

การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ คาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

THE STUDY OF MICROORGANISMS FOR CARBOHYDRATE COMPOUNDS DEGRADATION IN WASTE WATER FROM THE RICE NOODLE FACTORY

ผู้วิจัย

วัชรินทร์ แสงหลู¹

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัลทิมา พิชัย²

ดร.ทัตพร คุณประดิษฐ์³

บทคัดย่อ

การทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของจุลินทรีย์ จำนวน 10 ชนิด โดยวิธีการ
วัดการสร้างวงใสรอบโคโลนี การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยการทำให้น้ำแป้งใส และ
การวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวส์ พบว่า จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์
สูงสุดจากการทดสอบทั้ง 3 กิจกรรม 5 อันดับ ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*,
Bacillus licheniformis, *Bacillus subtilis* และ *Candida* sp. จุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ผลิตเอนไซม์อะไมเลส
ได้สูงสุดที่ pH 7.0–8.0 และอุณหภูมิ 50–55 องศาเซลเซียส

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและศึกษากิจกรรม
การผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยการวิเคราะห์ข้อมูลจากการหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 251.43 Unit/ml ภายในเวลา
56 ชั่วโมง รองลงมาคือ *B. amyloliquefaciens* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 203.00
Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง ส่วน *B. licheniformis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ
148.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง *Candida* sp. ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 131.20
Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง และ *Aspergillus oryzae* ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ
116.33 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง

คำสำคัญ : เอนไซม์อะไมเลส, สารประกอบคาร์โบไฮเดรต, น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน

¹ นักศึกษา สาขาวิชาการสอนวิทยาศาสตร์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

³ อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

ABSTRACT

Amylase Production by 10 microorganisms was evaluated by measuring clear zone around the colonies, the test for the enzyme amylase by making the dough and the measurement of enzyme activities in the form of reducing sugar found that microorganisms capable of producing maximum enzyme testing the 3 activities as 5 items are including *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Candida* sp. All 5 species of microorganisms produce enzymes amylase at maximum pH 7.0–8.0 and temperature 50–55 Celsius degree.

The high density cell cultivation of microbial bioreactor and studied enzyme production activities. Analyzing of data was by arithmetic mean and standard deviation that showed in the enzyme amylase. *B. subtilis* microbial enzymes are produced maximum amylase 251.43 Unit/ml within 56 hours. Secondly, *B. amyloliquefaciens* has produced maximum enzyme amylase 203.00 Unit/ml within 60 hours. *B. licheniformis* has produced the enzyme amylase at maximum of 148.00 Unit/ml within 60 hours, *Candida* sp. has produced enzyme amylase at maximum equal to 131.20 Unit/ml within 60 hours and *Aspergillus oryzae* enzyme amylase equals 116.33 Unit/ml within 60 hours.

Keywords : Enzymes Amylase, Carbohydrate Compounds, Waste Water from Rice Noodle Factory

บทนำ

กรรมวิธีการผลิตขนมจีน จะมีน้ำทิ้งในขั้นตอนต่างๆ มากมาย (วันเพ็ญ, 2542) สารอินทรีย์ในน้ำทิ้งส่วนใหญ่ เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีความเข้มข้นของแป้งค่อนข้างสูง หากโรงงานผลิตขนมจีนขาดการบำบัดที่ดีแล้วปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจะทำให้แหล่งน้ำเกิดการทับถมของตะกอนสีขาวของแป้งที่ใช้ในการผลิต ทำให้แหล่งน้ำเกิดการเน่าเสียและส่งกลิ่นเหม็นเปรี้ยว เป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคต่างๆ ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ สุขอนามัย และเกิดโรคติดต่อให้ผู้อาศัยในชุมชน จากข้อมูลความร่วมมือการบริการวิชาการและการวิจัย

ระหว่างเทศบาลตำบลชี้เหล็กและมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ พบว่า ปัญหาน้ำเน่าเหม็นที่เกิดจากโรงงานผลิตขนมจีน (บ้านน้ำริน) เป็นปัญหาที่ชุมชนต้องการให้มีการแก้ไขและพัฒนาอย่างเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมทอผ้า และอุตสาหกรรมการผลิตยาต่างๆ เป็นต้น แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่ที่ได้รับความนิยมและสนใจมากในขณะนี้ ทั้งนี้เพราะไม่มีข้อจำกัดมากเหมือนพืชและสัตว์ ราคาถูกและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในผลิตเอนไซม์อะไมเลส เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน รวมถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของจุลินทรีย์ เพื่อลดปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบการสร้างวงใสรอบโคโลนี โดยเพาะจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar บนจานเพาะเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นราดทับด้วยสารละลายไอโอดีน ถ้าเกิดบริเวณใส (Clear Zone) แสดงว่ามีการสร้างเอนไซม์อะไมเลส และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีการสร้างวงใสกว้างที่สุด

2. การทดสอบการสร้างอะไมเลสโดยทำให้น้ำแป้งใส เชื้อเชื้อจุลินทรีย์ อายุ 18-24 ชั่วโมง ลงในน้ำแป้งจำนวน 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ นำเข้าเครื่องเขย่า (Shaker) ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทำกิจกรรมการย่อยแบ่งตามวิธีของ Hesseltine, *et. al.* (1963) ตรวจสอบผลแบ่งที่เชื้อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน เกิดสีโดยใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำแบ่งที่มีเชื้อมา 20 ไมโครลิตร ลงบนจานหลุม หยดสารละลายไอโอดีน 20 ไมโครลิตร ลงไปผสมกันให้ทั่ว สังเกตสีที่เกิดขึ้นตามปริมาณแบ่งที่เชื้อ หรือโดยให้เครื่องหมาย ดังนี้ + สารละลายสีน้ำเงิน ++ สารละลายสีน้ำตาลเข้ม +++ สารละลายสีน้ำตาลอมเขียว ++++ สารละลายสีเหลือง เกือบเชื้อที่ +++ และ ++++

3. การทดสอบการวัดกิจกรรมการย่อยแบ่งในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวซ์ นำเชื้ออายุ 18-24 ชั่วโมง มาปรับ OD (optical density) ของสารละลายน้ำแบ่งให้เป็น 0.5 ที่ความยาวช่วงแสง 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ดูดสารละลายเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวจำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายน้ำส่วนใสไปทำกิจกรรมการย่อยแบ่งตามวิธีของ Nelson Somogyi (Nelson, 1944)

4. การทดสอบ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรต เตรียมน้ำเสียตัวอย่างปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH (pH stability) ให้เท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ตามลำดับ ดังนี้

น้ำทิ้งตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร เติมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949) ทำการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ให้ครบทั้ง 5 ชนิด

5. การทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรต เตรียมน้ำทิ้งตัวอย่างปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH (pH stability) ให้มีความเหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นาน 5 นาที เติมเชื้อแต่ละชนิด ลงไปในปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มต่อไปอีก 10 นาที ที่อุณหภูมินั้นๆ ดังนี้ น้ำทิ้งตัวอย่าง

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH บ่มที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นาน 5 นาที จากนั้นเติมเชื้อชนิดที่ 1 ลงไปในปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มต่อไปอีก 10 นาที ที่อุณหภูมินั้นๆ แล้วหาการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949) ทำการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ให้ครบทั้ง 5 ชนิด

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของจุลินทรีย์ เตรียมเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยง 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิเหมาะสม เป็นเวลา

18-24 ชั่วโมง ใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบ MD type Mini-Jar Fermentor เตรียมตัวอย่างน้ำทิ้งจำนวน 2.5 ลิตร ในถังหมัก นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เดิมกล้าเชื้อ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 vvm ปรับอุณหภูมิและ pH ให้เหมาะสม เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ ในช่วงแรก 6 ชั่วโมงต่อ 1 ครั้ง จนถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ 4 ชั่วโมงต่อ 1 ครั้ง จนครบ 72 ชั่วโมง วัดค่ากิจกรรมการย่อยแป้งตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949)

ผลการวิจัย

ตารางที่ 1 การสร้างวงใสของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)
<i>Aspergillus niger</i> 3913	5.50 ± 0.11
<i>Aspergillus oryzae</i> 3086	8.00 ± 0.20
<i>Aspergillus awamori</i>	4.00 ± 0.26
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 18049	12.00 ± 0.50
<i>Bacillus licheniformis</i> 18051	6.50 ± 0.17
<i>Bacillus subtilis</i> 23065	11.00 ± 1.32
<i>Pseudomonas</i> sp. 30502	3.00 ± 0.26
<i>Pichia acacia</i> 11767	3.50 ± 0.20
<i>Pichia</i> sp. 15025	7.00 ± 0.26
<i>Candida</i> sp. 15025	8.50 ± 0.50

จากตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาคูณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธีการวัดการสร้างวงใสรอบโคโลนีโดยการค่าหาเฉลี่ย (Arithmetic Mean) จาก 3 ซ้ำ พบว่า จุลินทรีย์ที่สร้างวงใสได้มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Candida* sp., *Aspergillus oryzae* และ *Pichia* sp. ตามลำดับ

ตารางที่ 2 การสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยการทำให้น้ำแบ่งใส

จุลินทรีย์	การเกิดสี
<i>Aspergillus niger</i> 3913	+
<i>Aspergillus oryzae</i> 3086	+++
<i>Aspergillus awamori</i>	++
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 18049	++++
<i>Bacillus licheniformis</i> 18051	+++
<i>Bacillus subtilis</i> 23065	++++
<i>Pseudomonas</i> sp. 30502	++
<i>Pichia acacia</i> 11767	+
<i>Pichia</i> sp. 15025	++
<i>Candida</i> sp. 15025	+++

+ สารละลายสีน้ำตาลเงิน ++ สารละลายสีน้ำตาลเข้ม +++ สารละลายสีน้ำตาลอมเขียว ++++ สารละลายสีเหลือง เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีเหลืองและสีน้ำตาลอมเขียวเพราะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี

จากตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีเหลือง คือ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus subtilis* จุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีน้ำตาลอมเขียว คือ *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis* และ *Candida* sp. จุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม คือ *Aspergillus awamori* และ *Pichia* sp. ส่วนจุลินทรีย์ที่ให้สารละลายสีน้ำตาลเงิน คือ *Aspergillus niger* และ *Pichia acacia*

ตารางที่ 3 กิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

จุลินทรีย์	Nelson Somogyi (unit/ml)
<i>Aspergillus niger</i> 3913	11.00 ± 0.36
<i>Aspergillus oryzae</i> 3086	38.50 ± 0.30
<i>Aspergillus awamori</i>	17.00 ± 0.26
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 18049	93.00 ± 0.20
<i>Bacillus licheniformis</i> 18051	12.50 ± 0.10
<i>Bacillus subtilis</i> 23065	13.80 ± 0.36
<i>Pseudomonas</i> sp. 30502	20.30 ± 0.65
<i>Pichia acacia</i> 11767	6.40 ± 0.10
<i>Pichia</i> sp. 15025	42.00 ± 0.43
<i>Candida</i> sp. 15025	67.50 ± 0.50

จากตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson-Somogy (Nelson, 1944) โดยการค่าหาเฉลี่ย (Arithmetic Mean) จาก 3 ซ้ำ พบว่า จุลินทรีย์ที่ให้ค่ากิจกรรมการย่อยแป้งสูงสุด 5 อันดับ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Candida* sp., *Pichia* sp., *Aspergillus oryzae* และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 93.0, 67.5, 42.0, 38.5 และ 20.0 Unit/ml ตามลำดับ

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์สูงสุดจากการทดสอบทั้ง 3 กิจกรรม มาคัดเลือกให้เหลือเพียง 5 ชนิด เพื่อนำไปศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของจุลินทรีย์

ตารางที่ 4 ผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949)

จุลินทรีย์	ผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ (Unit/mg)						
	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
<i>Aspergillus oryzae</i>	80.00 ± 0.26	10.00 ± 0.18	28.00 ± 0.17	30.00 ± 0.86	110.00 ± 0.40	110.00 ± 0.60	40.00 ± 0.17
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	33.00 ± 0.50	44.00 ± 0.20	56.00 ± 0.26	44.00 ± 0.10	70.00 ± 0.87	73.00 ± 0.87	87.00 ± 0.17
<i>Bacillus licheniformis</i>	20.00 ± 0.65	46.00 ± 0.26	52.00 ± 0.40	70.00 ± 0.17	90.00 ± 0.65	90.00 ± 0.65	57.00 ± 0.10
<i>Bacillus subtilis</i>	70.00 ± 0.30	60.00 ± 1.20	90.00 ± 0.43	80.00 ± 0.60	150.00 ± 0.18	120.00 ± 0.18	90.00 ± 0.40
<i>Candida</i> sp.	60.00 ± 0.26	20.00 ± 0.10	10.00 ± 0.17	62.00 ± 0.87	90.00 ± 0.40	80.00 ± 0.40	80.00 ± 0.30

จากตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของ จุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949) พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่ pH ที่เหมาะสมคือ 7.0–8.0

ตารางที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949)

จุลินทรีย์	ผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ (Unit/mg)						
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
<i>Aspergillus oryzae</i>	21.00 ± 0.36	29.00 ± 0.60	26.00 ± 0.26	31.00 ± 0.20	30.00 ± 0.50	38.00 ± 0.17	43.00 ± 0.86
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	22.00 ± 0.18	32.00 ± 0.65	28.00 ± 0.30	34.00 ± 0.36	30.00 ± 0.17	40.00 ± 0.26	44.00 ± 0.18
<i>Bacillus licheniformis</i>	20.00 ± 0.26	25.00 ± 0.43	37.00 ± 0.26	30.00 ± 0.10	31.00 ± 0.20	42.00 ± 0.18	45.00 ± 0.43
<i>Bacillus subtilis</i>	23.00 ± 0.50	30.00 ± 1.30	33.00 ± 0.40	31.00 ± 0.86	30.00 ± 0.65	37.00 ± 0.26	51.00 ± 0.36
<i>Candida</i> sp.	23.00 ± 0.10	32.00 ± 0.17	34.00 ± 0.20	23.00 ± 0.17	29.00 ± 0.30	35.00 ± 0.50	43.00 ± 0.20

จากตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของ จุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949) พบว่าจุลินทรีย์จะผลิต เอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50–55 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงและกิจกรรมการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949)

Time (hr)	<i>B. subtilis</i> (Unit/ml)	<i>B. licheniformis</i> (Unit/ml)	<i>B. amyloliquefaciens</i> (Unit/ml)	<i>Candida</i> (Unit/ml)	<i>A. oryzae</i> (Unit/ml)
0	–	–	–	–	–
6	9.24 ± 0.08	7.03 ± 0.11	16.03 ± 0.37	6.03 ± 0.15	4.03 ± 0.15
12	13.02 ± 0.06	9.23 ± 0.05	45.32 ± 0.02	8.02 ± 0.06	6.18 ± 0.10
24	67.05 ± 0.03	53.25 ± 0.05	78.30 ± 0.13	47.00 ± 0.36	31.00 ± 0.20
28	75.20 ± 0.26	67.30 ± 0.10	121.00 ± 0.70	68.00 ± 0.86	52.80 ± 0.26
32	86.32 ± 0.10	71.00 ± 0.91	134.20 ± 0.10	77.00 ± 0.36	65.20 ± 0.20
36	93.10 ± 0.36	79.10 ± 0.17	172.67 ± 0.37	69.80 ± 0.10	74.00 ± 0.20
48	119.02 ± 0.20	98.80 ± 0.03	181.00 ± 0.43	72.06 ± 0.05	78.25 ± 0.27
52	128.03 ± 0.05	102.80 ± 0.17	192.60 ± 0.18	88.90 ± 0.26	87.20 ± 0.20
56	251.43 ± 0.06	121.00 ± 0.40	198.49 ± 0.05	91.00 ± 0.36	93.50 ± 0.50
60	211.80 ± 0.02	148.50 ± 0.50	203.00 ± 0.26	131.20 ± 0.20	116.33 ± 0.32
73	196.46 ± 0.25	104.20 ± 0.21	175.68 ± 0.20	128.80 ± 0.20	101.30 ± 0.26

จากตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษากิจกรรมการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามวิธีของ Smith & Roe (Smith and Roe, 1949) ของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 251.43 Unit/ml ภายในเวลา 56 ชั่วโมง รองลงมาคือเชื้อจุลินทรีย์ *B. amyloliquefaciens* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสค่าสูงสุดเท่ากับ 203.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง ส่วน *B. licheniformis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 148.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง เชื้อ *Candida* sp. มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 131.20 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง และเชื้อ *Aspergillus oryzae* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 116.33 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จำนวน 10 ชนิด โดยวิธีการวัดการสร้างวงใสรอบโคโลนี การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยการให้น้ำแป้งใส และการวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์สูงสุดจากการทดสอบทั้ง 3 กิจกรรม ได้แก่ *Aspergillus oryzae* 3086, *Bacillus amyloliquefaciens* 18049, *Bacillus licheniformis* 18051, *Bacillus subtilis* 23065 และ *Candida* sp.

15025 จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดคือ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และราในสกุล *Aspergillus*

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกโดยการศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่ pH 7.0–8.0 และอุณหภูมิ 50–55 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูงของจุลินทรีย์ โดยใช้ น้ำที่

จากกระบวนการผลิตขนมจีนเป็นแหล่งคาร์บอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจากการหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 251.43 Unit/ml ภายในเวลา 56 ชั่วโมง รองลงมาคือเชื้อจุลินทรีย์ *B. amyloliquefaciens* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 203.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง ส่วน *B. licheniformis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 148.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง เชื้อ *Candida* sp. มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 131.20 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง และเชื้อ *Aspergillus oryzae* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 116.33 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง

อภิปรายผล

โมเลกุลแป้งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยอะไมเลสและอะไมโลเพกทิน อะไมเลสทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน ส่วนอะไมโลเพกทินทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำตาล (Reed and Underkofler, 1966) แป้งสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด คือ α -amylase, β -amylase และ starch phosphorylase เอนไซม์ amylases เร่งปฏิกิริยาการสลายแป้งไปเป็นหน่วยย่อยที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุล คือ มอลโตส จากนั้นมอลโตสจะถูกสลายต่อไปด้วยเอนไซม์ maltase เอนไซม์ α -amylase จะเร่งการสลายพันธะ α -(1-4) ของอะไมโลสแบบสุ่ม ได้ fragment ~10 glucose subunit เรียกว่า maltodextrins ซึ่งจะสลายไปเป็นมอลโตสอย่างช้าๆ โดย α -amylase สามารถสลายพันธะ α -(1-4) ของอะไมโลเพกทินได้เช่นกัน แต่ไม่ตัด α -(1-6) branch points จึง

เหลือ limit dextrins (>3 glucosylunits) 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 โดยวิธีการสร้างวงใสของจุลินทรีย์การสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยทำให้น้ำแป้งใสตามวิธีของ Hesseltine (Hesseltine, Smith and Bradie, 1963) และการวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson Somogyi (Nelson, 1944) เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์สูงสุดจากการทดสอบทั้ง 3 กิจกรรม ที่สามารถย่อยสลายโมเลกุลของแป้งได้สูงสุด 5 ชนิด ดังนี้ *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Candida* sp. ซึ่งจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ดวงพร คันทโชติ, 2530) เพื่อใช้ในการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก ดังรายงานวิจัยของสุมาลี เหลืองสกุล, สมใจ ศิริโชค และชจินาฏ โพธิเวชกุล (2542) รายงานว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย starch สูงสุด คือ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ส่วนราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งสูงสุดคือราในสกุล *Aspergillus* แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสเปอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี ส่วนราในสกุล *Aspergillus* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวของอาหารที่มีคาร์บอนมาก เช่น กลูโคส อะไมโลส และมักพบปนเปื้อนในอาหารที่มีแป้ง เช่น ขนมปังและมันฝรั่ง ซึ่งทำให้แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และราในสกุล

Aspergillus มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

ผลของ pH และอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตามวิธีของ Smith & Roe (1949) พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่ pH ที่เหมาะสมคือ 7.0–8.0 และอุณหภูมิที่ 50–55 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของธนภัทร สายเจริญ (2545) รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus firmus* มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดที่ 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 (Fukumoto, Yamamoto and Tsuru, 1958) โดยทั่วไปเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ยอมให้ประจุ H^+ หรือ OH^- ผ่านเข้าออกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น รวมทั้งภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์มีระบบบัฟเฟอร์ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ pH จึงทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีค่าใกล้เคียงกับ pH 7 จึงทำให้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สุด pH~7 (6.6–7.5) *B. amyloliquefaciens* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ~70 องศาเซลเซียส *B. licheniformis* มี Optimum temp ~90 ส่วนราในสกุล *Aspergillus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ~40–60 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40–90 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยการเติมกล้าเชื้อ 3–5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 vvm

ปรับอุณหภูมิและ pH ให้เหมาะสม โดยมีน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของสุธีรา ศรีสมัย (2556) รายงานว่า สเตรปโตมัยซินสามารถเจริญและให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดเมื่อเลี้ยงในน้ำล้างมันฝรั่ง ดังนั้นน้ำล้างมันฝรั่งน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน รำข้าว ช้างข้าว และเปลือกข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในสร้างพลังงานและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี ดังรายงานของเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, ศิริโฉม พุงเก้า และเยาวภา ไหวพริบ (2549) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยจุลินทรีย์ *B. licheniformis* ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงจากแหล่งคาร์บอน ที่ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีน มีแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับแป้งมันสำปะหลังคือ มีลักษณะเป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ โครงสร้างทางเคมีของจะประกอบไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส ประมาณ 15–20% และอะไมโลเพกทิน ประมาณ 80–85 จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งตรงตำแหน่งต่างๆ ของอะไมโลสและอะไมโลเพกทินเพื่อให้ได้น้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยลง เช่น มอลโตส กลูโคส เดรกทรีน เพื่อใช้ในการดำรงชีพและการเจริญเติบโตของเซลล์ เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 251.43 Unit/ml ภายในเวลา 56 ชั่วโมง รองลงมาคือเชื้อจุลินทรีย์ *B. amyloliquefaciens* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 203.00 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง ส่วน *B. licheniformis* มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 148.00 Unit/ml ภายในเวลา

60 ชั่วโมง เชื้อ *Candida* sp. มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 131.20 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง และเชื้อ *Aspergillus oryzae* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 116.33 Unit/ml ภายในเวลา 60 ชั่วโมง จะเห็นว่าจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด จะให้เอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในช่วง Stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีกคือ ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม สอดคล้องกับงานวิจัยของธีรพงษ์ สุขสว่าง (2550) รายงานว่าค่ากิจกรรมอะไมเลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด จากนั้นค่ากิจกรรมจะลดลงเพียงเล็กน้อยและคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก เนื่องจากช่วงแรกมีอัตราการเจริญของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วและเมื่อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่แล้วจะผลิตเอนไซม์อะไมเลส ส่วนในช่วงหลังวงจรชีวิตของจุลินทรีย์จะเข้าสู่ช่วงคงที่และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจะลดลงด้วย จุลินทรีย์ที่ควรนำไปใช้ในการลดปริมาณความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนคือ จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* เพราะมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดและมีคุณสมบัติในการสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาข้อมูลและจัดทำคู่มือการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน (เฉพาะโรงงานที่มีบ่อบำบัดน้ำทิ้ง) โดยใช้ผงจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มาใช้ในการบำบัดเพื่อลดปริมาณความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีน ให้กับกลุ่มผู้ผลิต

ขนมจีนก่อนปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อม

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยในครั้งนี้คือ ได้แนวทางการจัดทำคู่มือการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีน (เฉพาะโรงงานที่มีบ่อบำบัดน้ำทิ้ง) โดยใช้ผงจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มาใช้ในการบำบัดเพื่อลดปริมาณความเข้มข้นของแป้งในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนให้กับกลุ่มผู้ผลิตขนมจีนก่อนปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อมเพื่อลดปัญหาเบื้องต้นให้กับกลุ่มผู้ผลิตและคนในชุมชน

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการวัดค่า BOD, COD, pH ของน้ำทิ้งก่อน-หลังกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์เพื่อให้ทราบค่าการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์

เอกสารอ้างอิง

- ชนัทธ์ สายเจริญ. การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสจาก *alkaliphilic ~iBacillus firmus~i* K-1. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2545.
- ดวงพร คันธโชติ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์, 2530.
- ธีรพงษ์ สุขสว่าง. การหมักกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสในถังหมักแบบแพคเบด. กรุงเทพฯ : วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2550.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.
- วรพจน์ สุนทรสุข และเกวลี จันทรพันธุ์. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อกัก. กรุงเทพฯ : การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28, 2545.
- วันเพ็ญ วิโรจนกัญญ. โครงการจัดการน้ำเสียอุตสาหกรรมครัวเรือน. [ม.ป.ท. : ม.ป.พ.], 2542.
- เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, ศิริโสม พุ่งแก้ว และเยาวภา ไหวพริบ. การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคสอะไมเลสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากถังหมักสำหรับการสลายแป้งมันสำปะหลัง. ชลบุรี : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา, 2549.
- สุธีรา ศรีสมัย. การคัดเลือกและศึกษาการเจริญของสเตรปโตมัยซินในอาหารเหลวที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่งและน้ำหางนมกระป๋อง. เชียงใหม่ : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2556.
- สุมาลี เหลืองสกุล, สมใจ ศิริโชค และชจินาญ โพธิเวชกุล. “การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย”, *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* 4-18, 2541.
- Fukamoto, J., T. Yamamoto and D. Tsuru. *Symp. Enzyme Chem.* Kyoto : Marugen, 1958.
- Hesseltine, C. W., M. Smith, and B. Bradie. “Investigation of tempeh and Indonesian food”, *Developments in Industrial Microbiology.* 275-287, 1963.
- Nelson, N. “A Photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose”, *Journal of Biol. Chem.* 375-380, 1944.
- Reed, G. and L. A. Underkofler. *Enzyme in Food Processing.* New York : Academic Press, 1966.
- Smith, B.W. and T. H. Roe. “A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine with use of the starch iodine color”, *Journal of Biol. Chem.* 53-59, 1949.