

เนื้อหาวิทยานิพนธ์เล่มนี้นำเสนอถึงการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียจากดินที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 230 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาคัดเลือกซ้ำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชั้นต่ำที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุด ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ E90 มาใช้ในงานวิจัย และผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยระบบเอ พี ไอ พบว่าเชื้อ E90 จัดเป็น *Bacillus cereus*

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆในเมล็ดทุเรียนที่ใช้เป็นสับสเตรท พบว่ามีแป้งร้อยละ 25.73 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.55 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.81 โปรตีนร้อยละ 1.12 ของน้ำหนักแห้ง และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 11.52 โดยเชื้อ *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 101.24 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เมื่อใช้เมล็ดทุเรียนขนาด 75-150 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท เดิมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 โดยเติมสารละลายกลีเซอรอล soluble starch ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งคาร์บอน เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทพบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 100.43 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เมื่อใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท และพบว่า *Bacillus cereus* E90 ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะการหมักเดียวกัน โดยการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของ *Bacillus cereus* E90 และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

การศึกษาศสมบัติบางประการของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60-80 จากนั้นนำสารละลายตะกอนไปปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดที่มีเยื่อกรอง Centricon Plus-20 ที่มี Molecular Weight Cut off 30,000 คาลตัน พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเท่ากับ 193.70 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.62 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 2.17 โดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์คงตัวในช่วงพีเอชเท่ากับ 4.0-8.0 และคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส

The purpose of this thesis was to study about  $\alpha$ -amylase produced by bacteria isolated from soil using durian seeds as substrate. The results were as follows : the  $\alpha$ -amylase organisms were isolated from soil by using a selective medium as starch agar at 37 °C that 230 isolates were obtained. The  $\alpha$ -amylase-producing bacterial strains were isolated and confirmed for  $\alpha$ -amylase activity in minimal medium by quantitative assay. Among them strain E90 showed the highest  $\alpha$ -amylase activity at 37, 45 and 50 °C. So strain E90 was selected for studies on  $\alpha$ -amylase production. The strain E90 was further identified with the method of API 50 CHB test and designated as *Bacillus cereus*.

It was from the study found that fresh unfermented durian seeds contained 25.73% starch, 1.55% total sugar, 0.81% reducing sugar, 1.12% protein on a dry weight basis and 11.52% initial moisture content. A maximal  $\alpha$ -amylase activity produced by *Bacillus cereus* E90 was 101.24 U/g at 48 hours of fermentation when using durian seed 75-150  $\mu$ m as substrate, 15% (w/v) inoculum size, 70% initial moisture content by adding mineral salt solution , 1% (w/w) soluble starch as additional carbon source and 1% (w/w) yeast extract as additional nitrogen source. The medium was adjusted to a initial pH of 8.0 and incubated at 37 °C. The results of substrates comparison were as follows : a maximal  $\alpha$ -amylase activity produced by *Bacillus cereus* E90 was 100.43 U/g at 48 hours of fermentation when durian seeds was used as substrate. *Bacillus cereus* E90 showed higher  $\alpha$ -amylase activity than *Bacillus subtilis* TISTR 25 under solid state fermentation. The  $\alpha$ -amylase production was coupled with growth of *Bacillus cereus* E90 and became the maximal value in the late exponential growth phase at 48 hours of fermentation.

A study of some properties of  $\alpha$ -amylase by precipitating with 95% ethanol at 60-80% saturation was performed. The precipitate was centrifuged by Centricon Plus-20 Molecular Weight Cut off 30,000 Da. The enzyme was purified up to 3.62 folds of initial activity. The specific activity and yield of  $\alpha$ -amylase were 193.70 U mg<sup>-1</sup> protein and 2.17% respectively. The optimal pH and temperature of this enzyme were 8.0 and 70 °C respectively, the stable pH range was 4.0-8.0 and stable temperature range was 20-70 °C.