การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจากน้ำทิ้ง

โดย

ผ่องผกา เธียรมนตรี
วิวิทย์ ศมศานติ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะ ประจำปี 2539

สมอ
เลขหมู่ QP609.P78 W52 2540?
Bib Key 212513
6 ส.ค. 2544

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจากน้ำทิ้ง

ผ่องผกา เธียรมนตรี[1] และวิวิทย์ ศมศานติ์[2]

Abstract

Thianmontri, P. and Samasanti, W

Screening of Protease and Amylase Producing Bacteria from Drainage water

Thirty water samples were collected from household water and waste water in Songkhla province. *Bacillus* W2 and S3 were found to produce proteolytic enzyme and amylolytic enzyme, respectively. When *Bacillus* W2 was cultured in media with different nitrogen sources, it was found that the culture in nutrient broth with skim milk 0.8% w/v at 37°C, pH 8 for 42 hours with shaking had high proteolytic activity of 285 unit/ml. And when *Bacillus* S3 was cultured in media with different carbon sources, it was found that the culture in media C composed of polypeptone 4 g, K_2HPO_4 0.3 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g and soluble starch 3% w/v performed at 37°C pH 7 for 42 hours with shaking had high amylolytic activity of 0.36 unit/ml.

Optimal conditions for proteolytic activity and amylolytic activity were pH 7.5, at 37°C and pH 7, at 37°C, respectively.

Key words : protease, neutral protease, amylase, *Bacillus*

[1,2] Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

[1] วท.ม.(จุลชีววิทยา), ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[2] วท.ม.(จุลชีววิทยา), พ.บ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

บทคัดย่อ

ผ่องผกา เธียรมนตรี[1] และวิวิทย์ ศมศานติ์[2]

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจากน้ำทิ้ง

จากตัวอย่างน้ำทิ้งจำนวน 30 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำทิ้งของชุมชนในบริเวณเขตเทศบาลเมืองหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ย่อยแป้ง คือ *Bacillus* W2 และ *Bacillus* S3 เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* W2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 3 สูตร พบว่าอาหารสูตร nutrient broth ที่มี skim milk ความเข้มข้น ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 37°C พีเอช 8 มีการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 42 ชั่วโมง จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 285 unit/ml. และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* S3 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 สูตร พบว่าอาหารสูตร C ที่ประกอบด้วย polypeptone 4 g, K_2HPO_4 0.3 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g ที่มีปริมาณแป้งความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 37°C พีเอช 7 มีการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 42 ชั่วโมง จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุดเท่ากับ 0.36 unit/ml.

สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ย่อยแป้ง คือ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37°C และพีเอช 7 อุณหภูมิ 37°C ตามลำดับ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญรูป	ข
บทคัดย่อ	1
บทนำ	3
บทตรวจเอกสาร	4
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	31
ผลการทดลอง	37
วิจารณ์การทดลอง	57
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก ก	64
ภาคผนวก ข	65
ภาคผนวก ค	66

หอสมุด ดุสหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ได้รับจาก
คณะวิทยาศาสตร์ มช.
วันที่ 6 ส.ค. 2541

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติการทนความร้อนและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมของเอนไซม์ α-amylase จากเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ	17
2	แหล่งของเอนไซม์และชนิดของเอนไซม์ย่อยแป้ง	19
3	ลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของน้ำทิ้ง	38

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการเจริญของ *Bacillus* W2, W5, W15	40
2	เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2, W5, W15	41
3	ผลของปริมาณ skim milk ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร skim milk broth ที่อุณหภูมิ 37°C pH 7 ระยะเวลา 42 ชั่วโมง	42
4	ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร skim milk broth ที่มีความเข้มข้นของ skim milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 42 ชั่วโมง	43
5	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร skim milk broth ที่มีความเข้มข้นของ skim milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 42 ชั่วโมง	44
6	เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการเจริญของ *Bacillus* S1, S2, S3	46
7	เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S1, S2, S3	47
8	ผลของความเข้มข้นของแป้งต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร C ที่อุณหภูมิ 37 °C pH 7 ระยะเวลา 42 ชั่วโมง	48
9	ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร C ที่มีปริมาณแป้ง 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 42 ชั่วโมง	49
10	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร C ที่มีปริมาณแป้ง 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร pH 7 ระยะเวลา 42 ชั่วโมง	50
11	ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2	52
12	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2	53
13	ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3	55
14	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3	56

บทนำ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมเป็นปัญหาสำคัญยิ่งของมนุษยชาติ ปัญหานี้จะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้นในชุมชนเขตเมืองหรือเขตที่มีการอุตสาหกรรม ปัญหาเหล่านี้ได้มีการรายงานในเอกสารขององค์การอนามัยโลก (WHO 1992) ปัญหาเรื่องน้ำทิ้งจากชุมชนในเขตเมือง หรือเขตอุตสาหกรรม นับว่าเป็นส่วนหนึ่งของสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ความพยายามที่จะแก้ปัญหานี้ ได้มีการดำเนินการอยู่หลายวิธีรวมทั้งการประยุกต์วิธีการทางจุลชีววิทยา มีรายงานมากมายเกี่ยวกับความพยายามคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อประโยชน์ทางอุตสาหกรรม (Grueninger *et al.*, 1984, Hayashi *et al.*, 1988, Ikuru and Horikoshi, 1987, Steele and Stower, 1991) แต่ยังไม่มีรายงานที่ระบุชัดเจนว่าจุลินทรีย์ที่อยู่ตามธรรมชาติในน้ำทิ้งจะมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ที่จะช่วยรักษาหรือฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมโดยตรง แม้ว่าจะมีรายงานการทดลองใช้ *Pseudomonas* sp. B13 รวมทั้งสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรมในระบบบำบัดเพื่อลดภาวะมลพิษในน้ำ (Krumme *et al*, 1994) แต่จะมีเพียงส่วนน้อยและสายพันธุ์ที่สามารถอยู่ทนในสภาวะแวดล้อมเท่านั้น จึงจะนำมาใช้ประโยชน์ได้ตามวัตถุประสงค์ (Davis, 1987) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเสนอโครงการวิจัยนี้เพื่อทำการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของจุลินทรีย์ในน้ำทิ้ง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาหรือฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมต่อไป

บทตรวจเอกสาร

เอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์โปรตีเอส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน มีการซื้อขายกันมากที่สุดถึง 60% ของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม สามารถผลิต ได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความซับซ้อนและหลากหลายมาก ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น กลไกการทำงาน บริเวณเร่ง pH อุณหภูมิและความทนทาน มีทั้งแบบอยู่ภายในเซลล์ และอยู่ภายนอกเซลล์ มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก (detergent) นม (diary) ขนมอบ (baking) และอุตสาหกรรมหนังสัตว์ (leather) เป็นต้น

แหล่งของเอนไซม์โปรตีเอส

1. เอนไซม์โปรตีเอสจากพืช

เอนไซม์โปรตีเอสจากพืชที่สำคัญทางการค้ามีสามชนิด คือ papain, ficin และ bromelain เอนไซม์ papain สามารถสกัดได้จากมะละกอเป็น endopeptidase ทำงานในช่วง pH 7-8 ได้ดี เอนไซม์ bromelain สามารถสกัดจากด้านในของสับปะรด มีความเสถียรที่ pH 4.5-6.5 ส่วนเอนไซม์ ficin สกัดได้จากพืช *Ficus carica* (Chistopher และ Robert, 1981)

Feveriro (1986) พบว่าพืชใน Fimily Compositae คือ *Cynara cardunculus* และ *Silybum marianum* สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้นมเกิดการจับตัวกันเป็นก้อน (coagulating)

2. เอนไซม์โปรตีเอสจากสัตว์

ชนิดของเอนไซม์มักขึ้นอยู่กับชนิดของอวัยวะและชนิดของสัตว์นั้น ๆ ด้วย เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ rennet ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมทำเนย นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ pancretin, pepsin, chymotrypsin, trypsin

rennet สกัดได้จากกระเพาะส่วนที่ 4 ของลูกวัว (Loffler, 1986) มีความสำคัญในการทำเนย ส่วน pepsin สกัดได้จากกระเพาะของ ลูกวัว และ หมู มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ rennin ใช้ในการทำให้นมจับตัวกันเป็นก้อน และเอนไซม์ chymotrypsin และ trypsin ได้มาจากของเหลือในการผลิต insulin จากตับอ่อน

2. เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์ ได้มาจากทั้งแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ ส่วนมากจะเป็นแบบ extracellular enzyme และมักตรงกันข้ามกับเอนไซม์จากพืชและสัตว์ที่เป็นแบบ intracellular enzyme

Klapper (1973) สกัดเอนไซม์ serine protease และทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ NRRL 2160 โดยการเพาะเลี้ยงแบบ submerged culture

Aunstrup (1980) พบว่า *Aspergillus oryzae* สามารถผลิต acid, neutral และ alkaline protease ได้ ซึ่ง pH ที่เหมาะสมสำหรับ acid protease อยู่ระหว่าง 2.5-6.0 ส่วน neutral และ alkaline protease มี pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 8.0-10.0

Rollan (1995) พบว่าแบคทีเรีย *Leuconostoc oenos* สี่สายพันธุ์คือ X_2L, L_2, M และ ST ซึ่งแยกมาได้จาก *Argentinnian wines* สามารถผลิต extracellular protease ได้ 2 ชนิด ชนิดหนึ่งพบในช่วงแรก ๆ ของการเจริญ และอีกชนิดหนึ่งพบในช่วงท้ายของการเจริญ เอนไซม์ทั้งสองชนิดมี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกัน

Drapeau, Boily และ Houmard (1972) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* พบว่ามีเอนไซม์โปรตีเอสที่แตกต่างกันแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ protease I เป็น endopeptidase มีมวลโมเลกุล 12,000 ถูกยับยั้งได้โดย diisopropyl fluorophosphate (DFP) แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย EDTA protease II (thiol protease) มีมวลโมเลกุล 12,500 มี specificity กว้างมากและ protease III (metalloprotease) มีมวลโมเลกุล 28,000 ถูกยับยั้งได้โดย EDTA และ insensitive ต่อ sulfhydryl reagents และ DEP มี Ca^{2+} จำเป็นต่อความคงทนของเอนไซม์

Anunstrap (1972) กล่าวว่า เอนไซม์โปรตีเอสจาก thermophilic bacteria มีความสำคัญในทางการค้าโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก เนื่องจากสามารถทำงานได้ที่ pH และอุณหภูมิสูง ๆ มีการผลิต thermophilic protease จาก Bacillus สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น thermolysin จาก *Bacillus thermoprotolyticus* (Endo, 1962) alkaline protease จาก *B. alcalophilus* , thermostable neutral protease จาก *B. stearothermophilus* (Takii 1987)

Dhandapani และ Vijayaragavan (1994) สามารถสกัดเอนไซม์โปรตีเอสที่ทนอุณหภูมิได้สูงจาก *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ AP-4 ซึ่งแยกได้มาจากซากใบไม้ที่ทับถมกัน พบว่าเป็นชนิด alkaline serine protease มี pH ที่เหมาะสม 9.0 และอุณหภูมิ 55°C เอนไซม์ถูกยับยั้งโดย PMSF EDTA และ β-mercaptoethanol

Woods และ Kinesella (1980) พบว่ายีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส และโปรตีเอส โดย *Saccharomyces carlsbergensis* ผลิตเอนไซม์ neutral serine protease ได้

นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญอีกมากมาย เช่น *Mucor pusillus*, *Penicillium*, *Rhizopus spp.*, *Vibrio parahemolyticus* เป็นต้น

ประเภทของเอนไซม์โปรตีเอส

ความจำเพาะของเอนไซม์ในการเริ่งปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับหมู่ข้างเคียงของกรดอะมิโน (amino acid side-chain) และหมู่ที่อยู่ใกล้เคียงของจุดนั้น ๆ เอนไซม์โปรตีเอสสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามการย่อยสลายของพันธะ คือ ตัดพันธะจากภายนอก (exopeptidase) และตัดพันธะภายใน (endopeptidase) ของสายเปปไทด์ โดยชนิดของหมู่ข้างเคียงของกรดอะมิโนที่มีหรือไม่มีประจุ จะเป็นตัวกำหนดชนิดของเอนไซม์ที่มาตัดพันธะเปปไทด์เอนไซม์โปรตีเอสมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น peptidase, proteinase, proteolytic เอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็น endopeptidase มากกว่า exopeptidase ได้มีการจัดแบ่งชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสโดยเฉพาะ endopeptidase ซึ่งยกเว้นเอนไซม์จากมนุษย์ เลือด พิษงู พืช และสัตว์บางชนิดตามการตกลงของ The

Nomenclature of The International Union of Biochemistry ซึ่งสามารถแบ่งเอนไซม์เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1. Serine Proteinase
2. Thiol Proteinase (Sulfhydryl Proteinase)
3. Acid Proteinase (Aspatic Proteinase)
4. Metallo-Proteinase

1. Serine Proteinase

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมี active site ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน serine และ histidine ตัวอย่างของเอนไซม์ได้แก่ chymotrypsin, trypsin, elastase, subtilisine ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย คือ

1.1 Trypsin-like proteinase

มีส่วนของ trypsin และ chymotrypsin ร่วมกันได้มาจากเชื้อยีสต์ เช่น *Streptomyces griseus*, *S. fradiae* และ *S. erythreus* สามารถตัด insulin B ได้ที่พันธะเปปไทด์ระหว่าง Ary-Gly และ Lys-Ala มีค่า pH ที่เหมาะสมที่ 8.0 ถูกยับยั้งด้วย DFP, soybean trypsin inhibitor และ tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) การเรียงลำดับของกรดอะมิโนมีลักษณะคล้ายกับ bovine trypsin และแสดงปฏิกิริยาของ esterase ได้ trypsin ที่ได้มาจากตับอ่อนของลูกวัว สามารถทน pH ได้ช่วง 4-11 และอุณหภูมิสูงถึง 50°C

1.2 Alkaline Proteinase

Serine alkaline proteinase ได้มาจากแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ เช่น *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Aspergilus spp.*, *Pseudomonas aruginosa*, *Malbranchea pulchella*, *Tritichium album* และ *Candida lipolytica* เป็นต้น หรือแม้แต่เนื้อเยื่อของสัตว์ เอนไซม์ที่สำคัญที่สุดและใช้กันมากในอุตสาหกรรม คือ subtilisin นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถมีกิจกรรมอยู่ในช่วง pH 5-12 ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 50°C สามารถถูกยับยั้งด้วย DFP และ PMSF ส่วน TLCK และ tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TFCK) ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ subtilisin ผลิตได้จาก *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B.*

amyloliquefaciens มีชื่อเรียกทางการค้าแตกต่างกันไปตามผู้ผลิต เช่น subtilissin Novo (BPN), subtilisin carlsberg

2. Thiol Proteinase

เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโน cystine ที่ active site ทำให้สามารถกระตุ้นการทำงานด้วยสาร reducing compounds เช่น cystine และ hydrogen cyanide และถูกยับยั้งได้ด้วย oxidizing agents นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งด้วย sulfhydryl reagents เช่น pCMB ค่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์มักเป็นกลาง เอนไซม์ที่สำคัญกลุ่มนี้มักได้มาจากพืช ได้แก่ papain ได้จากยางมะละกอประกอบไปด้วย chymopapain และ lysozyme สามารถทนความร้อนได้ดี เอนไซม์ bromelain เป็น glycoprotien ได้จากสับปะรด เอนไซม์ ficin ได้จากยางของพืช Ficus หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ ที่ได้มาจากจุลินทรีย์ เช่น clostripain ได้จาก *Clostridium histolyticum* proteinase B จากยีสต์และ protienase จาก *Streptococcus* และ *Staphylococcus* ด้วย

3. Acid Proteinase

อาจเรียกว่า Carboxyl proteinase หรือ Aspartic protienase เอนไซม์มีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 3-4 สารยับยั้งหลายชนิดไม่สามารถยับยั้งได้ เช่น DFP, pCMB และ EDTA เอนไซม์ที่ได้มาจาก gastric juice เช่น pepsin, chymosin นอกจากนี้ ยังได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Aspergillus oryzae*, *A. saitoi*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus chinensis*, *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Saccharomyces varioti*, *Rhodotorula glutinis*, *Physarum polycephalum*, *Tetrahymena pyriformis* และ *Plasmodium berghei* เป็นต้น เอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมมี 2 ชนิด คือ rennet และ pepsin

3.1 Rennet และ rennet-proteinase

เอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะมากกับ k-casein ในนม นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเนยแข็ง เอนไซม์จะตัดตรงตำแหน่ง Phe-Met ของพันธะเปปไทด์ใน k-casein ซึ่งองค์ประกอบในนมจะมี α, β, γ และ k-casein ทำให้เกิดการตกตะกอนขนาดเล็กๆ (micell) ที่เสถียร

เอนไซม์ rennet จะย่อย casein ของตะกอนเล็ก ๆ ให้เป็นสายเปปไทด์ที่ละลายน้ำได้กับ para α-casein ที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ตะกอนเล็ก ๆ เหล่านี้ไม่เสถียรเกิดการแข็งตัว (clot) และเอนไซม์ไม่สามารถย่อย casein ชนิดอื่นได้

rennet ส่วนใหญ่ได้มาจากกระเพาะของลูกวัวระยะไม่หย่านม (suckling calf) ซึ่งเป็น chymosin 88-94% และมี pepsin ปนมาด้วย 6-12% นอกจากนั้นเอนไซม์ rennet จากเชื้อรา *Mucor miehei* และ *M. pusillis* และยีสต์ *Endothai parasitica* มีกิจกรรมคล้ายกับ chymosin จากกระเพาะลูกวัว

4. Metallo-Proteinase

เป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือร่วมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย ถูกยับยั้งได้โดย EDTA สามารถทนต่อ sulfhydryl agents เช่น pCMP และ DFP ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เอนไซม์กลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 ชนิดที่สำคัญ

4.1 Neutral proteinase

เอนไซม์ต้องมีอะตอมของโลหะหนัก เช่น สังกะสี (Zn) ร่วมในการทำงานมีค่า pH ค่อนข้างเป็นกลาง สามารถถูกกระตุ้นการทำงานได้ดีด้วย Furylacrolylglycylluecinamide (FAGLA) แต่เอนไซม์ serine proteiase ไม่สามารถทนทานได้ เอนไซม์กลุ่มนี้ส่วนมากได้มาจากเชื้อ Bacillus spp., และ Aspergillus spp., เช่น *B. stearothermophilus* ให้เอนไซม์ thermolysin มีน้ำหนักโมเลกุล 34,000 thermolysin จาก *B. thermoproteolyticus*, มี Ca^{2+} รวมอยู่ใน active site และจับกับกรดอะมิโน histidine และ glutamic acid Teufel และ Gotz (1993) พบว่า *Staphylococcus epidermis* มีการผลิต metallo proteinase ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 5-7 กิจกรรมถูกยับยั้งได้โดย Zinc, EDTA และ 1,10-phenanthroline

4.2 Alkaline metallo-proteinase

มีค่า pH ที่เหมาะสมในช่วง 7-9 สามารถทนต่อ EDTA ได้ดีกว่า neutral proteinase เล็กน้อย พบได้ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp.*, และ *Bacillus subtilis* โดยเฉพาะเอนไซม์จาก *B. subtilis* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงที่ 60°C pH 9.0 นาน 1 ชั่วโมง ทนทานต่อ EDTA และฟอสเฟต จึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

1. อาหาร

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ได้มาจากพวกคาร์โบไฮเดรต อาหารที่มีส่วนประกอบหลายอย่าง เช่น หัวบีทและน้ำตาลโมลาส ข้าวโพด แป้งมัน สำปะหลังและธัญพืช ซึ่งเป็นแหล่งของน้ำตาลกลูโคส wheat เป็นแหล่งของน้ำตาลแลกโตส จะทำให้พวกจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็ว และผลิตเอนไซม์ได้สูง

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเช่นกัน มักได้มาจากสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม เกลือไนเตรต นอกจากนี้ยังได้จากสารผสมเชิงซ้อน เช่น yeast extract peptone ส่วนฟอสฟอรัสและอิออนที่จำเป็นอื่น ๆ มักได้จาก เกลืออนินทรีย์

จุลินทรีย์บางชนิดจะเกิดขบวนการ catabolite repression ในการสร้าง catabolic ของเอนไซม์บางชนิด ในสภาวะที่มีกลูโคสมากเกินไป การป้องกันการยับยั้งการสร้างเอนไซม์สามารถทำได้โดย เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสต่ำ ๆ กว่าแป้งและแลกโตส หรือ ลดปริมาณกลูโคสที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ ให้อยู่ในระดับต่ำจนไม่สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้ (Demain, 1983)

Tomonaga (1966) พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อ Aspergillus niger ถูกยับยั้งโดยซัลเฟต ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยการหมักในสภาวะที่มีซัลเฟตในปริมาณจำกัด

2. สารเหนี่ยวนำ

การผลิตเอนไซม์บางชนิดจะต้องมีสารเหนี่ยวนำ ให้เกิดการผลิต ในบางกรณีสารเหนี่ยวนำอาจมีอยู่ตามธรรมชาติ สารประกอบบางชนิดมีลักษณะคล้ายสารเหนี่ยนนำธรรมชาติสามารถให้เร่งการผลิตเอนไซม์ได้เช่นกัน

3. อุณหภูมิ

การผลิตเอนไซม์ให้ปริมาณมาก และมีกิจกรรมดี ต้องเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งอุณหภูมิอาจจะแตกต่างกันไป ตามชนิดของจุลินทรีย์ และอาจต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ด้วย

4. pH

pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ตลอดจนหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ และการเจริญ อาจแตกต่างกันได้เช่นเดียวกับอุณหภูมิ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และจุลินทรีย์

5. การให้อากาศ

จุลินทรีย์มีความต้องการอากาศในการเจริญแตกต่างกัน โดยที่ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ เช่น proteolytic enzyme ที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* ซึ่งการผลิตให้ได้สูงสุดนั้นจะขึ้นอยู่กับอัตราการถ่ายเทออกซิเจน Diers (1976) พบว่า สภาวะที่ก๊าซออกซิเจนอยู่อย่างจำกัด เชื้อที่ใช้กลูโคสอย่างจำกัด จะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้น้อยลง

ชนิดและลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ประเภท extracellular ซึ่งสามารถย่อยแป้งได้พบในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด สามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์อะไมเลสตามตำแหน่งของการย่อยแป้งออกเป็น 2 ประเภท (ดวงพร, 2530) คือ

1. endoamylase

ย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-1,4-glycosidic linkage ถ้าย่อยไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโตส และเด็กตริน ถ้าการย่อยสมบูรณ์จะได้มอลโตส และกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ α-amylase (หรือ amylo (1-4) dextrinase, 1,4-α-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1)

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้เช่น *Bacillus subtilis* (Winkelmann, 1992), *Aspergillus oryzae* (Okazaki et al., 1980)

2. exoamylase

ย่อยแป้งจาก non-reducing and เข้าไปเอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ β-amylase, glucoamylase และ pullulanase

สำหรับ β-amylase (หรือ amylo (1-4) maltosidase, 1,4-α-D-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2) จะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α-1,4-glycosidic linkage เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะที่ต่อกันแบบ α-1,6-glucosidic linkage ได้ ผลที่ได้จากการย่อยจึงเป็นน้ำตาลมอลโตส และ limited dextrin ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย

ผลการย่อย จะได้น้ำตาลมอลโตสประมาณ 60% และ limited dextrin ประมาณ 40% (Cokowick and Kaplan, 1995)

เอนไซม์นี้พบมากในพืช และธัญพืช สำหรับจุลินทรีย์ที่สร้างส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย เช่น *B. cereus* (Shinke et al., 1979)

ส่วน glucoamylase (หรือ γ-amylase, amylo (1-4,1-6) glucosidase, 1,4-α-Dglucan glycohydrolase, EC 3.2.1.3) สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์มาก non-reducing end ที่ตำแหน่งต่าง ๆ คือ α-1,4 และα-1,6-glucosidic linkage เข้าไปทีละ 1 หน่วย จึงได้กลูโคสเพียงอย่างเดียวในการย่อย

เอนไซม์นี้พบครั้งแรกในจุลินทรีย์ ต่อมาพบในเนื้อเยื่อ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้มีทั้งยีสต์และรา เช่น *Endomycopsis fibuligera*, *Aspergillus oryzae*, และ *A. niger* เป็นต้น

pullulanase (หรือ α-dextrin 6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.41) ใช้ย่อยพันธะของ amylopectin มี 2 ชนิด Type 1 คือ สามารถย่อยพันธะ α-1,6 แต่ไม่ย่อย จึงไม่สาย oligomer ชนิดสายเดี่ยว ๆ ของแป้ง สำหรับ Type 2 จะย่อยพันธะα-1,6 และα-1,4 ได้จึงได้น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และ maltotriose

จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ pullulanase ได้เช่น *Thermoanaerobium brockii*, *B. subtillis*, *B. circulans* (Lin et al., 1994)

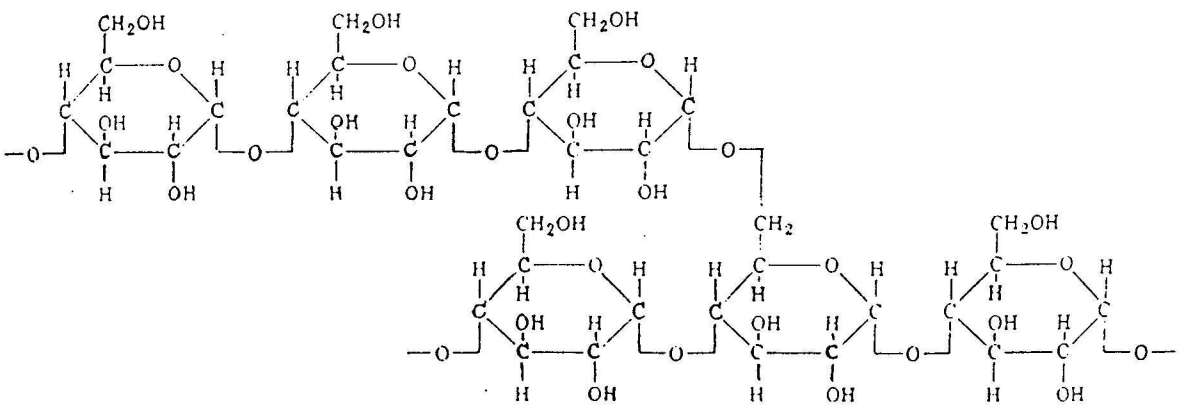
ผลที่เกิดจากการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลส

แป้งเป็นโพลิแซคคาไรด์ซึ่งถูกเก็บสะสมไว้ในพืช แป้งประกอบด้วยโพลิเมอร์ 2 ชนิด คือ อะไรโลส (amylose) และอะไมโลแพคติน (amylopectin)

อะไมโลสมีโครงสร้างเป็นสายเดี่ยว ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นจำนวนมากด้วยพันธะ α-1,4-glucosidic linkage (Jones, 1981) (แสดงดังภาพไม่มีการแตกแขนง ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 1,100-4,400 โมเลกุล (สัตถาพร, 2524) และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 ถึง 100,000 (Jones, 1981) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่กระจายอยู่ในน้ำในลักษณะ micelle ให้สีน้ำเงินกับสารละลายไอโอดีน (สัตถาพร, 2524)

อะไมโลแพคตินมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วย α-1,4-glucosidic linkage และมีโครงสร้างแตกแขนงทุก ๆ 25 หน่วยของกลูโคสตรงตำแหน่งที่แตกแขนงต่อกันด้วย β-1,4-glucosidic linkage (แสดงดังภาพ) และยังสามารถพบพันธะ α-1,3 ได้เช่นเดียวกันด้วย อะไมโลแพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000,000 หรืออาจมากกว่านี้ ละลายอยู่ในรูปของสารละลายคอลลอยด์ให้สีน้ำตาลกับสารละลายไอโอดีน และพบว่าอะไมโลแพคตินละลายน้ำได้ดีกว่าอะไมโลส (สัตถาพร, 2524)

โดยปกติแล้วแป้งจะมีอะไมโลสประมาณ 10-30% และมีอะไมโลเพคตินประมาณ 70-90% (Martin, 1977) แป้งแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะตัวแตกต่างกัน เช่น ขนาดของเม็ดแป้ง ปริมาณของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน อุณหภูมิที่จะทำให้เกิดเป็นเจล (ดวงพร, 2534)



Bernfled (1955) เมื่อแป้งถูกย่อยด้วยอะไมเลส จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังนี้

1. มีความเป็นรีดิวซ์สูงขึ้น
2. การให้สีกับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป
3. ความหนืดลดลง
4. ความสามารถในการเบี่ยงเบนแสงลดลง

จากที่กล่าวแล้วว่าแป้งประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันแบบ α,1-4 และ α,1-6 glucosidic linkage โดยอะตอมของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 จะต่อกับกลูโคสโมเลกุลอื่นทำให้สูญเสียความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) หรือเรียกว่า ปลายด้าน (reducing end) หายไป เมื่อนำแป้งมาย่อยด้วยเอนไซม์ แป้งจะถูกย่อยตรง glucosidic linkage ทำให้มี reducing power เพิ่มขึ้น ถ้าโมเลกุลของแป้งที่ถูกย่อยแล้วยังมีโมเลกุลขนาดใหญ่ปน เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนจะให้สีเข้ม และถ้าแป้งถูกย่อยได้มากความหนืดจะลดลงด้วยเช่นกัน

การวิเคราะห์ปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์อะไมเลส

จากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่ออะไมเลสย่อยแป้งถูกนำมาตรวจหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสโดยอาศัยคุณสมบัติต่าง ๆ ของแป้ง เช่น ตรวจหาความหนืดที่ลดลง ดูการเปลี่ยนจากโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็ก โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลายไอโอดีน และตรวจหากลูโคสจากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เราสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้หลายวิธี เช่น วิธีของ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944) เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ α- amylase

1. แคลเซียม

แคลเซียมจะจับอยู่ที่ active site ของโมเลกุลของเอนไซม์อย่างหนาแน่นแคลเซียมไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการจับของ Enzyme-Substrate เป็น enzyme-substrate-complex แต่ทำ

ให้โมเลกุลของเอนไซม์ยังคงรักษาระดับความคงตัวและระดับความว่องไวสูงไว้ได้ เนื่องจากแคลเซียมทำหน้าที่เป็น co-factor ที่จำเป็นต่อ amylolytic activity และทำให้โมเลกุลของเอนไซม์อะไมเลสมีความคงตัวรวมทั้งยังทำให้โปรตีนมีรูปร่างเหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี (สัตถาพร, 2524)

แคลเซียมถูกกำจัดออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ได้ในช่วง pH ต่าง ๆ โดย chelating agent เช่น EDTA การกำจัดออกไปทำให้เอนไซม์เกิดการ Inactive และ Denature โดยความร้อน กรด และยูเรียได้ง่าย โดยปกติแล้วปริมาณแคลเซียมในเอนไซม์จะมีมากพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ ในกรณีที่เอนไซม์มีแคลเซียมไม่เพียงพอ การเติมแคลเซียมปริมาณเล็กน้อยลงในแป้งก็จะช่วยให้เกิดปฏิกิริยาได้

Wind และ คณะ (1994) ได้ศึกษาพบว่า Thermostable α, - amylase จาก *Bacillus licheniformis* ต้องการแคลเซียมในปริมาณต่ำกว่า bacterial α, - amylase อื่น ๆ

2. pH

pH ทำให้เกิดการแตกตัวของ Side-chain groups โดยกลุ่มที่มีความจำเพาะคือ substrate binding group และ Catalytic group และ Catalytic groups ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ได้รูปกราฟระหว่าง pH และ activity ของเอนไซม์แตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของเอนไซม์ด้วย pH ที่ทำให้เอนไซม์มีความว่องไวสูงสุดจะอยู่ในช่วง 5.4-7.0 (สัตถาพร, 2524) ตัวอย่างแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ทนต่อความเป็นกรด-ด่างแสดงดังตารางที่ 1 (Winkelmann, 1992)

3. อุณหภูมิ

เอนไซม์ของอะไมเลสส่วนใหญ่จะมีการทำงานดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 0-40°C จากการที่ α, - amylase มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลจึงทนต่อความร้อนได้ดี เอนไซม์อะไมเลสจากแหล่งกำเนิดต่างกันจะมีความทนทานต่อความร้อนได้ต่างกัน โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียมีความทนทานต่ออุณหภูมิได้ดีที่สุดในบรรดาเอนไซม์อะไมเลสทั้งหมดที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ และแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงมักจะผลิต

เอนไซม์อะไมเลสที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงด้วย ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิต่างแสดงดังตารางที่ 1

α, - amylase จาก *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* สามารถทนความร้อนได้ดีกว่า α, - amylase จากแหล่งอื่น ๆ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยแป้งของ α, - amylase จาก *B. stearothermophilus* อยู่ในช่วง 55-57°C

อย่างไรก็ตามพบว่า Bacillus sp. ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 110°C ในขณะที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะมีผลต่อการผลิตอะไมเลสและการเจริญของเชื้อ ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปเซลล์จะเจริญได้ช้า จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและที่อุณหภูมิสูงเมื่อเชื้อผลิตเอนไซม์อะไมเลสแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ จะทำให้เอนไซม์ส่วนใหญ่จะสูญเสียคุณสมบัติไป

สามารถจัดเอนไซม์อะไมเลสตามอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ Thermostable amylase เช่น *B. stearothermophilus*, *B. lichemiformis* alkaline amylase เช่น *B. alkalophilus* และ Acidic amylase เช่น *B. acidocaldarius*

4. ปริมาณกล้าเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิต

สัตถาพร (2524) ศึกษาพบว่าปริมาณกล้าเชื้อที่แตกต่างกันให้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งใกล้เคียงกันโดยเมื่อทดลองกับ *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% *B. subtilis* จะมีกิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกันคือประมาณ 48 U/ml ส่วน *B. amyloliquefaciens* จะมีกิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกันประมาณ 48 U/ml ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Beckord et al. (1945) ซึ่งพบว่าปริมาณกล้าเชื้อไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

แหล่งของเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสสามารถผลิตจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ปริมาณและชนิดของเอนไซม์ที่พบนั้นจะแตกต่างกันไป แหล่งที่ได้รับความนิยมและสนใจมากคือจุลินทรีย์ เพราะเป็นแหล่งที่ไม่มีความจำกัดมากเหมือนพืชและสัตว์ และในแง่การผลิตเพื่ออุตสาห

กรรมแล้วใช้แบคทีเรียเพราะสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้อย่างไม่จำกัด สะดวก รวดเร็ว ต้นทุนการผลิตต่ำ การดูแลรักษาน้อยและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ตามต้องการ

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 (สัตถาพร, 2524)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติการทนความร้อนและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

เชื้อแบคทีเรีย	อุณหภูมิของการเจริญ (°ซ)	อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ (°ซ)	ค่ากรดด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์ (°ซ)
Arobic Bacteria			
Acinetobacter sp.	30	50-55	7.0
Bacillus acidocaldarius A-2	50	70	3.5
B.calophilus subsp.halodurans	37	-	10.5
B.amyloliquefaciens	37	50-70	5.5
B.caldolyticus	72	70	5.5
B. cereus	30	55	6.0
B.circulans	30	50	7.0
B.coagulans	35	45-55	6.5-8.0
B.licheniformis	30	90	7.0-9.0
B.macerans	40	-	6.0
B.natto	30	-	6.0
B.stearothemophilus	55	70-80	5.0-6.0
B.subtilis	37	55	6.5
Halobacterium halobium	37	55	6.5
Pseudomonas saccharophila	30	40	5.5
Themus aquaticus	70	-	-
Themus sp. AMD-33	70	70	5.5

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	อุณหภูมิของการเจริญ (°ซ)	อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ (°ซ)	ค่ากรดด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์ (°ซ)
Lactic Acid Bacteria			
Lactobacillus cellobiosus	37	50	7.5
Micrococcus halobius	30	50-55	6.0-7.0
Streptoccus sp.	40	48	5.5-6.5
Actinomycetes			
Tretomyces limosus	30	35	7.0
Themoactinomyces vulgaris	45	65	5.0-6.0
Themomonospora curvata	53	65	5.5-6.5
Anaerobic bacteria			
Bacteroides amylophilus	37	43	63
Clostridium acetobutylicum	-	-	5.0
C. butyricum	37	48	5.5
C. themosaccharolyticum	60	70-75	5.5
Dictyoglomus themophilum	78	90	-
Fervidobacterium sp.	70	90	5.5
Pyrococcus woesei	100	100	5.0
P. furiosus	100	100	5.0
Themoanaerobacter ethanolicus	65	90	5.5
T. finnii	65	90	5.5
Themoanaeobium brockii	65	85	5.0

ตารางที่ 2 แหล่งของเอนไซม์และชนิดของเอนไซม์

แหล่งผลิตเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส	หมายเหตุ
พืช : malts	α-amylase และ β-amylase	
: Potato	β-amylase	
สัตว์ : น้ำลาย	α-amylase	
: ตับอ่อน	α-amylase	
จุลินทรีย์ :		
Bacteria : *B. subtilis*	α-amylase	
: *B. stearethermophilus*	α-amylase	
: *B. polymyxa*	β-amylase	
: *B. megaterium*	β-amylase	-เอนไซม์ถูกสร้างในช่วง Stationary state
: *B. licheniformis*	Thermostable α-amylase	-เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมประมาณ 40-60% ที่ 110°C
: *B. cereus*	β-amylase	
Mold : *A. niger*	Glucoamylase และ α-amylase	
: *A. oryzae*	Glucoamylase และ α-amylase	
Yeast : *Endomycopsis* sp.		
: *Torulopsis* sp.	Glucoamylase และ α-amylase	

Central Library
Prince of Songkla University

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ แบคทีเรีย

การสร้างเอนไซม์อะไมเลสขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ช่วงการเจริญ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลือของสารอนินทรีย์ อิทธิพลของความเป็นกรดด่าง pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอิทธิพลของอุณหภูมิขณะที่เลี้ยงเชื้อ

1. ช่วงการเจริญ

ช่วงการสร้างเอนไซม์อะไมเลสกับชนิดของแบคทีเรีย แบคทีเรียบางชนิดจะถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดหลังจากแบคทีเรียเพิ่มจำนวนได้สูงสุดที่ stationary phase และแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมดไป เช่น *B. acidocaldarius* ซึ่งในระยะ stationary phase นี้เซลล์จะเริ่มย่อยสลายตัวเองทำให้เซลล์แตกและปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์มากขึ้น แต่ในแบคทีเรียบางชนิดอาจถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ช่วง logarithmic phase ได้

Shinke (1977) พบว่า *B. cereus* สร้างเอนไซม์ α-amylase ในช่วง log phase ใน basal medium

แบคทีเรียบางชนิดสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้โดยไม่ต้องอาศัยตัวกระตุ้นภายนอก จึงจัดเป็น constitutive enzyme ซึ่งจะสร้างเอนไซม์สูงสุดในช่วง stationary phase และแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมดไป เช่น *B. licheniformis* (สัตถาพร, 2524) และมีการศึกษาจาก *B. stearothermophilus* พบว่าสร้างเอนไซม์ในช่วง exponential phase (Wind et al., 1994)

2. แหล่งคาร์บอน

ในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสต้องมี inducer ซึ่งพบว่า starch, dextrin, maltose และ Pullulan จะเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ ในขณะที่ glucose, lactose และ fructose ไม่เหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์อะไมเลส (Sunna, 1990)

การสร้างเอนไซม์อะไมเลสถูกยับยั้งได้โดย glucose และ fructose ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ซึ่งเกิดจาก Glucose catabolite repression และ fructose catabolite repression (Wind et al., 1994) นอกจากนี้ความเร็วในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตก็มีผลต่อการยับยั้ง

การสร้างเอนไซม์อะไมเลสด้วย สัตถาพร (2524) ศึกษาการใช้แป้งมันสัมปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแป้งมันสำปะหลัง 7% จะให้การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และผลิตผลของเอนไซม์สูงสุดในเวลา 60 ชั่วโมงหลังเพาะเลี้ยง จากการทดลองเมื่อเพิ่มปริมาณแป้งมันสัมปะหลังลงในอาหารเหลวมากขึ้น ทำให้เชื้อเจริญดีขึ้นผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากขึ้นด้วย จนถึงจุดหนึ่งการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะคงที่แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณแป้งมากก็ตาม และหลังจากนั้นการผลิตเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลง

3. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์จะเป็นตัวกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลส ขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ไม่ได้ช่วยในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เช่น Urea สารมารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ (สัตถาพร, 2524) Shinke (1977) พบว่า *B. subtilis* เจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีและมีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นจาก 380 Unit เป็น 680 Unit เมื่อเติม meat extract ซึ่งเป็น organic nitrogen ใน basal medium และพบว่า *B. cereus* BQ 10-51 ซึ่งเป็น mutant ของ *B. cereus* ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดในอาหารที่มี polypeptone และ meat extract เป็นแหล่งไนโตรเจน

B. subtilis เจริญและสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น peptone ขณะที่เกลือแอมโมเนียมไนเตรต และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ทำให้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสในปริมาณต่ำและเจริญได้น้อย (สัตถาพร, 2524)

4. เกลือของสารอนินทรีย์

อนุมูลที่เป็นตัวเร่งในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ Mn^{2+}, Zn^{2+}, Na^{+}, Fe^{3+}

เชื้อแบคทีเรียที่สร้างสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สามารถแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่ เช่น ดิน, น้ำ

Lin, Tsau และ Chu (1994) แยกเชื้อจากดินได้เป็น thermophilic *Bacillus* sp. และ alkalophilic *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถผลิต extracellular amylase และ pullulanas ซึ่งมีกิจ

กรรมของเอนไซม์สูงประมาณ 102 U/ml ที่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ pH 8.8-9.6 และ 7.5-9.4 ตามลำดับและอุณหภูมิ 65°C

Sunna และ Hashwa (1990) แยกเชื้อจากดินได้คือ *Aspergillus oryzae*, *B. amylaliquefaciens*, *B. licheniformis* ซึ่งอะไมเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เหล่านี้จะนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น obligate aerobic, rod-shaped, gram-negative, non-sponeforming, thermophilic bacterium ไม่สามารถจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่มใดได้ เชื้อนี้สร้าง Thermostable amylotytic enzyme ในช่วง exponential phase มีกิจกรรมเอนไซม์สูงประมาณ 21.75 U/ml

Fujio และ Morita (1996) ศึกษาเชื้อที่แยกได้จาก Tempeh starter คือ *Rhizopus* sp. A-11 พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้ พบว่าความเข้มข้นขอไอออนของโลหะ การผลิตเอนไซม์และการเจริญของเชื้อมีความสัมพันธ์กันโดย *Rhizopus* sp. เจริญเติบโตในอาหารที่มี Zn^{2+} ต่ำ ๆ ถ้ามี Zn^{2+} สูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโต ถ้าใช้ Mn^{2+}, Fe^{+} และ Zn^{2+} รวมกันจะกระตุ้นการเจริญของ *Rhizopus* sp. และทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase สูงถึง 650 U/ml และ *Rhizopus* sp. ที่เลี้ยงใน solidstate culture จะให้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าใน liquid culture

Xinyu และคณะ (1991) ศึกษาเชื้อที่ได้จาก Chu-Chan-Nho Soda Lake ในประเทศจีน คือ Alkalophilic bacterium No. 10-1 ซึ่งเป็น areobic bacteria., gram negative, rod- shape, obligately alkalophilic bacterium ไม่เจริญในอาหารที่มีค่า pH เป็นกลาง เชื้อสร้าง alkaline amylase เมื่อมีแหล่งคาร์บอนคือ potato starch และแหล่งไนโตรเจน คือ polypeptone เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 10.0 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์คือ 50°C ผลจากการย่อยแป้งของเอนไซม์คือ maltose, maltotriose และ glucose

Giraud, Champailler และ Raimbault (1994) ศึกษาเชื้อที่แยกได้ จากกระบวนการของการหมักมันสำปะหลัง คือ *Lactobacillus plantarum* A6 จะให้เอนไซม์ α-amylase ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ 60 U/ml ที่ pH 6.0 โดยเอนไซม์ถูกสังเคราะห์ในช่วง stationary phase และให้กรดแลกติกจากกระบวนการหมัก ซึ่งทำให้ pH เปลี่ยนแปลงมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเป็น 2 U/ml

Wind และคณะ (1994) ศึกษาเชื้อที่แยกได้จากแป้งมันสัมปะหลังในกระบวนการอุตสาหกรรม ซึ่งมีการใช้ความร้อนสูง เชื้อที่แยกได้คือ *B. stearothermophilus* เป็น Thermophilic bacterium ผลิตเอนไซม์ Thermostable α-amylase ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่ 70-75°C และเอนไซม์ยังมีความคงทนที่อุณหภูมิ 80-90°C ได้ประมาณ 24 ชั่วโมงเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ 60-70°C

น้ำทิ้ง

น้ำทิ้ง

วิทยา (2525) ได้อธิบายความของน้ำทิ้งว่า น้ำทิ้งหรือน้ำโสโครก หมายถึง น้ำที่ใช้แล้วในกิจกรรมต่าง ของชุมชน บ้านเรือน อาคารพาณิชย์ สถานที่ประกอบการต่าง ๆ ตลอดจนโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งอาจประกอบด้วยน้ำใต้ดิน น้ำผิวดิน และน้ำฝนรวมอยู่ด้วย

แหล่งที่มาของน้ำทิ้ง

1. น้ำทิ้งชุมชน (Domestic wastewater)

เบญจา (2525) อธิบายว่าน้ำทิ้งและสิ่งสกปรกจากอาคารบ้านเรือน จัดเป็นน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชนมีหลายประเภท สามารถแยกได้หลายลักษณะตามการใช้ประโยชน์ของน้ำ เช่น น้ำทิ้งที่เกิดจากการชำระล้าง การบริโภค การประกอบอาหารรวมทั้งการทำความสะอาดวัสดุ อุปกรณ์และอาคารบ้านเรือน ซึ่งจะแยกได้เป็นน้ำจากท่อระบายน้ำโสโครก น้ำโสโครกที่ซึมจากส้วมซึมผ่านชั้นดินลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ ตลอดจนขยะมูลฝอยอื่น ๆ ที่ปนมากับน้ำทิ้ง ดังนี้น้ำทิ้งจากชุมชนส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สามารถสลายตัวได้เองในธรรมชาติโดยขบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ ในสภาวะแหล่งน้ำมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ ต่อการย่อยสลายของแบคทีเรีย ที่ใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญอาหาร ถ้าหากแหล่งน้ำมีปริมาณของออกซิเจนที่ละลายน้ำไม่เพียงพออาจจะทำให้เกิดก๊าซที่มีกลิ่นเหม็น (H_2S) ที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งแบ่งน้ำทิ้งจากชุมชนเป็น 4 ประเภท ดังนี้

1.1 น้ำทิ้งจากคนและสัตว์ ได้แก่ อุจจาระ ปัสสาวะ มูลสัตว์ต่าง ๆ ที่ทิ้งลงสู่ท่อระบายน้ำ

1.2 น้ำทิ้งจากครัวเรือน ได้แก่ น้ำที่ใช้ในการชำระร่างกาย น้ำซักผ้า จะมีผลซักฟอก เศษอาหารและไขมันมาก

1.3 น้ำฝนและน้ำล้างถนน น้ำฝนที่ไหลไปตามพื้นถนน ผิวดิน จะไหลรวมเอาเศษไม้ ใบไม้ ดิน ทราย ซากพืช และขยะต่าง ๆ ลงสู่ท่อระบายน้ำทิ้ง

1.4 น้ำใต้ดินที่ไหลเข้าสู่ท่อน้ำทิ้ง ปกติจะฝังอยู่ใต้ดินและบางแห่งอาจจะอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำใต้ดิน ทำให้น้ำใต้ดินสามารถซึมผ่านเข้าบริเวณข้อต่าง ๆ เข้าสู่ท่อน้ำทิ้งได้

2. น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม (Industrail wastewater)

โรงงานอุตสาหกรรม จะเป็นแหล่งรวมของวัตถุดิบที่นำเข้ามาผลิต แปรรูปเป็นสินค้าทางเศรษฐกิจและบริการ เพื่อประโยชน์ทั่วไปของมนุษย์ และเป็นแหล่งที่มาของน้ำทิ้งที่มีความสำคัญทำให้เกิดมลภาวะทางแหล่งน้ำ เพราะปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมจะมีจำนวนมากและมีสิ่งเจือปน ที่สกปรกเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ อาจแยกได้ดังนี้

2.1 น้ำหล่อเย็น เป็นน้ำที่ใช้ในกระบวนการหล่อเย็น โดยการระบายความร้อนจากเครื่องจักร น้ำทิ้งจะมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่สิ่งเจือปนไม่มากนัก

2.2 น้ำล้าง เช่น น้ำจากการล้างพื้นของโรงงาน เครื่องจักร อุปกรณ์ วัตถุดิบ รวมทั้งน้ำล้างห้องส้วม ห้องน้ำ เป็นต้น มีสิ่งเจือปนค่อนข้างสูง

2.3 น้ำจากกระบวนการผลิต แยกตามลักษณะอุตสาหกรรมได้ 2 ประเภท คือ น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอินทรีย์ และน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอนินทรีย์

2.4 น้ำทิ้งจากกิจกรรมอื่น ๆ เช่น จากคอนเดนเซอร์ หม้อน้ำ เครื่องทำน้ำอ่อน ฯลฯ

3. น้ำทิ้งจากการเกษตร (Agriculture wastewater)

เกษมและคณะ (2524) กล่าวว่า น้ำเสียจากการเกษตร เกิดได้ในทุกกระบวนการ เริ่มจากการเตรียมที่เพาะปลูก อาจเกิดจากการไถพรวนดิน เกิดจากใช้ปุ๋ย และวัตถุมีพิษ เช่น ยาฆ่าแมลง สารปราบศัตรูพืช และโอกาสที่จะพัดพาสิ่งเจือปนเหล่านี้ ลงสู่แหล่งน้ำจากการทำความสะอาดพืชผล เบญจา (2525) พบว่า แหล่งที่มีการเพาะปลูก เลี้ยงสัตว์ และการชลประทาน เป็นแหล่งที่ทำให้เกิดมลพิษของน้ำ โดยการใช้สารปราบศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง สารเคมีเหล่านี้บางชนิดสลายตัวเร็ว บางชนิดสลายตัวช้า ทำให้เกิดการสะสมในสิ่งมีชีวิตในน้ำ และร่างกายของมนุษย์ตามห่วงโซ่อาหาร

พารามิเตอร์ที่เป็นดัชนีสำคัญในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้ง

1. อุณหภูมิ

Reid (1961) ได้รายงานว่าอุณหภูมิของน้ำจะแปรผันตามอุณหภูมิของอากาศ แต่ทั้งนี้ขึ้นกับตำแหน่งทางเส้นรุ้ง ระดับความสูงและภูมิประเทศ Rutther (1953) พบว่ารังสีความร้อนจากดวงอาทิตย์ ลม และการระเหยของน้ำ มีส่วนทำให้อุณหภูมิของน้ำเปลี่ยนแปลง แต่ยังมีขีดจำกัดในการละลายน้ำของออกซิเจนในน้ำ ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ออกซิเจนจะละลายน้ำได้น้อย Harold (1950) พบว่าถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ความหนืดของน้ำจะลดลง การเกิดตะกอนสามารถเกิดได้ดีขึ้น Warren (1971) กิจกรรมของมนุษย์หลายอย่างที่เป็นเหตุทำให้อุณหภูมิของน้ำเปลี่ยนแปลงไปจากระดับปกติ แม้ว่าสิ่งมีชีวิตในน้ำจะปรับตัวเองให้เข้ากับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง แต่ก็ยังมีขีดจำกัดในการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

เกษม (2530) พบว่าน้ำเสียที่เกิดจากอุณหภูมิของน้ำนั้น ถ้ามีอุณหภูมิสูงเกินไปหรือต่ำเกินไป สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะได้รับอันตราย โดยปรกติแล้วอุณหภูมิของน้ำในแหล่งน้ำในประเทศไทย จะอยู่ในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส และจะลดลงถ้าหากอุณหภูมิสูงมากกว่านี้ Metcalf และ Eddy (1972) กล่าวว่าอุณหภูมิของน้ำทิ้งจะสูงกว่าธรรมชาติ และอุณหภูมิของอากาศเพราะมีน้ำอุ่นจากบ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรม ไหลลงสู่แหล่งน้ำ

2. ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH)

เป็นค่าที่บอกถึงความเข้มข้นของ ไฮโดรเจนอิออน (H^+) และไฮดรอกซิลอิออน (OH^-) ซึ่งมีความสำคัญต่อคุณภาพน้ำ เนื่องจากปลาและสัตว์อื่น ๆ ในน้ำจะมีชีวิตอยู่ในช่วง pH 6.5-8.5 (Mckee and Wolf 1971) พบว่าน้ำในธรรมชาติมีค่า pH ผันแปรอยู่ระหว่าง 6.5-8.5 แต่ส่วนใหญ่ pH จะต่ำค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อย เนื่องจากมีปริมาณไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และกรดอินทรีย์ละลายปนอยู่ด้วย pH โดยทั่วไปจะเป็นดัชนีพื้นฐาน ที่ชี้ถึงสภาพของปฏิกิริยาในน้ำขณะนั้นว่ามีแนวโน้ม ของการขับถ่ายลดต่ำลงเพราะเกิดกรดอินทรีย์จากการย่อยสลายของแบคทีเรีย

3. ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ มากน้อยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความดัน และสารละลายเป็นสำคัญ เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำมีค่า น้อยกว่าค่าอิ่มตัว ออกซิเจนในอากาศจะถ่ายเทลงสู่ผิวน้ำได้เองตามธรรมชาติ ปริมาณออกซิเจนในน้ำขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิของอากาศ ออกซิเจนจะละลายได้ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ถ้ามีการสลายตัวของสารอินทรีย์ จากการย่อยสลายของแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) จะทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดต่ำลง Nemerow (1974) กล่าวว่า ปลาส่วนใหญ่ไม่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 3.0 mg/l และปริมาณออกซิเจนยังเป็นดัชนีที่ป้องกันการเน่าเสียของแหล่งน้ำ ซึ่งสภาพปัญหามลภาวะต่าง ๆ ในปัจจุบันส่วนมากเกิดจากแหล่งน้ำที่มีออกซิเจนละลายอยู่ต่ำเกินไปหรือไม่มีเลย

4. ความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (BOD)

กรรณิการ์ (2526) กล่าวว่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี คือ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ที่แบคทีเรียต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ชนิดที่ย่อยสลายได้ในสภาวะมีออกซิเจน และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 5 วัน ความต้องการออกซิเจนในทางชีวเคมี เป็นค่าที่บอกถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ในน้ำทิ้ง ถ้าสารอินทรีย์ในน้ำมีปริมาณมาก อัตราการใช้ออกซิเจน ย่อมมากขึ้น ทำให้ความต้องการ

ออกซิเจนในทางชีวเคมีสูง แสดงว่าแหล่งน้ำมีความสกปรกมาก ในทางตรงกันข้าม หากความต้องการในการใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์มีน้อย แสดงว่าความสกปรกของน้ำก็มีน้อย

5. คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

กรรณิการ์ (2526) กล่าวว่าโรคที่สำคัญซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย และการแพร่กระจายของน้ำเป็นสื่อ ได้แก่ ไทฟอยด์ บิด และอหิวาตกโรค ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อเหล่านี้ จึงต้องวิเคราะห์หาจำนวน และชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ในอุจจาระของผู้ป่วยเป็นดัชนีสำคัญ ปริมาณจุลินทรีย์จะมากหรือน้อยขึ้นกับปัจจัยดังนี้

1. ปริมาณสารอาหาร
2. แหล่งน้ำ เช่น น้ำผิวดินมักมีจุลินทรีย์ สูงกว่าน้ำใต้ดินและน้ำฝน
3. อุณหภูมิ
4. แสง UV สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้
5. เกลือแร่ต่าง ๆ ถ้ามีอยู่มากในน้ำจะทำให้แบคทีเรียบางชนิดหยุดการเจริญเติบโต
6. ออกซิเจนละลายน้ำ ถ้ามีมาก พวก aerobic bacteria จะเจริญได้ดี
7. ความดันบรรยากาศ
8. Agitation และ Vibration น้ำที่มี gentle agitation เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย แต่ในน้ำที่มี vibration ในระยะเวลานานจะทำลายจุลินทรีย์ได้

การจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus (Parry 1983)

Bacillus สามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะและรูปร่างของสปอร์ และการป่อง (swollen) ของตัวเซลล์ที่เกิดจากภายในเซลล์ดังนี้

1. Morphological Group 1

ลักษณะ : ตัวเซลล์ไม่ป่องหรือป่องเล็กน้อย สปอร์รูปรี หรือทรงกระบอก ในตำแหน่ง central หรือ terminal ได้แก่

1. *B. megaterium*
2. *B. cereus*
3. *B. cereus* var. *mycoides*
4. *B. anthracis*
5. *B. thuringiensis*
6. *B. licheniformis*
7. *B. coaglulans*
8. *B. pumilus*
9. *B. subtilis*
10. *B. firmus*

2. Morphological Group 2

ลักษณะ : ตัวเซลล์ป่องออก สปอร์รูปกลม ในตำแหน่ง subterminal หรือ terminal ได้แก่

1. *B. polymyxa*
2. *B. macerans*
3. *B. circulasn*
4. *B. stearothermophilus*
5. *B. alvei*
6. *B. laterosporus*
7. *B. brevis*
8. *B. pulvifaciens*
9. *B. popilliae*
10. *B. larvae*

3. Morphological Group 3

ลักษณะ : ตัวเซลล์ป่องออก สปอร์รูปกลม ในตำแหน่ง subterminal หรือ terminal ได้แก่

1. *B. sphaericus*
2. *B. pasteurii*

ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ตัวอื่น ๆ ที่ไม่จัดอยู่ใน 3 กลุ่มนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น subgroup ตั้งแต่ A-E เป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วน subgroup E จัดเป็นพวก Psychrophilic bacteria คือ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

3.1 Subgroup A

ลักษณะ : สปอร์รูปไข่ เจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน hydrolyze strach ไม่เจริญที่ 3 องศาเซลเซียส ได้แก่

1. *B. apiarus*
2. *B. filicolonicus*
3. *B. thiaminolyticus*
4. *B. alcalophilus*

3.2 Subgroup B

ลักษณะ : สปอร์รูปไข่ ไม่เจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน ไม่ hydrollyze starch ไม่เจริญที่ 3 องศาเซลเซียส ได้แก่

1. *B. cirroflagellosus*
2. *B. chitinosporus*
3. *B. lentus*

3.3 Subgroup C

ลักษณะ : สปอร์รูปไข่ ไม่เจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน ไม่ hydrolyze starch เจริญที่ 3 องศาเซลเซียส ได้แก่

1. *B. badius*
2. *B. aneurinolyticus*
3. *B. macroides*
4. *B. freundenreichii*

3.4 Subgroup D

ลักษณะ : สปอร์รูปไข่หรือกลม เจริญหรือไม่เจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน hydrolyze starch ไม่เจริญที่ 3 องศาเซลเซียส ได้แก่

1. *B. pantothenticus*
2. *B. epiphytus*

3.5 Subgroup E1

ลักษณะ : สปอร์รูปกลม ไม่เจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน hydrolyze starch หรือไม่ hydrolyze starch เจริญได้ที่ 3-5 องศาเซลเซียส ได้แก่

1. *B. aminovorans*
2. *B. globisporus*
3. *B. insolitus*
4. *B. psychrophilus*

3.6 Subgroup E2

ลักษณะ : สปอร์รูปไข่ เจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน hydrolyze starch หรือไม่ hydrolyze starch เจริญได้ที่ 3-5 องศาเซลเซียส ได้แก่

1. *B. psychosaccharolyticus*
2. *B. macquariensis*

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของน้ำทิ้ง

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากแหล่งน้ำทิ้ง 30 ตัวอย่าง ในบริเวณเขตเทศบาลเมืองหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ทำการวัดอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำทิ้ง วัดพีเอช แล้วนำไปทำการวิเคราะห์หาค่า BOD, COD และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี pour plate

2. การแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ย่อยแป้ง

นำตัวอย่างน้ำทิ้ง มาแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ย่อยแป้งโดยวิธี spread plate technique โดยใช้อาหารที่เป็น screening media คือ skim milk agar สำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนและ Peptone Glucose Extract (PGE) สำหรับเอนไซม์ย่อยแป้ง บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° C นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรียที่มีวงใสรอบโคโลนี นำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการลากเป็นแนว (streak) บนอาหารที่เป็น screening media ของแต่ละเอนไซม์อีกครั้งหนึ่ง เก็บรักษาเชื้อที่ได้ในหลอดอาหารแข็งที่ 4° C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 มาทำ point inoculum ในอาหาร skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและวงใสรอบโคโลนี เลือกโคโลนีที่มีผลต่างมากระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกับรอบโคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหาร skim milk broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนตามวิธีของ Anson (1958) ภาคผนวก ก.

3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 มาทำ point inoculum ในอาหาร PGE โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้งโดยการราดสารละลายไอโอดีนลงไปให้ท่วมจานเลี้ยงเชื้อ

ทิ้งไว้ 3 นาที จะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนี วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและวงใสรอบโคโลนี เลือกโคโลนีที่มีผลต่างมากระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีกับวงใสรอบโคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PGE พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสไปหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง ภาคผนวก ข.

4. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ เพื่อเทียบเคียงชนิดดังนี้ คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแบบแกรม ดูการติดสีแกรม รูปร่างของเซลล์ ย้อมสีสปอร์ ดูลักษณะและตำแหน่งของสปอร์

5. การศึกษาสภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อที่คัดเลือกได้

5.1 ศึกษาสูตรอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่ทำการคัดเลือกมา 3 สายพันธุ์ (W2, W5, W15) เลี้ยงบน skim milk broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร pH 7 ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และปรับการดูดกลืนแสงที่ OD 660 nm ของอาหารและเชื้อที่เลี้ยงเท่ากับ 0.5 แล้วเติมเป็นหัวเชื้อปริมาตร 2 % ลงไปในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการคัดเลือกมา 3 สูตร คือ อาหารสูตร 1 (nutrient broth 8 g , skim milk 8 g น้ำกลั่น 100 มล.) อาหารสูตร 2 (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, CaCl 2 mM ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร) อาหารสูตร 3 {$(NH_4)_2SO_4$ 1 g, peptone 2 g, casein 2 g , น้ำตาลกลูโคส 18 g, yeast extract 2 g สารละลาย A 5 มล. (K_2HPO_4 50 g, KH_2PO_4 50 g ในน้ำกลั่น 500 ml) สารละลาย B 5 มล. ($MgSO_4$ 7 H_2O 1 g, NaCl 1 g, $FeSO_4$ 1 g, $MnSO_4$.$4H_2O$ 1 g, กรดเกลือเข้มข้น 1 มล. ในน้ำกลั่น 500 มล.) ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร} ปริมาตร 150 มิลลิลิตร พีเอช 7 ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง แล้วนำไปวัดการเจริญของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm เลือกชนิดของแบคทีเรียและชนิดของอาหารที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5.2 ศึกษาปริมาณ skim milk ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 โดยแปรผันปริมาณ skim milk ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมงเก็บตัวอย่าง 5 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ภาคผนวก ก.

5.3 ศึกษาค่า พีเอช ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 5.1 ที่มีปริมาณ skim milk เริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อที่ 5.2 โดยแปรผัน ค่า พีเอช เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8 ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมงเก็บตัวอย่าง 5 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ภาคผนวก ก.

5.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 5.1 ที่มีปริมาณ skim milk เริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 และมีพีเอชของอาหารเริ่มต้น ที่เหมาะสมจากข้อ 5.3 โดยทำการแปรผันอุณหภูมิ เป็น 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 5 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ภาคผนวก ก.

6. การศึกษาสภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งของเชื้อที่คัดเลือกได้

6.1 การคัดเลือกเชื้อและสูตรอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่ทำการคัดเลือกมา 3 สายพันธุ์คือ S1, S2, S3 เลี้ยงบนอาหาร PGE pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 ml บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และปรับการดูดกลืนแสงที่ OD 660 nm ของอาหารและเชื้อที่เลี้ยง ให้เท่ากับ 0.5 แล้วเติมเป็นหัวเชื้อลงโดยใช้ปริมาตร 2% ลงไปในสูตร

อาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการคัดเลือกมา 3 สูตร คือ อาหารสูตร A (polypeptone 3 g, KCl 0.5 g, NaCl 0.5 g, ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.) อาหารสูตร B (maltose 10 g, yeast extract 1 g, sodium citrate 0.5 g, K_2HPO_4 0.1 g, $(NH_4)H_2PO_4$ 0.5 g , $MgSO_4.7\ H_2O$ 0.5 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $FeSO_4.7\ H_2O$ 0.1 g ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มล.) อาหารสูตร C (polypeptone 4 g, K_2HPO_4 0.3 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g, soluble starch 10 g ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร พีเอช 7 ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 6 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บไปปั่น ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปหากิจกรรม ของเอนไซม์ย่อยแป้ง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง แล้วนำไปวัดการเจริญของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 660 nm เลือกชนิดของแบคทีเรียและชนิดของอาหารที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ ย่อยแป้งสูงสุดมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

6.2 ศึกษาปริมาณแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

คัดเลือกเชื้อและอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งจากข้อ 6.1 นำมาเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณแป้งที่เริ่มต้นความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง (เนื่องจากชั่วโมงที่ 42 เป็นชั่วโมงที่เชื้อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งมากที่สุด) เก็บตัวอย่าง 5 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ย่อยแป้ง ภาคผนวก ข.

6.3 ศึกษาค่า พีเอช ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 6.1 ที่มีปริมาณแป้งเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อที่ 6.2 โดยแปรผัน ค่า พีเอช เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8 ตามลำดับบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมงเก็บตัวอย่าง 5 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง ภาคผนวก ข.

6.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 6.1 ที่มีปริมาณแป้งเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 6.2 และมีพีเอชของอาหารเริ่มต้น ที่เหมาะสมจากข้อ 6.3 โดยการทำการแปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 32, 35,37, 40, 42, 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 5 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง ภาคผนวก ข.

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากเชื้อและอาหารที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน เป็นเวลา 42 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

7.1 ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

นำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยปรับค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ให้มีค่าพีเอชเป็น 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, และ 9.5 ตามลำดับ แล้ววิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยที่อุณหภูมิของการทำงานของเอนไซม์คือ 40 องศาเซลเซียส

7.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

นำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยปรับค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 7.1 นำสารละลายเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับแล้ววิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ได้จากเชื้อและอาหารที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง เป็นเวลา 42 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

8.1 ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง

นำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยปรับค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ให้มีค่าพีเอชเป็น 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, และ 9.5 ตามลำดับ แล้ววิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยที่อุณหภูมิของการทำงานของเอนไซม์คือ 40 องศาเซลเซียส

8.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

นำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยปรับค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 7.1 นำสารละลายเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับแล้ววิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

ผลการทดลอง

ลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของน้ำทิ้ง

จากตัวอย่างน้ำทิ้ง 30 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางกายภาพ พบว่าอุณหภูมิของแหล่งน้ำทิ้งอยู่ในช่วง 27.5-30°C ความเป็นกรด ด่าง อยู่ในช่วง 5.6-9.4 โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงเป็นกลางถึงด่าง ลักษณะทางชีวภาพของน้ำทิ้ง พบว่าค่า BOD อยู่ในช่วง 20-480 mg/l ค่า COD อยู่ในช่วง 77.97-549.20 mg/l จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.05x10^2$-$1.46x10^5$ cfu/ml (ตารางที่ 3)

คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

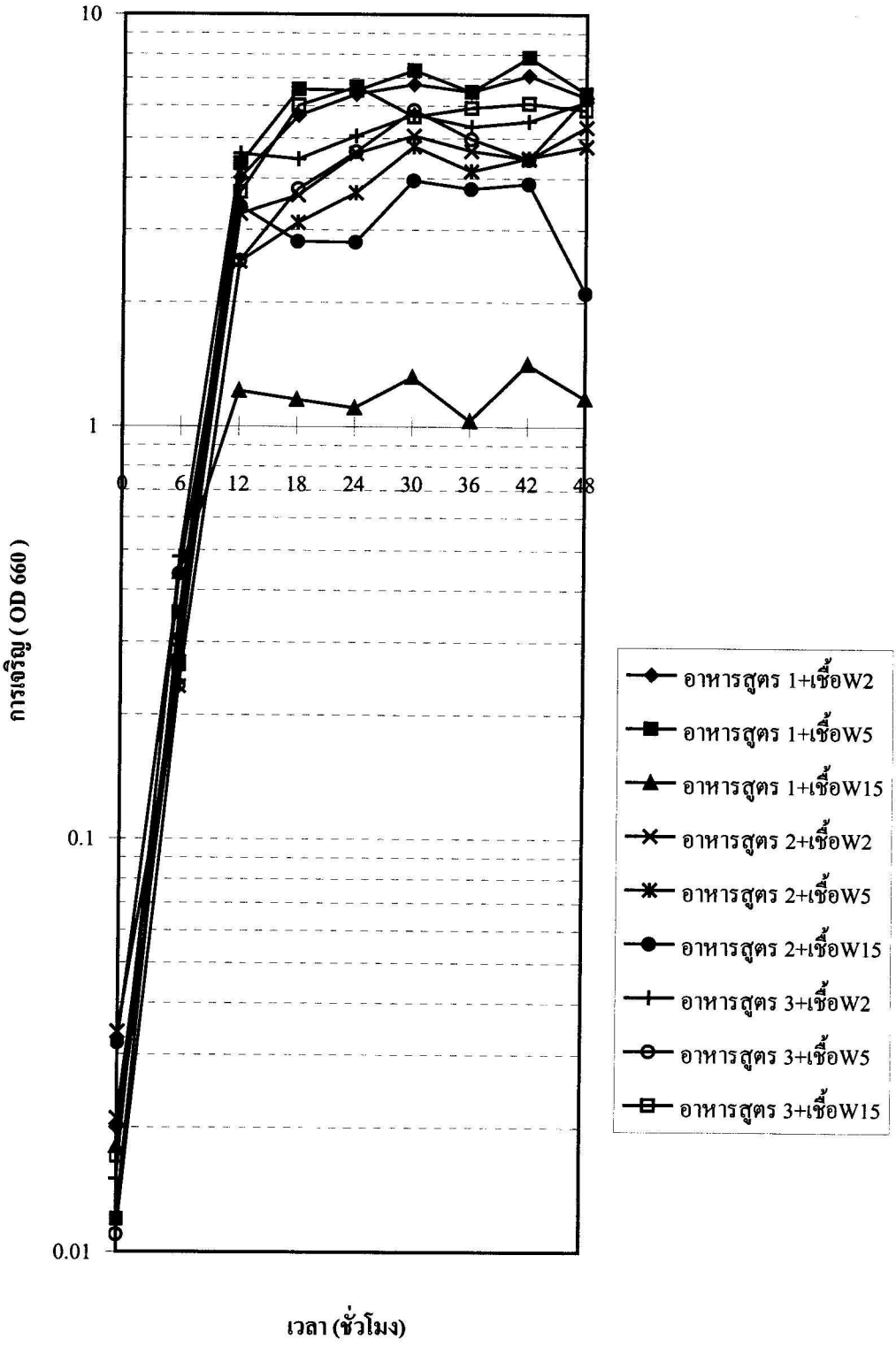
แบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างแหล่งต่าง ๆ มีทั้งหมด 30 สายพันธุ์ โดยอาศัยความแตกต่างของ ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี รวมทั้งความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือย่อยแป้งบนอาหารแข็งโดยเปรียบเทียบขนาดของวงใสกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และยืนยันความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือย่อยแป้งของแบคทีเรียที่แยกได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว skim milk medium และ PGE medium ตามลำดับ พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ย่อยแป้ง ปรากฏว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ W2, W5, W15 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและแบคทีเรียสายพันธุ์ S1, S2, S3 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปแท่ง สปอร์มีลักษณะรูปไข่อยู่กลางเซลล์ จัดอยู่ในสกุล *Bacillus*

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของน้ำทิ้ง

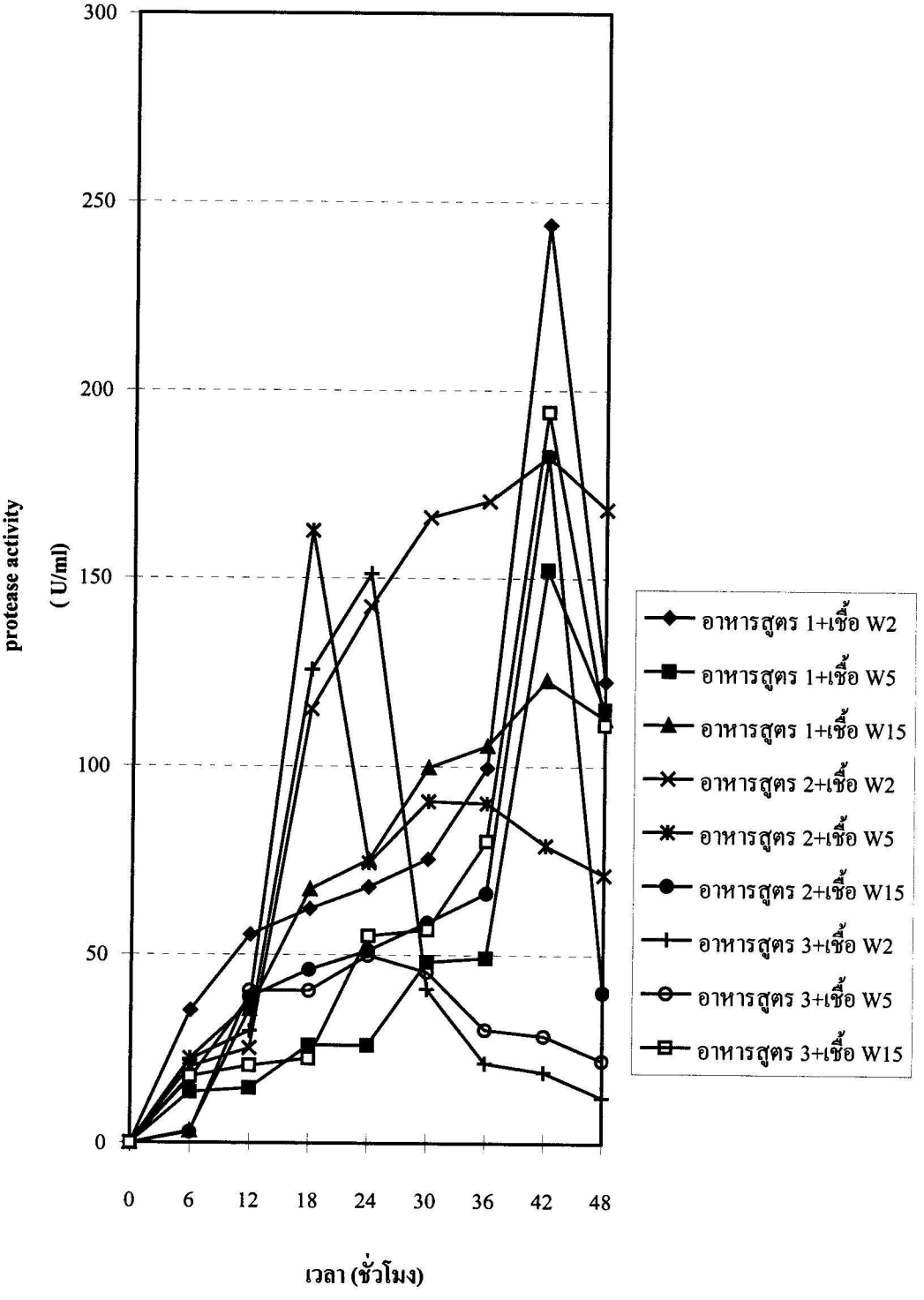
Waster water number	Temperature (°C)	pH	COD (mg/l)	BOD (mg/l)	Total bacteria (cfu/ml)
1	29.0	7.5	124.64	70	$6.2x10^3$
2	27.5	7.9	141.76	56	$3.5x10^4$
3	28.0	7.2	106.32	60	$1.12x10^3$
4	28.5	6.2	127.58	38	$8.2x10^5$
5	29.2	7.1	549.20	480	$2.11x10^4$
6	29.0	7.6	106.32	46	$1.13x10^5$
7	30.0	7.5	460.72	110	$3.90x10^5$
8	27.5	7.3	141.76	48	$5.20x10^3$
9	29.0	8.6	230.36	60	$1.25x10^3$
10	28.0	9.0	88.60	64	$1.05x10^2$
11	29.6	8.2	106.32	60	$4.73x10^3$
12	29.0	8.5	124.04	84	$2.46x10^4$
13	27.8	9.4	141.76	88	$1.32x10^5$
14	29.5	7.8	116.95	76	$1.46x10^5$
15	28.0	8.4	194.92	42	$1.80x10^4$
16	29.2	7.9	106.32	86	$1.16x10^3$
17	28.0	9.0	77.97	20	$1.30x10^3$
18	27.8	8.2	124.04	34	$8.60x10^3$
19	29.5	6.0	88.6	36	$1.21x10^3$
20	29.7	7.4	106.32	60	$2.40x10^3$
21	29.7	6.9	159.48	48	$2.71x10^4$
22	29.9	7.2	230.36	30	$2.62x10^3$
23	30.0	5.6	212.64	60	$1.87x10^2$
24	27.5	6.7	124.04	50	$2.44x10^2$
25	30.0	7.8	141.76	64	$1.34x10^3$
26	29.0	8.0	177.20	82	$2.85x10^4$
27	27.9	7.5	248.08	76	$5.40x10^4$
28	30.0	7.6	88.6	54	$7.80x10^4$
29	29.1	8.2	124.04	62	$1.08x10^5$
30	28.6	7.0	212.64	62	$7.50x10^4$

สภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

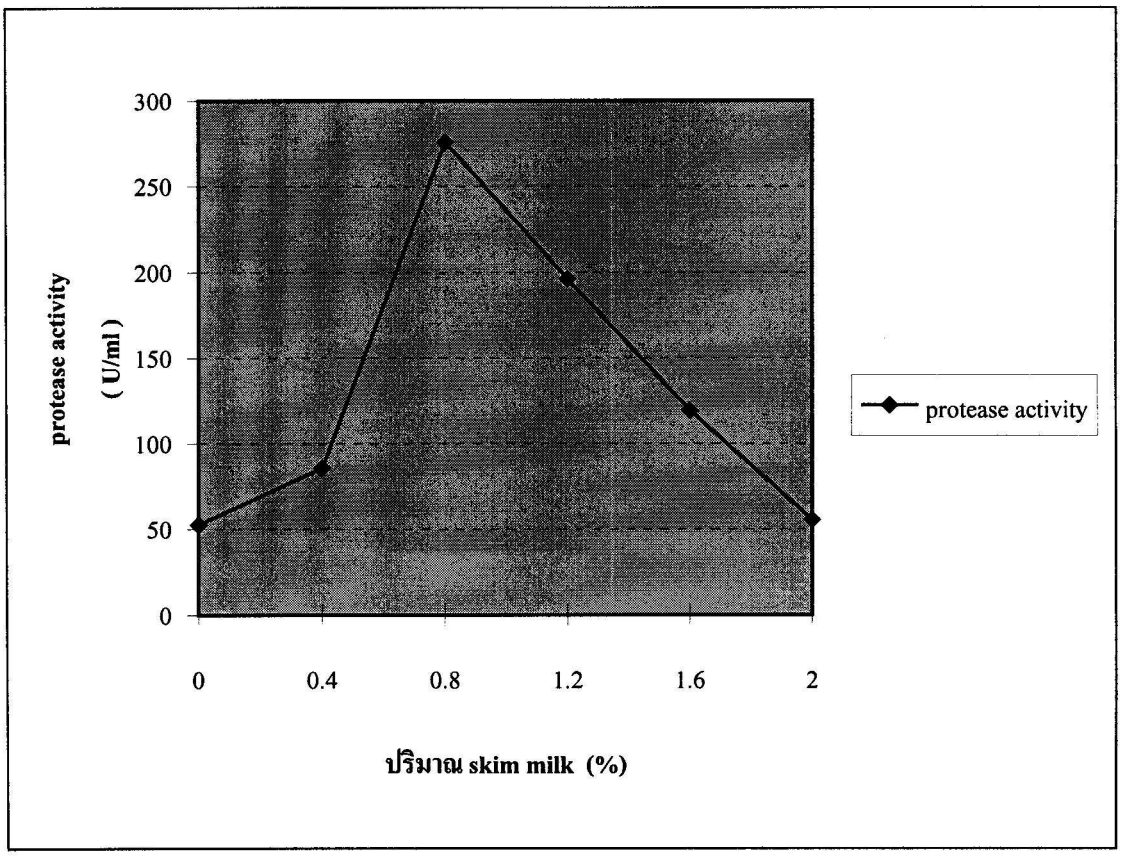
เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ผ่านการคัดเลือกว่าสามารถย่อยโปรตีนได้ดีมา 3 สายพันธุ์ คือ W2, W5, W15 มาเพาะเชื้อในอาหารที่มีสูตรแตกต่างกัน 3 สูตร โดยใส่เชื้อเริ่มต้น 2% ผลปรากฏว่า *Bacillus* W2 เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารสูตร 1 (รูปที่ 1) และผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุดคือ 244 unit/ml เมื่อบ่มเลี้ยงนาน 42 ชั่วโมง (รูปที่ 2) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1 ซึ่งประกอบด้วย nutrient broth โดยแปรผันปริมาณ skim milk เริ่มต้น พบว่าปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตคือ 0.8 % w/v (รูปที่ 3) เชื้อ W2 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 7-8 (รูปที่ 4) และเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30-45°C พบว่าเชื้อ W2 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C (รูปที่ 5)



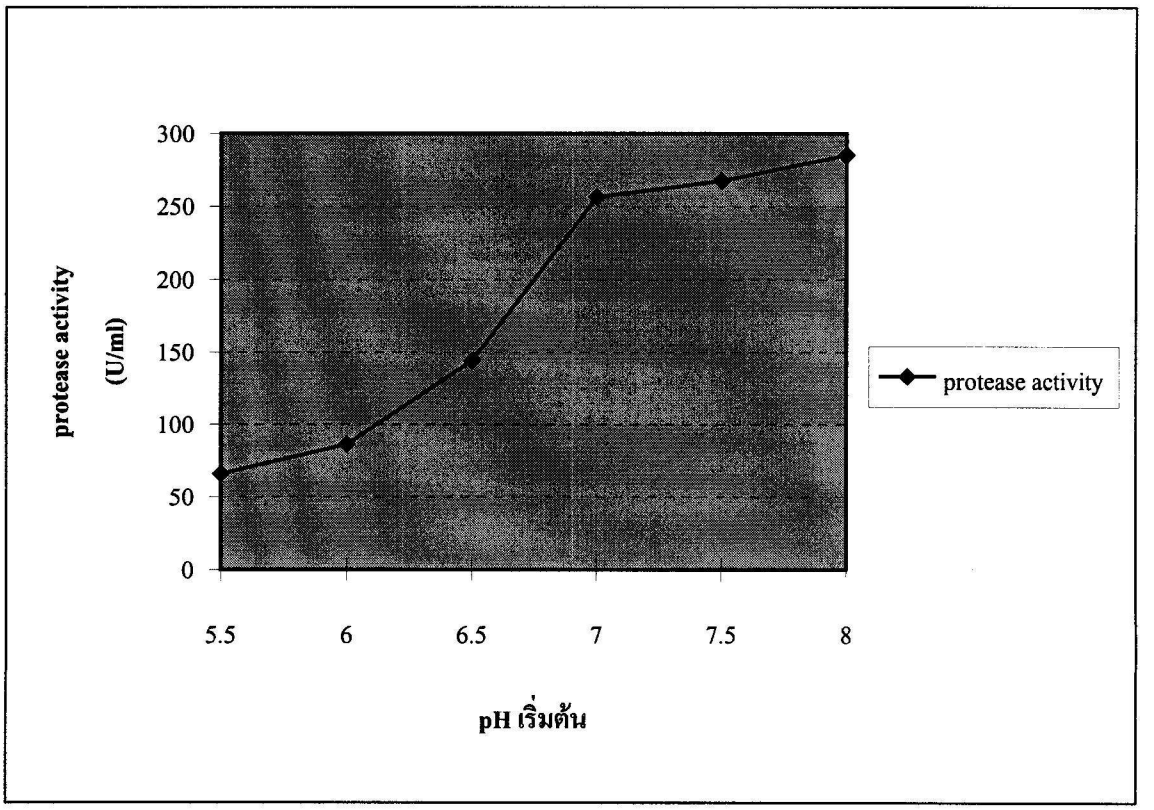
รูปที่ 1 เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการเจริญของ *Bacillus* W2, W5, W15



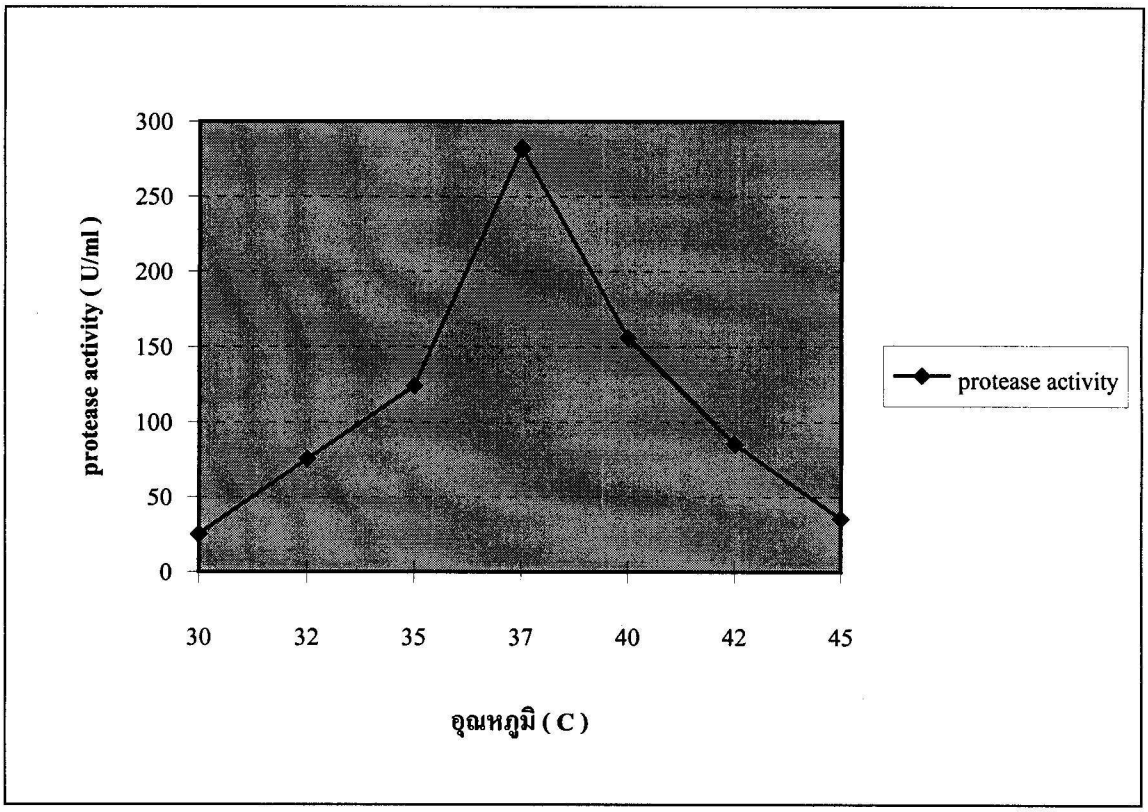
รูปที่ 2 เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ของ *Bacillus* W2, W5, W15



รูปที่ 3 ผลของปริมาณ skim milk ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร skim milk broth ที่อุณหภูมิ 37 C pH 7 ระยะเวลา 42 ชั่วโมง



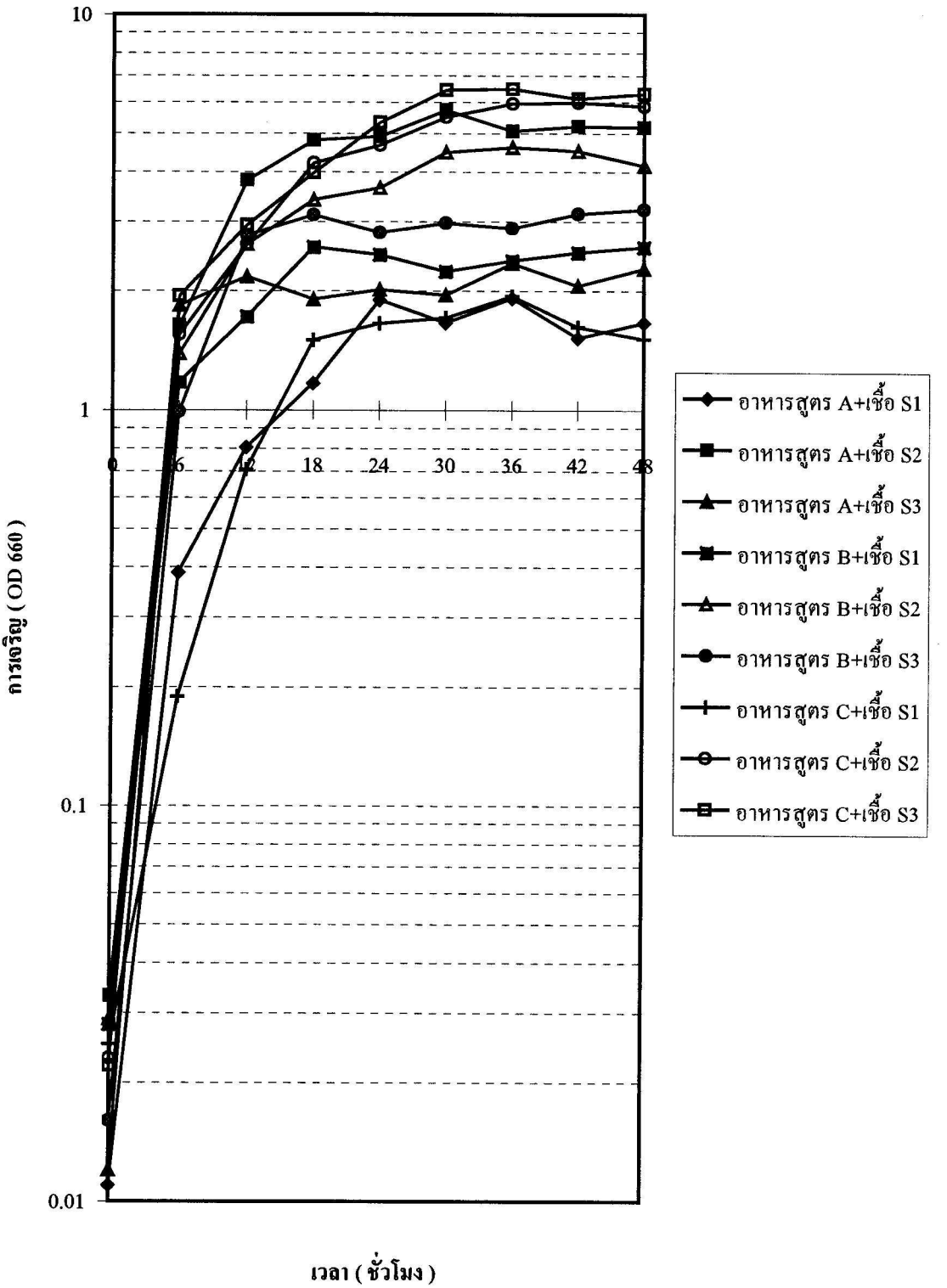
รูปที่ 4 ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร skim milk broth ที่มีความเข้มข้นของ skim milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 C ระยะเวลา 42 ชั่วโมง



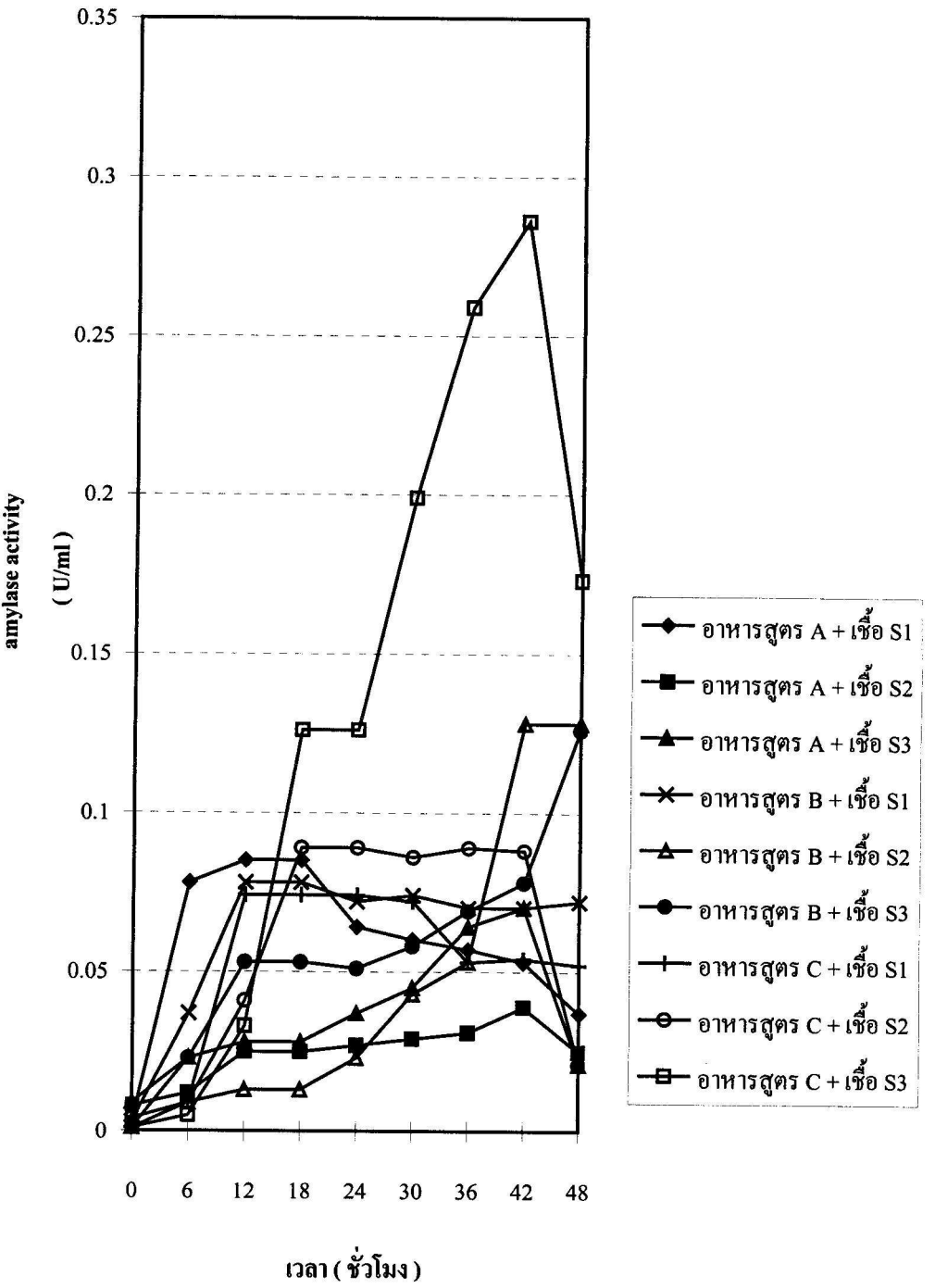
รูปที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร skim milk broth ที่มีความเข้มข้นของ skim milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลา 42 ชั่วโมง

สภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง

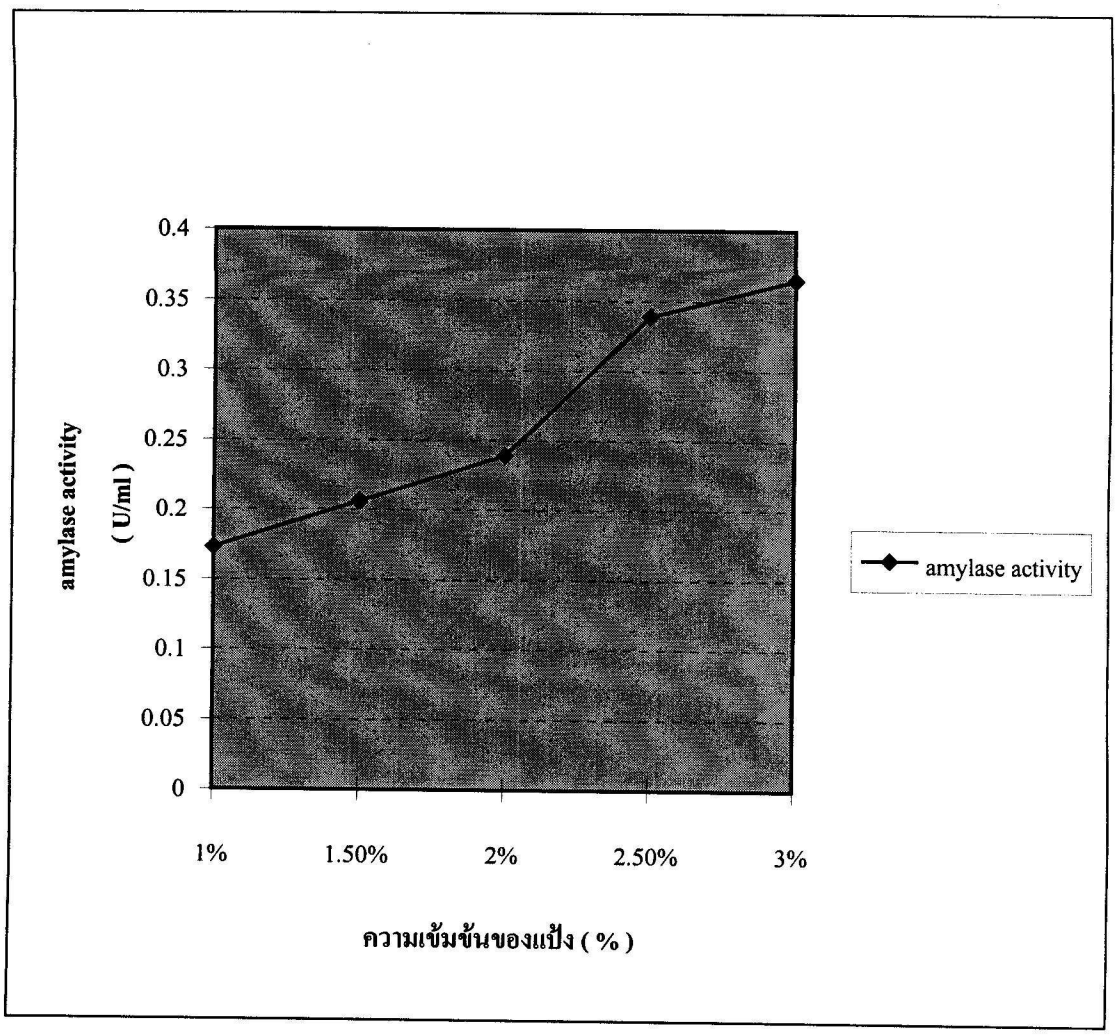
เมื่อนำแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกว่าสามารถย่อยแป้งได้คือ *Bacillus* S1, S2 และ S3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสูตรอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร โดยใส่เชื้อเริ่มต้น 2% ผลปรากฏว่า *Bacillus* S3 เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารสูตร C (รูปที่ 6) และผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุดคือ 0.3 unit/ml เมื่อบ่มเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง (รูปที่ 7) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร C ซึ่งประกอบด้วย polypeptone 4 g ,K_2HPO_4. 0.3 g, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.5 g โดยแปรผันปริมาณแป้งเริ่มต้น พบว่าปริมาณแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้สูงสูดคือ 3% w/v (รูปที่ 8) โดยไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแป้งได้เนื่องจากทำให้อาหารหนืดมากจนไม่สามารถศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่แปรผันค่า พีเอช เริ่มต้น พบว่าพีเอชที่ *Bacillus* S3 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดคือ พีเอช 7 (รูปที่ 9) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งคือ 37°C (รูปที่ 10)



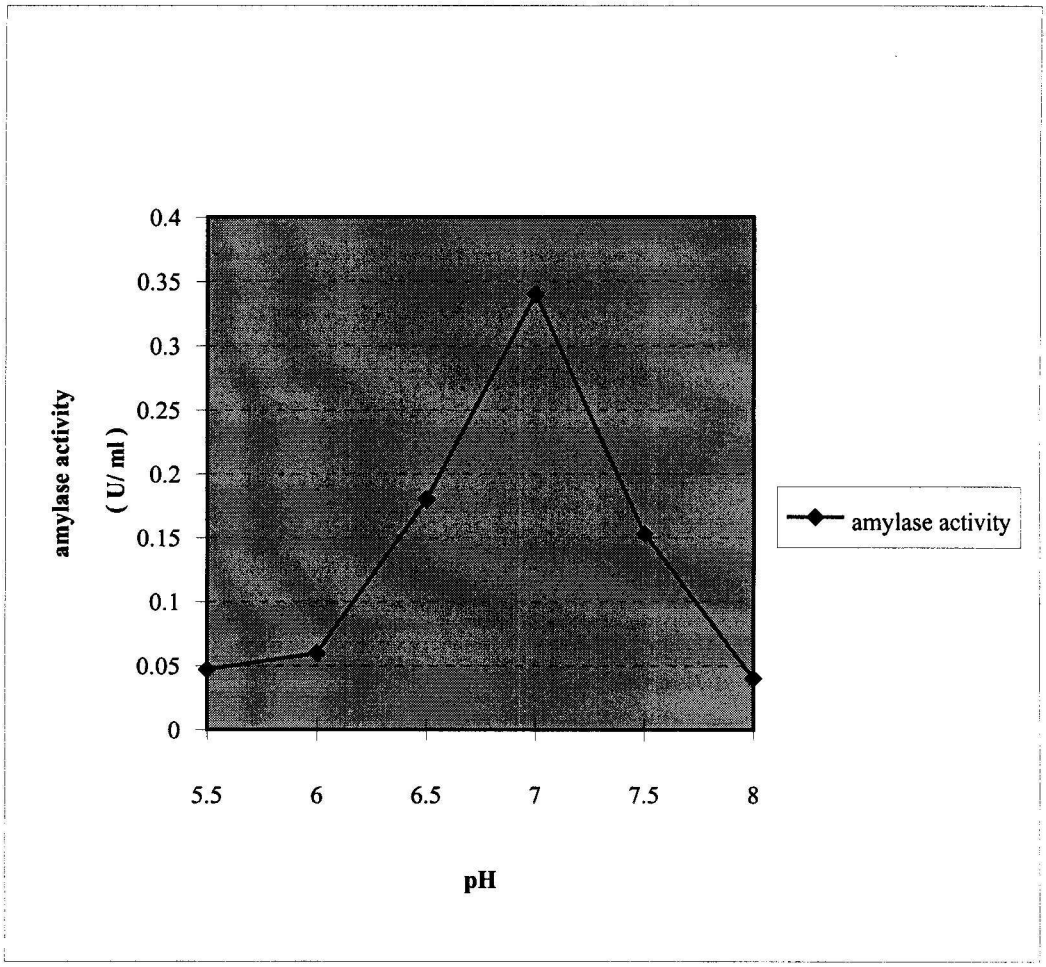
รูปที่ 6 เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการเจริญของ *Bacillus* S1, S2, S3



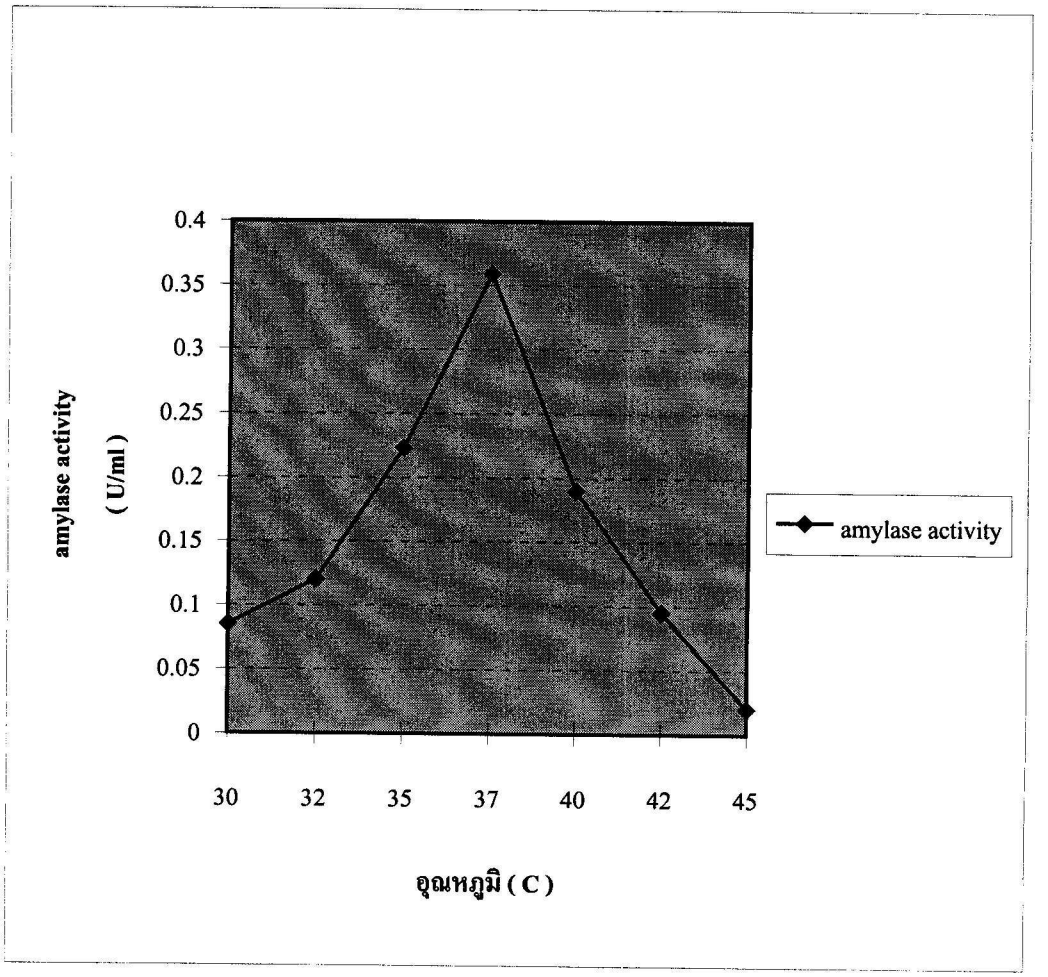
รูปที่ 7 เปรียบเทียบชนิดของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ของ *Bacillus* S1, S2, S3



รูปที่ 8 ผลของความเข้มข้นของแป้งต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร C ที่อุณหภูมิ 37 C pH 7 ระยะเวลา 42 ชั่วโมง



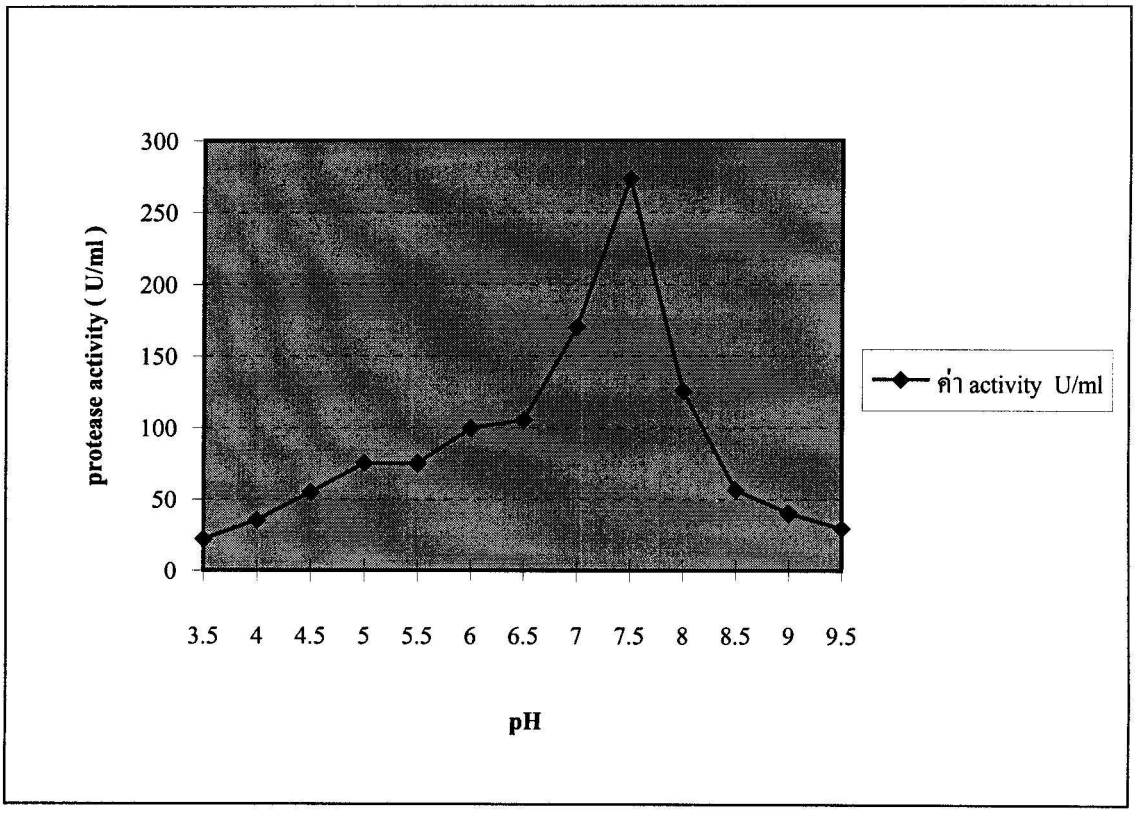
รูปที่ 9 ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร C ที่มีปริมาณแป้ง 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 C ระยะเวลา 42 ชั่วโมง



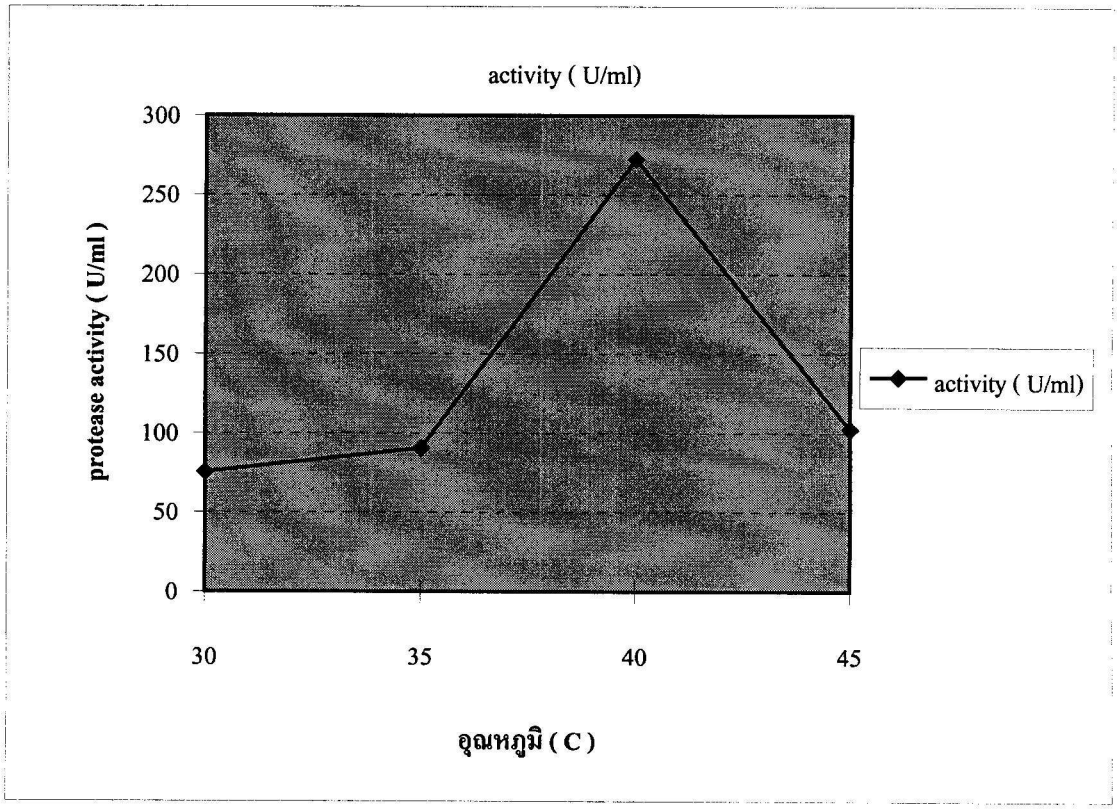
รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร C ที่มีปริมาณแป้ง 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร pH 7 ระยะเวลา 42 ชั่วโมง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* W2 ในอาหารสูตร 1. ที่มีปริมาณ skim milk เริ่มต้นคือ 0.8% w/v ที่ พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 42 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดสารละลายเอนไซม์มาตรวจหากิจกรรมการย่อยโปรตีน โดยมีการปรับพีเอช เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนจะมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.5 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน เป็น 276.63 u/ml (รูปที่ 11) แล้วทำการศึกษา อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ที่พีเอช 7.5 โดยทำการแปรผันอุณหภูมิที่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับพบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดในการย่อย ที่อุณหภูมิ 40องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์คือ 272.19 U/ml (รูปที่ 12)



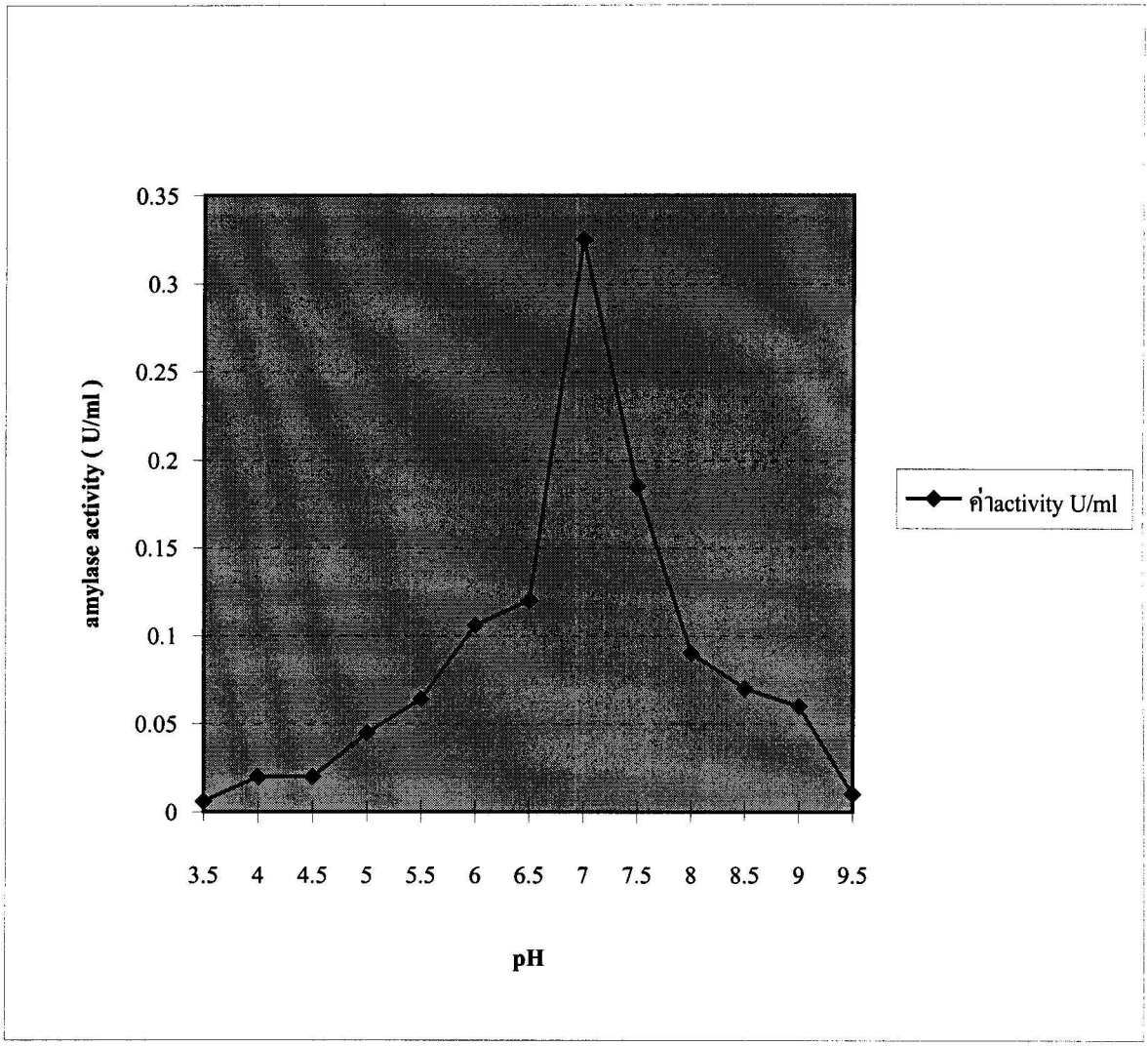
รูปที่ 11 ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2



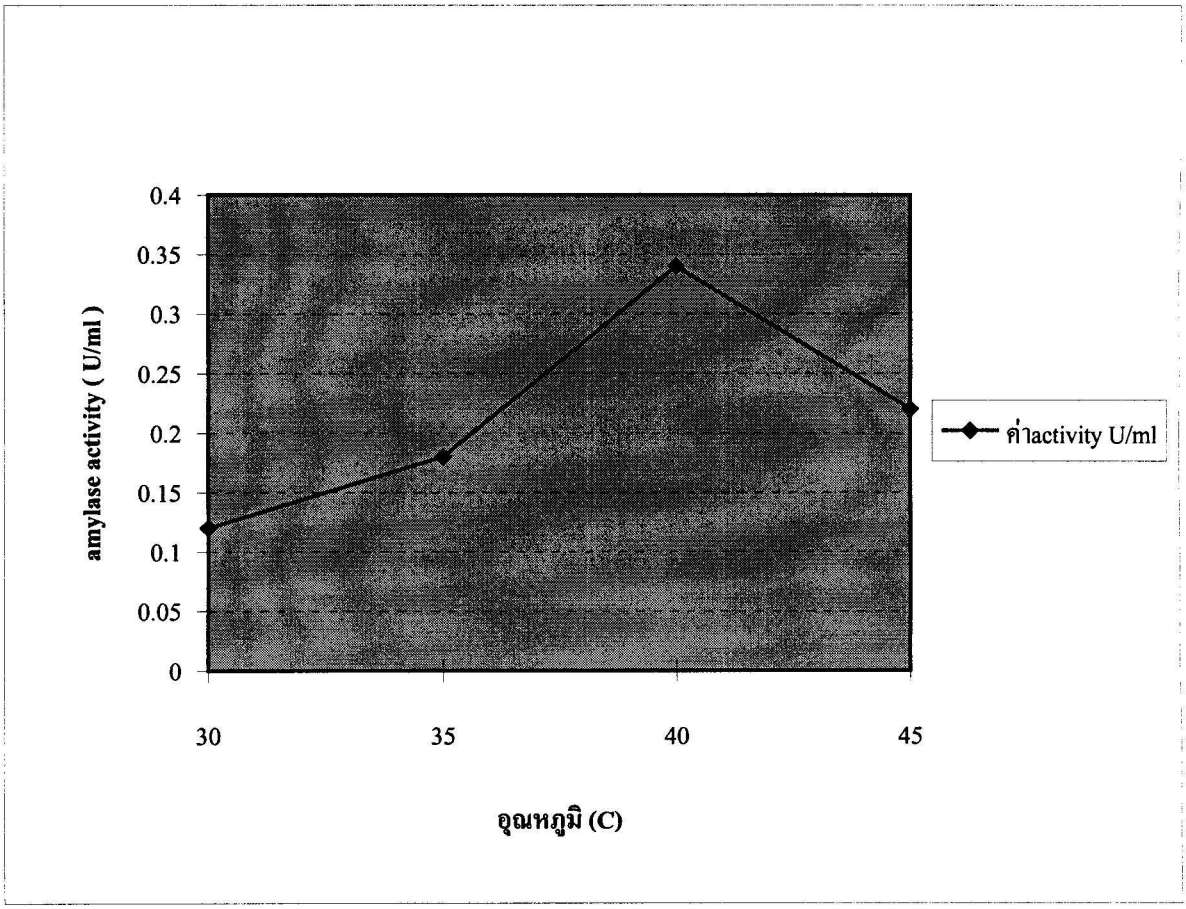
รูปที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนของ *Bacillus* W2

สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง

ผลการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งที่ผลิตโดย *Bacillus* S3 ในอาหารสูตร C โดยที่มีปริมาณแป้งเริ่มต้นคือ 3% w/v ที่ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 42 ชั่วโมง โดยทำการแปรผันคือค่า พีเอช ที่เอนไซม์ใช้ในการย่อยแป้ง ที่อุณหภูมิในการย่อยแป้งคือ 40 องศาเซลเซียส โดยมีการปรับ พีเอช เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 พบว่าเอนไซม์ย่อยแป้งจะมีกิจกรรมสูงสุดในการย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 40°C คือที่ พีเอช 7.0 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งเป็น 0.325 U/ml (รูปที่ 13) และทำการศึกษา อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยแป้งของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ พีเอช 7 โดยทำการแปรผันอุณหภูมิที่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับพบว่าเอนไซม์ย่อยแป้งจะมีกิจกรรมสูงสุดในการย่อยแป้งที่ พีเอช 7 คือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์คือ 0.34 U/ml (รูปที่ 14)



รูปที่ 13 ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3



รูปที่ 14 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งของ *Bacillus* S3

วิจารณ์การทดลอง

Bacillus W2 เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอาหาร nutrient broth ที่มี skim milk เป็นองค์ประกอบโดยใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีกิจกรรมสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร 2 ซึ่งมี tryptone, yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน และสูตร 3 ซึ่งมี $(NH_4)_2SO_4$, peptone, casein, เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นการผลิตเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็น extracellular enzyme และเป็น inducible enzyme ดังนั้นถ้าในอาหารประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้เลย เช่น กรดอะมิโน แอมโมเนีย จะทำให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดลง (Richard and Arnold, 1981; Arsenia *et. al* ,1991) *Bacillus* W2 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีในช่วง พีเอช 7-8 เช่นเดียวกับ *Bacillus* 1T (Arsenia *et al.*, 1991) ซึ่งสามารถเติบโตที่ พีเอช 7.5 เอนไซม์มีกิจกรรมได้ดีที่ พีเอช 7 ซึ่งจัดเป็น neutral protease ส่วน *Bacillus subtilis* (Ehernberg) (Noshi *et al.*, 1991) สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ พีเอช 7 และอุณหภูมิ 37°C และพบว่าแบคทีเรียเป็นพวก mesophile เช่นเดียวกับ *Bacillus* W2

Bacillus S3 เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอาหารสูตร C ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน และมี polypeptone เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร A ซึ่งมี polypeptone เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน อาหารสูตร B มี maltose เป็นแหล่งคาร์บอนและมี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงเช่นเดียวกับการเลี้ยง *Bacillus circulans* F-2 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน คือ glucose 1% , maltose 1% , maltotriose 1% จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง เป็น 0.01 unit/ml เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลขนาดเล็กนี้จะส่งผลให้เกิด catabolite repression ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง (Hiroshi *et al.*, 1987) ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็น peptone tryptone beef extract หรือ meat extract หรือ yeast extract ไม่ให้ผลแตกต่างต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของเชื้อ *Bacillus* sp. (Pratima *et al.* , 1992) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ากรดอะมิโน เช่น D, L-norvaline, β-alanine และ

methionine สามารถกระตุ้นการสร้าง α-amylase โดย *Bacillus* ได้ (Ikuru and Horikoshi, 1987) และอาจพบ *Bacillus* sp. สามารถผลิต α–amylase ได้มากกว่า 14 ชนิด (Hayashi *et al* 1988).

Bacillus S3 ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 37°C เช่นเดียวกับ *Bacillus* sp. ซึ่งรายงานโดย Pratima *et al* (1992) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงพีเอช 6-8 แต่สามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช10-11 ซึ่งในช่วงพีเอชดังกล่าวแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ต่ำมาก

โดยภาพรวมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่แยกได้จากน้ำทิ้งในการทดลองนี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 37-40°C ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิของน้ำทิ้งที่แยกเชื้อได้ในครั้งแรกคือช่วง 27.5-30°C จึงอาจยังไม่สามารถนำแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดการน้ำทิ้งหรือน้ำเสียโดยตรง แต่อาจนำมาเป็นแบคทีเรียต้นแบบในการปรับปรุงสายพันธุ์ได้เนื่องจากสามารถอยู่ทน (persist) ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

1. กรรณิการ์ สิริสิงห์. 2526. เคมีของน้ำ น้ำโสโครก และการวิเคราะห์บริษัทสยามมวลชนจำกัด กรุงเทพฯ
2. เกษม จันทร์แก้ว. 2530. วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ฉบับปรับปรุง, อักษรสยามการพิมพ์ กรุงเทพฯ.
3. เกษม จันทร์แก้ว, นิพนธ์ ตั้งธรรม, สามัคคี บุญยะวัฒน์ และวิชา นิยม. 2524. การวิจัยเกี่ยวกับการจัดการลุ่มน้ำบนภูเขา (สรุปรายงาน 15 ปี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
4. ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 46-58.
5. เบญจา พวงสุวรรณ. 2524. รายงานการวิเคราะห์ผลงานวิจัยอันดับ 6 น้ำทิ้งน้ำเสีย พ.ศ. 2523-2524 กองวิเคราะห์และประเมินผล สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน, กรุงเทพฯ.
6. สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524. การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียเนื้อย่อยแป้งมันสำปะหลัง วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
7. Anson, M.L. 1958. Estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Phys. 22:79-89.
8. Anunstrup,K., Outtrup,H., Anderson,O. and Damban, C. 1972. Protease from alkaline Bacillus species. In Proceeding of the 4th International Symposium On Fermentation Technology, Osaka, Japan, pp. 299-305.
9. Anustup, K. 1980. Proteinase. In:Rose AH(ed) Economic Microbiology. Academic Press, London, Vol. 5, pp. 49-113.

   Battaglino,.R.A., Huergo,M., Pilosof,A.M.R. and Bartholomai,G.B. 1991. Culture requirement for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Applied Microbiology and biotechnology*, Vol.35, pp. 292-296.

10. Arsenia, B. S., Shigeru, K. and Yusaku, F. 1991. Production, purification and characterization of a thermostable neutral protease from a *Bacillus* sp. (strain 1T) similar to *Thermus*. Annual Reports of IC Biotech., 14 : 187-195.

11. Bernfeld, R.D. 1955. Amylase α and β. Method in Enzymology I. Academic Press, Inc : New York.

12. Chistopher, S. and Robert, E. 1981. Molecular Enzymology. Blakie and son limited, London, pp. 310.

13. Cokowick, Sidney P. and Nathan O Kaplan. 1955. Amylase ; α and β. Methods in Enzymology I. 149-158. Ademic Press : New York.

14. Davis, B. D. 1987. Bacterial domestication : Underlying assumptions. Science 235 : 1329-1335

15. Dhandapani,R. and Vijarayagavan,R. 1994. Production of a thermophilic extracellular alkaline protease *by Bacillus stearothermophilus* AP-4. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.10, pp. 33-35.

16. Diers,I. 1976. Glucose isomerase in *Bacillus coagulans*. Continuous culture, Chichester U.K. pp. 208-225.

17. Drapeau, G.R., Boily, Y. and Houmard,J. 1972. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. Journal of Biological Chemistry, Vol. 247, pp.6720-6726.

18. Endo,S. 1962. Studies on protease by thermophilus. Hekko Kogaku Zasshi, Vol. 40, pp.346-353.

19. Feveriro,M., Zhong-Tain-Zue,Pais,M.S.S. and Brodelius,P.E. 1986. Biotechnology Letters, 8:1, pp. 19-24.

20. Fujio, Y. and Hiroshi M. 1996. Improved glucoamylase production by *Rhizopus* sp. A-11 using metal ion supplemented liquid medium. Journal of Fermentation and Bioengineering 82(6):554-557.

21. Giraud, E., Alain C. and Maurice R. 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus platarum.* Applied and Environmental Microbiology, Dec. p. 4319-4323.

22. Grueninger, H., Sonnlejtner, B., Fiechter, A. 1984. Bacterial diversity in thermophilic aerobic sewage sludge : III. A source of organisms producing heatstable industrially useful enzymes, e.g., α-amylases, Appl. Microbiol. Biotechnol. 19 : 414-421.

23. Hayashi, T., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1988. Production and purification of new maltohexose –forming amylases from alkalophilic *Bacillus* sp. H-167. Agric. Biol. Chem. 52:443-448.

24. Hiroshi, S., Hajime, T. and Yoshiharu, M. 1987. Regulation of amylase synthesis in *Bacillus circulans* F-2. Agric. Biol. Chem., 51 : 1521-1527.

25. Ikura, Y., Horikoshi., K. 1987. Effect of amino conpounds on alkaline amylase production by alkalophilic *Becillus* sp. J. Ferment Technol. 65 : 707-709.

26. Klapper,B.F. and Jameson, D.M. 1973. Factor effecting the synthesis and release of the extracellular protease of *Aspergillus oryzae* NRRL 2160. *Biochim.Biophys*, Acta 304, pp. 513-519.

27. Krumme, M.L., Smith R.L., Fgestorff J., Thiem. S.M., Tiedje. J.M., Timmis. K.N., and Duyer. D.F. 1994. Behavior of pollutant-degrading microorgamisms in aquifers : predictions for genetically engineered organisms Environ. Sci. Technol. 28 : 1134-1138.

28. Lin,L.L., Tsau, M.R. and Chu, W.S. 1994. General characteristics of thermostable anylpullulanases and amylases from the alkalophilic *bacillus* sp. TS-23 Biotechnology letters. 11 (5) : p 350-365.

29. Loffler,T. and Alicia,L. 1986. Proteolytic Enzyme:Source and Application. *Journal of food technology*, Vol. 21, pp. 60-63.

30. Martin, A. 1977. Microbiology of Other Polysaccharides. Introduction to Soil Microbiology. Inc:America:John Wiley & Sons.

31. Mckee,J.E. and Wolf, H.W. 1971. Water Quality Criteria. 2nd ed.The Resource Agency of California State Water Resource Control Board, California, U.S.A.

32. Nelson, N. 1944. A Photometeric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. of Biol. Chem. 153:375-380.

33. Nemerow, N.L. 1974. Scientific Stream Pollution Analysis. McGraw-Hill,Inc., New York.

34. Noshi, M., Margarita, A.M., Susana, M. M., Teresita, M. E., Masaaki, S., Kazuo, I. and Masaru I. 1991. Production and utilization of proteolytic enzymes of *Bacillus subtilis* (Ehernberg) Cohn BIOTECH 1333. Annual Reports of IC Biotech., 14 : 420-422.

35. Okazaki, N., Seinosuke, S. and Toshio, T. 1980. Mathematical Model for Surface Culture of Koji Mold. J. Ferment. Technol. 58(5) : p 471-476.

36. Pratima, B., Rajesh, K.G. and Pramod, K.B. 1992. Optimization studies for the production of α-amylase using cheese whey medium. Enzyme Microb. Technol., 14:679-682.

37. Richard, P.E. and Arnold, L.D. 1981. Genetics of microorganisms in relation to industrial requirements. **In** : Biotechnology : Microbial Fundamental. Ed. H.J. Rehm and G. Reed. Verlag Chemie, Florida, pp.233-277.

38. Ried,G.K. 1961. Ecology of Inland Water and Esturies. Reinhold Plublishing Corporation Chapman and Hall, Ltd., New York.

39. Shinke, R., Kenji, A. and Hiroshi, N. 1977. Fermentation and β-amylase in *B. cereus*. J. Ferment. Technol. 55(2) : p103-109.

40. Shinke, R., Kenji, A., Hiroshi, N. and Shohachiro, Y. 1979. Isolation of a rifampin-resistant, asporogenous mutant from *Bacillus cereus* and its high β-amylase Productivity. J. Ferment. Technol. 57(1):p53-55.

41. Steele, D.B. and Stower, MD. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. Annu. Rev. Microbiol. 45:89-106.

42. Sunna, A. And Fuad, H. 1990. Thermostable amylase form anaerobic, gram-negative, non-spore forming thermophilic bacteria. Biotechnology letters. 12(6) : p 433-438.

43. Teufel, P. and Gotz, F. 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermis. Journal of Bacteriology*, Vol. 175, No. 13, pp. 4218-4224.

44. WHO. 1992. Our planet, our health, report of the WHO commission on health and environment. World Health Organization, Geneva.

45. Wind, L.D., Buitelaar, R.M., Eggink, G., Huizing, H.J. and Dijkhuizen, L. 1994. Characterization of a new *Bacillus stearothermophillus* isolate : a highly thermostable α-amylase-producing stain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 155-162.

46. Winkelmann, G. 1992. Microbial degradation of natural products. VCH, Wenhim, p.36-37.

47. Woods, F.C. and Kinsella,J.E. 1980. Protease from *Saccharomyces carlsbergensis*: activity on food protein. *Journal food science*, Vol.45, pp. 120-125.

48. Xinyu, T., Yanhe, M., Peijin, Z. and Cazhen, W. 1991. Studies on alkaline amylase form alkalopilic bacterium. ACTC. Microbiol. 31(5) : p. 364-370.

ภาคผนวก ก.
การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยการดัดแปลงจากวิธีของ Anson (1958) โดยบ่มสารละลายสับเสตรท (casein) ความเข้มข้น 1.5 % พีเอช 8 ปริมาตร 1 มล. ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที เติมตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ 1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37° C นาน 10 นาที หยุดปฏิกริยาด้วย Trichloroacetic acid ความเข้มข้น 0.44 M ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 0.5 มล. ทำให้เป็นกลางด้วย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 0.44 M ปริมาตร 2.5 มล. เติม Folin-Ciocalteu's reagent ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank สำหรับการทดลองชุดควบคุมให้เติม TCA 2 มล. ลงในสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากันจากนั้นเติมสารละลายเคซีน 2 มล. แล้วทำตามวิธีดังกล่าวมาข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองหักลบกับชุดควบคุมแล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน ที่มีความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากกราฟมาตรฐานดังกล่าว โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนแล้วให้ไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมล. ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ภาคผนวก ข.

การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง

โดยบ่มสารละลายสับสเตรท soluble starch ความเข้มข้น 1 % พีเอช 7 ปริมาตร 1 มล. ที่อุณหภูมิ 40 ° C นาน 5 นาที เติมตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ 1 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 10 นาที เติมสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที เติมน้ำกลั่น 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank สำหรับการทดลองชุดควบคุมให้เติม DNS ปริมาตร 2 มล. ลงในสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติม soluble starch 1 มล. แล้วทำตามวิธีดังกล่าวมาข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองหักลบกับชุดควบคุมแล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลมอลโตส ที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัมต่อมล. ตามลำดับ คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง จากกราฟมาตรฐานดังกล่าว โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยแป้ง หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง 1 % ให้ได้น้ำตาลมอลโตส 1 มิลลิกรัม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ภาคผนวก ค.
การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. การหาค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำที่จะหาค่า DO
2. ขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร
3. flask ขนาด 500 มิลลิลิตร
4. บิวเรต (burette) ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. กระบอกตวงขนาด 200-250 มิลลิลิตร
6. Reagents
   - 6.1 สารละลายแมงกานัสซัลเฟต (Manganous sulfate solution)
   - 6.2 สารละลาย Alkaline-iodide-azide
   - 6.3 กรดซัลฟูริคเข้มข้น
   - 6.4 น้ำแป้ง
   - 6.5 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 N
   - 6.6 สารละลายโปตัสเซียมไดโครเมท 0.025 N

การหาค่ามาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตด้วยสารละลายโปตัสเซียมไดโครเมท

1. ละลาย KI 2 กรัม ใน flask ที่มีน้ำกลั่น 100-150 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายโปตัสเซียมไดโครเมท 0.025 N จำนวน 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่มือ 5 นาที
3. เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร

4. ติเตรทไอโอดีนที่เกิดขึ้น ด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ จะเติมน้ำแป้งลงไปเมื่อใกล้ถึงจุดยุติ ซึ่งสังเกตจากสีของสารละลายเป็นสีฟางข้าว ถ้าสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตมีความเข้มข้นพอดี 0.025 N ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการติเตรท จะเท่ากับ 20 มิลลิลิตรพอดี

$$\text{Normality ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต} = \frac{a \times N}{20}$$

เมื่อ a = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ (ml)

N = Normality ของสารละลายโปตัสเซียมไดโครเมท

1. เติมสารละลายแมงกานัสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร ลงไปใต้ผิวน้ำ ของตัวอย่างน้ำที่เก็บในขวด BOD ขนาด 300 มิลลลิตร

2. แล้วเติมสารละลาย alkali-iodide-azide ตามลงไปทันที ให้ถือปิเปตไว้ใต้ผิวน้ำ

3. ปิดจุกขวดให้แน่นและเขย่าแรง ๆ โดยกลับขวดไปมา ประมาณ 15 ครั้ง เมื่อวางลงปล่อยให้ตะก่อนนอนก้น จะสังเกตเห็นข้างบนเป็นน้ำใส ข้างล่างเป็นตะกอน เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นลงไป 2 มิลลิลิตร ให้กรดไหลลงไปตามคอขวด

4. ปิดจุกขวดให้และเขย่ากลับไปกลับมา จนตะกอนละลายหมด

5. ตวงสารละลายที่ได้ 203 มิลลิลิตรใส่ลงใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรที่ใช้ในการติเตรทนี้ให้แทนปริมาตรของตัวอย่างจริง ๆ เท่ากับ 200 มิลลิลิตร ทั้งนี้ เนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างน้ำถูกแทนที่ด้วยสารละลายแมงกานัสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร และสารละลาย alkali-iodide-azide 2 มิลลิลิตร ซึ่งเติมลงในขวดขนาด 300 มิลลิลิตร

ดังนั้นปริมาตรที่ใช้ในการติเตรทจึงเท่ากับ $\frac{200 \times 300}{(300-4)} = 203$ มิลลิลิตร

6. ติเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 N จนได้สีเหลืองอ่อน ๆ แล้วเติมน้ำแป้งลงไป 1-2 มิลลิลิตร ติเตรทต่อจนกระทั่งสีน้ำเงินกลายเป็นไม่มีสี

7. คำนวนค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำของตัวอย่างมีค่าเป็น มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้หลักว่า มิลลิลิตรของ 0.025 N โซเดียมไธโอซัลเฟต จะสมมูลย์กับออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 0.200 มิลลิกรัม ดังนั้น 1 มิลลิลิตร ของโซเดียมไธโอซัลเฟตจะเท่ากับ มิลลิกรัม/ลิตร ของ

ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เมื่อใช้ตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร (หรือตัวอย่างซึ่งเติมน้ำยาเคมีแล้ว 203 มิลลิลิตร)

2. การหาค่า Biochemical Oxygen Demand (BOD)

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์
2. ขวด BOD ขนาด 300 ลบ.ซม.
3. กระบอกตวงขนาด 1 ลิตร
4. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
5. flask ขนาด 500 ลบ.ซม.
6. ตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 + 1 องศาเซลเซียส
7. Reagents ต่าง ๆ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาค่า DO

วิธีการ

1. ปรับอุณหภูมิของน้ำให้ได้ประมาณ 20 องศาเซลเซียส
2. เติมออกซิเจนลงในน้ำโดยการพ่นอากาศลงไป แล้วเติมน้ำนั้นลงในขวด BOD 2 ขวดให้เต็ม
3. นำขวดที่ 1 มาหาค่า DO ของจุดเริ่มต้นหรือวันที่ศูนย์
4. ขวดที่ 2 นำไปบ่มในที่มืออุณหภูมิ 20 + 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และทำการวิเคราะห์หาค่า DO ของวันที่ 5
5. คำนวณค่า BOD จากสมการ $BOD_5 = DO_0 - DO_5$

3. การหาค่า Chemical Oxygen Demand (COD)

อุปกรณ์

1. Reflux apparatus ประกอบด้วยขวด COD ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่คอทำด้วย ground glass ขนาด 20/40 และ condenser ยาว 300 มิลลิลิตร Jacket Liebig ซึ่งมีข้อต่อทำด้วย ground glass ขนาด 24/40 เช่นกัน

2. Hot plate

3. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร

4. ตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์ COD

5. glass beeds

6. pipette

7. volumetric pipette

8. กระบอกแก้วตวงขนาด 50dมิลลิลิตร

9. น้ำยาเคมี

   9.1 สารละลายมาตรฐานโปรตัสเซียมไดโครเมท 0.250 N

   9.2 Sulfulic acid reagent

   9.3 เฟอร์โรอิน อินดิเคเตอร์

   9.4 สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.10 N

   9.5 Mercuric sulfate ผนึกหรือผง ($HgSO_4$)

   9.6 สารละลายโปตัสเซียมโฮโดรเจนฟอสเฟต

วิธีการ

1. ใส่ตัวอย่างน้ำ 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรีฟลักซ์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม $HgSO_4$ 1 กรัมพร้อมด้วย glass beeds 5 เม็ด เติม sulfulic acid reagent 5 มิลลิลิตร โดยเติมอย่างช้า ๆ พร้อมกับเขย่าเพื่อให้ $HgSO_4$ ละลาย ขณะที่เติมกรดควรนำไปแช่ในอ่างน้ำเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญหายไปของสารที่ระเหยได้ในน้ำตัวอย่าง

2. เติมสารละลายโปตัสเซียมไดโครเมท 0.250 N ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งแล้วสวมขวดรีฟลักซ์เข้ากับเครื่อง condenser เปิดให้น้ำเย็นไหลผ่าน เติม sulfuric acid reagent ผ่านทางปลายเปิดของ condenser อีก 25 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เขย่า เพื่อให้

ของผสมในขวดรีฟลักซ์เข้ากันดี ก่อนที่จะเปิด hot plate ให้ความร้อน มิฉะนั้นความร้อนจะทำให้ของผสมพุ่งออกจาก condenser

3. รีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปิด hot plate แต่ยังไม่ปิดน้ำเย็น วางจนกระทั่งของผสมเย็นลง ล้างท่อ condencer ด้วยน้ำกลั่น ปลดขวดรีฟลักออกและเติมน้ำกลั่นอีกเท่าตัว ปล่อยให้เย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง

4. ติเตรท $K_2Cr_2O_7$ ที่เหลือด้วย FAS โดยใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ถือเอาจุดที่เปลี่ยนจากสีเขียวน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลแดงเป็นจุดยุติ

5. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างให้ปริมาตรเท่ากัน ใช้น้ำยาเคมีและรีฟลักซ์เหมือนกันทุกประการ

6. คำนวณ $COD\ (mg\ O_2/L) = \dfrac{(A - B) \times N \times 8{,}000}{ml.sample}$

เมื่อ A = ml. ของ FAS ที่ใช้ในการติเตรท blank

B = ml. ของ FAS ที่ใช้ในการติเตรทตัวอย่าง

N = Normality ของ FAS ที่ใช้ในการติเตรท

4. การตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำด้วยวิธี pour plate หรือ standard plate count

อุปกรณ์

1. Plate count agar
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
3. sterile pipette
4. sterile petre dish
5. ตัวอย่างน้ำ
6. Water bath

วิธีการ

1. เขย่าตัวอย่างประมาณ 25 ครั้ง แล้วใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำ ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ได้ 10^{-1}-10^{-5}

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นใส่ใน petri dish ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร

3. เท melted plate count agar ลงใน petri dish แล้วหมุนจานไปในทิศทางที่ทวนเข็มนาฬิกาและตามเข็มนาฬิกา เพื่อให้ตัวอย่างน้ำผสมกับอาหารกระจายไปทั่วจานเพาะเชื้อ

4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อาหารแข็งตัว

5. เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้ว บ่มเชื้อใน incubater 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

6. หลังจากครบกำหนด นำ petri dish มานับโคโลนี โดยเลือกนับจานที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนแบคทีเรียต่อตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร โดยมีหน่วยเป็น cfu ต่อ ml (cfu = colony forming unit)