รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ และคณะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

31 ตุลาคม 2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ และคณะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

31 ตุลาคม 2544

23 ต.ค. 2547
I2365484

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ผศ. นภา ศิวรังสรรค์ สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์ สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ผศ.ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ

Executive summary

Amylase, protease, lipase, cellulase and xylanase treated the various stages of cotton fabric preparation process. Amylase was not appropriate for desizing. Therefore, thermotolerant amylase was suggested to replace the produced amylase in desizing at high temperature. In scouring, protease and lipase were worked as well as sodium hydroxide treatment to make a good absorbency like commercial enzyme. Xylanase and cellulase were good enough to bleach the cotton fabric.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ วศ
ตท 15
เลขทะเบียน 011522
วัน,เดือน,ปี 26 พ.ค. 46

บทคัดย่อ

การผลิตแอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ขนาด 5 ลิตร สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ระดับขวดเขย่าประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมคือแป้งมันสำปะหลัง 0.5% และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05%, KH_2PO_4 0.3% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v) และ$CaCl_2.2H_2O$ 0.017% (w/v) ภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 rpm การผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 5 ลิตรมีสูตรอาหารเหมือนกับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า โดยมีภาวะควบคุมเพิ่มเติมคือปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 (v/v) และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm การกรองด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่นและตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.5 เท่า เอนไซม์ที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 และ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใน 0.2M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 35 นาที และ 60 นาที เมื่อไม่มีการเติม และเติมแคลเซียมคลอไรด์ 5 mM ตามลำดับ ค่า Km และ Vmax ของการย่อยแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 0.65 mg/ml และ 2.78 x 10^{-2} nmol/min เอนไซม์ผงและเอนไซม์เหลวสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 และ 4 องศาเซลเซียส โดยสูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยเมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 8 เดือน

Bacillus subtilis TISTR 25 สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05% (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001% (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.1% (w/v), และกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3% (v/v) ในปริมาตรทั้งสิ้น 3.5 ลิตร ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสคือ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 174.82 ยูนิต/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 84

Pseudomonas aeruginosa สามารถผลิตไลเปสได้เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), Fructose 2% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v) และ Yeast extract 0.01% (w/v) ในปริมาตรทั้งสิ้น 4 ลิตร ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักในการผลิตไลเปสคือ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที, อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงสุด 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 นำเอนไซม์มากรองด้วยวิธีอัลตรา

ฟิลเตรชั่น และทำให้เป็นผงด้วยวิธีไลโอฟิไลเซชั่น ได้แอคติวิตีของเอนไซม์ผงเท่ากับ 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *T.reesei* สายพันธุ์ QM, สายพันธุ์ C และเชื้อ *A.pullulans* พบว่า *T.reesei* สายพันธุ์ QM ผลิตเอนไซม์หลักคือเซลลูเลสได้แอคติวิตีสูงสุด 0.296 U/ml ขณะที่มีไซแลนเนสเพียงเล็กน้อย (0.089 U/ml) *T.reesei* สายพันธุ์ C ผลิตเอนไซม์ผสมทั้ง 2 ได้ดีมากคือเซลลูเลสสูงที่สุด 5.365 U/ml ขณะที่ *A.pullulans* ผลิตไซแลนเนสเป็นหลักได้ถึง 7.344 (U/ml) แต่ผลิตเซลลูเลสได้น้อยมากในระดับ 0.091 U/ml ดังนั้นจะเห็นได้ว่า *T.reesei* สายพันธุ์ C เหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์ผสมที่มีแอคติวิตีของทั้ง 2 เอนไซม์ได้ดีที่สุด เมื่อนำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 80% ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มี endoglucanase สูงกว่า exoglucanase และ β-glucosidase อยู่มาก เนื่องจากเชื้อ *T.reesei* สายพันธุ์ C เป็นเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองจึงได้มีการเพิ่มกำลังการผลิตเป็นขนาด 1 ลิตร และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จาก *T.reesei* สายพันธุ์ C คือที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสดีที่สุด โดยเฉพาะ endoglucanase มีแอคติวิตีสูงที่สุด

การนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ทั้งห้าชนิดมาใช้ในขั้นตอนต่าง ๆ ในการเตรียมผ้า สำหรับการ*ลอกแป้ง เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นไม่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการลอกแป้งบนผ้าทอ จำเป็นต้อง*ใช้เอนไซม์อะไมเลสที่สามารถลอกแป้งที่อุณหภูมิสูงได้ ในส่วนขั้นตอนการกำจัดสิ่งสกปรกสามารถใช้เอนไซม์กำจัดสิ่งสกปรกได้ผลดีเทียบเท่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสามารถใช้เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นกำจัดสิ่งสกปรกได้ผลดีในแง่การดูดซึมน้ำเทียบเท่าการใช้เอนไซม์ที่จัดหามาสำหรับการฟอก เอนไซม์ที่ใช้ฟอกผ้ายังมีประสิทธิภาพการฟอกให้ผ้าขาวไม่เท่าการฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวที่สามารถฟอกผ้าให้ขาวได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

The production of extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* TISTR 25 was determined in a shaking flask and a 5-liter batch fermenter. The optimal composition for the enzyme production in the shaking flask contained KH_2PO_4 0.3% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.017% (w/v), 0.5% cassava starch and soybean meal hydrolysis in H_2SO_4 with nitrogen content 0.05% as the appropriate carbon and nitrogen sources, respectively. The optimal condition for pH, temperature and agitation were 7.0, 37°C and 250 rpm, respectively. Medium compositions for the enzyme production in 5-liter batch fermenter were the same as in the shaking flask. The optimal conditions for culturing were as follow: 1.0%(v/v) of inoculum and aeration rate at 1.0 vvm. Alpha-amylase from *Bacillus subtilis* TISTR 25 was partial purified about 3.5 folds by ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation, respectively. This enzyme possessed its maximum dextrinizing activity at pH 7.0 and 60°C. The half-life of the partial purified enzyme was 35 minutes at 60°C in 0.2M phosphate buffer pH 7.0, and over 60 minutes in the same buffer with 5 mM calcium chloride. The Km and Vmax value for potato soluble starch were 0.65 mg/ml and 2.78 x 10^{-2} nmol/min, respectively. The activity of enzyme powder and liquid form were slightly decreased when stored at –20 and 4°C for 8 months.

Bacillus subtilis TISTR25 can produce high amount of alkaline protease in 5-liter fermenter. Culture medium contains KH_2PO_4 0.1% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05% (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001% (w/v), Cassava starch 0.1 % (w/v) and mixture of soybean meal and sunflower seed meal with nitrogen content 0.3% (v/v) in total volume of 3.5 liter. The optimal conditions for culturing were as follows: inoculum size at 0.5% (v/v), aeration rate at 1 vvm, agitation speed of 250 rpm, temperature at 37°C and initial pH at 7.0. This strain can produce the highest amount of alkaline protease 174.82 unit/gram cell dry weight at 84 hours.

Pseudomonas aeruginosa produced a high amount of lipase in 5-liter fermenter. Culture medium contains $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), Fructose 2% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v) and Yeast extract 0.01% (w/v) in total volume of 4 liter. The optimal conditions for culturing were as follows: inoculum size at 0.5% (v/v) of the culture volume, aeration rate at 1.0 vvm, agitation speed of 250 rpm, temperature at 37°C and control pH at 7.0. This strain can produce the high amount of lipase 1,476.50 unit/ml. at 48 hours. The enzyme was filtrated by ultrafiltration and made in powder form by lyophilization. The specific activity of powder enzyme was 98.04 unit/mg powder.

Screening of bacteria producing cellulase and xylanase was performed on 3 strains of microorganisms, *T.reesei* strain QM, strain C and *A.pullulan*. Strain of *T.reesei* QM was major produced a high amount of cellulase 0.296 U/ml and xylanase 0.089 U/ml. *T.reesei* C produced high amount of cellulase 5.365 U/ml and xylanase was high too. While *A.pullulans* produced xylanase 7.344 U/ml but low amount of cellulase 0.091 U/ml. From the results, *T.reesei* C produced both enzymes with high activity. Enzymes from *T.reesei* C was partial purified by 80% ammonium sulphate precipitation to get a higher activity of endoglucanase than exoglucanase and β-glucosidase. Production of cellulase and xylanase from *T.reesei* C was scale-up to 1-L shaking flask and 5-L batch culture fermenter. The optimal conditions for enzyme production were as follows: temperature at 60°C and control pH at 5.0 especially for high endoglucanase activity.

The application of enzymes to use in various stages of cotton fabric preparation process. Amylase produced by *B.subtilis* TISTR25 was not appropriate for desizing. Therefore, thermotolerant amylase was suggested to replace the produced amylase in desizing at high temperature. In scouring, the enzymatic treatment was work as well as sodium hydroxide treatment. And the produced enzymes made a good absorbency like commercial enzyme. Unlike the hydrogen peroxide, the enzymatic treatment was not good enough to bleach the fabric. And glucose oxidase was the only enzyme which improved the whiteness of fabric.

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

Project: การผลิตอะไมเลสในระดับขวดเขย่าและถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 5 ลิตร

ผู้วิจัย

ผศ. นภา ศิวรังสรรค์

ผู้ช่วยวิจัย

วันทนา พินัยกุล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
1. บทนำ	1
2. ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	5
3. วิธีการทดลอง	6
4. ผลการทดลอง	11
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	33
รายการอ้างอิง	41
ภาคผนวก	44
ภาคผนวกที่ 1. การเตรียมสารละลาย	44
ภาคผนวกที่ 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	46
ภาคผนวกที่ 3. การสร้างวงใส	47
ภาคผนวกที่ 4. กราฟมาตรฐาน	47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1. ข้อมูลการนำเข้าเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี 1995-2001.....4
2. การทดสอบความสามารถในการสร้างวงใสของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ และ*Bacillus subtilis* TISTR 25.....12
3. การทำให้อะไมเลสบริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่าง ๆ.....27
4. เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร.....39
5. ต้นทุนของการผลิต(ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร).....39
6. เปรียบเทียบสมบัติอะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับเอนไซม์ทางการค้า...39

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อที่คัดเลือกได้ และ*Bacillus subtilis* TISTR25 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....13
2. เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันแหล่งคาร์บอน.....13
3. เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันปริมาณคาร์บอน.....16
4. เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันแหล่งไนโตรเจน.....16
5. เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันปริมาณไนโตรเจน.....17
6. เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันค่า pH.....17
7. เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันอุณหภูมิ.....18
8. เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันอัตราการกวน.....18
9. เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้น.....22
10. เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันปริมาณคาร์บอน.....22
11. เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันปริมาณไนโตรเจน.....22
12. เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันค่า pH 23
13. เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันอุณหภูมิ.....23
14. เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันอัตราการกวน.....23

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15.	เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมักแปรผันอัตราการให้อากาศ	23
16.	ลักษณะโครมาโตแกรมของน้ำตาลมาตรฐาน	25
17.	ลักษณะโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ ที่เกิดขึ้นจากการย่อย 0.2% soluble starch ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาต่างๆโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	25
18.	แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ	27
19.	แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ	28
20.	ความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	28
21.	ปริมาณกลูโคส (นาโนโมล) ที่เกิดขึ้นจากการบ่มสับเสตรทความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน	30
22.	Lineweaver-Burk Plot ของแอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25	30
23.	ปริมาณกลูโคส (นาโนโมล) ที่เกิดขึ้นจากการบ่มสับเสตรทกับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน	31
24.	ผลของความเข้มข้นของแอลฟา-อะไมเลสที่มีต่อความเร็วในการย่อยแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 7.0	31
25.	ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของเหลวที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 241 วัน	32
26.	ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปผงที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 241วัน	32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

°C	องศาเซลเซียส
g	กรัม
μmol	ไมโครโมล
μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร
mg	มิลลิกรัม
M	โมลาร์
ml	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
nm	นาโนเมตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร
rpm	รอบต่อนาที
U/mg	ยูนิตต่อมิลลิกรัม
HPLC	high performance liquid chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อะไมเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะ α-1,4ของสายโพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง หรือไกลโคเจน ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม และให้ผลผลิตเป็นกลูโคส มอลโตส และเดกซ์ทริน อะไมเลสนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร สิ่งทอ กระดาษ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอะไมเลสได้มีหลายประเภทได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่นิยมนำมาผลิต ได้แก่ *Bacillus stearothermophilus* MFF4 (Wind และคณะ, 1994) *Bacillus thermooleovorans* NP 54 (Malhotra และคณะ, 2000) *Bacillus* sp.WN 11 (Mamo และ Gessesse, 1999) *Bacillus licheniformis* (Medda and Chandra, 1980) *Bacillus flavothermus*(Bolton และคณะ, 1997) และ *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 (Bajpai และ Bajpai, 1987)

1. ประเภทของอะไมเลส (แบ่งตามความสามารถในการเข้าทำลายพันธะในโมเลกุล)

1.1 เอนโดอะไมเลส (Endoamylase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งที่พันธะ α-1,4 กลูโคซิดิกแบบสุ่ม ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโตส และเดกซ์ทริน ถ้าการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้มอลโตส และกลูโคส เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส และพูลลูลาเนส

1.2 เอกโซอะไมเลส (Exoamylase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งจากด้าน non-reducing ได้แก่ บีตา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

2. แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase)

แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) หรือ α-1,4–glucan 4-glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกลูโคสที่เชื่อมกันแบบ α-1,4 กลูโคซิดิกของอะไมโลส อะไมโลเพกทิน และไกลโคเจน แต่ไม่สามารถย่อยสลายกลูโคสที่เชื่อมกันแบบ α-1,6 กลูโคซิดิก สมบัติโดยทั่วไปจัดเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายได้เฉพาะภายในโมเลกุลของแป้ง (endo-acting-enzyme) มีผลทำให้ความหนืดของแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว และการเปลี่ยนสีของไอโอดีนที่ทำปฏิกิริยากับแป้งเปลี่ยนแปลงไป (Whistler และคณะ, 1984 ; Norman, 1979) แอลฟา-อะไมเลสประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) ที่ต่อกันเป็นสายยาว โดยจำนวนกรดอะมิโนจะแตกต่างตามแหล่งของเอนไซม์ โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน ความเสถียรของค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าระหว่าง 3.5-9.2 ส่วนความเสถียรของอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 35-75 องศาเซลเซียส

2. ประเภทแอลฟา-อะไมเลส แบ่งตามประเภทของแหล่งเอนไซม์ที่ผลิตได้

2.1 แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรีย (Bacterial α-amylase) เอนไซม์สามารถผลิตจาก *Bacillus subtilis* หรือ *Bacillus amyloliquefaciens* เอนไซม์ชนิดนี้จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 70–85 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* จะอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 90–105 องศาเซลเซียส (Gerhartz, 1990)

2..2 แอลฟา-อะไมเลสจากราและยีสต์ (α-amylase from Fungi) ในทางการค้า เชื้อราที่นิยมนำมาผลิตเอนไซม์ คือ *Aspergillus niger* หรือ *Aspergillus oryzae*

2.3 แอลฟา-อะไมเลสจากมอลท์ (Malt amylase) พบได้ในพืชได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ หรือข้าวสาลี ซึ่งจะพบรวมกับเอนไซม์บีตา-อะไมเลส, โปรติเอส และบีตา-กลูคาเนส

2.4 แอลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อน (Pancreatic amylase) เอนไซม์ชนิดนี้มี mercapto group (SH) ซึ่งจะถูกทำให้สูญเสียแอคติวิตีได้ง่ายโดยโลหะหนัก

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของแอลฟา-อะไมเลส

3.1 แคลเซียมจับอยู่ที่บริเวณเร่งของโมเลกุลอย่างหนาแน่น ทำหน้าที่เป็น co-factor ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงขึ้น อีกทั้งยังทำให้โปรตีนมีรูปร่างเหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี แคลเซียมถูกกำจัดออกจากโมเลกุลได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ หรือสารพวก chelating เช่น EDTA การที่แคลเซียมถูกกำจัดออกไปทำให้เกิดการสูญเสียแอคติวิตีได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน หรือกรด (Whistler และคณะ, 1984)

3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลทำให้เกิดการแตกตัวของ side-chain groupโดยกลุ่มที่มีความจำเพาะคือ substrate binding group และ catalytic group ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแหล่งต่างกันมีสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน

3.3 อุณหภูมิ อะไมเลสส่วนใหญ่มีการทำงานดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น จากการที่แอลฟา-อะไมเลสมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลจึงทนต่อความร้อนได้ดี เอนไซม์จากแหล่งกำเนิดต่างกันจะมีความทนทานต่อความร้อนได้ต่างกัน แบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงมักผลิตเอนไซม์ที่มีความคงตัวสูงด้วย (Wind และคณะ, 1994) แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus stearothermophilus* สามารถทนความร้อนได้ดีกว่าแอลฟา-อะไมเลสจากแหล่งอื่น

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตอะไมเลสโดยแบคทีเรีย

4.1 แหล่งคาร์บอน ที่สำคัญได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน เป็นต้น ได้มีการศึกษาจาก Ensari และคณะ (1995) รายงานว่าแป้งเป็นตัวชักนำ (inducer) ให้เกิดการสร้างเอนไซม์ของ *Bacillus subtilis* การใช้แป้ง 0.3% จะให้อะไมเลสที่มีแอคติวิตีสูงสุด การใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการยับยั้งการสร้างแอลฟา-อะไมเลส (Catabolite repression) หรือผลิตเอนไซม์ออกมาช้าลง เนื่องจาก

จุลินทรีย์สามารถนำกลูโคสไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้เลย โดยไม่จำเป็นต้องสร้างแอลฟา-อะไมเลส

4.2 แหล่งไนโตรเจน สามารถใช้ในรูปของสารอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ คุณภาพของแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์จะขึ้นกับชนิดของกรดอะมิโน พบว่ากรดอะมิโนบางชนิดมีความจำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ isoleucine cysteine และ aspartic acid และมีกรดอะมิโนบางชนิดที่ช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ คือ glutamic acid methionine และ glycine (Priest และ Sharp, 1989)

4.3 เกลืออนินทรีย์ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตแอลฟา-อะไมเลส พบว่า Ca^{2+} Sr^{2+} Mg^{2+} และ Ba^{2+} ช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ ส่วน Ag^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Sb^{3+} As^{3+} และ Au^{3+} ยับยั้งการผลิตเอนไซม์ Zn^{2+} และ Mn^{2+} ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (Priest และ Sharp, 1989)

4.4 อุณหภูมิ อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์มีหลายประเภท และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

4.5 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันไป จึงต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง

4.6 อัตราการกวนและการให้อากาศ การให้อากาศมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่วนการกวนเพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และทำให้ออกซิเจนถูกตีเป็นฟองอากาศเล็ก ๆ จำนวนมากเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวฟองอากาศให้สัมผัสอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารได้ดีขึ้น (สมใจ ศิริโภค, 2537)

5. การผลิตเอนไซม์อะไมเลส

Uguru และคณะ (1997) ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตอะไมเลสโดย *Thermoactinomyces thalpophilus* ในระดับขวดเขย่า การทดลองใช้ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีสูงกว่าการใช้แป้งที่ละลายน้ำเป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 90 องศาเซลเซียส และค่า pH ที่เหมาะสมคือ 5.0 และมีความเสถียรในช่วงค่า pH เท่ากับ 4.0–6.6

Mamo และGessesse (1999) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อ *Bacillus* sp. WN11 ในระดับขวดเขย่าโดยแปรผันภาวะในการเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อสามารถเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์สูงได้แก่ โปรติโอสเปปโทน และทริปโตน เมื่อเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็น NO_3^+ NH_4^+ และยูเรียพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้

Mamo และคณะ (1999) อะไมเลสทนร้อนถูกผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. WN11 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกมาจากน้ำพุร้อน เอนไซม์ที่ผลิตได้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 75–80 องศาเซลเซียส และค่า pH ที่เหมาะสมคือ 5.5

Malhotra และคณะ (2000) ผลิตแอลฟา-อะไมเลสจาก *Bacillus thermooleovorans* NP54 ในระดับขวดเขย่าและถังหมัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 2.0% แป้งที่ละลายน้ำได้ 0.3% ทริปโตน 0.3% สารสกัดจากยีสต์ และ 0.1% K_2HPO_4 ค่า pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่ 70 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 rpm พบว่าการผลิตในถังหมักสามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 เท่า เอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 8.0 และ 100 องศาเซลเซียสตามลำดับ

Narang และ Satyanarayana (2001) ผลิตแอลฟา-อะไมเลสจาก *Bacillus thermooleovorans* ในระดับขวดเขย่า และถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 20 ลิตร พบว่าแป้ง และทริปโตน เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เพิ่มมากขึ้นทุกปี ซึ่งสามารถดูได้จากแนวโน้มการนำเข้าเอนไซม์ของประเทศไทยที่เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 1 แสดงว่าในแต่ละปีต้องสูญเสียเงินในการสั่งซื้อเอนไซม์เป็นจำนวนมาก จากงานวิจัยนี้มีความสนใจในการผลิตอะไมเลส เนื่องจากอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรม สิ่งทอ อาหาร กระดาษ เป็นต้น ประกอบกับอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณการขายประมาณ 18% ของการขายเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด (Rao และคณะ, 1998) ในการวิจัยนี้ทำการผลิตอะไมเลสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทย สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ นำมาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 5 ลิตร โดยหาแหล่งวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกและสามารถหาได้ง่ายในประเทศ รวมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิต

ตารางที่1 ข้อมูลการนำเข้าเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี 1995-2001

ปี ค.ศ.	มูลค่าการนำเข้า	
	ปริมาณ (ล้านตัน)	จำนวนเงิน (ล้านบาท)
1995	2.12	334
1996	2.11	367
2000	2.43	559
2001	1.61	402

แหล่งที่มา กรมศุลกากร ประเทศไทย

ปี 2001 : เก็บข้อมูลตั้งแต่ เดือนมกราคม-กรกฎาคม 2001

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ครุภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

-เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Jenway 6400 บริษัท Labquip Co.,Inc., England

-เครื่องปั่นความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น J- 21 C บริษัท Beckman Instrument Inc., USA.

-เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิPsycrothermรุ่น G760 บริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc., USA

-ชุดเครื่องมือหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด บริษัท Scientific Promotion Thailand Co, Ltd.

-ถังหมัก ขนาด 5 ลิตร รุ่น Bio FLO IIC บริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc., USA

-เครื่องระเหยน้ำอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer) Flexi-Dry บริษัท Systems stone ridge, USA.

-เครื่องกรอง (Ultrafiltration) รุ่น Amicon PM-10, Microconcentrator รุ่น Centricon™ 10 Amicon Division บริษัท W.R.Grace & Co., USA.

-High Performance Liqiud Chromatography รุ่น LC-31 บริษัท Shimadzu Co., Japan

2.2 เคมีภัณฑ์

-Bovine serum albumin (BSA, A grade), Glucose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose, Maltoheptaose, Soluble starch(potato) บริษัท Sigma Chemical Co., Ltd., U.S.A.

-Agar, Beef extract, Peptone, Yeast extract บริษัท Bacto Difco, U.S.A.

-Disodium hydrogen phosphate, Diammonium hydrogen phosphate, Potassium dihydrogen phosphate, Sodium dihydrogen phosphate บริษัท Merck. Darmstadt, Germany

-Antifoam A , Iodine , Trichloroacetic acid บริษัท Fluka AG. Buch, Switzerland

-Acetonitrile (HPLC grade) บริษัท Lab-scan Co.,Ltd., Thailand

-Phosphoric acid 85% บริษัท Mallinckrodt. Baker,Inc., France

2.3 วัตถุดิบและ แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

กากถั่วเหลือง ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด ถนนธนบุรี-ปากท่อ ต.บางโทรัด อ.เมือง จ.สมุทรสาคร

แป้งข้าวเหนียวตราช้างสามเศียร แป้งข้าวโพดตรา Maizena แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ บริษัท BDH แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้าตรา Thaiwa

Bacillus subtilis TISTR 25 ได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technological Research) Culture Collection เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งจากตัวอย่างดินและน้ำ จากน้ำพุร้อน

3.1.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ spread ลงบนอาหารสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียดังภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1.1 และอาหารสำหรับคัดเลือกยีสต์ดังภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1.2 ด้วยปริมาตร 0.01, 0.1 และ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะต่างกันที่สามารถเจริญได้บนอาหาร

3.1.2 การคัดเลือกขั้นแรก (Primary screening) ดังภาพในภาคผนวกที่ 3 ก)

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มา grid ลงบนอาหาร starch plate (ดังภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1.3) โดยไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ราดทับด้วยสารละลายไอโอดีน คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่สามารถสร้างวงใส (clear zone)

3.1.3 การคัดเลือกขั้นที่สอง (Secondary screening) ดังภาพในภาคผนวกที่ 3 ข)

นำจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 3.1.2 โดยแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารเหลวดังภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1.1 ส่วนยีสต์เลี้ยงในอาหารเหลวดังภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างนำไปแยกเซลล์ออกโดยปั่นด้วยความเร็ว 5000 rpm 20 นาที นำเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมของจานอาหาร starch plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัดขนาดของวงใส (clear zone)

3.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

เขี่ยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จาก NA-slant 1 ลูป ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Nutrient broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 nm ให้ได้ประมาณ 0.5

3.3 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-อะไมเลสในระดับขวดเขย่า (Shaking flask)

ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมจากข้อ 3.2 ความเข้มข้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารสูตรพื้นฐาน (Bounocore, 1986) ค่า pH เท่ากับ 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm โดยแปรผันสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะของการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า ดังข้อ 3.3.1-3.3.7 หลังการเลี้ยงเชื้อทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวัดการเจริญของเชื้อโดยหาปริมาณเซลล์ด้วยวิธีนับเซลล์ที่มีชีวิต และนำน้ำหมักมาแยกเซลล์จุลินทรีย์โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า pH , แอคติวิตีของอะไมเลส (Dextrinizing activity) (Fuwa, 1956) ปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

3.3.1 แหล่งคาร์บอน แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยใช้ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1.0 % ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า ข้าวโพด แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ และแป้งข้าวเหนียว ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% ปรับค่า pH เป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm

3.3.2 ปริมาณคาร์บอน ใช้วัตถุดิบจากข้อ 3.3.1 มาเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันปริมาณวัตถุดิบดังนี้ 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0 (w/v) pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm

3.3.3 แหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อในอาหารโดยมีวัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.1 และปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2 เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารอินทรีย์ได้แก่ น้ำเต้าหู้ สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริก และแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4NO_3 และ $NaNO_3$ ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 % ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm

3.3.4 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อในอาหารโดยมีวัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.1 และปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2 เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.3 ทำการเลี้ยงเชื้อโดยแปรผัน %ไนโตรเจนดังนี้คือ 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%ไนโตรเจน ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm

3.3.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1–3.3.4 โดยปรับค่า pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าต่าง ๆ กัน คือ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm

3.3.6 อุณหภูมิ เลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1–3.3.4 และค่า pH ที่เหมาะสม จากข้อ 3.3.5 โดยแปรผันอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อดังนี้ 30, 33, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm

3.3.7 ความเร็วรอบ เลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.1–3.3.4 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5 และ 3.3.6 ตามลำดับ โดย แปรผันความเร็วรอบดังนี้ 150, 200, 250 และ 300 rpm

3.4 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-อะไมเลสในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 5 ลิตร

3.4.1 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมจากข้อ 3.2 โดยแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นคือ 0.1%, 1.0% และ 2.0 % (v/v) ของอาหารที่ใช้ผลิตเอนไซม์ เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 0.5%(w/v) สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05%(w/v) ค่าpH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวัดการเจริญของเชื้อโดยหาปริมาณเซลล์ด้วยวิธีนับเซลล์ที่มีชีวิตและนำน้ำหมักมาแยกเซลล์จุลินทรีย์โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาวัดแอคติวิตีของอะไมเลส (Dextrinizing activity) (Fuwa, 1986) และปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

3.4.2 ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้น 1.0% (w/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลังดังนี้ 0.1%, 0.5% และ 1.0%(w/v) pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

3.4.3 ปริมาณสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริก ถ่ายเชื้อตั้งต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 ใช้กากถั่วเหลืองสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยแปรผันปริมาณไนโตรเจนดังนี้ 0.01%, 0.05%, และ 0.1 %ไนโตรเจน pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

3.4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ถ่ายเชื้อตั้งต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 ตามลำดับ โดยแปรผันค่า pH คือ 6.0, 7.0 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

3.4.5 อุณหภูมิ ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่มีปริมาณ 1.0% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และค่า pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 - 3.4.4 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

3.4.6 อัตราการกวน ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่มีปริมาณ 1.0% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ค่า pH และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 - 3.4.5 ตามลำดับ อัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยแปรผันอัตราการกวน 200, 250 และ 300 rpm

3.4.7 อัตราการให้อากาศ ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ค่า pH อุณหภูมิ อัตราการกวนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2 – 3.4.6 ตามลำดับ โดยแปรผันอัตราการให้อากาศดังนี้ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

3.5 การวิเคราะห์

3.5.1 การวัดแอคติวิตีของอะไมเลส (Dextrinizing activity)

เติมสารละลายเอนไซม์ 10-100 ไมโครลิตร ลงใน 0.2% สารละลายแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ ใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่า pH 7.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M กรดไฮโดรคลอริก 4 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วเติมสารละลายไอโอดีน 0.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5) ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของสารประกอบแป้ง-ไอโอดีน ลดลง 10 % ที่ 600 nm ภายใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) คือจำนวนหน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม

3.6 การศึกษาผลผลิตจากการย่อยแป้งของเอนไซม์ โดยเทคนิค HPLC

บ่มเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร (250 unit/ml) กับ 0.2%สารละลายแป้งที่ละลายน้ำได้ ใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด กรองตัวอย่างด้วยแผ่นกรอง Cellulose acetate 0.45 μm ทำตัวอย่างให้เข้มข้นโดยการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilized ปรับปริมาตรเป็น 100 μl นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ใช้ Spherisorb-10NH_2 ขนาด (0.46 x 25 เซนติเมตร) ใช้RIเป็น detector สารละลายผสม acetonitrile : water อัตราส่วน 65 : 35 (โดยปริมาตร)โดยใช้น้ำตาลGlucose(G_1) Moltose(G_2) Maltotriose(G_3) Maltotetraose(G_4) Maltopentaose(G_5) Maltohexaose(G_6) และ Maltoheptaose(G_7) ความเข้มข้น 20 mg/ml เป็นสารมาตรฐาน

3.7 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purified enzyme)

3.7.1 ทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration นำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นโดยการกรองผ่านเมมเบรน Regenerated cellulose YM 10 MW. Cut off 10,000 ดาลตัน

3.7.2 ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate precipitation)

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.7.1 คนเบา ๆ จนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมด โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมครั้งละ 10% เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่า pH เท่ากับ 7.0 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มากำจัดเกลือโดยการทำ dialysis

3.7.3 ทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilization นำเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% มาแช่แข็งที่ –80 °C นำมาทำให้แห้งโดยการระเหิดน้ำออกด้วยเครื่อง Lyophilizer

3.8 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์

3.8.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

บ่มเอนไซม์จากข้อ 3.7.2 กับ 0.2 % แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ ใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่า pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 37, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม 0.2 M HCl เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติมสารละลายไอโอดีน 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

3.8.2 ค่าpHที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

บ่มสารละลายเอนไซม์กับ 0.2% แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำ ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ คือ 0.2 M อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0–5.0, 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0–7.0, 0.2 M ทรีส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 8.0–9.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 0.2 M HCl เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติมสารละลายไอโอดีน 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

3.8.3 ความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

บ่มเอนไซม์จากข้อ 3.7.2 ใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่า pH 7.0 ซึ่งเติมและไม่ได้เติม 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเอนไซม์ทุก 5 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือเปรียบเทียบกับแอคติวิตีเอนไซม์ตั้งต้น

3.8.4 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

บ่มสับสเตรท (แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้) ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 2, 6 และ 20 mg/ml ใน 0.2M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (เป็นค่าpHและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์) โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ 500 unit วัดปริมาณกลูโคสโดยวิธีของ Nelson และ Somogyl (Nelson, 1944) ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่าง ๆ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/V กับ 1[S] เพื่อหาค่า Km และ Vmax

บ่มเอนไซม์ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 125, 250 และ 500 unit ในแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ความเข้มข้น 2 mg/ml ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง V กับ [E]

3.8.5 ระยะเวลาการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของเหลวที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% และที่อยู่ในลักษณะผงที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% และทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilization เก็บรักษาที่ –20, 4 และ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างหาแอคติวิตีในระยะเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น ก่อนเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งจากตัวอย่างดินและน้ำ จากน้ำพุร้อน

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากน้ำพุร้อนที่จังหวัดเชียงใหม่ ราชบุรี และกาญจนบุรี นำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น ผลการทดลองดังตารางที่ 2 พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถย่อยแป้งได้ดีที่สุดโดยดูจากวงใส (clear zone) มีขนาดใหญ่สุด และเชื้อหมายเลข 22, 18, 19, 24 และ 28 มีขนาดวงใสใหญ่กว่าเชื้อที่คัดเลือกได้หมายเลขอื่น ๆ จึงนำเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อดังกล่าวมาหาแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังกราฟรูปที่ 1 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในการผลิตอะไมเลส โดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 5 ลิตร

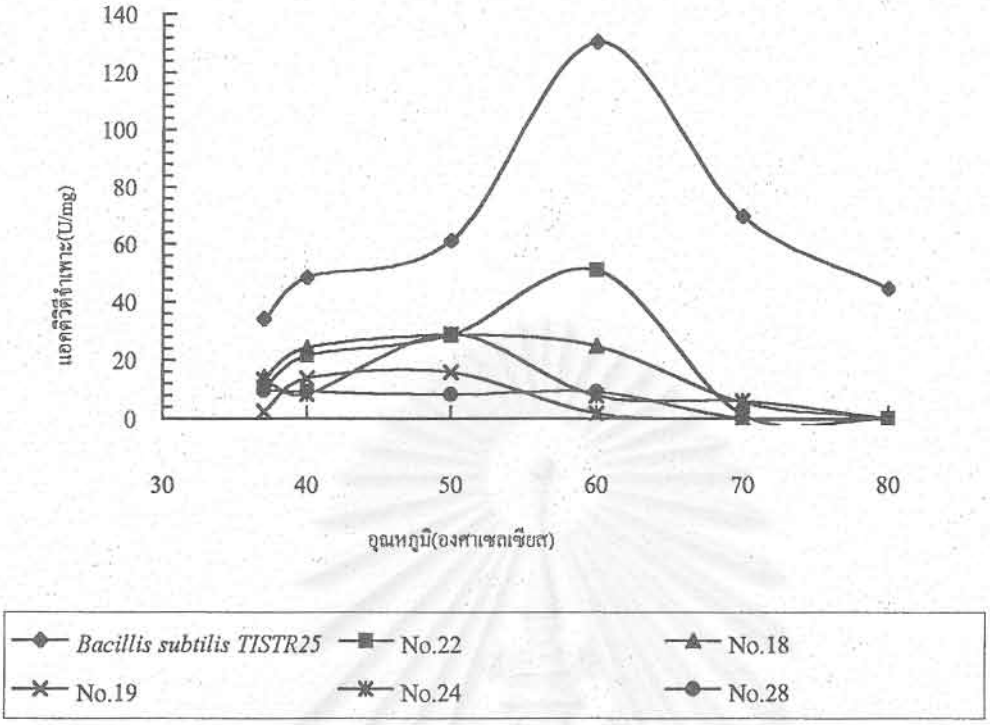
4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-อะไมเลสในระดับขวดเขย่า

4.2.1 แหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

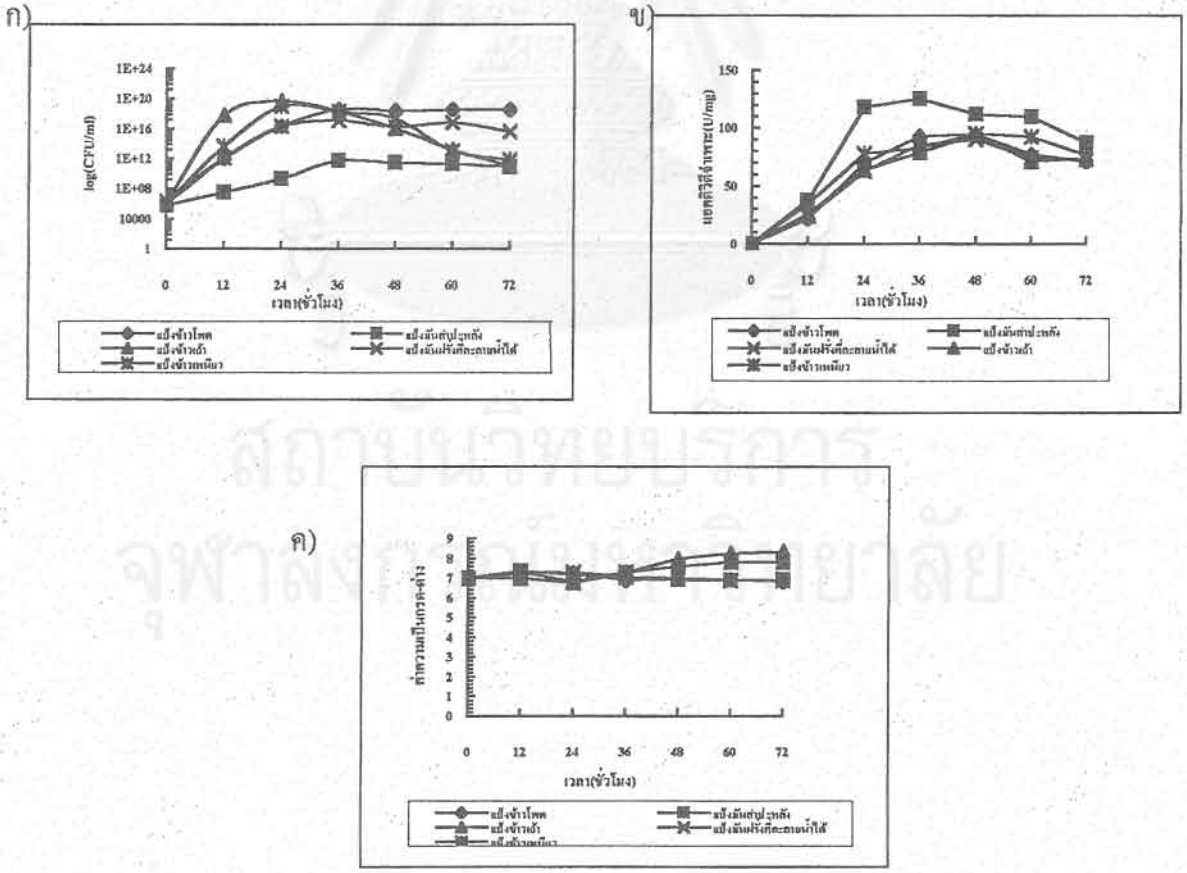
ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โดยทำการแปรผันแป้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว และ แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันคือ 1.0 % (w/v) และใช้สารละลายกากถั่วเหลืองย่อยสลายด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังประกอบด้วย $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), KH_2PO_4 0.3 % (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017 % (w/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 2 ก), 2 ข) และ 2 ค) จากกราฟรูปที่ 2 ก) พิจารณาการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) อยู่ในช่วง 0-24 ชั่วโมง ส่วนแป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้มีช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) อยู่ในช่วง 0-36 ชั่วโมง จากกราฟรูปที่ 2 ข) พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนการใช้แป้งชนิดอื่นเอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกันที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่า pH ของสูตรอาหารไม่เปลี่ยนแปลงมาก ดังกราฟรูปที่ 2 ค) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์

ตารางที่ 2 การทดสอบความสามารถในการสร้างวงใสของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้และ*Bacillus subtilis* TISTR 25

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่ง	จำนวนเชื้อที่คัดเลือกได้	จำนวนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง	หมายเลข	ความกว้างวงใส Clear zone(mm^2)
แบคทีเรีย	ดิน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่	35	18	2	100
				3	144
				4	121
				5	256
				8	144
				10	144
				16	169
				17	225
				18	361
				19	324
				22	441
				24	324
				26	169
				28	324
				30	144
				31	121
				32	225
				34	144
	ดิน จ.ราชบุรี	10	2	3	81
				4	81
	ดิน จ.กาญจนบุรี	6	2	1	30.25
				3	81
ยีสต์	ดิน จ.ราชบุรี	14	1	12	81
	ดิน จ.กาญจนบุรี	6	-	-	-
Bacillus subtilis TISTR 25	ดิน				529



รูปที่ 1 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อที่คัดเลือกได้ และ*Bacillus subtilis* TISTR25



รูปที่ 2 เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันแหล่งคาร์บอน

4.2.2 ศึกษาปริมาณแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

แปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังคือ 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% (w/v) ได้ผลดังนี้ จากกราฟรูปที่ 3 ก) พบว่าการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 โดยแป้ง 0.1% (w/v) ให้ค่าการเจริญต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ส่วนค่าแอคติวิตีจำเพาะดังกราฟรูปที่ 3 ข) พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ที่แอค่ติวิตีจำเพาะสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่ำคือ 0.1% (w/v) เอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูงกว่าคือ 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% (w/v) เมื่อทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มความ เข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมากกว่า 0.5 % (w/v) คือ 1.0, 1.5 และ 2.0% (w/v) จะทำให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะลดลง เมื่อพิจารณากราฟรูปที่ 3 ค) ค่า pH แต่ละช่วงเวลาเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.5% (w/v) เป็นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

4.2.3 แหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แปรผันแหล่งไนโตรเจน คือแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารอินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% ได้ผลการทดลอง ดังกราฟรูปที่ 4 ก), 4 ข) และ 4 ค) พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์คือ $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NaNO_3$ เชื้อมีการเจริญต่ำมากและไม่มีการผลิตเอนไซม์ ส่วนการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 มีการผลิตแอลฟา-อะไมเลสเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเปรียบเทียบสารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำเต้าหู้และสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากันคือ 0.05% พบว่าสารละลายกากถั่วเหลืองสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณากราฟรูปที่ 4 ค) พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละช่วงเวลาไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ยกเว้นการใช้ NH_4NO_3และ$(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าค่า pH ลดลงต่ำกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น จึงเลือกสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกเป็นแหล่งไนโตรเจน

4.2.4 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส

แปรผันปริมาณสารละลายกากถั่วเหลืองย่อยสลายด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.01%, 0.05%, 0.1% และ 0.5% ได้ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 5 ก), 5 ข) และ 5 ค) พบว่าการใช้สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1% ให้ค่าการเจริญของเชื้อต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น และจากกราฟรูปที่ 5 ข) พบว่าการใช้สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% จะมีการผลิตอะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เมื่อใช้ความเข้มข้นของปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจาก 0.05% พบว่าแอคติวิตีจำเพาะมีค่าลดลง ส่วนการใช้กากถั่วเหลืองที่มีไนโตรเจนต่ำคือ 0.01% จะมีแอคติวิตีจำเพาะต่ำสุดที่เวลา 48

ชั่วโมง จากกราฟรูปที่ 5 ค) ค่า pH เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงประมาณ 6.5-8.5 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณไนโตรเจน 0.05% ในการทดลองครั้งต่อไป

4.2.5 ค่า pH ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส

แปรผันค่า pH เป็น 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ได้ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 6 ก), 6 ข) และ 6 ค) พบว่า จากกราฟรูปที่ 6 ก) เชื้อมีการเจริญใกล้เคียงกัน โดยจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 และการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการปรับค่า pH เป็น 7.0 พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด รูปที่ 6 ข) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ในแต่ละช่วงเวลา พบว่าที่ 0-12 ชั่วโมง ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกภาวะมีการปรับอยู่ในช่วง 6.0-7.0 และมีค่าอยู่ในช่วงนี้ถึง 72 ชั่วโมง รูปที่ 6 ค) ดังนั้นจึงเลือกปรับค่า pH เป็น 7.0 ในการทดลองต่อไป

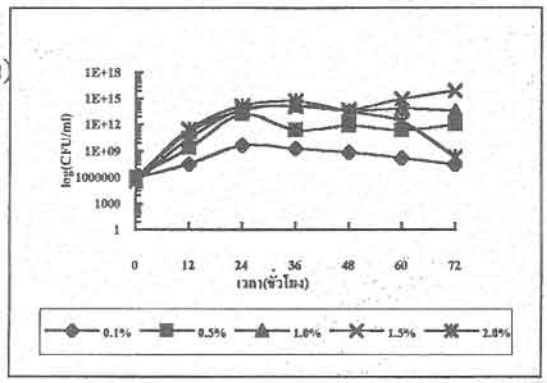
4.2.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส

แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 30, 33, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 7 ก), 7 ข) และ 7 ค) พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด ดังรูปที่ 7 ก) เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาเดียวกันคือ 24 ชั่วโมง พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 33 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 7 ค) พบว่า ค่า pH เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์

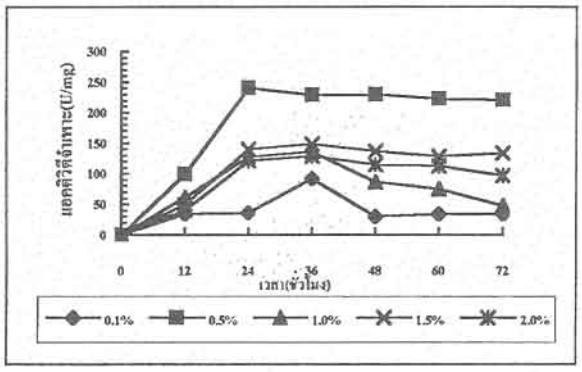
4.2.7 ความเร็วรอบในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส

แปรผันความเร็วรอบ 150, 200, 250 และ 300 rpm ได้ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 8 ก), 8 ข) และ 8 ค) จากภาวะที่ทำการทดลองพบว่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเร็วรอบเป็น 300 rpm เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดเนื่องจากเป็นภาวะที่มีออกซิเจนมากที่สุดทำให้เชื้อสามารถนำออกซิเจนไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีแต่แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ต่ำกว่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm จากกราฟรูปที่ 8 ค) ค่า pH เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ดังนั้นจึงเลือกความเร็วรอบ 250 rpm ในการผลิตเอนไซม์

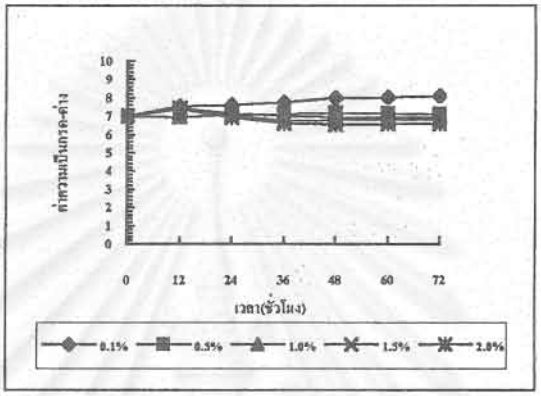
ก)



ข)

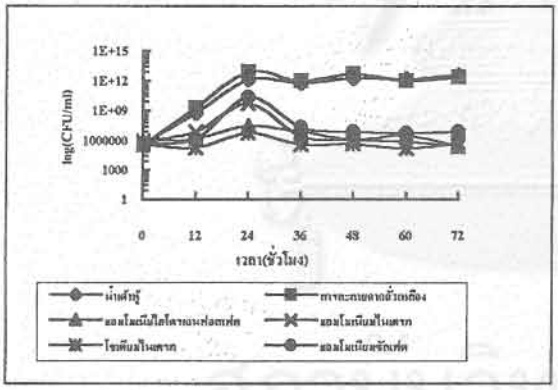


ค)

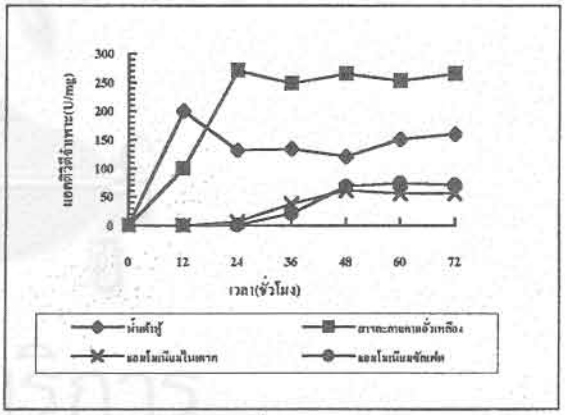


รูปที่ 3 เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันปริมาณคาร์บอน

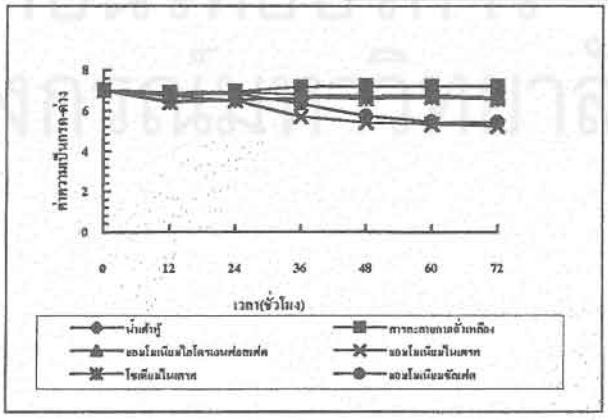
ก)



ข)

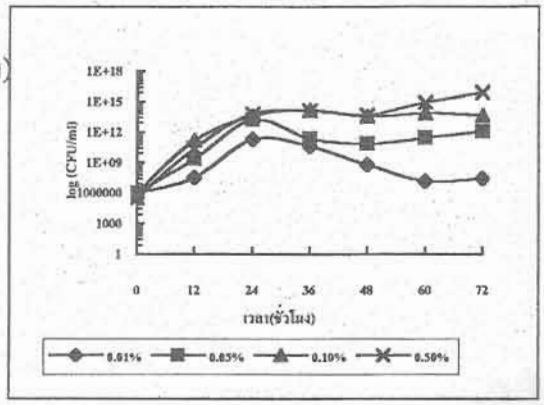


ค)

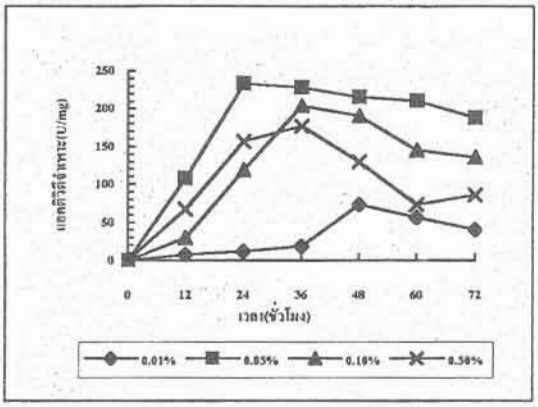


รูปที่ 4 เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันแหล่งไนโตรเจน

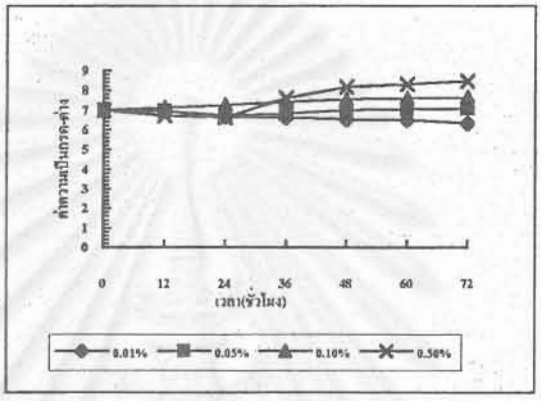
ก)



ข)

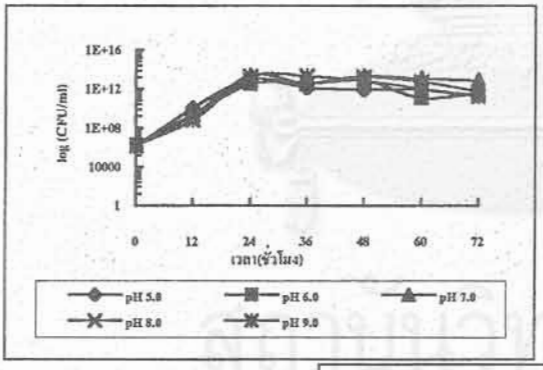


ค)

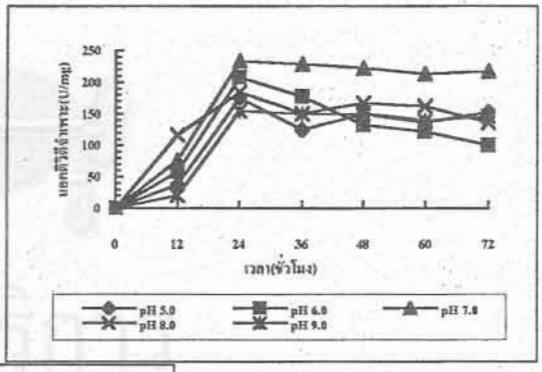


รูปที่ 5 เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันปริมาณไนโตรเจน

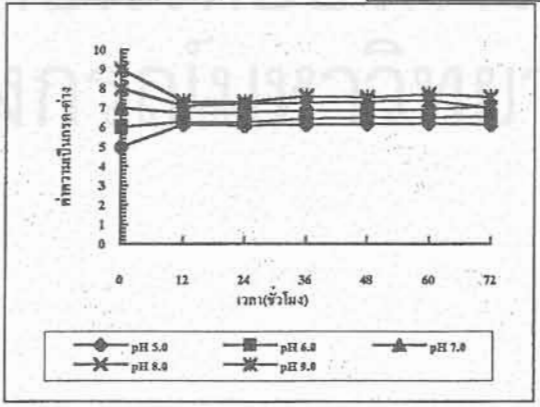
ก)



ข)

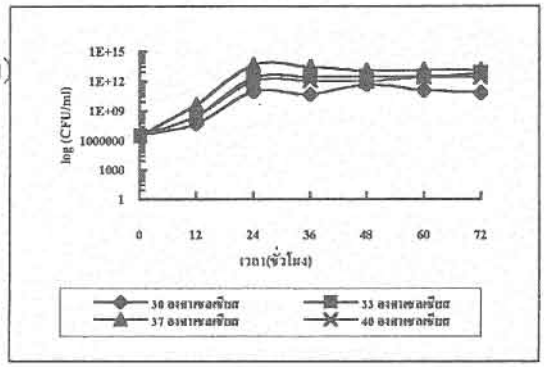


ค)

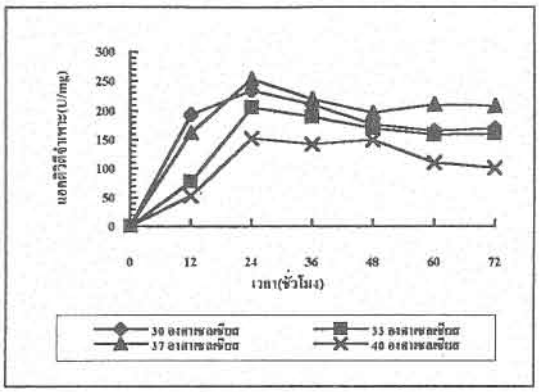


รูปที่ 6 เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันค่า pH

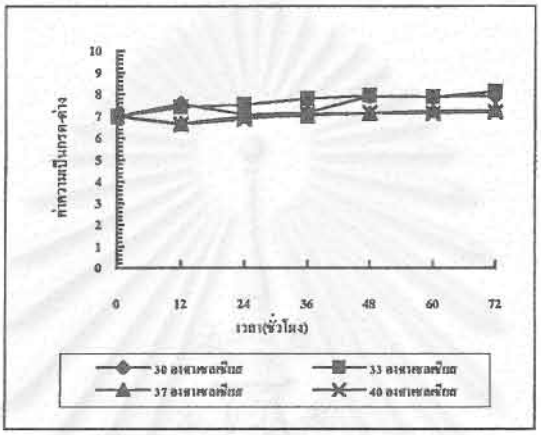
ก)



ข)

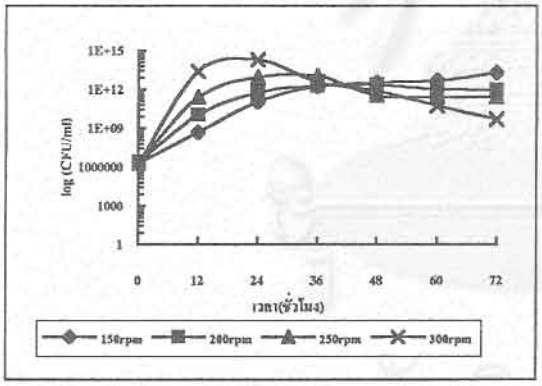


ค)

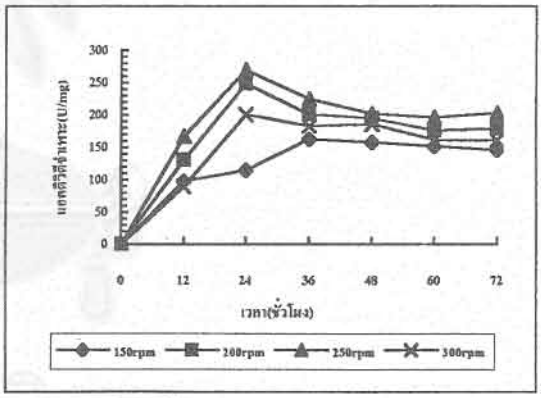


รูปที่ 7 เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันอุณหภูมิ

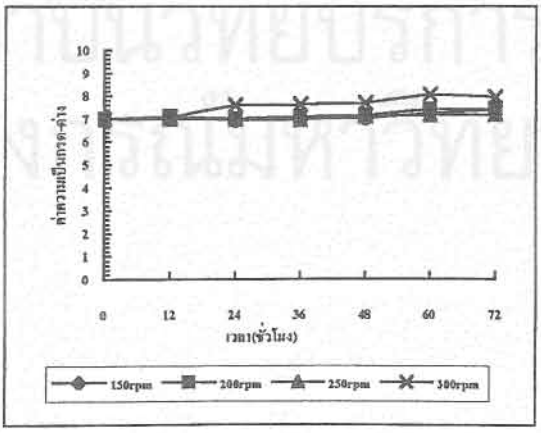
ก)



ข)



ค)



รูปที่ 8 เปรียบเทียบ ก) ค่าการเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ค) ค่า pH ในระดับขวดเขย่า แปรผันอัตราการกวน

4.3 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-อะไมเลสในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 5 ลิตร

4.3.1 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 0.5% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนประกอบอื่นคือ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017% (w/v) ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้ ค่า pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.1%, 1.0% และ 2.0% (v/v) ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง หาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 9 ก) และ 9 ข) ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1% (v/v) พบว่าที่ชั่วโมง 0-24 เชื้อมีการเจริญในช่วง lag phase ในชั่วโมงที่ 0-24 และจะเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบทวีคูณสูงสุด (log phase) ที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งใช้เวลานานกว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% และ 2.0% เนื่องจากปริมาณเชื้อตั้งต้นที่มีจำนวนเซลล์น้อยทำให้เชื้อต้องใช้เวลานานในการปรับตัวมีผลทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% และ 2.0% ซึ่งการใช้เชื้อเริ่มต้น 1.0% และ 2.0% ให้ผลการทดลองในการผลิตเอนไซม์ใกล้เคียงกันดังกราฟ รูปที่ 9 ข) คือการใช้เชื้อเริ่มต้น 1.0% และ 2.0% สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุด 470.20 U/mg และ 449.35 U/mg ที่ชั่วโมง 36 ตามลำดับ จึงเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% (v/v) ในการผลิตเอนไซม์

4.3.2 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่ประกอบด้วยสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนประกอบอื่นคือ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017%(w/v) ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้ ค่า pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0.1%, 0.5% และ 2.0% (w/v) ตามลำดับ ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 10 ก) และ 10 ข) การใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5% (w/v)เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 470.2 U/mg ที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 2.0% และ 0.1% เมื่อพิจารณาการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 0.1% เชื้อมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยกว่าการใช้แป้งที่ความเข้มข้นอื่น และจะเข้าสู่ระยะ death phase อย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 48 การเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังจากความเข้มข้น 0.1% (w/v) เป็น 0.5% (w/v) เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 2.0% (w/v) พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v)

4.3.3 ปริมาณสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนประกอบอื่นคือ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017% (w/v) ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้ ค่า pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แปรผันปริมาณไนโตรเจนของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกดังนี้ 0.01% 0.05% และ 0.1% ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 11 ก) และ 11 ข) เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดคือ 470.2 U/mg ในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05% ที่เวลา 36 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของปริมาณไนโตรเจน 0.01% เชื้อมีอัตราการเจริญต่ำกว่าการใช้สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05% และ 0.1% และพบว่าการใช้ปริมาณไนโตรเจน 0.05% และ 0.1% ให้ผลแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกันคือ 470.2 และ 438.6 U/mg ที่เวลา 36 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05% ในการผลิตเอนไซม์

4.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% ส่วนประกอบอื่นคือ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v) ,KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017%(w/v) ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ควบคุม pH ให้มีค่าคงที่ตลอดการทดลอง ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 12 ก) และ 12 ข) พบว่าเมื่อ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 อัตราการเจริญในช่วง lag phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 0-24 และเข้าสู่การเจริญแบบทวีคูณ(log phase)ในชั่วโมงที่ 24-36 ซึ่งมีอัตราการเจริญต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุม pH ในอาหารเป็น 6.0 และ 7.0 จากกราฟรูปที่ 12 ข) พิจารณาการผลิตอะไมเลสพบว่าที่ pH ท่ากับ 7.0 จะมีการผลิตแอลฟา-อะไมเลสที่แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 รองลงมาคือการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการควบคุมค่า pH เท่ากับ 6.0 ซึ่งมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 312.75 U/mg ที่เวลา 36 ชั่วโมง จึงเลือกใช้ค่า pH เท่ากับ 7.0 ในการผลิตเอนไซม์

4.3.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% ส่วนประกอบอื่นคือ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v),

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017% (w/v) ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้ ค่า pH เท่ากับ 7.0 อัตราการกวน 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แปรผันอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 13 ก) และ 13 ข) พบว่า ที่อุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดและสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดคือ 470.2 U/mg ที่เวลา 36 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในการผลิตแอลฟา-อะไมเลส

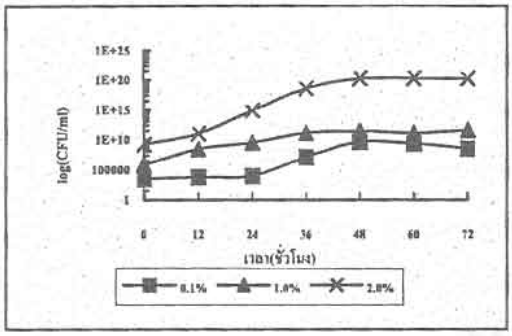
4.3.6 อัตราการกวนในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-อะไมเลส

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% ส่วนประกอบอื่นคือ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017% (w/v) ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้ ปรับค่า pH ของอาหารเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แปรผันอัตรา การกวนเป็น 200, 250 และ 300 rpm ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 14 ก) และ 14 ข) ที่อัตราการกวน 250 rpm เชื้อมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับอัตราการกวนที่ 200 rpm แต่เชื้อสามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสที่ให้แอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าที่อัตราการกวน 200 rpm เมื่อพิจารณาอัตราการกวน 300 rpm พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงแต่เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 328.4 U/mg ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการเลี้ยงเลี้ยงที่ปรับภาวะการกวนเป็น 250 และ 200 rpm ซึ่งมีค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ชั่วโมงที่ 36 คือ 470.2 U/mg และ 430 U/mg ตามลำดับ

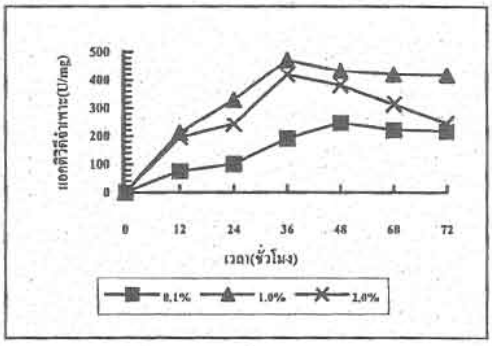
4.3.7 อัตราการให้อากาศในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตอะไมเลส

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% (v/v) ลงในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% ส่วนประกอบอื่นคือ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v) KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.017% (w/v) ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้ ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 rpm แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 15 ก) และ 15 ข) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่เลี้ยงในอาหารที่อัตราการให้อากาศเป็น 1.0 vvm สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 และ 0.5 vvm ที่เวลาเดียวกัน เมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อพบว่าที่อัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm เชื้อมีอัตราการเจริญสูงกว่าการภาวะการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.5 vvm

ก)

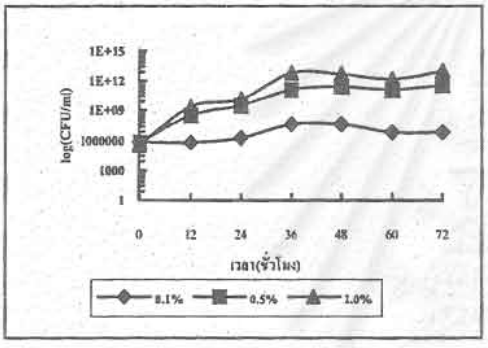


ข)

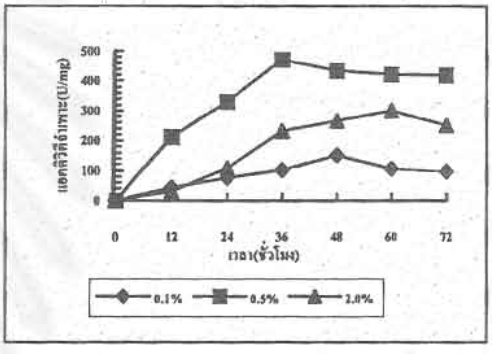


รูปที่ 9 เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ก)

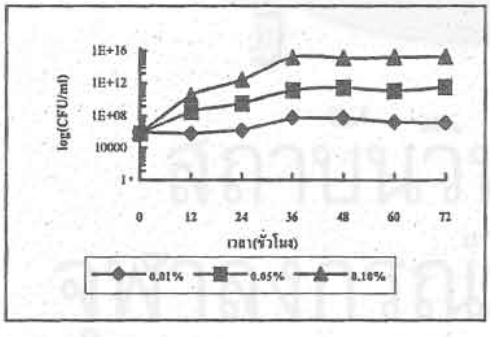


ข)

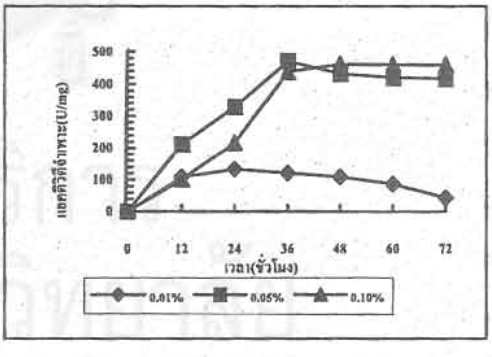


รูปที่ 10 เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันปริมาณคาร์บอน

ก)

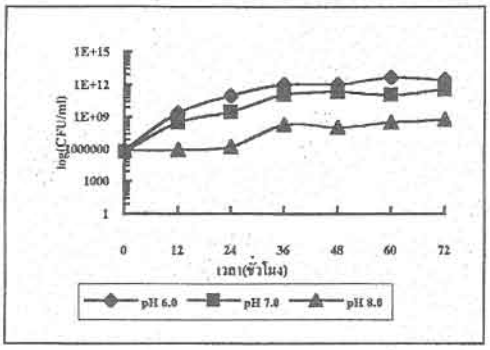


ข)

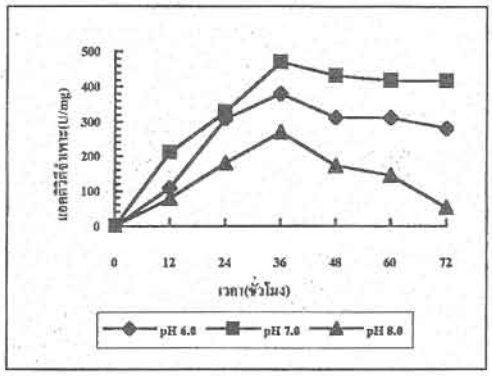


รูปที่ 11 เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันปริมาณไนโตรเจน

ก)

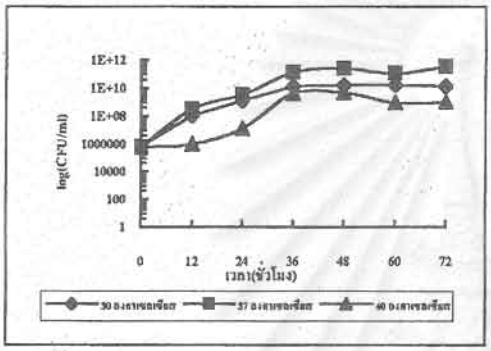


ข)

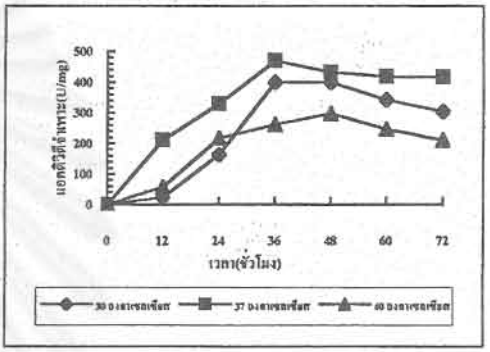


รูปที่ 12 เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันค่า pH

ก)

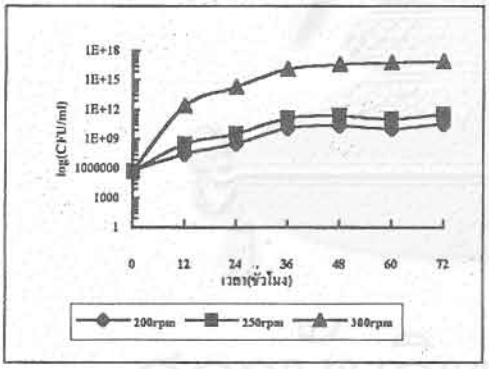


ข)

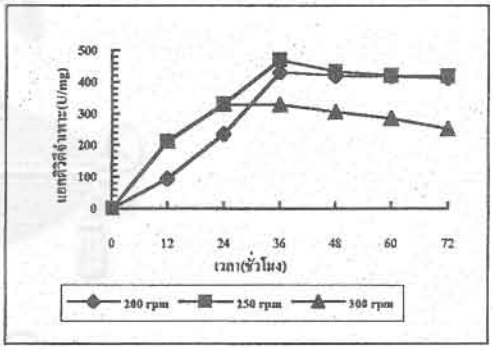


รูปที่ 13 เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันอุณหภูมิ

ก)

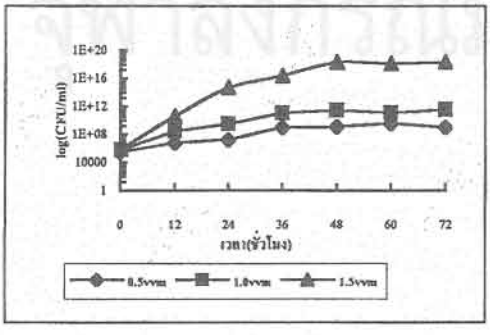


ข)

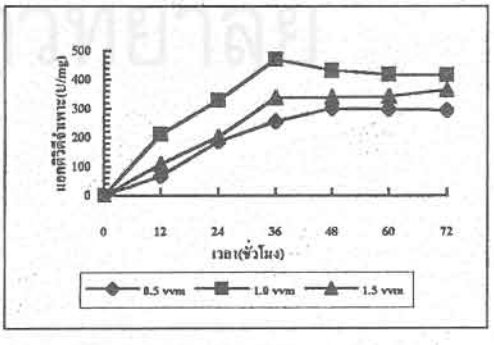


รูปที่ 14 เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันอัตราการกวน

ก)



ข)



รูปที่ 15 เปรียบเทียบค่า ก) การเจริญของเชื้อ ข) แอคติวิตีจำเพาะ ในถังหมัก แปรผันอัตราการให้อากาศ

4.4 การศึกษาผลผลิตจากการย่อยแป้งของเอนไซม์ โดยเทคนิค HPLC

บ่มเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% กับ 0.2% แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยของเอนไซม์ ทุก ๆ 30 นาที นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้น้ำตาลมาตรฐาน Glucose(G_1) Maltose(G_2) Maltotriose (G_3) Maltotetraose(G_4) Maltopentaose(G_5) Maltohexaose(G_6) และ Maltoheptaose(G_7) ความเข้มข้น 2 mg/ml เป็นสารมาตรฐานได้โครมาโตแกรมดังรูปที่ 16 จากการย่อยสารละลายแป้งด้วยเอนไซม์ที่เวลา 15 นาที เกิดน้ำตาล Glucose(G_1) Maltose(G_2) Maltotriose(G_3) Maltotetraose(G_4) และMaltopentaose(G_5) ดังโครมาโตแกรมรูปที่ 17A เมื่อเวลาการย่อยเพิ่มขึ้นเกิดน้ำตาลGlucose (G_1) Maltose(G_2) และMaltotriose(G_3) มากขึ้นด้วย ดังรูป 17 (B-C) แสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่บีตา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส เนื่องจากบีตา-อะไมเลสย่อยสลายพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิกจากปลาย non-reducing ทีละ 2 หน่วย ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งโดยจะเกิด Maltose ส่วนกลูโคอะไมเลสจะย่อยพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิกจากปลาย non-reducing ทีละ 1 หน่วย ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะได้น้ำตาล Glucose ดังนั้นเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นแอลฟา-อะไมเลส

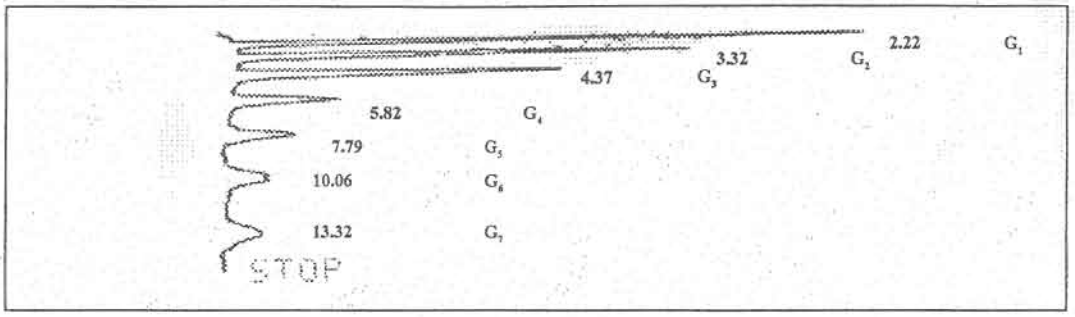
4.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification of enzyme)

4.5.1 การทำให้เข้มข้นโดย Ultrafiltration

กรองเอนไซม์ผ่านเมมเบรนRegenerated cellulose YM เมื่อเอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 6 เท่า พบว่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 1.2 เท่า และ เปอร์เซนต์ผลผลิตประมาณ 93.3% แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 296 U/mg เป็น 359.6 U/mg โปรตีนมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นประมาณ 4.8 เท่า ดังตารางที่ 3 หลังจากนั้นนำเอนไซม์เข้มข้นมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

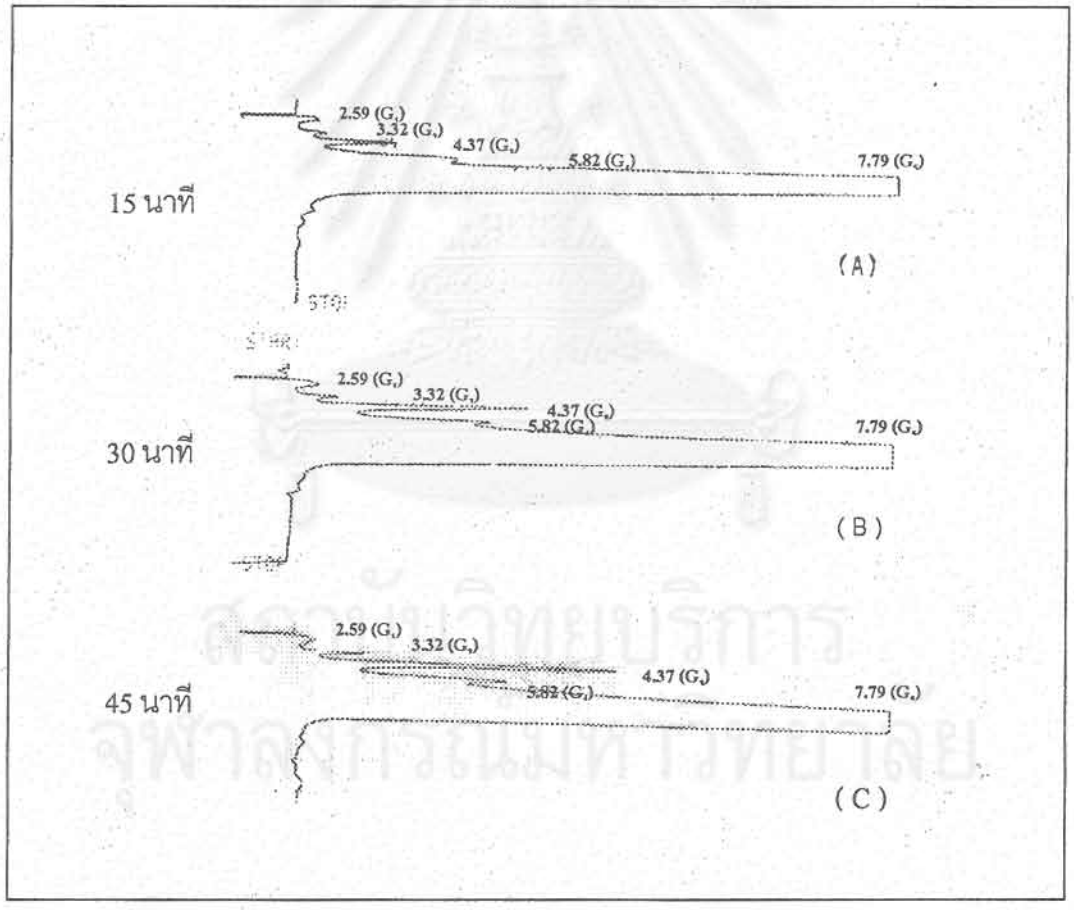
4.5.2 ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulfate Precipitation)

สารละลายเอนไซม์ จากข้อ 4.5.1 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) ซึ่งมีวิธีการคือเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงไปโดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือครั้งละ 10% จนสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 90% พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 60% เอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 3.5 เท่า และ เปอร์เซนต์ผลผลิต 92 % จึงเลือกตกตะกอนแอลฟา-อะไมเลสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 60%



รูปที่ 16 ลักษณะโครมาโตแกรมของน้ำตาลมาตรฐาน

Glucose(G_1) Maltose(G_2) Maltotriose(G_3) Maltotetraose(G_4) Maltopentaose(G_5) Maltohexaose (G_6) และ Maltoheptaose(G_7) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คอลัมน์ Spherisorb-10NH_2 ขนาด (0.46 x 25 cm) ตัวทำละลายผสม Acetonitrile : water 65 : 35 (v/v) อัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 17 ลักษณะโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ ที่เกิดขึ้นจากการย่อย 0.2% แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ โดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

4.6 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์

4.6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มกับ 0.2% แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ใน 0.2 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียสแอคติวิตีจำเพาะจะลดลงดังกราฟรูปที่ 18 การเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในตรวจหาแอคติวิตีของอะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือ 60 องศาเซลเซียส จึงใช้อุณหภูมินี้ในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์

4.6.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

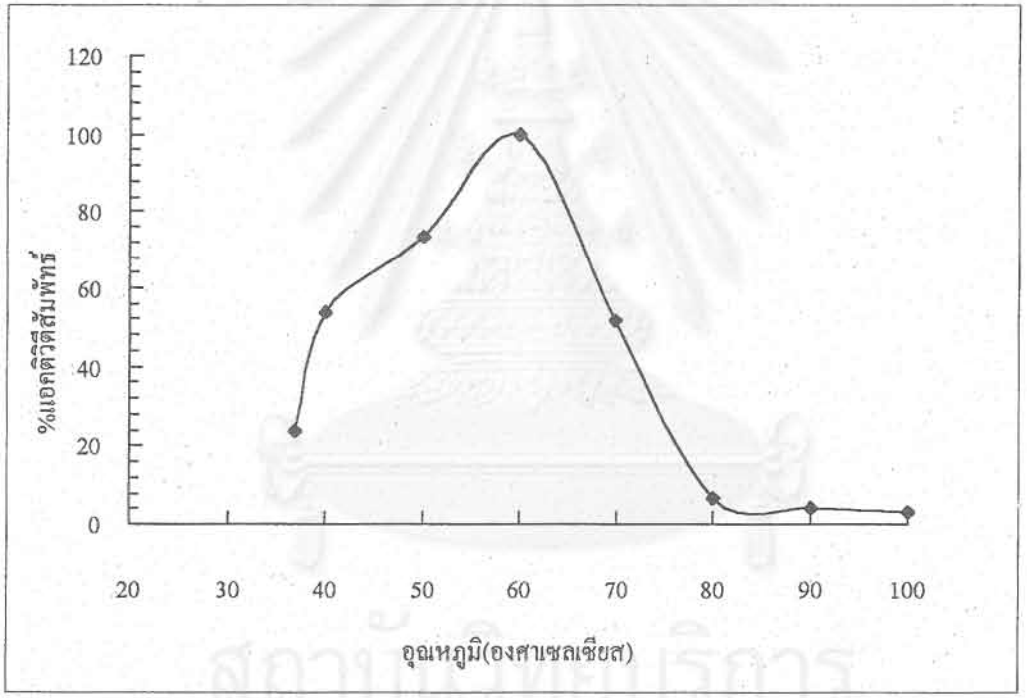
นำเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มกับ 0.2 % แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 (วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 1 ข้อ 4) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ได้ผลดังกราฟรูปที่ 19 พบว่า แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่ pH เท่ากับ 7.0 โดยแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ pH 4.0 จะสูงสุดที่ pH 7.0 และลดลงที่ pH 8.0 ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในตรวจหาแอคติวิตีของอะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือ 7.0

4.6.3 ความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

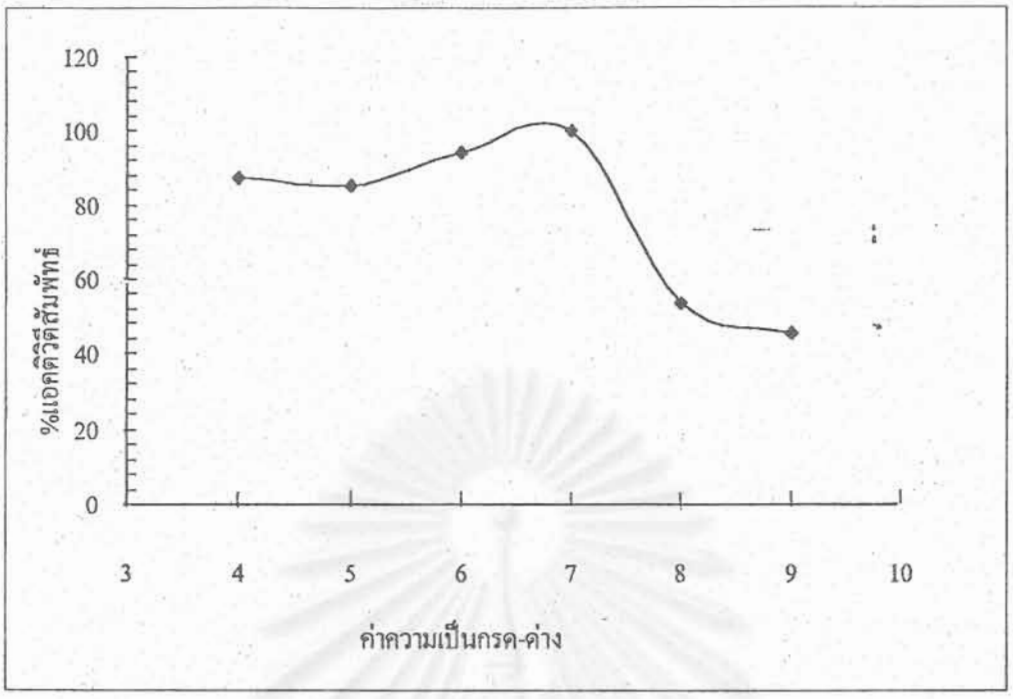
นำเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มใน 0.2M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเวลา 35 นาที แต่เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ 5 mM ลงในเอนไซม์ขณะทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถทนต่อความร้อนได้ดีขึ้นโดยแอคติวิตีจะลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 60 นาที ดังกราฟรูปที่ 20

ตารางที่ 3 การทำให้อะไมเลสบริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่าง ๆ

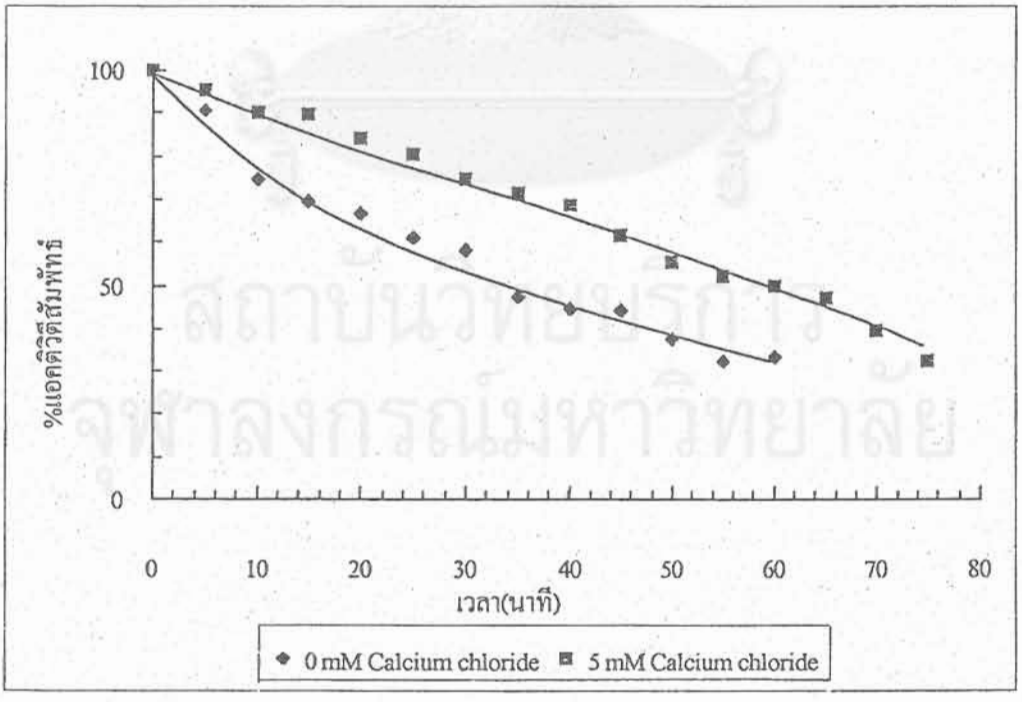
ขั้นตอน	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
Crude enzyme	324.0	9.59×10^5	296.0	100.0	1.0
Ultrafiltration	249.1	8.95×10^4	359.6	93.3	1.2
ตกตะกอนด้วย60% แอมโมเนียมซัลเฟต	80.3	8.21×10^4	1,022.2	91.8	3.5



รูปที่ 18 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ



รูปที่ 19 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ



รูปที่ 20 ความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

4.6.4 การศึกษาจลนพลศาสตร์

ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของแอลฟา-อะไมเลสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยบ่มเอนไซม์ในแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ผลดังกราฟรูปที่ 21 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสับเสตรทเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นก็มากขึ้นด้วย การทดลองเลือกใช้เวลา 15 นาที เนื่องจากเป็นช่วง First order kinetic มาเขียนกราฟ Lineweaver-Burk Plot ดังกราฟรูปที่ 22 หาค่า Km ได้เท่ากับ 0.65 mg/ml และ Vmax เท่ากับ 2.78×10^{-2} nmol/min

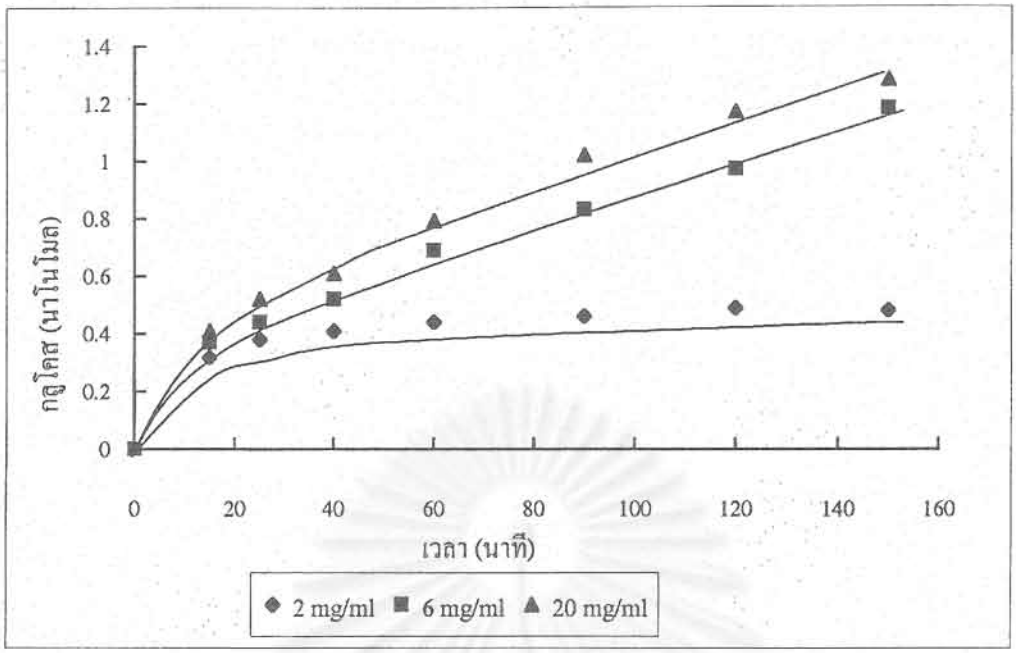
บ่มเอนไซม์ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 125, 250 และ500 unit ในแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ความเข้มข้น 2 mg/ml วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ดังรูปที่ 23 เลือกช่วงเวลาการเกิดน้ำตาลที่เวลา 15 นาที มาเขียนกราฟระหว่างค่า V กับ [E] ดังกราฟรูปที่ 24 พบว่าความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ปริมาณเอนไซม์ 500 unit ความเร็วของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยแป้งเกิดขึ้นเร็วที่สุด

4.6.5 ระยะเวลาการเก็บรักษาเอนไซม์

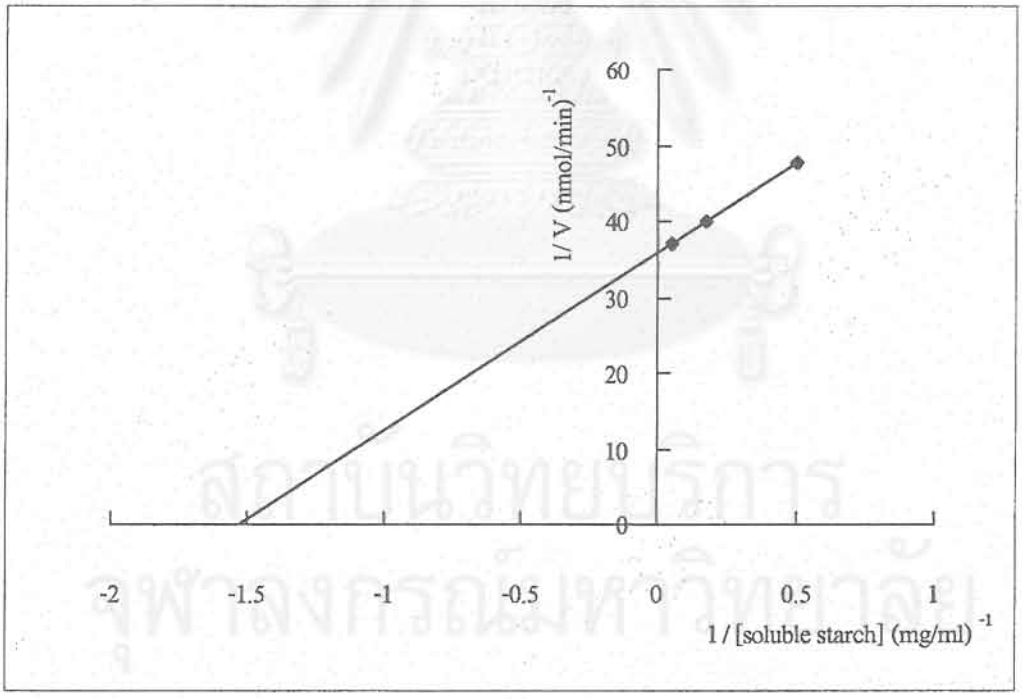
การเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของเหลวที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% วิธีการโดยวัดแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ –20 องศาเซลเซียส, 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 241 วัน เก็บตัวอย่างหาแอคติวิตีจำเพาะเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้น ผลการทดลองแสดงว่ามีการสูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยเมื่อเก็บรักษาที่ –20 และ 4 องศาเซลเซียส คือมีแอคติวิตีเหลือ 94.5% และ 85.0% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นของเอนไซม์ แต่ที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 30 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 50% เมื่อเก็บไว้ประมาณ 64 วัน ดังรูปที่ 47

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% และทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilization นำเอนไซม์ที่ได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ –20 องศาเซลเซียส 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 241 วัน พบว่าเอนไซม์ไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และสูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส คือมีแอคติวิตีเหลือ 90.5% และ 80.2% ตามลำดับ ดังรูปที่ 25

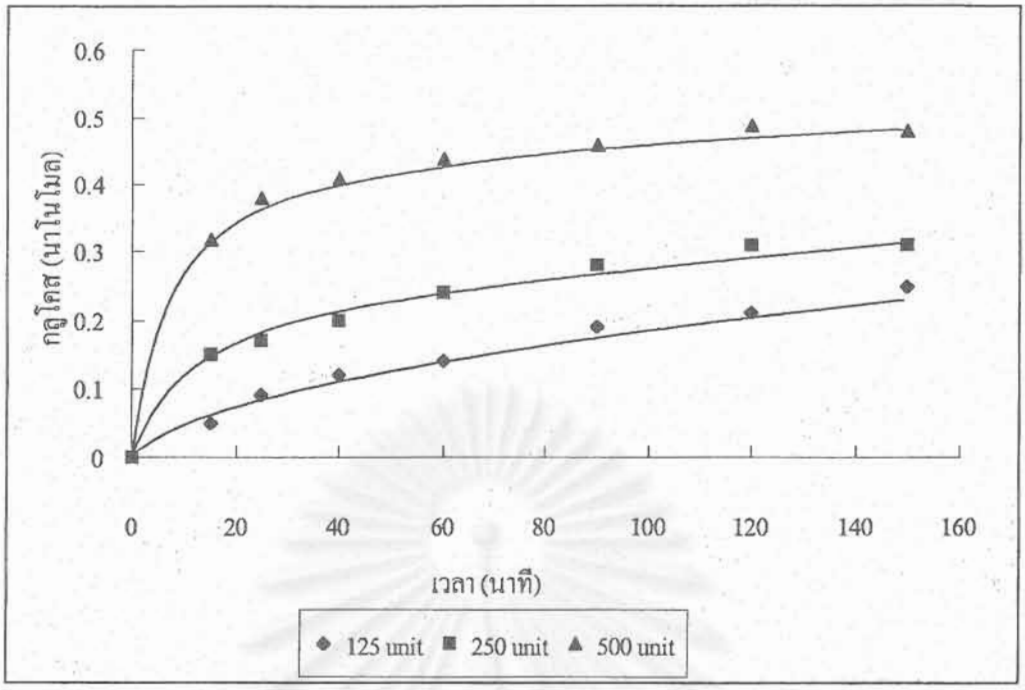
เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ในรูปของเหลวและผง เมื่อนำไปเก็บรักษาในอุณหภูมิต่าง ๆ คือ –20, 4 และ30 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 26 ผลการทดลองแสดงว่าการเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเอนไซม์ในรูปผงสามารถรักษาแอคติวิตีได้ดีกว่าการเก็บในรูปของเหลว ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิต่ำคือ –20 และ 4 องศาเซลเซียส เอนไซม์ในรูปผงและของเหลวสามารถรักษาแอคติวิตีได้ดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูง



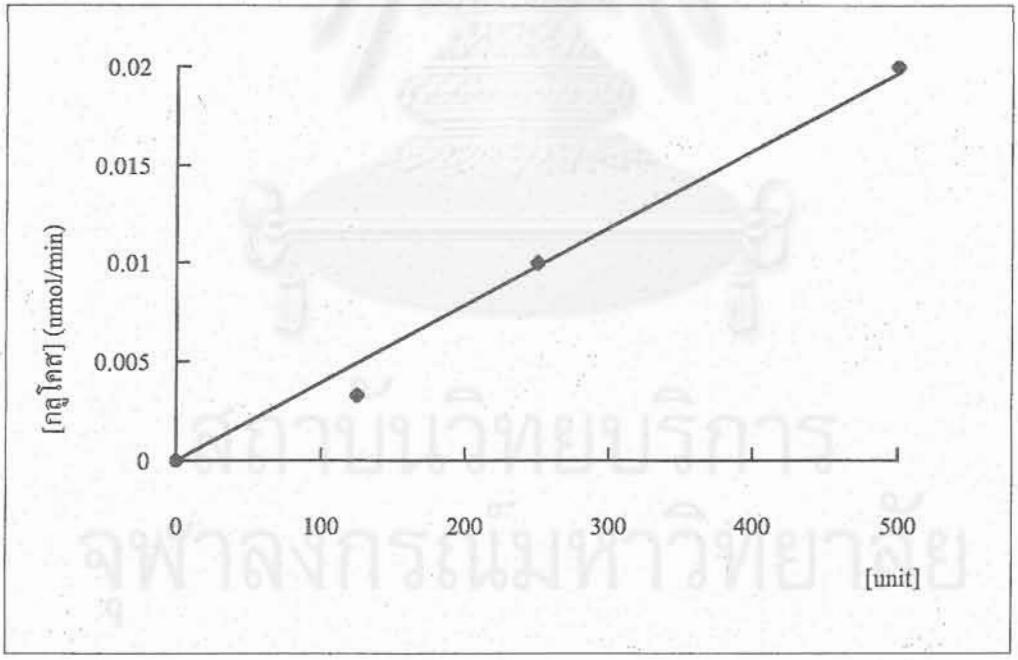
รูปที่ 21 ปริมาณกลูโคส (นาโนโมล) ที่เกิดขึ้นจากการบ่มสับเสตรทความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน



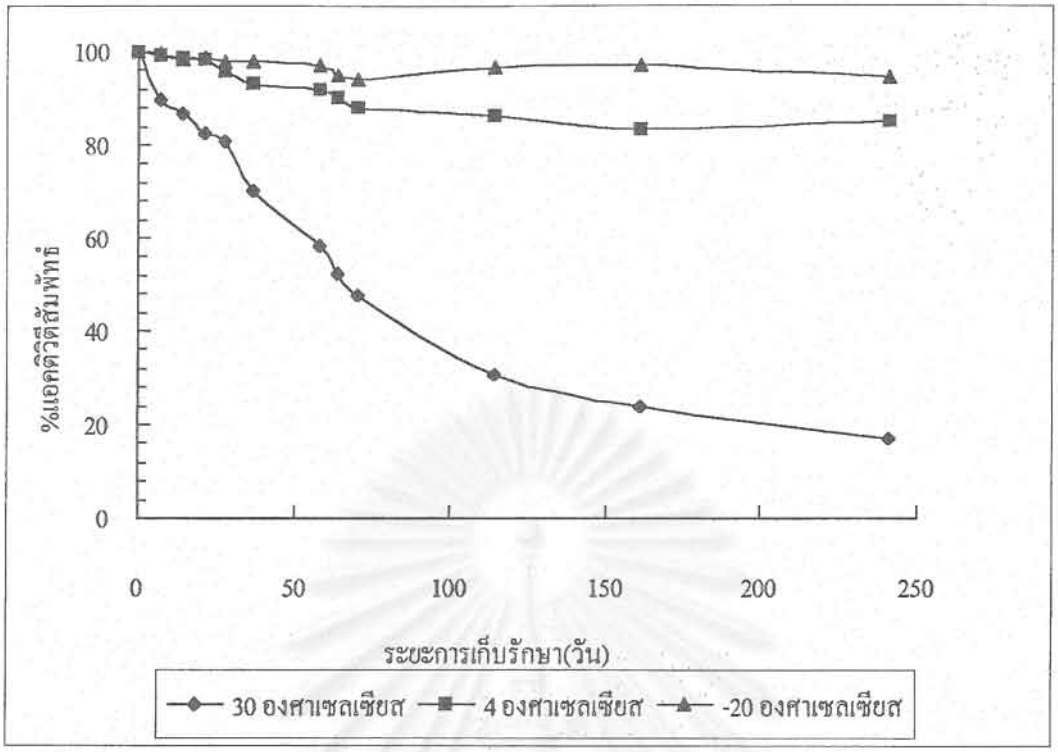
รูปที่ 22 Lineweaver-Burk Plot ของแอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25



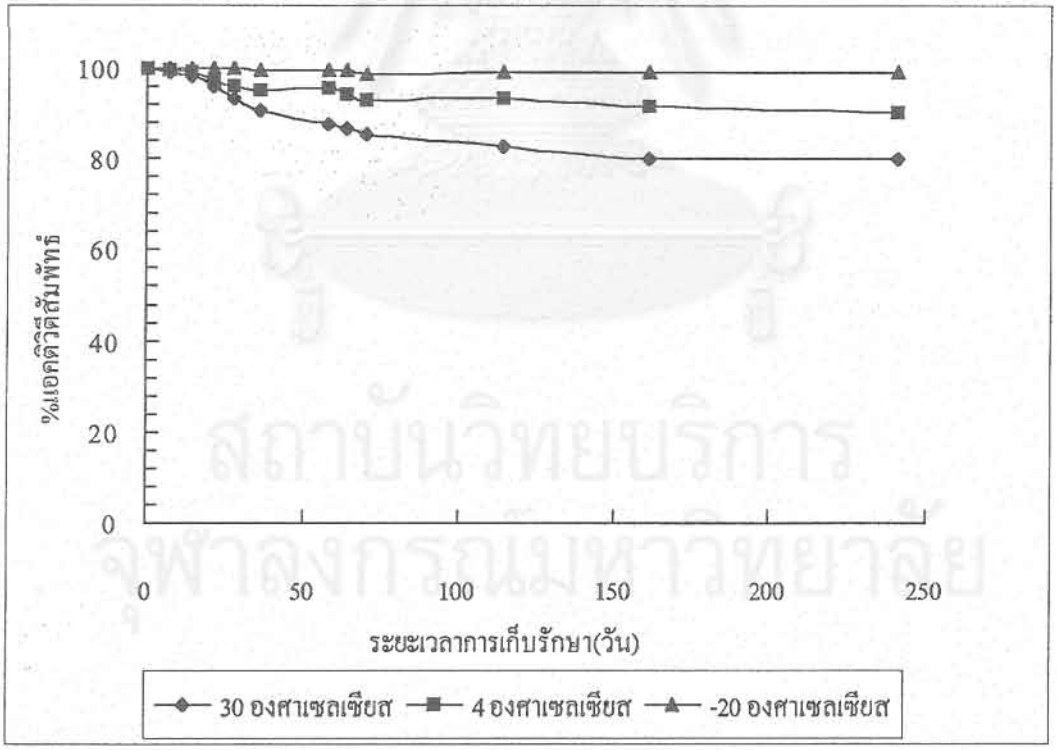
รูปที่ 23 ปริมาณกลูโคส (นาโนโมล) ที่เกิดขึ้นจากการบ่มสับเสตรทกับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน



รูปที่ 24 ผลของความเข้มข้นของแอลฟา-อะไมเลสที่มีต่อความเร็วในการย่อยแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 7.0



รูปที่ 25 ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของเหลวที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 241 วัน



รูปที่ 26 ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปผงที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 241 วัน

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการทดลองคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำและดินที่ได้จากน้ำพุร้อนจังหวัดเชียงใหม่ ราชบุรี และกาญจนบุรี เมื่อนำตัวอย่างน้ำพุร้อนที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่มาเลี้ยงบนอาหารสำหรับคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียและยีสต์พบว่าไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งน้ำพุร้อนตามธรรมชาติมีอุณหภูมิสูงถึง 98 องศาเซลเซียส ทำให้มีจุลินทรีย์จำนวนน้อยที่สามารถทนและเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง การคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้ทดลองโดยวัดขนาดวงใสรอบโคโลนีที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์หลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยเอนไซม์นั้นสามารถย่อยแป้งได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่าวงใสที่เกิดจากอะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีขนาดใหญ่ที่สุด และเมื่อนำไปวัดแอคติวิตีพบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่แยกได้จากดินในประเทศไทยมาเลี้ยงเชื้อเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับขวดเขย่า และขยายการผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์

การทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีสูตรอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 0.5%(w/v) และสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), KH_2PO_4 0.3% (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.1% (w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสที่มีแอคติวิตีสูงสุด พบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วงสูงสุดของการเจริญแบบทวีคูณที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่าและที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อผลิตในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 5 ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* MFF4 ทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมัก การผลิตแอลฟา-อะไมเลสเริ่มต้นในช่วงแรกของระยะการเจริญแบบทวีคูณและสูงสุดในช่วงปลายของระยะการเจริญแบบทวีคูณ (Wind และคณะ, 1994)

แหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส โดยทั่วไปสับสเตรทได้แก่ ไกลโคเจน แป้ง มอลโตส มอลโตไตรโอส และ แอลฟา-1,4 โอลิโกแซคคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตแอลฟา-อะไมเลส (Salva และ Moraes, 1995) การทดลองของ Dercova และคณะ (1992) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยแปรผันแหล่งคาร์บอนพบว่าแป้งและมอลโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำให้ผลิตแอลฟา-อะไมเลส และจะถูกกดดันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส เนื่องจากมีรายงานว่าแป้งสามารถเหนี่ยวนำ

การเจริญและการผลิตอะไมเลส (Salva และ Moraes, 1995) ดังนั้นการทดลองจึงใช้แป้งชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแป้งที่ใช้ในการทดลองส่วนใหญ่เป็นแป้งที่หาได้ง่ายและผลิตได้ในประเทศ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด และแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าการใช้แป้งชนิดอื่น

การเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังจากความเข้มข้น 0.1%(w/v) เป็น 0.5%(w/v) เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังสูงกว่า 0.5%(w/v) เอนไซม์ที่ผลิตได้กลับมีแอคติวิตีจำเพาะลดลงทั้งนี้อาจเกิดจากแป้งที่ความเข้มข้นสูงถูกย่อยสลายกลายเป็นกลูโคสปริมาณมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีมากเกินไปทำให้เกิด catabolite repression โดยที่กลูโคสจะไปกดการทำงานของยีนส่วนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้หรือทำให้เกิดการชะลอการสร้างเอนไซม์ อีกทั้งความเข้มข้นสูงของแป้งทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงซึ่งมีผลต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารที่เป็นไปได้ยาก และส่งผลต่อการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wind และคณะ (1994) และ Rukhaiyar และ Srivastava (1995)

ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นกับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ การทดลองแปรผันแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์พบว่ามีการเจริญของเชื้อและการผลิตแอลฟา-อะไมเลสต่ำกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ และเมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์คือ $(NH_4)_2SO_4$ และNH_4NO_3 สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสดีกว่าการใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NaNO_3$ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Narang และ Satyanarayana (2001) ที่แปรผันแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนพบว่าการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ และNH_4Cl เชื้อมีการเจริญดีและผลิตเอนไซม์สูง ในขณะที่แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต และ $NaNO_3$ มีผลทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ลดลง การทดลองของ Mamo และ Gessesse (1999) เชื้อ *Bacillus* WN11 เจริญและผลิตเอนไซม์สูงเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์คือ โปรติโอเปปโตน และทริปโตน แต่เชื้อไม่สามารถเจริญเมื่อใช้ KNO_3, NH_4Cl และ ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน

การใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์พบว่าสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด โดยนำกากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยกรดและความร้อนจะช่วยทำให้เปปไทด์สายยาวถูกตัดออกเป็นสายสั้นและเกิดกรดอะมิโนอิสระละลายในน้ำมากขึ้นทำให้เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดี อีกทั้งการทดลองนี้ต้องการลดต้นทุนการผลิตเพื่อขยาย

ขนาดในการผลิต เนื่องจากโดยทั่วไปราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักคิดเป็น 30% ของราคาค่าต้นทุนการผลิต (Lee และคณะ, 1998) มีรายงานการทดลองที่มีการนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้แทนสารที่มีราคาแพงเช่นการทดลองของMahmood และคณะ (1998) และ Uguru และคณะ (1997)

แปรผันปริมาณสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.01% 0.05% และ 0.10% พบว่าเมื่อใช้ไนโตรเจน 0.05% จะมีการผลิตแอลฟา- อะไมเลสสูงสุดแต่เมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.1% การผลิตแอลฟา-อะไมเลสกลับลดลงเนื่องจากปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ดังรายงานของการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนของ *Bacillus thermooleovorans* NP 54 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3% (w/v) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตอะไมเลส และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.3 % (w/v) กลับทำให้แอคติวิตีลดลง เนื่องจากเกิดการเหนี่ยวนำการสร้างโปรติเอสหรือกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงทำให้เกิดการกดดันแบบย้อนกลับของผลิตภัณฑ์ (Malhotra และคณะ, 2000)

ระหว่างการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่านั้น ผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจากเมแทบอลิซึมอาจทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อแปรเปลี่ยนไปจากเดิมอย่างรวดเร็วมาก มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดชะงักการเจริญเติบโตได้หรือไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งในการทดลองระดับขวดเขย่าได้แปรผันค่า pH เท่ากับ 5.0-9.0 พบว่าเชื้อมีการเจริญใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกพบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกภาวะมีการปรับอยู่ในช่วงค่า pH 6.0-7.0 และมีค่าอยู่ในช่วงนี้ตลอดการทดลอง ซึ่งอยู่ในช่วงค่า pH ที่เหมาะสมของการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. ส่วนการทดลองระดับถังหมักซึ่งมีการควบคุมค่า pH ตลอดการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ค่า pH เท่ากับ 8.0 เชื้อมีอัตราการเจริญต่ำกว่าการเลี้ยงที่ค่า pH 6.0 และ 7.0 ซึ่งอาจเป็นเพราะเป็นค่า pH ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ส่วนที่ค่า pH 6.0 และ7.0 มีการเจริญใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาค่าแอคติวิตีจำเพาะพบว่าที่ค่า pHในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด จึงใช้ค่านี้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญที่อุณหภูมิได้ต่างกัน ซึ่ง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Mesophile จึงทดลองแปรผันอุณหภูมิในช่วง 30–40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าและถังหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตสูงสุดและผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Salva และ Moraes (1994) ที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 601 โดยแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อคือ 30, 33, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้ดีและเอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด

การทดลองในระดับขวดเขย่าการให้อากาศทำโดยการใช้เครื่องเขย่าที่ให้อากาศโดยการหมุนเป็นวง (Rotary shaker) ซึ่งการละลายของออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นตามความเร็วรอบในการเขย่าที่เพิ่มขึ้น การกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และทำให้

ออกซิเจนถูกตีเป็นฟองอากาศเล็ก ๆ จำนวนมากเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวฟองอากาศให้สัมผัสอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารได้ดีขึ้น ถังหมักที่ใช้มีเครื่องกวน (stirrer) ซึ่งประกอบด้วยใบพัดชนิด disc turbine ซึ่งมีความสามารถในการตีอากาศเป็นฟองขนาดเล็กได้ดี นอกจากนี้ยังมีเหล็กกั้น (buffle) ในถังหมัก เพื่อป้องกันการเกิดน้ำวนและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการให้อากาศ จากการแปรผันอัตราการกวนดังนี้ 200, 250 และ 300 rpm พบว่าที่อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm เชื้อสามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสได้สูงที่สุด แต่ที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุด แต่มีการผลิตแอลฟา-อะไมเลสต่ำกว่าการใช้อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm เนื่องจากที่ความเร็ว 300 rpm เชื้อได้รับออกซิเจนและสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้มากที่สุด เชื้อจึงนำสารอาหารเหล่านั้นไปใช้ในการเจริญมากกว่าซึ่งสังเกตได้จากจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่มีปริมาณสูง จึงทำให้พบแอคติวิตีของแอลฟา-อะไมเลสน้อยลง และที่การกวน 200 rpm พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสได้สูงเท่าที่ควร ซึ่งเป็นเพราะที่การตีฟองอากาศไม่สามารถกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีเท่าที่ควรจึงทำให้เชื้อไม่สามารถได้รับออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

การทดลองในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 5 ลิตร ปริมาณการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดจากการให้อากาศ และการกวน ซึ่งถังหมักที่ใช้ในการทดลอง มีระบบการให้อากาศโดยอัดอากาศผ่าน Air compressor อากาศจะผ่านเครื่องวัดอัตราการไหล (rotameter) จากนั้นจึงผ่านฟิลเตอร์กรองอากาศที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร โดยให้อากาศผ่านเข้าทางด้านล่างของถังหมัก ในการทดลองแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm เชื้อมีอัตราการเจริญสูงกว่าการให้อากาศที่ 1.0 และ 0.5 vvm แต่เมื่อพิจารณาค่าแอคติวิตีจำเพาะพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เชื้อผลิตอะไมเลสได้สูงสุดซึ่งอาจจะมีผลเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนที่น้อยหรือมากเกินไปมีผลต่อการผลิตแอลฟา-อะไมเลส (Tonkova และคณะ, 1993)

ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยแป้งโดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน พบว่าเกิดน้ำตาล Glucose Maltose Maltotriose Maltotetraose และ Maltopentaose เมื่อเวลาการย่อยเพิ่มขึ้นเกิดน้ำตาลGlucose Maltose และ Maltotriose มากขึ้นด้วย ดังนั้นเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นแอลฟา-อะไมเลส ซึ่งตรงกับการทดลองของ Lealem และ Gashe (1994) พบว่าเมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. A-001 มาย่อยแป้ง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี paper chromatography ซึ่งช่วงแรกเกิดโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าMaltotetraose เมื่อบ่มต่อไปเกิด Maltotriose Maltose และ Glucose มากขึ้น ชี้ให้เห็นว่าเป็นแอลฟา-อะไมเลสเหมือนกัน

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยนำสารละลายเอนไซม์ (Crude enzyme) มากรองด้วยเครื่อง Ultrafiltration เอนไซม์มีความเข้มข้นขึ้น 6 เท่า ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 1.21 เท่า และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตประมาณ 93.3% หลังจากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียม-

ซัลเฟต โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นครั้งละ 10% พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 60 % ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดและมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 3.5 เท่า คล้ายกับการทดลองของ Freer (1993) นำแอลฟา-อะไมเลส (crude enzyme) ที่ผลิตโดย *Streptococcus bovis* JB1 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70% เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.9 เท่า

เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนทำงานได้ดีที่สุดที่ค่า pH เท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* DP1 ที่มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Dercova และคณะ, 1992) และเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* 65 ที่มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0 และ 60 องศาเซลเซียส (Hayashida และคณะ, 1988) ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อแอคติวิตีและความเสถียรต่อเอนไซม์โดยมีผลทำให้ความแรงของพันธะไฮโดรเจนและไอออนิกภายในโมเลกุลลดลง ส่งผลทำให้โครงรูป 3 มิติของเอนไซม์เสียสภาพไป (Ensari และคณะ, 1995) การที่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากค่า pH มีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง (active site) หรือทำให้โปรตีนเสียสภาพทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดต่ำลง

ความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้นเมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ โดยพิจารณาจากความสามารถในการทนความร้อนได้นานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแอลฟา-อะไมเลสเป็น metallo enzyme มีแคลเซียมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ทำหน้าที่เป็น co-factor การเติมแคลเซียมลงไปช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มขึ้น การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของแอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีค่า Km ของแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 0.65 mg/ml และค่า Vmax เท่ากับ 2.78×10^{-2} (nmol/min) ความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ ที่ปริมาณเอนไซม์ 500 unit ความเร็วของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยแป้งเกิดขึ้นเร็วที่สุด

ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาเอนไซม์โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ที่อยู่ในรูปผงและของเหลวที่อุณหภูมิ –20, 4 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 241 วัน สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ผงโดยสูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย จากผลการทดลองนี้แสดงว่าแอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่เตรียมในรูปผงสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) โดยมีการเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย ดังนั้นอุณหภูมิห้องก็เพียงพอต่อการรักษาเอนไซม์ ไม่จำเป็นที่จะต้องเก็บที่อุณหภูมิต่ำ อีกทั้งเอนไซม์ในรูปผงมีน้ำหนักเบาสะดวกแก่การบรรจุและการขนส่งอีกด้วย

การเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของเหลวที่อุณหภูมิ –20, 4 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บได้เป็นเวลา 241 วัน สูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 50% เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 64 วัน ดังนั้นการเก็บเอนไซม์ในรูปของเหลว ถ้าต้องการเก็บไว้เป็นระยะเวลานานควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตแอลฟา-อะไมเลส โดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งผลการทดลองทั้ง 2 ระดับได้ผลภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเหมือนกันดังตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตในระดับถังหมักมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับระดับขวดเขย่า แสดงให้เห็นว่าการผลิตในระดับถังหมักมีประสิทธิภาพช่วยให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีดีขึ้น งานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คือ สูตรอาหาร และภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสรุปได้ว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แป้งมันสำปะหลัง และสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกตามลำดับ เมื่อพิจารณาสูตรอาหารที่ใช้พบว่าแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่สามารถผลิตได้ภายในประเทศ หาซื้อง่าย และมีราคาถูก ส่วนกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงาน มีราคาถูก จึงจัดว่าวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด มีความเป็นไปได้ในการนำไปเป็นสูตรอาหารในระดับอุตสาหกรรม เมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิตเอนไซม์ พบว่าการผลิตทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักมีค่าใช้จ่ายของค่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าไฟฟ้าและสาธารณูปโภคใกล้เคียงกัน แต่แอคติวิตีจำเพาะที่ผลิตได้ในระดับขวดเขย่ามีค่าน้อยกว่าการผลิตในระดับถังหมัก ดังนั้นเมื่อคำนวณเป็น U/บาท การผลิตในถังหมักจึงคุ้มทุนกว่าการผลิตในระดับขวดเขย่าดังตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบสมบัติแอลฟา-อะไมเลสจากเอนไซม์ทางการค้า ได้แก่ Aquazym Ultra, BIOKEISTASE L150 นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ และ BAN ผลิตโดย *Bacillus amyloliquefeciens* มีสมบัติดังตารางที่ 6 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมใกล้เคียงกับเอนไซม์ทางการค้า และสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิห้องได้อย่างน้อย 8 เดือน เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เหลวที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับเอนไซม์ทางการค้า BAN ของบริษัท NOVO โดยนำเอนไซม์มาหาแอคติวิตี (Dextrinizing activity) โดยวิธีของ Fuwa (1954) เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีจำเพาะ ต่ำกว่า BAN 5 เท่า เปรียบเทียบราคาต้นทุนการผลิตพบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้มีต้นทุนการผลิตสูงกว่าเอนไซม์ BAN เนื่องจากเป็นต้นทุนการผลิตในระดับห้องทดลอง (lab scale) สารเคมีที่ใช้เป็น lab grade ซึ่งมีราคาสูง

แนวทางการปรับปรุงการผลิตแอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 อาจทำโดยเพิ่มขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เพื่อเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ให้สูงขึ้น แต่ขั้นตอนนี้จะทำให้ราคาของอะไมเลสสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อาจทำโดยการเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยทำการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต หรือสารเคมี เช่น การกลายพันธุ์ *Bacillus* sp. MK 716 โดยสารเคมี Ethyl Methane Sulfonic acid (EMS) ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของแอลฟา-อะไมเลสเพิ่มขึ้น 40 เท่า (Sidhu และคณะ, 1997) และการ กลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต, Ethyleneimine และ Nitrosoguanidine สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลสที่มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น 2 เท่า (Bailey และ Markkanen, 1975)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ปัจจัยที่ศึกษา	ขวดเขย่า 250 มิลลิลิตร	ถังหมัก 5 ลิตร
แป้งมันสำปะหลัง (แหล่งคาร์บอน)	0.5%(w/v)	0.5%(w/v)
กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริก(แหล่งไนโตรเจน)	0.05 %N	0.05 %N
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (% v/v)	1.0% (v/v)	1.0% (v/v)
อัตราการให้อากาศ (vvm)	-	1.0 vvm
อัตราเร็วในการกวน (rpm)	250 rpm	250 rpm
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.0 (ไม่ควบคุม)	7.0 (ควบคุม)
อุณหภูมิในการเลี้ยง(องศาเซลเซียส)	37	37
แอคติวิตีจำเพาะของ Crude enzyme (U/mg protein)	247.1	470.2

ตารางที่ 5 ต้นทุนของการผลิต (ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร)

Cost Element	Cost in shaking flask	Cost in fermentor
อาหารเลี้ยงเชื้อ(บาท)	52	52
ค่าไฟฟ้าและสาธารณูปโภค(บาท)	1,003.6	1,025.7
ค่าใช้จ่ายทั้งหมด(บาท)	1,055.6	1,075.4
Enzyme yield per batch(Unit)	131,930.5	263,860.9
Unit cost (U/บาท)	125	245.4

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบอะไมเลสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับเอนไซม์ทางการค้า

เอนไซม์อะไมเลส	อุณหภูมิ	ค่า pH	ลักษณะเอนไซม์	การเก็บรักษา
เอนไซม์ที่ผลิตในงานวิจัยนี้	60 °C	7.0	ของเหลวสีน้ำตาล, ผงสีน้ำตาล	ผง:เก็บที่อุณหภูมิห้อง และต่ำกว่า 4°C อย่างน้อย 8 เดือน ของเหลว:เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ประมาณ 2 เดือน และต่ำกว่า 4°C ได้อย่างน้อย 8 เดือน
Aquazym Ultra	70°C	5.5 – 7.5	ของเหลว สีน้ำตาล	ต่ำกว่า 25°C เก็บได้อย่างน้อย 3 เดือน
BIOKEISTASE L150	65-70 °C	5.8-6.0	ของเหลวสีน้ำตาล	เก็บที่อุณหภูมิต่ำ
Bacterial Amylase Novo (BAN)	70°C	5.0-7.0	ของเหลวสีน้ำตาล, เม็ด(Microgranulate)	25 °C เก็บได้นาน 6 เดือน 5°Cเก็บได้นานอย่างน้อย 1 ปี

สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟา-อะไมเลสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่าคือเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Basal medium (Bounocore, 1976) ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05%เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง
2. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟา-อะไมเลสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ในอาหารสูตร Basal medium (Bounocore, 1976) ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 0.5%เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0% (v/v) ค่า pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง
3. นำเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาย่อยแป้ง วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค HPLC พบว่าเกิดน้ำตาลกลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยนานขึ้น
4. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน โดยทำเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยการกรองผ่าน Regenerated Cellulose YM 10 เมื่อเอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 6 เท่า เอนไซม์จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า หลังจากนั้นนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 % มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 3.5 เท่า
5. อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ
6. นำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ใน 0.2M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 35 นาที และ 60 นาที เมื่อไม่มีการเติม และเติมแคลเซียมคลอไรด์ 5 mM ตามลำดับ
7. ค่า Km ของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนเมื่อใช้แป้งมันฝรั่งเป็นสับสเตรท เท่ากับ 0.65 mg/ml และ Vmax เท่ากับ 2.78×10^{-2} nmol/min
8. การเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของเหลวและผง ที่อุณหภูมิ –20 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 241 วัน สามารถเก็บรักษาเอนไซม์โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีหรือสูญเสียเพียงเล็กน้อย ส่วนการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ผงจะสูญเสียแอคติวิตีน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ในรูปของเหลว

รายการอ้างอิง

Bailey, M.J. and Markkanen, P.H. 1975. Use of mutagenic agents in improvement of α-amylase production by *Bacillus subtilis*. J.Appl. Chem. Biotechnol. 25 : 73-79.

Bajpai, P. and Bajpai, P.K. 1987. High-temperature alkaline alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. Biotech and Bioeng. 33 : 72-78.

Bolton, D.J, Kelly, C.T. and Forgarty, W.M. 1997. Purification and characterization of the α-amylase of *Bacillus flavothermus*. Enzyme Microb. Technol. 20 : 340-343.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.

Buonocore, V., Caporale, C., Rosa, M.D. and Gambacorta, A. 1976. Stable, Inducible thermoacidophilic alpha-amylase from *Bacillus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 128(2) : 515-521.

Dercova, K., Augustin, J. and Krajcova, D. 1992. Cell growth and alpha-amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. Folia Microbiol. 37(1) : 17-23.

Ensari, N.Y., Otludil, B. and Aytekin, M.C. 1995. Effect of starch induced bacterial growth and amylase production in *Bacillus subtilis*. Starch. 47(8) : 315-321.

Freer, S.N. 1993. Purification and characterization of the extracellular α-amylase *from Streptococcus bovis* JB1. Appl. Environ. Microbiol. 59(5) : 198-1402.

Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. J. Bio. Chem. 41 : 583-603.

Gerhartz, w. 1990. Enzyme in industry : Production and applications. Germany : Federal.

Hayashida, S., Teramoto, Y. and Inque, T. 1988. Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting α-amylase from *Bacillus subtilis* 65. Appl. Environ. Microbiol. 54(6) : 1516-1522.

Lealem, F. and Gashe, B.A. 1994. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). J. Appl. Bacteriol. 77 : 348-352.

Lee, B., Pometto, A.L., Demirci, A. and Hinz, P.N. 1998. Media evaluation for the production of microbial enzymes. J. Agric. Food Chem. 46 : 4775-4778.

Mahmood, A.U., Greenman, J. and Scragg, A.H. 1998. Orange and potato peel extracts: analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. Enzyme Microb. Technol. 22 : 130-137.

Malhotra, R., Noorwez, S.M. and Satyanarayana, T. 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovarans* NP 54. Letters in Appl. Microbiol. 31 : 378-384.

Mamo, G., Gashe, B.A. and Gessesse, A. 1999. A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilis *Bacillus* sp. WN11. J. Appl. Microbiol. 86 : 557-560.

Mamo, G. and Gessesse, A. 1999. Effect of cultivation conditions on growth and α-amylase production by a thermophilic *Bacillus* sp. Letters in Appl. Microbiol. 29 : 61-65.

Medda, S. and Chandra, A.K. 1980. New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α-amylase active at alkaline pH. J. of Appl. Bacteriol. 48 : 47-58.

Narang, S. and Satyanarayana, T. 2001. Thermostable α-amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans*. Letters in Appl. Microbiol. 32 : 31-35.

Nelson, N. 1994. A photometric Adaptation of the Somogyl method for the determination of glucose. J.Bio.Chem. 153 : 375-380.

Priest, R. and Sharp, E. 1989. Fermentation of Bacilli. In J.O. Neway (ed.), Fermentation process development of industrial organisms, PP. 95-107. California : Cetus Corporation Emeryville.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Bio. Rev. 62(3) : 597-635.

Rukhaiyar, R. and Srivastava, S.K. 1995. Effect of various carbon substrates on α-amylase production from *Bacillus* species. World J. of Microb. Biotecnol. 10(2) : 76-82.

Salva, T.de J.G. and Moraes, I.O. 1995. Effect of the carbon source on α-amylase production by *Bacillus subtilis* BA-04. Rev. Microbiol. 26(1) : 46-51.

Salva, T.de J.G. and Moraes, I.O. 1994. Effect of pH and temperature of *Bacillus subtilis* ATCC 601 alpha-amylase production some properties of the crude enzyme. Rev. Microbiol. 25 (2) : 119-125.

Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T. and Gupta, J.K. 1997. Strain improvement for the production of thermostable α-amylase. Enzyme Microb Technol. 21 : 525-530.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

   1.1 Bradford stock solution

   ละลาย Comassie brilliant blue G-250 350 มิลลิกรัม ในกรดฟอสฟอริก 85 % ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเอทธานอล 95 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บได้นานที่อุณหภูมิห้อง

   1.2 Bradford working solution

   ผสม Bradford stock solution ปริมาตร 30 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 % ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เอทธานอล 95 % 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา เก็บได้หลายสัปดาห์ในที่เย็น

   1.3 สารละลาย BSA มาตรฐาน

   ละลาย Bovine serum albumin จำนวน 1 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บที่ –20 °C

2. สารละลายสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

   2.1 Nelson Reagent

   ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 53.2 กรัม ละลายน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นใส่กรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำสารละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ จำนวน 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมลงไปกวนให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้

   2.2 Alkaline Copper Reagent

   ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)จำนวน 71 กรัม และโปแตสเซียมโซเดียมทาร์เตรทจำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 700 มิลลิลิตร ใส่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10 % จำนวน 80 มิลลิลิตร นำไปตั้งบน hot plate ให้อุ่น แล้วใส่โซเดียมซัลเฟตจำนวน 180 กรัม ลงไป คนให้ละลายปรับปริมาตร ให้เท่ากับ 10 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 – 48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ เก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Kjeldahl Nitrogen)

   3.1 ตัวเร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ต่อคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) อัตราส่วน 10 : 1

   3.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% : ชั่ง 400 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ละลายในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 1 ลิตร

   3.3 สารละลายกรดบอริก 2% : ชั่ง 20 กรัม (H_3BO_3) แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.4 สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริก 0.1 นอร์มัล : กรดซัลฟุริก 2.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร เทียบความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 นอร์มัล จำนวน 25 มิลลิลิตร โดยใช้เมทธิลเรด(อินดิเคเตอร์)บอกจุดยุติ จากสีส้มเป็นสีชมพู

3.5 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 นอร์มัล : อบโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถทำแห้ง ชั่งสาร 5.299 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.6 สารละลายอินดิเคเตอร์ผสมระหว่างบรอมครีซอลกรีนกับเมทธิลเรด : ละลายMethyl red จำนวน 20 มิลลิกรัม และBromcresol green จำนวน 100 มิลลิกรัม ในเอทธานอล 95 % หรือไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ จำนวน 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4 สารละลายสำหรับหาความเสถียรของเอนไซม์

4.1 สารละลายอะซีเตต บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ : ละลายโปแตสเซียมอะซีเตต (CH_3COOK) 1.96 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายด้วยกรดอะซีติก 0.2 โมลาร์ จนได้ pH 3.0, 4.0 หรือ 5.0 ตามต้องการแล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

4.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0

ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.H_2O$) 23.96 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 3.73 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

4.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7.0

ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.H_2O$) 10.98 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 17.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

4.4 สารละลายทรีส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

ละลายทรีส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) 2.42 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ให้เป็น 8.0 หรือ 9.0 ตามต้องการ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.5 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 10.0

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.69 กรัม และ โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 1.14 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.6 สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 11.0

ละลายไกลซีน 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย NaOH 1 โมลาร์ จนได้ pH 11.0

5 สารละลายไอโอดีนสำหรับหาแอคติวิตีเอนไซม์ (Iodine Reagent)

ละลายไอโอดีน 0.2 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

1.1 อาหารสำหรับคัดเลือกแบคทีเรีย

ละลายส่วนผสม Meat extract 5 กรัม Peptone 10 กรัม NaCl 5 กรัม Agar 20กรัม ในน้ำกลั่น จำนวน 1 ลิตร ปรับ pH 8.0 บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารสำหรับคัดเลือกยีสต์

ละลายส่วนผสม Peptone 5 กรัม Yeast extract 3 กรัม Malt extract 3 กรัม Glucose 10 กรัม Agar 20 กรัม ในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร ปรับ pH 5.6 บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Starch medium

ละลายส่วนผสม Soluble starch 10 กรัม Yeast extract 2 กรัม Agar 20 กรัม ในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร ปรับ pH 7.0 บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลฟา-อะไมเลส ในระดับขวดเขย่าและถังหมัก (Bounocore, 1986)

แหล่งคาร์บอน : แปรผันแหล่งคาร์บอน ดังนี้ แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้า แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ แป้งมันสำปะหลัง

แหล่งไนโตรเจน : แปรผันแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ น้ำเต้าหู้ สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริก $(NH_4)_2SO_4$,$(NH_4)_2HPO_4$, NH_4NO_3 และ $NaNO_3$

เกลือต่าง ๆ ดังนี้ : $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.2 กรัม KH_2PO_4 3 กรัม และ $CaCl_2 . 2H_2O$ 0.17 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ปรับ pH เท่ากับ 7.0

2. การเตรียมกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟุริก (เกษม พงษ์มณี, 2536)

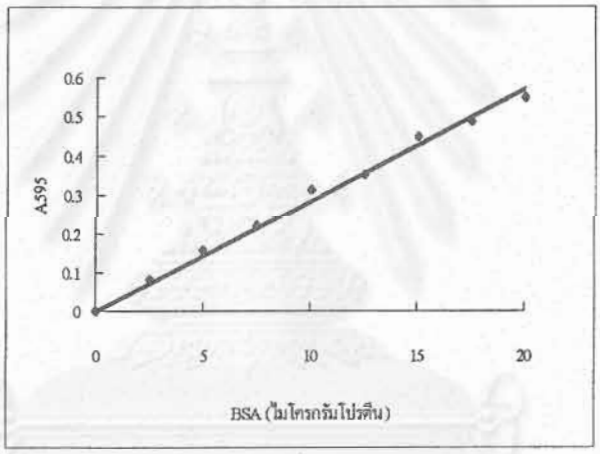
ชั่งกากถั่วเหลือง 12 กรัม ใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 1 นอร์มัลจำนวน 40 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 80 มิลลิลิตร กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใสปรับค่า pH ให้ได้ประมาณ 7.0 โดยใช้ NaOH เข้มข้น 10 นอร์มัล ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน นำเฉพาะส่วนน้ำใสมาใช้ นำไปหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl method แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ –20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการนำมาใช้

ภาคผนวกที่ 3 การสร้างวงใส (clear zone) ของ ก) การคัดเลือกจุลินทรีย์ขั้นแรก (Primary screen) และ ข) การคัดเลือกจุลินทรีย์ขั้นที่สอง (Secondary screen)

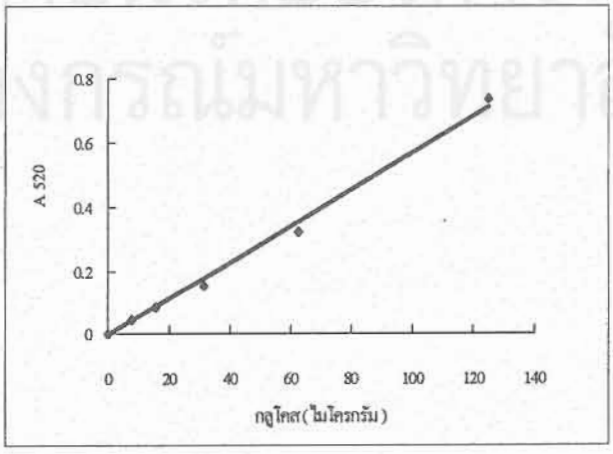
ก) ข)

ภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐาน

4.1 ปริมาณโปรตีน วิธี Bradford (1976) ความเข้มข้น BSA 0-20 ไมโครกรัม ที่ความยาวคลื่น 595 nm



4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ วิธี Nelson และ Somogyl (1944) ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐานความเข้มข้น0–125 ไมโครกรัม ที่ความยาวคลื่น 500 nm



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

Project: การผลิตโปรตีเอสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง

ผู้วิจัย

ผศ. นภา ศิวรังสรรค์

ผู้ช่วยวิจัย

วรรณวิมล ทรัพย์ดี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
1. บทนำ	1
2. ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	3
3. วิธีการทดลอง	5
4. ผลการทดลอง	12
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

โปรตีเอส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโน เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลชีพ (Ward, 1983) โดยโปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืชได้แก่ ปาเปนจากยางมะละกอ โบรมีเลนจากสับปะรด โปรตีเอสที่ได้จากสัตว์เช่น เรนนินจากกระเพาะลูกวัว, pepsin จากกระเพาะสุกรและ pancreatin จากตับอ่อน ส่วนโปรตีเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพได้แก่ เชื้อราและแบคทีเรีย (MG Halpem, 1981) ซึ่งมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมต่างๆได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมยา เป็นต้น ในทางการค้าพบว่ากลุ่มโปรตีเอสมีส่วนแบ่งในการตลาดถึง 60% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ (Ward, 1983)

ชนิดและสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส

- Acid Protease EC. 3.4.23
- Thiol Protease EC. 3.4.22
- Metallo Protease EC.3.4.24
- Alkaline Protease EC.3.4.21.14

การสร้างเอนไซม์และความสำคัญ

การสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จะเกิดขึ้นในช่วงปลายการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณ (Log phase) หรือในระยะแรกของการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) ใน complex media (Millet และคณะ, 1969; Priest, 1977) พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ขึ้นกับปริมาณกรดนิวคลีอิก ในขณะที่เซลล์มีการเจริญ จะนำเอากรดนิวคลีอิกจำนวนมากไปใช้ในการสังเคราะห์ไรโบโซม และเมื่อเซลล์หยุดการเจริญการสร้างไรโบโซมก็จะหยุดลงไปด้วย ทำให้กรดนิวคลีอิกที่เหลือพอที่จะนำไปสังเคราะห์เอนไซม์ ในช่วง stationary phase จึงพบว่าระยะนี้มีปริมาณเอนไซม์สูง (Coleman, 1967) เอนไซม์ที่สังเคราะห์จากไรโบโซมด้านปลายอะมิโนจะมี Leading sequence ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิค ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นผ่านออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากนั้น Leading sequence ซึ่งถือว่าเป็น signal sequence จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์เปปติเดสซึ่งอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อถูกตัดออกแล้วส่วนที่เป็นเอนไซม์ก็จะพับอยู่ในรูปที่เสถียร (Ward , 1983)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส

- แหล่งคาร์บอน
- แหล่งไนโตรเจน
- อิทธิพลของฟอสเฟต
- อิทธิพลของไอออนโลหะ
- อิทธิพลของภาวะแวดล้อมในการหมัก เช่น ความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ, อัตราเร็วในการกวนและการให้อากาศ

ประโยชน์และความสำคัญของแอลคาไลน์โปรตีเอสในด้านอุตสาหกรรม (Ward,1983; Outtrup & Boyce, 1990; Fox **และคณะ**, 1991)

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้กันในปัจจุบันโปรตีเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่นับว่ามีปริมาณการขายประมาณ 60% ของการขายเอนไซม์ชนิดต่างๆ ทั้งหมด (Ward, 1983) ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกจำนวน 1300-1500 ตันต่อปี และทำรายได้ทั้งหมด 300 ล้านเหรียญสหรัฐของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Hubner และคณะ, 1993) เราสามารถจำแนกประโยชน์ของโปรตีเอสในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้ดังนี้

1. การไฮโดรไลส์โปรตีน (Protein Hydrolysis) โดยทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและสะดวกขึ้น ตัวอย่างได้แก่
   - เจลาติน นำมาใช้ผสมในเครื่องดื่ม เครื่องสำอาง
   - กรดอะมิโนจากกากถั่วเหลืองนำไปใช้ผสมในอาหารลดความอ้วน เครื่องดื่ม
   - โปรตีนจากถั่วเหลือง นำไปใช้ในการหมักซอส
   - โปรตีนจากเนื้อปลา ช่วยลดระยะเวลาในการหมัก ช่วยลดปริมาณปลาที่นำมาใช้ในการหมัก เพิ่มคุณค่าทางอาหารและช่วยเพิ่มรสชาด
   - โปรตีนจากหางนมและเคซีน ช่วยให้โปรตีนละลายน้ำ เพิ่มรสชาดให้ดีขึ้น และทำให้สารละลายใส
   - โปรตีนจากเนื้อสัตว์ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ซุป ช่วยทำให้เนื้อสัตว์นุ่มขึ้น
2. การทำขนมปัง ทำให้แป้งโด (Dough) มีความเหนียวนุ่มและฟูขึ้น
3. อุตสาหกรรมนม ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนในกระบวนการทำเนยแข็ง
4. อุตสาหกรรมเบียร์และเครื่องดื่ม ช่วยย่อยโปรตีนทำให้เครื่องดื่มใส น่ารับประทาน
5. อุตสาหกรรมสารซักฟอก โดยเอนไซม์ที่นำไปผสมในสารซักฟอกจะช่วยย่อยสลายคราบโปรตีนต่างๆ ที่เกาะบนเนื้อผ้า อีกทั้งยังช่วยลดปัญหามลพิษของสภาวะแวดล้อม เนื่องจากเอนไซม์สามารถสลายได้เองตามธรรมชาติ
6. อุตสาหกรรมฟอกหนังโดยเอนไซม์จะช่วยกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ทำให้หนังสัตว์นุ่มและมีความยืดหยุ่นดี
7. ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ใช้ในการทำความสะอาดเยื่อหุ้มผ่านเครื่องมือต่างๆ เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

1. ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์	รุ่นที่ผลิต	บริษัท/ประเทศ
1. ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร	BIO FLO II C	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ., USA.
2. เครื่องวัดและบันทึกการดูดกลืนแสง (UV Spectrophotometer)	DU 650	Beckman, USA.
3. เครื่องงวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Spectronic 20D	Baush&Lomb, USA.
4. เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Microcentrifuge)	Sigma 2MK	Sigma Laboratory, Western Germany.
5. เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Centrifuge)	J-21C	Beckman, USA.
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	HA-30	Hirayama Manufacturing Coperation, Japan.
7. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Heraeus Type B 5050E	Heraeus, Germany
8. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน	H-103 N Series	Kokusan, Japan
9. เครื่องเขย่าให้อากาศที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Gyrotary Water Bath Shaker)	G76D	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ., USA
10. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิได้ (Controlled Environment Incubator Shaker Pychotherm)	G760	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ., USA
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	PHM 83 Autocal	Radiometer, Copenhagen, Denmark
12. เครื่องชั่งสาร	AE-200S	Mettler Instrument AG., Switzerland
13. เครื่องหปริมาณไนโตรเจน (Kjeldathem)		Gerhardt, Germany
14. เครื่องระเหยน้ำอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer)	Lyph-Lock 1L	LABCONCO, USA

2. เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัท/ประเทศ
Casein Hammarsten L-tyrosine	BHD Laboratory Chemical Division, England
Ammonium sulfate Glucose Imidazole Trichoroacetic acid	Fluka AG. Buch, Switzerland
Ammonium molybdate Boric acid Calcium choride Copper sulfate di-Sodium hydrogen phosphate	Merk AG. Darmstadt, Germany
Magnesium sulfate Potassium dihydrogen phosphate Potassium sodium tartrate Sodium carbonate Sodium bicarbonate Sodium hydroxide	Merk AG. Darmstadt, Germany
Bovine Serum Albumin (BSA) Antifoam A	Sigma Chemical Co., Ltd., USA
Skim milk	Mission Health Food Co., Ltd., Thailand

3. วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

กากถั่วเหลืองและเมล็ดทานตะวัน ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จำกัด บางนา-ตราด กม. 21 บางพลี สมุทรปราการ

4. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus subtilis TISTR25 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technological Research) Culture Collection เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา

Nutrient Agar Slant

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมของอาหารในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองแล้วนำนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อยังไม่นำมาใช้

3.1.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (inoculum medium) (Basal medium) เกษม พงษ์มณี (2536)

ในสารอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	20	กรัม
กลูโคส	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของกลูโคสแยกอบนึ่งฆ่าเชื้อต่างหากที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมเข้าไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5%

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม

กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันสัดส่วน 1:1

แป้งมันสำปะหลัง

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาปริมาณของกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.3 โดยใส่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังคงที่ แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่มีสัดส่วน 1:1 ในช่วงดังปริมาณข้างล่างนี้

แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่มีสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน

0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาหาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.3 โดยใส่ปริมาณของกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันคงที่ แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของแป้งมันสำปะหลังในช่วงดังปริมาณข้างล่างนี้

กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่มีสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน

0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

แป้งมันสำปะหลัง 0-1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบขั้นปฐมภูมิ

- Skim milk stock solution

นมผงขาดมัยเนย (Skim milk) จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที

- Skim milk agar plate

Bacto Agar 1.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม Skim milk stock solution 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้พออุ่น นำไปเทลงในจานเพาะเชื้อ

3.1.7 การเตรียมวัตถุดิบผสมซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (เกษม พงษ์มณี , 2536)

วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวัน โดยเตรียมดังนี้

ย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด โดยชั่งวัตถุดิบที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 จำนวน 12 กรัม ใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 นอร์มอล จำนวน 40 มิลลิลิตร นำไปนึ่งอบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นา ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำมากรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส นำมาปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ประมาณ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน นำเฉพาะส่วนน้ำใสมาใช้ นำไปหาปริมาณไนโตรเจนแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการนำมาใช้

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายสำหรับหาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี

- สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บเป็น Stock solution ผสมสารละลายของโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 202.5

มิลลิลิตร กับโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 10.5

- สารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6

  ชั่งอิมมิดาโซล 6.808 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.6

- สารละลายเคซีน 0.5% pH 10.5

  ชั่งเคซีนแฮมเมอร์สเตน 0.5 กรัม ละลายในสารละลายคาร์บอเนต - ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร คนจนเคซีนละลายหมด นำไปปรับ pH ให้ได้ 10.5 เก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำไปใช้

- สารละลายไตรคลอโรอะซิติก 10%

  ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นก่อนนำไปใช้

3.2.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (Leonard , 1987)

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40%

  ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายบอริก 4%

  ชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายอินดิเคเตอร์

  ชั่งเมธิลเรด 0.2 กรัม และเมธิลลีนบลู 0.1 กรัม นำไปละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

3.2.3 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson และ Somogyl (Nelson ; 1944)

- Nelson Reagent

  ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 53.2 กรัม ละลายน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นใส่กรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำสารละลาย $Na_2HasO_4.7H_2O$ จำนวน 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมลงไปกวนให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้

- Alkaline Copper Reagent

  ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) จำนวน 71 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร ใส่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ความเข้มข้น 10% จำนวน 80 มิลลิลิตร นำไปตั้งบน hot plate ให้อุ่น แล้วใส่โซเดียมซัลเฟตจำนวน 180 กรัม ลงไป คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนต้องกรองก่อนใช้ เก็บขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.2.4 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอรด์ (Bradford , 1976)

□ สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 85% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ1 ลิตร

□ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลาย Bovine Serum Albumin จำนวน 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การเก็บแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจาก stock แล้วเขี่ยลงบน Nutrient agar slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มที่ (ประมาณ 24 ชั่วโมง) พันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 2-3 เดือน

3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียระยะยาว

เลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุ Nutrient broth ประมาณ 24 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase แล้วนำมาผสมกับกลีเซอรอล 50% เทปิดทับผิวหน้า 1-2 ซม. พันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 1 ปี

3.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อ

3.4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum) (เกษม พงษ์มณี , 2536)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA slant นำมา streak ลงบน Skim milk agar plate นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก Skim milk agar plate 1-2 โคโลนี ใส่ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

3.4.2 การเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 เพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงถังหมัก 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร ใช้หัวเชื้อซึ่งมีประมาณ 35 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1% ของอาหารที่ใช้ในการผลิต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3 ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37°C อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วย 2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยควบคุมให้อยู่ในช่วง 7.0 ควบคุมความเป็นฟองด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3

3.4.3 การวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักจำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสไว้วิเคราะห์แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีและปริมาณน้ำ

ตาลรีดิวซ์ นำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำเซลล์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนักให้มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญ

3.5 การวัดแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี (ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Richardson และTewhaiti , 1978)

นำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.4.3 มาหาแอคติวิตี โดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายเคซีน 0.5% จำนวน 1.0 มิลลิลิตร นำสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวนหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>การคำนวนค่าแอคติวิตี</u>

$$\text{แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี} = \frac{OD280 \times \text{total volume (ml.)} \times \text{dilution}}{\text{slope} \times \text{sample volume (ml.)} \times \text{incubation time (min.)}}$$

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครกรัมที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่ภาวะของการหาแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกตัวอย่างต้องทำหลอดควบคุมด้วยสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% เป็นเวลา 20 นาทีก่อน จากนั้นจึงค่อยเติมสารละลายบัฟเฟอร์และตัวอย่างลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำไปเหวี่ยงตกตะกอน แยกส่วนน้ำใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงหาได้จากผลต่างของค่าการดูกลืนแสงของตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนกับกราฟมาตรฐาน

3.6 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (Leonard , 1987)

นำตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา 7 กรัม (โพแทสเซียสซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม) และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40% จำนวน 50 มิลลิลิตร นำเอาขวดรูปกรวยใส่กรดบอริก 4% จำนวน 150 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด มารองรับสารละลายที่กลั่นได้ จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอ

ริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงใส คำนวนหาปริมาณไนโตรเจนจากสูตรข้างล่างนี้

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{(A \times B) \times C \times 1.4}{V}$$

A = ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V = ปริมาตรของสารตัวอย่าง

1.4 = ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N จำนวน 1 มิลลิลิตร ที่สมมูลกับปริมาณไนโตรเจน 1.4 มิลลิกรัม

3.7 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีของ Nelson และ Samogyl (Nelson , 1944)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรผสมกับ Alkaline copper reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีโดยใส่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย Nelson's reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลืออยู่ในสารละลาย เปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีปริมาณกลูโคส 0-120 ไมโครกรัม

3.8 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford , 1976)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีโปรตีนความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม

3.9 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนและทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ผงโดยเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างๆ

โดยนำน้ำหมักที่แยกเอาเซลล์ออกโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกเก็บเฉพาะส่วนน้ำใสมาแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด 70 % (472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) ค่อยๆ เติมทีละน้อยพร้อมกับคนตลอดเวลาจนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมด นำไปทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน จากนั้นนำมาเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายด้วยสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 ส่วนที่ไม่ตกตะกอนนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 นำเอาตะกอนที่ได้ทั้งหมดมาทำการ dialyzed ในสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต ออกไป จากนั้นนำเอาสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยทำเป็นเอนไซม์ผงด้วยวิธี

Lyophilized นำผงเอนไซม์ที่ได้มาแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 , -20 , 4 , 25 –30 และ 65 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาหาแอคติวิตีเป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นก่อนที่จะนำมาเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ โดยหาแอคติวิตีที่เหลือเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์

3.10 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ผงในช่วง pH ต่างๆ เมื่อมี EDTA และไม่มี EDTA

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5 โดยนำเอนไซม์ผงมาละลายในบัฟเฟอร์ที่ต้องการศึกษา จำนวน 0.1 มิลลิลิตร มาบ่มกับสารละลายเคซีน 0.5% ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ที่ต้องการศึกษา จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์เดียวกันจำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ที่ pH ต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 โดยการคัดเลือก สูตรอาหารในระดับขวดเขย่า และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1% (w/v), $MgSO.7H_2O$ 0.05% (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001% (w/v), แป้งข้าวเหนียว 0.25% (w/v), กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งผ่านการย่อยสลายตัวกรดซัลฟิวริก อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 37°C อัตราการเขย่า 250 rpm ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้ได้นำมาเป็นภาวะเริ่มแรกในการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยได้ดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งข้าวเหนียวเป็นแป้งมันสัมปะหลัง เนื่องจากประเทศไทยเรามีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็นจำนวนมากและมีราคาถูกกว่าแป้งข้าวเหนียว

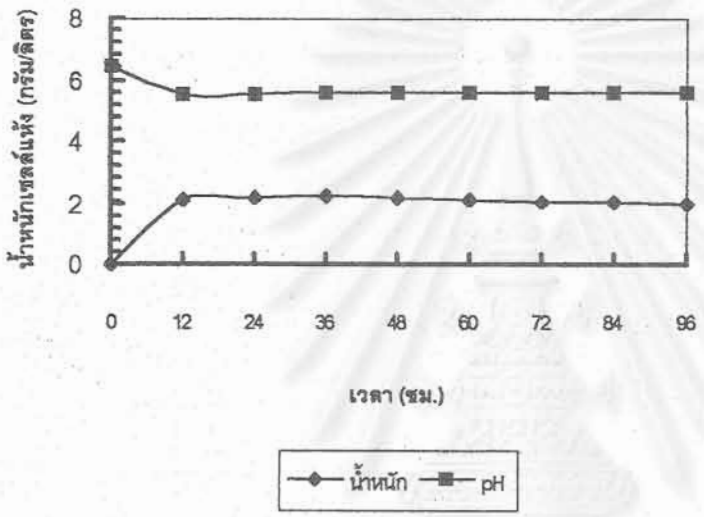
4.1.1 รูปแบบการเปลี่ยน pH การเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส

จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 เพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Basal medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 0.5% (w/v) กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3% (v/v) ที่อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°C อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm อัตราเร็วในการกวน 250 rpm เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 1 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 เชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วซึ่งอยู่ในระยะ log phase และ pH จะลดลงจาก 6.4 มาเป็น 5.5 หลังจากชั่วโมงที่ 25 pH จะมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ก็ยังมีค่าต่ำกว่า 7.0 เมื่อวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีไม่พบเลย ดังนั้นการทดลองต่อไป ยกเว้นการทดลองที่แปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องควบคุม pH ด้วย 2N NaOH เพื่อให้ pH อยู่ในช่วง 7.0 ทุกการทดลอง

4.1.2 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้

การผลิตเอนไซม์ในถังหมักจะทำให้ได้ ผลผลิตในปริมาณสูง ซึ่งจะต้องการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยเมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 ในสูตรอาหารที่ได้เตรียมจากข้อ 3.1.3 ในบทที่ 3 โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3% (v/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้นในการทดลองเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C ใช้อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แล้วแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 0.1%, 0.5%, 1.0% และ 3.0% (v/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 2-4 จากรูปที่ 2 จะพบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในช่วง log phase และพบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.1-0.5% การเจริญของเชื้อจะสูงสุดใกล้เคียงกัน แต่ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5% จะพบว่าเชื้อสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 84

ซึ่งผลิตได้ประมาณ 169.71 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟรูปที่ 2 ซึ่งในชั่วโมงที่ 0-24 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตในระยะ log phase หลังจากนั้นการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละปริมาณเชื้อเริ่มต้นมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v) สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v)



รูปที่ 1 การเจริญและ pH เมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05% (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001% (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5% (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3% (v/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการควบคุม pH ในระหว่างการทดลอง

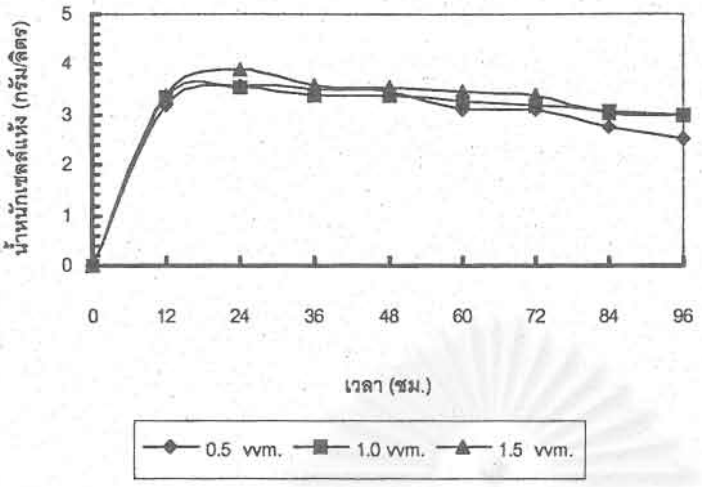
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 ผลของอัตราการให้อากาศ

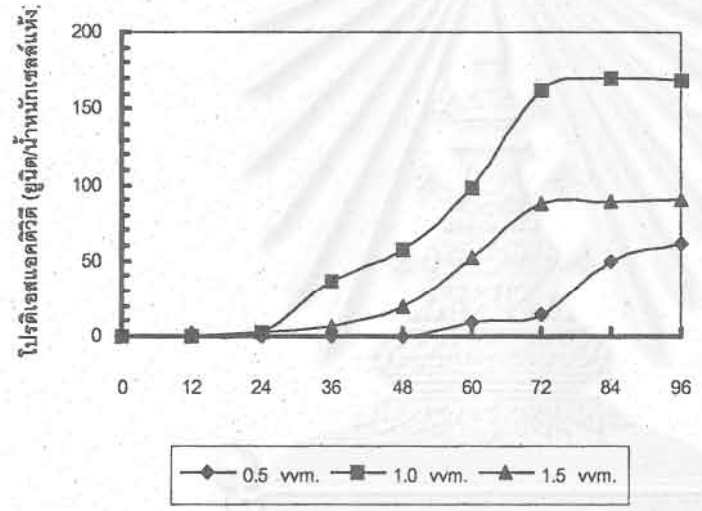
เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหาร ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.2 โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v) แล้วแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุด ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 vvm การเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกัน โดยในชั่วโมงที่ 0-24 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในระยะ log phase ดังแสดงในรูปที่ 5 แต่สำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm จะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด และที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำและช้ากว่า ดังแสดงในรูปที่ 6 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกอัตราการให้อากาศ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 5 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ หลังจากการเจริญเข้าสู่ stationary phase ปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่จะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 7 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีใน ชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละอัตราการให้อากาศมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm

4.1.4 ผลของอัตราการเร็วในการกวน

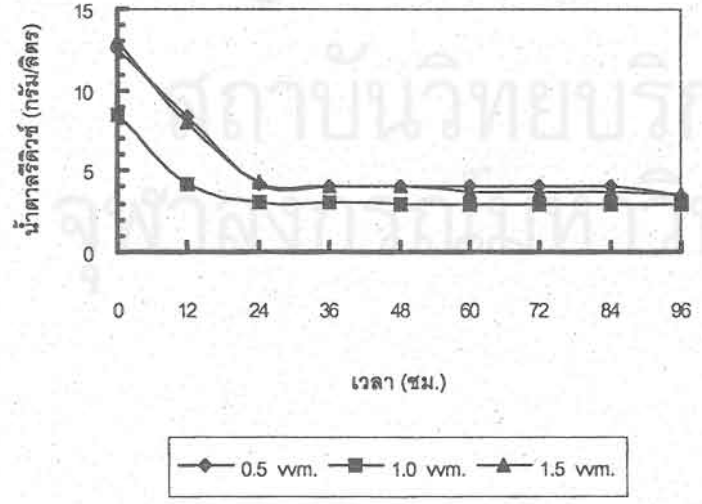
อัตราเร็วในการกวนก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใบกวนในถังหมักทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็กและแตกกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การกวนยังทำให้จุลินทรีย์และสารอาหารที่ใช้ไม่ตกตะกอน เกิดการผสมและสัมผัสกันอยู่เสมอจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.2 โดยมีอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 vvm แล้วแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm, 250 rpm และ 350 rpm ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8, 9 และ 10 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 8 พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 350 vvm จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวน 250 และ 150 rpm การเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm เชื้อจะผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 150 rpm จะพบว่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 9 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกอัตราเร็วในการกวน พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับในกราฟรูปที่ 8 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ หลังจากการเจริญเข้าสู่ stationary phase ปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่จะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 10 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละอัตราการให้อากาศมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราเร็วในการกวน 250 rpm สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm



รูปที่ 5

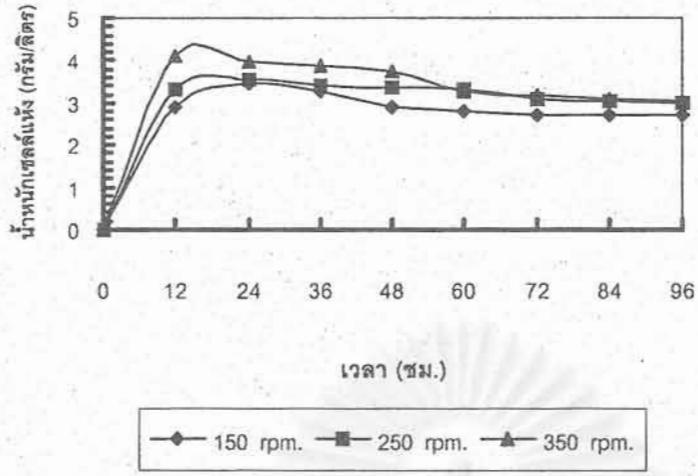


รูปที่ 6

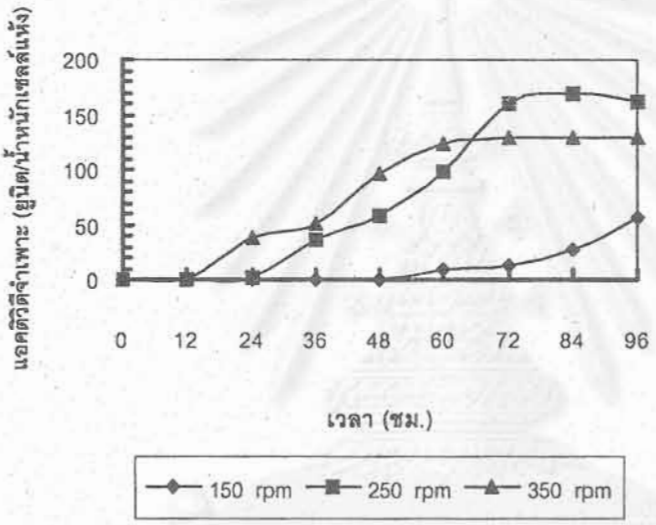


รูปที่ 7

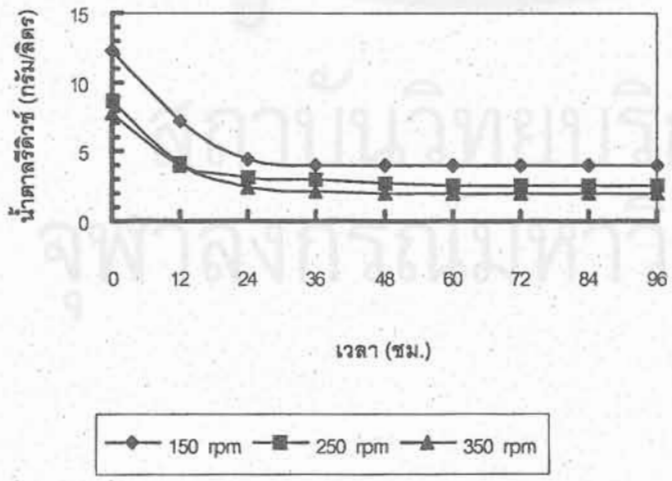
รูปที่ 5, 6 และ 7 แสดงการเจริญ, แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm



รูปที่ 8



รูปที่ 9



รูปที่ 10

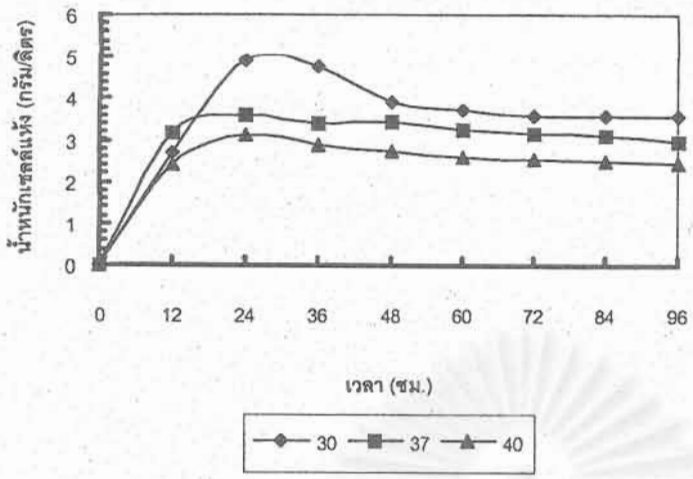
รูปที่ 8, 9 และ 10 แสดงการเจริญ, แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150, 250 และ 350 rpm

4.1.5 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ

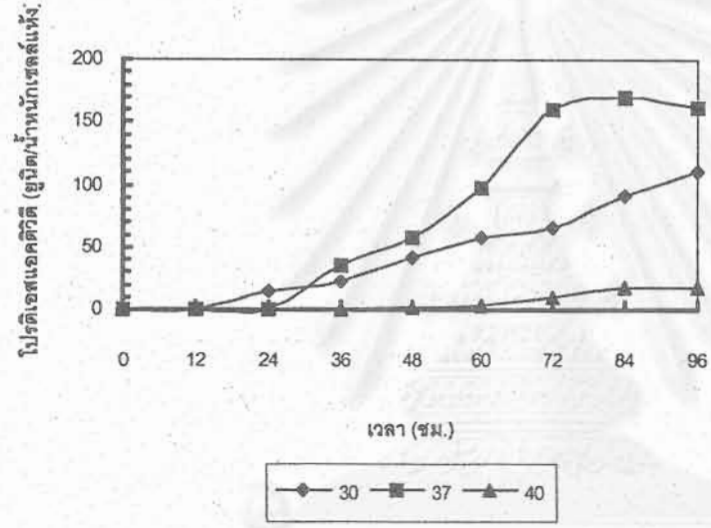
อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในถังหมักเช่นกัน เมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ใน 4.1.2, 4.1.3 และ 4.1.4 แล้วแปรผันอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อเป็น 30, 37 และ 40°C ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11, 12 และ13 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 11 พบว่าที่อุณหภูมิ 30°C มีการเจริญของเชื้อสูงสุด โดยจะมีการเจริญของเชื้อเข้าสู่ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 แต่ที่อุณหภูมิในการเลี้ยงที่ 37°C พบว่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงสุด ในขณะที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 40°C เชื้อผลิตเอนไซม์ตัวนี้ได้น้อยมาก ดังแสดงในกราฟรูปที่ 12 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับในกราฟรูปที่ 11 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตแบบทวีคูณในช่วงนี้เช่นกัน หลังจากเชื้อเจริญเข้าสู่ stationary phase แล้วนั้นปริมาณน้ำตาลจะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่13 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 37°C สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 37 °C

4.1.6 ผลของ pH เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ

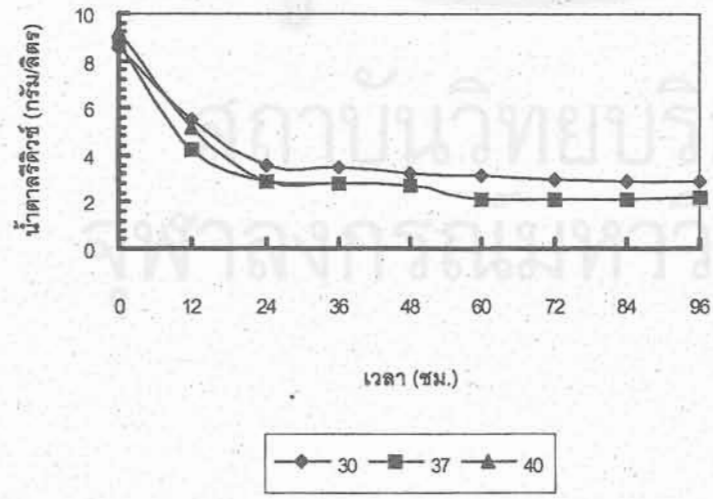
pH เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อขบวนการผลิตเอนไซม์และการส่งสารผ่านเซลล์เมมเบรนซึ่งเมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ใน 4.1.2, 4.1.3 และ 4.1.4 แล้วแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7 ,8 และ 9 ตามลำดับ โดยใช้ 2 N NaOH เป็นตัวปรับความเป็นด่าง ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 14,15 และ16 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 14 พบว่าที่ pH เท่ากับ 7.0 เชื้อจะมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 แต่ที่ pH 8.0 จะมีช่วง log phase ใน 24 ชั่วโมงแรกต่ำกว่าที่ pH 7.0 และจะเข้าสู่ช่วง log phase สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่ pH 9.0 เชื้อแทบจะมีการเจริญน้อยมากน้อยมาก จากกราฟรูปที่ 15 เมื่อพิจารณาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแล้วพบว่าที่ pH 8.0 น้ำตาลรีดิวส์แทบจะไม่ได้ใช้เลยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งสอดคล้องกับกราฟรูปที่14 ที่มีการเจริญของเชื้อค่อนข้างต่ำเกิดขึ้น และที่ pH เท่ากับ 9.0 น้ำตาลรีดิวส์จะถูกใช้ไปน้อยมาก เนื่องมีจากเชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยการใช้น้ำตาลจึงน้อยไปด้วย ส่วนที่ pH เท่ากับ 7.0 เชื้อมีการใช้น้ำตาลอย่างมากในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งเชื้อใช้ในการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ หลังจากเชื้อเข้าสู่ stationary phase แล้วปริมาณน้ำตาลมีปริมาตรคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่16 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของ pH เริ่มต้นของอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้ pH เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7



รูปที่ 11

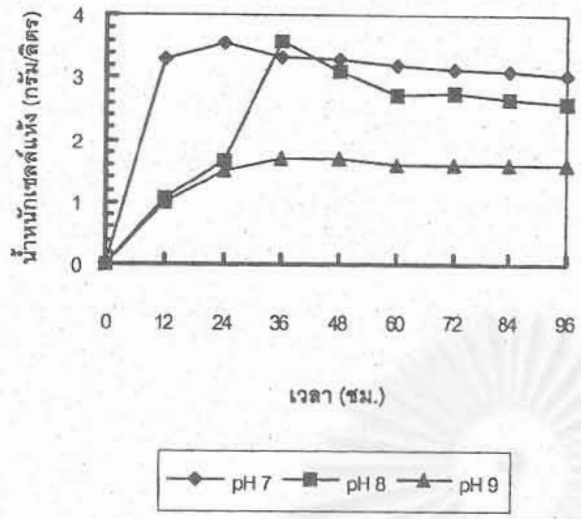


รูปที่ 12

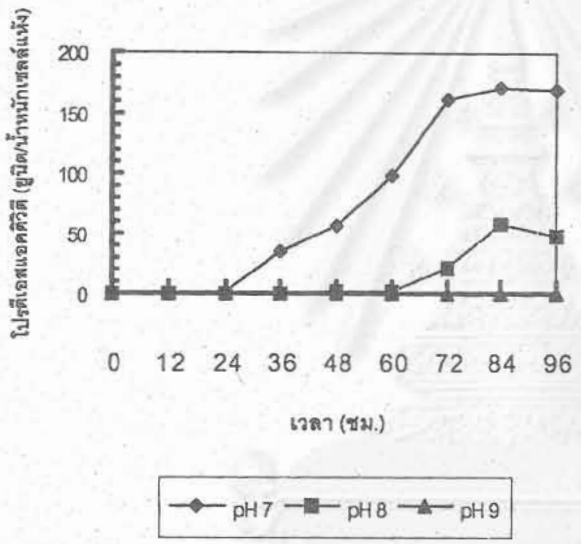


รูปที่ 13

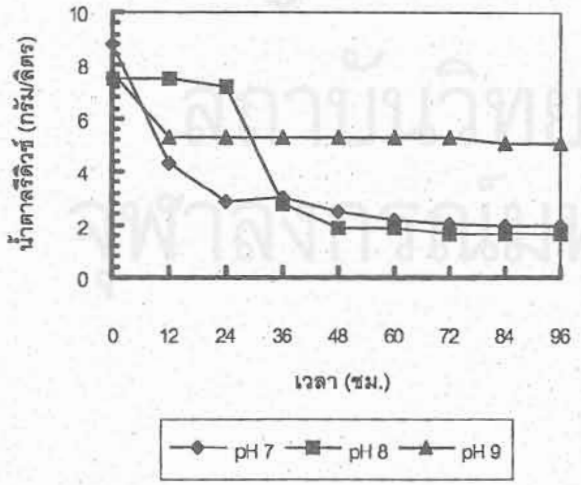
รูปที่ 11, 12 และ 13 แสดงการเจริญ, แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อแปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 14



รูปที่ 15



รูปที่ 16

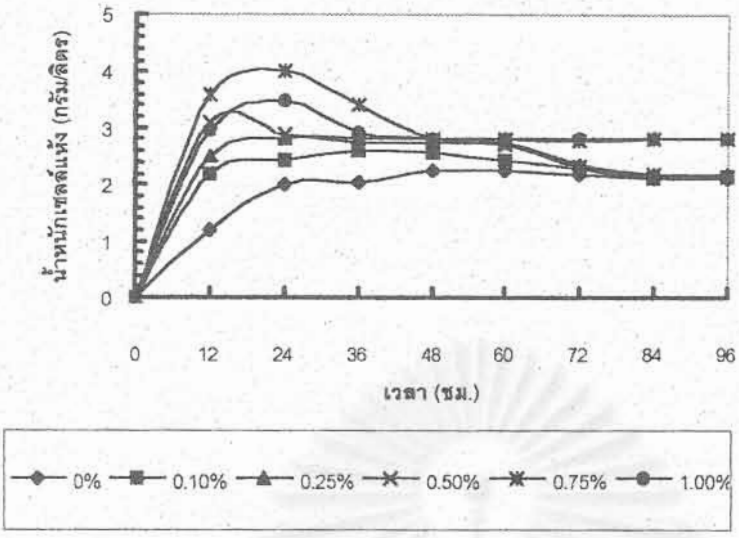
รูปที่ 14, 15 และ 16 แสดงการเจริญ, แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อแปรผันความเป็นกรด-ด่างเป็น 7, 8 และ 9

4.1.7 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน

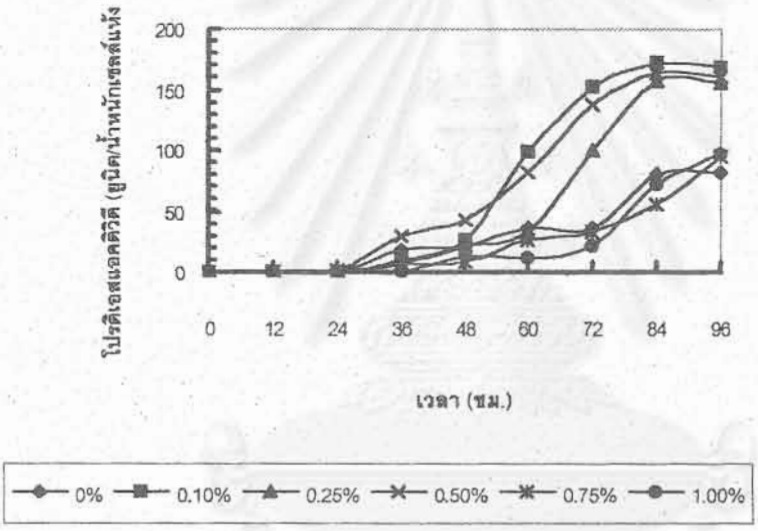
การเพิ่มการเจริญของเซลล์อีกวิธีหนึ่งอาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงปริมาณแป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 แปผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 0%, 0.10, 0.25%, 0.50%, 0.75% และ 1.00% (w/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 17, 18 และ 19 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 17 พบว่าที่ปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0% (w/v) ซึ่งไม่ได้ใส่แป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อเลย เชื้อก็ยังคงมีการเจริญอยู่แต่จะมีการเจริญต่ำสุด ที่ความเข้มข้น 0.75% (w/v) เชื้อจะเจริญได้สูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นพบว่ามีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน โดยจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 และที่ความเข้มข้นของปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1% (w/v) พบว่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงสุดดังแสดงในกราฟรูปที่ 18 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกปริมาณแป้งมันสำปะหลัง พบว่าการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 17 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในช่วงนี้เช่นกัน แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตในช่วงนี้ หลังจากเข้าสู่ stationary phase แล้วนั้นปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟ 19 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

4.1.8 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน

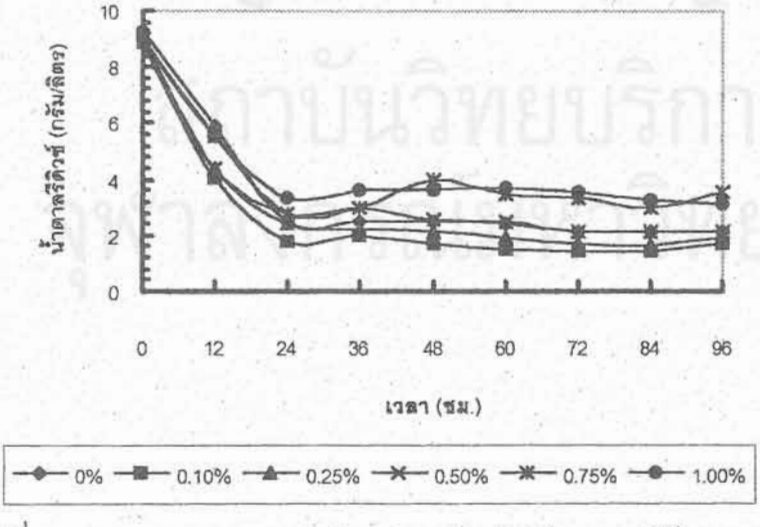
อีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสก็คือ การศึกษาถึงผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน ในการทดลองนี้ใช้กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกและความร้อน โดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 โดยแปรผันปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.1%, 0.2%, 0.3% และ 0.4% (v/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 20, 21 และ 22 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 20 พบว่าที่ปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.1% (v/v) การเจริญของเชื้อจะต่ำสุด ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นการเจริญจะใกล้เคียงกัน เมื่อดูการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจากกราฟรูปที่ 21 จะพบว่าที่ปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.1% และ 0.2% (v/v) เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้เร็ว โดยเริ่มผลิตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 ตามลำดับ แต่ที่ปริมาณของเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.3% (v/v) จะเริ่มผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ชั่วโมง 24 และการผลิตจะให้แอคติวิตีสูงสุดที่ชั่วโมง 84 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 ของทุกปริมาณไนโตรเจน พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 21 ซึ่งมีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วงนี้เช่นกัน แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในช่วงนี้ หลังจากเข้าสู่ stationary phase แล้วนั้น ปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ แต่จะพบว่าในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.4% (v/v) จะมีค่าสูงสุด ตามด้วยที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3%, 0.2% และ 0.1% (v/v) ตามลำดับ เนื่องจากในกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันมีคาร์โบไฮเดรทเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังแสดงในกราฟรูปที่ 28 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3% (v/v)



รูปที่ 17

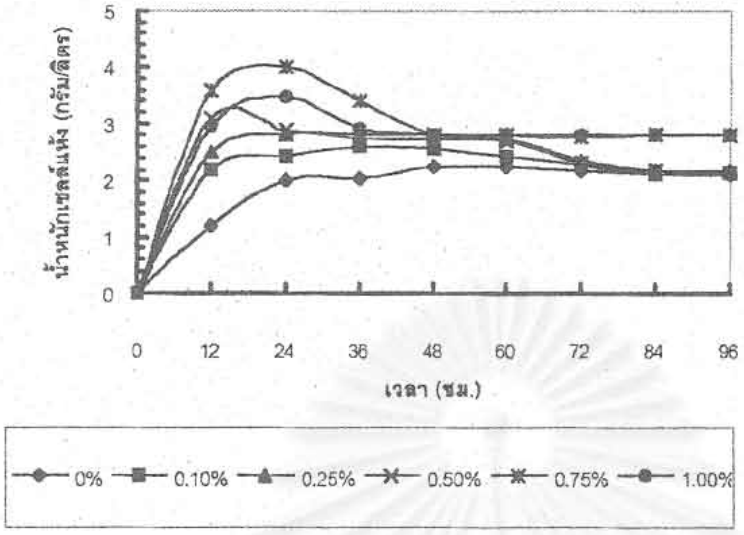


รูปที่ 18

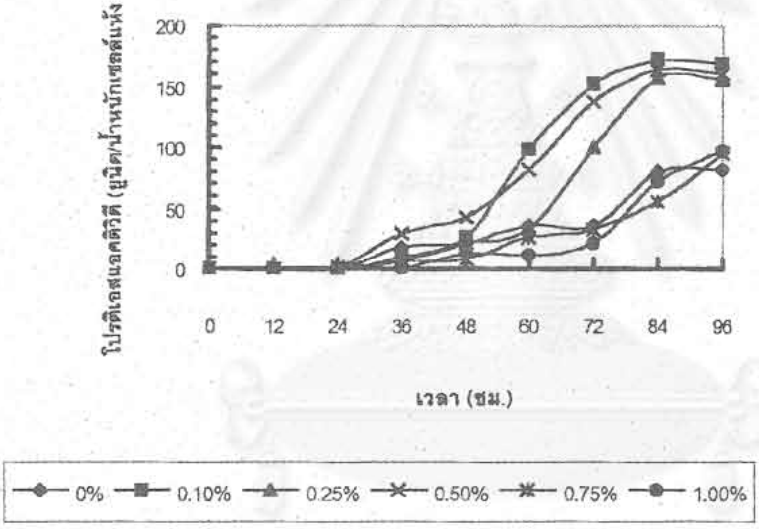


รูปที่ 19

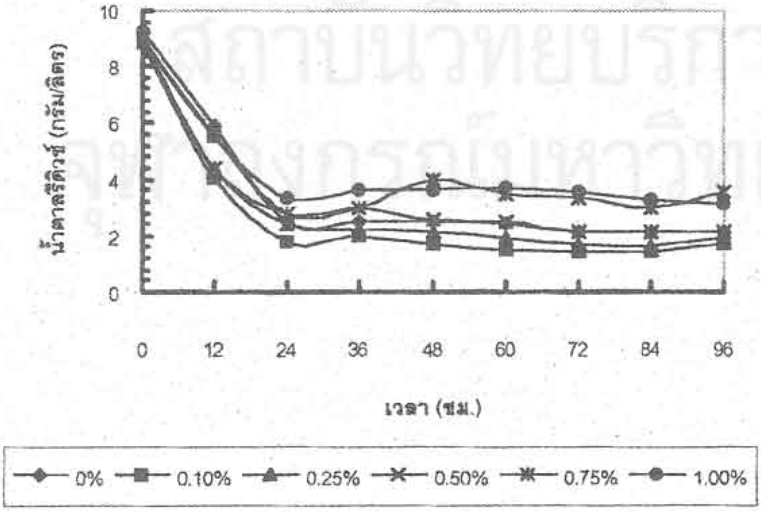
รูปที่ 17, 18 และ 19 แสดงการเจริญ, แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแปรผันปริมาณความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 20



รูปที่ 21



รูปที่ 22

รูปที่ 20, 21 และ 22 แสดงการเจริญ, แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแปรผันปริมาณความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

4.2 การเตรียมแอลคาไลน์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโนเนียมซัลเฟตและนำมาทำเป็นเอนไซม์ผง

เมื่อทำการศึกษาได้ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับถังหมัก 5 ลิตรได้แล้ว จึงทดลองเลี้ยงตามภาวะดังกล่าว จากนั้นนำน้ำหมักมาปั่นแยกส่วนน้ำใสด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ โดยปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาหาค่าแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีได้ค่า 353 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ1.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 198.32 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นตกตะกอน นำเอาตะกอนมาละลายด้วยสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 แล้วทำ dialyzed ในสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 เพื่อเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก นำสารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นมาหาแอคติวิตีได้ประมาณ 330.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีน 0.903 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 365.94 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเอนไซม์ที่ได้เท่ากับ 93.60% และสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 1.85 เท่า จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilyzed ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทำให้แอลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่างๆ

ขั้นตอน	แอคติวิตีรวม (ยูนิต/ลิตร)	ปริมาณโปตีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	%ผลผลิต	ความบริสุทธิ์
Crude enzyme	353000	1780	198.32	100	1
ตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟต	330400	902.88	365.94	93.60	1.85

4.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ระยะยาว

นำเอนไซม์ผงที่ได้จากข้อ 4.2 มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ -80°C , -20°C , 4°C , 25-30°C และ 65 °C แล้วนำมาทดสอบความเสถียรของแอคติวิตีทุกๆ 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น เก็บเป็นเวลา 60 วัน พบว่าทุกอุณหภูมิที่นำเอนไซม์ไปเก็บรักษาเมื่อตรวจสอบแอคติวิตีแล้วพบว่าไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย ดังแสดงในตารางที่ 2

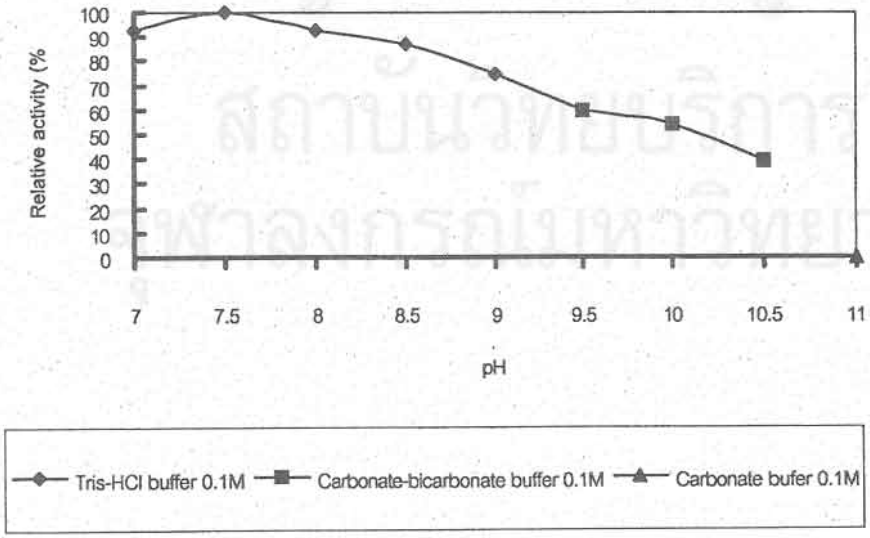
ตารางที่ 2 ผลการเก็บรักษาแอลคาไลน์โปรตีเอสที่อุณหภูมิต่างๆ

จำนวนวันที่เก็บ	Relative Activity (%)				
	-80°C	-20°C ,	4°C	25-30°C	65 °C
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	105.30	101.10	106.50	98.99	96.60
14	103.80	104.32	100.36	103.30	101.82
21	101.36	102.03	98.80	99.27	97.23
28	101.65	104.13	100.96	101.71	101.61
35	100.63	100.36	99.32	103.02	100.36
42	102.32	100.52	101.38	104.32	102.30
49	100.48	103.22	100.94	100.62	104.22
56	102.35	100.92	100.23	103.33	99.82
60	101.36	101.22	103.56	100.87	100.35

แอคติวิตีเอนไซม์ผง 330.40 ยูนิต/มิลลิกรัม = 100%

4.4 การตรวจหาโปรตีเอสแอคติวิตีของเอนไซม์ผงที่ pH ต่างๆ กันที่มี EDTA และไม่มี EDTA

เอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เหมาะสม (Optimum pH) จากรูปที่ 23 และตารางที่ 3 ทำการทดลองหาโปรตีเอสแอคติวิตีของเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 20 นาที โดยแปรผัน pH ในช่วง 7.0-11.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ พบว่า pH ที่ให้แอคติวิตีสูงสุดคือ สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ส่วนที่ pH 11.0 (สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์) ตรวจไม่พบแอคติวิตีเลย เมื่อใช้สารยับยั้ง EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผงในช่วง pH 7.0-9.5 ได้ถึง 77.49-16.10% ส่วนที่ pH 10.5 จะมีผลยับยั้งการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสเพียง 6.83% เท่านั้น



รูปที่ 23 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสผงจาก Bacillus subtilis TISTR25 เมื่อวัดแอคติวิตีที่ 45°C เป็นเวลา 20 นาที

ตารางที่ 3 ผลของสารยับยั้ง EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์ผงจาก *Bacillus subtilis* TISTR25

pH	Relative activity (%)		% Inhibition by EDTA
	Without EDTA	With EDTA	
7.0	93.29	15.3	77.94
7.5	100.00	37.35	62.65
8.0	93.38	34.98	58.40
8.5	86.72	35.98	50.74
9.0	75.73	41.32	34.41
9.5	60.36	44.26	16.10
10.0	59.05	49.67	9.38
10.5	36.70	29.87	6.83
11	0.00	0.00	0.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยของ เกษม พงษ์มณี (2536) ซึ่งได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในระดับขวดเขย่า งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องโดยนำ *Bacillus subtilis* TISTR25 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก โดยใช้สภาวะเดียวกับในระดับขวดเขย่าในการเริ่มการทดลองใช้อาหารสูตร Basal medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05% (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001% (w/v) โดยใช้กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันแทนสารสกัดจากยีสต์ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจน 0.3% (v/v) ใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5% (w/v) แทนกลูโคส ซึ่งในงานวิจัยของ เกษม พงษ์มณี ใช้แป้งข้าวเหนียวแทนการใช้กลูโคส เนื่องจากประเทศไทยเรามีการปลูกมันสำปะหลังเป็นจำนวนมาก ทำให้แป้งมันสำปะหลังมีมากและราคาถูก แต่ให้ผลในการผลิตเอนไซม์ไม่แตกต่างกันมากนัก ทำให้ต้นทุนการผลิตเอนไซม์น้อยลง ดังนั้นตลอดการทดลองนี้จึงใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กลูโคส

การทดลองในระดับถังหมัก 5 ลิตรโดยไม่ได้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.42 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 1 พบว่าใน ชั่วโมงที่ 0-24 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต่ำกว่า 6.0 หลังจากนั้นจะมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น แต่ยังมีค่าต่ำกว่า 7.0 มาก เมื่อนำน้ำหมักมาตรวจสอบโปรตีเอสแอคติวิตี ปรากฏว่าไม่พบการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเลย แต่เมื่อตรวจสอบโปรตีเอสชนิดอื่น พบว่ามีการผลิตซึ่งคาดว่าเป็น Neutral protease และทดสอบโดยการนำ skim milk agar plate ซึ่งมี pH ประมาณ 7.0 มาเจาะเป็นรูเล็กๆ แล้วนำน้ำหมักที่ได้มาหยอดใส่หลุมทิ้งไว้สักครู่ พบว่ามีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบหลุม แสดงว่าเชื้อนี้มีการผลิตนิวทรัลโปรตีเอส แต่ไม่ใช่แอลคาไลน์โปรตีเอส หรืออาจมีการสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสแต่เกิด Autodigestion ในภาวะที่ pH ต่ำกว่า 6.0 จึงทำให้การวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสไม่พบ ซึ่งอดคล้องกับการทดลองของ Moon & Parulekar (1991) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Bacillus firmus* ในถังหมักที่ไม่ควบคุม pH พบว่า pH จะมีค่าการเจริญลดลงในช่วงการเจริญของระยะ log phase และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของการเจริญ pH เริ่มต้นของการทดลองจะมีค่ามากกว่า pH สุดท้าย สาเหตุเพราะว่าเชื้อมีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมาในช่วงการเจริญระยะ growth phase จึงทำให้ pH มีค่าลดลงและทำให้การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสต่ำแต่มีการเจริญเติบโตดี และพบว่าที่ pH 7.0 การเจริญของเชื้อจะสูงสุด นอกจากนี้ Putter และคณะ (1996) ยังพบว่าการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* โดยควบคุม pH เชื้อจะผลิตโปรตีเอสสูงกว่าไม่ควบคุม pH ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงต้องมีการควบคุม pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้มีค่าต่ำกว่า 7.0 โดยใช้ 2N NaOH

ปัจจัยแรกที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งในการทดลองระดับขวดเขย่าใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ1% (w/v) โดยใช้สูตรอาหาร Basal medium มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0.5% (w/v),กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 37°C, pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 แต่ในระดับถังหมักได้แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.1%, 0.5%, 1.0% และ 3.0% (v/v) พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1% จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งคาดว่าเพราะปริมาณเซลล์น้อยจึงได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ทำให้เชื่อเจริญเติบโตได้ดีที่

สุด แต่ถ้าดูที่การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสพบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v) การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจะสูงสุด เหมาะสมสำหรับการใช้ผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส อาจเนื่องมาจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นและปริมาณอาหารที่ใช้เหมาะสมกันทำให้เชื่อผลิตเอนไซม์ได้ดีมาก

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักผสมเข้ากันอย่างสม่ำเสมอ จุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ทำให้เชื้อมีการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้ดีก็คือ อัตราการให้อากาศและอัตราเร็วในการกวน จากการทดลองในข้อ 4.1.3 โดยแปรผันอัตราการให้อากาศพบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ1.5 vvm เชื้อมีการเจริญได้ดีที่สุด เพราะเชื้อมีการได้รับออกซิเจนมากทำให้มีการใช้อาหารเป็นแหล่งพลังงานได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อดูการผลิตเอนไซม์พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุด และที่อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm จะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำสุด เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนพบว่าที่อัตราเร็ว 350 rpm เชื้อจะมีการเจริญสูงสุดเมื่อเทียบกับที่อัตราการกวนที่ 150 rpm และ 250 rpm อาจเนื่องมาจากที่อัตราเร็วในการกวน 350 rpm นั้นมีการผสมของอาหารเป็นเนื้อเดียวกันอย่างดีและต่อเนื่องทำให้อากาศมีฟองเล็กมีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก ซึ่งทำให้เชื้อได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ได้ทำให้เจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อดูที่การผลิตเอนไซม์ พบว่าผลิตได้ต่ำกว่าที่อัตราเร็วในการกวน 250 rpm แต่ที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 150 rpm พบว่าผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ต่ำสุด อาจเนื่องมาจากอัตราเร็วในการกวนที่ช้า ทำให้สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกันไม่สม่ำเสมอ เป็นสาเหตุให้เชื้อใช้สารอาหารได้ไม่สมบูรณ์ จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงนั้นต้องมีอัตราการให้อากาศและอัตราเร็วในการกวนที่เหมาะสมไม่ต่ำหรือสูงจนเกินไป คือที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และอัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Moon & Parulekar (1991) ที่พบว่าการที่จะทำให้เซลล์สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ให้มากต้องลดปริมาณการให้ออกซเจนลงให้เหมาะสม และพบว่าจุลินทรีย์พวกบาซิลลัส การสังเคราะห์โปรตีเอสซึ่งผลิตออกมานอกเซลล์จะถูกกดดันภายใต้การจำกัดออกซิเจนภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักนั้นพบว่าที่อุณหภูมิ 30°C, 37°C และ 40°C การเจริญเติบโตของเชื้อใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาการผลิตเอนไซม์พบว่าที่อุณหภูมิ 37°C จะผลิตได้ปริมาณสูงสุดอาจเป็นเพราะอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการดำรงชีวิตและการผลิตเอนไซม์เนื่องจากเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทยซึ่งมีอุณหภูมิในช่วงนี้ จากการทดลองของ Jaroslav และคณะ (1991) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อระดับของ mRNA ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนของ *Bacillus megaterium*

สภาพความเป็นกรด-ด่างก็มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อนั้น ผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาจากเมตาโบลิสม อาจทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปจากเดิมอย่างรวดเร็วมาก มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดชะงักการเจริญเติบโตได้ หรือไปยับยั้งการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ ในการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์มักมีปัญหาเรื่องการควบคุม pH และไม่อาจทำให้ pH เป็นปัจจัยที่คงที่ได้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงของ pH จึงต้องรู้วิธีการควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจทำได้โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและปริมาณที่พอเหมาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์และการขนส่งสารต่างๆ ผ่านเซลล์เมมเบรน การแปรผัน pH นั้นมีผลต่อสมดุลกรด-ด่าง มีผลต่อสรีระวิทยาบางอย่างของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2530) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารอาหาร, ตัวชักนำ และปัจจัยที่ทำให้เจริญเติบโตระหว่าง biotic และ abiotic phase ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผล

ของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ pH 7.0 จะมีการเจริญเติบโตสูงสุด และที่ pH 8.0 จะมีช่วง log phase ที่ต่ำกว่าในชั่วโมงที่ 0-24 หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ช่วง log phase ที่มีการเจริญสูงขึ้น ในชั่วโมงที่ 24-36 อาจเนื่องมาจากในชั่วโมงที่ 0-24 นั้น มีการผลิตกรดออกมาในน้ำหมัก pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงต่ำกว่า 7.0 จึงทำให้ไม่เหมาะสมในการทำให้เชื้อเจริญภายใน 24 ชั่วโมงแรก หลังจาก 24 ชั่วโมงแรกไปแล้ว pH โดยรวมลดลงใกล้ 7.0 เชื้อจึงเริ่มเจริญต่อไปได้ในชั่วโมงที่ 24-36 ต่อไป ส่วนที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 และ 9.0 นั้น พบว่ามีลักษณะการเจริญที่ค่อนข้างต่ำใน 24 ชั่วโมงแรก ได้มีผู้ศึกษาคือ Janssen และคณะ (1991) พบว่าในการเลี้ยง *Thermus sp.* Rt41A เพื่อผลิตโปรตีเอส พบว่าถ้า pH สูงกว่า 7.5 จะทำให้ธาตุที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตกตะกอน เป็นเหตุให้โปรตีเอสไม่เสถียรและอาจไม่ผลิตเอนไซม์นี้เลย Kitada และคณะ (1976) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก Alkalophilic *Bacillus sp.* โดยใช้ Methyl acetate เป็นแหล่งอาหารพบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ พบว่าเชื้อจะผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ต้องอยู่ในภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่างเท่านั้น

จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวก Chemmoorganotroph ซึ่งจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นพลังงาน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ เช่น คาร์โบไฮเดรต ลิปิด และโปรตีน เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ได้จากกระบวนการหมักเป็นชนิดที่ชักนำให้เกิดได้ เอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อมีสารเป็นตัวชักนำอยู่ด้วย Inducer ส่วนใหญ่ของเอนไซม์ก็คือ สับสเตรทนั่นเอง หรือเป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสับสเตรท ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ต้องมี inducer เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ความรู้เรื่อง ตัวชักนำ ไม่มีรายงานไว้มากนักเนื่องจากผู้ผลิตเอนไซม์เก็บไว้เป็นความลับ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์มากเช่นเดียวกับการผลิตสารอื่นๆในกระบวนการหมัก Aunstrup รายงานไว้ในปี 1974 ว่าในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในการเลี้ยงเชื้อต้องมีโปรตีนความเข้มข้นสูง และคาร์โบไฮเดรตต้องมีความเข้มข้นน้อย การใช้คาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นสูงมักจะเกิดปรากฏการณ์ Catabolite repression วิธีแก้ไขโดยการเติมคาร์โบไฮเดรตลงไปเป็นช่วงๆ ตลอดเวลาของการหมัก ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาถึงปริมาณของแหล่งคาร์บอน โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 0%, 0.10%, 0.25%, 0.50%, 0.75% และ 1.0% (w/v) พบว่าการเจริญจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยที่ 0% มีอัตราการเจริญต่ำสุด แต่ก็ยังเจริญได้เนื่องจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นมีคาร์โบไฮเดรทเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยในปริมาณสูงจึงใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย และถ้าพิจารณาการผลิตเอนไซม์ชั่วโมงที่ 84 พบว่าที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.75 และ 1.0% (w/v) การผลิตเอนไซม์จะต่ำสุด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเนื่องจากเกิด Catabolite repression โดยกลูโคสจะไปกดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ออกมาหรือทำให้สร้างได้น้อยลง (Bernlohr, 1964; Doi, 1973) และที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.10% (w/v) จะพบว่ามีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมส่วนมากจะใช้ไนโตรเจนในรูปสารประกอบอนินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ เชื้อจะใช้สารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อสร้าง กรดอะมิโนเริ่มต้น กรดนิวคลีอิก โปรตีนและส่วนประกอบของผนังเซลล์ Aunstrup และคณะ (1974) รายงานไว้ว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ถึง 15.6% ถ้ามีไนโตรเจนปริมาณมากหรือน้อยเกินไปอาจไปกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ (Kole และคณะ, 1988) จากรายงานของ Moon & Parulekar ในปี1991 พบว่าไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการรักษาสภาพเซลล์ไม่ให้เกิดการแตกได้ การเลือกแหล่งไนโตรเจนขึ้นอยู่กับว่าเชื้อสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดไหนได้ดีกว่ากัน เชื้อแต่

ละชนิดจะใช้แหล่งไนโตรเจนได้ไม่เหมือนกัน ในแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนได้ดีกว่าใช้แอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนหลายชนิด เชื้อจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้ง่ายที่สุดก่อน เมื่อสารนั้นหมดแล้วจึงใช้สารตัวอื่นต่อไป แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมมักเป็นผลผลิตทางการเกษตรหรือของเหลือใช้ในการเกษตรซึ่งมีมากและราคาถูก เช่น กากถั่วเหลือง, กากเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น ซึ่งในการทดลองนี้เราใช้กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริก โดยใช้ความร้อนและความดันสูงเพื่อให้เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้น และเกิดกรดอะมิโนอิสระ กากถั่วเหลืองนิยมใช้มากเพราะมีสมดุลของสารอาหารเหมาะสมซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เซลลูโลส แคลเซียม ฟอสฟอรัส (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534) ส่วนกากเมล็ดทานตะวันนั้นมีส่วนประกอบซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนในกากเมล็ดทานตะวันจะไปช่วยเสริมกับกรดอะมิโนที่มีในกากถั่วเหลืองให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงขึ้น ซึ่งในการทดลองได้ทำการแปรผันปริมาณไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1%, 0.2%, 0.3% และ 0.4% (v/v) ซึ่งเมื่อดูจากรูปที่ 26 พบว่าที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1% (v/v) การเจริญของเชื้อจะต่ำสุดคาดว่าเกิดจากมีปริมาณสารอาหารน้อยเกินไป และที่ปริมาณ ไนโตรเจนเท่ากับ 0.4% (v/v) พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ คาดว่าเกิด Catabolite repression แต่ที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3% (v/v) พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเพราะมีปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนนั้นมีหลายวิธีด้วยกันแล้วแต่ความเหมาะสมในการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ เช่นใช้วิธีตกตะกอนด้วยสารละลายโดยใช้เอทานอล เมทานอล อะซีโตน หรือใช้เกลืออนินทรีย์ เช่นแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ โซเดียมซัลเฟต ซึ่งในการทดลองนี้เลือกวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70% เพราะสะดวกและไม่ยุ่งยากซับซ้อน จากนั้นนำไปขจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกโดยใช้วิธี Dialyzed พบว่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 198.32 เป็น 365.94 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 1.85 เท่า เพราะเป็นการทำการบริสุทธิ์เอนไซม์เพียงขั้นตอนเดียว

จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าการผลิตเอนไซม์นั้นถ้าเปรียบเทียบกับวิธีทดลองของ เกษม พงษ์มณี (2536) มีค่าต่ำกว่ามาก เนื่องจากเชื้อนี้มีการ Subculture หลายครั้ง และมีการเก็บรักษาไม่ถูกต้องนัก ทำให้สูญเสียแอคติวิตีไป จึงได้ทำการกระตุ้นโดยการเลี้ยงบน skim milk plate แล้วทำการทดลองในระดับขวดเขย่าในช่วงแรก เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้กับในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากการทดลองพบว่าในระดับขวดเขย่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี 209.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรได้แอคติวิตี 356.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักมีประสิทธิภาพช่วยให้ผลิตได้ในปริมาณสูงขึ้น และที่ภาวะเหมาะสมในระดับถังหมักก็ไม่ได้แตกต่างจากภาวะในระดับขวดเขย่ามากนัก ยกเว้นปริมาณเชื้อเริ่มต้นและปริมาณแหล่งคาร์บอนเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก 5 ลิตร

ปัจจัยที่ศึกษา	ระดับขวดเขย่า	ระดับถังหมัก 5 ลิตร
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	1%	0.5%
อัตราการให้อากาศ	-	1.0 vvm
อัตราเร็วในการกวน	250 rpm	250 rpm
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.0 (ไม่ได้ควบคุม)	7.0 (ควบคุม)
อุณหภูมิในการเลี้ยง	37°C	37°C
ปริมาณคาร์บอน	0.5% แป้งมันสำปะหลัง	0.1% แป้งมันสำปะหลัง
ปริมาณไนโตรเจน	0.3% (v/v)	0.3% (v/v)
แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี	209.05 ยูนิต/มิลลิลิตร	365.63 ยูนิต/มิลลิลิตร

จากการนำเอาเอนไซม์มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงขั้นตอนเดียวโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70% มาหา pH เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าที่ 7.0-10.5 สามารถตรวจพบการทำงานของโปรตีเอสแอคติวิตี ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สามารถทำงานได้ในช่วงกว้างทำให้มีประโยชน์ในแง่การนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งนำเอาเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ ไปใช้ในการผสมอาหารกุ้ง และเชื้อแบคทีเรียสามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งซึ่งเอนไซม์ที่ไหลออกจากเชื้อชนิดนี้สามารถทำงานได้ตลอด ในช่วง pH ของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งอยู่ในช่วง 7.0-10.5 ทำให้ค่าใช้จ่ายน้อยลงเมื่อเติมเชื้อหรือเอนไซม์นี้เพียงครั้งเดียว และจากการใช้สาร EDTA ยับยั้งการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอส พบว่าที่ pH 10.5 แอคติวิตีของโปรตีเอสจะลดน้อยลงมากอาจเป็นเพราะที่ pH 10.5 นิวทรัลโปรตีเอสไม่สามารถทำงานได้มีแต่แอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้นที่ทำงานได้ แต่ที่ pH 7.0-9.5 เมื่อใช้สาร EDTA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พบว่าแอคติวิตีลดลง 77.94-16.10% แสดงว่าในช่วง pH นี้เป็นช่วงการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอส ส่วนแอคติวิตีที่ยังคงเหลืออยู่ในที่ที่มี EDTA อาจเนื่องมาจากที่ pH 7.0-9.5 มีแอลคาไลน์โปรตีเอสปนอยู่ด้วย ทำให้ทราบว่าการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70% เพียงขั้นตอนเดียวนั้นไม่สามารถแยกนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอสออกจากกันได้ และจากงานวิจัยหาภาวะที่เหมาะสมในถังหมัก 5 ลิตร เราตรวจหาเฉพาะแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้นเราจึงใช้ที่ pH 10.5 ในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากที่ pH 10.5 นิวทรัลโปรตีเอสไม่สามารถทำงานได้จึงมีแต่แอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้น ถึงแม้ว่าที่ pH 10.0 จะตรวจพบแอคติวิตีได้มากกว่าแต่ก็ยังมีนิวทรัลโปรตีเอสปนอยู่มากกว่าที่ pH10.5

จากงานวิจัยทั้งหมดนี้เรานำมาคำนวนต้นทุนการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีพบว่าในระดับถังหมักจะถูกกว่าในระดับขวดเขย่า เมื่อพิจารณาจากปริมาณวัตถุดิบและปริมาณเชื้อที่ใช้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่องโดยมีปริมาณน้ำหมัก 3.5 ลิตร ต่อการหมัก 1 ครั้ง มีดังนี้

1. ค่าวัตถุดิบในการผลิต 900 บาท
2. ค่าไฟฟ้าและสาธารณูปโภค 1,800 บาท

ดังนั้นต้นทุนการผลิตต่อครั้งประมาณ 2,700 บาท

ปริมาณเอนไซม์ผงที่ได้ต่อครั้งประมาณ 6.65 กรัมต่อปริมาณน้ำหมัก 3.5 ลิตร ดังนั้นแอคติวิตีรวมเท่ากับ (330.4 x 3,500) / 181 = 960.74 unit / gm. enzyme powder เมื่อเรานำมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ผงของบริษัท Sigma ซึ่งผลิตได้จาก *B.licheniformis* ซึ่งปริมาณเอนไซม์ผง 25 มิลลิกรัม จะมีแอคติวิตีเท่ากับ 175 ยูนิต ซึ่งมีราคา 1,500 บาท จึงเห็นได้ว่าเอนไซม์ผงที่ผลิตได้โดยการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในงานวิจัยนี้มีราคารวมทั้งหมด 54,762.17 บาท ซึ่งทำให้คุ้มค่าในการผลิตเอนไซม์เชิงการค้า

สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่องในสูตรอาหาร Basal medium โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v) อัตราการให้อากาศเท่ากับ1.0 vvm อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ซึ่งมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1% (w/v) และปริมาณไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เท่ากับ 0.3% (v/v) โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดประมาณ 174.28 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

2. การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิ 65, 25-30, 4, -20 และ -80°C สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ได้โดยไม่เสียแอคติวิตีเลยเป็นเวลา 60 วัน

3. เอนไซม์ผงที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70% มีความบริสุทธิ์ขึ้นเพียง 1.85 เท่า และมีช่วง pH ในการทำงานของเอนไซม์กว้างตั้งแต่ 7.0-10.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการเอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษม พงษ์มณี, 2536, การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดย *Bacillus subtilis* TISTR25, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534, จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2530, โภชนาการที่จำเป็นต่อการหมัก, เทคโนโลยีการหมัก, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ภาษาอังกฤษ

Aunstrup , K. 1974. Proteolytic Enzymes. Appl, Biochem. And Bioeng. 2: 49-53.

Bernlohr, W.R. 1964. Postlogarithmic phase Metabolism of Sporulation Microorganism I. Protease of *Bacillus licheniformis*. J. Biol. Chem. Vol. 239. No. 2: 538-543.

Bradford, M.M, 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities for Protein Utilizing The Principle Dye Binding. Anal.Chem. 72: 248-254.

Coleman, G. 1967. Studies on The Regulation of Extracellular Enzyme Formation by *Bacillus subtilis* J.Gen. Microbiol. 49: 421-431.

Doi, J.W. 1973. Role of Protease in Sporulation. Current Topics in cellular regulation. 7:1-20.

Fox, J.W., Shannon, J.D., and Bjarnason, J.B. 1991. Protease and Their Inhibitors in Biotechnology. In Leatbam, G.F. & Himmel, M.E., Enzyme in Biomass Cnversion. pp. 62-79. Washinton D.C.: American Chemical Society.

Hubner, U., Bock, U., and Schugerl, k. 1993. Production of Alkaline Serine Protease Subtilisin Carlsberg by *Bacillus licheniformis* on Complex Medium in a Stirred Tank Reactor. Appl. Microiol. Biotechnol. 40: 182-188.

Janssen, P.H., Peek, K.K., and Morgan, H.W. 1994. Effect of Culture Condition on the Production of an Extracellular Protease by *Thermus sp.* Rt 41A. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 400-406.

Jaroslav, V. et. al. 1987. External FactorInvolved in the Regulation of Synthesis of an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium*. The Effect of Glucose and Amino Acid. Appl. Mcrobiol. Biotechnol. 26: 373-377.

Kitida, M., and Horikoshi, K. 1976. Alkaline Protease Production from Methyl acetate by Alkalophilic *Bacillus sp.* J.Ferment. Technol. Vol. 54, No.6, pp. 383-392.

Kole, M.M., Daper., I. and Gerson, F.G. 1988. Production of Protease by *Bacilus subtilis* Using Simultaneous Contro! of Glucose and Ammonium Concentrations. J.Chem.Tech. Biotechnol. 41: 197-206.

Leonard, W.A., Woods, A.E., and Well, M.R. 1987. Protein Analysis. Food Composition and Analysis. An AVI Book. 275-276. New York: Academic Press.

Halpern, M.G. 1981. Production from *Bacillus subtilis* ATCC21451 Through 1481. Industrial Enzyme from Microbial Source (Recent Advance): 53-58. Chemical Technology Review 186. New Jersey: NOYES DATA Corporation.

Moon , S.H., and Parulekar, S.J. 1991. A Paramatic Study of Protease Production in Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus firmus*. Biotechnology and Bioengineering. 37: 467-483.

Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyl Method for the Determination of Glucose. J. Bio. Chem. 153: 375-380.

Outtrup, H., and Boyce, C.O. 1990. Microbial Protease and Biotechnology. In Fogarty. W.M. & Kelly, C.T., Microbial Enzyme and Biotechnology 2nd ed. pp. 227-254. New York: Elseveir Applied Science.

Priest, F.G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41: 711-753.

Putten, A.B.,et.al. 1996. Improvement of the Production of Subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor. J.Biotechnol. 49: 83-93.

Richardson, B.C., and Te Whaiti, I.E. 1978. Partial Characterization of Heat Stable Extracellular Protease of some Psychrotropic Bcteria from Raw Milk. N.ZJI. Daily Sci. Technol. 13. 173-176.

Ward, O.P. 1983. Proteinase In Fogarty, W.M. (eds.), Microbail Enzymes and Biotechnology, pp. 251-317. London and New York: Applied Science Publishers.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย
Project: การผลิตไลเปสในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง

ผู้วิจัย

ผศ. นภา ศิวรังสรรค์

ผู้ช่วยวิจัย

อังคาร ตั้นพันธ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ

I20547488

สารบัญ

บทที่	หน้า
1. บทนำ	1
2. ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	3
3. วิธีการทดลอง	5
4. ผลการทดลอง	9
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมา

ไลเปส หรือ อีกชื่อหนึ่งคือ Glycerol ester hydrolase หรือ Acylglycerol hydrolase (E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล พบว่าได กลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ โดยไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาว (long chain aliphatic acid) กับกลีเซอรอล โดยไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil-water interface (Macrae, 1983)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืชพวก ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวไรน์ (rye) ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง (Arnold และคณะ, 1975) ส่วนในสัตว์จะพบในตับอ่อน (pancreatic lipase) และในนม (milk lipase) (Shahani, 1975) แต่ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เติบโตได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ (ท น ง, 2522)

การทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด (Yamane, 1987) คือ

1. ไฮโดรไลซ์เอสเทอร์
2. สังเคราะห์เอสเทอร์
3. ทรานเอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งแบ่งได้เป็น
   - 3.1 Acidolysis
   - 3.2 Alcoholysis
   - 3.3 Ester exchange (interesterification)
   - 3.4 Aminolysis

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างไลเปสของจุลินทรีย์

- แหล่งคาร์บอน
- แหล่งไนโตรเจน
- แร่ธาตุ

อิทธิพลของภาวะแวดล้อมในการหมัก

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง
- อุณหภูมิ
- อัตราการให้อากาศและอัตราเร็วในการกวน

- ปริมาณเชื้อตั้งต้น

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส

- อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง
- แคลเซียมไอออน
- Physical state ของสับสเตรท
- ความถ่วงจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรท
- Lipase activator
- Lipase inhibitor
- ไอออนของโลหะบางชนิดที่จับอยู่กับเอนไซม์

ประโยชน์และความสำคัญของไลเปสในด้านอุตสาหกรรม

- ไลเปสกับอุตสาหกรรมอาหาร
- ไลเปสกับอุตสาหกรรมผงซักฟอก
- ไลเปสกับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง
- ไลเปสกับการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายดิบ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไลเปสในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร และทำเอนไซม์ให้อยู่ในรูปผงเพื่อใช้กำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยของผ้าฝ้ายดิบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

1.ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์	รุ่นที่ผลิต	บริษัท/ประเทศ
1.ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร	BIO FLO II C	New Brunswick Scientific Co.,Inc, Edison, N.J., U.S.A.
2.เครื่องวัดและบันทึกการดูดกลืนแสง (UV Spectrophotometer)	DU 650	Backman, U.S.A.
3.เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Spectronic 20 D	Baush&Lomb, U.S.A.
4.เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Microcentrifuge)	Sigma 2MK	Sigma Laboratory, Western Germany
5.เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Microcentrifuge)	J-21C	Beckman, U.S.A
6.เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	HA-30	Hirayama Manufacturing Coperation, Japan
7.ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Heraeus TypeB 5050E	Heraeus, Germany
8.เครื่องเหวี่ยงตะกอน (Centrifuge)	H-103 N Series	Kokusan, Japan
9.เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Gyrotary Water Bath Shaker)	G76D	New Brunswick Scientific Co.,Inc, Edison, N.J., U.S.A.
10.เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Controlled Environment Incubator Shaker Psychotherm)	G760	New Brunswick Scientific Co.,Inc, Edison, N.J., U.S.A.
11.เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)	PHM 83 Autocal	Radiometer, Copenhagen, Denmark
12.เครื่องชั่งสาร	AE-200S	Mettler Instrument AG., Switzerland
13.เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldathem)		Gerhardt , Germany
14.เครื่องระเหยไอน้ำอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer)	Lyph-Lock 1L	LABCONCO, U.S.A.

2.เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
Fructose Gum arabic Tributyrin	SIGMA Chemical Co., U.S.A.
Oleic acid	BDH Laboratory Chemical Division England.
Ammonium Sulphate	Fluka AG. Buch, Switzerland.
Phenolphtalein Calcium Chloride dihydrate Manganese Chloride	May&Baker Ltd., England.
Yeast extract	Oxiod Laboratories, U.S.A.
Bacto-agar Bacto-peptone	Difco Laboratories, U.S.A.
Lipase (Porcine Pancreas), Protease (*Aspergillus oryzae*) and Cellulase (*Aspergillus niger*)	Tokyo Chemical Industry.
Ethanol Sodium Chloride Di-potassium hydrogen phosphate, anhydrous Potassium dihydrogen phosphate	E.Merck Ag. Darmstadt, Germany.

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ โดย คุณเปรมสุดา สมาน เป็นผู้คัดแยกได้จากส่วนของน้ำและดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ประเทศไทย เมื่อส่งไปตรวจแยกสายพันธุ์ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยพบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เก็บใน LB ในหลอดที่มีฝาเกลียวปิดและปิดทับด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ -20°ซ เมื่อต้องการใช้เชื้อให้นำมาเลี้ยงบน minimum medium plate ใหม่

3.2 การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ

3.2.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum)

เขี่ยเชื้อในอาหารวุ้น 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 15 ชม.

3.2.2 การเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อผลิตไลเปสในระดับถังหมัก 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากการเตรียมเชื้อตั้งต้นลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรเริ่มต้น 4,000 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อซึ่งมีปริมาตร 40 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1% (v/v) ของอาหารที่ใช้ในการผลิต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลเปสซึ่งประกอบด้วย Ammonium sulfate 0.13% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ Fructose 2% (w/v) ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 37°ซ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วย 1M NaOH โดยควบคุมให้อยู่ในช่วง 7.0 ควบคุมการเกิดฟองด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3

3.2.3 การติดตามการเจริญของเชื้อ

นำน้ำหมักที่เก็บทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมงออกมาวัดการเจริญ (ความขุ่น) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

3.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

3.3.1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กันได้แก่ 0.05%, 0.13%, 0.26% และ 0.50% (w/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิต ไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยมีแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลฟรุกโตสต่างๆ กันได้แก่ 1%, 2% และ 3% (w/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสที่ปริมาณเชื้อตั้งต้นต่างๆคือ 0.25%, 0.50% และ 1.00% วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.4 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 37, 40 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.5 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.6 การศึกษาอิทธิพลของอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสโดยแปรผันอัตราการกวนเป็น150 rpm., 200 rpm และ 250 rpm วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.7 การศึกษาอิทธิพลของอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสโดยแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.4 การวัดแอคติวิตีของไลเปส

ปั่มสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. กับอิมัลชั่นของสับสเตรท 15 มล. และโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งมีฟีนอฟทาลีนละลายอยู่ในสัดส่วน 0.43% ปริมาณ 20 มล. แล้วนำไปไตเตรทกับ 0.025 M KOH จนฟีนอฟทาลีนเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู เพื่อหาปริมาณกรดไขมันที่ถูกปลดปล่อยออกมา เนื่องจากการย่อยน้ำมันมะกอก

1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกที่ 35°ซ ในเวลา 30 นาที ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน

3.5 การวัดปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล. ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่มีโปรตีน 0-60 ไมโครกรัม

3.6 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์

3.6.1 การเตรียมเอนไซม์ในรูป crude enzyme

เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 3.3 ในภาวะที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4°ซ นาน 30 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใสเรียกส่วนนี้ว่า Crude enzyme นำไปเก็บไว้ที่ 4°ซ เพื่อจะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.6.2 การทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่น (Ultrafiltration)

กรอง Crude enzyme ผ่านอัลตราฟิวเตรชั่นยูนิตซึ่งใช้แผ่นกรอง (membrane) เบอร์ YM10 ซึ่งกรองโมเลกุลที่มีขนาด 10,000 ดาลตันขึ้นไป โดยมีก๊าซไนโตรเจนช่วยดันที่ความดัน 40 psi เริ่มกรองตั้งแต่ปริมาตรเริ่มต้น 2,500 มล. จนเหลือปริมาตร 300 มล.

3.6.3 การทำเอนไซม์ในรูปผง (Powder Enzyme)

เก็บสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่เหลือจากการทำอัลตราฟิวเตรชั่นไปทำให้เป็นผงด้วยวิธี Lyophilization ที่อุณหภูมิ -50°ซ จนได้เอนไซม์แห้ง

3.7 การกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้าย

สำหรับงานวิจัยนี้มีการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย 2 วิธีคือ วิธีใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และวิธีที่ใช้เอนไซม์

3.7.1 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำผ้าดิบที่ผ่านการลอกแป้งแล้ว มาต้มในสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3% (w/v) และ Womine TE 1% (w/v) ที่อัตราส่วน 1:20 (w/v) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างผ้าในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกสำหรับงานวิจัยนี้คือ โปรตีเอส ไลเปส และเซลลูเลส ทั้งที่สั่งซื้อจากบริษัท Tokyo Chemical Industrial และที่ผลิตขึ้นเองคือ ไลเปสจาก *P. aeruginosa* (อังคาร, 2544) โปรตีเอสจาก *B.subtilis* TISTR25 (วรรณวิมล, 2540) และเซลลูเลสจาก *T. reesei* โดยทำการทดลองกับผ้าดิบขนาด 2 กรัม, อัตราส่วน 1:50 (w/v), ในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิดคือ

3.7.2.1 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก Porcine Pancreas (15 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ใน 0.05 Mทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 8.0, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.2 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* (98,040 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ใน 0.05 Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5, อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.3 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* (14,000 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีโปรตีเอส 0.5 g/l และ Womine TE1 g/l ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.4 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 (16.36 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีโปรตีเอส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในไบ-คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5, อุณหภูมิ 45°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.5 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* (25,000 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5, อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.5 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* (246 ยูนิต/มิลลิลิตร)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5, อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.6 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก Porcine Pancreas, โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* และเซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปสและโปรตีเอสอย่างละ 0.25 g/l และ Womine TE 1 g/l ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที กำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วตากแห้ง

3.7.2.7 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*, โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และเซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei*

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปสและโปรตีเอสอย่างละ 0.25 g/l และ Womine TE 1 g/l ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที กำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วตากแห้ง

ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วจะถูกทดสอบสมบัติของการดูดซึมน้ำ (Absorbency of fabric) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้กำหนดคุณภาพของผ้าดิบ ก่อนนำไปผ่านกระบวนการย้อมสีที่ต้องคำนึงถึงความสม่ำเสมอทั่วทั้งผืนผ้า ตามมาตรฐานการทดสอบ (AATCC Test Method 79) คือ หยดน้ำลงบนผ้าดิบที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้ว บันทึกเวลาที่หยดน้ำซึมลงในเส้นใยผ้า โดยเส้นใยที่มีการดูดซึมน้ำได้ภายใน 5 วินาที ถือเป็นเส้นใยที่มีคุณภาพดีพอที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการย้อมสีต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

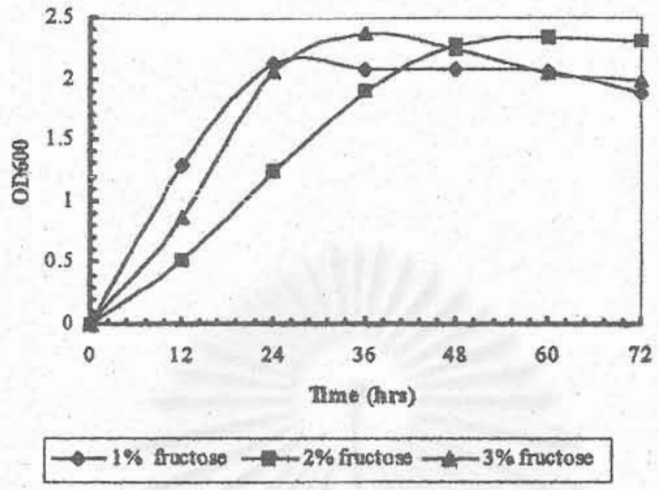
รักชนก ธีรกวินสกุล (2539) ได้ศึกษาการผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยการคัดเลือกสูตรอาหารในระดับขวดเขย่าและพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ ฟรุกโตส 2% (w/v) อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 37°ซ อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้ได้นำมาเป็นภาวะเริ่มแรกของการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง

4.1.1 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้

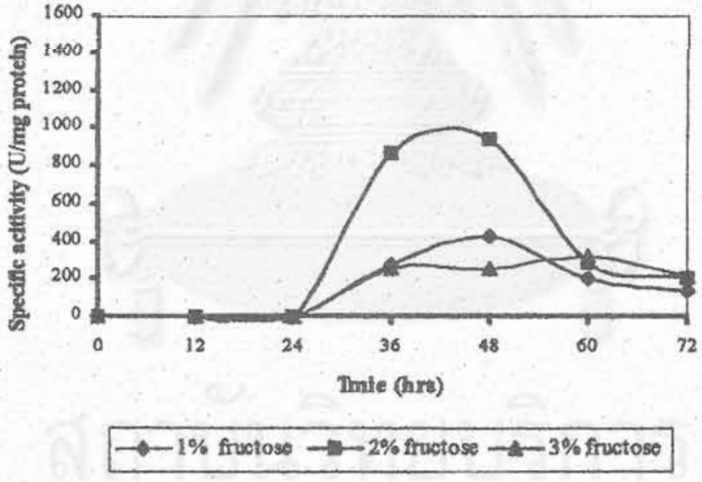
การเพิ่มการเจริญของเซลล์วิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันคือ การเพิ่มปริมาณสารอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงผลของปริมาณฟรุกโตสซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในสูตรอาหารที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วแปรผันปริมาณฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตไลเปส โดยการเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 1 และ 2 จากกราฟรูปที่ 1 พบว่าที่ปริมาณฟรุกโตสแต่ละความเข้มข้นมีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน โดยจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 และที่ความเข้มข้นของปริมาณฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) พบว่าเชื้อผลิตไลเปสให้แอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละปริมาณฟรุกโตสมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v) สามารถผลิตไลเปสให้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดคือ 938.48 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) เป็นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

4.1.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้

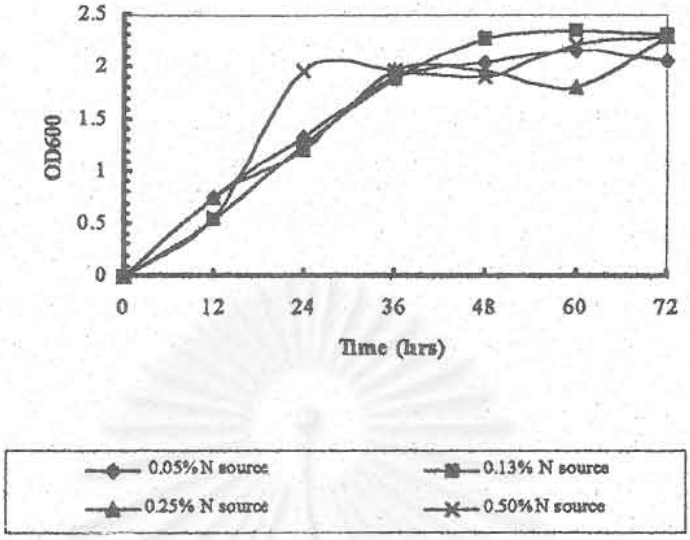
อีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสคือ การศึกษาถึงผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนในการทดลองนี้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ตามวิธีและภาวะเดียวกับข้อ 4.1.1 แล้วแปรผันปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตไลเปสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 3 และ 4 จากกราฟรูปที่ 3 พบว่าที่ปริมาณไนโตรเจนแต่ละความเข้มข้นจะให้การเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 0.50% (w/v) จะให้อัตราการเจริญที่เร็วกว่าความเข้มข้นอื่นๆ เมื่อดูการผลิตไลเปสจากกราฟรูปที่ 4 จะพบว่าที่ปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.13% (w/v) จะมีการผลิตไลเปสสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และเมื่อพิจารณาถึงแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละปริมาณไนโตรเจนมาเปรียบเทียบกันพบว่าที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.13% (w/v) จะมีการผลิตไลเปสแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.13% (w/v) ในการทดลองครั้งต่อไป



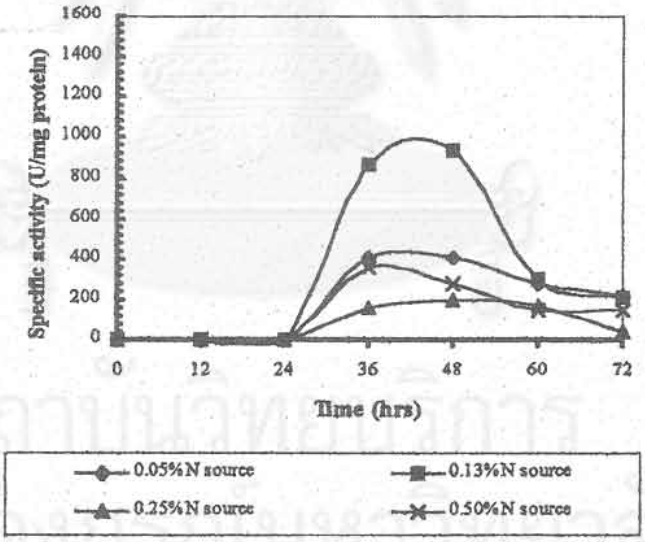
รูปที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v)



รูปที่ 2 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v)



รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v)



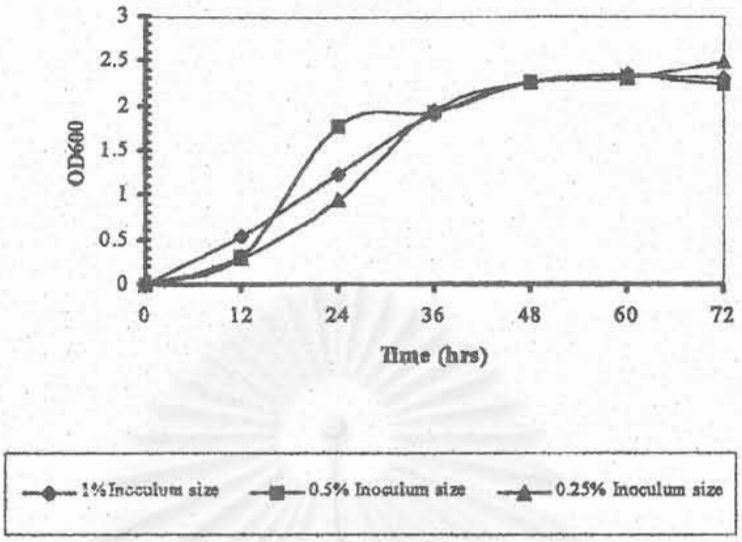
รูปที่ 4 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v)

4.1.3 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้

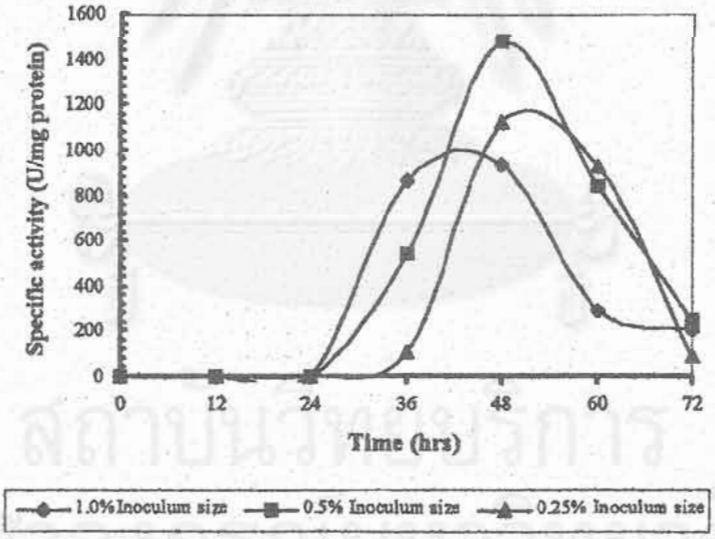
การผลิตเอนไซม์ในถังหมักจะทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูง ซึ่งจะต้องหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในสูตรอาหารที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยใช้ฟรุกโตส 2% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ ใช้อัตราเร็วในการกวน 250 rpm. อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm แล้วแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 5 จะพบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในช่วง log phase และพบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.25% - 1.00% (v/v) การเจริญสูงสุดจะใกล้เคียงกัน แต่ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.50% (v/v) พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงโดยเริ่มผลิตหลังชั่วโมงที่ 24 และจะผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 6 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละปริมาณเชื้อตั้งต้นมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.50% (v/v) สามารถผลิตไลเปสได้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดซึ่งผลิตได้ประมาณ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.50 % (v/v)

4.1.4 ผลของอัตราเร็วในการกวน

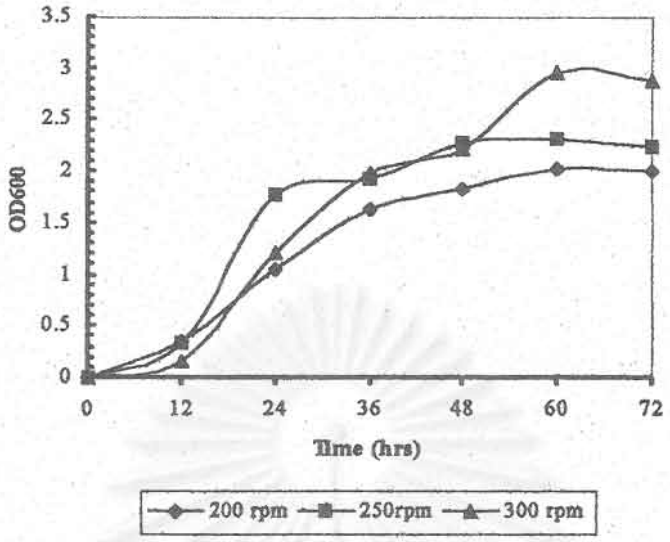
อัตราเร็วในการกวนก็มีปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใบกวนในถังหมักทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็กและแตกกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การกวนยังมีส่วนทำให้จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ตกตะกอนเกิดการผสมและสัมผัสกันอย่างสม่ำเสมอ จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.1, 4.1.2 และ 4.1.3 โดยมีการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm แล้วแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 200, 250 และ 300 rpm ตามลำดับ ติดตามการเจริญของเชื้อและการผลิตไลเปสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1, 4.1.2 และ 4.1.3 ผลการทดลองแสดงในกราฟรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 7 พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 300 rpm จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป ในขณะที่อัตราเร็วในการกวน 200 และ 250 rpm การเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm เชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงที่สุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 200 rpm จะพบว่าเชื้อจะผลิตไลเปสได้ต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 8 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละอัตราเร็วในการกวนมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm เชื้อจะมี แอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm



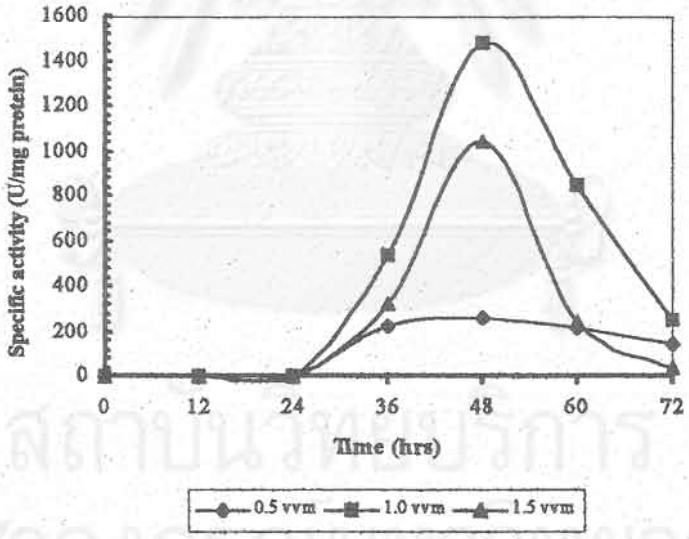
รูปที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v)



รูปที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v)



รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm



รูปที่ 8 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm

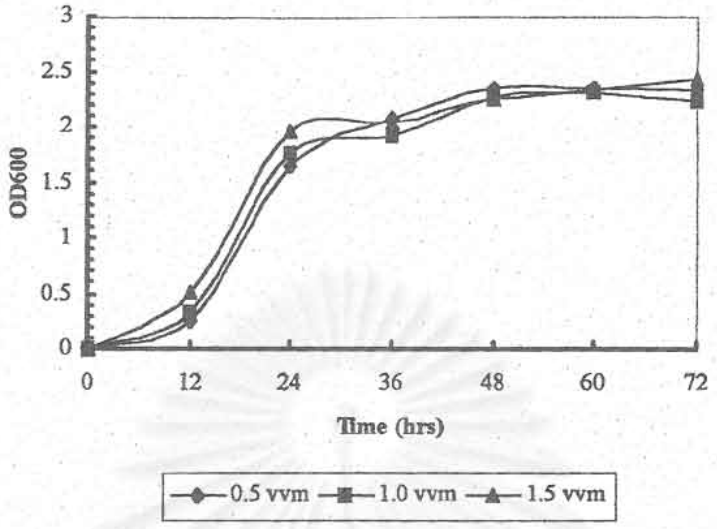
4.1.5 ผลของอัตราการให้อากาศ

เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย ซึ่งปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราเร็วในการกวน จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 4.1.4 โดยให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.5% (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที, ปริมาณของฟรุกโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 2% (w/v), ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.13% (w/v) แล้วแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตไลเปสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.4 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 9 และ 10 พบว่าที่อัตราการให้อากาศแต่ละชนิดให้ผลการเจริญของเชื้อไม่ต่างกัน แต่ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm เชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงที่สุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 0.5 vvm จะพบว่าเชื้อจะผลิตไลเปสได้ต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 10 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละอัตราการให้อากาศมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm เชื้อจะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm

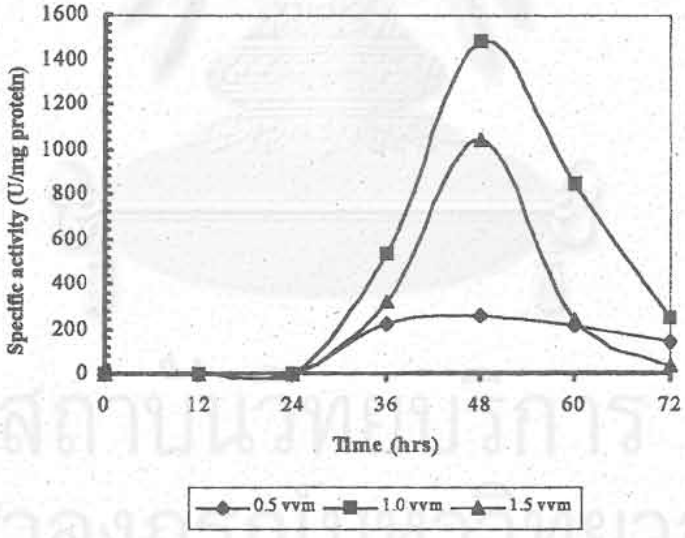
4.1.6 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อทดลองเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 และ 4.1.4 ทำการแปรผันอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 30, 37 และ 40 ตามลำดับ แล้วติดตามการเจริญและการผลิตไลเปส จะได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 11 แสดงให้เห็นถึงการเจริญของเชื้อที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันในแต่ละอุณหภูมิที่ทำการทดลอง แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเชื้อจะมีการเจริญสูงที่สุด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป และยังพบอีกว่ามีแอคติวิตีของไลเปสมากที่สุด ในขณะที่เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้น้อยมากจนเกือบไม่มีเลย แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสยังสามารถพบแอคติวิตีของไลเปสได้บ้าง ดังแสดงในรูปที่ 12 เมื่อนำเอาค่าแอคติวิตีจำเพาะของแต่ละอุณหภูมิในขณะทำการทดลองมาเปรียบเทียบกันที่ชั่วโมง 48 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่มีแอคติวิตีสูงสุดในช่วงของการเลี้ยง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสยังคงเป็นอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิในการทดลองคือ 37 องศาเซลเซียส

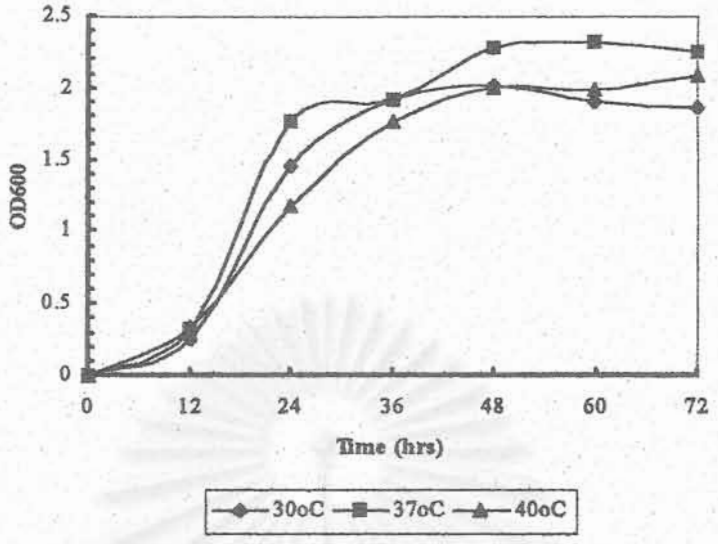
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



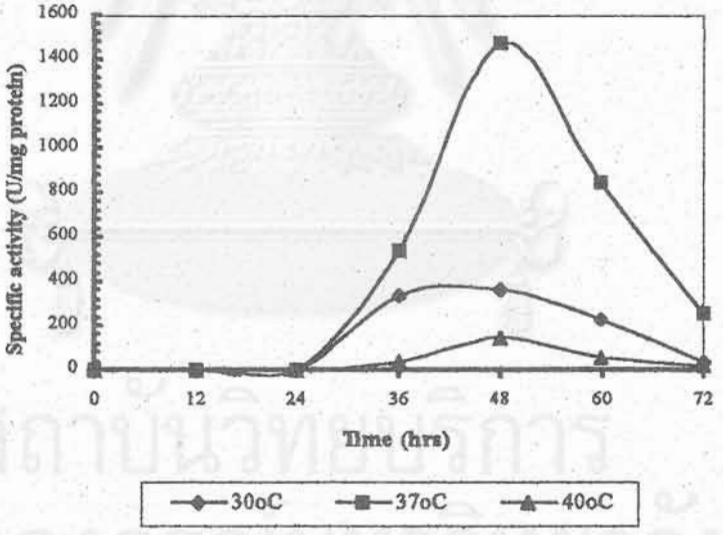
รูปที่ 9 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm



รูปที่ 10 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm



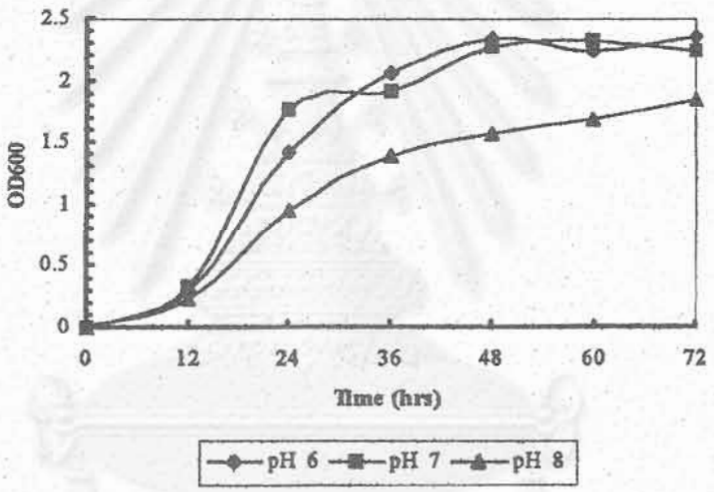
รูปที่ 11 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 12 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

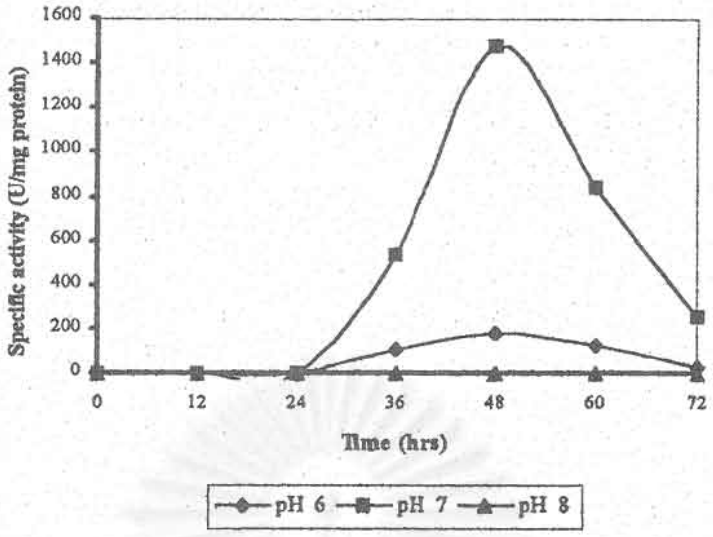
4.1.7 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์และการส่งผ่านเซลล์เมมเบรน ซึ่งเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อที่ผ่านมา แต่ทำการแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยใช้ 1N NaOH เป็นตัวควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะทดลอง แล้วติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 13 และ 14 จากรูปที่ 13 การเจริญของเชื้อในแต่ pH ที่กำหนดให้มีการเจริญที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยมีการเจริญในช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 จากกราฟรูปที่ 14 แสดงแอคติวิตีจำเพาะของ ไลเปสในชั่วโมงต่างๆกัน พบว่าที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และ 7.0 เชื้อจะเริ่มมีการผลิตไลเปสใน ชั่วโมงที่ 36 และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 แต่ที่ pH เท่ากับ 6.0 จะมีการผลิตไลเปสได้น้อยมากเมื่อเทียบกับที่ pH เท่ากับ 7.0 ในขณะที่เมื่อควบคุมให้ pH ในระหว่างทำการทดลองเป็น 8.0 แม้เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตได้ แต่ไม่พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้เลย ดังนั้นจึงเลือกใช้ pH เริ่มต้นในและควบคุมให้เท่ากับ 7.0 ตลอดการทดลอง



รูปที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8

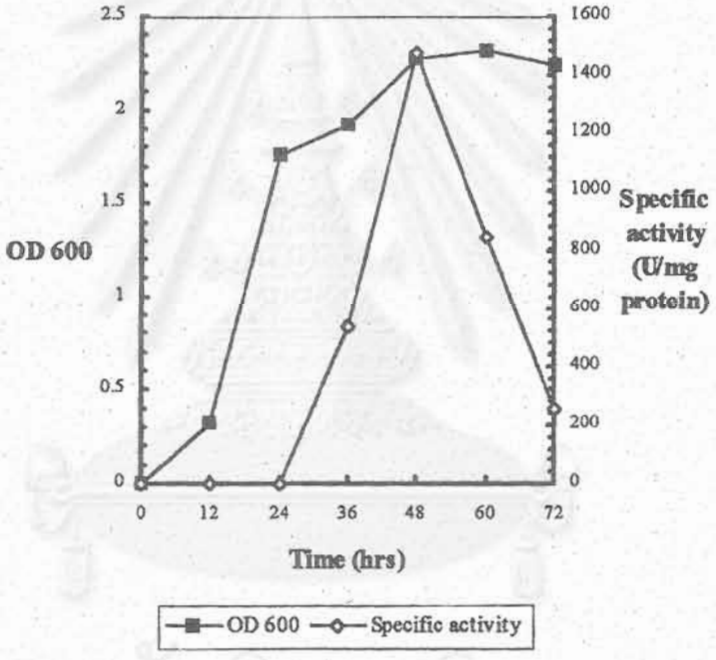
4.2 การเตรียมไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น และนำมาทำเป็นเอนไซม์ผง

เมื่อทำการศึกษาได้ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไลเปสในระดับถังหมัก 5 ลิตรได้แล้ว ดังแสดงในกราฟรูปที่ 22 จึงทดลองเลี้ยงตามภาวะดังกล่าวคือ เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 0.13% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และฟรุกโตส 2% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงโดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที, อุณหภูมิระหว่างการทดลองเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างการทดลองให้เท่ากับ 7.0 พบว่าเชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 จากนั้นการเจริญของเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ภาวะ stationary phase ส่วนการผลิตไลเปสของเชื้อนั้นจะเริ่มในช่วงชั่วโมงที่ 24-36 ซึ่งเป็นช่วงเริ่มต้นของ stationary phase และจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงเรื่อยๆ นำเอนไซม์ในช่วงชั่วโมงที่ 48 มาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสที่เรียกว่า crude enzyme มาหาไลเปสแอคติวิตีได้ 245.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 166 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น (ซึ่งมี molecular weight cut off ที่ 10,000 ดาลตัน) เนื่องจากได้มีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 185,000 ดาลตัน นำสารละลายเอนไซม์ที่ปั่นเก็บเซลล์แล้วปริมาตร 2,500 มล. มากรองผ่านเมมเบรนให้เหลือปริมาตรประมาณ 300 มล. นำเอนไซม์ที่เข้มข้นที่เหลือมาทำให้เป็นผงด้วยวิธี Lyophilization เอนไซม์ผงที่ได้มีน้ำหนักทั้งสิ้น 4 กรัมต่อน้ำหมัก 4 ลิตร นำมาหาแอคติวิตีได้ 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 50 มิลลิกรัม พบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,960.80 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ผลผลิต

เอนไซม์เท่ากับ 40% และสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 1.36 เท่า (ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.36 เท่า) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น

Sample	*Total activity*	*Protein*	*Specific activity (U/mg protein)*	*% Yield*	*Purify (fold)*
Crude	$2.451 * 10^5$ U/l	166 (mg/ml)	1,476.50	100	1.00
Powder	$9.804 * 10^4$ U/g	50 (mg protein/mg)	1,960.80	40	1.36



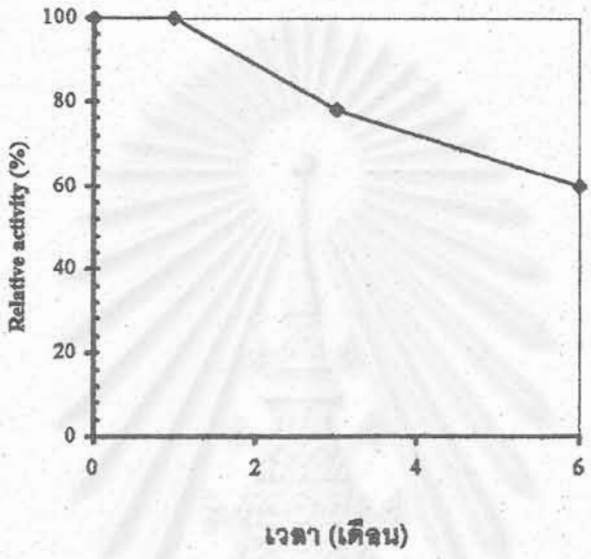
รูปที่ 15 แสดงการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm, pH 7.0 และควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.3 การศึกษาการเก็บเอนไซม์ผงในระยะยาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำเอนไซม์ผงที่ได้จากข้อ 4.2 มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆคือ 1, 3 และ 6 เดือน โดยเปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น พบว่าไลเปสผงที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน เป็นช่วงเวลาที่เอนไซม์ยังไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย แต่จะสูญเสียแอคติวิตีไป 22% เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน ดังแสดงในตารางที่2

ตารางที่ 2 แสดง Relative activity ของเอนไซม์ผงที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา (เดือน)	0	1	3	6
Activity(U/mg enzyme)	98.04	98.04	76.47	58.82
Relative activity(%)	100	100	78	60



*แอคติวิตีของเอนไซม์ผง 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ = Relative activity 100%

รูปที่ 23 ความเสถียรของไลเปสผงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

4.4 การประยุกต์ใช้ไลเปสเพื่อการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยของผ้าฝ้าย

ในการวิจัยนี้ได้มีการนำไลเปสที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยทำการเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรในภาวะที่เหมาะสม 2% (w/v) fructose, 0.13% (w/v) ammonium sulfate, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อุณหภูมิ 37 °ซ, pH 7.0 และปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v) มาทำงานร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น โดยตรวจสอบประสิทธิภาพของการกำจัดสิ่งสกปรกจากใยฝ้ายด้วยการตรวจดูคุณสมบัติในการดูดซับน้ำของผ้าที่ถูกนำมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเปรียบเทียบกับการใช้คอสติกโซดาในการกำจัดสิ่งสกปรกในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งผ้าที่สามารถดูดซับหยดน้ำได้ภายในเวลา 3 วินาทีหลังจากที่หยดน้ำลงบนผ้าถือว่าผ้านั้นมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดีพอที่จะนำไปเข้าสู่กระบวนการขั้นต่อไปได้ เนื่องจากการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วย 2 วิธีนี้จำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยเปียกเพื่อลดแรงตึงผิวของผ้าลงและทำให้สารต่างๆสามารถซึมเข้าผ้าได้ดีขึ้นจึงมีการ ศึกษาผลของสารช่วยเปียกต่อการดูดซึมน้ำของผ้า โดยนำผ้าฝ้ายมาแช่ในสารละลายที่มีสารช่วยเปียก (Womine TE) ความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37-40°ซ และที่ 80°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอุณหภูมิและเวลาที่ใช้สำหรับการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์และด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ตามลำดับ พบว่าผ้าไม่ดูดซึมน้ำทันทีแต่ดูดซึมหลังหยดน้ำลงบนผ้าแล้วมากกว่า 1 นาที ฉะนั้นสารช่วยเปียกนี้ไม่มีผลโดยตรงต่อการกำจัดสิ่ง

สกปรกเพื่อให้ผ้าดูดซึมน้ำแต่เป็นเพียงสารช่วยกำจัดสิ่งสกปรกให้เกิดสมบูรณ์ และทำนองเดียวกันด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์อย่างเดียวในการกำจัดสิ่งสกปรกก็ไม่สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันที ผลการทดลองกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์ได้แสดงในตารางที่ 3

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3 ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของคอสติกโซดาในการกำจัดสารขี้ผึ้ง (wax) และสารประกอบต่างๆ ที่เคลือบอยู่ตามเส้นใยให้หลุดออกไปได้ ทำให้ผ้ามีการดูดซึมน้ำได้ทันที ซึ่งบอกถึงความสามารถของเส้นใยที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับของเหลวได้ดี ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวไม่ว่าจะเป็นเซลลูเลส ไลเปส หรือโปรตีเอสทั้งที่นำเข้าและผลิตเองนั้นไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับของเหลวให้ดีขึ้นได้ แต่เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิดคือ เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* และไลเปสจาก Porcine Pancreas ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่าสามารถทำให้ผ้าดูดซับน้ำได้ทันทีเช่นเดียวกับการใช้คอสติกโซดา แต่เมื่อทดสอบกับเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองคือ เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าผ้าฝ้ายดิบสามารถดูดซับน้ำได้ช้ากว่าคือ ภายใน 3 วินาที แต่ผลการทดลองที่ได้นี้เมื่อเทียบตามมาตรฐานของ American Association Textile Chemist and Colorist แล้วถือว่าเป็นผ้าฝ้ายดิบที่มีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้ดีเพียงพอที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการย้อมสีต่อไปได้

ตารางที่ 3 แสดงผลของการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายเปรียบเทียบระหว่างการใช้เอนไซม์กับการใช้คอสติกโซดา

วิธีการทดลอง	*ผลการทดลอง*
คอสติกโซดา	+ (ผ้าดูดซึมน้ำทันที)
เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*	-
เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*	-
ไลเปสจาก Porcine Pancreas	-
ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*	-
โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae*	-
โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25	-
ไลเปสจาก Porcine Pancreas + โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* + เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*	+ (ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันที)
ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* + โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 + เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei*	+ (ผ้าดูดซึมน้ำภายใน 3 วินาที)

+ หมายถึง ผ้าสามารถดูดซึมน้ำได้

- หมายถึง ผ้าไม่สามารถดูดซึมน้ำได้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากรายงานการวิจัยของ รักชนก ธีรกวินสกุล (2539) ซึ่งได้ทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในระดับขวดเขย่า โดยงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องโดยนำ *Pseudomonas aeruginosa* มาทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณมากขึ้น โดยขั้นตอนเริ่มต้นจะใช้สูตรอาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ในระดับขวดเขย่า คือ ใช้สูตรอาหาร Minimum medium ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 1.3% (w/v), KH_2PO_4 0.9% (w/v), K_2HPO_4 0.6% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.2% (w/v), Yeast extract 0.1% (w/v) และฟรุกโตส 2% (w/v)

ปัจจัยแรกที่ทำการศึกษาคือ ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส ซึ่งทำการแปรผันปริมาณของฟรุกโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 1%, 2% และ 3% (w/v) โดยควบคุมภาวะต่างๆ ให้คงที่ เช่น ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนมีความเข้มข้น 0.13% (w/v), อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm., อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในระหว่างการทดลองเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้เท่ากับ 1% (v/v) พบว่าการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยที่การเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสต่างๆ จะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสเท่ากับ 1% (w/v) การเจริญของเชื้อจะมีค่าต่ำที่สุด ในขณะที่เชื้อจะมีการเจริญมากที่สุดเมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) และเมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสที่ ชั่วโมงที่ 48 พบว่าที่ปริมาณ ฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) จะมีการผลิตไลเปสได้สูงที่สุดคือ 938.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณฟรุกโตสให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 3% (w/v) พบว่าการผลิตไลเปสจะลดลงแม้จะมีการเจริญใกล้เคียงกับที่ 2% ก็ตาม อาจเป็นเพราะว่าฟรุกโตสสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้มากทำให้ acetyl CoA และ Citrate ในเซลล์สูงไปด้วย เป็นสัญญาณให้เกิด Fatty acid synthesis และไปยับยั้งการผลิตไลเปส (Stryer, 1988) ในขณะที่ความเข้มข้นของฟรุกโตส 2% (w/v) มีการผลิตไลเปสได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่ำจะสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้น้อยส่งผลให้ปริมาณของ acetyl CoA และ Citrate ในเซลล์ต่ำไปด้วย ซึ่งเป็นสัญญาณให้เกิด Fatty acid degradation เพื่อผลิตพลังงานและ Carbon Skeleton แก่เซลล์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์และใช้ในการเจริญ ดังนั้นการให้ฟรุกโตสความเข้มข้นต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนเดียวจึงเป็นการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไลเปสซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบ Fatty acid degradation ได้ นอกจากนี้การให้ปริมาณฟรุกโตสที่เหมาะสมยังกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับคาร์โบไฮเดรทได้ โดยมีรายงานว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* กระตุ้นการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับฟรุกโตสได้ (Seino, 1984) ดังนั้นถ้าเกิดเอสเทอร์ระหว่างฟรุกโตสและกรด ไขมันขึ้น จะทำให้กรดไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยของไลเปสถูกดึงออกจากระบบเพื่อไปสร้างเป็นเอสเทอร์จึงเป็นการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสให้สร้างกรดไขมันเพิ่มขึ้น และในอาหารที่มีฟรุกโตสเข้มข้น 2% (w/v) ก็อาจเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการเกิดเอสเทอร์จึงกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสได้ดีที่สุด

จุลินทรีย์ที่เลี้ยงเพื่อประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่างๆ มีทั้งที่ใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของสารประกอบอนินทรีย์และสารประกอบอินทรีย์แตกต่างกันไป เช่น Dimitris Papaparaskevas และคณะ (1992) ได้ทำการเลี้ยง *Rhodotorula glutinis* โดยใช้แหล่งชนิดต่างๆ ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (แอมโมเนียมคลอไรด์,

แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมฟอสเฟต, แอมโมเนียมซัลเฟต, เคซีน, เปปโตน, ทริปโตน, ยูเรีย และ สารสกัดจากยีสต์) พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุด (1.8 ยูนิต/มิลลิลิตร)โดยที่เชื้อจะนำแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้เพื่อสร้างกรดอะมิโนเริ่มต้น, กรดนิวคลีอิก, โปรตีน และส่วนประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็น 0.05, 0.13, 0.25 และ 0.50% (w/v) พบว่าการเจริญของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.50% (w/v) จะมีการเจริญของเชื้อในช่วง log phase สูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มากเพียงพอกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปส พบว่าเชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.13% (w/v) ในขณะที่เมื่อให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.50% (w/v) พบว่าการผลิตไลเปสจะมีค่าลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มากเกินไปทำให้เกิด Catabolite repression ดังนั้นจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.13% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองต่อไป

ปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการผลิตไลเปสของเชื้อ โดยในการทดลองระดับขวดเขย่าใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1% (v/v) โดยสูตรอาหาร Minimum medium แต่ในระดับถังหมักได้ทำการแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) พบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 0.25% (v/v) มีการเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อดูจากค่า OD_{600} แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสแล้วพบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 0.50% (v/v) จะมีการผลิตไลเปสมากที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าปริมาณของเชื้อและปริมาณสารอาหารที่ให้มีความเหมาะสมกันสำหรับการผลิตไลเปส ซึ่งถ้าให้ปริมาณของเชื้อตั้งต้นมากเกินไปจะทำให้เชื้อไม่สามารถรับสารอาหารได้ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญและการนำสารอาหารนั้นไปสร้างเป็นสารผลิตภัณฑ์ก็จะน้อยลงไปด้วย ในขณะที่เมื่อให้ปริมาณเชื้อตั้งต้นน้อยเกินไปจะทำให้เชื้อได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ จึงมีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงธรรมชาติของเชื้อที่จะผลิตไลเปสเมื่ออยู่ในภาวะกึ่งอดอาหารแล้วจะพบว่าที่ปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.25% (v/v) เชื้อสามารถได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ จึงทำให้มีการผลิตไลเปสได้ไม่มากเท่าที่ควร

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อใน ถังหมักผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ทำให้เชื้อมีการเจริญและมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีคือ อัตราการเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศ โดยเริ่มจากการแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที (rpm) พบว่าที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที เชื้อมีการเจริญสูงสุด อาจเนื่องมาจากการผสมของสารอาหารเป็นเนื้อเดียวกันและต่อเนื่องทำให้อากาศมีฟองเล็กและมีพื้นที่ผิวมาก ซึ่งทำให้เชื้อได้รับอาหารอย่างเต็มที่ทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปส พบว่าที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงที่สุด แต่ที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตไลเปสได้สูงเท่าที่ควร ซึ่งเป็นเพราะที่อัตราเร็วในการกวนช้าทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกันไม่สม่ำเสมอ และการตีฟองอากาศไม่สามารถกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีเท่าที่ควรจึงทำให้เชื้อไม่สามารถได้รับออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ส่วนเหตุผลที่เมื่อปรับอัตราเร็วในการกวนให้เท่ากับ 300 รอบต่อนาที แต่มีการผลิตเอนไซม์ได้ไม่ดีเท่าเมื่อให้อัตราเร็วในการกวนเป็น 250 รอบต่อนาทีนั้น อาจเนื่องมาจากที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เชื้อ

สามารถได้รับสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจนรวมทั้งอากาศได้มากที่สุด เชื้อจึงนำสารอาหารเหล่านั้นไปใช้ในการเจริญมากกว่าซึ่งสังเกตได้จากค่า OD_{600} ที่สูงที่สุด จึงทำให้มีการนำเอาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมาใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้ไม่มากเท่าที่ควร

อีกปัจจัยหนึ่งที่ควรพิจารณาควบคู่ไปกับการอัตราการกวนคืออัตราการให้อากาศ ซึ่งทำการแปรผันเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm พบว่าแม้ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm จะมีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด แต่ว่าเมื่อพิจารณาการผลิตไลเปส พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm มีการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดและที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm มีการผลิตไลเปสได้ต่ำที่สุด ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Lazic และคณะ (1993) ที่กล่าวว่าเมื่อให้อากาศมากเกินปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้เชื้อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้น้อยลง แต่กลับมีการเจริญที่มากขึ้น และในขณะเดียวกัน Chan และคณะ (1999) ได้ทำการเลี้ยง *Acinetobactor radioresistens* เพื่อผลิตไลเปสพบว่า ที่ภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และ 1.5vvm นั้น การให้อากาศ 1.5 vvm สามารถผลิตไลเปสได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และ Chan ยังกล่าวเพิ่มอีกว่าอัตราเร็วในการกวน (Agitation) จะมีผลต่อการผลิตไลเปสได้มากกว่าอัตราการให้อากาศ (Aeration) เพราะอัตราเร็วในการกวนมีผลต่อค่าอัตราการส่งผ่านออกซิเจน (Rate of Oxygen Transfer) มากกว่าอัตราการให้อากาศ โดยสามารถดูได้จากสมการของ Van't Riet (1979)

$$K_La = 0.002 (P_m/V)^{0.7} v_s^{0.2}$$

โดยที่ K_La คือ Rate of oxygen transfer

P_m คือ Power dissipated by impeller

V คือ Liquid volume

v_s คือ Superficial gas velocity

จะเห็นได้ว่าเทอมของอัตราการกวนคือ (P_m/V) นั้นมีอิทธิพลต่อการส่งผ่านออกซิเจนมากกว่า เทอมของการให้อากาศ (v_s) ซึ่งจากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. และอัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการละลายของออกซิเจนและการผสมของสารอาหารในถังหมักจึงทำให้เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Moon และ Parulekar (1991) พบว่าการที่จะทำให้เซลล์สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์มากจะต้องลดปริมาณการให้ออกซิเจนลงให้เหมาะสม

การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อเป็นผลที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ซึ่งก็คล้ายกับปฏิกิริยาเคมีทั่วๆ ไปที่อุณหภูมิมักมีส่วนสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา การเจริญและการตายของจุลินทรีย์ก็เช่นเดียวกัน ซึ่งการเจริญของจุลินทรีย์แบ่งตามอุณหภูมิได้ 3 แบบด้วยกันคือ Psychrophilic เป็นจุลินทรีย์พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส, Mesophilic เป็นจุลินทรีย์พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นประเภทเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองนี้ และ Thermophilic เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักนั้นพบว่าที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส การเจริญเติบโตของเชื้อใกล้เคียงกัน แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีการเจริญสูงกว่าเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสก็ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสยังเป็นอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์

ของเชื้อซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ ส่วนที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสนั้นเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้น้อยมาก ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเลยจุดที่เหมาะสม (Optimum temperature) อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งสามารถอธิบายสาเหตุได้จากสมการความสัมพันธ์ของ Arrhenius ดังนี้

$$\mu = A^{\circ} e^{-Ea/RT}$$

$$\alpha = A^{\circ} e^{-E'a/RT}$$

เมื่อเราให้ μ คือ Specific growth rate, α คือ Specific death rate, A° เป็นค่าคงที่, E_a และ E'_a คือ Activation energies, R คือ gas constant (R = 1.98 cal/mol-K°) และ T คือ อุณหภูมิมีหน่วยเป็น เคลวิน (K°) ซึ่งค่า Activation energies (E_a) สำหรับการเจริญมีค่าประมาณ 15-20 kcal/mol และสำหรับอัตราการตายมีค่าประมาณ 60-70 kcal/mol ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ จะส่งผลต่อค่าอัตราการตายของเชื้ออย่างรวดเร็ว ในขณะเดียวกันอุณหภูมิก็ส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ในลักษณะคล้ายๆกับการเจริญของจุลินทรีย์เช่นกัน ในขณะเดียวกันอุณหภูมิยังส่งผลต่อปัจจัยอื่นๆของเซลล์ด้วย เช่น อุณหภูมิจะส่งผลต่อการแพร่ของสารอาหารเข้า-ออกเซลล์ ในกรณีที่อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม การดูดซึมสารอาหารของจุลินทรีย์อาจทำได้ไม่ดีเท่าที่ควร และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นพลังงาน ทำให้มีการเจริญและสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้เพิ่มมากขึ้น

สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อนั้นผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจากเมตาโบลิซึม อาจมีผลไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้ ในกรณีศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์มักมีปัญหาเกี่ยวกับการควบคุม pH และมักไม่อาจทำให้ pH เป็นปัจจัยที่คงที่ได้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลง pH จึงจำเป็นต้องควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 จะมีการเจริญเติบโตสูงสุด และที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 จะมีการเจริญของเชื้อน้อยที่สุดซึ่งอาจเป็น pH ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ส่วนที่ pH เท่ากับ 6.0 นั้น เชื้อสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกับที่ pH เท่ากับ 7.0 เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสพบว่าที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงที่สุดซึ่งอาจเป็นเพราะ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์และการขนส่งของสารต่างๆ ผ่านเซลล์เมมเบรน การแปรผันของ pH นั้นมีผลต่อสมดุลย์กรด-ด่าง มีผลต่อสรีรวิทยาเฉพาะบางอย่างของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2530) และเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อาศัยของเชื้อซึ่งแยกมาจากดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้นสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกันแล้วแต่ความเหมาะสมของการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์เช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, การdialysis, การตกตะกอนด้วยเอทานอล, การกรองด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น เป็นต้น แต่ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีอัลตราฟิลเตรชั่น เพราะเป็นวิธีที่สะดวก ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและใช้เวลาน้อยที่สุด อีกทั้งยังได้แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่น้อยจนเกินไป พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะหลังจากทำการ อัลตราฟิวเตรชั่นแล้วนำไปทำให้เป็นผงด้วยวิธี Lyophilization นำเอนไซม์ผงที่ได้มาหาแอคติวิตีได้เท่ากับ 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัม

โปรตีนต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,960.80 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.36 เท่าเท่านั้น เพราะเป็นการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงขั้นตอนเดียวกันเท่านั้นแต่ถ้าต้องการให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นควรนำเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนของการตกตะกอนด้วยเอทานอลหรือเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตหลังจากกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชั่นแล้ว ซึ่งจะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้

จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง การผลิตเอนไซม์นั้นถ้าเปรียบเทียบแอคติวิตีกับการทดลองของ รักชนก ธีรกวินสกุล (2539) แล้วจะพบว่าการผลิตเอนไซม์โดยใช้ถังหมักจะมีค่าแอคติวิตีสูงกว่ามาก เนื่องมาจากในถังหมักมีการให้อากาศและมีการกวนในอัตราเร็วที่เหมาะสมทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีอีกทั้งยังผลิตเอนไซม์ได้มาก ซึ่งเมื่อเทียบกับระดับขวดเขย่าแล้วปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในขวดเขย่านั้นจะลดลงเรื่อยๆ จนไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ รวมไปถึงการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในขวดเขย่าไม่สามารถทำได้ดี แต่ในถังหมักสามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างได้ตลอดระยะเวลาการหมักจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่อยู่เสมอ ซึ่งจะทำให้การส่งผ่านของสารอาหารเข้าออกเซลล์เป็นไปได้อย่างคงที่ จากการทดลองพบว่าระดับขวดเขย่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสให้แอคติวิตีเท่ากับ 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงถึง 245.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตรแสดงให้เห็นว่าการผลิตไลเปสในระดับถังหมักมีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มทั้งผลผลิตคือเอนไซม์ให้มีมากขึ้นด้วย ในขณะที่ภาวะเหมาะสมในระดับถังหมักก็ไม่ได้แตกต่างจากภาวะเหมาะสมในระดับขวดเขย่าไปมากนัก ดังแสดงใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่า 1,000 มล. และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ปัจจัยที่ศึกษา	ระดับขวดเขย่า*	ระดับถังหมัก 5 ลิตร**
ปริมาตรอาหาร (ml)	250	4,000
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (%v/v)	3.0	0.5
อัตราการให้อากาศ (vvm)	-	1.0
อัตราเร็วในการกวน (rpm)	250	250
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.0 (ไม่ควบคุม)	7.0 (ควบคุม)
อุณหภูมิในการเลี้ยง ($^{\circ}C$)	37	37
ปริมาณแหล่งคาร์บอน (% w/v)	2	2
ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (% w/v)	0.13	0.13
ไลเปสแอคติวิตี (U/ml)	40.0	245.1
Total activity (U)	1.0×10^4	9.8×10^5

*(รักชนก, 2539), **(อังคาร, 2544)

จากงานวิจัยทั้งหมดนี้ถ้าเรานำมาคำนวณต้นทุนการผลิตไลเปสพบว่าในระดับถังหมักจะถูกกว่าในระดับขวดเขย่า เมื่อพิจารณาจากปริมาณวัตถุดิบและปริมาณเชื้อที่ใช้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง โดยมีปริมาตรน้ำหมัก 4 ลิตรต่อการหมัก 1 ครั้งแสดงดังตารางที่ 7 และได้แสดงการเปรียบเทียบราคาต่อหน่วยระหว่างไลเปสผงที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* กับไลเปสผงของบริษัท SIGMA ที่ผลิตจาก *Pseudomonas cepacia* ดัง ตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ต้นทุนของการผลิตต่อสเกล

Cost Element	*Cost*
Medium (บาท)	205
ค่าไฟฟ้าและสาธารณูปโภค (บาท)	1,075
Total cost (บาท)	1,280
Enzyme yield per batch* (Unit)	$3.9*10^5$
Unit cost (U/บาท)	306.375

*ปริมาตรรวม 4 ลิตร

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบราคาต่อหน่วยระหว่างไลเปสผงที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* กับไลเปสผงของบริษัท SIGMA ที่ผลิตจาก *Pseudomonas cepacia*

	งานวิจัยนี้	*ผลิตโดยบริษัท SIGMA*
แบคทีเรีย	*P. aeruginosa*	*P. cepacia*
*แอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิต/กรัม)	3,266	50
ราคา (บาท)	1,280	13,700
Unit cost (ยูนิต/บาท)	2.552	0.003

*Unit definition คือ 1 ยูนิตของเอนไซม์สามารถผลิต 1 ไมโครโมลกลีเซอรอลจากการย่อยไตรกลีเซอไรด์ ภายในเวลา 1 นาที ที่ภาวะเหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ (pH 6.5, อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *P. aeruginosa* และ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *P. cepacia*)

เมื่อคิดมูลค่าของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* ในเชิงการค้าแล้ว พบว่ามีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง ในขณะเดียวกันเราสามารถปรับราคาต้นทุนให้ต่ำลงกว่านี้ได้อีก เพราะในการทดลองนี้มีการใช้ D-fructose ที่จัดเป็นสารเคมีประเภทใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ (Lab grade) จึงทำให้มีต้นทุนสูง ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ถ้าต้องการจะผลิตในเชิงพานิชย์อาจต้องมีการทดลองเพื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นการลดต้นทุนลง ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้อาจเป็นน้ำตาลฟรุกโตสที่ผลิตในอุตสาหกรรมซึ่งมีราคาถูกกว่า lab grade

จากผลการทดลองการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายโดยเปรียบเทียบการใช้คอสติกโซดากับการใช้เอนไซม์ในการกำจัดสิ่งสกปรก พบว่าเมื่อใช้คอสติกโซดาเพื่อการกำจัดสิ่งสกปรกโดยกระทำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งการต้มสารละลายนี้ทั้งน้ำ สารช่วยเปียก (Surfactant) และด่างจะช่วยกันทำงาน กล่าวคือ สารช่วยเปียกจะเป็นตัวลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับเส้นใย ทำให้น้ำซึ่งมีสารละลายด่างอยู่ด้วยสามารถนำด่างเข้าไปทำ

ปฏิกิริยาบริเวณเส้นใยและไขมันในเส้นใยก็จะถูกละลายออกมากับน้ำ ในขณะเดียวกันสารช่วยเปียกจะทำหน้าที่กระจายไขมันที่ละลายออกมา รวมทั้งสิ่งสกปรกอื่นๆ ด้วยให้กระจายตัวหลุดลอยไปกับน้ำมีผลทำให้ผ้าสามารถดูดซับน้ำได้ทันทีเมื่อหยดน้ำลงไป ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมในการที่จะนำผ้าไปเข้าสู่กระบวนการฟอกและย้อมสีต่อไป ในส่วนของการนำเอนไซม์มาใช้กำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าดิบ พบว่าทั้งเซลลูเลส ไลเปสและโปรตีเอส ถ้าเลือกใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในการกำจัดสิ่งสกปรกแล้ว จะไม่สามารถทำให้ผ้ามีคุณสมบัติของการดูดซับน้ำได้ดีขึ้นเลย ทั้งนี้ในส่วนของเซลลูเลสนั้นเซลลูเลสไม่สามารถแทรกผ่านชั้น cutin เข้าทำปฏิกิริยากับเส้นใยได้ ในขณะที่ไลเปสสามารถกำจัดสารประกอบจำพวกไขมันได้แต่ไม่สามารถกำจัดสารประกอบจำพวกโปรตีนบางส่วนบนผิวของเส้นใยให้หลุดออกไปได้ และโปรตีเอสก็ทำหน้าที่ในการย่อยสารประเภทโปรตีน แต่ไม่สามารถย่อยไขมันที่เคลือบอยู่บนผิวของเส้นใยได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองนำเอนไซม์ทั้งสามชนิดมาทำงานร่วมกันโดยเริ่มจากการทดลองกับเอนไซม์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกเป็นการใช้ไลเปสจาก Porcine Pancreas โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดคอยทำหน้าที่ในการย่อยไขมันและโปรตีนที่เคลือบอยู่บนผิวของเส้นใยตามลำดับ และหลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำร้อนแล้วจึงต่อด้วยการใช้เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเส้นใย ทำให้เส้นใยมีความอ่อนตัวและช่วยเพิ่มช่องว่างระหว่างเส้นใยให้เพิ่มมากขึ้น ทำให้ผ้าสามารถดูดซับน้ำได้ทันทีในการทดสอบความสามารถในการดูดซับ ในขณะเดียวกันก็ได้ทำการทดลองกับเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองโดยการใช้ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ร่วมกับการทำงานของโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และเซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* นั้น พบว่าสามารถช่วยให้ผ้าฝ้ายดิบมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ภายใน 3 วินาที ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองมีแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยกว่าเอนไซม์ที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ แต่ถึงแม้ประสิทธิภาพในการดูดซับของเหลวจะช้ากว่าการดูดซับของเหลวเมื่อใช้คอสติกโซดาและเอนไซม์ทางการค้าก็ตามแต่ผลที่ได้สามารถยอมรับได้ว่าสามารถทำให้ผ้าดิบที่ผ่านกระบวนการกำจัดสิ่งสกปรกมาแล้วดูดซับน้ำได้ดีพอที่จะนำไปผ่านเข้าสู่กระบวนการต่อไป เอนไซม์แต่ละชนิดก็ทำหน้าที่ในการย่อยสารประกอบต่างๆ ที่เคลือบอยู่บนผิวเส้นใย ในส่วนของ ไลเปสนั้นจะทำหน้าที่ในการย่อยสารประกอบประเภทขี้ผึ้ง (wax) ซึ่งมีปริมาณ 0.6% ของน้ำหนักผ้าดิบ สารประกอบประเภทขี้ผึ้งประกอบไปด้วย กลีเซอไรด์ (glyceride), ไฮโดรคาร์บอนบางชนิด (n-hentriacontane และ n-dotriacontane) (Knecht และ Allan, 1911) และกรดไขมัน (palmitic acid, strearic acid, carnaubic acid, gossypic acid, geddic acid และ oleic acid) แต่กรดไขมันส่วนใหญ่จะเป็น palmitic acid (C_{16}) และ stearic acid (C_{18}) (Tulloch, 1976) ซึ่งไลเปสจะเข้าทำปฏิกิริยาตรงตำแหน่งที่จับกันอยู่ด้วยพันธะ Hydroxy fatty acid ของกรดไขมันแต่ละชนิด (Kolattukudy, 1975) ทำให้สารเคลือบผิวบนเส้นใยหลุดออกและโมเลกุลของน้ำและเอนไซม์ชนิดอื่นๆที่ทำงานร่วมกันสามารถแทรกเข้าไปทำปฏิกิริยาระหว่างเส้นใยของฝ้ายได้ จากประโยชน์ของการทำงานร่วมกันของเอนไซม์แต่ละชนิดนี้เองที่น่าจะเป็นก้าวใหม่ของการประยุกต์ใช้ความรู้ด้านเอนไซม์เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมสิ่งทอเพื่อมีส่วนช่วยปริมาณและปัญหามลภาวะในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสิ่งทอลงเป็นอย่างมาก

สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่องในอาหารสูตร minimum medium โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v), ปริมาณฟรุกโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน 2% (w/v), ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.13% (w/v), อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที, อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสแอคติวิตีสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 มีแอคติวิตี 254.01 ยูนิต/มิลลิลิตร

2. ไลเปสผงที่ผลิตได้มีแอคติวิตี 98,040 ยูนิตต่อกรัมเอนไซม์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.36 เท่า และสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 วันโดยไม่สูญเสียแอคติวิตี

3. ไลเปสผงที่ผลิตได้ถูกนำไปใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายร่วมกับโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และ เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งสกปรกได้ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตในเชิงการค้า คือสามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีพอที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ทนง ภัครัชพันธ์.เอนไซม์ในอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์:,2522.

รักชนก ธีรกวินสกุล. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะสมบัติของไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2539.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. เทคโนโลยีการหมัก. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 2530.

วรรณวิมล ทรัพย์ดี.การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในระดับถังหมัก ขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2540.

Arnold, R.G., Shahani, R.M. and Dwivedi, B.K. Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. J.Dairy Sci. 58(1975): 1127-1143.

Chan, J.Y.; Wen, C.M. and Chen, T.L. Effect of Oxygen Transfer on Lipase Production by *Acinetobacter radioresistens*. Biotech. Bioeng. 62 (FEB 1999):3.

Knecht, E. and Allan, J.(1911) In A.H. Warth (ed.), The Chemistry and Technology of Waxes, 203-207. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1956.

Kolattukudy, P.E, Biochemistry of Cutin, Suberin and Waxes the Lipid Barrier on Plants. In: Galliand, T. and Mercer, E.I. (eds.), Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plants Lipid. 203-246, New York, Academic Press. 1975.

Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Vucetic, J.I. and Vrvic, M.M. Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme.Microb.Technol.15(Apr.1993): 1546.

Macrae, A.R. In Willium M. Forgarty, Extracellular Microbial Lipase. Microbial enzyme and biotechnology. New York: Applied Science Publishers, 1983.

Moon, S.H. and Parulekar, S.J., A Paramatric Study of Protease in Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus firmus*. Biotech. Bioeng. 37 (1991): 467-483.

Stryer, I. Entry of Fructose and Galactose Into Glycolysis. Biochemistry, 3rd ed., New York: W.H. Freeman and Company, 1988.

Technical Manual of the American Association of Textile Chemists and Colorists. Research Triangle Park, USA, 1989.

Tulloch, A.P. Chemistry of Waxes of Higher Plants. In: Kolattukudy P.E. (ed.) Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes. 235-287. Amsterdam: Elsevier, 1976.

Van't Riet, K. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas–Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. Ind.Eng. Chem Proc. Des. Dev. 18 (1979): 357-364.

Yamane, T. Enzyme Technology for the Lipids Industry: An Engineering Overview. J.Amer.Oil.Soc. 64 (1987): 1659-1661.

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1. Luria-Bertani medium (LB)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ภายใต้ความดัน 12 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.2. อาหารสูตรปรับต่ำ (Minimum medium)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

$(NH_4)_2SO_4$	1.3	กรัม
K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Olive oil	10.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แล้วเติม Olive oil จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารแข็ง (Minimum medium agar plate) ให้เติม Bacto-agar 15 กรัมใน minimum medium จำนวน 1 ลิตร

2. <u>การเตรียมสารในการหาแอคติวิตีของไลเปส</u>

2.1 การเตรียมอีมัลชันของสับสเตรท (1.5% olive oil emulsion)

ดัดแปลงจากวิธีของ Sugihara และคณะ (1991) ในสารละลายประกอบด้วย

1% (w/v) gum arabic solution	300 ml
1M NaCl	30 ml
2% (w/v) $CaCl_2$	7 ml

ผสมทั้ง 3 ส่วนให้เข้ากันดีแล้วเติม Olive oil 1.5 มล. ต่อส่วนผสม 100 มล. แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่น moulinex ความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที

2.2 การเตรียม 0.05 M Acetate buffer, pH 4.5

- 0.05 M Sodium acetate

ละลาย CH_3COONa 4.3545 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

- 0.05 M Acetic acid

ละลายกรดอะซิติก 1.43 มล. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล.

ผสม 0.05 M Acetic acid : 0.05 M CH_3COONa ในอัตราส่วน 50.0 : 86.9

2.3 การเตรียม 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.5

- 0.05 M K_2HPO_4

ละลาย K_2HPO_4 4.3545 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

- 0.05 M KH_2PO_4

ละลาย KH_2PO_4 3.4022 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล.

ผสม 0.05 M K_2HPO_4 : 0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 32.43 : 67.57

2.4 การเตรียม 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0

- ละลาย Tris 1.212 กรัม ในน้ำ 100 มล. นำสารละลายนี้มา 50 มล. แล้วปรับ pH ด้วย HCl จนมี pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

2.5 การเตรียม 0.05 M Bicarbonate buffer, pH 10.5

- 0.05 M Na_2CO_3

ละลาย Na_2CO_3 5.31 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มล.

- 0.05 M $NaHCO_3$

ละลาย $NaHCO_3$ 4.20 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.

ผสม 0.05 M Na_2CO_3 : 0.05 M $NaHCO_3$ ในอัตราส่วน 202.5 : 47.5

3 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradforf, 1976)

3.1 สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 100 มก. ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 50 มล. เติม 85% กรดฟอสฟอริกปริมาตร 100 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ละลาย Bovine Serum Albumin10 มก.ในน้ำกลั่น 10 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
"การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย"

(สัญญาเลขที่ RDG 5/0006/2543)

Part : "การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส สำหรับการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก"

ผู้วิจัย

ผศ.ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

ผู้ช่วยวิจัย

พิเศษ เลี้ยวสกุล

ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
ผลการทดลอง	12
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และแอคติวิตีของเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ 15

2 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อทำการตกตะกอนตามด้วยขั้นตอนไดอะไลซิส..... 19

3 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T reesei* สายพันธุ์ C ในการผลิต 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน..... 23

4 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ..... 26

5 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ..... 29

6 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตจากห้องทดลองกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า..... 31

7 เปรียบเทียบสภาวะ pH 3-7 ต่อการทำงานของเอนไซม์จากแอคติวิตีของเอนไซม์..... 34

8 เปรียบเทียบสภาวะอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียสต่อการทำงานของเอนไซม์จากแอคติวิตีของเอนไซม์..... 36

9 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวณจาก specific activity ของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการผลิต 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน..... 53

10 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวณจาก specific activity ของเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการผลิต 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน..... 53

11 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวณจาก activity ของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ 53

12 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวณจาก activity ของเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ..... 54

13 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวณจาก activity ของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ 54

14 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวณจาก activity ของเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ 54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

15 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจาก activity ของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ สภาวะ pH 3-7 55

16 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจาก activity ของเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ สภาวะ pH 3-7 55

17 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจาก activity ของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส 55

18 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจาก activity ของเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส 56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง 13

2 การเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ของเชื้อ *T. reesei* 2 สายพันธุ์ ที่บ่มบนเครื่องเขย่า มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง 16

3 การเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ของเชื้อ *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ ที่บ่มบน เครื่องเขย่ามีความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง 16

4 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM หลังขั้นตอน การทำให้บริสุทธิ์ 20

5 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการ ผลิตระดับขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน 24

6 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการ ผลิตระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน 25

7 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ที่ผสมเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ 27

8 แอคติวิตีของเอนไซม์จากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจน ชนิดต่างๆ 30

9 แอคติวิตีของเอนไซม์จากการผลิตในห้องทดลองกับเอนไซม์ที่เป็นการค้า 32

10 เปรียบเทียบสภาวะ pH 3-7 ต่อการทำงานของเอนไซม์จากแอคติวิตีของเอนไซม์ 34

11 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ณ สภาวะอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส 36

12 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน 51

13 กราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน 52

"การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส สำหรับการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก"

บทนำ

เซลลูโลสเป็นสารพอลิเมอร์ที่พบทั่วไปในพืชชั้นสูง โดยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ในธรรมชาติผนังเซลล์พืชประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 50 % ส่วนที่เหลือเป็นเฮมิเซลลูโลส ลิกนินและอื่นๆ โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วย D – anhydrousglucopyranose เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วย 1, 4 – glucosidic lingkage

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เกิดการเน่าเปื่อยผุพังได้แก่ เชื้อรา และแบคทีเรียหลายชนิด ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกันโดยย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดทำงานร่วมกันซึ่งมีปฏิกิริยาในการย่อยสลายเซลลูเลสอย่างมีความจำเพาะเจาะจง ได้แก่ exoglucanase (E.C.3.2.1.31) endoglucanase (E.C.3.2.1.4) และ β-glucosidase (E.C.3.2.1.21) endoglucanase มีปฏิกิริยาแบบเลือกสุ่ม โดยตัด 1,4–glucosidic lingkage ภายในโมเลกุลของเซลลูโลสตรงบริเวณที่มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphose cellulose) exoglucanase มีปฏิกิริยาตัดปลายสายเซลลูโลสทั้งบริเวณที่เป็น amorphous และบริเวณที่มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ(crystalline) ตัด 1,4–glucosidic lingkage เกิดผลิตภัณฑ์เซลโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่และกลูโคสบางส่วน ส่วน β-glucosidase ช่วยย่อยสลายเซลโลไบโอสให้กลายเป็นกลูโคสต่อไป (Wyman, 1996).

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภทอาทิเช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการหมัก อุตสาหกรรมสิ่งทอ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมสิ่งทอที่ใช้ผ้าผลิตจากฝ้ายเพียงชนิดเดียวหรือฝ้ายผสม เอนไซม์เซลลูเลสมีบทบาทในการนำมาใช้ในกระบวนการ bio-polishing เพื่อลดขนที่เกิดจากเส้นใยผ้า ทำให้ผ้าไม่ยึดจับกันเป็นกลุ่ม ทำให้พิมพ์ติดสีดีขึ้น พร้อมทั้งมีความนุ่ม มีลักษณะของพื้นผิวที่เหมาะสม ทำให้ผ้าเปียกน้ำได้ดีและเร็วขึ้นเหมาะสำหรับการนำไปย้อมต่อ นอกจากนั้นเอนไซม์เซลลูเลสยังมีความสำคัญในกระบวนการ bio-stoning ใช้ในการฟอกสีของผ้า denim jeans ทำให้ไม่ต้องใช้ผงหินขัดมาขัด จึงทำให้ช่วยในการจัดการสิ่งแวดล้อมของระบบโรงงาน การฟอกผ้ายีนโดยผงหินขัดเริ่มเป็นที่นิยมมาตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 1970 เนื่องจากผ้ายีนใหม่แข็งกระด้างจึงขัดเพื่อทำให้ดูเก่าและสวมใส่สบาย แต่ผงหินทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับฝุ่นผงในโรงงาน รวมทั้งผงที่ติดมาทำให้เกิดปัญหาในเครื่องซักผ้า จึงมีผู้เริ่มนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ตั้งแต่ประมาณปี

ค.ศ. 1980 การใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยให้ผ้ายีนมีความนุ่มและฟอกได้เช่นเดียวกับการใช้ผงหินขัด (Tolan and Foody, 1999)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่อยู่ในส่วนของผนังเซลล์ของพืช พบในธรรมชาติทั้งไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง และพืชล้มลุกทั่วไป เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนพบในจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย ในราพบเอนไซม์ไซแลนเนสนี้แบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลัก คือ เอนไซม์เอนโดไซแลนเนส (endoxylanase) (1,4 - β - D –xylan - xylanohydrolase) ย่อยสลาย 1, 4 - β - D –xylosidic lingkage แบบสุ่ม และเอนไซม์บีตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) (1, 4 - β-D-xylan-xylohydrolase) ย่อย 1, 4 - β -D-xylopyranoside lingkage จากปลายให้ได้น้ำตาลไซโลส (Biely, 1985) การย่อยสลายของไซแลนในพืชโดยไซแลนเนสทำให้เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งทำให้สามารถใช้เอนไซม์ไซแลนเนสในการฟอกเยื่อกระดาษในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ Kraft (Jeffries, 1996) ซึ่งเป็นแนวทางว่าน่าจะเป็นประโยชน์ในการช่วยเสริมประสิทธิภาพของการเตรียมผ้าฝ้ายในอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสผสมไซแลนเนสเพื่อใช้ในการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก โดยเริ่มต้นจากการคัดเลือกหาสายพันธุ์ของเชื้อรา การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา และการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการฟอกผ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. <u>การคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์</u>

1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เริ่มดำเนินการวิจัยโดยคัดเลือกเชื้อราที่มีการรายงานและได้ผ่านการทดสอบเบื้องต้นมาแล้วว่าเหมาะสม เชื้อราดังกล่าวได้แก่

Trichoderma reesei สายพันธุ์ QM

Trichoderma reesei สายพันธุ์ C

Aureobasidium pullulans

เชื้อทั้ง 3 ชนิดได้มาจากห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด และเปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยดำเนินการทดลอง 3 ขั้นตอนดังนี้

1.2.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ

1.2.1.1 เลี้ยงเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C บนอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก) ที่บรรจุในหลอดทดสอบซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) จนเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร

1.2.1.2 เลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* บนอาหารแข็ง YMX (Yeast Malt Xylose) (ภาคผนวก) ที่บรรจุในหลอดทดสอบซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที โดยใช้เข็มเขี่ยลากบนอาหารแข็ง จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร

1.2.2 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อตั้งต้น

1.2.2.1 ย้ายเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1.1 ลงเลี้ยงบนอาหาร PDAในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลานาน 3 วัน

1.2.2.2 ย้ายเชื้อ *A. pullulans* ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1.2 ลงเลี้ยงในอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) (ภาคผนวก) บ่มเชื้อ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลานาน 2 วัน

1.2.3 ขั้นตอนการทดสอบการเจริญของเชื้อ

1.2.3.1 เจาะปลายเส้นใยของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM หรือสายพันธุ์ C ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.2.1 ซึ่งเจริญเป็นโคโลนีที่มีรัศมีแผ่ขยายกว้างและมีการเจริญสม่ำเสมอด้วยเครื่องเจาะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.80 มม. จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตักชิ้นวุ้นที่เจาะจำนวน 5 ชิ้นใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล.ที่มีอาหารเหลวเพื่อการเจริญ PDB ปริมาตร 100 มล.และมี pH เท่ากับ 5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 12 วัน ศึกษาการเจริญของเชื้อโดยชั่งน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ภาคผนวก) ทุกๆ วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นเขียนกราฟระหว่างเวลากับน้ำหนักเส้นใยแห้ง

1.2.3.2 เมื่อ *A. pullulans* ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.2.2 เจริญเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้น นำมานับจำนวนเซลล์ด้วย heamacytometer จากนั้นเจือจางเซลล์ด้วยอาหาร PDB ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^7 เซลล์ต่อมล. หลังจากนั้นจึงปิเปตใส่เชื้อ 5 มล.ลงในอาหารสูตรเพื่อการเจริญ (ภาคผนวก) ที่มีปริมาตร 95 มล. และมี pH เท่ากับ 5 บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล.ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน ศึกษาการเจริญของเชื้อโดยนับจำนวนโคโลนี (ภาคผนวก) บนอาหารแข็ง PDA ทุกๆ วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงเขียนกราฟระหว่างเวลากับจำนวนโคโลนี

2. <u>การผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์</u>

ทำการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารเหลวดังนี้

2.1 ทำการเตรียมเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM หรือสายพันธุ์ C ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แต่เปลี่ยนจากอาหาร PDB เป็นอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์สูตร Production ของ Punnapayak, Kuhirun และ Thanonkeo (1999) (ภาคผนวก) ซึ่งมี 3% (w/v) อัลฟา-เซลลูโลส มี pH เท่ากับ 5 ปริมาตร 100 มล. ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยนำ crude enzyme ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธี FPA ของ Ghose (1987) และแอคติวิตีของไซแลนเนสด้วยวิธีการของ Ghose และ Bisaria (1987) ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 12 วัน นำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไปเขียนกราฟกับระยะเวลาการบ่มเชื้อและการผลิตเอนไซม์

วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

2.1.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธี FPA ของ Ghose (1987)

นำ crude enzyme 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ แล้วเติม 0.05 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 1 มล. และใส่กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 1.0 x 6.0 ซม.^{2} เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม dinitrosalicylic (DNS) reagent 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มให้เดือด เป็นระยะเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เติมน้ำกลั่น 20 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก) แล้วจึงนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก) ค่าเซลลูเลสที่ได้เป็นค่าแอคติวิตีรวมหรือ exoglucanase

2.1.2 การวัดแอคติวิตีของไซแลนเนสตามวิธีการของ Ghose และ Bisaria (1987)

นำ crude enzyme 0.25 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ แล้วเติม 1% ไซแลน 0.25 มล. และ 50 mM ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 0.25 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เติม alkaline copper reagent 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นระยะเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เติม arsenomolybdate reagent 1 มล. เขย่าแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 520 นาโนเมตร โดยใช้ 50 mM ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลไซโลสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก) แล้วจึงนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสจากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก)

2.2 ทำการเตรียมเชื้อ *A. pullulans* ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2 โดยเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญ บ่มเชื้อไว้ในระยะเวลาที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากการเจริญของเชื้อในข้อ 1.2 เสียก่อน จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมล. จึงย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรเพื่อการผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน

ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *A. pullulans* โดยนำ crude enzyme ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที มาวัดแอคติวิตีของเอนไซเซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 และวัดแอคติวิตีของไซแลนเนสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับ

ข้อ 2.1.2 ทุกๆ วัน เป็นระยะเวลา 5 วัน นำค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไปเขียนกราฟกับระยะเวลาการบ่มเชื้อและการผลิตเอนไซม์

3. <u>การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์</u>

เอนไซม์ที่เชื้อผลิตได้นั้นเป็น crude enzyme ที่ยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอจึงต้องหาวิธีที่จะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อให้เอนไซม์มีความเข้มข้นเหมาะสมกับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เริ่มต้นโดยดำเนินการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.1 แต่เพิ่มขยายขนาดการผลิตโดยมีเชื้อตั้งต้นจากชิ้นเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.80 มม. จำนวน 20 ชิ้นต่ออาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ 400 มล.ต่อขวดรูปกรวยขนาด 1000 มล. บ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วดำเนินการทดลองต่อไปอีก 3 ขั้นตอนคือ

3.1 ขั้นตอนก่อนการตกตะกอน

นำสารละลายแขวนลอยของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 9000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนตะกอนทิ้งไป ได้ส่วนใสเป็น crude enzyme เก็บรวบรวมมาดำเนินการทดสอบดังนี้

แบ่ง crude enzyme ส่วนที่ 1 ไปคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 ชนิดด้วยกันคือ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ดังนี้

3.1.1 วัดปริมาณเอนไซม์ exoglucanase ตามวิธีของ Ghose (1987) จาก crude enzyme โดยวิเคราะห์ผลจากปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS assay ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์จากสูตรมาตรฐาน

3.1.2 วัดปริมาณเอนไซม์ endoglucanase ตามวิธีของ Ghose (1987) จาก crude enzyme โดยวิเคราะห์ผลจากปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS assay ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์จากสูตรมาตรฐาน

3.1.3 วัดปริมาณเอนไซม์ β-glucosidase ตามวิธีของ Sternberg และคณะ (1976) จาก crude enzyme โดยวิเคราะห์ผลจากปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS assay ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์จากสูตรมาตรฐาน

แบ่งส่วนที่ 2 ไปหาปริมาณโปรตีนเริ่มต้นตามวิธี Biuret test (Sikyta, 1983) (ภาคผนวก) เพื่อต้องการนำไปหา specific activity ของ crude enzyme

เหลือส่วนที่ 3 เป็น crude enzyme นำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยนำไปตกตะกอนด้วยวิธีการในข้อ 3.2 ต่อไป

3.2 ขั้นตอนการตกตะกอน

นำ crude enzyme ที่ผลิตได้จากการทดลองข้อ 3.1 ไปตกตะกอน โดยทำการเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนโดยใช้อะซีโตนกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก) ดังนี้

3.2.1 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตน (C_3H_6O)

นำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วยอะซีโตนในอัตราส่วน 1:3 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยค่อยๆ เติมอะซิโตนลงไปพร้อมทั้งคนสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 M pH 4.8 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 - 3.1.3 และนำอีกส่วนหนึ่งไปทำการไดอะไลซีสต่อไปในการทดลองข้อ 3.3

3.2.2 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$

นำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ค่าความอิ่มตัวระดับต่างๆ คือ 40 55 และ 80 % ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนสารละลายตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลาจนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้นำมาละลายด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 M มี pH 4.8 นำสารละลายเอนไซม์ส่วนหนึ่งไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 - 3.1.3 และนำอีกส่วนหนึ่งซึ่งเป็นส่วนใหญ่ไปทำการไดอะไลซีสต่อไปในข้อ 3.3

3.3 ขั้นตอนการไดอะไลซีส

เป็นขั้นตอนการกำจัดเกลือออกจากตะกอน โดยใส่สารละลายเอนไซม์ที่ได้ลงในถุงไดอะไลซีสที่มี Molecular Cut Off เท่ากับ 12-14,000 (Thomas Scientific, USA) แล้วนำแช่ในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M pH 4.8 โดยมีแท่งแม่เหล็กคนอยู่ตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ทุกๆ 6 ชั่วโมง ทำการไดอะไลซีสทั้งสิ้นเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

หลังจากทำการไดอะไลซีสเอนไซม์จนได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นแล้ว จึงนำสารละลายเอนไซม์ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 - 3.1.3 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ในรูปของ specific activity

4. <u>การขยายขนาดการผลิตเอนไซม์</u>

เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จากการทดลองในข้อ 1-2 และได้วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3 แล้ว จึงดำเนินการผลิตเอนไซม์จากเชื้อที่คัดเลือกไว้ดังนี้

4.1 การผลิตเอนไซม์ในขวดรูปกรวย (flask) ขนาด 1 ลิตร

ควบคุมสภาวะการผลิตเอนไซม์ในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ตลอดระยะเวลาการบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

การทดลองแบ่งเป็น 2 กรณีคือ

กรณีที่ 1 ถ้าคัดเลือกเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และ/หรือสายพันธุ์ C เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เพิ่มการผลิตโดยเพิ่มปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 20 ชิ้นต่ออาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 400 มล ในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 12 วัน นำ crude enzyme ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยวิธีการจากผลการศึกษาข้อ 3 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1-3.1.3 และวัดแอคติวิตีของไซแลนเนสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 จากเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นทุกขั้นตอน และหาปริมาณโปรตีนเริ่มต้นตามวิธี Biuret test (Sikyta, 1983) จาก crude enzyme เพื่อนำไปหา specific activity ของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์

กรณีที่ 2 ถ้าคัดเลือกเชื้อ *A. pullulans* เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2 แต่ขยายขนาดการผลิตในอาหารเหลวปริมาตร 380 มล. ในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วจึงนำ crude enzyme ไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีการจากผลการศึกษาข้อ 3 ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1-3.1.3 และวัดแอคติวิตีของไซแลนเนสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 จากเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้เพิ่มขึ้นทุกขั้นตอน และหาปริมาณโปรตีนเริ่มตามวิธี Biuret test (Sikyta, 1983) จาก crude enzyme เพื่อนำไปหา specific activity ของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์

4.2 การผลิตเอนไซม์ในถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร

ทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมสภาวะตลอดระยะเวลาของการผลิตเอนไซม์ซึ่งได้แก่ การบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 SLPM ต่ออาหาร 1 ลิตร ควบคุมการเกิดฟองโดยใช้ Antifoam A และควบคุม pH ให้เท่ากับ 5 ตลอดระยะเวลาการผลิตโดยการปรับด้วย 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH

การทดลองแบ่งเป็น 2 กรณีคือ

กรณีที่ 1 ถ้าคัดเลือกเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และ/หรือสายพันธุ์ C เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เพิ่มการขยายการเตรียมเชื้อตั้งต้นเป็น 10 ชิ้นต่อในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 200 มล.ต่อขวดรูปกรวยขนาด 500 มล. เป็นระยะเวลาเป็นระยะเวลาตามความเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาการเจริญของเชื้อในข้อ 1 เสียก่อน แล้วเทใส่ลงถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 2.8 ลิตร ทำให้มีปริมาตรรวม 3 ลิตร บ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำ crude enzyme ไปทำการตกตะกอนตามสภาวะที่เหมาะสมและผ่านการทำไดอะไลซีส จากนั้นทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1-3.1.3 และวัดแอคติวิตีของไซแลนเนสตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 จากเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้มากขึ้นทุกขั้นตอน และหาปริมาณโปรตีนเริ่มต้นตามวิธี Biuret test (Sikyta, 1983) จาก crude enzyme เพื่อหา specific activity ของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์

กรณีที่ 2 ถ้าคัดเลือกเชื้อ *A. pullulans* เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2 โดยเพิ่มขยายการเตรียมเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลวปริมาตร 400 มล. บ่มเชื้อเป็นระยะเวลาตามความเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาการเจริญของเชื้อในข้อ 1 เสียก่อน แล้วเทใส่ลงถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 2.6 ลิตร ทำให้มีปริมาตรรวม 3 ลิตร บ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำ crude enzyme ไปทำการตกตะกอนตามสภาวะที่เหมาะสมและผ่านการทำไดอะไลซีส จากนั้นวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 - 3.1.3 และวัดแอคติวิตีของไซแลนเนสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 จากเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้เพิ่มขึ้นทุกขั้นตอน และหาปริมาณโปรตีนเริ่มต้นตามวิธี Biuret test (Sikyta, 1983) จาก crude enzyme เพื่อหา specific activity ของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์

4.3 การผลิตเอนไซม์โดยหาแหล่งอาหารอื่นทดแทน

การผลิตเอนไซม์ของเชื้อมีความจำเป็นต้องใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จึงต้องศึกษาหาความเป็นไปได้ที่จะหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากแหล่งอื่นๆ มาใช้ทดแทนหรือผสมเพื่อเป็นแนวทางลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ โดยทำการทดลองกับเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ดังนี้

4.3.1 การทดสอบหาแหล่งคาร์บอนผสมเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ทำการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เป็นไปได้จากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีเซลลูโลสเหลืออยู่มากพอควร เช่น ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี เป็นต้น

ทำผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยผสมเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร 4 ชนิดคือ ชานอ้อย หรือเปลือกถั่วลิสง หรือรำข้าวเจ้า หรือรำข้าวสาลี 2 % (w/v) ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์

4.3.2 การทดสอบหาแหล่ง ไนโตรเจนทดแทนในการผลิตเอนไซม์

ทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น ammonium sulphate ammonium nitrate, urea, peptone เป็นต้น

ทำผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยผสมสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ 0.1 % (w/v) คือ ammonium sulphate หรือ ammonium nitrate หรือ urea หรือ peptone เปรียบเทียบกับการใช้ cornsteep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์

5. <u>การเปรียบเทียบเอนไซม์ที่ผลิตได้ในห้องทดลองกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า</u>

ทำการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ใน 3 สภาวะคือ เอนไซม์ที่ได้จากการผลิตในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร กับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการค้า โดยนำผลการผลิตเอนไซม์ที่ผลิตได้จากข้อ 4.1-4.2 เป็นเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายซึ่งผลิตในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร และในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามลำดับ มาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า (TCI Tokyo Kasei , Japan) ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Aspergillus niger* โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสรวมด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสตามวิธีเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.1.2 และหาปริมาณโปรตีนตามวิธี Biuret test (Sikyta, 1983) เพื่อนำไปคำนวณหา specific activity ของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์

6. <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

สภาวะที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ช่วยทำให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิจัยนี้ ทำการเปรียบเทียบสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

6.1 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำการปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ 5 ระดับคือ ปรับสภาวะที่ระดับ pH 3 ด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 3 ปรับสภาวะที่ระดับ pH 4 และ pH 5 ด้วยอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 4 และ pH 5 ตามลำดับ ปรับสภาวะที่ระดับ pH 6 และ pH 7 ด้วยฟอตเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 6 และ pH 7 ตามลำดับ

จากนั้นนำไปทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1-3.1.3 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบผลของสภาวะ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำการทดลองเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 5 ระดับคือ ที่ระดับอุณหภูมิ 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส ปรับระดับ pH ให้เหมาะสม (ซึ่งได้ผลจากการทดลองในข้อ 6.1) ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองข้อ 6.1 โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1-3.1.3 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT และนำค่าเฉลี่ยไปเขียนกราฟเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

การทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิดคือ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C และเชื้อ *A. pullulans* โดยเตรียมหัวเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าเส้นใยเจริญแผ่ขยายเป็นรัศมีโดยรอบมีลักษณะโคโลนี (ภาพที่ 1 ก-ข) จากนั้นจึงเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เพื่อศึกษาการเจริญจากน้ำหนักเฉลี่ยของเส้นใยแห้งทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 12 วัน

ส่วนการศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. pullulans* นั้น ได้เตรียมหัวเชื้อบนอาหาร YMX เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าเชื้อเจริญแบบการแตกหน่อเช่นเดียวกับยีสต์มีลักษณะโคโลนีของเชื้อ (ภาพที่ 1 ค) จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อมล. ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเตรียมเป็นเชื้อตั้งต้นในการศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* จากการนับจำนวนเซลล์เฉลี่ยทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 84 ชั่วโมง

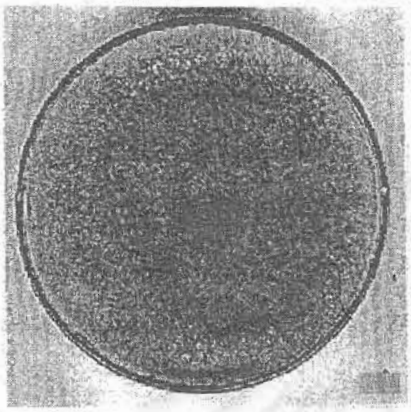
เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่า

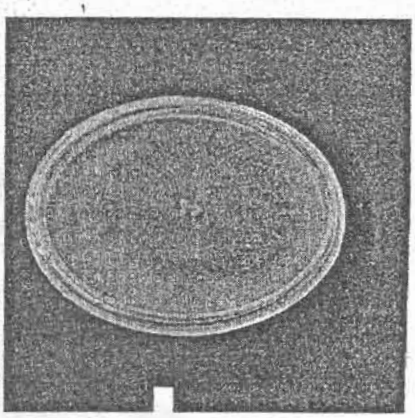
T. reesei สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C เจริญภายใน 3 วันแรกอยู่ในระยะ log phase แล้วจึงเริ่มเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase จนถึงวันที่ 5 จึงมีการเจริญลดลง (ภาพที่ 2)

A. pullulans ไม่เจริญเพิ่มขึ้นใน 12 ชั่วโมงแรกซึ่งเป็นระยะ lag phase แล้วเจริญเข้าสู่ระยะ log phase หลังจากนั้นถึงชั่วโมงที่ 36 และเริ่มเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase จนถึงชั่วโมงที่ 60 จึงมีการเจริญลดลง (ภาพที่ 3)

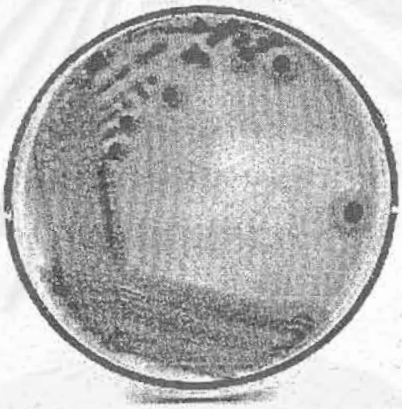
จากการศึกษาพบว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้เจริญในระยะ log phase ภายใน 3 วัน ดังนั้นในการเตรียมเชื้อตั้งต้นในอาหารเพื่อการเจริญของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C จึงต้องบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน ส่วนเชื้อ *A. pullulans* ควรบ่มเชื้อเป็นระยะเวลาไม่เกิน 30 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์

ก.





ข.



ค

ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง

ก. เชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM บนอาหาร PDA

ข. เชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C บนอาหาร PDA

ค. เชื้อ *A. pullulans* บนอาหาร YMX

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>การผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์</u>

เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จาก crude enzyme โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C แล้วผลิตเอนไซม์ในอาหารสูตร Production ส่วนเชื้อตั้งต้นของ *A. pullulans* ให้เตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยมีความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อมล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ แล้วนำ crude enzyme มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธี FPA ของ Ghose (1987) และแอคติวิตีของไซแลนเนสตามวิธีการของ Ghose และ Bisaria (1987) ทุกๆ วัน ได้ผลดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2-3 พบว่า

เชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตีสูงที่สุดในวันที่ 12 เท่ากับ 0.296 U/ml และผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดในวันที่ 6 เท่ากับ 0.084 U/ml

เชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตีสูงที่สุดในวันที่ 9 เท่ากับ 0.621 U/ml และผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดในวันที่ 12 เท่ากับ 5.362 U/ml

ส่วนเชื้อ *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตีสูงที่สุดในวันที่ 1 เท่ากับ 0.091 U/ml และผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดในวันที่ 3 เท่ากับ 7.344 U/ml

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ดังนี้

เชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากกว่าไซแลนเนส โดยผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด 0.296 U/ml

เชื้อ *A. pullulans* ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้มากกว่าเซลลูเลสมาก โดยผลิตไซแลนเนสได้สูงสุดถึง 7.344 U/ml

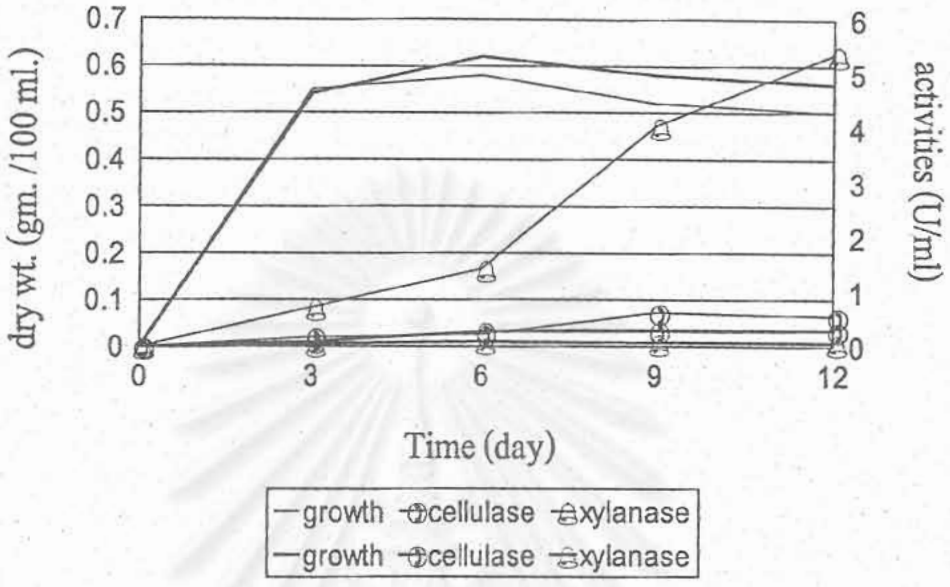
ส่วนเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดมากถึง 0.621 U/ml และผลิตไซแลนเนสได้ดีที่สุด 5.362 U/ml ดังนั้นเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ผลิตทั้งเซลลูเลสและไซแลนเนสได้ดีจึงเป็นเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ในการวิจัยครั้งนี้ซึ่งจะใช้ศึกษาต่อไปในหัวข้อที่ 4-6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

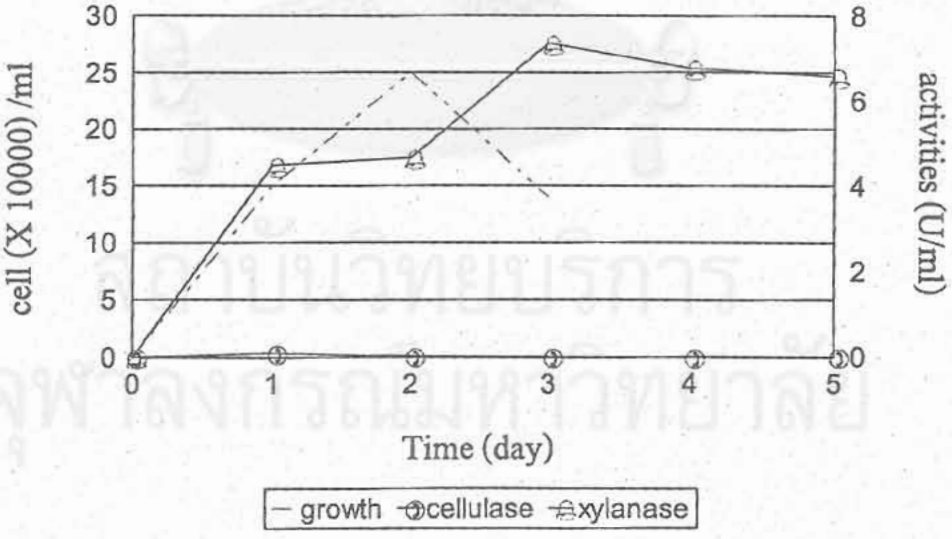
ตารางที่ 1 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และแอคติวิตีของเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญของเชื้อ*	แอคติวิตีของเอนไซม์ (U/ml)	
			เซลลูเลส	ไซแลนเนส
T. reesei สายพันธุ์ QM	3	0.54	0.093	0.045
	6	0.62	0.270	0.084
	9	0.58	0.289	0.072
	12	0.56	0.296	0.069
T. reesei สายพันธุ์ C	3	0.55	0.173	0.711
	6	0.58	0.214	1.419
	9	0.52	0.621	4.037
	12	0.50	0.557	5.362
A. pullulans	1	0	0.091	4.470
	2	15	0.031	4.653
	3	25	0.003	7.344
	4	14	0.002	6.765
	5	-	0.003	6.578

หมายเหตุ : * การเจริญของเชื้อ *T. reesei* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีหน่วย กรัมต่อ 100 มล.
การเจริญของเชื้อ *A. pullulans* มีหน่วยเป็น เซลล์ต่อมล. (x 10^4)



ภาพที่ 2 การเจริญและแอคติวีตีของเอนไซม์ของเชื้อ *T. reesei* 2 สายพันธุ์ ที่บ่มบนเครื่องเขย่ามีความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 3 การเจริญและแอคติวีตีของเอนไซม์ของเชื้อ *A. pullulans* ที่บ่มบนเครื่องเขย่ามีความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง

3. <u>การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์</u>

การศึกษาผลของการตกตะกอนและการทำไดอะไลซีสกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM โดยทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งประกอบด้วยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 4 ก- ข ดังนี้

3.1 เอนไซม์เซลลูเลสก่อนการตกตะกอน (crude enzyme)

crude enzyme ประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 1.658 x10^{-4} U/mg protein 3.567 x10^{-4} U/mg protein และ 0.170 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

3.2 เอนไซม์เซลลูเลสหลังการตกตะกอน

เมื่อนำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วยวิธีการแตกต่างกัน 4 วิธีคือ ตกตะกอนด้วยอะซิโตน อัตรา 1:3 กับวิธีการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 3 ระดับคือ ให้สารละลายของเอนไซม์มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 40 % 55 % และ 80 % ตามลำดับ ได้ผลดังนี้

เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยอะซีโตนประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 0.248 x10^{-4} U/mg protein 0.704 x10^{-4} U/mg protein และ 0.256 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วย 40% $(NH_4)_2SO_4$ ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 0.491 x10^{-4} U/mg protein 4.317 x10^{-4} U/mg protein และ 0.029 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ตกตะกอนเด้วย 55% $(NH_4)_2SO_4$ ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 5.059 x10^{-4} U/mg protein 16.609 x10^{-4} U/mg protein และ 1.059 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 1.967 x10^{-4} U/mg protein 8.587 x10^{-4} U/mg protein และ 2.320 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ จะทำให้ได้เอนไซม์ endoglucanase ที่มี specific activity สูงมากที่สุดเท่ากับ 8.578 x10^{-4} U/mg protein ขณะเดียวกัน crude enzyme จะประกอบด้วยเอนไซม์ endoglucanase ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 3.567 x10^{-4} U/mg protein จึงสรุปได้ว่าการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด

3.3 เอนไซม์เซลลูเลสหลังการไดอะไลซีส

เมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยวิธีต่างๆ จากข้อ 3.2 และจาก crude enzyme มาทำการไดอะไลซีสเพื่อขจัดเกลือแอมโมเนียมออกให้หมดเพื่อทำให้ได้เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น ได้ผลการทดลองดังนี้

เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตนอัตรา 1 : 3 แล้วตามด้วยการทำไดอะไลซีสทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 1.000 x10^{-4} U/mg protein 2.814 x10^{-4} U/mg protein และ 1.025 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 40% $(NH_4)_2SO_4$ แล้วตามด้วยการทำไดอะไลซีสทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 1.967 x10^{-4} U/mg protein 17.267 x10^{-4} U/mg protein และ 0.117 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 55% $(NH_4)_2SO_4$ แล้วตามด้วยการทำไดอะไลซีสทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 18.550 x10^{-4} U/mg protein 24.233 x10^{-4} U/mg protein และ 3.883 x10^{-4}U/mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ แล้วตามด้วยการทำไดอะไลซีสทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 7.375 U/mg protein 32.200 x10^{-4} U/mg protein และ 8.700 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

ส่วน crude enzyme ที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการตกตะกอน แต่ทำการไดอะไลซีสทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบด้วยเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มี specific activity เท่ากับ 3.218 x10^{-4} U/mg protein 6.924 x10^{-4} U/mg protein และ 0.329 x10^{-4} U/mg protein ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าการทำไดอะไลซีส crude enzyme เพียงขั้นตอนเดียวโดยไม่ได้ผ่านการตกตะกอนก็สามารถทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นได้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง endoglucanase มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นจากเอนไซม์ที่มี specific activity เท่ากับ 3.567 x10^{-4} U/mg protein เพิ่มเป็น 6.924 x10^{-4} U/mg protein

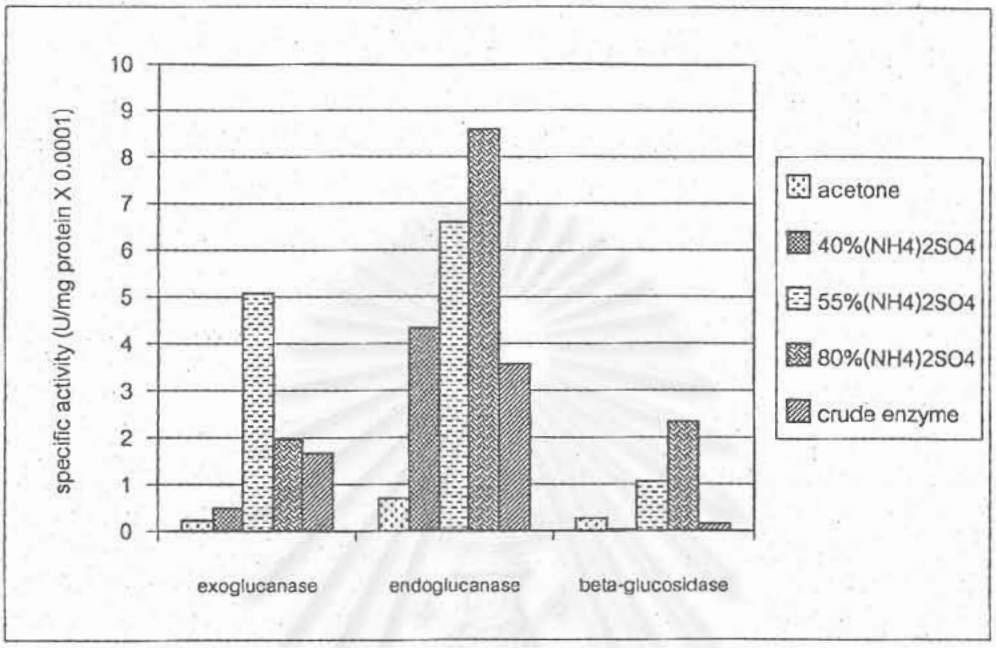
อย่างไรก็ตามจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าการตกตะกอนตามด้วยขั้นตอนไดอะไลซีสจะช่วยให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นได้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ สามารถทำให้ได้เอนไซม์ endoglucanase มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นได้มากที่สุด มีค่า specific activity สูงที่สุดถึง 32.200

$x10^{-4}$ U/mg protein มี exoglucanase และ β-glucosidase เท่ากับ 7.375 $x10^{-4}$ U/mg protein และ 8.700 $x10^{-4}$ U/mg protein ตามลำดับ

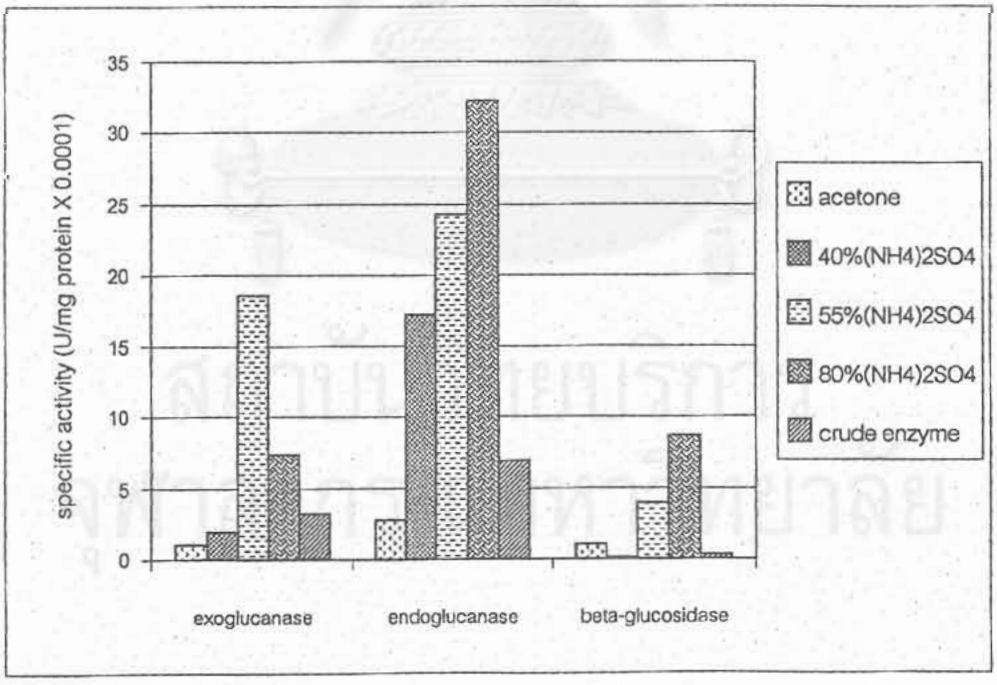
เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสำหรับฟอกผ้าจำเป็นที่มีองค์ประกอบของ endoglucanase สูง แต่ exoglucanase ไม่จำเป็นต้องสูงมาก ดังนั้นจากผลการทดลองจึงควรเลือกวิธีที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นด้วยการนำเอา crude enzyme ที่ได้จากการผลิตของเชื้อไปตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 80% แล้วตามด้วยการทำไดอะไลซีส

ตารางที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อทำการตกตะกอนตามด้วยขั้นตอนไดอะไลซีส

วิธีการตกตะกอน	specific activity ของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ mg protein) $x10^{-4}$		
	exoglucanase	endoglucanase	β-glucosidase
หลังตกตะกอน			
อะซีโตน	0.248	0.704	0.256
40% $(NH_4)_2SO_4$	0.491	4.317	0.029
55% $(NH_4)_2SO_4$	5.059	6.609	1.059
80% $(NH_4)_2SO_4$	1.967	8.587	2.320
crude enzyme	1.658	3.567	0.170
หลังทำไดอะไลซีส			
อะซีโตน	1.000	2.814	1.025
40% $(NH_4)_2SO_4$	1.967	17.267	0.117
55% $(NH_4)_2SO_4$	18.550	24.233	3.883
80% $(NH_4)_2SO_4$	7.375	32.200	8.700
crude enzyme	3.218	6.924	0.329



ก.



ข.

ภาพที่ 4 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ QM หลังขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์
ก. หลังขั้นตอนการตกตะกอน
ข. หลังขั้นตอนการตกตะกอนแล้วตามด้วยขั้นตอนไดอะไลซีส

4. <u>การขยายขนาดการผลิตเอนไซม์</u>

4.1 การผลิตเอนไซม์ในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C เป็นเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในการวิจัยครั้งนี้ (ได้ผลจากการศึกษาคัดเลือกในข้อ 1-2) จึงนำมาผลิตเอนไซม์ในอาหารสูตร Production ของ Punnapayak, Kuhirun และ Thanonkeo (1999) ขยายขนาดเป็นปริมาตร 400 มล.ต่อขวดรูปรวยขนาด 1 ลิตร จากนั้นนำ crude enzyme ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ แล้วตามด้วยการทำไดอะไลซีส (จากผลการศึกษาวิธีการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 3) เปรียบเทียบเอนไซม์ที่ได้โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและหาปริมาณโปรตีน แล้วคำนวณหา specific activity ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 5-6 ดังนี้

crude enzyme ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มี exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase มีค่า specific activity เท่ากับ 0.1931 U/mg protein 2.4336 U/mg protein และ 0.0005 U/mg protein ตามลำดับ และประกอบด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีค่า specific activity เท่ากับ 0.5951 U/mg protein

หลังตกตะกอนทำให้ได้ได้เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 4.3583 U/mg protein 8.5152 U/mg protein และ 0.0019 U/mg protein ตามลำดับ และประกอบด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีค่า specific activity เท่ากับ 42.5968 U/mg protein

หลังทำไดอะไลซีสได้เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 8.4602 U/mg protein 45.2811 U/mg protein และ 0.0032 U/mg protein ตามลำดับ และประกอบด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีค่า specific activity เท่ากับ 151.9729 U/mg protein

4.2 การผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารสูตร Production ของ Punnapayak, Kuhirun และ Thanonkeo (1999) ขยายขนาดเป็นปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นระยะเวลา 9 วัน ควบคุมสภาวะการผลิต ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของการกวน 150 รอบต่อนาที มีอัตรการไหลของอากาศ 1 SLPM ต่อลิตร ควบคุมการเกิดฟองด้วย Antifoam A และควบคุมให้มี pH 5 เมื่อนำ crude enzyme ที่ได้ไปทำให้มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นโดยการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ ตามด้วยทำไดอะไลซีส (จากผลการศึกษาการทดลองข้อ 3) ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 5-6 พบว่า

crude enzyme ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มี exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase มีค่า specific activity เท่ากับ 0.2804 U/mg protein 1.1772 U/mg protein และ 0.0003 U/mg protein ตามลำดับ และประกอบด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีค่า specific activity เท่ากับ 21.9849 U/mg protein

หลังตกตะกอนทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 3.1502 U/mg protein 10.0133 U/mg protein และ 0.0093 U/mg protein ตามลำดับ และประกอบด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีค่า specific activity เท่ากับ 870.7570 U/mg protein

หลังทำไดอะไลซีสทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 6.0152 U/mg protein 37.4920 U/mg protein และ 0.0360 U/mg protein ตามลำดับ และประกอบด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีค่า specific activity เท่ากับ 1,770.9801 U/mg protein

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี DMRT การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ได้ผลดีกว่าการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร กล่าวคือ crude enzyme จากการผลิตในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร มี endoglucanase แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีค่า specific activity เท่ากับ 2.4336 U/mg protein และ 1.1773 U/mg protein ตามลำดับ ในขณะเดียวกันในทั้ง 2 สภาวะการผลิตนี้ให้ exoglucanase และ β-glucosidase ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ตามลำดับ

และเมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตจากทั้ง 2 สภาวะมาทำให้มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นโดยการตกตะกอนแล้วตามด้วยทำไดอะไลซีสสรุปได้ว่า การทำให้เอนไซม์ที่ผลิตในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นทำให้ได้ exoglucanase และ endoglucanase แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการทำให้เอนไซม์จากการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ในสภาวะการผลิตจากขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร และจากการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร มี endoglucanase ที่มีค่า specific activity สูงที่สุด เท่ากับ 45.2791 U/mg protein และ 37.4938 U/mg protein ตามลำดับ และในขณะเดียวกันมีเอนไซม์ exoglucanase ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 8.4602 U/mg protein และ 6.0152 U/mg protein ตามลำดับ

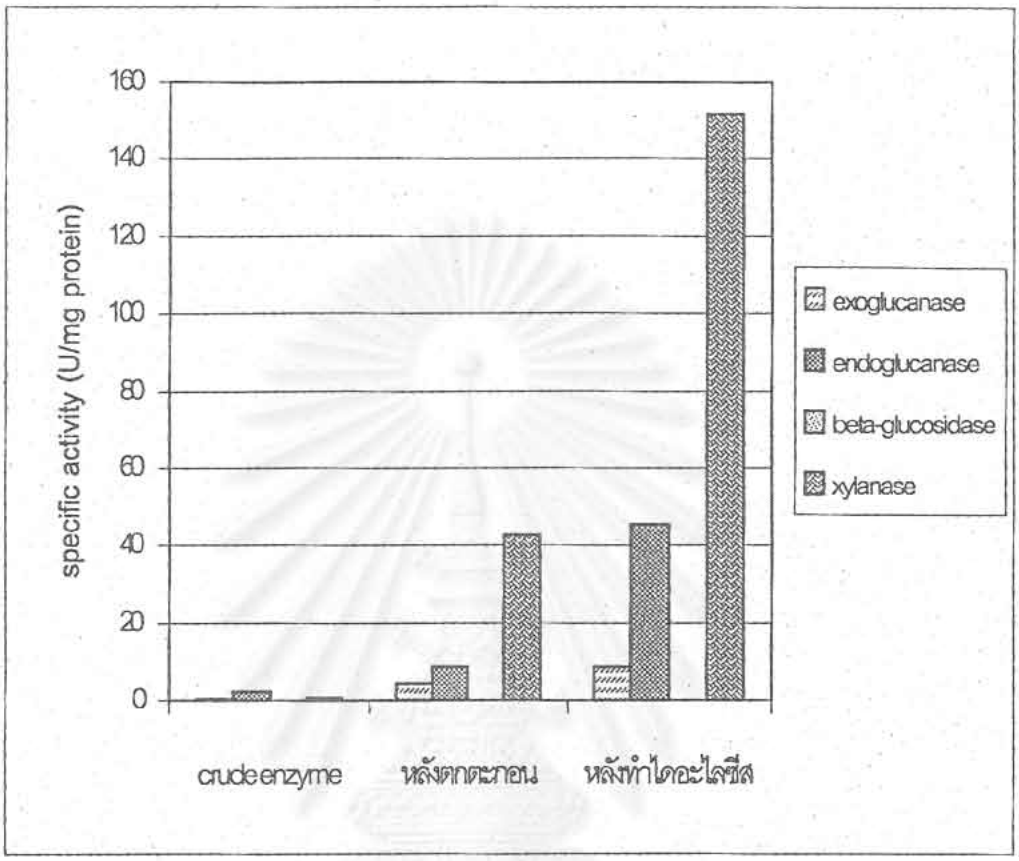
เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทั้ง 2 สภาวะสรุปได้ว่า crude enzyme ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการตกตะกอนแล้วตามด้วยการทำไดอะไลซีส เอนไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการผลิตในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร กล่าวคือการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และในขวด

. รูปกรวยขนาด 1 ลิตรให้ค่า specific activity เท่ากับ 1,770.9800 U/mg protein และ 151.8620 U/mg protein ตามลำดับ

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการผลิต 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน

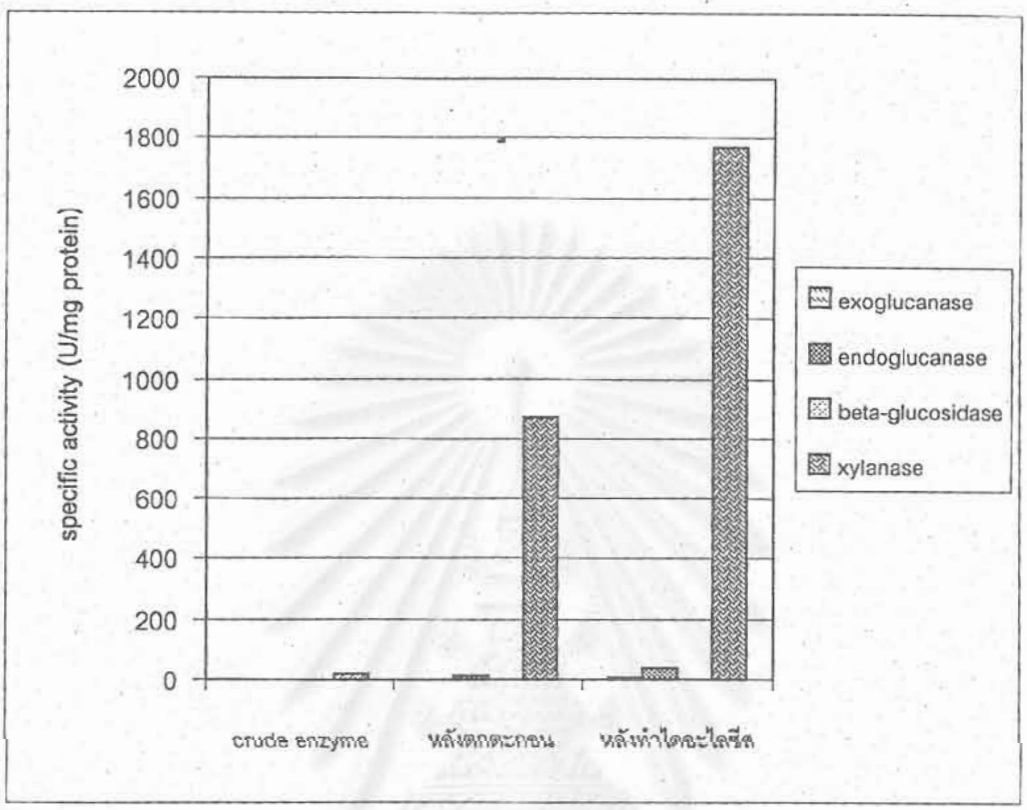
สภาวะการทดลอง	ชนิดของเอนไซม์	specific activity ของเอนไซม์เซลลูเลส (U/mg protein)		
		exoglucanase	endoglucanase	β-glucosidase
ขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร	crude enzyme	0.1931 j	2.4336 h	0.0005 j
	หลังตกตะกอน	4.3585 f	8.5147 d	0.0018 j
	หลังทำไดอะไลซีส	8.4602 d	45.2791 a	0.0032 j
ถังหมักขนาด 5 ลิตร	crude enzyme	0.2804 j	1.1773 i	0.0003 j
	หลังตกตะกอน	3.1503 g	10.0129 c	0.0398 j
	หลังทำไดอะไลซีส	6.0152 e	37.4938 b	0.0360 j
		specific activity ของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/mg protein)		
ขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร	crude enzyme	0.5950 D		
	หลังตกตะกอน	42.5968 D		
	หลังทำไดอะไลซีส	151.8620 C		
ถังหมักขนาด 5 ลิตร	crude enzyme	21.9849 D		
	หลังตกตะกอน	870.7569 B		
	หลังทำไดอะไลซีส	1,770.9800 A		

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่อยู่ตามหลังตัวเลขจะบ่งบอกถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการผลิตในระดับขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน

4.3 การผลิตเอนไซม์โดยหาแหล่งอาหารอื่นทดแทน

จากการศึกษาหาความเป็นไปได้ที่จะใช้แหล่งอาหารอย่างอื่นที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทดแทน จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารปริมาตร 100 มล. ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 12 วัน แล้วจึงนำ crude enzyme มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสรวมตามวิธี FPA ของ Ghose (1987) และวัดแอคติวิตีของไซแลนเนสตามวิธีการของ Ghose และ Bisaria (1987) ผลการทดลองพบว่า

4.3.1 การทดสอบหาแหล่งคาร์บอนจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

จากการทดลองเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่มาจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 4 ชนิดคือ ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี 2% ใส่ลงในสูตรอาหาร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 7 โดยพบว่า

เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในอาหารสูตรที่ผสมรำข้าวเจ้า โดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.656 U/ml ในวันที่ 12 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากสูตรที่ผสมชานอ้อยในวันที่ 12 ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.367 U/ml

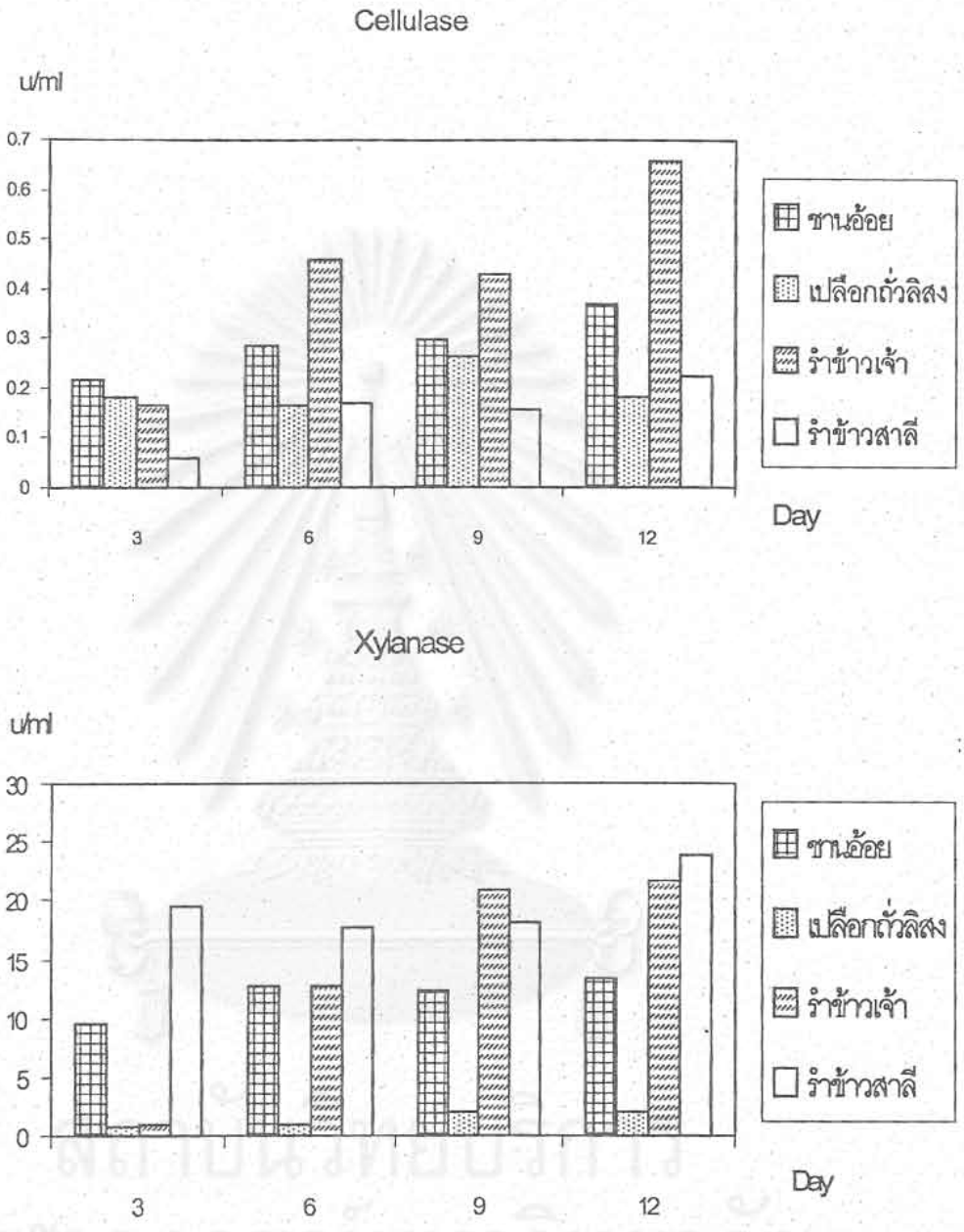
ในขณะเดียวกันเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดีที่สุดในอาหารสูตรผสมรำข้าวสาลี ในวันที่ 12 มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 23.931 U/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากสูตรที่ผสมรำข้าวเจ้า ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 21.708 U/ml

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าถ้าต้องการเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสและไซแลนเนสที่มีแอคติวิตีสูง สามารถพิจารณาที่จะเลือกการผลิตเอนไซม์จากสูตรอาหารที่ผสมรำข้าวเจ้า โดยใช้ระยะเวลาบ่มนาน 12 วันจะได้เอนไซม์ที่ประกอบด้วยแอคติวิตีของเซลลูเลส 0.656 U/ml กับแอคติวิตีของไซแลนเนสเท่ากับ 21.708 U/ml

ตารางที่ 4 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งคาร์บอนเป็นเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส(U/ml)			
	วันที 3	วันที 6	วันที 9	วันที 12
ชานอ้อย	0.217 g	0.283 g	0.299 e	0.367 d
เปลือกถั่วลิสง	0.181 h	0.165 h	0.263 f	0.182 h
รำข้าวเจ้า	0.165 h	0.460 b	0.428 c	0.656 a
รำข้าวสาลี	0.061 i	0.169 h	0.156 h	0.226 g
	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส(U/ml)			
ชานอ้อย	9.585 F	12.658 E	12.331 E	13.409 E
เปลือกถั่วลิสง	0.821 G	0.983 G	1.934 G	2.001 G
รำข้าวเจ้า	1.007 G	12.742 E	20.770 BC	21.708 B
รำข้าวสาลี	19.371 CD	17.698 D	18.170 D	23.931 A

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่อยู่ตามหลังตัวเลขจะบ่งบอกถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ที่ผสมเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ

4.3.2 การทดสอบหาแหล่งไนโตรเจนอื่น

จากการศึกษาเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น ammonium sulphate ammonium nitrate urea peptone 0.1 % กับ cornsteep liquor ในอาหารสูตร Punnapayak, Kuhirun และ Thanonkeo (1999) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 8 ซึ่งพบว่า

เชื้อสามารถใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดในวันที่ 12 โดยเชื้อให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงถึง 0.345 U/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากทุกแหล่งไนโตรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งแตกต่างจาก cornsteep liquor แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจาก ammonium sulphate กล่าวคือเชื้อสามารถใช้ cornsteep liquor และ ammonium sulphate ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.261 U/ml และ 0.234 U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 12

ส่วนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสนั้นเชื้อสามารถใช้ cornsteep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดโดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 27.946 U/ml ในวันที่ 12 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากทุกแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแตกต่างทางสถิติจาก ammonium nitrate ในวันที่ 9 ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 20.929 U/ml

สรุปได้ว่าถ้าต้องการเอนไซม์ผสมทั้งเซลลูเลสและไซแลนเนสที่มีแอคติวิตีสูงควรเลือก peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 9 วัน จะได้เอนไซม์ที่ประกอบด้วยแอคติวิตีของเซลลูเลส 0.345 U/ml กับแอคติวิตีของไซแลนเนสเท่ากับ 6.828 U/ml ส่วนแหล่งไนโตรเจนอื่นที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นไปได้คือ ammonium sulphate ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 12 วัน จะให้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสเท่ากับ 0.234 U/ml กับแอคติวิตีของไซแลนเนสเท่ากับ 17.409 U/ml

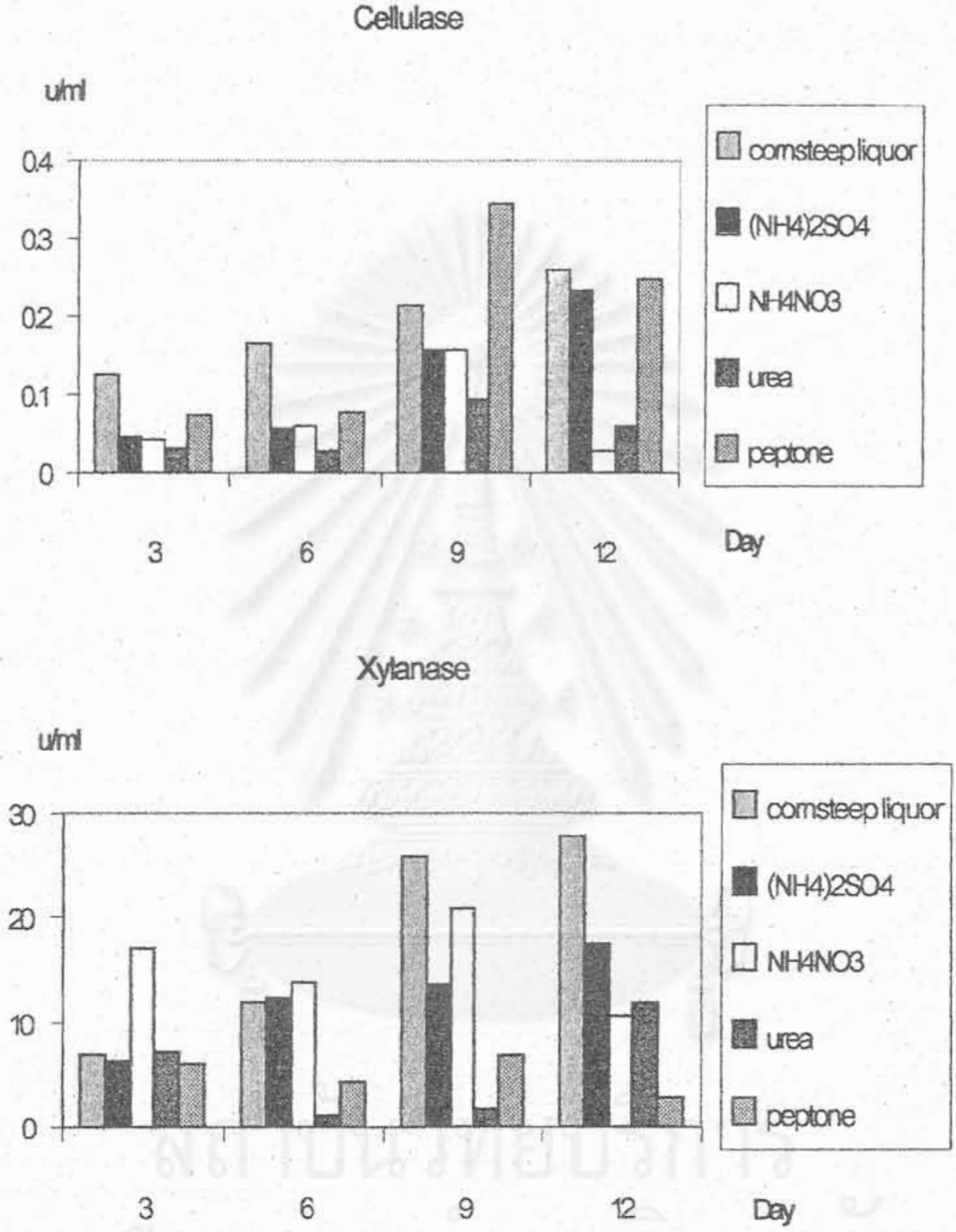
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส(U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Cornsteep liquor	0.126 ef	0.166 d	0.215 c	0.261 b
Ammonium sulphate	0.046 hi	0.057 g-i	0.156 de	0.234 bc
Ammonium nitrate	0.044 hi	0.059 g-i	0.158 de	0.030 i
Urea	0.032 i	0.030 i	0.094 fg	0.061 g-i
Peptone	0.074 gh	0.076 gh	0.345 a	0.249 bc
	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส(U/ml)			
Cornsteep liquor	6.926 F	11.905 DE	25.988 A	27.946 A
Ammonium sulphate	6.188 FG	12.364 DE	13.616 D	17.409 C
Ammonium nitrate	17.090 C	13.791 D	20.929 B	10.613 E
Urea	7.084 F	1.043 I	1.683 I	11.867 DE
Peptone	6.049 FG	4.324 G-H	6.828 F	2.897 GH

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่อยู่ตามหลังตัวเลขจะบ่งบอกถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์ของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

5. <u>การเปรียบเทียบเอนไซม์ที่ผลิตได้ในห้องทดลองกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า</u>

จากการทดลองเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตเป็นการค้ากับเอนไซม์ที่ได้จากห้องทดลอง 2 สภาวะคือ สภาวะการผลิตเอนไซม์ในขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร และสภาวะการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ค่า specific activity ของเอนไซม์เซลลูเลสรวมและเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 8 พบว่า

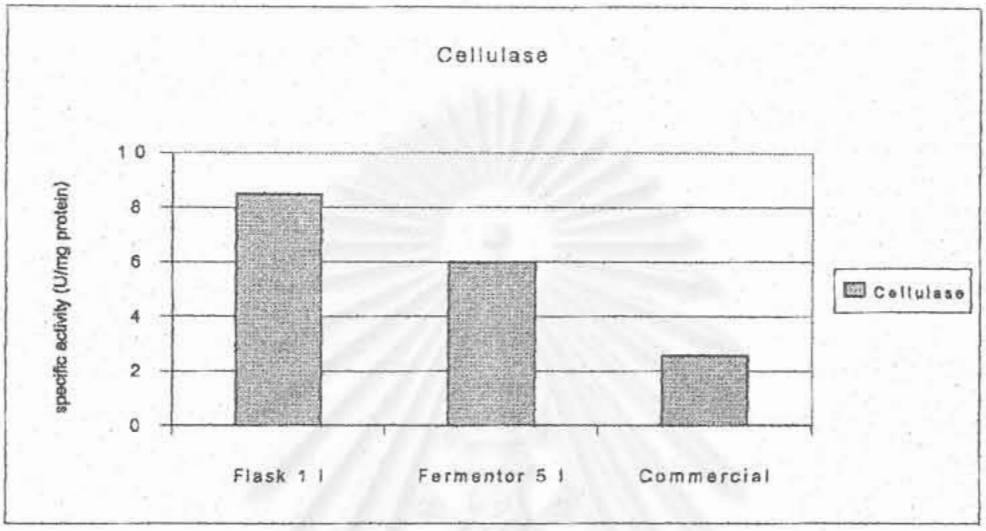
เอนไซม์ที่ผลิตได้จากขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ประกอบด้วย specific activity ของ exoglucanase และเอนไซม์ไซแลนเนส เท่ากับ 8.4602 U/mg protein และ 151.8620 U/mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ผลิตจากถังหมักขนาด 5 ลิตร ประกอบด้วย specific activity ของ exoglucanase และเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 6.0152 U/mg protein และ 1,770.9800 U/mg protein ตามลำดับ

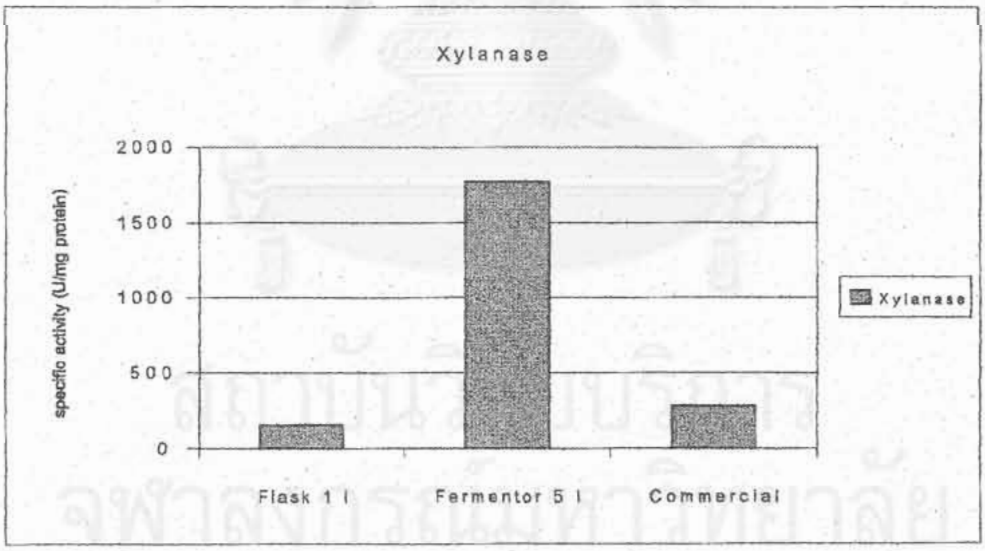
ส่วนเอนไซม์จากที่ได้จากการผลิตเป็นการค้าจากเชื้อ *A. niger* ของบริษัท TCI Tokyo Kasei ประกอบด้วย specific activity ของ exoglucanase และเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 2.5791 U/mg protein และ 282.6004 U/mg protein ตามลำดับ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตจากห้องทดลองกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า

แหล่งผลิต	specific activity ของเอนไซม์ exoglucanase (U/ mg protein) (FPA)
ขวดรูปกรวย 1 ลิตร	8.4602
ถังหมัก 5 ลิตร	6.0152
ผลิตเป็นการค้าจากเชื้อ *A. niger* ของบริษัท TCI Tokyo Kasei	2.5791
	specific activity ของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ mg protein)
ขวดรูปกรวย 1 ลิตร	151.8620
ถังหมัก 5 ลิตร	1,770.9800
ผลิตเป็นการค้าจากเชื้อ *A. niger* ของบริษัท TCI Tokyo Kasei	282.6004



ก.



ข.

ภาพที่ 9 แอคติวิตีของเอนไซม์จากการผลิตในห้องทดลองกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า

ก. เซลลูเลส

ข. ไซแลนเนส

6. <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส ได้แก่ ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ โดยการหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แล้วนำข้อมูลจากผลการทดลองไปวิเคราะห์สถิติโดยวิธี DMRT ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7-8 และภาพที่ 10-11 ดังนี้

6.1 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่ระดับ pH ตั้งแต่ pH 3 ถึงระดับ pH 7 ได้ผลดังตารางที่ 7 และภาพที่ 10 ซึ่งพบว่า

exoglucanase มีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ pH 5 โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.190 U/ml ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากที่ระดับ pH 4 ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.177 U/ml แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากที่ระดับ pH 3 pH 6 และ pH 7

endoglucanase มีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ pH 5 โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 3.104 U/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากระดับ pH 3 pH 4 pH 6 และ pH 7

ส่วน β-glucosidase มีแอคติวิตีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ทุกระดับ pH

นอกจากนี้เอนไซม์ไซแลนเนสมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ระดับ pH 5 โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.538 U/ml ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากระดับ pH 3 pH 4 pH 6 และ pH 7

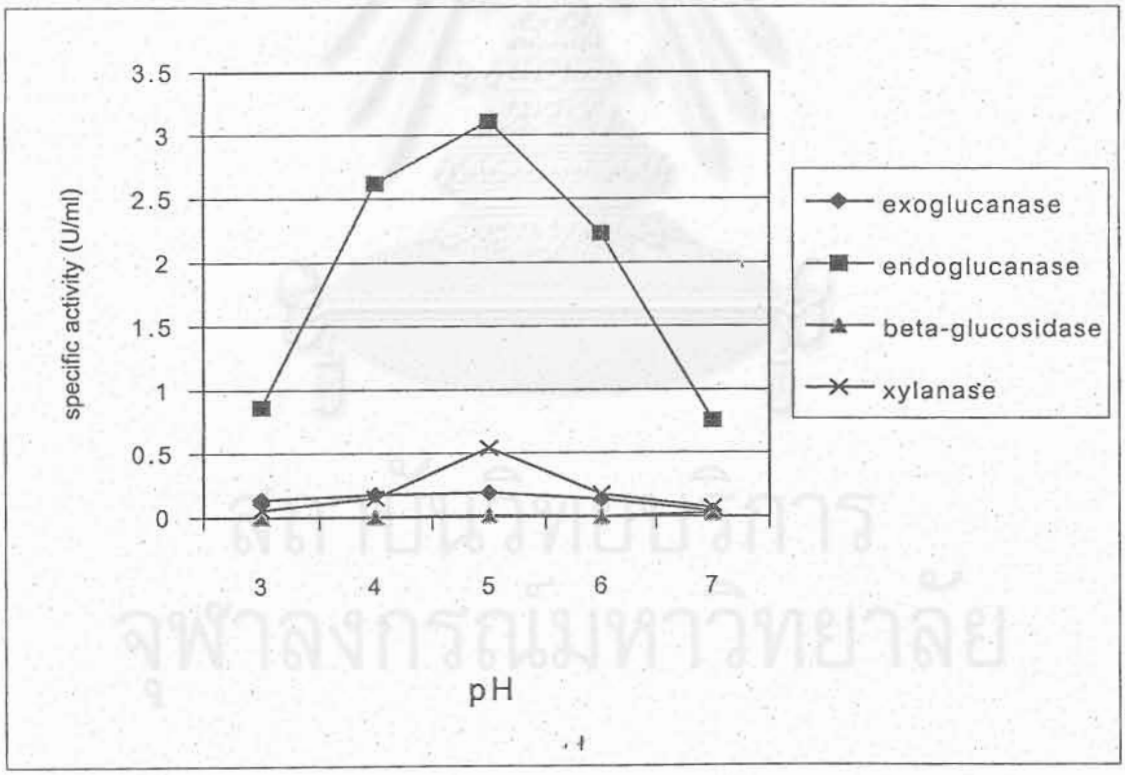
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ระดับ pH 5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซแลนเนส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบสภาวะ pH 3-7 ต่อการทำงานของเอนไซม์จากค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

ชนิดเอนไซม์		แอคติวิตีของเอนไซม์ (U/ml) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)				
		3	4	5	6	7
เซลลูเลส	exoglucanase	0.0.13 g	0.177 e	0.190 de	0.130 f	0.034 g
	endoglucanase	0.868 d	2.621 b	3.104 a	2.224 c	0.752 de
	β-glucosidase	0.005 g	0.001 g	0.010 g	0.001 g	0.033 g
ไซแลนเนส		0.059 C	0.155 B	0.538 A	0.178 B	0.073 C

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่อยู่ตามหลังตัวเลขจะบ่งบอกถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบสภาวะ pH 3-7 ต่อการทำงานของเอนไซม์จากค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 11 คือ

exoglucanase มีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.334 U/ml ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากที่ระดับอุณหภูมิ 30 ถึง 50 และ 70 องศาเซลเซียส

endoglucanase มีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 4.490 U/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากที่ระดับอุณหภูมิ 30 ถึง 50 และ 70 องศาเซลเซียส

และ β-glucosidase มีแอคติวิตีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ทุกระดับอุณหภูมิ

ส่วนเอนไซม์ไซเลนเนสมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.538 U/ml ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากอุณหภูมิ 30 ถึง 50 และ 70 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองจะได้ว่าที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase อยู่ในช่วง 0.191– 0.334 U/ml 3.117 – 4.490 U/ml และ 0.007 -0.002 U/ml ตามลำดับ และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซเลนเนสอยู่ในช่วง 0.128 – 0.538 U/ml

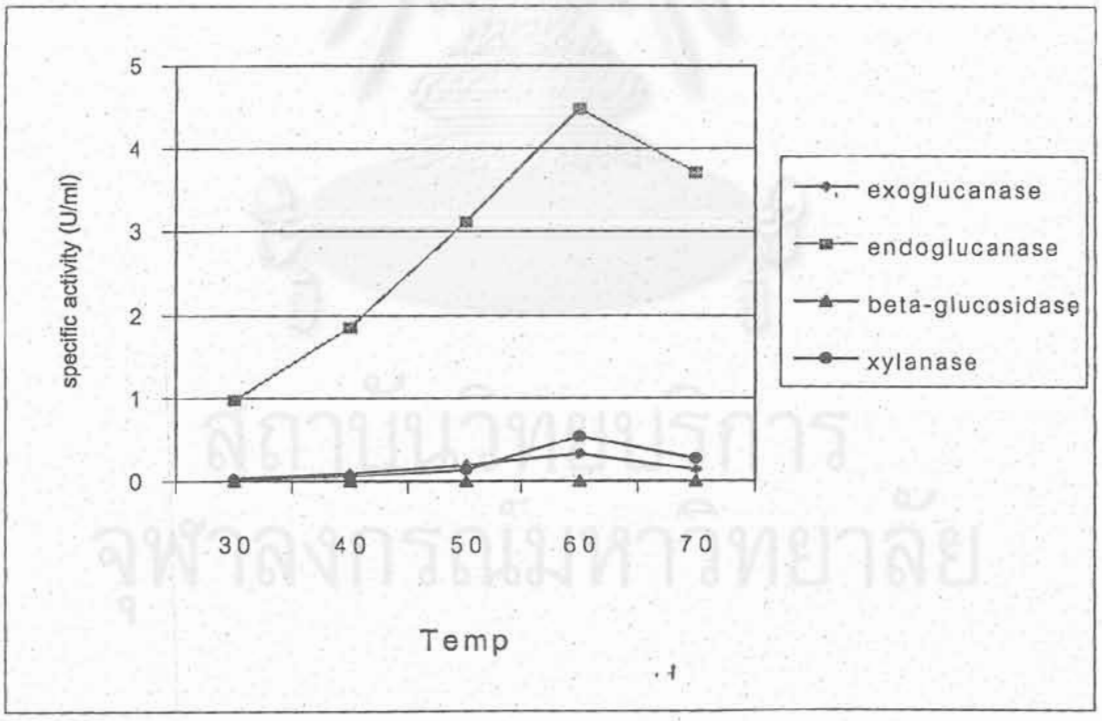
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทุกชนิดในการวิจัยครั้งนี้คือที่ระดับ pH 5 อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบสภาวะอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียสต่อการทำงานของเอนไซม์จากค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

ชนิดเอนไซม์		แอคติวิตีของเอนไซม์ (U/ml)				
		อุณหภูมิ (°ซ)				
		30	40	50	60	70
เซลลูเลส	exoglucanase	0.034 j	0.087 i	0.191 g	0.334 e	0.140 h
	endoglucanase	0.970 f	1.853 d	3.117 c	4.490 a	3.717 b
	β-glucosidase	0.002 k	0.007 k	0.007 k	0.002 k	0.005 k
ไซแลนเนส		0.018 D	0.050 D	0.128 C	0.538 A	0.260 B

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่อยู่ตามหลังตัวเลขจะบ่งบอกถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ณ สภาวะอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส

สรุปและวิจารณ์

1. การคัดเลือกชนิดหรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

T. reesei เป็นราที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมเอนไซม์ มีการสร้างสายพันธุ์แปลงโดยการกลายพันธุ์เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น เอนไซม์เซลลูเลสนี้ผลิตขึ้นโดยรา อาจมีแอคติวิตีของเอนไซม์ร่วมกันกับเอนไซม์ไซแลนเนสมากน้อยต่างกัน *T. reesei* สายพันธุ์ต่างชนิดกันมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไม่เท่ากัน รวมถึงการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งราบางชนิดเช่น *A. pullulans* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดี ดังนั้นงานวิจัยในขั้นแรกได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดลองผลิตเอนไซม์ โดยศึกษาจากการเจริญและลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *T. reesei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C และเชื้อ *A. pullulans* โดยเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดแรกเป็นเชื้อราที่มีโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญแผ่ขยายโดยรอบเป็นรัศมี ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดหลังเป็นเชื้อราที่มีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กเจริญโดยการแตกหน่อคล้ายยีสต์ ดังนั้นการเตรียมหัวเชื้อและการเตรียมเชื้อตั้งต้นจึงต้องเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างเพื่อให้เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของเชื้อเช่น *T. reesei* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ใช้อาหาร PDA ขณะที่ *A. pullulans* ใช้อาหาร YMX

2. การผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์

T. reesei สายพันธุ์ QM ผลิตเอนไซม์หลักคือเซลลูเลสได้แอคติวิตีสูงสุด 0.296 U/ml ขณะที่มีไซเลนเนสเพียงเล็กน้อย (0.089 U/ml) *T. reesei* สายพันธุ์ C ผลิตเอนไซม์ผสมทั้ง 2 ได้ดีมากคือคือเซลลูเลสสูงที่สุด 5.362 U/ml ขณะที่ *A. pullulans* ผลิตไซแลนเนสเป็นหลักได้ถึง 7.344 (U/ml) แต่ผลิตเซลลูเลสได้น้อยมากในระดับ 0.091 U/ml หรือต่ำกว่า

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า เชื้อทั้ง 3 มีคุณสมบัติต่างกัน คือ *T. reesei* สายพันธุ์ QM เหมาะสำหรับการใช้ผลิตเซลลูเลส *T. reesei* สายพันธุ์ C เหมาะสำหรับการใช้ผลิตเอนไซม์ผสมที่มีแอคติวิตีของทั้ง 2 เอนไซม์ และ *A. pullulans* เหมาะสำหรับการใช้ผลิตไซแลนเนส

เอนไซม์ที่ผลิตได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีการตกตะกอนด้วยการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือโดยการใช้อะซิโตนพบว่า $(NH_4)_2SO_4$ ที่ 80% มีผลทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อนำมาไดอะไลซิสเพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมแล้วจะได้ endoglucanase ที่มี specific activity ของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือ exoglucanase ส่วน β-glucosidase มี specific activity เพียงเล็กน้อย การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นมากด้วยวิธีการดังกล่าวนี้

สามารถทำให้มี specific activity ของ endoglucanase exoglucanase และ β-glucosidase มากขึ้นถึง 9 เท่า 4.5 เท่า และ 13.6 เท่า ตามลำดับ จาก crude enzyme

โดยทั่วไปอาจสรุปได้ว่าการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 40-80% ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มี endoglucanase สูงกว่า exoglucanase และ β-glucosidase อยู่มาก

ส่วนการตกตะกอนด้วยอะซีโตน 1 : 3 แม้จะตามด้วยขั้นตอนการทำไดอะไลซีสก็ไม่ได้ช่วยให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มากขึ้น กลับได้ผลน้อยกว่า crude enzyme ถึง 5 เท่า

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการที่เหมาะสมมีส่วนสำคัญที่จะช่วยให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีองค์ประกอบตามต้องการ

การทำให้เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 80% สอดคล้องกับรายงานการตกตะกอนเซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Neurospora crassa* (Macris and Kekos, 1989) Yu และคณะ (1999) ทำการตกตะกอนเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 60 % ทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคติวิตีที่ประกอบด้วย exoglucanase endoglucanase เพิ่มมากขึ้นถึง 13 เท่า และ18 เท่า คือมีแอคติวิตีของ exoglucanase เพิ่มจาก 30.60 U/ml เป็น 396.7 U/ml และแอคติวิตีของ endoglucanase เพิ่มจาก 359.7 U/ml เป็น 6481 U/ml

3. <u>การขยายขนาดการผลิตเอนไซม์และการเปรียบเทียบแอคติวิตีกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า</u>

การผลิตเอนไซม์ในงานวิจัยที่ผ่านมา ทำในระดับขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. การขยายขนาดเริ่มต้นจากการเพิ่มปริมาตรของอาหารเหลวและขวดรูปกรวยเป็นขนาด 1 ลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30+ 2 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นเพิ่มกำลังผลิตเป็นการผลิตในถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร ซึ่งควบคุมสภาวะการผลิตให้อย่างดีพบว่า

ค่าของเซลลูเลสรวม หรือ exoglucanase นั้น มีค่าลดลง จาก specific activity 8.4602 U/ mg protein ในระดับขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร มาเป็น 0.0152 U/ mg protein แต่เมื่อเทียบกับเซลลูเลสที่ผลิตเป็นการค้าของบริษัท TCI Tokyo Kasei นี้ ให้แอคติวิตีของเซลลูเลสรวม 2.5791 U/ mg protein ทำให้สามารถระบุได้ว่า เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองในประเทศไทยมี specific activity ของเซลลูเลสรวมสูงกว่า สำหรับเอนไซม์ไซแลนเนสพบว่า การใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร จะทำให้ได้ผลผลิตที่มี specific activity สูงสุดถึง 1,770.98 U/ mg protein ขณะที่การผลิตในระดับขวดรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ให้ specific activity 151.8620 U/ mg protein และเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้ามีไซแลนเนสที่มี specific activity 282.6004 U/ mg protein

อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ถึง endoglucanase อย่างเดียว พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้าให้ endoglucanase ที่มี specific activity 158.7810 U/ mg protein ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตเอง 4.23 เท่า

สูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อราที่ใช้ต่างกัน รวมถึงวิธีการที่ทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้น น่าจะมีผลต่อปริมาณของเอนไซม์

Reczey และคณะ (1995) ผลิตเอนไซม์ exoglucanase จากเชื้อ *T. reese* ในขวดรูปกรวยขนาดขนาด 750 มล. เทียบกับในถังหมักขนาด 4 ลิตรได้แอคติวิตีของเอนไซม์น้อยกว่า 100 U/ml ไม่แตกต่างจากที่ผลิตในถังหมักขนาดใหญ่ 22 ลิตรมากนักคือได้แอคติวิตี 108 U/ml

4. <u>การศึกษาหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอื่น</u>

เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ และนำเอาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่ทั่วไปและหาง่าย ราคาถูกมาใช้ให้เป็นประโยชน์อีกทางหนึ่ง จากผลการทดลองนี้มีแนวโน้มว่ารำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส รองลงมาเป็นชานอ้อย ส่วนรำข้าวสาลีมีแนวโน้มว่าจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส รองลงมาเป็นรำข้าวเจ้า สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Yu และคณะ (1998) ที่เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *T. reesei* ในอาหารที่ผสมรำข้าวสาลีจะได้ exoglucanase สูง โดยเฉพาะที่ผสมรำข้าวสาลี 5 % สูงกว่าที่ 3% โดยให้แอคติวิตี 12.85 U/ml

ส่วนแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ นั้นมีแนวโน้มว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุด ดีกว่า cornsteep liquor รองลงมาคือ ammonium sulphate และ ammonium nitrate ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสมีแนวโน้มว่า ammonium nitrate และ ammonium sulphate ให้ผลได้ไม่ดีเท่าใช้ cornsteep liquor ในปริมาณที่เท่ากัน

การทดลองประเด็นนี้ เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการในอุตสาหกรรม ซึ่งถ้ามีการวิจัยเพิ่มเติมถึงการผลิตเอนไซม์กับวัสดุที่มีความหลากหลายมากขึ้น และวิเคราะห์เชิงเศรษฐศาสตร์ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อไป

5. <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมทั้งความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส จากค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลว่า

exoglucanase และ endoglucanase มีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ขณะที่ β-glucosidase ให้ผลไม่แตกต่างกันทุกระดับ pH ตั้งแต่ pH 3 - 7 อุณหภูมิก็ไม่แตกต่างกันตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส

ส่วนไซแลนเนสมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ระดับ pH 5 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ดังนั้นสภาวะ pH 5 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสที่สุด โดยเฉพาะ endoglucanase มีแอคติวิตีสูงที่สุด สอดคล้องกับที่ Busto และคณะ (1996) รายงานการทดลองไว้จากเอนไซม์ endoglucanase จากเชื้อ *T. reesei* นอกจากนั้นใกล้เคียงกับในรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* คือ pH 4.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Gattinger *et. al.*, 1990) และ Gomes และคณะ (1992) ก็รายงานสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ exoglucanase β-glucosidase และไซแลนเนส ที่ผลิตจากเชื้อ *T. viride* ที่ pH 4.5-6.0

สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จะมีความสำคัญต่อการนำเอนไซม์ไปใช้ในการเตรียมผ้าในอุตสาหกรรมสิ่งทอที่ควรจะมีการปรับสภาวะให้เหมาะสม เพื่อประสิทธิภาพของการทำงานของเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสและไซแลนเนส

<u>เอกสารอ้างอิง</u>

Biely . 1985. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology. 3(11) : 286-290.**

Busto, M.D., Ortega, N. and Perez-Mateos, M. *1996.* Location, kinetics and stability of cellulase induced in *Trichoderma reesei* cultures. **Bioresource Technology.** 57 : 187-192.

Gattinger, L.D., Durnjak, Z. and Khan A.W. 1990. The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei* . **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33 : 21-25.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. **International Union of Pure and Applied** Chemistry. 59 : 257-268.

Ghose , T.K. and Bisaria, V.A. 1987. Measurement of hemicellulase activities Part 1 : Xylanase. **Pure & Appl. Chem.** 59 (2) : 1739-1752.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wide strain of *Trichoderma viride.* **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36 : 701-707.

Hari, K.S., Sekhar Rao K.C., Suresh, B.J. and Srirami, R.D. 2000. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei.* QM-9414. **Bioprocess Engineering. 22** : 467-470.

Jeffries, T.W. 1996. Biochemistry and Genetics of microbial xylanases. **Current Opinion in Biotecnology.** 7 : 337-342.

Macris, B.J. and Kekos, D. 1989. Enhanced cellulase activities using straw as growth substrate. **Enzyme systems for lignocellulose degradation.** 261-273 p.

Punnapayak, H., Kuhirun, M. and Tanonkeo, P. 1999. Cellulolytic fungi and the bioconvertion of fiber from *Agave sisalina.* Science Asia. 25 : 133-136.

Reczey, K., Szengyel Zs., Eklund, R. and Zacchi, G. 1996. Cellulase production by *Trichoderma reesei.* **Bioresource Technology.** 57 : 25-30

Sikyta, B. 1983. **Methods in Industrial Microbiology.** John willey & sons, New York. p. 214-249.

Sternberg, D., Vihayakumar, P. and Reese, E.T. 1976. β-glucosidase : microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal of Microbiology.** 23 : 139-147.

Tolan, J. and Foody, B. 1999. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.** 65 : 41-67.

Wyman, C.E. 1996. **Handbook of bioethanol.** Taylor & Francis Publishers, PA, USA. pp. 424.

Yu, Xiao-Bin, Hyun,S.Y.,and Yoon-Mo, K. 1999. Cellulase Production in Fed-Batch culture by *Trichoderma reesei* Rut C30 in wheat bran-containing media. **J. Microbiol. Biotechol.** 8 (3) : 208-213.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. <u>อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์</u>

1.1 <u>Potato Dextrose Agar</u> (PDA) สำหรับเชื้อ *T. resei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C มีองค์ประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กโตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มมันฝรั่งซึ่งล้างสะอาดและหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลบ.ซม. ในน้ำกลั่น 500 มล. จนสุก แล้วกรองแยกน้ำมันฝรั่งออกมาด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลเด็กโตรสและวุ้นผงลงไปแล้วอุ่นต่อ คนจนวุ้นละลายหมด จึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.2 <u>Yeast Malt Xylose</u> (YMX) สำหรับเชื้อ *A.pullulans* มีองค์ประกอบดังนี้

yeast extract	3	กรัม
malt extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
xylose	10	กรัม
วุ้นผง	1.5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. อาหารเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2.1 Potato dextrose broth (PDB) เป็นอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *T. resei* สายพันธุ์ QM และสายพันธุ์ C

มีองค์ประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กโตรส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มมันฝรั่งซึ่งล้างสะอาดและหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลบ.ซม.ในน้ำกลั่น 500 มล. จนสุก แล้วกรองแยกน้ำมันฝรั่งออกมาด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลเด็กโตรสลงไปแล้วอุ่นต่อ คนจนวุ้นละลายหมด จึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.2 อาหารเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans*

มีองค์ประกอบดังนี้

xylose	1	%
yeast nitrogen base	0.07	%
asparagine	0.2	%
KH_2PO_4	0.5	%

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. อาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์

3.1 Production medium (Punnapayak, Kuhirun และ Thanonkeo (1999)

มีองค์ประกอบดังนี้

$MgSO_4$	0.1	%
$CaHPO_4$	0.5	%
$(NH_4)_2SO_4$	0.4	%
Cornsteep liquor	0.7	%
Tween 80	0.2	%
Alpa-cellulose	3.0	%

$FeSO_4$	0.0005	%
$ZnSO_4$	0.0014	%
$MnSO_4$	0.00156	%
$CoCL_2$	0.00366	%

ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มล. ต้มให้เดือด คนให้ละลาย แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับให้มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 โดยใช้ 1 N NaOH และ 1 N HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.2 Xylannase Production Medium

มีองค์ประกอบดังนี้

xylose	0.1	%
yeast extract	0.1	%
$(NH_4)_2SO_4$	0.25	%
KH_2PO_4	0.5	%

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. ส่วนผสมของสารสำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

4.1 Reagent A

มีองค์ประกอบดังนี้

Na_2CO_3	25	กรัม
NaK Tartatate	25	กรัม
(Rochelle salt)		
$NaHCO_3$	20	กรัม
Na_2SO_4	200	กรัม

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร.ในขวดวัดปริมาตร

4.2 Regent B

ละลาย $CuSO_4 . 5H_2O$ 150 กรัมด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรครบ 100 มล.ในขวดวัดปริมาตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 หยด

4.3 Reagent C

ปิเปต Reagent A 25 มล. ผสมกับ Reagent B 1 มล. (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

4.4 Reagent D

มีองค์ประกอบดังนี้

* ammonium molybdate	25	กรัม
$Na_2HAsO_4.7H_2O$	3	กรัม
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	21	มล.

ละลาย ammonium molybdate ในน้ำ 450 มล. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นขณะละลาย ammonium molybdate จากนั้นผสม $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ที่ละลายในน้ำ 25 มล. ลงไปละลายให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล บ่มไว้ ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน

5. วิธีการวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

5.1 การหาน้ำหนักเส้นใยแห้ง

กรองเส้นใยของเชื้อด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 โดยใช้เครื่องดูดกรอง ขณะกรองให้ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าได้เส้นใยไม่มีอาหารติดอยู่ นำไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น นำไปชั่งโดยละเอียดด้วยเครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง

5.2 การนับจำนวนเซลล์

cell suspension ของเชื้อ *A. pullulans* ที่เจริญบนอาหาร xylanase inoculum มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 ถึง 100 เท่า แล้วนำมา spread บนอาหารแข็ง PDA ทำในสภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้นาน 3 วัน ณ อุณหภูมิห้อง นำจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น นำไปคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ต่อมล.

6. กระบวนการผลิตเอนไซม์ มีขั้นตอนดังนี้

6.1 นำเชื้อจุลินทรีย์เลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

6.2 ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อในระดับขวดภาพกรวย (Flask scale) มีอาหารปริมาตร 400 มล. pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน บ่มในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)

ส่วนการเลี้ยงในระดับถังหมัก (Fermentor scale) ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร มี pH เท่ากับ 5 ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงโดยใช้ 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ความเร็วในการกวน (Agitation) 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง

6.3 นำ supernantant มาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วแยกเอาส่วนใสไว้เรียก crude enzyme มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80 %

6.4 นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แยกเอาส่วนของตะกอนไว้มาละลายใน 0.05 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 แล้วทำการไดอะไลซีสเพื่อแยกเกลือแอมโมเนียมออกทำให้ได้เอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้น

6.5 นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วไปวัดเอนไซม์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซแลนเนส และหาปริมาณโปรตีน

7. <u>การตกตะกอนเอนไซม์</u>

7.1 เตรียม crude enzyme ตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น รวบรวม crude enzyme ให้มีปริมาตรประมาณ 1 ลิตรไว้ในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร ซึ่งแช่ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา

7.2 เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในสารละลาย โดยค่อยๆ แบ่งตักเติมช้าๆ พร้อมทั้งคนสารละลายเอนไซม์อย่างช้าๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กจนมีความอิ่มตัวที่ 80 % เมื่ออิ่มตัวแล้ว ให้คนต่อไปเบาๆ อีก 30 นาที ทิ้งให้ตกตะกอนใน ตู้เย็น 1 คืน

7.3 ทำการเก็บตะกอนโดยนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปแช่ในซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 4.8 ได้เป็นสารละลายของเอนไซม์

8. <u>การทำไดอะไลซีส</u>

8.1 ขั้นตอนการเตรียมถุงไดอะไลซีส

8.1.1 นำถุงไดอะไลซีสของบริษัท Spectrum Medical Industries, Inc. รุ่น Spectra 1 Por moleculerporous membrane tubing ต้มในสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ 0.3 % ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

8.1.2 นำถุงไดอะไลซีสไปล้างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

8.1.3 นำถุงไดอะไลซีสไปแช่ในกรดซัลฟูริค ที่มีความเข้มข้น 0.2 % จากนั้นล้างออกด้วยน้ำร้อนนาน 5 นาที

8.2 การทำไดอะไลซีส

8.2.1 ใส่สารละลายของเอนไซม์ในซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 4.8 ลงในถุงไดอะไลซีส ผูกถุงให้แน่น แล้วแช่ถุงลงในซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 4.8 ปริมาตร 2 ลิตร อยู่ในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตรซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งและคนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลา ทำการเปลี่ยนสารละลายของซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 4.8 ทุก 4 ชม. ทำการไดอะไลซีสจนกระทั่งแน่ใจว่าเกลือแอมโมเนียมแยกออกมาหมดแล้ว

8.2.2 เก็บเอนไซม์ที่ได้ในซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 4.8 ที่ทราบปริมาตรที่แน่นอนไว้ในหลอดทดสอบ เก็บแช่เย็นไว้ในตู้เย็น จึงนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

9. <u>การวัดแอคติวิตีเอนไซม์</u>

9.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสมี 2 วิธีการดังนี้

9.1.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสรวมตามวิธี FPA ของ Ghose (1987)

นำ crude enzyme 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ แล้วเติม 0.05 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 1 มล. และใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1.0x 6.0 ซม.^{2} เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม dinitrosalicylic (DNS) reagent 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มให้เดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เติมน้ำกลั่น 20 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน แล้วนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากสูตรมาตรฐาน

9.1.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสแยกตามองค์ประกอบ

9.1.2.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase โดยวิธีของ Ghose (1987) ผสมเอนไซม์ 0.5 มล. กับซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M pH 4.8 ปริมาตร 1 มล. และใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0 × 6.0 เซนติเมตร (หนัก 50 มก.) เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M ซิเตรต-บัฟเฟอร์ pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

9.1.2.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase โดยวิธีของ Ghose (1987) ผสมเอนไซม์ 0.5 มล. กับ CMC 2% ที่ละลายอยู่ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M ซิเตรต- บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยให้ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

9.1.2.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ β-glucosidase โดยวิธีของ Sternberg และคณะ (1976) ผสมเอนไซม์ 0.5 มล. กับ salicin ความเข้มข้น 4 มก.ต่อมล. ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.025 M pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยให้ 0.05 M ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

9.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสตามวิธีการของ Ghose และ Basiria(1987)

ผสมเอนไซม์ 0.25 มล. กับ 1% ไซแลน และ 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 0.25 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน10นาที เติม alkaline copper reagent 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เติม arsenomolybdate reagent 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มล. เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 520 นาโนเมตร โดยใช้ 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบน้ำตาลไซโลสจากกราฟไซดลสมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสจากสูตรมาตรฐาน

9.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการของ Tsujisaka และคณะ (1973)

ปิเปตสารละลาย crude enzyme จำนวน 1 มล. ใส่ในขวดภาพกรวยขนาด 250 มล. ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 2 กรัม สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 M และมี pH 5.6 จำนวน 9 มล. และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) จำนวน 1 มล. จากนั้นนำ reaction mixture นี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมเอธานอล จำนวน 40 มล. นำ reaction mixture ที่หยุดปฏิกิริยาแล้วไปติเตรตกับ

สารละลาย 0.05 N KOH เพื่อหาปริมาณของกรดไขมันอิสระที่ถูกปล่อยออกมา โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็น blank แทนสารละลายเอนไซม์ จากนั้นนำปริมาตรของสารละลาย KOH ที่ใช้ไปคำนวณหาค่า unit of enzyme

10. <u>การคำนวณค่า Unit of enzyme</u> ตามวิธีของ The International Union of Biochemistry

10.1 การคำนวณค่า unit of enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 μM ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 μM ของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.180 มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.018 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = $\frac{1}{0.180 \times 60}$ หน่วย

= 0.093 หน่วย

หากปลดปล่อยกลูโคส X มล. ใน 60 นาทีจะมีค่า = (X)×(0.093) หน่วย

จากการทดลองในปริมาณเอนไซม์ 0.5 มล.ถ้าหากใช้เอนไซม์ 1 มล.

= $\frac{(X) \times (0.093)}{0.5}$ หน่วย

หรืออาจคิดเป็น = $\frac{\text{มก.กลูโคส} \times (0.093)}{\text{มล.เอนไซม์}}$ หน่วยต่อมล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10.2 การคำนวณค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ไซแลนเนส

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 μM ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 μM ของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.150 มิลลิกรัมของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.150 มิลลิกรัมไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัมไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 10 นาที มีค่า $= \frac{1}{0.150 \times 10}$ หน่วย

$= 0.670$ หน่วย

หากปลดปล่อยกลูโคส X มล. ใน 10 นาทีจะมีค่า $= (X) \times (0.670)$ หน่วย

จากการทดลองในปริมาณเอนไซม์ 0.25 มล.ถ้าหากใช้เอนไซม์ 1 มล.

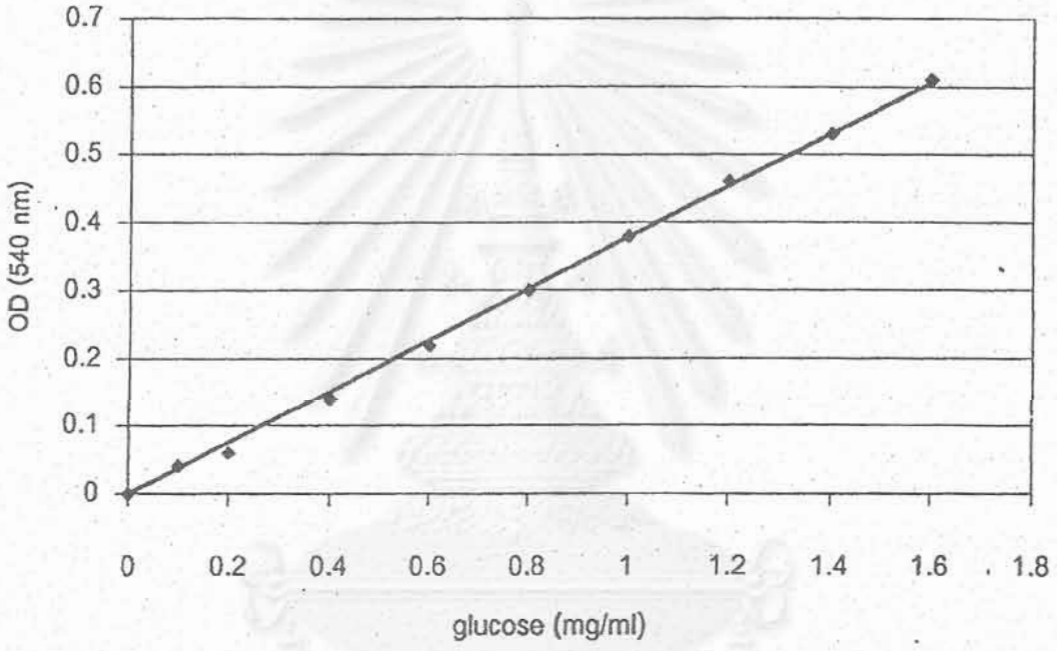
$= \frac{(X) \times (0.670)}{0.25}$ หน่วย

หรืออาจคิดเป็น $= \frac{\text{มก.ไซโลส} \times (0.670)}{\text{มล.เอนไซม์}}$ หน่วยต่อมล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. การทำกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมล. ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มล. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 20 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

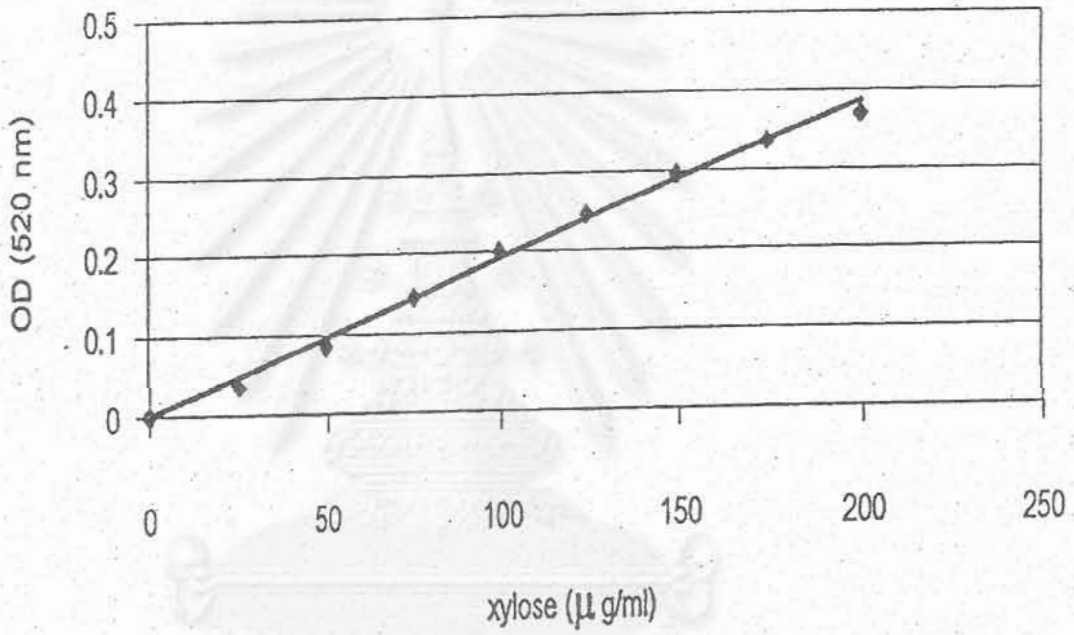


ภาพที่ 12 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. <u>การทำกราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน</u>

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่ความ เข้มข้นต่างๆ กัน คือ 25 50 75 100 125 150 175 และ 200 ไมโครกรัมต่อมล. ใส่ในหลอดทดลอง เติม Reagent C หลอดละ 0.5 มล. นำไปตั้งในน้ำเดือด 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม Reagent D หลอดละ 1.0 มล. . นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลส



ภาพที่ 13 กราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

13. <u>การวัดปริมาณโปรตีนตามวิธี Biuret test</u> (Sikyta, 1983)

การวัดปริมาณโปรตีนด้วย Biuret reagent โดยนำส่วนน้ำใสใส่ลงในหลอดทดลอง 1.0 มล. เติม 4 มล. Biuret reagent ที่ประกอบด้วย $CuSO_4.5H_2O$ 0.75 กรัม Rochelle salt 3.0 กรัม ต่อน้ำ 250 มล. ผสมกับ 10% NaOH 150 มล.

14. ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในการทดลอง

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจาก specific activity ของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ใน การผลิต 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	17	8,611.2480	506.5440	7,220.8960**
ERROR	36	2.5254	0.0701	
TOTAL	53	8,613.7734		

CV = 3.74%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของ จาก specific activity ของเอนไซม์ไซแลนเนส จากเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในการผลิต 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	5	7,673,545.0000	1,534,709.0000	1,203.9294**
ERROR	12	15,297.0000	1,274.7500	
TOTAL	17	7,688,842.0000		

CV = 7.49%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งคาร์บอนเป็นเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	15	0.9894	0.0660	273.6364
ERROR	32	0.0077	0.0002	
TOTAL	47	0.9971		

CV = 5.81%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งคาร์บอนเป็นเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	15	3,045.7959	203.0531	133.8438**
ERROR	32	48.5469	1.5171	
TOTAL	47	3,094.3428		

CV = 10.42%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	19	0.4933	0.0260	53.2547**
ERROR	40	0.0195	0.0005	
TOTAL	59	0.5128		

CV = 17.57%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ในอาหารผสมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	19	3,293.5308	173.3437	88.9588**
ERROR	40	77.9434	1.9486	
TOTAL	59	3,371.4741		

CV = 12.32%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ สภาวะ pH 3-7

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	14	0.7053	0.0504	445.8914**
ERROR	30	0.0034	0.0001	
TOTAL	44	0.7087		

CV = 10.55%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ สภาวะ pH 3-7

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	4	0.0030	0.0007	111.3231**
ERROR	10	0.0001	0.0000	
TOTAL	14	0.0030		

CV = 16.84%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ สภาวะอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	14	1.4954	0.1068	2,945.4221**
ERROR	30	0.0011	0.0000	
TOTAL	44	1.4964		

CV = 4.09%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อ *T. reesei* สายพันธุ์ C ณ สภาวะอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส

SOV	DF	SS	MS	F
TREATMENTS	4	0.0029	0.0007	101.2874**
ERROR	10	0.0001	0.0000	
TOTAL	14	0.0029		

CV = 18.29%

*, ** = SIGNIFICANT AT 95%, 99% LEVEL

NS = NON SIGNIFICANT AT 95% LEVEL

15. ต้นทุนการผลิตเอนไซม์ผสมเซลลูเลสและไซแลนเนส

ต้นทุนการผลิตเอนไซม์ผสมเซลลูเลสและไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* ปริมาตร 3 ลิตร ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (FPA) มี specific activity เท่ากับ 3.89 U/mg protein ผสมกับเอนไซม์ไซแลนเนสที่มี specific activity เท่ากับ 148.65 U/mg protein มีรายละเอียดดังนี้

15.1 ค่าสารเคมีในการผลิตเอนไซม์

อาหารเลี้ยงเชื้อ	314	บาท
สารเคมีที่ใช้ในการตกตะกอน	500	บาท
สารเคมีที่ใช้ในการไดอะไลซีส	70	บาท
สารเคมีที่ใช้ในการวัดแอคติวิตี	300	บาท
15.2 ค่าไฟฟ้า	342	บาท
15.3 ค่าน้ำ	50	บาท
รวม	1,576	บาท

ดังนั้นต้นทุนการผลิตของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส 1 U/mg protein เท่ากับ 405 บาทและ 10.60 บาท ตามลำดับ

ร่างรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

Project: Applications of Enzymes in Cotton Fabric Preparation Processes

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์ และ คณะ

ตุลาคม 2544

ร่างรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

Project: Applications of Enzymes in Cotton Fabric Preparation Processes

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. นายธีระดล รุ่งเรืองกิจไกร	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. นส. กิ่งกมล ชูนุกูลพงศ์	ภาควิชาวิศวกรรมเคมีสิ่งทอ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพ
4. นส. จิตติมา ฐิติธนนันท์	ภาควิชาวิศวกรรมเคมีสิ่งทอ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพ
5. นส. ชญาณี เนื่องไชยลี	ภาควิชาวิศวกรรมเคมีสิ่งทอ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	4
1. หลักการและเหตุผล	5
2. วัตถุประสงค์	5
3. วิธีดำเนินการวิจัย	6
4. ผลการดำเนินการวิจัย	19
5. สรุปผลการดำเนินการวิจัย	36
6. การเผยแพร่ผลงานและการผลิตบัณฑิต	36
7. ข้อมูลดิบ	60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนในด้านเงินทุนวิจัยและความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณโครงการ OECF-TJTTP ที่สนับสนุนในด้านเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณ Professor Mitsuo Ueda จาก Kyoto Institute of Technology สำหรับความรู้เรื่องการประยุกต์เอนไซม์ในกระบวนการทางสิ่งทอ ขอขอบคุณฝ่ายประสานงานชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอและผู้ประเมินโครงการวิจัยทุกท่าน

ผู้วิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

1. หลักการและเหตุผล

ขั้นตอนการเตรียมผ้าก่อนย้อม/พิมพ์/ตกแต่งสำเร็จเป็นขั้นตอนที่ใช้สารเคมีและน้ำมาก น้ำเสียจากขั้นตอนจึงมีมาก ทำให้ต้องใช้สารเคมีจำนวนมากเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อนทิ้งลงแหล่งน้ำสาธารณะ ปัจจุบันมีผู้ประกอบการสิ่งทอและนักวิจัยจำนวนหนึ่งให้ความสนใจที่จะเลือกใช้สารเคมีที่บำบัดง่ายและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย เช่น การใช้เอนไซม์แทนสารเคมีอันตราย เอนไซม์ที่ใช้อยู่แล้วในโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ คือ เอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลสและคาทาเลสสำหรับการไล่แป้งบนผ้าฝ้ายทอ การกำจัดขนบนผ้าฝ้าย/การทำยีนส์ฟอก และการกำจัดสารเปอร์ออกไซด์ตกค้างบนผ้าฝ้ายหลังฟอก ตามลำดับ

ขั้นตอนการเตรียมผ้าฝ้ายอีก 2 ขั้นตอนที่มีแนวโน้มสามารถใช้เอนไซม์ได้ คือ การกำจัดสิ่งสกปรกไขมันและชี้ผึ้งบนผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอส เพกติเนสและเซลลูเลส และการฟอกผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์ไซลาเนส/เซลลูเลส เปอร์ออกซิเดสหรือกลูโคสออกซิเดส จากผลการวิจัยเบื้องต้นพบว่า การใช้เอนไซม์เพกติเนสร่วมกับเซลลูเลสในการกำจัดสิ่งสกปรกจะให้ผลการกำจัดไขมันและชี้ผึ้งออกได้ดีเทียบเท่าผลจากกระบวนการเดิมที่ใช้ด่างคือ ผ้าที่ได้มีความสามารถดูดซึมน้ำได้ดีแต่ผ้ามีความแข็งแรงลดลงบ้างเล็กน้อย การฟอกด้วยเอนไซม์ที่ได้ผลดีที่สุดคือ การฟอกด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งได้ผ้าที่มีความขาวมากขึ้นแต่ยังไม่สูงเท่าผ้าที่ฟอกด้วยสารเปอร์ออกไซด์

โครงการวิจัยนี้มีความต้องการทดลองทำการลอกแป้งผ้าฝ้ายทอด้วยเอนไซม์อะไมเลสทั้งที่ผลิตเองและที่ซื้อมา ทำการกำจัดสิ่งสกปรกไขมันและชี้ผึ้งบนผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์เพกติเนส ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสทั้งที่ผลิตเองและที่ซื้อมาและทำการการฟอกผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดสและไซลาเนสทั้งที่ผลิตเองและที่ซื้อมา ซึ่งผลการทดลองนี้จะถูกเปรียบเทียบกับการลอกแป้ง การกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอกผ้าฝ้ายด้วยสารเคมีที่ใช้อยู่ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้ายในปัจจุบัน

เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งที่ผลิตเองและที่ซื้อมาจากต่างประเทศ เอนไซม์ที่ผลิตเองประกอบด้วยอะไมเลส ไลเปส โปรทีเอส เซลลูเลสและไซลาเนส ซึ่งผลิตจากห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมีและภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนเอนไซม์ที่ซื้อมาประกอบด้วยอะไมเลส ไลเปส โปรทีเอส เซลลูเลส ไซลาเนส เพกติเนส เปอร์ออกซิเดสและกลูโคสออกซิเดส

โครงการวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อสนับสนุนให้มีการผลิตและใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย (ซึ่งใช้พลังงานในกระบวนการต่ำและน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการจะบำบัดง่าย) แทนการใช้สารเคมี (ซึ่งใช้พลังงานในกระบวนการมากและน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการจะมีความเป็นด่างสูงต้องบำบัดด้วยกรด) ตามที่ใช้ในอุตสาหกรรมเตรียมผ้าฝ้ายในปัจจุบัน

2. วัตถุประสงค์

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์คือ เพื่อศึกษาผลของการเตรียมผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบกับการเตรียมผ้าฝ้ายด้วยสารเคมีที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม และเพื่อสนับสนุนการผลิตและการใช้เอนไซม์

ที่สามารถผลิตได้เองในประเทศแทนเอนไซม์นำเข้าจากต่างประเทศ

3. วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้มีการดำเนินงาน 2 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการผลิตเอนไซม์และการจัดหาเอนไซม์และสารเคมี และส่วนหลังเป็นการนำเอนไซมและสารเคมีไปใช้ในการเตรียมผ้าฝ้ายและการทดสอบผ้าฝ้ายดังต่อไปนี้

3.1 การผลิตเอนไซม์ (ดูรายละเอียดจากรายงานใน 2 บทแรก) และการจัดหาเอนไซม์และสารเคมี

3.1.1 การผลิตและการจัดหาเอนไซม์อะไมเลสสำหรับการลอกแป้งบนผ้าฝ้ายทอ

3.1.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส และการจัดหาเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอส เซลลูเลส เพกติเนสและสารเคมีสำหรับการกำจัดสิ่งสกปรกไขมันและซี่ผึ้งออกจากผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก (คณะผู้วิจัยไม่มีผู้ผลิตเอนไซม์เพกติเนส)

3.1.3 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส และการจัดหาเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส เปอร์ออกซิเดส กลูโคสออกซิเดสและสารเคมีสำหรับการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก (คณะผู้วิจัยไม่มีผู้ผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและกลูโคสออกซิเดส)

3.1.4 เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (ของเหลว), ไลเปส (ของเหลวและผง), โปรทีเอส (ผง), เซลลูเลส (ของเหลว), และไซลาเนส (ของเหลว) หลังการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ถูกทดสอบหาค่าแอคติวิตี้และหาภาวะการใช้งานที่เหมาะสม (ดูรายละเอียดผลการทดสอบจากรายงานใน 2 บทแรก)

ตารางที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นและภาวะการใช้งานที่เหมาะสม

เอนไซม์	ผลิตจาก	แอคติวิตี้	pH	อุณหภูมิ (°C)
อะไมเลส	Bacillus subtilis	1,022 หน่วย/มก	7.0	40-60
อะไมเลส	Bacillus subtilis	ไม่มีข้อมูล	7.0	40-60
อะไมเลส	Bacillus subtilis	ไม่มีข้อมูล	7.0	40-50
อะไมเลส	Bacillus subtilis	ไม่มีข้อมูล	6.5	40
ไลเปส	P.aeruginosa	8.33 หน่วย/มก	6.0	35
ไลเปส	P.aeruginosa	98.04 หน่วย/มก	6.5	35
ไลเปส	P.aeruginosa	20.1 หน่วย/มล	8.0	40
ไลเปส	Fungal	5.25 หน่วย/มล	5.6	30

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เอนไซม์	ผลิตจาก	แอคติวิตี้	pH	อุณหภูมิ (°C)
โปรทีเอส	Bacillus subtilis	7.39 หน่วย/มก	10.5	45
โปรทีเอส	Bacillus subtilis	16,365 หน่วย/มก	6.0	35-40
โปรทีเอส	Bacillus subtilis	3,500 หน่วย/มล	10.6	40
เซลลูเลส	Trichoderma reesei	26.356 หน่วย/มล	4.8	50
เซลลูเลส	Trichoderma reesei	69.577 หน่วย/มล	4.8	50
เซลลูเลส	Trichoderma reesei	73.886 หน่วย/มล	5.0	30
เซลลูเลส	Trichoderma reesei	0.118 หน่วย/มล	4.8	50
เซลลูเลส	Trichoderma reesei	0.295 หน่วย/มล	4.8	50
เซลลูเลส	Trichoderma reesei	1.113 หน่วย/มล	4.8	50
ไซลาเนส	Aureobasidium pullulans	1,006.364 หน่วย/มล	5.0	50
ไซลาเนส	Aureobasidium pullulans	17,490.200 หน่วย/มล	4.8	60
ไซลาเนส	Aureobasidium pullulans	87,109.561 หน่วย/มล	5.0	30

3.1.5 เอนไซม์ที่จัดหามาประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (ของเหลว), ไลเปส (ผง), โปรทีเอส (ผง), เซลลูเลส (ผง), ไซลาเนส (ผง), เพกติเนส (ผง), เปอร์ออกซิเดส (ผง), และกลูโคสออกซิเดส (ผง)

ตารางที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ที่จัดหามาและภาวะการใช้งานที่เหมาะสม

เอนไซม์	ผลิตจาก	แอคติวิตี้	pH	อุณหภูมิ (°C)
อะไมเลส	Bacillus subtilis	120,000 หน่วย/กรัม	6.5	100
ไลเปส	Porcine Pancreas	15 หน่วย/กรัม	8.0	37

ตารางที่ 2 (ต่อ)

เอนไซม์	ผลิตจาก	แอคติวิตี้	pH	อุณหภูมิ (°C)
โปรทีเอส	Aspergillus oryzae	14,000 หน่วย/กรัม	7.0	37
เซลลูเลส	Aspergillus niger	25,000 หน่วย/กรัม	4.5	40
ไซลาเนส	Trichoderma viride	300,000 หน่วย/กรัม	4.5	30
เพกติเนส	Aspergillus niger	1,700 หน่วย/กรัม	4.0	37
เปอร์ออกซิเดส	Horseradish	170,000 หน่วย/กรัม	6.0	20
กลูโคสออกซิเดส	Aspergillus niger	18,000 หน่วย/กรัม	7.0	25

3.2 การนำเอนไซมและสารเคมีไปใช้ในการเตรียมผ้าฝ้าย 3 ขั้นตอนคือ การลอกแป้งบนผ้าฝ้ายทอ การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก และการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก และการทดสอบผ้าฝ้าย

3.2.1 การจัดหาผ้าฝ้ายดิบและการทดสอบผ้าฝ้ายดิบ

ผ้าฝ้ายดิบที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 4 ชนิดประกอบด้วย ผ้าทอหนา ผ้าทอบาง ผ้าถักหนาและผ้าถักบาง และผ้าทั้งสี่นี้ถูกทดสอบสมบัติตามมาตรฐานการทดสอบดังนี้

- ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load (ASTM D5035)
- ความแข็งแรงของผ้าถัก-ความต้านทานแรงดันทะลุ, bursting strength (JIS L0888)
- ชนิดของแป้งบนผ้าทอ-spot test (Livengood, C. "Spot Test for Identification of Warp Sizes on Fabrics," Textile Industries, 147(9):114-116, 1983)
- ระดับของแป้งบนผ้าทอ-TEGEWA violet scale test method (จาก Technical information TI/T 170 defs ของ Textile and Leather Dyes and Chemicals, September 1994)
- การดูดซึมน้ำของผ้า-absorbency of fabric (AATCC Test Method 79)
- ปริมาณสิ่งสกปรกบนผ้า-extractable content of greige and/or prepared textiles (AATCC Test Method 97)
- ระดับของเพกตินบนผ้า-absorption of methylene blue โดยการย้อมผ้าด้วยสี methylene blue ที่ความเข้มข้น 0.001 โมล/ลิตร อุณหภูมิ 70°C L/R 1:50 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายสีที่เหลือจากการย้อมไปวัดหาค่าการดูดซับ (absorbance) แสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เทียบหาความเข้มข้นสารละลายสีนี้กับ calibration

curve ระหว่างค่าการดูดซับแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารละลายสี methylene blue แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสี methylene blue บนผ้า ถ้ามีค่าสูงแสดงว่าผ้ามีระดับของเพกตินสูงโดยใช้หลักการว่าเพกตินบนผ้ามีประจุลบจะดูดติดสี methylene blue ที่มีประจุบวก

- ความขาวของผ้า-whiteness วัดความขาวของผ้าด้วยเครื่องวัดสี MacBeth COLOR-EYE® 7000 reflectance spectrophotometer

3.2.2 การลอกแป้งบนผ้าฝ้ายทอและการทดสอบผ้าฝ้ายทอ

3.2.2.1 การลอกแป้งบนผ้าฝ้ายทอด้วยเอนไซม์ที่จัดหามาและการทดสอบผ้าฝ้ายทอ

เอนไซม์ที่ใช้นี้คือ เอนไซม์อะไมเลส โดยได้รับความอนุเคราะห์ให้จาก บริษัท อิสท์เอเชียติก จำกัด เอนไซม์นี้มีชื่อทางการค้าว่า Termamyl 120L มีแอคติวิตี้ 120,000 หน่วย/กรัม

- ผ้าฝ้ายทอ (ผ้าดิบ) ถูกลอกแป้งในสารละลายที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์เป็นสารช่วยให้เอนไซม์เสถียร, สารช่วยเปียกที่ไม่มีประจุชื่อ Womine TE (Tokai Seiyu จากญี่ปุ่น) และเอนไซม์ Termamyl 120L (Novo Nordisk จากเดนมาร์ค) ในเครื่องย้อมขนาดเล็ก Ahiba Polymat® ใช้อัตราส่วนผ้าต่อสารละลายหรือ liquor ratio 1:20, ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นผ้าจะถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ล้างและตากผ้าให้แห้ง ปริมาณเอนไซม์และสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถลอกแป้งออกจากผ้าได้หมดหรือเกือบหมด (ทดสอบผ้าได้ TEGEWA violet scale ระดับ 8-9)
- ผ้าที่ผ่านการลอกแป้งแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

ระดับของแป้งบนผ้า-TEGEWA violet scale
น้ำหนักที่หายไปของผ้า-อบและชั่งผ้าจนน้ำหนักผ้าคงที่
การดูดซึมน้ำของผ้า-absorbency of fabric
ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load
ความขาวของผ้า-whiteness

3.2.2.2 การลอกแป้งบนผ้าฝ้ายทอด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นและการทดสอบผ้าฝ้ายทอ

เอนไซม์ที่ใช้นี้เป็นเอนไซม์อะไมเลสที่มาจากแหล่งการผลิตเดียวกันแต่ผลิตคนละช่วงเวลากัน มีแอคติวิตี้แตกต่างกันซึ่งมีข้อมูลเกี่ยวกับแอคติวิตี้เพียง 1 เอนไซม์เท่านั้นและมีภาวะการใช้งานต่างกันเล็กน้อยตามที่แสดงไว้ในตารางที่1

- ผ้าฝ้ายทอ (ผ้าดิบ) ถูกลอกแป้งในสารละลายที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์, สารช่วยเปียก Womine TE และเอนไซม์

อะไมเลสในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:20, ที่ pH 6.5-7.0 อุณหภูมิ 40-60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผ้าจะถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากผ้าให้แห้ง ปริมาณเอนไซม์และสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถลอกแป้งออกจากผ้าได้หมดหรือเกือบหมด

- ผ้าที่ผ่านการลอกแป้งแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

ระดับของแป้งบนผ้า-TEGEWA violet scale
น้ำหนักที่หายไปของผ้า-อบและชั่งผ้าจนน้ำหนักผ้าคงที่
การดูดซึมน้ำของผ้า-absorbency of fabric
ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load
ความขาวของผ้า-whiteness

3.2.3 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักและการทดสอบผ้าฝ้าย

3.2.3.1 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และการทดสอบผ้าฝ้าย

- ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกในสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารช่วยเปียก Womine TE ใช้ liquor ratio 1:20 ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในเครื่องย้อมขนาดเล็ก จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ล้างและตากแห้ง ปริมาณสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันทีหรือภายใน 3 วินาที

(ได้มีการศึกษาผลของสารช่วยเปียกต่อการดูดซึมน้ำของผ้า โดยนำผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) มาแช่ในสารละลายที่มีสารช่วยเปียก Womine TE ความเข้มข้น 1, 3, 5, 8, และ 10 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 37-80°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงซึ่งเป็นอุณหภูมิและเวลาที่ใช้สำหรับการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์และด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าผ้าไม่ดูดซึมน้ำทันทีแต่ดูดซึมหลังหยดน้ำบนผ้าแล้วมากกว่า 1 นาที ฉะนั้นสารช่วยเปียกนี้ไม่มีผลโดยตรงต่อการกำจัดสิ่งสกปรกเพื่อให้ผ้าดูดซึมน้ำ เป็นแต่เพียงสารช่วยการกำจัดสิ่งสกปรกให้เกิดสมบูรณ์ยิ่งขึ้น)

- ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

การดูดซึมน้ำของผ้า-absorbency of fabric
น้ำหนักที่หายไปของผ้า-อบและชั่งผ้าจนน้ำหนักผ้าคงที่
ระดับของเพกตินบนผ้า-absorption of methylene blue
ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load
ความแข็งแรงของผ้าถัก-ความต้านทานแรงดันทะลุ, bursting

strength

ความขาวของผ้า-whiteness

3.2.3.2 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่จัดหามาและการทดสอบผ้าฝ้าย

- การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์เพกติเนส

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เพกติเนสและ Womine TE ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 ที่ pH 4 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง ปริมาณเอนไซม์และสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันทีหรือภายใน 3 วินาที

- การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 8 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นไม่ดูดซึมน้ำทันทีแต่ดูดซึมหลังหยดน้ำบนผ้าแล้วมากกว่า 1 นาที

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์โปรทีเอส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นไม่ดูดซึมน้ำทันทีแต่ดูดซึมหลังหยดน้ำบนผ้าแล้วมากกว่า 1 นาที

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่า ผ้าทุกชิ้นไม่ดูดซึมน้ำทันทีแต่ดูดซึมหลังหยดน้ำบนผ้าแล้วมากกว่า 1 นาที

-จากผลนี้แสดงว่าการใช้เอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสหรือเซลลูเลสอย่างเดียวร่วมกับสารช่วยเปียก Womine TE ไม่สามารถกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายออกได้มากพอที่ทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีจึงได้ทำการลองใช้เอนไซม์ร่วมกันดังนี้

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 8 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นดูดซึมน้ำทันทีหลังหยดน้ำลงบนผ้า

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์โปรทีเอส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นดูดซึมน้ำทันทีหลังหยดน้ำลงบนผ้า

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เอนไซม์ไลเปสและโปรทีเอส (50%/50%) 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นไม่ดูดซึมน้ำทันทีแต่ดูดซึมหลังหยดน้ำลงบนผ้าแล้วมากกว่า 1 นาที

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เอนไซม์

ไลเปสและโปรทีเอส (50%/50%) 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นดูดซึมน้ำทันทีหลังหยดน้ำลงบนผ้า

-จากผลนี้แสดงว่าการใช้เอนไซม์หลายชนิดสามารถช่วยการกำจัดสิ่งสกปรกได้ดีขึ้นมาก จึงมีการทดลองลดปริมาณการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดและลดเวลาในการกำจัดสิ่งสกปรกลงจนได้วิธีดังต่อไปนี้

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปส 0.5 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 8 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 0.5 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นดูดซึมน้ำทันทีหลังหยดน้ำลงบนผ้า

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์โปรทีเอส 0.5 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 0.5 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นดูดซึมน้ำทันทีหลังหยดน้ำลงบนผ้า

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปส

และโปรทีเอส (50%/50%) 0.5 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 0.5 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°C ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง พบว่าผ้าทุกชิ้นดูดซึมน้ำทันทีหลังหยดน้ำลงบนผ้า

- การทดสอบผ้าฝ้าย

-ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

การดูดซึมน้ำของผ้า-absorbency of fabric
น้ำหนักที่หายไปของผ้า-อบและชั่งผ้าจนน้ำหนักผ้าคงที่
ระดับของเพกตินบนผ้า-absorption of methylene blue
ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load
ความแข็งแรงของผ้าถัก-ความต้านทานแรงดันทะลุ, bursting strength
ความขาวของผ้า-whiteness

3.2.3.3 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นและการทดสอบผ้าฝ้าย

- การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอส และเซลลูเลส

-การลอกแป้งผ้าฝ้ายทอด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นไม่สามารถลอกแป้งออกจากผ้าจนหมดหรือเกือบหมดได้ จึงไม่ได้ใช้ผ้าเหล่านี้ในการกำจัดสิ่งสกปรกแต่ใช้ผ้าที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาแทน

-ทำการทดลองกำจัดสิ่งสกปรกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสที่ผลิตขึ้นตามวิธีเดียวกับที่ได้กระทำเมื่อกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสที่จัดหามา สรุปได้ดังนี้

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปส 0.5-20 กรัม/ลิตรและสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 5.6, 6.0, 6.5 และ 8.0 อุณหภูมิ 30, 35, 35 และ 40°C ตามลำดับ ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย

เอนไซม์เซลลูเลส 0.5-20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.8 และ 5.0 อุณหภูมิ 50 และ 30°C ตามลำดับ ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง

-ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามาและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์โปรทีเอส 0.5-20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 6.0, 10.5 และ 10.6 อุณหภูมิ 35-40, 45 และ 40°C ตามลำดับ ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง และถูกกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย เอนไซม์เซลลูเลส 0.5-20 กรัม/ลิตร และสารช่วยเปียก Womine TE 1 กรัม/ลิตร ที่ pH 4.8 และ 5.0 อุณหภูมิ 50 และ 30°C ตามลำดับ ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 เป็นเวลา 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง

• การทดสอบผ้าฝ้าย

-ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

การดูดซึมน้ำของผ้า-absorbency of fabric

น้ำหนักที่หายไปของผ้า-อบและชั่งผ้าจนน้ำหนักผ้าคงที่

ระดับของเพกตินบนผ้า-absorption of methylene blue

ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load

ความแข็งแรงของผ้าถัก-ความต้านทานแรงดันทะลุ, bursting strength

ความขาวของผ้า-whiteness

3.2.4 การฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักและการทดสอบผ้าฝ้าย

3.2.4.1 การฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และการทดสอบผ้าฝ้าย

• ผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถูกฟอกในสารละลายที่ประกอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมซิลิเกตและสารช่วยเปียก WomineTE ในเครื่องย้อมขนาดเล็ก ใช้ liquor ratio 1:20 ที่ pH 11.5 อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผ้าถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ล้างและตากแห้ง ปริมาณสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่ทำให้ผ้ามีความขาวใกล้เคียงหรือตั้งแต่ 70 ขึ้นไป

• ผ้าที่ผ่านการฟอกแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

ความขาวของผ้า-whiteness
ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load
ความแข็งแรงของผ้าถัก-ความต้านทานแรงดันทะลุ, bursting strength
การตกค้างของสารเปอร์ออกไซด์บนผ้า-residual peroxide, spot test (A Bleachers Handbook, Interox, 1980)
pH ของผ้า-pH ของน้ำสกัดจากผ้า (AATCC Test Method 81)

3.2.4.2 การฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่จัดหามาและการทดสอบผ้าฝ้าย

• การฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

-การฟอกผ้าด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสใช้หลักการที่ว่า เมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ผสมกับกลูโคสในสารละลายที่มีออกซิเจนที่ประมาณ 25°C, pH 7 จะสามารถผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาซึ่งใช้ในการฟอกผ้าฝ้ายได้ และในขณะเดียวกันก็ผลิตกรดกลูโคนิคด้วย ก่อนการฟอกจึงต้องมีการเตรียมสารละลายฟอกก่อน โดยเริ่มจากการศึกษาปริมาณสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ณ ภาวะต่างๆ เช่น ที่ความเข้มข้นของกลูโคสและเวลาการให้ออกซิเจนต่างๆ ดังนี้

-เตรียมสารละลายที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1 กรัม/ลิตร, กลูโคส 10-80 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และพ่นออกซิเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายด้วยวิธีโปรแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต (A Bleachers Handbook, Interox, 1980) แสดงผลในรูปที่ 1 พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกผลิตออกมามากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสราวๆ 50-60 กรัม/ลิตร จึงทำการเตรียมสารละลายอีกกลุ่มเพื่อศึกษาเวลาการให้ออกซิเจนแก่สารละลาย ดังนี้

-เตรียมสารละลายที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1 กรัม/ลิตร, กลูโคส 50 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และพ่นออกซิเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายด้วยวิธีโปรแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต แสดงผลในรูปที่ 2 พบว่าเวลา 2 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสำหรับการให้ออกซิเจนแก่สารละลายฟอกนี้

-เตรียมสารละลายฟอกโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1 กรัม/ลิตร กลูโคส 50 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และพ่นออกซิเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อพร้อมจะฟอกผ้า เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม/ลิตรและปรับ liquor ratio ให้เป็น 1:20 จากนั้นเติมผ้าที่ผ่าน

การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสและทำการฟอกที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นต้มผ้าในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง

• การฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและไซลาเนส

-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและไซลาเนสที่จัดหามามีปริมาณน้อยมากเพราะมีราคาแพงมาก การทดลองพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีสีน้ำตาลอ่อนซึ่งเมื่อนำมาฟอกผ้าที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยมีและไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาณเล็กน้อยไม่สามารถเพิ่มความขาวของผ้าได้เลยและยังทำให้ผ้าหมองขึ้นเมื่อฟอกโดยไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนการฟอกผ้าด้วยเอนไซม์ไซลาเนสที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ก็ไม่ได้เพิ่มความขาวให้ผ้าเช่นกัน จึงไม่ได้ทำการฟอกผ้าด้วยเอนไซม์ที่จัดหามา 2 ชนิดนี้อีก

• การทดสอบผ้าฝ้าย

-ผ้าที่ผ่านการฟอกแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

ความขาวของผ้า-whiteness

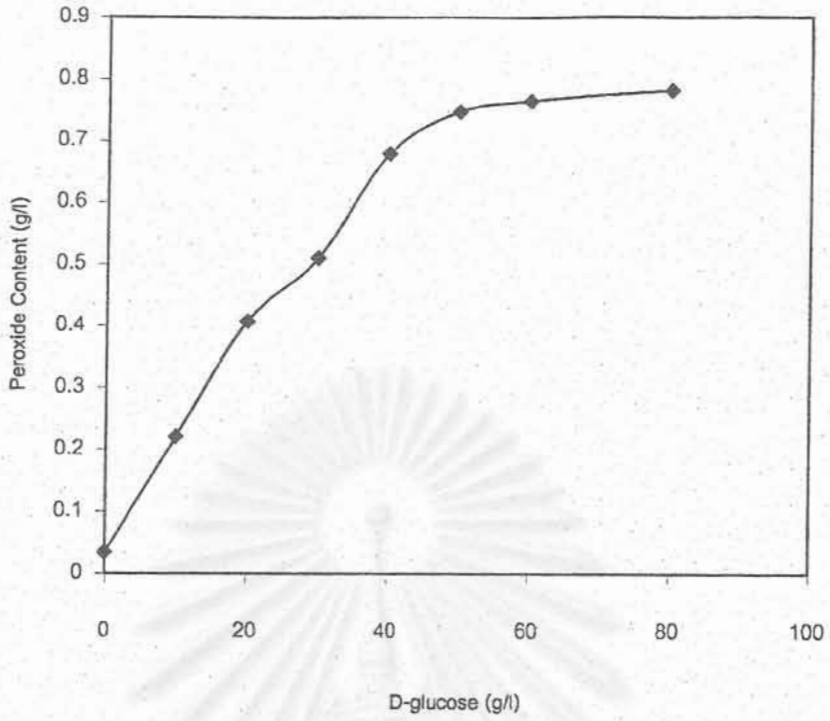
ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load

ความแข็งแรงของผ้าถัก-ความต้านทานแรงดันทะลุ, bursting strength

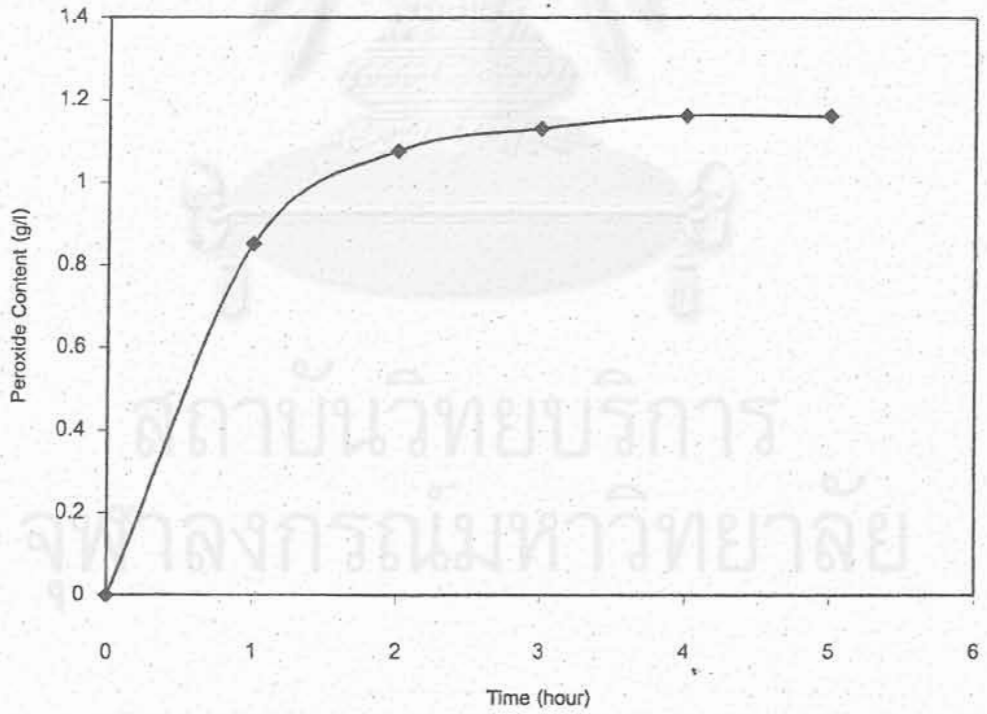
การตกค้างของสารเปอร์ออกไซด์บนผ้า-residual peroxide

pH ของผ้า-pH ของน้ำสกัดจากผ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1 กรัม/ลิตร, กลูโคส 10-80 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และพ่นออกซิเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1 กรัม/ลิตร, กลูโคส 50 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และพ่นออกซิเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง

3.2.4.3 การฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นและการทดสอบผ้าฝ้าย

• การฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ไซลาเนส

-ผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกถูกฟอกด้วยเอนไซม์ไซลาเนสเข้มข้นที่ pH 4.8, 5.0 และ 5.0 อุณหภูมิ 60, 30 และ 50°C ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้liquor ratio 1:50 จากนั้นต้มผ้าในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ล้างและตากแห้ง

• การทดสอบผ้าฝ้าย

-ผ้าที่ผ่านการฟอกแล้วถูกทดสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

ความขาวของผ้า-whiteness

ความแข็งแรงของผ้าทอ-แรงดึงขาด, breaking load

ความแข็งแรงของผ้าถัก-ความต้านทานแรงดันทะลุ, bursting strength

pH ของผ้า-pH ของน้ำสกัดจากผ้า

4. ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบผ้าฝ้ายดิบ

ผ้าฝ้ายดิบ 4 ชนิดประกอบด้วยผ้าทอหนา ผ้าทอบาง ผ้าถักหนาและผ้าถักบางถูกทดสอบสมบัติต่างๆ แสดงผลในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติของผ้าฝ้ายดิบต่างๆ

สมบัติของผ้า	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
โครงสร้าง	ลายขัด	ลายสอง	เจอร์ซี่	เจอร์ซี่
เบอร์ด้าย	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	50/1	24/2
น้ำหนัก (กรัม/100ตร.ซม.)	1.50	3.90	1.18	2.79
ชนิดของแป้ง	แป้งมัน	แป้งมันและพีวีเอ	ไม่มี	ไม่มี
ระดับของแป้ง (TEGEWA violet scale, 1=มากสุด 9 = ไม่มี)	1 (มากสุด)	1 (มากสุด)	9 (ไม่มี)	9 (ไม่มี)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สมบัติของผ้า	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
ปริมาณMB methylene blue กรัม/ลิตร (ระดับของเพกติน)	0.3988 (ปริมาณ MB สูง	0.4406 หมายถึงมีปริมาณ	0.4028 เพกตินสูงด้วย)	0.3932
ปริมาณสิ่งสกปรก (%)	9.029	9.129	2.959	2.391
แรงดึงขาด (นิวตัน)	ยืน 213.6 พุ่ง 155.3	ยืน 568.7 พุ่ง 247.0	ไม่มีการทดสอบ	ไม่มีการทดสอบ
ความต้านทานแรงดันทะลุ (กก/ตร.ซม.)	ไม่มีการทดสอบ	ไม่มีการทดสอบ	6.04	13.98
ความขาว	< 0	< 0	5.348	< 0
การดูดซึมน้ำ	ไม่ดูดซึมน้ำ			

ผ้าฝ้ายดิบทั้งสี่นี้ไม่ดูดซึมน้ำเมื่อหยดน้ำลงบนผ้า มีความขาวอยู่ในระดับที่ต่ำด้วยสีธรรมชาติของฝ้าย และมีปริมาณสารที่สกัดออกจากผิวผ้าหรือสิ่งสกปรกอยู่ประมาณ 9% ในผ้าทอซึ่งประกอบด้วยแป้ง ไขมัน ขี้ผึ้ง เพกตินและอื่นๆ และ 2-3% ในผ้าถักซึ่งประกอบด้วยสารจากธรรมชาติเหมือนบนผ้าทอแต่ไม่มีแป้ง

4.2 ผลการลอกแป้งบนผ้าฝ้ายทอด้วยเอนไซม์ที่จัดหามา

ผ้าทอบางและผ้าทอหนาถูกลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสชื่อ Termamyl 120L และถูกทดสอบสมบัติต่างๆ แสดงในตารางที่ 4 พร้อมสูตรการลอกแป้งที่เหมาะสม

การลอกแป้งด้วยสูตรในตารางสามารถไล่แป้งออกจากผ้าได้หมด โดยวัดระดับของแป้งตกค้างบนผ้าด้วย TEGEWA violet scale ได้ 8-9 ซึ่งเป็นระดับที่ไม่มีแป้งหลงเหลือบนผ้าพร้อมสำหรับการเตรียมผ้าในขั้นตอนต่อไปได้ (ในโรงงานกำหนดว่าผ้าที่ลอกแป้งแล้วทดสอบหาแป้งตกค้างบนผ้าด้วยวิธีนี้ควรได้ TEGEWA violet scale ที่มากกว่า 6 ขึ้นไป จึงจะสามารถย้อมและพิมพ์ผ้าด้วยสีรีแอคทีฟได้ แต่การลอกแป้งผ้าในระดับห้องปฏิบัติการควรได้ค่านี้ตั้งแต่ 8 ขึ้นไปเพราะการลอกแป้งในระดับห้องปฏิบัติการควรได้ผลดีและสม่ำเสมอกว่าการลอกแป้งในระดับอุตสาหกรรม) อย่างไรก็ตามผ้ายังมีการดูดซึมน้ำไม่ดี ผ้าสูญเสียน้ำหนักไปประมาณ 8.7% ซึ่งเป็นการสูญเสียน้ำหนักของแป้งบนผ้า สารที่ละลายน้ำบนผ้าและเศษเส้นใยที่หลุดจากผ้าขณะทำการลอกแป้ง ผ้าทอบางมีค่าแรงดึงขาดลดลงไปประมาณ 14% ในแนวด้ายยืนและมีค่ามากขึ้น 1.5% ในแนวด้ายพุ่ง ในขณะที่ผ้าทอหนามีค่าแรงดึงขาดลดลงไป 10% ในแนวด้ายยืนและมีค่ามากขึ้น 22% ในแนวด้ายพุ่งเมื่อเทียบกับค่าแรงดึงขาดของผ้าดิบ ผ้ามีความขาวเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากผ้าดิบแต่ยังมีค่าต่ำอยู่

ตารางที่ 4 สมบัติของผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส Termamyl 120L และสูตรการลอกแป้งที่เหมาะสม

สูตรการลอกแป้งและสมบัติของผ้า	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา
Termamyl 120L (กรัม/ลิตร)	1.0	2.0
โซเดียมคลอไรด์ (กรัม/ลิตร)	4.0	4.0
แคลเซียมคลอไรด์ (กรัม/ลิตร)	0.3	0.3
Womine TE (กรัม/ลิตร)	1.0	1.0
pH	6.5	
อุณหภูมิ (°C)	100	
เวลา (นาที)	45	
liquor ratio	1:20	
TEGEWA violet scale	8-9	8-9
น้ำหนักที่หายไปของผ้า (%)	8.73	8.68
แรงดึงขาด (นิวตัน)	ยืน 183.4 พุ่ง 157.6	ยืน 511.1 พุ่ง 301.6
การดูดซึมน้ำ	ดูดซึมหลังหยดน้ำบนผ้าแล้วหลายนาที	
ความขาวของผ้า	5.487	2.901

4.3 ผลการลอกแป้งบนผ้าฝ้ายทอด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น

ผ้าทอบางและผ้าทอหนาถูกลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้น 4 ครั้งจากแหล่งเดียวกัน ซึ่งการผลิตแต่ละครั้งต้องใช้เวลานานและผลิตได้ปริมาณน้อย เพียงพอเฉพาะการลอกแป้งเพื่อการทดสอบหาระดับแป้งตกค้างบนผ้าด้วย TEGEWA violet scale แต่ไม่พอเมื่อต้องการลอกแป้งและทดสอบหาสมบัติอื่นๆ ของผ้า เอนไซม์อะไมเลสนี้ไม่สามารถลอกแป้งออกจากผ้าได้หมดเหมือนเอนไซม์อะไมเลส Termamyl 120L หลังการลอกแป้งพบว่า ผ้ามี TEGEWA violet scale อยู่ในระดับ 2-7 ซึ่งแสดงว่ายังมีแป้งตกค้างบนผ้าและผ้าไม่ดูดซึมน้ำ (ดูตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การลอกแป้งผ้าฝ้ายทอด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นและระดับของแป้งบนผ้า

อะไมเลส (กรัม/ลิตร)	pH	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)	Tegewa Violet Scale ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา
20	7.0	50	1	3-4	3
30	7.0	50	1	3-4	3
เข้มข้น	7.0	40	1	6-7	6-7
เข้มข้น	7.0	50	1	5	4
เข้มข้น	7.0	60	1	5	4

ตารางที่ 5 (ต่อ)

อะไมเลส (กรัม/ลิตร)	pH	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)	Tegewa Violet Scale ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา
เข้มข้น	7.0	40	1	5	5
เข้มข้น	7.0	50	1	6	6
เข้มข้น	6.5	40	1	6-7	6-7
เข้มข้น	7.0	40	1	3	4
เข้มข้น	7.0	50	1	4	5
เข้มข้น	7.0	60	1	1	2-3

หมายเหตุ การลอกแป้งนี้ใช้โซเดียมคลอไรด์ 4 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.3 กรัม/ลิตร
Womine TE 1 กรัม/ลิตร ในเครื่องย้อมขนาดเล็กใช้ liquor ratio 1:20

การลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นนี้กระทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า (40-60°C) การลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส Termamyl 120L (100°C) ที่จัดหามาทั้งนี้เพราะ Termamyl 120L เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้สูงกว่า สามารถใช้งานที่อุณหภูมิสูงได้ และการลอกแป้งที่อุณหภูมิสูงนี้สามารถลอกแป้งมันและพีวีเอออกจากผ้าได้มากและดีกว่าการลอกแป้งที่อุณหภูมิต่ำ และคณะผู้วิจัยไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้จากเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่

4.4 ผลการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก

4.4.1 ผลการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ตารางที่ 6 แสดงผลการดูดซึมน้ำของผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่าด้วยปริมาณสารเคมีและภาวะที่แสดงนี้สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันทีหลังการกำจัดสิ่งสกปรกและผ้าหนาจำเป็นต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในปริมาณที่มากกว่าผ้าบางสำหรับการกำจัดสิ่งสกปรกทั้งที่ระดับของเพกตินและสิ่งสกปรกไม่ได้แตกต่างกันนักอาจเป็นเพราะผ้าทอหนามีโครงสร้างผ้าลายสองซึ่งแน่นกว่าผ้าทอบางที่มีโครงสร้างผ้าลายขัด และผ้าถักหนามีเส้นด้ายขนาดใหญ่กว่า (24/2) เส้นด้ายในผ้าทอบาง (50/1) ทำให้ผ้าหนาต้องใช้ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์สำหรับกำจัดสิ่งสกปรกออกจากผ้ามากกว่าผ้าบาง

ตารางที่ 6 การดูดซึมน้ำของผ้าฝ้ายต่างๆ หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และสูตรการกำจัดสิ่งสกปรกที่เหมาะสม

สูตรการกำจัดสิ่งสกปรก	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
การดูดซึมน้ำ	ทันที	ทันที	ทันที	ทันที
NaOH (%ของน้ำหนักของผ้า)	2	4	3	5
Womine TE (กรัม/ลิตร)	3	3	3	3

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สูตรการกำจัดสิ่งสกปรก	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
อุณหภูมิ (°C)		80		
เวลา (ชั่วโมง)		1		
liquor ratio		1:20		

เมื่อทดสอบหาน้ำหนักที่หายของผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่าผ้าทอบางหายไป 1.32%, ผ้าทอหนา 1.61%, ผ้าถักบาง 3.32 และผ้าถักหนา 3.08% (ดูตารางที่ 7) ซึ่งน้ำหนักที่หายไปนี้คือสิ่งสกปรกบนผ้าที่หลุดออกมาที่ประกอบด้วยไขมัน ขี้ผึ้ง เพกติน โปรทีน แร่ธาตุและอื่นๆ โดยผ้าทอสูญเสียน้ำหนักไปน้อยกว่าผ้าถักราว 1 เท่าตัว อาจเนื่องมาจากสิ่งสกปรกที่ละลายน้ำบนผ้าทอถูกกำจัดออกไปแล้วเมื่อผ้าทอถูกลอกแป้งในขั้นตอนก่อนหน้านี้ ฝ้ายโดยปกติประกอบด้วยเพกติน 0.9% ขี้ผึ้งและไขมัน 0.6% โปรทีน 1.3% แร่ธาตุ 1.2% และอื่นๆ อีก 2% รวมเป็น 6% อีก 94% เป็นเซลลูโลส สิ่งสกปรกที่หลุดออกมาจากผ้าทอทั้งสองชนิดนี้ส่วนใหญ่ควรเป็นไขมัน ขี้ผึ้งและเพกติน (รวมกันราว 1.46%) แต่ที่หลุดออกมาจากผ้าถักน่าจะเป็นสิ่งที่ละลายน้ำ ไขมัน ขี้ผึ้งและเพกติน (รวมกันราว 3.20% โดย 1.74% เป็นสิ่งที่ละลายน้ำ และ 1.46% เป็นไขมัน ขี้ผึ้งและเพกติน ถ้าถือว่ามีการสูญเสียเส้นใยน้อยมาก) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารช่วยเปียกจะทำหน้าที่เปลี่ยนไขมัน/น้ำมัน ขี้ผึ้ง เพกตินและสิ่งสกปรกอื่นๆ ให้กลายเป็นสารที่ละลายน้ำและบางส่วนแขวนลอยในน้ำแยกตัวออกจากผ้าด้วยปฏิกิริยาแซปปอนนิฟิเคชั่น (saponification) และอิมัลซิฟิเคชั่น (emulsification)

การทดสอบหาระดับเพกตินบนผ้าก่อนและหลังการกำจัดสิ่งสกปรกพบว่าปริมาณ methylene blue บนผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกมีค่าต่ำกว่าผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก (ดูตารางที่ 7) แสดงว่าผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกมีระดับของเพกตินต่ำกว่าผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก 2.2% จาก 100% เพกตินถูกกำจัดออกจากผ้าทอบาง 13.3% จากผ้าทอหนา 11.4% จากผ้าถักบาง และ 8.6% จากผ้าถักหนา หรือ 0.0198% จาก 0.9% เพกตินบนผ้าถูกกำจัดออกจากผ้าทอบาง 0.1197% จากผ้าทอหนา 0.1026% จากผ้าถักบางและ 0.0774% จากผ้าถักหนา จะเห็นว่าแม้ปริมาณเพกตินเพียง 0.02-0.12% จาก 0.9% ถูกกำจัดออกไปจากผ้าแต่ผ้าก็มีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้ดีน่าจะเป็นเพราะไขมันและขี้ผึ้งบนผ้าถูกกำจัดออกไปมาก

ตารางที่ 8 แสดงความแข็งแรงของผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกโดยวัดหาค่าแรงดึงขาดผ้าทอและความต้านทานแรงดันทะลุผ้าถัก พบว่าผ้าทอมีค่าแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นจากผ้าหลังการลอกแป้งโดยที่ผ้าทอบางมีค่าแรงดึงขาดในแนวด้ายยืนเพิ่มขึ้น 8.1% และแนวด้ายพุ่งเพิ่มขึ้น 17.6% ผ้าทอหนามีค่าแรงดึงขาดในแนวด้ายยืนเพิ่มขึ้น 5.8% และแนวด้ายพุ่งเพิ่มขึ้น 4.2% ในขณะที่ผ้าถักมีค่าความต้านทานแรงดันทะลุลดลงจากผ้าดิบหลังการกำจัดสิ่งสกปรกคือ ผ้าถักบางลดลง 5.6% และผ้าถักหนาลดลง 18.3% ซึ่งสาเหตุของการลดลงของความแข็งแรงของผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกสามารถอธิบายได้จากการสูญเสียสิ่งสกปรกที่เคลือบเส้นใย แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุที่ทำให้ผ้ามีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรก จึงควรมีการศึกษาในเรื่องนี้อย่างละเอียดต่อไป

ตารางที่ 7 น้ำหนักที่หายไปของผ้าและระดับของเพกติน (ปริมาณ methylene blue) บนผ้าหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก

ผ้าฝ้าย	น้ำหนักที่หายไปของผ้า(%)	ปริมาณ methylene blue (กรัม/ลิตร) บนผ้า
ผ้าทอบาง		
ผ้าหลังการลอกแป้ง	0.000	0.3988
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	1.318	0.3900
ผ้าทอหนา		
ผ้าหลังการลอกแป้ง	0.000	0.4406
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	1.607	0.3820
ผ้าถักบาง		
ผ้าดิบ	0.000	0.4028
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	3.322	0.3568
ผ้าถักหนา		
ผ้าดิบ	0.000	0.3932
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	3.079	0.3592

ตารางที่ 8 แรงดึงขาดและความต้านทานแรงดันทะลุของผ้าฝ้ายต่างๆ หลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก

ผ้าฝ้าย	แรงดึงขาด (นิวตัน)		ความต้านทานแรงดันทะลุ (กก/ตร.ซม.)
ผ้าทอบาง			
ผ้าดิบ	ยืน 213.6	พุ่ง 155.3	-
ผ้าหลังการลอกแป้ง	ยืน 183.4	พุ่ง 157.6	-
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	ยืน 198.3	พุ่ง 185.3	-
ผ้าทอหนา			
ผ้าดิบ	ยืน 568.7	พุ่ง 247.0	-
ผ้าหลังการลอกแป้ง	ยืน 511.1	พุ่ง 301.6	-
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	ยืน 540.9	พุ่ง 314.2	-
ผ้าถักบาง			
ผ้าดิบ	-		6.04
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	-		5.70
ผ้าถักหนา			
ผ้าดิบ	-		13.98
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	-		11.42

ตารางที่ 9 แสดงค่าความขาวของผ้าก่อนและหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าผ้าทุกชนิดมีความขาวเพิ่มขึ้นหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรก ทั้งนี้เพราะสีธรรมชาติในฝ้ายถูกทำลายโครงสร้างสีจนทำให้ไม่สามารถมองเห็นสีเดิมได้อีกและสีธรรมชาติบางส่วนถูกกำจัดออกไปพร้อมกับสิ่งสกปรกบนผ้า จะเห็นว่าผ้าฝ้ายถักมีความขาวเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากกว่าผ้าฝ้ายทอหลังการกำจัดสิ่งสกปรก อาจเนื่องมาจากผ้าฝ้ายถักสูญเสียสิ่งสกปรกที่มีสีธรรมชาติไปมากกว่าผ้าฝ้ายทอ (น้ำหนักที่หายไปของผ้าฝ้ายถักมีค่าสูงกว่าของผ้าฝ้ายทอและระดับของเพกตินในผ้าฝ้ายถักมีค่าต่ำกว่าในผ้าฝ้ายทอหลังการกำจัดสิ่งสกปรก)

ตารางที่ 9 ความขาวของผ้าฝ้ายต่างๆ หลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก

ผ้าฝ้าย	ความขาวของผ้า
ผ้าทอบาง	
ผ้าดิบ	< 0
ผ้าหลังการลอกแป้ง	5.487
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	10.947
ผ้าทอหนา	
ผ้าดิบ	< 0
ผ้าหลังการลอกแป้ง	2.901
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	4.186
ผ้าถักบาง	
ผ้าดิบ	5.348
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	23.612
ผ้าถักหนา	
ผ้าดิบ	< 0
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรก	7.884

4.4.2 ผลการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่จัดหามาซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เพกติเนสไลเปสโปรทีเอสและเซลลูเลส

จากการทดลองกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์เพกติเนสไลเปสโปรทีเอสและเซลลูเลสพบว่า เอนไซม์เหล่านี้สามารถถูกใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายได้ผลดีคือ ทำให้ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วสามารถดูดซึมน้ำได้ทันทีหรือภายใน 3 วินาทีหลังหยดน้ำลงบนผ้า โดยที่เอนไซม์เพกติเนสเร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรไลซิสของสารพอลิเมอร์ชื่อ กรดพอลิกาแลคตูโรนิค (polygalacturonic acid) ให้กลายเป็นกรดกาแลคตูโรนิคละลายน้ำแยกหลุดออกจากผ้า เอนไซม์ไลเปสช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไขมันในฝ้ายให้ละลายน้ำหลุดออกจากผ้า เอนไซม์โปรทีเอสช่วยเร่งการเปลี่ยนโปรทีนในฝ้ายให้มีขนาดโมเลกุลเล็กของกรดอะมิโนแยก

หลุดออกจากผ้า และเอนไซม์เซลลูเลสช่วยเร่งการเกิดไฮโดรไลซิสของเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลต่ำละลายน้ำ ทำให้เส้นใยฝ้ายบางส่วนหลุดออกมาจากผ้าพร้อมสิ่งสกปรกด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสหรือโปรทีเอสหรือเซลลูเลสเดี่ยวๆ กับสารช่วยเปียกไม่สามารถกำจัดสิ่งสกปรกออกจากผ้าได้มากพอที่ทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดี จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ร่วมกันอย่างต่ำ 2 ชนิด โดยการใช้เอนไซม์ไลเปสกำจัดสิ่งสกปรกในขั้นแรกแล้วตามด้วยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสกำจัดสิ่งสกปรกในขั้นต่อมาจึงจะทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดี เช่นเดียวกันต้องใช้เอนไซม์โปรทีเอสกำจัดสิ่งสกปรกในขั้นแรกแล้วตามด้วยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสกำจัดสิ่งสกปรกในขั้นต่อมา และใช้เอนไซม์ไลเปสผสมกับโปรทีเอสกำจัดสิ่งสกปรกในขั้นแรกแล้วตามด้วยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในขั้นต่อมา เมื่อได้กรรมวิธีการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสแล้วได้ทดลองลดปริมาณเอนไซม์และลดเวลาที่จำเป็นต้องใช้ พบว่าจำเป็นต้องใช้ปริมาณเอนไซม์เพียง 0.5 กรัม/ลิตร สำหรับการกำจัดสิ่งสกปรกในแต่ละขั้นรวม 2 ขั้นใช้ 1 กรัม/ลิตร (ยกเว้นผ้าถักหนาที่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์มากกว่าผ้าชนิดอื่นๆ, ดูตารางที่ 10) ใช้เวลาเพียงขั้นละ 30 นาทีรวม 2 ขั้นใช้ 1 ชั่วโมง และเวลาต้มผ้าหยุดการทำงานของเอนไซม์อีกขั้นละ 10 นาที รวมทั้งสิ้นใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 20-30 นาที การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสในการทดลองนี้จำเป็นต้องแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนเพราะเอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพการทำงานดีคนละช่วง pH (pH 4.5) กับเอนไซม์ไลเปสและโปรทีเอส (pH 7-8) จึงรวมการกำจัดสิ่งสกปรกเป็นขั้นตอนเดียวไม่ได้ เมื่อใช้ไลเปสหรือใช้ไลเปสผสมโปรทีเอสในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอบางพบว่าสามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีโดยไม่ต้องทำการกำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายถักหนาจำเป็นต้องใช้ปริมาณของเอนไซม์ทั้งสามชนิดมากกว่าการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายอื่นๆ ทั้งๆ ที่มีปริมาณสิ่งสกปรกน้อยกว่าผ้าฝ้ายอื่นๆ และมีโครงสร้างผ้าเป็นซิงเกอเจอร์ซี่เหมือนผ้าถักบาง อาจเนื่องมาจากผ้าถักหนานี้มีขนาดด้ายที่โต เมื่อถักเป็นลายเจอร์ซี่จึงแน่นกว่าผ้าถักบางและอาจทำให้การแทรกซึมของเอนไซม์บนผ้าทำได้ยากกว่าผ้าชิ้นอื่นๆ ทำให้จำเป็นต้องใช้ปริมาณเอนไซม์มากกว่า

ตารางที่ 10 การดูดซึมน้ำของผ้าฝ้ายชนิดต่างๆ หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส และปริมาณสารต่ำสุดที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรก

สาร (กรัม/ลิตร)	ผ้าทอบาง			ผ้าทอหนา			ผ้าถักบาง			ผ้าถักหนา		
ไลเปส	0.5			0.5			0.5			2		
WomineTE	1			1			1			1		
โปรทีเอส		0.5			0.5			0.5			8	
WomineTE		1			1			1			1	
ไลเปส+โปรทีเอส			0.5			0.5			0.5			1
WomineTE			1			1			1			1
เซลลูเลส		0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	5	6	3
WomineTE		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1
การดูดซึมน้ำ	ทันที											

การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าด้วยเอนไซม์ไลเปสหรือโปรทีเอสหรือไลเปสผสมโปรทีเอสจำเป็นต้องตามด้วยการกำจัดสิ่งสกปรกขั้นต่อมาด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการกำจัดโปรทีนและไขมันขี้ผึ้งบนผ้าด้วยเอนไซม์โปรทีเอสและไลเปสอาจไม่มีประสิทธิภาพดีพอ สิ่งสกปรกหลุดออกจากผ้าน้อยเกินไปจนน้ำไม่สามารถซึมผ่านลงบนผ้าได้ แต่เมื่อทำการกำจัดสิ่งสกปรกต่อมาด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์นี้จะทำให้เส้นใยเล็กๆ และสิ่งสกปรกที่ผิวหลุดออกมามากขึ้นจนสามารถทำให้ผ้าซึมน้ำได้ดีขึ้น

การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าด้วยเอนไซม์เพกติเนสสามารถกระทำได้ผลดีด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวใน 1 ขั้นตอนแต่ต้องใช้เวลาถึง 2 ชั่วโมงและเวลาต้มผ้าหยุดการทำงานของเอนไซม์อีก 10 นาที รวมเวลาทั้งสิ้นราว 2 ชั่วโมง 10-20 นาที และใช้ปริมาณเอนไซม์มากกว่า 1 กรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส ผ้าที่ได้สามารถดูดซึมน้ำได้ทันทีหรือภายใน 3 วินาทีซึ่งยอมรับได้ การใช้เอนไซม์เพกติเนสเพื่อกำจัดเพกตินบนผ้าถักหนาต้องใช้ปริมาณที่สูงกว่าผ้าอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลเดียวกับที่ต้องใช้เอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสปริมาณมากกว่าผ้าอื่นๆ ในการกำจัดสิ่งสกปรกผ้าถักหนานี้

ตารางที่ 11 การดูดซึมน้ำของผ้าฝ้ายชนิดต่างๆ หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสและปริมาณสารต่ำสุดที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรก

การกำจัดสิ่งสกปรก	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
เพกติเนส (กรัม/ลิตร)	3	5	5	7
Womine TE (กรัม/ลิตร)	1	1	1	1
การดูดซึมน้ำ	ทันที	ภายใน 3 วินาที	ทันที	ภายใน 3 วินาที

ตารางที่ 12 แสดงระดับของเพกตินบนผ้าในรูปของปริมาณ methylene blue ที่ถูกเพกตินบนผ้าดูดซึมเข้าไป ผ้าที่มีปริมาณ methylene blue สูงแสดงว่ามีระดับของเพกตินสูงด้วย ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วจะมีปริมาณ methylene blue ต่ำลง (ยกเว้นผ้าฝ้ายทอบางซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นในการทดลอง) หรือมีระดับของเพกตินบนผ้าลดลง โดยภาพรวมพบว่าการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ทำให้ผ้าส่วนใหญ่ดูดซึม methylene blue น้อยลงกว่าด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือหมายถึงว่าการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์สามารถกำจัดเพกตินออกจากผ้าได้มากกว่าการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์แต่ผ้ามีความสามารถดูดซึมน้ำได้เท่าเทียมกัน 2.2-13.3% จาก 100% ของเพกตินถูกกำจัดออกจากผ้าด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6.3-17% ด้วยเอนไซม์เพกติเนส 3.2-38% ด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส จะเห็นว่าการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะกำจัดเพกตินออกต่ำสุด เอนไซม์เพกติเนสช่วยกำจัดออกมากกว่าแต่เอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสช่วยกำจัดออกมากที่สุดถึง 38% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโซเดียมไฮดรอกไซด์จะกำจัดไขมันขี้ผึ้งบนผ้ามากกว่าการกำจัดเพกติน เอนไซม์เพกติเนสจะเร่งการกำจัดเพกตินโดยเฉพาะจึงควรสามารถกำจัดเพกตินออกจากผ้าได้มากที่สุดแต่เนื่องจากตามสมมติฐาน

ของนักวิจัยหลายกลุ่มพบว่า ในเส้นใยฝ้ายจะมีสารที่เคลือบนอกสุดเส้นใยคือ ไขมันขี้ผึ้ง ชั้นถัดเข้ามาอาจเป็นชั้นของโปรทีนตามด้วยชั้นของเพกติน หรืออาจเป็นชั้นผสมของโปรทีนและเพกติน โดยชั้นนอกสุดของไขมันขี้ผึ้งอาจมีช่องว่างเล็กๆ (micropores) ระหว่างรอยต่อของชั้นไขมันขี้ผึ้ง ถ้าโครงสร้างของชั้นสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายเป็นไปตามนี้ การกำจัดชั้นของไขมันขี้ผึ้งและโปรทีนด้วยเอนไซม์ไลเปสและโปรทีเอสจะช่วยให้สามารถกำจัดเพกตินออกได้มากขึ้นกว่านี้ การใช้เอนไซม์เพกติเนสเดี่ยวๆ จึงไม่สามารถกำจัดเพกตินออกจากผ้าได้มากเทียบเท่าการกำจัดเพกตินด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสที่ช่วยกำจัดเส้นใยสั้นๆ และสิ่งสกปรกที่ผิวผ้าออกมากขึ้น เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสไปเร่งการกำจัดชั้นของไขมันขี้ผึ้งและโปรทีเอสช่วยเร่งการกำจัดชั้นของโปรทีนออกจากผ้า ชั้นสิ่งสกปรกเหล่านี้อาจจะบางลง หลุดออกไปจากผิวผ้าหรือเกิดเป็นช่องว่างระหว่างสิ่งสกปรกที่ใหญ่พอให้โมเลกุลของน้ำซึมเข้าไปถึงชั้นของเพกตินหรือถึงชั้นของเส้นใยได้ เปิดทางให้เอนไซม์เซลลูเลสเข้าไปถึงเส้นใยเพื่อช่วยกำจัดเส้นใยสั้นๆ และสิ่งสกปรกบางส่วนรวมถึงเพกตินหลุดออกมาจากผ้าได้มากขึ้น ปริมาณเพกตินบนผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสจึงมีเหลือน้อยกว่าผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสหรือด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ตารางที่ 12 ระดับของเพกติน (ปริมาณ methylene blue) บนผ้าฝ้ายต่างๆ หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนส ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสเปรียบเทียบกับผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรกและผ้าหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ผ้าฝ้ายต่างๆ	ปริมาณ methylene blue บนผ้า (กรัม/ลิตร)			
	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
ก่อนกำจัดสิ่งสกปรก	0.3988	0.4406	0.4028	0.3932
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วย NaOH	0.3900	0.3820	0.3568	0.3592
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเพกติเนส	0.3736	0.3660	0.3536	0.3372
หลังกำจัดด้วยไลเปสต่อเซลลูเลส	-	0.3040	0.3900	0.3120
หลังกำจัดด้วยโปรทีเอสต่อเซลลูเลส	0.4340*	0.2920	0.3812	0.2440
หลังกำจัดด้วยไลเปส+โปรทีเอสต่อเซลลูเลส	-	0.2880	0.3840	0.2560
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปส	0.4148*	-	-	-
หลังกำจัดด้วยไลเปส+โปรทีเอส	0.4456*	-	-	-

หมายเหตุ *ปริมาณ methylene blue บนผ้าฝ้ายทอบางหลังการกำจัดสิ่งสกปรกมีค่าสูงกว่าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก อาจเนื่องมาจากความผิดพลาดของการทดลอง

ตารางที่ 13 น้ำหนักที่หายไปของผ้าและความขาวของผ้าหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนส ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสเปรียบเทียบกับผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรกและผ้าหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ผ้าฝ้ายต่างๆ	น้ำหนักผ้าที่หายไป(%)	ความขาวของผ้า
ผ้าทอบาง		
ก่อนกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	5.487
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วย NaOH	1.318	10.947
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเพกติเนส	0.721	10.783
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปส	10.800	7.719
หลังกำจัดด้วยไลเปส+โปรทีเอส	11.450	8.559
หลังกำจัดด้วยโปรทีเอสต่อเซลลูเลส	17.303	12.198
ผ้าทอหนา		
ก่อนกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	2.901
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วย NaOH	1.607	4.186
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเพกติเนส	0.785	3.404
หลังกำจัดด้วยไลเปสต่อเซลลูเลส	12.903	8.560
หลังกำจัดด้วยโปรทีเอสต่อเซลลูเลส	12.160	6.744
หลังกำจัดด้วยไลเปส+โปรทีเอส ต่อเซลลูเลส	12.473	7.498
ผ้าถักบาง		
ก่อนกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	5.348
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วย NaOH	3.322	23.612
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเพกติเนส	3.000	23.242
หลังกำจัดด้วยไลเปสต่อเซลลูเลส	2.043	26.975
หลังกำจัดด้วยโปรทีเอสต่อเซลลูเลส	2.870	22.987
หลังกำจัดด้วยไลเปส+โปรทีเอส ต่อเซลลูเลส	2.260	25.901
ผ้าถักหนา		
ก่อนกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	< 0
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วย NaOH	3.079	7.884
หลังกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเพกติเนส	2.700	7.269
หลังกำจัดด้วยไลเปสต่อเซลลูเลส	2.920	4.767
หลังกำจัดด้วยโปรทีเอสต่อเซลลูเลส	3.030	4.658
หลังกำจัดด้วยไลเปส+โปรทีเอส ต่อเซลลูเลส	3.017	4.415

ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยด่างคอสติกโซดา ด้วยเอนไซม์เพกติเนสและด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสมีความขาวสูงกว่าผ้าที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกอยู่ 1.4-4.4 เท่า, 1.2-4.3 เท่า และ 1.4-5.0 เท่า ตามลำดับ ความขาวของผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยด่างคอสติกโซดา ด้วยเอนไซม์เพกติเนสและด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสอยู่ในช่วง 4.2-23.6, 3.4-23.2 และ 4.4-27.0 ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่เอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสช่วยกำจัดสีธรรมชาติของฝ้ายได้ดีกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์เพกติเนสอยู่เล็กน้อย (ดูตารางที่ 13) การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และด้วยเอนไซม์เพกติเนสให้ผ้าที่มีความขาวใกล้เคียงกันมากอาจเป็นเพราะสิ่งสกปรกที่ถูกกำจัดออกมาส่วนใหญ่เป็นสารชนิดเดียวกันคือเพกติน โดยดูจากค่า methylene blue ของผ้าทั้งสองพบว่ามีค่าใกล้เคียงเช่นกัน (ดูตารางที่ 12) จะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะกระทำการกำจัดสิ่งสกปรกส่วนของไขมันชี้ผึ้ง โปรทีน เพกตินหรือแม้แต่เส้นใยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เอนไซม์เพกติเนส ไลเปส โปรทีเอสหรือเซลลูเลสก็สามารถกำจัดสีธรรมชาติบนฝ้ายจนผ้ามีความขาวเพิ่มขึ้นได้ ฉะนั้นจากผลตรงนี้ทำให้อาจสรุปได้ว่าสีธรรมชาติในฝ้ายมีอยู่ในทุกส่วนทั้งในสิ่งเจือปนธรรมชาติและในเส้นใยฝ้ายเอง ส่วนที่ใดจะมีมากหรือน้อยเพียงใดนั้นควรจะมีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป

ส่วนการทดสอบหาน้ำหนักผ้าที่หายไปหลังการกำจัดสิ่งสกปรกแสดงในตารางที่ 13 พบว่าการกำจัดสิ่งสกปรกทำให้ผ้าสูญเสียน้ำหนักไปมากน้อยแตกต่างกันดังนี้ สำหรับผ้าทอการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้ผ้าทอสูญเสียน้ำหนักไป 1.3-1.6% ด้วยเอนไซม์เพกติเนส 0.7-0.8% และด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส 10.8-17.3% สำหรับผ้าถักการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้ผ้าถักสูญเสียน้ำหนักไป 3.1-3.3% ด้วยเอนไซม์เพกติเนส 2.7-3.0% และด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส 2.0-3.0% จากผลนี้ทำให้เห็นว่าการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และด้วยเอนไซม์เพกติเนสทำให้ผ้าถักสูญเสียน้ำหนักมากกว่าผ้าทอ 1.7% และ 2.2% ตามลำดับ แต่เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้ากลับพบว่า ผ้าถักสูญเสียน้ำหนักไปน้อยกว่าผ้าทอมากคือน้อยกว่าถึง 14.3% ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากผ้าทอและผ้าถักมีโครงสร้างต่างกันจึงเอื้ออำนวยให้สารต่างชนิดกันเข้าถึงผ้าได้ต่างกัน ไม่ว่าผ้าถักจะถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารชนิดใดในที่นี้ก็จะสูญเสียน้ำหนักไปใกล้เคียงกันคือราว 2-3% ในขณะที่ผ้าทอจะสูญเสียน้ำหนักไปมากที่สุดเมื่อถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสคือราว 11-17% โดยเฉพาะเมื่อมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสอาจเป็นเพราะมีการสูญเสียเส้นใยฝ้ายไปมากนั่นเอง

ตารางที่ 14 แสดงผลความแข็งแรงของผ้าก่อนและหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และด้วยเอนไซม์ต่างๆ พบว่าการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้ผ้าทอมีค่าแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นทั้งในแนวด้ายยืนและด้ายพุ่ง 5.8%, 8.1% และ 4.2%, 17.6% ตามลำดับ แต่ทำให้ค่าความต้านทานแรงดันทะลุของผ้าถักลดลง 5.6% และ 18.3% ด้วยเอนไซม์เพกติเนสเฉพาะผ้าทอบางที่มีค่าแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นในแนวด้ายยืน 5.0% และแนวด้ายพุ่ง 15.3% ผ้าอื่นๆ ต่างมีค่าแรงดึงขาดและความต้านทานแรงดันทะลุลดลง 2.0-8.7% ด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลส ผ้าทอบาง ผ้าทอหนาและผ้าถักบางมีค่าแรงดึงขาดและค่าความต้านทานแรงดันทะลุเพิ่ม

ขึ้น ผ้าถักหนามีค่าความต้านทานแรงดันทะลุลดลงมากราว 11-26% ซึ่งสาเหตุของการเพิ่มขึ้นและลดลงของความแข็งแรงของผ้านี้ยังไม่สามารถสรุปแน่ชัด ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมอย่างละเอียดต่อไป

ตารางที่ 14 แรงดึงขาดและความต้านทานแรงดันทะลุของผ้าหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนส ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสเปรียบเทียบกับผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรกและผ้าหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

	แรงดึงขาด (นิวตัน)				ความต้านทานแรงดันทะลุ (กก./ตร.ซม.)	
	ผ้าทอบาง		ผ้าทอหนา		ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
	ยืน	พุ่ง	ยืน	พุ่ง		
ก่อนกำจัดสิ่งสกปรก	183.4	157.6	511.1	301.6	6.04	13.98
หลัง-NaOH	198.3	185.3	540.9	314.2	5.70	11.42
หลัง-เพกติเนส	192.6	181.7	500.6	293.2	5.90	12.76
หลัง-ไลเปส	317.3	283.4	-	-	-	-
หลัง-ไล+โปร	304.2	281.5	-	-	-	-
หลัง-ไล ต่อ เซล	-	-	843.9	457.0	6.87	12.47
หลัง-โปร ต่อ เซล	328.6	295.6	917.4	465.7	6.80	11.13
หลัง-ไล+โปร ต่อ เซล	-	-	1,017.5	477.1	6.93	10.30

4.4.3 ผลการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอส และเซลลูเลส

ก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก ผ้าทอบางและผ้าทอหนาถูกลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นซึ่งพบว่าไม่สามารถลอกแป้งออกจากผ้าได้หมด จึงได้ใช้เอนไซม์อะไมเลสที่จัดหามา Termamyl 120L ในการลอกแป้งออกจากผ้าแทน จากนั้นได้นำผ้าทอที่ลอกแป้งออกหมดและผ้าถัก (ผ้าดิบ) มาทำการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสที่ผลิตขึ้นแต่ละชนิดเดี่ยวๆ และกำจัดสิ่งสกปรกแบบ 2 ขั้นตอนด้วยเอนไซม์เหล่านี้เหมือนวิธีที่ใช้กับเอนไซม์ที่จัดหามา

ตารางที่ 15 แสดงเวลาดูดซึมน้ำของผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสที่ผลิตขึ้น พบว่าผ้าที่ดูดซึมน้ำได้ดีมากคือดูดซึมทันทีที่หยดน้ำลงบนผ้าเป็นผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแบบ 2 ขั้นตอนด้วยเอนไซม์ไลเปสตามด้วยเซลลูเลสหรือโปรทีเอสตามด้วยเซลลูเลส เอนไซม์เซลลูเลสเดี่ยวๆ ไม่สามารถกำจัดสิ่งสกปรกมากพอที่ทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดี เอนไซม์โปรทีเอสที่ใช้ที่ pH 10.5 อุณหภูมิ 45°C สามารถกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าได้มากแต่ต้องใช้ปริมาณสูง เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่ pH 6.5 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 35°C และ 40°C จึงจะทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดี

ตารางที่ 15 การดูดซึมน้ำของผ้าฝ้ายชนิดต่างๆ หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสเดี่ยวๆที่ผลิตขึ้น

เอนไซม์ (กรัม/ลิตร)	pH	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ดูดซึมน้ำภายในเวลา			
				ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
ไลเปส(เข้มข้น)	5.6	30	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
ไลเปส(เข้มข้น)	6.0	35	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
ไลเปส(15-20)	6.5	35	30	≤3 วินาที	≤3 วินาที	≤3 วินาที	≤3 วินาที
ไลเปส(0.5-20)	8.0	40	30	-	-	>3 วินาที	-
ไลเปส(25)	8.0	40	30	-	-	≤3 วินาที	-
ไลเปส(30)	8.0	40	30	-	-	-	≤3 วินาที
โปรทีเอส(0.5-20)	6.0	35-40	30	-	-	>3 วินาที	-
โปรทีเอส(เข้มข้น)	6.0	35-40	60	-	-	>3 วินาที	-
โปรทีเอส(15-20)	10.5	45	30	≤3 วินาที	≤3 วินาที	≤3 วินาที	≤3 วินาที
โปรทีเอส(0.5-20)	10.6	40	30	-	-	>3 วินาที	-
โปรทีเอส(เข้มข้น)	10.6	40	60	-	-	>3 วินาที	-
เซลลูเลส(เข้มข้น)	4.8	50	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
เซลลูเลส(เข้มข้น)	4.8	50	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
เซลลูเลส(เข้มข้น)	4.8	50	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
เซลลูเลส(เข้มข้น)	4.8	50	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
เซลลูเลส(เข้มข้น)	4.8	50	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
เซลลูเลส(เข้มข้น)	5.0	30	60	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที	>3 วินาที
ไลเปส(0.5-20)	5.6	30	30	-	-	>3 วินาที	-
เซลลูเลส(0.5-20)	5.0	30	30				
ไลเปส(0.5-5)	6.0	35	30	-	-	>3 วินาที	-
เซลลูเลส(0.5-5)	5.0	30	30				
ไลเปส(0.5)	6.0	35	30	-	-	ทันที	-
เซลลูเลส(5-20)	5.0	30	30				
ไลเปส(0.5-20)	6.5	35	30	ทันที	ทันที	ทันที	ทันที
เซลลูเลส(5)	4.8	50	30				
โปรทีเอส(0.5)	6.0	35-40	30	-	-	>3 วินาที	-
เซลลูเลส(1)	5.0	30	30				
โปรทีเอส(0.5)	6.0	35-40	30	-	-	ทันที	-
เซลลูเลส(5-20)	5.0	30	30				
โปรทีเอส(0.5-20)	10.5	45	30	ทันที	ทันที	ทันที	ทันที
เซลลูเลส(5)	4.8	50	30				

ผลจากตารางที่15 ทำให้พอสรุปได้คร่าวๆ ว่า การใช้เอนไซม์ไลเปส โปรทีเอสและเซลลูเลสในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายนี้สามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ไลเปสหรือโปรทีเอสแบบเดี่ยวโดยให้เลือกใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดที่ทำงานได้ดีที่ pH 6.5, 35°C (ดูแอคติวิตี้จากตารางที่ 1) หรือที่ pH 8.0, 40°C แต่ต้องใช้ปริมาณมากซึ่งทำให้เพิ่มค่าใช้จ่าย และให้เลือกใช้เอนไซม์โปรทีเอสชนิดที่ทำงานได้ดีที่ pH 10.5, 45°C ซึ่งต้องใช้ปริมาณมากเช่นกัน นอกจากนี้อาจใช้การกำจัดสิ่งสกปรกแบบ 2 ขั้นตอนดังนี้

-เอนไซม์ไลเปสที่ pH 6.0, 35°C ตามด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH 5.0, 30°C
-เอนไซม์ไลเปสที่ pH 6.5, 35°C ตามด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH 4.8, 50°C
-เอนไซม์โปรทีเอสที่ pH 6.0, 35-40°C ตามด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH 5.0, 30°C
-เอนไซม์โปรทีเอสที่ pH 10.5, 45°C ตามด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH 4.8, 50°C

เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมีปริมาณการผลิตแต่ละครั้งน้อยไม่เพียงพอสำหรับการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าเพื่อทดสอบสมบัติอื่นๆ ของผ้า จึงสามารถทดสอบได้เฉพาะสมบัติการดูดซึมน้ำเท่านั้น

4.5 ผลการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถัก

4.5.1 ผลการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ถูกฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และพบว่าไม่มีสารเปอร์ออกไซด์ตกค้างและมี pH ของน้ำสกัดผ้าอยู่ในช่วง 7.0-8.5

ตารางที่ 16 ความขาว แรงดึงขาดและความต้านทานแรงดันทะลุของผ้าหลังผ่านการฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และปริมาณสารต่ำสุดที่ใช้ในการฟอกผ้า

	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
H_2O_2 (50%) กรัม/ลิตร	4	7	3	4
NaOH, กรัม/ลิตร	2	3	2	2
Na_2SiO_3 กรัม/ลิตร	2	2	2	2
Womine TE กรัม/ลิตร	1	1	1	1
ความขาว	72.68	69.13	76.33	71.82
แรงดึงขาด นิวตัน	ยืน 174.5 พุ่ง 166.7	ยืน 519.3 พุ่ง 310.4	-	-
ความต้านทานแรงดันทะลุ กก./ตร.ซม.	-	-	5.54	11.35

ตารางที่ 16 แสดงสมบัติของผ้าหลังฟอกพบว่าด้วยปริมาณสารที่ใช้นี้สามารถฟอกผ้าให้มีความขาวในช่วง 70 ผ้าทอบางมีค่าแรงดึงขาดลดลง 12% ในแนวด้ายยืนและ 10% ในแนวด้ายพุ่ง ผ้าทอหนาลดลง 4% ในแนวด้ายยืนและ 1.2% ในแนวด้ายพุ่ง ผ้าถักบางมีค่าความต้านทานแรงดันทะลุลดลง 2.8% และผ้าถักหนาลดลง 0.6% เมื่อเทียบกับผ้าก่อนการฟอก

4.5.2 ผลการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่จัดหามา

การฟอกผ้าด้วยเอนไซม์ที่จัดหามานี้ประกอบด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เปอ์ออกซิเดสและไซลาเนส แต่ได้ผลการฟอกผ้าเฉพาะการฟอกด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเท่านั้น (ดู 3.2.4.2)

ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสถูกฟอกด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยพบว่า ผ้าที่ผ่านการฟอกไม่มีสารเปอร์ออกไซด์ตกค้างและมี pH ของน้ำสกัดผ้าอยู่ในช่วง 7.0-8.5 สมบัติอื่นๆ ของผ้ามีแสดงไว้ในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ความขาว แรงดึงขาดและความต้านทานแรงดันทะลุของผ้าหลังผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

	ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
ความขาวก่อนฟอก	10.78	3.40	23.24	7.27
ความขาวหลังฟอก	22.30	17.12	39.33	24.59
แรงดึงขาด นิวตัน	ยืน 176.7 พุ่ง 160.5	ยืน 436.3 พุ่ง 271.3	-	-
ความต้านทานแรงดันทะลุ,กก/ตร.ซม	-	-	5.54	11.08

การฟอกผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสทำให้ผ้ามีความขาวเพิ่มขึ้นจากเดิมเพียง 11.52-17.32 ได้ผ้าขาวสุดแค่ราว 40 ซึ่งถือว่ายังไม่ขาวพอ อาจเนื่องมาจากในสารละลายฟอกนอกจากจะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วยังมีกรดกลูโคนิคจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกลูโคสและออกซิเจน กรดนี้ทำให้ pH ของสารฟอกต่ำเกินไปคือราว 6.5 เมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในสารละลายก่อนฟอก (ได้ทดลองเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เกินพอเพื่อปรับ pH ของสารฟอกแต่กลับทำให้กลูโคสในสารละลายสลายตัวให้สารสีน้ำตาล) ซึ่งควรมีการศึกษาอย่างละเอียดเพื่อแก้ไขปัญหานี้ต่อไป ผ้าทอบางมีค่าแรงดึงขาดลดลง 8.3% ในแนวด้ายยืนและ 11.7% ในแนวด้ายพุ่งผ้าทอหนาลดลง 12.8% ในแนวด้ายยืนและ 7.5% ในแนวด้ายพุ่ง ผ้าถักบางมีค่าความต้านทานแรงดันทะลุลดลง 6.1% และผ้าถักหนาลดลง 13.2% เมื่อเทียบกับผ้าก่อนการฟอก ค่าแรงดึงขาดและค่าความต้านทานแรงดันทะลุของผ้าทอและผ้าถักหลังฟอกด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลดลงจากผ้าก่อนฟอกมากกว่าผ้าที่ถูกฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

4.5.3 ผลการฟอกผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น

ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์ถูกฟอกด้วยเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งมีปริมาณน้อยเพียงพอเฉพาะการฟอกผ้าเพื่อวัดความขาวเท่านั้น ไม่พอสำหรับการฟอกผ้าเพื่อทดสอบสมบัติอื่นๆ ของผ้า

ตารางที่ 18 ความขาวของผ้าที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ไซลาเนสต่างๆ ที่ผลิตขึ้น

เอนไซม์ไซลาเนส (กรัม/ลิตร)	pH	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ความขาวของผ้า			
				ผ้าทอบาง	ผ้าทอหนา	ผ้าถักบาง	ผ้าถักหนา
ก่อนฟอก				-	-	25.087	-
หลังฟอก(0.5)	5.0	30	60	-	-	26.405	-
หลังฟอก(1)	5.0	30	60	-	-	26.749	-
หลังฟอก(5)	5.0	30	60	-	-	28.004	-
หลังฟอก(10)	5.0	30	60	-	-	28.010	-
หลังฟอก(20)	5.0	30	60	-	-	28.289	-
ก่อนฟอก				-	-	17.513	-
หลังฟอก(เข้มข้น)	5.0	50	60	-	-	25.292	-
ก่อนฟอก				-	-	-	8.181
หลังฟอก(เข้มข้น)	5.0	50	60	-	-	-	4.740
ก่อนฟอก				-	-	18.311	-
หลังฟอก(เข้มข้น)	5.0	50	60	-	-	16.042	-
ก่อนฟอก				-	-	-	4.292
หลังฟอก(เข้มข้น)	5.0	50	60	-	-	-	4.565
ก่อนฟอก				-	-	14.888	-
หลังฟอก(เข้มข้น)	4.8	60	60	-	-	12.491	-
ก่อนฟอก				-	-	-	4.644
หลังฟอก(เข้มข้น)	4.8	60	60	-	-	-	3.544
ก่อนฟอก				22.705	-	-	-
หลังฟอก(เข้มข้น)	4.8	60	60	17.598	-	-	-
ก่อนฟอก				-	13.731	-	-
หลังฟอก(เข้มข้น)	4.8	60	60	-	4.819	-	-

จากผลการฟอกผ้าด้วยเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตขึ้นพบว่า ผ้าที่ฟอกแล้วมีความขาวเพิ่มขึ้นในบางกรณีและลดลงในบางกรณี การลดลงของความขาวของผ้าหลังฟอกอาจเนื่องมาจากเอนไซม์ไซลาเนสบางชนิดมีสีเทาอ่อนๆ ซึ่งสีนี้อาจเกาะติดบนผ้าและซักไม่ออกจนทำให้ผ้ามีความขาวลดลง เอนไซม์ไซลาเนสที่ให้ผลการฟอกผ้าได้ขาวมากที่สุดคือ เอนไซม์ไซลาเนสที่ทำงานได้ดีที่ pH 5.0,

30°C ซึ่งมีแอคติวิตี้สูงที่สุดใน 3 ชนิดที่ใช้ฟอกผ้า อย่างไรก็ตามผ้าฟอกยังคงมีความขาวต่ำเกินไปที่จะนำไปย้อมหรือผ่านไปในขั้นตอนการผลิตผ้าต่อไปได้

5. สรุปผลการดำเนินการวิจัย

จากผลงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้คร่าวๆ ดังนี้

- สำหรับการลอกแป้ง เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นไม่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการลอกแป้งบนผ้าทอ จำเป็นต้องใช้เอนไซม์อะไมเลสที่สามารถลอกแป้งที่อุณหภูมิสูงได้
- สำหรับการกำจัดสิ่งสกปรก สามารถใช้เอนไซม์กำจัดสิ่งสกปรกได้ผลดีเทียบเท่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสามารถใช้เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นกำจัดสิ่งสกปรกได้ผลดีในแง่การดูดซึมน้ำเทียบเท่าการใช้เอนไซม์ที่จัดหามา
- สำหรับการฟอก เอนไซม์ที่ใช้ฟอกผ้ายังมีประสิทธิภาพการฟอกให้ผ้าขาวไม่เท่าการฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวที่สามารถฟอกผ้าให้ขาวได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ

6. การเผยแพร่ผลงานและการผลิตบัณฑิต

6.1 ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้จัดสัมมนาวิชาการภายใต้โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีไทย-ญี่ปุ่น ให้แก่ผู้ประกอบการสิ่งทอและผู้สนใจจำนวนกว่า 60 คน เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2543 โดยมี Professor Mitsuo Ueda เป็นผู้บรรยายหลักและผู้วิจัยได้เสนอผลงานวิจัยนี้ในเรื่อง Enzymes in Preparation Process of Cotton

6.2 ผู้วิจัยได้เสนอผลงานเรื่อง Enzymes in Preparation Process of Cotton Fabric and Yarn ในงาน the First Thailand Materials Science and Technology Conference จัดโดย MTEC/NSTDA/MOSTE เมื่อวันที่ 19-20 กรกฎาคม 2543

6.3 ผู้วิจัยได้เสนอผลงานเรื่อง Enzymatic Desizing, Scouring, and Bleaching of Cotton ในงาน the Second International Workshop on Green Polymers, Science and Technology จัดโดย Agengy/Japan and Dutch Polymer Institute/The Netherlands เมื่อวันที่ 15-20 ตุลาคม 2543 ที่ประเทศอินโดนีเซีย

6.4 ผู้วิจัยได้เสนอผลงานเรื่อง Enzymatic Scouring of Cotton Fabric ในงานวิชาการประจำปี 2544 ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.5 ผู้วิจัยได้เสนอผลงานเรื่อง Enzymatic Scouring of Cotton Fabric ในงาน the 2001 AATCC International Conference & Exhibition จัดโดย American Textile Chemists and Colorists เมื่อวันที่ 21-24 ตุลาคม 2544 ที่เมืองกรีนวิลล์ มลรัฐเซาท์แครอลไลน่า ประเทศสหรัฐอเมริกา

6.6 ผู้วิจัยได้เขียนบทความเรื่อง การประยุกต์เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย ลงในวารสาร Colourway ของสมาคมฟอกย้อม พิมพ์และตกแต่งสำเร็จสิ่งทอไทย ฉบับเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2543 ปีที่ 6 เล่มที่ 31 หน้า 14-20

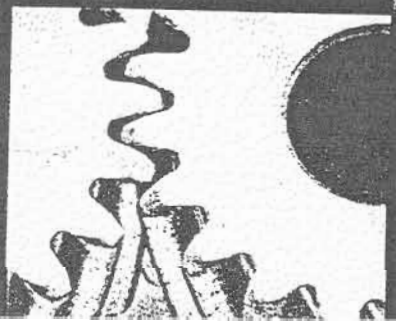
6.7 งานวิจัยนี้สามารถผลิตบัณฑิต 2 คน 1 คนในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ จากภาควิชาวัสดุศาสตร์ ในภาคการศึกษาปลายประจำปี 2542 คือ นายธีระตล รุ่งเรืองกิจไกร ทำงานวิทยานิพนธ์เรื่อง การประยุกต์เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมด้ายและผ้าฝ้าย
และปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งทอ 1 คน คือ นางสาวกิ่งกมล ชูนุกูลพงศ์ จากภาควิชาวิศวกรรมเคมีสิ่งทอ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The First Thailand Materials Science and Technology Conference

19–20 กรกฎาคม 2543
โรงแรม อมารี วอเตอร์เกท
กรุงเทพฯ

MTEC
ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC)
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (NSTDA)
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม (MOSTE)



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENZYMES IN PREPARATION PROCESS OF COTTON FABRIC AND YARN

Usa Sangwatanaroj*, Theeradol Rungraungkijkrai*, and Mitsuo Ueda#
*Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
#Department of Design Engineering and Management, Faculty of Textile Science,
Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan

ABSTRACT

Cotton plain and twill weave fabrics, cotton jersey knits and cotton yarn were treated under enzymatic and conventional preparation processes. Samples desized with amylase enzyme show complete sizes removal. Samples scoured with pectinase enzyme provide good absorbency and obtain lower weight loss than conventional scoured samples. Both scouring methods give almost comparable capability of pectin removal with a little higher efficiency in enzymatic scouring. Plain weave fabric and yarn increase in strength after pectinase scouring while twill weave fabric and jersey knits decrease. Scoured jersey knits lose more strength from conventional scouring than from pectinase scouring. Samples bleached with glucose oxidase enzyme obtain whiteness index nearly 20 degree improvement with 3-13% strength loss.

EXPERIMENTAL

Materials

Cotton greige substrates containing two woven fabrics (plain and twill weaves), two knitted fabrics (single jersey, yarn count 24/2 and 50/1), and a yarn (yarn count 50/1) were selected as samples for this task. All chemicals used in this project were reagent grade chemicals. Three enzymes, α-amylase; pectinase; and glucose oxidase were used for the enzymatic desizing, scouring, and bleaching respectively.

Methods

Cotton substrates were desized, scoured, and bleached using the conventional and the enzymatic processes described as follows. They were then tested using the standard test methods.

Desizing

Each greige woven fabric was desized in a solution containing calcium chloride and sodium chloride as stabilizers, Womine TE supplied by Tokai Seiyu, Japan as a nonionic wetting agent, and Termamyl 120L supplied by Novo Nordisk, Denmark as an α-amylase enzyme, in the Ahiba Polymat® laboratory dyeing equipment at a liquor ratio of 1:20, pH 6.5, temperature 100°C for 45 minutes. The amount of enzyme and chemicals used in desizing were varied for each fabric to achieve a complete size removal. After desizing, the fabrics were tested for the presence of residual starch size, %weight loss, water absorbency, and strength.

Scouring

Conventional Scouring

Greige yarn, greige knitted fabrics, and desized woven fabrics were scoured in solutions containing sodium hydroxide and Womine TE in the dyeing equipment mentioned earlier at a liquor ratio of 1:20 at 80°C for 1 hour. The amount of chemicals used in scouring were varied for each substrate to achieve an adequate absorbency.

Enzymatic Scouring

Greige yarn, greige knitted fabrics, and desized woven fabrics were scoured in solutions containing pectinase enzyme and Womine TE in the dyeing equipment at a liquor ratio of 1:50 at pH 4, temperature 40°C for 2 hours. The amount of pectinase enzyme and Womine TE were varied for each substrate to achieve an adequate absorbency.

After scouring, each substrate was tested for water absorbency, %weight loss, the presence of residual pectin, and strength.

Bleaching

Conventional Bleaching

Conventional scoured substrates were bleached in solutions containing hydrogen peroxide, sodium hydroxide, sodium silicate, and Womine TE in the dyeing equipment at a liquor ratio of 1:20 at pH 11.5, temperature 95°C for 1 hour. The amount of chemicals used in bleaching were varied for each substrate to achieve a minimum whiteness index of 70.

Enzymatic Bleaching

Bleaching solutions were prepared based on an experimental result of studying the occurrence of hydrogen peroxide in the solutions of 1g/l glucose oxidase enzyme and various concentrations of glucose at various times in the presence of oxygen. The result indicates that to obtain the highest amount of hydrogen peroxide in the bleaching bath, the bleaching solutions may be prepared using 1 g/l glucose oxidase, 50 g/l glucose at pH 7 and aerated with oxygen for 2 hours at 25°C. Then sodium hydroxide was added into each solution before adding cotton substrates. The bleaching was conducted at a liquor ratio of 1:20 at 95°C for 1 hour.

Each bleached substrate was tested for whiteness index, strength, pH, and residual peroxide.

Test Procedures

Yarn and woven fabrics were tested for breaking load using the ASTM D2256 and D5035 respectively and knitted fabrics were tested for bursting strength using the JIS L 0888. The type of size on greige woven fabrics was determined using the spot test introduced by Livengood[1]. Desized fabrics were tested for the presence of residual starch size using the TEGEWA violet scale test method by immersing the fabric into an iodine/potassium iodide solution and rating the staining fabric with a nine shades TEGEWA violet scale. A rating of 1 indicates the highest amount of starch on and 9 indicates no starch on. Water absorbency of fabrics and yarn was determined using the AATCC Test Method 79 "Absorbency of Bleached Fabric". Greige yarn and fabrics were tested for extractable materials using the AATCC Test Method 97 "Extractable Content of Greige and/or Prepared Textiles". Yarn and fabrics were tested for the presence of pectin by measuring the absorption of methylene blue onto the samples. This method is based on the interaction between the cationic dye of methylene blue and the carboxylate anion of pectin on the sample. The higher the dye molecules are absorbed by the sample, the higher the presence of pectin on the sample. Bleached substrates were determined for the whiteness index using the MacBeth COLOR-EYE® 7000 reflectance spectrophotometer. They were also tested for residual peroxide using a spot test introduced by Interox[2] and tested for pH using the AATCC Test Method 81 "pH of the Water-Extract from Bleached Textiles". Hydrogen peroxide content in the bleaching solution was determined using the potassium permanganate method introduced by Interox[2].

RESULTS AND DISCUSSION

After the greige woven fabrics were desized, the fabrics are free of size. Although around 8-9% of size and water soluble materials were removed, the fabrics still do not absorb water well. Plain weave fabric loses strength around 8% while twill weave fabric loses only 0.37% compared to the greige fabric.

In general, the first requirement for the scoured substrate is the substrate should uniformly absorb water within 5 seconds at room temperature. For this experimental lab scale, a 3 seconds was used to signify an adequate absorbency of scoured substrate. Both scouring methods provide substrates with the adequate absorbency. The enzymatic scouring method provides substrates with lower % weight loss than the conventional scouring method. This may be due to the different penetration abilities of the scouring agents toward the substrates and the reactions of the scouring agents toward the impurities on the substrates. Sodium hydroxide and wetting agent in the solution might have penetrated deeper into the fibers and reacted with the fibers and the impurities. While pectinase and wetting agent stay on the fiber surface catalyzing the scouring reaction. As a result, impurities on substrates are removed more from the conventional scouring than from the enzymatic scouring and thus the conventional scoured substrates lose more weight than the enzymatic scoured substrates. Woven fabrics lose the least weight compared to knitted fabrics and yarn and the reason for this could be woven fabrics have lost some weight since desizing step thus contained less impurities to be removed. Both scouring methods give almost comparable capability of pectin removal with a little higher efficiency in enzymatic scouring.

Both conventional and enzymatic scouring methods increase the woven fabric and yarn breaking load 5-43%, except for the enzymatic scoured twill weave fabric. The degree of strength increase is higher in the conventional than in the enzymatic scoured substrates. Knitted fabrics from both scouring methods lose strength after scouring and the degree of strength loss is higher in the conventional than in the enzymatic scouring methods. The reasons for gaining and losing strength of scoured substrates are still under studying.

After bleaching, all substrates contain pH in the range of 7.0-8.5 and contain no peroxide. Conventional bleached substrates obtain whiteness index above or close to 70. Enzymatic bleaching using the hydrogen peroxide generated from the reaction of glucose oxidase, glucose and oxygen can increase

whiteness index of scoured substrates to nearly 20 degree maximum (see Table 1). In terms of substrate strength change, the enzymatic bleached substrates lose strength 3-13% compared with the strength of scoured substrates while the conventional bleached substrates lose about the same strength (1-11%) but obtaining whiteness index 27-52 degree higher than the enzymatic bleached substrates.

Table 1 Whiteness index of substrates after bleaching with the conventional and the enzymatic bleaching methods compared with whiteness index of scoured substrates.

	Whiteness index				
	Plain	Twill	Jersey (50/1)	Jersey (24/2)	Yarn (50/1)
Conventional scoured	10.95	4.11	23.61	7.88	38.36
Conventional bleached	72.68	69.13	76.33	71.82	81.10
Enzymatic scoured	10.78	3.40	23.24	7.27	38.17
Enzymatic bleached	22.30	17.12	39.33	24.59	54.04

The reason for obtaining low whiteness index of substrates from glucose oxidase bleaching may be explained as follows. During the bleaching solution preparation, not only the hydrogen peroxide was generated from the reaction of glucose oxidase enzyme, glucose, and oxygen, but gluconic acid was also taken place in the bleaching bath. This acid decreased the bath pH from 7 to approximately 3. Once the required amount of sodium hydroxide was added into the bath just before bleaching, the bath pH was increased from 3 to only 6.5 while the appropriate pH for bleaching with hydrogen peroxide is between 10.5-11.5. Bleaching at other pH regions can result in obtaining low whiteness index of bleached substrates. Adding excess sodium hydroxide into the bath led to glucose degradation and the bath solution turned into brown color. An attempt on the glucose oxidase bleaching without sodium hydroxide was conducted and found that whiteness index of bleached substrates were only 10 degree improvement. A careful control of pH bleach liquor (either by removing the gluconic acid from the bleaching solution or by neutralizing this acid with other alkali solutions) is believed to be one of the factors to improve the whiteness index of bleached substrate and it is under studying.

CONCLUSIONS

Enzymatic scouring using pectinase enzyme and a small amount of wetting agent can be used to scour cotton substrates to their adequate absorbency with low % weight loss and strength loss comparable to sodium hydroxide in conventional scouring. Although bleaching cotton substrates using glucose oxidase can increase whiteness index of substrate to maximum nearly 20 degree at this stage, but a good pH control of bleach liquor may help improving the whiteness index of bleached substrates to the required level.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thanks Thailand Research Fund for providing the fund and Thailand-Japan Technology Transfer Project-OECF for supporting some materials in this work.

REFERENCES

1. Livengood, C. "Spot Test for Identification of Warp Sizes on Fabrics," Textile Industries, 147(9): 114-116. 1983.
2. A Bleachers Handbook. Interox America, Houston, Texas, 1980.

Proceedings of
The Second International Workshop on Green Polymers
15-20 October 2000/Bandung-Bogor

Supported by
Science and Technology Agency, Japan
Dutch Polymer Institute, The Netherlands

Jan Christoffel Schultz after W. O. J. Nieuwenkamp (1926)
"Het Oogsten van Rubber"
from Leo Haks and Guus Maris compiled
"Lexicon of Foreign Artists Who Visualized Indonesia 1600-1950".
Archipelago Press (1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Jointly organized by
Indonesian Polymer Association, Indonesia
National Institute of Materials and Chemical Research, Japan
Eindhoven University of Technology, The Netherlands

Proceeding of The Second International Workshop on Green Polymers
15-20 October 2000, Bandung-Bogor, Indonesia

ENZIMATIC DESIZING, SCOURING, AND BLEACHING OF COTTON

Usa Sangwatanaroj[1], Theeradol Rungraungkijkrai[1], Mitsuo Ueda[2]
[1] *Dept. of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
[2] *Dept. of Design Engineering and Management, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan*

Greige cotton woven fabrics, knitted fabrics and a yarn were treated under the enzimatic preparation process containing desizing, scouring, and bleaching. Three enzymes, alpha-amylase; pectinase; and glucose oxidase were used in these three steps respectively. Greige substrates were also treated under conventional preparation process for comparison. They were then tested using the standard test methods. The test results are as follows. Samples desized with amylase enzyme show complete size removal. The conventional scouring with caustic soda and the enzymatic scouring with pectinase enzyme provide a very similar performance on cotton cleaning. Scoured cotton substrates from both processes show good water aborbancy with same degree of whiteness. The enzymatic scoured substrates lose less weight and contain lower level of pectin than the conventional scoured substrates. The conventional bleaching with hydrogen peroxide and the enzymating bleaching with glocose oxidase equally decrease the substrate strength 1-13%. Substrates bleached with hydrogen peroxide show 50-60 degrees increase in whiteness while those bleached with glucose oxidase enzyme obtain nearly 20 degree improvement (see table 1). The overall substrates strength loss from the conventional preparation are 6-19%, comparable to those from the enzymatic preparation of 5,5-22%.

Table 1. Whiteness index of substrates after bleaching with the conventional and the enzymatic bleaching methods compared with whiteness index of scoured substrates.

	Whiteness index				
	Plain Weave	Twill Weave	Jersey Knit (Yarn 50/l)	Jersey Knit (Yarn 24/2)	Yarn (50/l)
Convention al scoured	10,85	4,11	23,61	7,88	38,36
Convention al bleached	72,68	69,13	76,33	71,82	81,10
Enzymatic scoured	10,78	3,40	23,24	7,27	38,17
Enzymatic Bleached	22;30	17,12	39,33	24,59	54,04

ACKNOWLEDGEMENTS

The authers wish to thanks Thailand Research Fund for providing the fund and Thailand-Japan Technology Transfer Project-OECF for supporting some materials in this work.

REFERENCE

1. Livengood, C. "Spot Test for Identification of Warp Sizes on Fabrics," Textile Industries, 147(9):114-116. 1983.
2. A Bleachers Handbook Interox America, Houston, Texas, 1980.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AATCC

Textiles 2001

Technical Innovations for Global Challenges

Hyatt Regency
Greenville, SC

October 21-24, 2001

IC&E

International Conference & Exhibition

Hyatt Regency
Greenville, South Carolina

Register online at www.aatcc.org

ENZYMATIC SCOURING OF COTTON FABRIC

Usa Sangwatanaroj[a], *Kingkamol Choonukulpong*[a], *and Mitsuo Ueda*[b]
[a]*Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.*
[b]*Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan.*

Introduction

Prior to dyeing, cotton fabric is normally scoured in a boiled caustic soda solution to improve its wettability towards water and dye liquor. This conventional cotton cleaning step consumes a large quantity of water and energy, and needs a special handling of the caustic effluent. An enzymatic scouring is one of many approaches being introduced as a clean technology for the cotton scouring. Li and Hardin[1] used pectinase and cellulase enzymes, together and separately, for scouring cotton and found that the scoured cotton showed an adequate absorbency. They concluded that pectinases penetrated the cuticle, then contacted and catalyzed the hydrolysis of the pectin substances, while cellulases catalyzed the hydrolysis of the cellulose in the primary wall. Sawada et. al.[2], studied the bioscouring of cotton with pectinase and also obtained a good water absorbency of the scoured cotton. Hartzell and Hsieh[3] found that pectinase, lipase, and protease treatments provided a very little improvement in the water wetting and retention properties of cotton, while a combination use of pectinase and cellulase enzymes for the cotton scouring significantly improved these properties. Buchert and Pere[4] conducted the cotton scouring with pectinases, proteases, and lipases. The results indicated that the water absorbency of cotton was improved in the pectinase treatment but impaired in the protease treatment. Both lipases and proteases were less efficient for the cotton scouring than pectinases. In this work, four cotton woven and knitted fabrics were scoured with several enzymes, pectinase; lipase; protease; and cellulase. Our previous study showed that scouring cotton fabrics with nonionic wetting agent alone; with lipase/nonionic wetting agent; with protease/nonionic wetting agent; with lipase/protease/nonionic wetting agent; and with cellulase/nonionic wetting agent were not able to acquire an adequate absorbency on the scoured fabrics. To obtain a successful scouring, these following processes were applied : one-step scouring with pectinase/nonionic wetting agent; two-steps scouring with lipase/nonionic wetting agent and then with cellulase/nonionic wetting agent; two-steps scouring with protease/nonionic wetting agent and then with cellulase/nonionic wetting agent; and two-steps scouring with lipase/protease/nonionic wetting agent and then with cellulase/nonionic wetting agent. The fabrics were also scoured with caustic soda solutions under the conventional process for a comparison.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Experimental

Materials

Greige cotton substrates containing two woven fabrics and two knitted fabrics were selected as the samples for this task. The plain fabric weighed 1.5 g/100 cm^2 and the twill fabric weighed 3.9 g/100 cm^2. Both knitted fabrics were a single jersey structure and weighed 1.2 and 2.8 g/100 cm^2. Some properties

of these greige fabrics are shown in Table I. All chemicals used in this work were the reagent grade chemicals. Four commercial enzymes, pectinase; lipase; protease; and cellulase supplied by Tokyo Chemical Industry, Japan were used. Their activities were 1,700 units/g, 15 units/g, 14,000 units/g, and 25,000 units/g, respectively.

Methods

Greige woven fabrics were first desized with an alpha-amylase enzyme (BAN 240L supplied by Novo Nordisk, Denmark) for a complete size removal before scouring. Then the desized woven fabrics and the greige knitted fabrics were enzymatic scoured with pectinase; lipase; protease; and cellulase, and conventional scoured with the caustic soda. Finally the scoured fabrics were tested for the water absorbency, the whiteness, the strength, the %weight loss, the dyeability, and the pectin content using the standard test methods.

Conventional Scouring

Fabrics were scoured in the solutions containing sodium hydroxide and Womine TE (nonionic wetting agent supplied by Tokai Seiyu, Japan) in the Ahiba Polymat® laboratory dyeing equipment at a liquor ratio of 1:20, 80°C for 1 hour. Then they were washed and dried. The amount of chemicals used was varied for each fabric to achieve an adequate absorbency.

Enzymatic Scouring

Pectinase

Fabrics were scoured in the solutions containing pectinase and Womine TE in the dyeing equipment at a liquor ratio of 1:50, pH 4, 40°C for 2 hours. Then they were boiled in the distilled water for 10 minutes before washed and dried. The amount of pectinase and Womine TE used was varied for each fabric to achieve an adequate absorbency.

Lipase/Protease/Cellulase

Fabrics were first scoured in the solutions containing lipase; protease; or lipase/protease, and Womine TE in the dyeing equipment at a liquor ratio of 1:50, pH 8; 7; or 7.5 respectively, 37°C for 30 minutes and they were boiled in the distilled water for another 10 minutes. Then they were continually scoured in the solutions containing cellulase and Womine TE at a liquor ratio of 1:50, pH 4.5, 40°C for 30 minutes. Finally they were boiled in the distilled water for 10 minutes before washed and dried. The amount of enzymes and Womine TE used was varied for each fabric to achieve an adequate absorbency.

Fabric Testing Procedures

The woven fabrics were tested for the breaking load in both warp and weft directions using the ASTM D5035 and the knitted fabrics were tested for the bursting strength using the JIS L 0888. The

water absorbency of the fabrics was determined using the AATCC Test Method 79 "Absorbency of Bleached Fabric." The fabrics were tested for the presence of pectins by measuring the absorption of the methylene blue onto the fabrics. This method is based on the interaction between the cationic dye of methylene blue and the carboxylate anion of pectins on the fabric. The higher the dye molecules are absorbed by the sample, the higher of the pectins present on the sample. The fabrics were determined for the whiteness using the MacBeth COLOR-EYE® 7000 reflectance spectrophotometer. The scoured fabrics were dyed with a direct dye "Benzopurpurine 4B 1% owf at a liquor ratio of 1:30, 95°C for 45 minutes. Then the fabrics were measured for the color strength using the same equipment as the whiteness measurement. The fabric weight loss was determined by weighing and drying the fabric until a constant weight was obtained. The fabrics were tested for the extractable materials using the AATCC Test Method 97 "Extractable Content of Greige and/or Prepared Textiles."

Results and Discussion

The amount of the extractable materials from these greige fabrics was 9.029% for the plain woven fabric, 9.129% for the twill woven fabric, 2.959% for the light weight knitted fabric, and 2.391% for the heavy weight knitted fabric. Some properties of the fabrics prior to scouring are shown in Table I. Before scouring, the fabrics were not able to absorb water and showed low whiteness.

Table I. Some properties of the fabrics prior to scouring.

	Woven (Plain)	**Woven (Twill)**	**Knitted (Light)**	**Knitted (Heavy)**
MB on the fabric (g/l)	0.3988	0.4406	0.4028	0.3932
Whiteness	5.487	2.901	5.348	< 0
Breaking load (N)	Warp 183.4 Weft 157.6	Warp 511.1 Weft 301.6	-	-
Bursting strength (kg/cm^2)	-	-	6.04	13.98
Water absorbency	did not absorb water			

MB means methylene blue

After scouring, the pectinase scoured fabrics showed approximately the same whiteness as the caustic scoured fabrics, 3.4-23.2 and 4.2-23.6, respectively. The lipase/protease/cellulase scoured fabrics showed a little higher whiteness of 4.4-29.2. These fabrics were dyed with a pure direct dye "Benzopurpurine 4B" 1% owf and they all had the same color strength or K/S between 2.7-5.0. Tables II and III display the amount of chemicals and enzymes used for obtaining a successful scouring. To scour the fabric with caustic soda, the one-step, one-hour scouring at 80°C was needed while the pectinase scouring required one-step and two hours at 40°C. Lipase, protease, and cellulase were not as effective as pectinase in terms of cotton scouring. They could not function independently like pectinase. A combination use of enzymes was necessary. The two-steps scouring with lipase; protease; or lipase/protease at 37°C for 30 minutes, then followed by cellulase at 40°C for 30 minutes was applied to

acquire an adequate absorbency on the scoured fabrics. Unexpectedly, the plain woven fabric required only one-step scouring with either lipase or lipase/protease. This could be explained as the loose structure of plain weave might allow the lipase enzyme to catalyze the scouring process easier than other structures such as twill and single jersey. Therefore, more impurities were removed from the plain woven fabric via just one-step scouring with lipase or lipase/protease and the amount of removal was sufficient to get an adequate absorbency of the scoured fabric.

Table II. Water absorbency of the fabrics after scouring with caustic soda and with pectinase.

	Woven (Plain)	Woven (Twill)	Knitted (Light)	Knitted (Heavy)
Caustic, %owf	2	4	3	5
Womine TE, g/l	3	3	3	3
Water absorbency	A	A	A	A
Pectinase, g/l	3	5	5	7
Womine TE, g/l	1	1	1	1
Water absorbency	A	B	A	B

A = Absorbed instantaneously B = Absorbed within 1-3 seconds

Table III. Water absorbency of the fabrics after scouring with lipase, protease, and cellulase.

	Woven (Plain)			Woven (Twill)			Knitted (Light)			Knitted (Heavy)		
Lipase	0.5			0.5			0.5			2.0		
WomineTE	1.0			1.0			1.0			1.0		
Protease		0.5			0.5			0.5			8.0	
WomineTE		1.0			1.0			1.0			1.0	
Lipase+Protease			0.5			0.5			0.5			1.0
WomineTE			1.0			1.0			1.0			1.0
Cellulase		0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	5.0	6.0	3.0
WomineTE		1.0		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Water absorbency	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A = Absorbed instantaneously

Table IV display the level of pectin content on the fabric by means of a determination of the amount of methylene blue absorbed on the fabric. The higher the amount of the methylene blue is, the higher of the pectins present. The result shows that 2.2-13.3% of pectins were removed from the fabrics by the caustic scouring, 6.3-17% by the pectinase scouring, and 3.2-38% by the lipase/protease/cellulase scouring. The fabric weight loss examination indicated that the caustic scoured fabrics lost 1.3-3.3%, the pectinase scoured fabrics lost 0.7-3.0%, and the lipase/protease/cellulase lost 2.0-17.3%, compared to

the fabrics before scouring. Scouring cotton fabric with the two-steps scouring using lipase, protease and cellulase produced the highest weight loss on the fabric. This may be explained as the cellulase enzyme used in the second step of scouring assisted the hydrolysis of the cellulose polymer chains, shortened them, weakened the cellulosic fibers, and promoted the removal of the fibers from the fabric surface, leading to a high loss of the fabric weight. Pectin substrates could have been removed from the fabric via this cellulase treatment and thus means more pectins were removed from the fabric by the two-steps scouring with lipase, protease, and cellulase than the one-step scouring with pectinase or with caustic soda.

Table IV. Pectin content (methylene blue) on the fabrics after scouring with caustic soda, pectinase, and lipase/protease/cellulase.

Pectin Content	Methylene Blue on the Fabric (g/l)			
	Woven(Plain)	Woven(Twill)	Knitted(Light)	Knitted(Heavy)
Before scouring	0.3988	0.4406	0.4028	0.3932
Caustic soda	0.3900	0.3820	0.3568	0.3592
Pectinase	0.3736	0.3660	0.3536	0.3372
Lipase then cellulase	-	0.3040	0.3900	0.3120
Protease then cellulase	-	0.2920	0.3812	0.2440
Lipase+Protease then cellulase	-	0.2880	0.3840	0.2560

The results on the fabric strength shown in Table V indicate that scouring with caustic soda increased the breaking load of the woven fabrics but decreased the bursting strength of the knitted fabrics to 5.6% and 18.3%, scouring with pectinase increased the breaking load of the plain woven fabric but decreased the breaking load of the twill woven fabric to 2% and the bursting strength of the knitted fabrics to 2% and 8.7%, and scouring with lipase/protease/cellulase increased the breaking load of the woven fabrics and the bursting strength of the light weight knitted fabric but decreased the bursting strength of the heavy weight knitted fabric from 10-26% due to the high amount of cellulase used in the second scouring step (see Table III) leading to a high loss of the fibers and the fabric strength.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table V. Strength (breaking load and bursting strength) of the fabrics after scouring with caustic soda, pectinase, and lipase/protease/cellulase.

Fabric Strength	Breaking Load (N)				Bursting Strength (kg/cm^2)	
	Woven(Plain)		Woven (Twill)		Knitted(Light)	Knitted(Heavy)
	Warp	Weft	Warp	Weft		
Before scouring	183.4	157.6	511.1	301.6	6.04	13.98
Caustic soda	198.3	185.3	540.9	314.2	5.70	11.42
Pectinase	192.6	181.7	500.6	293.2	5.90	12.76
Lipase	317.3	283.4	-	-	-	-
Lipase+Protease	304.2	281.5	-	-	-	-
Lipase then cellulase	-	-	843.9	457.0	6.87	12.47
Protease then cellulase	328.6	295.6	917.4	465.7	6.80	11.13
Lipase+Protease then cellulase	-	-	1,017.5	477.1	6.93	10.30

Conclusions

The results from this study have shown that the impurities such as pectins can be removed from the cotton fabrics by both the conventional scouring using caustic soda and the enzymatic scouring using pectinase, lipase, protease, and cellulase enzymes. All scoured fabrics showed an adequate absorbency towards water and dye solutions. Lipase, protease, and cellulase were not as effective as pectinase and caustic soda in terms of cotton scouring. They could not function independently. A combination use of enzymes was necessary. The two-steps scouring with lipase; protease; or lipase/protease then followed by cellulase was applied and could remove the highest amount of pectins compared with the caustic and the pectinase scouring processes.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgements

The authors of this article would like to express their thanks to the Thailand Research Fund for providing the fund and the TJTTP-OECF for providing some materials for this study.

References

1. Yonghua Li and Ian R. Hardin, Enzymatic Scouring of Cotton : Effects on Structure and Properties, Textile Chemist and Colorist, Vol. 29, No. 8, August 1997, p. 71-76.
2. K. Sawada, S. Tokino, M. Ueda, and X. Y. Wang, Bioscouring of Cotton with Pectinase Enzyme, Journal of Society of Dyers and Colorists, Vol. 114, November 1998, p. 333-336.
3. M. Michelle Hartzell and You-Lo Hsieh, Enzymatic Scouring to Improve Cotton Fabric Wettability, Textile Research Journal, Vol. 68, No. 4, April 1998, p. 233-241.
4. Johanna Buchert and Jaakko Pere, Scouring of Cotton with Pectinases, Proteases, and Lipases, Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter, Vol.32, No.5, May 2000,p. 48-52.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ATDP COLOURWAY

น้ำบาดาล

หัวใจของอุตสาหกรรมฟอกย้อม

การประยุกต์เอ็นไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

ผลของคลอรีนต่อการย้อมสี

การประยุกต์เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย

ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์ และ ธีระดล รุ่งเรืองกิจไกร
ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Professor Mitsuo Ueda
Department of Design Engineering and Management, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan

อุตสาหกรรมฟอกย้อม พิมพ์และตกแต่งสำเร็จสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่มีบทบาทสำคัญมากในการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์สิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม และในขณะเดียวกันก็เป็นอุตสาหกรรมที่สามารถสร้างของเสียให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากเช่นกัน ขั้นตอนการเตรียมผ้าก่อนย้อม/พิมพ์/ตกแต่งสำเร็จเป็นขั้นตอนที่ใช้สารเคมีและน้ำมาก น้ำเสียจากขั้นตอนจึงมีมากทำให้ต้องใช้สารเคมีจำนวนมากเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อนทิ้งลงแหล่งน้ำสาธารณะ ปัจจุบันมีผู้ประกอบการสิ่งทอและนักวิจัยจำนวนหนึ่งให้ความสนใจที่จะเลือกใช้สารเคมีที่บำบัดง่ายและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย เช่น การใช้เอนไซม์แทนสารเคมีอันตราย เอนไซม์เป็นสารประกอบพวกโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของกระบวนการต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต มีการผลิตและนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นจำนวนมาก อุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีการนำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการผลิต เอนไซม์ที่ใช้อยู่แล้วในโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอคือ เอนไซม์อะไมเลสสำหรับการลอกแป้งออกจากผ้าทอ เซลลูเลสสำหรับการกำจัดขนบนผ้าใยเซลลูโลสและสำหรับการฟอกผ้ายีนส์ และคาทาเลสสำหรับการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่หลงเหลือบนผ้าหลังฟอก

ปัจจุบันเริ่มมีการทดลองใช้เอนไซม์ต่างๆ ในงานวิจัยด้านการเตรียมผ้าฝ้ายเช่น ใช้ในขั้นตอนการลอกแป้ง การกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอก บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้น โดยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการประยุกต์เอนไซม์ต่างๆ ในขั้นตอนการลอกแป้ง การกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอกผ้าฝ้าย

การทดลอง

วัสดุ

ผ้าฝ้ายดิบที่ใช้ในการทดลองนี้มี 4 ชนิดคือ ผ้าทอหนา ผ้าทอบาง ผ้าถักหนาและผ้าถักบางซึ่งสมบัติของผ้ามีแสดงไว้ในตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้เป็นเกรดรีเอเจนต์ เอนไซม์ที่ใช้คือ เอนไซม์อะไมเลส เพกติเนสและกลูโคสออกซิเดสสำหรับการลอกแป้ง การกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอก ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดของเอนไซม์เหล่านี้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 *สมบัติของผ้าฝ้ายดิบต่างๆ*

รายละเอียด	ผ้าทอ	ผ้าทอ	ผ้าถัก	ผ้าถัก
โครงสร้างผ้า	ลายขัด	ลายสอง	เจอร์ซี่	เจอร์ซี่
เบอร์ด้าย	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	50/1	24/2
ชนิดของแป้ง	แป้งมัน	แป้งมันและพีวีเอ	ไม่มี	ไม่มี
ระดับของแป้ง (TEGEWA violet scale. 1 = มากสุด 9 = ไม่มี)	1 (มากสุด)	1 (มากสุด)	9 (ไม่มี)	9 (ไม่มี)
ปริมาณ MB methylene blue กรัม/กรัมของผ้า (ระดับของเพกติน : ปริมาณ MB สูง หมายถึงมีระดับเพกตินสูงด้วย)	11.96	13.21	12.08	11.80
ปริมาณสิ่งสกปรก (%)	9.029	9:129	2.959	2.391
น้ำหนักผ้า (กรัม/100 ตร.ซม.)	1.50	3.90	1.18	2.79
แรงดึงขาด (นิวตัน. ยืน + พุ่ง)	368.9	815.7	ไม่มีการทดสอบ	ไม่มีการทดสอบ
ความแข็งแรง แรงดันทะลุ (กก/ตร.ซม.)	ไม่มีการทดสอบ	ไม่มีการทดสอบ	6.04	13.98
การดูดซึมน้ำ	ไม่ดูดซึมน้ำ			

ตารางที่ 2 *รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง*

เอนไซม์	เบอร์ EC	แหล่ง	แอคติวิตี้	ผู้จำหน่าย
แอลฟาอะไมเลส* (Termamyl 120)	EC 3.2.1.1	Bacillus subtilis	120.000 หน่วย/กรัม	Novo Nordisk. Denmark
เพกติเนส	EC 3.2.1.15	Aspergillus niger	1.700 หน่วย/กรัม	Tokyo Chemical Industry. Japan
กลูโคสออกซิเดส	EC 1.1.3.4	Aspergillus niger	18 หน่วย/มิลลิกรัม	Tokyo Chemical Industry. Japan

**เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้รับความอนุเคราะห์ให้จาก บมจ. อิสต์เอเชียติ๊ก (ประเทศไทย)*

ขั้นตอนการทดลอง

การทดลองนี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการเตรียมผ้าและขั้นตอนการทดสอบสมบัติของผ้า การเตรียมผ้าแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ การลอกแป้ง การกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอก ในส่วนของการกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอกได้กระทำการเตรียมผ้าด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบกับการเตรียมผ้าด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม ในส่วนของการลอกแป้งได้กระทำการเตรียมผ้าด้วยเอนไซม์อย่างเดียว

การเตรียมผ้า

การลอกแป้ง

ผ้าฝ้ายทอ (ผ้าดิบ) ถูกลอกแป้งในสารละลายที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์เป็นสารช่วยให้เอนไซม์เสถียร. สารช่วยเปียกที่ไม่มีประจุชื่อ Womine TE (Tokai Seiyu จากญี่ปุ่น) และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสชื่อ Termamyl 120L (Novo Nordisk จากเดนมาร์ค) ในเครื่องย้อมขนาดเล็ก Ahiba Polymat® ใช้อัตราส่วนผ้าต่อสารละลายหรือ liquor ratio 1:20 ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 45 นาที ปริมาณเอนไซม์และสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถลอกแป้งออกจากผ้าได้หมดหรือเกือบหมด ผ้าที่ผ่านการลอกแป้งแล้วถูกทดสอบหาสมบัติต่างๆ เช่น ระดับของแป้งหลงเหลือบนผ้า น้ำหนักผ้าที่หายไป (%) การดูดซึม

น้ำของผ้าและความแข็งแรงของผ้า ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

การกำจัดสิ่งสกปรก

การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม

ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ได้ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกในสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และ Womine TE โดยใช้ liquor ratio 1:20 ที่อุณหภูมิ 80°C (Womine TE ทำหน้าที่ได้ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 80°C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในเครื่อง Ahiba Polymat® ปริมาณสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันทีหรือภายใน 3 วินาที

การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนส

ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการลอกแป้งและผ้าฝ้ายถัก (ผ้าดิบ) ได้ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกในสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์เพกติเนสและ Womine TE โดยใช้ liquor ratio 1:50. ที่ pH 4 อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงในเครื่อง Ahiba Polymat® ปริมาณเอนไซม์และสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันทีหรือภายใน 3 วินาที

ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วถูกทดสอบหาสมบัติต่างๆ เช่น การดูดซึมน้ำของผ้าน้ำหนักผ้าที่หายไป (%) ระดับเพกตินหลงเหลือบนผ้าและความแข็งแรงของผ้า ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4-6

การฟอกขาว

การฟอกขาวด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม

ผ้าฝ้ายทอและผ้าฝ้ายถักที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมถูกฟอกขาวในสารละลายที่ประกอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมซิลิเกตและ Womine TE ด้วย liquor ratio 1:20 ที่ pH 11.5 อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในเครื่อง Ahiba Polymat® ปริมาณสารเคมีที่ใช้ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับผ้าแต่ละชนิดจนได้สูตรปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถทำให้ผ้ามีดัชนีความขาวอย่างต่ำ 70

การฟอกขาวด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

การฟอกขาวผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมี 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการเตรียมสารฟอกขาวและขั้นตอนการฟอกขาว การเตรียมสารฟอกขาวในที่นี้หมายถึงการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เกิดขึ้นในหม้อฟอกด้วยปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส กลูโคสและออกซิเจน เมื่อกลูโคสออกซิเดสและกลูโคสถูกละลายในน้ำที่ pH 7 อุณหภูมิ 25°C โดยมีการพ่นออกซิเจนลงในสารละลายตลอดเวลา สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดกลูโคนิกจะเกิดขึ้นในสารละลาย เมื่อได้ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากสุดแล้วก็จะหยุดปฏิกิริยาเพื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์และทำการฟอกผ้าทันที

การเตรียมสารฟอกขาวต้องมีการศึกษาถึงปริมาณกลูโคสที่ต้องใช้และเวลาในการให้ออกซิเจนเพื่อให้เกิดสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากที่สุดโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร ในการศึกษานี้พบว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อเตรียมด้วยสารละลาย pH 7 ที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1 กรัม/ลิตรและกลูโคส 50 กรัม/ลิตร และพ่นออกซิเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25°C หลังจากได้สารละลายสำหรับฟอกแล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม/ลิตร เติมผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสและทำการฟอกผ้าที่ liquor ratio 1:20 อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ผ้าที่ผ่านการฟอกแล้วถูกทดสอบหาสมบัติต่างๆ เช่น ดัชนีความขาวของผ้า ความแข็งแรงของผ้า pH ของผ้าและสารเปอร์ออกไซด์หลงเหลือบนผ้า ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7-8

การทดสอบสมบัติของผ้า

ความแข็งแรงของผ้าทอถูกวัดโดยการทดสอบหาค่าแรงดึงขาดตามมาตรฐานการทดสอบ ASTM D5035 ความแข็งแรงของผ้าถักถูกวัดโดยการทดสอบหาค่าความแข็งแรงแรงดันทะลุตามมาตรฐานการทดสอบ JIS L0888 ชนิดของแป้งบนผ้าทอทราบได้จากการทดสอบด้วยวิธี spot test ของ Livengood โดยการหยดสารละลายต่างๆ ที่เตรียมขึ้นด้วยวิธีตามการทดสอบลงบนผ้าแล้วสังเกตสีผ้าตรงที่หยดเทียบกับผลแสดงไว้ในการทดสอบ ระดับของแป้งหลงเหลือบนผ้าสามารถทดสอบได้ด้วยวิธีของ TEGEWA violet scale โดยการแช่ผ้าลงในสารละลายไอโอดีน 1 นาทีแล้วล้างน้ำ ซับผ้าและเทียบสีผ้ากับสีบนแถบสีม่วง 9 แถบของ TEGEWA violet scale แถบสีเบอร์ 1 หมายถึงมีแป้งอยู่บนผ้ามากที่สุด แถบสีเบอร์ 9 หมายถึงไม่มีแป้งหลงเหลือบนผ้า ความสามารถในการดูดซึมน้ำของผ้าทดสอบตามมาตรฐานการทดสอบของ AATCC Test Method 79 "Absorbency of Bleached Fabric" ระดับของเพกตินบนผ้าวัดจากปริมาณสี methylene blue ที่ผ้าดูดซับเข้าไป ถ้ามีปริมาณสีสูงหมายถึงผ้ามีปริมาณของเพกตินสูงด้วย ดัชนีความขาวของผ้าวัดได้จากเครื่อง reflectance spectrophotometer ระดับของสารเปอร์ออกไซด์หลงเหลือบนผ้าหลังฟอกขาววัดตามวิธี spot test ของ Interox[2] และค่า pH ของน้ำสกัดจากผ้าวัดตามมาตรฐานการทดสอบของ AATCC Test Method 81 "pH of the Water-Extract from Bleached Textiles" ปริมาณของไฮโดร-

เจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายฟอกขาวที่เตรียมขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส กลูโคสและออกซิเจน วัดด้วย Potassium permanganate method ของ Interox[2]

ผลการทดสอบสมบัติผ้า

ผ้าฝ้ายทอ (ผ้าดิบ) ผ่านการลอกแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส (Termamyl 120L) และถูกทดสอบหาสมบัติของผ้าดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 *สมบัติของผ้าฝ้ายทอทั้งสองชนิดที่ผ่านการลอกแป้งและปริมาณสารที่ใช้ในการลอกแป้ง*

รายละเอียด	ผ้าทอลายขัด	ผ้าทอลายสอง
Termamyl 120L (กรัม/ลิตร)	1.0	2.0
โซเดียมคลอไรด์ (กรัม/ลิตร)	4.0	4.0
แคลเซียมคลอไรด์ (กรัม/ลิตร)	0.3	0.3
Womine TE (กรัม/ลิตร)	1.0	1.0
TEGEWA violet scale	8.5	8.5-9.0
น้ำหนักที่หายไปของผ้า (%)	8.73	8.68
แรงดึงขาด (นิวตัน)	341.0	812.7
การดูดซึมน้ำ	ดูดซึมหลังหยดน้ำบนผ้าแล้วหลายนาที	

การลอกแป้งด้วยสูตรข้างต้นสามารถไล่แป้งออกจากผ้าได้เกือบหมด โดยวัดระดับของแป้งตกค้างบนผ้าด้วย TEGEWA violet scale ได้ 8.5-9.0 ซึ่งเป็นระดับที่เกือบไม่มีแป้งหลงเหลือบนผ้าเลย พร้อมสำหรับการเตรียมผ้าในขั้นตอนต่อไปได้ (ในโรงงานกำหนดว่าผ้าที่ลอกแป้งแล้วควรได้ TEGEWA violet scale ที่มากกว่า 6 ขึ้นไป จึงจะสามารถย้อมและพิมพ์ผ้าด้วยสีรีแอคทีฟได้) อย่างไรก็ตามผ้ายังมีการดูดซึมน้ำไม่ดี ผ้าสูญเสียน้ำหนักไปประมาณ 8.7% ซึ่งเป็นการสูญเสียน้ำหนักของแป้งบนผ้า สารที่ละลายน้ำบนผ้าและเศษเส้นใยที่หลุดจากผ้าขณะลอกแป้ง ผ้าทอลายขัดสูญเสียความแข็งแรงไปประมาณ 8% ในขณะที่ผ้าทอลายสองสูญเสียความแข็งแรงเพียง 0.4% เมื่อเทียบกับความแข็งแรงของผ้าดิบ

ผ้าทอที่ผ่านการลอกแป้งและผ้าถัก (ผ้าดิบ) ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมและด้วยเอนไซม์เพกติเนสเพื่อให้ผ้ามีความสามารถดูดซึมน้ำได้ดี ซึ่งโดยทั่วไป ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกควรดูดซึมน้ำได้ทันทีที่หยดน้ำลงบนผ้าหรือดูดซึมภายใน 3-5 วินาที ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารเคมีและปริมาณเอนไซม์เพกติเนสที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายชนิดต่างๆ และผลการดูดซึมน้ำหลังการกำจัดสิ่งสกปรก

ตารางที่ 4 *การดูดซึมน้ำของผ้าฝ้ายชนิดต่างๆ หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมและด้วยเอนไซม์เพกติเนส และปริมาณสารที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรก*

สารที่ใช้	ผ้าทอลายขัด	ผ้าทอลายสอง	ผ้าถัก 50/1	ผ้าถัก 24/2
สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม				
NaOH. % (ของน้ำหนักของผ้า)	2	4	3	5
Womine TE. (กรัม/ลิตร)	3	3	3	3
การดูดซึมน้ำ	ทันที	ทันที	ทันที	ทันที
เอนไซม์เพกติเนส				
เพกติเนส. (กรัม/ลิตร)	3	5	5	7
Womine TE. (กรัม/ลิตร)	1	1	1	1
การดูดซึมน้ำ	ทันที	ภายใน 3 วินาที	ทันที	ภายใน 3 วินาที

ตารางที่ 5 *น้ำหนักที่หายไปและระดับของเพกติน (ปริมาณ methylene blue) บนผ้าฝ้ายต่างๆ หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมและด้วยเอนไซม์เพกติเนสเปรียบเทียบกับผ้าก่อนผ่านการกำจัดสิ่งสกปรก*

รายละเอียด	น้ำหนักที่หายไปของผ้า (%) เทียบกับผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก	ปริมาณ methylene blue (กรัม) บนผ้า (กก)
ผ้าทอลายขัด		
ผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	11.96
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	1.318	11.70
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	0.721	11.21
ผ้าทอลายสอง		
ผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	13.21
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	1.607	11.46
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	0.785	10.98
ผ้าถักเจอร์ซี่ 50/1		
ผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	12.08
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	3.322	10.70
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	3.000	10.61
ผ้าถักเจอร์ซี่ 24/2		
ผ้าก่อนการกำจัดสิ่งสกปรก	0.000	11.80
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	3.079	10.78
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	2.700	10.12

ตารางที่ 6 *แรงดึงขาดและแรงดันทะลุของผ้าฝ้ายต่างๆ หลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมและด้วยเอนไซม์เพกติเนส เปรียบเทียบกับผ้าก่อนผ่านการกำจัดสิ่งสกปรก (ผ้าดิบและผ้าหลังการลอกแป้ง)*

รายละเอียด	แรงดึงขาด (ยืน + พุ่ง), นิวตัน	แรงดันทะลุ กก/ตร.ซม.
ผ้าทอลายขัด		
ผ้าดิบ	368.9	-
ผ้าหลังลอกแป้ง	341.0	-
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	383.6	-
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	374.3	-
ผ้าทอลายสอง		
ผ้าดิบ	815.7	-
ผ้าหลังลอกแป้ง	812.7	-
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	855.1	-
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	782.0	-
ผ้าถักเจอร์ซี่ 50/1		
ผ้าดิบ	-	6.04
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	-	5.70
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	-	5.90
ผ้าถักเจอร์ซี่ 24/2		
ผ้าดิบ	-	13.98
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย สารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรม	-	11.42
ผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วย เอนไซม์เพกติเนส	-	12.76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงผลของการดูดซึมน้ำของผ้าหลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมและด้วยเอนไซม์เพกติเนส พบว่าสูตรปริมาณสารเคมีและเอนไซม์ที่แสดงในตารางเป็นปริมาณต่ำสุดที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกและสามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันทีหรือภายใน 3 วินาที

ตารางที่ 5 แสดงผลว่าผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสสูญเสียน้ำหนักไปน้อยกว่าผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมหรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของความสามารถในการแทรกซึมผ่านเข้าผ้าของด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์เพกติเนส และความแตกต่างของปฏิกิริยาต่อสิ่งสกปรกบนผ้าของด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์เพกติเนส กล่าวคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์และสารช่วยเปียก (Womine TE) ในสารละลายอาจแทรกซึมลึกเข้าไปในเส้นใยและทำปฏิกิริยากับสิ่งสกปรกได้มากกว่าเอนไซม์เพกติเนสและสารช่วยเปียกซึ่งอาจอยู่ที่ผิวเส้นใยเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นสิ่งสกปรกจึงอาจถูกกำจัดออกจากผ้าด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้มากกว่าเอนไซม์เพกติเนสและมีผลทำให้ผ้าสูญเสียน้ำหนักไปมากกว่า อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์เพกติเนสก็สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีมากโดยไม่จำเป็นต้องกำจัดสิ่งสกปรกออกมากเท่าการใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ผ้าทอสูญเสียน้ำหนักน้อยกว่าผ้าถัก หลังผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกเพราะผ้าทอได้สูญเสียน้ำหนักจากการลอกแป้งแล้วก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ในตารางยังแสดงระดับของเพกตินบนผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกพบว่าทั้งโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์เพกติเนสสามารถกำจัดเพกตินออกจากผ้าได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน โดยที่เอนไซม์เพกติเนสมีประสิทธิภาพสูงกว่าเล็กน้อย

ตารางที่ 6 แสดงความแข็งแรงของผ้าจากค่าแรงดึงขาดสำหรับผ้าทอและแรงดันทะลุสำหรับผ้าถักหลังผ้าผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และด้วยเอนไซม์เพกติเนส พบว่าผ้าทอลายขัดมีค่าความแข็งแรงมากขึ้นกว่า 10% เมื่อผ้าถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยทั้งสองวิธี ผ้าทอลายสองมีค่าความแข็งแรงมากขึ้น 5% เมื่อผ้าถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่มีค่าความแข็งแรงลดลงเกือบ 4% เมื่อถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนส ผ้าถักมีแรงดันทะลุลดลงหลังการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยทั้งสองวิธีแต่ผ้าที่ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์มีความแข็งแรงลดลงมากกว่าผ้าที่ถูกกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนส สาเหตุการเพิ่มหรือลดลงของความแข็งแรงของผ้าหลังการกำจัดสิ่งสกปรกนี้จะมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

หลังจากผ้าผ่านการลอกแป้งและการทำความสะอาดด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมหรือสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้ว ผ้าถูกฟอกด้วยสารที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยทั่วไปผ้าฟอกเพื่อย้อมสีควรมีดัชนีความขาวอยู่ราว 70 เป็นอย่างต่ำ ตารางที่ 7 แสดงค่าดัชนีความขาวและความแข็งแรงของผ้าฝ้ายชนิดต่างๆ หลังการฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการฟอก

ตารางที่ 7 *ดัชนีความขาวและความแข็งแรงของผ้าฝ้ายต่างๆ หลังการฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารช่วย และปริมาณการใช้สารในการฟอกผ้า*

	ผ้าทอลายขัด	ผ้าทอลายสอง	ผ้าถัก 50/1	ผ้าถัก 24/2
H_2O_2 (50%) กรัม/ลิตร	4	7	3	4
NaOH. กรัม/ลิตร	2	3	2	2
Na_2SiO_3. กรัม/ลิตร	2	2	2	2
Womine TE กรัม/ลิตร	1	1	1	1
ดัชนีความขาว	72.68	69.13	76.33	71.82
แรงดึงขาด.นิวตัน (ยืน+พุ่ง)	341.2	829.7	-	-
แรงดันทะลุ กก./ตร.ซม.	-	-	5.58	11.35

ผ้าที่ผ่านการฟอกขาวด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่มีสารเปอร์ออกไซด์ตกค้างและมี pH ของน้ำสกัดจากผ้าอยู่ในช่วง 7.0-8.5 มีดัชนีความขาวราว 70 และความแข็งแรงลดลงราว 10% เมื่อเทียบกับผ้าก่อนฟอกขาว

ผ้าที่ผ่านการลอกแป้งและการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสถูกฟอกขาวด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและพบว่าผ้าทุกผืนไม่มีสารฟอกตกค้าง มี pH ของน้ำสกัดจากผ้า 7.0-8.5 มีดัชนีความขาวและความแข็งแรงของผ้าตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 *ดัชนีความขาวและความแข็งแรงของผ้าฝ้ายต่างๆ หลังผ่านการฟอกขาวด้วยสารละลายที่เตรียมจากเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1 กรัม/ลิตร. กลูโคส 50 กรัม/ลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และพ่นออกซิเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการฟอกขาวโดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม/ลิตร ฟอกขาวที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง*

	ผ้าทอลายขัด	ผ้าทอลายสอง	ผ้าถัก 50/1	ผ้าถัก 24/2
ดัชนีความขาว (ก่อนฟอก)	10.78	3.40	23.24	7.27
ดัชนีความขาว (หลังฟอก)	22.30	17.12	39.33	24.59
แรงดึงขาด. นิวตัน	337.2	707.6	-	-
แรงดัน ทะลุ. กก/ตร.ซม	-	-	5.54	11.08

การฟอกขาวผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสทำให้ผ้ามีดัชนีความขาวเพิ่มขึ้นมากสุดเกือบ 20 ซึ่งถือว่ายังไม่ขาวพอ และมีความแข็งแรงลดลง 6-13% เมื่อเทียบกับผ้าก่อนฟอก สาเหตุของการฟอกขาวได้ผ้ามีความขาวไม่สูงนักอาจเนื่องมาจากในสารละลายฟอกขาวนอกจากมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วยังมีกรดกลูโคนิคจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส กลูโคสและออกซิเจน กรดนี้ทำให้ pH ของ สารฟอกขาวต่ำเกินไปคือ ราว 3-4 และเมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในสารละลายก่อนฟอกขาวสามารถปรับ pH ของสารฟอกขาวให้เพิ่มได้มากที่สุดแค่ราว 6.5 (ได้ทดลองเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เกินพอเพื่อปรับ pH ของสารฟอกขาวแต่กลับทำให้กลูโคสในสารละลายสลายตัวให้สารสีน้ำตาล) ซึ่งจะมีการศึกษาถึงวิธีการปรับ pH ของสารฟอกขาวนี้ให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถฟอกขาวผ้าได้ความขาวมากขึ้นกว่านี้

สรุปผล

การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์เพกติเนสและสารช่วยเปียกสามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีมากและผ้ามีสมบัติอื่นเทียบเท่าผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ การฟอกขาวผ้าด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสถึงแม้จะสามารถเพิ่มความขาวให้ผ้าได้แค่ราว 20 แต่ถ้ามีการปรับภาวะการเตรียมสารฟอกขาวให้ดีขึ้นเชื่อว่าจะสามารถฟอกผ้าให้ขาวมากยิ่งขึ้นได้

หมายเหตุ *การกำจัดสิ่งสกปรกและการฟอกขาวผ้าด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ กำลังอยู่ในช่วงการดำเนินงาน*

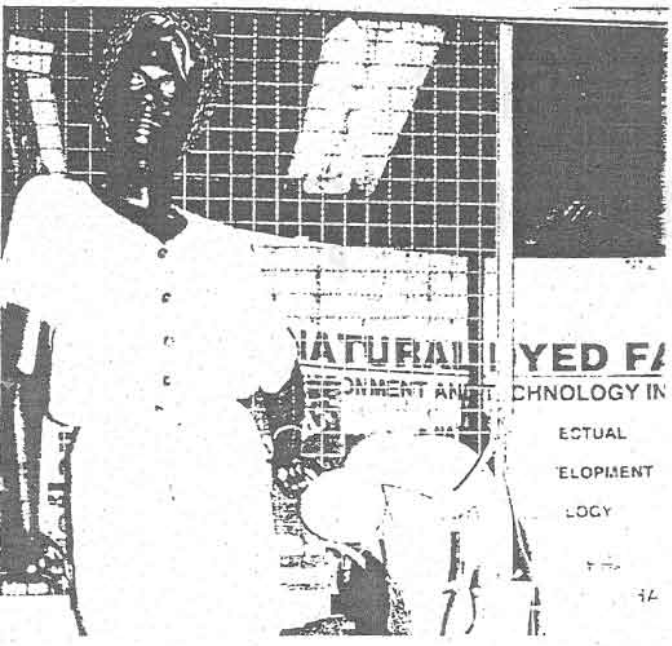
เอกสารอ้างอิง

1. Livengood. C.. Spot Test for Identification of Warp Sizes on Fabrics. Textile Industries. 147(9) : 114-116. 1983.

2. A Bleachers Handbook. Interox America. Houston. Texas. USA. 1980.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในเรื่องเงินทุนวิจัย ขอขอบคุณโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีไทย-ญี่ปุ่น (TJTTP-OECF) ในเรื่องการจัดหาเอนไซม์และสารเคมีบางชนิด สุดท้ายขอขอบคุณบุคคลทุกท่านในหน่วยงานราชการและเอกชนที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือและข้อมูลต่างๆ ให้แก่ทีมงานของผู้เขียน



Bangkok International Fashion Fair 2001

BIFF 2001

18-22 มกราคม 2544

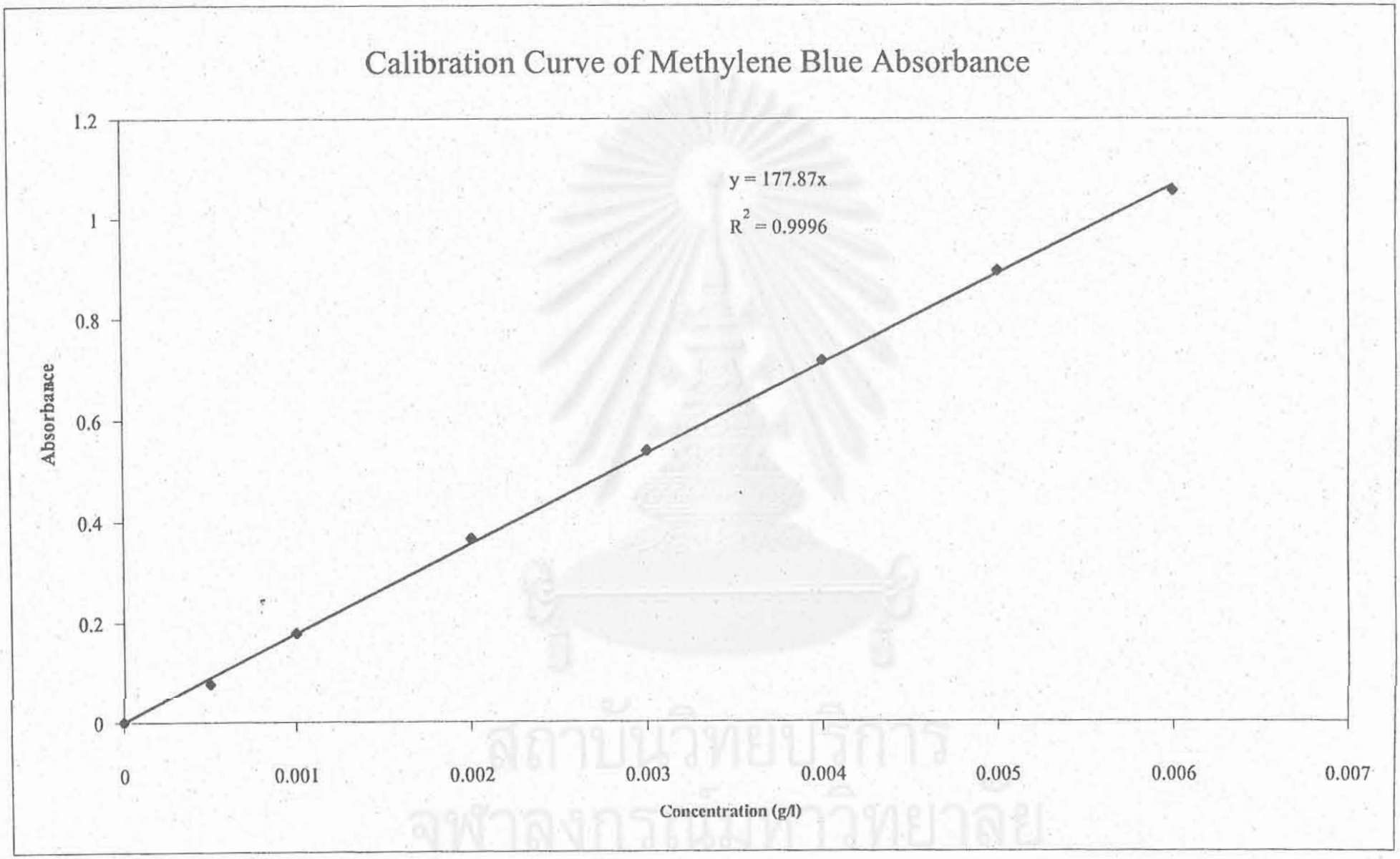
ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค

วันเจรจาธุรกิจ 18-20 มกราคม 2544

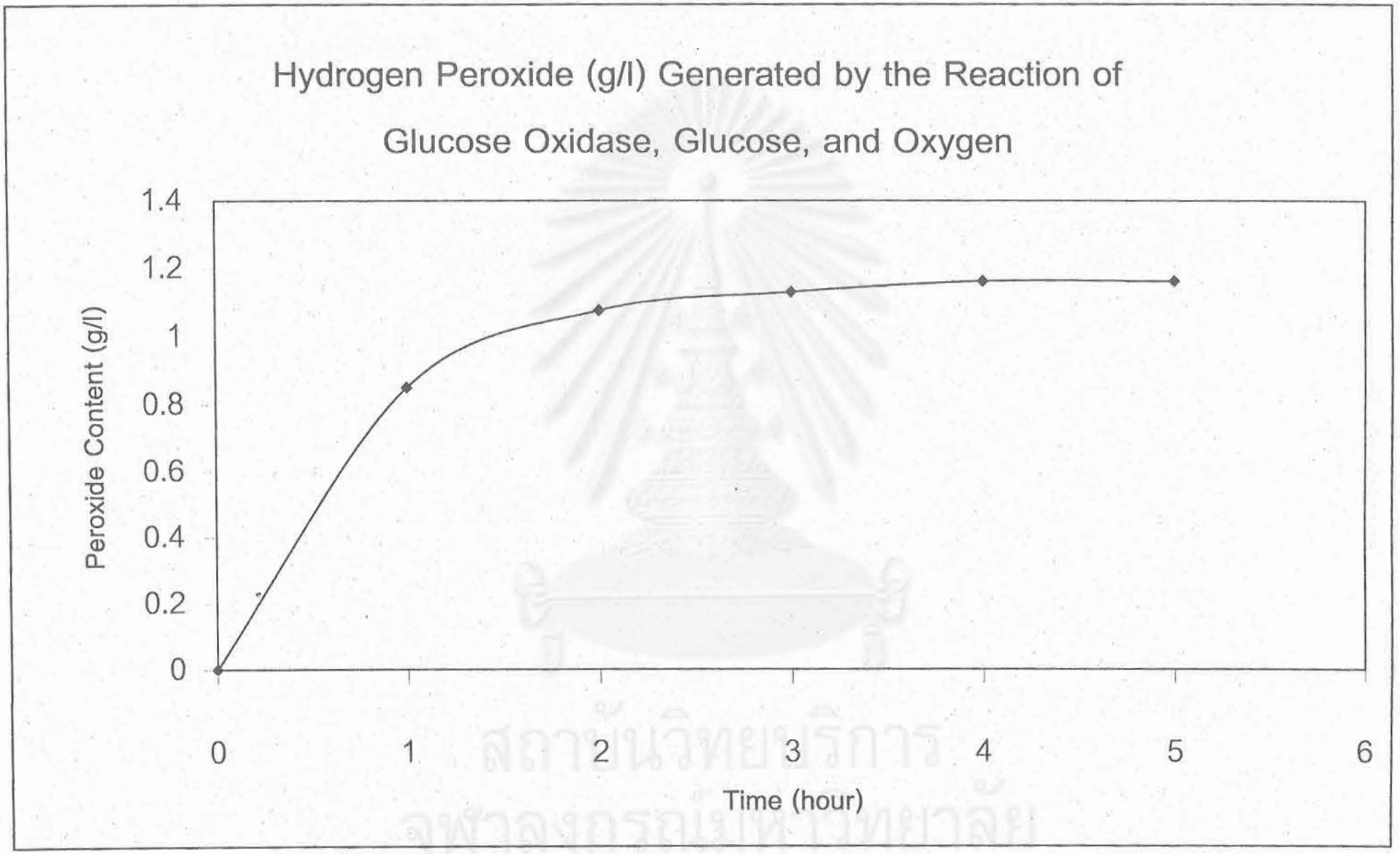
วันจำหน่ายปลีก 21-22 มกราคม 2544

7. ข้อมูลดิบ

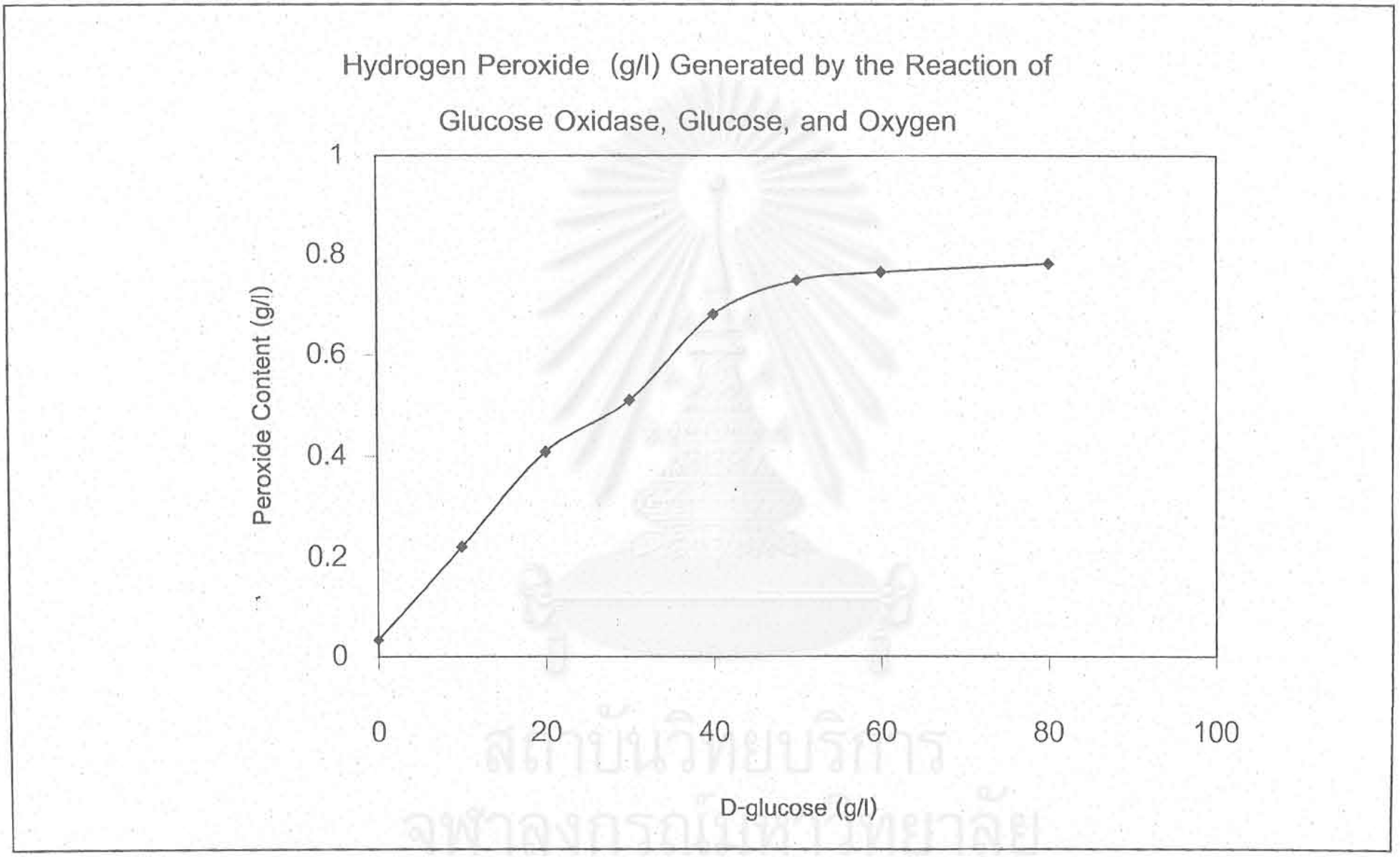
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table A1 Breaking loads (N) in warp direction of greige, desized, scoured and bleached plain weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	219.7	169.1	204.7	180.3	191.0	181.4	168.6
2	200.3	186.2	198.9	204.0	176.8	175.3	162.9
3	220.9	178.1	191.5	200.1	170.8	178.4	154.4
4	213.9	196.3	192.3	186.4	160.3	170.6	165.8
5	213.2	187.1	204.2	192.3	173.7	177.7	156.3
Mean	213.6	183.4	198.3	192.6	174.5	176.7	161.6

Table A2 Elongation (%) in warp direction of greige, desized, scoured and bleached plain weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	14.08	18.65	22.23	18.13	20.45	21.64	22.33
2	13.69	19.702	22.51	22.51	20.80	20.93	23.79
3	14.33	19.29	20.07	20.24	20.60	21.33	21.64
4	17.01	20.29	21.89	19.68	19.61	20.62	23.24
5	13.77	19.05	21.44	21.17	21.08	21.04	23.36
Mean	14.58	19.40	21.63	20.35	20.51	21.38	22.87

Table A3 Breaking loads (N) in warp direction of greige, desized, scoured and bleached twill weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	565.0	506.6	546.8	497.5	540.3	461.8	402.8
2	577.5	514.6	518.3	525.1	513.1	427.2	388.0
3	581.4	496.2	522.5	495.7	517.4	436.2	407.0
4	562.6	529.0	553.4	483.9	542.5	420.1	406.6
5	557.1	509.3	563.4	-	-	-	-
Mean	568.7	511.1	540.9	500.6	519.3	436.3	401.1

Table A4 Elongation (%) in warp direction of greige, desized, scoured and bleached twill weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	17.05	25.64	29.17	26.43	29.57	27.37	28.91
2	18.00	26.56	29.17	28.73	30.34	28.73	30.84
3	16.45	25.95	29.32	26.51	28.97	27.20	27.92
4	16.44	26.03	29.17	27.20	28.31	27.08	29.08
5	16.47	26.25	28.97	27.35	-	-	-
Mean	16.88	26.09	29.16	27.24	29.30	27.60	29.19

Table A5 Breaking loads (N) in weft direction of greige, desized, scoured and bleached plain weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	162.7	150.7	198.6	169.5	174.9	165.9	157.9
2	156.5	166.9	195.5	191.2	153.0	155.7	147.1
3	146.6	158.6	156.6	176.0	157.7	151.9	143.9
4	146.6	154.6	176.8	190.5	185.5	168.8	141.6
5	164.3	157.2	199.2	181.3	165.3	160.2	148.3
Mean	155.3	157.6	185.3	181.7	166.7	160.5	147.8

Table A6 Elongation (%) in weft direction of greige, desized, scoured and bleached plain weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	11.31	11.59	14.59	14.33	13.64	14.41	14.59
2	12.05	13.73	14.01	14.39	13.64	14.23	14.31
3	11.37	12.71	12.56	14.05	14.21	14.65	15.08
4	10.03	13.73	14.24	14.44	14.89	14.07	13.57
5	10.63	13.22	14.16	13.44	13.81	14.15	14.45
Mean	11.08	13.00	13.91	14.13	14.04	14.30	14.40

Table A7 Breaking loads (N) in weft direction of greige, desized, scoured and bleached twill weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	260.9	274.1	345.2	314.0	317.4	268.7	236.4
2	242.8	302.8	312.0	272.1	305.1	277.6	227.1
3	250.8	304.9	281.4	273.2	304.0	280.6	228.1
4	229.0	312.3	335.5	281.0	317.9	259.1	245.4
5	251.4	314.0	297.1	325.8	-	-	-
Mean	247.0	301.6	314.2	293.2	310.4	271.3	234.2

Table A8 Elongation (%) in weft direction of greige, desized, scoured and bleached twill weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	8.72	10.28	11.83	11.83	11.06	11.88	11.95
2	9.37	10.15	11.33	10.85	11.20	11.91	11.80
3	9.35	10.92	11.21	11.59	11.37	11.39	12.32
4	8.95	11.00	12.05	11.89	12.13	12.08	12.14
5	9.59	10.59	10.95	11.97	-	-	-
Mean	9.20	10.59	11.47	11.63	11.44	11.81	12.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table A9 Breaking loads (N) of greige, scoured and bleached yarns.

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	1.396	2.243	2.248	2.142	2.121	1.898
2	1.450	2.293	2.369	2.065	1.896	2.064
3	1.705	2.491	1.979	2.214	1.945	2.140
4	1.472	2.670	2.056	2.418	1.959	1.965
5	1.851	2.167	2.342	2.095	2.033	1.701
6	1.656	1.907	1.936	2.055	1.911	2.079
7	1.811	2.369	2.319	1.948	1.865	2.033
8	1.602	2.351	2.293	2.207	2.190	2.247
9	1.789	2.380	2.407	2.246	2.143	1.905
10	1.587	2.438	2.083	2.423	2.025	1.896
Mean	1.632	2.331	2.203	2.183	2.009	1.993

Table A10 Elongation (%) of greige, scoured and bleached yarns.

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		Conventional	Enzymatic	Conventional	Pre	Post
1	5.864	7.576	7.584	7.224	8.18	7.884
2	5.160	8.104	6.836	7.172	8.104	8.012
3	4.872	7.364	3.788	6.532	7.364	7.056
4	5.272	8.468	7.676	6.960	8.468	6.608
5	5.364	6.080	7.288	7.464	6.080	6.890
6	5.532	6.464	6.564	6.804	6.464	8.324
7	4.444	7.364	6.968	7.468	7.64	8.292
8	5.420	7.304	7.656	7.092	7.576	9.112
9	4.964	7.268	8.072	7.428	7.268	7.636
10	5.264	7.572	7.88	7.496	7.572	7.488
Mean	5.216	7.356	7.031	7.164	7.472	7.730

Table A11 Bursting strength (Kg/cm^2) of greige, scoured and bleached knitted fabrics (yarn count 50/1).

	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		Conventional	Enzyme	Conventional	Pre	Post
1	6.1	5.8	6.1	5.4	5.4	4.8
2	5.8	5.9	5.8	5.5	5.5	4.8
3	6.1	5.5	5.9	5.8	5.8	4.7
4	6.2	5.5	5.6	4.9	4.9	4.7
5	6.0	5.8	6.1	6.1	6.1	4.6
Mean	6.04	5.70	5.90	5.54	5.54	4.72

Table A12 Bursting strength (Kg/cm^2) of greige, scoured and bleached knitted fabrics (yarn count 24/2).

	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		Conventional	Enzyme	Conventional	Pre	Post
1	14.1	11.7	12.8	11.2	10.9	8.5
2	14.3	11.3	12.3	11.4	10.9	8.4
3	13.8	11.3	13.0	11.5	11.2	8.3
4	13.8	11.6	13.1	11.3	10.8	8.4
5	13.9	11.2	12.6	-	11.6	-
Mean	13.98	11.42	12.76	11.35	11.08	8.40

Table A13 Weight of greige woven and knitted fabrics ($g / 100\ cm^2$).

Trial No.	Plain weave	Twill weave	Knitted 50/1	Knitted 24/2
1	1.4952	3.9051	1.1772	2.7973
2	1.5020	3.9176	1.1802	2.7885
3	1.5015	3.8685	1.1778	2.7707
Mean	1.4996	3.8971	1.1784	2.7855

Table A14 Extractable materials in plain weave fabrics: hot water, enzymatic and solvent extractions.

	Trial 1		Trial 2		Trial 3		Mean
	g.	%	g.	%	g.	%	
Greige fabric	2.5341		2.4623		2.4396		
Hot Water ext. fabric	2.4452		2.3712		2.3498		
Enz. ext. fabric	2.3198		2.2424		2.2210		
Sol. ext. fabric	2.3103		2.2345		2.2119		
- Water soluble		3.508		3.370		3.681	3.520%
- Enzyme extractable		4.948		5.231		5.280	5.153%
- Sol. extractable		0.375		0.321		0.373	0.356%
Total ext. materials		8.832		8.922		9.334	9.029%

Table A15 Extractable materials in twill weave fabrics: hot water, enzymatic and solvent extractions.

	Trial 1		Trial 2		Trial 3		Mean
	g.	%	g.	%	g.	%	
Greige fabric	2.3506		2.3386		2.2668		
Hot Water ext. fabric	2.2519		2.2400		2.1700		
Enz. ext. fabric	2.1449		2.1383		2.0380		
Sol. ext. fabric	2.1369		2.1279		2.0563		
- Water soluble		4.199		4.216		4.270	4.228 %
- Enzyme extractable		4.552		4.349		4.500	4.467%
- Sol. extractable		0.340		0.445		0.516	0.434%
Total ext. materials		9.091		9.010		9.286	9.129%

Table A16 Extractable materials in knitted fabric (yarn count 50/1) : hot water, enzymatic and solvent extractions.

	Trial 1		Trial 2		Trial 3		Mean
	g.	%	g.	%	g.	%	
Greige fabric	2.5219		2.4830		2.4723		
Hot Water ext. fabric	2.4602		2.4216		2.4091		
Enz. ext. fabric	2.4607		2.4224		2.4082		
Sol. ext. fabric	2.4486		2.4103		2.3970		
- Water soluble		2.447		2.473		2.557	2.492%
- Enzyme extractable		-		-		-	-
- Sol. extractable		0.460		0.455		0.489	0.468%
Total ext. materials		2.907		2.923		3.046	2.959%

Table A17 Extractable materials in knitted fabric (yarn count 24/2) : hot water, enzymatic and solvent extractions.

	Trial 1		Trial 2		Trial 3		Mean
	g.	%	g.	%	g.	%	
Greige fabric	2.4831		2.4721		2.5061		
Hot Water ext. fabric	2.4321		2.4225		2.4550		
Enz. ext. fabric	2.4327		2.4258		2.4546		
Sol. ext. fabric	2.4232		2.4141		2.4456		
- Water soluble		2.054		2.006		2.039	2.033%
- Enzyme extractable		-		-		-	-
- Sol. extractable		0.358		0.340		0.375	0.358%
Total ext. materials		2.412		2.346		2.414	2.391%

Table A18 Extractable materials in yarns: hot water, enzymatic and solvent extractions.

	Trial 1		Trial 2		Trial 3		Mean
	g.	%	g.	%	g.	%	
Greige fabric	2.3665		2.3818		2.3884		
Hot Water ext. fabric	2.2989		2.3147		2.3185		
Enz. ext. fabric	2.2996		2.3151		2.3183		
Sol. ext. fabric	2.2881		2.3031		2.3063		
- Water soluble		2.857		2.817		2.927	2.867%
- Enzyme extractable		-		-		-	-
- Sol. extractable		0.456		0.487		0.511	0.485%
Total ext. materials		3.313		3.304		3.438	3.352%

Table A19 Weight loss (%) of desized and scoured plain weave fabrics.

	Conventional Process			Enzymatic Process		
	Trial 1	Trial 2	Mean	Trial 1	Trial 2	Mean
Greige (g)	5.0231	5.0111		5.0401	4.9389	
Desizing (g)	4.5812	4.5717		4.6125	4.5016	
Scoured (g)	4.5214	4.5109		4.5813	4.4671	
% Weight Loss after desizing	8.797 %	8.768 %	8.783%	8.484 %	8.854 %	8.669%
% Weight Loss after scouring	1.305 %	1.330 %	1.318%	0.676 %	0.766 %	0.721%

Table A20 Weight loss (%) of desized and scoured twill weave fabrics.

	Conventional Process			Enzymatic Process		
	Trial 1	Trial 2	Mean	Trial 1	Trial 2	Mean
Greige (g)	5.0194	4.9825		4.9404	4.8394	
Desizing (g)	4.5836	4.5544		4.5103	4.4162	
Scoured (g)	4.5073	4.4839		4.4704	4.3860	
% Weight Loss after desizing	8.683%	8.592%	8.639%	8.705%	8.740%	8.723%
% Weight Loss after scouring	1.665%	1.548%	1.607%	0.885%	0.684%	0.785%

Table A21 Weight loss (%) of scoured knitted fabrics (yarn count 50/1).

	Conventional Process			Enzymatic Process		
	Trial 1	Trial 2	Mean	Trial 1	Trial 2	Mean
Greige (g)	5.0643	5.0520		4.9867	4.9390	
Scoured (g)	4.8961	4.8841		4.8356	4.7923	
% Weight Loss after scouring	3.321%	3.323%	3.322%	3.030%	2.970%	3.000%

Table A22 Weight loss (%) of scoured knitted fabrics (yarn count 24/2).

	Conventional Process			Enzymatic Process		
	Trial 1	Trial 2	Mean	Trial 1	Trial 2	Mean
Greige (g)	4.9448	4.9417		4.9076	4.8943	
Scoured (g)	4.7934	4.7887		4.7769	4.7608	
% Weight Loss after scouring	3.062%	3.096%	3.079%	2.663%	2.728%	2.700%

Table A23 Weight loss (%) of scoured yarns.

	Conventional Process			Enzymatic Process		
	Trial 1	Trial 2	Mean	Trial 1	Trial 2	Mean
Greige (g)	4.5100	4.6980		4.6961	4.5294	
Scoured (g)	4.3290	4.5137		4.5504	4.3821	
% Weight Loss after scouring	4.013	3.923	3.968%	3.103	3.252	3.178%

Table A24 Adsorption of methylene blue (MB) on fabrics and yarn.

Substrate	Absorbance of sol. after dyeing (dilute 40 times)	MB (g/l) in sol. sol. after dyeing (dilute 40 times)	MB (g/l) in sol. sol. after dyeing	MB(g/l) on substrate	MB(g) on substrate (kg)
Plain weave					
Desized	0.450	0.00253	0.1012	0.3988	11.96
Scoured (Conventional)	0.534	0.00300	0.1200	0.3900	11.70
Scoured (Enzymatic)	0.562	0.00316	0.1264	0.3736	11.21
Twill weave					
Desized	0.265	0.00149	0.0596	0.4406	13.21
Scoured (Conventional)	0.524	0.00295	0.1180	0.3820	11.46
Scoured (Enzymatic)	0.596	0.00335	0.1340	0.3660	10.98
Knitted (yarn count 50/1)					
Greige	0.432	0.00243	0.0972	0.4028	12.08
Scoured (Conventional)	0.637	0.00358	0.1432	0.3568	10.70
Scoured (Enzymatic)	0.651	0.00366	0.1464	0.3536	10.61
Knitted (yarn count 24/2)					
Greige	0.475	0.00267	0.1068	0.3932	11.80
Scoured (Conventional)	0.626	0.00352	0.1408	0.3592	10.78
Scoured (Enzymatic)	0.724	0.00407	0.1628	0.3372	10.12

Table A24 (Continued)

Substrate	Absorbance of sol. after dyeing (dilute 40 times)	MB (g/l) in sol. sol. after dyeing (dilute 40 times)	MB (g/l) in sol. sol. after dyeing	MB(g/l) on substrate	MB(g) on substrate (kg)
Yarn					
Greige	0.358	0.00201	0.0804	0.4196	12.59
Scoured (Conventional)	0.600	0.00337	0.1348	0.3652	10.96
Scoured (Enzymatic)	0.599	0.00337	0.1348	0.3652	10.96

Note : a. The solutions after dyeing were diluted 40 times and were measured for the maximum absorbances at wavelength 662 nm using a UV-Vis spectrophotometer.

b. The amount of methylene blue (g/l) in the solutions after dyeing (diluted 40 times) were directly drown from the calibration curve in Figure 3.5 at the maximum absorbance (see note a.).

c. Substrates with higher amount of methylene blue on indicate higher amount of pectin presence.

Table A25 Whiteness index of greige, desized, scoured and bleached plain weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	-4.972	9.451	11.019	10.700	72.510	21.997	71.389
2	-5.050	9.186	10.701	11.057	72.801	22.463	72.251
3	-4.791	9.619	10.399	11.422	72.648	22.107	71.981
4	-3.577	8.044	11.122	10.423	72.751	21.994	72.150
5	-5.825	8.305	11.494	10.313	72.705	22.934	70.993
Mean	-4.843	8.921	10.947	10.783	72.683	22.299	71.753

Table A26 Whiteness index of greige, desized, scoured and bleached twill weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	-17.017	-0.890	5.792	3.584	69.117	16.819	68.860
2	-16.869	-1.535	3.507	3.652	69.968	17.012	68.935
3	-16.503	-2.102	3.413	3.207	69.065	17.451	69.314
4	-16.647	0.947	3.385	3.016	68.775	17.355	69.211
5	-16.743	0.957	4.833	3.559	68.718	16.984	68.367
Mean	-16.756	-0.525	4.186	3.404	69.129	17.125	68.939

Table A27 Whiteness index of greige, scoured and bleached knitted fabrics (yarn count 50/1)

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	0.295	24.476	22.513	76.634	40.619	74.545
2	-0.890	23.913	23.229	76.239	38.270	74.681
3	-1.107	24.515	23.556	76.439	38.636	74.604
4	-1.382	22.880	23.828	76.126	39.295	74.007
5	-0.540	22.274	23.086	76.227	39.824	74.819
Mean	-0.725	23.612	23.242	76.333	39.329	74.531

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table A28 Whiteness index of greige, scoured and bleached knitted fabrics (yarn count 24/2)

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	-10.735	6.397	6.754	72.477	23.848	71.235
2	-10.879	7.226	7.233	71.497	25.919	71.868
3	-9.986	8.093	7.639	71.691	25.441	70.844
4	-10.766	7.934	7.586	71.500	23.254	71.315
5	-10.533	9.772	7.132	71.910	24.476	71.390
Mean	-10.580	7.884	7.269	71.815	24.588	71.330

Table A29 Whiteness index of greige, scoured and bleached yarns.

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	15.812	39.104	37.784	81.379	53.328	78.328
2	15.939	38.257	38.08	80.778	54.780	77.854
3	14.199	37.651	38.974	80.860	54.415	78.411
4	14.216	39.14	37.659	81.698	53.93	79.015
5	14.532	37.666	38.374	80.773	53.759	79.392
Mean	14.940	38.364	38.174	81.100	54.042	78.600

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table A30 Yellowness of greige, desized, scoured and bleached plain weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	28.747	23.375	22.315	23.010	4.074	19.913	4.033
2	28.877	23.443	23.433	22.843	4.034	19.811	4.123
3	28.663	23.260	23.582	22.748	3.995	20.031	4.082
4	28.300	23.652	22.350	23.074	4.062	19.999	4.023
5	29.184	23.544	22.185	23.033	4.021	20.024	4.047
Mean	28.754	23.455	22.773	22.942	4.037	19.956	4.062

Table A31 Yellowness of greige, desized, scoured and bleached twill weave fabrics.

Trial No.	Greige	Desized	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
			(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	31.244	24.917	23.683	24.522	5.600	21.396	5.903
2	31.251	25.000	24.535	24.329	5.155	20.949	5.886
3	31.337	24.949	24.440	25.011	5.891	21.154	5.874
4	31.301	24.224	24.181	25.107	5.412	21.205	5.781
5	31.217	24.634	23.829	24.534	5.379	21.248	5.597
Mean	31.270	24.745	24.134	24.701	4.487	21.190	5.808

Table A32 Yellowness of greige, scoured and bleached knitted fabrics

(yarn count 50/1)

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	26.869	19.818	20.485	2.967	14.882	3.401
2	27.193	19.958	20.466	3.124	15.421	3.243
3	27.290	19.749	20.399	3.153	15.177	3.253
4	27.431	20.073	20.257	3.005	15.203	3.384
5	27.221	19.513	20.502	3.074	15.005	3.091
Mean	27.201	19.822	20.422	3.064	15.138	3.274

Table A33 Yellowness of greige, scoured and bleached knitted fabrics (yarn count 24/2)

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	30.933	25.849	26.015	4.657	14.882	4.823
2	31.009	25.547	25.432	4.833	15.421	4.847
3	30.322	24.957	25.648	4.795	15.177	4.784
4	30.957	25.283	25.241	4.953	15.203	4.821
5	30.607	24.660	25.207	4.733	15.005	4.835
Mean	30.766	25.259	25.509	4.794	15.138	4.822

Table A34 Yellowness of greige, scoured and bleached yarns.

Trial No.	Greige	Scoured		Bleached	Enzymatic Bleached	
		(Conventional)	(Enzymatic)	(Conventional)	Pre	Post
1	25.027	16.360	16.540	2.627	11.043	3.093
2	24.884	16.859	17.123	3.395	11.327	3.154
3	24.515	16.733	16.778	3.099	11.117	3.242
4	24.508	16.003	16.869	3.082	11.054	3.004
5	24.683	16.721	16.095	3.131	11.015	3.310
Mean	24.723	16.535	16.681	3.067	11.110	3.161

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าทอบางก่อนทำ scouring

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.2094	0.1967	0.2168	0.1985	0.2010	0.2117	0.2152	0.1976	0.2347	0.2039	0.2528	0.2016
2	0.2072	0.1952	0.2153	0.1980	0.2001	0.2111	0.2140	0.1964	0.2340	0.2021	0.2516	0.2011
3	0.2068	0.1952	0.2141	0.1974	0.1985	0.2107	0.2129	0.1951	0.2339	0.2021	0.2519	0.2007
4	0.2066	0.1947	0.2139	0.1977	0.1980	0.2104	0.2126	0.1953	0.2336	0.2015	0.2510	0.2009
5	0.2068	0.1946	0.2133	0.1979	0.1981	0.2106	0.2123	0.1953	0.2337	0.2018	0.2514	0.2006
6	0.2063	0.1945	0.2129	0.1973	0.1979	0.2105	0.2122	0.1952	0.2334	0.2019	0.2509	0.2004
7	0.2065	0.1945	0.2130	0.1972	0.1981	0.2103	0.2124	0.1953	0.2335	0.2020	0.2511	0.2005
8	0.2064	0.1946	0.2131	0.1973	0.1980	0.2102	0.2125	0.1954	0.2334	0.2017	0.2512	0.2004
9	0.2062	0.1943	0.2130	0.1971		0.2103	0.2124			0.2018	0.2511	0.2003
10	0.2064	0.1944	0.2131	0.1973						0.2018		0.2004
11		0.1945										
12												
13												
14												
15												
น้ำหนักที่ต้องการ	0.2064	0.1945	0.2131	0.1973	0.1980	0.2103	0.2124	0.1953	0.2334	0.2018	0.2511	0.2004

ชิ้นที่ 1,2,3 scour ด้วย Protease ⟶ Cellulase

ชิ้นที่ 4 scour ด้วย Protease

ชิ้นที่ 5,6,7 scour ด้วย Lipase ⟶ Cellulase

ชิ้นที่ 8 scour ด้วย Lipase

ชิ้นที่ 9,10,11 scour ด้วย Protease+Lipase ⟶ Cellulase

ชิ้นที่ 12 scour ด้วย Protease+Lipase

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าทอบางหลังทำ scouring

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.1791	0.1610	0.1822	0.1729	0.1718	0.1867	0.1837	0.1777	0.2031	0.1800	0.2162	0.1732
2	0.1754	0.1603	0.1807	0.1715	0.1709	0.1852	0.1824	0.1760	0.2022	0.1792	0.2154	0.1728
3	0.1742	0.1599	0.1792	0.1710	0.1705	0.1844	0.1810	0.1754	0.2017	0.1785	0.2146	0.1722
4	0.1721	0.1602	0.1795	0.1709	0.1701	0.1839	0.1806	0.1749	0.2006	0.1787	0.2139	0.1717
5	0.1708	0.1596	0.1791	0.1702	0.1700	0.1840	0.1804	0.1748	0.2004	0.1786	0.2137	0.1714
6	0.1704	0.1597	0.1782	0.1707	0.1699	0.1838	0.1805	0.1742	0.2000	0.1788	0.2132	0.1719
7	0.1699	0.1599	0.1784	0.1700	0.1702	0.1837	0.1804	0.1746	0.2005	0.1786	0.2135	0.1716
8	0.1700	0.1598	0.1781	0.1704	0.1701	0.1839	0.1804	0.1742	0.2001	0.1787	0.2130	0.1718
9	0.1701	0.1596	0.1782	0.1705	0.1700	0.1834		0.1743	0.2002	0.1787	0.2109	0.1715
10	0.1702	0.1597	0.1783	0.1702	0.1701	0.1838		0.1742	0.2002		0.2130	0.1716
11	0.1699	0.1597	0.1782	0.1703		0.1836			0.2003		0.2131	0.1716
12	0.1700			0.1702		0.1838			0.2002		0.2130	
13												
14												
15												
น้ำหนักที่ได้	0.1700	0.1597	0.1782	0.1702	0.1701	0.1838	0.1804	0.1742	0.2002	0.1787	0.2130	0.1716

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าทอหนาก่อนการทำ scouring แล้ว

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.5049	0.4386	0.4510	0.6224	0.5614	0.5200	0.4724	0.7138	0.6227	0.5693	0.6288	0.7342
2	0.5036	0.4380	0.4502	0.6210	0.5611	0.5187	0.4732	0.7127	0.6215	0.5687	0.6282	0.7326
3	0.5028	0.4376	0.4508	0.6198	0.5607	0.5172	0.4718	0.7119	0.6198	0.5662	0.6272	0.7324
4	0.5022	0.4375	0.4503	0.6178	0.5609	0.5158	0.4712	0.7115	0.6186	0.5650	0.6279	0.7321
5	0.5016	0.4377	0.4496	0.6189	0.5609	0.5156	0.4709	0.7116	0.6187	0.5648	0.6277	0.7318
6	0.5017	0.4378	0.4492	0.6180	0.5608	0.5154	0.4710	0.7112	0.6189	0.5644	0.6276	0.7322
7	0.5015.	0.4378	0.4493	0.6181	0.5610	0.5152	0.4708	0.7113	0.6185	0.5646	0.6275	0.7319
8	0.5017	0.4377	0.4494	0.6185	0.5609	0.5151	0.4706	0.7115	0.6188	0.5644		0.7320
9	0.5015	0.4378	0.4494	0.6184		0.5150	0.4707	0.7112	0.6187	0.5643		0.7318
10	0.5017		0.4497	0.6181		0.5151	0.4707	0.7111	0.6182			0.7317
11	0.5017		0.4494	0.6180		0.5153		0.7112	0.6188			0.7318
12				0.6181		0.5151						0.7317
13												0.7317
14												
15												
น้ำหนักที่ ได้	0.5017	0.4378	0.4494	0.6181	0.5609	0.5151	0.4707	0.7112	0.6188	0.5643	0.6276	0.7317

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าทอหนาที่ผ่านการทำ scouring แล้ว

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.4547	0.3902	0.3892	0.5618	0.5013	0.4476	0.4111	0.6396	0.5597	0.4858	0.5567	0.6637
2	0.4533	0.3892	0.3881	0.5607	0.5007	0.4470	0.4082	0.6400	0.5583	0.4832	0.5545	0.6628
3	0.4522	0.3895	0.3873	0.5600	0.5000	0.4458	0.4071	0.6386	0.5580	0.4821	0.5551	0.6626
4	0.4517	0.3888	0.3866	0.5589	0.5001	0.4441	0.4064	0.6388	0.5574	0.4823	0.5538	0.6624
5	0.4511	0.3882	0.3869	0.5592	0.4997	0.4432	0.4069	0.6384	0.5566	0.4816	0.5526	0.6627
6	0.4513	0.3887	0.3824	0.5596	0.4991	0.4426	0.4067	0.6383	0.5548	0.4817	0.5527	0.6623
7	0.4507	0.3889	0.3820	0.5590	0.4985	0.4423	0.4069	0.6383	0.5547	0.4819	0.5504	0.6624
8	0.4509	0.3887	0.3818	0.5595	0.4986	0.4428	0.4067		0.5551	0.4820	0.5509	
9	0.4500	0.3889	0.3812	0.5597	0.4988	0.4422	0.4068		0.5545	0.4818	0.5502	
10	0.4502	0.3889	0.3817	0.5596	0.4987	0.4427	0.4067		0.5543	0.4817	0.5501	
11	0.4503		0.3819	0.5596	0.4988	0.4426	0.4066		0.5543	0.4818	0.5503	
12	0.4501		0.3818		0.4986	0.4428	0.4067		0.5544	0.4817	0.5501	
13	0.4502		0.3816		0.4988	0.4428			0.5543		0.5501	
14	0.4502		0.3817									
15												
น้ำหนักที่ได้	0.4502	0.3889	0.3818	0.5596	0.4986	0.4428	0.4067	0.6383	0.5543	0.4817	0.5501	0.6624

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าถักบางก่อนทำ scouring

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.6288	0.6367	0.6565	0.7933	0.8904	0.8872	0.8457	0.8215	0.4519	0.5057	0.8246	0.8170
2	0.6263	0.6354	0.6542	0.7920	0.8896	0.8864	0.8438	0.8207	0.4521	0.5046	0.8241	0.8162
3	0.6234	0.6341	0.6539	0.7919	0.8882	0.8857	0.8432	0.8199	0.4512	0.5046	0.8242	0.8160
4	0.6227	0.6334	0.6535	0.7921	0.8878	0.8849	0.8430	0.8187	0.4513	0.5045	0.8238	0.8159
5	0.6226	0.6333	0.6530	0.7918	0.8884	0.8846	0.8429	0.8189	0.4516	0.5046	0.8234	0.8158
6	0.6228	0.6334	0.6538	0.7919	0.8885	0.8845	0.8433	0.8190	0.4512		0.8239	0.8157
7	0.6228	0.6334	0.6532	0.7915	0.8886	0.8847	0.8432	0.8189	0.4511		0.8238	0.8156
8	0.6230		0.6531	0.7920	0.8885	0.8846	0.8431	0.8186	0.4512		0.8238	0.8159
9	0.6227		0.6533	0.7919	0.8885	0.8843	0.8432	0.8188				
10	0.6228		0.6532	0.7918		0.8844		0.8189				
11			0.6532			0.8846						
12												
13												
14												
15												
น้ำหนักที่ได้	0.6228	0.6334	0.6532	0.7919	0.8885	0.8846	0.8432	0.8189	0.4512	0.5046	0.8238	0.8159

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าถักบางหลังทำ scouring

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.6062	0.6155	0.6349	0.7777	0.8710	0.8641	0.8304	0.8009	0.4415	0.4942	0.8079	0.8047
2	0.6057	0.6157	0.6336	0.7771	0.8699	0.8637	0.8297	0.8007	0.4411	0.4933	0.8072	0.8038
3	0.6055	0.6156	0.6335	0.7764	0.8698	0.8634	0.8296	0.8000	0.4402	0.4931	0.8070	0.8039
4	0.6056	0.6155	0.6339	0.7761	0.8700	0.8630	0.8297	0.8002	0.4404	0.4936	0.8075	0.8037
5	0.6052	0.6154	0.6332	0.7763	0.8699	0.8631	0.8299	0.8000	0.4401	0.4932	0.8071	0.8038
6	0.6054	0.6153	0.6337	0.7760	0.8697	0.8630	0.8297	0.8001	0.4400	0.4931	0.8070	0.8038
7	0.6055	0.6155	0.6335	0.7762	0.8699	0.8629	0.8298	0.8000	0.4402	0.4930	0.8069	
8	0.6055		0.6334	0.7761	0.8699	0.8631			0.4401	0.4931	0.8070	
9			0.6336	0.7761		0.8630			0.4402			
10									0.4401			
11									0.4401			
12												
13												
14												
15												
น้ำหนักที่ได้	0.6055	0.6155	0.6336	0.7761	0.8699	0.8630	0.8297	0.8000	0.4401	0.4931	0.8070	0.8038

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าถักหนาก่อนทำ scouring

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.4921	0.5114	0.5610	0.6261	0.5006	0.5437	0.5904	0.5230	0.4948	0.5192	0.4519	0.5654
2	0.4915	0.5111	0.5605	0.6252	0.4996	0.5422	0.5898	0.5224	0.49+3	0.5195	0.4518	0.5647
3	0.4914	0.5108	0.5597	0.6251	0.4997	0.5417	0.5885	0.5220	0.4932	0.5183	0.4521	0.5644
4	0.4916	0.5109	0.5599	0.6250	0.4999	0.5414	0.5884	0.5219	0.4934	0.5182	0.4517	0.5632
5	0.4912	0.5109	0.5598	0.6251	0.4998	0.5412	0.5888	0.5221	0.4930	0.5184	0.4512	0.5634
6	0.4914	0.5109	0.5599	0.6249	0.4998	0.5415	0.5887	0.5222	0.4931	0.5183	0.4511	0.5632
7	0.4913	0.5107	0.5599	0.6250	0.4997	0.5416	0.5886	0.5225	0.4932	0.5183	0.4509	0.5637
8	0.4914	0.5108		0.6250	0.4998	0.5415	0.5890	0.5220	0.4932		0.4510	0.5639
9		0.5109				0.5415	0.5887	0.5221			0.4512	0.5638
10							0.5886	0.5221				0.5638
11												0.5638
12												
13												
14												
15												
น้ำหนักที่ได้	0.4914	0.5109	0.5599	0.6250	0.4998	0.5415	0.5887	0.5221	0.4932	0.5183	0.4512	0.5638

ข้อมูลดิบของน้ำหนักผ้าที่ทดสอบหาน้ำหนักที่คงที่ ของผ้าถักหนาหลังทำ scouring

ชิ้นที่ / ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.4788	0.4940	0.5444	0.6114	0.4875	0.5280	0.5694	0.5114	0.4795	0.5032	0.4390	0.5504
2	0.4778	0.4935	0.5439	0.6102	0.4869	0.5272	0.5687	0.5107	0.4782	0.5030	0.4387	0.5501
3	0.4776	0.4932	0.5440	0.6105	0.4866	0.5277	0.5682	0.5110	0.4785	0.5025	0.4381	0.5500
4	0.4774	0.4933	0.5432	0.6101	0.4862	0.52730	0.5684	0.5100	0.4782	0.5022	0.4381	0.5507
5	0.4778	0.4932	0.5435	0.6102	0.4864	.5271	0.5688	0.5106	0.4781	0.5021	0.4380	0.5501
6	0.4777	0.4931	0.5438	0.6099	0.4867	0.5270	0.5686	0.5105	0.4783	0.5020	0.4381	0.5502
7	0.4778	0.4930	0.5439	0.6101	0.4862	0.5275	0.5689	0.5102	0.4782	0.5023		0.5501
8		0.4932	0.5440	0.6101	0.4860	0.5271	0.5687	0.5105		0.5022		0.5499
9			0.5439		0.4862	0.5271	0.5687	0.5106				0.5501
10					0.4862		0.5688	0.5105				
11							0.5688					
12												
13												
14												
15												
น้ำหนักที่ได้	0.4778	0.4932	0.5439	0.6101	0.4862	0.5271	0.5688	0.5105	0.4782	0.5022	0.4381	0.5501