อัลคาไลน์อะไมเลสจาก alkaliphilic *Bacillus* sp. SS-8 และสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์

สุวรรณา ศักดิ์ดาสถาพร [1] ธนภัทร สายเจริญ [2] คิน เลย์ คู [3] และ กนก รัตนะกนกชัย [4]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 6 พฤศจิกายน 2546 ตอบรับเมื่อ 13 ตุลาคม 2547

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกเชื้อ alkaliphilic *Bacillus* 27 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะเป็นด่าง โดยพิจารณาจากความสามารถของอะไมเลสในการย่อยแป้งดิบ รวมถึงการทดสอบประสิทธิภาพของอะไมเลสในการทำงานในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดต่างๆ พบว่า อะไมเลสจาก alkaliphilic *Bacillus* sp. SS-8 มีศักยภาพสูงสุด เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอะไมเลสพบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ pH เริ่มต้นเท่ากับ 11 อุณหภูมิ 37 ºซ. ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 1.5 กรัม/100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เวลาที่เหมาะสมในการผลิตอะไมเลสของ *Bacillus* sp. SS-8 อยู่ในช่วง stationary phase ที่เวลาประมาณ 42-60 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ การผลิตอะไมเลส และการผลิตโปรตีนเพิ่มขึ้นแปรผันตามกัน แสดงว่าการผลิตอะไมเลสน่าจะเป็นแบบ growth-associated enzyme นอกจากนี้พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. SS-8 ในสภาวะที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อไม่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude amylase คือ pH ระหว่าง 7-12 และอุณหภูมิ 50 ºซ. ขณะที่เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อ pH และอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่าง pH 7-10 และอุณหภูมิ 30-50 ºซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8 สามารถย่อยแป้งดิบ โดยย่อยแป้งสาลีได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง แต่ย่อยแป้งพุทธรักษาและแป้งสาคูได้น้อยมาก

คำสำคัญ : อัลคาไลน์อะไมเลส / alkaliphilic *Bacillus* sp. / แป้งมันสำปะหลัง / แป้งดิบ / อะไมเลสย่อยแป้งดิบ

---

[1] นักศึกษาปริญญาโท สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

[2] ครูปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

[3] ผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

[4] รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Alkaline Amylase from *Bacillus* sp. SS-8 and Its Properties

Suwanna Sukdasathaporn [1] Tanapatr Saicharoen [2] Khin Lay Kyu [3]
and Khanok Ratanakhanokchai [4]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Received 6 November 2003 ; accepted 13 October 2004

Abstract

Selection of alkaliphilic *Bacillus* from 27 isolates which produced alkaline amylase based on the maximum capacity of amylase to hydrolyse raw starch was conducted. The effect of detergents on enzyme efficiency was also investigated. *Bacillus* sp. SS-8 was the best strain among all the isolates. Maximum amylase activity was achieved in a medium containing 1.5 g/100 ml raw cassava starch as the carbon source with the initial pH of 11, at 37˚C. The culture was harvested between 42-60 hours in the stationary phase. As both alkaline amylase and protein productions, increased along with the cell growth, amylase production from this stain should be growth-associated enzyme. No contamination occurred although the medium was not sterilized. The optimum pH and temperature for starch hydrolysis were between pH 7-12 and 50˚C and the crude enzyme was stable in the broad pH range of 7-10 and 30-50˚C for 1 hour. It could digest raw-starch granules of wheat higher than those of rice, corn and cassava. However, canna and sago granules were hardly hydrolyzed by the enzyme.

Keywords : Alkaline Amylase / Alkaliphilic *Bacillus* sp. / Cassava Starch / Raw Starch / Starch Binding Amylase

---

[1] *Graduate Student, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology.*

[2] *Teaching Assistant, Department of Microbiology, Faculty of Science.*

[3] *Expert, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[4] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล พบได้ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เหตุผลสำคัญที่นิยมใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการย่อยแป้ง คือ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก ต้นทุนการผลิตต่ำ และควบคุมสภาวะได้ง่าย [1] อะไมเลสถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทและมีแนวโน้มในการนำมาใช้งานมากขึ้น เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้ง อุตสาหกรรมการผลิตผงชูรส หรืออุตสาหกรรมการผลิตสารซักล้าง ซึ่งต่างต้องการเอนไซม์ที่มีสมบัติพิเศษที่ทนต่อความกดดันของสภาวะแวดล้อม ทั้งความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และส่วนประกอบต่างๆ ในผลิตภัณฑ์ ในการย่อยแป้งโดยใช้อะไมเลส แป้งต้องผ่านกระบวนการต้มให้สุกจึงจะได้สภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งการต้มเป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน จึงมีการศึกษาเพื่อย่อยแป้งดิบโดยไม่ต้องทำให้แป้งสุกก่อนโดยใช้อะไมเลสที่ผลิตจากแหล่งต่างๆที่มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบ (starch-binding amylase) เช่น อะไมเลสจากรา และแบคทีเรีย [2] ซึ่งเป็นประโยชน์มากต่ออุตสาหกรรม ทำให้ประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่าย ปัจจุบันประเทศไทยนำเข้าเอนไซม์ปีละมากกว่า 700 ล้านบาทต่อปี [3] โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่นำเข้าเป็นอะไมเลส ดังนั้นการคัดเลือก *Bacillus* ที่ผลิตอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งดิบ และศึกษาสมบัติต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการทำงานจะช่วยให้สามารถนำอะไมเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการลดการนำเข้าอะไมเลสจากต่างประเทศ

จากการศึกษาของห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สามารถแยก alkaliphilic *Bacillus* หลายชนิด ที่ผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง และบางชนิดมีสมบัติยึดเกาะกับสับสเตรททีไม่ละลายน้ำได้อย่างจำเพาะ ทำให้ย่อยสับสเตรททีไม่ละลายน้ำได้ดี [4] การคัดเลือก *Bacillus* ที่ผลิตอะไมเลสที่ย่อยแป้งดิบได้สูง ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะเป็นด่าง การศึกษาสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ และความสามารถในการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ จะเป็นแนวทางในการนำอะไมเลสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมสารซักล้าง และการผลิตน้ำตาลจากแป้งดิบ

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 แหล่งของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ alkaliphilic *Bacillus* 27 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อใน stock ของห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยเชื้อที่ 1-16 แยกได้จากน้ำเสียของโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษสยาม จำกัด จังหวัดราชบุรี เชื้อที่ 17-23 แยกได้จากน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เชื้อที่ 24-26 แยกได้จากกากถั่วเน่าจากจังหวัดเชียงใหม่ และเชื้อที่ 27 แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งใกล้วัดบัวผัน เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ

2.2 การผลิตอะไมเลส

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้ Berg's mineral medium [5] ที่มีสูตรดังต่อไปนี้ คือ $NaNO_3$ 0.2 กรัม K_2HPO_4 0.05 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.02 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 กรัม $MnSO_4.H_2O$ 0.002 กรัม และ

$FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยเติมแป้งมันสำปะหลัง (ตราปลามังกร ของห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลตงจั่น) 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับ pH เป็น 10.5 ด้วย Na_2CO_3 100 กรัม/ลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อจากข้อ 1 แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ํซ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ํซ เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ (supernatant) เป็น crude enzyme เก็บไว้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

2.3 การตรวจวัดกิจกรรมอะไมเลส

เติม crude enzyme 0.125 มิลลิลิตร ลงในแป้งละลายน้ำ (soluble potato starch) (Sigma, analytical grade) 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร ของ 0.05 โมลาร์ sodium carbonate buffer pH 9.0 ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 ํซ นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson [6] โดยใช้ D-Glucose (Merck, analytical grade) เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

1 หน่วย (U) ของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก โดยใช้วิธีการของ Somogyi-Nelson [6] และใช้ D-Glucose ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างตามวิธีของ Lowry และคณะ [7] และใช้สารละลาย bovine serum albumin (Sigma, analytical grade) ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของอัลคาไลน์อะไมเลส

ก. ผลของ pH ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของอัลคาไลน์อะไมเลส

ตรวจสอบค่า pH ที่ให้กิจกรรมของอะไมเลสสูงสุด โดยบ่ม crude amylase กับแป้งละลายน้ำ 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ pH 6.0-7.0 (sodium phosphate), pH 7.0-9.0 (Tris-HCl), pH 9.0-11.0 (sodium carbonate-bicarbonate) และ pH 11.0-12.0 (Na_2HPO_4/NaOH) แล้วตรวจวัดกิจกรรมของอะไมเลสตามหัวข้อที่ 2.3

ตรวจสอบค่า pH ที่มีต่อเสถียรภาพของอะไมเลสโดยแช่อะไมเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีค่า pH ระหว่าง 6.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 50 ํซ นาน 60 นาที แล้วตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ ตามหัวข้อที่ 2.3 แต่ใช้แป้งละลายน้ำความเข้มข้น 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะไมเลสที่ได้จากการทดลองด้านบน

ข. ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของอัลคาไลน์อะไมเลส

ตรวจวัดกิจกรรมอะไมเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ ก. ที่อุณหภูมิระหว่าง 30-80 °ซ. นาน 60 นาที ส่วนเสถียรภาพของอะไมเลส ทำได้โดยแช่อะไมเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน อุณหภูมิระหว่าง 30-80 °ซ. นาน 60 นาที แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตามวิธีการในข้อ 2.3

2.7 ผลของสารซักล้าง และ surfactant ต่อเสถียรภาพของอัลคาไลน์อะไมเลส

เติม crude enzyme ลงในสารซักล้างชนิดผงความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร หรือ สำหรับชนิดเหลว 10 มิลลิลิตร/ลิตร ในอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารซักล้างเท่ากับ 1:2 ผสมให้เข้ากัน แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. นาน 60 นาที จากนั้นตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารซักล้าง

ในกรณีของ surfactant ทำการทดลองเช่นเดียวกับสารซักล้าง แต่ใช้ความเข้มข้น 5 กรัม/ลิตร สำหรับชนิดผง และ 5 มิลลิลิตร/ลิตร สำหรับชนิดเหลว

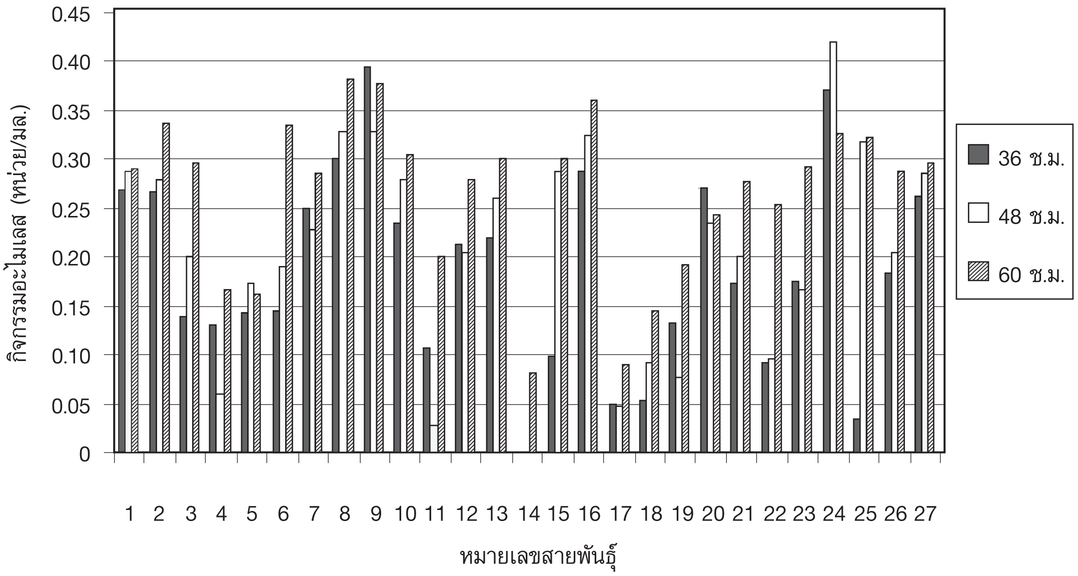
2.8 การย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ โดยอัลคาไลน์อะไมเลส

เตรียมแป้งดิบชนิดต่างๆ ให้มีความเข้มข้น 2 กรัม/100 มิลลิลิตร ของ sodium carbonate-bicarbonate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 10.0 เติม sodium azide ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่อปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติมเอนไซม์ลงไปเพื่อย่อยแป้งแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใน water bath shaker จากนั้นปั่นแยกแป้งออกที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสต่างๆ ไปตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือก alkaliphilic *Bacillus* ที่ผลิตอัลคาไลน์อะไมเลส

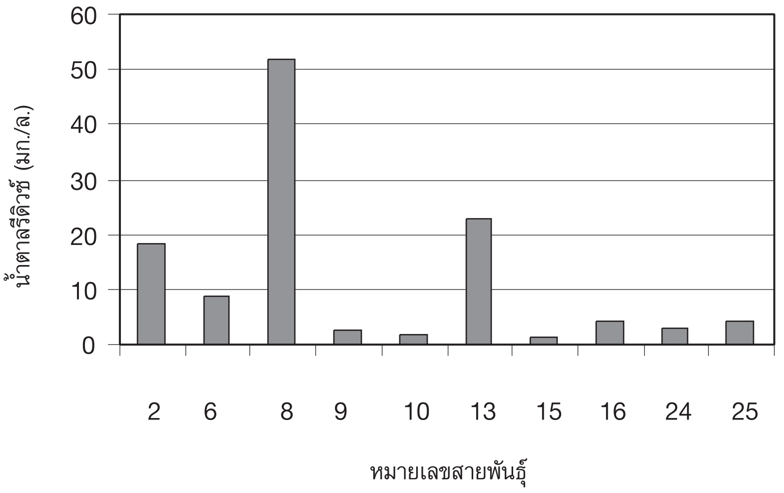
ภายหลังการเพาะเลี้ยง alkaliphilic *Bacillus* 27 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 10.5 อุณหภูมิ 37 °ซ. ในเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 48 และ 60 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงที่แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง มาตรวจหาปริมาณกิจกรรมอะไมเลส โดยใช้แป้งละลายน้ำ 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร ของ 0.05 โมลาร์ sodium carbonate buffer pH 9 ที่อุณหภูมิ 50 °ซ. นาน 10 นาที สำหรับสาเหตุที่ไม่ใช้แป้งดิบในการตรวจวัดกิจกรรมอะไมเลสนั้น เนื่องจากให้ผลของกิจกรรมอะไมเลสต่ำ โดยแป้งดิบไม่ละลายน้ำ จึงมีสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการย่อยของอะไมเลส และการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ใช้ระยะเวลาสั้นๆ เพียง 10 นาที การใช้แป้งละลายน้ำเป็นสับสเตรทจะได้ค่าที่น่าเชื่อถือมากกว่าการใช้แป้งดิบ ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตอะไมเลสจึงใช้แป้งละลายน้ำในการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งพบว่า *Bacillus* ทั้ง 27 สายพันธุ์ผลิตอะไมเลส (รูปที่ 1) จากผลของการตรวจวัดกิจกรรมอะไมเลสในรูปที่ 1 สามารถคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่มีกิจกรรมอะไมเลสสูง (มากกว่า 0.3 หน่วย/มิลลิลิตร) 10 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อหมายเลข 2 6 8 9 10 13 15 16 24 และ 25 ซึ่งจะนำอะไมเลสจากเชื้อกลุ่มนี้ไปตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบต่อไป



รูปที่ 1 กิจกรรมอะไมเลสจากการย่อยแป้งละลายน้ำของ *Bacillus* 27 สายพันธุ์

3.2 การศึกษาความสามารถของอะไมเลสในการย่อยแป้งดิบ

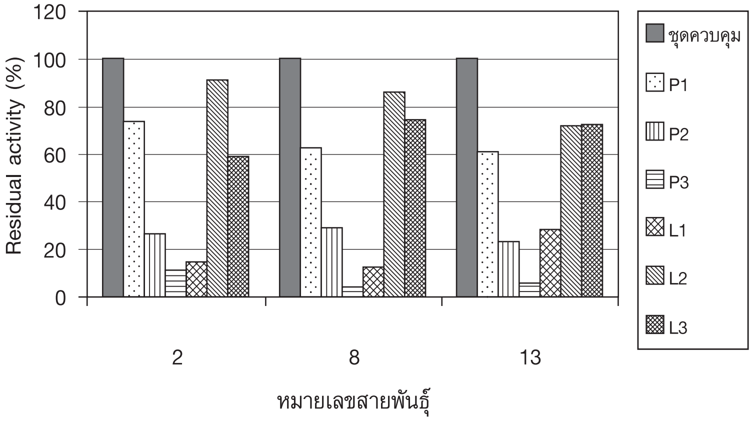
เมื่อนำ crude amylase จากเชื้อ *Bacillus* 10 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้มาย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบ 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร ของ 0.05 โมลาร์ sodium carbonate buffer pH 9 อุณหภูมิ 50 ˚ซ. นาน 10 นาที โดยปรับให้ความเข้มข้นสุดท้ายของอะไมเลสต่อปริมาตรทั้งหมดเป็น 2 หน่วย พบว่า *Bacillus* sp. หมายเลข 8 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เท่ากับ 52 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่เชื้อหมายเลข 13 และ 2 ให้ปริมาณน้ำตาลรองลงมาเท่ากับ 22 และ 18 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบ
โดย crude amylase จาก *Bacillus* 10 สายพันธุ์

3.3 การศึกษาผลของสารซักล้าง และ surfactant ต่อเสถียรภาพของอะไมเลส

อุตสาหกรรมสารซักล้างมีการเติมเอนไซม์ เช่น อัลคาไลน์โปรติเอส และอัลคาไลน์อะไมเลส ลงไปเพื่อช่วยขจัดคราบสิ่งสกปรกที่ติดมากับเนื้อผ้า [8] อัลคาไลน์อะไมเลสที่มีความคงทนต่อสารซักล้างจึงเป็นที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนี้ สารซักล้างชนิดผงที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ แฟ้บเพอร์เฟคกลิ่นส้ม (P1) บรีสเพาเวอร์ (P2) และเปาแฮนด์ฟอร์ช (P3) และชนิดน้ำ ได้แก่ แฟ้บเพอร์เฟค (L1) ไฟน์ไลน์ (L2) และโฮม (L3) (สารซักล้างทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่มีโปรติเอสและอะไมเลสผสมอยู่) เมื่อแช่ crude enzyme (ความเข้มข้นสุดท้ายต่อปริมาตรทั้งหมด 2 หน่วย) จากเชื้อหมายเลข 2 8 และ 13 กับสารซักล้างต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาตรวจวัดกิจกรรมของอะไมเลสที่เหลืออยู่ พบว่าในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิด P1 L2 และ L3 อะไมเลสยังคงมีเสถียรภาพมากกว่าร้อยละ 59 ขณะที่ P2 P3 และ L1 ทำให้ความคงทนของอะไมเลสลดลงมาก (น้อยกว่าร้อยละ 28) ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งมีรายงานว่า surfactant ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารซักล้างมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ [9] และเมื่อศึกษาผลของ surfactant 3 ชนิดต่อเสถียรภาพของอะไมเลสจากเชื้อหมายเลข 8 พบว่า surfactant แต่ละชนิดมีผลต่ออะไมเลสต่างกัน โดย Triton-X 100 sodium dodesyl sulfate และ Tween 80 ทำให้เสถียรภาพสัมพัทธ์ของอะไมเลสเหลือร้อยละ 23 31 และ 93 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการเติม surfactant ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า alkyl benzene sulfonate ซึ่งเป็น surfactant ในสารซักล้าง P2 และ P3 และ sodium dodecyl benzene sulfonate ใน L1 น่าจะมีผลให้เสถียรภาพของอะไมเลสจากเชื้อทั้ง 3 ชนิดสูงกว่าใน P1 ที่มี surfactant เป็น linear alkyl benzene sulfonate L2 ที่มี sodium lauryl ether sulfate และ sodium lauryl sulphate และ L3 ที่มี alcohol ethoxylate เป็นส่วนประกอบในสารซักล้าง



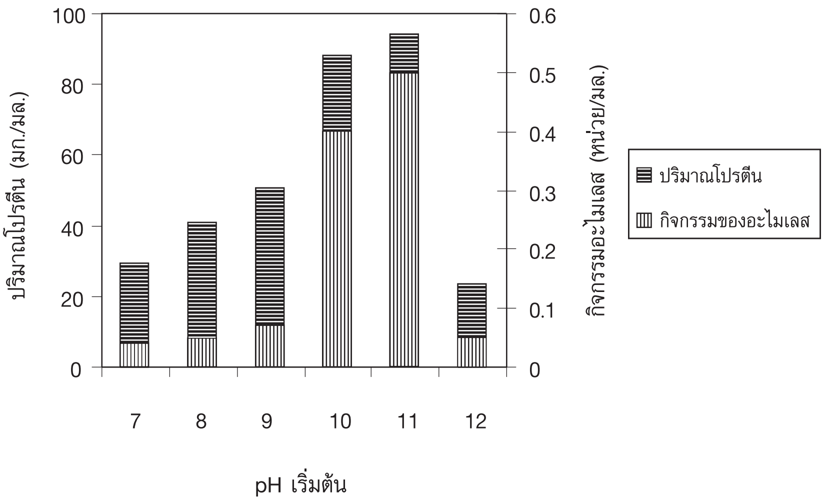
รูปที่ 3 ผลของสารซักล้างต่อความคงทนของอัลคาไลน์อะไมเลส โดยสารซักล้างชนิดผง ได้แก่ แฟ้บเพอร์เฟคกลิ่นส้ม (P1) บรีสเพาเวอร์ (P2) และเปาแฮนด์ฟอร์ช (P3) และชนิดเหลว ได้แก่ แฟ้บเพอร์เฟคชนิดน้ำ (L1) ไฟน์ไลน์ (L2) และโฮม (L3)

จากผลการทดลองในข้อ 1 2 และ 3 พบว่า *Bacillus* sp. หมายเลข 8 ผลิตอัลคาไลน์อะไมเลสที่มีกิจกรรมสูง ย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบได้ดี และทนต่อสารซักล้าง เมื่อเปรียบเทียบกับอะไมเลสจากเชื้ออื่นๆ ซึ่งคาดว่าเกิดจากสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์แต่ละชนิด ที่ขึ้นอยู่กับการจัดเรียงตัวและโครงสร้างของเอนไซม์ จึงเลือก *Bacillus* sp. หมายเลข 8 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป ซึ่งต่อไปจะเรียกเชื้อนี้ว่า *Bacillus* sp. SS-8

3.4 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลส

3.4.1 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตอะไมเลส

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. SS-8 ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลัง 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 ˚ซ. ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ pH 7.0-12.0 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่า pH 11.0 เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตอะไมเลส โดยให้ปริมาณเซลล์ ค่ากิจกรรมของอะไมเลส (0.51 หน่วย/มิลลิลิตร) และปริมาณโปรตีน (94.1 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่า pH อื่น (รูปที่ 4) นอกจากนี้ค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสที่ pH 11.0 เท่ากับ 5.31 หน่วย/มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าที่ pH อื่น โดยที่ pH 7.0 8.0 9.0 10.0 และ 12.0 ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสเท่ากับ 1.36 1.21 1.35 4.54 และ 2.13 หน่วย/มิลลิกรัม ตามลำดับ การผลิตอะไมเลสที่ pH 7.0 ได้กิจกรรมของอะไมเลสค่อนข้างต่ำ เนื่องจาก *Bacillus* sp. SS-8 เป็น alkaliphilic *Bacillus*



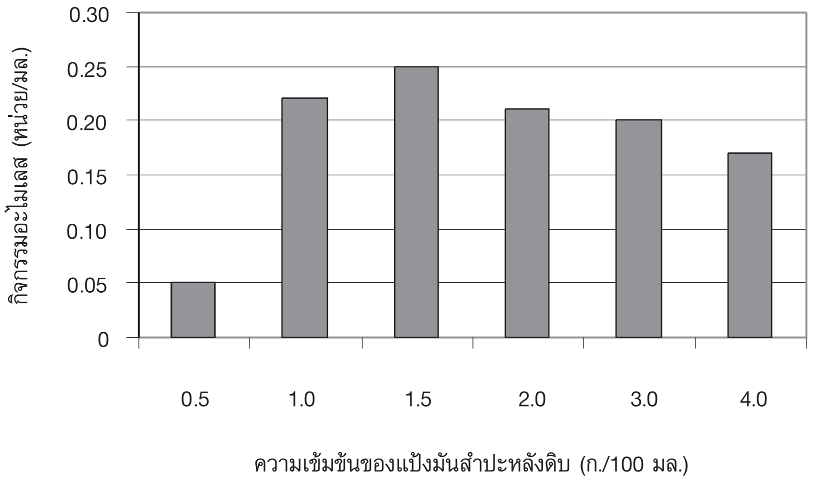
รูปที่ 4 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตอะไมเลส ของ *Bacillus* sp. SS-8
(ค่าที่ใช้เป็นค่าที่วัดที่เวลา 60 ชั่วโมง)

3.4.2 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังดิบต่อการผลิตอะไมเลส

รูปที่ 5 พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 1.5 กรัม/100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน *Bacillus* sp. SS-8 ผลิตอะไมเลสได้สูงสุด เมื่อความเข้มข้นของแป้งมากกว่า 1.5 กรัม/100 มิลลิลิตร การผลิตอะไมเลสลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากปริมาณของแป้งที่มากขึ้นทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในน้ำหมักลดลง ซึ่ง *Bacillus* sp. SS-8 เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เมื่อปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจำกัด การเจริญและการผลิตอะไมเลสจึงน้อยลง ซึ่งปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการผลิตอะไมเลส [10] หรืออาจเกิดจาก

catabolite repression โดยน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งที่ความเข้มข้นแป้งสูง ไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ (จากรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 175 มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่ง Lin และคณะ [11] รายงานว่าส่วนใหญ่การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง โดย genus *Bacillus* มักเกิด catabolite repression โดยน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการย่อยแป้งหรืออาจจะเป็นผลจากทั้ง 2 ปัจจัยร่วมกัน

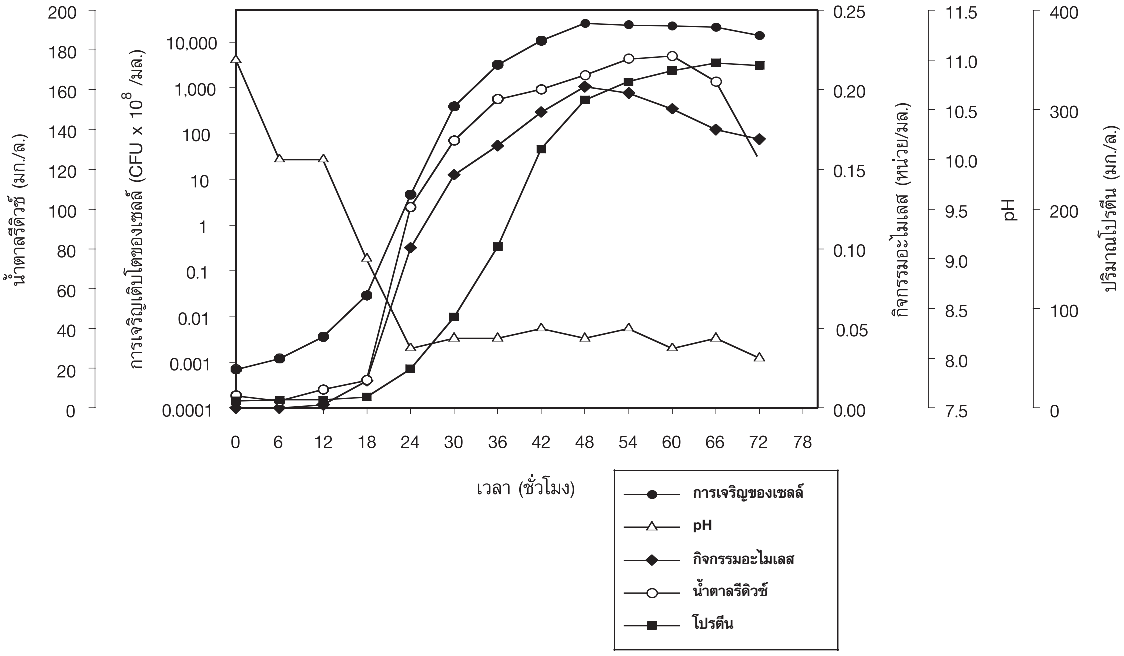
3.5 การผลิตอะไมเลสที่ระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 5 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังดิบต่อการผลิตอะไมเลสของ *Bacillus* sp. SS-8 ที่ pH 11 อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. SS-8 ที่ pH 11 อุณหภูมิ 37 °ซ. ความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 1.5 กรัม/100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 0 ถึง 72 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเป็นระยะ lag phase เซลล์เจริญช้า เนื่องจากอยู่ในสภาวะปรับตัวในอาหารและเตรียมพร้อมที่จะแบ่งเซลล์ หลังจากนั้นระหว่างชั่วโมงที่ 18-30 อยู่ในช่วง log phase เซลล์เจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งในช่วงนี้เซลล์แบ่งตัวเป็นจำนวนมาก และผลิตอะไมเลสเพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเข้าสู่เซลล์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ ปริมาณโปรตีนจึงเพิ่มขึ้นแปรผันตามการเจริญของเซลล์และการผลิตเอนไซม์ หลังจากชั่วโมงที่ 48 เริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ (stationary phase) (รูปที่ 6) ส่วนปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นมากระหว่างชั่วโมงที่ 18 ถึง 30 ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นน่าจะเกิดจากเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง log phase แล้วผลิตอะไมเลสออกมาย่อยสลายแป้ง โดยอัตราการผลิตน้ำตาลโดยอะไมเลสมากกว่าอัตราการใช้น้ำตาลของเซลล์ จึงทำให้มีน้ำตาลเหลืออยู่ในน้ำหมัก เนื่องจากแป้งเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ จุลินทรีย์จึงผลิตอะไมเลสออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายแป้งให้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต จากการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ การผลิตโปรตีน และการผลิตอะไมเลสแปรผันตามกัน ดังนั้นการผลิตอะไมเลสน่าจะเป็นแบบ growth-associated enzyme [12] ในระหว่างการเจริญ พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งอาจมีสาเหตุจากสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อมี buffer capacity ต่ำ จากการศึกษาของ Lin และคณะ [11] พบว่าค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตอะไมเลสจาก

alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23 เท่ากับ 8.5 และ pH สุดท้ายของการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 5.7 ถ้าหากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีการควบคุม pH ให้เท่ากับ 8.5 ตลอดการทดลอง การเจริญของ *Bacillus* sp. TS-23 น้อยมาก จึงตรวจไม่พบกิจกรรมอะไมเลส ดังนั้นในการผลิตอะไมเลสของ *Bacillus* sp. SS-8 จึงปรับค่า pH เริ่มต้นในการผลิตเท่านั้น การที่ pH ลดลงในอาหารอีกสาเหตุหนึ่งอาจเนื่องจากระหว่างที่เซลล์มีการเจริญและแบ่งเซลล์ เซลล์ผลิตอะไมเลสออกมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ ในวัฏจักรเครบส์มีการผลิตสารที่เป็นกรด เช่น citric acid succinic acid และ oxaloacetic acid จึงทำให้ค่า pH ลดลง แต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 ค่า pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ อาจเนื่องจากในช่วงนี้กระบวนการแมตาบอลิซึมต่างๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อสังเคราะห์กรดอะมิโนและกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับการมีชีวิตอยู่ของจุลินทรีย์มากขึ้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทำให้มีการขับสารที่มีสมบัติเป็นด่าง เช่น แอมโมเนีย ออกมามากขึ้น หรืออาจจะเป็นผลจากปริมาณแป้งที่จะถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์อะไมเลสมีปริมาณลดลง ทำให้การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นพลังงานและผลิตสารที่มีสมบัติเป็นกรดลดลง



รูปที่ 6 การเจริญของ *Bacillus* sp. SS-8 ค่า pH ปริมาณการผลิตอะไมเลส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีนในน้ำหมักที่เปลี่ยนแปลงระหว่างเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

3.6 การผลิตอะไมเลสในสภาวะที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

Bacillus sp. SS-8 สามารถเจริญในสภาวะเป็นด่างสูง จึงทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารเหลวตามข้อ 2.2 โดยไม่ต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (autoclave) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบ 1.5 กรัม/100 มล.

เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 11.0 พบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ได้กิจกรรมของอะไมเลสไม่แตกต่างจากเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมากนัก และเมื่อตรวจสอบด้วยการ pour plate บน starch agar ตรวจดูลักษณะรูปร่างของเชื้อ การย้อมแกรม และทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุจากการใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในปริมาณสูง (7.0×10^4 CFU/มล.) *Bacillus* sp. SS-8 เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้อย่างรวดเร็วในสภาวะความเป็นด่างสูง นอกจากนี้ mineral salt ที่ใช้เป็น minimal medium ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus* มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น และแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอนที่ย่อยได้ยาก ทำให้จุลินทรีย์อื่นไม่สามารถเจริญในช่วงเวลาเก็บเกี่ยวเอนไซม์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการประหยัดพลังงานและเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

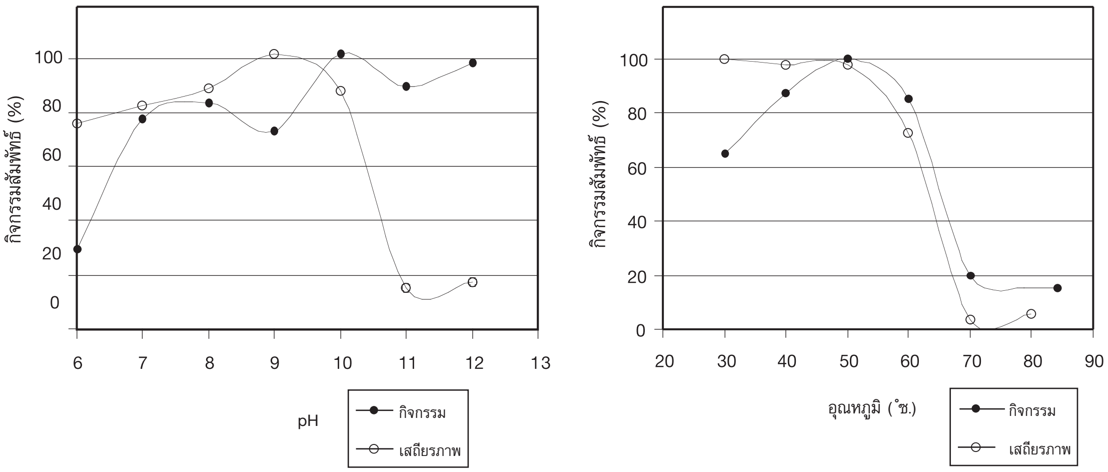
3.7 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการทำงาน และเสถียรภาพของอะไมเลส

3.7.1 ผลของ pH ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของอะไมเลส

จากรูปที่ 7 (ก) พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของอะไมเลสจาก *Bacillus* sp. SS-8 มี 2 ช่วง คือที่ pH 8 และ 10 ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุจากอะไมเลสที่นำมาวิเคราะห์เป็น crude amylase ซึ่งใน crude enzyme น่าจะมีอะไมเลสมากกว่า 2 ชนิด โดยที่ pH 8 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 80 ขณะที่ pH 10 มีกิจกรรมอะไมเลสสูงสุดคิดเป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ pH 11 และ 12 ยังคงมีกิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 84 crude amylase มีเสถียรภาพสูงสุดที่ pH 9 ขณะที่ pH 11 ถึง 12 เสถียรภาพของอะไมเลสลดลงมาก สาเหตุที่ pH 11-12 กิจกรรมและเสถียรภาพของอะไมเลสต่างกันมาก อาจมีสาเหตุจากในการศึกษาเสถียรภาพอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีเพียงเอนไซม์อยู่ร่วมกับบัฟเฟอร์ ทำให้ active site ของอะไมเลสถูกทำลายได้ง่าย ขณะที่ในการตรวจสอบกิจกรรมของอะไมเลส เอนไซม์จับกับสับสเตรทเกิดเป็น enzyme-substrate complex ขึ้น ซึ่งสับสเตรทน่าจะมีผลในการปกป้อง active site ของเอนไซม์ในสภาวะที่มี pH สูงได้ ทำให้มีความคงทนดีขึ้น [13, 14] นอกจากนี้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ใช้เวลาเพียง 10 นาที ขณะที่การตรวจสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ใช้เวลา 60 นาที อะไมเลสจาก *Bacillus* sp. SS-8 มีกิจกรรมและเสถียรภาพสูงในช่วง pH กว้าง (7-10) จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมสารซักล้าง และการผลิตน้ำตาลจากแป้ง เป็นต้น

3.7.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของอะไมเลส

ในเวลา 1 ชั่วโมง crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8 ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 ˚ซ. และมีเสถียรภาพสูงที่อุณหภูมิ 30-50 ˚ซ. ที่อุณหภูมิ 70 ˚ซ. ทั้งกิจกรรมและเสถียรภาพของอะไมเลสลดลงมากเหลือกิจกรรมสัมพัทธ์เพียงร้อยละ 20 และร้อยละ 3 ตามลำดับ (รูปที่ 7 (ข))

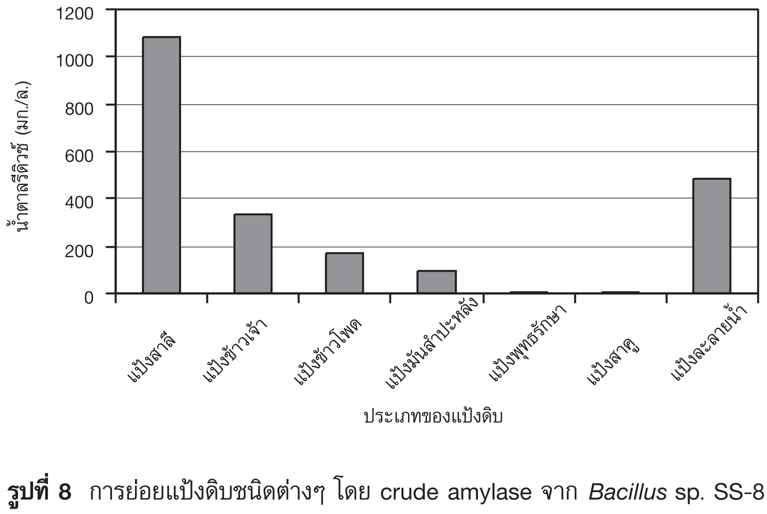


(ก) (ข)

รูปที่ 7 ผลของ pH (ก) และอุณหภูมิ (ข) ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของ crude amylase ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. SS-8

3.8 การย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ

เมื่อนำ crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อปริมาตรทั้งหมด มาย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งข้าวโพด (ตราคนอร์ ไมซิน่า บริษัทซีพีซี/อายิ ประเทศไทย จำกัด) แป้งสาลี (ตรานิวเกรด บริษัท Thai Wah Food Products Public จำกัด) แป้งข้าวเจ้า (บริษัท ไทยเบตเตอร์ฟู้ด จำกัด) แป้งมันสำปะหลัง (ตราปลามังกร ของห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลตงจั่น) และแป้งสาคูและแป้งพุทธรักษาพันธุ์ไทยเขียว (เตรียมโดยห้องปฏิบัติการคาร์โบไฮเดรต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี) ที่ความเข้มข้น 2 กรัม/100 มิลลิลิตร ใน carbonate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 10.0 อุณหภูมิ 50°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการย่อยแป้งละลายน้ำ พบว่า crude amylase ย่อยแป้งดิบได้ โดยเฉพาะแป้งสาลีถูกย่อยได้ดีกว่าแป้งละลายน้ำ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 การย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ โดย crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8

จากรูปที่ 8 พบว่า crude amylase ย่อยแป้งสาลีได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง แต่ย่อยแป้งพุทธรักษาและแป้งสาคูได้น้อยมาก สำหรับสาเหตุที่ crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8 ย่อยแป้งดิบได้นั้น อาจมีสาเหตุจากใน crude enzyme มี starch-binding amylase ปนอยู่ จึงทำให้สามารถย่อยแป้งดิบได้ [15] และการที่อะไมเลสจาก *Bacillus* sp. SS-8 ย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ ได้ดีไม่เท่ากัน อาจเนื่องจากสมบัติของแป้งชนิดต่างๆ ไม่เหมือนกันทั้งทางด้านกายภาพและเคมี เช่น ขนาดของเม็ดแป้ง การพองตัวของแป้ง โครงสร้างการจัดเรียงตัวของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้ง ความยาวของสายอะไมโลส และจำนวนโมเลกุลกิ่งของสายอะไมโลเพคติน ตลอดจนความจำเพาะในการยึดเกาะระหว่าง starch-binding region ของอะไมเลสกับแป้งดิบต่างๆ ต่างกัน [16] และจากผลการทดลองที่ได้ พบว่า crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8 มีแนวโน้มย่อยแป้งจากธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวเจ้า และข้าวโพด ได้ดีกว่าแป้งจากรากและลำต้นของพืช เช่น มันสำปะหลัง พุทธรักษา และสาคู

4. สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือก alkaliphilic *Bacillus* 27 สายพันธุ์จาก stock culture ของห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี พบว่า alkaliphilic *Bacillus* sp. SS-8 ที่แยกได้จากน้ำเสียของโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษสยาม จำกัด จังหวัดราชบุรี สามารถผลิตอะไมเลสย่อยแป้งดิบได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น และมีความคงทนต่อสารซักล้างหลายชนิด สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์อะไมเลสของ *Bacillus* sp. SS-8 คือที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 11 อุณหภูมิ 37 ํซ. ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบ 1.5 กรัม/100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. SS-8 ในอาหารเหลวที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เป็นการประหยัดพลังงานและเวลาในการเตรียมอาหาร ซึ่งเวลาที่เหมาะสมในการผลิตอะไมเลสของ *Bacillus* sp. SS-8 อยู่ในช่วง stationary phase ที่เวลาประมาณ 42-60 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ การผลิตอะไมเลส และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นแปรผันตามกัน ดังนั้นการผลิตอะไมเลสน่าจะเป็นแบบ growth-associated enzyme crude enzyme ทำงานได้ดีใน pH ช่วงกว้างระหว่าง 7-12 และมี pH ที่เหมาะสม 2 ช่วง (pH 8 และ 10) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากใน crude enzyme มีอะไมเลสมากกว่า 1 ชนิด และ crude amylase มีเสถียรภาพสูงต่อ pH ในช่วง 6-10 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่เวลา 60 นาทีเท่ากับ 50 ํซ. และมีเสถียรภาพดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-50 ํซ. crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8 สามารถย่อยแป้งดิบ โดยย่อยแป้งสาลีได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง แต่ย่อยแป้งพุทธรักษาและแป้งสาคูได้น้อยมาก จากสมบัติต่างๆ ของอัลคาไลน์อะไมเลสจาก *Bacillus* sp. SS-8 มีแนวโน้มที่จะนำ crude amylase จาก *Bacillus* sp. SS-8 ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมสารซักล้างและการผลิตน้ำตาลจากแป้งได้

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน หมวดเงินอุดหนุนการวิจัย ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ประจำปีงบประมาณ 2546

6. เอกสารอ้างอิง

1. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., and Mohan R., 2000, "Advances in Microbial Amylases," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 31, pp. 135-152.

2. Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., and Mikami, B., 2000, "Comparison of Degradation Abilities of α- and β-Amylases on Raw Starch Granules," *Process Biochemistry*, Vol. 35, pp. 711-715.

3. Thai Customs Department, Import and Export Statistics (Online), Available: http://www.customs.go.th/statistic/statistic index.jsp (HS-code: 3507900009) [2003, June 17].

4. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., and Tanticharoen, M., 1999, "Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp. 690-697.

5. Berg, B., Hofstan, B. V., and Petterson, B., 1972, "Growth and Cellulose Formation by *Celluvibrio folvus*," *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 35, pp. 201-214.

6. Somogyi, M., 1952, "Notes in Sugar Determination," *Journal of Biology and Chemistry*, Vol. 195, pp. 265-275.

7. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 93, pp. 265-275.

8. Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Kitayama, K., Ozaki, K., Kawai, S., and Ito, S., 2001, "Novel α-Amylase That is Highly Resistant to Chelating Reagents and Chemical Oxidants from the Alkaliphilic *Bacillus* Isolated KSM-K38," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, pp. 1744-1750.

9. Anstrup, K. and Andersen, D., 1974, *Enzyme Products*, U.S. Patent 3, pp. 827-933.

10. Milner, J. A., Martin, D. J., and Smith, A., 1997, "Two Stage Inocula for the Production of Alpha-Amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 21, pp. 382-386.

11. Lin, L., Chyau, C., and Hsu, W. H., 1998, "Production and Properties of a Raw Starch-Degrading Amylase from the Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 28, pp. 61-68.

12. Hayashida, S., Teramoto, Y., and Inoue, T., 1988, "Production and Characteristics of Raw Potato-Starch-Digesting-Amylase from *Bacillus subtilis* 65," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54, pp. 1516-1522.

13. Ali, M. B., Mezghani, M., and Bejar, S. A., 1999, "Thermostable Alpha Amylase Producing Maltohexose from a Newly Isolated *Bacillus* sp. US100: Study of Activity and Molecular Cloning of the Corresponding Gene," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 24, pp. 584-589.

14. Lo, H. F., Lin, L. L., Chen, H. L., Hsu, W. H., and Chang, C. T., 2001, "Enzyme Properties of a SDS-Resistant *Bacillus* sp. TS-23 α–Amylase Produced by Recombinant *Escherichia coli*," *Process Biochemistry*, Vol. 36, pp. 743-750.

15. Goto, M., Semimaru, T., Furukawa, K., and Hayashida, S., 1994, "Analysis of the Raw Starch-Binding Domain by Mutation of a Glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, pp. 3926-3930.

16. Gunaratne, A. and Hoover, R., 2002, "Effect of Heat-Moisture Treatment on the Structure and Physicochemical Properties of Tuber and Root Starchs," *Carbohydrate Polymers*, Vol. 49, pp. 425-437.