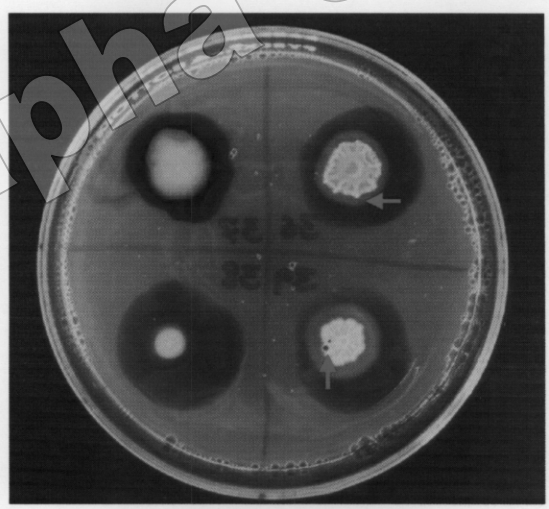
บทที่ 4
ผลการวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็ง

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็งจากตัวอย่างดินและกากมันจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยที่มีการปลูกและแปรรูปมันสำปะหลัง ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จังหวัดฉะเชิงเทราและจังหวัดนครราชสีมา ทั้งหมด 20 แหล่ง โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งที่มี Soluble Starch เป็นองค์ประกอบและทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารแข็งจากการเกิดบริเวณใส (Clear Zone) รอบ ๆ โคโลนีของจุลินทรีย์บนพื้นอาหารที่มีสีน้ำเงินเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ภาพที่ 7) และสามารถคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีแบบต่าง ๆ ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้ง สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 120 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียจำนวน 111 ไอโซเลต ราจำนวน 5 ไอโซเลต และแอคติโนมัยซีตีสจำนวน 4 ไอโซเลต โดยพบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลตต่าง ๆ มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 8



ภาพที่ 7 ลักษณะการเกิดบริเวณใส (Clear Zone) ของแบคทีเรียหลังจากการเทราดด้วยสารละลายไอโอดีนเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลานาน 1 วัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการย่อยแป้งของจุลินทรีย์ไอโซเลตต่าง ๆ ที่คัดแยกได้

จุลินทรีย์	อัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนี			
	1.0-1.9	2.0-2.9	3.0-3.9	4.0-4.9
แบคทีเรีย	94	15	2	ND
รา	ND	ND	ND	ND
แอคติโนมัยซีตีส	1	ND	ND	3

หมายเหตุ: ND คือ ไม่สามารถหาอัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีได้

จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็งจากแหล่งดินและกากมันตัวอย่างต่าง ๆ ดังตารางข้างต้น พบว่า จุลินทรีย์ทุกไอโซเลตสามารถย่อยแป้งได้ทั้งหมด จึงคัดเลือกไอโซเลตที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มที่ให้ประสิทธิภาพของการย่อยแป้งต่าง ๆ เพื่อทำการศึกษาต่อไปในขั้นตอนการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเหลว โดยในกลุ่มที่ให้อัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีอยู่ในช่วง 1.0-1.9 ถูกนำมาศึกษามีทั้งหมด 41 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียทั้งหมด 40 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตที่ 1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 29, 47, 65, 94, 96, 98, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118 และ119 และแอคติโนมัยซีตีส 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตที่ 87

กลุ่มที่ให้อัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีอยู่ในช่วง 2.0 - 2.9 ไอโซเลตที่นำมาศึกษาเป็นแบคทีเรียทั้งหมด 11 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตที่ 7, 10, 12, 62, 95, 97, 99, 104, 108, 113 และ 120 กลุ่มที่ให้อัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีอยู่ในช่วง 4.0 - 4.9 ไอโซเลตที่นำมาศึกษาซึ่งเป็นแอคติโนมัยซีตีสทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตที่ 69, 75 และ 76 และราทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตที่ 88, 89, 90, 91 และ 92 ที่ไม่สามารถวัดขนาดของบริเวณใสได้นั้น เนื่องจากรามีลักษณะการเจริญสร้างเส้นใยแผ่เป็นเส้นสายบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเทสารละลายไอโอดีนลงไป จึงไม่สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดขึ้นบริเวณด้านล่างเส้นใยได้อย่างชัดเจน ทำให้ไม่สามารถหาประสิทธิภาพการย่อยแป้งได้ ได้คัดเลือกราทั้งหมดมาทำการศึกษา ส่วนกลุ่มที่ให้อัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีอยู่ในช่วง 3.0 - 3.9 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตที่ 3 และ 63 ไม่ได้ทำการคัดเลือกมาทดสอบในขั้นต่อไป เนื่องจากจุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการเจริญระหว่างการเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเหลว

จากการนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้จากการทดสอบบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม จากนั้น ทำการสกัดเอนไซม์และวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเหลว โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเหลว โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (DNS Method) ตามวิธีของ Miller (1959) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลตที่ 19, 21, 93, 97 และ 108 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง แสดงดังตารางที่ 9 ส่วนการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีสทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเหลว โดยวัดปริมาณซับสเตรทที่ลดลง (Iodine Method) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Jin et al. (2001) พบว่า ราไอโซเลตที่ 88 และ 90 และแอคติโนมัยซีตีสไอโซเลตที่ 69 และ 87 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 และตารางที่ 11 ตามลำดับ

ตารางที่ 9 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี DNS Method

ไอโซเลตที่	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)
19	1.4
21	1.0
93	1.3
97	1.4
108	1.4

ตารางที่ 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากราไอโซเลตต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี Iodine Method

ไอโซเลตที่	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)
88	22.3
90	12.4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 11 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีสไอโซเลตต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี Iodine Method

ไอโซเลตที่	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)
69	11.8
87	6.4

จากผลการทดลองการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง คือ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลตที่ 19 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ชื่อ สามชัยพืชผล อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา แบคทีเรียไอโซเลตที่ 21 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 1.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่คัดแยกได้จากดินจากแหล่งเดียวกัน แบคทีเรียไอโซเลตที่ 93 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณลานตากมันแห่งที่ 1 อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี แบคทีเรียไอโซเลตที่ 97 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ชื่อ แคสซาวาอินดัสเทรียลแสงไทยอุตสาหกรรม: STC อ.บางประกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และแบคทีเรียไอโซเลตที่ 108 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่คัดแยกได้จากดินและกากมันบริเวณโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ชื่อ ศิริไพศาลพืชผล แยกคีรี อ.เมือง จ.ชลบุรี

ส่วนในการคัดเลือกรานั้นคัดเลือกราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง คือ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ราไอโซเลตที่ 88 และ 90 โดยคัดแยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ชื่อ สามชัยพืชผล อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 22.3 และ 12.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอคติโนมัยซีตีสที่ได้คัดเลือกที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง คือ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้แก่ แอคติโนมัยซีติสไอโซเลตที่ 69 และ 87 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 11.8 และ 6.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยคัดแยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ชื่อ สามชัยพืชผล อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมาเช่นกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

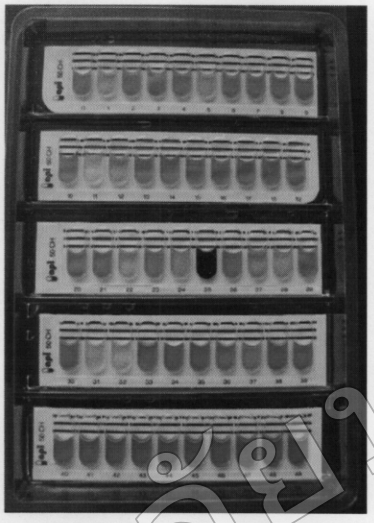
การจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่คัดเลือกได้

จากผลการคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง ได้จัดจำแนกจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้โดยกรณีของแบคทีเรียจัดจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นโดยพิจารณาจากลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรมของเซลล์ และการสร้างสปอร์ จากนั้นจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ API ของ BIOMERIEUX Industry (France) สำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรีย ส่วนราที่คัดเลือกได้จัดจำแนกราโดยดูลักษณะโคโลนี ลักษณะสัณฐานวิทยาจากการใช้เทคนิค Slide Culture แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้จัดจำแนกแอคติโนมัยซีตีสโดยดูลักษณะของเส้นใย คุณสมบัติทางเคมีของเซลล์ ได้แก่ ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิคในองค์ประกอบของผนังเซลล์และชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เซลล์และดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสามารถจัดจำแนกจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. **การจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้**

จากผลการจัดจำแนกแบคทีเรียขั้นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็งเป็นเวลานาน 1 วัน พบว่า แบคทีเรียไอโซเลตที่ 19, 21, 93, 97 และ 108 ทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีขนาดใหญ่ประมาณ 6 มิลลิเมตร มีสีครีม ขอบไม่เรียบ นูน ผิวหน้าไม่มัน และพบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทุกไอโซเลตมีรูปร่างท่อน เซลล์ติดสีแกรมบวกและสามารถสร้างสปอร์ได้ โดยลักษณะโคโลนีและลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียไอโซเลตที่ 19, 21, 93, 97 และ 108 แสดงดังภาคผนวก ค ข้อ2 จากนั้นจึงจัดจำแนกแบคทีเรียในขั้นต่อไปโดยใช้ชุดทดสอบ API ของ BIOMERIEUX Industry สำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกบาซิลไล (ภาพที่ 8) โดยผลการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากชุดทดสอบ API แสดงดังตารางที่ 12

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 8 ตัวอย่างผลการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ได้จากชุดทดสอบ API (BIOMERIEUX Industry: France)

ตารางที่ 12 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากชุดทดสอบ API

แบคทีเรียไอโซเลตที่	ผลการจัดจำแนก
19	*Bacillus pumilus*
21	*Bacillus licheniformis*
93	*Bacillus cereus*
97	*Bacillus subtilis* LK97
108	*Bacillus subtilis* LK108

จากข้อมูลที่ได้จากการแปรผลในโปรแกรมที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากชุดทดสอบ API ที่ได้ (ภาคผนวก ค ข้อ2) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลตที่ 19 คือ *B. pumilus* แบคทีเรียไอโซเลตที่ 21 คือ *B. licheniformis* แบคทีเรียไอโซเลตที่ 93 คือ *B. cereus* แบคทีเรียไอโซเลตที่ 97 และ 108 คือ *B. subtilis* เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงกำหนดรหัสเชื้อให้แตกต่างกัน โดยไอโซเลตที่ 97 กำหนดเป็น *B. subtilis* LK97 และแบคทีเรียไอโซเลตที่ 108 กำหนดเป็น *B. subtilis* LK108 โดยแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลตที่ 19, 21, 97 และ108

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ถูกนำไปทำการศึกษาในขั้นต่อไป ส่วนแบคทีเรียไอโซเลตที่ 93 นั้น ทำการคัดเลือกออกไม่นำมาใช้ทำการศึกษาต่อ เนื่องจาก *Bacillus cereus* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ไม่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

2. การจัดจำแนกราที่คัดเลือกได้

จัดจำแนกราที่คัดเลือกได้ ได้แก่ จุลินทรีย์ไอโซเลตที่ 88 และ 90 จากลักษณะโคโลนี พบว่า ไอโซเลตที่ 88 และ 90 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงราบนอาหารแข็งเป็นเวลานาน 3-4 วัน โคโลนีของรามีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว สปอร์มีสีเขียวอ่อนเหมือนกัน จากนั้นจึงศึกษาลักษณะภายนอกและลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทั้งสองไอโซเลตจัดเป็นราที่มีเส้นใยที่มีผนังกั้น แบ่งเป็นหลายเซลล์ แต่ละเซลล์มีหลายนิวเคลียส ส่วนโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) เกิดขึ้นโดยการเจริญแตกแขนงจากเส้นใยเจริญตั้งตรงขึ้นไป ส่วนปลายมีการโป่งออกเป็นเวสิเคิล (Vesicle) รอบ ๆ เวสิเคิลจะเป็นที่เกิดของฟิอาไลด์ (Phialide) ที่มีการสร้างโคนิเดียม (Conidium) หลายอันเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ ซึ่งตรงกับลักษณะของราที่อยู่ในสกุล *Aspergillus* ตามที่กล่าวไว้ใน Smith's Introduction to Industrial Mycology (Onion et al., 1938) โดยกำหนดให้ไอโซเลตที่ 88 เป็น *Aspergillus* sp. LK88 และไอโซเลตที่ 90 เป็น *Aspergillus* sp. LK90 ลักษณะโคโลนีและลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลตที่ 88 และ 90 แสดงดังภาคผนวก ค ข้อ2

3. การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้

จัดจำแนกแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ ได้แก่ ไอโซเลตที่ 69 และ 87 โดยดูจากลักษณะของเส้นใย คุณสมบัติทางเคมีของเซลล์ ได้แก่ ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิคในองค์ประกอบของผนังเซลล์ ชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เซลล์และดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีตีสทั้งสองไอโซเลตเป็นเวลานาน 2 วัน แอคติโนมัยซีติสไอโซเลตที่ 69 มีลักษณะโคโลนีขนาดประมาณ 4 มิลลิเมตร มีสีขาว นูน ผิวหน้าย่นมีลักษณะเหมือนกำมะหยี่และเซลล์ติดสีแกรมบวก ส่วนแอคติโนมัยซีตีสไอโซเลตที่ 87 มีลักษณะโคโลนีขนาดประมาณ 4 มิลลิเมตร มีสีขาว นูน ผิวหน้าย่นมีลักษณะเหมือนกำมะหยี่และเซลล์ติดสีแกรมบวกเช่นกัน

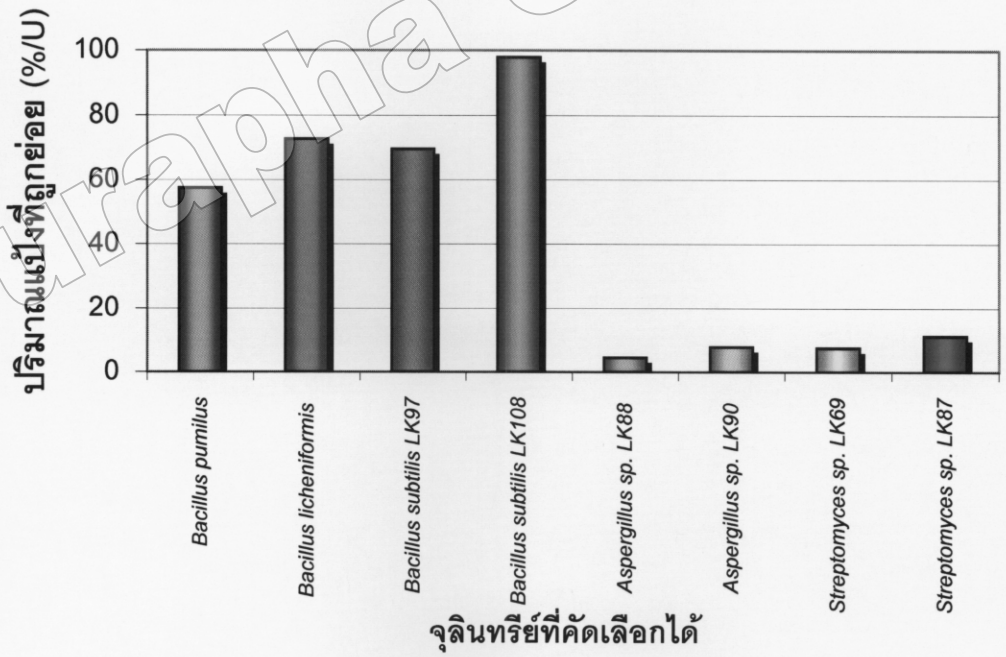
จากนั้นจัดจำแนกจุลินทรีย์โดยศึกษาถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์และชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เซลล์ พบว่า แอคติโนมัยซีตีสทั้งสองไอโซเลตมีกรดไดอะมิโนไพมิลิคและไกลซีนอยู่ในองค์ประกอบของผนังเซลล์และไม่พบน้ำตาลชนิดใดที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เซลล์ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของทั้งสองไอโซเลต พบว่าสามารถสร้างเส้นใยที่เป็นสายยาวได้ทั้งเส้นใยภายใต้ผิวอาหาร (Substrate Mycelium) และเส้นใยเหนือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผิวอาหาร (Aerial Mycelium) โดยเส้นใยมีความแข็งแรง ไม่พบการแตกหักของเส้นใย เส้นใยเหนือผิวอาหารสามารถสร้างสปอร์เป็นสายยาวตรง ซึ่งตรงกับลักษณะของแอคติโนมัยซีตีสที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* ตามที่กล่าวไว้ใน Bergey's Manaul of Systematic Bacteriology Volume 4 (Williams et al., 1989) โดยกำหนดให้แอคติโนมัยซีตีสไอโซเลตที่ 69 เป็น *Streptomyces* sp. LK69 และไอโซเลตที่ 87 เป็น *Streptomyces* sp. LK87 ลักษณะโคโลนีและลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแอคติโนมัยซีตีสไอโซเลตที่ 69 และ 87 แสดงดังภาคผนวก ค ข้อ2

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

เมื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเหลว จากนั้นนำจุลินทรีย์ทุกไอโซเลตที่ได้ทำการคัดเลือกมาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง โดยดูจากปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไปจากปริมาณความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น คือ 3.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลการทดลองความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ แสดงภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK108 สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด โดยดูจากปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไป คือ 97.90 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 หน่วยของเอนไซม์ ในสภาวะที่ทดสอบ รองลงมาได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังโดยมีปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไป คือ 72.67 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 หน่วยของเอนไซม์ ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 และ *B. pumilus* สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ในปริมาณน้อยรองลงมา โดยมีปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไป คือ 69.67 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 หน่วยของเอนไซม์และ 57.36 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 หน่วยของเอนไซม์ ตามลำดับ

สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากราที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK90 ซึ่งย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังโดยมีปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไป คือ 7.81 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 หน่วยของเอนไซม์ ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังโดยมีปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไป คือ 4.50 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 หน่วยของเอนไซม์ น้อยรองลงมา และในส่วนของเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีส พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Streptomyces* sp. LK69 โดยมีปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไป คือ 11.11 และ 7.51 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 หน่วยของเอนไซม์ ตามลำดับ

ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

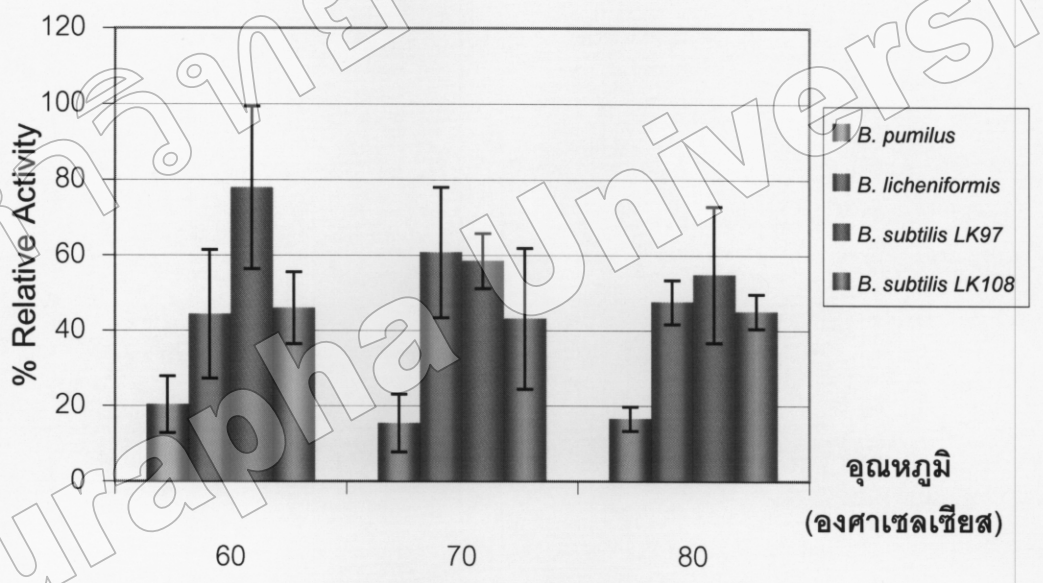
จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังโดยดูจากปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไปของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ต่อมาได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทำการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ ได้แก่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ พีเอช 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 นาน 10 นาที ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีสทำการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ ได้แก่ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ พีเอช 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 นาน 10 นาที เช่นกัน ซึ่งจากผลการทดลองที่ทุกพีเอชที่ทำการศึกษาที่ได้ พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่มีแนวโน้มลดลง ดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. ความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 4.5

พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตส่วนใหญ่จะลดลง โดยที่อุณหภูมิสูงสุดที่ทำการทดสอบ คือ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 มีความเสถียรต่อพีเอช 4.5 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 54.86% ในขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* และ *B. subtilis* LK108 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ คือ 47.57% และ 45.07% ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. pumilus* มีความเสถียรต่อพีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนี้ได้น้อยที่สุด เหลือกิจกรรม เท่ากับ 16.56% แสดงดังภาพที่ 10

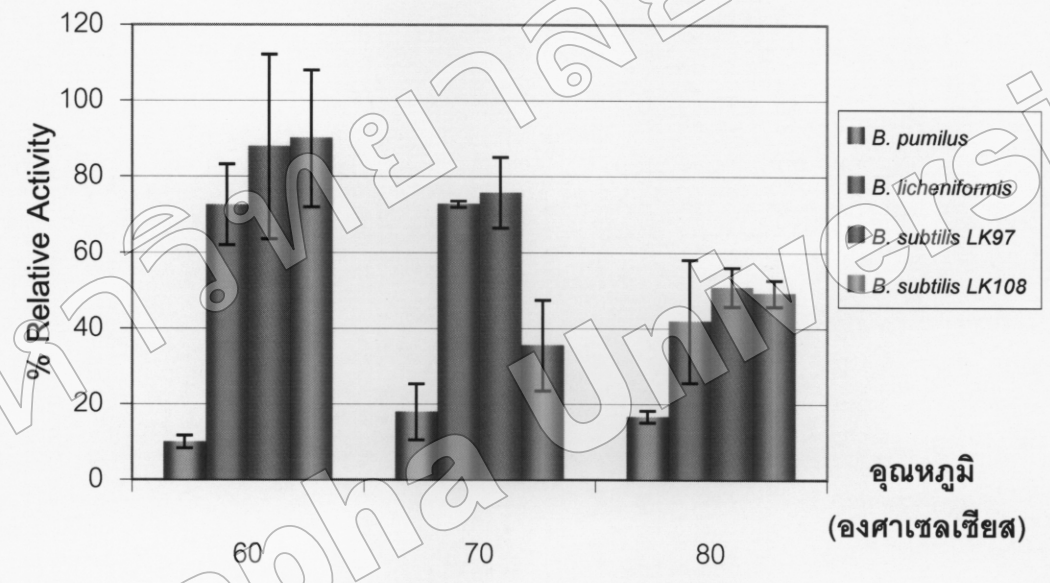


ภาพที่ 10 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 4.5 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.0

พบว่า ที่พีเอช 5.0 ให้ผลเช่นเดียวกันกับผลของความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 4.5 โดยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 มีความเสถียรต่อพีเอช 5.0 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 50.93% ในขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK108 และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 49.30% และ 41.89% ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. pumilus* มีความเสถียรต่อพีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนี้ได้น้อยที่สุด เหลือกิจกรรม เท่ากับ 16.68% แสดงดังภาพที่ 11

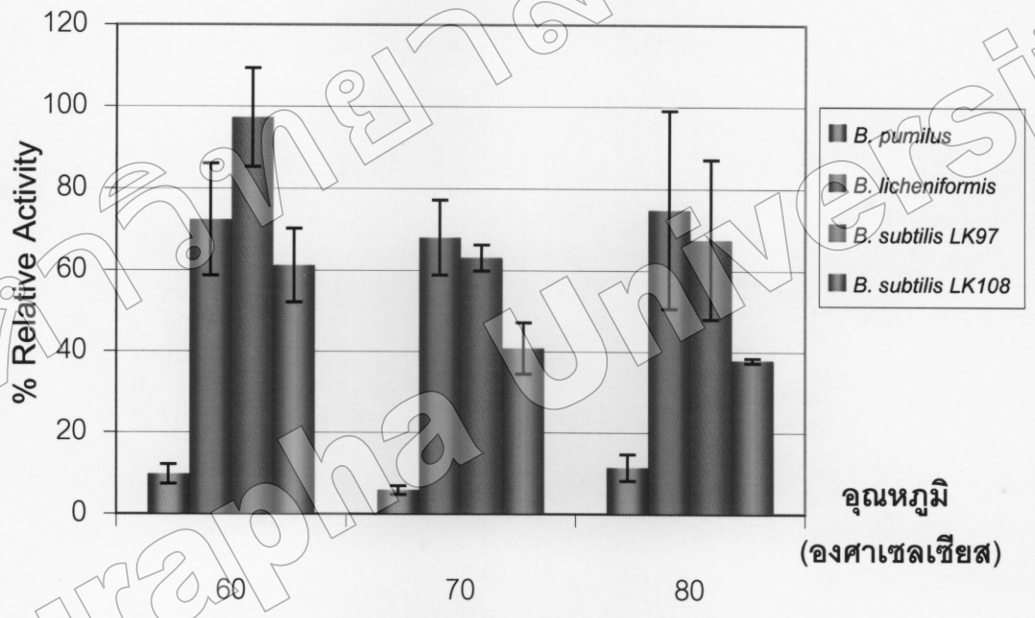


ภาพที่ 11 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.0 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.3 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.5

จากการศึกษา พบว่า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มีความเสถียรต่อพีเอช 5.5 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 74.85% และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 67.54% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK108 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 37.89% รองลงมา และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. pumilus* มีความเสถียรต่อพีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนี้ได้น้อยที่สุด เหลือกิจกรรม เท่ากับ 11.36% แสดงดังภาพที่ 12

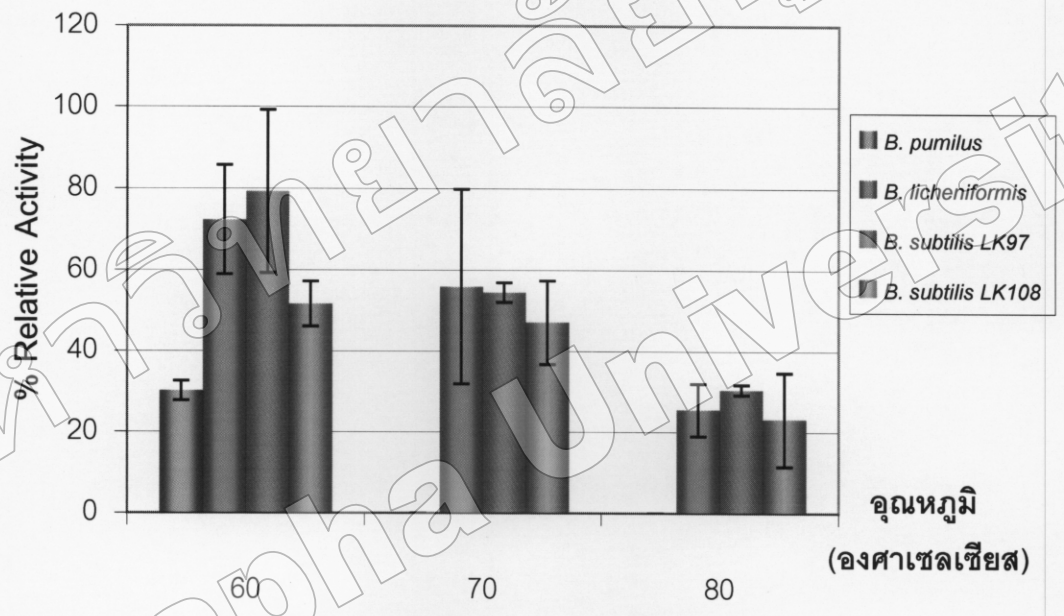


ภาพที่ 12 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.5 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 6.0

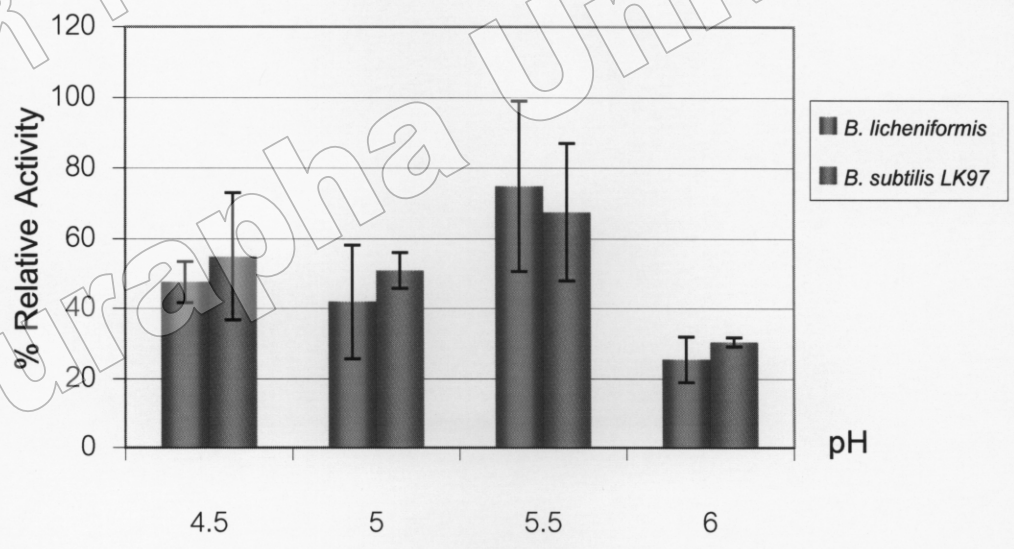
ที่พีเอช 6.0 ของเอนไซม์ที่นำมาทดสอบ พบว่า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 มีความเสถียรต่อพีเอช 6.0 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 30.44% ในขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK108 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 25.47% และ 23.09% ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. pumilus* นั้น ไม่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เลย แสดงดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 6.0 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากผลการวิจัยที่ได้ข้างต้น พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* และ *B. subtilis* LK97 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงใกล้เคียงกันในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ จึงได้เปรียบเทียบความเสถียรต่อพีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิสูงสุดของการทดสอบ คือ 80 องศาเซลเซียส ระหว่างเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลต พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตมีความเสถียรที่พีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5.5 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงมีความแตกต่างจากที่พีเอช 5.0 และ 6.0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* LK97 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอชระหว่าง 4.5-5.5 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงมีความแตกต่างจากที่พีเอช 6.0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 14 จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ ได้ดีและสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ในปริมาณสูง มีความเหมาะสมแก่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องต่อไป



ภาพที่ 14 ความเสถียรต่อพีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* และ *B. subtilis* LK97

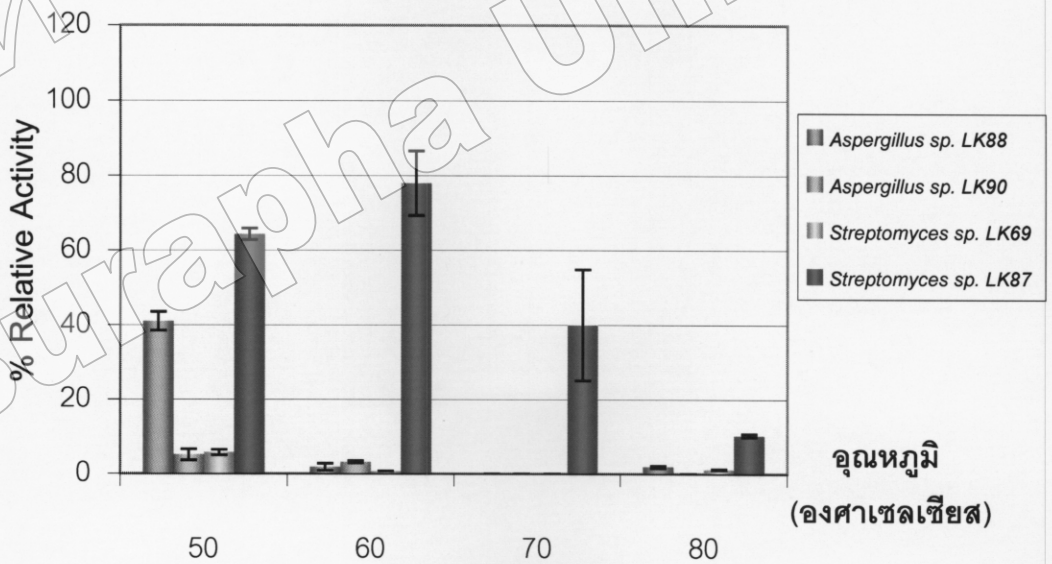
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์ที่ผลิตจากรา และแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้

2.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 4.5

จากการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 4.5 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากราที่คัดเลือกได้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 มีความเสถียรต่อพีเอช 4.5 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 41.04% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK90 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 5.11% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 4.5 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ พบว่า ที่อุณหภูมิสูงสุดของการทดสอบ คือ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 มีความเสถียรต่อพีเอช 4.5 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 10.34% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK69 (1.14%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 15



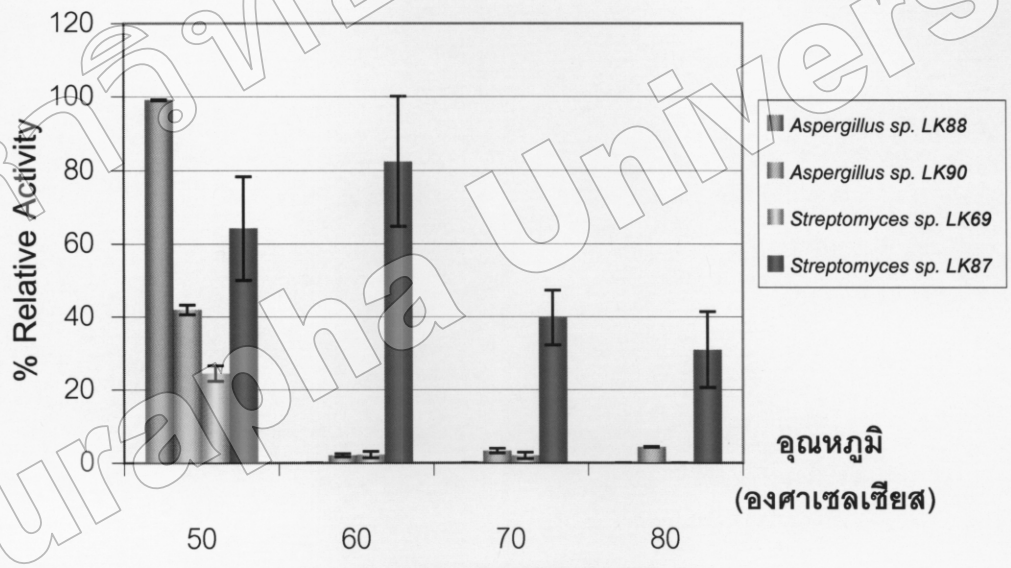
ภาพที่ 15 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 4.5 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.0

สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.0 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากรา ที่คัดเลือกได้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 มีความเสถียรต่อพีเอช 5.0 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 99.06% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK90 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 41.94% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ในกรณีของเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 มีความเสถียรต่อพีเอช 5.0 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 31.03% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK69 ที่ไม่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เลยอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 16



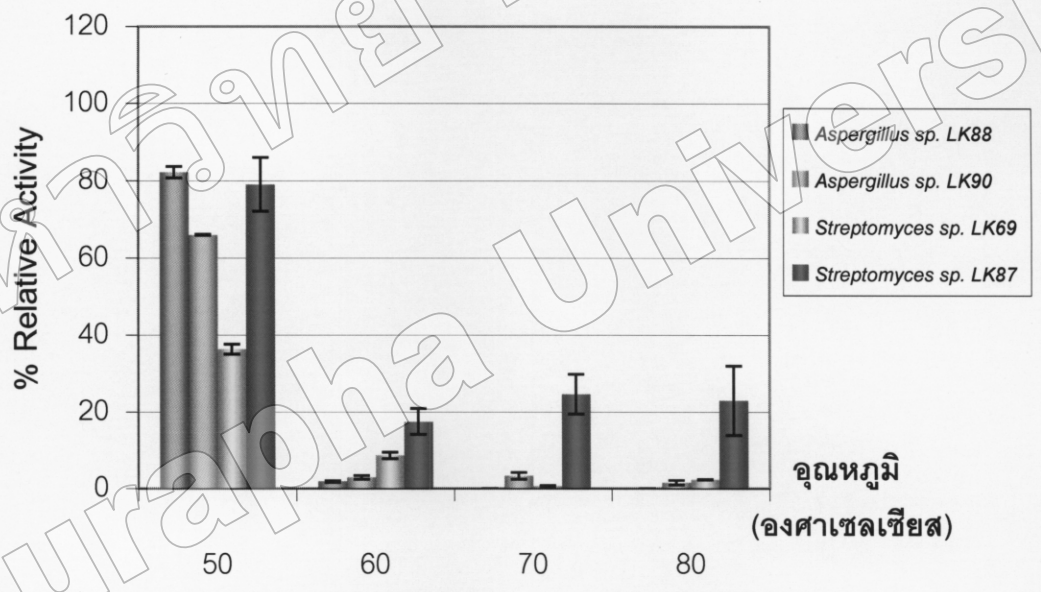
ภาพที่ 16 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.0 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.5

พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 มีความเสถียรต่อพีเอช 5.5 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 82.18% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK90 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 66.04% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 สามารถทนต่อพีเอช 5.5 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 22.94% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK69 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 2.29% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 17



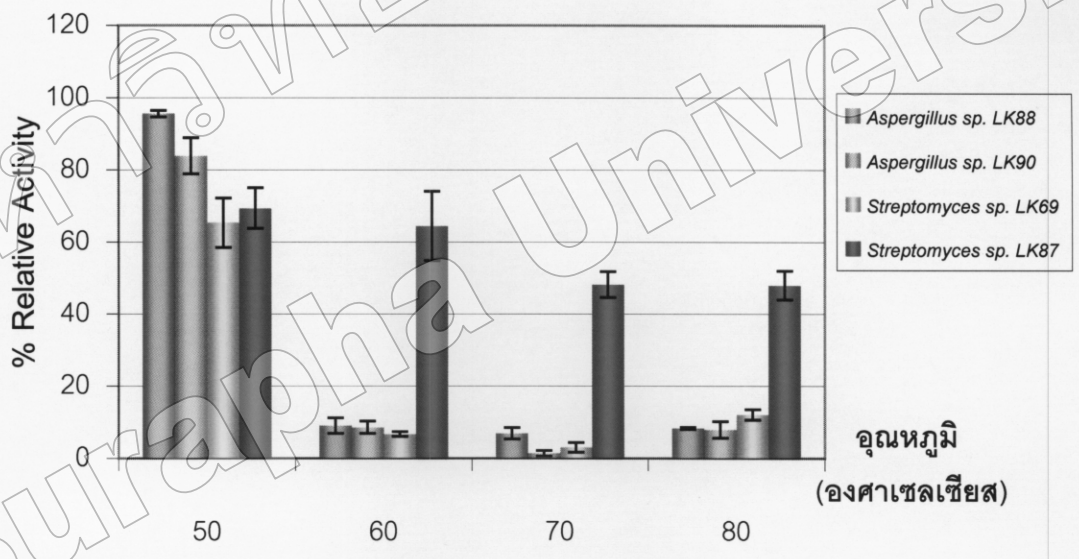
ภาพที่ 17 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 5.5 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 6.0

จากการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 6.0 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากรา ที่คัดเลือกได้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 มีความเสถียรต่อพีเอช 6.0 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 95.64% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK90 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 83.95% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

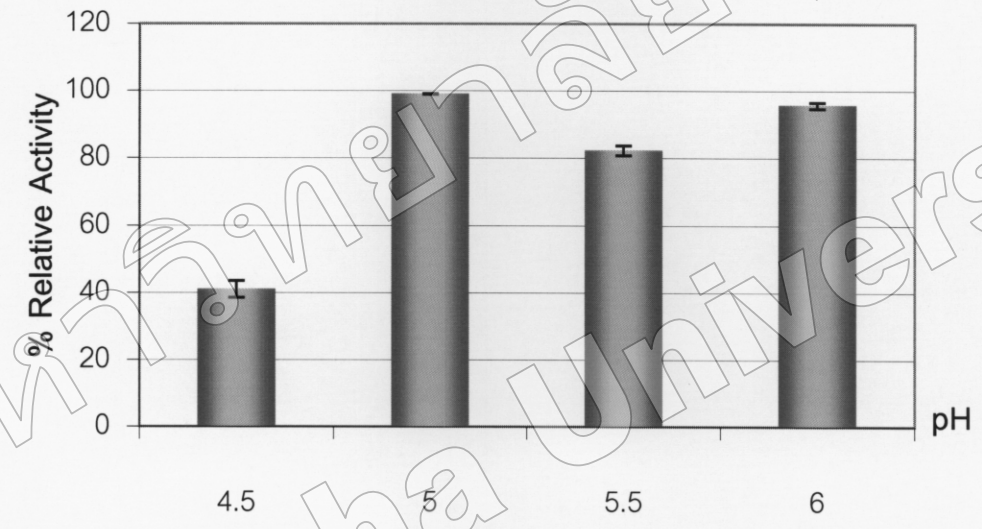
สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 มีความเสถียรต่อพีเอช 6.0 สูงสุด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงเท่ากับ 47.91% มีความแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK69 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 12.06% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ความเสถียรต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ที่พีเอช 6.0 ของเอนไซม์ที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

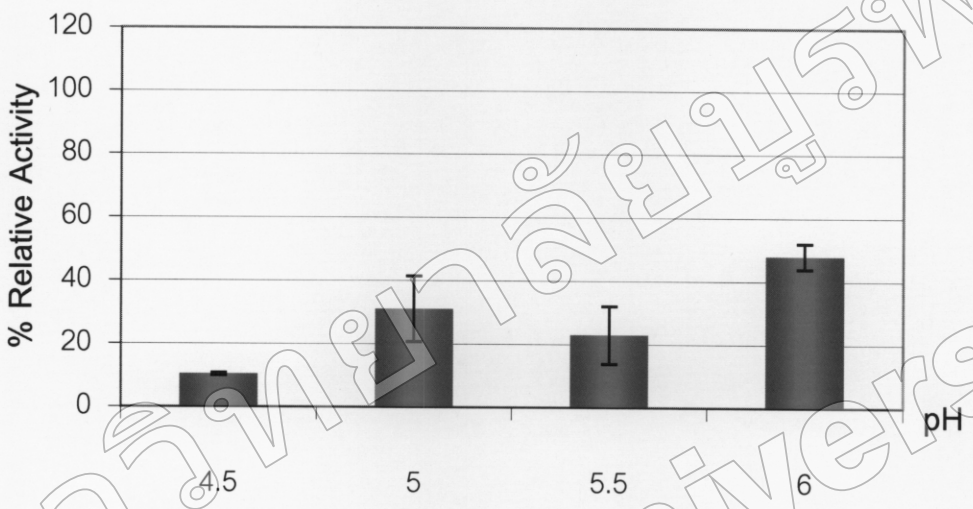
จากผลการวิจัยที่ได้ข้างต้น สรุปได้ว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ ได้ดี จึงได้เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 และความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงสุดที่พีเอช 5.0 มีความแตกต่างจากพีเอชอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมาได้แก่ พีเอช 6.0 5.5 และ 4.5 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ความเสถียรต่อพีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp. LK88 ที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 พบว่า มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงสุดที่พีเอช 6.0 มีความแตกต่างจากพีเอชอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รองลงมา ได้แก่ พีเอช 5.0 5.5 และ 4.5 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 ความเสถียรต่อพีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. LK87 ที่คัดเลือกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University