574.1025
ว1438

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

The Study of Optimal Conditions for Amylase,Protease and Lipase Production

02 ส.ค. 2545

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2541

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล
สุมาลี เหลืองสกุล
สมใจ ศิริโภค

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ล 143983

คำนำ

จากบทบาทของเอนไซม์เอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมผงซักฟอก และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น (1) และนอกจากนี้การที่เอนไซม์ยังมีความสำคัญในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมนั้น ทำให้น่าสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์เหล่านี้เพื่อเป็นแนวทางการผลิตเอนไซม์ขึ้นใช้เองภายในประเทศ

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ การที่จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงนั้นจะต้องเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์นั้นๆ ทั้งในแง่ของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งทั้งนี้มีผู้ที่ศึกษาและรายงานไว้ว่าชนิดและปริมาณของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะต้องเหมาะสมกับจุลินทรีย์นั้นๆ เช่น อุณหภูมิที่ใช้การเพาะเลี้ยง pHของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการให้อากาศ เป็นต้น จุลินทรีย์จึงจะผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสได้ในปริมาณสูง

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวางแผนและพัฒนา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ชจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของเชื้อที่คัดเลือกได้พบว่า A และ Bs ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ประมาณ 98 และ 7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส และบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 300 รอบ ต่อนาที ในอาหารที่มี soluble starch และ corn starch 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ casitone และ polypeptone ปริมาณ15 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทั้ง 2 ได้แก่ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต และแคลเซียม คลอไรด์ สำหรับ A ต้องการในปริมาณ 0.5,3.0และ 0.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วน Bs ต้องการแร่ธาตุดังกล่าวในปริมาณ 0.3,5.0และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 8

CHB_9และ 1.4 SA ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ประมาณ 96 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสและบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 300 รอบ ต่อนาที ในอาหารที่มีมอลโทส 10 และ 8 กรัม ต่อ ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ tryptone และ casitone ปริมาณ 10 และ 8 กรัม ต่อ ลิตร ตามลำดับ และแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทั้งสองได้แก่ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต สังกะสีคลอไรด์ และแคลเซียม คลอไรด์ ในปริมาณ 0.25, 5.0 , 0.3 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10

AUA_2 และ TR ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ประมาณ 3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในอาหารที่มี olive oil 1.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อทั้งสอง ได้แก่ แอมโมเนียม ซัลเฟต ปริมาณ13 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุที่เชื้อทั้งสองต้องการได้แก่ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต และแคลเซียม คลอไรด์ ในปริมาณ 0.5,1.0และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5

Abstract

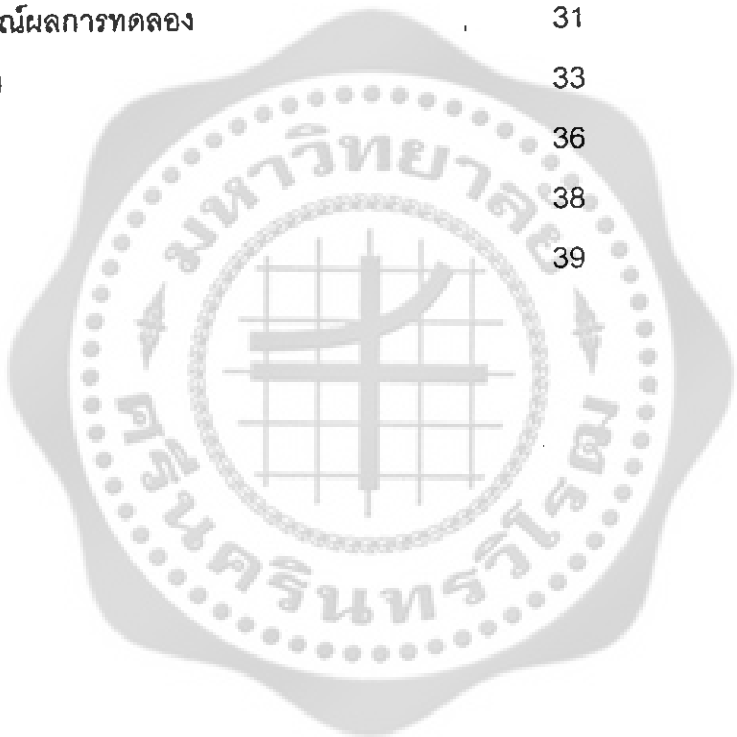
Factors affecting amylase , protease and lipase productions of bacterial isolates were investigated. For amylase production, the best-performing isolates named A with amylase acitivity of 98 $Uml^{-1}$and Bs with amylase acitivity of 7 Uml^{-1}were obtained when cultured for 24 hrs. at 37°C and 55°C, respectively, with 300 rpm. agitation. The optimized medium for isolate A contained 15 $gl^{-1}$of soluble starch as the carbon source, 15 $gl^{-1}$of casitone as the nitrogen source and 0.5 gl^{-1} of $MgSO_4.7H_2O$, 3.0 gl^{-1} of KH_2PO_4 and 0.2 $gl^{-1}$of $CaCl_2.2H_2O$ as the mineral sources at pH 8.The optimized medium for isolate Bs contained 15 $gl^{-1}$of corn starch as the carbon source, 15 $gl^{-1}$of polypeptone as the nitrogen source and 0.3 gl^{-1} of $MgSO_4.7H_2O$, 5.0 gl^{-1} of KH_2PO_4 and 0.2 gl^{-1} of $CaCl_2.2H_2O$ at pH 8.

For protease production, the best-performing isolates designated CHB_9 with protease acitivity of 96 $Uml^{-1}$and 1.4 SA with protease acitivity of 100 Uml^{-1} were obtained when cultured for 24 hrs. at 37°C and 55°C, respectively, with 300 rpm. agitation. Maltose was the best carbon source for CHB_9 at 10 gl^{-1} and for 1.4 SA at 8 gl^{-1}. The best nitrogen source for CHB_9 and 1.4 SA were 10 $gl^{-1}$of tryptone and 8 gl^{-1} of casitone, respectively. The optimized mineral sources for both isolates were 0.25 gl^{-1} of $MgSO_4.7H_2O$, 5.0 gl^{-1} of KH_2PO_4, 0.3 gl^{-1} of $ZnCl_2$ and 0.2gl^{-1} of $CaCl_2$ at pH 10.

For lipase production, the best-performing isolates designated AUA2 and TR with lipase acitivities of 3 Uml^{-1} for both isolates were obtained when cultured for 24 hrs. at 37°C and 55°C, respectively , with 300 rpm. agitation. The best carbon sources for AUA2 and TR were 1.0 % and 1.5 % of olive oils, respectively. The optimized medium for both isolates contained 13 gl^{-1} of NH_4SO_4 as the nitrogen source, 0.5 gl^{-1} of $MgSO_4.7H_2O$, 1.0 gl^{-1} of KH_2PO_4, and 0.5 gl^{-1} of $CaCl_2$ at pH 5.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	6
-วัตถุประสงค์	8
-ขอบเขตการวิจัย	8
-ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	9
ผลการทดลอง	16
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก ก	36
ภาคผนวก ข	38
ภาคผนวก ค	39



บทนำ

อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมผงซักฟอก และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น (1-3) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ในปริมาณสูงนั้น ต้องเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อและการผลิตเอนไซม์ โดยมีผู้ศึกษาและรายงานว่าแตกต่างกันไปขึ้นกับความต้องการของจุลินทรีย์แต่ละชนิดดังนี้

เอนไซม์อะไมเลส มีรายงานว่า แหล่งคาร์บอน เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยที่น้ำตาลบางชนิด เช่น แลคโตส และกาแลคโตส จะกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ สำหรับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถกระตุ้นการผลิตแอลฟา-อะไมเลสได้ เช่น แป้งชนิดต่าง ๆ และเดกซ์ตริน เป็นต้น โดยใช้ในปริมาณต่าง ๆ กัน ในช่วงระหว่าง 2-80 กรัมต่อ ลิตร (4-9)

แหล่งไนโตรเจน มีรายงานว่าสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เช่น เคซีน, yeast extract, beef extract, Bacto liver, peptone และ tryptone เป็นต้น (6,10) สารอนินทรีย์อื่น ๆ ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อผลิตอะไมเลสในแบคทีเรีย เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมกลูตาเมท และโซเดียมไนเตรท เป็นต้น โดยใช้ในปริมาณ 2-12 กรัมต่อลิตร (7, 11-12)

แร่ธาตุอื่น ๆ ที่ช่วยกระตุ้นการสร้างอะไมเลส นั้น มีรายงานว่า อะไมเลส จากแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* หลายสายพันธุ์เป็น metalloenzymes ซึ่งต้องการแร่ธาตุหลายชนิด เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Na^{+}, Fe^{3+} (13-15) และ Ca^{2+} ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์นี้ เนื่องจากเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่าเกลือฟอสเฟต คาร์บอเนต และไบคาร์บอเนต จะช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ได้ (6, 14) และการไม่เติมแร่ธาตุใด ๆ จะทำให้ *Bacillus* sp.บางสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้เลย (6-8)

ส่วนปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสนั้นมีรายงานว่า pHของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ เช่น *Bacillus* sp. No. A-40-2 ซึ่งผลิต alkaline amylase จะเจริญได้น้อย หรือไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เป็นกลางได้ และไม่ผลิตเอนไซม์ในสภาพแวดล้อมเช่นนี้เลย (6-13)

อุณหภูมิ มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส แต่มีแบคทีเรียบางพวกเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงและสามารถผลิต thermostable amylase ได้ (6-7,15)

การให้อากาศและการกวนผสมมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ (growth associated) (16-17) ดังนั้นถ้ามีการกวนผสมและการให้อากาศที่เหมาะสม เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง

เอนไซม์โปรติเอส มีรายงานเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในแบคทีเรีย โดยมีรายงานการใช้ soluble starch กลูโคส เดกซ์ตริน มอลโตส ฟรุคโตส แลคโตส และstarch hydrolysateเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ได้สูง(8,18-21) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารอนินทรีย์พวกเกลือคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น โปแตสเซียมคาร์บอเนต โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมไบคาร์บอเนต (20)

สำหรับแหล่งไนโตรเจน มีรายงานการใช้สารอินทรีย์หลายชนิด เช่น yeast extract, peptone, corn steep liquor และ soy bean meal เป็นต้น สารอินทรีย์เหล่านี้จะช่วยกระตุ้นเชื้อให้มีการผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงขึ้น (20-22)

แร่ธาตุ แร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อเอนไซม์โปรติเอส เช่น Ca, Zn, Mg, Fe และ Mn พบว่าจะเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณต่าง ๆ กัน (20-21) เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ดีและมีความคงทน (stability)

ส่วนปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีรายงานว่าแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus*สามารถผลิตเอนไซม์ alkaline protease ในปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นด่าง (2,20-21)

อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ มีรายงานเกี่ยวกับการเจริญของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอุณหภูมิช่วงกว้างตั้งแต่ 25 จนถึง 60 องศาเซลเซียส (20-23) เชื้อที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงจะผลิต thermostable protease ซึ่งทนอุณหภูมิสูง ๆ ได้

เอนไซม์ไลเปส มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในจีนัสต่าง ๆ โดยสารอาหารที่จำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีดังนี้

แหล่งคาร์บอน มีรายงานว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ จะใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่าง ๆ กัน ในปริมาณ 1-2% (24 25)

แหล่งไนโตรเจน มีรายงานการใช้สารอินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* บางสายพันธุ์จะใช้เปปโตนในปริมาณ 3% ร่วมกับ yeast extract 1% (24) สารอินทรีย์อื่นๆที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเช่นโพลีเปปโตนปริมาณ 1.5% (20-24) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สาร

อนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ในปริมาณ 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อ *Chromobacterium viscosum* (25)

แร่ธาตุที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น Mg, Ca เป็นต้น โดยแร่ธาตุเหล่านี้จะเติมในปริมาณ 0.025% - 0.5% (20-25)

ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น มีรายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์ไลเปสสำหรับแบคทีเรียทั่วไปจะมีpH ประมาณ 7 (23-27) และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส มีรายงานว่าอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส (23-27)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 55°C
2. เพื่อศึกษาสภาวะในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และการให้อากาศ

ขอบเขตของการวิจัย

ในงานวิจัยนี้จะทำการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ให้เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการวิจัยนี้จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 55°C ในปริมาณสูง ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาวิธีการสกัดแยก และปรับปรุงรูปแบบให้เหมาะสมกับการใช้งาน อาจนำไปสู่แนวทางการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสที่คัดเลือกได้ โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้แก่ A และ Bs ตามลำดับ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ โปรติเอส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้แก่ CHB_9 และ 1.4 SA ตามลำดับ และแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสได้แก่ AUA_2 และ TR ตามลำดับ

2. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium(ภาคผนวก ก.) โดยบ่มบนเครื่องเขย่า (New Brunswick Scientific rotary shaker, model Innova 4000) ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซียส ด้วยความเร็ว250 rpm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจาก inoculum medium ปริมาตร10 % ใส่ลงใน production medium. (ภาคผนวก ก.) และนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 และ 55 ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์โดยใช้ refrigerated centrifuge (Sorval model RC 5 plus) ด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนน้ำใส (crude extract) มาทำการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ต่อไป

3. การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

3.1 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

นำส่วนน้ำใสที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย โซเดียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7 ปริมาตร 0.5 มล. เติมซับสเตรท (ภาคผนวก ข.) 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ด้วยวิธีการของ Bernfeld (28) โดยเติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน และนำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้สารละลายเย็นลง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มล. และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส (ภาคผนวก ค) และคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (unit enzyme) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวส์ 1 มิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีการของ Hagihara และคณะ (29) โดยการนำส่วนน้ำใสที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย ทริส ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์

pH 9.5 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มล. เติมซับสเตรท (ภาคผนวก ข.) 1 มล เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยใช้สารละลาย Trichloroacetic acid ที่มี 0.22โมลาร์ โซเดียม อะซิเตท และ 0.33 โมลาร์ ของ Acetic acid เขย่าอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No 5 นำสารละลายที่ได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีนและคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนในรูปของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการของ Odera และคณะ (30) โดยนำส่วนน้ำใสที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายทริส ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 4 มล. เติมซับสเทรท (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 2 มล. และสารละลายทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.5 และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย อะซิโดน -แอลกอฮอล์ (1:1) ปริมาตร 20 มล และนำมาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.05 นอร์มอล โดยใช้Phenolphthaleinเป็น indicator จนกระทั่งได้ end point สีชมพูอ่อน คำนวณหาปริมาณ Oleic acid ที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Oleic acid (ภาคผนวก ค) และคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้เป็นกรดไขมัน ในรูปของ oleic acid 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

4 .การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

4.1 การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

4.1.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

ก.อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก)ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ soluble starch ,starch, corn starch ,potato starch และ glucose บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก)ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ glucose , starch ,maltose และ sucrose บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 2 ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2

ค.ไลเปส

เลี้ยงเชื้อ AUA_2และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production (ภาคผนวก ก)ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ tributyrin oil ,soy bean oil, palmitic acid และ olive oil บ่มเป็นเวลา24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

4.1.2 การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

ก.อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium(ภาคผนวก ก)โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 และแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นดังนี้ 5 ,10 ,15 และ 20 กรัม ต่อ ลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium(ภาคผนวก ก) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 และแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นดังนี้ 5 ,8 ,10 และ 15 กรัม ต่อ ลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2

ค.ไลเปส

เลี้ยงเชื้อ AUA_2 และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 และแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นดังนี้ 0.5 ,1.0,1.5 และ2 เปอร์เซนต์ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 2 จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

4.2 การแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน

4.2.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

ก.อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium(ภาคผนวก ก) ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆดังนี้คือ peptone polypeptone casitone yeast extract และ แอมโมเนียมซัลเฟต บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ในinoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก) ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ที่ได้จากข้อ 4.1 และแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ดังนี้คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปโตน casitone และ ทริปโตน บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2.

ค.ไลเปส

เลี้ยงเชื้อ AUA_2 และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ในinoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium(ภาคผนวก ก) ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ที่ได้จากข้อ 4.1 และแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆดังนี้คือ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต casitone เปปโตน และ โพลีเปปโตน บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

4.2.2 การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

ก.อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ในinoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก)ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1ที่ความเข้มข้นดังนี้ 5 , 7 , 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ในinoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium(ภาคผนวก ก) ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 ที่ความเข้มข้นดังนี้ 5, 8,10 และ 15 กรัม ต่อ ลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2

ค.ไลเปส

เลี้ยงเชื้อ AUA_2และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก) ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 ที่ความเข้มข้นดังนี้ 10,13,15 และ20 กรัม ต่อ ลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

4.3 การแปรผันชนิดและปริมาณเกลือแร่

ก.อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium(ภาคผนวก ก) ที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 และแปรผันแร่ธาตุต่างๆดังนี้ คือ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแคลเซียม คลอไรด์ ในปริมาณต่างๆ บ่มเป็นเวลา24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 ปั่นแยกเซลล์และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ในinoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก) ที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 และแปรผันแร่ธาตุต่างๆ ดังนี้คือ แคลเซียม คลอไรด์ แมกนีเซียม ซัลเฟต สังกะสีคลอไรด์ และ โปตัสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟตในปริมาณต่างๆบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2

ค.ไลเปส

เลี้ยงเชื้อ AUA_2 และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium (ภาคผนวก ก) ที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 และแปรผันแร่ธาตุต่างๆดังนี้

คือ แมกนีเซียม ซัลเฟต แคลเซียม คาร์บอเนต และโปตัสเซียมได ไฮโดรเจนฟอสเฟตในปริมาณต่างๆ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามวิธีการในข้อ 2 จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

4.4 การแปรผันสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

4.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

ก.<u>อะไมเลส</u>

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production mediumที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.1,4.2และ4.3โดยที่ A แปรผันอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ 25, 30,37 และ 40 องศาเซลเซียส ส่วน Bs แปรผันอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ 45,50,55 และ60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.<u>โปรติเอส</u>

เลี้ยงเชื้อ CHB_5และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2และ 4.3 โดยที่ CHB_5 แปรผันอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ส่วน 1.4 SA แปรผันอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ 45 ,50. 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2

ค.<u>ไลเปส</u>

เลี้ยงเชื้อ AUA_2 และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2และ 4.3 โดยที่ AUA_2แปรผันอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ 25, 30 , 37 และ 40 องศาเซลเซียส ส่วน TR แปรผันอุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ 45 ,50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

4.4.2 การศึกษาผลของpHของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

ก.<u>อะไมเลส</u>

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production mediumที่มีสูตรอาหารที่

เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2และ 4.3 .โดยแปรผัน pH ต่างๆดังนี้ 5,6,7,8,9 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2และ 4.3 โดยแปรผันpHต่างๆ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2

ค.ไลเปส

เลี้ยงเชื้อ AUA_2และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2และ 4.3 โดยแปรผันpHต่างๆ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

4.4.3 การศึกษาผลของการให้อากาศที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

ก.อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์ อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production mediumที่มีสูตรอาหาร และpH ที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2,4.3และ 4.4.2 และบ่มบนเครื่องเขย่าที่แปรผันความเร็วในการเขย่าดังนี้ 150 , 200 250 และ 300 รอบต่อนาที บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.1

ข.โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium ที่มีสูตรอาหาร และ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2, 4.3 และ 4.4.2 และบ่มบนเครื่องเขย่าที่แปรผันความเร็วรอบในการเขย่าดังนี้ 150 , 200 250 และ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.2

ค.ไลเปส

เลี้ยงเชื้อ AUA_2และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน inoculum medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงใน production medium ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2, 4.3 และ 4.4.2 และบ่มบนเครื่องเขย่าที่แปรผันความเร็วในการเขย่าดังนี้ 150 , 200 250 และ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์และนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3.3

ผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของเชื้อที่คัดเลือกได้ ได้แก่ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ CHB_9และ 1.4 SAซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ AUA_2และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ได้ผลดังนี้

1 การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส(A และ Bs) โปรติเอส (CHB_9และ 1.4 SA) และไลเปส (AUA_2และTR)ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสในproduction medium ที่แปรผันชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนต่างๆ และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใสได้ผลดังตารางที่ 1-6

ตารางที่ 1 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
กลูโคส	17.65	4.77
Starch	26.41	5.06
Soluble starch	20.60	5.20
Potato starch	19.85	5.24
Corn starch	22.54	5.44

จากตารางที่ 1 พบว่า starch และ corn starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ Aและ Bs ตามลำดับ เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้ starch และ corn starch เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ Aและ Bs ตามลำดับ และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยการเลี้ยงเชื้อ A และ Bsใน production medium ที่แปรผันความเข้มข้นของ starch และ corn starch และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณ starch และ corn starch ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ปริมาณแหล่งคาร์บอน(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
5	28.72	5.86
10	36.57	5.98
15	41.08	6.76
20	38.64	4.74

จากตารางที่ 2 พบว่า ปริมาณstarch และ corn starch ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ Aและ Bs คือ 15 กรัมต่อลิตร เนื่องจากให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9และ 1.4 SA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
กลูโคส	8.80	15.00
มอลโทส	10.50	16.50
ซูโครส	7.80	14.75
Starch	9.80	11.80

จากตารางที่ 3 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4SA คือ มอลโทส เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้มอลโทสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของของCHB_9และ1.4SA ตามลำดับ และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยการเลี้ยงเชื้อ CHB_9และ1.4 SA ใน production medium ที่แปรผันความเข้มข้นของมอลโทสและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 4 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณ maltoseซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
5	11.20	30.20
8	12.50	44.30
10	16.70	39.50
15	10.20	40.05

จากตารางที่ 4 พบว่า ปริมาณมอลโทสที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA คือ 10 และ 8 กรัม ต่อ ลิตร เนื่องจากให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2และTR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
Tributyrin oil	0.88	0.93
Soy bean oil	0.91	0.90
Olive oil	1.00	1.03
Palmitic acid	0.88	0.87

จากตารางที่ 5 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และTR คือ olive oil เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้ olive oil เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ AUA_2 และTR ตามลำดับ และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยการเลี้ยงเชื้อ AUA_2 และTR ใน production medium ที่แปรผันความเข้มข้นของ Olive oil และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใสได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณ olive oilซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ปริมาณ olive oil(เปอร์เซนต์)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
0.5	1.48	1.41
1.0	1.70	1.75
1.5	1.55	1.95
2.0	1.45	1.80

จากตารางที่ 6 พบว่า ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2และ TR คือ 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเนื่องจากให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.2 การแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส (A และ Bs)โปรติเอส (CHB_9 และ 1.4 SA)และไลเปส (AUA_2 และ TR) ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน production medium ที่แปรผันชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่างๆตามวิธีการในข้อ 2 และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จากสวนน้ำใส ได้ผลดังตารางที่ 7-12

ตารางที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
Peptone	44.60	4.81
Polypeptone	52.80	5.53
Casitone	65.40	4.92
Yeast extract	50.65	4.75
Ammonium sulfate	47.54	5.32

จากตารางที่ 7 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs คือ casitone และ polypeptone ตามลำดับ เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้น

ในการทดลองต่อไปจะใช้ casitone และ polypeptone เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ Aและ Bs ตามลำดับ และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยการเลี้ยงเชื้อ A และ Bsใน production medium ที่แปรผันความเข้มข้นของ casitone และ polypeptone และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bsเมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจน

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
5	57.24	4.26
7	60.31	4.75
10	64.62	5.07
15	72.15	5.87
20	70.64	5.12

จากตารางที่ 8 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของcasitone และ polypeptone ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs คือ 15 กรัม ต่อ ลิตรเนื่องจากให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 9 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
Peptone	43.20	40.26
Casitone	29.96	51.30
tryptone	45.86	45.21
Ammonium chloride	36.92	42.10

จากตารางที่ 9 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA คือ tryptone และ casitone ตามลำดับเนื่องจากให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้คือ tryptone และ casitone ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ CHB_9 และ 1.4 SA และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยการเลี้ยงเชื้อ CHB_9และ 1.4 SA ใน

production medium ที่แปรผันความเข้มข้นของ tryptone และ casitone และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณ tryptone และ casitone ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
5	52.33	64.21
8	69.67	71.30
10	70.83	60.50
15	64.49	54.30

จากตารางที่ 11 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของtryptone และ casitone ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA คือ 10 และ 8 กรัม ต่อ ลิตร ตามลำดับเนื่องจากให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 11 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
โซเดียมไนเตรท	0.50	0.61
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.62	2.26
casitone	0.51	0.88
เปปโตน	0.49	0.78
โพลีเปปโตน	0.37	0.81

จากตารางที่ 11 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของAUA_2 และ TR คือ แอมโมเนียมซัลเฟตเนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ของไลเปส AUA_2 และTR ตามลำดับ และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยการเลี้ยงเชื้อ AUA_2 และ TR

143983
157193

ใน production medium ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใสได้ผลดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
10	2.12	1.75
13	2.45	2.55
15	2.37	2.25
20	2.16	1.82

จากตารางที่ 12 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR คือ 13 กรัมต่อลิตรเนื่องจากให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.3 การแปรผันชนิดและปริมาณเกลือแร่

เลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส (Aและ Bs) โปรติเอส(CHB_9และ1.4 SA) และไลเปส(AUA_2 และTR)ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน production medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 แต่แปรผันชนิด และปริมาณเกลือแร่ต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 2 และ วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใสดังข้อ 3ได้ผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ Aและ Bs เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
0.1	65.21	4.10
0.3	72.25	6.26
0.5	81.45	5.70
1.0	70.56	4.85

ตารางที่ 14 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
1	81.45	3.26
3	87.70	5.75
5	83.50	6.57
10	81.26	4.56

ตารางที่ 15 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของแคลเซียม คลอไรด์

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
0.1	85.21	4.98
0.2	91.89	6.86
0.3	86.25	4.75
0.4	81.57	4.26

ผลจากตารางที่ 13,14 และ15 พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟต และแคลเซียม คลอไรด์ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ A คือ 0.5, 3.0และ 0.2 กรัม ต่อ ลิตร ตามลำดับ และปริมาณที่เหมาะสมของ Bs คือ 0.3 , 5.0 ,และ 0.2 กรัม ต่อ ลิตร ตามลำดับ เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป

ตารางที่ 16 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียม ซัลเฟต

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
0.1	70.54	65.20
0.25	72.05	73.40
0.3	61.45	67.50
0.4	59.37	54.60

ตารางที่ 17 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SAเมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณโปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
1	71.25	61.21
5	74.45	78.32
8	64.32	64.75
10	70.12	61.25

ตารางที่ 18 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณสังกะสีคลอไรด์

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
0.1	65.45	61.30
0.2	74.40	74.82
0.3	80.34	82.48
0.4	74.12	70.25

ตารางที่ 19 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA เมื่อเ ลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแคลเซียม คลอไรด์

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
0.1	80.45	80.21
0.2	84.83	86.16
0.3	81.34	82.24
0.4	78.15	60.30

ผลจากตารางที่ 16 ,17 , 18 และ 19 พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต สังกะสีคลอไรด์ และ แคลเซียม คลอไรด์ ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA คือ 0.25 ,5.0 , 0.3 และ 0.2 กรัม ต่อ ลิตร ตามลำดับเนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป

ตารางที่ 20 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และTR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียม ซัลเฟต

แร่ธาตุ (กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
0.2	2.15	1.31
0.4	2.22	1.42
0.5	2.46	2.57
0.8	2.34	2.21

ตารางที่ 21 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และTR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณโปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

แร่ธาตุ (กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
0.5	2.15	2.05
1.0	2.68	2.74
1.5	2.40	2.55
2.0	1.54	2.12

ตารางที่ 22 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2และTR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแคลเซียม คาร์บอเนต

แร่ธาตุ (กรัม/ลิตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
0.3	2.20	2.17
0.5	2.79	2.81
0.7	2.35	2.45
1.0	2.14	2.07

ผลจากตารางที่ 20 ,21 และ22 พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ แคลเซียม คาร์บอเนต ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR คือ 0.5, 1.0 และ 0.5 กรัม ต่อ ลิตร ตามลำดับเนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป

2 การแปรผันสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน production mediumที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 1โดยแปรผันอุณหภูมิต่างๆ และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 2.1 จากส่วนน้ำใสได้ผลดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของ A ,CHB_9 และ AUA_2เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผันอุณหภูมิ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)		
	A	CHB_9	AUA_2
25	7.24	40.12	1.75
30	70.50	80.45	2.10
37	91.75	85.25	2.80
40	50.24	47.48	1.26

ผลจากตารางที่ 23 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของ A , CHB_9และ AUA_2 คือ 37 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แอคติวิตีเอนไซม์จะลดลง ส่วนที่ 40 องศาเซลเซียสไม่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยง เนื่องจากพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำมาก

ตารางที่ 24 แอคติวิตีของเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของ Bs,1.4 SA และ TR เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผันอุณหภูมิ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)		
	Bs	1.4 SA	TR
45	6.25	70.45	2.15
50	6.65	82.78	2.37
55	6.78	86.85	2.84
60	3.42	65.31	2.26

ผลจากตารางที่ 24 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของBs , 1.4 SA และ TR คือ 55 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่าการเพาะเลี้ยงที่ 45 และ50 องศาเซลเซียส ยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่แอคติวิตีเอนไซม์จะต่ำกว่าที่ 55 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 60 องศาเซลเซียสไม่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยง เนื่องจากพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำมาก

2.2 การศึกษาผลของpH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อ ที่ ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน production mediumที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 1 และแปรผัน pH ต่างๆ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใสดังวิธีการในข้อ 3 ได้ผลดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผัน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

pH	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
5	50.32	2.55
6	80.40	4.75
7	88.41	6.06
8	97.12	7.20
9	75.22	4.70

ผลจากตารางที่ 25 พบว่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs คือ pH 8 ส่วนที่ pH ในช่วงกรดนั้นไม่เหมาะที่จะใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำมาก

ตารางที่ 26 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4SA เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผัน pHของอาหารเลี้ยงเชื้อ

pH	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4 SA
8	47.09	57.16
9	65.62	68.99
10	91.24	92.33
11	79.59	59.35

ผลจากตารางที่ 26 พบว่า pH ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA คือ pH10 เนื่องจากให้เอนไซม์แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

ตารางที่ 27 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2และ TR เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผัน pHของอาหารเลี้ยงเชื้อ

pH	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
4	1.78	2.85
5	2.91	2.97
6	2.54	2.61
7	2.12	2.06
8	1.32	1.35

ผลจากตารางที่ 27พบว่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2และ TR คือ pH 5 ส่วนที่ pH ในช่วงด่างนั้นไม่เหมาะที่จะใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ

2.3 การศึกษาผลของการให้อากาศที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ใน production mediumที่มีสูตรอาหารและ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 1 และบ่มบนเครื่องเขย่าที่แปรผันความเร็วในการเขย่าดังนี้ 150 , 200 250 และ 300 รอบต่อนาที และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใส ดังวิธีการในข้อ 3 ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 28 แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผันการให้อากาศ

ความเร็วในการเขย่า (rpm.)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	A	Bs
150	82.35	4.24
200	90.52	5.65
250	95.26	7.16
300	98.17	7.50

ผลจากตารางที่ 28 พบว่า การให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ A และ Bs โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว300 รอบต่อนาที เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

ตารางที่ 29 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4SA เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผัน การให้อากาศ

ความเร็วในการเขย่า (rpm.)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	CHB_9	1.4SA
150	75.45	45.36
200	84.21	60.22
250	90.35	94.54
300	96.02	100.25

ผลจากตารางที่ 29 พบว่า การให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9 และ 1.4 SA โดยบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 rpm เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

ตารางที่ 30 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แปรผัน การให้อากาศ

ความเร็วในการเขย่า (rpm.)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)	
	AUA_2	TR
150	2.20	2.15
200	2.74	2.61
250	2.97	2.80
300	2.94	3.08

ผลจากตารางที่ 30 พบว่า การให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR โดยบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 rpmเนื่องจากให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของเชื้อที่คัดเลือกได้ ได้แก่ A และ Bs ซึ่งผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ CHB$_9$และ 1.4 SAซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ AUA$_2$และ TR ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยแปรผันส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อได้ผลดังนี้

การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ A เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ starchในปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร ส่วน Bs นั้นพบว่าการใช้ corn starch ใน ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด.. casitone และ polypeptone ในปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ของ A และ Bs ตามลำดับ สำหรับแร่ธาตุที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ A ได้แก่ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ แคลเซียม คลอไรด์ ในปริมาณ 0.5,3.0 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน Bs ต้องการในปริมาณ 0.3, 5.0 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความต้องการแร่ธาตุเหล่านี้คล้ายกับแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* หลายสายพันธุ์ (6,13-14) ส่วน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อ การเลี้ยงเชื้อ A และ Bs ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง pH 8 ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ที่ผลิตโดย*Bacillus* sp.No A-40-2ซึ่งผลิตเอนไซม์ในสภาพด่าง (6)

ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่า ที่อุณหภูมิ37 และ 55 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อเชื้อ A และ Bs เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด และนอกจากนี้ยังพบว่า การให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาทีทั้งนี้เนื่องจากและการผลิตเอนไซม์สัมพันธ์กับการเจริญ (growth associate) ดังนั้นการที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อัตราการให้อากาศสูงสุด จึงมีผลให้ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ A ประมาณ 98 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ BS ประมาณ 7.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ของ CHB$_9$ และ 1.4 SA โดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่า น้ำตาล มอลโทส กลูโคส ซูโครส รวมทั้ง starch สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยที่ มอลโทส จะทำให้ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เช่นเดียวกับที่ Yutani และคณะได้รายงานถึงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Bacillus stearothermophilus* (18) ทั้งนี้ปริมาณมอลโทสที่เหมาะสมของเชื้อ CHB$_9$ และ 1.4 SA คือ 10 และ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB$_9$ และ 1.4 SA ได้แก่ tryptone ปริมาณ 10 กรัม ต่อ ลิตร และ casitone ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้

แร่ธาตุที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ CHB_9และ1.4 SA ได้แก่ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต สังกะสี คลอไรด์ และแคลเซียม คลอไรด์ ในปริมาณ 0.25, 5.0 , 0.3 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ความต้องการแร่ธาตุดังกล่าวจะคล้ายกับแบคทีเรียอื่นๆที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส (22-23) ซึ่งมีรายงานว่า แมกนีเซียม ซัลเฟต และสังกะสีคลอไรด์จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่วนแคลเซียม คลอไรด์มีผลต่อสเถียรภาพของเอนไซม์

สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสพบว่า ที่อุณหภูมิ37 และ 55 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อเชื้อ CHB_9 และ 1.4 SA เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดและนอกจากนี้ การให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาทีเนื่องจากการเจริญและการผลิตเอนไซม์สัมพันธ์กับการเจริญ (growth associate)โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ CHB_9 และ 1.4 SA ผลิตได้ประมาณ 96 และ 100. หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ AUA_2 และ TR เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ olive oil เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.(24) ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Bs นั้นพบว่าการใช้ ใน ปริมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด แอมโมเนียม ซัลเฟตในปริมาณ 13 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ AUA_2 และ TR ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Yamagushi และคณะ(27) สำหรับแร่ธาตุที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR ได้แก่ แมกนีเซียม ซัลเฟต โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ แคลเซียม คลอไรด์ ในปริมาณ 0.5,1.0 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า pH 5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ AUA_2 และ TR ซึ่งต่างจากแบคทีเรียอื่นๆที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส(24-25)

ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่า ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อเชื้อ AUA_2 และ TR เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด และนอกจากนี้ยังพบว่า การให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาทีโดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสเชื้อ AUA_2 และ TR ที่ผลิตได้ประมาณ 3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เชื้อที่คัดเลือกได้ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่สูงนัก ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อในธรรมชาติส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่ไม่สูงมาก ดังนั้นในงานวิจัยที่จะทำต่อไป จะได้ปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้นี้ให้สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูงขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางในการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. Industrial Microbiology. 3rd ed. New York : McGraw-Hill Book Company.
2. Beynon, R. J. and J. S. Bond. 1989. Proteolytic Enzyme in A Practical Approach. London : Oxford University Press.
3. Tauber, H. 1943. Bacterial Fermentations in Enzyme Technology. New York : John Wiley and Son Inc.
4. Stockton, J. R. and O. Wyss. 1947. Amylase Production by *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 52 : 227-228.
5. Chandra, A. K., S. Medda and A. K. Bhadra. 1980. Production of Extracellular Thermostable α-Amylase by *Bacillus licheniformis*. J. Ferment. Technol. 58 (1) : 1-10.
6. Windish, W.W. and N.S. Mhatre. 1965. Microbial Amylase. In Advanced in Applied Microbiology. (W.W. Umbreit ed.). New York : Academic Press.
7. Saito, N. 1973. A Thermophillic Extracellular α-Amylases from *Bacillus licheniformis*. Arch. Biochem. Biophys. 155 : 290-298.
8. Ingle, M. B. and R. J. Erickson. 1978. Bacterial α-Amylase In Advances in Applied Microbiology. (D. Perlman ed.) 44 : 257-278.
9. Morgan, F.T. and F.G. Priest. 1981. Characterization of a Thermostable α-Amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. J. Appli. Bacteriol. 50 : 107-114.
10. Buonocore, I., C. Caporale, M. De Rosa and A. Gambacorta. 1976. Stable, Inducible Thermophilic α-Amylase from *Bacillus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 128 Z2X : 515-521.
11. Medda, S. and A.K. Chandra. 1980. New Strains of *Bacillus licheniformis* and *B. coagulan* Producing Thermostable α-Amylase Action at Alkaline pH. J. Appl. Bacteriol. 48 : 47-58.
12. Shinmyo, A., H. Kimura and H. Okada. 1982. Physiology of α-Amylase by Immobilized *Bacillus amyloliquefaciens*. Eru. J. Appl. Biotechnol. 14 : 7-12.
13. Coleman, G., W. H. Elliott. 1962. Studies on α-Amylase formation by *Bacillus subtilis*. Biochem. J. 83 : 256-263.

14. Fukomoto, J., T. Yamamoto and D. Tsuru. 1967. Amylase Formation and Carbon Source Metabolism of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 62 : 247-249.

15. Stockton, J. R. and O. Wyss. 1977. Proteinase Production by *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 52 : 227-228.

16. Edwards, C. 1990. Thermophiles. In Microbiology of Extreme Environments. (C. Edwards, ed.) Milton Keynes : Open University Press.

17. Hamamoto, T., M. Kaneda, K. Horikoshi and T. Kudo. 1994. Characterization of a Protease from a Psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. Appl. Environ. Microbiol. 60 (10) : 3878-3880.

18. Yutani, K., I. Sasaki and K. Ogasahare. 1973. Comparison of thermo α-Amylase from *Bacillus stearothermophilus* Grown at Different Temperatures. J. Biochem. 74 : 573-579.

19. Sonnleitner, B. 1981. Biotechnology of Thermophilic Bacteria : Growth, Products and Application. New York : Academic Press.

20. Takami, H., T. Akiba and K. Horikoshi. 1989. Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 : 120-124.

21. Halpern, M. G. 1981. Industrial Enzymes from Microbial Sources. New Jersy : Noyes Data Corperation.

22. Manachini, P. L., M. G. Fortina and C. Parini. 1988. Thermostable Alkaline Protease Produced by *Bacillus thermoruber*-A New Species of *Bacillus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 : 409-413.

23. Lilly, M.D. 1979. Production of Intracellular Microbial Enzymes. Appl. Biochem. Bioeng. 2 : 1-70.

24. Muraoka, T., T. Ando and H. Okuda. 1982. Purification and Properties of A Novel Lipase. J. Biochem. 92 : 1933-1939.

25. Sugihara, A., T. Tani and Y. Tominaga. 1991. Purification and Characterization of A Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. J. Biochem. 109 : 211-216.

26. Lee, S. Y., B. H. Lee. 1989. Production and Charactrization of Esterase-Lipase of *Lactobacillus casei* subsp. *pseudo-plantarum* LE 2. Biotechnol. Appl. Biochem. 11 : 552-563.

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

28. .Bernfeld, P. 1955. Amylase α- and β- In Methods in Enzymology. (S. P. Colowick and M.O. Kaplan, eds.) vol. 1 : 149, New York : Academic Press.

29. Hagihara, B., H. Matsubara, M. Nakai and K. Okunuki. 1958. Biochem. (Tokyo) vol. 45 : 185.

30. 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
peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCi	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร, pH 7.0

Production medium

Starch	15	กรัม
Casitone	10	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
$MgSO_4 .7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร, pH 7.0

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

Inoculum medium

กลูโคส	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Production medium

กลูโคส	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	กรัม
KH_2PO_4	5	กรัม
$ZnCl_2$	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร,ปรับ pH สุดท้ายเป็น 9.5

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์ไลเปส

Inoculum medium

Olive oil	10	กรัม
Peptone	13	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร,ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.0

Production medium

Olive oil	10	กรัม
NH_4SO_4	10	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
KH_2PO_4	0.9	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร,ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.0

ภาคผนวก ข.
สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

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

1.2 สารละลาย DNSA (Dinitrosalicylic acid)

DNSA	1	กรัม
2M.NaOH	20	มล.
K,Na-Tartrate	30	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1000	มล.

2.การวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส

2.1 สับสเทรต: 10% Casein ใน ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 9.5

2.2 0.5 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 9.5

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

3. การวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

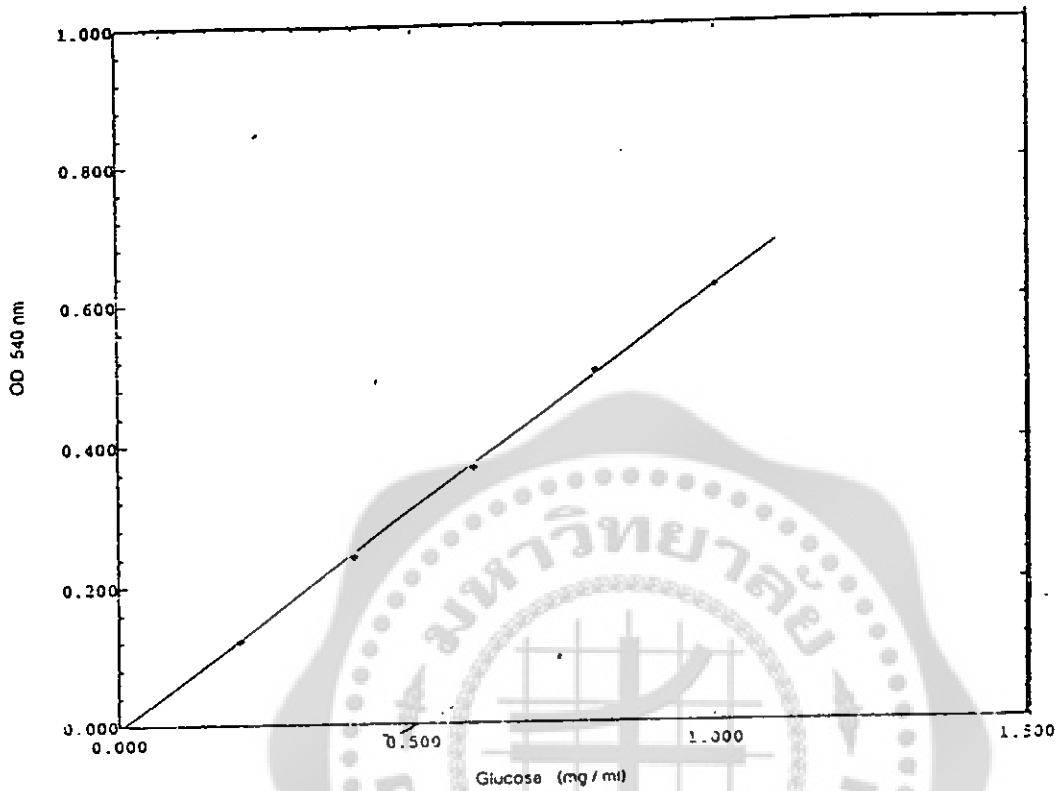
3.1 สับสเทรต: ประกอบด้วย

Olive oil	1.0	มล.
Polyvinyl alcohol	0.09	มล.
น้ำกลั่น	100	มล.

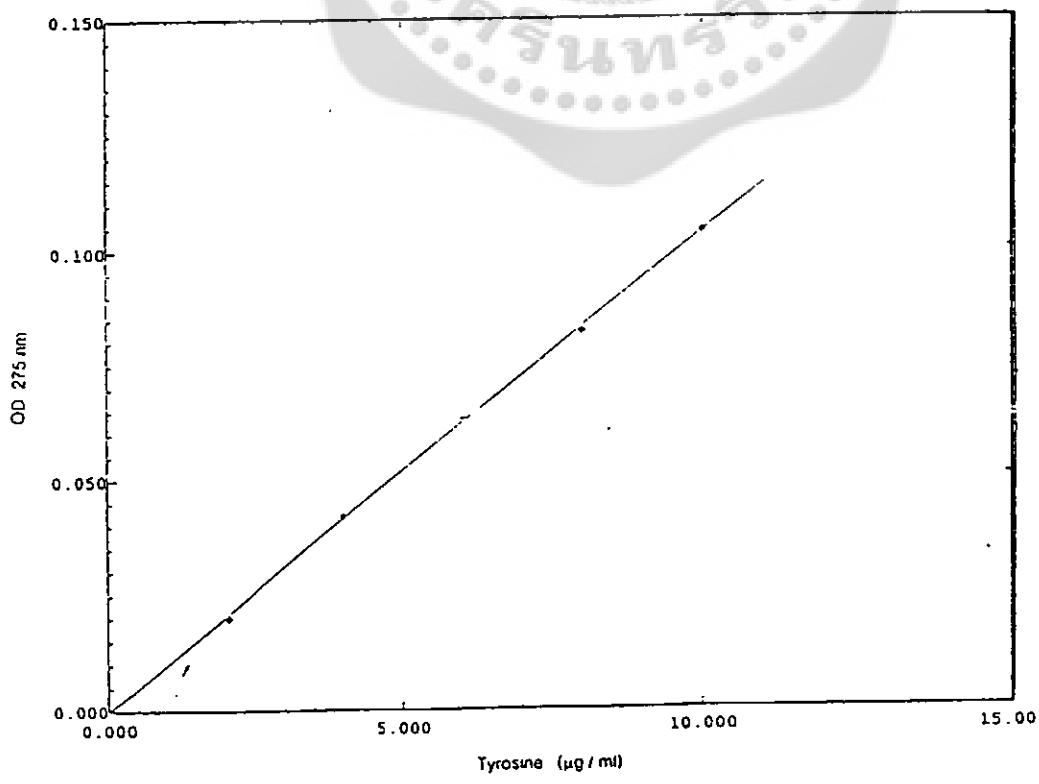
ภาคผนวก

Standard curve

1. standard curve ของ น้ำตาลรีดิวส์ (Amylase)



2. Standard curve ของไทโรซีน (Protease)



3. standard curve ของ Oleic acid (Lipase)