576
ข1435

รายงานการวิจัย

เรื่อง

# การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

# Screening of Microorganisms for Amylase, Protease and Lipase Production

9 - ส.ค. 2542

โดย

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล
สุมาลี เหลืองสกุล
สมใจ ศิริโภค

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ห 14432

123735

# คำนำ

อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมผงซักฟอก และ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น (1) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ในปัจจุบัน ประเทศไทยต้องนำเข้าเอนไซม์เหล่านี้จากต่างประเทศเป็นมูลค่าปีละหลายล้านบาท ดังนั้น การศึกษาการผลิตเอนไซม์เหล่านี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อที่จะได้เป็นแนวทางในการผลิตขึ้นใช้เองในประเทศ และยังเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีขึ้นใช้ในประเทศแทนการพึ่งพาหรือการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศด้วย

แหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญและเป็นที่น่าสนใจเป็นอันมาก คือ จุลินทรีย์ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์พื้นฐานที่ใช้กันมากในประเทศโดยคัดเลือกทั้งเอนไซม์ที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิห้องและเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูงเพื่อประโยชน์ในการใช้งานหลายๆด้าน

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2540 ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร.อนันต์ พูพิทยาสถาพร ที่ให้ความช่วยเหลือในการถ่ายภาพจุลินทรีย์จากกล้องจุลทรรศน์

ขจีนาฏ โพธิเวชกุลและคณะ

# บทคัดย่อ

การแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสจากตัวอย่างต่างๆ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 104 และ 34 ไอโซเลต แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 63 และ 47 ไอโซเลต ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสแยกได้จำนวน 82 และ 27 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาคัดเลือกซ้ำโดยนำเชื้อที่ให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป มาเลี้ยงในอาหารเหลว และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้สูง คือ A, JA8 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ TR และ BS สำหรับเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้สูง คือ CHB9, JB33 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ 1.4SA และ C2 ส่วนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้สูง คือ AUA2 และ M18 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ TR และ BS ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาศึกษารูปร่างและการติดสีย้อมแกรม ได้ผลทำให้จำแนกได้ว่าอยู่ในจีนัส *Bacillus* ทั้งหมด

## Abstract

The isolation of microorganisms producing amylase , protease and lipase at 37° C and 55 °C was carried out by selection of microorganisms grew on selective medium as starch agar, skim milk agar and tributyrin agar. 104 and 34 isolates of amylase producers, 63 and 47 isolates of protease producers and 82 and 47 isolates of lipase producers were screened at 37° C and 55 °C respectively. The microorganisms producing clear zone diamiter more than 1 cm. were selected and confirmed for amylase, protease and lipase activity in liquid medium by quantitative assay. Among them, A and JA8 showed high amylase activitty at 37° C while BS and TR showed at 55 °C, CHB9 and JB33 showed high protease activity at 37°C as well as 1.4 SA and C2 at 55°C, AUA2 and M18 showed high lipase activity at 37° C and also TR and BS at 55 °C. The microorganisms were all identified as genus *Bacillus* .

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทนำ | 6 |
| - วัตถุประสงค์ | 8 |
| - ขอบเขตการวิจัย | 8 |
| - ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 8 |
| อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 9 |
| ผลการทดลอง | 12 |
| สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | 28 |
| เอกสารอ้างอิง | 29 |
| ภาคผนวก ก | 31 |
| ภาคผนวก ข | 33 |
| ภาคผนวก ค | 34 |

# บทนำ

อุตสาหกรรมหลายประเภทจำเป็นต้องใช้เอนไซม์พื้นฐานหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส เอนไซม์อะไมเลสมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร การย่อยแป้ง การผลิตแอลกอฮอล์ และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมทอผ้า เอนไซม์โปรติเอสใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เบียร์ เนยแข็ง อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก และใช้ในทางเภสัชกรรม เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ไลเปสใช้กันมากทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่นการสังเคราะห์ flavor กรดไขมัน และอุตสาหกรรมผงซักฟอก เป็นต้น (2) และนอกจากนี้เอนไซม์ดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด ยังมีบทบาทในการจัดการสิ่งแวดล้อม โดยอาจนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียและขยะในแหล่งชุมชนด้วย (3)

การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบหลายอย่าง จึงเป็นที่นิยมใช้กันในทางอุตสาหกรรม (1) เอนไซม์อะไมเลสซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ α - 1,4 glucosidic linkage ของโพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง ไกลโคเจน หรือ โอลิโกแซคคาไรด์นั้น พบได้ในจุลินทรีย์พวกรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ในอุตสาหกรรมต่างๆจะใช้เอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียกันมาก เนื่องจากมีข้อดี คือ มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส *Bacillus* (4) เช่น *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* , *B. licheniformis* และ*B. coagulan* เป็นต้น ( 5-7) มีรายงานว่าเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็น α-amylase ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง คือ α- amylase ที่ทนอุณหภูมิสูง ( thermophillic α- amylase ) α- amylase ที่ทำงานในสภาพที่เป็นกรดได้ ( Acidic α- amylase ) และ α- amylase ที่ทำงานในสภาพที่เป็นด่าง ( Alkaline α- amylase ) (8) พบว่ามีแบคทีเรียบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ที่ทนความร้อนและมีความคงทนต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง เช่น *B. acidocaldarius* และ *B. licheniformis* CUMC 305 (7) ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในทางอุตสาหกรรม

เอนไซม์โปรติเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน หรือโพลีเปปไทด์ได้เป็นโมโนเปปไทด์ และกรดอะมิโน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน (9)

การจำแนกเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสโดยสหภาพเคมีนานาชาติ (IUB) ตามลักษณะการใช้งาน แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก serine protease (alkaline protease ) เช่น trypsin, chymotrypsin และ subtilisins เป็นต้น กลุ่มที่ 2 triol protease เช่น papain และ Bromelain กลุ่มที่ 3 carboxyl protease ( acid protease) เช่น rennin , pepsin , และกลุ่มที่ 4 metallo protease ( neutral protease ) เช่น thermotrypsin เป็นต้น (10) การที่เอนไซม์นี้มี

ความจำเพาะต่อสับสเทรตหลายชนิด และสามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่กว้างมาก จึงมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ

แหล่งของเอนไซม์โปรติเอสที่พบในจุลินทรีย์มีทั้งแบคทีเรียและรา ในกลุ่มของ alkaline protease พบในแยคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เช่น *B. subtilis, B. licheniformis* และ alkallophillic bacilli เป็นต้น acid protease พบในราในจีนัส *Aspergillus* และ *Mucor* ส่วน neutral protease พบทั้งในแบคทีเรียและรา เช่น *B.thermoproteolyticus* , *B. subtilis* และราในจีนัส *Aspergillus* หลาย species (11)

เอนไซม์ไลเปสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไขมันพวกไตรกลีเซอไรด์โดยไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ของกลีเซอรอล (glycerol -ester hydrolase ) แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่นิยมใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตมากกว่า เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งในไตรกลีเซอไรด์ จึงสามารถย่อยไตร-กลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ให้ผลผลิตเป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล เอนไซม์ในกลุ่มนี้พบได้ทั้งในยีสต์ และแบคทีเรีย เช่น *Candida cylindracea* , *Staphylococcus aureus* กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ และให้ผลผลิตเป็นกรดไขมัน 2- monoglyceride และ 1,2 - diglyceride หรือ 2,3 - diglyceride ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่คงตัวและถูกย่อยสลายไปจนกระทั่งได้กรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ในกลุ่มนี้พบในราจีนัส *Rhizopus* หลาย species *Aspergillus niger* และ *Mucor javanicus* ส่วนไลเปสกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไม่พบในจุลินทรีย์ทั่วไปยกเว้นไลเปสจาก *Geotrichum candidum* (12)

ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีสมบัติแตกต่างกัน บางชนิดทำงานได้ในช่วง pH ที่เป็นกลาง (neutral lipase) เช่น ไลเปสจาก *Chromobacterium* sp. (13) บางชนิดทำงานได้ที่ pH เป็นด่าง ( alkaline lipase ) เช่น ไลเปสจาก *Bacillus licheniformis* และ *Pseudomonas fragi* (14) และบางชนิดทำงานได้ที่ pH ค่อนไปทางกรด เช่น ไลเปสของ *Rhizopus delemar* ซึ่งทำงานได้ที่ pH 5.6 เป็นต้น (15) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *B. stearothermophilus* สามารถผลิตไลเปสที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง ( thermostable lipase ) ได้อีกด้วย (11)

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ทั้งเอนไซม์ที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิห้อง และเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้

2. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ได้สูง

3. ศึกษาและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อย่างคร่าวๆ

## ขอบเขตการวิจัย

1. แยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส จากแหล่งต่างๆ ทั้งเอนไซม์ที่ทำงานได้ที่ 37 และ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารแข็ง starch agar , skim milk agar และ tributyrin agar ตามลำดับ

2. คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยนำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสของโคโลนี และนำมาคัดเลือกซ้ำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อจัดจำแนกชนิดอย่างคร่าวๆ

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ทนความร้อนได้

2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม เพื่อให้เชื้อที่คัดเลือกได้จะผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูงสุด

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**1. การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส**

1.1 การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆ น้ำทิ้งโรงอาหาร และอาหารบูด มาทำให้เป็น suspension ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเจือจาง suspension ของตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar ในจานเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และตรวจหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะให้บริเวณใสรอบโคโลนี เลือกเก็บโคโลนีที่ให้บริเวณใสซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันมาแยกจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง nutrient agar

1.2 . การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำ suspension ของตัวอย่างที่ได้เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 1.1 มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar ซึ่งปรับ pH เป็น 5.5 , 7.0 , และ 8.0 แล้วในจานเพาะเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และตรวจหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเลือกเชื้อที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง nutrient agar

1.3 การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำ suspension ของตัวอย่างที่ได้เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 1.1 มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง และตรวจหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเลือกโคโลนีที่ให้บริเวณใสรอบๆโคโลนี เลือกเก็บโคโลนีที่ให้บริเวณใสซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง nutrient agar

**2. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสปริมาณสูง**

2.1 การคัดเลือกขั้นต้น

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ1.มาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารแข็ง starch agar, plate count agar ที่เติม skim milk และ tributyrin agar ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดความกว้างของบริเวณใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และเลือกเก็บเฉพาะเชื้อที่ให้ความกว้างของบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไปมาคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งในอาหารเหลวต่อไป

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นต้นจากข้อ 2.1 ซึ่งให้ความกว้างของบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไปมาศึกษาการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาใส่ลงในอาหารเหลว inoculum medium (ภาคผนวก ก.) และบ่มบนเครื่องเขย่า ( New Brunswick scientific rotary shaker , model Innova 4000) ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้ inoculum size 10 % และนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำ broth ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์โดยใช้ refrigerated centrifuge (Sorval model RC-5Plus) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดตามวิธีการในข้อ 4. เชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงจะคัดเลือกไว้เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ต่อไป

**3. การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์**

3.1 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อที่คัดเลือกได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้หลังการปั่นแยกเซลล์ในข้อ 2.2 (crude enzyme) ซึ่งเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสับสเทรต (ภาคผนวก ข. ข้อ 1.1) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีของ Bernfeld (17) ซึ่งทำโดยเติมสารละลาย DNSA (ภาคผนวก ข. ข้อ 1.2) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ค.) และแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (unit enzyme) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งให้น้ำตาลรีดิวส์ 1 มิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวตามวิธีของ Hagihara (18) โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้หลังจากการปั่นแยกเซลล์ในข้อ 2 ( crude enzyme ) ซึ่งได้เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 mM Tris HCl buffer pH 9 ที่มี 2 mM $CaCl_2$ ด้วยปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสับสเทรต (ภาคผนวก ข.) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 หรือ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Trichloroacetic acid ที่มี 0.22 M sodium acetate และ 0.33 M acetic acid เขย่าอย่างแรงและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ต่อจากนั้น นำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 สารละลายใสที่ได้จากการกรองจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน (ภาคผนวก ค.) และคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนและให้กรดอะมิโนในรูปของไทโรซีน 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวตามวิธีของ Odera (19) โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้หลังการปั่นแยกเซลล์ในข้อ 2.2 (crude enzyme) ซึ่งเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วย 0.1 M. Tris HCl buffer pH 8.5 นำ crude enzyme นี้มา 4 มิลลิลิตร เติมสับสเทรต (ภาคผนวก ข.) นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเติม acetone: alcohol (1:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.05 N sodium hydroxide โดยใช้ phenophthalein เป็น indicator คำนวณหาปริมาณ oleic acid ที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ oleic acid (ภาคผนวก ค.) และคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (unit enzyme) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้กรดไขมันในรูปของ oleic acid 1 ไมโครโมลใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

**4. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้**

ศึกษาลักษณะและวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อย่างคร่าวๆโดยการย้อมสีแกรม (Gram's stain) เพื่อศึกษารูปร่าง ลักษณะ และการติดสีแกรม และการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี เพื่อจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการใน Bergey's Manual (16)

## ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส จากแหล่งต่างๆ พบว่า สามารถแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้ทั้งหมด 104 isolates และ 34 isolates ตามลำดับ และแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสได้ทั้งหมด 63 isolates และ 47 isolates ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสแยกได้ทั้งหมด 82 isolates และ 27 isolates ตามลำดับ ดังตารางที่ 1,2,3

ตารางที่ 1. จำนวน isolatesที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 หรือ 55 องศาเซลเซียส จากแหล่งต่างๆ

| ชนิดเอนไซม์ | รหัสตัวอย่าง | แหล่งของแบคทีเรีย | จำนวน isolates |
|---|---|---|---|
| อะไมเลส 37° ซ | KS | ดิน จ. กาฬสินธุ์ | 3 |
| | KB | ดิน จ. กาญจนบุรี | 5 |
| | U | ดิน จ. อุดรธานี | 3 |
| | SB | ดิน จ. สระบุรี | 4 |
| | SP, SU | ดิน จ. ปทุมธานี | 10 |
| | CHA, CHB | ดิน จ. เชียงใหม่ | 14 |
| | AUA | ดิน จ. อุตรดิตถ์ | 14 |
| | NA | ดิน จ. หนองคาย | 2 |
| | SK | ดิน จ. สมุทรสาคร | 4 |
| | S, M | ดินกรุงเทพมหานคร | 2 |
| | K, RM | ดินกองขยะ | 3 |
| | SU | ดิน มศว ประสานมิตร | 3 |
| | A, JA, KA, F | น้ำทิ้งจากโรงอาหาร มศว ประสานมิตร | 21 |
| | JB, C, D | ดิน จ. ขอนแก่น อุบลราชธานี มหาสารคาม ศรีษะเกษ | 16 |
| อะไมเลส 55°ซ | TU | ดิน จ. อุดรธานี | 6 |
| | TKB | ดิน จ. กาญจนบุรี | 3 |
| | TSB | ดิน จ. สระบุรี | 4 |
| | TUB | ดิน จ. อุบลราชธานี | 4 |
| | UNK, U | น้ำทิ้งโรงอาหาร มศว ประสานมิตร | 3 |
| | X | ดินกองขยะหนองแขม | 4 |
| | BS | อาหารกระป๋องเสีย | 3 |
| | TR, S, UK, SA | ข้าวบูด , อาหารบูด | 7 |

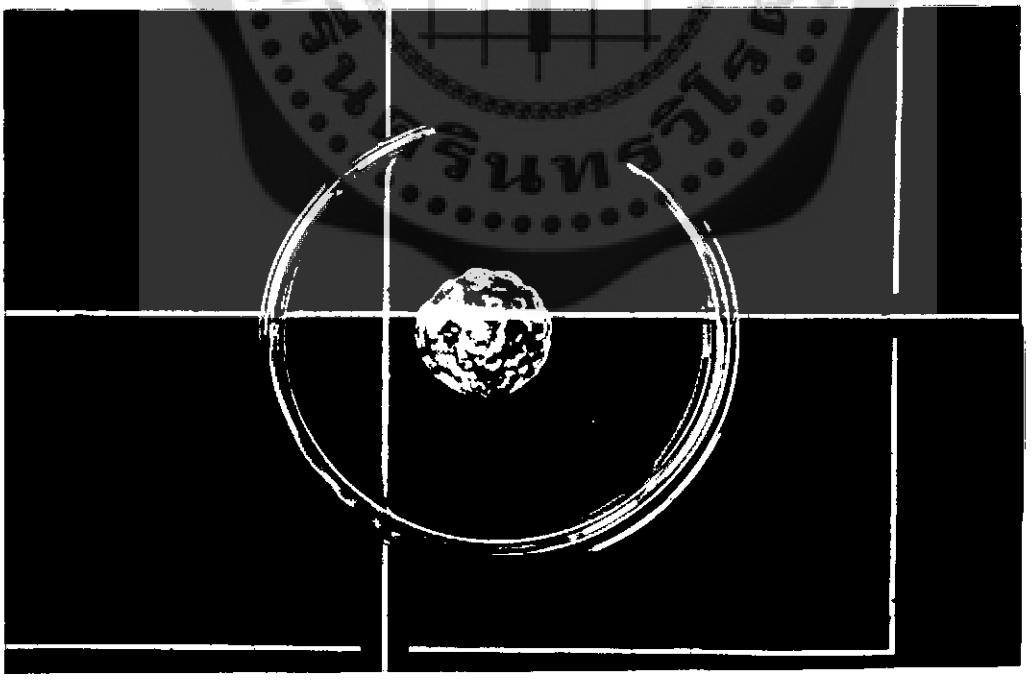
ตารางที่ 2. จำนวน isolatesที่ผลิตเอนไซม์ โปรติเอส ที่อุณหภูมิ 37 หรือ 55 องศาเซลเซียส จากแหล่งต่างๆ

| ชนิดเอนไซม์ | รหัสตัวอย่าง | แหล่งของแบคทีเรีย | จำนวน isolates |
|---|---|---|---|
| โปรติเอส 37°ซ | CHA, CHB | ดิน จ. เชียงใหม่ | 10 |
| | NA, NB | ดิน จ. หนองคาย | 6 |
| | SP | ดิน จ. ปทุมธานี | 10 |
| | SU | ดิน มศว ประสานมิตร | 3 |
| | JB | ดิน จ. ขอนแก่น | 2 |
| | X | ดิน กองขยะ | 8 |
| | SK | ดิน จ. สมุทรสาคร | 6 |
| | F, UK, JA | น้ำทิ้งโรงอาหาร มศว ประสานมิตร | 10 |
| | PP | น้ำทิ้งโรงงาน | 8 |
| โปรติเอส 55°ซ | TX | ดินกองขยะ | 8 |
| | TA, TB, C | ดิน จ. ขอนแก่น อุบลราชธานี | 10 |
| | AUA | ดิน จ. อุตรดิตถ์ | 7 |
| | SA, T, TR | อาหารบูด | 12 |
| | UNK, U | น้ำทิ้งโรงอาหาร มศว ประสานมิตร | 7 |
| | BS | อาหารกระป๋องที่เสีย | 3 |

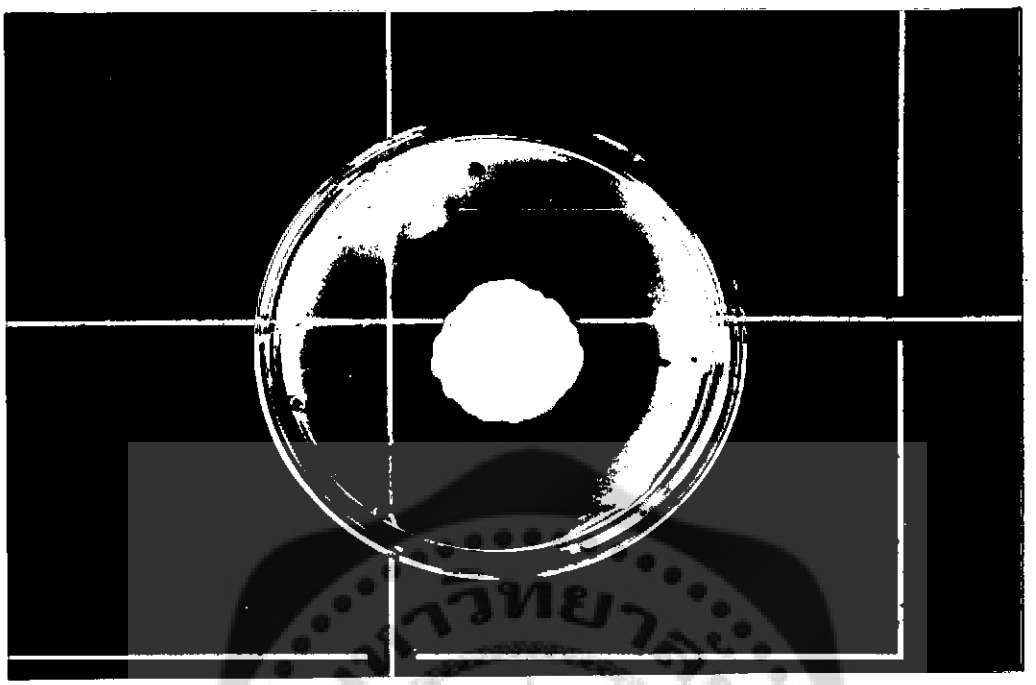
ตารางที่ 3. จำนวน isolatesที่ผลิตเอนไซม์ ไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 หรือ 55 องศาเซลเซียส จากแหล่งต่างๆ

| ชนิดเอนไซม์ | รหัสตัวอย่าง | แหล่งของแบคทีเรีย | จำนวน isolates |
|---|---|---|---|
| ไลเปส 37°ซ | WML, ML | น้ำทิ้งโรงงานมาลี | 8 |
| | ML | ดินโรงงานมาลี | 6 |
| | NP, TB, Y, O | น้ำจากกองขยะ | 9 |
| | P | ดินสีดา | 3 |
| | G, K, X | ดินกองขยะ | 10 |
| | A, RM, F, JA | น้ำทิ้งโรงอาหาร มศว | 12 |
| | JB, JC | ดิน จ. ขอนแก่น อุบลราชธานี | 4 |
| | WW | น้ำทิ้งบ้านเรือน | 10 |
| | N | ดิน จ. นครปฐม | 4 |
| | AUA | ดิน จ. อุตรดิตถ์ | 5 |
| | NA,NB | ดิน จ. หนองคาย | 5 |
| | CHB | ดิน จ. เชียงใหม่ | 6 |
| ไลเปส 55° ซ | SA, T, TR, UK, C | อาหารบูด | 14 |
| | SK | ดิน จ. สมุทรปราการ | 4 |
| | TB | ดิน จ. ขอนแก่น | 1 |
| | BS | อาหารกระป๋องเสีย | 1 |
| | X | ดินกองขยะหนองแขม | 4 |
| | NP | น้ำจากกองขยะ | 3 |

ภาพที่ 1 แสดงบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อที่ย่อยสลาย starch



ภาพที่ 2 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ย่อยสลายโปรทีน



**ภาพที่ 3 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ย่อยสลายไขมัน**

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสในขั้นต้น

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 37 หรือ 55 องศาเซลเซียส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้น และคัดเลือกขั้นต้นเฉพาะเชื้อที่ให้บริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป เพื่อนำไปคัดเลือกอีกครั้ง ได้ผลดังตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4. เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ 37 องศาเซลเซียสที่ได้ในการคัดเลือกขั้นต้น

| รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.) | รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.) |
|---|---|---|---|---|---|
| KS1.1 | 0.5 | 1.2 | JA9 | 1.0 | 1.8 |
| KB3.1 | 1.1 | 1.7 | JA10 | 0.7 | 1.4 |
| KB3.3 | 0.4 | 1.3 | JA16 | 0.9 | 1.5 |
| U4.1 | 0.5 | 1.4 | JA18 | 0.7 | 1.3 |
| U5.1 | 0.6 | 1.3 | JB20 | 0.8 | 1.4 |
| SB6.1 | 1.0 | 1.8 | JB24 | 0.4 | 1.7 |
| SB6.4 | 0.9 | 1.7 | JB29 | 0.9 | 1.6 |
| SB7.3 | 0.7 | 1.6 | JB33 | 0.9 | 1.8 |
| SB11 | 0.5 | 1.0 | JB38 | 1.0 | 1.7 |
| M2.1 | 1.1 | 2.1 | JB55 | 0.8 | 1.2 |
| M5.2 | 0.6 | 1.7 | AUA2 | 1.0 | 2.3 |
| M8.1 | 0.9 | 1.9 | AUA8 | 0.7 | 1.0 |
| S3.1 | 0.6 | 2.5 | AUA11 | 0.6 | 1.1 |
| S3.3 | 0.5 | 1.9 | AUA12 | 0.7 | 1.3 |
| S2 | 0.7 | 1.6 | AUA14 | 0.8 | 1.6 |
| A | 2.8 | 3.8 | CHB4 | 0.6 | 1.0 |
| KB1A | 0.6 | 1.7 | CHB10 | 0.9 | 1.2 |
| KB3A | 0.7 | 1.5 | NA1 | 1.0 | 1.6 |
| C | 0.5 | 1.7 | RM2 | 1.2 | 2.4 |
| KB3D | 0.7 | 1.2 | SK11 | 0.7 | 1.0 |
| JA8 | 0.8 | 1.9 | | | |

ตารางที่ 5. เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ 55 องศาเซลเซียสที่ได้ในการคัดเลือกขั้นต้น

| รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.) | รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.) |
|---|---|---|---|---|---|
| TU1.1 | 0.7 | 1.0 | S3.1E | 0.5 | 1.5 |
| TU1.2 | 0.6 | 1.3 | S5.2 | 0.4 | 1.4 |
| TU1.4B | 1.0 | 1.7 | S6.1 | 0.6 | 1.7 |
| TU1.4R | 0.9 | 1.6 | UKR | 0.9 | 1.6 |
| TKB3.3 | 0.7 | 1.5 | UK5 | 0.7 | 1.4 |
| TKB4.4 | 0.6 | 1.2 | X2 | 0.6 | 1.5 |
| TSB5 | 0.5 | 1.1 | X3 | 0.5 | 1.0 |
| TSB5.1 | 0.7 | 1.0 | X4 | 0.6 | 1.5 |
| TSB5.2 | 0.4 | 1.2 | BS | 0.4 | 1.8 |
| TSB5.3 | 0.7 | 1.1 | NP2 | 0.7 | 1.4 |
| TSB5.6 | 0.6 | 1.0 | 5SA | 0.8 | 1.0 |
| TUB6.5 | 0.8 | 1.2 | T5.6 | 1.2 | 1.7 |
| TUB6.6 | 0.7 | 1.1 | T6.1 | 0.7 | 1.2 |
| TR | 0.8 | 2.8 | T6.5 | 0.8 | 1.5 |
| S3.1 | 0.6 | 1.6 | UNK | 0.7 | 1.6 |

ตารางที่ 6. เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ 37 องศาเซลเซียสที่ได้ในการคัดเลือกขั้นต้น

| รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส(ซม.) | รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.) |
|---|---|---|---|---|---|
| CHB1 | 1.5 | 2.0 | SU1 | 1.5 | 2.0 |
| CHB2 | 0.8 | 1.2 | SU4 | 0.6 | 1.0 |
| CHB3 | 1.0 | 1.5 | PP11 | 1.0 | 1.8 |
| CHB5 | 1.1 | 1.5 | SP1 | 3.1 | 3.6 |
| CHB6 | 1.0 | 1.5 | SP6 | 0.7 | 1.4 |
| CHB9 | 0.8 | 1.2 | SP7 | 1.0 | 1.2 |
| CHB10 | 2.3 | 4.2 | SK7 | 0.8 | 1.0 |
| NB1 | 0.7 | 1.2 | NA3 | 0.9 | 1.4 |
| NB5 | 3.2 | 3.5 | NA11 | 1.0 | 1.8 |
| NB8 | 0.8 | 1.3 | JB33 | 0.8 | 1.9 |
| F4 | 0.6 | 1.0 | JB55 | 0.9 | 1.7 |
| F10 | 0.6 | 1.6 | AUA2 | 0.7 | 1.9 |

ตารางที่ 7. เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ 55 องศาเซลเซียสที่ได้ในการคัดเลือกขั้นต้น

| รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส(ซม.) | รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (ซม.) |
|---|---|---|---|---|---|
| X2 | 0.7 | 1.0 | 1.4SA | 0.5 | 1.0 |
| X3 | 0.5 | 1.2 | 1.5SA | 0.7 | 1.0 |
| C | 1.0 | 2.2 | 3.1SA | 0.9 | 1.1 |
| C1 | 0.5 | 1.5 | 5SA | 0.8 | 1.0 |
| C2 | 0.7 | 1.5 | T1.2 | 0.9 | 1.2 |
| TA2 | 0.6 | 1.2 | T1.4R | 0.5 | 1.1 |
| TA8 | 0.5 | 2.2 | T1.4B | 0.5 | 1.1 |
| TA14 | 0.6 | 1.8 | T5.3B | 0.7 | 1.0 |
| TB19 | 0.6 | 2.3 | T5.6R | 0.6 | 1.0 |
| TB20 | 0.7 | 2.3 | T6.5R | 0.7 | 1.0 |
| TB22 | 0.7 | 1.5 | T7.2 | 0.7 | 1.0 |
| TB23 | 0.4 | 1.7 | UK5 | 0.5 | 1.1 |
| 8SA | 0.4 | 1.1 | UNK | 0.5 | 1.0 |
| 1.2SA | 0.6 | 1.0 | BS | 0.6 | 1.2 |

ตารางที่ 8. เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ 37 องศาเซลเซียสที่ได้ในการคัดเลือกขั้นต้น

| รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส(ซม.) | รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส( ซม.) |
|---|---|---|---|---|---|
| P1 | 0.5 | 1.0 | JA18 | 0.7 | 1.0 |
| P3 | 1.0 | 1.5 | JB29 | 0.6 | 1.0 |
| M18 | 0.8 | 1.0 | JB33 | 0.5 | 1.0 |
| RM2 | 0.5 | 1.0 | JB55 | 0.6 | 1.0 |
| O4 | 0.7 | 1.0 | K1.1 | 0.6 | 1.0 |
| NA18 | 0.4 | 1.0 | K6.1 | 0.5 | 1.3 |
| A | 0.6 | 1.0 | K6.4 | 0.6 | 1.0 |
| 3A | 0.7 | 1.0 | R7 | 0.4 | 1.0 |
| AUA2 | 0.4 | 1.1 | R8 | 0.3 | 1.0 |
| AUA12 | 0.6 | 1.0 | R17 | 0.7 | 1.0 |
| M14 | 0.5 | 1.0 | R27 | 0.4 | 1.0 |
| SK3 | 0.4 | 1.0 | CHB1 | 0.3 | 1.0 |
| ML2 | 0.3 | 1.0 | CHB3 | 0.8 | 1.0 |
| S3.3 | 0.5 | 1.0 | CHB10 | 0.6 | 1.0 |
| S6.1 | 0.4 | 1.0 | NA11 | 0.6 | 1.0 |
| JA8 | 2.7 | 2.2 | NB5 | 0.7 | 1.0 |
| JA9 | 1.0 | 1.5 | M8.1 | 0.3 | 1.0 |
| JA16 | 2.7 | 1.5 | | | |

ตารางที่ 9. เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไอเปสที่ 55 องศาเซลเซียสที่ได้ในการคัดเลือกขั้นต้น

| รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส( ซม.) | รหัสเชื้อ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ( ซม.) | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส( ซม.) |
|---|---|---|---|---|---|
| T5.6 | 0.2 | 1.0 | TB | 0.6 | 1.0 |
| T6.5 | 0.4 | 1.0 | T7.2 | 0.7 | 1.0 |
| UK5 | 0.4 | 1.0 | X2 | 0.5 | 2.0 |
| BS | 0.6 | 1.0 | X3 | 0.8 | 2.0 |
| TR | 0.5 | 1.0 | X4 | 0.5 | 1.5 |
| 1.2SA | 0.5 | 1.0 | NP2 | 0.5 | 1.0 |
| 5SA | 0.6 | 1.0 | NP4 | 0.45 | 1.0 |
| S3.1SA | 0.4 | 1.0 | | | |

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ในอาหารเหลว

เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทำการคัดเลือกซ้ำโดยนำเชื้อที่ให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไปมาเลี้ยงในอาหารเหลว และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลดังตารางที่ 10 ดังนี้

ตารางที่ 10 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อที่คัดเลือกขั้นต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

| รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มล.) | รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มล.) |
|---|---|---|---|
| KS1.1 | 3.02 | JA10 | 2.69 |
| KB3.1 | 3.41 | JA16 | 1.28 |
| KB3.3 | 3.65 | JA18 | 1.82 |
| U4.1 | 1.27 | JB20 | 3.92 |
| U5.1 | 4.32 | JB24 | 2.60 |
| SB6.1 | 2.24 | JB29 | 2.15 |
| SB6.4 | 2.07 | JB33 | 1.85 |
| SB7.3 | 2.90 | JB38 | 2.56 |
| SB11 | 2.17 | JB55 | 1.71 |
| M2.1 | 4.92 | AUA2 | 2.88 |
| M5.2 | 4.68 | AUA8 | 2.33 |
| M8.1 | 4.28 | AUA11 | 1.35 |
| S2 | 4.52 | AUA12 | 2.86 |
| A | 10.94 | AUA14 | 3.53 |
| KB1A | 3.10 | CHB4 | 2.14 |
| KB3A | 2.97 | CHB10 | 2.71 |
| C | 5.47 | NA1 | 3.06 |
| KB3D | 3.43 | RM2 | 2.84 |
| JA8 | 6.79 | SK11 | 1.58 |
| JA9 | 1.44 | | |

ตารางที่ 11 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อที่คัดเลือกขั้นต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

| รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มล.) | รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มล.) |
|---|---|---|---|
| TU1.1 | 2.45 | S3.1E | 1.65 |
| TU1.2 | 2.51 | S5.2 | 2.13 |
| TU1.4B | 2.55 | S6.1 | 6.48 |
| TU1.4R | 6.02 | UNK | 2.14 |
| TKB3.3 | 2.92 | UKR | 2.06 |
| TKB4.4 | 2.51 | UK5 | 2.68 |
| TSB5 | 2.57 | X2 | 6.12 |
| TSB5.1 | 2.63 | X3 | 6.03 |
| TSB5.2 | 2.54 | X4 | 4.75 |
| TSB5.3 | 2.58 | BS | 7.05 |
| TSB5.6 | 2.27 | NP2 | 5.86 |
| TUB6.5 | 2.59 | 5SA | 6.43 |
| TUB6.6 | 1.85 | T5.6 | 4.41 |
| TR | 6.86 | T6.1 | 2.70 |
| S3.1 | 6.21 | T6.5 | 2.16 |

ผลจากตารางที่ 10 และ 11 แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือ A, JA8, M2.1, S2, และ U5.1 ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ BS, TR, S6.1 และ X2 ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการคัดเลือกขั้นต้นซึ่งให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไปมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี pH 9.5 และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 ,13

ตารางที่ 12 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อที่คัดเลือกขั้นต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

| รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/มล.) | รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/มล.) |
|---|---|---|---|
| CHB1 | 14.77 | F4 | 20.1 |
| CHB2 | 14.58 | F10 | 15.0 |
| CHB3 | 18.58 | SU1 | 15.17 |
| CHB5 | 13.37 | SU4 | 16.11 |
| CHB6 | 14.37 | PP11 | 18.51 |
| CHB9 | 31.0 | SP1 | 19.12 |
| CHB10 | 17.98 | SP6 | 10.23 |
| NA3 | 14.37 | SP7 | 13.45 |
| NA11 | 14.10 | SK7 | 18.11 |
| NB1 | 13.17 | JB33 | 25.2 |
| NB5 | 15.44 | JB55 | 21.19 |
| NB8 | 17.44 | AUA2 | 13.3 |

ตารางที่ 13 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อที่คัดเลือกขั้นต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

| รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/มล.) | รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/มล.) |
|---|---|---|---|
| X2 | 18.9 | 3.1SA | 12.8 |
| X3 | 16.4 | 5SA | 12.8 |
| C | 23.4 | 8SA | 16.5 |
| C1 | 18.2 | T1.2 | 17.8 |
| C2 | 31.4 | T1.4R | 26.3 |
| TA8 | 12.97 | T1.4B | 22.5 |
| TA14 | 12.21 | T5.3B | 16.4 |
| TB19 | 12.25 | T5.6R | 17.4 |
| TB20 | 14.10 | T6.5R | 21.9 |
| TB22 | 12.45 | T7.2 | 20.8 |
| TB23 | 13.15 | UK5 | 15.7 |
| 1.2SA | 13.8 | UNK | 24.2 |
| 1.4SA | 34.4 | TR | 19.9 |
| 1.5SA | 15.4 | BS | 17.0 |

ผลจากตารางที่ 12 และ 13 แสดงว่าเชื้อที่เอนไซม์โปรติเอสที่ 37 องศาเซลเซียสซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูง คือ CHB9, B33, B55 และ F4 ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูง คือ 1.4SA, C2, UNK และ T1.4R ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากการคัดเลือกขั้นต้นซึ่งให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไปมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ 37 และ55 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 14 ,15

ตารางที่ 14 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อที่คัดเลือกขั้นต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

| รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มล.) | รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มล.) |
|---|---|---|---|
| P1 | 2.64 | JB29 | 2.87 |
| P3 | 4.20 | JB33 | 4.19 |
| M18 | 4.26 | JB55 | 4.55 |
| RM2 | 4.07 | S3.3 | 3.00 |
| O4 | 3.75 | S6.1 | 2.67 |
| NA18 | 4.19 | K1.1 | 2.67 |
| A | 4.19 | K6.1 | 2.27 |
| 3A | 3.47 | K6.4 | 3.00 |
| AUA2 | 4.28 | R7 | 2.61 |
| AUA12 | 4.01 | R8 | 2.82 |
| M14 | 4.01 | R17 | 2.67 |
| SK3 | 2.61 | R27 | 2.67 |
| ML2 | 3.81 | CHB1 | 2.67 |
| S3.3 | 3.00 | CHB3 | 3.45 |
| S6.1 | 2.67 | CHB10 | 2.67 |
| JA8 | 3.00 | NA11 | 3.15 |
| JA9 | 2.55 | NB5 | 2.46 |
| JA16 | 3.00 | M8.1 | 2.46 |
| JA18 | 2.61 | | |

ตารางที่ 15 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อที่คัดเลือกขั้นต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

| รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มล.) | รหัสเชื้อ | แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มล.) |
|---|---|---|---|
| T5.6 | 3.00 | TB | 2.94 |
| T6.5 | 3.75 | T7.2 | 3.48 |
| UK5 | 2.94 | X2 | 2.73 |
| BS | 4.01 | X3 | 2.82 |
| TR | 4.07 | X4 | 2.73 |
| 1.2SA | 3.75 | NP2 | 3.27 |
| 5SA | 3.96 | NP4 | 2.82 |
| S3.1SA | 3.87 | | |

ผลจากตารางที่ 14 และ 15 แสดงว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูง คือ AUA2, M18, P3, NA18, A, JB33, JB55 และ T6.5ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูง คือ TR, BS และ S3.1SA ตามลำดับ

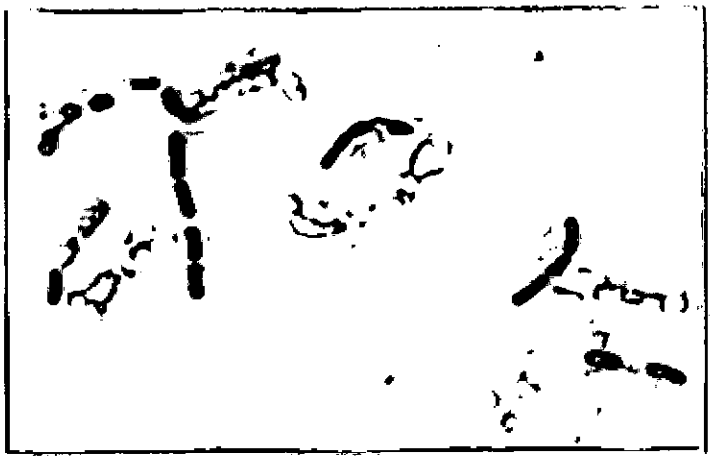
4. การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการย้อมแกรมเพื่อศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อที่คัดเลือกได้ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดรูปร่างเป็นท่อนที่มีขนาดต่างๆกัน สร้างเอนโดสปอร์ และติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 1- และการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี แสดงไว้ในตารางที่ 16

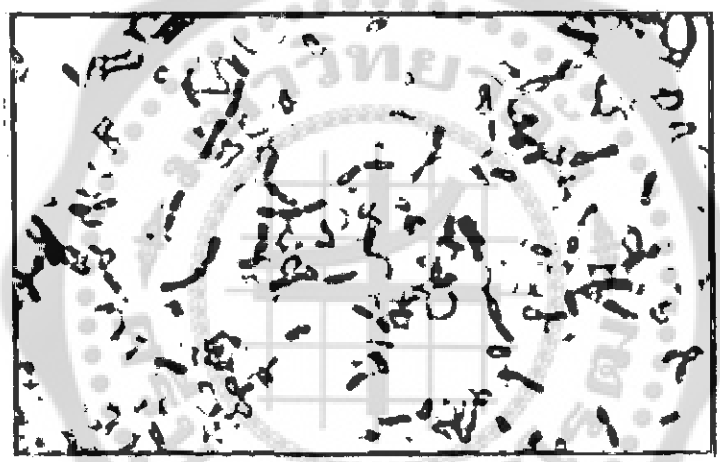
**ตารางที่ 16 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่คัดเลือกได้**

| characteristic | AUA2 | M18 | JB33 | F4 | A | CHB9 | JA8 | 1.4SA | C2 | TR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hydrolysis of strach | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Hydrolysis of casein | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + |
| Hydrolysis of gelatin | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Utilization of citrate | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Acid from D-glucose | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| Acid from D-mannitol | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - |
| Gas from glucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tryptone | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Catalase | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MR-VP test | - | - | + | + | + | - | + | - | + | - |
| Growth on 7% NaCl | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

จากการย้อมสีแกรมและการทดสอบสมบัติทางเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเปรียบเทียบกับ Bergey's manual พอสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดอยู่ในจีนัส *Bacillus* แต่ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็น species ใด เนื่องจากการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีที่ทำได้คร่าวๆนี้ไม่เพียงพอที่จะจัดจำแนกเชื้อได้อย่างแน่นอน หากต้องการจัดจำแนกอย่างถูกต้อง ควรต้องมีการวิเคราะห์สมบัติอื่นๆเพิ่มเติม



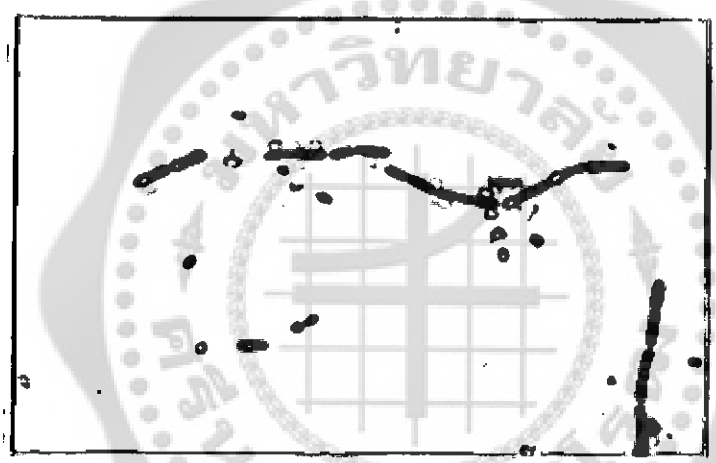
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อ A (500×)



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะของเชื้อ JA8 (500×)

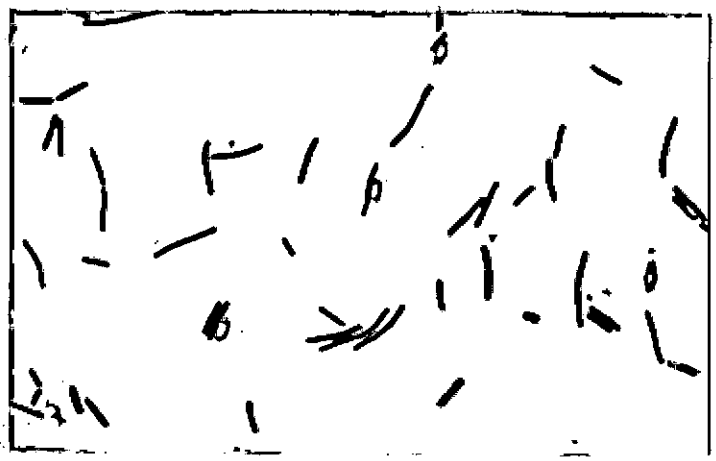
ภาพที่ 6 แสดงลักษณะของเชื้อ TR (500×)

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของเชื้อ BS (500×)

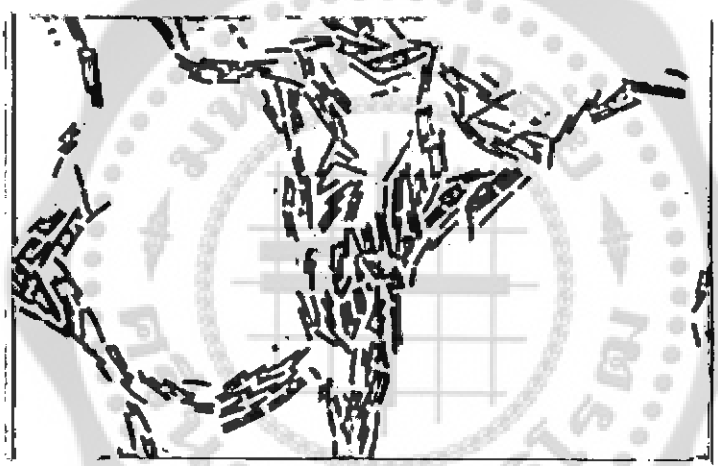


ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของเชื้อ CHB 9 (500×)

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของเชื้อ JB 33 (500×)



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะของเชื้อ 1.4 SA (500×)



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะของเชื้อ C 2 (500×)

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะของเชื้อ AUA 2 (500×)

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะของเชื้อ M 18 (500×)

มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ

# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสจากตัวอย่างต่างๆโดยอาศัยจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในอาหารแข็ง 3 ชนิด คือ starch agar, skim milk agar และ tributyrin agar ตามลำดับ และแยกเฉพาะเชื้อที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนีนั้น พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้ทั้งหมด 104 และ 34 isolates ตามลำดับ แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสได้ 63 และ 47 isolates ส่วนแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้ทั้งหมด 82 และ 27 isolates ตามลำดับ แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดนี้ได้นำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูง โดยวิธีการ 2 ขั้นตอน คือ การคัดเลือกขั้นต้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็งทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธี point inoculation และเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสรอบโคโลนีตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นต้นมาคัดเลือกซ้ำ โดยศึกษาการผลิตเอนไซม์โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้น พบว่าเชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสคือ A และ JA8 ส่วนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ BS และTR และเชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CHB9 และ JB33 และที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ 1.4 SA และ C2 สำหรับเชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือ AUA2 และ M 18 และที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ TR และ BS แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 12 isolates นี้ เมื่อนำไปศึกษารูปร่างและการติดสีย้อมแกรม พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีรูปร่างเป็นท่อนขนาดต่างๆกัน สร้างเอนโดสปอร์ และติดสีแกรมบวก จึงจัดว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส แบซิลลัส แต่จากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเหล่านี้เปรียบเทียบกับ Bergey 's manual แล้ว ไม่สามารถสรุปได้แน่นอนว่าเป็นแบคทีเรียใน species ใด ดังนั้นจึงอาจจะต้องมีการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆเพื่อนำมาใช้ในการจำแนก species อย่างแน่นอนต่อไป

# เอกสารอ้างอิง


1. Aunstrup, K. 1979. Production, Isolation and Economic of Extracellular Enzymes In **Appl. Biochem. Bioeng.** ( Wingard,L. Katchalaski- Katzir, E. and L. Goldstein, eds. ) , 2 : 27-69. Academic Press. New York.

2. Halpern, M.G. 1981. Industrial Enzymes from Microbial Source: **Recent Advances.** Noyes Data Cooperation, USA.

3. Gerhartz, W. 1990. **Enzymes in Industry : Production and Applications.** VCH. Publishers. Weinheim, Germany.

4. Ingle, M.B. and R.J. Erickson. 1978. Bacterial α- Amylase. **In Advances in Applied Microbiology**. ( D. Perlman. ed. ) , 24: 257-278. Academic Press. New York.

5. Tsuchiya, K., A. Shinyo., K. Shimogama., M. Okazaki and Y. Miura. 1975. "Characteristics of α- Amylase Production by *B. subtilis* . KYA 741 " . **Ferment. Technol.** 53(4) : 199-206.

6. Hartman, P. A. , R. Jr. Willerson and P.A. Tetraut. 1955. "*Bacillus stearothermophilus*. Thermal and pH stabilty of the Amylase. " **Appl. Microbiol.** 3: 7-10.

7. Medda, S. and A.K. Chandra . 1980. New Strains of *B. licheniformis* and *B. coagulan* Producing Thermostable α- Amylase Acyion at alkaline pH " **J. Appl. Bacteriol.** 48: 47-58.

8. Outrup, H., O. Anderson and K. Aunstrup. 1976. **Improvements in pr Relating to the Preparation of Microbial Enzyme.** US. patant 1,296,839.

9. Hui, Y. H. 1991. **Encyclopidia of Food Science and Technology.** vol. 2 : 745-748. John Wiley and Sons , Inc. USA.

10. Whitaker, J. R. 1972. **Principle of Enzymology for the Food Science** . Marcel Dekker, Inc. New York.

11. Rehm, H-J and G. Reed. 1987. Production of Enzymes by Fermentation. In **Biotechnology** ( J. Kenedy ed.) 7a : 110-150. Academic Press, New York .

12. Maerae, A.R. 1983. Lipase-catalized Intevesterification of Oils and Fats. **Amer.Oil Chem.Soc.** 60(2) : 234A-246A.

13. Yamaguchi,T.N. Muroya, M. Isoba and M. Sugiura. 1973. Production and Properties of Lipase from a Newly Isolated Chromobacterium. **Agr. Biol. Chem.** 37(5) :999-1005.

14. Johnson, N. and B.G. Snyg. 1974. Lipase Production and Activity as A Function of Incubation Time, pH and Temperature of Four Lipolytic Microorganisms. **J Appl. Bacteriol.** 37:571-575.

15. Fukumoto, J., Y. Tsujisaka., and M. Iwai. 1966. **Preparation of a stable Lipase Composition and Purification.** US. patent 3262863.

16. Sneath, P.H.A., N.S.Mair, M.E. Sharpe and J.G.Holt.1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** vol.2.London : Williams and Wilkins. P.1105-1139.

17. Bernfeld,P.1965. Amylase $\alpha$- and $\beta$-. In **Methods in Enzymology** ( S.P. Colowick and M.O. Kaplan,eds. ) 1:149. New York : Academic Press.

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

19. Odera, M.,K.Takeuchi and A.Tohe.1986. Molecular Cloning of Lipase Genes from *Alcaligenes denitrificans* and their Expression in *Escherichia coli* , **J. Ferment. Technol.** 64(5):363-371.

# ภาคผนวก ก.

## อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

**Inoculum medium**

| | | |
|---|---|---|
| soluble starch | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Peptone | 5 | กรัม |
| NaCl | 5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มล. , pH 7.0 |

**Production medium**

| | | |
|---|---|---|
| Soluble starch | 10 | กรัม |
| casamino acid | 5 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 3.0 | กรัม |
| $MgSO_4 . 7H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มล. , pH 7.0 |

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

**Inoculum medium**

| | | |
|---|---|---|
| กลูโคส | 10 | กรัม |
| Peptone | 5 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| $MgSO_4 . 7H_2O$ | 0.25 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มล. , ปรับ pH สุดท้ายเป็น 9.5 |

**Production medium**

| | | |
|---|---|---|
| กลูโคส | 10 | กรัม |
| Peptone | 5 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| $MgSO_4 . 7H_2O$ | 0.25 | กรัม |

| | | |
|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 5 | กรัม |
| $NaHCO_3$ | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มล. , ปรับ pH สุดท้ายเป็น 9.5 |

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์ไลเปส

**Inoculum medium**

| | | |
|---|---|---|
| Olive Oil | 10 | มล. |
| Peptone | 3 | กรัม |
| Yeast extract | 2 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มล. , ปรับ pH เป็น 7.0 |

**Production medium**

| | | |
|---|---|---|
| Olive Oil | 10 | มล. |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1.3 | กรัม |
| Yeast extract | 0.2 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.9 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มล. , ปรับ pH เป็น 7.0 |

# ภาคผนวก. ข.
# สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

## 1. การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

1.1 สับสเทรต : 2% Soluble Strach ใน 0.02 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.9

1.2 สารละลาย DNSA ( Dinitrosalicylic acid )

| | | |
|---|---|---|
| DNSA | 1 | กรัม |
| 2 M. NaOH | 20 | มล. |
| K, Na-Tartrate | 30 | กรัม |
| ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น | 1,000 | มล. |

## 2. การวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส

2.1 สับสเทรต : 10% Casein ใน ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 9.5

2.2 0.5โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 9.5

| | | |
|---|---|---|
| 0.5M. Tris -HCl | 0.23 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.04 | กรัม |
| ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น | 100 | มล. |

## 3. การวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

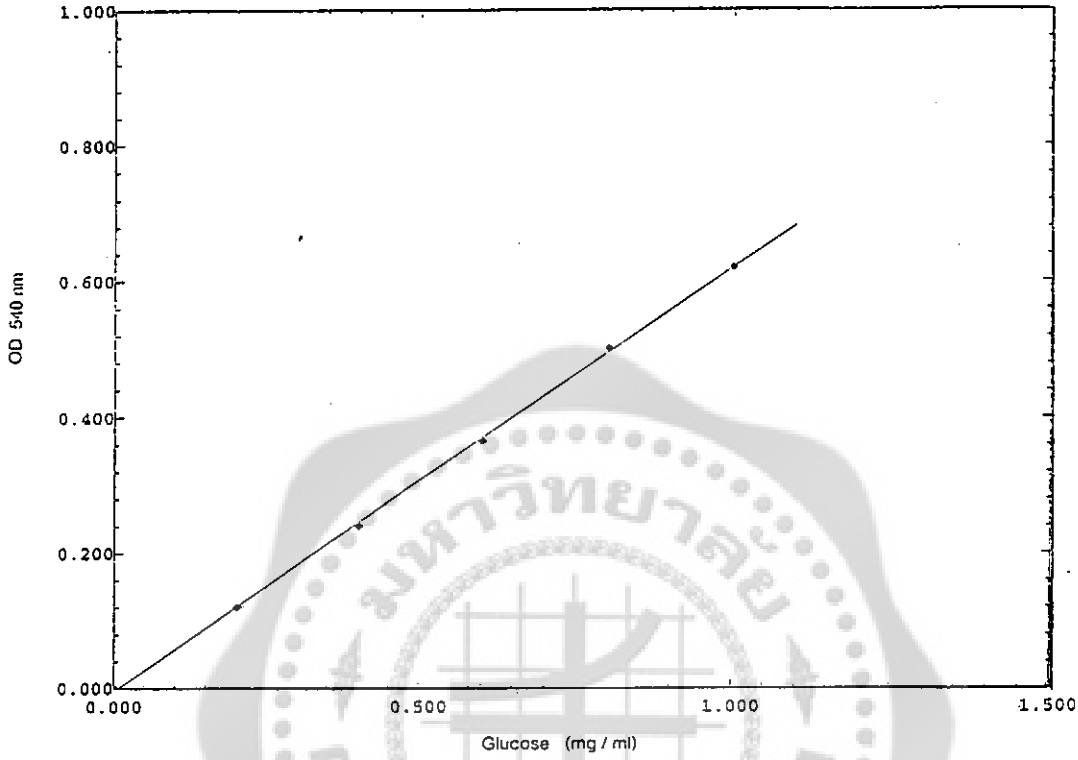
3.1 สับสเทรต : ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Olive Oil | 1.0 | มล. |
| Polyvinyl alcohol | 0.09 | มล. |
| น้ำกลั่น | 100 | มล. |

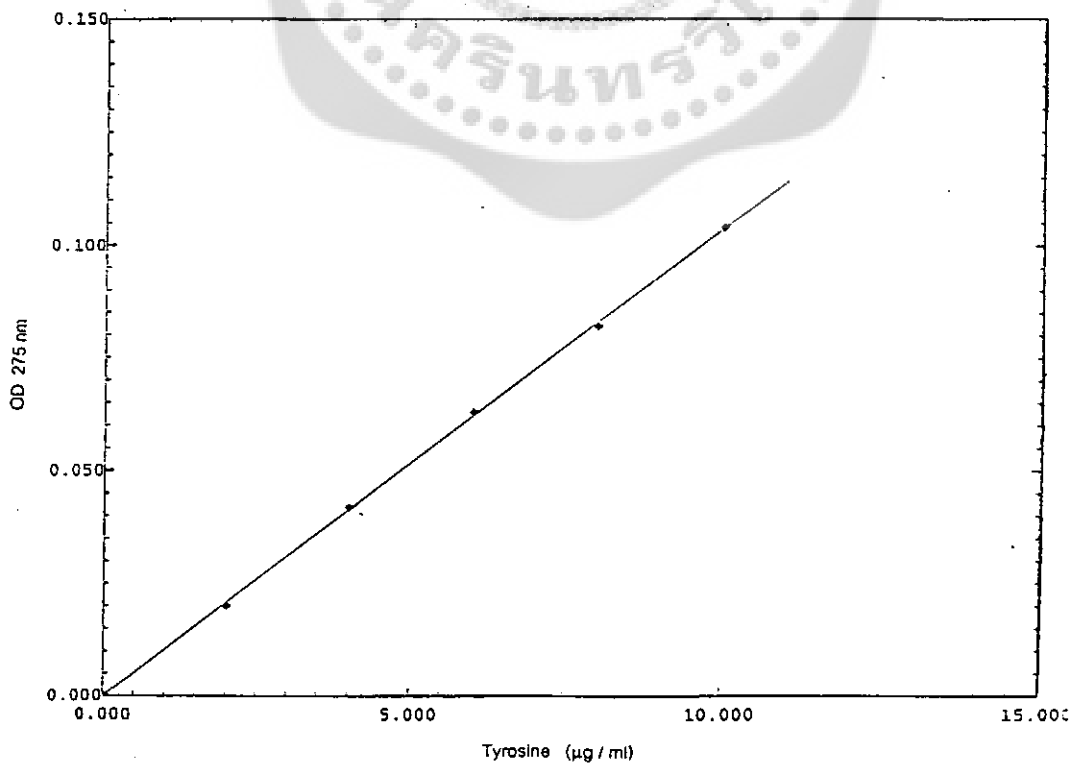
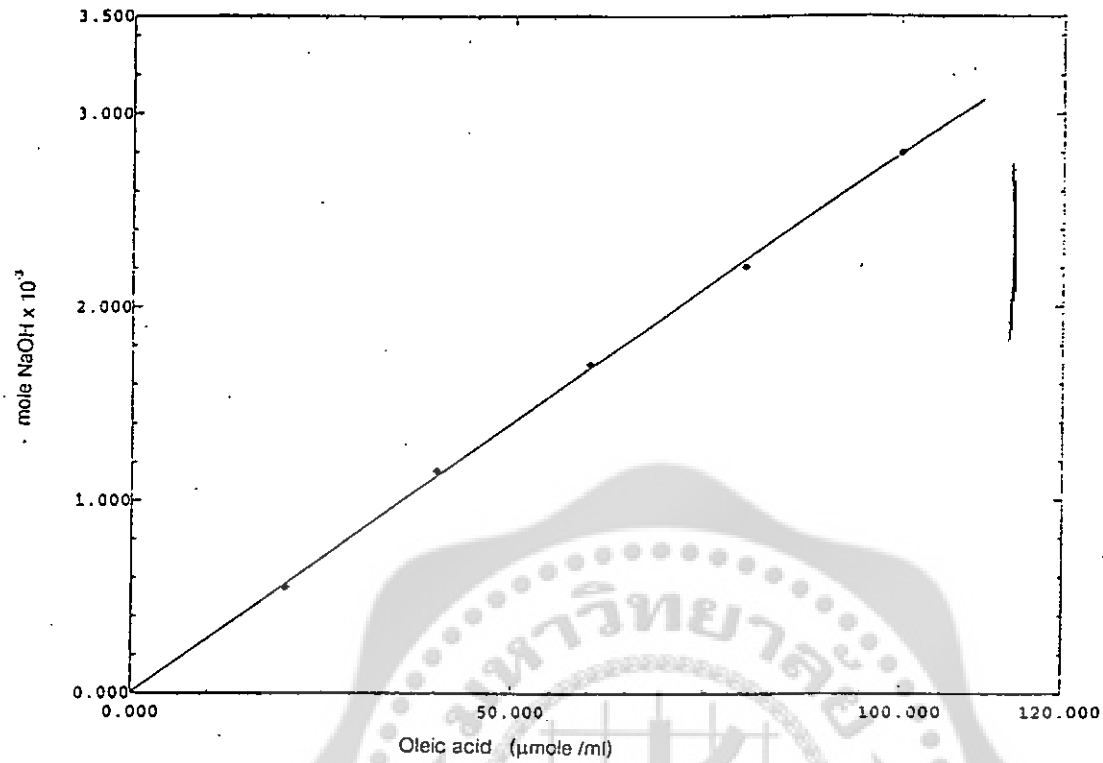
## ภาคผนวก. ค.

## Standard curve

1. Standard curve ของ reducing sugar (Amylase)




2. Standard curve ของ tyrosine ( Protease )



3. Standard curve ของ Oleic acid ( Lipase )