รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง

Screening of Amylase Producing Bacteria from Traditionally Fermented Soybean (Thua-nao) as Potential Starter Culture in Starch Degradation

ผศ. ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง
แหล่งทุน งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสบับสนุน 80,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2555 ถึงกันยายน 2556
หัวหน้าโครงการ และหน่วยงานต้นสังกัด
ผศ. ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถประสงค์เพื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยคัดแยกจากถั่วเน่าจำนวน 9 ตัวอย่าง และนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งเบื้องต้นบนอาหาร starch agar โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบโคโลนีที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน และคำนวนหาค่า hydrolysis capacity (HC) จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว nutrient broth โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) และวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าว จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 179 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มี 103 ไอโซเลทที่ให้ผลการเกิดโซนในรอบโคโลนี คัดเลือกไอโซเลทที่มีค่า HC สูงสุด คือไอโซเลท 1-16, 5-4, 5-6, 5-7, 5-20, 6-6, 7-1, 7-3, 7-13, 7-14 และ 9-11 ตามลำดับ นำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวและทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งต่างๆ พบว่าทุกไอโซเลทสร้างเอนไซม์อะไมเลส และย่อยแป้งได้ทุกชนิด และไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 พบมีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าวได้สูงสุด นำมาระบุสายพันธุ์ของเชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA พบว่า ไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 คือ *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* และ *Bacillus cereus* ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรียบาซิลลัส. ถั่วเน่า อะไมเลส แป้ง

Research Title: Screening of Amylase Producing Bacteria from Traditionally Fermented Soybean (Thua-nao) as Potential Starter Culture in Starch Degradation

Researcher: Assist. Prof. Dr. Aphacha Jindaprasert

Faculty: Agro-Industry **Department:** -

ABSTRACT

The aim of this research was to isolate of amylase producing bacteria from 9 traditionally fermented soybean (Thua-nao) samples. All of bacteria isolates were examined for amylase production on starch agar staining with Gram's iodine solution, calculated of hydrolysis capacity (HC) value, determined of reducing sugar by dinitrosalicylic (DNS) method and protein concentration by Bradford test kit in nutrient broth, and test ability for degradation of tapioca, corn and rice starches. One hundred and three of 179 isolates showed clear zone with Gram's iodine. The high HC value isolates, 1-16, 5-4, 5-6, 5-7, 5-20, 6-6, 7-1, 7-3, 7-13, 7-14 and 9-11 were selected to determine amylase production in nutrient broth. The result showed that three isolates, 5-20, 6-6 and 7-1 could degrade tapioca, corn and rice starches at high level of enzyme specific activities. In addition, isolates, 5-20, 6-6 and 7-1 were identified as *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*, respectively, using 16s rRNA analysis.

Keywords : *Bacillus* species. Fermented Soybean (Thua-nao), Amylase, Starch

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556

ขอขอบคุณ นางสาวศิริพรรณ มิ่งขวัญ นางสาวศุภัทรกาญจน์ แนวณรงค์ นางสาวภัทราภรณ์ ธนาการสิทธิ์ และนางสาวสรวีย์ เกียรติศุภมงคล นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัวคุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว ผศ. กรรณ จินดาประเสริฐ และเด็กชายกัณต์ณภัค จินดาประเสริฐ ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อพัชชา จินดาประเสริฐ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 แนวคิด และทฤษฎีหลัก 3

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 10

3.1 วัตถุดิบ 10

3.2 สารเคมี และอาหารเชื้อ 10

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 11

บทที่ 4 ผลการวิจัย 14

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่า 14

4.2 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากถั่วเน่า 14

4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและความสามารถในการย่อยแป้ง ของเชื้อที่แยกได้ 21

4.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย 23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 25

5.1 สรุปผลการวิจัย 25

5.2 ข้อเสนอแนะ 25

เอกสารอ้างอิง 26

ภาคผนวก 27

ภาคผนวก ก การตรวจวิเคราะห์ 28

ภาคผนวก ข สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย 35

ประวัตินักวิจัย 36

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเน่า 4
2.2 ลักษณะของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน 6
2.3 เปรียบเทียบแอกทิวิตีสัมพันธ์ของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดต่อหน่วยหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น 7
2.4 การย่อยสลายแป้งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ 7
3.1 แหล่งที่มาและสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทำถั่วเน่า 10
4.1 ไอโซเลทที่แยกได้จากถ่วเน่าที่พบที่สร้างโซนใสบนอาหาร starch agar และค่า hydrolysis capacity (HC) 15
4.2 การจัดกลุ่มตามค่า hydrolysis capacity (HC) ของเชื้อที่พบการเกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร starch agar ที่ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน จำนวน 103 ไอโซเลท 19
4.3 ค่า hydrolysis capacity (HC) ของเชื้อ จำนวน 11 ไอโซเลท บนอาหาร starch agar 21
4.4 กิจกรรรมเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อแต่ละไอโซเลท 22
4.5 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากการย่อยแป้งต่างๆ ของเชื้อแต่ละไอโซเลท 23
4.6 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 24

ตารางภาคผนวกที่

ก1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ 31
ก2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร กับปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ 33

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 ลักษณะการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหาร starch agar ที่ทดสอบด้วย สารละลายไอโอดีน 20

ภาพภาคผนวกที่

ก1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับปริมาณกลูโคส 31

ก2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 595 กับ ปริมาณโปรตีน (mg/ml) 33