บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จำนวน 10 ชนิด โดยวิธีการวัดการสร้างวงใสรอบโคโลนี การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยการทำให้น้ำแป้งใส และการวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวส์ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์สูงสุดจากการทดสอบทั้ง 3 กิจกรรมได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และ *Candida* sp. จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดคือ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ รา ในสกุล *Aspergillus*

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ของจุลินทรีย์ที่โดยการศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่ pH 7.0-8.0 และอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของจุลินทรีย์โดยใช้ น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนเป็นแหล่งคาร์บอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยการวิเคราะห์ข้อมูลจากการหาค่าเฉลี่ย(Arithmetic Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส สูงสุด 251.43 Unit/ml ภายในเวลา 56 ชั่วโมง รองลงมาคือ เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus amyloliquefaciens* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 203.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง ส่วน *Bacillus licheniformis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 148.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง เชื้อ *Candida sp.* มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์อะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 131.20 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง และ เชื้อ *Aspergillus oryzae* มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์อะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 116.33 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง

อภิปรายผล

โมเลกุลแป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยอะไมเลสและอะไมโลเพคติน อะไมเลสทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน ส่วนอะไมโลเพคติน ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำตาล รีด แอนด์ อันเดอร์คอฟเลอร์ (Reed and Underkofler, 1966) แป้งสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด คือ α -amylase , β -amylase และ starch phosphorylase เอนไซม์ amylases เร่งปฏิกิริยาการสลายแป้งไปเป็นหน่วยย่อยที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลคือ มอลโตส จากนั้นมอลโตสจะถูกสลายต่อไปด้วยเอนไซม์ maltase (ดังแสดงในภาพที่ 2.3) เอนไซม์ α -amylase จะเร่งการสลายพันธะ a -(1-4) ของอะไมโลสแบบสุ่ม ได้ fragment ~ 10 glucose subunit เรียกว่า maltodextrins ซึ่งจะสลายไปเป็นมอลโตสอย่างช้า ๆ โดย α -amylase สามารถสลายพันธะ α -(1-4) ของอะไมโลเพกตินได้เช่นกัน แต่ไม่ตัด α -(1-6) branch points จึงเหลือ limit dextrins (> 3 glucosylunis) ส่วน β -amylase ตัด maltose units เริ่มจาก non-reducing end ถึง α -(1-6) branching point ให้ maltose และ limit dextrins สำหรับ starch phosphorylase ตัดพันธะ α -(1-4) แต่ให้ glucose-1-phosphate และต้องใช้ H_2O ในการตัดแต่ละพันธะ การทดสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่คัดเลือกจากจุลินทรีย์ทั้ง 10 ชนิด โดยวิธีการสร้างวงใสของจุลินทรีย์ การสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยทำให้น้ำแป้งใสตามวิธีของ เฮสเซลทีน Hesseltine (Hesseltine, Smith and Bradie, 1963) และการวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของเนลสัน โซโมจี้ Nelson Somogyi (Nelson, 1944) เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์สูงสุด จากการทดสอบทั้ง 3 กิจกรรม ที่สามารถย่อยสลายโมเลกุลของแป้งได้สูงสุด 5 ชนิด ดังนี้ *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Candida* sp. ซึ่งจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ดวงพร คันธโชติ, 2530) เพื่อใช้ในการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก ดังรายงานวิจัยของ สุมาลี เหลืองสกุล สมใจ ศิริโภคและขจีนาฏ โพธิเวชกุล (2542) รายงานว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย starch สูงสุด คือ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ส่วนราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย starch สูงสุด คือราในสกุล *Aspergillus* แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม ต่าง ๆ ได้ดี ส่วนราในสกุล *Aspergillus* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวของอาหารที่มีคาร์บอนมากเช่น กลูโคส อะไมโลสและมักพบปนเปื้อนในอาหารที่มีแป้ง เช่นขนมปังและมันฝรั่ง ซึ่งทำให้ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และราในสกุล *Aspergillus* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

ผลของ pH และอุณหภูมิ ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตามวิธีของ สมิท แอนด์ โร Smith & Roe (1949) พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่ pH ที่เหมาะสมคือ 7.0 – 8.0 และอุณหภูมิที่ 50-55 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนภัทร สายเจริญ (2545) รายงานว่า เชื้อจุลินทรีย์ *Balcillus firmus* มีกิจกรรมของเอนไซม์ อะไมเลส สูงสุดที่ pH 11.0 และมีเสถียรภาพในช่วง pH 8.0-11.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 70 องศาเซลเซียส โดยมีเสถียรภาพในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส เพราะอัลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีในช่วง pH 3.0 – 9.5 และ pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ pH 6.0 ฟูคูโมโต้ ยามาโมโต้ และซึรุ (Fukumoto,Yamamoto and Tsuru,1958) โดยทั่วไปเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ยอมให้ประจุ H^+ หรือ OH^- ผ่านเข้าออกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น รวมทั้งภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์มีระบบบัฟเฟอร์ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ pH จึงทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีค่าใกล้เคียงกับ pH 7 จึงทำให้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สุด pH ~ 7 (6.6-7.5) *Bacillus amyloliquefaciens* มี Optimum temp ~ 70 องศาเซลเซียส *Bacillus licheniformis* มี Optimum temp ~ 90 ส่วนราในสกุล *Aspergillus* มี Optimum temp ~ 40-60 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่ อุณหภูมิตั้งแต่ 40- 90 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อจุลลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยการเติมกล้าเชื้อ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 vvm ปรับอุณหภูมิและ pH ให้เหมาะสม โดยมีน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าจุลินทรีย์ ทั้ง 5 ชนิดสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุธีรา ศรีสมัย (2556) รายงานว่า สเตรปโตมัยซีส สามารถเจริญและให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดเมื่อเลี้ยงในน้ำล้างมันฝรั่ง ดังนั้น น้ำล้างมันฝรั่ง น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน รำข้าว ซังข้าว และเปลือกข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในสร้างพลังงานและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี ดังรายงานของ เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ , ศิริโฉม ทุ่งเก้า และเยาวภา ไหวพริบ (2549) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ อะไมเลสโดยจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงจากแหล่งคาร์บอนที่ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนมีแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับแป้งมันสำปะหลังคือ มีลักษณะเป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ โครงสร้างทางเคมีของจะประกอบไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลสประมาณ 15-20 % และ อะไมโลเพกติน ประมาณ 80-85 % (ดังแสดงในภาพที่ 2.1และ2.2) จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งตรงตำแหน่งต่างๆ ของอะไมโลสและอะไมโลแพคตินเพื่อให้ได้น้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยลง เช่น

มอลโทส กลูโคส เดรกทริน กัปท่า และ คนอื่น ๆ (Gupta et,al., 2003) เพื่อใช้ในการดำรงชีพและการเจริญเติบโตของเซลล์ เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มีการผลิตเอนไซม์ อะไมเลส สูงสุด 251.43 Unit/ml ภายในเวลา 56 ชั่วโมง รองลงมาคือ เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus amyloliquefaciens* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 203.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง ส่วน *Bacillus licheniformis* มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์อะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 148.00 Unit/ml ภายในเวลา 60ชั่วโมง เชื้อ *Candida sp.* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 131.20 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง และ เชื้อ *Aspergillus oryzae* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 116.33 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง จะเห็นว่าจุลินทรีย์ ทั้ง 5 ชนิด จะให้เอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในช่วง Stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก คือ ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมทาบอลิซึม สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธีรพงษ์ สุขสว่าง (2550) รายงานว่า ค่ากิจกรรม อะไมเลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด จากนั้นค่ากิจกรรมจะลดลงเพียงเล็กน้อยและคงที่จนสิ้นสุดระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก เนื่องจากช่วงแรกมีอัตราการเจริญของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วและเมื่อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่แล้วจะผลิตเอนไซม์อะไมเลส ส่วนในช่วงหลังวงจรชีวิตของจุลินทรีย์จะเข้าสู่ช่วงคงที่และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจะลดลงด้วย จุลินทรีย์ที่ควรนำไปใช้ในการลดปริมาณความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนคือ จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* เพราะมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดและมีคุณสมบัติในการสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม ต่าง ๆ ได้ดี (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาข้อมูลและจัดทำคู่มือการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน (เฉพาะโรงงานที่มีบ่อพักน้ำทิ้ง) ดังแสดงใน (ภาคผนวก ง) โดยใช้ผงจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มาใช้ในการบำบัดเพื่อลดปริมาณความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีน ให้กับกลุ่มผู้ผลิตขนมจีนก่อนปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อม

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยในครั้งนี้คือ ได้แนวทางการจัดทำคู่มือการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน (เฉพาะโรงงานที่มีบ่อพักน้ำทิ้ง) โดยใช้ผงจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มาใช้ในการบำบัดเพื่อลดปริมาณความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีน ให้กับกลุ่มผู้ผลิตขนมจีนก่อนปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อมเพื่อลดปัญหาเบื้องต้นให้กับกลุ่มผู้ผลิตและคนในชุมชน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ อะไมเลสได้สูงสุดของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

2. ควรศึกษาแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์เช่น น้ำล้างมันฝรั่ง น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว

3. ควรมีการวัดค่า BOD ,COD , pH ของน้ำทิ้งก่อนและหลังกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์เพื่อให้ทราบค่าการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์