บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของแบซิลลัส 9 สายพันธุ์

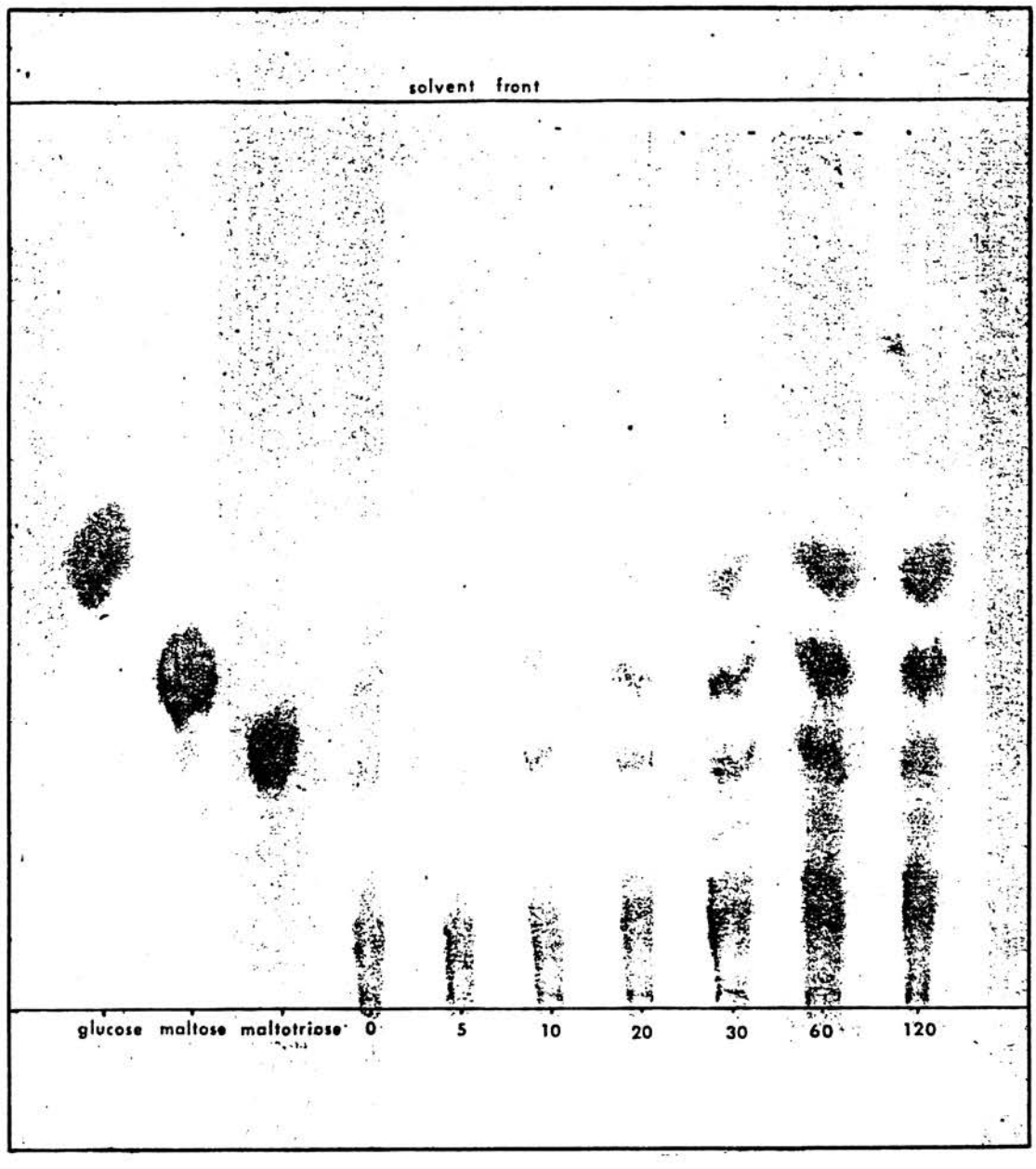
จากการเลี้ยงแบซิลลัส 9 สายพันธุ์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้งตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 เพื่อเปรียบเทียบและคัดเลือกแบซิลลัส สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำงานสูงสุด พบว่า B. amyloliquefaciens KA 63 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในตารางที่ 7 ดังนั้นจึงเลือก B. amyloliquefaciens KA 63 สำหรับการศึกษาการผลิตแอลฟาอะไมเลส ในการวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของแบซิลลัส 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์แบซิลลัส	หน่วยการทำงาน (unit activity) หน่วย/มล.	การทำงานสัมพัทธ์ (relative activity) ร้อยละ
B. amyloliquefaciens KA 63	49.0	100
Bacillus sp. สายพันธุ์ ASRCT B-14	1.19	2.43
Bacillus sp. สายพันธุ์ ASRCT B-15	1.18	2.41
Bacillus sp. สายพันธุ์ ASRCT B-10	0.97	1.98
Bacillus sp. สายพันธุ์ AMY 3	0.96	1.96
B. cereus	0.94	1.92
Bacillus sp. สายพันธุ์ B # 2	0.28	0.57
Bacillus sp. สายพันธุ์ AMY 2	0.18	0.36
Bacillus sp. สายพันธุ์ AMY 1	0.09	0.18

2. การตรวจสอบประเภทของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 โดยเอล์เซนดิงเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี

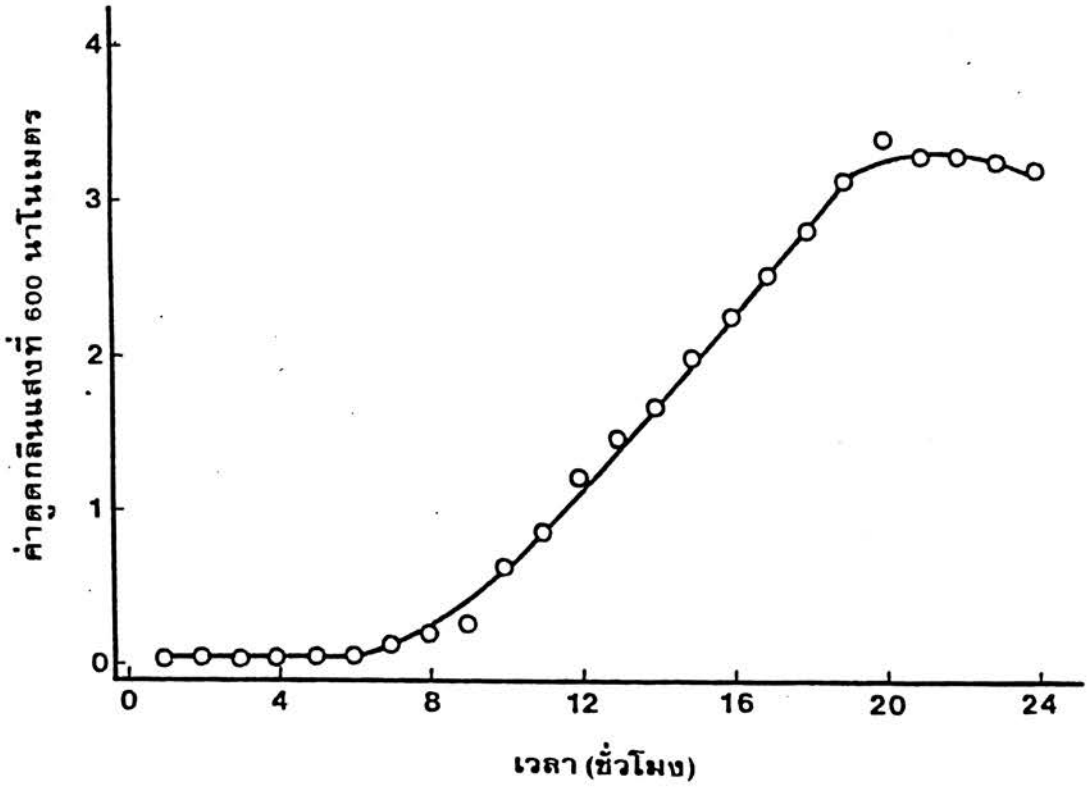
จากการนำสารละลายผสมของแป้ง และเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 ซึ่งบ่มไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ กันมาทำเอล์เซนดิงเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5 เพื่อตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ และตัดสินประเภทของเอนไซม์ พบว่าที่เวลา 5-10 นาที จะมีมอลโตสและมอลโตไตรโอสเกิดขึ้นแล้ว ในขณะที่ไม่มีกลูโคสเกิดขึ้นเลย แสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่กลูโคอะไมเลส ที่เวลา 20-120 นาที เริ่มมีกลูโคสเกิดขึ้น แสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่เบตาอะไมเลส ดังแสดงในรูปที่ 2 นอกจากนี้ยังมีมอลโตไตรโอสเหลืออยู่ที่ทุกจุดเวลา ซึ่งเป็นข้อยืนยันได้อีกว่าเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 น่าจะเป็นแอลฟาอะไมเลส



รูปที่ 2 เปเปอร์โครมาโตแกรมของสารละลายผสมของสับสเตรทกับเอนไซม์ที่ผลิต B.amyloliquefaciens KA 63 ที่เวลา 0 5 10 20 30 60 และ 120 นาที เทียบกับสารละลายมาตราฐานกลูโคส มอลโตส และมอลโตไตรโอส โดยใช้ตัวทำละลายผสม 1-โพรพานอลและน้ำในอัตราส่วน 7 : 3 ตามลำดับ

3. การศึกษาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อ B. amyloliquefaciens KA 63

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 วัดค่าดูดกลืนแสงของสารแขวนลอยของเซล (cell suspension) ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อทุกชั่วโมง เพื่อศึกษาระยะการเจริญ พบว่าเชื้อเริ่มเข้าระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ในชั่วโมงที่ 7 และเข้าระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 19 ดังแสดงในรูปที่ 3 ดังนั้นจึงเลือกเชื้อที่มีอายุ 15 ชั่วโมง สำหรับเป็นหัวเชื้อของการผลิตแอลฟาอะไมเลส เนื่องจากเป็นจุดกึ่งกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid-log phase) ซึ่งเชื้อจะมีความว่องไวในการแบ่งตัวมากที่สุด



รูปที่ 3 การเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

4. การศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการทำงานของแอลฟาอะไมเลส ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรทกับอัตราเร็วของปฏิกริยา

จากการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ ร้อยละ 0.1 0.5 1.0 2.0 -3.0 และ 4.0 คำนวณอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็น มก.มอลโตส/นาที เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรทกับอัตราเร็วของปฏิกิริยา พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรทและอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นเส้นตรง ในช่วงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทเป็นร้อยละ 0.1 ถึง 1.0 ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งแสดงว่าในช่วงนี้เป็นปฏิกิริยาอันดับ 1 อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรทไม่เหมาะที่จะใช้เป็นสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเป็นร้อยละ 2.0 เพราะเป็นช่วงที่เป็นปฏิกิริยา อันดับศูนย์ อัตราเร็วของปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรท นั่นคือ มีปริมาณสับสเตรทมากเกินพอ

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

จากการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ พบว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นเส้นตรงในช่วง 3 นาทีแรก ดังแสดงในรูปที่ 5 ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลา 3 นาที ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ในการวิจัยขั้นต่อไป

4.3 สภาพความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ คือ อะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่ค่าพีเอช 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 และทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 8.0 8.5 และ 9.0 สำหรับทำเอนไซม์เจือจางและเตรียมสารละลายสับสเตรท เพื่อศึกษาสภาพความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีการทำงานสูงสุดเมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ดังแสดงในรูปที่ 6 ดังนั้นจึงเลือกสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 สำหรับการวิจัยขั้น

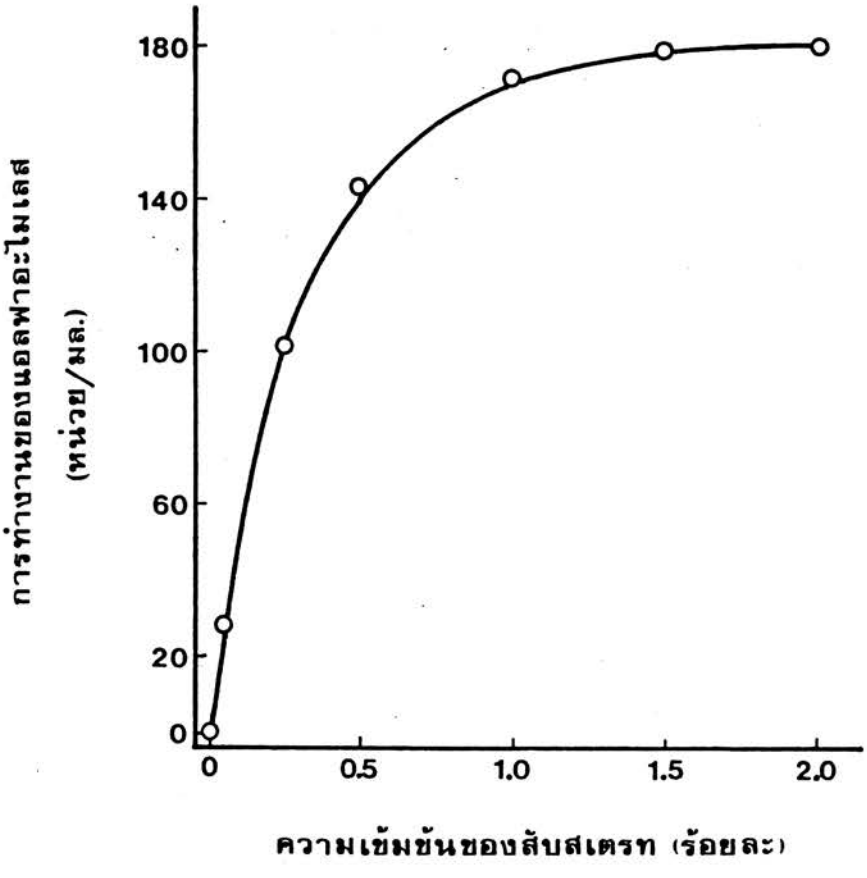
ต่อไป

4.4 <u>ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

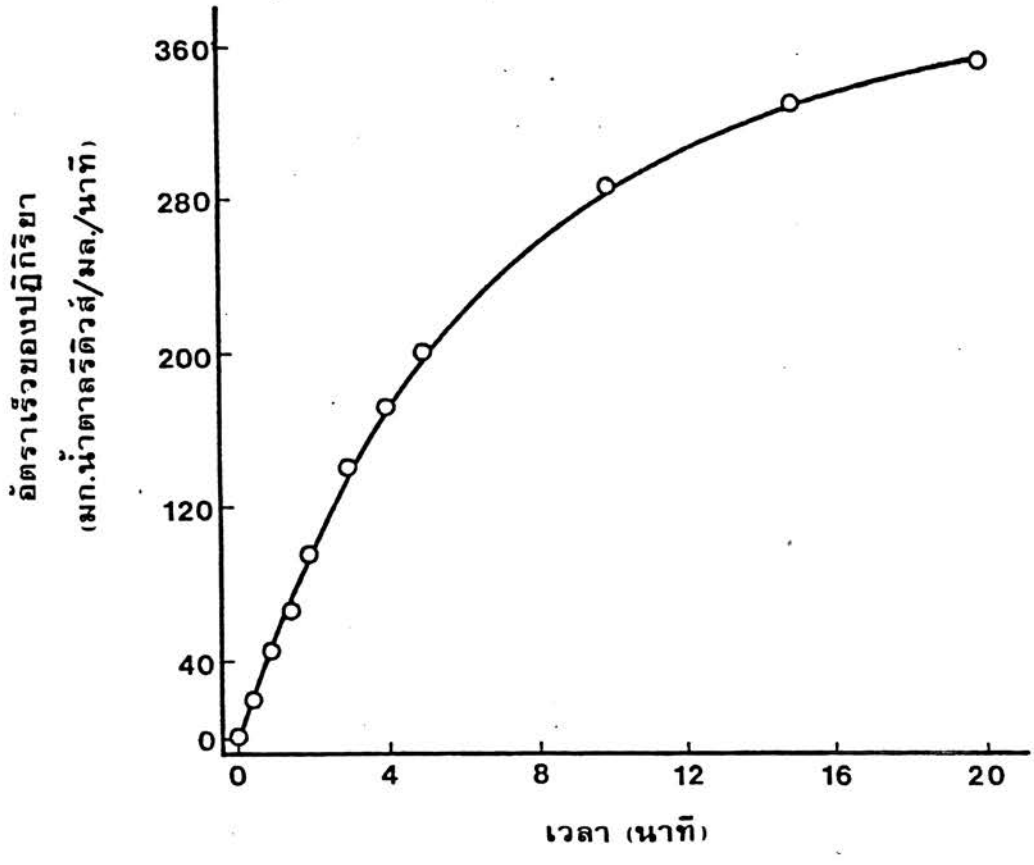
จากการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0 20 50 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ สำหรับทำเอนไซม์เจือจาง และเตรียมสารละลายสับสเตรท เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า-เอนไซม์มีการทำงานสูงสุด เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เข้มข้น 20 มิลลิ-โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 7 ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นนี้ สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป

4.5 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

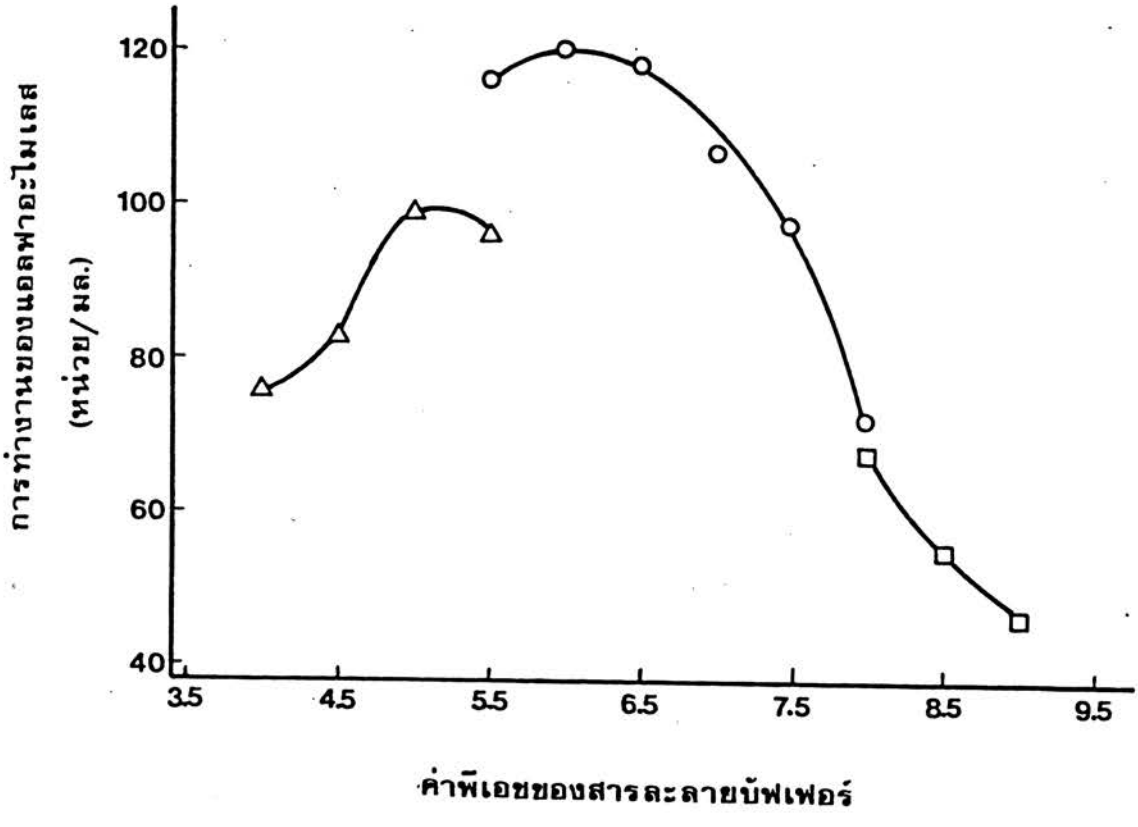
จากการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30 40 45 50 55 60 65 70 75 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์มีการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซล-เซียส ดังแสดงในรูปที่ 8 ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในการวิจัยขั้นต่อไป



รูปที่ 4 อิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นผันแปรความเข้มข้นของสับสเตรท

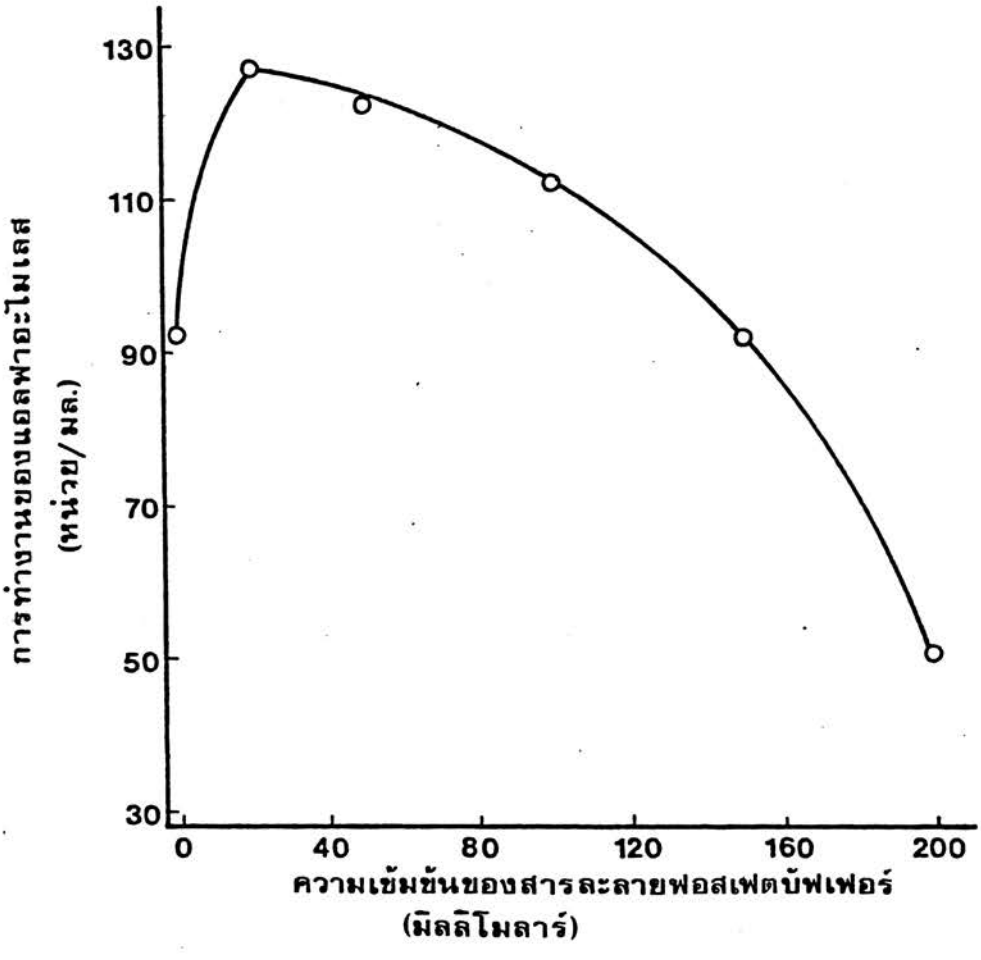


รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวส์กับเวลา เมื่อบ่มสับสเตรทเข้มข้นร้อยละ 2 กับแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีของ Bernfeld

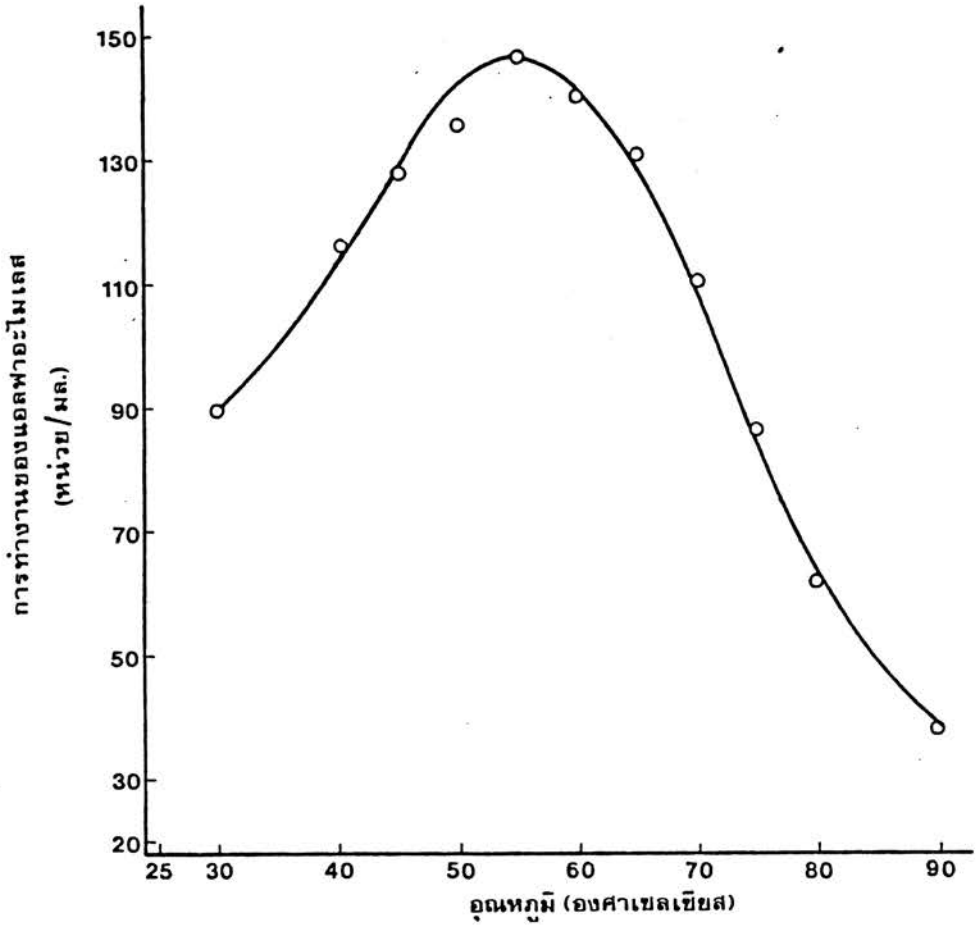


รูปที่ 6 ผลของค่าพีเอชต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในย่วงพีเอชต่าง ๆ กัน

- o ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 5.5-8.0)
- △ อะซีเตทบัฟเฟอร์ (พีเอช 4.0-5.5)
- □ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (พีเอช 8.0-9.0)



รูปที่ 7 ผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ โดยวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นผันแปรความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0



รูปที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 ยกเว้นบ่มสารละลายเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิต่าง ๆ

5. การศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลส โดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในขวดแก้วทรงกรวย

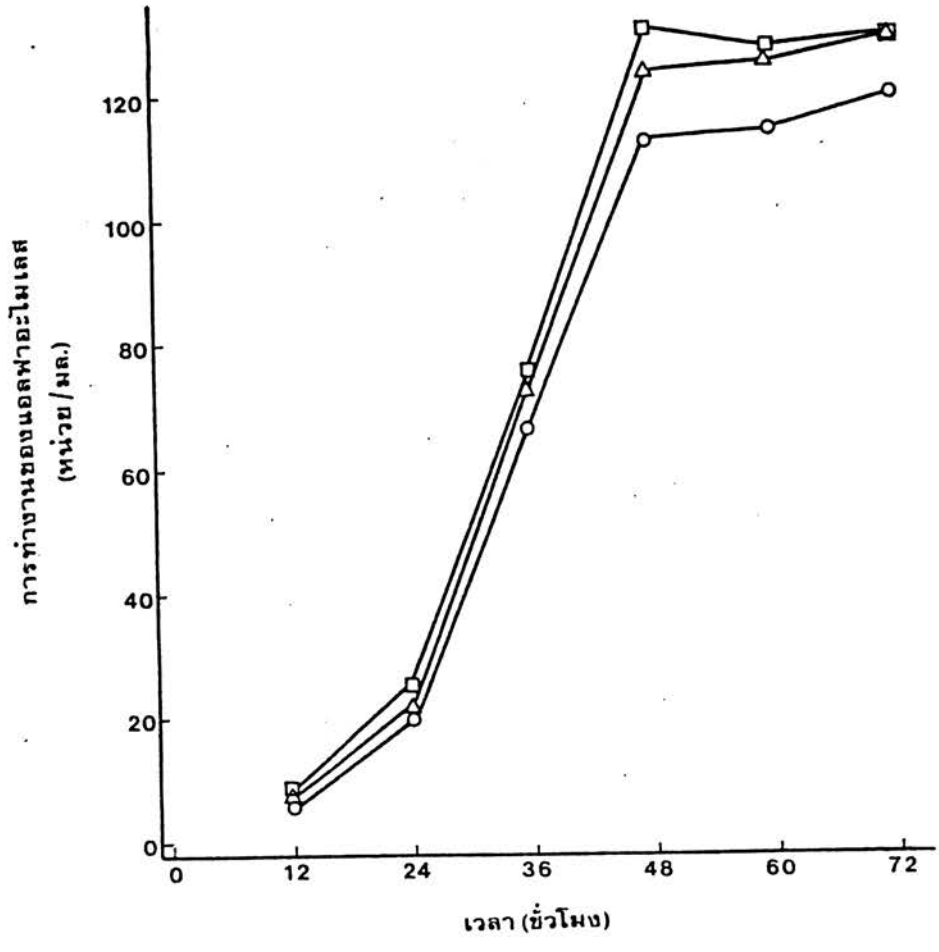
5.1 สภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นปรับค่าพีเอชของอาหารด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดเกลือเข้มข้น 1 โมลาร์ให้เป็น 6.0 7.0 และ 8.0 และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่า ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของ B. amyloliquefaciens KA 63 ไม่แตกต่างกันสำหรับเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.0 และ 7.0 และแตกต่างจากเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0 เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 9 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชของอาหารในขณะที่เชื้อเจริญ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกัน และได้ค่าพีเอชสุดท้ายใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 10 ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงไม่จำเป็นต้องปรับค่าพีเอชของอาหารด้วยกรดหรือด่าง ซึ่งอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก 1.3) ถ้าไม่มีการปรับค่าพีเอชด้วยกรดหรือด่าง จะมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.0-6.5

5.2 อุณหภูมิสำหรับการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 11 ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมินี้สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป

I16673876

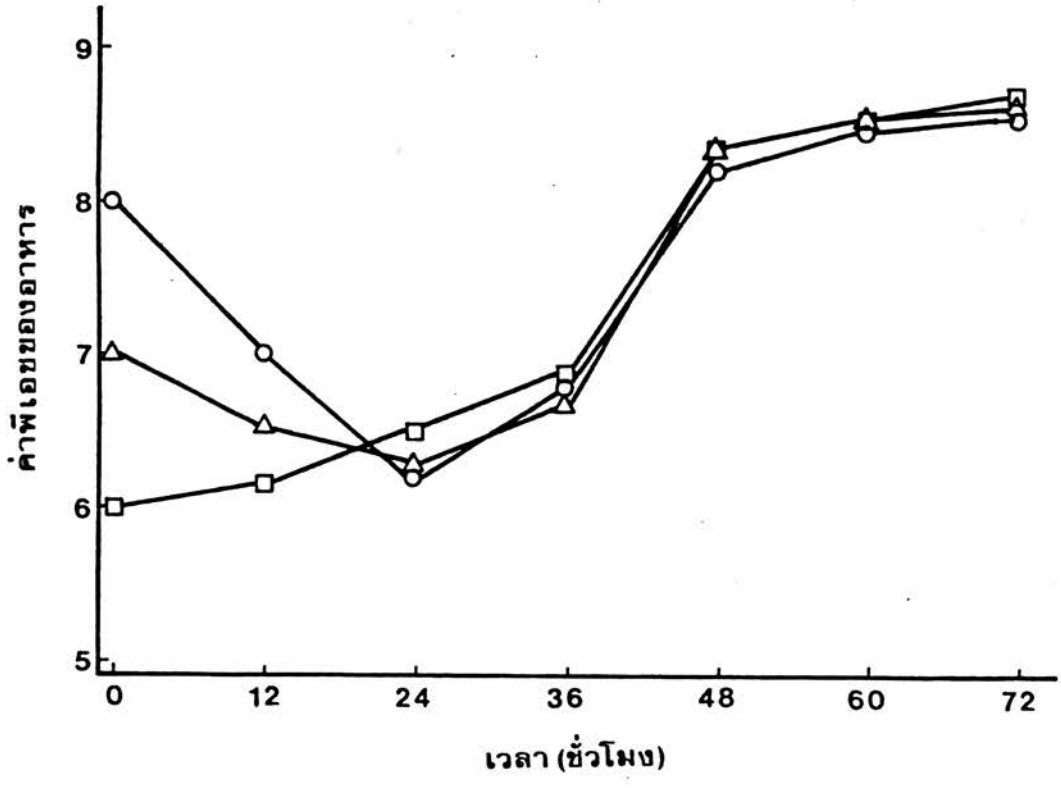


รูปที่ 9 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้น ที่ระดับต่าง ๆ กัน ในขวดแก้วทรงกรวย

□ พีเอช 6.0

△ พีเอช 7.0

○ พีเอช 8.0

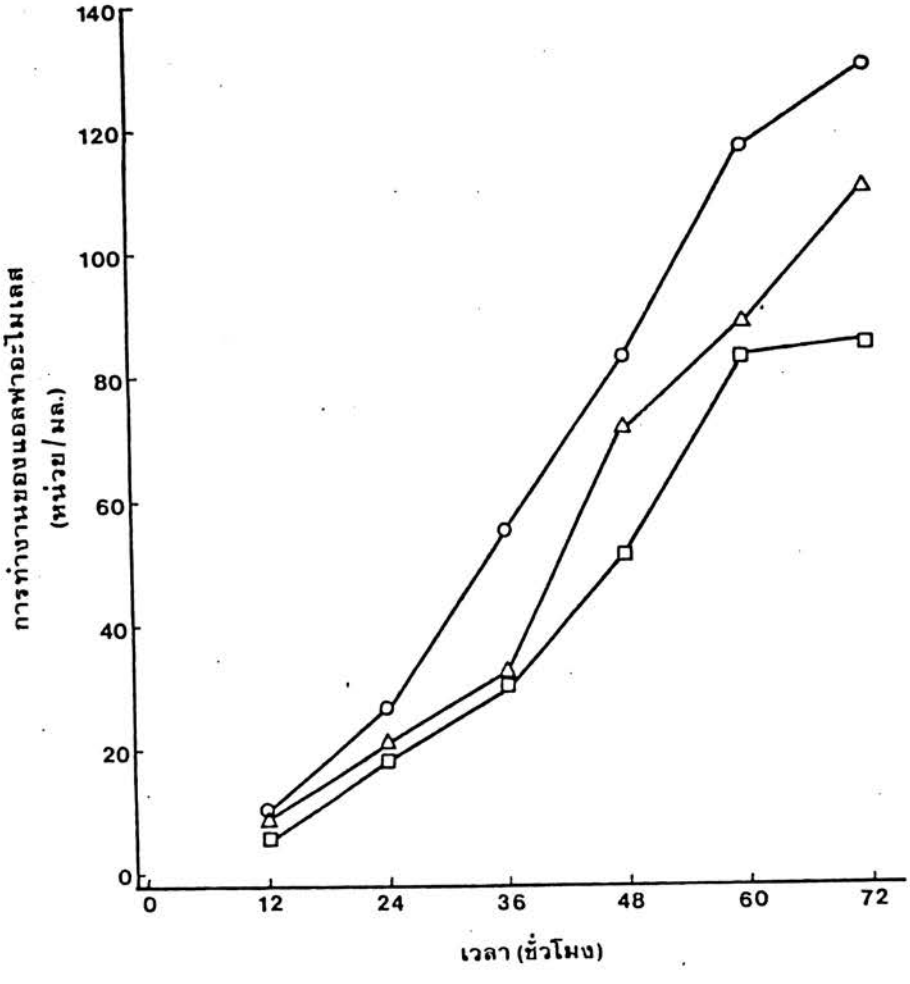


รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเมื่อเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ในอาหารที่มีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นที่ระดับต่าง ๆ ในขวดแก้วทรงกรวย

□ พีเอช 6.0

△ พีเอช 7.0

○ พีเอช 8.0



รูปที่ 11 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในขวดแก้วทรงกรวย

o อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

△ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

□ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.3 องค์ประกอบของอาหาร

5.3.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน ดังนี้

1. กากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันปริมาณร้อยละ 4

2. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

3. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันรวมทั้งกากเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

4. กากรำข้าวจากการสกัดน้ำมัน ปริมาณร้อยละ 4

5. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวจากการสกัดน้ำมันเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

6. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวจากการสกัดน้ำมันรวมทั้งกากเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

โดยวิธีการเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองและรำข้าวกล่าวไว้ในภาคผนวก 1.6 (43) และวิเคราะห์การทำงานตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 12

5.3.2 ปริมาณกากถั่วเหลือง

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองเป็นร้อยละ 2 3 4 6 8 และ 10 และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุดทั้งที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเอนไซม์จะมีการทำงานสูงขึ้นเมื่อปริมาณกากถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น และสูงที่สุดเมื่อมีกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 หลังจากนั้นการเพิ่มปริมาณกากถั่วเหลืองจะทำให้เอนไซม์มีการทำงานลดลง ดังแสดงในรูปที่ 13

5.3.3 ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ใน

บทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็นร้อยละ 1 2 3 5 7 และ 9 และวิเคราะห์การทำงานตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่า เมื่อปริมาณแป้งเพิ่มขึ้นทำให้เอนไซม์มีการทำงานสูงขึ้น และการเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังจะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อปริมาณแป้งมันสำปะหลังสูงกว่าร้อยละ 3 ดังแสดงในรูปที่ 14

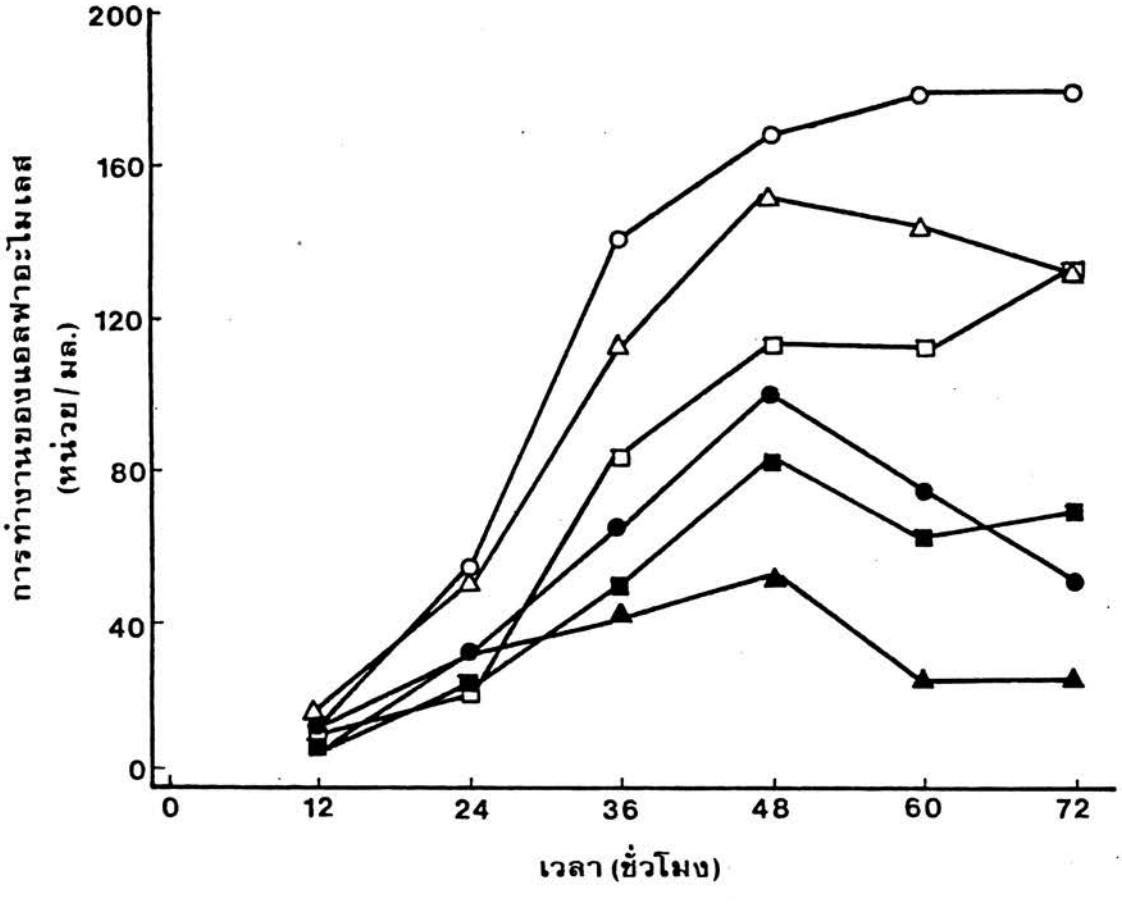
5.3.4 ผลร่วมกันของปริมาณกากถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลัง

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลัง และกากถั่วเหลือง โดยใช้การทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design experiment) 2 ตัวแปร 3 ระดับ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ระดับของปริมาณกากถั่วเหลืองที่ผันแปร คือ 3 4 และ 5

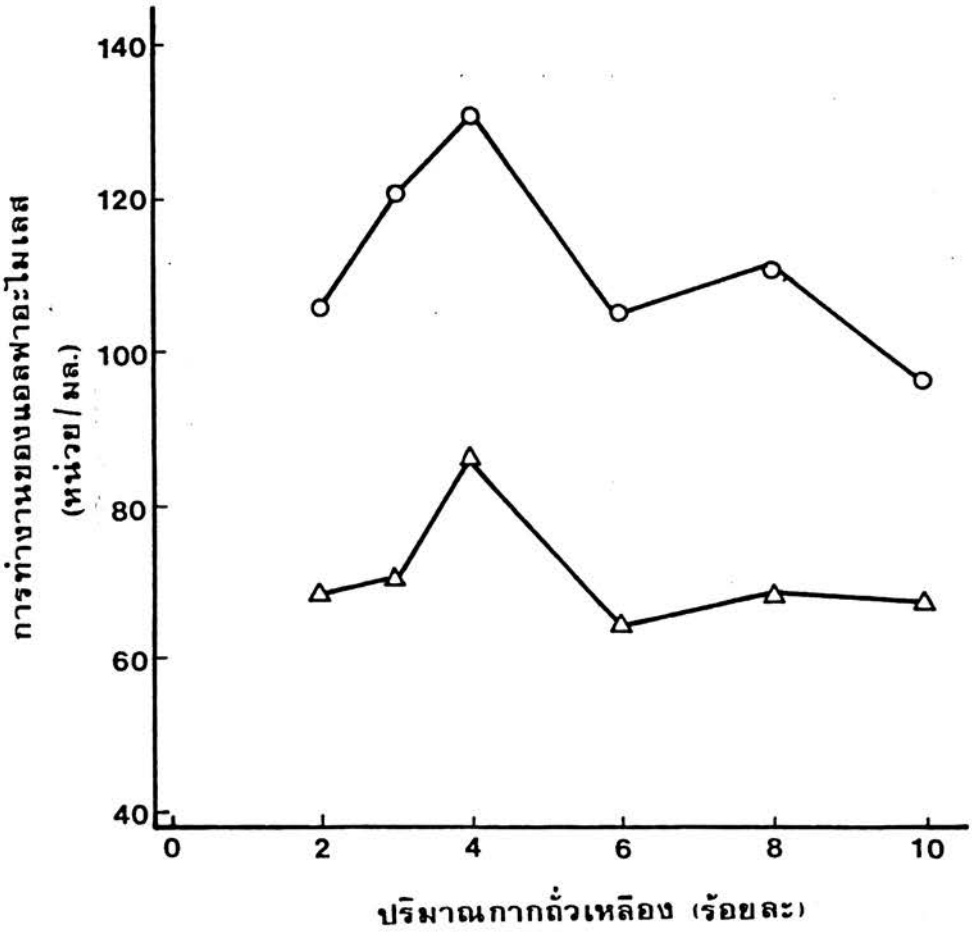
ระดับของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ผันแปร คือ ร้อยละ 2 3 และ 4

และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 และแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3 ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 15 และจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว(ANOVA for one way classification) พบว่า การทำงานของเอนไซม์เมื่อมีกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 และแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3 แตกต่างจากการทำงานของเอนไซม์ เมื่อมีกากถั่วเหลืองร้อยละ 3 และแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 4 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 75 แตกต่างจากการทำงานของเอนไซม์ เมื่อมีกากถั่วเหลืองร้อยละ 5 และแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และแตกต่างจากการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะอื่น ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ดังนั้นจึงเลือกปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3 เป็นแหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนตามลำดับ สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป

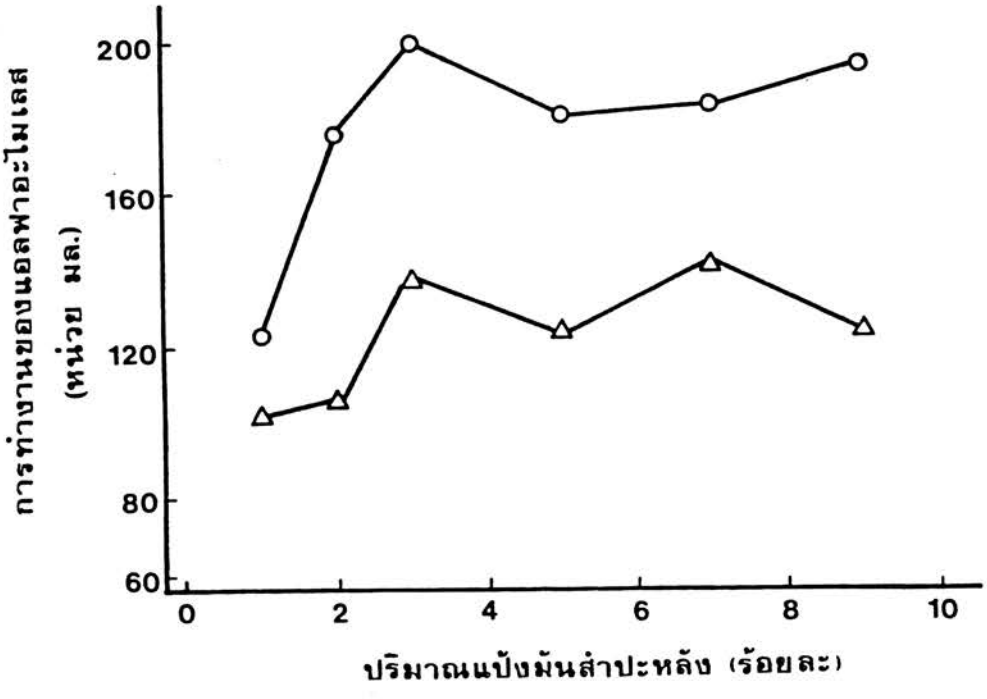


รูปที่ 12 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ในขวดแก้วทรงกรวย

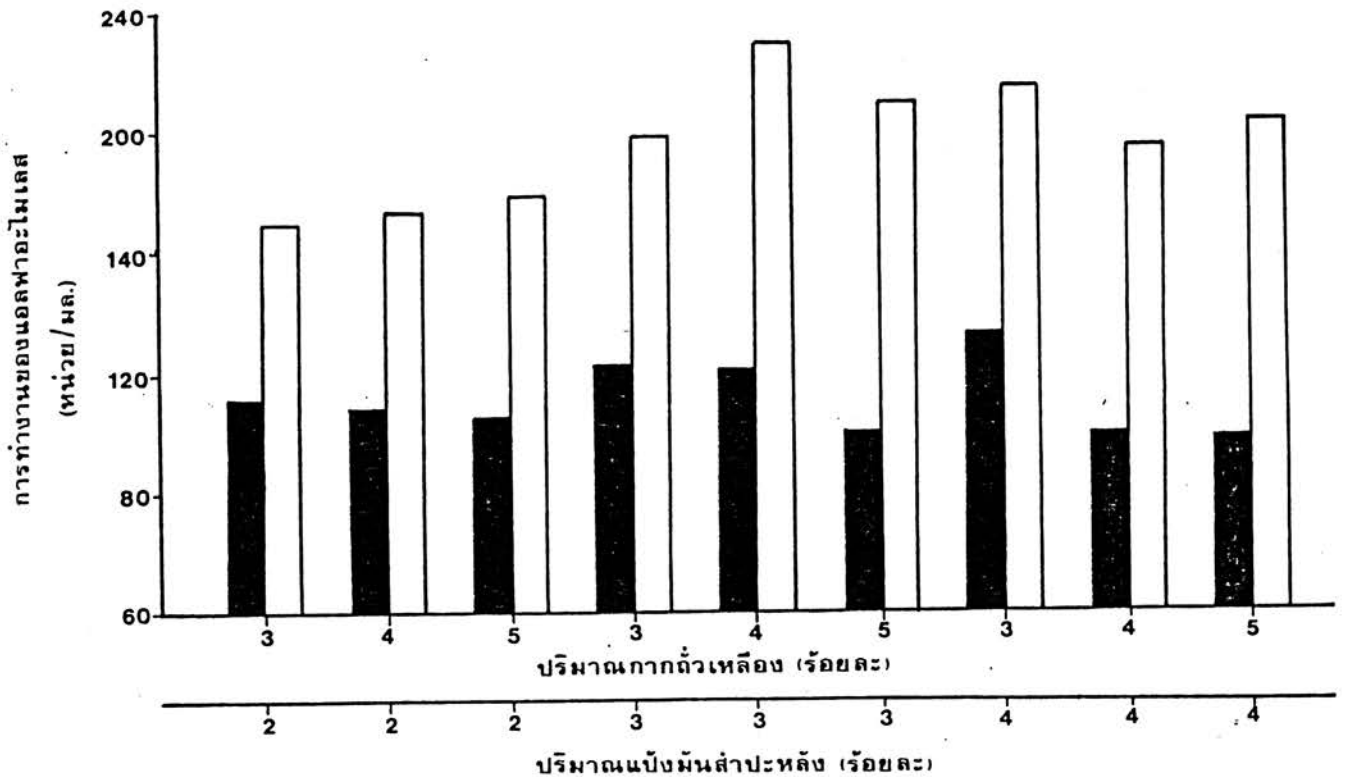
- o กากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันปริมาณร้อยละ 4
- △ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
- □ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันรวมทั้งกากเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
- ● กากรำข้าวจากการสกัดน้ำมันปริมาณร้อยละ 4
- ▲ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวจากการสกัดน้ำมันเข้มข้นร้อยละ (น้ำหนัก/ปริมาตร)
- ■ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวจากการสกัดน้ำมันรวมทั้งกากเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร)



รูปที่ 13 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองและมีแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 48 ชั่วโมง (△) และ 72 ชั่วโมง (○) ในขวดแก้วทรงกรวย



รูปที่ 14 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลัง โดยมีกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 4 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เวลา 48 ชั่วโมง (△) และ 72 ชั่วโมง (○) ในขวดแก้วทรงกรวย



รูปที่ 15 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณกากถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลัง แบบแฟคทอเรียล (3^3) ที่เวลา 48 ชั่วโมง(■)และ 72 ชั่วโมง (□) ในขวดแก้วทรงกรวย

5.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนของสูตรอาหารเหมาะสม

จากการนำกากรำข้าวจากการสกัดน้ำมัน กากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันและแป้งมันสำปะหลังมาวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) โดยวิธี Walkley - Black Method (44) (ภาคผนวก 3.3) และวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl's method (45) (ภาคผนวก 3.2) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 จากตารางที่ 8 และผลการวิจัยในข้อ 5.3.4 สรุปได้ว่าอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ของ B. amyloliquefaciens KA 63 มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 7:1

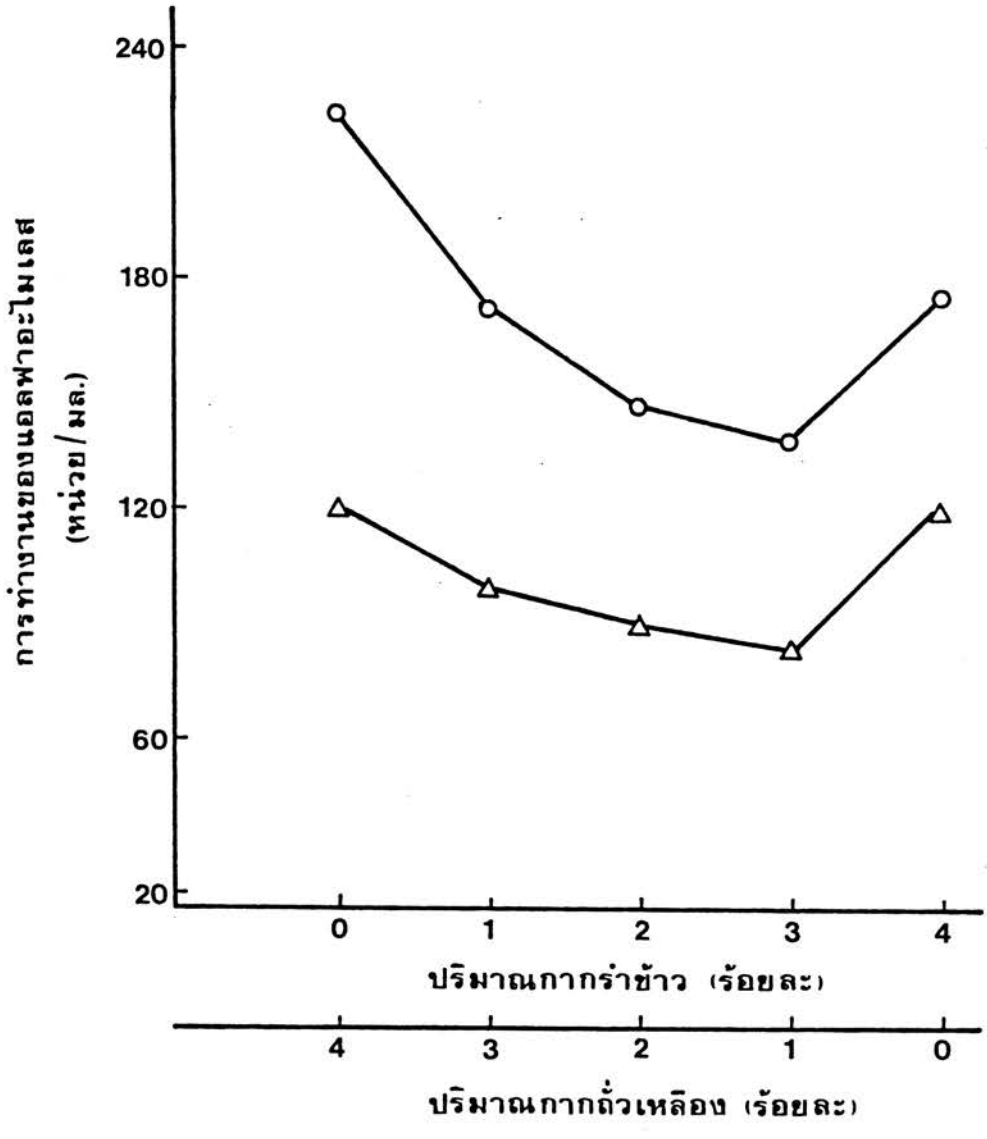
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน และไนโตรเจนของกากรำข้าวจากการสกัดน้ำมัน ในตารางที่ 8 พบว่า กากรำข้าวน่าจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนกากถั่วเหลืองได้ แต่จากผลการวิจัยในข้อ 5.3.1 พบว่าการใช้กากรำข้าวอย่างเดียวให้เอนไซม์ที่มีการทำงานไม่สูงเท่ากับการใช้กากถั่วเหลือง ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงทดลองใช้กากรำข้าวทดแทนกากถั่วเหลืองบางส่วน เนื่องจากมีราคาถูกกว่ามาก ดังจะกล่าวในขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ และปริมาณไนโตรเจนในแหล่งต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)	อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน
กากถั่วเหลือง	30.63	8.72	3.51
กากรำข้าว	35.54	3.71	9.58
แป้งมันสำปะหลัง	41.08	0	หาค่าไม่ได้

5.3.6 การใช้กากรำข้าวทดแทนกากถั่วเหลืองบางส่วน

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นใช้กากรำข้าวทดแทนกากถั่วเหลืองบางส่วน โดยที่ผลรวมของปริมาณกากถั่วเหลือง และกากรำข้าวเป็นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และวิเคราะห์การทำงานตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าการใช้กากรำข้าวแทนกากถั่วเหลืองทำให้ได้เอนไซม์ที่มีการทำงานต่ำลง ดังแสดงในรูปที่ 16 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 3 และกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 4 เป็นแหล่งของคาร์บอน และไนโตรเจนตามลำดับ



รูปที่ 16 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการใช้กากรำข้าวแทนกากถั่วเหลืองบางส่วน โดยมีแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 48 ชั่วโมง (△) และ 72 ชั่วโมง (○) ในขวดแก้วทรงกรวย

5.3.7 ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)

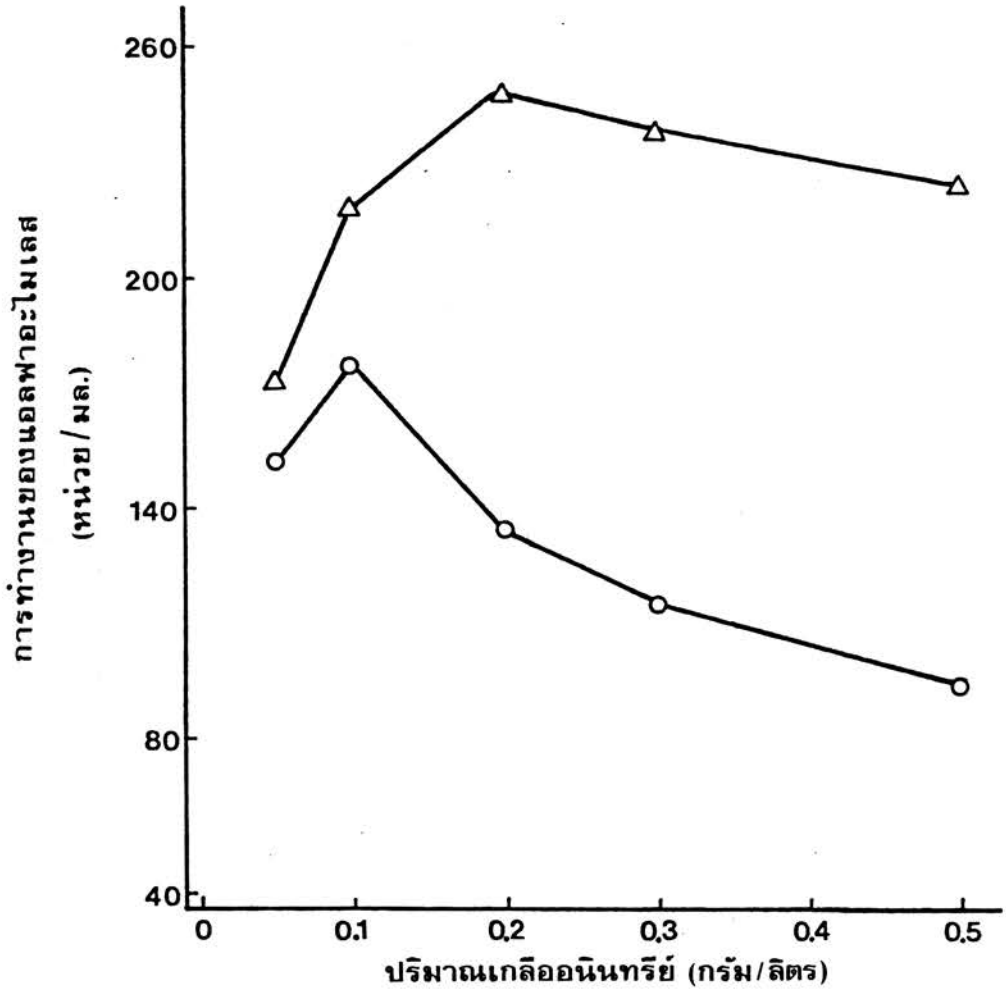
จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นผันแปรปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เป็น 0.05 0.1 0.2 0.3 และ 0.5 กรัม/ลิตร และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม/ลิตร ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุด และเมื่อปริมาณแคลเซียมคลอไรด์มากขึ้น จะทำให้เอนไซม์มีการทำงานลดลง ดังแสดงในรูปที่ 17

5.3.8 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

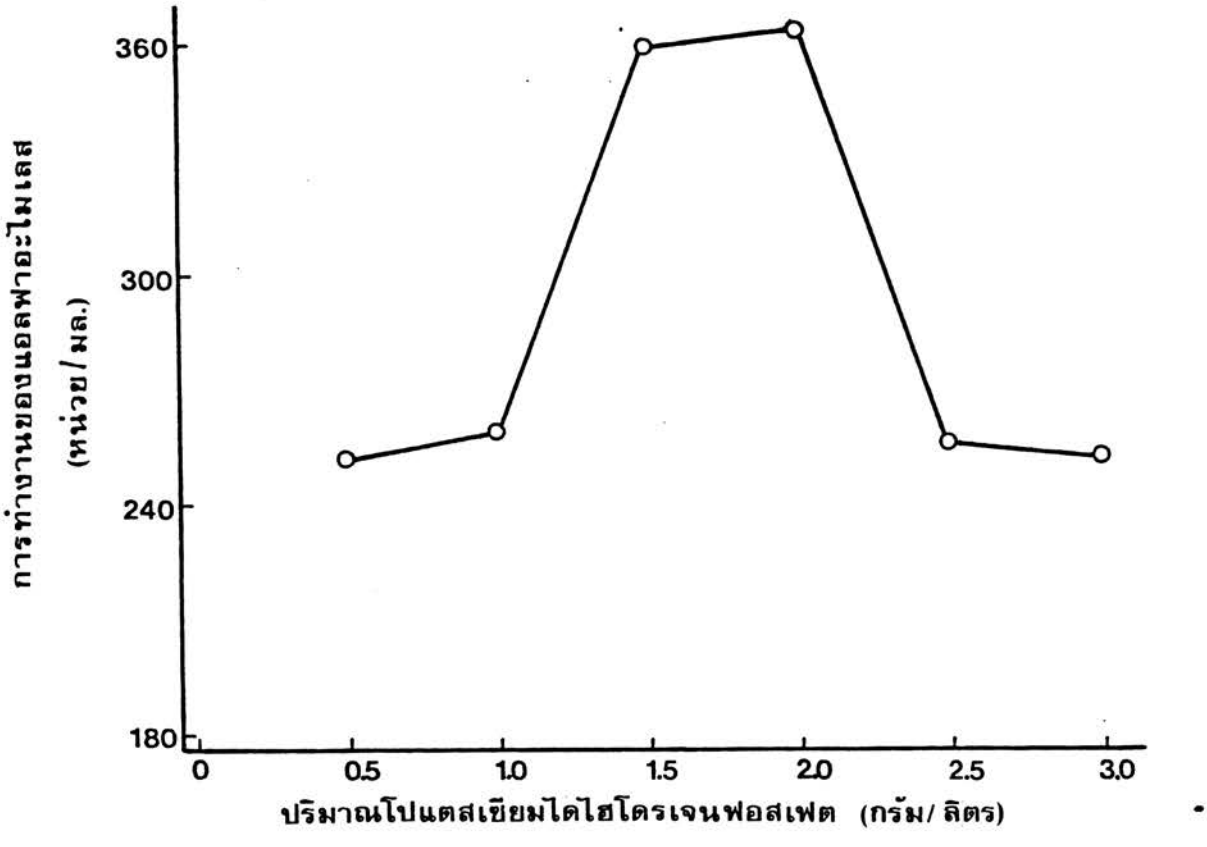
จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นผันแปรปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.05 0.1 0.2 0.3 และ 0.5 กรัม/ลิตร และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม/ลิตร ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุดและเมื่อปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตมากขึ้น จะทำให้เอนไซม์มีการทำงานลดลง ดังแสดงในรูปที่ 17

5.3.9 ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6 ยกเว้นผันแปรปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุด และเมื่อปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตสูงขึ้นทำให้เอนไซม์มีการทำงานลดลง ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 17 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ (O) และปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต (Δ) ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขวดแก้วทรงกรวย



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณโปแตส์เซียมไดไฮโดรเจนฟอส์เฟตต่าง ๆ กัน ในขวดแก้วทรงกรวย

6. การศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลส โดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

6.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ของการหมักกับเวลา

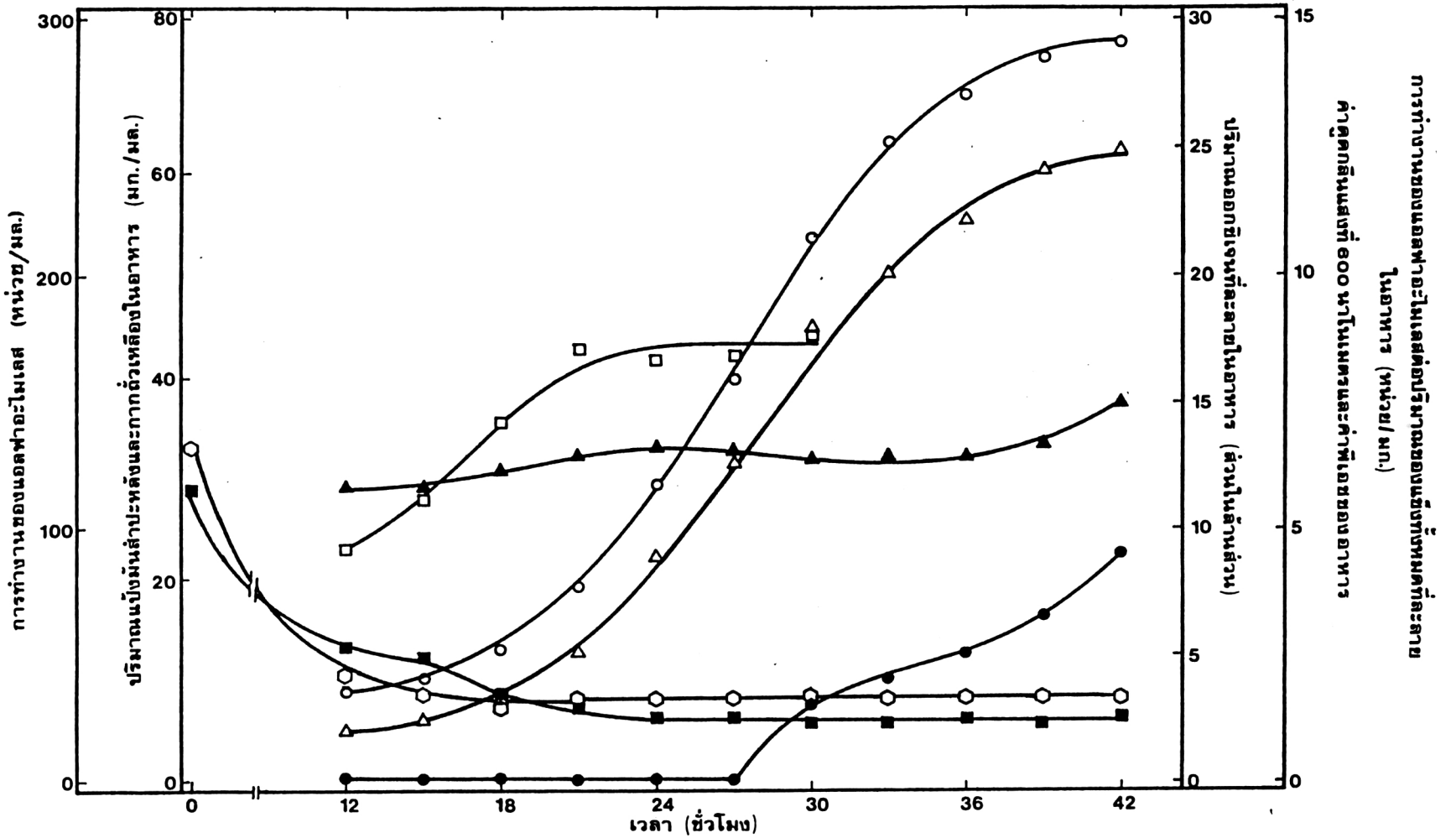
จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ เมื่อเวลาผ่านไป ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 19 พบว่าการทำงานของแอลฟาอะไมเลสจะเข้าสู่ระยะทวีคูณ เมื่อเซลเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่แล้ว และการทำงานของเอนไซม์จะสูงสุดที่เวลา 39 ชั่วโมง ในขณะที่การเจริญของเซลเข้าสู่ระยะคงที่ที่เวลา 21 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหาร พบว่า มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อการทำงานของเอนไซม์เข้าสู่ระยะคงที่

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร ซึ่งปรับให้มีค่า 10 ส่วนในล้านส่วนในตอนเริ่มต้นของการหมัก กับการเจริญ พบว่าในขณะที่เซลมีการเจริญแบบทวีคูณ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารจะเป็นศูนย์ แสดงว่าเซลต้องการออกซิเจนมากขณะเจริญ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารจะสูงขึ้น เมื่อเซลเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลังกับการเจริญ พบว่าจะมีการใช้กากถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลังในช่วงที่มีการเจริญเท่านั้น และเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ ปริมาณสารอาหารทั้งสองจะคงที่

ปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่จะบอกได้ว่ามีสารอาหารเหลืออยู่ในอาหารมากน้อยเพียงไร นอกเหนือจากการวิเคราะห์ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง และกากถั่วเหลืองโดยตรง คือ การทำงานของเอนไซม์ต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในอาหาร ซึ่งมีหน่วยเป็น หน่วย/มก. จากรูปที่ 19 จะเห็นว่าแนวโน้มของการทำงาน และการทำงานของเอนไซม์ต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในอาหารเป็นไปในแนวเดียวกัน แต่ถ้ามีสารอาหารเหลือมาก แนวโน้มของการทำงานของเอนไซม์ต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในอาหารจะลดต่ำลงแยกจากแนวโน้มของการทำงานของเอนไซม์



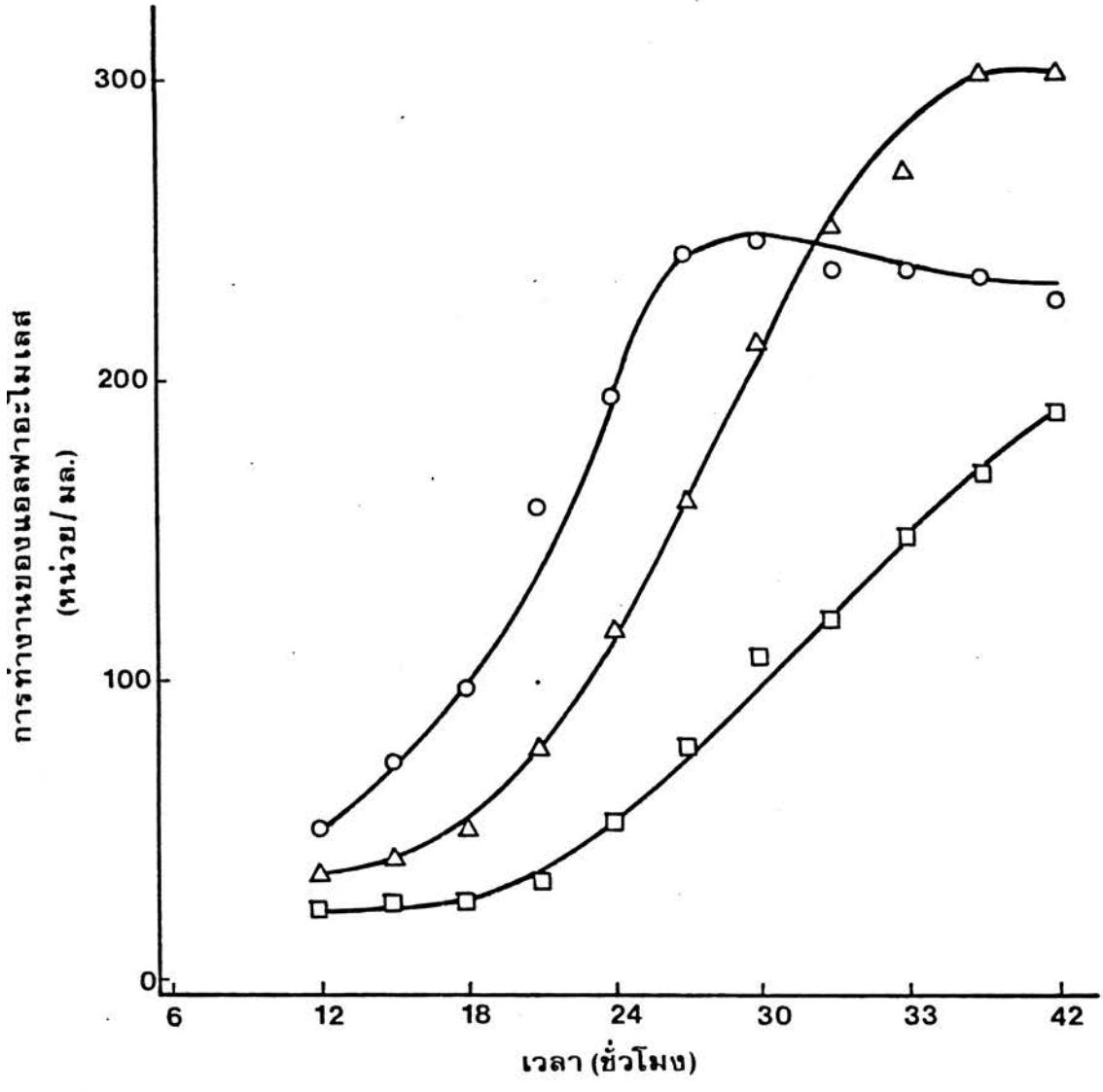
รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ ในถังหมักเมื่อมีการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 เพื่อผลิตแอลฟาอะไมเลส์ การทำงานของเอนไซม์ (○) การทำงานของเอนไซม์ต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในอาหาร (△) การเจริญ (□) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (●) ค่าพีเอช ของอาหาร (▲) ปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหลือในอาหาร (⬡) ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือในอาหาร (■)

6.2 อัตราการกวนที่เหมาะสม

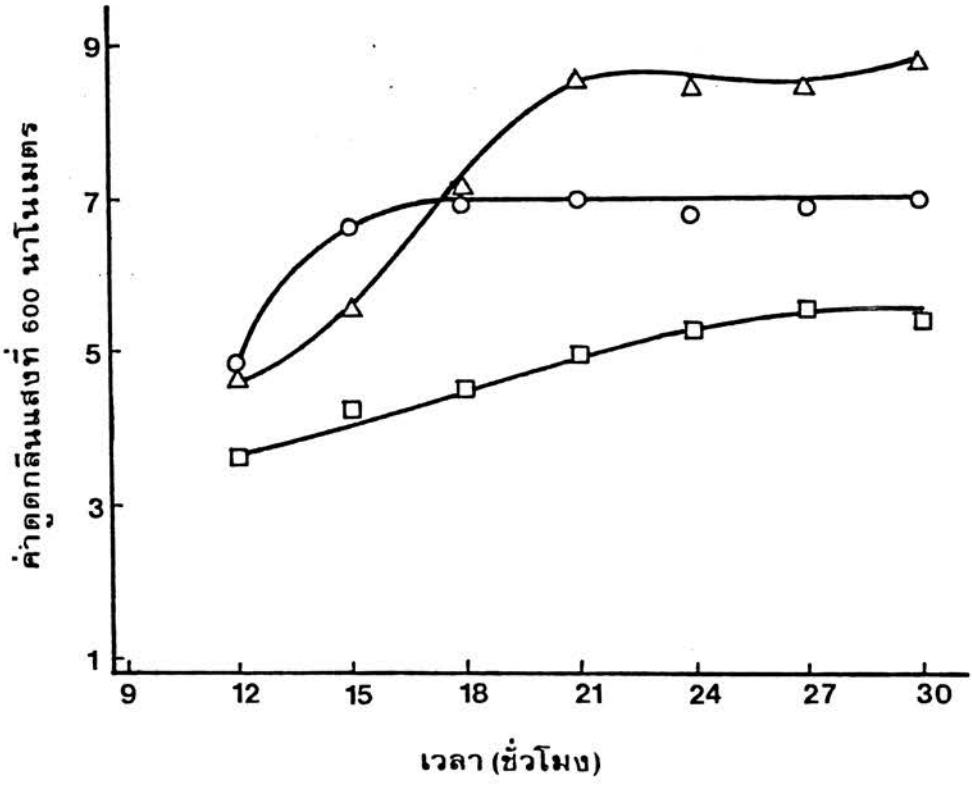
จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7 ยกเว้นผันแปรอัตราการกวนเป็น 200 300 และ 400 รอบ/นาที พบว่าเชื้อที่เจริญที่อัตราการกวน 300 รอบ/นาที ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุดที่เวลา 39 ชั่วโมง โดยเชื้อที่เจริญที่อัตราการกวน 400 รอบ/นาที ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานต่ำกว่า แต่ใช้เวลาน้อยกว่า คือ 30 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 20 เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่าเชื้อที่เจริญที่อัตราการกวน 300 รอบ/นาที มีการเจริญดีที่สุด โดยเชื้อที่เจริญที่อัตรากวน 400 รอบ/นาที เจริญได้น้อยกว่า แต่เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ได้เร็วกว่า ซึ่งก็สอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 21 โดยผลการทดลองทั้งสองก็สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 22 และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 23 ดังนั้นจึงเลือกอัตราการกวน 300 รอบ/นาที สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป

6.3 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

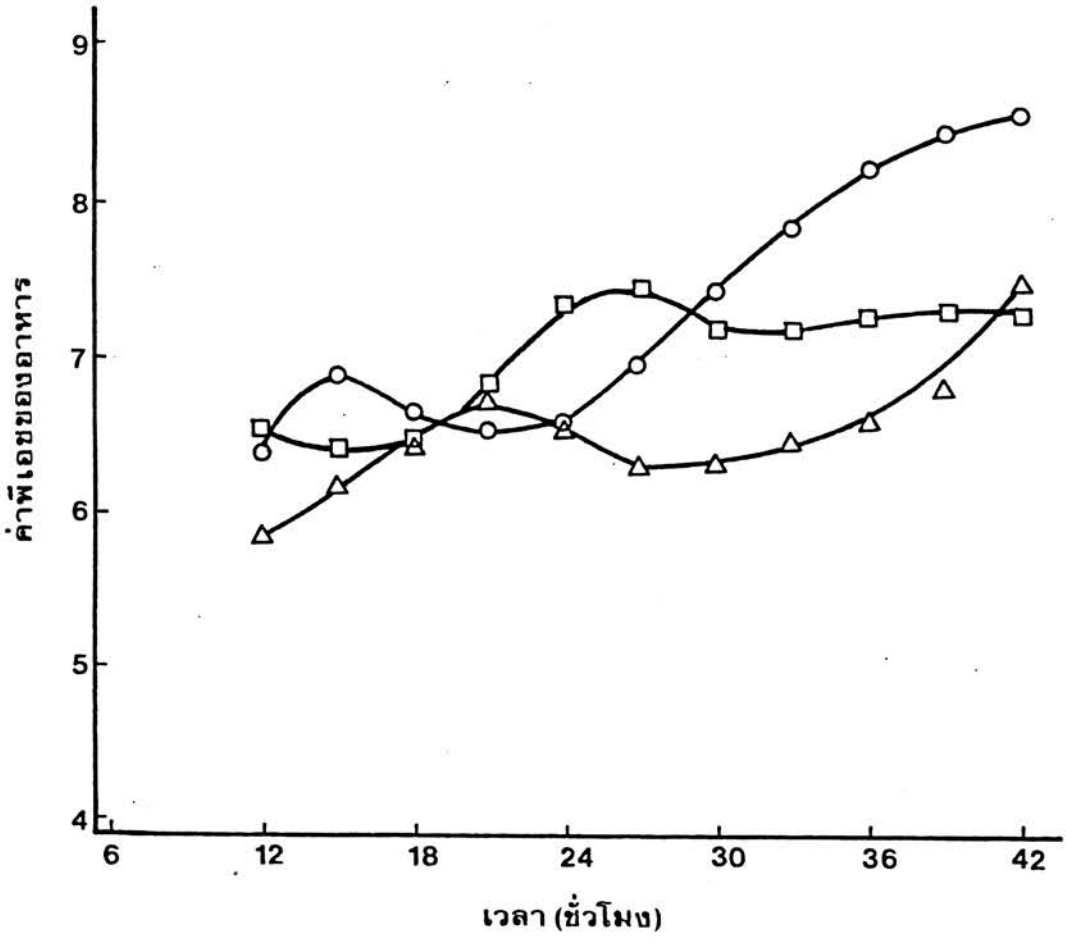
จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7 ยกเว้นผันแปรอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 1.0 และ 1.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 และ 1.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานไม่แตกต่างกัน และสูงกว่าเชื้อที่เจริญในสภาวะที่มีอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที ในช่วงหลังของการหมักเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 24 โดยที่ปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7 มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกัน ดังนั้นจึงเลือกอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป



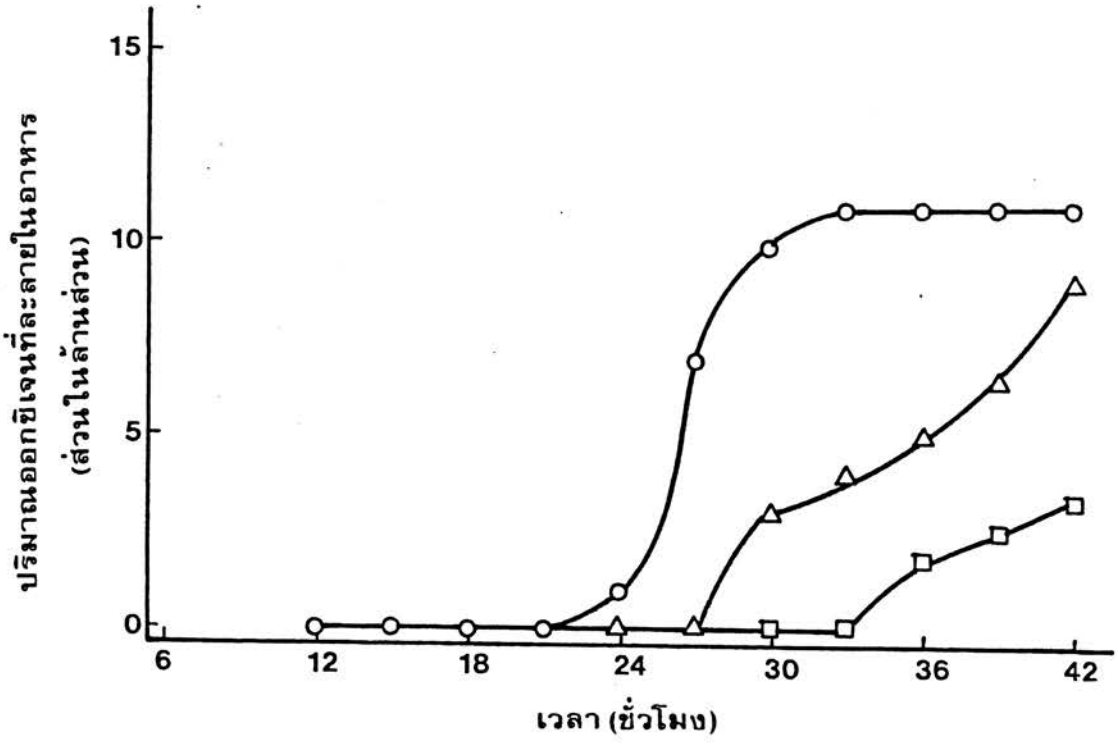
รูปที่ 20 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในถังหมักยนาด 5 ลิตร ที่มีอัตราการกวนเป็น 200 (□) 300 (△) และ 400 รอบ/นาที (○) โดยมีอัตราการให้อากาศเป็น 1 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที



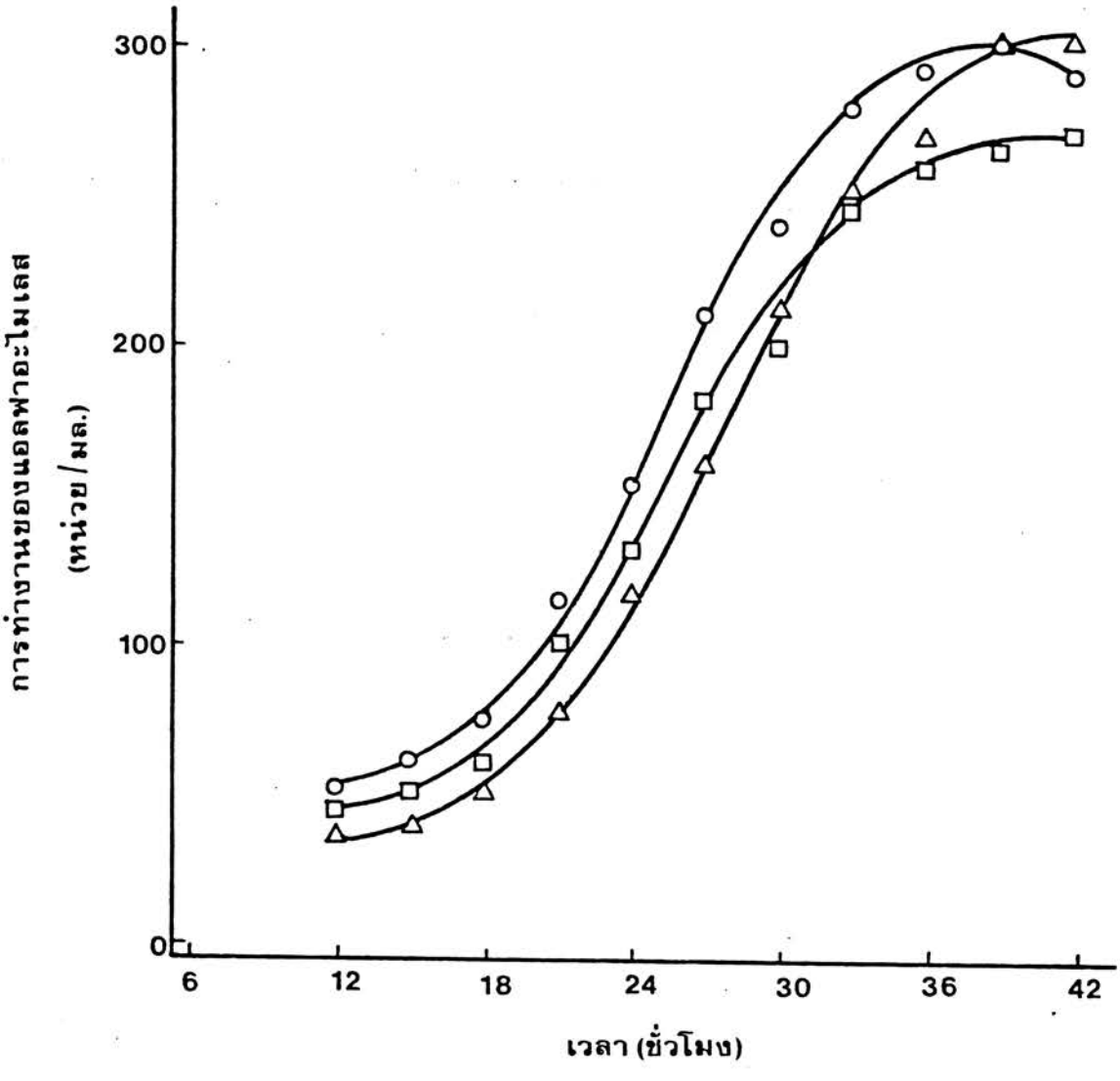
รูปที่ 21 เปรียบเทียบการเจริญของ B.amyloliquefociens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอัตราการกวนเป็น 200 (□) 300 (△) และ 400 รอบ/นาที (○) โดยมีอัตราการให้อากาศเป็น 1 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที



รูปที่ 22 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชของอาหารที่มีการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอัตราการกวนเป็น 200 (□) 300 (△) และ 400 รอบ/นาที (○) โดยมีอัตราการให้อากาศเป็น 1 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที



รูปที่ 23 เปรียบเทียบปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารที่มีการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีอัตราการกวนเป็น 200 (□) 300 (△) และ 400 รอบ/นาที (○) โดยมีอัตราการให้อากาศเป็น 1 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที โดยปรับให้ค่าออกซิเจนที่ละลายในอาหารเริ่มต้นเป็น10 ส่วนในล้านส่วน



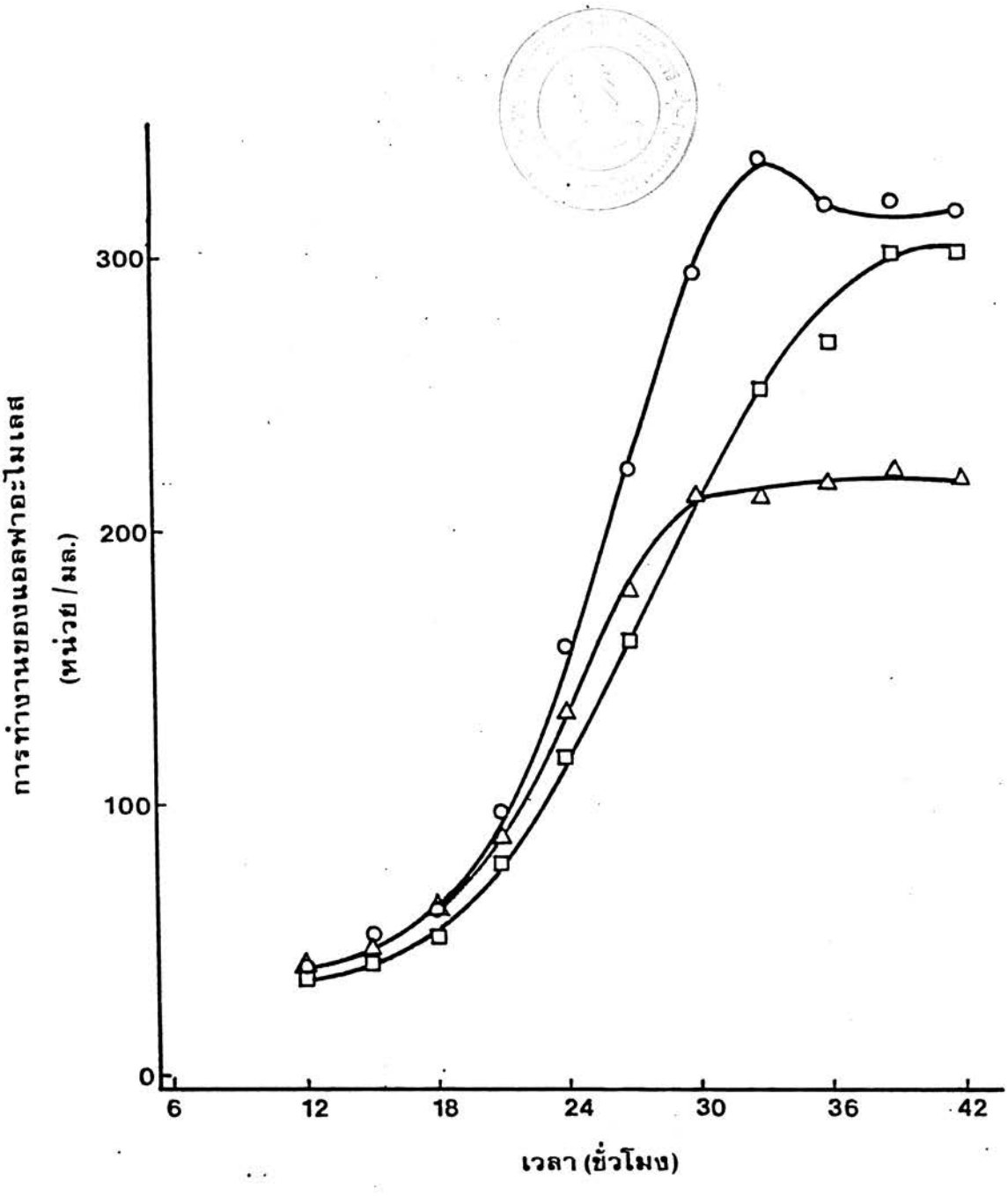
รูปที่ 24 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 (□) 1.0 (△) และ 1.5 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที (○)โดยมีอัตราการกวนเป็น 300 รอบ/นาที

6.4 ปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหมาะสม

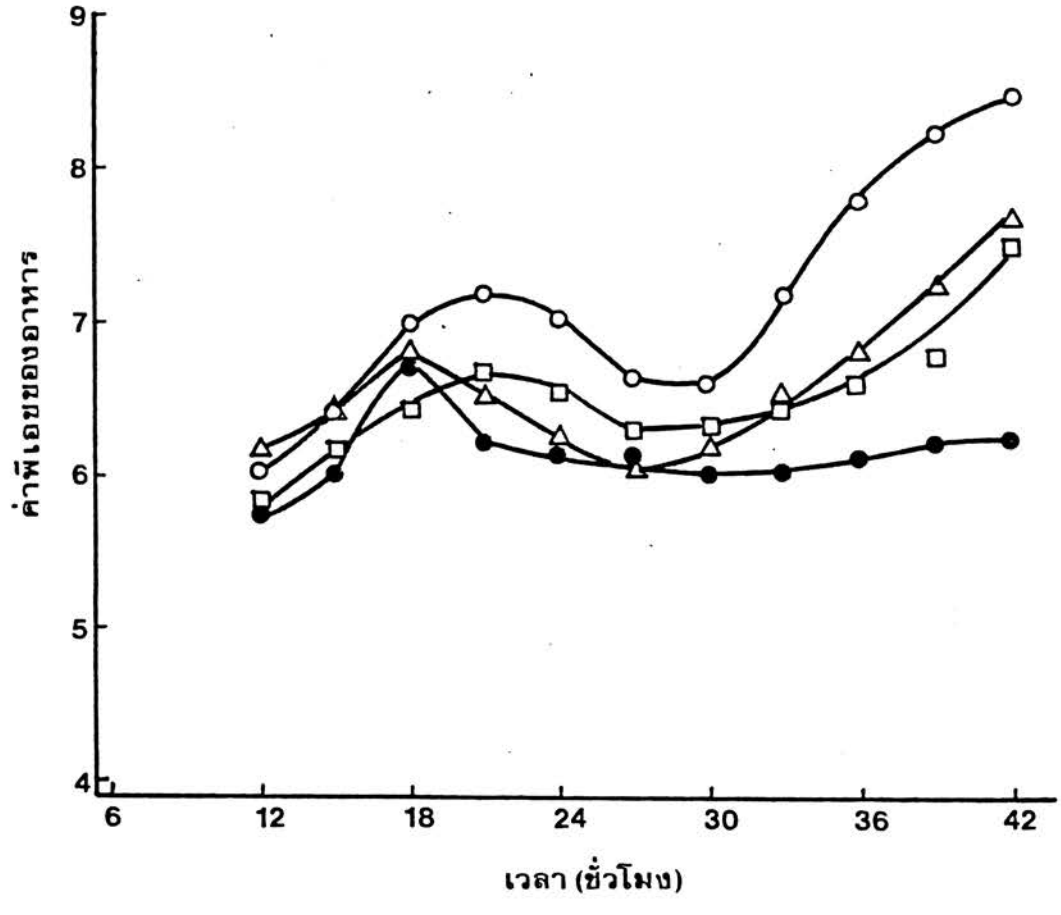
จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7 ยกเว้นผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองเป็นร้อยละ 3 4 และ 5 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกากถั่วเหลืองทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงขึ้น โดยเมื่อปริมาณกากถั่วเหลืองเป็นร้อยละ 5 เชื้อจะผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุดที่เวลา 33 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 25 และหลังจากนั้นการทำงานของเอนไซม์จะลดลงทันที ซึ่งเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารในรูปที่ 26 พบว่าอาหารที่มีกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 5 จะมีค่าพีเอชสูงกว่าอาหารสูตรอื่นมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้ไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองนั่นเอง และทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาการทำงานของเอนไซม์ต่อของแข็งทั้งหมดที่ละลายในอาหารในรูปที่ 27 พบว่าในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 5 ให้เอนไซม์ที่มีการทำงานจำเพาะต่ำกว่าในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 4 แสดงว่ายังมีอาหารเหลืออยู่มาก ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหลือในอาหาร ในรูปที่ 28 ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือในอาหารในรูปที่ 30 ไม่แตกต่างกันมากนัก และเมื่อพิจารณาการเจริญในรูปที่ 31 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 4 มีการเจริญดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกปริมาณกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 4 เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเหมาะสม

6.5 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7 ยกเว้นผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็นร้อยละ 2 3 และ 4 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 3 และ 4 ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานใกล้เคียงกันและสูงกว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญในรูปที่ 29 แต่เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือในอาหารในรูปที่ 30 พบว่าอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 4 มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเหลือในอาหารมากกว่าอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 3 ดังนั้นจึงเลือกแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 3 เป็นแหล่งของคาร์บอนในสูตรอาหารเหมาะสม สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป

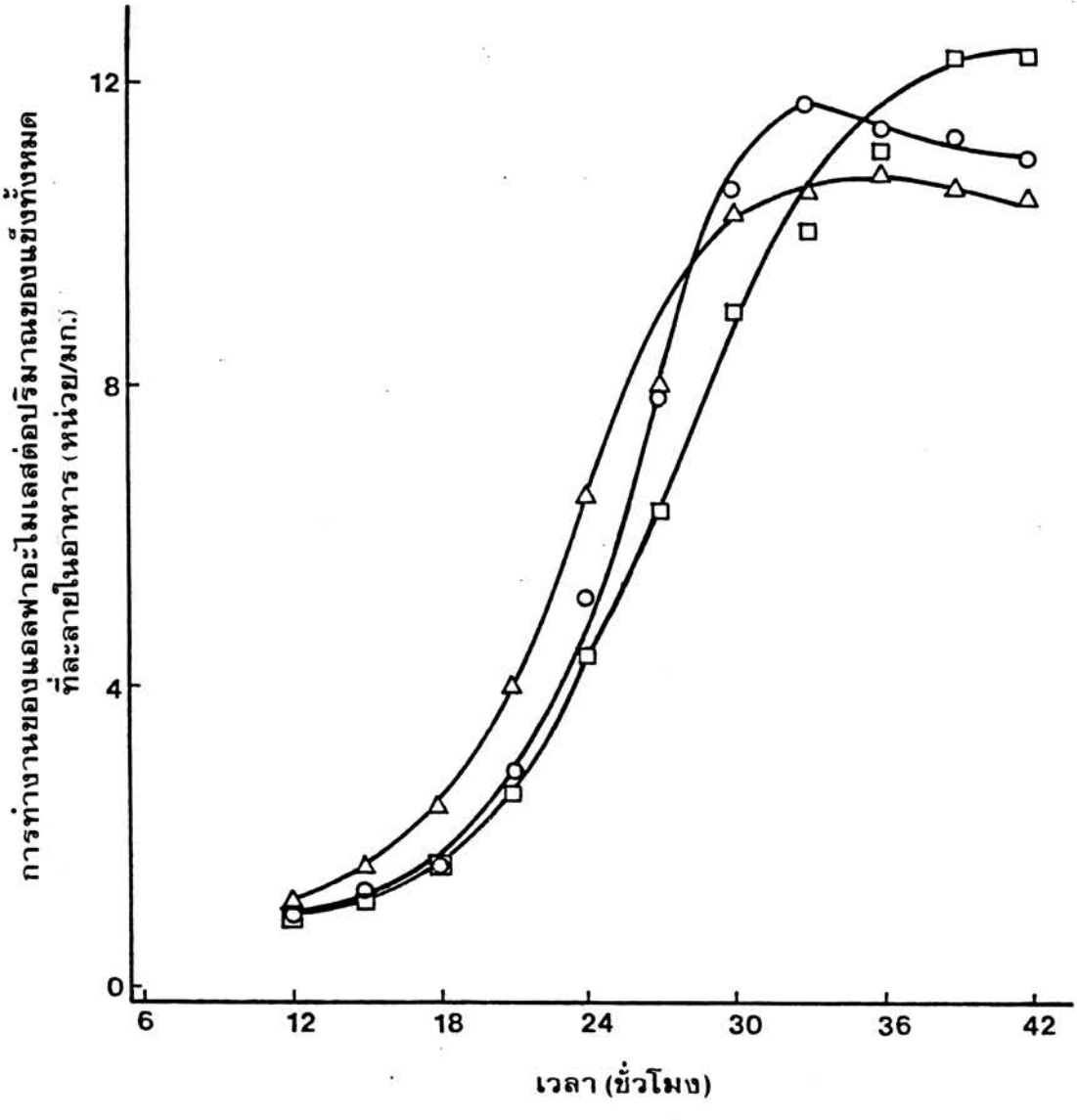


รูปที่ 25 เปรียบเทียบการทำงานยองแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองเป็น ร้อยละ 5 (○) ร้อยละ 4 (□) และร้อยละ 3 (△) โดยมีแป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

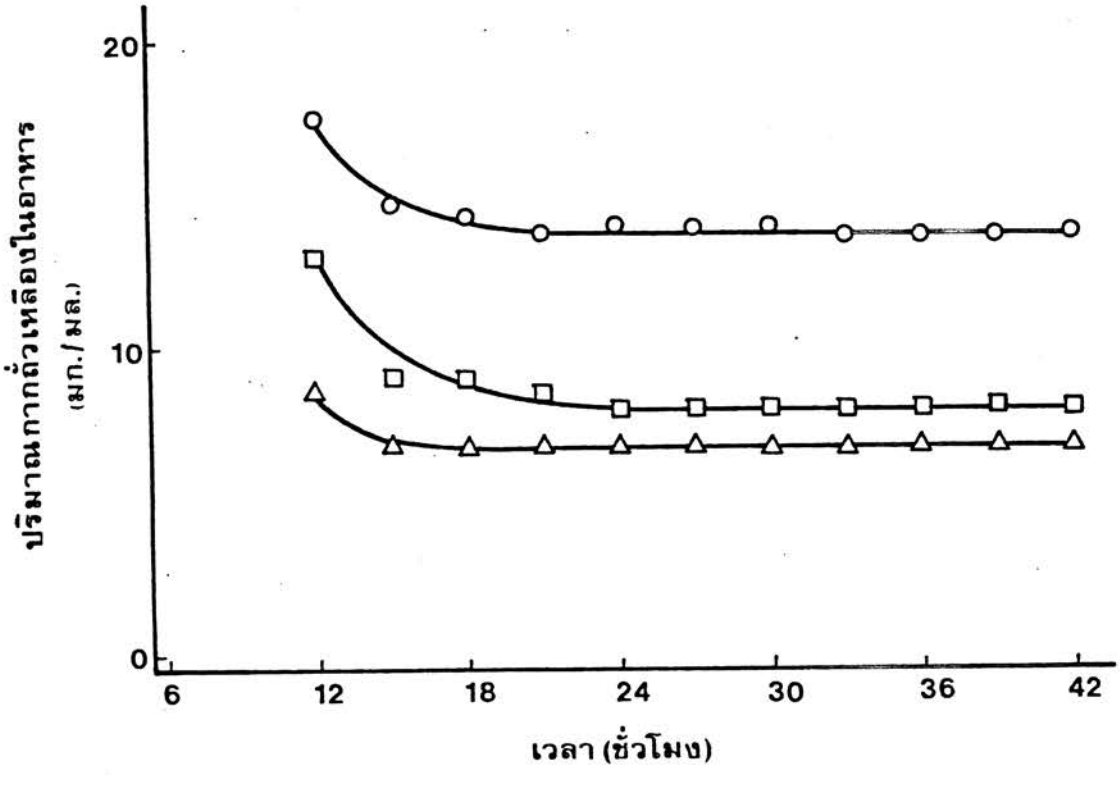


รูปที่ 26 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารที่มีการผันแปรปริมาณกาก ถั่วเหลืองและแป้งมันสำปะหลัง เมื่อมีการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

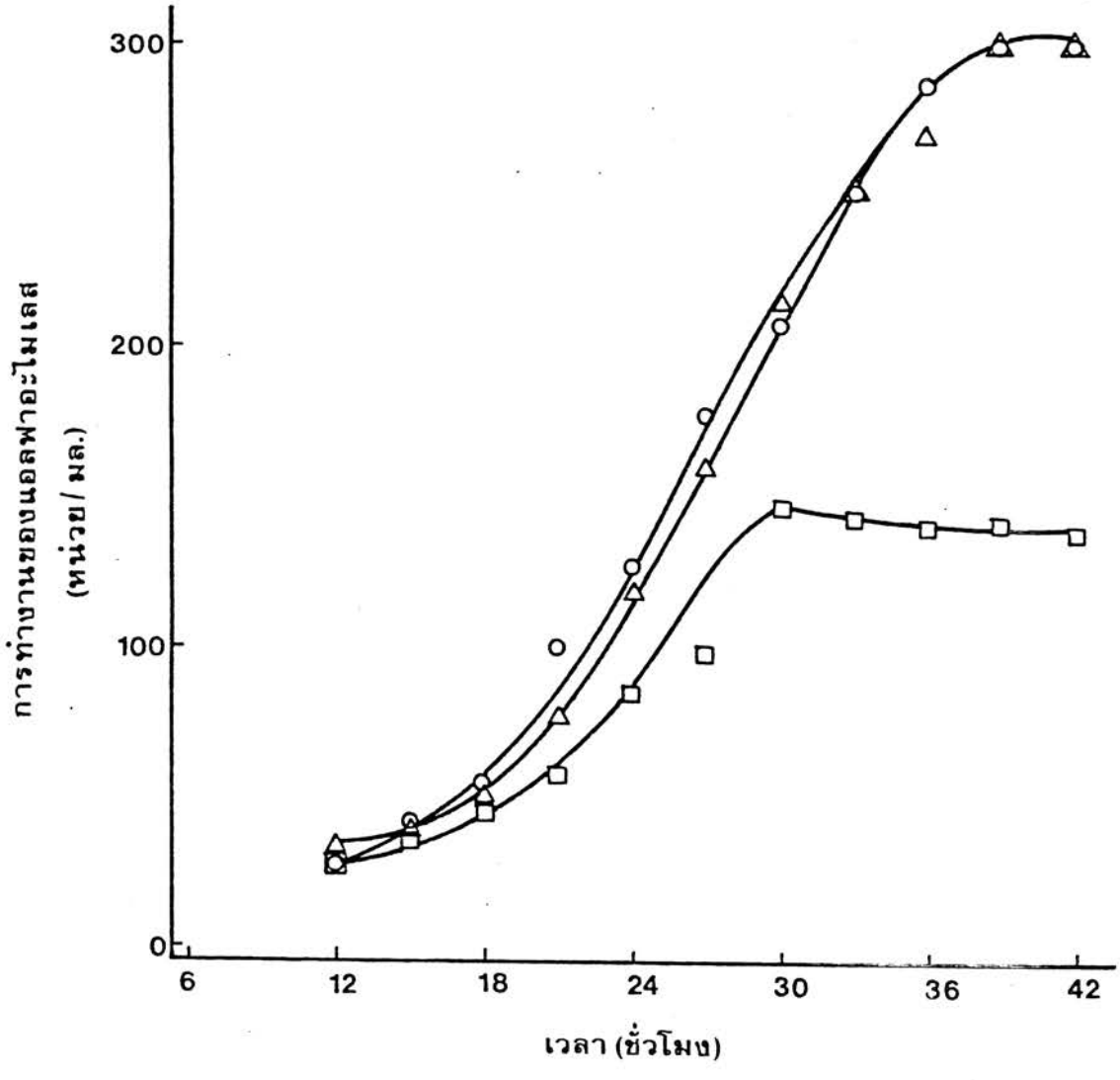
- ● ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 4
- ○ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 5 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3
- □ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3
- △ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 3 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3



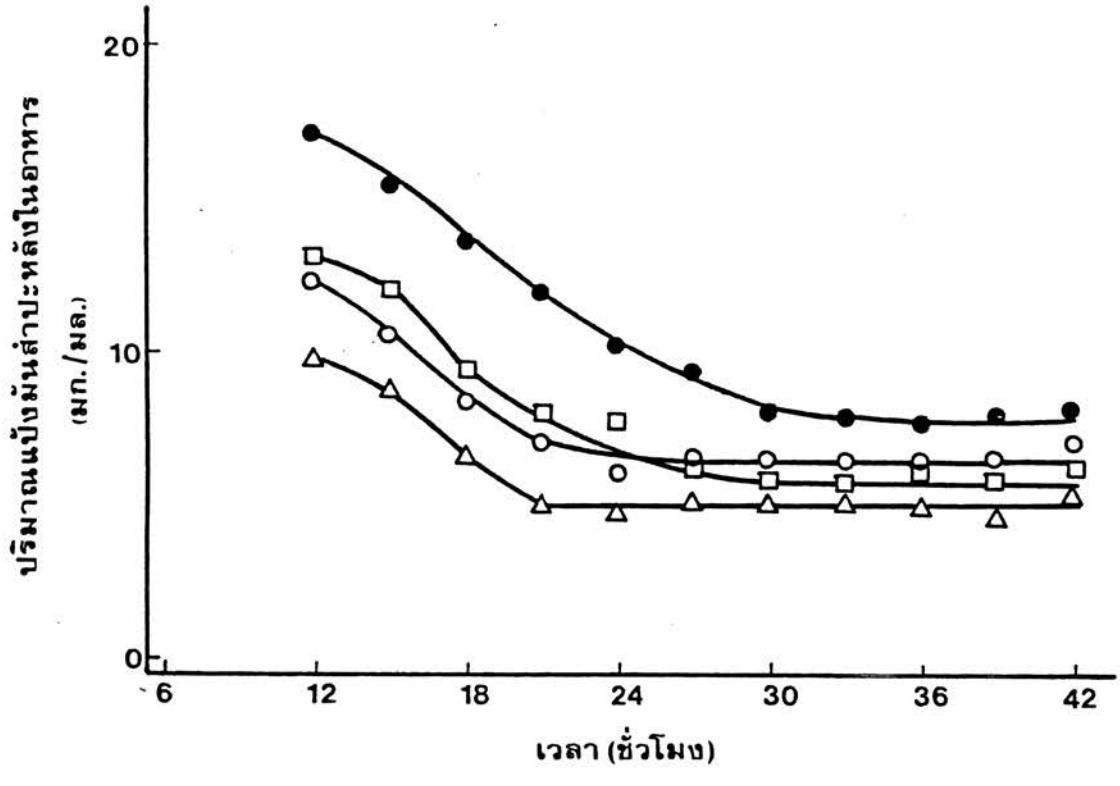
รูปที่ 27 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 ต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในอาหาร ในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองเป็น ร้อยละ 5 (○) ร้อยละ 4 (□) และ ร้อยละ 3 (△) แป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 28 เปรียบเทียบปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหลือในอาหารที่มีการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อมีการผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองเริ่มต้นเป็นร้อยละ 5 (O) 4 (□) และ 3 (△)

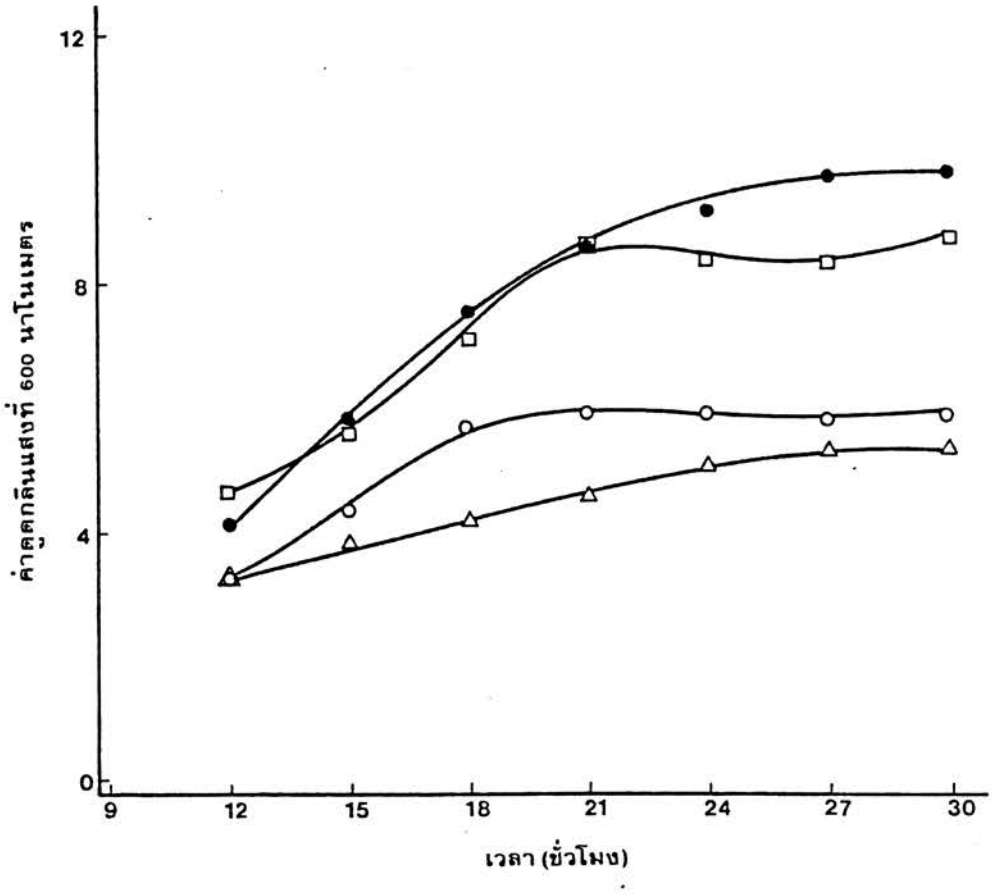


รูปที่ 29 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็นร้อยละ 4 (O)3 (△) และ 2 (□) โดยมีกากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 4 เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 30 เปรียบเทียบปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองและแป้งมันสำปะหลัง เมื่อมีการเจริญของ B.amyloliquefociens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

- ● ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 4
- ○ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 5 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3
- □ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3
- △ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 3 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3



รูปที่ 31 เปรียบเทียบการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในอาหารที่มีการผันแปรปริมาณกากถั่วเหลืองและแป้งมันสำปะหลัง ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

● ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 4

○ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 5 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3

□ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3

△ ปริมาณกากถั่วเหลืองร้อยละ 3 และปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 3

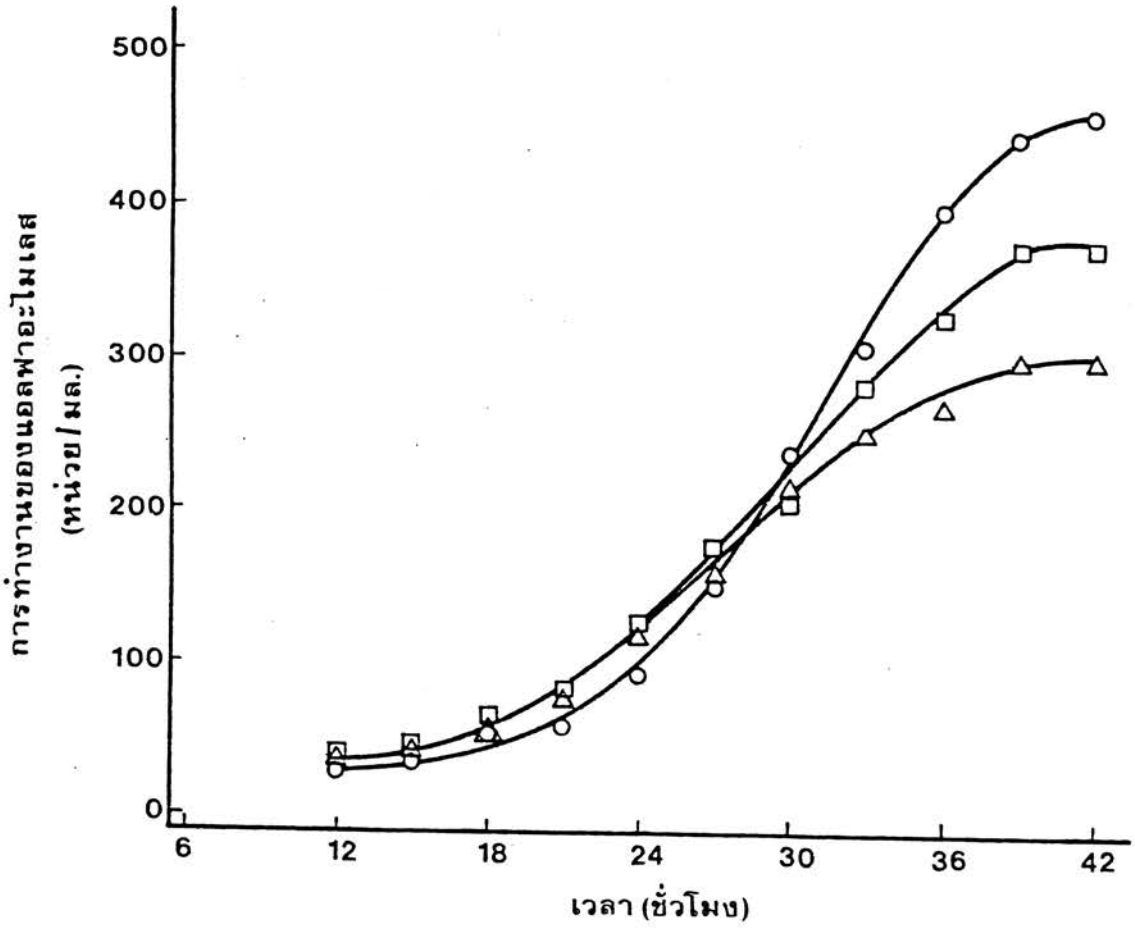
6.6 ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอาหาร

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 7 ยกเว้นผันแปรความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่ใช้เป็น 0 0.01 และ 0.05 โมลาร์ โดยในสภาพที่ความเข้มข้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นศูนย์นั้น เติมโปแตสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟต 1.5 กรัม/ลิตร พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 0.01 โมลาร์ สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 32 แม้ว่าจะมีการเจริญไม่ดีเท่ากับเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0 โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 33 เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารในรูปที่ 34 พบว่าค่าพีเอชในช่วงหลังของการหมักจะต่ำลง เมื่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 เข้มข้น 0.01 โมลาร์ สำหรับการวิจัยต่อไป

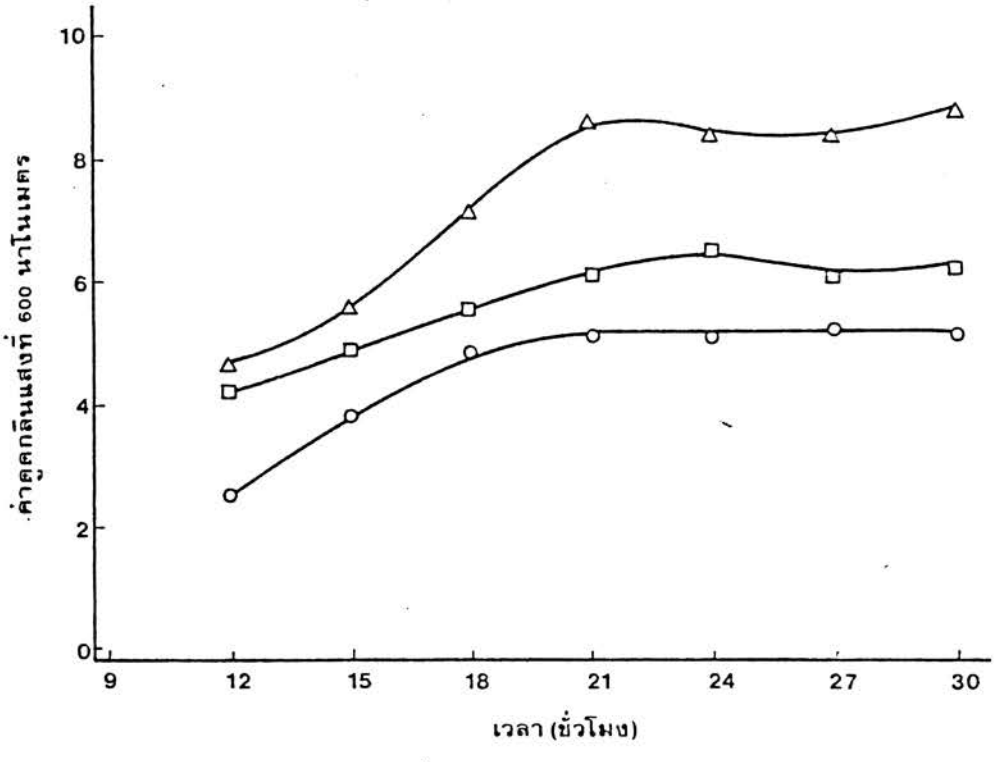
6.7 ค่าพีเอชของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอาหาร

จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 7 ยกเว้นผันแปรค่าพีเอชของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์เป็น 6.0 และ 7.0 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงกว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ในช่วงต้นของการหมัก และใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานสูงสุดน้อยกว่า ดังแสดงในรูปที่ 35 ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 36 แม้ว่าในช่วงหลังของการหมักจะให้เอนไซม์ที่มีการทำงานเท่ากัน เพื่อเป็นการประหยัดเวลาที่ใช้ในการหมักจึงเลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในสูตรอาหารเหมาะสม

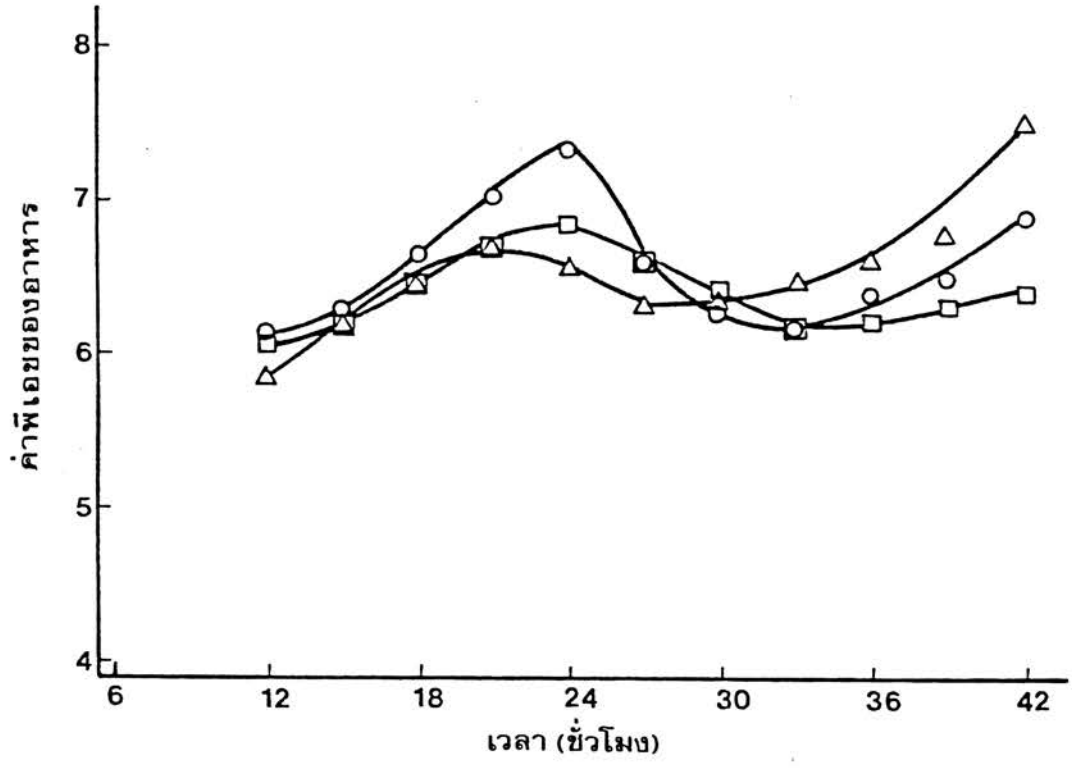
จากการเลี้ยง B. amyloliquefaciens KA 63 ในสูตรอาหารเหมาะสมที่ได้ปรับปรุงแล้ว พบว่าจะได้เอนไซม์ที่มีการทำงาน 465.17 หน่วย/มล. โดยวิธีวิเคราะห์ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และ 646.59 หน่วย/มล. โดยวิธีวิเคราะห์ในบทที่ 2 ข้อ 4.2 ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาพที่ยังไม่ได้ปรับปรุงประมาณ 9 เท่า



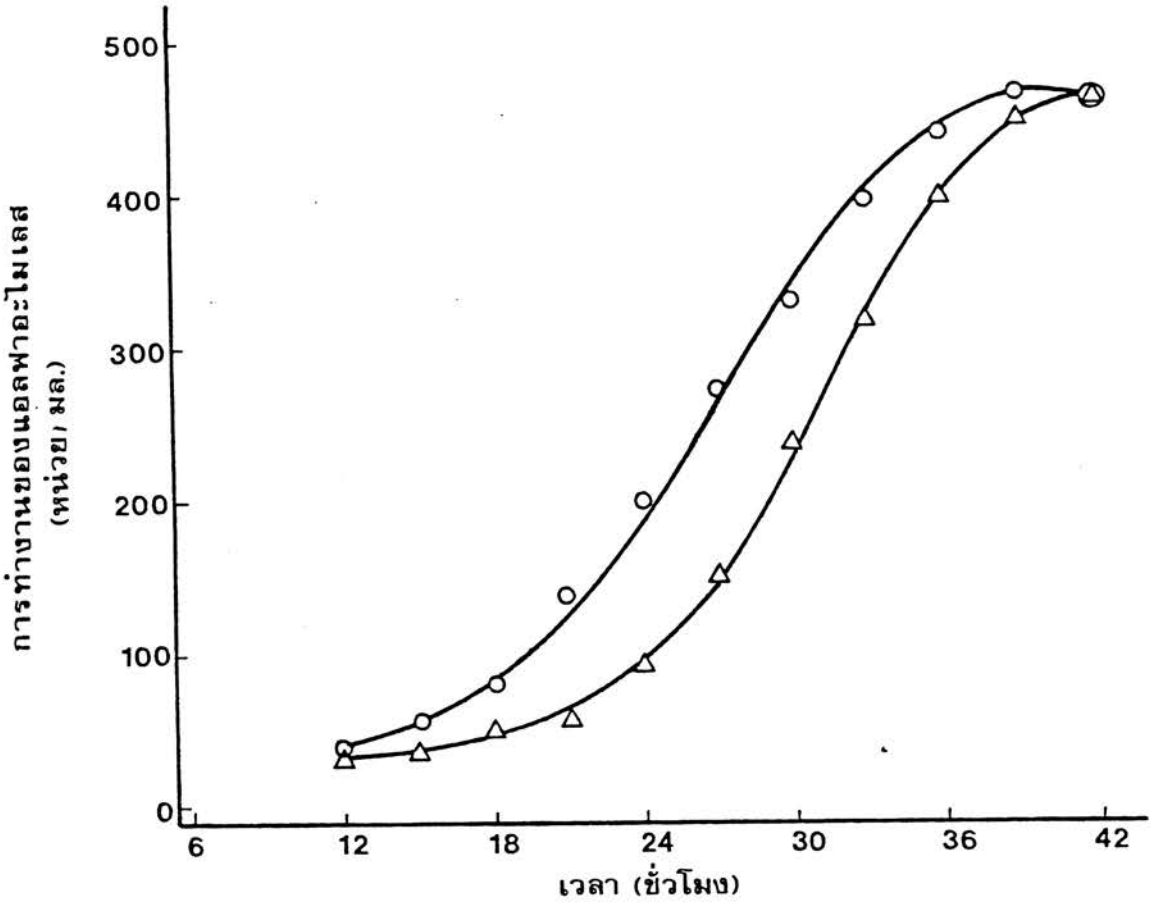
รูปที่ 32 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 ในอาหารที่มีการผันแปรความเข้มข้นของฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เป็น 0 (△) 0.01 (○) และ 0.05 (□) มิลลิโมลาร์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



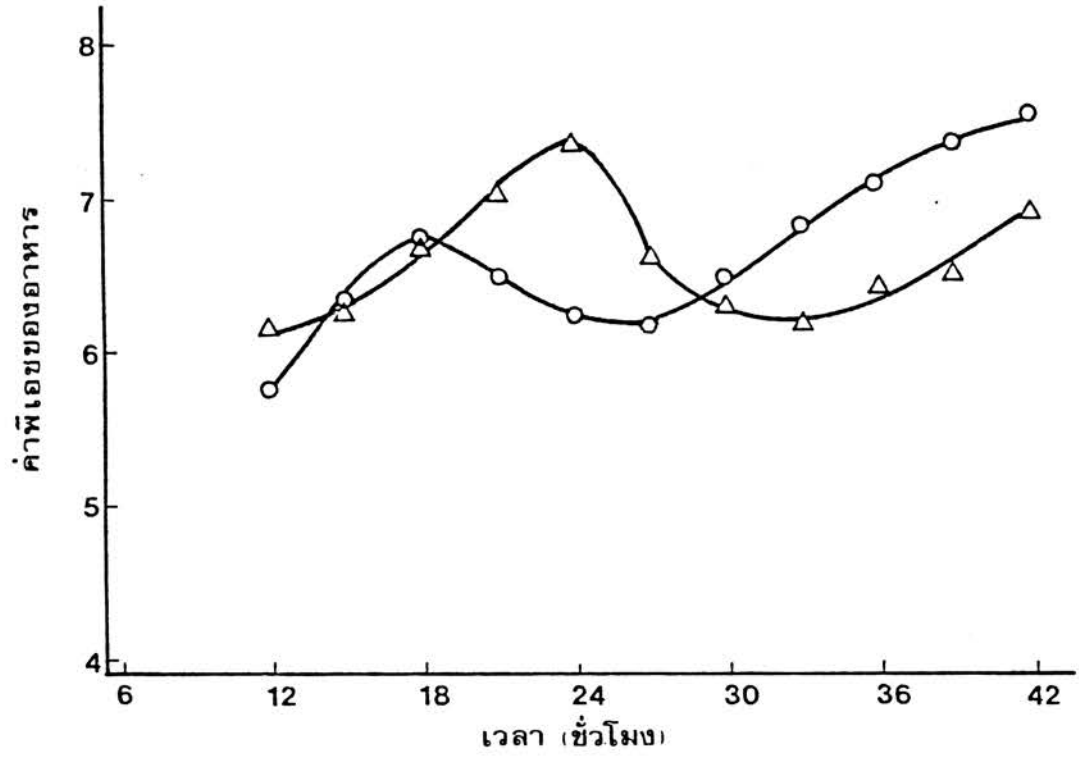
รูปที่ 33 เปรียบเทียบการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในอาหารที่มีการผันแปรความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เป็น 0 (△) 0.01 (○)และ 0.05 (□) มิลลิโมลาร์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 34 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารที่มีการผันแปรความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เป็น 0 (△) 0.01 (○) และ 0.05 (□) มิลลิโมลาร์ เมื่อมีการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 35 เปรียบเทียบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 ในอาหารที่มีการผันแปรค่าพีเอชของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 6 (△) และ 7 (○) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 36 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารที่มีการผันแปรค่าพีเอชของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 6 (△) และ 7 (○) เมื่อมีการเจริญของ B.amyloliquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

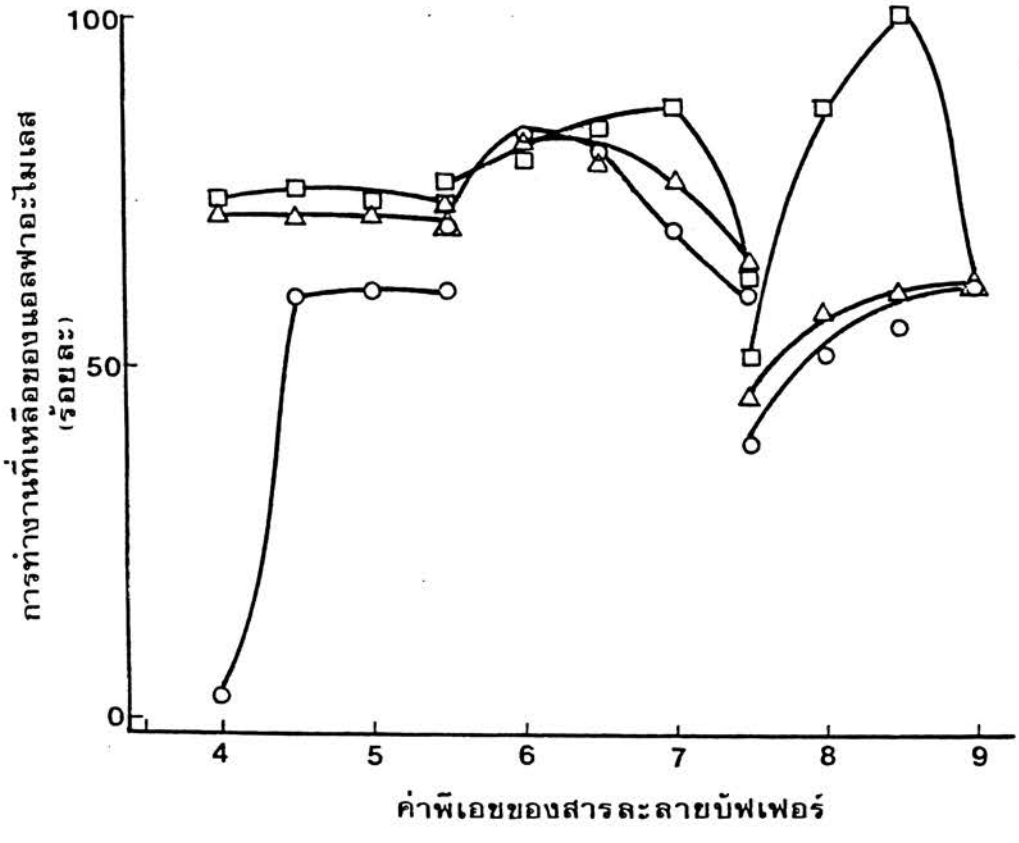
7. การเก็บรักษาแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63

7.1 ความคงทนของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

จากการศึกษาความคงทนของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ต่อความเป็นกรดด่าง ดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้าง คือ 4.5 - 9.0 และจะมีความคงทนมากขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไป ดังแสดงในรูปที่ 37 โดยที่เอนไซม์จะมีความคงทนดีที่สุด ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.5 ในสภาพที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์

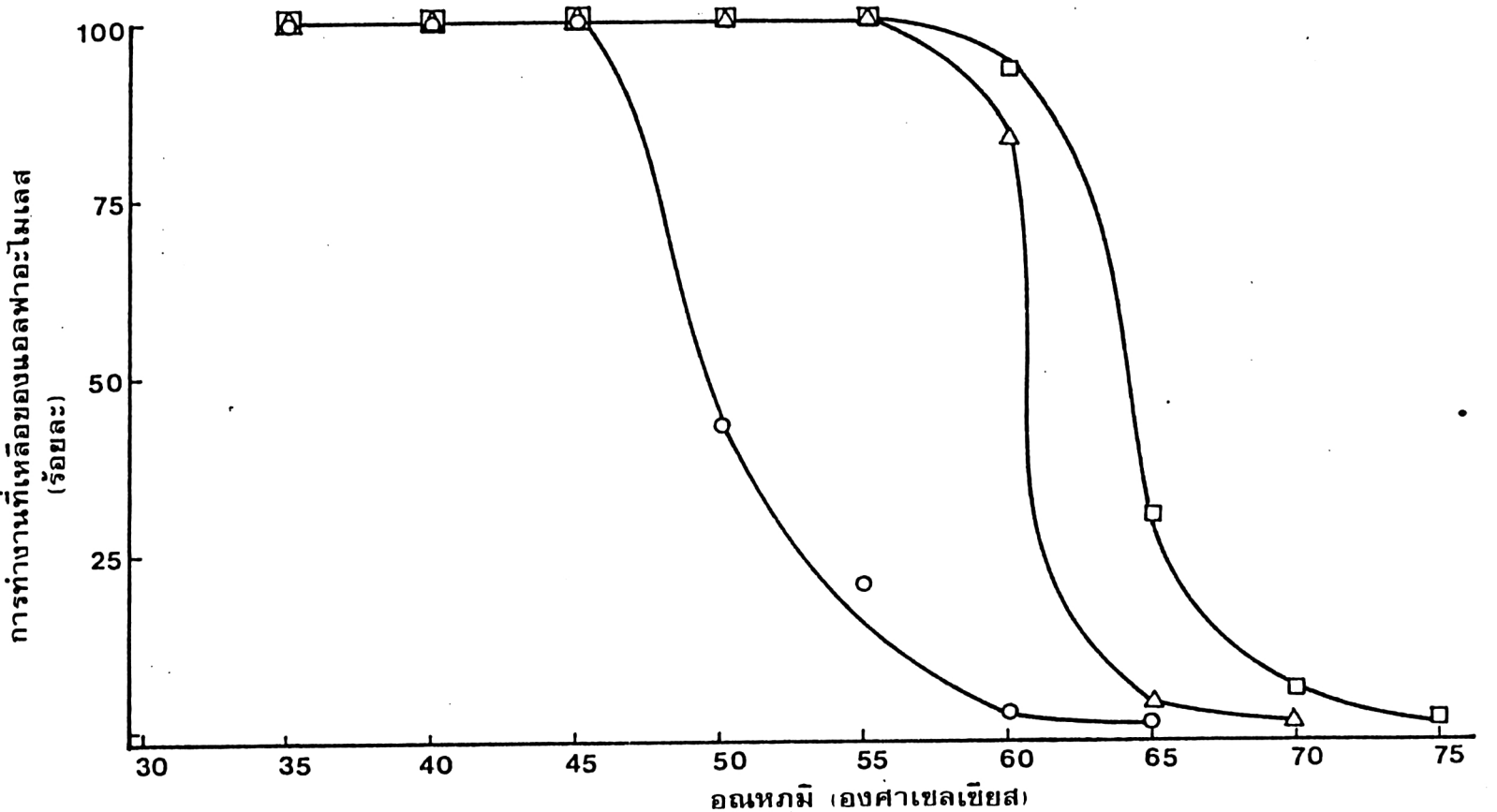
7.2 ความคงทนของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

จากการศึกษาความคงทนของแอลฟาอะโมเลส์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ต่ออุณหภูมิตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.2 พบว่าเอนไซม์จะมีความคงทนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยไม่สูญเสียการทำงานเลย และความคงทนจะเพิ่มขึ้น เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไป ดังแสดงในรูปที่ 38 โดยถ้าเติมแคลเซียมคลอไรด์ 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เอนไซม์มีความคงทนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที โดยการทำงานจะลดลงเหลือร้อยละ 93 และ 83 ตามลำดับ



รูปที่ 37 ความคงทนต่อค่าพีเอชของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0 (○) 5 (△) และ 10 (□) มิลลิโมลาร์ โดยการบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์การทำงาน

อะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่ค่าพีเอช 4.0 - 5.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าพีเอช 5.5 - 7.5 ทริสไฮโดรคลอไรด์ ที่ค่าพีเอช 7.5 - 9.0



รูปที่ 38 ความคงทนต่ออุณหภูมิของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B.amyloliquefaciens KA 63 ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0 (○) 5 (△) และ 10 (□) มิลลิโมลาร์ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์การทำงาน

7.3 การเตรียมเอนไซม์เหลวเข้มข้น

จากการเตรียมเอนไซม์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในสภาพของเหลวเข้มข้น ดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.3 ได้เอนไซม์ที่มีการทำงาน 14,392 หน่วย/มล. โดยการวิเคราะห์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และ 20,004.8 หน่วย/มล. โดยการวิเคราะห์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.2 และเอนไซม์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มากกว่าเอนไซม์เริ่มต้น 9.27 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 9

7.4 การเตรียมเอนไซม์ผง

จากการเตรียมเอนไซม์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในสภาพผง ดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.4 ได้เอนไซม์ที่มีการทำงาน 163,414.2 หน่วย/กรัม โดยการวิเคราะห์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และ 227,145.7 หน่วย/กรัม โดยการวิเคราะห์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.2 และเอนไซม์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มากกว่าเอนไซม์เริ่มต้น 6.12 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 10

7.5 การเตรียมเอนไซม์ระเหิดแห้ง

จากการเตรียมเอนไซม์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในสภาพระเหิดแห้ง ดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.5 ได้เอนไซม์ที่มีการทำงาน 7931.4 หน่วย/กรัม โดยการวิเคราะห์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และ 11,024.6 หน่วย/กรัม โดยการวิเคราะห์ในบทที่ 2 ข้อ 4.2 ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 9 ปริมาณของแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 40-60

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ	ปริมาตร มล.	ปริมาณโปรตีน มก.	การทำงานของเอนไซม์ หน่วย	การทำงานจำเพาะ หน่วย/มก.	ปริมาณเอนไซม์ที่ได้คิดเป็นร้อยละ	ความบริสุทธิ์ เท่า
0	1,500	19,054.35	365,068.5	19.16	-	-
40-60	15	1,215.06	215,880.0	177.67	59.13	9.27

ตารางที่ 10 ปริมาณของแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยอะซีโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 30-50

ปริมาณอะซีโตน ร้อยละ	ปริมาณเอนไซม์		ปริมาณโปรตีน มก.	การทำงานของเอนไซม์ หน่วย	การทำงานจำเพาะ หน่วย/มก.	ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ คิดเป็นร้อยละ	ความบริสุทธิ์ เท่า
	ปริมาตร (มล.)	น้ำหนัก (กรัม)					
0	1,000	-	11,992.8	415,483.33	34.64	-	-
30-50	-	1.8337	1,413.3	299,652.66	212.02	72.1	6.12

ตารางที่ 11 ผลการเตรียมแอลฟาอะไมเลส์ที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ในสภาพระเหิดแห้งโดย Freeze Drying Machine

สภาพของเอนไซม์	ปริมาณเอนไซม์		การทำงานของเอนไซม์ หน่วย	ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ คิดเป็นร้อยละ
	ปริมาตร (มล.)	น้ำหนัก (กรัม)		
ก่อนทำระเหิดแห้ง	500	-	97,660	-
หลังทำระเหิดแห้ง	-	8.05	63,847.7	69.13

7.6 การตรวจสอบการทำงานขณะเก็บ

จากการเก็บเอนไซม์เหลวเข้มข้น เอนไซม์ผงและเอนไซม์ระเหิดแห้ง ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.6 พบว่าเอนไซม์เหลวเข้มข้นจะมีการทำงานลดลง เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน เหลือเพียงร้อยละ 40 เท่านั้น ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และจะเหลือ 80 และ 82 ถ้าเก็บไว้ในตู้เย็น และตู้แช่แข็งตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12

ส่วนเอนไซม์ผง และเอนไซม์ระเหิดแห้งนั้น การทำงานแทบจะไม่ลดลงเลย เมื่อเก็บไว้นาน 1 เดือน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 12 ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเก็บเอนไซม์ในสภาพของแข็งจะมีเสถียรภาพดีกว่าการเก็บในสภาพของเหลว

ตารางที่ 12 การทำงานของแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ซึ่งเตรียมในรูปต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันนาน 1 เดือน

รูปของเอนไซม์	การทำงานที่เหลือ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ร้อยละ)		
	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	ตู้แช่แข็ง
ของเหลวเข้มข้น	40	80	82
ผง	100	100	100
ระเหิดแห้ง	97	100	100

ตารางที่ 13 คุณสมบัติของแอลฟา อะไมเลสที่ผลิตโดย B. amyloliquefaciens KA 63 ซึ่งเตรียมในรูปต่าง ๆ

รูปของเอนไซม์	วิธีการเตรียม	การทำงาน	ยีลด์ (ร้อยละ)	ความชื้น (ร้อยละ)	การทำงานหลังเก็บไว้ 1 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (ร้อยละ)
ของเหลวเข้มข้น	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำให้เข้มข้นด้วยอุลตราฟิลเตรชัน	14,392 (หน่วย/มล.)	59.13	93.75	40
ผง	ตกตะกอนด้วยอะซีโตน และทำให้แห้งในเดซิเคเตอร์	163,414.2 (หน่วย/กรัม)	72.10	8.39	100
ระเหิดแห้ง	ทำระเหิดแห้งโดย Freeze Drying Machine	7,931.4 (หน่วย/กรัม)	69.13	6.30	97