กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง: *Bacillus* สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2

Enzyme activities of α-amylase produced by thermophilic bacteria : *Bacillus* strain BA 1 and BA 2

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ บางพลี สมุทรปราการ 10540

บทคัดย่อ

ทำการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้ในปริมาณมากจากดิน จำนวน 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ซึ่งมีดีกรีในการย่อยแป้ง 2.1 และ 2.6 ตามลำดับ โดยที่เชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ BA 1 มีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์มากที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 บ่มนาน 2 วัน ส่วน *Bacillus* สายพันธุ์ BA 2 มีสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 บ่มนาน 3 วัน โดยเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 146 และ 166 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้ที่อุณหภูมิสูงสันนิษฐานได้ว่าเอนไซม์ α-amylase ที่ผลิตจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้น่าจะมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง (thermostable α-amylase) เช่นเดียวกัน สมควรที่จะนำไปศึกษาต่อไป

Abstract

Thermophilic bacteria (*Bacillus* strain BA 1 and BA 2) which produced large amounts of α-amylase, were isolated from soil. The ratio of the hydrolysis zone to the colony dimeter of *Bacillus* strain BA 1 and BA 2 were 2.1 and 2.6, respectively. The optimal condition for α-amylase production of *Bacillus* strain BA 1 was at 55 ^{0}C, pH 5.0 for 2 days and α-amylase production was at its highest 146 unit/ml. The highest α-amylase produced by *Bacillus* strain BA 2 was 166 unit/ml at 55 ^{0}C, pH 7.0 for 3 days. In this study showed that, *Bacillus* strain BA1 and BA 2 hold great promise for thermostable α-amylase and provided attractive possibilities for further study.

1. บทนำ

α-amylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง ไกลโคเจน แบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-1,4 glycocidic linkage จะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตส เอนไซม์ α-amylase ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ [1] ที่ต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอซึ่งจะทำให้ด้ายดิบนั้นขาดได้ง่ายดังนั้นก่อนจะนำมาทอผ้า เส้นด้ายดิบนั้นต้องนำไปชุบน้ำแป้งเพื่อให้เส้นด้ายมีความคงทนต่อแรงดึง หลังจากทอเป็นผ้าแล้วจะต้องมีการนำเอาแป้งที่ ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์ α-amylase อีกทั้งถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้ ซึ่งโดยปกติแล้วน้ำผลไม้ที่คั้นจากผลไม้มักจะมีลักษณะขุ่นและมีปริมาณแป้งอยู่สูง ทำให้มีลักษณะไม่น่ารับประทาน ถ้ามีการเติมเอนไซม์ α-amylase ลงไปจะทำให้น้ำผลไม้นั้นใสขึ้น นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเบียร์อีกด้วย [2] จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ α-amylase มีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ดังนั้นจึงมีการศึกษา ค้นคว้าแหล่งผลิตเอนไซม์ α-amylase กันมากขึ้น โดยทั่วไปเอนไซม์ α-amylase มักมีการแยกได้จากเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติได้แก่เชื้อรา *Rhizomucor* spp., [3] *Aspergillus* spp. [4] และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. [5,6] ซึ่งแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้นี้มักมีคุณสมบัติพิเศษเหมาะสมต่อการใช้งานในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ α-amylase ที่มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูง (thermostable α-amylase) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงโดยที่เอนไซม์ไม่เสียสภาพไป ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้ จากตัวอย่างดินและศึกษาอิทธิพลของพีเอช อุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อการผลิต α-amylase ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว จังหวัดนครปฐม ทั้งหมด 20 ตัวอย่างมา ตัวอย่างละ 10 กรัม ผสมในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ดูดส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar (SA) (soluble starch ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ใน minimal media) บ่มที่อุณหภูมิ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ทดสอบการสร้างเอนไซม์ α-amylase ของเชื้อโดยการราดทับด้วยสารละลายไอโอดีน (iodine ร้อยละ 1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ที่ประกอบด้วย potassium iodide ร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร)) ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้จะให้โซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ ทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีดีกรีในการย่อยแป้งมากกว่า 2 (ดีกรีในการย่อยแป้งคำนวณจากเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสหารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี) จากนั้นนำมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เก็บไว้เป็นเชื้อต้นตอ (stock culture) เพื่อทำการวินิจฉัยแยกเชื้อแบคทีเรียออกเป็นจีนัส สปีชีส์ และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

2.2 วินิจฉัยแยกเชื้อแบคทีเรียออกเป็นจีนัส สปีชีส์

2.2.1 ศึกษาสัณฐานโคโลนี ลักษณะของเซลล์ และสปอร์ของเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงที่สามารถสร้างเอนไซม์ α-amylase ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SA โดยสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ การติดสีย้อมแกรมและลักษณะสปอร์ เพื่อดูลักษณะของเซลล์และตำแหน่งของสปอร์

2.2.2 ทดสอบชีวเคมีของเชื้อ

ทดสอบชีวเคมีของเชื้อ ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase ทดสอบการเคลื่อนที่ ทดสอบการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน ทดสอบ Methyl Red (MR) ทดสอบ Voges-Proskauer (VP) ทดสอบการย่อยสลายแป้ง ทดสอบการย่อยสลายน้ำตาลมอลโตส ทดสอบความต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต

2.3 ศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ α-amylase

2.3.1 ศึกษาพีเอชและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 2.1) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ starch broth (SB) ในพีเอชที่แตกต่างกัน ได้แก่ 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 และ 11.0 ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยปรับให้เชื้อมีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 MacFarland No 1 ($1.5x10^8$ CFU/ml) จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิที่สามารถแยกเชื้อนั้นได้ (จากข้อ 2.1) ในตู้บ่มแบบเขย่า (incubator shaker) ที่เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการวัด กิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน

2.3.2 ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ starch broth (SB) ในพีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 2.3.1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันได้แก่ 37, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบเขย่า (incubator shaker) ที่เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการวัด กิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน

2.3.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) [7]

α-amylase จากเชื้อที่นำมาศึกษาเป็นเอนไซม์ชนิดที่ถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ดังนั้นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ทำโดยนำ SB ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะต่าง ๆ (จากข้อ 2.3.1-2.3.2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของ α-amylase โดยการเติมส่วนใสปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในสารละลายน้ำแป้ง (soluble starch solution ร้อยละ 0.5 (น้ำหนักโดยปริมาตร)) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่กำหนด (37, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส) นาน 20 นาที จากนั้นเติม DNS reagent ลงไปปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วัดปริมาณ reducing sugar ที่ถูกปล่อยออกมาจาก ปฏิกริยาโดยเปรียบเทียบกับ glucose standard curve [8] คำนวนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase (enzyme activity) มีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (unit/ml)

1 ยูนิตของกิจกรรมเอนไซม์ α-amylase หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นได้ ผลผลิตเป็น reducing sugar ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ในสภาวะที่กำหนด [7]

3. ผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้ โดยเก็บตัวอย่างจากดินบริเวณน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว พบสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยแป้งได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีดีกรีในการย่อยแป้งมากกว่า 2 จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 มีดีกรีในการย่อยแป้งเท่ากับ 2.1 และ 2.6 ตามลำดับ (ส่วนการคัดเลือกเชื้อที่อุณหภูมิ 60 และ 65 องศาเซลเซียส พบเชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้แต่มีดีกรีในการย่อยแป้งน้อยกว่า 2.0 จึงไม่นำศึกษาต่อ) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 มาศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อพบว่าสายพันธุ์ BA 1 มีโคโลนีขนาดใหญ่ ประมาณ 5-8 มิลลิเมตร มีสีขาว โคโลนีค่อนข้างแบนขอบไม่เรียบ เมื่อนำมาย้อมแกรมจะพบเชื้อมีลักษณะติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการเรียงตัวเป็นสาย (gram-positive bacilli in chain) เซลล์มีขนาด 0.3-0.6 X 3.0-5.3 ไมโครเมตร มีสปอร์อยู่ภายในเซลล์ รูปไข่ (oval shape) อยู่บริเวณค่อนมาทางปลายเซลล์ (subterminal spore) สปอร์มีขนาดเล็กกว่าเซลล์ทำให้เซลล์ไม่โป่งออก ดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วนสายพันธุ์ BA 2 โคโลนีมีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์ BA 1 โคโลนีมีขนาดประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ลักษณะกลมนูน มีสีขาว เมื่อทำการย้อมแกรมจะมีลักษณะติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งมีการเรียงตัวเป็นสาย เซลล์มีขนาด 0.3-0.5 X 2.3-3.5 ไมโครเมตร มีสปอร์รูปไข่ คล้ายสายพันธุ์ BA 1 แต่ตำแหน่งสปอร์อยู่ที่บริเวณปลายเซลล์ (terminal spore) และสปอร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ทำให้เซลล์มีการโป่งออกมองดูคล้ายไม้กระบอง (drum strick) ดังแสดงในรูปที่ 2 จากลักษณะโคโลนีและจากผลการย้อมแกรมสรุปได้ว่าของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เป็นเชื้อในจีนัส *Bacillus* และเมื่อทำการทดสอบชีวเคมีเพื่อจำแนกสปีชีส์ของเชื้อจะพบว่าสายพันธุ์ BA 1 มีคุณสมบัติให้ผลบวกต่อการทดสอบ

catalase, VP สามารถย่อยสลายมอลโตสได้ เคลื่อนที่ได้ ไม่สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ให้ผลลบต่อการทดสอบ MR จำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนในการเจริญเติบโต (strictly aerobe) สายพันธุ์ BA 1 น่าจะเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ส่วนสายพันธุ์ BA 2 มีคุณสมบัติเหมือนกับ สายพันธุ์ BA1 ยกเว้นให้ผลผบวกต่อการทดสอบ citrate และสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสายพันธุ์ BA 2 เป็นสปีชีส์ใด

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อสายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ที่ พีเอช อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มที่แตกต่างกันพบว่า สภาวะที่เชื้อสายพันธุ์ BA 1 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ -amylase มากที่สุด คือ บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ที่ พีเอช 5.0 นาน 2 วัน ส่วนสายพันธุ์ BA 2 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase มากที่สุดคือ บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ที่ พีเอช 7.0 นาน 3 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3 ถึงรูปที่ 5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ α-amylase ที่ผลิตจากเชื้อ สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละเชื้อจะพบว่า สายพันธุ์ BA 2 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าสายพันธุ์ BA 1 นอกจากนี้จะพบว่าสายพันธุ์ BA 1 มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมค่อนข้างแคบคือ 55 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ BA 2 มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมค่อนข้างกว้างคือ 50-60 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์จะผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้ปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น

4. สรุปและวิจารณ์

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้จากแหล่งธรรมชาติได้แก่ ดิน พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงมาก 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) คืออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและชอบพีเอช ที่เป็นกลางคือ พีเอช 5-7 (neutrophile) เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อพบว่าเป็นเชื้อในจีนัส *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยที่ สายพันธุ์ BA 1 น่าจะเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ส่วนสายพันธุ์ BA 2 ยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาทั้งรูปร่าง ลักษณะของโคโลนี ลักษณะการติดสีย้อมแกรมของเซลล์ รูปร่างและตำแหน่งของสปอร์ และการทดสอบชีวเคมี อย่างไรก็ตามควรที่จะมีการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมมากกว่านี้เพื่อจะได้ทำการจำแนก จีนัสและสปีชีส์ของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากเชื้อในจีนัส *Bacillus* มักมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใกล้เคียงกันทำให้การจำแนกเชื้อทำได้ยาก ในการศึกษานี้ได้เชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ α- amylase สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จึงสันนิษฐานได้ว่าเอนไซม์ α-amylase ที่ผลิตจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้น่าจะเป็นเอนไซม์ที่คงทนต่ออุณหภูมิสูงด้วย (thermostable α- amylase) สมควรที่จะถูกนำไปศึกษาต่อไป โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณมาก ๆ ในถังหมัก (fermentor) จากนั้นนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ (purification) โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วย chromatrography ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น แล้วจึงนำไปศึกษา คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วพร้อมทั้งทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ (molecular weight) โดยวิธี run polyacrylamide gel electrophoresis นอกจากนี้อาจทำการตัดต่อยีนแล้วนำไปโคลน (clone) ใน expression vector ใส่ในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เพื่อให้เซลล์เจ้าบ้านนั้นผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากสะดวกต่อการใช้งานต่อไป [9]

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Forgarty, W.M., and Kelly, C.T. Recent advances in microbial amylase, pp.71-132, In : Forgarty, W.M., Kelly, C.T. Microbial enzymes and biotechnology, 2ed., Elsevier Appied Science, Amsterdam, 1990.

[2] Sharp, R.J., Scawen, M.D., and Atkinson, T. Fermentation and down stream processing of *Bacillus*.,pp 255-292, In : Harwood CR *Bacillus*.

Biotechnology handbooks, Vol. 2 Plenum Press, New York, 1994.

[3] Kanlayakrit, W., Ishimashu, K., Nakao, M., *et al.* Characterization of raw-starch-digesting glucoamylase from thermophilic *Rhizomucor pusillus*. J. Ferment. Technol. Vol. 65 ; pp. 379-385, 1987.

[4] Hayashida, S., Nakahara, K., Kanlayakrit, W., *et al.* Characterization and function of raw-starch-affinity site on *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase I molecule. Agric. Biol. Chem., Vol 53 ; pp.143-149, 1989.

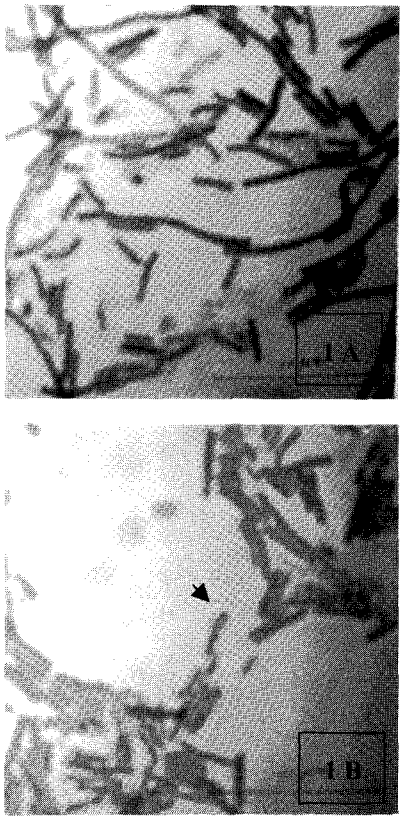
[5] Wind, R.D., Buitelaar, R.M., Eggink, G., *et al.* Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate : a highly thermostable α-amylase-producing strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 41 ; pp.155-162, 1994.

[6] Bergmann, F.W., Abe, J., and Hizukuri. S. Selection of microorganisms which produce raw-starch degrading enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 27 ; pp.443-446, 1988.

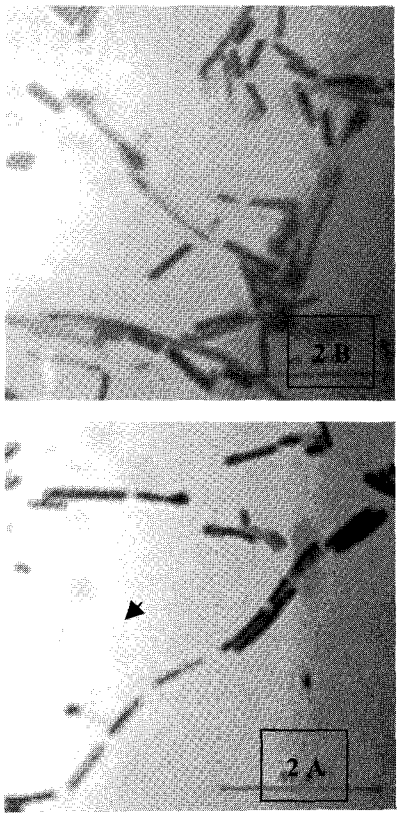
[7] Lealem, F., and Gashe, B.A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*) J. Appl. Bacteriol. Vol 77 ; pp.348-352, 1994.

[8] Miller, G.l. Use of dinitrosylicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. Vol 31 ; pp.426-428, 1959.

[9] Lim, W.J., Park, S.R., An, C.L., *et al.* Cloning and characterization of a thermostable amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga* intracellular alpha-*maritima* MSB8. Res. Microbiol. Vol 154 ; pp.681-687, 2003.



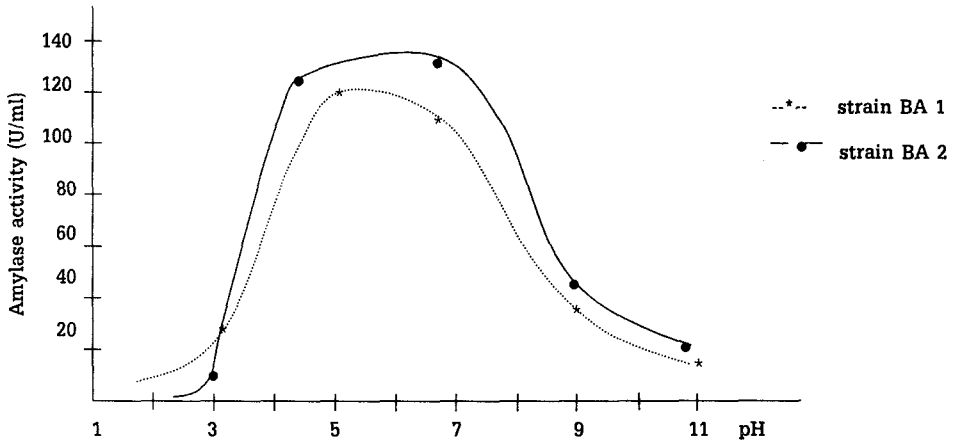
รูปที่ 1 แสดงผลการย้อมแกรมของเชื้อสายพันธุ์ BA 1 จะพบลักษณะเป็นแกรมบวกรูปร่างแท่ง มีการเรียงตัวเป็นสาย (รูปที่ 1 A) และผลการย้อมสปอร์ จะพบสปอร์มีรูปร่างรี อยู่บริเวณค่อนมาที่ปลายเซลล์ (รูปที่ 1 B)



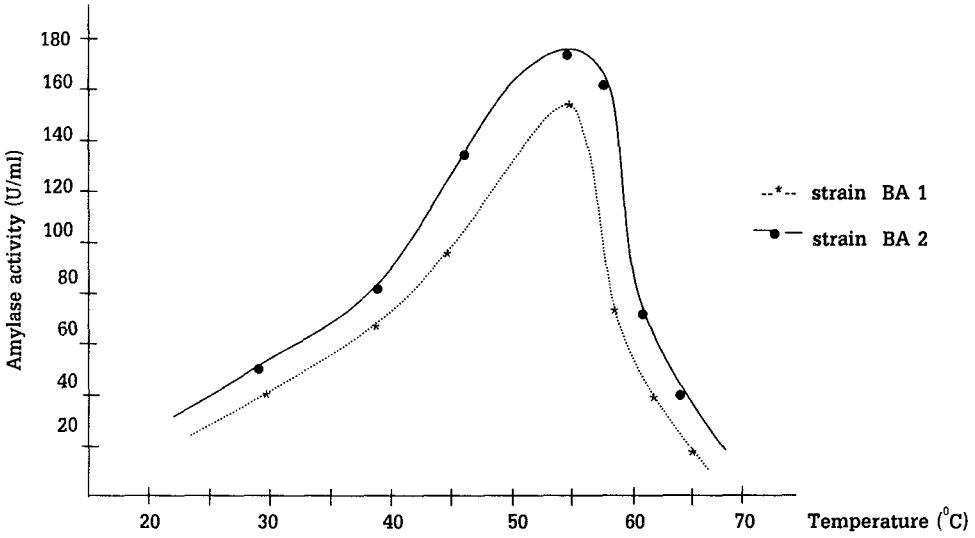
รูปที่ 2 แสดงผลการย้อมแกรมของเชื้อสายพันธุ์ BA 2 จะพบลักษณะเป็นแกรมบวกรูปร่างแท่ง มีการเรียงตัวเป็นสาย (รูปที่ 2 A) และผลการย้อมสปอร์ จะพบสปอร์มีรูปร่างรี อยู่บริเวณปลายเซลล์ สปอร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ทำให้เซลล์โป่งออกมองดูคล้ายไม้กระบอง (รูปที่ 2 B)

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของเชื้อสายพันธุ์ BA 1 และ BA 2

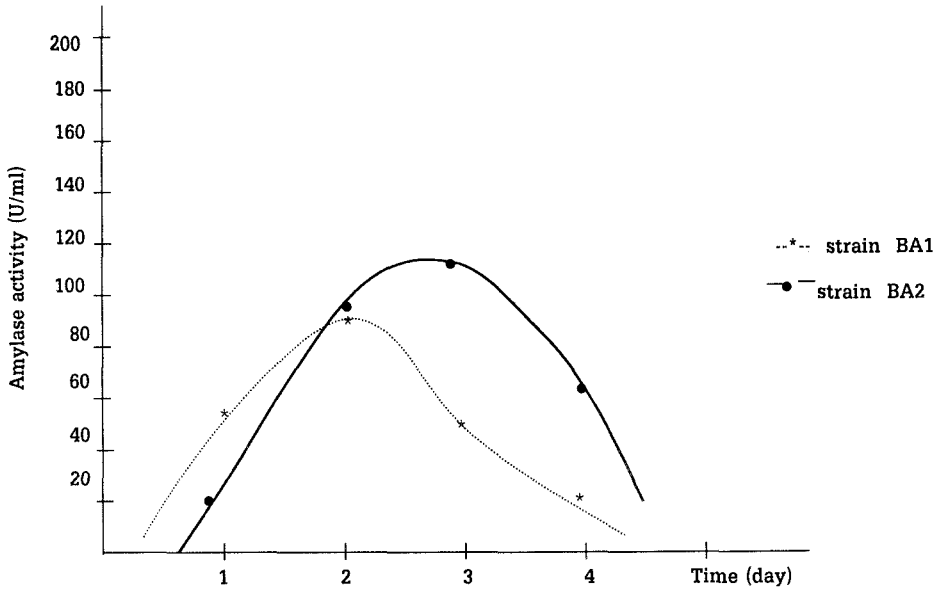
การทดสอบ	คุณสมบัติ	
	สายพันธุ์ BA 1	**สายพันธุ์ BA 2**
1. การย้อมแกรม	Gram-positive bacilli in chain with spore	Gram-positive bacilli in chain with spore
2. ลักษณะสปอร์	Oval / subterminal	Oval / terminal
3. การทดสอบ catalase	+	+
4. การเคลื่อนที่	+	+
5. การทดสอบ MR	-	-
6. การทดสอบ VP	+	+
7. การใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน	-	+
8. การให้กรดจากการใช้น้ำตาลมอลโตส	+	+
9. ความต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต	Strictly aerobe	Facultative anaerobe
10. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (องศาเซลเซียส)	50-55	55-60



รูปที่ 4 แสดงอิทธิพลของพีเอช ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ α-amylase ของเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 จะเห็นได้ว่าพีเอช ที่เหมาะสมที่เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดคือ พีเอช 5.0 และ พีเอช 7.0 ตามลำดับ (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) โดย สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 117 และ 131 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 3 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ α-amylase ของเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดคือ 55 องศาเซลเซียส (สายพันธุ์ BA 1 ที่ พีเอช 5.0 ส่วนสายพันธุ์ BA 2 ที่ พีเอช 7.0) โดยสายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 142 และ 172 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 5 แสดงระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ BA 1 และ BA 2 ที่ผลิตเอนไซม์ α-amylase ได้มากที่สุดคือ 2 และ 3 วันตามลำดับ (สายพันธุ์ BA 1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 และสายพันธุ์ BA 2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0)