซม์สกัดมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่านอัลตร้าฟิวเตรชั่น ทำไดอะไลซิส ผ่าน DEAE-Cellulose chromatography และผ่าน Sephadex G-200 gel filtration พบว่าเอนไซม์เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 28.3 เท่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 631.00 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีผลผลิตร้อยละ 6.2

Stamford *et. al.* (2001) ทำการศึกษาการผลิตและลักษณะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงโดย *Nocardiopsis* sp. โดยนำเอนไซม์สกัดมาทำให้บริสุทธิ์โดยนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 0-20, 20-40, 40-60 และ 60-80 จากนั้นนำไปทำไดอะไลซิส ผ่านโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชั่นโดยใช้ Bio gel P-2 column พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1,130 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีผลผลิตร้อยละ 28

ตารางที่ 4.18 แสดงผลของการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน

ขั้นตอน	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (ร้อยละ)
เอนไซม์สกัด	2,411.89	45.58	53.57	1.0	100
ตกตะกอนด้วยเอทธานอลร้อยละ 95 ระดับความเข้มข้นร้อยละ					
0-20	468.56	39.29	11.93	0.22	19.43
20-40	422.94	14.37	29.43	0.55	17.54
40-60	568.42	9.70	58.60	1.09	23.57
60-80	1,185.21	9.64	122.95	2.30	49.13
80-90	428.47	8.83	48.52	0.91	17.76
สารละลายตะกอนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60-80 ปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรอง Centricon Plus-20 Molecular Weight Cut off 30,000 ดาลตัน	52.30	0.27	193.70	3.26	2.17

4.7.2 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแสดงดังรูปที่ 4.16 พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่บริสุทธ์บางส่วนที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 7.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 9.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 6.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 5.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 4.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.97 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 3.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพีเอชเท่ากับ 10.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.87 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรทมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 สอดคล้องกับรายงานของ Wikelman (1992) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* คือที่ช่วงพีเอชระหว่าง 7.0-9.0

Ivanova *et. al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* 44MB82 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-6.5 สำหรับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* CUMC 305 และ *Bacillus coagulans* CUMC 512 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วงพีเอชระหว่าง 7.5-8.5 (Medda and Chandra. 1980) และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วงพีเอชระหว่าง 4.5-8.0 (Vihinen and Mantsala 1990)

4.7.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

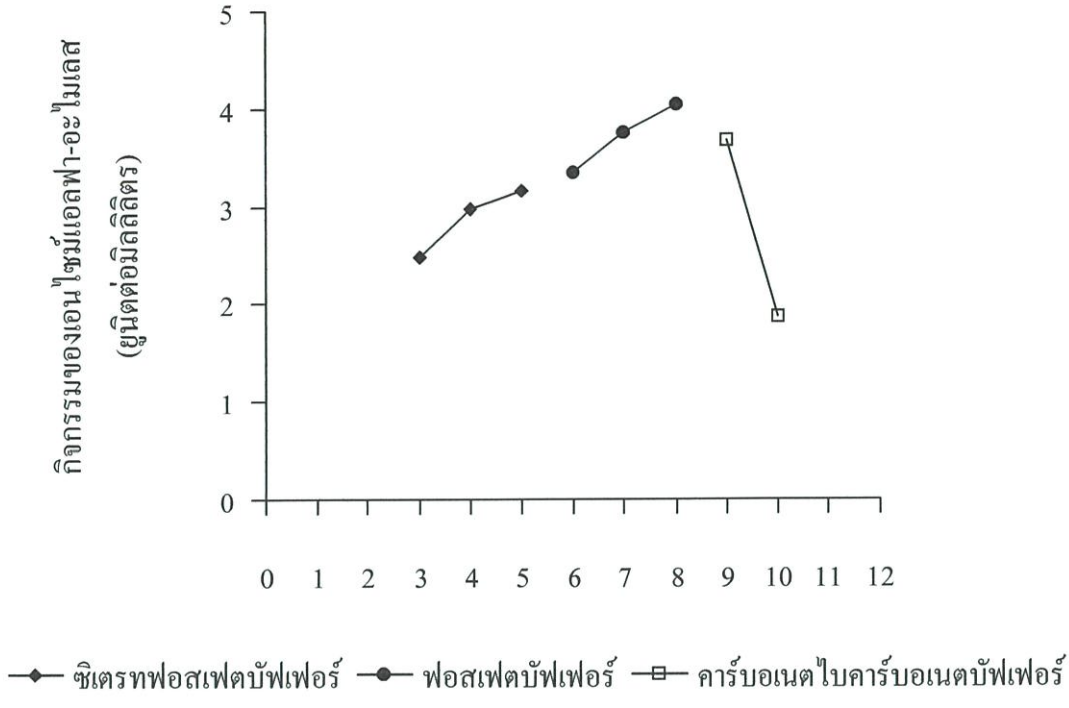
ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสแสดงดังรูปที่ 4.17 พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่บริสุทธ์บางส่วนที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 6.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของ

เอนไซม์เท่ากับ 5.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

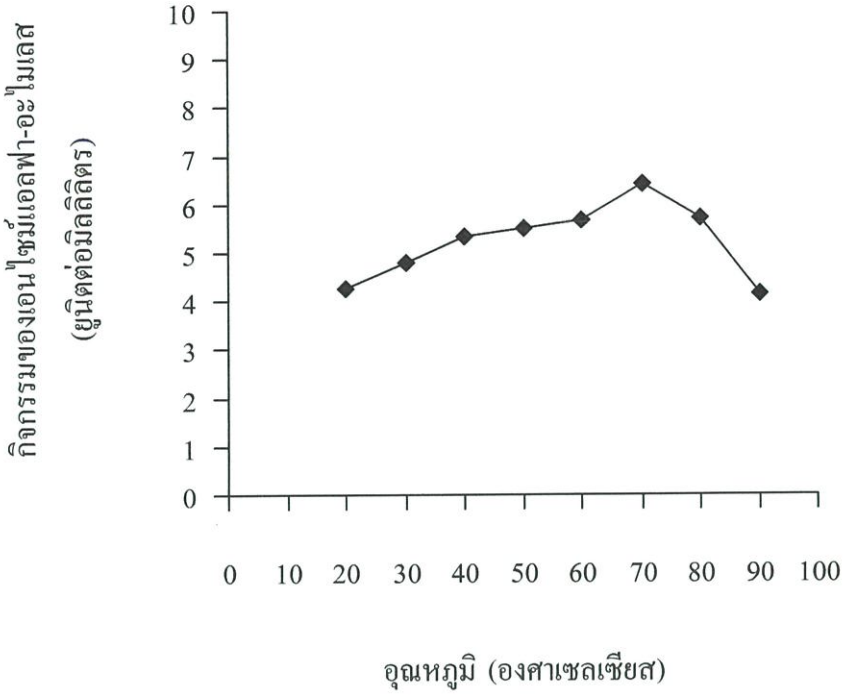
จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานของ Campbell and Clevelland (1961) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจาก *Bacillus stearothermophilus* มีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งที่อุณหภูมิระหว่าง 55-70 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* MFF4 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิระหว่าง 70-80 องศาเซลเซียส (Vihinen and Mantsala 1990)

Medda and Chandra (1980) พบว่าเอนไซม์ alkaline thermostable α-amylase ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* CUMC 305 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 91 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ alkaline thermostable α-amylase ที่ผลิตโดย *Bacillus coagulans* CUMC 512 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส

Uguru *et. al.* (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจาก *Aspergillus niger* โดยใช้เปลือกแยมเป็นสับสเตรท พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 70 องศาเซลเซียส Nguyen *et. al.* (2002) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.16 แสดงผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที



รูปที่ 4.17 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90 โดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท

4.7.4 ผลของความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่พีเอชต่างๆ

ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่พีเอชต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.18 พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90 คงตัวที่ช่วงพีเอชเท่ากับ 4.0-8.0 โดยที่พีเอชเท่ากับ 8.0 มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 50.36 เมื่อเทียบกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ไม่ได้ผ่านการบ่มในบัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม) รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 7.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 50.00 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 6.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 47.45 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 5.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 45.80 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 4.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 37.77 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 9.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 37.77 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่พีเอชเท่ากับ 10.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ

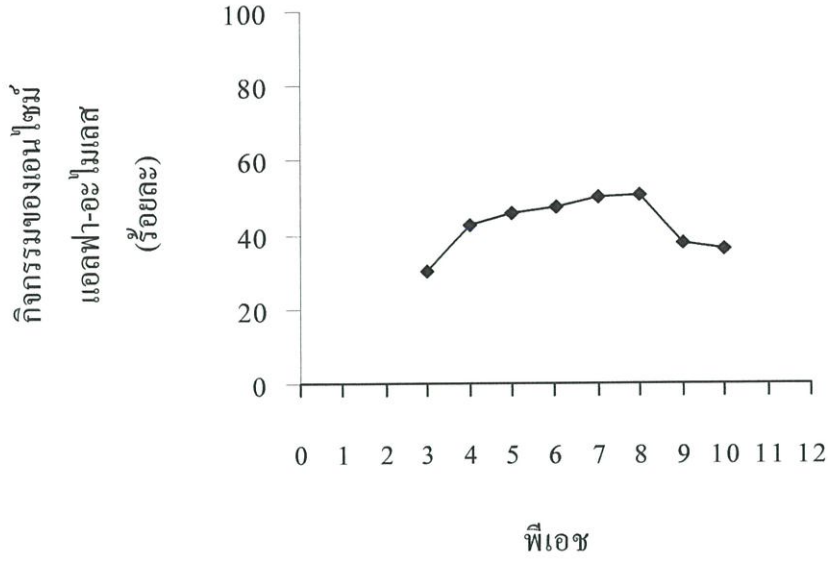
35.77 ของกิจกรรมสูงสุด และที่พีเอชเท่ากับ 3.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 30.29 ของกิจกรรมสูงสุด ตามลำดับ

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Mamo and Gessesse (1999) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งสองชนิด คือ Amy I และ Amy II ซึ่งผลิตโดย *Bacillus* sp. WN11 มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบที่พีเอชเท่ากับ 5.5 โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดคงตัวที่พีเอชเท่ากับ 5.5 และ 8.0 ตามลำดับ

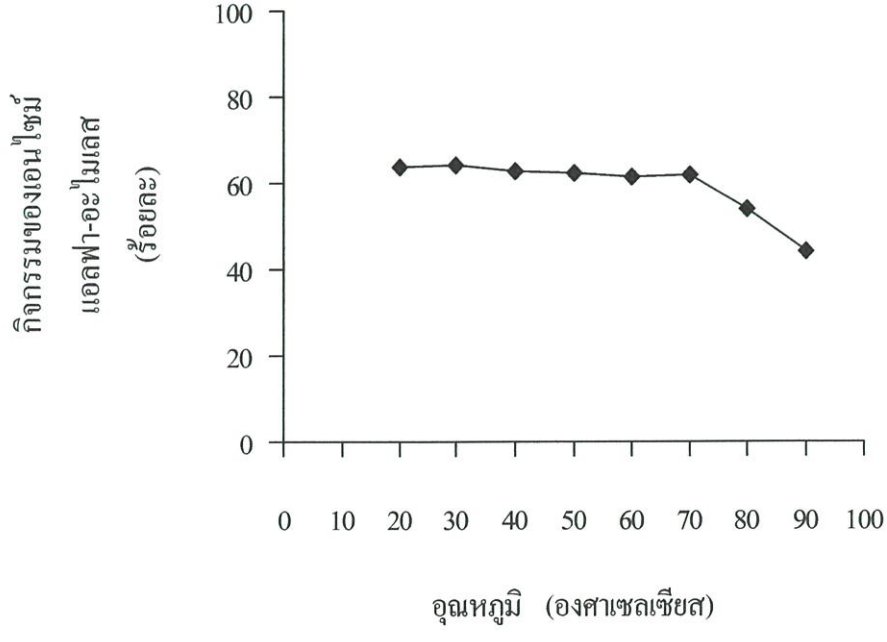
Aguilar *et. al.* (2000) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^{T} มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 5.5 เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-6.0 โดยเอนไซม์มีความคงตัวสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 5.5

4.7.5 ผลของความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ

ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.19 พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* E90 คงตัวในช่วงอุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 64.00 เมื่อเทียบกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ไม่ได้ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (ชุดควบคุม) รองลงมาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 61.73 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 63.70 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 62.80 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 62.50 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 61.23 ของกิจกรรมสูงสุด รองลงมาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 54.00 ของกิจกรรมสูงสุด และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 44.00 ของกิจกรรมสูงสุด ตามลำดับ



รูปที่ 4.18 แสดงผลของความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่บริสุทธิ์บางส่วนที่พีเอชต่างๆ



รูปที่ 4.19 แสดงผลความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่บริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เนื้อหาวิทยานิพนธ์เล่มนี้นำเสนอถึงการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียจากดินที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 230 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาคัดเลือกซ้ำโดยนำเชื้อที่ให้ความกว้างของบริเวณใสสูงสุด 10 อันดับแรก ได้แก่ H24, M17, J19, J102, E90, M19, K122, G22, E141, C26 และ *Bacillus subtilis* TISTR25 (เชื้อเปรียบเทียบ) มาเลี้ยงในอาหารเหลวขั้นต่ำ พบว่าที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เชื้อ E90 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 10.33, 6.84 และ 5.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ E90 มาใช้ในงานวิจัย จากการศึกษาสันฐานวิทยาเบื้องต้นของสายพันธุ์ E90 พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก และมีโคโลนีเป็นสีขาว เมื่อนำเชื้อ 90 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยระบบเอ พี ไอ พบว่าเชื้อ E90 จัดเป็น *Bacillus cereus*

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆ ในเมล็ดทุเรียนที่ใช้ปั่นสับสเตรท พบว่ามีแป้งร้อยละ 25.73 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.55 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.81 โปรตีนร้อยละ 1.12 ของน้ำหนักแห้ง และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 11.52

ผลการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท เติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ลงในสูตรอาหาร และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 โดยเติมสารละลายเกลือแร่ โดยเชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 76.01 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 คือใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เติม soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งคาร์บอน เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 101.24 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

ผลการศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรท พบว่าเมื่อใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท *Bacillus cereus* E90 สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 100.43 ยูนิตต่อกรัม

สับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยเชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้รำข้าวเจ้า แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพดเป็นสับสเตรท และพบว่า *Bacillus cereus* E90 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยเชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 100.31 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะเดียวกัน

ผลการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบว่าการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* E90 โดยเชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 109.88 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ซึ่งมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 6.9 CFU/g x 10^8

การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยนำเอนไซม์สกัด (crude α-amylase) มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60-80 จากนั้นนำสารละลายตะกอนไปปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรอง Centricon Plus-20 Molecular Weight Cut off 30,000 ดาลตัน พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเท่ากับ 193.70 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.62 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 2.17 โดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์คงตัวที่ช่วงพีเอชเท่ากับ 4.0-8.0 และคงตัวที่ช่วงอุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท มีข้อเสนอแนะในงานวิจัยดังนี้ การแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากดิน ควรเติมเมล็ดทุเรียนลงในอาหารแข็ง starch agar เพื่อแยกแบคทีเรียที่สามารถใช้เมล็ดทุเรียนเป็นแหล่งอาหารได้ การทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสให้บริสุทธิ์ควรนำเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์หลายๆขั้นตอนเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นและสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ควรศึกษาการนำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ เช่น นำไปทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบ การผลิตกลูโคสไซรัป เป็นต้น เพื่อจะได้ทราบถึงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้

บรรณานุกรม

กฤติกานต์ มหวรรณ. 2523. "การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2532. **การปฏิบัติการเทคโนโลยีของแป้ง.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. **เทคโนโลยีของแป้ง.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ. 2541. "การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส." **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.** 14(2) : 18-32.

ชัยอนันต์ นามงาม. 2545. "การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งขนุนเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR25 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณัฐดา ชวศิริ. 2525. "การเปลี่ยนแปลงมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลโดยเชื้อราเพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2531. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

_____ . 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ.** กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2534. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรป.** กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นเฮ้าส์.

ปรีชา สุวรรณพินิจ และนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2541. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิเชฐ อิฐกอ. 2528. "การผลิตอัลฟาอะมัยเลสจากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KA 63. " วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พจน์ ศรีบุญเรือง และคณะ. 2543. **ตำราชีวเคมี.** พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วชิรพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์. 2542. "การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยเอนไซม์พลูลูลาเนสเพื่อใช้ในการทำแผ่นฟิล์ม." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอเอสพรินติงเฮาส์.

สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524. "การผลิตเอนไซม์อะมิเลสจากแบคทีเรียเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมลักษณ์ เนาวรัตน์พนมมาศ. 2538. "การผลิตและการใช้กลูโคสไซรัปจากสตาร์ชข้าวโพดในไอศกรีม." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคตะวันออก. 2534. **ทุเรียน ภาคตะวันออก.** ระยอง : สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคตะวันออก.

Agger, T. et. al. 2002. "Physiological Characterisation of Recombinant *Aspergillus nidulans* Strains with Different *cerA* Genotypes Expressing *Aspergillus oryzae* α-Amylase." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 92 : 279-285.

Agger, T. et. al. 2001. "α-Amylase Production in High Cell Density Submerged Cultivation of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55 : 81-84.

Aguilar, G. et. al. 2000. "Purification and Characterization of an Extracellular α-Amylase Produced by *Lactobacillus mamihotivorans* LMG 18010^{T}, an Amylolytic Lactic Acid Bacterium." **Enzyme Microbial Technol.** 27 : 406-413.

Allen, W.G. and Dawson, H.G. 1975. "Technology and Uses of Debranching Enzyme." **Food Technol.** 52 : 70-80.

Amartery, S.A. et. al. 1991. "Development and Optimization of a Defined Medium for Aerobic Growth of *Bacillus stearothermophilus* LLD-15." **Biotechnol. Lett.** 13 : 621-626.

Amund, O.O. and Ogunsina, O.A. 1987. "Extracellular Amylase Production by Cassava-Fermenting Bacteria." **J. Industrial. Micrabiol.** 2 : 123-127.

Atlas, R.M. 1993. **Handbook of Microbiological Media.** Florida : CRC. Press Inc.

Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). 1975. **Official Method of Analysis.** Washington. D.C. : Georgo Benta.

Baker, H. et. al. 1960. "Growth Requirements of 94 Strains of Thermophilic *Bacilli.*" **J. Microbiol.** 6 : 557-563.

Beckord, L.D. 1946. "Bacterial Amylase." **Indus. Eng. Chem.** 37 : 692-696.

Bernfeld, P. 1951. **Amylase α and β Method in Enzymology.** New York : Academic Press, Inc.

Beynum, G.M.A.V. and Roels, J.A. 1985. **Starch Conversion Technology.** New York : Marcel Dekker Inc.

Birch, G.G. and Shallenberger, R.S. 1977. **Developments in Food Carbohydrate-1.** London : Applied Science Pudlishers Ltd.

Birch, G.G. et. al. 1970. **Glucose Syrup and Relate Carbohydrates.** London : Elsevier Publishing Company, Ltd.

Birch, G.G. et. al. 1981. **Enzyme and Food Processing.** London : Applied Science Publishers Ltd.

Bolton, D. J. et. al. 1997. "Purification and Characterization of the α-Amylase of *Bacillus flavothermus*." **Enzyme Microbial Technol.** 20 : 340-343.

Bose, K. and Das, D. 1996. "Thermostable Alpha-Amylase Production Using *Bacillus licheniformis* NRRL B1 4368." **J. Indian. Exp. Biol.** 34 : 1279-1282.

Buonocore, V. et. al. 1976. "Stable Inducible Thermoacidophilic α-Amylase from *Bacillus acidocaldaris*." **J. Bacteriol.** 128(2) : 515-521.

Campell, L.L. 1954. "Crystallization of α-Amylase from Thermophilic Bacterium." **J. Amer. Chem. Soc.** 76 : 52-56.

_____ . 1963. "Purification and Properties of an α-Amylase from Facultative Thermophilic Bacteria." **Arc. Biochemis. Biophy.** 54 : 24-35.

Campell, L.L. and Cleveland, P.D. 1961. "Thermostable α-Amylase of *Bacillus steaothermophilus* I Crystallization and some General Properties." **J. Biol. Chem.** 236 : 29-52.

Champ, M. et. al. 1983. "Amylase Production by Three *Lactobacillus* Strains Isolated from Chicken Crop." **J. Appl. Bacteriol.** 55 : 487-493.

Chandra, A. et. al. 1980. "Production of Extracellar Thermostable α-Amylase by *Bacillus licheniformis*." **J. Ferment. Tech.** 58 : 1-10.

Chaplin, M.F. and Bucke, C. 1990. **Enzyme Technology.** Cambridge : Cambridge University Press.

Chiou, S.Y. and Jeang, C.L. 1995. "Factors Affecting Producing of Raw-Starch Digesting Amylase by the Soil Bacterium *Cytophaga* sp." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 22 : 377-384.

Coronado, M. J. et. al. 2000. "Production and Biochemical Characterization of an α-Amylase from the Moderate Halophile *Halomonas meridiana*." **FEMS. Microbiol. Lett.** 183 : 67-71.

Davies, P.E. et. al. 1980. "The Production of α-Amylase in Batch and Chemostate Cultures of *Bacillus stearothermophilus*." **Anotonie Van Leeuwenhoek.** 46 : 391-398.

Deutch, C.E. 1994. "Characterization of a Novel Salt-Tolerant *Bacillus* sp. from the Nasal Cavity Desert Iguanas." **FEMS. Microbiol. Lett.** 121 : 55-60.

————. 2002. "Characterization of a Salt-Tolerant Extracellular α-Amylase from *Bacillus dipsosauri*." **Lett. Appl. Microbiol.** 35 : 78-84.

Dubois, M. et. al. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substance." **Anal. Chem.** 28(3) : 350-356.

Durian Snapshot. 2002. **Durian Nutrition.** [Online]. Availble : www.Foodmarketexchange.com.

Fogarty, W.M. and Kelly, C.T.,editor. 1990. **Microbial Enzymes and Biotechnology.** 2nd ed. New York : Elsevier Science Publishing.

Fogarty, W.N. et. al. 1994. "Extracellular Maltotetraose-Forming Amylase of *Pseudomonas* sp. IMD 353." **Biotechnol. Lett.** 16 : 473-478.

Fukomoto, J. et. al. 1958. "Microbial Amylase." **Adv. Appl. Microbiol.** 7 : 288-291.

Giraud, E. et. al. 1991. "Influence of pH and Initial Lactate Concentration on the Growth of *Lactobacillus plantarum*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36 : 96-99.

Giraud, E. et. al. 1993. "Purification and Characterization of an Extracellular Amylase from *Lactobacillus plantarum* Strain A6." **J. Appl. Bacteriol.** 75 : 276-284.

Giraud, E. et. al. 1994. "Degradation of Raw Starch by a Wild Amylolytic Strain of *Lactobacillus platarum*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60(12) : 4319-4323.

Goldberg, J.D. and Edwards, C. 1990. "Purification and Characterization of an Extracellular Amylase from a Thermophilic *Streptomycete*." **J. Appl. Bacteriol.** 69 : 712-717.

Gomori, G. 1955. "Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies." **Methods Enzyme.** 1: 139-146.

Good, W.A. and Hartman, P.A. 1970. "Properties of the Amylase from *Halobacterium halobium*." **J. Bacteriol.** 104 : 601-603.

Gupta, L. M. et. al. 2003. "Microbiol α-Amylase : Biotechnology Perspective." **Proc. Biochem.** 38 : 1599-1616.

Hamilton, L.M. et. al. 1999. "Purification and Properties of the Raw Starch-Degrading α-Amylase of *Bacillus* sp. IMD 434." **Biotechnol. Lett.** 21 : 111-115.

Hesseltine, C. W. et. al. 1963. "Investigation of Temphe, an Indonesian Food." **Developments Industrial. Microbiol.** 4 : 275-287.

Hofer, F. 1976. "Identifizierung von Milchsäurebakterien mit Hilfe des API-Systems." **Schweiz. Mikchw. Forsch.** 5 : 17-22.

Iman, S.H. et. al. 1991. "A Study of Corn Starch Granule Digestion by an Unusually High Molecular Weight Alpha-Amylase Secreted by *Lactobacillus amylovorus*." **Curr. Microbiol.** 23 : 365-370.

Inger, M.B. and Erickson, R.J. 1978. "Bacterial α-Amylase." **Adv. Appl. Microbiol.** 24 : 257-278.

Ivanova. V.N. et. al. 1993. "Purification and Characterization of Thermostable Alpha-Amylase from *Bacillus licheniformis*." **J. Biotech.** 28 : 277-289.

James, C.S. 1995. **Analytical Chemistry of Foods.** London : Chapman and Hall.

Junk, W.R. et. al. 1973. **Handbook of Sugars.** Westport : The AVI Publishing Company Inc.

Kelly, C.T. et. al. 1993. "Mechanisim of Action of the α-Amylase of *Mocromonospora melanosporea*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72 : 599-603.

Kenedy, J.F. et. al. 1987. **Starch Biomass : a Chemical Feedstock for Enzyme and Fermentation Process in Starch : Properties and Potential.** vol. 3. New York : Wiley and Sons.

Khire, J.M. 1994. "Production of Moderately Halophilic Amylase by Newly Isolated *Micrococcus* sp. 4 from a Salt-Pan." **Lett. Appl. Microbiol.** 19 : 210-212.

Khire, J.M. and Pant, A. 1992. "Thermostable Salt-Tolernat Amylase from *Bacillus* sp. 64." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8 : 167-170.

Knight, J.W. 1969. **The Starch Industry.** London : Pergamon Press.

Kobayashi, T. et. al. 1992. "Haloalkaliphilic Maltotriose-Forming α-Amylase from the Archaebacterium *Natronococcus* sp. Strain Ah-36." **J. Bacteriol.** 174(11) : 3439-3444.

Kooi, E.R., editor. 1965. **Dextrose and Starch Syrup in Encyclopedia of Chemical Technology.** vol. 6. 2nd ed. New York : John Wiley and Sons Inc.

Krihna, C. and Chandrasekaran, M. 1996. "Banana Waste as Substrate for α-Amylase Production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under Solid-State Fermentation." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 46 : 106-111.

Kuo, M.J. and Hartman, P.A. 1966. "Isolation of Amylolytic Strains of *Thermoactinomyces valgaris* and Production of Thermophilus Actinomycete Amylase." **J. Bacteriol.** 92 : 723-726.

Lachmund, A. et. al. 1993. "Regulation of α-Amylase Formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* Transformants." **Curr. Microbiol.** 26 : 47-51.

Lages, A.N. and Tannenbaum, C.A. 1978. "Production of Glucose from Tapioca and Farinka Demandioca." **J. Food Science.** 43(3) : 1012-1018.

Lam, S. and Malikin, G. 1994. **Analytical Application of Immobilized Enzyme Reaction.** Cornwall : T. J. Press (Padstow) Ltd., Padstow.

Lampen, J.O. 1965. "Function and Structure in Microorganisms." **Adv. Appl. Microbiol.** 7 : 288-292.

Lowry, O.H. et. al. 1951. "Protein Measurment with the Folin Phenol Reagent." **J. Biol. Chem.** 193 : 265-275.

Lee, S.K. et. al. 1997. "Note : Purification of Amylase Secreted from *Bifiobactrium adolescentis*." **J. Appl. Microbiol.** 83 : 267-272.

Lee, Y.H. et. al. 1982. "Defined Minimal Media for the Growth of Prototrophic and Auxotrophic Strains of *Bacillus stearothermophilus*." **J. Appl. Bacteriol.** 53 : 179-187.

Leloup, V. et. al. 1994. **Enzymatic Processing of Carbohydrates in Bioconversion of Cereal Products.** New York : VCH.

Le Mense, E. H. et. al. 1947. "Production of Mold Amylase in Submerged Culture." **Bacteriol.** 54 : 144-159.

Lin, L.L. et. al. 1998. "Production and Properties of a Raw-Starch-Degrading Amylase from the Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 28 : 61-68.

Lynn, M. et. al. 1999. "Purification and Properties of the Raw Starch-Degrading α-Amylase of *Bacillus* sp. IMD 434." **Biotechnal Lett.** 21 : 111-115.

Madeson, G. B. et. al. 1973. "A New Heat Stable Bacterial Amylase and Its Use in High Temperature Starch Liquefaction." **Biochem. Biophy. Res. Cummum.** 65 : 248-257.

Mahon, H.E. et. al. 1997. "Effect of Growth Rate on α-Amylase Production by *Streptomyces* sp. IMD 2679." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48 : 504-509.

Malhotra, R. et. al. 2000. "Production and Partial Characterization of Thermostable and Calcium-Independent α-Amylase of an Extreme Thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54." **Lett. Appl. Microbiol.** 31 : 378-384.

Mamo, G. and Gessesse, A. 1999. "Effect of Cultivation Conditions on Growth and α - Amylase Production by a Thermophilic *Bacillus* sp. WN11." **Lett. Appl. Microbiol.** 29 : 61-65.

_____. 1999. "Purification and Characterization of Two Raw-Starch-Digesting Thermostable α-Amylase from a Thermophilic *Bacillus*." **Enz. Microbiol. Technol.** 25 : 433-438.

Mamo, G. et. al. 1999. "A Highly Thermostable Amylase from a Newly Isolated Thermophilic *Bacillus* sp. WN11." **J. Appl. Microbiol.** 86 : 557-560.

Medda, S. and Chandra, A.K. 1980. "New Strain of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* Producing Thermostable α-Amylase Active at Alkaline." **J. Appl. Bacteriol.** 48 : 47-58.

Meers, J.L. 1972. "The Regulation of α-Amylase Production in *Bacillus licheniformis*." **Antonie Van Leeuenhoek.** 38 : 378-384.

Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for the Cultivation of *Lactobacilli*." **J. Appl. Bacteriol.** 23 :130-135.

Morgan, L. et. al. 1994. **Biochemistry.** 2nd ed. Toronto : Neil Patterson Publishers/Prentice-Hall, Inc.

Murray, P. R. et. al. 1995. **Manual of Clinical Microbiology.** 6th ed. Washington D. C. : American Society for Microbiology.

Møkeberg, R. et. al. 1995. "Induction and Repression of α-Amylase Production in Batch and Continuous Cultures of *Aspergillus oryzae*." **Microbiol.** 41 : 2449-2454.

Narang, S. and Satyanarayana, T. 2001. "Thermostable α-Amylase Production by an Extreme Thermophile *Bacillus thermooleovorans*." **Lett. Appl. Micrabiol.** 32 : 31-35.

Nguyen, O.D. et. al. 2002. "Purification and Characterization of Amylolytic Enzyme from Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* Strain ATCC 34626." **Enz. Microbiol. Technol.** 31 : 345-352.

Nelson, N.J. 1994. "A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose." **J. Biol. Chem.** 153 : 375-380.

Nicholus, B.P. 1975. **Edible Starches and Starch-Derived Syrup.** London : Noyes Data Corporation.

Nomura, M. et. al. 1956. "Microbiol Amylases." **J. Biochem.** 43 : 143-148.

Onishi, H. and Sonoda, K. 1979. "Purification and some Properties of an Extracelluar Amylase from a Moderate Halophile *Micrococcus halobius*." **Appl. Environmental. Microbiol.** 38 : 612-620.

Pompeyo, C.C. et. al. 1993. "Comparison of Amylolytic Properties of *Lactobacillus amylovorus* and *Lactobacillus amylophilus*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40 : 266-269.

Peltier, G.L. and Beckord. 1945. "Source of Amylase Producing Bacteria." **J. Bacteriol.** 50 : 711-714.

Paquest, V. et. al. 1991. "Purification and Characterization of the Extracellular α-Amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." **Appl. Enviromtal. Microbiol.** 57(1) : 212-218.

Reed, G. and Underkofler, L.A. 1966. **Enzyme in Food Processing.** New York : Academic Press, Inc.

Robert, K. 1994. **Protein Purification.** New York : Harrisonburg V.A.

Roy, N.B. et. al. 1984. **Starch Chemistry and Technology.** 2nd ed. Florida : Academic Press, Inc.

Rukhaiyar, R. and Srivastava, S.K. 1995. "Effect of Various Carbon Substrate on α-Amylase Production from *Bacillus* species." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 10(2) : 76-82.

Saha, B.C. and Zeikus, J.G. 1989. "Novel Highly Thermostable Pullulanase from Thermophiles." **Tibtech.** 7 : 234-239.

Saito, N. and Yamamoto, K. 1975. "Regulation Factor Affecing α -Amylase Production in *Bacillus licheniformis*." **J. Bacteriol.** 121 : 848-856.

Sani, A. et. al. 1992. "Amylase Synthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* Grown on Cassava Peel." **J. Industrial. Microbiol.** 10 : 55-59.

Shallenberger, R.S. and Birch, G.G. 1975. **Sugar Chemistry.** New York : The AVI Publishing Company.

Shink, R. et. al. 1977. "Filamentation in *Bacillus cereus* During β-amylase Production." **J. Ferment. Technol.** 55(2) : 103-109.

Shinmyo, A. et. al. 1982. "Physiology of α -Amylase by Immobilize *Bacillus amyloliquefaciens*." **European J. Appl. Biotechnnol.** 14 : 7-12.

Stamford, T.L.M. et. al. 2001. "Production and Characterization of a Thermostable α -Amylase from *Nocardiopsis* sp. Endophyte of Yam Bean." **Bioresource Technol.** 72 : 137-141.

Stein, E.A. and Fisher, E.H. 1985. "The Resistant of α -Amylase Towards Proteolytic Attact." **J. Biol. Chem.** 232 : 867-897.

Sribir, S. and Chakrabarty, S.L. 1986. "Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 Isolated from Vegetable Wastes : Purification and Characterization." **J. Appl. Bacteriol.** 60 : 419-423.

Tigue, M.A. et. al. 1994. "Production Studies on the Alkaline Amylase of Three Alkalophilic *Bacillus* sp." **Biotechnol. Lett.** 16 (6) : 569-574.

Totora, G.T. et. al. 1991. **Microbiology an Introduction.** 4th ed. California : The Benjamin/Cummings. Publishing Company, Inc.

Uguru, G.C. et. al. 1997. "The Use of Yam peel for Growth of Locally Isolated *Aspergillus niger* and Amylase Production." **Enzyme Microbial Technol.** 21 : 48-51.

Underkofler, L. A. and Hickley, R. J. 1954. "Methods of Preserving Stock Culture on *Aspergillus oryzae*." **Industrial. Fermantation.** 14 : 123-125.

Vallee, B.L. et. al. 1959. "Metal Content of α-Amylase of Various Origin." **J. Biol. Chem.** 234 : 2901-2905.

Van der Maarel, M.J.E.C. et. al. 2002. "Properties and Application of Starch-Converting Enzymes of the α-Amylase Family." **J. Biotechnol.** 94 : 137-155.

Vihinen, M. and Mantsala, P. 1989. "Microbiol Amylolytic Enzyme." **Biochem. Molec. Biol.** 24(2) : 329-418.

_____ . 1990. "Characterization of a Thermostable *Bacillus stearothermophilus* α-Amylase." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 12 : 427-435.

Wallerstein, L. 1937. "Enzyme Preparations from Microorganisms." **Indus. Eng. Chem.** 31 : 1218-1224.

Welker, N.E. and Cambell, L.L. 1963. "Induced Biosynthesis of α -Amylase by Growing Culture of *Bacillus stearothermophilus*." **J. Bacteriol.** 86 : 1196-1201.

Winkelman, G. 1992. **Microbial Degradation of Natural Products.** New York : VCH. Publishers, Inc.

Windish, W.W. and Mhatre, N.S. 1965. "Microbiol Amylase." **Adv. Appl. Microbiol.** 7 : 273-283.

Wind, R.D. et. al. 1994. "Characterization of a New *Bacillus sterothermophilus* Isolate : a Highly Thermostable α -Amylase Producing Strain." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44 :155-162.

Yamanaka, T. et. al. 1957. "Determination of Enzyme Protein VIII. Thermodynamic Aspects of Denaturation of Crystalline α-Amylase of *Bacillus subtilis*." **J. Biochem.** 44 : 637-648.

Yamane, K. and Maruo, B. 1974. "Properties of Thermosensitive Extracellular α-Amylase of *Bacillus subtilis*." **J. Bacteriol.** 120 : 792-798.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาเคมี

1. อาหารแข็ง starch agar (Buonocore *et. al.* 1976)

สารสกัดจากเนื้อวัว	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม
soluble starch	15.0 กรัม
วุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง nutrient agar อาหารสำเร็จของ Difco

สารสกัดจากเนื้อวัว	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม
วุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเหลว nutrient broth อาหารสำเร็จของ Difco

สารสกัดจากเนื้อวัว	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวขั้นต่ำ (Narang and Satyanarayana. 2001)

soluble starch	20.0 กรัม
ทริปโตน	3.00 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	3.00 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.00 กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.00 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายเกลือแร่ (Atlas. 1993)

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.60 กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.40 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20 กรัม
แมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO_4.2H_2O$)	0.05 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.08 กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	5.00 มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($CuSO_4.H_2O$)	5.00 มิลลิกรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.50 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate-Phosphate Buffer) (Gomori. 1955)

สารละลาย ก ละลายกรดซิตริก จำนวน 2.101 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

สารละลาย ข ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) จำนวน 5.365 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

ผสม X มิลลิลิตร (ของสารละลาย ก) กับ Y มิลลิลิตร (ของสารละลาย ข) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ได้ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

X (มิลลิลิตร)	Y (มิลลิลิตร)	พีเอช
398	102	3.0
307	193	4.0
243	257	5.0

7. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer) (Gomori. 1955)

สารละลาย ก ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4.H_2O$) จำนวน 3.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

สารละลาย ข ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต จำนวน 5.365 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

ผสม X มิลลิลิตร (ของสารละลาย ก) กับ Y มิลลิลิตร (ของสารละลาย ข) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ได้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

X (มิลลิลิตร)	Y (มิลลิลิตร)	พีเอช
877	123	6.0
390	610	7.0
53	947	8.0

8. คาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (Carbonate-Bicarbonate Buffer)

(Gomori. 1955)

สารละลาย ก ชั่งไดโซเดียมคาร์บอเนต (ปราศจากน้ำ) จำนวน 2.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

สารละลาย ข ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต จำนวน 1.68 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

ผสม X มิลลิลิตร (ของสารละลาย ก) กับ Y มิลลิลิตร (ของสารละลาย ข) แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ได้คาร์บอเนตไบคาร์โบเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

X (มิลลิลิตร)	Y (มิลลิลิตร)	พีเอช
4.0	46.0	9.0
27.5	22.5	10.0

9. สารละลายไอโอดีน (Hesseltine *et. al.* 1963)

โปแตสเซียมไอโอไดร์ (KI)	6.6 กรัม
ไอโอดีน (I_2)	0.66 กรัม
น้ำกลั่น	165 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (James. 1995)

วัสดุอุปกรณ์

1. กระทง aluminum foil สำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบแห้ง
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

1. นำกระทง aluminum foil มาอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำมาทำให้เย็นโดยใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของกระทงจนได้น้ำหนักที่แน่นอนโดยมีผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในกระทง aluminum foil ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3. นำตัวอย่างไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

4. นำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งแล้วไปทำให้เย็นโดยใส่ไว้ในโถดูดความชื้น จากนั้นนำตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก

5. อบตัวอย่างซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

เมื่อ W_1 หมายถึง น้ำหนักของกระทง aluminum foil

W_2 หมายถึง ผลรวมของน้ำหนักของกระทง aluminum foil กับน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

W_3 หมายถึง ผลรวมของน้ำหนักของกระทง aluminum foil กับน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสตามวิธีของ Bernfeld

(Bernfeld. 1951)

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
2. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก จำนวน 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมโปแตสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$) จำนวน 30 กรัม แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย soluble starch ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลาย soluble starch จำนวน 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 0.035 กรัม ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด ทำให้เย็น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์นำน้ำแป้งไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส

การเตรียมกราฟมาตรฐานมอลโตส

เตรียมสารละลายมอลโตสโดยชั่งมอลโตส จำนวน 180 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ไมโครโมล จากนั้นปิเปตสารละลายมอลโตสปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโมเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายมอลโตสมาสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา–อะไมเลส

นำสารละลายน้ำแป้งที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานมอลโตส แสดงดังรูปที่ ข 1 และคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์มีหน่วยเป็นยูนิต

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตภายใต้สภาวะอาหารเหลว มีหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร

$$= \frac{\text{ไมโครโมลของมอลโตสที่ได้จากปฏิกิริยา}}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์ x เวลาในการบ่มเอนไซม์ (3 นาที)}}$$

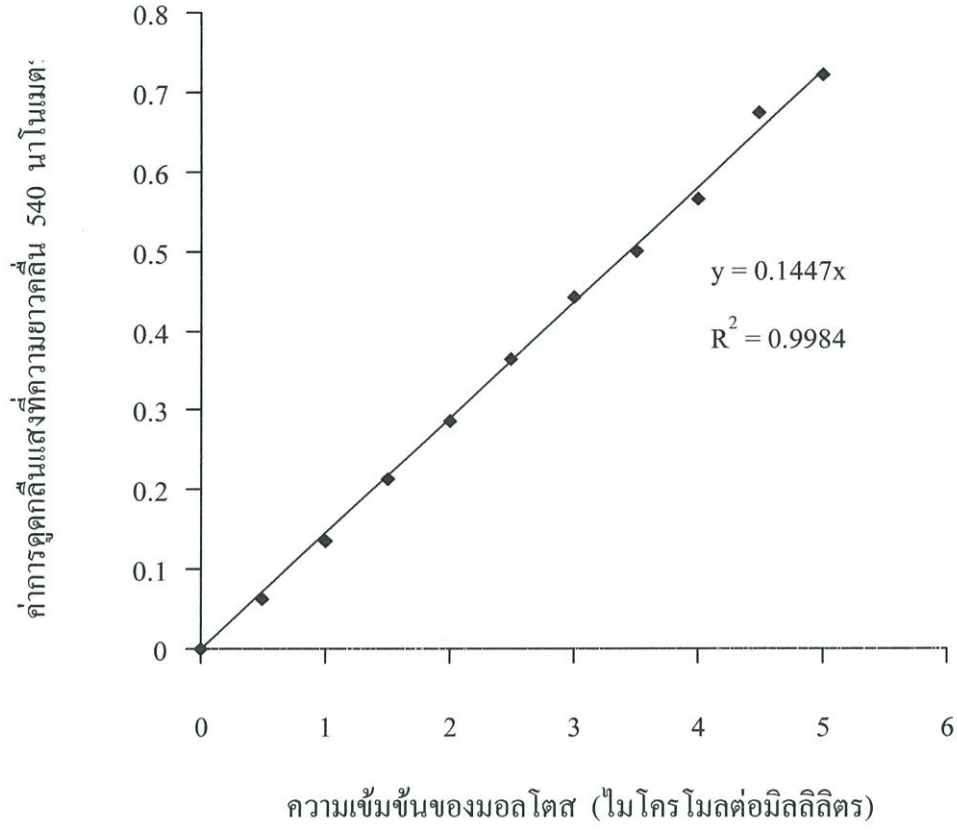
การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตภายใต้สภาวะอาหารแข็ง มีหน่วย ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

= กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลว x (ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด+ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมัก)/น้ำหนักสับสเตรท

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ soluble starch ไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (เทียบเท่ามอลโตส) 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ หรือสภาวะที่ทำการทดลอง

การคำนวณปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมัก

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ณ ชั่วโมงที่ 12-72 ของการหมัก (เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง) มาหาปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมักโดยวิเคราะห์ความชื้นตามวิธีของ Jame (1995) ในภาคผนวก ข โดยคำนวณเป็นร้อยละของความชื้น (ร้อยละของน้ำที่เหลือจากการหมัก) จากนั้นนำค่าร้อยละที่ได้ไปเปรียบเทียบกับร้อยละความชื้นของเมล็ดทุเรียน แสดงดังตารางที่ ค 16 (ภาคผนวก ค) จากนั้นคำนวณเป็นปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมัก ซึ่งการหาปริมาตรน้ำที่เหลือจาการหมักต้องทำควบคู่ไปกับการทดลองทุกครั้งตลอดงานวิจัย



รูปที่ ข 1 แสดงกราฟมาตรฐานมอลโตสที่ความเข้มข้น 0.5-5.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี **Lowry** (Lowry *et. al.* 1951)

สารเคมี

สารละลาย ก

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จำนวน 2.0 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ข

ละลายโปแตสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$) จำนวน 2.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ค

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) จำนวน 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ง

เติมสารละลาย ข ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย ค ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย ก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที (สารละลายนี้ผสมเมื่อจะใช้เท่านั้น)

สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent

นำสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (สารนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างที่บดแล้วใส่กระทง aluminum foil นำไปอบซ้ำอีกครั้ง เป็นเวลา 1 คืน เก็บตัวอย่างไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

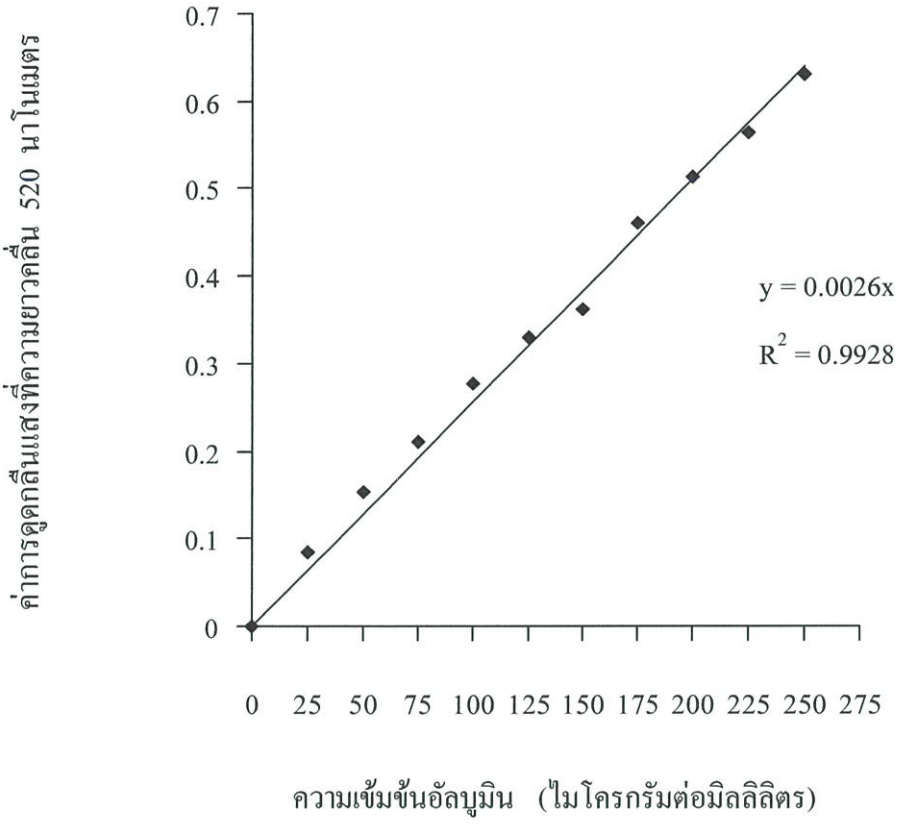
ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งแล้ว จำนวน 0.1 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry *et. al.* 1951)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin

ละลาย bovine serum albumin จำนวน 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย bovine serum albumin มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย bovine serum albumin ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดอง เติมสารละลาย ง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลาย bovine serum albumin มาสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน) เติมสารละลาย ง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐาน bovine serum albumin แสดงดังรูปที่ ข 2 และคำนวณปริมาณโปรตีน



รูปที่ ข 2 แสดงกราฟมาตฐานอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (AOAC. 1975)

สารเคมี

สารละลายกรดไฮโดรคลอริค (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียด เก็บตัวอย่างที่บดแล้วใส่กระทง aluminum foil แล้วนำไปอบซ้ำอีกครั้ง เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณแป้ง จำนวน 0.5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริคปริมาตร 19.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับพีเอชให้มีค่า 7.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson-Somogyi (Nelson. 1994) และคำนวณปริมาณแป้งจากสูตรข้างล่าง

ปริมาณแป้ง (กรัม) = 0.9 x ปริมาณกลูโคส

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Nelson-Somogyi (Nelson. 1994)

สารเคมี

การเตรียม Copper reagent

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) จำนวน 71.0 กรัม และโปแตสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$) จำนวน 40.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) จำนวน 8.0 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปทำให้ร้อน แล้วเติมไดโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) จำนวน 180.0 กรัม ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปเก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การเตรียม Nelson reagent

ละลายเกลือแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) จำนวน 50.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นลงไป (concentrated H_2SO_4) ปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออก

การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 15, 30, 50, 75, 120 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายกลูโคสปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม Copper reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน) ทำให้เย็นทันทีโดยแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นเติม Nelson reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมตัวอย่าง

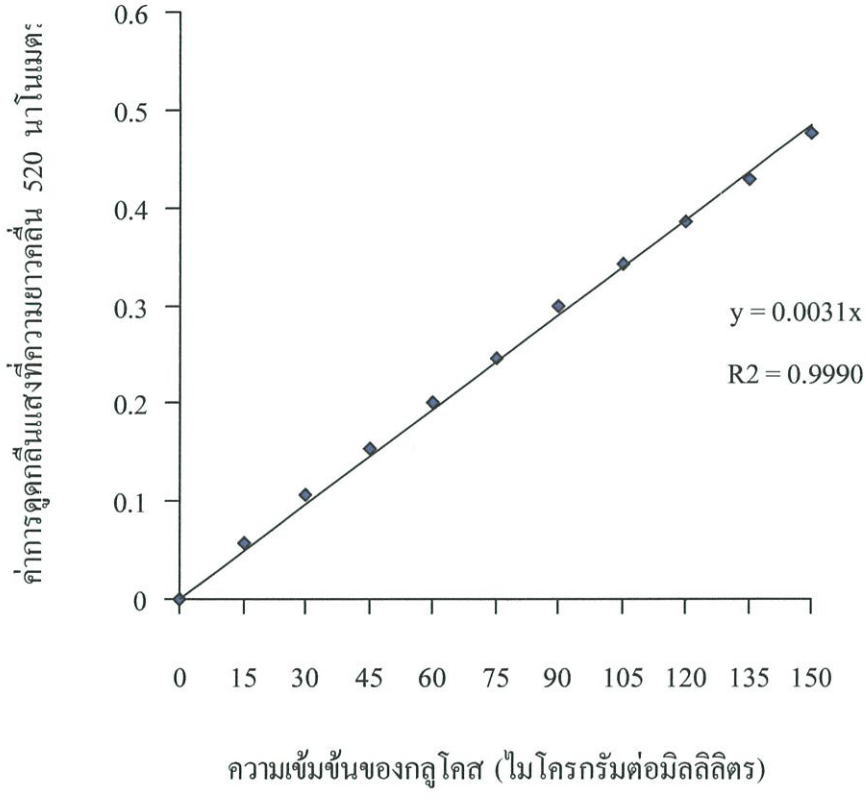
นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างที่บดแล้วใส่กระทง aluminum foil นำไปอบซ้ำอีกครั้ง เป็นเวลา 1 คืน เก็บตัวอย่างไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งแล้ว จำนวน 100 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอลร้อยละ 80 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (เขย่าทุก 30 นาที) จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 541 ทำการดูดสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปีเปตตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Copper reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน) ทำให้เย็นทันทีโดยแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นเติม Nelson reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงดังรูปที่ ข 3 และคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



รูปที่ ข 3 แสดงกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามวิธี **Phenol-sulphuric** (Dubois *et. al.* 1956)

สารเคมี

สารละลายฟีนอล (C_2H_5OH) ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

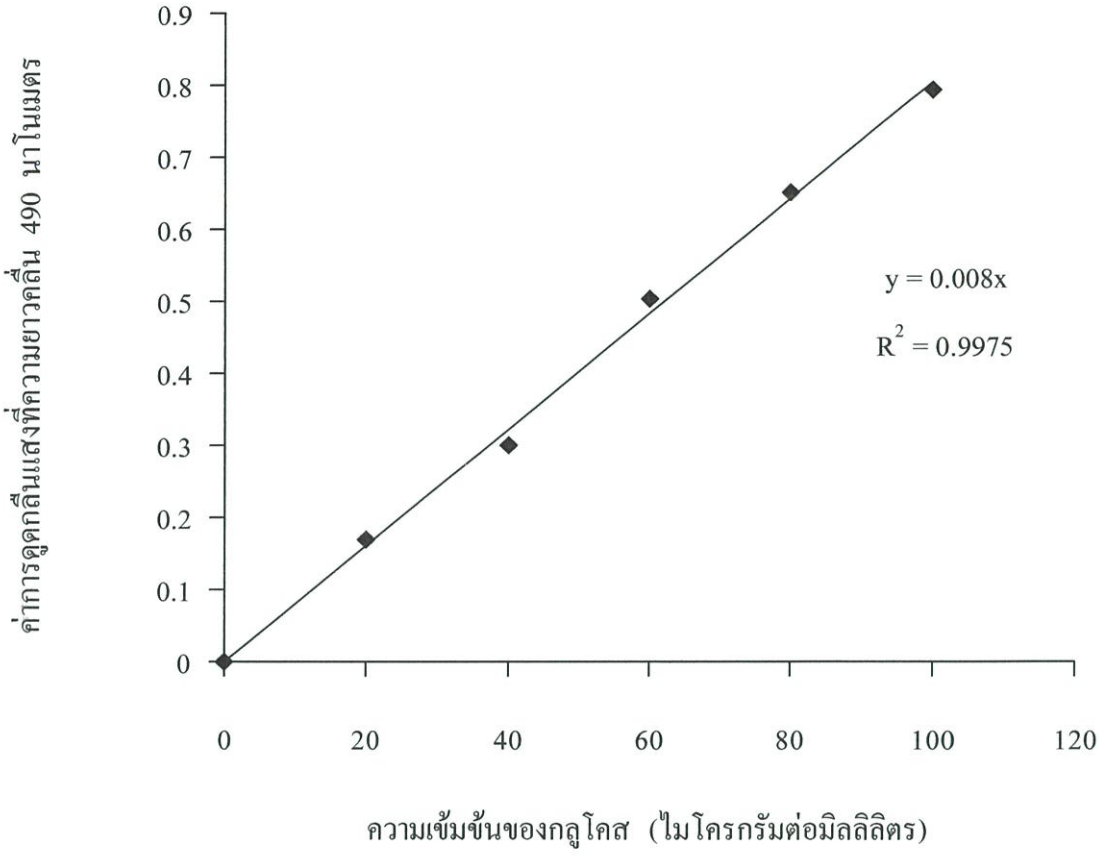
กรดกำมะถันเข้มข้น (concentrated H_2SO_4)

การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายกลูโคสปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าสารละลายตัวอย่างให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสารละลายฟีนอลปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน) แล้วเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เขย่าสารละลายตัวอย่างให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงดังรูปที่ ข 4 และคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด



รูปที่ ข 4 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์เอ พี ไอ (Analytical Profile Index : API 50 CHB test) (Hofer. 1976 ; Murray *et. al.* 1995)

ระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ API 50 CHB เป็นการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Bacillus* โดยใช้ชุดทดสอบ (Test Kit) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่พร้อมใช้ทดสอบ (ready-to-use) โดยมีหลักการที่ว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีในการหมักคาร์โบไฮเดรต (น้ำตาล) ไปเป็นกรดแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ จึงส่งผลให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ซึ่งสังเกตได้จากสีของอินดิเคเตอร์ที่อยู่ในอาหารจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้สามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ใด สำหรับวิธี API 50 CHB จะวิเคราะห์ความสามารถของจุลินทรีย์ตัวอย่างในการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด

วัสดุอุปกรณ์

1. ชุดทดสอบ ประกอบด้วย อาหารทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร API 50 CHB medium และอาหาร suspension medium
2. McFarland standard เบอร์ 2 หรือ เครื่องวัดความขุ่น (densitometer)
3. โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปสำหรับจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ (identification software)
4. ปิเปต
5. น้ำมันแร่ (mineral oil)
6. ไม้ที่ปลายไม้มีสำลีพัน (swab)
7. อาหารแข็ง nutrient agar
8. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส
9. ชั้น หรือตะแกรงสำหรับใส่หลอด (rack)
10. ตะเกียงบุนเสน (Bunser burner)
11. ระบบการบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic incubation system)

ขั้นตอนการจัดจำแนก

1. นำจุลินทรีย์ตัวอย่างมาแยกจนกระทั่งได้โคโลนีที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน

2. ทำการทดสอบสายพันธุ์ตัวอย่าง โดยศึกษาความสามารถในการสร้างกรดแลคติก ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง nutrient agar สันฐานวิทยาของเชื้อ การติดสีแกรม การสร้างสปอร์ การสร้างเอนไซม์แคทาเลส และความต้องการออกซิเจนในการเจริญ

3. เตรียมหัวเชื้อของสายพันธุ์ตัวอย่าง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนชุดทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน โดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ

4. การวิเคราะห์ผล

- positive test สัมพันธ์กับการสร้างกรดโดยจะเปลี่ยนสีของ bromocresol purple indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง
- Esculin test เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีดำ

รวบรวมผลการทดสอบและคุณสมบัติทางชีวเคมีของสายพันธุ์ตัวอย่างไปจัดจำแนก โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

อาหารที่ใช้ทดสอบ

1. อาหาร suspension medium ใช้น้ำปราศจากแร่ธาตุ (Demineralized water) ปริมาตร 2 และ 5 มิลลิลิตร

2. อาหาร API 50 CHB medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

2.1 โพลีเปปโตน	10.0	กรัม
2.2 สารสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
2.3 ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	มิลลิลิตร
2.4 ไดโปแตสเซียมฟอสเฟต	2.0	กรัม
2.5 โซเดียมอะซิเตรทไตรไฮเดรต	5.0	กรัม
2.6 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
2.7 แมงกานีสซัลเฟตเพนตระไฮเดรต	0.05	กรัม
2.8 bromocresol purple	0.17	กรัม
2.9 น้ำปราศจากแร่ธาตุ	1,000	มิลลิลิตร

3. อาหารแข็ง nutrient agar อาหารสำเร็จของ Difco ประกอบด้วย

3.1 สารสกัดจากเนื้อวัว	3.0	กรัม
3.2 เปปโตน	5.0	กรัม
3.3 วุ้น	15.0	กรัม
3.4 น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ตารางที่ ข 1 แสดงปริมาณเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ) ที่ใช้ตกตะกอนเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

From ↘ To																				
C_1 %	C_2 % →	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
0		52	111	176	250	333	428	538	666	818	1,000	1,222	1,500	1,857	2,333	3,000	4,000	5,666	9,000	19,000
	5		55	117	187	266	357	461	583	727	900	1,111	1,375	1,714	2,166	2,800	3,750	5,333	8,500	18,000
		10		58	125	200	285	384	500	636	800	1,000	1,250	1,571	2,000	2,600	3,500	5,000	8,000	17,000
			15		62	133	214	307	416	545	700	888	1,125	1,428	1,833	2,400	3,250	4,666	7,500	16,000
				20		66	142	230	333	454	600	777	1,000	1,285	1,666	2,200	3,000	4,333	7,000	15,000
					25		71	153	250	363	500	666	875	1,142	1,500	2,000	2,750	4,000	6,500	14,000
						30		76	166	272	400	555	750	1,000	1,333	1,800	2,500	3,666	6,000	13,000
							35		83	181	300	444	625	857	1,166	1,600	2,250	3,333	5,500	12,000
								40		90	200	333	500	714	1,000	1,400	2,000	3,000	5,000	11,000
									45		100	222	375	571	833	1,200	1,750	2,666	4,500	10,000
										50		111	250	428	666	1,000	1,500	2,333	4,000	9,000
											55		125	285	500	800	1,250	2,000	3,500	8,000
												60		142	333	600	1,000	1,666	3,000	7,000
													65		166	400	750	1,333	2,500	6,000
														70		200	500	1,000	2,000	5,000
															75		250	666	1,500	4,000
																80		333	1,000	3,000
																	85		500	2,000
																		90		1,000

ที่มา : Robert. (1994)

ภาคผนวก ค

ข้อมูล

ตารางที่ ค 1 แสดงผลของรายละเอียดการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียสายพันธุ์ E90 โดยระบบจัดจำแนกจุลินทรีย์เอ พี ไอ จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from :	
-glycerol	+
-erythritol	-
-D-arabinose	-
-L-arabinose	-
-ribose	+
-D-xylose	-
-L-xylose	-
-adonitol	-
-β-methyl-D-xyloside	-
-galactose	+
-D-glucose	+
-D-fructose	-
-D-mannose	-
-L-sorbose	-
-rhamnose	-
-dulcitol	-
-inositol	-
-mannitol	

Remark : +ve = Gram positive bacteria

+ = Positive reaction

- = Negative reaction

ตารางที่ ค 1 (ต่อ)

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from : (continued)	
-sorbitol	-
-α-methyl-D-mannoside	-
-α-methyl-D-glucoside	-
-N-acetyl-glucosamine	+
-amygdaline	+
-arbutine	+
-esculine	+
-salicine	+
-cellobiose	+
-maltose	+
-lactose	-
-melibiose	-
-sucrose	+
-trehalose	+
-inuline	-
-melezitose	-
-D-raffinose	-
-starch	+
-glycogene	+
-xylitol	-
-β-gentiobiose	+
-D-turanose	-
-D-lyxose	-

Remark : +ve = Gram positive bacteria

\+ = Positive reaction

\- = Negative reaction

ตารางที่ ค 1 (ต่อ)

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from : (continued)	
-D-tagatose	-
-D-fucose	-
-L-fucose	-
-D-arabitol	-
-L-arabitol	-
-gluconate	-
-2-keto-gluconate	-
-5-keto-gluconate	-

Remark : +ve = Gram positive bacteria

\+ = Positive reaction

\- = Negative reaction

ตารางที่ ค 2 แสดงผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

สูตรอาหาร	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)					
	1	2	3	4	5	6
เวลา (ชั่วโมง)						
12	26.70	16.82	24.02	26.91	30.94	34.94
24	53.22	24.01	28.20	35.72	43.41	60.00
36	68.03	25.54	36.23	51.20	44.52	64.63
48	70.02	30.63	40.00	54.41	59.74	76.01
60	60.84	24.92	36.24	46.53	54.64	74.01
72	57.03	22.83	28.41	46.00	43.11	68.70

ตารางที่ ค 3 แสดงผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

กล้าเชื้อเริ่มต้น (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	ร้อยละ 10	ร้อยละ 15	ร้อยละ 20	ร้อยละ 25
เวลา (ชั่วโมง)				
12	41.04	37.83	26.43	20.00
24	55.61	60.40	29.52	33.04
36	59.72	68.82	45.14	34.41
48	67.70	75.61	50.32	41.03
60	52.42	69.02	44.00	30.94
72	49.73	57.61	33.73	28.50

ตารางที่ ค 4 แสดงผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ความชื้นเริ่มต้น	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	ร้อยละ 50	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ 80
เวลา (ชั่วโมง)				
12	26.01	31.03	34.60	37.20
24	38.04	49.30	62.03	43.51
36	42.03	60.01	66.40	53.34
48	48.01	66.72	76.00	59.63
60	39.52	49.74	66.34	55.12
72	36.84	45.32	60.02	49.31

ตารางที่ ค 5 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

แหล่งคาร์บอน	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	แป้ง	มอลโตส	ไซโลส	กลูโคส
เวลา (ชั่วโมง)				
12	37.51	29.11	26.02	32.84
24	49.52	46.44	39.40	35.20
36	70.00	58.82	53.51	46.73
48	77.63	64.30	59.84	50.42
60	70.04	52.01	56.63	41.33
72	56.62	42.73	40.00	36.50

ตารางที่ ค 6 แสดงผลของความเข้มข้นของ soluble starch ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ความเข้มข้น (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	ร้อยละ 1	ร้อยละ 2	ร้อยละ 3	ร้อยละ 4
เวลา (ชั่วโมง)				
12	40.00	36.04	34.82	27.40
24	54.03	58.21	48.03	40.51
36	74.11	68.83	61.52	46.21
48	82.84	72.40	66.01	50.03
60	70.30	58.34	61.80	42.22
72	61.12	50.01	44.43	38.14

ตารางที่ ค 7 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	เปปโตน	สารสกัดจากยีสต์	แอมโมเนียมซัลเฟต	แอมโมเนียมคลอไรด์
เวลา (ชั่วโมง)				
12	28.02	40.02	38.00	33.24
24	45.24	65.11	55.82	60.00
36	51.43	77.84	61.23	68.13
48	58.60	90.02	71.44	77.51
60	54.52	78.01	69.60	66.32
72	45.51	74.10	57.31	63.63

ตารางที่ ค 8 แสดงผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ความเข้มข้น (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	ร้อยละ 1	ร้อยละ 2	ร้อยละ 3	ร้อยละ 4
เวลา (ชั่วโมง)				
12	37.50	41.60	31.52	24.64
24	61.31	57.71	46.42	30.63
36	65.54	72.24	51.44	44.42
48	81.32	75.62	61.80	48.14
60	76.90	64.70	51.21	45.53
72	63.503	57.61	48.13	34.80

ตารางที่ ค 9 แสดงผลของขนาดเมล็ดทุเรียนต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ขนาดเมล็ดทุเรียน (ไมโครเมตร)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	เล็กกว่า 75	75-150	150-500	500-850
เวลา (ชั่วโมง)				
12	28.82	42.02	36.54	34.04
24	49.62	67.02	61.30	44.00
36	57.00	74.83	80.92	50.93
48	64.43	101.04	89.50	56.31
60	58.71	85.24	80.83	53.61
72	45.31	78.40	75.41	48.93

ตารางที่ ค 10 แสดงผลของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ชนิดเกลืออนินทรีย์	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)			
	แคลเซียมคลอไรด์	เฟอรัสซัลเฟต	คอปเปอร์ซัลเฟต	ไม่เติมเกลืออนินทรีย์
เวลา (ชั่วโมง)				
12	44.04	38.02	34.02	41.01
24	59.50	55.14	39.63	66.92
36	72.34	83.10	49.70	78.04
48	75.63	90.53	52.44	98.60
60	66.93	84.41	40.01	87.11
72	62.92	75.01	34.93	80.43

ตารางที่ ค 11 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	37	45	50	55	60
เวลา (ชั่วโมง)					
12	43.80	40.82	37.21	32.30	28.71
24	68.00	54.63	59.24	45.13	33.04
36	73.34	75.61	63.12	48.70	39.20
48	99.22	81.14	70.00	53.31	41.51
60	84.03	74.02	58.02	42.54	36.03
72	76.61	62.80	52.33	37.51	32.02

ตารางที่ ค 12 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
เวลา (ชั่วโมง)					
12	29.33	32.01	39.40	45.03	42.00
24	38.41	35.52	61.51	64.60	68.22
36	41.92	48.20	71.43	76.32	73.43
48	46.31	54.83	88.82	101.24	82.20
60	38.04	53.14	83.23	87.51	72.41
72	35.20	43.70	68.54	80.34	71.42

ตารางที่ ค 13 แสดงผลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ชนิดสับสเตรท	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	เมล็ดทุเรียน	รำข้าวเจ้า	แป้งมันฝรั่ง	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวโพด
เวลา (ชั่วโมง)					
12	41.61	47.53	45.71	36.50	27.30
24	70.00	65.14	57.13	42.04	36.83
36	79.20	70.33	76.54	64.81	39.02
48	100.43	92.71	83.60	76.02	50.84
60	84.02	87.30	70.02	72.51	36.51
72	76.94	72.02	62.22	57.14	32.83

ตารางที่ ค 14 แสดงผลของการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus cereus* E90 กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25

สายพันธุ์แบคทีเรีย	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	
	Bacillus cereus E90	*Bacillus subtilis* TISTR 25
เวลา (ชั่วโมง)		
12	41.54	44.40
24	66.60	58.71
36	75.22	81.03
48	100.31	94.00
60	83.63	87.14
72	77.40	73.81

ตารางที่ ค 15 แสดงผลของการศึกษาการเจริญของ *Bacillus cereus* E90 กับการผลิตเอนไซม์แอลฟา- อะไมเลส

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	ปริมาณโคโลนีของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ E90 (CFU/g) x 10^8
0	0.00	0.2
6	35.00	1.2
12	48.74	1.8
18	59.32	2.9
24	66.17	3.6
30	72.84	5.4
36	83.72	6.2
42	98.46	6.5
48	109.88	6.9
54	101.66	6.3
60	91.94	5.9
66	84.53	4.6
72	76.05	3.4

ตารางที่ ค 16 แสดงผลของร้อยละความชื้นของเมล็ดทุเรียน

อัตราส่วนของเมล็ดทุเรียนต่อน้ำกลั่น (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ร้อยละความชื้น
1 : 0.0	11.52
1 : 0.5	38.21
1 : 1.0	53.35
1 : 1.5	63.58
1 : 2.0	68.60
1 : 2.5	76.04
1 : 3.0	79.09

ตารางที่ ค 16 (ต่อ)

อัตราส่วนของเมล็ดทุเรียนต่อน้ำกลั่น (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ร้อยละความชื้น
1 : 3.5	80.86
1 : 4.0	81.31
1 : 4.5	82.28
1 : 5.0	84.40

ตารางที่ ค 17 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน และ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)					
เวลา (ชั่วโมง)	12	24	36	48	60	72
สายพันธุ์แบคทีเรีย						
C26	0.58	2.26	3.30	4.96	5.67	5.10
E90	2.38	4.77	8.42	10.33	9.25	8.49
E141	2.37	4.12	5.06	5.79	4.76	3.77
G22	1.34	3.67	5.07	5.66	4.61	3.48
H24	1.54	3.41	6.26	7.61	6.21	4.21
J19	1.29	3.21	4.55	5.42	3.98	2.98
J102	1.45	3.38	4.49	5.39	4.63	3.71
K122	1.95	4.51	5.18	6.91	5.15	4.20
M17	1.51	4.02	4.77	5.21	4.32	3.52
M19	1.40	3.77	4.65	5.21	4.24	3.22
Bacillus subtllis TISTR 25	3.08	4.47	6.47	8.04	7.36	5.69

ตารางที่ ค 18 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน และ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)					
	12	24	36	48	60	72
สายพันธุ์แบคทีเรีย						
C26	0.90	2.22	2.34	2.51	3.29	2.83
E90	2.41	4.17	5.51	6.84	5.61	4.04
E141	1.67	2.30	2.84	3.83	2.97	2.36
G22	1.06	2.30	3.22	3.96	3.07	2.66
H24	1.50	1.88	2.39	4.20	2.96	2.31
J19	1.18	2.24	2.87	3.21	2.71	2.16
J102	1.06	2.29	2.78	2.74	3.20	2.31
K122	1.60	2.41	3.17	3.36	2.96	2.24
M17	1.41	3.06	4.14	4.95	3.38	2.38
M19	1.32	2.55	4.02	4.87	3.29	2.35
Bacillus subtllis TISTR 25	1.88	3.35	4.03	4.59	3.62	3.02

ตารางที่ ค 19 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน และ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลวขั้นต่ำ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)					
เวลา (ชั่วโมง)	12	24	36	48	60	72
สายพันธุ์แบคทีเรีย						
C26	0.97	2.57	3.21	3.59	4.20	3.83
E90	2.29	2.84	4.03	5.24	4.50	3.19
E141	1.45	2.17	2.59	3.27	2.50	1.98
G22	0.93	2.02	2.78	3.21	2.70	2.57
H24	1.28	1.83	2.25	3.21	2.57	2.18
J19	1.35	2.20	2.41	3.01	2.35	1.98
J102	0.82	1.38	2.76	3.61	2.82	2.12
K122	0.99	1.46	2.85	3.52	2.66	2.02
M17	1.17	2.38	3.21	4.11	2.88	2.17
M19	1.14	2.31	3.17	4.09	2.82	2.12
Bacillus subtllis TISTR 25	1.36	2.36	2.87	3.76	2.96	2.34

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอรอุมา สวัสดิ์กิจ เกิดวันที่ 22 มิถุนายน 2521 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับศึกษาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา เกียรตินิยมอันดับ 2 คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร จังหวัดกรุงเทพมหานคร ปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่ปีการศึกษา 2544 จนถึงปีการศึกษา 2546