

รหัสโครงการ SUT3-305-62-12-25



## รายงานการวิจัย

เอนไซม์ของจุลินทรีย์เพื่ออุตสาหกรรมอาหารและพลาสติกชีวภาพ  
(Microbial Enzyme for Food and Bioplastics Industry)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

# เอนไซม์ของจุลินทรีย์เพื่ออุตสาหกรรมอาหารและพลาสติกชีวภาพ (Microbial Enzyme for Food and Bioplastics Industry)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2564

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณที่ได้รับอุดหนุนทุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2562 ขอขอบคุณ บริษัท เอี่ยมรงค์ชัยอุตสาหกรรม จำกัด สำหรับการเอื้อเฟื้อวัตถุดิบ ตัวอย่างหัวมัน กากมัน และแป้งมันสำปะหลัง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำอาคารเครื่องมือ 2 และ 3 ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ระดับสูง ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีจุลินทรีย์ เพื่ออุตสาหกรรมเกษตร อาคารศูนย์วิจัยมันสำปะหลัง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ คำแนะนำการเพาะเลี้ยงและการใช้เชื้อสำหรับงานวิจัยอย่างถูกต้อง ตามราชกิจจานุเบกษาในพระราชบัญญัติพิษจากสัตว์และเชื้อโรค อีกทั้งเกี่ยวหนุนถึงหมักปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณศุภกาจน์ บุญอยู่ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไปของสถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการควบคุม การเบิกจ่าย การรักษาเสถียรภาพของงบประมาณตลอดระยะเวลาของโครงการวิจัยจนเป็นที่เรียบร้อย ขอขอบคุณ คุณ Fu Tian และคุณเจนจิรา กราวระโทก สำหรับการถ่ายทอดองค์ความรู้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเครื่องแยกสารชีวโมเลกุลโปรตีนแบบโครมาโทกราฟี อนึ่ง ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยโครงการคุณรัฐพร สุมาลย์ คุณลพดาว แซ่ลี คุณณัฐชา ธีญญะแก้ว และคุณกฤษณพงศ์ แก้วบังเกิด ที่อุทิศตนปฏิบัติงานวิจัยพร้อมจัดทำรูปเล่มรายงานอย่างวิริยะอุตสาหะ และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือทุก ๆ ท่าน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ซึ่งคณะผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามท่านได้ทั้งหมด คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คณะผู้วิจัย  
ตุลาคม 2564

## บทคัดย่อ

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมหลากหลาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรม การผลิตกรดแล็กติกจากวัตถุดิบประเภทแป้ง เอนไซม์อะไมเลสสามารถใช้ลดปัญหาความหนืดจาก วัตถุดิบที่มีความเข้มข้นของแป้งสูง แบคทีเรียกลุ่มแล็กติกผลิตกรดแอล-แล็กติกได้โดยตรงจากกลูโคสซึ่ง เป็นผลมาจากการย่อยแป้ง พบว่า *Streptococcus* sp. SUT 513 เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพดังกล่าว ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตอะไมเลสสำหรับสายพันธุ์นี้ยังไม่ชัดเจน วัตถุประสงค์ในงานวิจัยครั้งนี้คือ การ ผลิต การทำบริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียแล็กติก *Streptococcus* sp. SUT 513 จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์อะไมเลสหรือ deRAM มีส่วนประกอบสำหรับปริมาตร 1 ลิตร ดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง 45.0 กรัม สารสกัดยีสต์ชนิด FP101 1.0 กรัม ไทโพแทสเซียมฟอสเฟต 6.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต 0.03 กรัม การเลี้ยงเชื้อด้วยสูตรอาหารนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ pH เริ่มต้น 8.5 พบ ปริมาณโปรตีนเท่ากับ  $50.4 \pm 0.0$  กรัมต่อลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง  $9.6 \pm 0.60$  ยูนิตต่อ มิลลิลิตร (ที่แป้งละลายน้ำเป็นสารตั้งต้น) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรมาตรฐาน De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สามารถลดต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อลงได้ 11.7 เท่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพปริมาตร 3 ลิตร *Streptococcus* sp. SUT 513 แสดงศักยภาพสูงสุดในการผลิต เอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้ง (Amylolytic activity) ณ เวลา 16 ถึง 22 ชั่วโมง ที่  $17.6 \pm 1.91$  ยูนิตต่อ มิลลิลิตร จากคุณลักษณะทางชีวเคมี เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% และโครมาโทกราฟีแบบการแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchange) พบเอนไซม์อะไมเลสและ พลูลาเนสที่บริสุทธิ์สูงขึ้น 2.08 และ 0.71 เท่า ตามลำดับ กิจกรรมของอะไมเลสและพลูลาเนสเพิ่มขึ้น เป็น 300 และ 160% ที่ ค่า pH เหมาะสมคือ 9.0 (ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะไมเลสคือ 40 ถึง 55 และ 75 องศา เซลเซียส ในขณะที่พลูลาเนสทำงานได้ดีในช่วง 25 ถึง 75 องศาเซลเซียส เพอร์ริสไอออนมีศักยภาพใน การกระตุ้นกิจกรรมของอะไมเลสและพลูลาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 9 และ 6 เท่า ตามลำดับ แต่ทว่า แคลเซียม แมกนีเซียม และเอทิลีนไดอามีนเตตราแอสिटิก (EDTA) เปิดเผยผลของการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์ทั้งสอง โดยเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้ พบมวลโมเลกุล (Mw) 31.7, 33.4 และ 68.9 กิโลดาลตัน เอนไซม์สกัดหยาบที่ได้สามารถย่อยหัวมันและกากมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึง ศักยภาพที่จะเป็นเอนไซม์ทดแทนเอนไซม์ย่อยแป้งทางการค้า นอกจากนี้ ตะกอนเหลือทิ้งจากการผลิต เอนไซม์มีปริมาณแป้ง 90.27% พร้อมแสดงคุณลักษณะพิเศษที่ยังสามารถคงสภาพความเป็นเจลแป้งได้ ภายใต้อุณหภูมิเดือด ซึ่งเหมือนจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากการคืนตัวของเดกซ์ทริน (Dextrin retrogradation) อย่างไรก็ตาม คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวควรจะได้รับการศึกษเพิ่มเติม

## Abstract

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

# สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญ .....	ง-ช
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญภาพ .....	ฅ-ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์ .....	ฏ-ฐ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย .....	3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	3
<b>บทที่ 2 ปรัชญาบรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 แแบคทีเรียแล็กติก .....	4
2.2 เอนไซม์อะไมเลส .....	5-6
2.3 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสในจุลินทรีย์ .....	6-7
2.3.1 สารอาหาร (Nutrients) .....	7
2.3.1.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon source) .....	7
2.3.1.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) .....	7
2.3.1.3 แร่ธาตุที่จำเป็น (Essential elements) .....	7
2.3.2 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (Temperature and pH) .....	8-10
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย</b>	
3.1 การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเพื่อผลิต เอนไซม์ย่อยแป้ง .....	11
3.1.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ .....	11
3.1.2 การศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ..	11-12
3.1.3 การศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ..	12
3.1.4 การศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อแหล่ง ไนโตรเจนคัดเลือก .....	12-13

## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
<b>บทที่ 3</b>	
<b>วิธีการดำเนินการวิจัย (ต่อ)</b>	
3.1.5 การศึกษาปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง .....	13-14
3.1.6 การหาปริมาณกลีโคเซียมเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง	14
3.1.7 การเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Batch scale) .....	14
3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นส่วนน้ำ (Analysis of supernatant sample) .....	14
3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein determination) .....	14
3.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar determination) .....	14-15
3.2.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (Amylolytic activity) ...	15
3.2.3.1 ชนิดอะไมเลส (Amylase type) .....	15
3.2.3.2 ชนิดพุลูลาเนส (Pullulanase type) .....	15
3.2.4 การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และการตกตะกอนของโปรตีนที่เกิดขึ้นในเอนไซม์สกัดหยาบ .....	15
3.2.5 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งด้วยชุดทดสอบทางการค้า (Amylolytic activity by commercial test kits) .....	16
3.2.6 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ .....	16
3.2.6.1 การตกตะกอนด้วยเกลือ (Salt precipitation) .....	16-17
3.2.6.2 โครมาโทกราฟีแบบแบบไอออนแลกเปลี่ยน (Anion exchange chromatography) .....	17
3.2.7 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ .....	17
3.2.7.1 สภาวะความเป็นกรด-ด่าง .....	17
3.2.7.2 อุณหภูมิ .....	18
3.2.7.3 สารคีเลตและไอออนโลหะ .....	18
3.2.7.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบระดับโมเลกุลของเอนไซม์ (Molecule enzyme component analysis) .....	18-19
3.3 พัฒนาการวิธีการผลิตเอนไซม์เพื่อการใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ ....	19
3.3.1 การทดลองย่อยหัวมันและกากมันสำปะหลังขั้นต้น .....	19
3.3.2 การทดลองย่อยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	19-20
3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นส่วนตะกอน (Analysis of pellet sample)..	20



## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
<b>บทที่ 3</b>	<b>วิธีการดำเนินการวิจัย (ต่อ)</b>
3.4.1 การหาปริมาณแป้งและสารตั้งต้นคงเหลือที่เชื้อไม่สามารถย่อยได้ .....	20
3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total carbohydrate determination) .....	20
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch) .....	20-21
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis) .....	21
3.6 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/ เก็บข้อมูล (Place of research and data collection) .....	21
<b>บทที่ 4</b>	<b>ผลและการอภิปรายผลการวิจัย</b>
4.1 เชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus</i> sp. SUT 513 และการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RAM .....	22
4.2 การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งจากแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก <i>Streptococcus</i> sp. SUT 513 .....	23
4.2.1 ผลของแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ....	23-24
4.2.2 ผลของแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง .....	24-26
4.2.3 ผลของสัดส่วนความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อแหล่งไนโตรเจนคัดเลือก .....	26-28
4.2.4 ผลของชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง .....	28-30
4.2.5 ราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง .....	30
4.2.6 ผลของการหาปริมาณเซลล์กล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง .....	30-32
4.2.7 ผลของการการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	32-38
4.3 การจัดจำแนกกิจกรรมย่อยแป้ง (Amylolytic activity) ในส่วนของเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตโดยเชื้อ <i>Streptococcus</i> sp. SUT 513 .....	34-35
4.4 การทำปรีสุทธ์เอนไซม์ย่อยแป้ง .....	35
4.4.1 การทดลองตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต .....	35-36
4.5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตและเก็บเกี่ยวได้.....	36
4.5.1 ผลของ pH ที่มีต่อเสถียรภาพและการทำงานของเอนไซม์สกัดหยาบ ...	36-37



## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย (ต่อ)</b>	
4.5.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้ขั้นต้น ที่ได้มาจากการตกตะกอนด้วย .....	37
ก. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่สภาวะความเป็นกรด-ต่าง ต่าง ๆ .....	37-38
ข. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ .....	38
ค. การศึกษาผลของไอออนโลหะและสารคีเลต และความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ .....	39-40
4.4.2 ผลการทำบริสุทธิ์โดยการใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ .....	41-42
4.5.3 คุณลักษณะชีวเคมีของเอนไซม์ที่ผ่านการทำทำบริสุทธิ์โดยการใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ .....	42
ก. ผลของความเป็นกรด-ต่าง (pH) ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ .....	42-43
ข. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ .....	44
ค. ผลของไอออนชนิดต่าง ๆ และสารคีเลตที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ .....	44-45
ง. รูปแบบโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า ...	45-46
4.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยหัวมันสำปะหลังสดและกากมันสำปะหลังที่ได้จากบริษัทผู้ร่วมทุนวิจัย .....	47
4.6.1 การทดลองย่อยหัวมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้ง 10% (w/v) ขั้นต้น ....	47-48
4.6.2 การทดลองย่อยหัวมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้ง 10% (w/v) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้เอนไซม์สกัดหยาบ .....	49
4.7 ผลเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ร่วมจากกระบวนการเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกเพื่อผลิตเอนไซม์ .....	49-53
<b>บทที่ 5 บทสรุปผลการวิจัย</b>	
สรุปผลการวิจัย .....	54
ข้อเสนอแนะ .....	55
บรรณานุกรม .....	56-64
ภาคผนวก.....	65-79
ประวัติผู้วิจัย.....	80-82

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	อุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ	9
2.2	อุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พุลูลาเนสโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ	10
3.1	ส่วนประกอบของแต่ละสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการหาความเหมาะสมของ แหล่งไนโตรเจน .....	12
3.2	แผนแสดงการกำหนดระดับตัวแปรการศึกษาด้วยวิธีการ CCD .....	12
3.3	สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อย แป้งโดยออกแบบตามหลัก CCD สำหรับ 2 ตัวแปร .....	13
4.1	แสดงผลสัดส่วนความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังและสารสกัดยีสต์ที่มีต่อการสร้าง เอนไซม์ย่อยแป้ง.....	27
4.2	เทียบส่วนประกอบและราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร.....	31
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต.....	36
4.4	ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์..	41
4.5	ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์พุลูลาเนสในตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์.....	42

## สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ประเภทการเจริญของแบคทีเรียโดยการใช้ออกซิเจนเป็นดัชนี .....	4
2.2	วัฏจักรความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมของการผลิตโพลีแล็กติก (PVA) .....	5
2.3	เอนไซม์อะไมเลสชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง .....	6
4.1	โคโลนี และเซลล์ของเชื้อ <i>Streptococcus</i> sp. SUT 513: โคโลนีอายุ 24 ชั่วโมงที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร RAM สันฐานเซลล์ของแบคทีเรีย หลังจากผ่านการย้อมสีแบบแกรม และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า, และ 2,000 เท่า. ที่ผ่านการขยาย.....	22
4.2	กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวสาคัดน้ำมันและสารสกัดยีสต์ชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8% (w/v).....	24
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งที่แสดงออกหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอนที่มาจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง หัวมันสด และกากมันสำปะหลังอ่อน.....	25
4.4	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งที่พบในเอนไซม์สกัดหยาบ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร dRAM ที่มี $\text{FeSO}_4$ เข้มข้น 0, 0.1, 1.0 และ 10 mM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 °ซ.....	28
4.5	กิจกรรมของอะไมเลสที่พบในเอนไซม์สกัดหยาบ ที่มาจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร dRAM ที่มี $\text{MgSO}_4$ เข้มข้น 0, 0.1, 1.0, 2.3 และ 10 mM หลังเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 °ซ.....	29
4.6	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบ หลังการเลี้ยงเชื้อใน dRAM ที่ไม่เติมแร่ธาตุกับสูตรที่เติม $\text{FeSO}_4$ และ $\text{MgSO}_4$ อย่างละ 0.1 mM.....	30
4.7	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งที่พบในเอนไซม์สกัดหยาบ ที่มาจากการใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ 6 log CFU/mL หลังเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 °ซ.....	32
4.8	แผนภูมิแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ค่า pH และปริมาณเชื้อ ที่เกิดระหว่างการเลี้ยงเชื้อในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาดถังหมัก 5 ลิตร ด้วยปริมาตร 3 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตีความที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที.....	34
4.9	แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทดสอบชุดทดสอบทางการค้าที่ทดสอบในตัวอย่างไม่ใช่สกัดหยาบ.....	35

สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
4.10	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของเอนไซม์สกัดหยาบที่ผ่านการบ่มภายใต้สภาวะ pH ต่าง ๆ.....	37
4.11	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80 และ 80-100% ความอิมตัว และไดอะไลซิสทดสอบการทำงานของเอนไซม์ที่ pH 3.0-9.0 ที่ 35°ซ.....	38
4.12	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80 และ 80-100% ความอิมตัว หลังไดอะไลซิส เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 30-100°ซ เป็นเวลา 30 นาที ที่ pH 7.20.....	38
4.13	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 80% และ ไดอะไลซิส ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 80-100% หลังไดอะไลซิสและทำการบ่มทำปฏิกิริยาในสารละลายแป้งที่มีไอออนหรือสารคีเลตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์.....	39
4.14	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80 และ 80-100% ความอิมตัว และไดอะไลซิส ที่เกิดขึ้นในสารละลายแป้งที่มีแคลเซียมไอออนความเข้มข้นต่างกัน.....	40
4.15	ผลของ pH ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อกิจกรรมจำเพาะของแอลฟา-อะไมเลส (ก) พูลูลาเนส (ข) ในตัวอย่างส่วนที่ไม่เกาะกับเรซิน (Unbound purified enzyme).....	43
4.16	ผลของอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสและพูลูลาเนส.....	44
4.17	ผลของไอออน ที่ส่งผลต่อกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส และพูลูลาเนส ในตัวอย่างของเอนไซม์ที่ไม่เกาะกับเรซิน (Unbound purified enzyme).....	45
4.18	รูปแบบโปรตีนของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ บนเจลอะคริลลาไมด์เข้มข้น 10%.....	46
4.19	การทดลองย่อย หัวมันและกากมันโดยใช้ เอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเหลวหลังการเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์โดยตรง.....	47
4.20	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/mL) และค่า pH หลังการย่อยหัวมันสำปะหลังสายพันธุ์ระยอง 89 ด้วยเอนไซม์สกัดหยาบ.....	48
4.21	กิจกรรมของเอนไซม์ (U/mL) น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/mL) ปริมาณเชื้อ (log CFU/mL) และค่า pH ฯ .....	49

## สารบัญรูปลูกภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.22 การเลี้ยงเชื้อ <i>Streptococcus</i> sp. SUT 513 เพื่อผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้งด้วย แป้ง10% ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	50
4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อต่อค่า pH และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ณ เวลาในการเลี้ยง เชื้อ 24 ชั่วโมง.....	51
4.24 ผลิตภัณฑ์ร่วม [ตะกอนแป้ง] หลังการเลี้ยงเชื้อด้วยแป้งมันสำปะหลัง 10% ในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	53
4.25 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและแป้งในผลิตภัณฑ์ร่วม [ตะกอนแป้ง] หลังการเลี้ยงเชื้อ ที่ 24 ชั่วโมง เทียบกับแป้งมันสำปะหลังทางการค้า.....	53
ภาคผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 595 นาโนเมตร.....	77
ภาคผนวกที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 490 นาโนเมตร.....	77
ภาคผนวกที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมอลโทสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 นาโนเมตร.....	78
ภาคผนวกที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 440 นาโนเมตร.....	78
ภาคผนวกที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมาตรฐาน (ร้อยละ โดยมวลต่อปริมาตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 580 นาโนเมตร.....	79

## คำอธิบายสัญลักษณ์

BME	เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol)
BSA	โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)
CCD	หลักการวิเคราะห์ส่วนผสมกลาง (Central composite design)
CFU	หน่วยการตรวจนับจุลินทรีย์ (Colony forming unit)
Conc.	เข้มข้น (Concentrate)
DNS	กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitro salicylic acid)
dRAM	อาหารเลี้ยงเชื้อ RAM สูตรปรับปรุง (Modify RAM Medium)
deRAM	อาหารเลี้ยงเชื้อ dRAM สูตรปรับปรุง
EDTA	กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราแอซติก (Ethylenediaminetetraacetic acid)
FeSO <sub>4</sub>	เฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulfate)
g	กรัม (gram)
xg	แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ (Relative centrifugal force)
HCl	กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
h	ชั่วโมง (Hour)
kDa	กิโลดาลตัน (Kilodalton)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)
KOH	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide)
L	ลิตร (Liter)
M	โมลาร์ (Molarity)
MgSO <sub>4</sub>	แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate)
MnSO <sub>4</sub>	แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulfate)
Mw	มวลโมเลกุล (Molecular mass)
mg	มิลลิกรัม (Milligram)
mL	มิลลิลิตร (Milliliter)
mM	มิลลิโมลาร์ (Millimolar)
NaCl	โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
NaOH	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (Sodium metabisulfite)

## คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

nm	นาโนเมตร (Nanometer)
PAGE	พอลิอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	สารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline)
RAM	อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรปรับปรุง (Modify <i>Lactobacillus</i> MRS Medium)
rpm	รอบต่อนาที (Round per minute)
SDS	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfat)
pH	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (Positive potential of the Hydrogen ions)
TEMED	เตตระเมทิลเอทิลีนไดอะมีน (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
Tris	ทริสเบส หรือ ทริสอะมีโนมีเทน (Tris aminomethane: $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ )
U	ยูนิต (Unit)
$^{\circ}\text{C}/^{\circ}\text{ซ}$	องศาเซลเซียส (Degree Celsius)
%	เปอร์เซ็นต์ หรือ ร้อยละ (Percentage)
% (w/v)	สัดส่วน หรือ ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร (weight by volume: w/v)
% (v/v)	สัดส่วน หรือ ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร (volume by volume: v/v)
$\alpha$	แอลฟา (Alpha)
$\beta$	เบต้า (Beta)
$\gamma$	แกมมา (Gamma)
$\lambda_{\text{max}}$	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด (Wavelength of maximum absorbance)



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Provenance and significance of the study)

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสามารถและจำเพาะต่อการย่อยสารชีวภาพกลุ่มคาร์โบไฮเดรตประเภทแป้ง อะไมเลสสามารถสลายย่อยโมเลกุลแป้งจนทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ของพอลิเมอร์อย่างโอลิโกแซคคาไรด์แบบสายและ/หรือแบบกิ่งที่เรียกว่า เด็กซ์ตริน (Dextrin) และมอนอเมอร์อย่างกลูโคส (Glucose) (Gupta et al., 2003) โดยทั่วไปเอนไซม์อะไมเลสสามารถจัดจำแนกได้ตามแหล่งที่พบ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Pandey et al., 2000) อีกทั้งยังสามารถจัดจำแนกได้ตามความจำเพาะกับสารตั้งต้น เช่น 1.) แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) 2.) เบต้า-อะไมเลส ( $\beta$ -amylase) และ 3.) แกมมา-อะไมเลส ( $\gamma$ -amylase) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความหลากหลายทางชีวภาพ แต่การใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมนั้น ส่วนใหญ่จะมาจากกลุ่มของแอลฟา-อะไมเลส โดยเฉพาะจากจุลินทรีย์สกุล *Bacillus* ในหลายสายพันธุ์ อาทิ *B. licheniformis* *B. amyloliquefaciens* *B. stearothermophilus* และ *B. subtilis* (Nigam and Singh, 1995; Sivaramakrishnan et al., 2006; Yan and Wu, 2017; Elmansy et al., 2018)

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์อะไมเลสนั้นถูกประยุกต์อย่างหลากหลายในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร การหมัก สิ่งทอ กระดาษ และเภสัชกรรม (Machius et al., 1995; Nigam and Singh, 1995; Pandey et al., 2000; Richardson et al., 2002) โดยในปี ค.ศ. 2015 มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ถึง 47,234 ตัน เพื่อตอบสนองความต้องการของการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งตลาดโลกของเอนไซม์อะไมเลสสำหรับขนมอบ (Global alpha-amylase baking enzyme market) นอกจากนี้จากการคาดการณ์ของ James ในปี ค.ศ. 2016 พบว่า ตลาดการค้าโลกของเอนไซม์อะไมเลสนี้จะสร้างมูลค่าได้ถึง 320 ล้านดอลลาร์สหรัฐในปี ค.ศ. 2024 และในอีกมุมหนึ่งอาจส่งผลให้ต้นทุนการผลิตกรดแอส-แล็กติกนั้นสูงขึ้น เพราะฉะนั้นทางเลือกสำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในระดับอุตสาหกรรมที่คุ้มค่าสมควรที่จะได้รับการศึกษาเพิ่มเติม

มันสำปะหลัง [*Manihot esculenta* (L.) Crantz] เป็นพืชเศรษฐกิจในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2563 มีการเพาะปลูกเพื่อเกษตรกรรมมากถึง 29.88 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) มันสำปะหลังเป็นแหล่งสะสมแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานแก่มนุษย์ผ่านอาหารตลอดจนใช้ในงานอุตสาหกรรมดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ มันสำปะหลังในรูปของแป้งยังจัดเป็นแหล่งของคาร์บอนในการผลิตเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้นของแป้งสูงถึงร้อยละ 12 แต่ระดับความเข้มข้นนี้มักจะก่อให้เกิดปัญหาในการเตรียมอาหารและ

ไม่เหมาะแก่การนำไปเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ อันมีสาเหตุมาจากความหนืดสูง ส่งผลให้ส่วนผสมในอาหารไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันและจุลินทรีย์ไม่สามารถใช้สารอาหารหรือส่วนประกอบอื่น ๆ ในการเจริญได้ ซึ่งการแก้ไขปัญหของระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบัน จะทำได้โดยการเติมเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า เพื่อให้เกิดการย่อยอันเป็นผลทำให้ความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง จุดสำคัญนี้ชี้ให้เห็นว่า หากทำการเลี้ยงเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้โดยตรง จะสามารถลดต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อจากส่วนประกอบที่มีราคาแพงอย่างเอนไซม์อะไมเลสนี้ได้ อีกทั้งยังสามารถเป็นวิธีการผลิตทางเลือกให้กับเอนไซม์ชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมได้

จากธรรมชาติและศักยภาพในการผลิตกรดแล็กติกจากวัตถุดิบประเภทแป้ง-คาร์โบไฮเดรตนั้น จะได้รับอิทธิพลมาจากการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งพบในการรายงานทางวิชาการจากแบคทีเรียกลุ่มแล็กติกในหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Exiguobacterium* sp. *Oceanobacillus* sp. *Leuconostoc* sp. *Lactobacillus* sp. *Lactococcus* sp. *Pediococcus* sp. *Tetragenococcus* sp. *Vagococcus* sp. ฯลฯ (Hatti-Kaul et al., 2018; Abedi et al., 2020) โดยปกติกรดแอล-แล็กติกมักถูกใช้ประโยชน์ในลักษณะหน่วยองค์ประกอบสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ (Building block for the synthesis of biopolymers)(Castro-Aguirre et al., 2016; Dedenaro et al., 2016) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ผ่านกระบวนการอัดพอง (Extrusion) ได้แก่ ฟิล์ม การพิมพ์สามมิติ การขึ้นรูป การหล่อ และการปั่นเส้นใย ฯลฯ (Tümer and Erbil, 2021) ซึ่งในปัจจุบัน ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีจุลินทรีย์เพื่ออุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่ากลุ่มแบคทีเรียแล็กติกสายพันธุ์ *Streptococcus* sp. SUT 513 สามารถผลิตกรดแอล-แล็กติกบริสุทธิ์ (99.9%) จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังได้เช่นกัน เพราะฉะนั้น แบคทีเรียกลุ่มแล็กติกจึงจัดได้ว่ามีความโดดเด่นในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งอย่างอะไมเลส เป็นต้น

ดังนั้น แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะต้องมียาระบบของเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้ง (Amylolytic activity) หลายชนิด โดยอาจจะแสดงกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลส อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลยืนยันที่ชัดเจนเกี่ยวกับกิจกรรมดังกล่าวในแบคทีเรียกรดแล็กติกโดยเฉพาะ *Streptococcus* sp. SUT 513 โดยมีความคาดหวังว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะมีศักยภาพในการผลิตอะไมเลส เพื่อลดทอนหรือทดแทนการใช้อะไมเลสทางการค้า หรือผลผลิตที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบกลุ่มมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Research objectives)

- 1.2.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งชนิดอะไมเลสจากแบคทีเรียแล็กติก (*Streptococcus* sp. SUT 513) บนปัจจัยของความเข้มข้น/ชนิดของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อุณหภูมิ และระดับของปริมาณหัวเชื้อ

1.2.2 เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งและชนิดของเอนไซม์ ในเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Streptococcus* sp. SUT 513

1.2.3 เพื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์สกัดหยาบจาก *Streptococcus* sp. SUT 513 ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือและการแยกสารชีวโมเลกุลด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนลบ

1.2.4 เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์บริสุทธิ์ ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH สารคีเลต และไอออน

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย (Scope of this study)

ศึกษาเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้ง และการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติก จากหัวมันและกากมันสำปะหลังเพื่อการผลิตอาหารที่เริ่มผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นลำดับแรก และพลาสติกชีวภาพจากแล็กติกแอซิด ที่ครอบคลุมประเด็นดังต่อไปนี้

1.3.1 ศึกษาและจัดจำแนกกิจกรรมย่อยแป้งของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กติก *Streptococcus* sp. SUT 513

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งของแบคทีเรียกรดแล็กติก

1.3.3 ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ (Purify) ย่อยแป้ง

1.3.4 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ได้

1.3.5 เก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยเทคนิคที่ทำให้ได้ผลผลิต (Yield) สูง

1.3.6 ทดสอบความสามารถในการย่อยหัวมันสำปะหลังสดและกากมันสำปะหลัง

1.3.7 พัฒนาการวิธีการผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้งจุลินทรีย์

1.3.8 ศึกษาการบำบัดของเหลือทิ้งจากการพัฒนารวมวิธีการผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้งของจุลินทรีย์ที่ใช้

1.3.9 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่บริษัทผู้ร่วมวิจัยเพื่อการประเมินการผลิตในอนาคต

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected results)

1.4.1 ได้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Streptococcus* sp. SUT 513 เพื่อกรรมวิธีการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง (อะไมเลส)

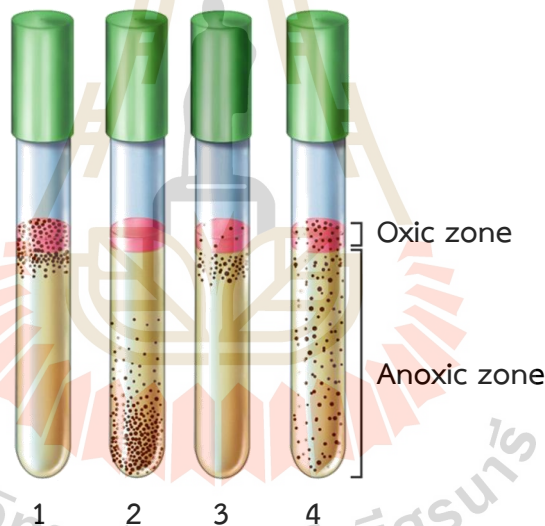
1.4.2 ได้กระบวนการทำบริสุทธิ์บางส่วน (Partial purify) และฐานข้อมูลคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์อะไมเลสจาก *Streptococcus* sp. SUT 513

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แบคทีเรียแล็กติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแล็กติกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส ไม่เคลื่อนไหว ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเซลล์มีทั้งแบบท่อนหรือกลม มีความสามารถที่โดดเด่นในผลิตภัณฑ์แล็กติกระหว่างการหมัก (Ho and Sze, 2018) กล่าวคือ แบคทีเรียที่มีคุณลักษณะทางชีวเคมีภายในเซลล์เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน จนสุดท้ายได้ผลผลิตเป็นกรดแล็กติก (Fossi and Tavea, 2013) แบคทีเรียแล็กติกมีความสามารถในการเจริญได้หลากหลายรูปแบบขึ้นกับสายพันธุ์และความเหมาะสมของสภาวะในการเจริญด้วยดัชนีของออกซิเจน (รูปที่ 2.1) ได้แก่ 1.) กลุ่มที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobes) 2.) กลุ่มที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่หากมีไม่มีออกซิเจนก็สามารถเจริญได้ (Facultative anaerobes) 3.) กลุ่มที่เจริญในสภาวะออกซิเจนในปริมาณน้อย (Microaerophile) ฯลฯ

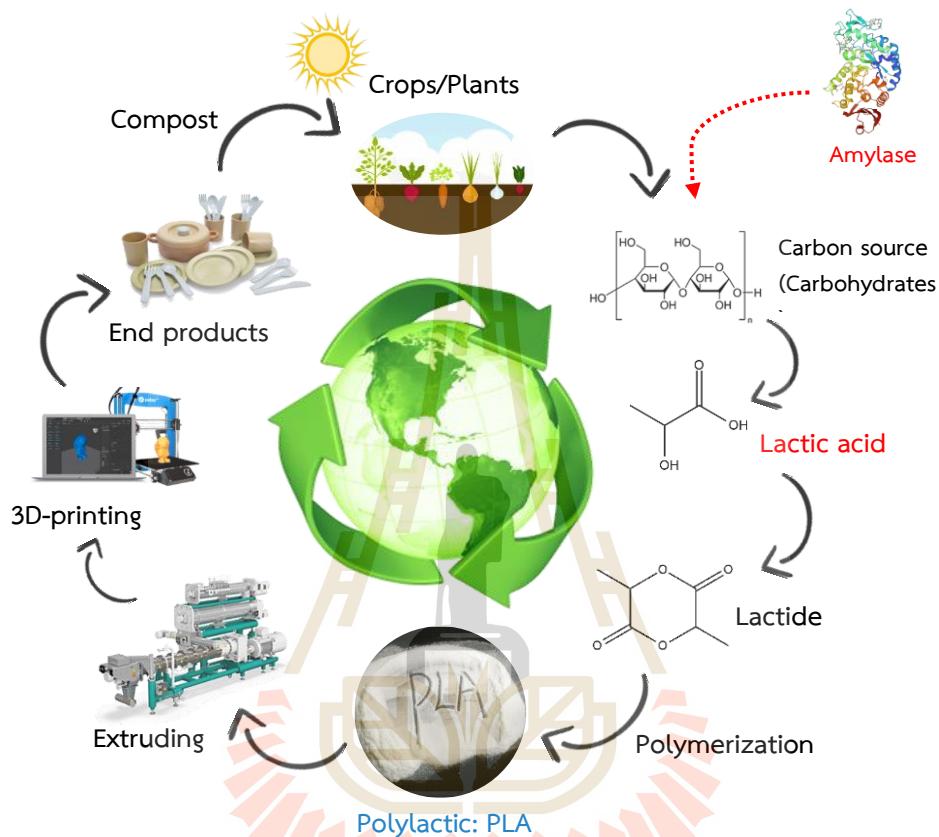


รูปที่ 2.1 ประเภทการเจริญของแบคทีเรียโดยการใช้ออกซิเจนเป็นดัชนี

(1: Aerobes; 2: Anaerobes 3: Microaerophile 4; Facultative anaerobes)

แบคทีเรียแล็กติกสามารถเปลี่ยนแปลงหรือคาร์โบไฮเดรตให้อยู่ในรูปแล็กติกได้ 2 รูปแบบคือ ดี-หรือ แอล-แล็กติก โดยการสังเคราะห์ทางเคมีจะได้พร้อมกันทั้ง 2 รูปแบบ ทำให้เกิดค่าใช้จ่ายสิ้นเปลืองจากกระบวนการแยกแต่ละฟอร์มออกเพื่อให้บริสุทธิ์ขึ้น แต่แบคทีเรียกลุ่มแล็กติกจะสามารถผลิตกรดแล็กติกบริสุทธิ์ได้หลังจากการหมัก/ย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส ทีมคณะผู้วิจัยของ Reddy (2008) ยังพบอีกว่า แบคทีเรียแล็กติกสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตได้หลากหลาย ได้แก่ แป้งสาลี มันสำปะหลัง และข้าวโพด การใช้ประโยชน์ที่น่าสนใจจากกรดแอล-แล็กติกคือ การนำมาผลิตเป็นสารโมเลกุลขนาด

ใหญ่ (Polymerization) ให้ได้เป็นโพลิแล็กติก (Polylactic acid) หรือที่เรียกกันว่า PLA ที่จะสามารถนำไปผลิตต่อเป็นพลาสติกชีวภาพ (รูปที่ 2.2) จากการศึกษาวิจัยของ Kanpiengjai และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 พบว่า *Lactobacillus plantarum* S21 สามารถผลิตกรดแล็กติกในปริมาณที่สูงมากและพบการมีกิจกรรม-การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งอย่างชัดเจนที่สามารถระบุความเข้มข้นได้ถึงร้อยละ 96 ว่าเป็นแอลฟา-อะไมเลส



รูปที่ 2.2 วัฏจักรความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมของการผลิตโพลิแล็กติก (PLA)  
ดัดแปลงจาก Tümer and Erbil (2021)

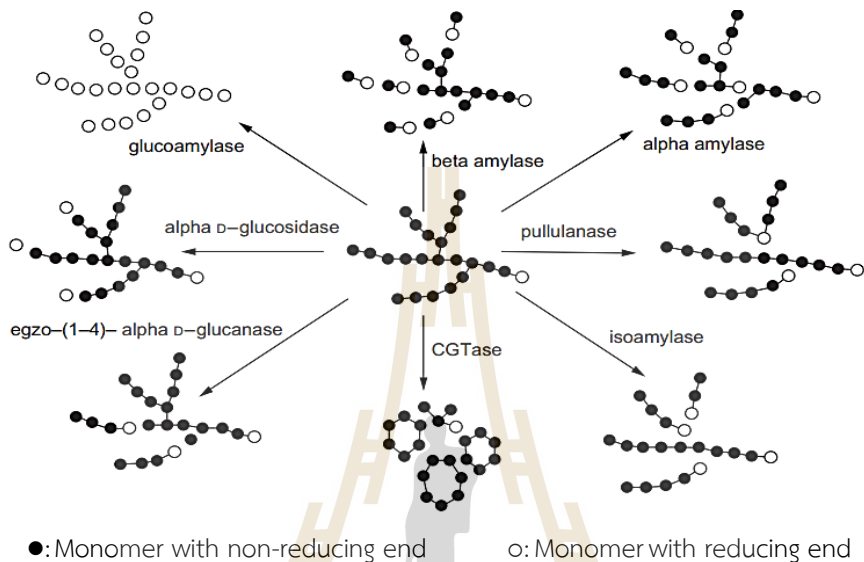
## 2.2 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase enzyme)

อะไมเลสคือเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยแป้งให้มีโมเลกุลเล็กลงจากการตัดพันธะไกลโคซิดิกหรือไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่างกันออกไปตามเกณฑ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ (รูปที่ 2.3) แต่ถ้าหากจัดจำแนกตามบริเวณที่เอนไซม์จะสามารถไฮโดรไลซิสแป้ง จะแบ่งได้ 2 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

(1) Endoamylase อะไมเลสกลุ่มนี้ จะสามารถย่อยตัวโมเลกุลของแป้งจากภายใน มีความสามารถในการตัดพันธะ  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสุ่มตัด ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจะมีทั้งโพลีแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์ หรือไดแซคคาไรด์ ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase; EC. 3.2.1.1) (Gupta et al., 2003; Kelly et al., 1991)



(2) Exoamylase เอนไซม์กลุ่มนี้จะทำการตัดเฉพาะส่วนที่เป็นปลายด้าน non-reducing มีความสามารถในการตัดทั้งพันธะ  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond และ  $\alpha$ -1,6-glycosidic (Hii et al. 2012) ทำให้ผลผลิตที่ได้ออกมาเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ๆ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เบต้า-อะไมเลส ( $\beta$ -amylase; EC 3.2.1.2) (Mihajlovski et al., 2016) แอลฟา-กลูโคซิเดส ( $\alpha$ -glucosidases: EC 3.2.1.20) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylases: EC 3.2.1.3)



รูปที่ 2.3 เอนไซม์อะไมเลสชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง  
ดัดแปลงจาก Tomasik and Horton (2012)

### 2.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสในจุลลินทรีย์ (Optimization of cultivation medium and conditions for amylase production by microorganisms)

การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลลินทรีย์โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำนั้นเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะกับการผลิต แอลฟา-อะไมเลส ทั้งการหมักบนอาหารแข็ง (Solid-state fermentation) และการหมักในอาหารเหลว (Liquid-state or submerged fermentation) (Mora-Villalobos et al., 2020) โดยปกติการผลิตอะไมเลสด้วยแบคทีเรียที่เรี่ยนั้นนิยมใช้การหมักในอาหารเหลว เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ (temperature) และความเป็นกรดต่าง (pH) ได้ง่ายกว่าการหมักบนอาหารแข็งซึ่งจะเป็นที่นิยมในกลุ่มของเชื้อรา ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิตอะไมเลสโดยแบคทีเรียในอาหารเหลวสังเคราะห์ (Synthetic media) จะใช้ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน และส่วนประกอบอื่น ๆ ที่มีราคาแพงนั้นจะถูกแทนที่ด้วยผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ และในบางกรณีที่มีการคัดแยกเชื้อมาจากแหล่งธรรมชาติที่อุดมไปด้วยแป้ง ก็จะสามารถใช้วัตถุดิบจากแหล่งแยกเชื้อนั้นดังเช่น ข้าวสาลี ข้าว ถั่วเหลือง และมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อลดต้นทุนการผลิตลงได้อีกด้วย (Mielenz, 1983; Sivaramakrishnan et al., 2006)

### 2.3.1 สารอาหาร (Nutrients)

#### 2.3.1.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

พบว่าจุลชีพมีการใช้น้ำตาลและแป้งหลากหลายเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น สตาร์ช กลูโคส กาแล็กโทส ไกลโคเจน และอินูลิน เป็นต้น ซึ่งได้มีการรายงานทางวิชาการว่าเหมาะกับการเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตอะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus sp. I-3* (Chandra et al., 1980) สำหรับ soluble starch พบว่ามีการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* (Srivastava and Baruah, 1986) และเชื้อในกลุ่มของ *Bacillus sp.* นั้นมีการรายงานว่าสามารถย่อยแป้งดิบได้สูงสุดในอาหารเหลวที่มีแล็กโทส และ สารสกัดยีสต์เป็นส่วนประกอบร่วมด้วย (Rahardjo et al., 2005) และได้มีการใช้ผลิตผลหรือของเหลือใช้จากการเกษตรมาเป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อที่จะลดต้นทุนการผลิตลง โดยในผลผลิตทางการเกษตรหรือสิ่งเหลือใช้ เช่น กากสับ แป้งข้าวฟ่าง แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งสาลี และแป้งข้าวเจ้า มักจะมีสารอาหารที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจน ที่จำเป็นต่อการเจริญและเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Ashraf et al., 2005; Chandra et al., 1980).

#### 2.3.1.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

ในการผลิตแอลฟา-อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Bacillus sp. I-3* นั้นพบว่ากากถั่วเหลืองให้ผลผลิตของเอนไซม์สูงที่สุดจากบรรดาแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนั้น (Francis et al., 2003; Goyal et al., 2005; Sodhi et al., 2005) Tanyildizi et al. (2007) ได้รายงานไว้ว่าการเพิ่มเพปไทด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งพบในเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่พบว่ามีกิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลสสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารดังนี้ เพปไทด์ (1%) สารสกัดยีสต์ (0.5%) และมอลโทส (0.5%) และเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าอยู่ตลอดเวลา (Dettori-Campus et al., 1992) ในปี ค.ศ. 2004 Aiyer ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์กับอนินทรีย์ โดยศึกษาในเชื้อ *B. licheniformis* SPT 278 ซึ่งพบว่าการใช้เพปไทด์นั้น ส่งผลให้การผลิตอะไมเลสสูงกว่าการใช้แอมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตซึ่งนับว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าแอล-แอสพาราจิน (*L-asparagine*) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สนับสนุนการผลิตอะไมเลสได้มากที่สุดของเชื้อสายพันธุ์ *Thermomyces lanuginosus* รวมถึงสารสกัดยีสต์ก็ให้ผลที่สอดคล้องที่ดีไปในทิศทางเดียวกัน (Nguyen et al., 2000).

#### 2.3.1.3 แร่ธาตุที่จำเป็น (Essential elements)

การเติมเกลือที่เป็นกลุ่มเมทัลไอออนนั้นได้มีการรายงานว่าช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อ และส่งผลให้การผลิตอะไมเลสเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เนื่องจากอะไมเลสโดยเฉพาะชนิดแอลฟา-อะไมเลสเป็นแคลเซียมเมทัลโลเอนไซม์ (metalloenzyme  $Ca^{2+}$  ion) ซึ่งหมายความว่าต้องการแคลเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์เพื่อเริ่มการทำงาน ดังนั้นจึงพบการเติมแคลเซียมคลอไรด์



(CaCl<sub>2</sub>) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการผลิตและการทำงานของเอนไซม์ (Francis et al., 2003; Patel et al., 2005) โดยปริมาณที่มีการเติมลงไปนั้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อคือ CaCl<sub>2</sub> (0.1%) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl: 0.1%) ที่ใช้การหมักในอาหารเหลวซึ่งเมล็ดอามาราทัสเป็นสารตั้งต้น (Viswanathan and Surlikar, 2001) นอกจากนี้การเติมลิเทียมซัลเฟต (LiSO<sub>4</sub>) และแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Goyal et al., 2005; Sodhi et al., 2005), แต่ในเชื้อบางกลุ่มกลับพบว่า เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl<sub>3</sub>) และแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) ส่งผลให้การผลิตอะไมเลสนั้นลดลง (Viswanathan and Surlikar, 2001).

### 2.3.2 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (Temperature and pH)

อิทธิพลของอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการผลิตอะไมเลสของเชื้อจุลินทรีย์นั้น สัมพันธ์กับความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่สอดคล้องกับประเภทของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2.1-2.2) ส่วนความเป็นกรดต่างนั้น สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกในลักษณะที่คล้ายกันกล่าวคือ อาศัยการติดตามการเจริญของเชื้อและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีความไวต่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มของเชื้อราจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะค่อนข้างเป็นกรด และแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางจนถึงเป็นเบสอ่อน (ตารางที่ 2.1-2.2) ซึ่งความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จะส่งผลต่อการผลิตและหลังแอลฟา-อะไมเลสในจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ด้วย (Sivaramakrishnan et al., 2006)



ตารางที่ 2.1 อุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ

ประเภทจุลินทรีย์	มวลโมเลกุล (kDa)	สภาวะที่เหมาะสม		แหล่งที่มา
		อุณหภูมิ (°ซ)	pH	
<b>Bacterial</b>				
<i>Aeribacillus pallidus</i> BTPS-2	100	70	7.0	Timilsina et al. (2020)
<i>Anoxybacillus thermarum</i> A4	50	70	5.5-10.5	Baltas et al. (2016)
<i>Bacillus</i> sp. YX1	56	40-50	5.0	Liu and Xu (2008)
<i>B. pacificus</i>	40	55	9.0	Alonazi et al. (2021)
<i>B. licheniformis</i>	58	90	4.0-9.0	Hmidet et al. (2008)
<i>B. stearothermophilus</i>	59	80-82	5.6	Ali et al. (2001)
<i>Chromohalobacter</i> sp.	72	65	9.0	Prakash et al. (2009)
<i>Chryseobacterium taeanense</i>	47	50	9.0	Wang et al. (2011)
<i>Geobacillus</i> sp. LH8	52	80	5.0-7.0	Khajeh et al. (2009)
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	140	60-65	5.5	Burgess-Cassler, and Iman (1991)
<i>L. manihotivorans</i>	135	55	5.5	Aguilar et al. (2000)
<i>L. plantarum</i>	-	40	7.0	Onilude et al. (2017)
<i>Marinobacter</i> sp. EMB8	72	80	6.0-11.0	Kumar and Khare (2012)
<i>Staphylothermus marinus</i>	82.5	100	5.0	Li et al. (2010)
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	53.5	85	5.5	Horvathova et al. (2006)
<i>Thermotoga maritima</i>	50	70	7.0	Lim et al. (2003)

ตารางที่ 2.2 อุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พุลูซานเนสโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ

ประเภทจุลินทรีย์	มวลโมเลกุล (kDa)	สภาวะที่เหมาะสม		แหล่งที่มา
		อุณหภูมิ (°ซ)	pH	
<b>Bacterial</b>				
<i>Aerobacter aerogenes</i>	114.3	50	-	Nigam and Singh (1995)
<i>Arthrobacter aerogenes</i>	51-52	50	5.3-5.8	Ge et al. (1980)
<i>Bacillus</i> sp. No. 202-1	92	55	-	Nigam and Singh (1995)
<i>Bacillus methanolicus</i> PB1	73	50	5.5	Zhang et al. (2020)
<i>B. polymyxa</i>	48	45	-	Nigam and Singh (1995)
<i>B. pseudofirmus</i> 703	87	45	7.0-8.0	Lu et al. (2018)
<i>Fervidobacterium nodosum</i>	95	80	5.0	Yang et al. (2020)
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	80.4	70	6.5	Li et al. (2018)
<i>Lactococcus lactis</i>	74	45	4.5	Waśko et al. (2011)
<i>Thermus aquaticus</i>	83	85	6.4	Plant et al. (1986)
<b>Archeal</b>				
<i>Desulfurococcus mucosus</i>	-	100	5.0	Odibo et al. (1992)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	110	95	5.5	Brown and Kelly (1993); Lee et al. (2006)
<i>P. woesei</i>	-	100	6.0	Ruediger et al. (1995)
<i>Thermococcus litoralis</i>	119	98	5.5	Brown and Kelly (1993); Lee et al. (2006)

หมายเหตุ - ไม่แสดงข้อมูล

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

##### 3.1.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์

การศึกษาจะเริ่มจากส่วนประกอบอาหารตั้งต้นที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และมีทริปโตนกับสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (สูตร RAM) โดยทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) จากการเตรียมเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 บริสุทธิ์ ในอาหารเหลวปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 12 ชม. ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นจึงย้ายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงสู่อาหารเหลวปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชม. ขณะการบ่มจะมีการเก็บข้อมูลต่าง ๆ ดังเช่น ค่าการเจริญของแบคทีเรียและค่าพีเอช (pH) ของอาหารเหลว ก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ (0 และ 24 ชม.)

จากนั้นอาหารเหลวจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำ (Supernatants) โดยเรียกว่า อะไมเลสก่ดหยาบ (Crude enzyme) ไปวิเคราะห์คุณสมบัติและปัจจัย (\*: หัวข้อ 3.2) ได้แก่ (1) ปริมาณโปรตีน (2) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (3) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (4) การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ (5) คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์บริสุทธิ์

##### - การวัดค่าการเจริญของแบคทีเรีย

ตรวจสอบได้โดยวิธีมาตรฐานทางเทคนิคการดรอปเพลท (Drop plate technique) (Naghili และคณะ, 2013) โดยหดยดสารละลายที่มีเชื้อแขวนลอยปริมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ผ่านการทำเจือจางเป็นลำดับขั้น (Serial dilution) ลงบนอาหารวุ้นที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบ (RAM) จากนั้นรอให้สารละลายซึมเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อจนแห้ง แล้วทำการคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม.

##### 3.1.2 การศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

เริ่มต้นจากการแทนที่ทริปโตนและสารสกัดยีสต์ (Hi-Media Laboratories Pvt Ltd, Mumbai, India) ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร RAM ด้วยยีสต์สกัดชนิด FM902 FP101 และ FP103 (Angel Yeast Co. Ltd., China) ซึ่งผลจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การใช้แหล่งคาร์บอนดังเช่นแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 4.5% โดยมวลต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือรำข้าวสกัดน้ำมันร้อยละ 0.6% โดยมวลต่อปริมาตรและ pH เริ่มต้นอยู่ที่ 8.5 นั้น ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง จึงนำมาทดสอบร่วมกับสูตรอาหารตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของแต่ละสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการหาความเหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

ส่วนประกอบ	สูตรที่			
	1	2	3	4
แป้งมันสำปะหลัง (กรัม)	4.5	4.5	4.5	4.5
รำข้าวสาคัดน้ำมัน (กรัม)	0.6			
สารสกัดยีสต์ FM902 (กรัม)		0.6		
สารสกัดยีสต์ FP101 (กรัม)			0.6	
สารสกัดยีสต์ FP103 (กรัม)				0.6
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต: $K_2HPO_4$ (กรัม)	0.6	0.6	0.6	0.6
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	100	100	100	100

หมายเหตุ สูตรที่ 1 คือ สูตรอาหารควบคุม (Control)

### 3.1.3 การศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

การศึกษาจะใช้หัวมันสำปะหลังสายพันธุ์ 1.) เกษตรแดง 2.) เกษตรพื้นบ้าน และ 3.) ระยอง 72 และ 4.) กากมันอ่อนเป็นแหล่งของคาร์บอน (โดยมีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนคู่เทียบ: control) เริ่มต้นจากการเตรียมแหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิด ที่ได้ระดับความเข้มข้นของแป้งเท่ากับ 4.5% (w/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ \*\*\*ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน (ยีสต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวส่วนใสและนำไปวิเคราะห์ตามคุณสมบัติและปัจจัย (\*)

### 3.1.4 การศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อแหล่งไนโตรเจนคัดเลือก

เริ่มต้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกปรับเปลี่ยนส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการออกแบบตามการวิเคราะห์แบบหลักส่วนผสมกลาง (Central composite design: CCD) ด้วยโปรแกรม Design-Expert 11.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) ทำการกำหนดตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง และแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกไว้ สภาวะที่เหมาะสมได้ถูกออกแบบให้ทำการทดลอง 5 ระดับของตัวแปรอิสระ  $-\alpha$  -1 0 +1  $+\alpha$  ด้วยค่า  $\alpha$  เท่ากับ 1.68179 ได้ผลการกำหนดตัวแปรตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แผนแสดงการกำหนดระดับตัวแปรการศึกษาด้วยวิธีการ CCD

ตัวแปรอิสระ (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร)	ระดับ				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A: แป้งมันสำปะหลัง	0.28	1.00	2.75	4.50	5.22
B: สารสกัดยีสต์ FP101	0.05	0.13	0.32	0.50	0.58

เมื่อออกแบบการทดลองตามหลัก CCD ทำให้ได้ตารางส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนที่ต้องปรับเปลี่ยน (ตารางที่ 3.3) ได้ทั้งหมด 9 สูตร 13 การทดลอง หลังการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ด้วยปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในตู้บ่มสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงตรวจหาปริมาณเชื้อ และนำส่วนใสไปทดสอบหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน ค่า pH หลังการเลี้ยง ปริมาณแป้งคงเหลือ แล้วนำมาเปรียบเทียบหาสูตร/ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์มากที่สุด โดยกำหนดให้ อาหารเลี้ยงเชื้อ RAM สูตรปรับปรุงที่ได้ เรียกว่า Developed RAM medium (dRAM)

**ตารางที่ 3.3** สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง โดยออกแบบตามหลัก CCD สำหรับ 2 ตัวแปร

การทดลองที่	ความเข้มข้น % (w/v)	
	A: แป้งมันสำปะหลัง	B: สารสกัดยีสต์
1	1.00	0.13
2	2.75	0.32
3	2.75	0.32
4	5.22	0.32
5	2.75	0.32
6	4.50	0.50
7	2.75	0.58
8	4.50	0.13
9	0.28	0.32
10	1.00	0.50
11	2.75	0.32
12	2.75	0.05
13	2.75	0.32

### 3.1.5 การศึกษาปริมาณแร่ธาตุจำเป็นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

เริ่มจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงของ RAM (dRAM) ที่ส่วนประกอบของสารสกัดยีสต์ และแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม โดยเติม  $\text{FeSO}_4$  เพียงชนิดเดียวลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และที่เติม  $\text{MgSO}_4$  เพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 2.3 และ 10 มิลลิโมลาร์ และแบบผสมแร่ธาตุทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นที่อย่างละ 0.1 มิลลิโมลาร์ (โดย



มีตัวอย่างควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร dRAM ที่ไม่มีการเติมแร่ธาตุ) ทำการทดลองที่ปริมาตร 50 มิลลิตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์คุณสมบัติและปัจจัย (\*) โดยกำหนดให้อาหารเลี้ยงเชื้อ dRAM สูตรปรับปรุงจากการเติมแร่ธาตุว่า Developed with Element RAM medium (deRAM)

### 3.1.6 การหาปริมาณเซลล์กล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

ลงเชื้อบริสุทธิ์ ในอาหารสูตร dRAM ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มไว้ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการเจือจางเชื้อที่แต่ละความเข้มข้น โดยจะทำการเจือจางเป็น 5 10 100 เท่า และเจือจางเป็น 0.5 Mc farland scale แล้วเจือจางต่อเป็น 5 เท่า และ 10 เท่า จากนั้นจึงทำการหาจำนวนเชื้อโดยใช้วิธีการ drop plate บ่มไว้ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการนับโคโลนีต่อ จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร dRAM ปริมาตร 50 มิลลิตร ในอัตราส่วน 2-10% (v/v) บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์คุณสมบัติและปัจจัย (\*)

### 3.1.7 การเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Batch scale)

ทำการศึกษาด้วยสูตรอาหาร deRAM ใน 1 ลิตร กล่าวคือ แป้งมันสำปะหลัง (45 กรัม) สารสกัดยีสต์ชนิด FP101 (1 กรัม)  $K_2HPO_4$  (6 กรัม)  $FeSO_4$  (0.03 กรัม) และ  $MgSO_4$  (0.025 กรัม) ที่ pH 8.0-8.5 ปริมาตร 3 ลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้อายุ 12-16 ชั่วโมง ลงถังหมักที่ต้องการให้ระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6 log CFU/ml (7% w/v) บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์คุณสมบัติและปัจจัย (\*)

## 3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นส่วนน้ำ (Analysis of supernatant sample)

### 3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein determination)

ดัดแปลงตามวิธีการของ Bradford (1976) หรือที่เรียกว่า Bradford's method โดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin: BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานช่วงความเข้มข้นโปรตีน 0.01-0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันด้วยการผสมแบบฟุ้งกระจาย (Re-suspension) ในไมโครเวลเพลท 96 หลุม (96-well plate) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ( $\lambda_{max}$ ) ที่ 595 นาโนเมตร

### 3.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar determination)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1955) ใช้ตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบ 100 ไมโครลิตร ผสมกับแป้งละลายน้ำ (Soluble starch) เข้มข้น 1 % (w/v) ที่เตรียมในเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate-buffered saline: PBS) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่



อุณหภูมิ 35°C บ่มเป็นเวลา 30 นาที ทำการเริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติม Dinitro salicylic colorimetric (DNS) reagents ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90°C เป็นเวลา 10 นาที พักให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตตัวอย่างมา 40 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับน้ำกลั่นปราศจากไอออน 160 ไมโครลิตร วัดค่า  $\lambda_{max}$  ที่ 540 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส (Maltose) ความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Standard curve) และรายงานปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในหน่วยของ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL)

### 3.2.3 การจัดจำแนกกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (Amylolytic activity)

#### 3.2.3.1 ชนิดอะไมเลส (Amylase type)

การหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งชนิดอะไมเลส ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Takenaka และคณะ (2015) จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตามการดำเนินการทดลองในหัวข้อ 3.2.2 ซึ่งจะวัดค่า  $\lambda_{max}$  ที่ 540 นาโนเมตร แบบจลศาสตร์ (Kinetic) เป็นเวลา 30 นาที เทียบกับสารมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส (Maltose) ความเข้มข้น 100 ถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรของอะไมเลสจะเท่ากับปริมาณน้ำตาลมอลโทสที่เอนไซม์ย่อยได้ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที และรายงานค่ากิจกรรมของอะไมเลสในหน่วยของ ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (U/mL)

#### 3.2.3.2 ชนิดพุลูลานเนส (Pullulanase type)

การหากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ดัดแปลงตามวิธีของ Wang และคณะ (2019) โดยตัวปฏิกิริยาประกอบด้วยตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบ 100 ไมโครลิตร ผสมกับพุลูลาน (Pullulan) ความเข้มข้น 2% (w/v) จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์พุลูลานเนสตามการดำเนินการทดลองในหัวข้อ 3.2.3.1

### 3.2.4 การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และการตกตะกอนของโปรตีนที่เกิดขึ้นในเอนไซม์สกัดหยาบ

นำเอนไซม์สกัดหยาบมาปรับ pH ในสถานะต่าง ๆ ที่ 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 และ 9.0 ด้วยการใช้สารละลาย NaOH และ HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นทำการถ่ายสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงชนิดพลาสติก PP ทำการบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนใสและตะกอน แล้วนำทั้ง 2 ส่วนไปหากิจกรรมของเอนไซม์ตามการดำเนินการทดลองในหัวข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2

### 3.2.5 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งด้วยชุดทดสอบทางการค้า (Amylolytic activity by commercial test kits)

#### 3.2.5.1 แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase)

จากนั้นเริ่มทำปฏิกิริยาโดยบ่มสารทดสอบ (Amylase HR reagent) และตัวอย่างเอนไซม์อย่างละ 20 ไมโครลิตร ที่ 40°C จากนั้นจึงนำมาผสมกัน แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแบ่งมา 30 ไมโครลิตร และเติมตัวหยุดปฏิกิริยา ① ปริมาตร 225 ไมโครลิตร แล้วทำการอ่านค่า  $\lambda_{max}$  ที่ 400 นาโนเมตร และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของ ยูนิตเซอร์อลฟาต่อมิลลิลิตร (Ceralpha U/ml)

#### 3.2.5.2 เบต้า-อะไมเลส ( $\beta$ -amylase)

การวิเคราะห์เริ่มจากการบ่มสารทดสอบ (Betamyl-3 substrate solution) และตัวอย่างเอนไซม์ ไว้ที่ 40°C แล้วดำเนินการวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.2.5.1 แต่ใช้ตัวหยุดปฏิกิริยา ② และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของ ยูนิตเบต้าต่อมิลลิลิตร (Beta U/ml)

#### 3.2.5.3 พูลูลานาส (Pullulanase)

เริ่มจากการบ่มสารทดสอบ (PullG6 reagent solution) และตัวอย่างเอนไซม์ ไว้ที่ 40°C แล้วดำเนินการวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.2.5.1 แต่ใช้ตัวหยุดปฏิกิริยา ③ และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยของ ยูนิตพูลูลานาสต่อมิลลิลิตร (Pull U/ml)

#### 3.2.5.4 อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase)

นำ p-Nitrophenyl- $\beta$ -maltoside plus thermostable  $\beta$ -glucosidase และตัวอย่างเอนไซม์ บ่มไว้ที่ 40°C แล้วดำเนินการวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.2.5.1 แต่ใช้ตัวหยุดปฏิกิริยา ④ และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยของ ยูนิตอะไมโลกลูโคซิเดสต่อมิลลิลิตร (Amg U/ml)

ตัวหยุดปฏิกิริยา ①-④ แสดงรายละเอียดที่ ภาคผนวก ก

### 3.2.6 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์

#### 3.2.6.1 การตกตะกอนด้วยเกลือ (Salt precipitation)

เอนไซม์อะไมเลสสกัดหยาบจะถูกนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) ตามวิธีของ Kanpiengjai และคณะ (2015) ที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 30-100 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย PBS ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการเก็บเกี่ยวส่วนใสเพื่อมาทำการกรองผ่านเยื่อกรองชนิดไนลอน (Nylon syringe filter) ที่ขนาดรูเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อกรอง 0.45 ไมครอน แล้วต่อด้วยการทำไดอะฟิลเทรชัน (Diafiltration) ผ่านเยื่อกรองชนิดไหมเทียม (Regenerated cellulose) ที่ขนาดรูเยื่อกรอง 10 กิโลดาลตัน โดย

การปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 ×g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บเกี่ยวสารละลายส่วนที่ไม่ผ่านการกรอง (Retentate) ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนที่ไม่ละลายน้ำออก เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ขั้นต่อไป

### 3.2.6.2 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Anion exchange chromatography)

ใช้หลักการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Anion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ prepacked HiTrap DEAE sepharose fast flow 1 ml (GE Healthcare Life Sciences, USA) ใช้สารละลายเกลือบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8.5) เป็นตัวบ่มคอลัมน์ (Equilibrated column) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วทำการฉีด (Inject) ตัวอย่างเอนไซม์หยาบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้าสู่คอลัมน์ จากนั้นทำการล้างคอลัมน์/พร้อมแยกส่วน (fraction) โดยเอนไซม์บริสุทธิ์ส่วนแรกที่ไม่ได้ถูกจับกับไอออนบนคอลัมน์จะถูกแยกออกมาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ข้างต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งตัวอย่างนี้จะเรียกว่า Unbound purified-enzyme

จากนั้นจึงใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 8.5) เป็นตัวชะออก (Elution) โดยการชะออกจะใช้รูปแบบการจากไล่ระดับ (Linear gradient) ความเข้มข้นจาก 0 ถึง 1 โมลาร์ ที่ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล (Flow rate) 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที เอนไซม์บริสุทธิ์ส่วนที่ 2 ที่จับอยู่กับคอลัมน์จะถูกแยกออกมา โดยเรียกตัวอย่างนี้ว่า Bound purified-enzyme

### 3.2.7 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์

#### 3.2.7.1 สภาวะความเป็นกรด-ด่าง

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปฏิกิริยากับแป้งละลายน้ำเข้มข้น 1% (w/v) กับสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

สารละลายบัฟเฟอร์	ช่วง pH
Glycine-HCl	3.0 - 4.0
Sodium acetate	4.0 - 5.0
PBS	6.0 - 7.0
Malate	6.0 - 8.0
Tris-HCl	7.0 - 9.0

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตามการดำเนินการทดลองในหัวข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2

### 3.2.7.2 อุณหภูมิ

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากันในสภาวะแบ่งละลายเข้มข้น 1% (w/v) สารละลาย PBS บัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.2) โดยบ่มตัวอย่างเอนไซม์แยกกับสารตั้งต้นไว้ที่อุณหภูมิ 40 50 60 70 80 90 และ 100°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อน จากนั้นจึงผสมเข้าด้วยกันบ่มให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที (โดยให้อุณหภูมิ 30°C คือ ชุดตัวอย่างควบคุม) จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์ตามการดำเนินการทดลองในหัวข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2

### 3.2.7.3 สารคีเลตและไอออนโลหะ

ทำการวิเคราะห์หับนไอออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไอออนของโลหะหมู่ 1 ไอออนโซเดียม ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NaCl}$ )/ โลหะหมู่ 2 ไอออนแมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{MgSO}_4$ )/ และไอออนแคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ) ในส่วนของไอออนของโลหะหมู่ทรานซิชัน (Transition metal ions) ได้แก่ ไอออนแมงกานีส ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{MnSO}_4$ ) และไอออนโลหะ ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{FeSO}_4$ ) และสารคีเลต (Chelating agent) คือ สารอีดีทีเอ (EDTA)

ทุกไอออนจะถูกเตรียมที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ แล้วจะถูกนำมาผสมในสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ (pH 6.8) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 30 นาที โดยกำหนดให้ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมไอออนหรือสารคีเลตลงไปในปฏิกิริยาเป็นตัวควบคุม (control) จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์ตามการดำเนินการทดลองในหัวข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2

### 3.2.7.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบระดับโมเลกุลของเอนไซม์

(Molecule enzyme component analysis)

วิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยกโปรตีนตามขนาดผ่านสนามไฟฟ้า (SDS-PAGE) ดัดแปลงตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยละลายตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วทำการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด จากนั้นผสมตัวอย่างที่ละลายแล้วเข้ากับ Treatment buffer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วดำเนินการแยกโปรตีนผ่านเจลกักและเจลแยก (Stacking gel and running gel) ที่ ความเข้มข้น 4.0% และ 10.0% ตามลำดับ โดยความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการแยกโปรตีนคือ 1.0 ไมโครกรัม ในระบบสารละลาย Tank buffer บนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกโปรตีน 80 โวลต์

ทำการย้อมแถบโปรตีนโดยวิธีย้อมด้วยซิลเวอร์ (Silver staining) ตามวิธีของ Kavran และ Leahy (2014) ทำการตรึงเจลด้วยสารละลาย Fix solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างเจลด้วยสารละลาย Washing gel solution จำนวน 2 ครั้ง ที่ครั้งละ 20 นาที จากนั้นทำการคืนตัวเจลด้วยการล้างน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ที่ครั้งละ 1 นาที ต่อด้วยการกระตุ้นโปรตีนให้ไวต่อซิลเวอร์ด้วยสารละลายไซเตียมไฮโอซัลเฟต

( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างเจลด้วยน้ำปราศจากอีก 2 ครั้ง ทำการตรึงซิลเวอร์เข้ากับโปรตีนด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ( $\text{AgNO}_3$  reagent) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ต่อด้วยการย้อมสีเจลด้วยสารละลาย Developed solution เป็นเวลา 3 นาที (ทำการเปลี่ยนสารละลายจนกว่าแถบจะย้อมติดสี) หยุดปฏิบัติการจับซิลเวอร์เพื่อป้องกันการรบกวน (Noise) จากสีย้อมที่มากเกินไปด้วย Stop solution เป็นเวลา 10 นาที ทุกขั้นตอนของการย้อมจะทำบนเครื่องเขย่า (Shaker) ที่ความเร็วรอบ 75 rpm ทำการถ่ายภาพและคำนวณมวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Gel document (Fire reader V4, Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

### 3.3 พัฒนาการวิธีการผลิตเอนไซม์เพื่อการใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์

#### 3.3.1 การทดลองย่อยหัวมันและกากมันสำปะหลังขั้นต้น

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 ด้วยอาหารสูตร dRAM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 6.80 โดยจะเรียกในส่วนนี้ว่า เอนไซม์ดิบ จากนั้นทำการพาสเจอร์ไรส์ด้วยการบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่  $63.5^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นจึงนำมาย่อยหัวมันสำปะหลังที่มีแป้งเข้มข้น 10% และกากมันสำปะหลังที่มีแป้งเข้มข้น 4.5% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ผ่านการต้มในน้ำเดือด (เพื่อเจลาติไนซ์แป้ง: 10 นาที) และทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น แล้วเติมเอนไซม์ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่ระดับความเข้มข้น 10-20% (v/v) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  แล้วเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ในตู้บ่มแบบเขย่า จากนั้นจึงนำตัวอย่างมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (หัวข้อ 3.2.2) ที่ช่วงเวลา 0 3 5 8 และ 24 ชั่วโมง และทำการเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ดิบก่อน-หลังการทำพาสเจอร์ไรส์

#### 3.3.2 การทดลองย่อยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

โดยจะเตรียมเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 บริสุทธิ์ ในอาหารเหลวปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ  $35^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ ปริมาณ 6 log CFU/ml ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงสู่อาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 10% (w/v) ที่มีสารสกัดยีสต์ FP101 เข้มข้น 0.1 และ 0.2% (w/v) ให้ปริมาณเป็น 200 มิลลิลิตร โดยหลังการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์คุณสมบัติ และปัจจัย (\*) ซึ่งจะเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างอาหารแต่ละสูตรเพื่อคัดเลือกเป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับปริมาณตะกอนแป้งตกค้างมากที่สุด

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 ด้วยอาหารสูตร dRAM (pH 6.80) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะเรียกในส่วนนี้ว่า เอนไซม์ดิบ และแบ่งเอนไซม์ดิบส่วนหนึ่งมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นจึงนำมาย่อยหัวมันสำปะหลังที่มีแป้งเข้มข้น 10% ที่บรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยจะใช้เอนไซม์ที่ 10-20% (v/v) [ขึ้นกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์] พยายามปรับให้อยู่ในช่วงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน



จากนั้น จึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50°C แล้วติดตามค่า pH และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วง 0 จนถึง 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์คุณสมบัติและปัจจัย (\*)

### 3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นส่วนตะกอน (Analysis of pellet sample)

#### 3.4.1 การหาปริมาณแป้งและสารตั้งต้นคงเหลือที่เชื้อไม่สามารถย่อยได้

ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีไอโอดีน (Iodine method) โดยการนำตัวอย่างที่ได้จากภาณเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำป่นหึ่งที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นจึงเทส่วนใสออก แล้วทำการอบแห้งส่วนตะกอนในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 55°C 24 ชั่วโมง และทำการชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบ นำตะกอนอบแห้งที่ได้ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เข้ากับสารละลายไอโอดีน (Iodine solution) 100 ไมโครลิตร ใน 96 ไมโครเพลท วัดค่า  $\lambda_{max}$  ที่ 580 นาโนเมตร โดยใช้แป้งละลาย (Soluble starch) เป็นสารเทียบมาตรฐาน (หากมีปริมาณของแป้งน้อยต้องเพิ่มความเข้มข้นของไอโอดีนตามความเหมาะสม)

#### 3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

##### (Total carbohydrate determination)

ทำการวิเคราะห์โดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (phenol-sulfuric method) ดัดแปลงตามวิธีของ Viel et al. (2018) ทำการย่อยตัวอย่างแป้ง (100 มิลลิกรัม) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ชนิดของแข็ง เพื่อทำการปรับ pH ให้เป็นกลาง (เติมจนกว่าสารละลายจะไม่เกิดฟองฟู: until effervescence ceases) ทำการกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ลงขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงหลอดทดลองแก้วขนาดยาว (16×150 มิลลิเมตร) เติมสารละลายฟินอลเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (96%) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ทำการวัดค่า  $\lambda_{max}$  ที่ 490 นาโนเมตร ด้วยคิวเวตชนิดแก้ว และคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%) ในตัวอย่างเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 0.00-0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch)

ดัดแปลงตามวิธีของ McCleary, Charmier, และ McKie (2019) ตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ถูกทำการกระจายตัวของอนุภาคด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 80% ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ด้วย vortex mixer ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที ทำการเติม

สารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และกวนให้เข้ากันด้วย magnetic bar บนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน

จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 1.2 โมลาร์ (pH 3.8) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex แล้วเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (3,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และอะไมโลกลูโคซิเดส (3,300 หน่วยต่อมิลลิลิตร) อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที (โดยเอาออกมา vortex ทุก ๆ 10 นาที) นำตัวอย่างไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใสไปปรับปริมาตรต่อในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ปิดเตตตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส-กลูโคส ออกซิเดส (Peroxidase-glucose oxidase: PGO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดค่า  $\lambda_{max}$  ที่ 440 นาโนเมตรคำนวณปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 0.02-0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคูณด้วยแฟกเตอร์ 0.9 ( $162/180 =$  เป็นการเปลี่ยน free D-glucose ให้เป็น anhydro D-glucose) เพื่อให้ได้เป็นปริมาณของแป้งทั้งหมด (%)

### 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics for Windows เวอร์ชัน 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)

### 3.6 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/ เก็บข้อมูล (Place of research and data collection)

1.) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีจุลินทรีย์เพื่ออุตสาหกรรมเกษตร อาคารศูนย์วิจัยมันสำปะหลัง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.) ห้องปฏิบัติการวิจัยอาหาร 2 ห้อง F03214A ชั้น 2 อาคารเครื่องมือ 3 (F3) ของสาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตามเลขทะเบียนห้องปฏิบัติการหมายเลข 2-0080-0046-0 ตามกองมาตรฐานงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

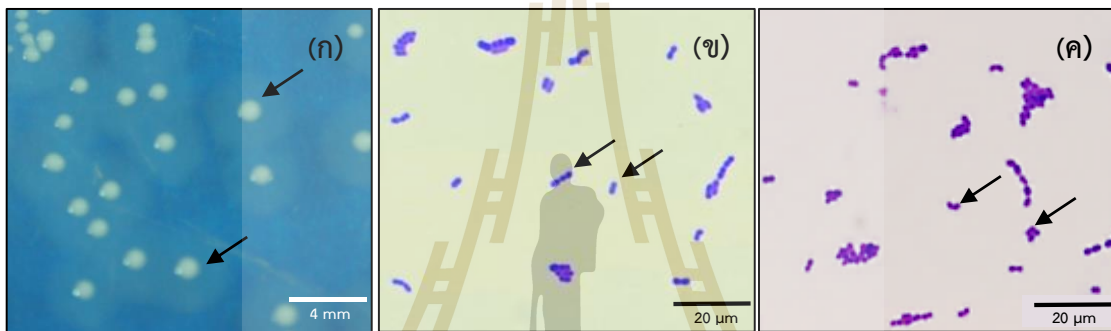


## บทที่ 4

### ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

#### 4.1 เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SUT 513 และการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RAM

เชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 นั้น เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในผลิตภัณฑ์แอล-แล็กติก และย่อยสลายแป้งสูง ได้ผ่านการศึกษาและคัดเลือก ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งสูตรเฉพาะที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ชื่อว่า starch agar medium หรืออาหาร MRS สูตรปรับปรุง (RAM) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในตู้ปัมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (°ซ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะพบโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ได้จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธีชิตลากแบบไขว้ (Cross streak plate) ขึ้นบนผิวหน้าของอาหารแข็ง ดังรูปที่ 4.1ก



รูปที่ 4.1 โคโลนี (ลูกศร) และเซลล์ (ลูกศร) ของเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513: โคโลนีอายุ 24 ชั่วโมงที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร RAM (ก) สัณฐานเซลล์ของแบคทีเรีย (ลูกศร) หลังจากผ่านการย้อมสีแบบแกรม (Gram staining) และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ข) และ 2,000 เท่า (ค) ที่ผ่านการขยาย

สัณฐานของโคโลนีเดี่ยวของ *Streptococcus* sp. SUT 513 มีลักษณะสีขาวขุ่น รูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.2 มิลลิเมตร (Circular form) มีความนูนของโคโลนีแบบยกนูนเล็กน้อย (Raised elevation) ผิวของโคโลนีเรียบ (Smooth surface) ขอบของโคโลนีเรียบ (Entire edge) ซึ่งเมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่ผิวหน้ามีความชื้นสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีจะขยายได้ถึง 2.0 มิลลิเมตร ขอบโคโลนีจะมีความเป็นรอยยักเล็กน้อย (Undulate edge) แต่จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบ (RAM) ของการศึกษาในครั้งนี้จะพบว่า โคโลนีปรากฏบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนี สืบเนื่องมาจากความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ เมื่อสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 ที่พบจากการชิตลากและแทงในหลอดที่บรรจุอาหารแข็งผิวเอียง (Slant medium) จะพบว่า เชื้อเจริญตามแนวการแทงและชิตลาก และพบว่าเชื้อชนิดนี้ไม่มีการเคลื่อนที่ (Non-motile) ที่การทดสอบในอาหารแบบกึ่งแข็ง สำหรับอาหาร

ชนิดเหลว หลังจากที่ใช้มีการเจริญจะพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความขุ่นและเกิดตกตะกอนที่มีลักษณะที่ค่อนข้างหนืดสีขาวขุ่นเกิดขึ้นที่ก้นหลอด นอกจากนี้ เมื่อทำการศึกษาเชื้อภายใต้กล้อง

จุลทรรศน์ (รูปที่ 4.1ข และ 4.1ค) พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ซึ่งดูจากการติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต มีลักษณะกลม (Cocci) มีขนาดเซลล์เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1 ไมโครเมตร การเรียงตัวโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปเป็นสายสั้น ๆ 2-4 เซลล์ แต่ก็พบว่ามี การเรียงตัวแบบสายยาว ไม่พบการสร้างสปอร์ (Non-endospore forming) และไม่มีแฟลกเจลลา (Non-flagellated)

#### 4.2 การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งจากแบคทีเรียผลิตภัณฑ์ Streptococcus sp. SUT 513

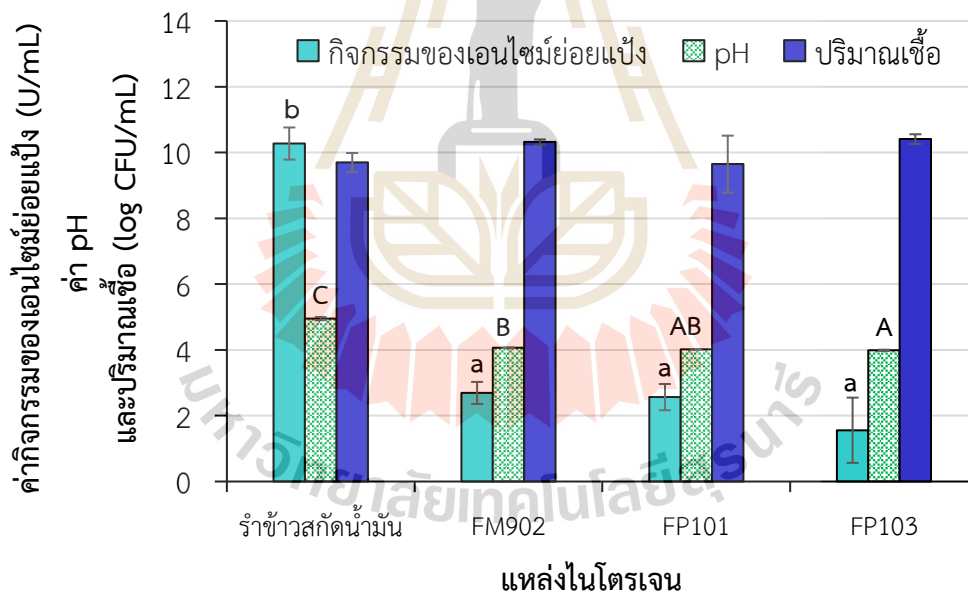
##### 4.2.1 ผลของการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

พบว่าที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนทุกชนิด (รำข้าวสาคัดน้ำมัน สารสกัดยีสต์ชนิด FM902 FP101 และ FP103) ที่ปรับให้มีความเข้มข้น 0.6% (w/v) เท่ากันนั้น หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณของเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 ในทุกแหล่งไนโตรเจนโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 9.65-10.32 log CFU/mL ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ที่ 3.99-4.06 (รูปที่ 4.2) ซึ่งสารสกัดยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจวัดในส่วนของน้ำหลังจากการเลี้ยงเชื้อ (เอนไซม์สกัดหยาบ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์แต่ละชนิดเป็นส่วนประกอบจะอยู่ที่ 1.56-2.96 U/ml ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) แต่ในขณะที่ตัวอย่างที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ รำข้าวสาคัดน้ำมัน ( $10.27 \pm 0.49$  U/ml) สาเหตุที่รำข้าวสาคัดน้ำมันนั้นให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคาดว่า รำข้าวมีส่วนของเนื้อเยื่อพืชหลายชั้น และส่วนของจมูกข้าว ซึ่งก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์แอลฟาหรือเบต้าอะไมเลส เพื่อย่อยแป้งที่ข้าวได้สะสมไว้ในเมล็ดขณะที่เมล็ดข้าวกำลังทำการงอก (Usansa et al., 2009) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีวิตามิน ไอออน หรือโปรตีน ยังหลงเหลืออยู่แม้จะผ่านกระบวนการสกัดน้ำมัน ก่อให้เกิดการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อได้ผลิตออกมา

โดยจากการรายงานงานของบริษัทผู้ผลิตยีสต์พบว่า สารสกัดยีสต์ชนิด FM902, FP101 และ FP103 มีค่าไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen: TN) อยู่ที่ 9, 10 และ 12.5% ตามลำดับ ซึ่งมีการดอสมิโนที่เด่นหลายชนิด ได้แก่ อะลานีน (Alanine) วาลีน (Valine) ไทโรซีน (Tyrosine) ทรีโอนีน (Threonine) ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) เมทไธโอนีน (Methionine) ลิวซีน (Leucine) ไอโซลิวซีน (Isoleucine) กลูตามีน (Glutamine) ซิสเทอีน (Cysteine) สำหรับทุกตัวอย่างมีการรายงานว่ามีแร่ธาตุอยู่เล็กน้อย และพบว่ามีวิตามินบีอยู่ด้วย และจากการสืบค้นพบว่า มีการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus amylophilus* GV6 ก็มีการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยมีการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทางเลือกที่มีผลต่อการส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง เพื่อให้เชื้อนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นในการผลิตเป็นกรดแอลแล็กติกในการหมักขั้นต้นตอนเดียว โดยมีการศึกษาในแป้งที่มีโปรตีนที่มาจาก ถั่วระ (pigeon pea) ถั่วเลนทิล (red lentil gram) ถั่วดำ (black gram) ถั่วลูกไก่

(Bengal gram) ถั่วเขียว (green gram) และถั่วเหลือง (soya bean) นอกจากนี้ยังมีการนำยีสต์เบเกอรี่ (baker's yeast) มาใช้ในการศึกษาด้วย (Altaf et al., 2007)

เนื่องจาก FP103 นั้นพบว่ามีความกิจกรรมของเอนไซม์หลังการเลี้ยงค่อนข้างไม่เสถียรเท่าที่ควร จึงได้ทำการเลือก FP101 มาใช้แทนรำข้าวสาคัดน้ำมัน เพื่อประโยชน์ต่อการศึกษาด้านการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ เนื่องจากพบว่าการใช้รำข้าวสาคัดน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้น มีส่วนกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง แต่หลังจากการเลี้ยงก็พบว่ามีความโปรตีนคงเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะลดน้อยลง และโปรตีนคงเหลือยังส่งผลกระทบต่อวิธีการทำบริสุทธิ์เพราะมีโปรตีนรำข้าวปะปน จึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้ในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์เพื่อการทำบริสุทธิ์ ถ้าหากจะใช้รำข้าวสาคัดน้ำมันก็อาจจะต้องมีการนำไปผ่านขั้นตอนขั้นต้นอย่างการไฮโดรไลซิส เพื่อย่อยโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สายสั้น ๆ นอกจากนี้ อีกปัญหาหนึ่งของรำข้าวสาคัดน้ำมันคือ ความผันแปรของปริมาณโปรตีนในรำข้าวสาคัดน้ำมัน และเพื่อความคุ้มค่าในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง เมื่อศึกษาสารสกัดยีสต์เพื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสม จึงจะเป็นสารอาหารทางเลือกที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งที่มีการโปรตีนปนเปื้อนน้อยเป็นต้น

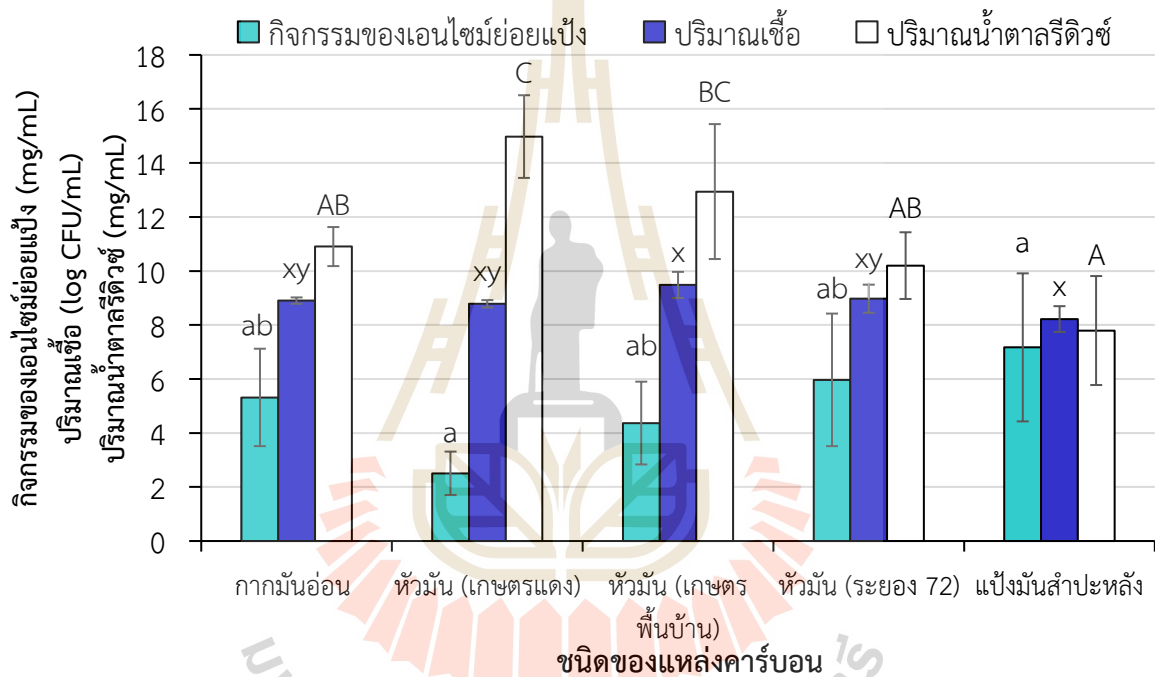


รูปที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวสาคัดน้ำมันและสารสกัดยีสต์ชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวลต่อปริมาตร

#### 4.2.2 ผลของการศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

โดยทำการแทนที่แป้งมันสำปะหลังด้วยตัวอย่างของกากมันอ่อน หัวมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เกษตรแดง เกษตรพื้นบ้าน และระยอง 72 ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างมาจากโรงงานเอี่ยมธงชัย ที่ปรับให้มีปริมาณแป้งอยู่ที่ 4.5% (w/v) โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของตัวอย่างหลังการเลี้ยงเชื้อแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่า การใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังให้ค่ากิจกรรมของ

เอนไซม์ย่อยแป้งสูงที่สุด ( $7.17 \pm 2.74$  U/ml) ตามด้วยกากมันอ่อน ( $5.32 \pm 1.80$  U/ml) หัวมันสำปะหลังสดสายพันธุ์ระยอง 72 ( $5.97 \pm 2.45$  U/ml) เกษตรพื้นบ้าน ( $4.37 \pm 1.53$  U/ml) และสายพันธุ์เกษตรแดง ( $2.51 \pm 0.81$  U/ml) ที่นับว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งต่ำที่สุด เมื่อสังเกตจากผลการเจริญของเชื้อ พบว่าแหล่งของคาร์บอนไม่มีผลต่อปริมาณของเชื้อมากนัก โดยอยู่ในช่วง  $8.22-9.48$  log CFU/ml ซึ่งจะเห็นว่าหัวมันสำปะหลังสายพันธุ์เกษตรพื้นบ้านจะตรวจพบปริมาณของเชื้อมากที่สุดอยู่ที่  $9.48 \pm 0.48$  log CFU/ml และเมื่อตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 24 ชั่วโมงได้เปิดเผยว่าหัวมันสายพันธุ์เกษตรพื้นบ้านและเกษตรแดงนั้นให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่  $12.94-14.98$  mg/ml รองลงมาคือกากมันอ่อนและหัวมันสำปะหลังสดสายพันธุ์ระยอง 72 อยู่ที่  $10.20-10.90$  mg/ml และแป้งมันสำปะหลังพบว่ามือน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุดอยู่ที่  $7.79 \pm 2.02$  mg/ml



**รูปที่ 4.3** กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งที่แสดงออกหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอนที่มาจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง หัวมันสด และกากมันสำปะหลังอ่อน (เมื่อกำหนด a, b และ c แทนการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง; A, B, และ C แทนการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; x และ y แทนการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ)

ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 นั้น มีความต้องการของแหล่งไนโตรเจนน้อย โดยสังเกตได้จากตัวอย่างของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเข้าไปในส่วนประกอบของอาหารเชื้อก็ยังสามารถที่จะเพิ่มจำนวนและผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งแล้วหลั่งออกมา และยังเป็นไปได้ที่เชื้อนั้นจะสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนจากกากมันอ่อนและหัวมันได้ จึงเกิดการเจริญที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฉพาะแป้งมันสำปะหลัง โดยในการทดลองครั้งนี้พบว่าในหัวมันสด หลังจากทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะมีความไม่เป็นเนื้อเดียวกันเนื่องจาก เปลือก

กาก และส่วนหัวมันที่มีไฟเบอร์ ทำให้ยังมีลักษณะการจับตัวเป็นก้อนแม้จะทำการปั่นให้ละเอียดแล้วก็ตาม ส่งผลให้แป้งมันสำปะหลังยังคงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ แต่ถ้าหากจะเลือกอีก 2 แหล่งก็ควรใช้กากมันอ่อน และหัวมันสำปะหลังสายพันธุ์ระยอง 72 และ/หรือสายพันธุ์เทียบเคียงระยอง

นอกจากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกเพื่อทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคสแล้ว ยังมีการรายงานการผลิตกรดแล็กติกโดยตรงจาก *Lactobacillus amylophilus* GV6 สามารถใช้วัตถุดิบประเภทที่มีปริมาณแป้งสูงที่มีการปะปนโปรตีน ได้แก่ แป้งข้าวสาลี (Wheat flour) แป้งข้าวฟ่าง (Sorghum flour) แป้งมันสำปะหลัง (Cassava flour) แป้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า (Rice flour) และแป้งข้าวบาร์เลย์ (Barley flour) ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งในตัวเชื้อ (Vishnu et al., 2002)

#### 4.2.3 ผลของการศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อแหล่งไนโตรเจน คัดเลือก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยหลักของ CCD บน 13 ชุดการทดลอง แสดงดัง ตารางที่ 4.1 เมื่อทุก ๆ สูตรอาหารมีการเติมไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) 0.6% เพื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งฟอสเฟตและเพิ่มความเป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 8.50 จะเห็นว่าตัวแปรที่ส่งเสริมการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ การเติมแป้งมันสำปะหลัง 4.5% (w/v) และสารสกัดยีสต์ชนิด FP101 ปริมาณ 0.13% (w/v) (สูตรที่ 8) ซึ่งต่อมาได้ปรับสูตรเป็นการใช้สารสกัดยีสต์ FP101 ที่ความเข้มข้น 0.1% (w/v) เพื่อความสะดวกในการเตรียมและลดราคาต้นทุนลง ไม่พบความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์ที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) โดยกำหนดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ส่วนประกอบหลักทั้ง 2 ชนิดนี้ว่า Developed RAM หรือ dRAM ซึ่งจะมีการปรับเปลี่ยนส่วนผสมไปตามความต้องการใช้งานตามวัตถุประสงค์อีกต่อไป เมื่อพิจารณาค่าต่าง ๆ ใน ตารางที่ 4.1 พบว่าเมื่อปริมาณแป้งเพิ่มมากขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็ส่งผลให้มีการพบปริมาณของแป้งคงเหลือในส่วนของเอนไซม์สกัดมากยิ่งขึ้น โดยพบว่าความเข้มข้นที่ไม่พบแป้งคงเหลือก็คือ เมื่อมีแป้งเริ่มต้นเข้มข้น 1% (w/v) โดยจะต้องมีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมด้วยซึ่งในที่นี้คือ 1.3% (w/v) สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ FP101 นั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับการผลิตกรด โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นก็จะพบว่าค่าของ pH จะมีการลดน้อยลงถึงแม้จะมีการใช้แป้งเริ่มต้นในปริมาณที่เท่าเทียมกัน ยกตัวอย่างเมื่อเทียบ สูตรที่ 1 (pH 6.50) กับ สูตรที่ 10 (pH 4.04) เป็นต้น และเมื่อให้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งเสริมให้เชื้อมีการผลิตกรดได้มากขึ้น เช่นในสูตรที่ 4 และ 6

นอกจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนแล้ว ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งที่เหมาะสม เช่น ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิขณะการเลี้ยง ความเร็วในการตีกวนอาหารเหลว ระดับกล้าเชื้อเริ่มต้น และยังมีการศึกษาในด้านของการเพิ่มเติมสารทั้งที่เป็นอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า *Bacillus subtilis* strain-MK1 มีการศึกษา 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้น Beef extract และปริมาณแร่ธาตุ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  หรือ  $K_2HPO_4$



ตารางที่ 4.1 แสดงผลสัดส่วนความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังและสารสกัดยีสต์ที่มีต่อการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง

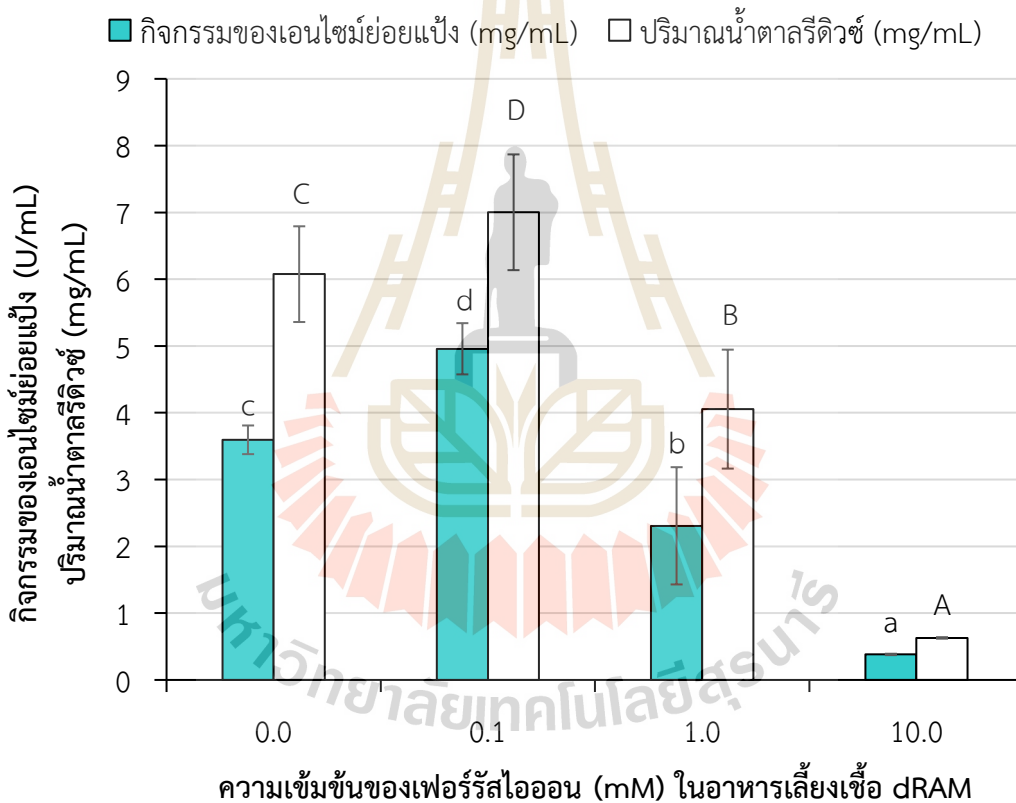
ชุดการทดลอง (แผน CCD)	แป้งมันสำปะหลัง (% w/v)	สารสกัดยีสต์ ชนิด FP101 (% w/v)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (% w/v)	ปริมาณแป้งคงเหลือ (% w/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ค่า pH	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml)
1	1.00	0.13	2.67±0.51	0.00±0.00	0.66±0.14	6.50	7.3
2	2.75	0.32	2.83±0.36	0.05±0.00	0.54±0.14	4.03	11.5
3	2.75	0.32	3.19±0.56	0.06±0.00	0.51±0.27	3.99	9.6
4	5.22	0.32	3.95±0.26	0.77±0.05	0.62±0.18	3.96	10.8
5	2.75	0.32	3.08±0.19	0.07±0.01	0.57±0.07	3.98	10.5
6	4.50	0.50	4.04±0.27	0.37±0.05	0.59±0.47	3.96	10.9
7	2.75	0.58	3.98±0.28	0.05±0.00	4.90±0.30	4.00	11.12
<b>8</b>	<b>4.50</b>	<b>0.13</b>	<b>8.10±2.82<sup>a</sup></b>	<b>0.17±0.04</b>	<b>21.64±1.74</b>	<b>5.36</b>	<b>10.0</b>
9	0.28	0.32	1.98±0.49	0.02±0.01	0.78±0.10	5.84	10.7
10	1.00	0.50	0.68±0.09	0.03±0.00	2.46±0.80	4.04	11.4
11	2.75	0.32	3.03±0.29	0.04±0.00	4.65±0.30	3.98	11.4
12	2.75	0.05	3.17±0.66	0.03±0.00	4.29±0.14	5.40	8.41
13	2.75	0.32	3.06±0.29	0.05±0.00	5.11±0.56	3.98	11.4



และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยมีการใช้วิธีการทดลองแบบหนึ่งปัจจัยต่อเวลา (One-factor-at-a-time) ผ่านการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ที่สามารถศึกษาได้มากกว่า 10 ปัจจัยในการทดลองเพียงรอบเดียว ทำให้ประหยัดเวลา แรงงาน และทรัพยากร (Ahmed et al., 2019)

#### 4.2.4 ผลของชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

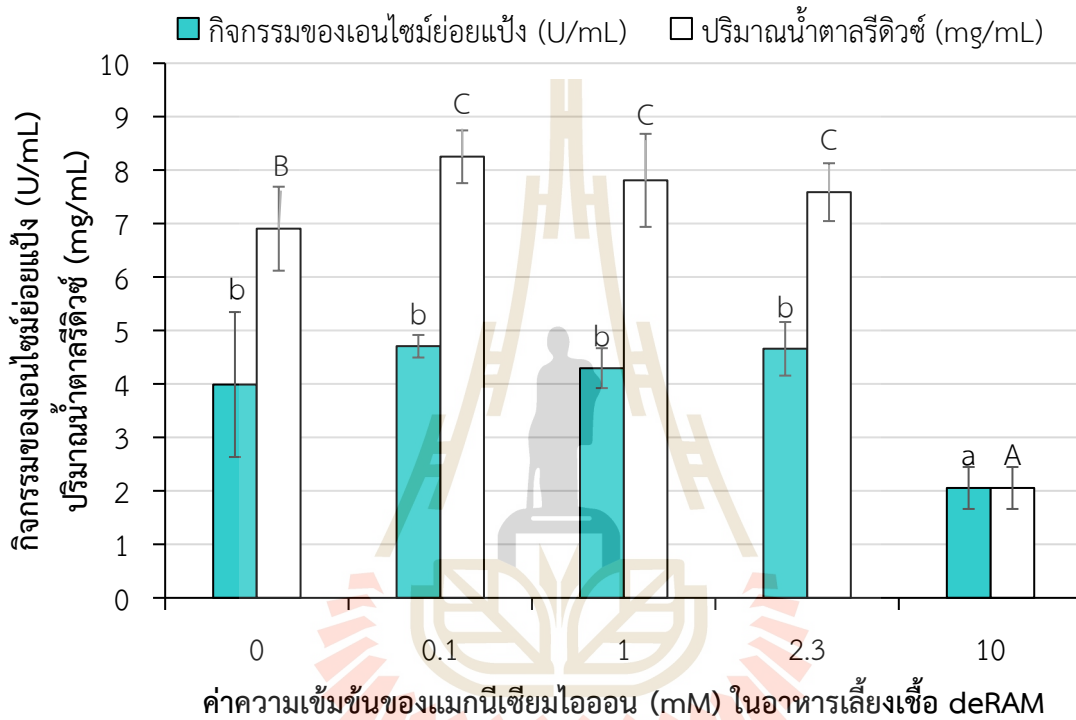
หลังจากเติม  $\text{FeSO}_4$  ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร dRAM อย่างละ 0, 0.1, 1.0 และ 10 mM พบว่าเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $\text{FeSO}_4$  ต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ 0.1 mM ซึ่งมีโอกาสผลิตอะไมเลสได้สูงที่สุดถึง  $4.96 \pm 0.83$  U/mL แต่ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.4) นับว่าความเข้มข้นที่สูงมากเกินไปจึงทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ก็ต่ำที่สุดเช่นเดียวกัน



**รูปที่ 4.4** กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งในเอนไซม์สกัดหยาบ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร dRAM ที่มี  $\text{FeSO}_4$  เข้มข้น 0, 0.1, 1.0 และ 10 mM 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 °ซ

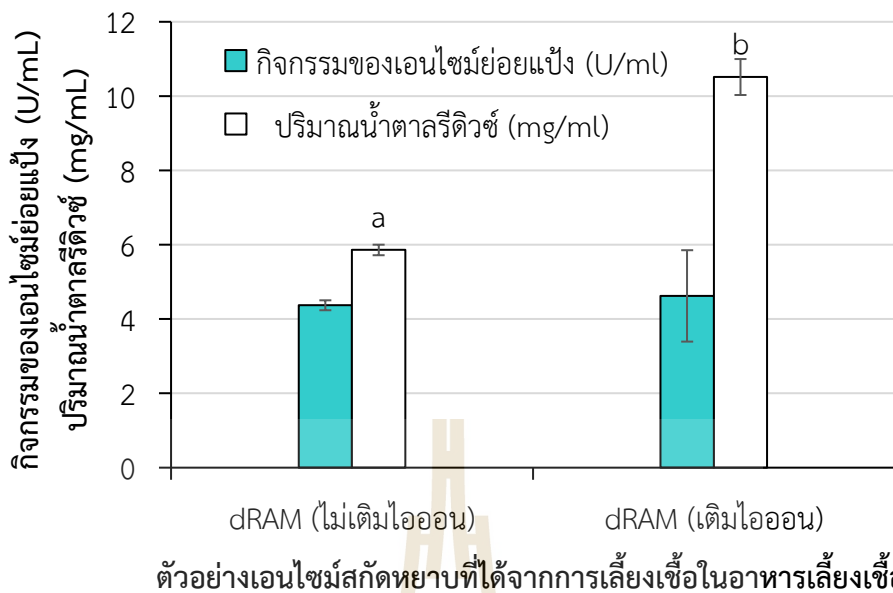
สำหรับการศึกษาไอออนแมกนีเซียมไอออนแสดงรูปที่ 4.5 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร dRAM ที่มี  $\text{MgSO}_4$  ความเข้มข้น 0, 0.1, 1.0, 2.3 และ 10 mM เป็นส่วนประกอบ นั้นจะมีโอกาสผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งอยู่ในช่วง 3.99-4.70 U/mL ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งนับว่าเป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่แสดงถึงกิจกรรมการย่อยแป้งที่เกิดขึ้นระหว่างการ

เลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติม  $MgSO_4$  จะได้ค่าสูงสุดอยู่ที่ 7 mg/mL แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าจะเป็นความเข้มข้นที่สูงมากเกินไปจึงทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด อยู่ที่  $2.06 \pm 0.39$  U/mL และปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 0.63 mg/mL เพื่อดูผลการออกฤทธิ์ร่วมของแร่ธาตุทั้งสอง  $FeSO_4$  และ  $MgSO_4$  ต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จึงได้เลือกสัดส่วนจากความเข้มข้นที่เหมาะสม 1 สัดส่วนมาศึกษา ได้แก่  $FeSO_4$  และ  $MgSO_4$  อย่างละ 0.1 มิลลิโมลาร์ หลังการเลี้ยงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์นั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นนั้นสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.5 กิจกรรมของอะไมเลสที่พบในเอนไซม์สกัดหยาบ ที่มาจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร dRAM ที่มี  $MgSO_4$  เข้มข้น 0, 0.1, 1.0, 2.3 และ 10 mM หลังเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 °ซ

จากการทดลองนี้เป็นไปได้ว่า  $FeSO_4$  และ  $MgSO_4$  จะส่งผล 2 อย่างที่แตกต่างกันต่อเชื้อและเอนไซม์ย่อยแป้ง โดยแร่ธาตุทั้งสองนั้นอาจจะไปกระตุ้นให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ที่มากขึ้น หรืออาจจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ระหว่างการเลี้ยงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการเลี้ยงนั้นมีปริมาณที่มากขึ้น โดยในเชื้อ *Bacillus subtilis* strain-MK1 ก็พบว่า  $Mg^{2+}$  นั้นก็ส่งกระตุ้นในการทำงานและการผลิตของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Ahmed et al., 2019)



**รูปที่ 4.6** ปริมาณน้ำตาลลิกติก และกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบ หลังการเลี้ยงเชื้อใน dRAM ที่ไม่เติมแร่ธาตุกับสูตรที่เติม  $\text{FeSO}_4$  และ  $\text{MgSO}_4$  อย่างละ 0.1 mM

#### 4.2.5 ราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

จากอาหารเลี้ยงเชื้อแล็กติกสูตรมาตรฐาน (MRS) ได้มีการปรับปรุงให้มีราคาถูกลง แต่ยังคงมีคุณสมบัติที่จะส่งเสริมการเจริญของเชื้อผลิตกรดแล็กติกเรียกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรปรับปรุง (RAM) (ตารางที่ 4.2) เพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งที่เหมาะสมและลดราคาต้นทุนในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปอีกระดับหนึ่ง จึงทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ RAM สูตรปรับปรุงที่เติมแร่ธาตุ (deRAM) ที่มีราคารวมต่อลิตรเท่ากับ 9.23 บาท เมื่อทำการเปรียบเทียบราคาของอาหารสูตร dRAM กับอาหารเลี้ยงเชื้อแล็กติกสูตร MRS ที่มีราคา 108.46 บาท/ลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร RAM ที่มีราคา 81.07 บาท/ลิตร จะพบว่าถูกลงถึง 11.7 และ 8.8 เท่า ตามลำดับ

#### 4.2.6 ผลของการหาปริมาณเซลล์กล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

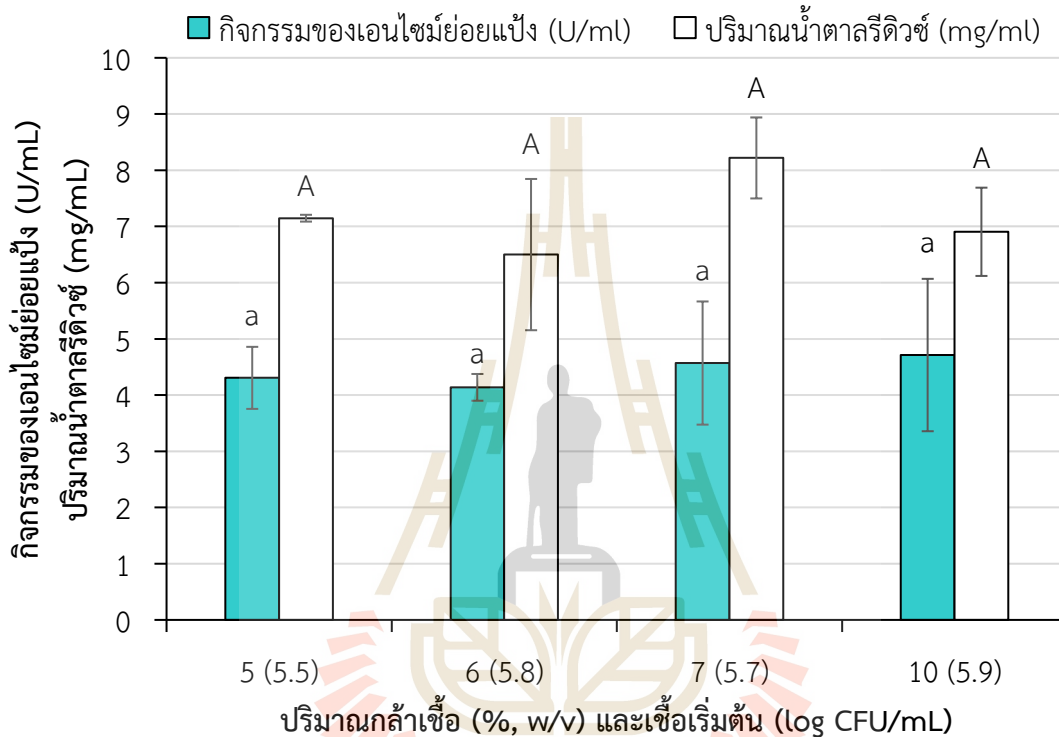
พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม 5-7% (v/v) (รูปที่ 4.7) เนื่องจากการมีเชื้อเริ่มต้น 5.5-5.9 log CFU/mL ด้วยปริมาตรที่ใช้ 5-10% (v/v) หลังจากที่ได้เลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งแล้วนั้นไม่มีความแตกต่างกัน ประโยชน์จากการศึกษาครั้งนี้คือการลดต้นทุนในส่วนการผลิตกล้าเชื้อสำหรับการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องในภาชนะที่มีความจุมากขึ้น เช่น การขยายกำลังผลิตจากขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ไปยังถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5, 10, 180 หรือ 1000 ลิตร ที่ 1% (v/v) ก็นับว่าเป็นปริมาณที่มาก หากไม่มีการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมมาก่อนอาจจะทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่เป็นไปตามคาด หรือหากใช้มากเกินไปก็จะเป็นการสิ้นเปลืองทรัพยากรเกินกว่าที่ควร และอาจส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารนั้น ๆ เนื่องจากมีเชื้อเริ่มต้นที่สูงอยู่แล้ว

จากการสืบค้นพบว่า ในเชื้อ *Bacillus* sp. R2 ได้มีการใช้กล้าเชื้อปริมาณ 4% (v/v) เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 mL เขย่า 150 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ pH 6 และอุณหภูมิ 40 °C โดยมี น้ำตาลกลูโคสและโซเดียมไนเตรท เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนรอง (Choubane et al., 2015)

ตารางที่ 4.2 เทียบส่วนประกอบและราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร

สูตรอาหาร	อาหารเลี้ยงเชื้อแอลีกติก					
	สูตรมาตรฐาน (MRS)		สูตรปรับปรุง MRS (RAM)		สูตรปรับปรุง RAM (deRAM)	
	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	ราคา (บาท/ลิตร)	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	ราคา (บาท/ลิตร)	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	ราคา (บาท/ลิตร)
<b>ส่วนประกอบ</b>						
Beef extract	10.00	34.00	-	-	-	-
Meat peptone	10.00	25.00	-	-	-	-
Yeast extract	5.00	12.90	3.00	7.74	-	-
Tryptone	-	-	5.00	19.50	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.00	2.45	6.00	7.34	6.00	7.34
Sodium citrate	2.00	11.60	-	-	-	-
Sodium acetate	5.00	5.10	-	-	-	-
tri-Ammonium citrate	-	-	1.00	45.50	-	-
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	0.14	0.57	0.75	0.57	0.75
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.05	0.07	0.12	0.07	-	-
FeSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	-	-	0.03	0.05	0.03	0.05
Tween 80	1.00	1.60	-	-	-	-
Glucose	20.00	15.60	-	-	-	-
Cassava starch	-	-	10.00	0.14	45.00	0.63
Yeast extract FP101	-	-	-	-	1.00	1.19
<b>ราคารวม</b>	-	<b>108.46</b>	-	<b>81.07</b>	-	<b>9.23</b>

โดยพบว่าสามารถเตรียมกล้าเชื้อสำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์ ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5.3-6.2 log CFU/mL โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ในสภาวะไร้ออกซิเจน 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จะได้เชื้ออยู่ที่ ช่วง 8-9 log CFU/mL จากนั้นจึงปรับให้ความเข้มข้นของเชื้อ อยู่ในระดับ 0.5 McFarland scale จุดนี้จะมีเชื้ออยู่ที่ปริมาณ 6-7 log CFU/mL จากนั้นเจือจางลงอีก 10 เท่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร deRAM หรือ สารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85% (w/v) จะทำให้ได้กล้าเชื้อที่อยู่ในช่วงประมาณ 5-6 log CFU/mL



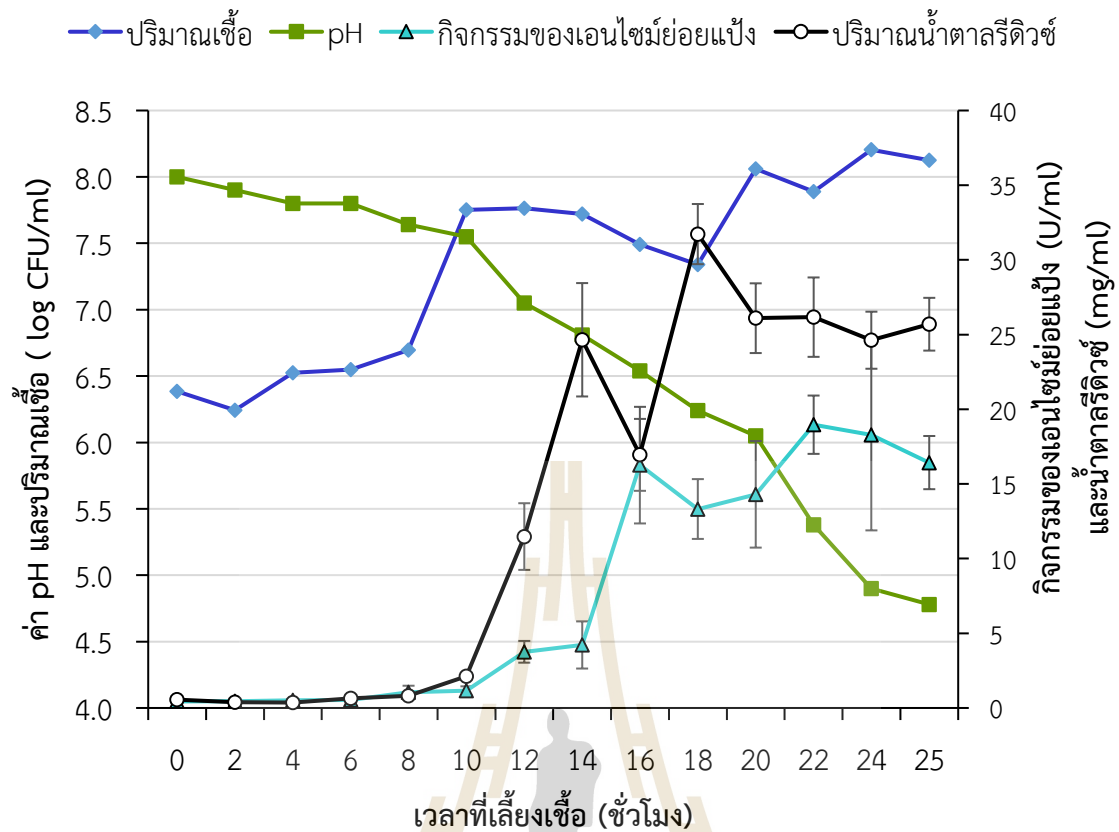
รูปที่ 4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งที่พบในเอนไซม์สกัดหยาบ ที่มาจากการใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ 6 log CFU/mL หลังเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 °ซ

#### 4.2.7 ผลของการการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เป็นทดลองเลี้ยงเชื้อในระดับสเกลที่ใหญ่ขึ้นจากในขวดรูปพู่ขนาด 125 หรือ 250 มิลลิลิตร เป็นการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตร 3 ลิตร ที่มีการตีความความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่าการใช้ กล้าเชื้อที่มีเซลล์เข้มข้น 6 log CFU/mL ปริมาตร 5 % (v/v) ใช้สูตรอาหาร deRAM ใน 1 ลิตรจะประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 45 กรัม สารสกัดยีสต์ FP101 1 กรัม  $K_2HPO_4$  6 กรัม  $FeSO_4$  (0.03 กรัม) และ  $MgSO_4$  (0.025 กรัม) ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยมี pH เริ่มต้น 8.50 (หลังอัตโนมัติเคลฟจะได้ pH 7.9-8.0)

เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ เริ่มต้นจากที่เวลา 0 ชั่วโมงพบว่า มี 0.444 U/mL จากนั้นจึงพบการเพิ่มขึ้นแบบเอ็กโพเนนเชียลของกิจกรรมของเอนไซม์ จาก 1.164 U/mL ในชั่วโมงที่ 10 กลายเป็น 16.28 ถึง 18.97 U/mL ในชั่วโมงที่ 16- 22 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) ซึ่งนับว่าเป็นช่วงที่ตรวจวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด โดยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของเชื้อจะพบว่า 16-22 ชั่วโมงนั้น จะอยู่ในช่วงของการเจริญในช่วงท้ายจนถึงช่วงที่เชื้อเข้าสู่สภาวะนิ่ง โดยค่า pH ลดต่ำอย่างรวดเร็วจาก 6.5 เป็น 5.4 ที่ 16-22 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าการเอนไซม์ย่อยแป้งของเชื้อแบบในแต่ละรอบนั้นอาจมีความแตกต่างกัน จากประสบการณ์ที่ตรวจวัดได้คือ เริ่มสร้างในปริมาณน้อยในช่วงเวลา 8-10 ชั่วโมง และจึงเริ่มผลิตเอนไซม์ด้วยอัตราที่สูงขึ้น ที่ช่วงเวลา 12-16 ชั่วโมง เมื่อติดตามปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า เมื่อถึงจุดหนึ่งเชื้อจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรดแล็กติกมากกว่าการผลิต อีกข้อสังเกตหนึ่งคือความหนืดที่ลดลงนั้นก็ชี้ให้เห็นการเกิดกิจกรรมการย่อยแป้ง ซึ่งการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งที่มีรูปแบบเวลาลักษณะนี้ก็มีการพบและได้รายงานของ Giraud et al., (1991) ว่า เชื้อ *Lactobacillus plantarum* A6 นั้นมีการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งโดยที่แม้จะอยู่ในช่วงที่เป็นช่วงนิ่งของการเจริญ (stationary phase) แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์และการย่อยแป้งนั้นไม่ได้ถูกจำกัดโดยการเจริญของเชื้อชนิดนี้เพียงอย่างเดียว โดยการเลี้ยงในระดับนี้จะทำเพื่อพัฒนากรรมวิธีการผลิตเอนไซม์หากต้องการใช้ประโยชน์ในปริมาณมากในครั้งเดียวเช่น เพื่อการนำไปใช้ย่อยหัวมันสำปะหลัง การผลิตแป้งต้านทาน การผลิตกรดแล็กติก และการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ เป็นต้น



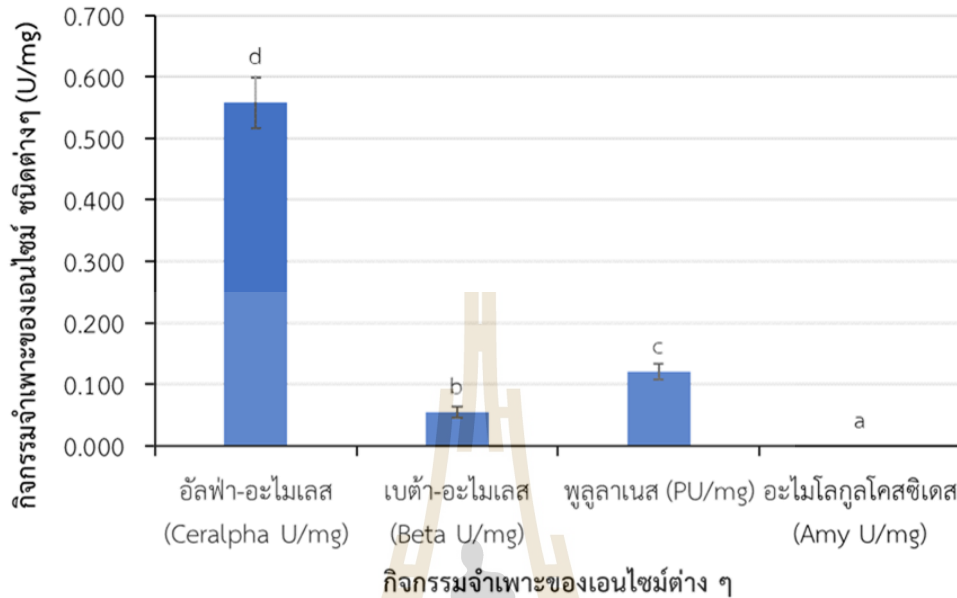


รูปที่ 4.8 แผนภูมิแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ค่า pH และปริมาณเชื้อ ที่เกิดระหว่างการเลี้ยงเชื้อในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาดถังหมัก 5 ลิตร ด้วยปริมาตร 3 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตีความที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

#### 4.3 การจัดจำแนกกิจกรรมย่อยแป้ง (Amylolytic activity) ในส่วนของเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตโดยเชื้อ *Streptococcus sp.* SUT 513

จากการใช้ชุดทดสอบทางการค้าทั้ง 4 ชนิด พบว่าเอนไซม์สกัดหยาบนั้นมีการทำปฏิกิริยาย่อยสารตั้งต้นในชุดทดสอบแอลฟา-อะไมเลส เบต้า-อะไมเลส และพุลูลานเนส (รูปที่ 4.9) เมื่อพิจารณาที่ฐานความเข้มข้นของโปรตีนจะได้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ จะได้ผลว่าเอนไซม์สกัดหยาบแสดงค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสอยู่ที่  $0.558 \pm 0.041$  Ceralpha U/mg เบต้า-อะไมเลสอยู่ที่  $0.054 \pm 0.009$  Beta U/mg และพุลูลานเนสอยู่ที่  $0.120 \pm 0.012$  PU/mg ซึ่งก็ได้มีการพบการผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้จากแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก เช่น *Lactococcus lactis* IBB500 นั้นมีการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Wasko et al., 2010) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84 นั้นก็มีรายงานว่าพบการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และอะไมโลพุลูลานเนส (Petrov et al., 2008) โดยพบว่าเชื้อผลิตกรดแล็กติกบางสายพันธุ์สามารถผลิตกรดแล็กติกได้จากแป้งโดยตรงในการเลี้ยงขั้นตอนเดียว จากที่มีการรายงานไว้ เช่น เชื้อ *Lactobacillus plantarum* A6 นั้นมีการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ (Giraud et al., 1991), *Lactobacillus amylovorus* (Zhang and Cheyran,

1991), และ *Streptococcus bovis* (Narita et al., 2004) ที่สามารถใช้แบ่งละลายน้ำและแบ่งดิบเป็นวัตถุดิบได้ โดยในส่วนของพุลูลานสนั้นพบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* IBB 500 ในส่วนของเอนไซม์สกัดหยาบนั้นมีการผลิตเอนไซม์พุลูลานเนสชนิดที่ 1 (Wasko et al., 2011)



รูปที่ 4.9 แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทดสอบชุดทดสอบทางการค้าที่ทดสอบในตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบ

#### 4.4 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ย่อยแป้ง

##### 4.4.1 การทดลองตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบมาจากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 ในอาหารเหลวสูตร deRAM หลังจากผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นตัว 80-100% มีการนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์แบบหยาบ (โดยใช้แบ่งละลายน้ำเป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ) และปริมาณโปรตีนเพื่อหาค่ากิจกรรมจำเพาะโดยแสดงผลในตารางที่ 4.3 โดยเมื่อพิจารณาผลการทดลองจากในตารางพบว่า ในตัวอย่างการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80% ความเข้มข้นตัวหลังทำการไดอะไลซิสแล้ว นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งพบว่า มีปริมาณของค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ที่  $18.79 \pm 7.17$  ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน มีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น 3.14 เมื่อได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วจึงได้เลือกทำการตกตะกอนที่แอมโมเนียมซัลเฟต 80% ความเข้มข้นตัว จึงนำไปศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ในขั้นต่อไป โดยทำการศึกษาคคุณลักษณะของเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้และเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้ในขั้นต่อไป

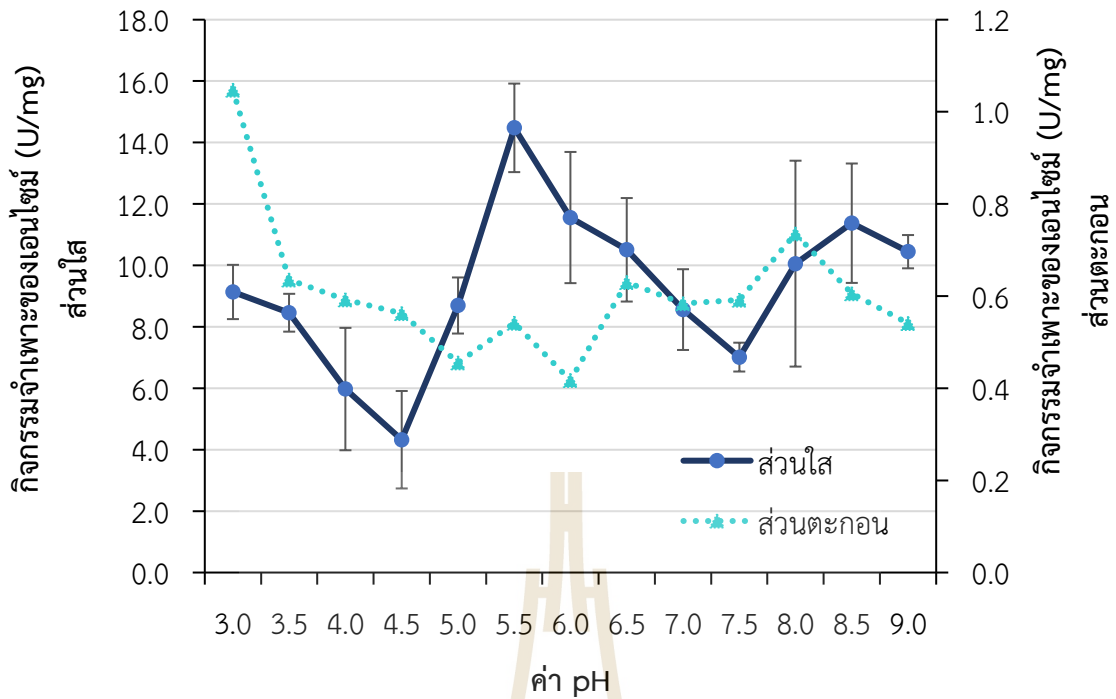
ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต

ขั้นตอน	ปริมาตร (mL)	กิจกรรมของเอนไซม์โดยรวม (U)	ปริมาณของโปรตีน (mg)	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/mg)	ค่าความบริสุทธิ์ (เท่า)	Yield (%)
Crude enzyme and Dialysis	100	24.00±9.00	4.00±0.00	5.99±2.19	1.00	100.0
80% Saturated (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8	20.40±7.84	1.12±0.00	18.79±7.17	3.14	85.0
80-100% Saturated (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.5	1.08±0.05	0.27±0.05	3.81±0.63	0.64	4.5

#### 4.5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตและเก็บเกี่ยวได้

##### 4.5.1 ผลของ pH ที่มีต่อเสถียรภาพและการทำงานของเอนไซม์สกัดหยาบ

หลังจากที่บ่มในสภาวะ pH ต่าง ๆ ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าหลังปั่นเหวี่ยงเกิดการตกตะกอน ซึ่งจะพบแนวโน้มว่าในส่วนตะกอนจะมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าส่วนใส แสดงให้เห็นว่าเมื่อ pH เปลี่ยนแปลงไปก็จะเกิดการตกตะกอนของเอนไซม์ลงมาปริมาณเล็กน้อย เมื่อพิจารณา **รูปที่ 4.10** พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งในส่วนใสนั้นมีมากกว่าในส่วนตะกอน ประมาณ 10-14 เท่า โดยการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าที่ส่วนของตะกอน ค่า pH ช่วง 3.0 พบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 1.04 U/ml นอกจากนั้นในช่วง pH 3.5-9.0 พบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนตะกอนเพียงเล็กน้อย โดยพบว่าเมื่อ บ่มเอนไซม์ไว้ที่ pH 5.5 จะพบว่าในส่วนน้ำมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด โดยถ้าสูงหรือต่ำกว่านั้นค่าก็จะลดลง นั้นแสดงให้เห็นถึงความเสถียรของเอนไซม์ที่มี อยู่ มีการรายงาน เอนไซม์พุลูลานเนสชนิดที่ 1 ที่สร้างโดย *Bacillus pseudofirmus* 703 นั้นผลิต ที่สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 7.0-8.0 และยังสามารถรักษาเสถียรภาพได้กว่า 80% หลังจากเอนไซม์นั้นถูกบ่มที่ pH 5.5-9.5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Lu et al., 2018)

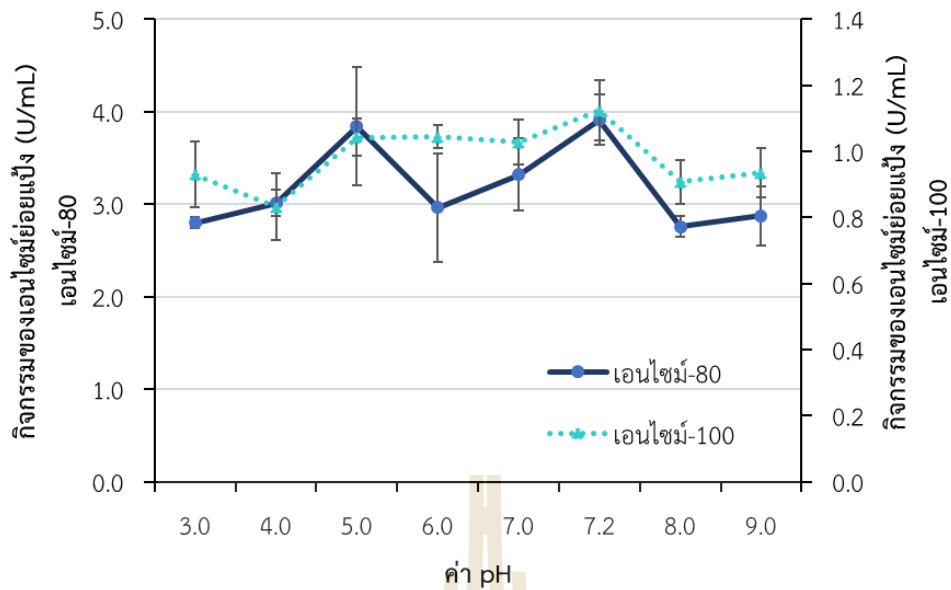


รูปที่ 4.10 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของเอนไซม์สกัดหายาบที่ผ่านการบ่มภายใต้สภาวะ pH ต่าง ๆ

#### 4.5.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้ขั้นต้น ที่ได้มาจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80% และตกตะกอนต่อเนื่องที่ ความเข้มข้น 80-100%

##### ก. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่สภาวะความเป็นกรด-ต่าง ต่าง ๆ

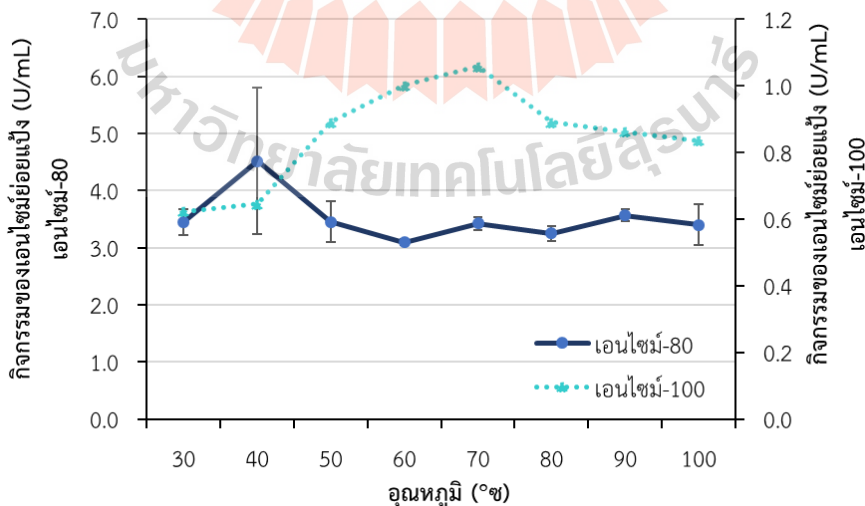
หลังจากที่ผ่านการตกตะกอนเกลือ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80% ความเข้มข้น ที่ผ่านการทำไดอะไลซิสแล้ว จะถูกเรียกว่า “เอนไซม์-80” และในส่วนตะกอนที่ได้จาก 80-100% ความเข้มข้น และผ่านการไดอะไลซิส จะเรียกว่า “เอนไซม์-100” หลังการไดอะไลซิส และทำปฏิกิริยากับน้ำแป้งละลายน้ำที่สภาวะความเป็นกรด-ต่าง pH 3.0-9.0 เมื่อเทียบกับตัวควบคุม ที่ค่า pH เท่ากับ 7.0 (100%) พบว่า เอนไซม์-80 มีค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ อยู่ที่ pH 5.0 (115%) และ 7.2 (117%) (รูปที่ 4.11) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับจุดที่เหมาะสมของ พูลูลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus acidopullulyticus* และเชื้อ *Bacillus methanolicus* PB1 ที่มีการรายงานว่าทำงานได้ดีช่วง 5.0-5.5 (Chen et al., 2015; Zhang et al., 2020) เบต้า-อะไมเลสที่มีการรายงานว่าอยู่ในช่วง pH 4.6-5.0 (Sivaramakrishnan et al, 2006) และแอลฟา-อะไมเลสที่ อยู่ในช่วง pH 6.7-7.0 (Sundarram and Murthy, 2014) โดยส่วนของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80-100% นั้นมีการทำงานได้สูงที่สุดในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5 ถึง 7.2 จะมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์อยู่ที่ 100 ถึง 109.32%



รูปที่ 4.11 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80 และ 80-100% ความอืดัว และไดอะไลซิสทดสอบการทำงานของเอนไซม์ที่ pH 3.0-9.0 ที่ 35°ซ

#### ข. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

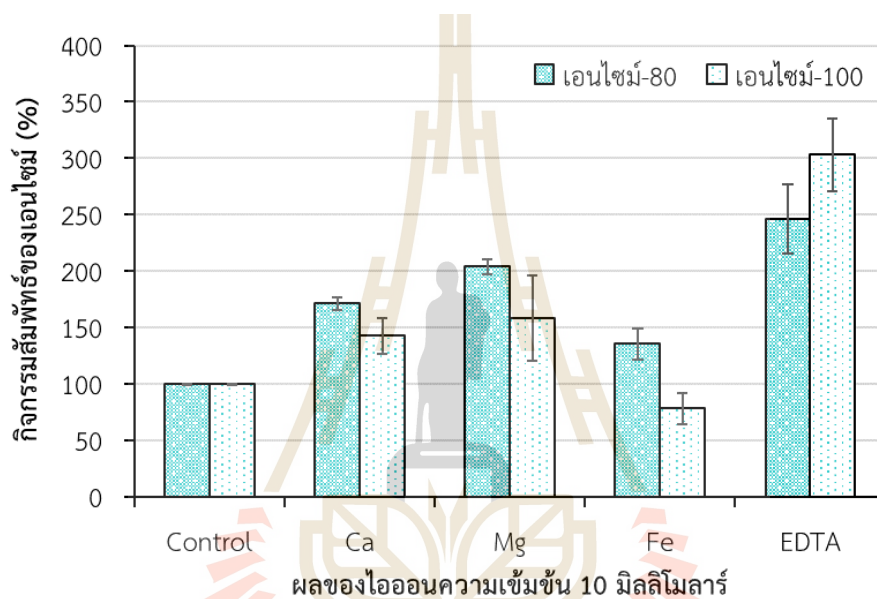
พบว่าในส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80% ความอืดัว นั้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นที่ อุณหภูมิ 40°ซ ที่ 130% เมื่อเทียบกับจุด 30°ซ ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80-100% ความอืดัว นั้นสูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส ที่ 169% เมื่อเทียบกับจุด 30°ซ ซึ่งคล้ายกับจุดสูงสุดของแอลฟา-อะไมเลสที่มาจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ที่อยู่ที่ ประมาณ 65 °ซ (Syu and Chen, 1997) รูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80 และ 80-100% ความอืดัว หลังไดอะไลซิส เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 30-100°ซ เป็นเวลา 30 นาที ที่ pH 7.20

### ค. การศึกษาผลของไอออนโลหะและสารคีเลต และความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

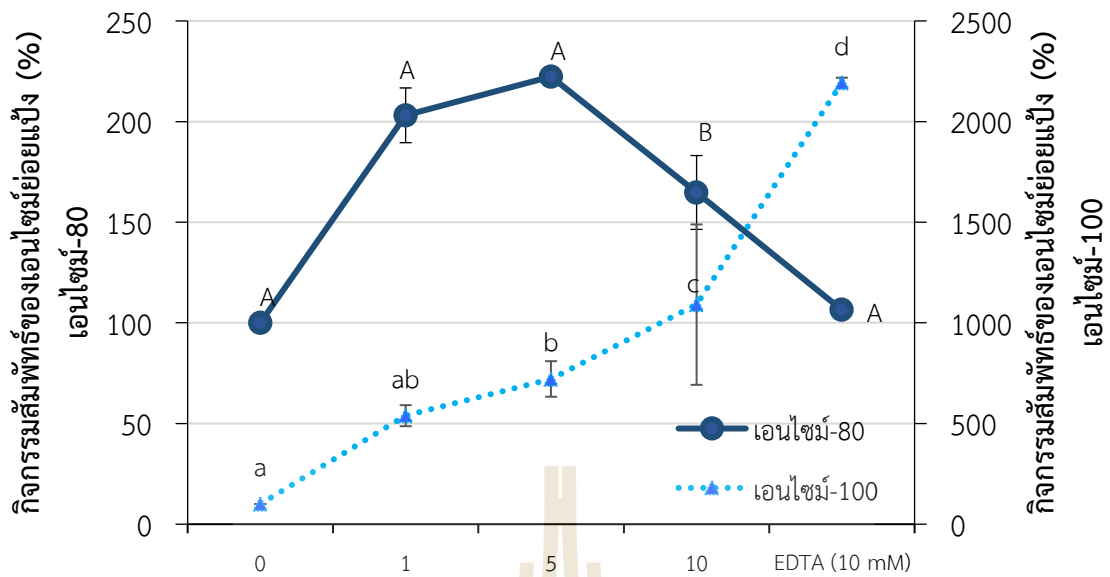
ในตัวอย่างเอนไซม์-80 และเอนไซม์-100 นั้นมีลักษณะรูปแบบของการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในสารตั้งต้นที่เติมไอออนและสารคีเลตตั้งที่ความเข้มข้น 10 mM คล้ายคลึงกัน พบว่า  $Mg^{2+}$  นั้นมีความสามารถกระตุ้น กิจกรรมของเอนไซม์สัมพันธ์เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมไอออน อยู่ที่ 204% และ 191% นอกจากนี้พบว่า EDTA นั้นยังมีความสามารถในการกระตุ้นที่ 246% และ 267% (รูปที่ 4.13) โดยในตัวอย่างไอออนที่มีแนวโน้มแสดงผลยับยั้งในตัวอย่างเอนไซม์-100 คือ  $Fe^{2+}$  ที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์นั้นลดลงเหลือการทำงาน 78%



**รูปที่ 4.13** ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 80% และไดอะไลซิส ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 80-100% หลังไดอะไลซิสและทำการบ่มทำปฏิกิริยาในสารละลายแบ่งที่มีไอออนหรือสารคีเลตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลองของค่ากิจกรรมของตัวอย่างเอนไซม์-80 พบว่า จากตัวควบคุมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะอยู่ที่  $18.794 \pm 7.169$  U/mg ไอออนหรือสารคีเลตที่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และ EDTA โดยในส่วนเมื่อทำการทดสอบเพิ่มเติม ที่ความเข้มข้น 1 mM แคลเซียม (174%) จะมีการกระตุ้นการทำงานมากกว่า EDTA (92%) (รูปที่ 4.14) จากผลการทดลองของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัวร้อยละ 80-100 และผ่านการทำไดอะไลซิสพบว่า ไอออนหรือสารคีเลต ที่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในทุกการทดลอง ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และ EDTA โดยจากที่ EDTA ให้ผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ประมาณ 20 เท่า ซึ่งมากกว่า แคลเซียมไอออน ที่กระตุ้น 10 เท่า ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ที่ความเข้มข้น 10 mM (รูปที่ 4.14)





ส่วนของเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนเกลือ 80-100% ในตัวอย่างที่มีแคลเซียมไอออน ความเข้มข้นต่าง ๆ (mM)

**รูปที่ 4.14** ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 80 และ 80-100% ความอิมัตว และไดอะไลซิส ที่เกิดขึ้นในสารละลายแบ่งที่มีแคลเซียมไอออนความเข้มข้นต่างกัน

จากผลของ EDTA เอนไซม์ที่เราพบนี้อาจจะมีโอกาสทำงานได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน 2 บวก และมีสิทธิ์เป็นไปได้ที่ EDTA นั้นจะไปคีเลตกับ สารประจุบวกที่อาจจะแสดงผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้ การทำงานของเอนไซม์สูงมากขึ้นจากการสืบค้นพบว่า *Bacillus pseudofirmus* 703 มีการผลิตเอนไซม์พอลิกลูตามินชนิด I โดยมีการทำงานของเอนไซม์ที่ดี ณ 45 °ซ และยังคงมีการทำงานอยู่ที่ 25-35 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และที่ pH 7.0-8.0 นั้นเหมาะสมกับการทำกิจกรรมของเอนไซม์ และเอนไซม์ พอลิกลูตามินจากเชื้อชนิดนี้ ยังคงสามารถทำงานได้ แม้อยู่ใน pH ช่วง 5.5-9.5 โดยมีความต้านทานการคีเลตไอออนของ EDTA และทนสารลดแรงตึงผิวได้ (Lu et al., 2018) *Thermococcus kodakarensis* KOD1 เมื่อใช้ความเข้มข้นของไอออนและสารคีเลตตั้ง 5 mM พบว่าการแสดงออกแบบยับยั้งของพอลิกลูตามินใน EDTA (78.03%)  $Fe^{2+}$  (45.28%) การแสดงผลที่กระตุ้นการทำงาน คือ  $Ca^{2+}$  (123.78%) และ  $Mg^{2+}$  (102.03%) (Han et al., 2013)

ในการทดลองครั้งหนึ่งพบว่า EDTA มีผลลดการทำงานของเอนไซม์ลง ร้อยละ 20 ถึง 30 ซึ่งอาจจะมาจากการที่ตกตะกอนแล้วได้โปรตีนชนิดที่แตกต่างกันจาก 2 รอบก่อนหน้า ต้องมีการทดลองซ้ำและทำบริสุทธิ์ แล้วยังพบอีกว่า การใช้บัฟเฟอร์ 1XPBS นั้นจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีกว่าการใช้บัฟเฟอร์ malate โดยคุณลักษณะของเอนไซม์อาจจะมีการแสดงออกที่ชัดเจนยิ่งขึ้น หากผ่านการทำบริสุทธิ์ขั้นตอนถัดไปจากนี้

#### 4.4.2 ผลการทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ

หลังจากทำบริสุทธิ์เอนไซม์ขั้นต้นด้วยการตกตะกอนโปรตีน และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบด้วยคอลัมน์ DEAE Sepharose *Fast Flow* เมื่อดูผลการทดลองจาก ตารางที่ 4.4 จะพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในเกือบทุกส่วนของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ยกเว้น ตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้มาจากการทำบริสุทธิ์ในส่วนที่เกาะกับเรซิน (Bound purified protein) ซึ่งในตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากการทำโดยอะพิเทรชันในส่วนที่ไม่ผ่านเมมเบรนขนาด 3 กิโลดาลตัน พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด อยู่ที่  $5.41 \pm 0.32$  ceralpha unit/mg และมีค่าความบริสุทธิ์อยู่ที่ 9.84 เท่า สำหรับตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้มาจากการทำบริสุทธิ์ในส่วนที่ไม่เกาะเรซิน (Unbound purified enzyme) มีค่าความบริสุทธิ์อยู่ที่ 2.08 เท่า และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส อยู่ที่  $1.16 \pm 0.11$  ceralpha unit/mg

เมื่อพิจารณาผลการทำบริสุทธิ์จาก ตารางที่ 4.5 จะพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์พุลูลาเนสในทุกส่วนของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ซึ่งในตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากการทำโดยอะพิเทรชันในส่วนที่ไม่ผ่านเมมเบรนขนาด 3 กิโลดาลตัน พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์พุลูลาเนสสูงสุดที่  $1.10 \pm 0.18$  PU/mg และมีค่าความบริสุทธิ์อยู่ที่ 1.98 เท่า สำหรับตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้มาจากการทำบริสุทธิ์ในส่วนที่ไม่เกาะเรซิน (Unbound purified enzyme) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์พุลูลาเนส อยู่ที่  $0.40 \pm 0.05$  PU/mg และความบริสุทธิ์อยู่ที่ 0.71 เท่า โดยหลังจากที่ทำบริสุทธิ์แล้วจึงนำไปศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์อีกต่อไป

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร (ml)	กิจกรรมโดยรวมของเอนไซม์ (Ceralpha unit)	ปริมาณของโปรตีนโดยรวม (mg)	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (Ceralpha unit /mg)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	Yield (%)
เอนไซม์สกัดหยาบ	3,000	$137.13 \pm 5.54$	$247.26 \pm 27.81$	$0.56 \pm 0.04$	1.00	100
เอนไซม์บริสุทธิ์ขั้นต้น	87.5	$1.14 \pm 0.13$	$12.89 \pm 0.96$	$0.09 \pm 0.01$	0.16	0.8
เอนไซม์ส่วนที่ไม่ผ่านเยื่อขนาด 3 กิโลดาลตัน	10	$1.62 \pm 0.11$	$0.30 \pm 0.00$	$5.41 \pm 0.32$	9.84	1.2
เอนไซม์ส่วนที่ผ่านเยื่อขนาด 3 กิโลดาลตัน	108	$1.12 \pm 0.45$	$1.27 \pm 0.20$	$0.88 \pm 0.38$	1.60	12.5
เอนไซม์ส่วนที่เกาะกับเรซิน	40	$1.03 \pm 0.10$	$0.88 \pm 0.01$	$1.16 \pm 0.11$	2.08	0.7
เอนไซม์ส่วนที่ไม่เกาะเรซิน	40	$0.00 \pm 0.00$	$0.82 \pm 0.01$	$0.00 \pm 0.00$	0.00	0

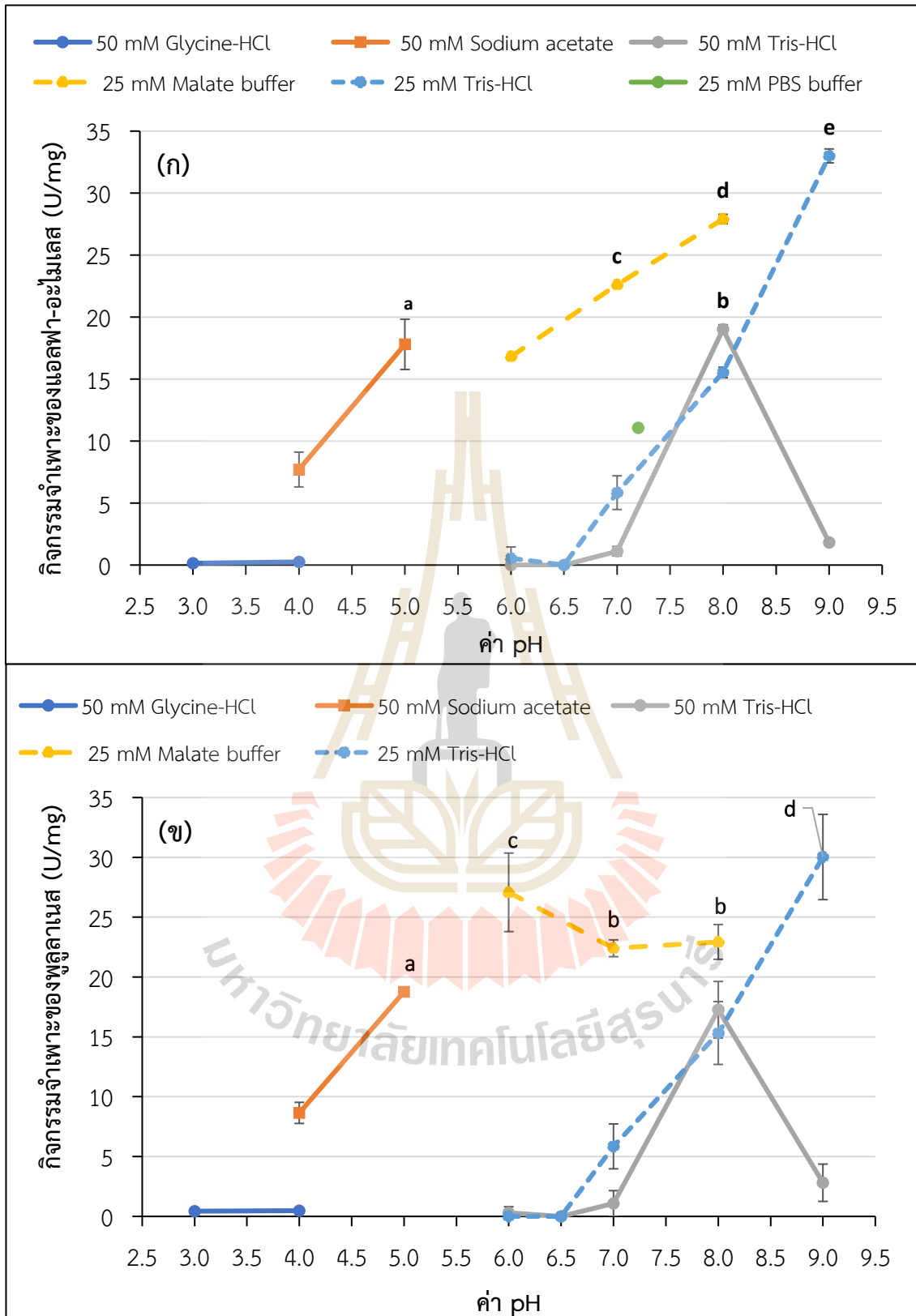
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์พุลูลาเนสในตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร (ml)	กิจกรรมโดยรวมของเอนไซม์ (PU)	ปริมาณของโปรตีนโดยรวม (mg)	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (PU/mg)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	Yield (%)
เอนไซม์สกัดหยาบ	3,000	29.59±1.41	247.26±27.81	0.12±0.01	1.00	100
เอนไซม์บริสุทธิ์ขั้นต้น	87.5	0.73±0.15	12.89±0.96	0.06±0.01	0.10	2.5
เอนไซม์ส่วนที่ไม่ผ่าน						
เยื่อขนาด 3 กิโลดาลตัน	10	0.33±0.05	0.30±0.00	1.10±0.18	1.98	1.1
เอนไซม์ส่วนที่ผ่านเยื่อ						
ขนาด 3 กิโลดาลตัน	108	1.06±0.73	1.27±0.20	0.83±0.55	1.44	3.6
เอนไซม์ส่วนที่เกาะกับเรซิน						
	40	0.35±0.05	0.88±0.01	0.40±0.05	0.71	1.2
เอนไซม์ส่วนที่ไม่เกาะกับเรซิน						
	40	0.27±0.15	0.82±0.01	0.33±0.18	0.59	0.9

#### 4.5.3 คุณลักษณะชีวเคมีของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้วิธีทางโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ

##### ก. ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

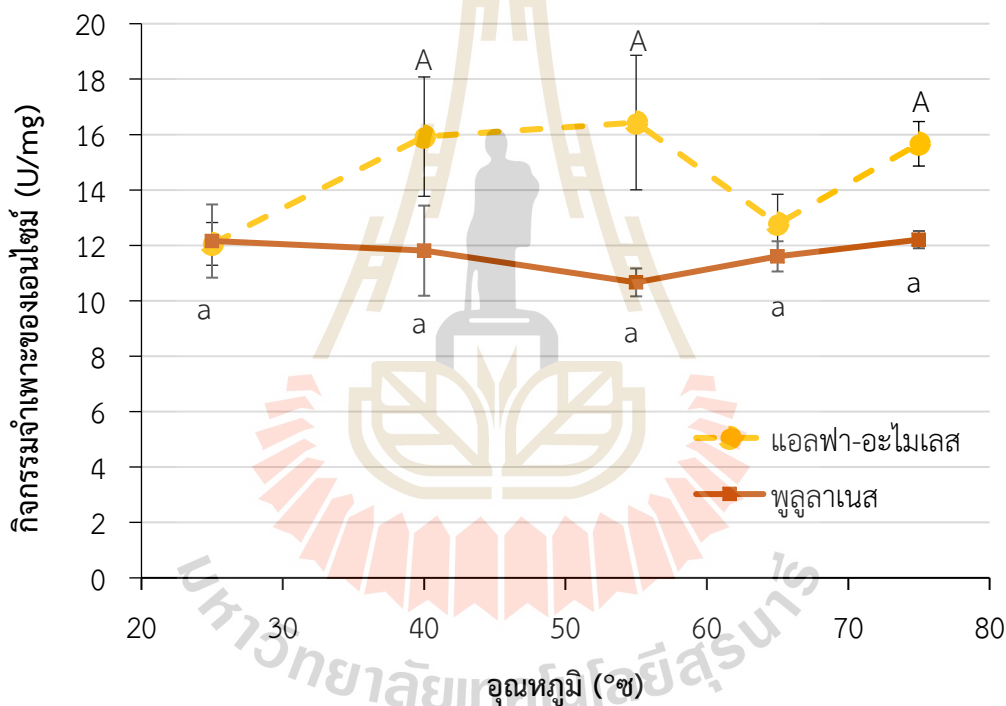
เมื่อพิจารณา รูปที่ 4.16ก ผลของค่า pH ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่างของเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในส่วนของโปรตีนที่ไม่เกาะกับคอลัมน์ (Unbound purified enzyme) พบว่าใน Tris-HCl pH 9.0 ที่ 25 mM ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่  $33 \pm 0.56$  U/mg แต่เมื่อเป็น 50 mM กลับพบว่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสนั้น กลับลดลงเป็น  $1.82 \pm 0.07$  U/mg แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์นั้น มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยอีกหนึ่งข้อสังเกตคือเมื่อปรับค่า ของ Tris-HCl ให้มีความเป็นกรดมากขึ้นพบว่ามีความลดลงของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสจาก  $19.01 \pm 0.37$  U/mg ที่ pH 8.0 เป็น  $1.11 \pm 0.38$  U/mg ที่ pH 7.0 ซึ่งเป็นไปตามปริมาณของ pH ที่มีการปรับให้ลดน้อยลงด้วย HCl และพบว่าการทดสอบกิจกรรมของพุลูลาเนส ใน รูปที่ 4.15 ก็มีผลเช่นเดียวกัน เป็นไปได้ว่า คลอไรด์ไอออน (Cl<sup>-</sup>) ที่เกิดขึ้นนั้นอาจจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสและพุลูลาเนสได้ โดยพบว่าบัฟเฟอร์ที่สนับสนุนให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับรองลงมาของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส คือ Malate buffer ที่ pH 8.0 ที่ความเข้มข้น 25 mM และในพุลูลาเนส คือ Malate buffer ที่ pH 6.0 ที่ความเข้มข้น 25 mM (รูปที่ 4.15ข) โดยมีการค้นพบว่า *Bacillus pseudofirmus* 703 นั้นผลิตเอนไซม์พุลูลาเนสชนิดที่ 1 ที่สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 7.0-8.0 (Lu et al., 2018)



รูปที่ 4.15 ผลของ pH ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อกิจกรรมจำเพาะของแอลฟา-อะไมเลส (ก) พุลูลานเนส (ข) ในตัวอย่างส่วนที่ไม่เกาะกับเรซิน (Unbound purified enzyme)

### ข. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อแอลฟา-อะไมเลส ใช้ Malate buffer pH 8.0 ความเข้มข้น 25 mM และสำหรับ พูลูลาเนส ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท pH 5.0 ความเข้มข้น 50 mM การทดสอบ พบว่า แอลฟา-อะไมเลส นั้นทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ ช่วง 40-55°C และที่ 75°C ได้ในระดับเดียวกัน ในส่วนของพูลูลาเนส พบว่าสามารถทำงานได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 25-75 °C (รูปที่ 4.16) ด้วยระดับการทำกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งได้มีรายงานเกี่ยวกับพูลูลาเนสที่ทำงานได้ในอุณหภูมิต่ำในเชื้อ *Bacillus methanolicus* PB1 โดยสามารถทำงานได้ดีในช่วง 30-50°C ที่ pH 5.5 (Zhang et al., 2020) นอกจากนี้ยังมีรายงานมากมายเกี่ยวกับแอลฟา-อะไมเลสที่ทำงานได้ในอุณหภูมิช่วง 40-50°C เช่น เชื้อ *Lactobacillus plantarum* แยกมาจากหัวมันสำปะหลังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งชนิดแอลฟา-อะไมเลสโดยทำงานได้ดีที่ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 55°C (Giraud et al., 1991)

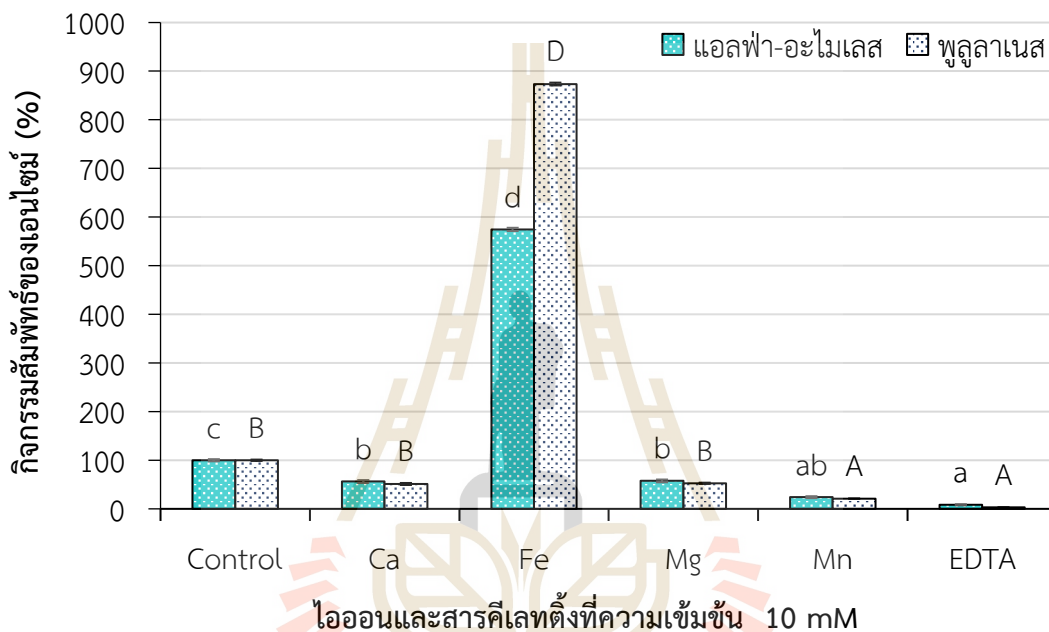


รูปที่ 4.16 ผลของอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสและพูลูลาเนส

### ค. ผลของไอออนชนิดต่าง ๆ และสารคีเลตที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์

พบว่า  $Fe^{2+}$  นั้นมีความสามารถในการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยพูลูเลน และแป้งละลายน้ำ ภายใต้สภาวะของบัฟเฟอร์และ pH ที่แตกต่างกัน โดย แอลฟา-อะไมเลส มีกิจกรรมสูงขึ้นถึง 574.6% และพูลูลาเนส ก็มีกิจกรรมสูงขึ้นถึง 873.6% ส่วนของไอออนแล้ว สารคีเลตตั้งที่แสดงออกถึงการยับยั้งจากมากไปน้อย ได้แก่ EDTA  $Mn^{2+}$   $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$  ทำให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ทำงานได้ 3.2, 21.2, 52.6 และ 51.2% และส่งผลให้ทำให้เอนไซม์พูลูลาเนส ทำงานได้ 8.3, 24.1, 56.2 และ 57.2% ซึ่ง EDTA นั้นถือว่าเป็นตัวจับประจุบวกที่รุนแรงสามารถยับยั้งการ

ทำงานของพุลูลานเนสชนิดที่ 1 ที่สร้างมาจากเชื้อ *Bacillus methanolicus* PB1 ให้เหลือการทำงานเพียง 21% (Zhang et al., 2020) แต่ว่าผลการยับยั้งโดย EDTA นั้นก็มีความหลากหลาย เช่น ในพุลูลานเนสที่มาจากเชื้อ *Bacillus pseudofirmus* 703 เป็นประเภทที่ทนต่อการคีเลตติ้งได้ (Lu et al., 2018) แต่ว่าพุลูลานเนสที่มาจากเชื้อ *Geobacillus thermocatenulatus* และ *Shewanella arctica* นั้นพบว่า EDTA มีการตอบสนองแบบยับยั้งที่รุนแรงคล้ายคลึงกัน (Li et al., 2018; Elleuche et al., 2015). ซึ่งกลไกการทำงานของ EDTA ต่อตัวเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 ยังคงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษากันต่อไป



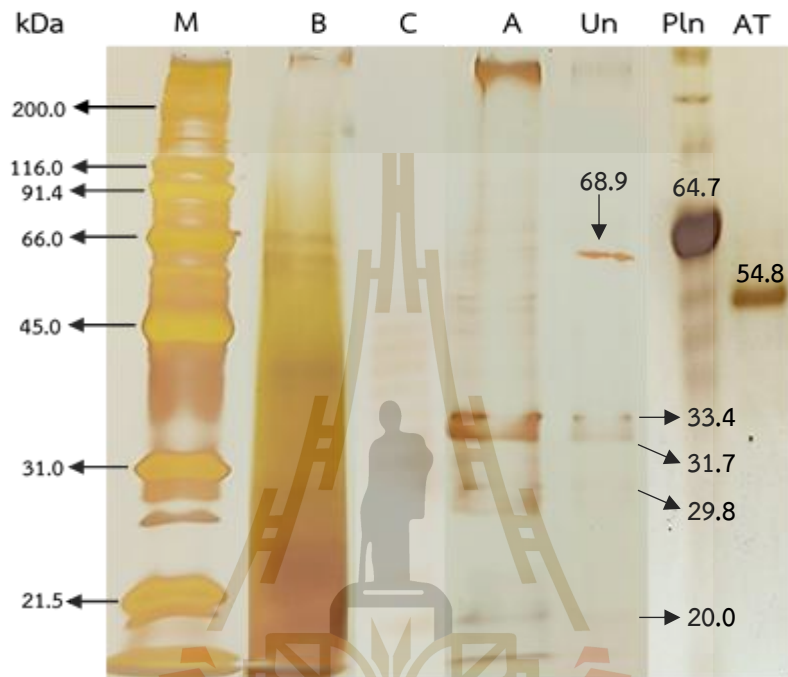
**รูปที่ 4.17** ผลของไอออน ที่ส่งผลต่อกิจกรรมจำเพาะของอะไมเลส และพุลูลานเนส ในตัวอย่างของเอนไซม์ที่ไม่เกาะกับเรซิน (Unbound purified enzyme)

#### ง. รูปแบบโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า

เอนไซม์ผ่านการทำบริสุทธิ์พบรูปแบบของโปรตีนดังรูปที่ 4.18 จากการวิเคราะห์พบว่าโปรตีนช่อง B คืออาหาร deRAM (ตัวอย่างควบคุม) ซึ่งมีสารสกัดยีสต์ (Yeast extract) เป็นส่วนประกอบ โดยพื้นฐานเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับจุลินทรีย์เนื่องจากมีโปรตีนและกรดอะมิโนอยู่มาก ส่งผลให้ย้อมติดสีบนเจลเป็นแนวกว้างได้ สำหรับเอนไซม์สกัดหยาบ (ช่อง C) ปรากฏแถบโปรตีนจำนวนมาก แสดงถึงความเป็นไปได้ของการมีเอนไซม์ที่ถูกผลิตโดยแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SUT 513 แต่ยังไม่สามารถระบุขนาดของเอนไซม์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเป็นเอนไซม์สกัดหยาบและยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ เมื่อทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ช่อง A) พบโปรตีนที่มีความชัดเจนมากขึ้นในช่วง 45-100 กิโลดาลตัน (kDa) และชัดเจนมากยิ่งขึ้นที่โมเลกุลโปรตีนขนาด 28-30 kDa โดยหลังจากการทำบริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (ช่อง Un) พบโปรตีนบริสุทธิ์หลักที่มี



ขนาดคือ 68.9 kDa ซึ่งเปิดเผยว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเอนไซม์พุลลาเนส เพราะขนาดโปรตีนนี้มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์มาตรฐานพุลลาเนสจาก *Bacillus licheniformis* ที่มีขนาด 64.7 kDa (ช่อง Pln) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาด 31.7 และ 33.4 kDa ที่ยังไม่สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนและ/หรือเอนไซม์อะไมเลสได้ เนื่องจากเอนไซม์มาตรฐานอะไมเลสจาก *Bacillus licheniformis* แสดงขนาดโปรตีนอยู่ที่ 54.8 kDa (ช่อง AT)



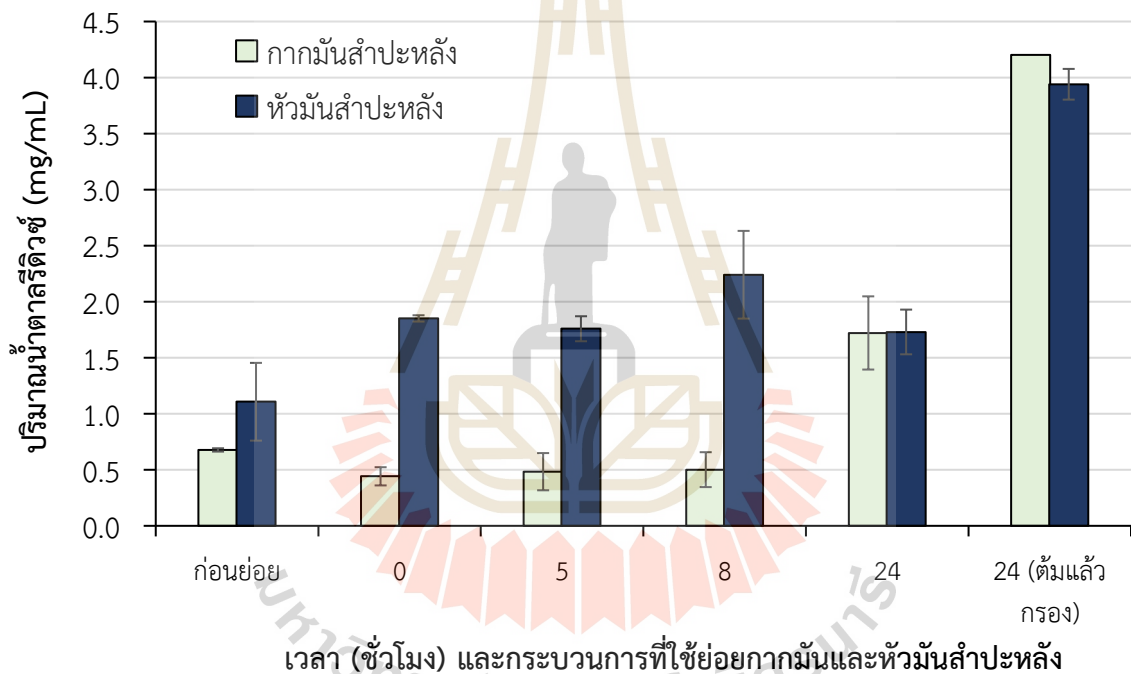
**รูปที่ 4.18** รูปแบบโปรตีนของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ บนเจลอะคริลลาไมด์เข้มข้น 10%  
**หมายเหตุ** M: โปรตีนมาตรฐาน, B: อาหารเลี้ยงเชื้อ deRAM, C: เอนไซม์สกัดหยาบ, A: เอนไซม์ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, Un: เอนไซม์ทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบไอออนลบ (Unbound purified-enzyme), Pln: เอนไซม์มาตรฐานพุลลาเนส และ AT: เอนไซม์มาตรฐานแอลฟาอะไมเลส

จากข้อมูลทางวิชาการของแบคทีเรียแล็กติกสายพันธุ์ *Lactobacillus manihotivorans* และ *Lactobacillus* sp. G3\_4\_1TO2 นั้น ได้มีการรายงานขนาดเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 135 และ 95 kDa ตามลำดับ (Aguilar et al., 2000; Tallapragada et al., 2018) อีกทั้งจากการศึกษาของ Waśko และคณะ (2011) พบเอนไซม์พุลลาเนสจากแบคทีเรียแล็กติก *Lactococcus lactis* IBB 500 ที่มีมวลโมเลกุล 74 kDa ซึ่งจะเห็นว่าทั้ง 2 ชนิดเอนไซม์ มีมวลโมเลกุลที่หลากหลายทางชีวภาพตามสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแล็กติก เพราะฉะนั้น การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เพิ่มเติมและ/หรือการระบุชนิดของเอนไซม์ (Enzyme identification) ให้ชัดเจนยิ่งขึ้นจากแบคทีเรียแล็กติก *Streptococcus* sp. SUT 513 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม

#### 4.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยหัวมันสำปะหลังสดและกากมันสำปะหลังที่ได้จากบริษัทผู้ร่วมทุนวิจัย

##### 4.6.1 การทดลองย่อยหัวมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้ง 10% (w/v) ขั้นต้น

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยสูตรอาหาร dRAM ด้วยกล้าเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 log CFU/mL ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนทำการพาสเจอร์ไรส์อยู่ที่  $0.80 \pm 0.02$  U/mL และค่ากิจกรรมของอะไมเลสหลังทำการพาสเจอร์ไรส์อยู่ที่  $0.66 \pm 0.02$  U/mL จากนั้นก็ทำการย่อยกากมัน และหัวมันสำปะหลังโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ดิบ โดยการใส่เอนไซม์ปริมาณ 10% (v/v) โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในหัวมันสำปะหลังที่มีแป้งอยู่ 10% เมื่อเทียบให้ตัวอย่างที่ทดสอบมีน้ำหนักเป็น 1 กรัม เท่า ๆ กัน จะได้ว่า ก่อนย่อยมีน้ำตาลรีดิวซ์  $1.11 \pm 0.35$  mg/mL



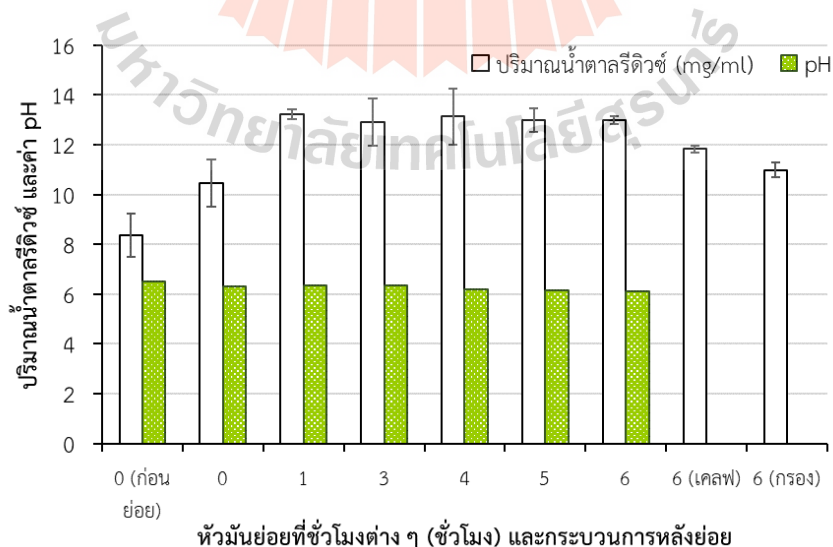
รูปที่ 4.19 การทดลองย่อย หัวมันและกากมันโดยใช้ เอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเหลวหลังการเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์โดยตรง

หลังจากที่ทำการย่อยพบว่าหลังเติมเอนไซม์ดิบลงไปเป็นเวลา 0 ชั่วโมง พบน้ำตาลรีดิวซ์  $1.851 \pm 0.028$  mg/mL ที่เวลา 8 ชั่วโมง พบน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น เป็น  $2.240 \pm 0.391$  mg/mL ซึ่งสูงขึ้นจากเดิม 17% และหลังจากที่ทำการต้มแล้วกรองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลสูงขึ้นเป็น  $3.940 \pm 0.137$  mg/mL ซึ่งสูงขึ้นจากเดิม 53% ในกากมันสำปะหลังที่มีแป้งอยู่ 4.5% (รูปที่ 4.19) เมื่อเทียบให้ตัวอย่างที่ทดสอบมีน้ำหนักเป็น 1 กรัม เท่า ๆ กัน จะได้ว่า ก่อนย่อยมีน้ำตาลรีดิวซ์  $0.677 \pm 0.015$  mg/mL หลังจากทำการย่อยพบว่าหลังเติมเอนไซม์ดิบลงไปเป็นเวลา 0 ชั่วโมง พบน้ำตาลรีดิวซ์  $0.442 \pm 0.081$  mg/mL ที่เวลา 5 และ 8 ชั่วโมงพบว่ายังมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นเพียง

เล็กน้อย แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น เป็น  $1.721 \pm 0.327$  mg/mL ซึ่งสูงขึ้นจากเดิม 74% และหลังจากที่ทำการต้มแล้วกรองที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลสูงขึ้นเป็น  $4.20 \pm 0.42$  mg/mL ซึ่งสูงขึ้นจากเดิม 89% เมื่อเทียบกับที่ 0 ชั่วโมง การย่อยด้วยเอนไซม์สกัดหยาบเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ออกมานั้นยังไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควรจึงแก้ปัญหาโดยการทำให้ตัวอย่างนั้นเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการระเหยด้วยเครื่อง Evaporator หรือการทำไลโอไฟไลซ์ (Lyophilization) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์นั้นยังต้องควบคุมให้ดีกว่านี้ และควรปรับปริมาณแบ่งให้สัมพันธ์กัน เนื่องจากในครั้งนี้จะพบว่า มีแบ่งเหลือในหัวมันสำปะหลังอยู่สังเกตจากความหนืดของตัวอย่างหลังจากที่ทำการย่อย 24 ชั่วโมง และทำการต้มกรอง บางช่วงเวลาน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงเช่น ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงในตัวอย่างหัวมันสำปะหลัง อาจะมาจากการปนเปื้อนเชื้อที่ใช้น้ำตาลในภายหลัง หรือวิธีการเก็บตัวอย่างที่คลาดเคลื่อน ซึ่งจะต้องกลับไปทบทวนที่จุดนี้ต่อไป

#### 4.6.2 การทดลองย่อยหัวมันสำปะหลังที่มีปริมาณแบ่ง 10% (w/v) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้เอนไซม์สกัดหยาบ

ตัวอย่างหัวมันสำปะหลังล็อตเดียวกัน มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นอยู่ที่ 13.49 และ 8.37 mg/mL ตามลำดับ โดยพบว่าหากใช้เอนไซม์ดิบหลังย่อยอาจจะมึ้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ตรวจสอบได้เพิ่มขึ้นหรือลดลง แต่สิ่งที่สังเกตได้ว่าการย่อยในตัวอย่างที่น้ำตาลรีดิวซ์ลดลง คือ ความหนืดที่ลดลงอย่างที่เกิดในการย่อยครั้งที่ 2 และในบางกรณีเช่นในการย่อยครั้งที่ 1 พบว่าความหนืดลดลงอย่างมากและ pH ก็มีการลดลงเนื่องจากเชื้อแล็กติกในเอนไซม์ดิบยังสามารถย่อยแบ่งและผลิตรกรดได้อยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงเกิดแนวคิดในการใช้เอนไซม์สกัดหยาบมาใช้ในการย่อยครั้งที่ 2 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 4.719 U/mL และมีน้ำตาลรีดิวซ์ 10.545 mg/mL และ การย่อยครั้งที่ 3 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 7.471 U/mL และมีน้ำตาลรีดิวซ์ 14.33 mg/mL (รูปที่ 4.20)

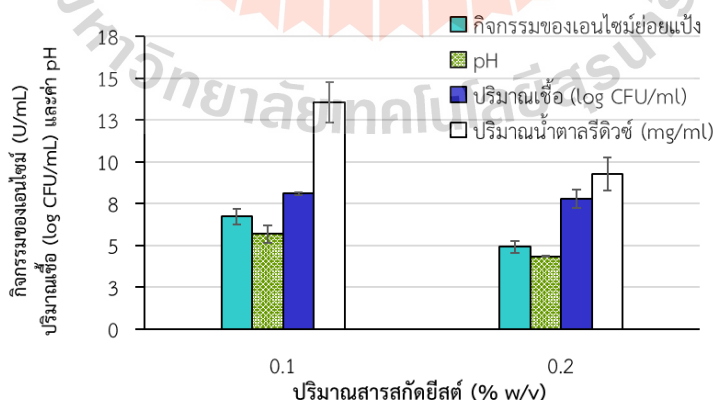


รูปที่ 4.20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/mL) และค่า pH หลังการย่อยหัวมันสำปะหลังสายพันธุ์ระยอง 89 ด้วยเอนไซม์สกัดหยาบ

ซึ่งเมื่อผสมกับตัวหัวมันในสัดส่วนที่คำนวณไว้ ก็จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยรวมอยู่ในช่วง 0.4-0.74 U/mL โดยพบว่าหลังการย่อยที่ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งถึง 6 ชั่วโมงนั้นพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกัน แต่สิ่งที่ต่างกันคือ ความหนืดที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงที่ 3 และค่า pH พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ด้วยเหตุนี้การย่อยหัวมันสำปะหลังด้วยเวลา 3-4 ชั่วโมง จึงถือว่าเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสม หลังจากมีการกรองและปั่นเหวี่ยงก็จะมีการนำส่วนน้ำไปพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เชิงซ้อน ในกลุ่มเชื้อผลิตภัณฑ์แล็กติก เชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส และรวมถึงยีสต์อีกต่อไปตามแต่ความต้องการ

#### 4.7 ผลเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ร่วมจากระบวนการเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกเพื่อผลิตเอนไซม์

จากการที่พบว่าหลังจากการทดลองเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในขั้นตอนการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์นั้น ในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์สกัดหยาบหลังจากที่ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส และตะกอนเซลล์ออกจากกันพบว่า จะมีตะกอนแป้งที่ติดกับตะกอนออกมาด้วยโดยที่ ตะกอนแป้งจะมีการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าแป้งในส่วนนี้หลังจากที่ตกตะกอนมาแล้วนั้นเมื่อทำการต้มในน้ำเดือดกลับเกิดการเจลาติไนซ์ได้ยากมากจนแทบไม่เกิดขึ้น จึงเกิดการเริ่มที่จะศึกษาตะกอนแป้งที่เป็นแป้งด้านการเจลาติไนซ์เหล่านี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งสูงขึ้นจากเดิม 4.5 เป็น 10% (w/v) จากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า เชื้อนั้นมีความสามารถในการเจริญการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและผลิตภัณฑ์แสดงในรูปที่ 4.21 และหลังการปั่นเหวี่ยงก็ได้ตะกอนแป้งออกมา ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัม เติมน้ำยีสต์ 0.1 กรัม จะได้ตะกอนแป้งหลังย่อยและอบแห้งที่ 3.55 กรัม และเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัม เติมน้ำยีสต์ 0.2 กรัม จะได้ตะกอนแป้งหลังย่อยและอบแห้งที่ 3.47 กรัม จึงสรุปเลือกความเข้มข้นยีสต์ที่เหมาะสมต่อการขยายกำลังผลิตเป็น 5 ลิตร ที่ 1% (w/v)



**รูปที่ 4.21** กิจกรรมของเอนไซม์ (U/mL) น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/mL) ปริมาณเชื้อ (log CFU/mL) และค่า pH ของตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแป้งมันสำปะหลัง 10% (w/v) และมีการเติมน้ำยีสต์ FP101 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)



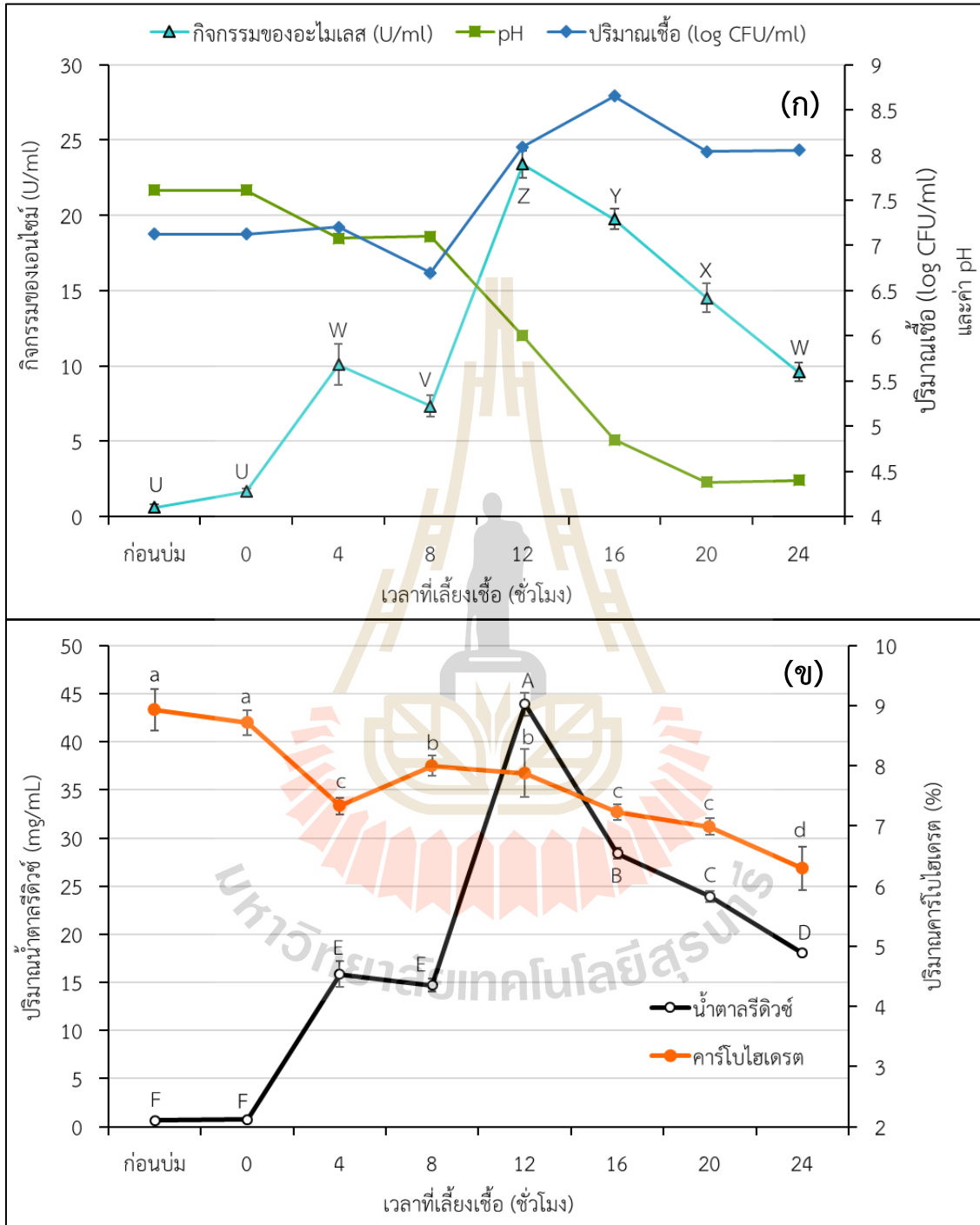
สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก *Streptococcus* sp. SUT 513 ด้วยแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 10% ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแสดงลักษณะทางกายภาพ ณ ชั่วโมงที่ 0, 12 และ 24 ดังรูปที่ 4.22 โดยชั่วโมงที่ 0 จะปรากฏลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อจะหนืดใสมีสีน้ำตาลอ่อนเนื่องมาจากแป้งมันสำปะหลังถูกเจลาติไนส์ (Gelatinized) และเฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4$ ) ที่เป็นหนึ่งในส่วนประกอบอาหารของเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เกิดสี หลังจากที่ได้ทำการเลี้ยงเชื้อได้ 12 ชั่วโมง จะพบว่า เกิดผลึก (อนุภาคสีขาว) เกิดขึ้นภายในระบบ และเพิ่มมากขึ้นเมื่อการเลี้ยงเชื้อผ่านไปจนถึง 24 ชั่วโมง รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อแปลงสภาพเป็นของเหลวคล้ายน้ำแป้ง ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ปัจจัยทางชีวเคมีและจุลินทรีย์ พบความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง ค่า pH ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังรูปที่ 4.23ก-ข



รูปที่ 4.22 การเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. SUT 513 เพื่อผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้งด้วยแป้ง 10% ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อได้มีการเพิ่มขึ้นถึง 1 log CFU/mL อันสอดคล้องกับการพบกิจกรรมการย่อยแป้ง  $23.40 \pm 0.90$  U/mL (รูปที่ 4.23ก) บ่งชี้ถึงการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งเมื่อมีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้น ซึ่งสามารถยืนยันได้จากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ลดลงถึง  $7.88 \pm 0.40\%$  พร้อมกับมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเป็น  $43.89 \pm 1.21$  mg/mL (รูปที่ 4.23 ข) อันมีสาเหตุมาจากการย่อยแป้ง อีกทั้งช่วงเวลา 4-8 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่ประมาณ 15.4 mg/mL คาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจาก เชื้อมีการใช้น้ำตาลที่เป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับการเจริญ และจะเห็นได้ว่าหลังจากการเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 16-24 ระดับของปริมาณเชื้อจะเริ่มคงที่ ( $\sim 8.0-8.5$  log CFU/mL) อีกทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ด้วยจุดนี้อาจจะเป็นเพราะว่า ภาวะการถ่วงน้ำหนักน้ำตาลไปใช้ของเชื้อลดน้อยลง ดังนั้น เชื้อไม่มีความจำเป็นต้องทำการย่อยแป้งเพื่อผลิตน้ำตาลสำหรับการนำไปใช้ในการเจริญอีกต่อไป โดยแท้ที่จริงแล้ว ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) เช่นเดียวกัน ปรากฏการณ์นี้น่าจะมา

จาก เชื้อนํ้าตาลที่ติงเข้าสู่เซลล์ไปทำการเปลี่ยนนํ้าตาลให้เป็นพลังงาน หรือที่เรียกว่าการหมัก (Fermentation) ได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ กรดแล็กติก

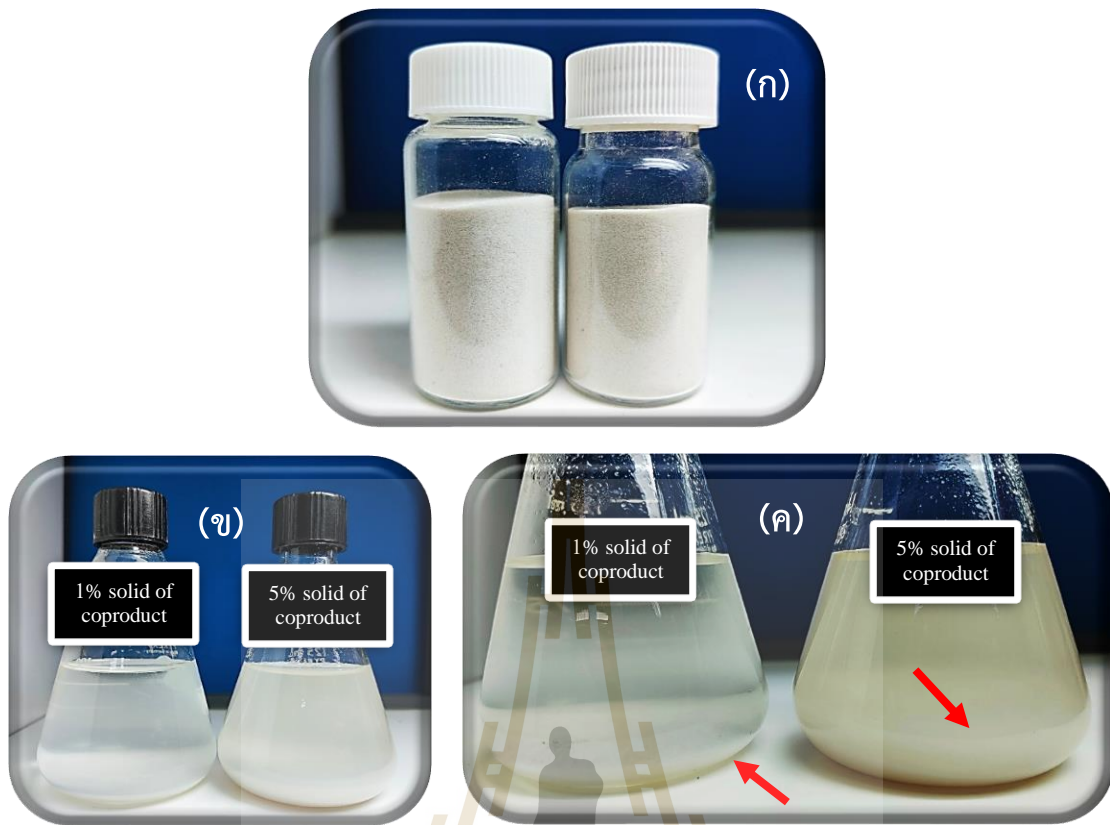


**รูปที่ 4.23** ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อต่อค่า pH และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตและนํ้าตาลรีดิวซ์ (ข) ณ เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง

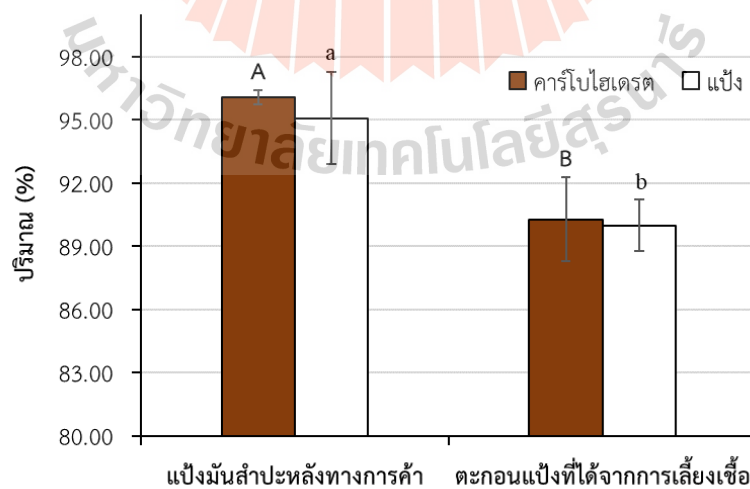


ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า pH ของระบบการเลี้ยงเชื้อสุดท้าย (24 ชั่วโมง) ลดลงถึงสภาวะความเป็นกรดอ่อนคือ 4.5 คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากปริมาณกรดแล็กติกที่เพิ่มมากขึ้นจากการผลิตของเชื้อ เพื่อต้องการพลังงานในการนำไปใช้กิจกรรมอื่น ๆ เช่น แบ่งเซลล์ สร้างสภาวะความอยู่รอด หรือผลิต bacteriocin เพราะฉะนั้น จะเห็นได้ว่าทั้ง 5 ปัจจัยสามารถเป็นดัชนีที่ใช้ในการติดตาม/บ่งชี้กิจกรรมของเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ ทั้งนี้ จากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ยังคงเหลือ ( $\sim 6\%$ ) ในระบบของการเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งเอนไซม์ที่เชื้อผลิตนั้นมีศักยภาพของกิจกรรมย่อยแป้งในกลุ่มเอนไซม์พุลูลานเนส แล้วเมื่อหยุดการเลี้ยงเชื้อทำให้พบว่า เกิดตะกอนสีขาวมีลักษณะเป็นสารชีวภาพกึ่งแข็ง (Semi-solid) ที่ก้นของถัง ทำให้คาดการณ์ว่า ตะกอนดังกล่าวนี้ น่าจะเป็น แป้งต้านทานการย่อย ที่ถูกผลิตโดยเอนไซม์พุลูลานเนส เนื่องจากเป็น Debranching enzyme ที่สามารถเข้าตัดโมเลกุลของอะไมโลเพคตินแล้วทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ (Rearrangement) ของโมเลกุลอะไมโลสหรือเด็คซ์ตริน จนเหนี่ยวนำให้เกิดการจัดโครงสร้างเป็นผลึกแป้งใหม่ในที่สุด โดยเรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า Dextrin retrogradation อันสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนเป็นของเหลวขาว เพราะปริมาณอะไมโลเพคตินลดลงทำให้เกิดความหนืดลดลง

เมื่อนำตะกอนแป้งมาทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  แล้วบดให้เป็นผง ผ่านตะแกรงร่อน 125 ไมโครเมตร จะได้ผลิตภัณฑ์ร่วมดังรูปที่ 4.24 โดยนำผลิตภัณฑ์นี้ ไปทำละลายกับที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5% ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ลักษณะทางกายภาพของก่อนและหลังทั้งใน 2 ระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างกัน กล่าวคือ พบตะกอนแป้งจำนวนมากตกอยู่ที่ก้นขวดรูปที่ 4.24ข-ค จากนั้นนำตะกอนแป้งนี้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและแป้งเปิดเผยว่า ผลิตภัณฑ์ร่วมนี้ มีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและแป้งอยู่  $90.27 \pm 2.00\%$  และ  $89.99 \pm 1.22\%$  เทียบกับแป้งมันสำปะหลังทางการค้าแสดงค่าที่มากกว่า 95% ของคาร์โบไฮเดรตและแป้ง (รูปที่ 4.25) เพราะฉะนั้น มีความเป็นไปได้ที่สูงมากสำหรับผลิตภัณฑ์ร่วม (Dextrin retrogradation) จะเป็นแป้งทนย่อย และมีประเด็นที่น่าสนใจเพราะถูกผลิตด้วยการเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก ในปัจจุบัน คณะผู้วิจัยของ Thakur (2021) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ พุลูลานเนสจาก *Bacillus subtilis* 168 ด้วยวิธี metagenome สำหรับการหลั่งเอนไซม์พุลูลานเนสในเชิงปริมาณเพื่อนำไปผลิตแป้งทนย่อย แต่ยังไม่มีการรายงานทางวิชาการที่ผลิตแป้งทนย่อยโดยตรงจากการเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก โดยตรง ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางนวัตกรรมใหม่ที่ประหยัดต้นทุน เวลา หรือค่าใช้จ่ายมากกว่าการใช้เทคโนโลยีระดับสูง อีกทั้งหากตะกอนแป้งได้รับการศึกษาต่อและพิสูจน์ได้ว่าเป็นแป้งทนย่อย จะถือเป็นข้อได้เปรียบในแง่ของการนำไปใช้ เพราะเนื่องจากแป้งทนย่อยได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ (Applications) ได้อย่างหลากหลาย ได้แก่ 1.) 프리ไบโอติก (Prebiotic) Rengadu et al., 2020 2.) ผลิตภัณฑ์ซีเรียลอัดแท่งแบบปลดปล่อยน้ำตาลช้า (Gourineni et al., 2020) 3.) ป้องกันมะเร็งลำไส้ 4.) ป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูง (Ashwar et al., 2016) จึงเหมาะแก่การที่จะนำส่วนผลิตภัณฑ์ร่วม (ตะกอนแป้ง) นี้ มาศึกษาต่อเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด



รูปที่ 4.24 ผลิตภัณฑ์ร่วม [ตะกอนแข็ง] หลังการเลี้ยงเชื้อด้วยแป้งมันสำปะหลัง 10% ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก: ตัวอย่างที่ผ่านการบด/ตะแกรงร่อน 125 ไมโครเมตร, ข: ตัวอย่างแป้งก่อนการต้มในน้ำเดือด 30 นาที และ ค: ตัวอย่างแป้งหลังการต้มในน้ำเดือด 30 นาที)



รูปที่ 4.25 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและแป้งในผลิตภัณฑ์ร่วม [ตะกอนแข็ง] หลังการเลี้ยงเชื้อ ที่ 24 ชั่วโมง เทียบกับแป้งมันสำปะหลังทางการค้า

## บทที่ 5

### บทสรุปผลการวิจัย

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

เชื้อผลิตกรดแอล-แล็กติกความบริสุทธิ์สูง (*Streptococcus* sp. SUT 513) แสดงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้ง โดยเชื้อสามารถใช้/และย่อยแหล่งคาร์บอน (สารตั้งต้น) ได้ทั้งแป้งมันสำปะหลัง หัวมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลัง ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ deRAM ที่พัฒนาขึ้นจัดเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง สารสกัดยีสต์ชนิด FP101 ไคโทแซนไฮนพอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และเฟอร์รัสซัลเฟต ปริมาณ 45.0, 1.0, 0.025 และ 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าราคาต้นทุนถูกลงถึง 11.7 เท่า เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล็กติกสูตรมาตรฐาน (MRS) จากการเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ด้วย deRAM ที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (pH 8.5) ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งอยู่ที่  $9.60 \pm 0.60$  หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อปรับการเลี้ยงเชื้อสู่ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพปริมาตร 3 ลิตร พบกิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุดที่  $17.61 \pm 1.91$  หน่วยต่อมิลลิลิตร ณ เวลา 16-22 ชั่วโมง จากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 80% และการทำไดอะไพเวชันพบว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 10.8 เท่า และหลังจากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบได้แอลฟา-อะไมเลสที่มีความบริสุทธิ์ 2.08 เท่า และ 0.71 เท่าสำหรับเอนไซม์พุลูลานเนส ทั้งนี้คุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ไม่เกาะคอลัมน์ (Unbound purified-enzyme) พบประเภทของเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยแป้ง 2 ชนิดหลักคือ แอลฟา-อะไมเลสที่ 0.52 หน่วยแอลฟาต่อมิลลิลิตร และพุลูลานเนสที่ 0.12 หน่วยพุลูลานเนสต่อมิลลิลิตร ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสทำงานได้ดี (บนความเข้มข้นของสารละลายที่เท่ากัน 25 มิลลิโมลาร์) ณ อุณหภูมิ 40-55 และ 75°C ที่ pH 8.0 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Malate แต่จะทำงานได้ดีขึ้นอีก 3.0 เท่า ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่ pH 9.0 สำหรับกิจกรรมของพุลูลานเนสจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-75°C ในสารละลายบัฟเฟอร์ Malate ที่ pH 6.0 และเพิ่มขึ้นเป็น 1.6 เท่า ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่ pH 9.0 นอกจากนี้ไอออนของเฟอร์รัสจะสามารถกระตุ้นการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและพุลูลานเนสได้ 9 และ 6 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ไอออนของแคลเซียม แมกนีเซียม และโดยเฉพาะสารคีเลต EDTA มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีน พบโปรตีนขนาด 31.7, 33.4 และ 68.9 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตาม หลังจากการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ พบตะกอนเหลือทิ้งที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและปริมาณแป้งมากกว่า 90% และเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้มีศักยภาพในการย่อยหัวมันและกากมันสำปะหลัง ดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่า *Streptococcus* sp. SUT 513 สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อที่จะทดแทนเอนไซม์ทางการค้า

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

*ประเด็นที่ 1* จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ที่ทำผ่านการทำบริสุทธิ์ยังไม่สามารถจำแนกมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้อย่างชัดเจน พบแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 33.4, 31.7, 29.8 และ 20 kDa เพราะฉะนั้น การทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมและการกำหนดลักษณะของเอนไซม์ควรจะต้องได้รับการศึกษาให้ละเอียดมากยิ่งขึ้น อาทิ 1.) การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แบบไม่เติมสารทำลายเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน (Non-BME: non-reducing) ใน treatment buffer เพื่อตรวจสอบความเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ (Enzyme subunit) หรือ การศึกษาด้วย Gel filtration เพื่อดูขนาดของโปรตีนที่ยังคงสภาพโครงสร้างสมบูรณ์ (Native form) ของเอนไซม์ 2.) การวิเคราะห์ SDS-PAGE แบบการย้อมของ Activity staining และ 3.) การระบุชนิดของโปรตีน (Protein identification) ด้วยการทำให้โปรตีโอมิกส์ (proteomics) เพื่อศึกษาโมเลกุลของโปรตีนบนพื้นฐานการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Sequencing) เทียบกับฐานข้อมูลจีโนมิก (Genome sequencing database: NCBI)

*ประเด็นที่ 2* จะเห็นได้ว่าตัวอย่างตะกอนแบ่งจากการหมักด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ได้นั้น มีปริมาณแบ่งในตัวอย่างเกิน 90% ซึ่งถือได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม (Coproducts) ที่น่าสนใจแก่การทำการศึกษาต่อโดยละเอียด เช่น 1.) ปริมาณแป้งทนย่อย (Resistant starch content) 2.) เทคนิคการกระเจิงแสงด้วยมุมแคบ (Small Angle X-ray Scattering: SAXS) 3.) พฤติกรรมกับปัจจัยทางความร้อน (Thermal behavior: Differential scanning calorimetry) 4.) พฤติกรรมการเกิดเจลของแป้ง (Rapid visco amylograph: RVA) 5.) ค่าดัชนีน้ำตาล (Glycemic index: GI-index) 6.) ดัชนีการใช้แป้งทนย่อยต่อกิจกรรมจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Prebiotic index/ probiotic activity) และอื่น ๆ เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ของการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์แล็กติกในอุตสาหกรรมอาหารและพลาสติกชีวภาพแขนงใหม่ ซึ่งในทางปฏิบัติของอุตสาหกรรมการผลิตกรดแล็กติกนั้น ผลิตภัณฑ์ร่วมนี้จะถูกกำจัดและไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ โดยทางคณะผู้วิจัยได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าผลิตภัณฑ์ร่วมนี้ อาจจะเป็น “แป้งทนย่อยที่ผลิตโดยแบคทีเรีย (Resistance starch induced by bacteria)” ในปัจจุบันยังไม่พบการรายงานทางวิชาการทั้งในและต่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแป้งทนย่อยจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียแล็กติกอย่างชัดเจน ทำให้เป็นจุดที่น่าสนใจสำหรับความเป็นไปได้ในการศึกษาวิจัยและพัฒนาต่ออย่างครบวงจร ที่เป็นการนำผลิตผลพลอยได้มาใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่า/สร้างมูลค่า อีกทั้งจะทำให้แผนการวิจัยตอบโจทย์ยุทธศาสตร์หลักของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี บนฐาน SUT zero waste ตามการบริหารงานที่นำสมัยและสร้างระบบนิเวศแห่งคุณภาพของการพัฒนาประเทศ อันสอดคล้องไปกับนโยบาย Zero Waste Thailand ของ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และทุนวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.) ที่มีวัตถุประสงค์และเป้าหมายของแผนงานที่สำคัญ (Flagship) เพื่อที่จะส่งเสริมให้มีการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุดอย่างไม่เกิดของเสียสู่สภาวะแวดล้อม เพราะฉะนั้น ทางคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่า โครงการวิจัยนี้สามารถต่อยอดและพัฒนาเพื่อให้เกิดขีดความสามารถของนวัตกรรมใหม่ต่อไปได้ เป็นต้น



## บรรณานุกรม

- Abedi, E. and Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. Heliyon. Vol 6. Article no e04974.
- Aiyer, P. D. (2004). Effect of C: N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. African Journal of Biotechnology. Vol 3. Issue 10. 519-522.
- Ahmed, S. A., Abdella, M. A. A., El-Sherbiny, G. M., Ibrahim, A. M., El-Shamy, A. R., and Atalla, S. M. M. (2019). Application of one-factor-at-a-time and statistical designs to enhance  $\alpha$ -amylase production by a newly isolate *Bacillus subtilis* strain-MK1. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Vol 22. Article no 101397.
- Ali, M. B., Mhiri, S., Mezghani, M., and Bejar, S. (2001). Purification and sequence analysis of the atypical maltohexaose-forming  $\alpha$ -amylase of the *B. stearrowthermophilus* US100. Enzyme and Microbial Technology. Vol 28. 537-542
- Alonazi, M., Karray, A., Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y., and Bacha, A. B. (2021). Alpha amylase from *Bacillus pacificus* associated with Brown Algae *Turbinaria ornata*: Cultural conditions, purification, and biochemical characterization. Processes. Vol 9. Article no 16.
- Altaf, M., Naveena, B. J., and Reddy, G. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. Bioresource Technology. Vol 98. Issue 3. 498-503.
- Ashraf, H., Qadeer, M., and Iqbal, J. (2005). Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. Bioresource Technology. Vol 96. Issue 10. 1201-1204.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Shah, A., Wani, I. A., and Masoodi, F. A. (2016). Preparation, health benefits and applications of resistant starch-a review. Starch/Stärke. Vol 68. 287-301.
- Baltas, N., Dincer, B., Ekinici, A. P., Kolayli, S., and Adiguzel, A. (2016). Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Anoxybacillus thermarum* A4 strain. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol 59. Article no e16160346.
- Bernfeld, P. (1951). Enzymes of starch degradation and synthesis. Advances in enzymology and related areas of molecular biology. Vol 12. 379-428.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Vol 72. Issue 1. 248-254.

- Brown, S. H. and Kelly, R. M. (1993). Characterization of amylolytic enzymes having both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 hydrolytic activity from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 59. 2614-2621.
- Burgess-Cassler, A. and Iman, S. (1991). Partial purification and comparative characterization of  $\alpha$ -Amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. Current Microbiology. Vol 23. 207-213.
- Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X., and Auras, R. (2016). Poly (lactic acid) - mass production, processing, industrial applications, and end of life. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol 107. 333-366.
- Chandra, A., Medda, S., and Bhadra, A. (1980). Production of extracellular thermostable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus licheniformis*. Journal of Fermentation Technology. Vol 58. Issue 1. 1-10.
- Chen, A., Li, Y., Nie, J., McNeil, B., Jeffrey, L., Yang, Y., and Bai, Z. (2015). Protein engineering of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enhanced thermostability using in silico data driven rational design methods. Enzyme and Microbial Technology. Vol 78. 74-83.
- Choubane, S., Khelil, O., and Cheba, B. A. (2015). *Bacillus* sp. R2  $\alpha$ -amylase production optimization: pasta cooking water as medium of amylase production. African Journal of Biotechnology. Vol 14. 3184-3189.
- Dedenaro, G., Costa, S., Rugiero, I., Pedrini, P., and Tamburini, E. (2016). Valorization of agri-food waste via fermentation: production of L-lactic acid as a building block for the synthesis of biopolymers. Applied Science. Vol 6. Issue 12. Article no 379.
- Dettori-Campus, B., Priest, F., and Stark, J. (1992). Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearotherophilus* NCA 26. Process Biochemistry. Vol 27. Issue 1. 17-21.
- Elmansy, E. A., Asker, M. S., El-Kady, E. M., Hassanein, S. M. and El-Beih, F. (2018). Production and optimization of  $\alpha$ -amylase from thermo-halophilic bacteria isolated from different local marine environments. Bulletin of the National Research Centre. Vol 42. Article no 31.
- Elleuche, S., Qoura, F. M., Lorenz, U., Rehn, T., Brück, T., and Antranikian, G. (2015). Cloning, expression and characterization of the recombinant cold-active type-I pullulanase from *Shewanella arctica*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol 116. 70-77.
- Fossi, B. T. and Tavea, F. (2013). Application of amylolytic *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 in fermentation for simultaneous production of thermostable  $\alpha$ -



- amylase and lactic acid. Lactic Acid Bacteria-R and D for Food, Health, and Livestock Purposes. pp. 633-658. IntechOpen: London, UK.
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., and Pandey, A. (2003). Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. Biochemical Engineering Journal. Vol 15. Issue 2. 107-115.
- Ge, S., Yang, S. J., and Zhang, S. Z. (1980). Studies on pullulanase from *Acetobacter aerogenes*. I. Purification and some properties. Acta microbiologica Sinica. Vol 20. Issue 4. 415-420.
- Giraud, E., Lelong, B., and Raimbault, M. (1991). Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol 36. Issue 1. 96-99.
- Goyal, N., Gupta, J., and Soni, S. (2005). A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology. Vol 37. Issue 7. 723-734.
- Gourineni, V., Stewart, M. L., Wilcox, M. L., Maki, K. C. (2020). Nutritional bar with potato-based resistant starch attenuated post-prandial glucose and insulin response in healthy adults. Foods. Vol 9. Article no 1679.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., and Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry. Vol 38. Issue 11. 1599-1616.
- Han, T., Zeng, F., Li, Z., Liu, L., Wei, M., Guan, Q., Liang, X., Peng, Z., Liu, M., Qin, J., Zhang, S., and Jia, B. (2013). Biochemical characterization of a recombinant pullulanase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. Letter of Applied Microbiology. Vol 57. Issue 4. 336-343.
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., and Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. FEMS Microbiology Letters. Vol 365. Article no fny 213.
- Hii, S. L. (2012)., Tan, J. S., Ling, T. C., and Ariff, A. B. (2012). Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. Enzyme Research. Vol 2012. Article ID 921362.
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J. G., Kanoun, S., Juge, N., and Nasri, M. (2008). Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. Process Biochemistry. Vol 43. 499-510.

- Ho, J. C. K. and Sze, L. Y. (2018). Isolation, identification and characterization of enzyme-producing lactic acid bacteria from traditional fermented foods. Bioscience Horizons. Vol 11. Article no hzy004.
- Horvathova, V., Godany, A., Sturdik, E., and Janecek, S. (2006).  $\alpha$ -Amylase from *Thermococcus hydrothermalis*: re-cloning aimed at the improved expression and hydrolysis of corn starch. Enzyme and Microbial Technology. Vol 39. 1300-1305.
- James, S. (2016). Alpha-Amylase Baking Enzyme Market Worth \$320.1 Million by 2024 (On-line). Available: <https://www.prnewswire.com/...580930831.html>
- Kavran, J. M. and Leahy, D. J. (2014). Chapter 14 Silver staining of SDS-polyacrylamide gel. In Jon, L., Methods in Enzymology (Vol 541). pp. 169-176. Elsevier: UK.
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Nguyen, T.-H., Haltrich, D., and Khanongnuch, C. (2015). Characterization of a maltose-forming  $\alpha$ -amylase from an amyolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol 120. 1-8.
- Kelly, D., Smyth, J. A., and McCracken, K. J. (1991). Digestive development of the early-weaned pig. 2. effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. British Journal of Nutrition. Vol 65. Issue 2. 181-188.
- Khajeh, K., Hosseinkhani, S., and Mollania, N. (2009). Purification, biochemical characterization and sequence analysis of a phytate-resistant and thermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* spp. LH8. New Biotechnology. Vol 25. Article no S87.
- Kumar, S., and Khare, S. K. (2012). Purification and characterization of malto oligosaccharide-forming  $\alpha$ -amylase from moderately halophilic *Marinobacter* sp. EMB8. Bioresource Technology. Vol 116. 247-251.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol 227. 680-685.
- Lappalainen, A., Niku-Paavola, M. L., Suorti, T., and Poutanen, K. (1991). Purification and characterization of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase from enzymic starch modification. Starch/Stärke. Vol 43. 477-482.
- Lee, H. S., Shockley, K. R., Shut, G. J., Comes, S. B., Montero, C. I., Johnson, M. R., Chou, C. J., Bridger, S. L., Wigner, N., Brehm, S. D., Jenny, F. E. Jr., Comfort, D. A., Kelly, R. M., and Adams, M. W. W. (2006). Transcriptional and biochemical analysis of starch metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, The Journal of Bacteriology. Vol 188. Issue 6. 2115-2125.
- Li, D., Park, J. T., Li, X., Kim, S., Lee, S., Shim, J. H., et al. (2010). Overexpression and characterization of an extremely thermostable maltogenic amylase, with an

- optimal temperature of 100 degrees C, from the hyperthermophilic archaeon *Staphylothermus marinus*. N. Biotechnology Journal. Vol 27. 300-307.
- Li, L., Dong, F., Lin, L., He, D., Wei, W., and Wei, D. (2018). N-Terminal domain truncation and domain insertion- based engineering of a novel thermostable type I pullulanase from *Geobacillus thermocatenulatus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 66. Issue 41. 10788-10798.
- Lim, W. J., Park, S. R., An, C. L., Lee, J. Y., Hong, S. Y., Shin, E. C., et al. (2003). Cloning and characterization of a thermostable intracellular alpha-amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. Research in Microbiology. Vol 154. 681-687.
- Liu, X. D., and Xu, Y. (2008). A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. Bioresource Technology. Vol 99. 4315-4320.
- Lu, Z., Hu, X., Shen, P., Wang, Q., Zhou, Y., Zhang, G., and Ma, Y. (2018). A pH-stable, detergent and chelator resistant type I pullulanase from *Bacillus pseudofirmus* 703 with high catalytic efficiency. International Journal of Biological Macromolecules. Vol 109. 1302-1310.
- Machius, M., Wiegand, G., and Huber, R. (1995). Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase at 2.2 Å Resolution. Journal of Molecular Biology. Vol 246. Issue 4. 545-559.
- McCleary, B. V., Charmier, L. M. J., and McKie, V. A. (2019). Measurement of starch: critical evaluation of current methodology. Starch. Vol 71. Article no 1800146.
- Mielenz, J. R. (1983). *Bacillus stearothermophilus* contains a plasmid-borne gene for alpha-amylase. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol 80. Issue 19. 5975-5979.
- Mihajlovski, K. R., Radovanović, N. R., Veljović, Đ. N., Šiler-Marinković, S. S., and Dimitrijević-Branković, S. I. (2016). Improved  $\beta$ -amylase production on molasses and sugar beet pulp by a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. Industrial Crops and Products. Vol 80. 115-122.
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J. P. (2020). Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. Fermentation. Vol 6. Article no 23.
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Rouhani, S. M. R., Ehsani, A., and Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. Veterinary Research Forum. Vol 4. Issue 3. 179-183.

- Nigam, P. and Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme and Microbial Technology. Vol 17. Issue 9. 770-778.
- Nguyen, Q., Rezessy-Szabó, J. M., and Hoschke, Á. (2000). Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. Food Technology and Biotechnology. Vol 38. Issue 3. 229-234.
- Odibo, F. J. C., Okafor, N., and Okafor, B. U. (1992). Purification and immobilization of *Scytolidium* sp.  $\alpha$ -Amylase and its general properties. The Journal of General and Applied Microbiology. 1–11.
- Okwuenu, P. C., Agbo, K. U., Ezugwu, A. L., Eze, S. O., and Chilaka, F. C. (2017). Effect of divalent metal ions on glucoamylase activity of glucoamylase isolated from *Aspergillus niger*. Journal of Fermentation Technology. Vol 6. Issue 1. 1000141.
- Richardson, T. H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J. M., Robertson, D. E., and Miller, C. (2002). A novel, high performance enzyme for starch liquefaction discovery and optimization of a low pH, thermostable  $\alpha$ -amylase. Journal of Biological Chemistry. Vol 277. Issue 29. 26501-26507.
- Rengadu, D., Gerrano, A. S., and Mellem, J. J. (2020). Prebiotic effect of resistant starch from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (cowpea) using an in vitro simulated digestion model. International Journal of Food Science and Technology. Vol 55. 332–339.
- Rodtong, S. and Ishizaki, A. (2003). Potential microorganisms for the direct production of L-lactic acid from cassava starch without carbon dioxide production. Macro Review. Vol 16. Issue 1. 332-336.
- Ruediger, A., Jorgensen, P. L., and Antranikian, G. (1995). Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 61. 567–575.
- Rahardjo, Y. S., Sie, S., Weber, F. J., Tramper, J., and Rinzema, A. (2005). Effect of low oxygen concentrations on growth and  $\alpha$ -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. Biomolecular Engineering. Vol 21. Issue 6. 163-172.
- Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M. S., Muralikrishna, G., and Sreeramulu, K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. Process Biochemistry. Vol 44. 210–215.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D., and Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry. Vol 31. 135-152.

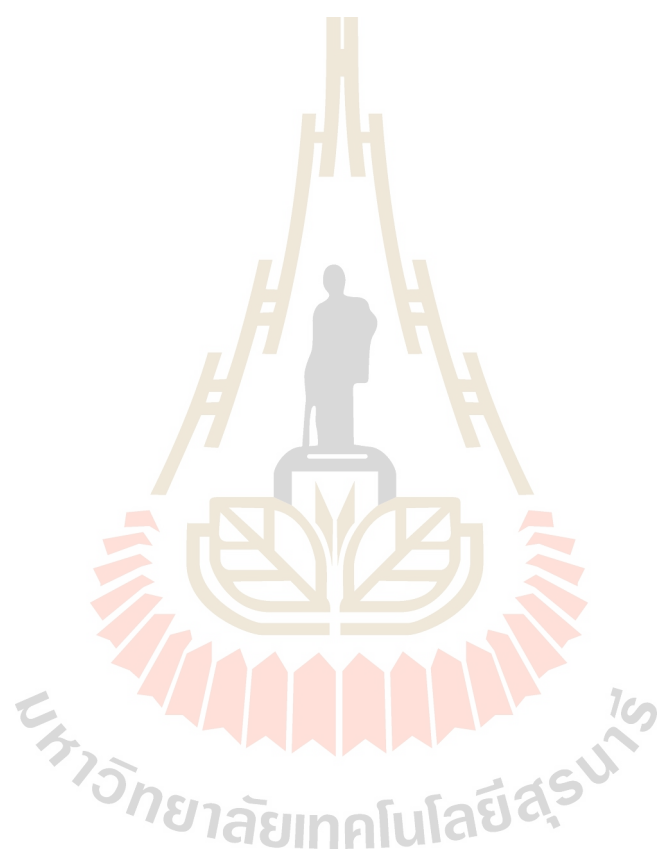
- Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Szakacs, G., and Pandey, A. (2005). Partial purification and characterization of alpha-amylase produced by *Aspergillus oryzae* using spent-brewing grains. Indian Journal of Biotechnology. Vol 4. Issue 4. 336-341.
- Petrov, K., Urshev, Z., and Petrova, P. (2008). l(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis* B84. Food Microbiology. Vol 25. Issue 4. 550-557.
- Plant, A. R., Morgan, H. W., and Daniel, R. M. (1986). A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1. Enzyme and Microbiology Technology. Vol 8. 668-672.
- Srivastava, R. and Baruah, J. (1986). Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 52. Issue 1. 179-184.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan, Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., and Pandey, A. (2006).  $\alpha$ -Amylases from microbial sources – An overview on recent developments. Food Technology and Biotechnology. Vol 44. Issue 2. 173-184.
- Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., and Soni, S. K. (2005). Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Process Biochemistry. Vol 40. Issue 2. 525-534.
- Syu, M.-J., and Chen, Y.-H. (1997). A study on the  $\alpha$ -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. Chemical Engineering Journal. Vol 65. Issue 3. 237-247.
- Takasaki, Y. (1993). Thermostable pullulanase its production with Microbacterium and its use in saccharification of starch. EU Patent. Patent no. EP 557637.
- Takasaki, Y., Tsuruta, T., Hayashi, S. and Imada, K. (1992). Reaction conditions for saccharification of liquified starch by a maltotriose-producing amylase from *Microbacterium imperiale* (in Japanese). Hakko Kogaku Kaishi. Vol 70. 255-258.
- Takenaka, S., Miyatake, A., Tanaka, K., Kuntiya, A., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P., Chaiyaso, T., Watanabe, M., and Yoshida, K. (2015). Characterization of the native form and the carboxy-terminally truncated halotolerant form of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* strain FP-133. Journal of Basic Microbiology. Vol 55. Issue 6. 780-789.
- Tanyildizi, M. S., Ozer, D., and Elibol, M. (2007). Production of bacterial  $\alpha$ -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. Biochemical Engineering Journal. Vol 37. 294-297.
- Timilsina, P. M., Pandey, G. R., Shrestha, A., Ojha, M., and Karli, T. B. (2020). Purification and characterization of a noble thermostable algal starch liquefying alpha-



- amylase from *Aeribacillus pallidus* BTPS-2 isolated from geothermal spring of Nepal. Biotechnology Reports. Vol 28. Article no e00551.
- Tomasik, P. and Horton, D. (2012). Chapter 2 - Enzymatic conversions of starch. In Derek, H. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. pp. 59-436. Elsevier: Oxford, UK.
- Tümer, E. H. and Erbil, H. Y. (2021). Extrusion-based 3D printing applications of PLA composites: A review. Coatings. Vol 11. Article no 390.
- Usansa, U., Sompong, N., Wanapu, C., Boonkerd, N., and Teaumroong, N. (2009). The Influences of steeping duration and temperature on the  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. *Indica*). Journal of the Institute of Brewing. Vol 115. Issue 2. 140-147.
- Viel, M., Collect, F., and Lanos, C. (2018). Chemical and multi-physical characterization of agro-resources' by-product as a possible raw building material. Industrial Crops & Products. Vol 120. 214-237.
- Vishnu, C., Seenayya, G., and Reddy, G. (2002). Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol 18. Issue 5. 429-433.
- Viswanathan, P., and Surlikar, N. R. (2001). Production of  $\alpha$ -amylase with *Aspergillus flavus* on amaranthus grains by solid-state fermentation. Journal of Basic Microbiology. Vol 41. Issue 1. 57-64.
- van der Maarel, M. J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. Journal of Biotechnology. Vol 94. Issue 2. 137-155.
- Wang, S. L., Liang, Y. C., and Liang, T. W. (2011). Purification and characterization of a novel alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. Process Biochemistry. Vol 46. 745-750.
- Wang, X., Chen, Y., Nie, Y., and Xu, Y. (2019). Improvement of extracellular secretion efficiency of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli*: Peptide fusion and cell wall modification. Protein Expression and Purification. Vol 155. 72-77.
- Waśko, A., Polak-Berecka, M., and Targonski, Z. (2010). A new protein of alpha-amylase activity from *Lactococcus lactis*. Journal of microbiology and biotechnology. Vol 20. Issue 9. 1307-1313.
- Waśko, A., Polak-Berecka, M., and Targoński, Z. (2011). Purification and characterization of pullulanase from *Lactococcus lactis*. Preparative Biochemistry & Biotechnology. Vol 41. Issue 3. 252-261.



- Yan, S. and Wu, G. (2017). Bottleneck in secretion of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis*. Microbial Cell Factories. Vol 16. Article no 124.
- Zhang, S., Guo, Z., Wu, X., Ou, X., Zong, M., and Luo, W. (2020). Recombinant expression and characterization of a novel cold-adapted type I pullulanase for efficient amylopectin hydrolysis. Journal of Biotechnology. Vol 313. 39-47.



# ภาคผนวก





# ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## ส่วนที่ 1 น้ำยาและสารเคมีสำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแล็กติก

### 1.1 การระบุพื้นฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย (Gram staining)

#### 1.1.1 Crystal violet (Primary stain)

Crystal violet	2.00	กรัม
Ethanol	20.00	มิลลิลิตร
ละลาย Crystal violet ด้วย Ethanol		
Ammonium oxalate (ความเข้มข้น 1%)	80.00	มิลลิลิตร

#### 1.1.2 Gram's iodine (Stabilizer of primary stain)

Iodine	0.33	กรัม
Potassium iodide	0.67	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น	100.00	มิลลิลิตร

#### 1.1.3 Decolorizer

Absolute ethanol	50.00	มิลลิลิตร
Acetone	50.00	มิลลิลิตร

#### 1.1.4 Safranin (Counter/ secondary stain)

Safranin O (ความเข้มข้น 2.5% ใน 95% Ethanol)	10.00	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

### 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียแล็กติก (Culture media for lactic acid bacteria)

#### 1.2.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS: commercial)

Beef extract	10.00	กรัม
Meat peptone	10.00	กรัม
Yeast extract	5.00	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.00	กรัม
Sodium citrate	2.00	กรัม
Sodium acetate	5.00	กรัม
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.10	กรัม
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
Tween 80	1.00	กรัม
Glucose	20.00	กรัม
*** Agar	15.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH) เท่ากับ  $7.0 \pm 0.2$  ที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$   
จากนั้นนำส่วนประกอบไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่  
อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

\*\*\* เติมส่วนผสมนี้ หากต้องการทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Solid medium)

### 1.2.2 Modify Lactobacillus MRS medium (RAM) (Rodtong and Ishizaki, 2003)

Pancreatic digest of casein or Tryptone	5.00	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	6.00	กรัม
Yeast extract	3.00	กรัม
tri-Ammonium citrate	1.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.57	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.12	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.03	กรัม
Cassava starch	10.00	กรัม
*** Agar	15.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH) เท่ากับ  $7.0 \pm 0.2$  ที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$   
จากนั้นนำส่วนประกอบไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่  
อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

\*\*\* เติมส่วนผสมนี้ หากต้องการทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Solid medium)

### 1.2.3 Developed RAM (dRAM)

Yeast extract FP101	1.00	กรัม
Potassium hydrogen phosphate	6.00	กรัม
Cassava starch	4.50	กรัม
*** Agar	15.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH) เท่ากับ  $8.5 \pm 0.2$  ที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$   
จากนั้นนำส่วนประกอบไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่  
อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

\*\*\* เติมส่วนผสมนี้ หากต้องการทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Solid medium)

### 1.2.4 Developed with Element RAM medium (deRAM)

Yeast extract FP101	1.00	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	6.00	กรัม

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.57	กรัม
FeSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.03	กรัม
Cassava starch	10.00	กรัม
*** Agar	45.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH) เท่ากับ 8.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25°ซ		
จากนั้นนำส่วนผสมไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที		
*** เติมส่วนผสมนี้ หากต้องการทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Solid medium)		

### 1.3 สารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (10X Phosphate buffer saline)

Disodium hydrogen phosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	14.40	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.40	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	80.00	กรัม
Potassium chloride (KCl)	2.00	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ 7.2±0.2 ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที		

## ส่วนที่ 2 น้ำยาและสารเคมีสำหรับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง

### 2.1 สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitro salicylic colorimetric: DNS reagent)

3,5-Dinitrosalicylic acid	7.06	กรัม
Sodium hydroxide	13.42	กรัม
Potassium sodium tartrate	216.10	กรัม
Phenol	5.37	กรัม
Sodium metabisulfite (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	5.86	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 2.2 สารละลายไอโอดีน (Lugol's iodine solution)

Potassium iodide (KI)	10.00	กรัม
Iodine	5.00	กรัม
ละลาย KI ใน 20-30 มิลลิลิตรน้ำกลั่น จนกระทั่งละลายเข้ากันได้ดี		
จากนั้นจึงเติม Iodine แล้วค่อย ๆ คนให้ละลาย และอุ่นให้ความร้อน		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร



## 2.3 สารละลายในการหากิจกรรมย่อยแบ่งของชุดทดสอบทางการค้า

### 2.3.1 ตัวหยุดปฏิกิริยา ① (1% w/v Tris-sodium phosphate)

Tris-sodium phosphate ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ )	10.00	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $11.0 \pm 0.2$ ด้วย NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 2.3.2 ตัวหยุดปฏิกิริยา ② (1% w/v Tris-HCl)

Tris	10.00	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $8.5 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 2.3.3 ตัวหยุดปฏิกิริยา ③ (2% w/v Tris-HCl)

Tris	20.00	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $9.0 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 2.3.4 ตัวหยุดปฏิกิริยา ④ (2% w/v Tris-HCl)

Tris	20.00	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $8.5 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

## ส่วนที่ 3 น้ำยาและสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์คุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์

### 3.1 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (Acetate buffer)

Acetic acid ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )	1.96	มิลลิลิตร
Sodium acetate	5.52	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $5.0 \pm 0.2$ ด้วย acetic acid หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 3.2 สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (Citrate buffer)

Citric acid ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8$ )	17.41	กรัม
Sodium citrate dihydrate ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$ )	2.76	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $3.0 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 3.3 สารละลายไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (Glycine-HCl buffer)

Glycine	7.51	กรัม
HCl	832.00	มิลลิกรัม
ปรับ pH เท่ากับ $3.0 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 3.4 สารละลายเมเลทบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (Malate buffer)

Malic acid ( $C_4H_6O_5$ )	13.21	กรัม
NaCl	5.80	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $6.5 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 3.5 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (Tris-HCl buffer)

Tris	12.11	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $8.0 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 3.6 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 mM (Tris-HCl buffer: Mobile phase A)

Tris	6.06	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $8.5 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

### 3.7 สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 M ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 mM (50 mM Tris-HCl containing 1 M NaCl buffer: Mobile phase B)

Tris	6.06	กรัม
NaCl	58.40	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ $8.5 \pm 0.2$ ด้วย HCl หรือ NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

## ส่วนที่ 4 น้ำยาและสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและรูปแบบโปรตีนบนสนามไฟฟ้า

### 4.1 สารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent)

Coomassie brilliant blue-G250	500.00	มิลลิกรัม
Absolute ethanol	25.00	มิลลิลิตร
85% Phosphoric acid	50.00	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร	500.00	มิลลิลิตร

#### 4.2 สารละลายอะคริลลาไมด์ (30%T, 2.7%C)

Acrylamide	73.00	กรัม
N, N'-methylene-bis-acrylamide	2.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI) แล้วปรับปริมาตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ 4°C	250.00	มิลลิลิตร

#### 4.3 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเจลแยกเข้มข้น 1.5 M (4X Running gel buffer)

Tris	45.40	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ 8.8±0.2 ด้วย Conc. HCl		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บอุณหภูมิ 4°C	250.00	มิลลิลิตร

#### 4.4 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเจลกักเข้มข้น 0.5 M (4X Stacking gel buffer)

Tris	15.00	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ 6.8±0.2 ด้วย Conc. HCl		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บอุณหภูมิ 4°C	250.00	มิลลิลิตร

#### 4.5 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10%

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	50.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร	500.00	มิลลิลิตร

#### 4.6 สารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (Initiator solution)

Ammonium per sulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	0.10	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI ปริมาตร	1.00	มิลลิลิตร
*** เตรียมก่อนใช้		

#### 4.7 สารละลายแท็งก์บัฟเฟอร์ (4X Tank buffer)

Tris	24.00	กรัม
Glycine	115.20	กรัม
Sodium Dodecyl Sulfate	8.00	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ 8.3±0.2 ด้วย Conc. HCl		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร	2,000.00	มิลลิลิตร

#### 4.8 สารละลายโบรมอฟีนอลบลูเข้มข้น 1%

Bromophenol blue	0.10	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับ ปริมาตร	10.00	มิลลิลิตร

#### 4.9 สารละลายทรีทเมนต์บัฟเฟอร์ (2X Treatment buffer)

Stacking gel buffer	6.25	มิลลิลิตร
10% SDS	10.00	มิลลิลิตร
Glycerol	5.00	มิลลิลิตร
$\beta$ -Mercaptoethanol or BME	2.50	มิลลิลิตร
1% Bromophenol blue	0.50	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร	25.00	มิลลิลิตร
ผสมแล้ว aliquot ลงใน microcentrifuge tube หลอดละ เก็บที่ อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส	1.00	มิลลิลิตร

#### 4.10 สารละลายตรึงโปรตีน (Fixing solution)

Methanol	50.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	12.00	มิลลิลิตร
Formaldehyde	50.00	ไมโครลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร *** เตรียมก่อนใช้	100.00	มิลลิลิตร

#### 4.11 สารละลายสำหรับล้างเจล (Washing gel solution)

Methanol	250.00	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI	500.00	มิลลิลิตร

#### 4.12 สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 1.3 mM (Sodium thiosulfate solution)

Sodium thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	50.00	มิลลิกรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร *** เตรียมก่อนใช้	250.00	มิลลิลิตร

#### 4.13 สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 11.8 mM ( $\text{AgNO}_3$ reagent)

Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ )	500.00	มิลลิกรัม
Formaldehyde	188.00	ไมโครลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร *** เตรียมก่อนใช้	250.00	มิลลิลิตร

#### 4.14 สารละลายย้อมสีเจล (Developed solution)

Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60.00	กรัม
1.3 mM Sodium thiosulfate	20.00	มิลลิลิตร
Formaldehyde	188.00	ไมโครลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร *** เตรียมก่อนใช้	1,000.00	มิลลิลิตร

#### 4.15 สารละลายหยุดย้อม (Stop solution)

Methanol	50.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	12.00	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร	100.00	มิลลิลิตร

### ส่วนที่ 5 น้ำยาและสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ร่วม (ตะกอนแป้ง)

#### 5.1 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total carbohydrate)

##### 5.1.1 สารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.5 M

HCl	41.70	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรปริมาตร	250.00	มิลลิลิตร

##### 5.1.2 สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5%

Phenol crystal	25.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรปริมาตร	500.00	มิลลิลิตร

#### 5.2 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch)

##### 5.2.1 สารละลายเอทานอลเข้มข้น 80%

Absolute ethanol	400.00	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรปริมาตร	500.00	มิลลิลิตร

##### 5.2.2 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 M

Potassium hydroxide (KOH)	112.2	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร
เก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

##### 5.2.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 M

NaOH	160.00	กรัม
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

**5.2.4 สารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 1.2 M**

Glacial acetic acid	69.6	มิลลิลิตร
ปรับ pH เท่ากับ $3.8 \pm 0.2$ ด้วย 4 M NaOH		
ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร



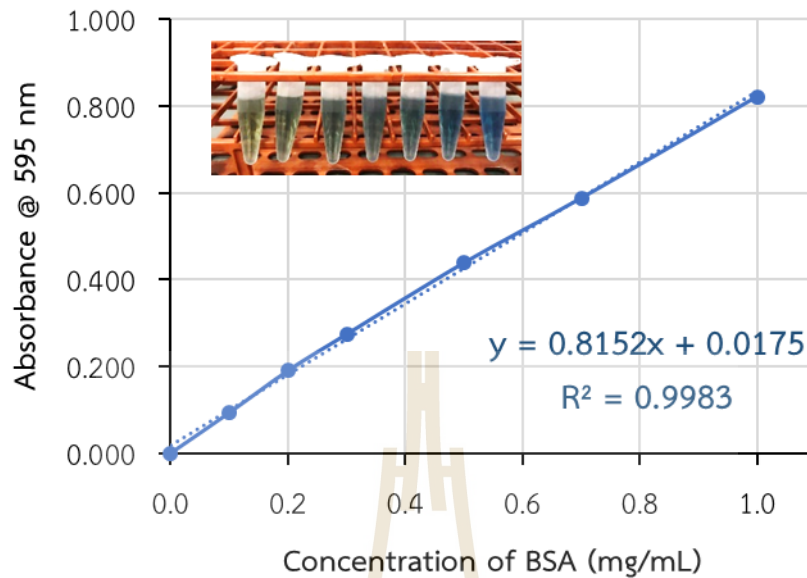


# ภาคผนวก ข

แผนภูมิความสัมพันธ์ของสารมาตรฐาน

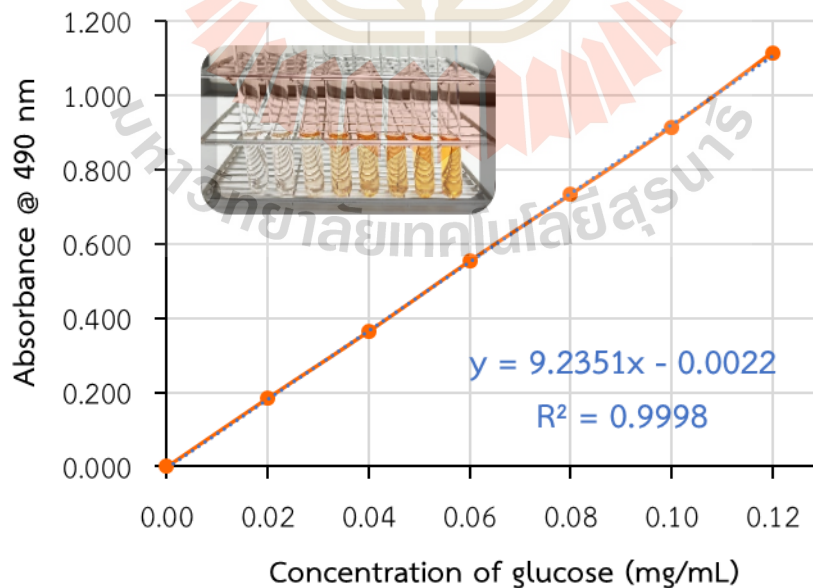
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 1. ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford method



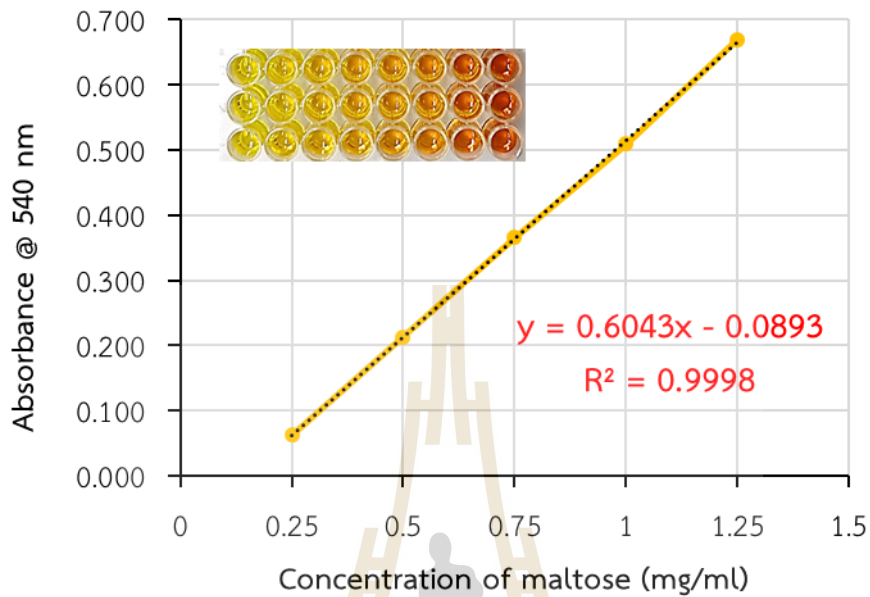
รูปภาพผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 595 นาโนเมตร

## 2. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)



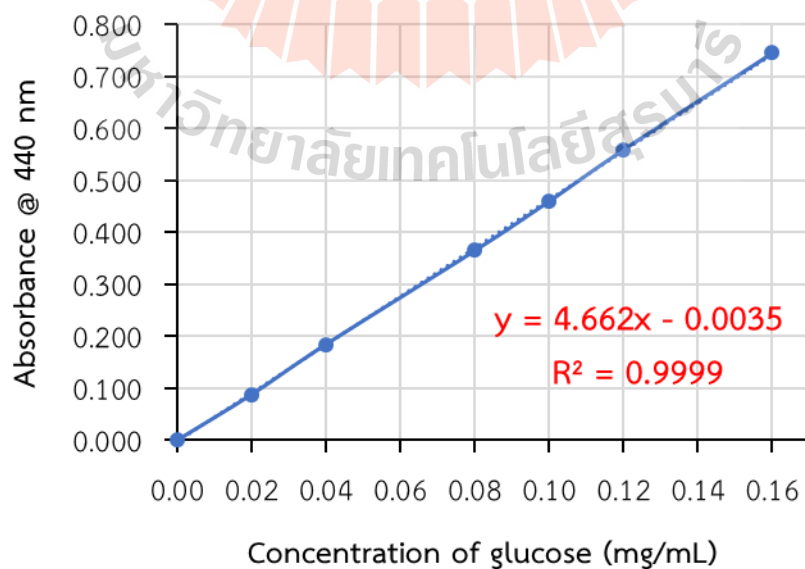
รูปภาพผนวกที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 490 นาโนเมตร

### 3. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด (Total reducing sugar)



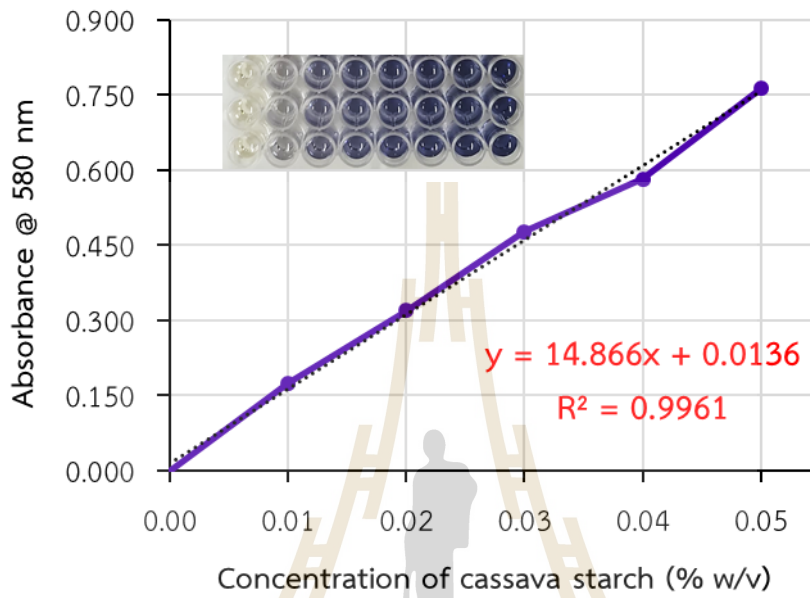
รูปภาคผนวกที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมอลโทสมมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 นาโนเมตร

### 4. ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch)



รูปภาคผนวกที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 440 นาโนเมตร

#### 5. ปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอดีน (Starch content by iodine method)



รูปภาคผนวกที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมาตรฐาน (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร) และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 580 นาโนเมตร

# ประวัติผู้วิจัย



## 1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1.1 ชื่อ รองศาสตราจารย์ ดร. จีรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล (Assoc. Prof. Dr. Jirawat Yongsawatdigul)

### 1.2 หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000  
โทร 044-22-4359 โทรสาร 044-22-4387  
E-mail: jirawat@sut.ac.th

### 1.3 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา (สาขาวิชา)	วิชาเอก	สถาบันศึกษา	ประเทศ
2539	Ph.D. (Food Science and Technology)	Seafood chemistry	Oregon State University	อเมริกา
2535	M.S. (Food Science)	Food processing	University of Wisconsin-Madison	อเมริกา
2532	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต) เกียรตินิยมอันดับ 2	เทคโนโลยีอาหาร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

### 1.4 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการพิเศษ

- โปรตีน เพปไทด์ และเอนไซม์สำหรับเทคโนโลยีการอาหาร
- การใช้ประโยชน์จากวัสดุชีวภาพเหลือทิ้งจากฟาร์ม-อุตสาหกรรม เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพมูลค่าสูง
- การใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักโปรตีน
- วิทยาศาสตร์ทางด้านโปรตีนหลังการเก็บเกี่ยวในระดับโมเลกุล
- กระบวนการแปรรูปและคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากโปรตีนปลา

### 1.5 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

1.5.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: จำนวน 50 โครงการ

1.5.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียนในประเทศไทย: จำนวน 1 สิทธิบัตร

1.5.3 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการวารสารระดับชาติ 2 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ 108 เรื่อง



## 2. ผู้ร่วมวิจัย

2.1 ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรียลักษณ์ รอดทอง (Asst. Prof. Dr. Sureelak Rodtong)

### 2.2 หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาวิชาปริคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
 เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000  
 โทรศัพท์ 044-22-4297, 044-22-4673, 08-8469-6190  
 โทรสาร 044-22-4185  
 E-mail: sureelak@sut.ac.th, sureelakr@gmail.com

### 2.3 ประวัติการศึกษา:

ปีที่จบ	วุฒิการศึกษา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2536	Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	นิวซีแลนด์
2533	PGDip.Sci. (Biotechnology) with Credit	University of Otago	นิวซีแลนด์
2527	วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2524	วท.บ. (ชีววิทยา เลือุกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย

### 2.4 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการพิเศษ

- พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์
- การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา)
- ความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร พลาสติกชีวภาพ พอลิเมอร์ชีวภาพ และพลังงาน

### 2.5 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

2.5.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: จำนวน 61 โครงการ

2.5.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียนในประเทศไทย: จำนวน 6 คำขอ

#### 2.5.3 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ  
วารสารระดับชาติ 22 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ 51 เรื่อง
- ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ  
ระดับชาติ 107 เรื่อง และระดับนานาชาติ 101 เรื่อง