

รายงานผลโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2547

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลัง
และมันเส้นโดยเชื้อ *Aspergillus awamori* ATCC 22342,
Aspergillus awamori ATCC 46890 และ *Aspergillus niger*
NRRL 377 และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิตเอทานอล

Glucoamylase Production from Cassava Flour and Cassava
Root by *Aspergillus awamori* ATCC 22342, *Aspergillus awamori*
ATCC 46890 and *Aspergillus niger* NRRL 377 and Application
to Ethanol Production

โดย

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

RCH

QP

609

A45

๓๗๔๓๕

เลขหมู่.....

58934

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบมาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการ

ไม่รวมลิขสิทธิ์อื่น. อีกทั้งห้ามแก้ไขตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่ 17 ก.พ. 2549

b. 11506๓๗๔

i.

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อใช้เด็กทรีนจากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงกว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ส่วนการหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) ที่ใช้ย่อยเพื่อผลิตเด็กทรีน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ร้อยละ 5 และความเข้มข้นเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) ที่ร้อยละ 0.1 จะให้ผลผลิตเด็กทรีนสูงสุดคือ ค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์เท่ากับ 17.63

ส่วนการหาระยะเวลาการย่อยและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทรีน พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาการย่อย 30 นาทีและอุณหภูมิการบ่มเป็น 40 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเด็กทรีนสูงสุดคือ ค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์เท่ากับ 19.61

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 คือ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ระยะเวลาการบ่มคือ 5 วัน เติมน้ำแอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.007 เป็นแหล่งเกลือแร่

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต้องใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 วีวีเอ็ม

การแยกและการทำให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์บางส่วน ได้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 89.90 เมื่อผ่านขั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 และร้อยละ 67.99 เมื่อผ่านขั้นไดอะไลซิส ซึ่งคิดเป็นความบริสุทธิ์ 1.72 และ 3.98 เท่า ตามลำดับ

ในส่วนการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำเชื่อม หลังจากนั้นนำน้ำเชื่อมไปหมักแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับกากน้ำตาล พบว่าน้ำเชื่อมที่ผลิตได้นั้นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 สามารถใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกับกากน้ำตาล โดยมีค่าดีกรีสุกด้ายใกล้เคียงกัน คือ 7.25 ในกรณีของน้ำเชื่อมและ 7.15 ในกรณีของกากน้ำตาล

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study about glucoamylase produces from tropica flour and cassava by *Aspergillus awamori* ATCC 22342. The results were as follows : dextrin from tropica flour was the best carbon source. The optimal concentration of the tropica flour was 5% and 0.1% concentration of enzyme Termanyl (α - amylase) for glucoamylase production. The dextrose equivalent obtained was 17.63. Digestion time and temperature for dextrin production were 30 minute and 40°C respectively. The dextrose equivalent obtained was 19.61. The optimal condition for glucoamylase production by *Aspergillus awamori* ATCC 22342 were 4×10^6 cells/ ml and 4 ml of the initial inoculum size, incubated at 35 °C The initial pH was 5.0 for 5 days of incubation by adding 0.05% NH_4NO_3 for nitrogen source and 0.007% MgSO_4 for mineral salt.

In a 5 liters fermenter, production of glucoamylase was maximized at 200 rpm of the agitation speed and 0.2 vvm of the aeration rate. Glucoamylase was partially purified by precipitation with 80% ammonium sulfate and dialysis. The yield of glucoamylase were 89.90% and 67.99% respectively. The enzyme was purified up to 1.72 and 3.98 folds of initial activity respectively.

Comparision between glucose syrup from glucoamylase hydrolysis of tropica flour and molasses for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90., it was found that the final degree of alcohol from glucose syrup and molasses were 7.25 and 7.15 respectively.

บทนำ

1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ในปัจจุบันการผลิตและการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหารและ เครื่องดื่มมีความสำคัญมากทั้งนี้ เพราะการใช้เอนไซม์ จะช่วยลดต้นทุนการผลิตและ สามารถควบคุมกรรมวิธีการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นการนำเอนไซม์เข้าไปช่วยในปฏิกิริยาต่างๆเอนไซม์จะช่วยเร่งการเปลี่ยนแปลง วัตถุประสงค์ให้เป็น ผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่รุนแรงและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ ที่เราไม่ต้องการในขบวนการผลิต

เนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทแป้งที่มีราคาถูก เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพดอยู่มาก ตามสถิติของผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย

ในส่วนของมันสำปะหลัง ในปี พ.ศ. 2539 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 7.885 ล้านไร่ ผลผลิต 17.388 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,205 กิโลกรัม ในปี พ.ศ.2540 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 7.831 ล้านไร่ ผลผลิต 18.088 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,310 กิโลกรัม ในปี พ.ศ. 2541 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 6.99 ล้านไร่ ผลผลิต 15.96 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,282 กิโลกรัม ในปี พ.ศ. 2542 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 7.02 ล้านไร่ ผลผลิต 16.69 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,378 กิโลกรัม

ด้านราคาในปี พ.ศ. 2539 ราคาหัวมันสำปะหลังที่เกษตรกรขายได้ทั่วประเทศ ปี พ.ศ. 2539 เฉลี่ยกิโลกรัมละ 0.84 บาท การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 3.5 ล้านตัน มูลค่า 11,500 ล้านบาท สำหรับแป้งมันสำปะหลัง มีปริมาณ 0.85 ล้านตัน มูลค่า 7,300 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2539)

ในปี พ.ศ. 2540 การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 3.850 ล้านตัน มูลค่า 10,800 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2540)

ด้านราคาในปี พ.ศ. 2541 ราคาหัวมันสำปะหลังที่เกษตรกรขายได้ทั่วประเทศ ปี พ.ศ. 2541 เฉลี่ยกิโลกรัมละ 0.71 บาท การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 3.486 ล้านตัน มูลค่า 19,525 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2541)

ด้านราคาในปี พ.ศ. 2542 ราคาหัวมันสำปะหลังที่เกษตรกรขายได้ทั่วประเทศ ปี พ.ศ. 2542 เฉลี่ยกิโลกรัมละ 0.85 บาท การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 4.17 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2542)

ในปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยมีการส่งออกมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกไปสู่ต่างประเทศเป็นปริมาณ 4,676,213 ตัน มีมูลค่า 20,280,129,000 ล้านบาท (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2543)

ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตและ การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบประเภทแป้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส อาจช่วยลดต้นทุนการผลิต และปริมาณการนำเข้าของเอนไซม์ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้เกิดอุตสาหกรรมหลากหลายขึ้นในประเทศอีกด้วย

2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาหาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเด็กทรีนซ์ จากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นโดยใช้เอนไซม์ อัลฟาอะไมเลส (Ternanyl)
- 2.2 เพื่อศึกษาหาสภาวะและ ปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคอะไมเลส จากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342
- 2.3 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90

3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้นำตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณสูง ทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เกิดขึ้น โดยวัดในรูปของ ปริมาณของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สะสม ระหว่างกระบวนการหมักสามารถวิเคราะห์โดยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid) ของ Ueda และคณะ (1981) จากนั้นนำเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพื่อดูศักยภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยวัดการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ด้วยการหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี ของ Lowry และคณะ (1951) ต่อจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ผลิตได้ (crude enzyme) มาทำการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน จากนั้นนำเอนไซม์ย่อยแป้งเปลี่ยนน้ำตาล แล้วนำไปทำการหมักแอลกอฮอล์ โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 เปรียบเทียบกับแหล่งวัตถุดิบเป็นกากน้ำตาล

4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 4.1 ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ที่ทำการศึกษา
- 4.2 เป็นแนวทางในการใช้วัตถุดิบราคาถูกลงที่มีอยู่ในประเทศเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า ซึ่งเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต
- 4.3 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนมีการแยกสารเจือปนออกไปบางส่วนทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น
- 4.4 เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงขึ้นไป



ผลผลิตมันสำปะหลังภายในประเทศเกือบทั้งหมดได้นำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรม คือ ประมาณร้อยละ 70 ใช้ทำเป็นมันเส้นและมันอัดเม็ด อีกร้อยละ 30 ให้แปรรูปเป็นแป้ง(ตารางที่ 2.2) ผลิตภัณฑ์แป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการแปรรูปนี้เป็นสินค้าที่สำคัญของประเทศทำรายได้ให้ประเทศมากถึง 23,173.8 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2534 โดยปริมาณการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทยระหว่าง ปี พ.ศ. 2534-2541 แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ปริมาณการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2534-2541

ปี พ.ศ.	ผลิตเพื่อ				รวมทั้งสิ้น	
	ใช้ภายในประเทศ		ส่งออกต่างประเทศ			
	แป้ง	หัวมันสด ที่ใช้	แป้ง	หัวมันสด ที่ใช้	แป้ง	หัวมันสด ที่ใช้
2534	559,000	2,795,000	860,681	4,303,405	1,149,681	7,098,405
2535	615,810	3,079,050	946,749	4,733,745	1,562,559	7,812,795
2536	680,358	3,401,790	1,041,422	5,207,110	1,721,780	8,608,900
2537	754,004	3,770,020	936,390	4,681,950	1,690,394	8,451,970
2538	723,269	3,435,527	857,852	4,074,797	1,581,121	7,510,324
2539	759,434	3,607,311	905,136	4,299,396	1,664,570	7,906,707
2540	770,000	3,657,500	1,115,738	5,489,755	1,925,738	9,147,255
2541	650,000	3,087,500	784,835	3,727,966	1,434,835	6,185,466

ที่มา : กล้าณรงค์ (2542)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกมากที่สุดในโลก ทั้งนี้เพราะประเทศที่ผลิตมันสำปะหลังได้มาก ๆ คือ ไนจีเรีย บราซิล และประเทศอื่น ๆ ผลิตมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นอาหารของพลเมืองภายในประเทศ ส่วนประเทศไทยใช้มันสำปะหลังเพื่อบริโภคน้อยมาก ประเทศที่ไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันอัดเม็ดไปขายมากที่สุด คือ ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป หรือ EEC (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน และ โปรตุเกส) เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น ส่วนในรูปของแป้งมันสำปะหลังประเทศได้หวั่นตั้งชื่อมากที่สุด รองลงมาคือ ญี่ปุ่น สหภาพโซเวียต สหรัฐอเมริกา สิงคโปร์ ฮองกง ฯลฯ

2 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง ซึ่งวิเคราะห์ในรูปส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัมของมันสำปะหลังสดมีองค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	เจริญศักดิ์ (2532)	Balagopalan และ คณะ (1988)	Beynum และ Roles (1985)
ความชื้น (ร้อยละ)	63.28	59.40	66.00
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	29.73	38.10	38.10
โปรตีน (ร้อยละ)	1.18	0.70	1.00
ไขมัน (ร้อยละ)	0.08	0.30	0.30
เถ้า (ร้อยละ)	0.85	1.00	*
เยื่อใย (ร้อยละ)	0.99	0.60	1.00
โปตัสเซียม (mg/kg)	0.26	*	*
ฟอสฟอรัส (mg/kg)	0.04	4.00	*
กรดไฮโดรเจน (ppm)	173	15-400	*
วิตามินซี (ร้อยละ)	*	252	*

หมายเหตุ * ไม่มีการรายงาน

ที่มา: กล้าณรงค์ (2542)

3 อายุและฤดูการเก็บเกี่ยว

มันสำปะหลังเป็นพืชไร่ที่ได้เปรียบพืชไร่ชนิดอื่น ๆ คือ สามารถยืดหยุ่นอายุเก็บเกี่ยวได้จากที่มีผู้ทำการศึกษา พบว่ามันสำปะหลังจะเริ่มมีหัวเมื่ออายุประมาณ 3 เดือนเป็นต้นไป หัวจะเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ โดยการสะสมแป้งมากขึ้น และหลังจาก 6 เดือนไปแล้ว เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวมันจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แต่ปริมาณแป้งจะเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักหัวสดเพิ่มขึ้นจาก 1.2 ตันต่อไร่ เมื่ออายุ 6 เดือน เป็น 4.1 ตันต่อไร่ เมื่ออายุ 12 เดือน และ 7.2 ตันต่อไร่ เมื่ออายุ 16 เดือน เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละพบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 6 เดือน ได้ผลผลิตเพียงร้อยละ 29 หรือ

ประมาณ 1 ใน 3 ของผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยวอายุ 12 เดือน และการเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 8 และ 10 เดือน ก็ได้ผลผลิตเพียงร้อยละ 46 และร้อยละ 70 ของผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุ 12 เดือน และเมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุมากกว่า 12 เดือน ก็พบว่าผลผลิตยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังเมื่ออายุ 12 เดือน จะได้ผลผลิตสูงขึ้น แต่จะทำให้การปลูกรุ่นต่อไปไม่ตรงกับฤดูกาลที่เหมาะสม และหัวมันจะมีขนาดใหญ่ มีเยื่อใย (fiber) มาก ตลาดไม่ต้องการ

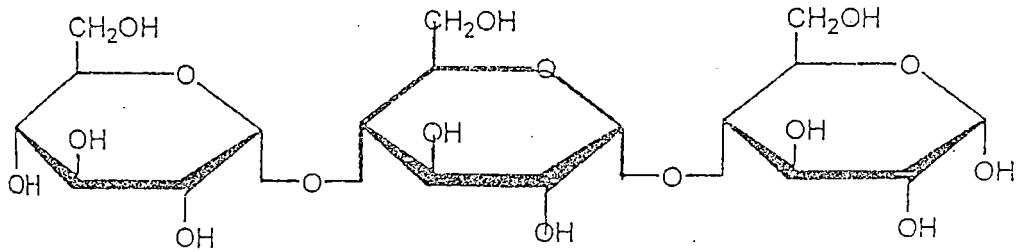
ฤดูกาลเก็บเกี่ยวเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อคุณภาพของหัวมันสำปะหลัง กล่าวคือ การเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้งหรือช่วงที่อากาศแห้งติดต่อกันโดยไม่มีฝนตกหรือดินมีความชื้นต่ำ จะทำให้หัวมันสำปะหลังมีน้ำน้อย เป็นผลให้มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงกว่าการเก็บเกี่ยวในช่วงที่มีฝนตกชุก เนื่องจากราคาหัวมันจะขึ้นกับเปอร์เซ็นต์แป้งในหัว ดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จะเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเมษายน เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงฤดูแล้ง มักจะได้เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวสูง (ร้อยละ 21.4-23.5) ในขณะที่การเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำกว่าร้อยละ 20

4 การย่อยหัวมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล

การย่อยหัวมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล ในที่นี้หมายถึงการย่อยแป้งที่ตกค้างอยู่ในหัวมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล (starch saccharification)

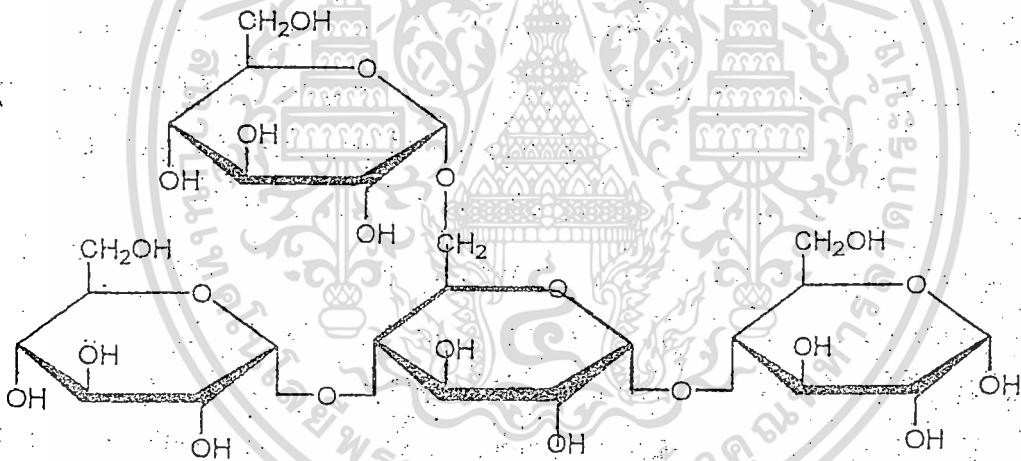
เนื่องจากลักษณะของแป้งที่ได้จากพืชเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) แป้งประกอบไปด้วยโพลีเมอร์ของกลูโคสแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น หรืออะไมเลส (amylose) และโพลีเมอร์เชิงกิ่งหรืออะไมโลเพกทิน (amylopectin) โดยมีอะไมโลสเป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 75-85 เปอร์เซนต์ (สมชาย, 2537)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1,4) กลูโคซิดิก (α -1,4-glucosidic linkage) มีลักษณะเป็นเส้นยาว ๆ ปิดกันเป็นเกลียว (helix) ไม่ละลายน้ำแต่กระจายตัวในลักษณะไมลล์เซลล์ (micelle) เมื่อรวมตัวกับไออนิดินแล้วเกิดสีน้ำเงิน



รูปที่ 1 โครงสร้างของอะไมโลส

อะไมโลเพกตินเป็นโพลิเมอร์เชิงกิ่งที่ประกอบด้วยกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคส เชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา (1,4) กลูโคซิดิก และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้นเชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา (1,6) กลูโคซิดิก (α -1, 6 - glucosidic linkage) ลักษณะของ อะไมโลเพกตินในน้ำจะให้สารแขวนลอย (colloidal solution) เมื่อรวมตัวกับไอโอดีนแล้วเกิดสีม่วงแดง



รูปที่ 2 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน

เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ปกติ จะไม่สามารถใช้แป้งในการหมักแอลกอฮอล์ ได้ในขั้นตอนเดียว จึงต้องทำการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน ซึ่งวิธีที่ใช้ในการย่อยแป้งมีด้วยกัน 2 วิธี คือ การย่อยแป้งโดยใช้กรด และการใช้เอนไซม์ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลส (amylase) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นแล้วปลดปล่อยออกมา นอกเซลล์ (กล้าณรงค์, 2542)

ลักษณะการทำงานของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม (กล้าณรงค์, 2542; มีชัย, 2542) คือ

5.1 เอนไซม์เอนโด - อะไมเลส (endo - amylase) หรือ เอนไซม์แอลฟา - อะไมเลส

เอนไซม์แอลฟา - อะไมเลส (α - amylase หรือ amylo (1 - 4) dextrinase หรือ 1,4 - α - glucan - gluconohydrolase EC 3.2.1.1) จัดเป็น extracellular enzyme คือ เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแล้วถูกขับออกมานอกเซลล์ พบได้ในสัตว์ พืช และ จุลินทรีย์หลายชนิด ถ้าแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลสจัดเป็น endo - acting enzyme ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา - 1,4 ไกลโคซิดิก (α - 1,4 glycosidic linkages) ภายในโมเลกุลของแป้งอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำตาลของลดลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้แตกต่างกันตามความยาวของสายโซ่ เอนไซม์แอลฟา - อะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลส (amylase) ได้ดีเมื่อย่อยต่อเนื่องในเวลาที่ยาวพอจะได้ ผลิตภัณฑ์เป็นมอลโตส (maltose) และ มอลโตไตรออส (maltotriose) มอลโตไตรออสจัดเป็นลิมิตเดกซ์ทรินที่ไม่ดีสำหรับเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลส และขั้นสุดท้ายเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลสจะย่อยมอลโตไตรออสเป็นมอลโตส และกลูโคสอย่างช้าๆ แต่เอนไซม์แอลฟา - อะไมเลสไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิก (α - 1,6 glycosidic linkages) ที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ ดังนั้นแอลฟา - ลิมิตเดกซ์ทริน (α - limit dextrans) จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลส (วชิราพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์, 2543) การย่อยโมเลกุลของแป้งในขั้นที่สองเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เหมือนกับการย่อยอะไมโลส แต่เป็นการย่อยพันธะแอลฟา - 1,4 ไกลโคซิดิกที่ติดกับพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิกของแอลฟา - ลิมิตเดกซ์ทริน (Kenedy et. al. 1987; Leloup et. al. 1994)

5.2 เอนไซม์เอ็กโซ - อะไมเลส (exo - amylase) ประกอบด้วยเอนไซม์เบต้า - อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอนไซม์เบต้า - อะไมเลส (β - amylase หรือ 1,4 - α - D - glucan maltohydrolase EC 3.2.1.2.) พบมากในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี มันฝรั่งหวาน และถั่วเหลือง เป็นต้น และเป็น extracellular enzyme ในเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus cereus* และ *B. polymyxa* เป็นต้น เอนไซม์เบต้า - อะไมเลสจัดเป็น exo - acting enzyme โดยย่อยพันธะแอลฟา - 1,4 ไกลโคซิดิกของแป้งจากตำแหน่ง non - reducing end ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้

หลังจากการย่อยคือเบต้า - มอลโตส (β - maltose) เอนไซม์เบต้า - อะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลสได้เกือบสมบูรณ์ และสามารถย่อยอะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นมอลโตสได้ร้อยละ 50 - 60 แต่เอนไซม์เบต้า - อะไมเลสไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ ดังนั้นจึงยังคงเหลือเบต้า - ลิมิตเด็คซ์ตริน (β - limit dextrins) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase หรือ 1,4 - α - D - glucan glucohydrolase หรือ glucamylase หรือ amyloglucosidase หรือ γ - amylase EC 3.2.1.3) สามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในสกุล *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* นอกจากนั้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถผลิตได้จากยีสต์ *Saccharomyces diastaticus* และแบคทีเรีย *Flavobacterium sp.* เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจัดเป็น exo - acting enzyme โดยย่อยพันธะแอลฟา - 1,4 ไกลโคซิดิกและพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิกจากตำแหน่ง non - reducing end ของแป้งทีละหน่วยเป็นกลูโคส อย่างไรก็ตามอัตราการย่อยขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลและโครงสร้างของสับสเตรทโดยอัตราการย่อยพันธะแอลฟา - 1,4 ไกลโคซิดิกมากกว่าพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิก ประมาณ 15 - 30 เท่า ดังนั้นการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงมีการนำเอนไซม์ดีبرانซิงค์ (debranching enzyme) ซึ่งย่อยสามารถพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิก มาใช้ร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อให้สามารถย่อยแป้งได้สมบูรณ์เร็วขึ้น และพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบางชนิดสามารถย่อยแป้งดิบได้ (Kenedy et. al. 1987; Leloup et. al. 1994)

5.3 เอนไซม์ดีبرانซิงค์ (debranching enzyme) ประกอบด้วยเอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พูลูลานเนส

เอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase หรือ glucogen - 6 - glucanohydrolase EC 3.2.1.68) และเอนไซม์พูลูลานเนส (pullulanase หรือ pullulan 6 - glucanohydrolase EC 3.2.1.41) เอนไซม์ไอโซอะไมเลสสามารถย่อยพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคติน ไกลโคเจนเด็คซ์ตรินที่มีกิ่งก้านและสารโอลิโกแซคคาไรด์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิกของพูลูลแลน และเบต้า - ลิมิตเด็คซ์ตรินได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ไอโซอะไมเลสมีความสามารถในการจับกับสายโซ่ที่สั้นกว่า โดยที่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *Pseudomonas amyloferamosa* สามารถย่อยโมเลกุลที่ประกอบด้วยกลูโคสอย่างน้อยที่สุดสามหน่วยในสายโซ่ที่เป็นกิ่งก้าน มีการเสนอว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลสย่อยแบบ exofasion proceeding จากตำแหน่ง non - reducing end ในการตัดกิ่งก้านของแป้งในการผลิตกลูโคสและมอลโตส ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไอโซอะไมเลสได้ เช่น *Saccharomyces*

cerevisiae, *Escherichia coli*, *Cytophaga sp.*, *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350, *Lipomyces kononenkoae*, *Flavobacterium sp.*, และ *Pseudomonas amylocleramosa* SB - 15 เป็นต้น (Vihinen and Mantsala. 1989)

เอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พอลิวูลานเนสสามารถย่อยพันธะแอลฟา - 1,6 ไกลโคซิดิก ของแป้งได้เป็นสายโซ่ของสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีความยาวต่างๆ (Saha and Zeikus. 1989) โดยที่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พอลิวูลานเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน กล่าวคือ เอนไซม์พอลิวูลานเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีโมเลกุลเล็กที่สุดคือมอลโตส แต่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสมีความจำเพาะต่อสับสเตรท ที่มีโมเลกุลเล็กที่สุด คือมอลโตไตรโอสและมอลโตเตตระโอส (maltotetraose) (Allen and Dawson. 1975) แสดงดังรูปที่ 2.2 แต่มีบางรายงานกล่าวว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลส มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีสายโซ่ที่สั้น ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 -3 หน่วย แต่สับสเตรทที่ดีที่สุดคือสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Kennedy et. al. 1987) เอนไซม์พอลิวูลานเนสและเอนไซม์ไอโซอะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลเพคติน แป้งและไกลโคเจนได้ แต่มีรายงานว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลสเป็น เอนไซม์ที่ปราศจากซิงค์เพียงชนิดเดียวที่สามารถย่อยไกลโคเจนได้ทั้งหมดและ เอนไซม์พอลิวูลานเนสสามารถย่อยพอลิวูลาน เป็นมอลโตไตรโอส ได้ แต่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสไม่สามารถย่อยพอลิวูลานได้ (Allen and Dawson. 1975)

กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, และ *Rhizopus spp.* เอนไซม์นี้จัดเป็นแอลฟาอะไมเลส (α -amylase) ชนิดหนึ่งที่ย่อยจากปลายโมเลกุล (exo-hydrolase) ทั้งพันธะ α -(1,4) และ α -(1,6) โดยจะตัดพันธะ α -(1,6) เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor) นอกจากนี้ยังมีบีต้าอะไมเลส (β -amylase) ย่อยจากปลายโมเลกุล (exo-hydrolase) ครึ่งละ 2 โมเลกุลกลูโคสทำให้ได้น้ำตาลมอลโตสเป็นผลผลิต ส่งผลต่อพันธะ α -(1,4) และเมื่อย่อยมาถึงพันธะ α -(1,6) กิจกรรมเอนไซม์จะหยุดลง เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) เป็นโคแฟกเตอร์

6 กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์

เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสมีหลายชนิดแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติต่างกัน ดังนั้น เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดจึงแบ่งขั้นตอนในการย่อยแป้งเป็น 2 ขั้นตอน (มีชัย, 2542; Boyce, 1986) คือ

...6.1 การทำให้แป้งเหลว (liquefaction)

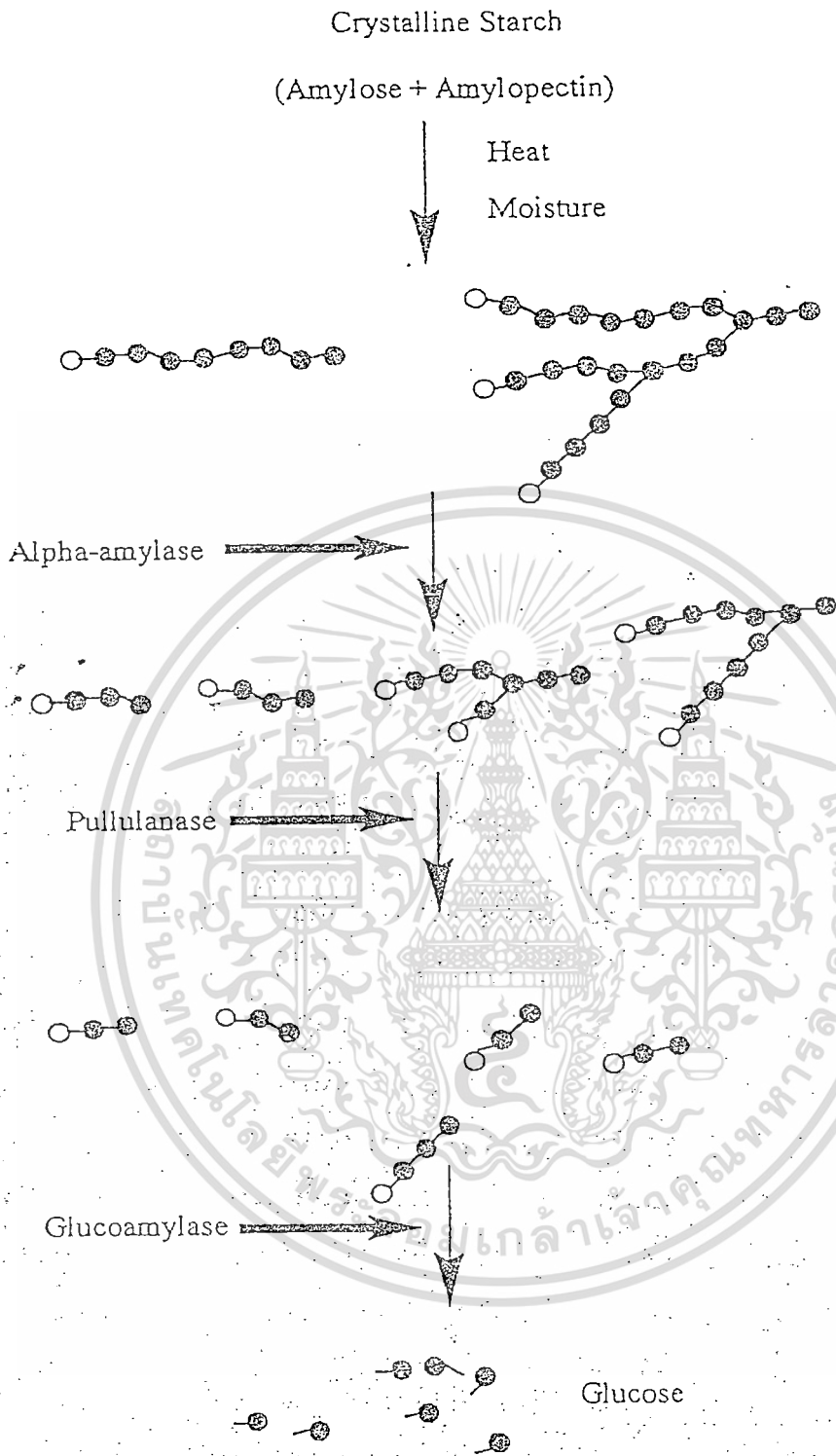
ขั้นตอนนี้เป็นการทำงานให้แป้งเหลวโดยหลังจากการเจลาติไนซ์ (gelatinize) แป้งจะมีความหนืดสูง การเติมเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟาอะไมเลสลงไปทำให้โมเลกุลของแป้งถูกย่อยให้สั้นลง ความหนืดลดลง ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าในกลุ่มแอลฟาอะไมเลส ได้แก่ เทอร์มาไมล (Termamyl) เอนไซม์ดังกล่าวจะเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* การทำงานจะใช้ความเข้มข้นของแป้งร้อยละ 30-40 โดยน้ำหนัก ปรับพีเอชเป็น 6.0-6.5 ใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในรูปแคลเซียมคลอไรด์ 20-80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นโคแฟกเตอร์ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ประมาณ 0.5-0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัมแป้ง เริ่มต้นใช้อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้แป้งเกิดการเจลาติไนซ์อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นย่อยู่ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้จะได้แป้งโมเลกุลเล็กและเด็กทรีน (dextrin)

Ejiofor และคณะ (1996) รายงานถึงการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ทนความร้อน (thermostable) จาก *Bacillus licheniformis* 0.3 กรัม/กิโลกรัมแป้ง ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นถึง 100 ส่วนในล้านส่วน ในรูปแคลเซียมคลอไรด์เป็นโคแฟกเตอร์ ปรับพีเอชเป็น 6.1-6.3 ควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงซึ่งให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นแป้งโมเลกุลเล็กและเด็กทรีนเช่นกัน

6.2 การเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาล (saccharification)

ขั้นตอนนี้อาศัยเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะไมเลสในการเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาล ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าที่ใช้ ได้แก่ เด็กซ์โทรไซม์ (Dextrozyme) และเอเอ็มจี (AMG) หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้แป้งเหลวทำการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเป็น 60 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 4-4.5 เติมเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะไมเลส 0.65-0.80 มิลลิกรัมต่อแป้ง 1 กิโลกรัม ใช้เวลาเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง พบว่าการเติมเอนไซม์มากขึ้นจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น

นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูป (glucoamylase immobilized) บน porous diatomaceous earth ในการเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาล โดยอายุการใช้งานของเอนไซม์ตรึงรูปนานถึง 3 สัปดาห์ (Krishnan และคณะ, 2000)

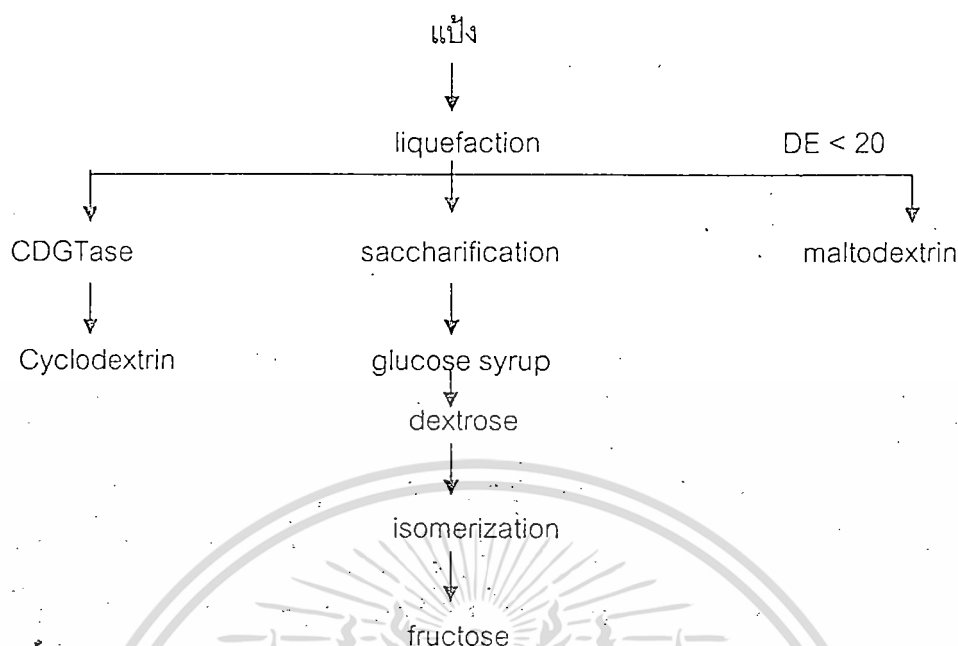


รูปที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสในการย่อยแป้ง
ที่มา: Boyce (1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปตีพิมพ์หรือใช้รูปกราฟิก
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้คัดแปลงเนื้อหา และเผยแพร่ซ้ำโดยไม่ขออนุญาตจากสำนักพิมพ์สงวนลิขสิทธิ์

7 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน

เมื่อแบ่งเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งานสามารถแบ่งเอนไซม์ได้เป็น 3 กลุ่มดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน
ที่มา : กล้าณรงค์และเกื้อกุล (2543)

7.1 กลุ่มเอนไซม์เพื่อลิกวิฟแฟคชัน (liquefaction)

ในการย่อยแป้งเพื่อจะผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง ซึ่งก็คือ กลูโคสนั้น จะต้องมีขั้นตอนที่ทำให้แป้งสุก และของเหลวมีความหนืดต่ำ ก่อนที่จะนำไปทำการผลิตต่อไป ดังนั้นเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับ การทำให้น้ำแป้งเป็นของเหลวที่มีความหนืดน้อย ถือว่าเป็นการย่อยครั้งแรก ของกระบวนการย่อยสลายแป้งเอนไซม์ ควรเป็นประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุมภายในเส้นสาย (endo enzyme) คือ ทำงานหรือตัดพันธะภายในโมเลกุลของแป้ง เพื่อที่จะทำให้แป้งถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ เท่าๆ กันในเวลาสั้น (สั้นกว่าเอนไซม์ประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุมภายนอกเส้นสาย (exo enzyme) เป็นของเหลวที่ค่อนข้างสมบูรณ์และมีความหนืดต่ำ มีค่าเด็กโทรลอิควิวาเลนต์ (dextrose equivalent; DE) ต่ำกว่า 20 ซึ่งโอกาสที่แป้งจะจับตัวเป็นได้ต่ำ

7.2 กลุ่มเอนไซม์เพื่อการแซคคาริฟิเคชัน (saccharification)

แซคคาริฟิเคชัน หมายถึง ระดับการย่อยแป้งที่มากขึ้น ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น (มีค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์ (DE) สูงขึ้น) น้ำแป้งเกิดรสหวานเป็นน้ำเชื่อม ปกติพบการใช้เอนไซม์อยู่ 2 กลุ่ม คือ

7.2.1 การย่อยเพื่อให้ได้น้ำเชื่อมชนิดที่มีค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์ระหว่าง

38-42

น้ำเชื่อมกลูโคสขนาดที่มีค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์ระหว่าง 38-42 มีความเหนียว ความหวานพอดี เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไปใช้เอนไซม์ประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุ่มภายในเส้นสาย เพื่อให้แป้งถูกย่อยจนภายในเส้นสาย มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหลือน้อยต่ำพอที่จะไม่เกิดการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) และเกิดน้ำตาลชนิดต่างๆ (กลูโคส มอลโตส ฯลฯ) ที่สร้างความหวานขึ้น เอนไซม์ที่เหมาะสมกับการผลิตน้ำเชื่อมชนิดนี้ คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่สกัดจากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อราจะมีคุณสมบัติที่คล้ายๆ กัน คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำแป้งที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 30 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3-8 (ปกติใช้ค่าพีเอชในช่วง 4-5) และต้องใช้ความร้อนในการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์

7.2.2 การย่อยเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์สูง (ค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์สูงกว่า 95)

ในการผลิตน้ำตาลกลูโคสเพื่อที่จะทำเป็นวัตถุดิบของการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องต่อไป เช่น น้ำตาลฟรักโทส ซอร์บิทอล หรือทำกลูโคสผง (เด็กซ์โทรส) ชนิดต่างๆ จำเป็นต้องใช้น้ำเชื่อมขนาดที่มีความบริสุทธิ์สูง หมายถึงมีจำนวนน้ำตาลกลูโคสต่อของแข็งทั้งหมดสูง หรือ ค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์สูงกว่า 95 การย่อยจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุ่มภายในเส้นสายที่ย่อยจากปลายสายเข้ามาและสามารถย่อยพันธะได้ทั้ง α -1,4 และ α -1,6 ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าว คือเอนไซม์กลูโคอะไมเลสหรืออะไมโลกลูโคไซด์ที่ได้จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* ลักษณะของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ มีความสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส) ค่าพีเอชประมาณ 4-6 (พีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5) ความเข้มข้นของน้ำแป้งประมาณร้อยละ 30-35 ไม่ต้องการแคลเซียมในการร่วมกิจกรรม จำเป็นต้องใช้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมก่อนที่จะดำเนินการกระบวนการผลิตต่อไป บางกรณีมีการใช้เอนไซม์ที่ตัดพันธะ α -1,6 เช่น เอนไซม์พูลูลานสรวรร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะทำให้การทำงานเร็วขึ้น

8 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase , Amyloglucosidase , E.C. 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสที่สลายพันธะอัลฟา (1,3) , (1,4) และ (1,6) ไกลโคซิดิกในแป้ง จากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) โดยทำงานจากปลายนอกสุดเข้ามา (exo-acting) ให้ผลิตภัณฑ์เป็น เบตา-ดี-กลูโคส (β -D- Glucose) ที่ละหนึ่งโมเลกุล

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเองยังอาจจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นพวกที่สามารถย่อยแป้งและ เบตาลิมิตเดกซ์ตริน (β - limit dextrin) ได้อย่างสมบูรณ์ กลุ่มที่ 2 สามารถย่อยแป้งได้เพียงร้อยละ 80 และ ย่อยเบตาลิมิตเดกซ์ตรินได้ เพียงร้อยละ 40 ซึ่งกลุ่มที่ 2 นี้ไม่สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ กลูโคอะไมเลสทั้ง 2 กลุ่ม สามารถย่อยน้ำตาลแพนโทส (pantose) และ อัลฟาลิมิตเดกซ์ตริน (α - limit dextrin) ได้อย่างสมบูรณ์

8.1 คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความคงตัวในช่วงพีเอชต่ำ (Reilly , 1979) ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จาก *Aspergillus* sp. อยู่ระหว่าง 3.5- 5.0 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0 (Pazur, 1972) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะมีพีเอชอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 สำหรับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus delemar* มีพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.5 (Phillips และ Caldwell, 1951) และที่พีเอช 4.3-4.7 (Adams, 1953)

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส มีขนาดตั้งแต่ 50,000 ถึงมากกว่า 110,000 ซึ่งค่าของน้ำหนักโมเลกุลนี้จะแตกต่างกันในเชื้อราแต่ละชนิด เอนไซม์กลูโคอะไมเลสส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 70,000 (Reilly , 1979)

8.2 แหล่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ผลิตได้จากทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในกลุ่มจุลินทรีย์ อาจพบในแบคทีเรียเช่น *Clostridium acetobutylicum* และ *Flavobacterium* sp. พบในยีสต์บางชนิด เช่น *Endomyces* sp. , *Endomycopsis* sp. , *Saccharomyces diastaticus* และ *Candida pelliculosa* ราที่พบว่าผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เช่น *Aspergillus* spp. , *Rhizopus* spp. , *Mucor* spp. , *Amylomyces* spp. , *Chlamydomucor* spp. และ *Penicillium* เป็นต้น สำหรับ เชื้อรา *Aspergillus niger* นอกจากผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแล้วยังสร้างเอนไซม์ trans-glucosidase

ซึ่งเปลี่ยนกลูโคสและไดแซคคาไรด์ไปเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นผลให้เกิดโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งโพลีแซคคาไรด์นี้จะไปขัดขวางการเกิดผลึกกลูโคสทำให้ผลผลิตกลูโคสลดลง ดังนั้นต้องกำจัดเอนไซม์ดังกล่าวก่อนที่จะนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อรานี้ไปใช้ สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* sp. ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเอนไซม์สร้าง trans- glucosidase (Wiseman , 1975)

8.3 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

สารที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยในธรรมชาติคือ แป้ง และจะต้องทำให้สารละลายน้ำแป้งนั้นเกิด gelatinization ก่อนซึ่งเป็นการทำให้ ลักษณะทางกายภาพ ของเม็ดแป้งเปลี่ยนแปลงเสียก่อนเอนไซม์จึงจะย่อยได้ดี โดยจะทำให้ glycosidic bond แตก ทำให้ชิ้นส่วนใหญ่ๆ ของเม็ดแป้งแตกกระจาย และความหนืดลดลง จึงดูเหมือนว่าเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างของแป้งกระจัดกระจายไม่เป็นระเบียบ พร้อมทั้งทำให้ความหนืดลดลงได้ ในทำนองเดียวกันกับการย่อยด้วยกรด สำหรับสารละลายแป้งดิบทั้งชนิดเข้มข้นและเจือจางนั้น เอนไซม์จะย่อยได้ช้า (Hockenull, 1967) Barker และ Fleetwood (1957) ได้อธิบายว่าจุดตัดในโมเลกุลของแป้งที่กลูโคอะไมเลสตัดคือ พันธะระหว่าง คาร์บอนตัวที่หนึ่งกับออกซิเจน (C₁-O) เช่นเดียวกับจุดตัดของแอลฟาอะไมเลส เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของ เอนไซม์กลูโคอะไมเลสและ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แล้วพบว่ากลูโคอะไมเลสจะย่อยแป้งได้ช้ากว่า โดยจะย่อยจากปลายโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน ครั้งละหนึ่งหน่วยกลูโคส แต่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะย่อยแบบสุ่ม จึงย่อยได้เร็วกว่า ดังจะสังเกตได้จากสีของไอโอดีนที่ทำปฏิกิริยากับแป้งจะหายไปเร็วกว่าที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในทำนองเดียวกับอัตราการลดความหนืดของสารละลายแป้ง เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อราอย่างน้อยประกอบด้วย 2 ชนิด คือ กลูโคอะไมเลส 1 (GA I) และกลูโคอะไมเลส 2 (GA II) GA I มีความสามารถในการย่อย α -1,6-glycosidic linkage และแป้งดิบ ได้ดีกว่า GA II จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะให้ปริมาณและชนิดของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างกัน เช่น เชื้อรา *Aspergillus awamori* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้งสามชนิด คือ GA I, GA I' และ II GA I เป็นเอนไซม์ชนิดที่ย่อยแป้งดิบได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 90,000 สามารถย่อยแป้งข้าวโพดดิบได้อย่างสมบูรณ์ ย่อยแป้งมันฝรั่งที่ผ่านการ เจลาติไนซ์ และไกลโคเจนได้ร้อยละ 90 และร้อยละ 100 ตามลำดับ GA I' เป็นเอนไซม์ชนิดที่ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 83,000 สามารถย่อยแป้งมันฝรั่งที่ ผ่านการเจลาติไนซ์ และ ไกลโคเจนได้ร้อยละ 90 และร้อยละ 80 ตามลำดับ สำหรับ GA II เป็นชนิดที่ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 51,000 สามารถย่อยแป้งมันฝรั่งที่ผ่านการเจลาติไนซ์ และไกลโคเจนได้ร้อยละ 60 และร้อยละ 40 ตามลำดับ (Hayashida และ Yoshino, 1977 ; Yoshino และ Hayashida , 1978) ส่วนเชื้อรา *A.niger* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 2 ชนิดคือ GA I และ GA II (Pazur และคณะ, 1971) โดยที่

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรานี้ สามารถย่อยแป้งดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ดีที่พีเอช 3.4 ซึ่งเป็น isoelectric point ของเอนไซม์ (Medda และคณะ, 1982)

8.4. การวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์อะไมเลสมีหน้าที่คือ การย่อยโมเลกุลของแป้งให้เล็กลง และนอกจากจะทำให้ลักษณะทางกายภาพของแป้ง เช่น ความหนืดลดลงแล้ว ยังให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย ได้แก่ โมเลกุลของแป้งมีขนาดเล็กลงหลาย ๆ โมเลกุล และโมเลกุลเดี่ยว ๆ ของกลูโคส จากรายงานของ Bernfeld (1951, 1955) พบว่า เมื่อสารละลายแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส คุณสมบัติของแป้งจะเปลี่ยนแปลงดังนี้คือ

1. จะมีคุณสมบัติเป็นรีดิวซิ่งเพิ่มขึ้น
2. คุณสมบัติในการเกิดสีกับไอโอดีนเปลี่ยนไปจากสีน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลแดง
3. ความหนืดลดลง
4. ความสามารถในการเบี่ยงเบนแสงลดลง(Optical rotation)

ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ เช่น ตรวจการหลอมเหลวของแป้ง จากความหนืดที่ลดลงและ ตรวจประสิทธิภาพการเปลี่ยนโมเลกุลใหญ่ ๆ ของแป้งให้กลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลงได้ โดยการสังเกตการเกิดสีกับไอโอดีน รวมทั้งตรวจการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส โดยการวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง (Underkofler, 1961) น้ำตาลรีดิวซิ่งนี้เราสามารถวิเคราะห์ หาปริมาณได้หลายวิธี อย่างเช่น วิธีของ A.O.A.C. (1970); วิธีของ Somogyi (1945) ; วิธีใช้กลูโคสออกซิเดส (Kato, 1976) หรือวิธีของ Nelson- Somogyi (Krzeczowska และ Urbanek, 1975) และวิธี Saccharification ของ Bernfeld (1951,1955) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Weill (1954) ที่ได้กล่าวถึงการวัดปฏิกิริยา ของเอนไซม์อะไมเลสไว้ว่า สามารถวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์เหล่านั้นได้ 3 วิธีด้วยกันคือ การวัดอัตราของปฏิกิริยาการเกิดน้ำตาล (Saccharogenic activity) หรือวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์โดยตรง (Glucose-Direct activity) และวัดจากปฏิกิริยาการย่อยแป้ง (Amyloelastie activity) ได้เช่นกัน

วิธีแรกคือ การวัดอัตราปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดน้ำตาลขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหน่วยย่อยๆ ของกลูโคสจะมีหน่วย (-C-OH group) ที่เป็นรีดิวซ์อยู่เฉพาะที่ปลายสุดของโมเลกุล เมื่อแขน α -(1,4) glycosidic แยกออกเนื่องจากการย่อยของเอนไซม์ จะทำให้ปริมาณของกรุปที่เป็นรีดิวซ์เพิ่มขึ้น และจะเพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วนโดยตรงต่อจำนวนแขนที่เอนไซม์ย่อยให้ขาดออกจากกันไป ฉะนั้นโดยวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งที่เกิดขึ้น จากผลการย่อยของเอนไซม์การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งมักจะใช้วิธีของ Bernfeld (1951,1955) ซึ่งวิธีการนี้เป็นการวัดสีที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างกรุปรีดิวซ์ซึ่งของน้ำตาลกับกรด 3,5 dinitrosalicylic ซึ่งจะได้สีน้ำตาลแดงและดูดแสงได้สูงสุดที่ 550 nm แสดงผลที่ได้เป็นมิลลิกรัมของกลูโคสต่อมิลลิกรัมของกลูโคสต่อมิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

วิธีที่สอง เนื่องจากเอนไซม์อะไมเลสบางชนิดจะย่อยจากปลายโมเลกุลของแป้ง ฉะนั้นหลังจากการย่อยแล้วจะได้กลูโคสเกิดขึ้น ดังนั้นวิธีนี้จึงอาจจะเกิดน้ำตาลกลูโคสได้โดยตรง โดยวัดออกมาในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง เช่นเดียวกันวิธีของ Zerban และ Sattler (Weill, 1945)

วิธีที่สาม เป็นการวัดปฏิกิริยาการย่อยแป้ง โดยวัดจำนวนแป้งที่ถูกย่อยในขอบเขตที่จะทำให้สารละลายที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน แล้วจะให้สีแดง การปฏิบัติในวิธีการนี้จะทำให้สภาพคล้ายวิธีที่ 1 และ 2 ยกเว้นความเข้มข้นของแป้งที่ใช้จะเป็นร้อยละ 1 แล้วแสดงผลที่ได้ออกมาเป็นจำนวนมิลลิกรัมของแป้งที่ย่อยได้โดยเอนไซม์ 1 มิลลิกรัม ในเวลา 30 นาที

วิธีการหาปฏิกิริยาเอนไซม์ของกลูโคอะไมเลสจะกระทำโดยวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ย่อยแป้ง แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการปรับปรุงวิธีการต่างๆ เหล่านี้ตลอดมาตามความเหมาะสมของแต่ละวิธีการ ดังเช่น Kujuwaki (1974) ได้อธิบายวิธีมาตรฐานสำหรับการหาปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากจุลินทรีย์ โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารละลายแป้งที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 วิเคราะห์หากกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยใช้กลูโคสออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส แล้วคิดเป็นหน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสซึ่งหมายถึงจำนวนเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งแล้วได้กลูโคสออกมา 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

Krzechowska (1975) ได้ทดลองวิธีการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้สารละลายเอนไซม์ และสารละลายแป้งมันเข้มข้นร้อยละ 1 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งโดยวิธีการของ Nelson (1944)

สำหรับการหาปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีของ Kato และคณะ (1976) ได้ใช้สารละลายของเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแป้งที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร และควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีกลูโคสออกซิเดส โดยกำหนดให้เอนไซม์จำนวน 1 หน่วย หมายถึง จำนวนเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ส่วนความสามารถในการทำให้เกิดการหลอมเหลวตัว (liquefying activity) จะหาโดยวิธีของ Fuwa (1954)

8.5 อุณหภูมิ , พีเอช และเกลือที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยทั่วไปเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากราจะเสถียรที่พีเอช ระหว่าง 3-8 และที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะมีกิจกรรมสูงที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus* sp. จะทำงานสูงที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ส่วนมากเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะมีการทำงานสูงที่สุดที่พีเอชประมาณ 4-5 ดังแสดงในตารางที่ 2.4

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (Co-factor) ในการทำงานหรือช่วยทำให้เสถียร อย่างเช่นในเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสต้องการ Ca^{2+} แต่ Moriyama (1980) พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะเสถียรต่ออุณหภูมิสูง เมื่อเติมกลูโคสและกลูโคโนแลคโตน จะรวมตัวที่ Active site สำหรับแลคโตนและกลีเซอรอลจะช่วยลดค่าคงที่ไดอิเล็กตริกในสารละลาย (dielectric constant)

ตารางที่ 4 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของกลูโคอะไมเลส

เชื้อรา	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
<i>Aspergillus awamori</i> <i>A. awamori</i> var <i>kawachi</i> I and II	4.5	60
<i>A. niger</i> I	4.5-5.0	-
<i>A. niger</i> II	4.5-5.0	-
<i>A. oryzae</i> A-1, A-2, A-3 and B-2	4.1-4.7	-
<i>A. oryzae</i> I	4.5	60
<i>A. oryzae</i> III	4.5	40
<i>A. phoenicis</i>	4.6	60
<i>Cephalosporium charticola</i> Lindau	5.4	60
<i>Coniophora cerebella</i>	4.0-4.5	-
<i>Corticium rolfsii</i>	4.5	40-60
<i>Endomycopsis capsularis</i>	4.5	40-50
<i>Hemicola lanuginosa</i> I	4.9	-
<i>Hemicola lanuginosa</i> II	6.6	65-70
<i>Mucor rouxianus</i> I	4.6	55
<i>Mucor rouxianus</i> II	5.0	55
<i>Penicillium oxalicum</i> I	5.0	55-60
<i>Penicillium oxalicum</i> II	4.5	60
<i>Piricularia oryzae</i>	6.5	50-55
<i>Rhizopus delemar</i>	4.5	40

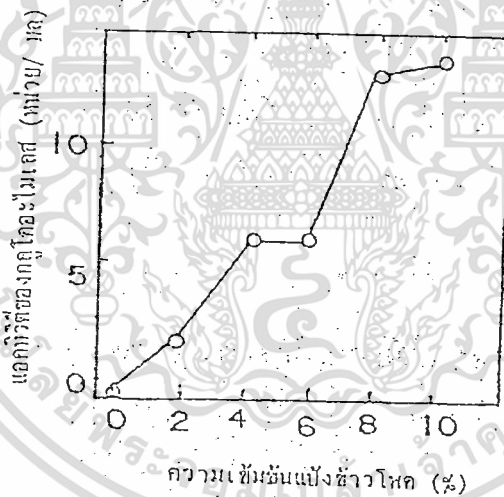
ที่มา : Forgarty และคณะ , 1979

8.6. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

8.6.1 แหล่งคาร์บอน

ปริมาณการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของราจะตอบสนองต่อโครงสร้างและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารนั้น ๆ โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเป็นสารโมเลกุลเชิงซ้อนของน้ำตาลพวกโพลีแซคคาไรด์เช่น เด็กทริน แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง ในขณะที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่น กลูโคส ไซโลส ฟรุกโตส จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพราะให้พลังงานมากพอแก่การเจริญโดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อยแป้ง

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อปริมาณ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส เช่น *Aspergillus awamori* NRRL 3112 จะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาณสูงเป็น 2 ช่วง เมื่อความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดเพิ่มขึ้น ช่วงแรกคือ เมื่อแป้งข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 4-6 และอีกช่วงคือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8-10 ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ข้อเสียคือความเข้มข้นแป้งข้าวโพดที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 6 จะมีความหนืดสูง (Qadeer, 1971)



รูปที่ 2.5 อิทธิพลของแป้งข้าวโพดต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดย *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (Qadeer, 1971)

การแก้ปัญหาคความหนืดทำได้โดย liquefy ด้วยเอนไซม์จากมอลท์หรือโดยเอนไซม์ α -amylase (Aunstrup, 1972; Smiley, 1967; Baribo, 1967) วิธีนี้มีข้อดี คือลดความหนืดของอาหารเหลว ลดพลังงานที่ใช้ในการกวนน้ำหมัก ช่วยให้มีการถ่ายเทความร้อนระหว่างการฆ่าเชื้ออาหารเหลวได้ดี รวมทั้งลดการเดือดล้น ระหว่างการพ่นไอน้ำมาเชื้อรา นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ใน *A. niger* ได้ (Smith, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับวงใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อฝ่ายบริการลูกค้าของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ

1.8.6.2 แหล่งไนโตรเจน

ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสขึ้นกับความสามารถในการใช้โพลีเปปไทด์หรือสารประกอบไนโตรเจนที่เล็กกว่า เช่น กรดอะมิโน เพราะสารประกอบไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอนไซม์

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ที่จะช่วยให้ราผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูง มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่มักจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับรา *Aspergillus* sp. เช่น การใช้เส้นใยจากการหมักยาเพนนิซิลิน และ Corn steep liquor เหมาะสำหรับ *Aspergillus awamori* , น้ำล้กัด ถั่วเหลือง หรือถั่วเขียวเหมาะสำหรับ *Aspergillus usamii* , กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันและรำข้าวสำหรับ *Amylomyces* sp. , โปรตีนถั่วลิสงสำหรับ *Aspergillus niger* และรำข้าวสำหรับ *Rhizopus oryzae* (Sukhumavasi, 1982 ; จตุพร พรศิลป์, 2528 ; ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์, 2526) แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์นั้น จะพบว่าเกลือของแอมโมเนียม จะให้ผลผลิตสูงกว่าเกลือไนเตรท (Barton, 1972)

1.8.6.3 เกลืออนินทรีย์

โดยทั่วไปอาจจะถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์ปล่อยออกมานอกเซลล์มากกว่า เดิมเมื่อใช้เกลือซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่จำเป็นในการเจริญ (Barton, 1972)

นอกจากนี้ PO_4^{2-} , Mg^{2+} , Fe^{2+} ก็กระตุ้นการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่ในอุตสาหกรรม Fe^{2+} อาจไม่จำเป็นต้องเติม เพราะในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจะมีอยู่แล้ว

9 ปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนอาหารเหลว

การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวนั้น ปัจจัยความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และความชื้นในอากาศไม่มีความสำคัญ แต่พีเอชในอาหารจะเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระหว่งการหมัก จะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้รวดเร็ว กว่าในอาหารแข็ง อย่างไรก็ตามการหมักในถังหมักสามารถควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ โดยการเติมกรดหรือด่าง หรือใช้บัฟเฟอร์ในอาหาร อุณหภูมิ การให้อากาศและ การกวน เป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถควบคุมได้อย่างแน่นอนกว่า การหมักบนอาหารแข็ง สิ้นเปลืองแรงงานน้อยกว่า และสามารถป้องกันการติดเชื้ออื่นที่มากับอากาศที่ให้ได้ดีกว่า

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นกับชนิดของเชื้อซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาและเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีหนังสือสงวนลิขสิทธิ์และสงวนสิทธิในสิ่งพิมพ์ด้วย

กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการผลิตในอาหารแข็งแต่ในอาหารเหลวมีข้อได้เปรียบที่การกระจายสารอาหารทั่วถึงดีกว่า และไม่มีปัญหาการควบคุมขนาด รูปร่างของอาหาร

ในการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ไม่มีความสำคัญหลังการหมักเพียงกรองหรือปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วแยกเซลล์ออกเท่านั้น ซึ่งจะเห็นได้ว่า การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในอาหารเหลวมีปัจจัยที่ต้องควบคุมน้อยกว่าในอาหารแข็ง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบที่จะลงทุนโดยค่าใช้จ่ายจะลดลง ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่สำคัญสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็งและอาหารเหลว

การผลิตบนอาหารแข็ง	การผลิตบนอาหารเหลว
1. การปรับความชื้นเริ่มต้นในอาหาร	1. พีเอชของอาหาร
2. การควบคุมขนาดและรูปร่างอาหาร	2. อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง
3. ความชื้นในอากาศ	3. การให้อากาศ
4. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	4. การกวน
5. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	5. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. การพลิกกลับอาหารแข็ง	6. ปริมาณสปอร์ที่ใช้
7. ปริมาณสปอร์ที่ใช้	
8. การสกัดเอนไซม์จากอาหารแข็ง	

ที่มา : ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์ (2526)

10 การแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จากแหล่งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มักจะมีเอนไซม์อื่นๆ ปะปนอยู่ด้วย เช่น α -glucosidase (Fleming and Stone, 1965; Taylor และคณะ, 1978) แอลฟาอะไมเลส (Saha และคณะ, 1979; Takahashi และคณะ, 1978; Medda และคณะ, 1982) เซลลูเลส (Takahashi และคณะ, 1978) transglucosidase (Barker and Fleetwood, 1957; Lineback และคณะ, 1969; Qadeer และ Kansar, 1971) Glucooxidase (Barker และ Fleetwood, 1957) โปรติเอส (Miah และ Ueda, 1977, Tsujita และ Endo, 1976) α -mannosidase (Fleming and Stone, 1965) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้อาจมีผลต่อการศึกษาคคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนั้นจึงต้องมีการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้

บริสุทธิ์ เอนไซม์กลูโคสไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราส่วนใหญ่ เป็นเอนไซม์ที่จับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงไม่ยุ่งยากมากนัก เช่น ใช้แบ่งเป็นสารดูดซับเอนไซม์กลูโคสไมเลส (Ueda และ Kano, 1975) การตัดเจลของเอนไซม์ที่แยกได้จาก Polyacrylamide eletrophoresis (Takahashi และคณะ ., 1978) ซึ่งไม่เหมาะกับการใช้แยกเอนไซม์ในปริมาณมาก ๆ นอกจากนี้ยังมีการใช้ Column chromatography โดยใช้สาร Bio-Gel 150, Sephadex G-200, Sephadex G-100 , Ultrogel AcA 44 มาใช้เป็นสารแยกเอนไซม์ (Takahashi และคณะ ., 1978)

10.1 การทำเอนไซม์กลูโคสไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน (Enzyne Purification)

การทำเอนไซม์กลูโคสไมเลสให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยหลายกระบวนการ ทั้งนี้เมื่อแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกไป วิธีการนั้นทำได้โดย

10.1.1 การตกตะกอนเอนไซม์กลูโคสไมเลสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

(Salting out)

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นหลักการตกตะกอนโปรตีนในขณะที่มี การละลายของโปรตีนต่ำสุด(Whitaker,1972) โดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในเอนไซม์ อย่างช้า ๆ แล้วจนอย่างต่อเนืองจนมีความเข้มข้นร้อยละ 80-100 (Saturation) (King, 1967; Saha และคณะ., 1979) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ตะกอนโปรตีนเกือบทั้งหมดและ จะได้เอนไซม์ที่มีสภาพเป็นตะกอน นอกจากนั้นอาจมีการตกตะกอนแยกลำดับส่วน (fractionation) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นต่างกันในแต่ละครั้ง แล้วแยกตะกอนเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละส่วนออกมา เช่น ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 60 และร้อยละ 90 ในการตกตะกอนลำดับส่วนของเอนไซม์กลูโคสไมเลส จากเชื้อรา *A. oryzae* (Ohga และคณะ., 1966) หรือแยกตะกอนเอนไซม์กลูโคสไมเลส จากการตกตะกอนลำดับส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 50 และร้อยละ 70 จาก crude enzyme ของเชื้อรา *Endomycopsis fibulligera* (Sukhumavasi และคณะ ., 1975)หรือใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 55-100 เพื่อตกตะกอนแยกส่วนเอนไซม์กลูโคสไมเลสจาก crude enzyme ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* (Mitsue และคณะ., 1979) หรืออาจใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40-80 ในการตกตะกอน Crude enzyme ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. (Tawachapun และคณะ ., 1982) เป็นต้น จากนั้นทั้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ แยกตะกอนเอนไซม์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงและด้วยความเร็ว 8,500-12,000 รอบต่อนาที (Saha และคณะ., 1979; Mitsue และคณะ 1979) ตะกอนที่ได้อาจนำไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze dried แล้วนำมาละลายในบัฟเฟอร์เพื่อแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยการใช้dializationเป็นขั้นต่อไป(Hayashida and Hor,1981)

การเติมสารละลายเกลือลงไปเป็นปริมาณเล็กน้อย เพื่อให้โปรตีนละลายได้ดียิ่งขึ้น เพราะเกลือจะเกาะกับโปรตีนแล้วรวมกับน้ำได้ดี กระบวนการนี้เรียกว่า (salting in) ในขณะที่เดียวกัน การเติมเกลือในปริมาณที่มาก เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน เรียกว่า (salting out) (มุกดา รัฐตะสุต ; 2527) การตกตะกอนโปรตีนส่วนใหญ่มักใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Scopes, 1978) เนื่องจากเป็นการเพิ่มการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic protein-protein interaction) นอกจากนั้นยังส่งผลให้โปรตีนสามารถละลายได้สูงขึ้น (ประมาณ 4 โมลสารละลายจะอิมิตัวร้อยละ 100) อีกทั้งการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ความร้อนมีผลเล็กน้อยต่อการละลายและสารละลายอิมิตัว มีความหนืดต่ำ และมีความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงออกมาได้ง่าย

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ช่วงร้อยละความอิมิตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ แสดงดังตารางที่ .6 และเอนไซม์กลูโคสไมเลสตกตะกอนที่เปอร์เซ็นต์ความอิมิตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ แสดง ดังตารางที่ .7

ตารางที่ .6 การทดลองตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิมิตัวในช่วงต่าง ๆ

การทดลองครั้งที่	ช่วงความอิมิตัวของ แอมโมเนียมซัลเฟต(%)	ปริมาณเอนไซม์ที่ ตกตะกอน(%)	โปรตีนที่ตกตะกอน(%)
1	0-40	4	25
	40-60	62	22
	60-80	32	32
	80	2*	21*
2	0-45	6	32
	45-70	90	38
	70	4*	30*
3	0-48	10	35
	48-65	75	25
	65	15*	40*

ที่มา: Scopes (1978)

หมายเหตุ * เป็นปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนนั้น ๆ

มีรายงานของ Freedberg et.al. (1975) ศึกษาการแยกเอนไซม์กลูโคสไมเลสจากเชื้อรา

Aspergillus niger ให้บริสุทธิ์ โดยขั้นตอนทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมิตัวที่ร้อยละ 40 ถึงร้อยละ 60 จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังนี้ เซฟาเดก จี 100 (Sephadex G-100) และไบโอเจลพี 150 (Biogel P-150) เก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ร้อยละ 90 นอกจากนี้ Li. et.al. (1998) ทำการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* โดยหลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมิตัวร้อยละ 90 นำส่วนที่แยกนี้ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออน ดังนี้ ดีอีเออี - โดโยเพิล และบิวทิว - โดโยเพิล ไฮโดรโฟบิก (Butyl- Toyopearl hydrophobic) ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ 11.9 และ 17.7 เท่า ตามลำดับ แล้วสุดท้ายนำไปผ่านคอลัมน์เซฟลาคริลเอส - 300 และ เพลฟี่แอลซีโมโนคิว (PLC MonoQ) มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ เป็น 22 และ 26 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ Morita และ Fujio (1997) ได้ศึกษาการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Rhizopus sp.* สายพันธุ์ A-11 ให้บริสุทธิ์ โดยเมื่อนำมาทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมิตัวร้อยละ 80 ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ 3.61 เท่า

ตารางที่ 7 ช่วงร้อยละความอิมิตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

แหล่งเอนไซม์	ความอิมิตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i>	40-80	Freedberg et.al (1975)
<i>Aspergillus niger</i>	70-100	Fogarty และ Benson (1983)
<i>Rhizopus sp. A-11</i>	80	Morita และ Fujio (1997)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	90	Li et.al. (1998)

10.1.2 การทำ Dialization

การทำ Dialization เป็นขั้นตอนหนึ่งในการแยกอิมิตัวของเกลือและสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 4,000 ออกจาก crude enzyme โดยใช้ dialyzing tube ที่เป็น cellophane (Takahashi และคณะ ., 1978) หรือใช้ collagen tube (Medda และคณะ ., 1982 ; Razzaque และ Ueda, 1978) ซึ่งรูเล็ก ๆ ที่ผนังของ tube จะยอมให้โมเลกุลเล็กผ่านเข้าออกได้ แต่ไม่ยอมให้เอนไซม์ ซึ่งมีโมเลกุลใหญ่กว่าอิมิตัวของเกลือ ผ่านออกมาได้ การแยกอิมิตัวของเกลือออกจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือ crude enzyme อาจใช้เวลาในการแยกอิมิตัวประมาณ 12 ชั่วโมง (Yamasaki และ Suzuki, 1978) 24 ชั่วโมง (Saha และคณะ ., 1979 ; Razzaque และ Ueda, 1978) หรือ 48 ชั่วโมง (Medda และคณะ ., 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากสถาบันวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

โดยการแช่ dialyzing tube ในสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น อะซีเตทบัฟเฟอร์ (Miah และ Ueda, 1977) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Takahashi และคณะ., 1981) เป็นต้น ในระหว่างแช่นั้นจะต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้อย่างน้อย ๆ เพื่อให้ไอออนของเกลือซึมออกมาได้เร็วขึ้น ส่วนชนิดของบัฟเฟอร์ ที่ใช้ควรจะมียผลต่อการทำลายเอนไซม์น้อยที่สุด อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองควรจะมีความต่ำและเป็นอุณหภูมิที่ให้เอนไซม์มีความคงทนมากที่สุด

10.1.3 การกำจัดสี

crude enzyme ที่สกัดได้มักมีสีของอาหารและ สีของสปอร์ เชื้อราปะปนอยู่ด้วย ดังนั้นจึงมีการกำจัดสีโดยใช้ Rivanol treatment เช่น นำเอาสารละลายเอนไซม์มา 240 มิลลิลิตร แล้วเติม rivanol ร้อยละ 1 (2-ethoxy-6, 9-diamino-acridinum lactate) ลงไป 15 มิลลิลิตร จะทำให้สีตกตะกอน แยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่มีความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยก rivanol ที่เหลือในเอนไซม์ผลออกมา โดยการเติม Kaolin 2 กรัม เขย่าให้กระจายในสารละลายเอนไซม์พร้อมทั้งคนช้าๆ ประมาณ 10 นาที แล้วจึงกรอง rivanol ออก กระทำเช่นนี้หลายๆ ครั้งจนกระทั่ง crude enzyme ไม่มีสี (Razzaque และ Ueda, 1978) หรือการแยก rivanol อาจจะใช้ acid clay ได้เช่นเดียวกัน (Yoshino และ Hayashi, 1978)

11. อิทธิพลของอุณหภูมิและ พีเอช ต่อความคงตัวของเอนไซม์

11.1 อิทธิพลของ พีเอช ต่อความคงตัวของเอนไซม์

เอนไซม์กลูโคสอะไมเลสทั่วไปมักมีความคงตัวต่อ พีเอช ในช่วงความเป็นกรด คืออยู่ในช่วง พีเอช 4.0-7.0 เช่น glu I ของ black *Aspergillus* มีความคงตัวที่ พีเอช 4.0-5.0 ที่ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ (Medda และคณะ., 1982) ในขณะที่เอนไซม์กลูโคสอะไมเลสจาก *A. oryzae* มีความคงตัวในช่วง 5.5-7.0 (Lineback และคณะ., 1969) เอนไซม์กลูโคสอะไมเลสจาก *A. oryzae* มีความคงตัวในช่วง พีเอช 5.0-6.0 (Mitsue และคณะ., 1979) หรือมีความคงตัวในช่วง พีเอช 5.6-6.2 (Ohga และคณะ., 1966) ส่วนเอนไซม์จาก *A. awamori* มีความคงตัวที่ 5.5 (Hayashida และคณะ., 1976) ในขณะที่เอนไซม์กลูโคสอะไมเลส (I,II) จากเชื้อรา *A. awamori* เช่นกัน สามารถทน พีเอช ในช่วงกว้างมากระหว่าง พีเอช 2.0-10.0 และ 4.0-7.0 ตามลำดับ และพบว่าเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสจาก *A. niger* มีความคงตัวในช่วง พีเอช 3.5-6.0 (Lineback และคณะ., 1969)

11.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

อุณหภูมิสูงขึ้นมักจะมีผลต่อการทำลายเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั่วไป มักทนอุณหภูมิได้สูงไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส (Medda และคณะ., 1982; Miah และคณะ., 1977) ในเวลา 30 นาที ที่ พีเอช ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด แต่พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จาก *A. awamori* var *kawachi* (Yoshino และ Hayashida, 1978) และจาก *A. oryzae* (Ohga และคณะ., 1966) บางชนิดที่สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส โดยเกือบจะไม่มี การสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์เลยในเวลา 30 นาที

12 รูปแบบการเตรียมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในทางการค้า

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีในรูปของเหลวและผง ในการทำเอนไซม์เหลวเข้มข้นอาจใช้วิธีทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศ และเติมโซเดียมคลอไรด์ หรือกรดเบนโซอิกเป็นสารกันบูด (Aunstrup, 1972) นอกจากนี้ อาจจะใช้วิธีระเหยเข้มข้นแบบหมุน (rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรือ อุดราฟิลเตรชัน ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ (membrane) ขนาดโมเลกุล 25,000 และขนาด 60,000 (Andrzejczuk, 1977)

สำหรับเอนไซม์ผงทำการตกตะกอนด้วยร้อยละ 95 แอลกอฮอล์หรือร้อยละ 90 แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว แล้วนำมาทำให้แห้งเก็บในภาชนะกันความชื้น (moisture-proof package) (Andrzejczuk, 1977)

13 กากน้ำตาล (molasses)

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย สามารถจัดจำแนกเป็น 3 ชนิดดังนี้ (Paturau, 1982; Meade, 1985)

1. Blackstrap molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 หรือมีปริมาณของแข็งเมื่อเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:1 อยู่ประมาณ 42 องศาบริกซ์

2. Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48

3. Hightest molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการนำน้ำอ้อยมาย่อยด้วยกรดแล้วระเหยให้เข้มข้นเป็นน้ำเชื่อม อาจเรียกว่า invert molasses มีปริมาณน้ำตาลประมาณร้อยละ 77 นอกจากนี้ยังมีการจำแนกกากน้ำตาลโดยอาศัยปริมาณน้ำและน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์จะให้ blackstrap molasses ซึ่งมีน้ำตาลซูโครเป็นส่วนประกอบหลัก และ hightest molasses ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลรีดิวิซ์

13.1. Blackstrap molasses

Blackstrap molasses เป็นผลพลอยได้จากการกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นของเหลวข้น มีความหนืด และมีสีน้ำตาลเข้ม ได้จากการตกผลึกน้ำตาลครั้งสุดท้ายแล้วนำไปปั่นแยกเอาผลึกซูโครสออกของเหลวที่เหลือคือกากน้ำตาล องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลนี้แสดงดังตารางที่ 8

องค์ประกอบอย่างหนึ่งในกากน้ำตาลที่สำคัญ คือ วิตามิน ซึ่งเป็นวิตามินที่ทนความร้อนในสภาวะต่าง และมีอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก เช่น ไบโอดีน (biotin) ไนอะซิน (niacin) กรดแพนโทธีนิก (pantothenic acid) และ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) วิตามินเหล่านี้มีความสำคัญในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลในอาหารสัตว์ รวมถึงการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการหมัก วิตามินหลายชนิดช่วยส่งเสริมการเติบโตและสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์วิตามินที่พบในกากน้ำตาลแสดงดังตารางที่ 9

13.2. Hightest molasses

Hightest molasses เป็นกากน้ำตาลที่ได้จากการนำน้ำอ้อยมาย่อยด้วยกรดแล้วระเหยให้เข้มข้นเป็นน้ำเชื่อม จึงไม่เรียกว่ากากน้ำตาล ความเข้มข้นที่ได้หลังจากที่ทำการระเหยแล้วมีค่าประมาณ 85 องศาบริกซ์ การใช้ hightest molasses ค่อนข้างกว้างขวางเนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลสูงและมีสารปนเปื้อนต่ำ สามารถใช้ทดแทน blackstrap molasses ได้เป็นอย่างดี ตารางที่ 8 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลอ้อย

กากน้ำตาล		องค์ประกอบ
Usual range (%)	Usual range (%)	
17-25	20	น้ำ
30-40	35	น้ำตาลซูโครส
4-9	7	น้ำตาลกลูโคส
5-12	9	น้ำตาลรีดิทริออลอื่นๆ
1-5	3	คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ
7-15	12	เถ้า
2-6	4.5	Nitrogenous compounds
2-8	5	Non nitrogenous acid
0.1-1	0.4	Wax, Sterols, and Phospholipids
		(1-triacontanol, phytosterol, Stigmasterol)
	Varying amounts	วิตามิน

ที่มา :Paturau (1982)

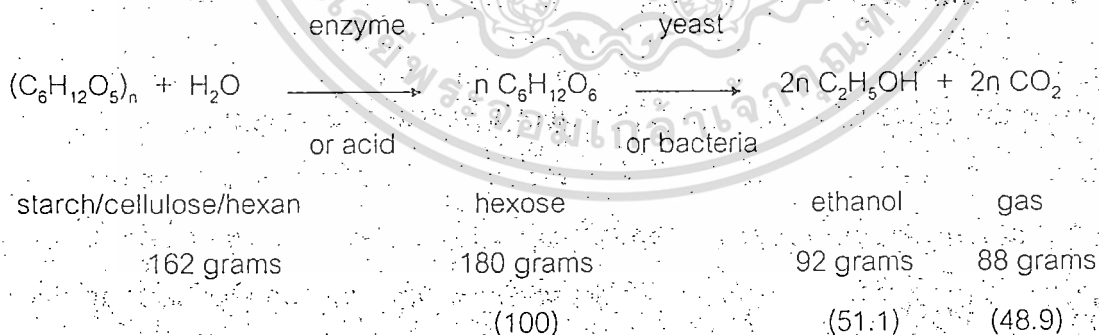
ตารางที่ 9 วิตามินที่พบในกากน้ำตาลข่อย

วิตามิน	ความเข้มข้น(ไมโครกรัม/กรัม)
ไบโอติน (H)	1-3
โคลีน (choline: B ₄)	880
กรดโฟลิก (folic acid: B complex)	0.3-0.4
ไนอะซิน (B complex)	17-30
กรดแพนโทธีนิก (B complex)	20-60
ไรโบฟลาวิน (B ₂)	2-3
ไพริดอกซีน (pyridoxine: B ₆)	1-7
ไทอะมีน (thiamine: B ₁)	0.6-1.0

ที่มา: Paturau (1982)

14 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ(anaerobic condition) จุลินทรีย์ที่ใช้กระบวนการหมักแอลกอฮอล์คือยีสต์ โดยทำการหมักแอลกอฮอล์ผ่านวิถี Glycolysis หรือวิถี Embden-Meyerhof-Parnas ยีสต์จะได้พลังงานจากวิถีดังกล่าวเล็กน้อย ผลได้ของแอลกอฮอล์จากกลูโคสตามทฤษฎีเท่ากับร้อยละ 51.1 และเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 48.9 ดังสมการ



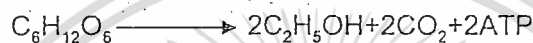
การหมักทางอุตสาหกรรม ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ดังสมการ นั่นคือน้ำตาลกลูโคส 1 กิโลกรัม เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ได้

$$\begin{array}{l}
 = 92 / 180 \quad \text{กิโลกรัม} \\
 = 0.511 \quad \text{กิโลกรัม} \\
 = 0.511 / 0.7905 \quad \text{ลิตร} \\
 = 0.647 \quad \text{ลิตร}
 \end{array}$$

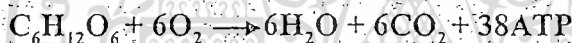
แต่ในทางปฏิบัติกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ น้ำตาลร้อยละ 95 เท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้สำหรับการบำรุงรักษาเซลล์ และสร้างผลพลอยได้ (by product) อื่น ๆ คือ แอลกอฮอล์ร้อยละ 48.4 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 46.5 อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ร้อยละ 0-0.3 กรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ 0.05-0.25 กลีเซอไรด์ (glyceride) ร้อยละ 2.5-3.6 กรดแลคติก (lactic acid) ร้อยละ 0-0.2 กรดซัคซินิก (succinic acid) ร้อยละ 0.5-0.77 fusel oil ร้อยละ 0.25-0.5 และเฟอฟูรัล (furfural) เล็กน้อย

14.1. กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์เกิดขึ้นในสภาวะไม่มีอากาศผ่านวิถี Glycolysis ได้ผลผลิตแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP ปริมาณน้อยกว่า การสร้างพลังงานในสภาวะที่มีอากาศ ดังสมการ



ในสภาวะที่มีอากาศยีสต์จะใช้กลูโคสในกระบวนการหายใจ (respiration) เพื่อการเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ ได้ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP



Saccharomyces cerevisia, *Saccharomyces uvarum*, *Kluveromyces fragilis*

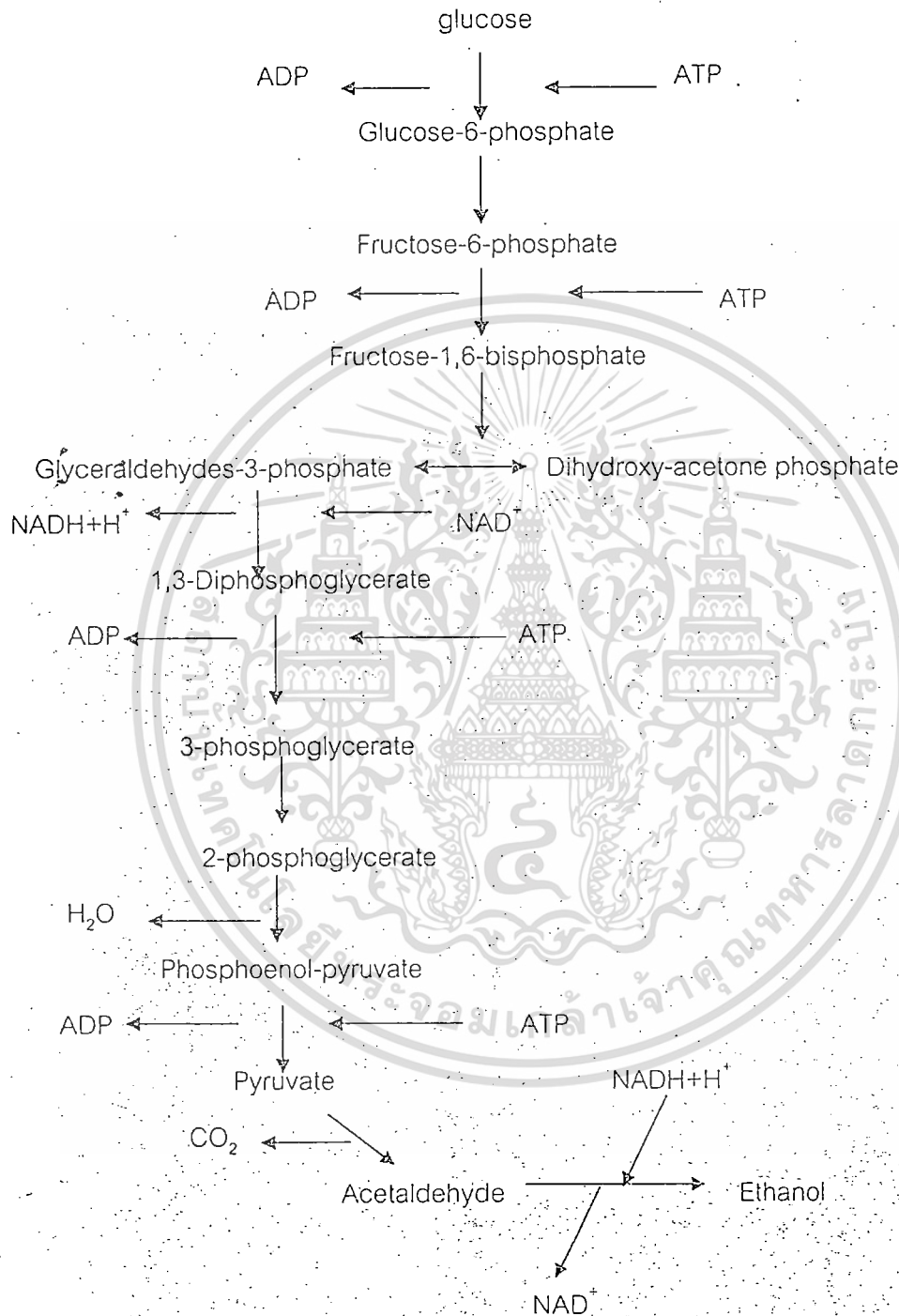
สามารถใช้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) ทั้งในรูปเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อน เช่น กลูโคส (glucose) ฟรุกโทส (fructose) แมนโนส (mannose) ซูโครส (sucrose) และราฟิโนส (raffinose) เป็นต้น

นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดยังสามารถใช้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) ได้ เช่น *Candida utilis* สามารถใช้ไซโลส (xylose) ตามปกติ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถใช้แป้งและเซลลูโลส (cellulose) วัสดุทั้ง 2 อย่างจึงต้องผ่านการย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนนำมาใช้ในการหมัก (Krishnan และคณะ, 2000; McMillan, 1997)

Verma และคณะ (2000) ศึกษาการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งผ่านขั้นตอนเดียว โดยเปรียบเทียบกระบวนการที่ใช้เชื้อผสมสองชนิดกับ กระบวนการที่ใช้เชื้อชนิดเดียว พบว่าการเพาะเลี้ยง *Saccharomyces diastaticus* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* 21 ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้มีความเข้มข้น 24.8 กรัม/ลิตร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 48 เทียบกับเมื่อใช้ *S. diastaticus* เพียงสายพันธุ์เดียว (16.8 กรัม/ลิตร) อย่างไรก็ตาม

ประสิทธิภาพที่ได้ยังต่ำกว่ากระบวนการที่ผ่านสองขั้นตอน

Biol และคณะ (1998) ทำการปรับปรุงยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ให้สามารถเติบโตและหมักแอลกอฮอล์จากแป้ง โดยทำการตัดต่อยีนส์แอลฟาอะมิเลสจาก *Bacillus subtilis* และกลูโคอะมิเลส จาก *Aspergillus awamori* ใส่เข้าไปในยีสต์



รูปที่ 1.6 การหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์ผ่านวิถี ไกลโคไลซิส

ที่มา : Scragg (1999)

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. Hemacytometer ของบริษัท Boeco, Germany รุ่น Neubauer bright
2. เครื่องเขย่า ของบริษัท FIRSTEK SCIENTIFIC รุ่น S103
3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ของบริษัท
LAB LINEINSTRUMENTS รุ่น 3527-1
4. เครื่องวัดพีเอชของบริษัท BACKMAN รุ่น 50 pHMETER
5. กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Nikon รุ่น 145377
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge)ของบริษัท Hettich รุ่น Universal 2 S
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) ของบริษัท
Hermle-labortechnik รุ่น Z383 K
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert รุ่น WB 14
9. หม้ออบฆ่าเชื้อโรคด้วยไอน้ำ(autoclave)ของบริษัท Rexall Industries
รุ่น LS-2D
10. เครื่องผสม(mixer)ของบริษัท Scientific Industry รุ่น Vortex- Genie 2
11. เครื่องหมักขนาด 5 ลิตร ของบริษัท New Brunswick Scientific
รุ่น BIOFLO III
12. เครื่องอัดลม (air compressor) ขนาด 0.5 แรงม้า ของบริษัท SWAN
Industry รุ่น DR-213
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-160 A
14. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท Shimadzu รุ่น LIBROR
4000 H
15. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น
A 200 S
16. ตู้เยเยื่อ ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123
17. ตู้ดูดควัน ของบริษัท ASTEC รุ่น Astecair 5000 E
18. Hot plate Stirrer ของบริษัท BARNSTAD/THERMOLYNE รุ่น
SP46920-26

สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Scharlur
2. เปปโตน (peptone) ของบริษัท Carlo erba Reagenti
3. กลูโคส ของบริษัท Fluka
4. ฝรั่ง (agar) ของบริษัท Scharlau
5. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Fluka
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck
7. โปแตสเซียมโซเดียมทาทเรต ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
9. เกลิอแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Sigma
10. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
11. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
12. ไดโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
13. แมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
14. คอปเปอร์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Scharlau
15. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
16. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
17. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
18. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
19. ยูเรีย (NH_3CONH_2) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
21. สารละลายฟีนอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) ของบริษัท Sigma
22. น้ำกลั่น
23. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
24. โปแตสเซียมไอโอไดร์ (KI) ของบริษัท Sigma
25. กรดไฮโดรคลอริก (HCL) ของบริษัท J.T. Baker
26. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ของบริษัท J.T. Baker
27. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti

28. โทลูอิน ของบริษัท J.T. Baker
29. กรดไดโนโตรซาลิไซลิก ของบริษัท Sigma
30. สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ของ Fluka
31. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ขององค์การสุรากรมสรรพสามิตจังหวัด ฉะเชิงเทรา
32. ซีเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Aspergillus awamori* ATCC 22342

A. awamori ATCC 46890 และ *A. niger* NRRL 377 จุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ ซึ่งเมื่อทำการศึกษาความสามารถสูงสุดของเชื้อในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่า เชื้อ *A. awamori* ATCC 22342 มีความสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด ดังนั้นจึงใช้เชื้อนี้ในการทดลองต่อไป โดยเก็บรักษาเชื้อไว้ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆเดือน

4. วัตถุดิบ

- 4.1 แป้งมันสำปะหลัง ตราปลามังกร ของโรงงานแป้งมัน ไทยท่า ชลบุรี
- 4.2 มันเส้นที่ผ่านการบดแล้วจากบริษัท อุตสาหกรรมอาหาร จำกัด

5. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

- 5.1 อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342
- 5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 สำหรับผลิตเอนไซม์

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

6.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยให้สารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จำนวน 10^6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวที่ทำการแปรผันชนิดของ

แหล่งคาร์บอน ได้แก่ เด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังและเด็กทรินที่ได้จากมันเส้นความเข้มข้นร้อยละ 3 เปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นชุดควบคุมซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 3 เช่นเดียวกัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 เปปโตนร้อยละ 1 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.01 เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธี Ueda และคณะ(1981) วัดทุก 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 1.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิด ได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เด็กทรินจากแป้งมันเส้นสำปะหลัง	คคค		
เด็กทรินจากมันเส้น	คคค		
แป้งมันสำปะหลัง			

6.2 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) เพื่อการผลิตเด็กทริน การหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) เพื่อการผลิตเด็กทริน โดยมี 2 ปัจจัยร่วม ได้แก่ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นซึ่งแปรผันตั้งแต่ร้อยละ 1 ร้อยละ 2 ร้อยละ 3 ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 นำหนักโดยปริมาตรและความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) ชนิด 60 L ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์ตั้งแต่ ร้อยละ 0.1 ร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3 ปริมาตรโดยปริมาตร โดยกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มคือ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการผลิตเด็กทริน 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ค่าเด็กโทรสอิดควิวาเลนซ์ (D.E.)

การทดลองแบบแฟกตอเรียลทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและความเข้มข้นของเอนไซม์ในการผลิตเด็กทรีน ซึ่งแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับดังนี้

ตารางที่ 2 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและความเข้มข้นของเอนไซม์ในการผลิตเด็กทรีน

ความเข้มข้นเอนไซม์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)	ค่าเด็กโทรสอิคิวาเลนซ์ (D.E.)				
	ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง(ปริมาตรโดยปริมาตร)				
	1%	2%	3%	4%	5%
การทดลองที่ 1	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
การทดลองที่ 2	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%
การทดลองที่ 3	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%

6.3 การศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเด็กทรีน

การหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเด็กทรีน โดยมี 2 ปัจจัยร่วม ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน และเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน จากการศึกษาในข้อ 6.2 จะได้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและความเข้มข้นของเอนไซม์Ternanyl ที่เหมาะสม จะทำการทดลองต่อโดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน ตั้งแต่ 10 , 20 , 30, และ 40 นาที โดยอุณหภูมิที่ใช้มี 3 ระดับคือ 30, 37, 40 องศาเซลเซียส แล้วทำการวิเคราะห์ค่าเด็กโทรสอิคิวาเลนซ์ (D.E.):

การทดลองแบบแฟกตอเรียล

ทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน และอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน และอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเด็กโทรสอิคิววาเลนซ์ (D.E.)			
	เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน (นาที)			
	10 นาที	20 นาที	30 นาที	40 นาที
การทดลองที่ 1	30	30	30	30
การทดลองที่ 2	37	37	37	37
การทดลองที่ 3	40	40	40	40

3.6.4 วิธีการเตรียมเชื้อราเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยถ่ายเชื้อรา จากเชื้อราบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ใน PDA Slant ลงใน PDA agar 3-4 ครั้ง เพื่อให้เชื้อราแข็งแรงพร้อมที่จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เตรียมเชื้อราเริ่มต้น เตรียมเชื้อราจาก PDA Slant บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส นำมาใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 5 มิลลิลิตร ที่ผสม Tween 80 0.1 มิลลิลิตร แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อราเขี่ยให้สปอร์กระจายในน้ำกลั่นนำมานับปริมาณ สปอร์ด้วย Hemacytometer ให้ได้ปริมาณสปอร์ 1.0×10^6 ถ่ายเชื้อราลงในอาหารสำหรับผลิตกลูโคอะไมเลส ตามแผนการทดลองตารางที่ 3.4 โดยปริมาตรของอาหารในแต่ละฟลasks ก็คือ 100 มิลลิลิตร

3.6.5 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เตรียมเชื้อราจาก PDA Slant ถ่ายลงใน PDA agar 3-4 ครั้ง เพื่อให้เชื้อราแข็งแรง ถ่ายเชื้อราลง PDA slant บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส นำมาใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 5 มิลลิลิตร ที่ผสม Tween 80 0.1 มิลลิลิตร ให้เข็มเขี่ยเชื้อราให้สปอร์กระจายลงในน้ำกลั่น ตรวจนับ สปอร์ด้วย Hemacytometer แล้วเจือจางให้ได้ปริมาณสปอร์ตามตารางที่ 4

การทดลองแฟกตอเรียลทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ ปริมาณสปอร์เริ่มต้นและปริมาณมิลลิลิตรเริ่มต้นที่ใส่ลงไป ซึ่งแต่ละปัจจัยมี 5 ระดับดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ปริมาณสปอร์เริ่มต้นและ ปริมาณมิลลิลิตรเริ่มต้นที่ใส่ลงไป

มิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป (มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)				
	1×10^6	2×10^6	3×10^6	4×10^6	5×10^6
การทดลองที่ 1	1	1	1	1	1
การทดลองที่ 2	2	2	2	2	2
การทดลองที่ 3	3	3	3	3	3
การทดลองที่ 4	4	4	4	4	4
การทดลองที่ 5	5	5	5	5	5

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ของ Glucoamylase โดยวิธี Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

6.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองข้อ 6.5 ผลมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ประกอบด้วย เด็กทรินที่ได้จากการทดลองข้อ 6.2 และ 6.3 เติมเปปโตนร้อยละ 1, ไคโตเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.02, แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และเฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 0.005 พีเอช 4.5 นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วจึงทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อราข้างต้นแล้วแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ตั้งแต่ 20 , 25 , 30 , 35 ,37 และ 40 องศาเซลเซียสวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ (1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่ 1, 4, และ 5 ของการทดลองจำนวน 5 วัน และ ทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองจำนวน 5 วัน

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.02 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และเฟอร์รัสซัลเฟตร้อยละ 0.005 พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 5 วัน นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ส่วนแหล่งไนโตรเจน แปรผัน 5 ชนิดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรียและเปปโติน ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0.05 ร้อยละ 0.1 ร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3

การทดลองแบบแฟกตอเรียลทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 5 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ชนิดของแหล่งไนโตรเจน				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ CL	NH ₄ NO ₃	ยูเรีย	เปปโติน
การทดลองที่ 1	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
การทดลองที่ 2	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
การทดลองที่ 3	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%
การทดลองที่ 4	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%

วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่ 1, 4 และ 5 ของการทดลองจำนวน 5 วัน และ ทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองจำนวน 5 วัน

6.10 การศึกษาผลของชนิดของเกลือแร่และความเข้มข้นของเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคสไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เดิมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองข้อ 6.5 ผลมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ประกอบด้วย เด็กทรินที่ได้จากการทดลองข้อ 6.2 และ 6.3 เติมแอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 0.05, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.02 พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาบ่ม 5 วัน ส่วนแหล่งเกลือแร่แปรผัน 3 ชนิดดังนี้ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟตรวมกับแคลเซียมคลอไรด์ ส่วนความเข้มข้นที่ใช้มี 3 ค่า คือ ร้อยละ 0.005 ร้อย

ละ 0.007 และร้อยละ 0.01 น้ำหนักโดยปริมาตร

การทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่

ตารางที่ 1.6 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่

ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลส(ยูนิิตต่อมิลลิลิตร)		
	ชนิดของแหล่งเกลือแร่		
	MgSO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄ +CaCl ₂
การทดลองที่ 1	0.005%	0.005%	0.005%
การทดลองที่ 2	0.007%	0.007%	0.007%
การทดลองที่ 3	0.01%	0.01%	0.01%

วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่ 1, 4 และ 5 ของการทดลองจำนวน 5 วัน และ ทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองจำนวน 5 วัน

6.11 การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวนในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคสไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

นำเชื้อราเริ่มต้นของ *Apergillus awamori* ATCC 22342 อายุ 24 ชั่วโมง มาปรับสภาวะตามที่ได้จากการทดลองข้อ 6.2, 6.10 ทำการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบ 2 ปัจจัย คือ อัตราการให้อากาศ และ ความเร็วรอบของการกวน

ตารางที่ 7 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ อัตราการให้อากาศ และ ความเร็วรอบของการกวน

อัตราการให้อากาศ (vvm)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	ความเร็วรอบของการกวน (รอบต่อนาที)			
	100	200	300	400
การทดลองที่ 1	0.1	0.1	0.1	0.1
การทดลองที่ 2	0.15	0.15	0.15	0.15
การทดลองที่ 3	0.2	0.2	0.2	0.2

เก็บตัวอย่างครั้งละ 20 มิลลิลิตร จุดแรกที่ 8 ชั่วโมง และทุกๆ 8 ชั่วโมง ต่อมาจนถึงชั่วโมงที่ 120 นำตัวอย่างไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์กิจกรรมของกลูโคอะไมเลสตามวิธีของ Ueda และคณะ (1981)

7 การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New Multiple-Range Test จากการทดลอง 3 ซ้ำ

8 การศึกษาการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน

8.1 การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342

ปีปโตอาหารเลี้ยงเชื้อราจากถังหมักที่มีสภาพที่เหมาะสม(จากข้อ 3.5) จากนั้นนำ อาหารเลี้ยงเชื้อรามาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

8.2 การศึกษาการแยกและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

8.2.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำ (salt fractionation) เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอน ขณะเติมจะมีการกวนอย่างช้า ๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช เท่ากับ 4.0 โดยใช้ซีเตรทบัฟเฟอร์ปริมาณเล็กน้อย ในการละลายโปรตีน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

8.2.2 การกำจัดเกลือโดยการทำไดอะไลซิส (dialysis)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต มาทำการแยกเกลือ ออกโดยการไดอะไลซิส โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่ทำให้น้ำหนักโมเลกุล น้อยกว่า 12,000 ดาลตันผ่านได้ ในซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช เท่ากับ 4.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซิสมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดตะกอนอื่น ๆ ออกไป เก็บสารละลายเอนไซม์ส่วนใสมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้หลังการกำจัดเกลือแล้ว

9 การศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมเพื่อเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์

Saccharomyces cerevisiae Sc-90

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6 มา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร ย่อยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เป็นร้อยละ 17 ปริมาตร 5 ลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป 50 กรัม แล้วเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ลงไปปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลาสามวัน ตรวจสอบร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก พีเอช อุณหภูมิ และองศาบริกซ์ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลาสามวัน

เปรียบเทียบกับกากน้ำตาลโดยนำกากน้ำตาลมาวิเคราะห์ความหวานตามวิธีของ Somogyi (1945) ได้ค่าร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์เจือจางให้ได้ค่าร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ของกากน้ำตาลเริ่มต้นเป็นร้อยละ 17 ปริมาตร 5 ลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป 50 กรัม แล้วเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ลงไปปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลาสามวัน ตรวจสอบร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก ที่เอช อุณหภูมิ องศาบริกซ์ และ ร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน และ เปรียบเทียบร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก ที่เอช อุณหภูมิ องศาบริกซ์ และร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากน้ำเชื่อมที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและกากน้ำตาล



ผลการทดลองและวิจารณ์

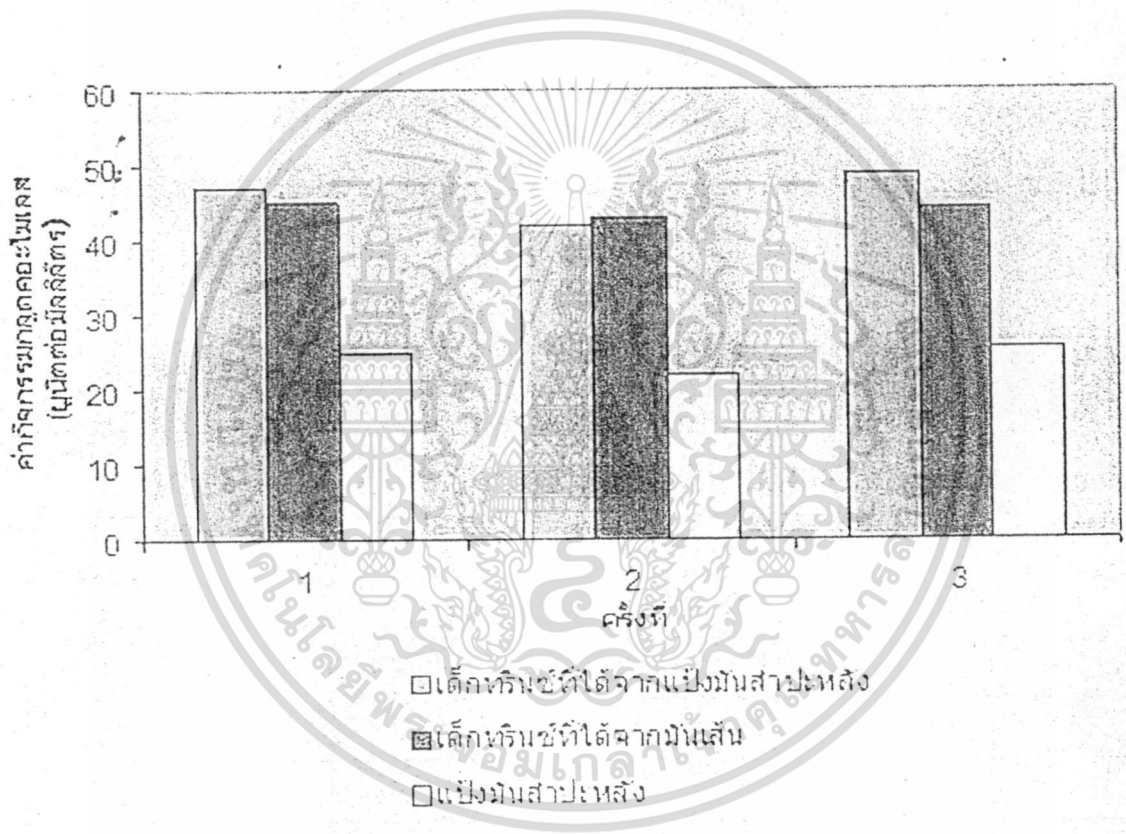
1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

1.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ เด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังและเด็กทรินที่ได้จากมันเส้นเปรียบเทียบกับ แป้งมันสำปะหลัง ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังและ เด็กทรินที่ได้จากมันเส้น เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลองและค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง แล้วจะมีค่าคงที่ในวันที่ 5 ของการทดลอง ส่วนแป้งมันสำปะหลังเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง และค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง และคงที่ในวันที่ 5 ของการทดลอง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเมื่อใช้เด็กทรินจากแป้งมันเส้นสำปะหลัง และเด็กทรินจากมันเส้นความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 เปรียบเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดคือ 45.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิด ได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
เด็กทรินจากแป้งมันเส้นสำปะหลัง	46.98	42.10	48.76	49.95
เด็กทรินจากมันเส้น	45.07	42.95	44.38	44.13
แป้งมันสำปะหลัง(ชุดควบคุม*)	25.01	22.02	25.44	24.16



รูปที่ 1.1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิด ได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง

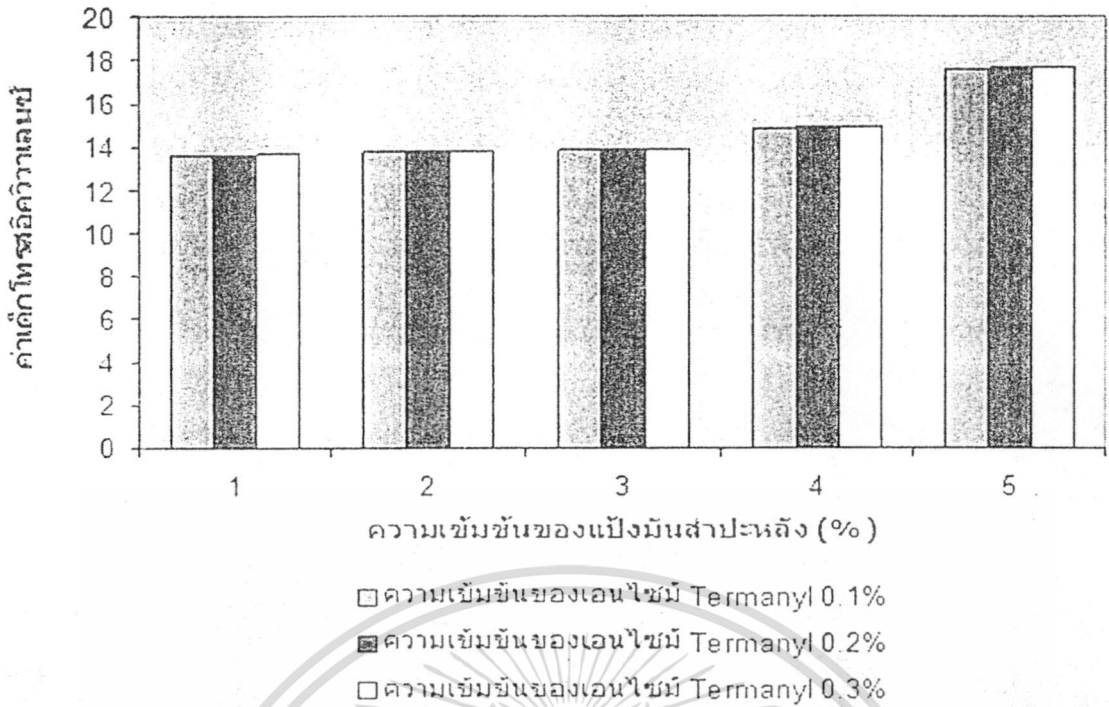
1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) เพื่อการผลิตเด็กทรีน

ผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมของ การผลิตเด็กทรีนของแป้งมันสำปะหลัง โดยมีปัจจัยร่วม 2 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของแป้งมัน ซึ่งแปรผันตั้งแต่ร้อยละ 1 ถึง ร้อยละ 5 น้ำหนักโดยปริมาตร และความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α - amylase) ชนิด 60 L ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของเอนไซม์ตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม คือ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการผลิตเด็กทรีน คือ 30 นาที จากผลการทดลองพบว่า การผลิตเด็กทรีนจากแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของน้ำแป้งที่ร้อยละ 5 น้ำหนักโดยปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α - amylase) ชนิด 60 L คือร้อยละ 0.1 ปริมาตรโดยปริมาตร โดยจากการวัดค่า D.E. พบว่าความเข้มข้นของน้ำแป้งที่ร้อยละ 1 ค่า D.E. ที่ได้มีค่าต่ำ คือ 13.65 ค่า D.E. ที่ร้อยละ 2 มีค่าสูงขึ้นมาเล็กน้อย คือ 13.78 ค่า D.E. ที่ร้อยละ 3 และร้อยละ 4 มีค่าใกล้เคียงกันคือ 13.85 และ 14.90 ต่ำมาลำดับ ส่วนค่า D.E. ที่ร้อยละ 5 มีค่าสูงที่สุด คือ 17.63 ความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α - amylase) ที่ใช้ ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3 ให้ค่าไม่แตกต่างกัน คือ ค่า D.E. ที่ได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า D.E. ที่ได้จากการยอยน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 5 และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเด็กทรีน ตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3

ความเข้มข้นเอนไซม์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)	ค่าเด็กโทรสอิคิวาเลนซ์ (D.E.)				
	ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง(น้ำหนักโดยปริมาตร)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0.10%	13.61	13.75	13.84	14.86	17.60
0.20%	13.62	13.77	13.85	14.91	17.63
0.30%	13.65	13.78	13.85	14.90	17.63

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากขึ้นจากร้อยละ 0.1 เป็นร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3 ค่าเด็กโทรสอิคิวาเลนซ์ (D.E.) จะไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้น ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม คือร้อยละ 0.1 ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงค่า D.E. ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 5 และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินซ์ ตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3

ส่วนปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้งนั้น เมื่อเพิ่มปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้งแล้ว จะทำให้ค่าเด็กโทรสาคิวาเลนซ์สูงขึ้นตาม เพราะว่ามีปริมาณสารตั้งต้นสูงขึ้น ดังกราฟที่ 4.2. ซึ่งค่า D.E. ที่ได้ที่ความเข้มข้นของแป้งร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 4 ได้ค่าใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกัน ส่วนที่ร้อยละ 5 ให้ค่าสูงสุด ดังนั้นจึงใช้ค่าความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมคือร้อยละ 5 และความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) คือร้อยละ 0.1 ในการผลิตเด็กทรินซ์เพื่อทำการทดลองต่อไป

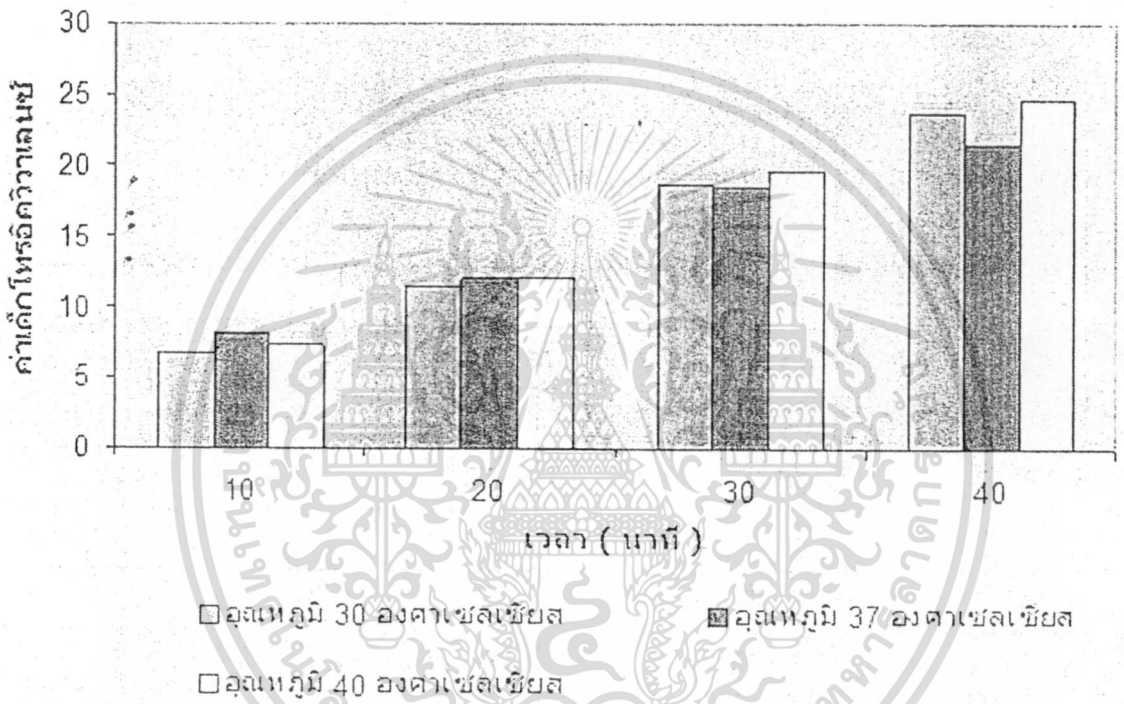
4.1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทรินซ์

ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทรินซ์ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง มี 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 10, 20, 30 และ 40 นาที ส่วนอุณหภูมิมี 3 ระดับ คือ ที่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเด็กทรินซ์ คือ 30 นาที อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 40 องศาเซลเซียส สำหรับเวลาที่ใช้ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อให้ได้ค่า D.E. ตามต้องการ พบว่าค่า D.E. จะสูงขึ้นตามเวลาที่ใช้ย่อย ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ค่า D.E. ที่เหมาะสม คือ 19.61 ส่วนค่า D.E. ที่ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ 18.53 ที่ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 18.60 ซึ่งค่า D.E. ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ค่า D.E. ที่ได้จากการแปรผันเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเด็กโทรสอิกิวาเลนซ์ (D.E.)			
	เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน (นาที)			
	10 นาที	20 นาที	30 นาที	40 นาที
30	6.65	11.44	18.60	23.61
37	8.12	12.03	18.53	21.56
40	7.26	12.11	19.61	24.63



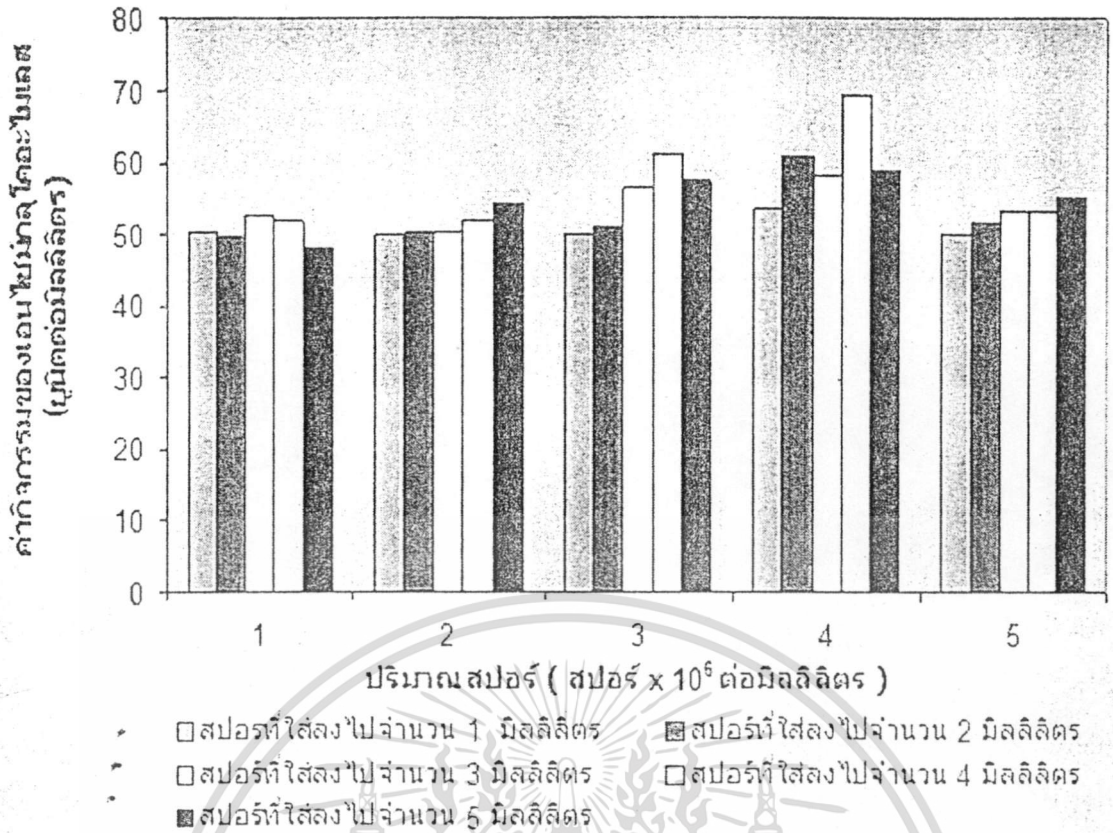
รูปที่ 3 แสดงค่า D.E. ที่ได้จากการแปรผันเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน

1.4. ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์
 กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เติมปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นคือ ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจำนวนมิลลิลิตรที่ปิเปตเท่ากับ 4 มิลลิลิตร โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 69.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 5 ของการหมักซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในทุกความเข้มข้นของปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นกับปริมาณสปอร์เริ่มต้นแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น และมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไปเพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ วันที่ 5 ของการหมัก

มิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป (มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)				
	1×10^6	2×10^6	3×10^6	4×10^6	5×10^6
1	50.37	49.91	50.10	53.48	50.16
2	49.85	50.27	51.06	66.89	51.61
3	52.67	50.36	56.56	65.31	53.36
4	51.90	52.02	61.14	69.31	53.25
5	48.09	54.34	57.42	64.97	55.30



รูปที่ 4 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น และมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป เพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคสไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณสปอร์เริ่มต้นและมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป ที่ปริมาณสปอร์เริ่มต้น เท่ากับ 4×10^6 ที่ 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแตกต่างที่ 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 และ 5×10^6 ที่ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และที่ 4×10^6 ที่ 1 มิลลิลิตร จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า ปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นเท่ากับ 4×10^6 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 69.31 ยูนิิตต่อมิลลิลิตร จะทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคสไมเลสสูงสุดดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 มิลลิลิตร เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อราในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อไป

1.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ซึ่งทำการแปรผันอุณหภูมิที่ 20, 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 และจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 85.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าต่ำ เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงใช้ อุณหภูมินี้ในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Jin et. al. (1999) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากน้ำทิ้งในกระบวนการแปรรูป แป้ง (starch processing wastewater) โดยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* DAR 2710 พบว่าที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เชื้อราชนิดนี้ ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด

ตารางที่ 5 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ วันที่ 5 ของการหมัก

	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (องศาเซลเซียส)					
	20	25	30	35	37	40
กิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	55.21	64.53	77.67	85.14	78.65	55.14

1.6 ผลการศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ค่าพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ผลการทดลองพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่มีค่าพีเอช 3, 4 และ 5 นั้นให้ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดลองแล้วจะสูงสุดในวันที่ 5 แต่ที่ค่าพีเอช 5.0 เป็น พีเอช ที่ให้ผลค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าสูงสุด เท่ากับ 102.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 92.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ พีเอช เท่ากับ 6 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะมีค่าสูงรองลงมาจากที่ พีเอช เท่ากับ 5 ส่วนที่ พีเอช 7, 7.5, 8 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในปริมาณที่ไม่มาก ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เสถียรที่ พีเอช อยู่ระหว่าง 3.5 – 5.0 และมีพีเอชเหมาะสมที่ 5.0 (Pazur, 1972)

ตารางที่ 6 แสดงค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

	พีเอชเริ่มต้นของอาหาร								
	3	4	5	6	7	7.5	8	9	10
กิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	84.70	92.55	102.09	93.21	81.11	79.32	67.01	*	*

* เท่ากับ เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ไม่มีการเจริญ

เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Sadjilhan et al. (1990) ซึ่งได้รายงานผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูง *Myceliophthora thermophila* N14 (ATCC 48104) พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอช เท่ากับ 5.5

1.7 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

จากผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 ซึ่งทำการแปรผันระยะเวลาการบ่มเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 วัน ผลการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการบ่มเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 วัน เป็นดังนี้ วันที่ 1 ของการทดลองเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 อยู่ในระยะ lag phase ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 มีการเจริญต่ำ ปริมาณชีวมวลที่คิดได้จากน้ำหนักแห้งมีปริมาณต่ำ ดังนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าต่ำ ต่อมาเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 2 วัน พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มค่ากิจกรรมที่ได้ของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้น ปริมาณชีวมวลมีค่าสูงขึ้น ส่วนวันที่ 3 และ 4 เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ยังคงอยู่ในช่วง log phase โดยพบว่า การเจริญเติบโตในอัตราสูงปริมาณชีวมวลสูง ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส คือ 69.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการบ่ม และ 89.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการบ่ม ส่วนในวันที่ 5 พบว่าค่าชีวมวลมีค่าเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่ต่ำเมื่อเทียบกับวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการบ่ม ส่วนวันที่ 6, 7 และ 8 มีค่าชีวมวลลดลงและ กิจกรรมเอนไซม์มีค่าน้อยลง ซึ่งจากการศึกษา ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 พบว่า เชื้อรามีการเจริญเติบโตในช่วง lag phase เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและพบว่า *Aspergillus awamori* ATCC22342 มีการเจริญในช่วง log phase เป็นเวลา 15 ชั่วโมง โดยในชั่วโมงที่ 50 ของการทดลองพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 16 กรัมต่อลิตร แล้วจึงเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) อีก 50 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 94 เชื้อราจะเข้าสู่ระยะตาย (death phase) ส่วนการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสนั้นพบว่า เชื้อราจะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสออกมาในชั่วโมงที่ 45 จากนั้นเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณสูงขึ้น และสูงสุดเท่ากับ 101.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 5 ของการหมัก เป็นที่น่าสังเกตว่า ลักษณะการเจริญของเชื้อราไม่สัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (non-associated) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของFeng, et.al.(2002)ได้ทำการศึกษากการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Thermoanaerobactuium thermosaecharolyticum* ATCC 7956 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร เป็นเวลา 46 ชั่วโมง พบว่าเชื้อราชนิดนี้มีระยะ log phase 12 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ระยะพักตัว เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ส่วนการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสนั้นเชื้อราจะปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ในช่วงระยะพักตัว โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด เท่ากับ 101.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7. แสดงระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา

Aspergillus awamori ATCC 22342

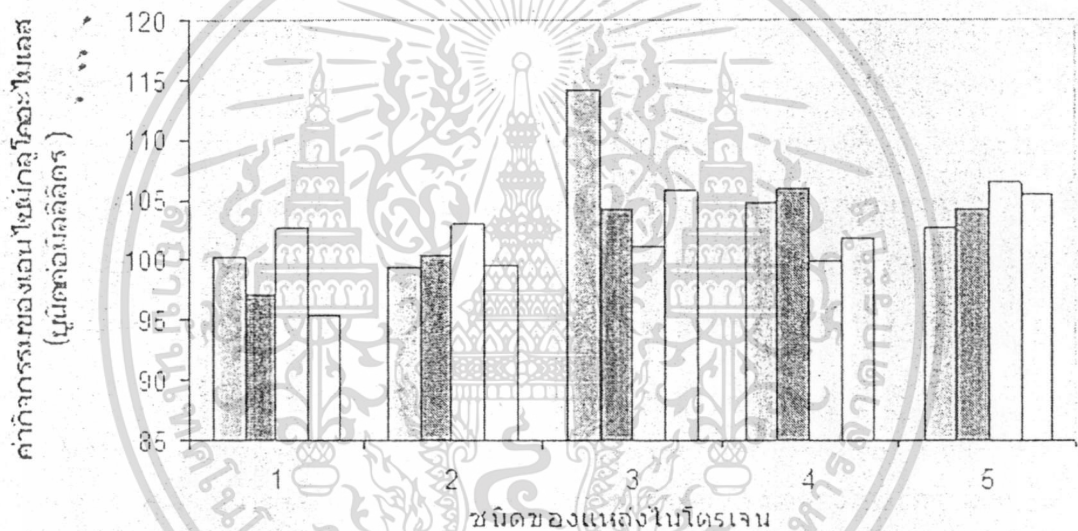
	ระยะเวลาการบ่ม(วัน)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
กิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	24.70	33.55	69.85	89.61	101.87	90.32	82.01	75.42

1.8 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเราใช้แหล่งไนโตรเจนทั้ง 5 อย่าง อันได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และ เปปโตน ผลปรากฏว่า แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา จากการศึกษาถึงผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยทำการแปรผันชนิดของไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และ เปปโตน โดยทุกชนิดแหล่งไนโตรเจน ทำการแปรผันความเข้มข้นอีก 4 ค่า คือความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ร้อยละ 0.1 ร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 พบว่าเมื่อใช้ แอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 114.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งในวันที่ 5 ของการทดลองจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด

ตารางที่ 8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ชนิดของแหล่งไนโตรเจน				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ CL	NH ₄ NO ₃	ยูเรีย	เปปโตน
0.05%	100.21	99.41	114.17	104.67	102.76
0.10%	97.08	100.36	104.30	105.90	104.23
0.20%	102.65	102.97	101.20	99.84	106.42
0.30%	95.46	99.53	105.77	101.85	105.38



- ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% ■ ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.10%
- ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.20% □ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.30%

1 = (NH₄)₂SO₄ 2 = NH₄Cl 3 = NH₄NO₃ 4 = Urea 5 = Peptone

รูปที่ 5 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

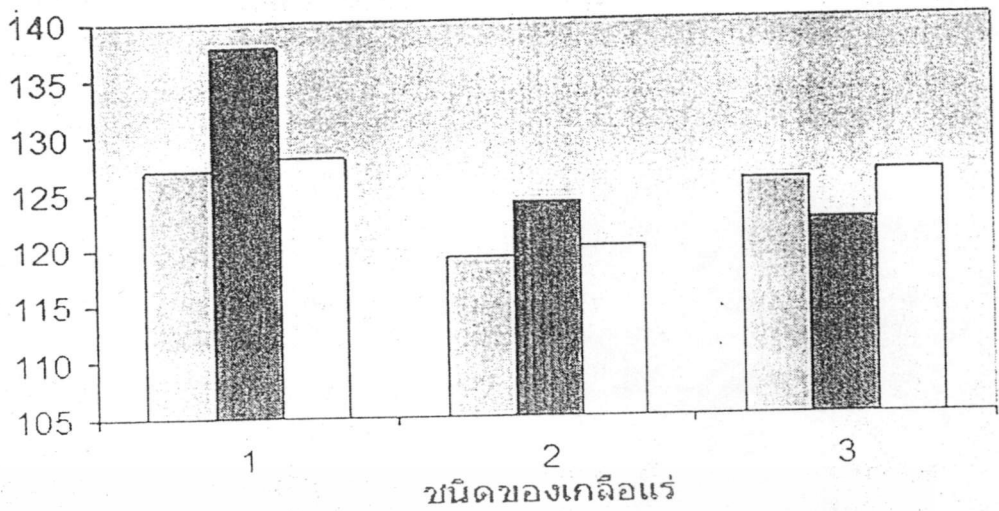
1.9 ผลการศึกษาชนิดของเกลือแร่และความเข้มข้นของเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เมื่อทำการทดลองแบบแฟคทอเรียล โดยมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของเกลือแร่ และความเข้มข้นของเกลือแร่นั้น ผลการทดลองปรากฏว่าแมกนีเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.007 มีผลทำให้เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 137.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดลองในชุดอื่น ๆ จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำกว่า เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เพิ่มแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.007 และร้อยละ 0.01 จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับการทดลองชุดอื่น ๆ ซึ่ง ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.007 มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตน้อยกว่าแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ดังนั้นเราจึงเลือกความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ร้อยละ 0.007 ทำการทดลองต่อไป นอกจากนี้ Sadhukhan et. al. (1990) ได้รายงานถึงผลของชนิด และความเข้มข้นของเกลือแร่ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104) ผลการทดลองพบว่า Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} และ Zn^{2+} มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ส่วน Mg^{2+} , Ca^{2+} และ Mn^{2+} มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้สูง แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราชนิดนี้

ตารางที่ 9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งเกลือแร่ และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus awamori* ATCC2234 ณ วันที่ 5 ของการหมัก

ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	ชนิดของแหล่งเกลือแร่		
	$MgSO_4$	$CaCl_2$	$MgSO_4+CaCl_2$
0.005%	126.98	119.08	125.76
0.007%	137.71	123.97	122.21
0.01%	128.01	120.02	126.44

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส
(หน่วยต่อมิลลิลิตร)



□ ความเข้มข้นของเกลือแร่ 0.005 เปอร์เซ็นต์
 ▨ ความเข้มข้นของเกลือแร่ 0.007 เปอร์เซ็นต์
 □ ความเข้มข้นของเกลือแร่ 0.01 เปอร์เซ็นต์

1 = $MgSO_4$ 2 = $CaCl_2$ 3 = $MgSO_4 + CaCl_2$

รูปที่ 6 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งเกลือแร่ และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ วันที่ 5 ของการหมัก

1.10 ผลการศึกษาอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

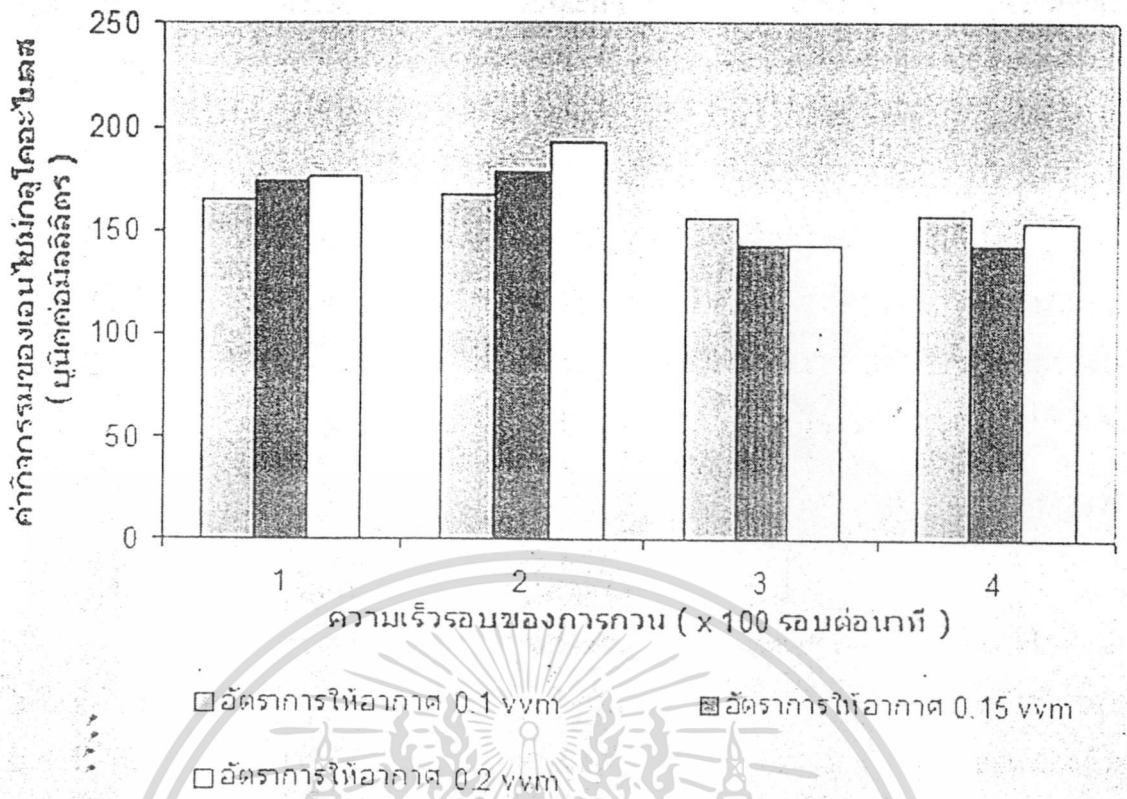
ผลการทดลองแบบแฟคทอเรียลปรากฏว่าปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่ออัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาทีและการให้อากาศเป็น 0.2 วีวีเอ็ม ดังแสดงในตารางที่ 1.10 จากผลนี้แสดงว่าการกวนและการให้อากาศมีอิทธิพลร่วมกันต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มการให้อากาศจาก 0.1 วีวีเอ็ม 0.15 วีวีเอ็ม และ 0.2 วีวีเอ็ม จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงขึ้น เมื่อให้อัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนมากกว่า 200 รอบต่อนาที จะเกิดฟองจำนวนมาก ทำให้ต้องใช้สารกันฟองซึ่งทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการให้อากาศต่อออกซิเจนที่ละลายโดยเพิ่มการให้อากาศจาก 0.1 วีวีเอ็ม 0.15 วีวีเอ็ม และ 0.2 วีวีเอ็ม สำหรับอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที เวลาที่ออกซิเจนหมดจะเลื่อนจาก ชั่วโมงที่ 28 เป็นชั่วโมงที่ 54 และเมื่อใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เวลาที่ออกซิเจนหมดจะเลื่อนจาก ชั่วโมงที่ 32 เป็นชั่วโมงที่ 67 เนื่องจากออกซิเจนในอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการหมักเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความรู้เกี่ยวกับการให้อากาศและการกวนที่มีผลต่อออกซิเจนในอาหารจึงเป็นประโยชน์สำหรับการหมักเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอย่างยิ่ง

ตารางที่ 10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากการแปรผันอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน เพื่อศึกษาการแปรผัน อัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ วันที่ 5 ของการหมัก

อัตราการให้อากาศ (vvm)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	ความเร็วรอบของการกวน (รอบต่อนาที)			
	100	200	300	400
0.1	164.96	167.89	156.43	157.44
0.15	174.31	178.32	142.54	142.60
0.2	175.90	193.29	143.08	154.56



รูปที่ 7 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันอัตราการใช้อากาศและความเร็วยอบของการยอบ เพื่อศึกษาการแปรผัน อัตราการใช้อากาศและความเร็วยอบของการยอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ วันที่ 5 ของการหมัก

ผลการศึกษากการแยกและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวโดยใช้ สภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 5 วัน สามารถสกัดสารละลายเอนไซม์ได้ปริมาตร 2 ลิตร มีค่ากิจกรรมรวม (total activity) ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 386,580 หน่วย และค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 42.16 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

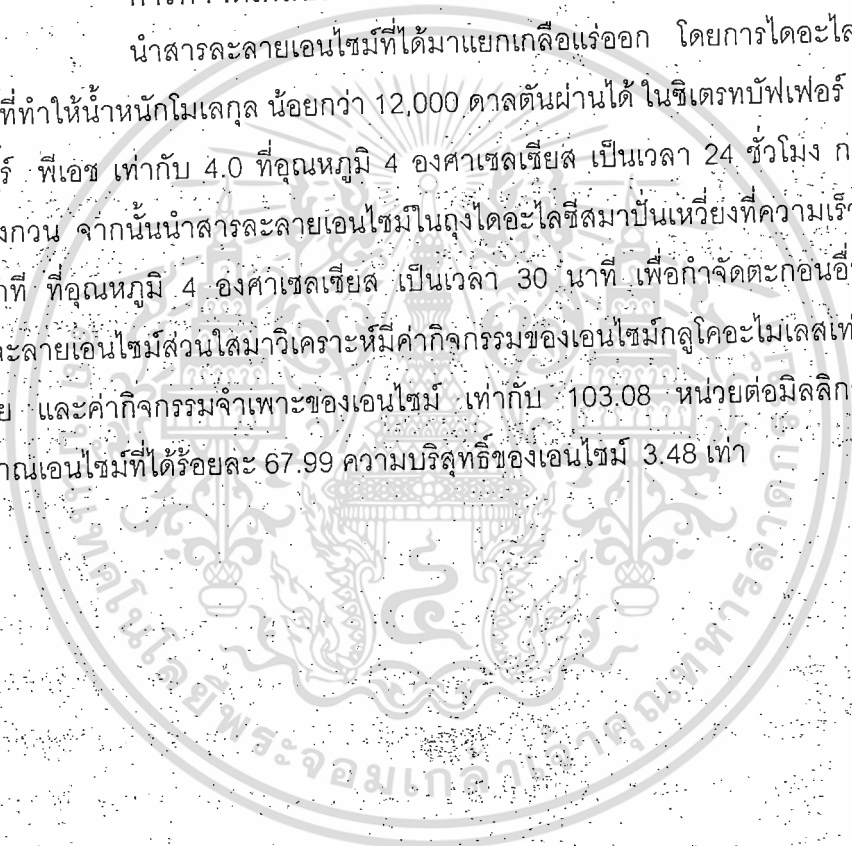
1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 386,580 หน่วยและ ค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์กลูโคอะ

ไมเลส 42.16 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่าง ๆ จากผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 80 ส่งผลให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตกตะกอนได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fredberg et al.(1975) ที่ทำการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 นอกจากนี้ Morita และ Fujio (1997) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 80 ในการตกตะกอนเอนไซม์ ปริมาตร 2 ลิตร มีค่ากิจกรรมรวมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 347,535.42 หน่วย และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 45.43 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ได้ร้อยละ 89.90 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 1.72 เท่า

การกำจัดเกลือโดยการทำไดอะไลซิส (dialysis)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาแยกเกลือแร่ออก โดยการไดอะไลซิสโดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่ทำให้น้ำหนักโมเลกุล น้อยกว่า 12,000 ดาลตันผ่านได้ ในซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช เท่ากับ 4.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซิสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดตะกอนอื่น ๆ ออกไป เก็บสารละลายเอนไซม์ส่วนใสมาวิเคราะห์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 111,226.13 หน่วย และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 103.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ได้ร้อยละ 67.99 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 3.48 เท่า



ตารางที่ 11 แสดงผลการแยกและการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 4 วัน

ขั้นตอนของการทำ เอนไซม์ให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรม ของเอนไซม์ รวม(ยูนิต)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม)	ค่ากิจกรรม จำเพาะของ เอนไซม์ ยูนิตต่อมิลลิ กรัมโปรตีน)	ปริมาณ เอนไซม์ ที่ได้ (ร้อยละ)	ความ บริสุทธิ์ของ เอนไซม์ (เท่า)
ลารละลายเอนไซม์	2,000	386,580	9169.35	42.16	100	1
ตกตะกอนด้วยแอมโม เนียมซัลเฟตอิ่มตัว	2,000	347,535.42	7649.91	45.43	89.90	1.72
เข้มข้นร้อยละ 80						
การกำจัดเกลือ	600	111,226.13	1079.03	103.08	67.99	3.48

ผลการศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อม
เปรียบเทียบกับกากน้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์
Saccharomyces cerevisiae Sc-90

ผลการศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมเปรียบเทียบกับกาก
น้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ปรากฏว่าเมื่อ
นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมและ นำไปทดลองหมักแอลกอฮอล์เปรียบ
เทียบกับกากน้ำตาล ผลการทดลองปรากฏผลว่าน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสสามารถหมักและ
ผลิตแอลกอฮอล์ ได้รวดเร็วกว่ากากน้ำตาล โดยชั่วโมงที่ 48 ค่าร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำ
หมักในน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสมีค่าสูงสุด คือ 7.25 แล้วส่วนในกากน้ำตาล ค่าร้อยละ
แอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก คือ 7.13 ส่วนค่าพีเอช
น้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสมีค่าที่เขลลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับกากน้ำตาลโดยค่าพีเอช
ของน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสในชั่วโมงที่ 24 มีค่า 3.85 ในขณะที่พีเอชของกากน้ำตาลมีค่า
ในชั่วโมงที่ 24 มีค่า 4.76 ส่วนค่าบrixในน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสลดลงอย่างรวดเร็วกว่า
ของกากน้ำตาลโดยในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ค่าบrixของน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสมีค่า
ต่ำที่สุดในส่วนกากน้ำตาลค่าบrixของกากน้ำตาลยังคงลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นค่าบrixต่ำ
ที่สุดของกากน้ำตาล

ตารางที่ 12 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการหมักแอลกอฮอล์ โดยใช้ น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่วโมงที่	น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส				
	ร้อยละแอลกอฮอล์ ที่ละลายในน้ำหมัก	พีเอช	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ร้อยละน้ำตาล รีดิวซ์	องศา บริกซ์
24	4.35	3.85	37	16.95	28.65
48	7.25	4.50	32.0	1.94	12.75
72	7.25	4.23	33.5	1.82	12.55

ตารางที่ 13 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการหมักเอธานอล โดยใช้กากน้ำตาล

ชั่วโมงที่	กากน้ำตาล				
	ร้อยละแอลกอฮอล์ ที่ละลายในน้ำหมัก	พีเอช	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ร้อยละน้ำตาล รีดิวซ์	องศา บริกซ์
24	3.50	4.76	36.5	16.95	28.70
48	6.85	4.70	33.0	4.38	16.35
72	7.15	4.65	33.5	2.56	14.25

ในการผลิตแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม วัตถุดิบที่นำมาผลิตแอลกอฮอล์ ทำให้ต้นทุนต่อลิตรของแอลกอฮอล์ต่ำที่สุด คือ กากน้ำตาล เพราะที่ไม่ต้องมีขั้นตอนซับซ้อนยุ่งยาก เช่น ขั้นตอนเปลี่ยนแปลงซึ่งเป็นการโอบไฮเดรทโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นน้ำตาล แต่เมื่อนำกากน้ำตาลไปผลิตแอลกอฮอล์ จะเกิดน้ำกากสาปริมาณมาก ซึ่งน้ำกากสาเป็นน้ำทิ้งที่ยากต่อการกำจัดอย่างสูง เนื่องจากมีสีดำ ทำให้ต้นทุนการกำจัดน้ำกากสาที่มีราคาสูง เป็นเหตุให้ต้นทุนสูงในอนาคตส่วนผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง จะให้ต้นทุนต่อลิตรของแอลกอฮอล์ต่ำลงมาเป็นอันดับสองรองจากกากน้ำตาล ซึ่งปริมาณการผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทยสามารถผลิตหัวมันสำปะหลังสดได้ปีละ 20 ล้านตัน (กล้าณรงค์, 2543) ซึ่งมีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการในการผลิตแอลกอฮอล์เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ จึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจอันดับหนึ่ง ข้อเปรียบเทียบการใช้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังผลิตแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับกากน้ำตาล แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบการใช้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังกับกากน้ำตาลในการผลิตแอลกอฮอล์

ผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง	กากน้ำตาล
1. ขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อนต้องเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลก่อน	1. ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน
2. น้ำทิ้งกำจัดได้ง่าย	2. น้ำทิ้งกำจัดได้ยากมาก
3. ราคาถูก	3. ราคาถูกกว่า

ส่วนในต่างประเทศ เช่น ในทวีปอเมริกาเหนือนิยมใช้ธัญญาพืช เช่น ข้าวโพดในการผลิตแอลกอฮอล์ ทางประเทศแถบยุโรปจะใช้หัวผักกาดหวานเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ โดยวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด คือ ข้าวโพดและหัวผักกาดหวานมีราคาสูงกว่า กากน้ำตาลและผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง ทำให้ต้นทุนต่อลิตรของแอลกอฮอล์ สูงกว่า การใช้กากน้ำตาลและผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อใช้เด็กทริน จากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้น เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบว่าเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงกว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ส่วนความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) ที่ใช้ย่อยเพื่อผลิตเด็กทริน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นที่ร้อยละ 5 และความเข้มข้นเอนไซม์ Termanyl (α -amylase) ที่ร้อยละ 0.1 จะให้ผลผลิตเด็กทรินสูงที่สุด คือ ค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์เท่ากับ 17.63

การหาระยะเวลาการย่อยและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทริน พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาการย่อย 30 นาทีและอุณหภูมิการบ่มเป็น 40 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเด็กทรินสูงที่สุด คือ ค่าเด็กโทรสอิกควาเลนซ์เท่ากับ 19.61

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 คือ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ระยะเวลาการบ่มคือ 5 วัน เติมน้ำแอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.007 เป็นแหล่งเกลือแร่

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต้องใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 วัตต์แอมป์

การแยกและการทำให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์บางส่วน โดยการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 จากนั้นแยกเกลือออกโดยการไดอะไลซิส ซึ่งได้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 89.90 เมื่อผ่านขั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 และร้อยละ 67.99 เมื่อผ่านขั้นไดอะไลซิส ซึ่งคิดเป็นความบริสุทธิ์ 1.72 และ 3.98 เท่า ตามลำดับ

การนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทดสอบประสิทธิภาพ การย่อยแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำเชื่อมหลังจากนั้นนำน้ำเชื่อมไปหมักแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับ กากน้ำตาลพบว่าน้ำเชื่อมที่ผลิตได้นั้นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 สามารถใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกับกากน้ำตาล โดยมีค่าร้อยละแอลกอฮอล์สุดท้ายที่ละลายในน้ำหมักใกล้เคียงกัน คือ 7.25 ในกรณีของน้ำเชื่อมและ 7.15 ในกรณีของกากน้ำตาล

บรรณานุกรม

- กล้าณรงค์ ศรีรอด . 2542. เทคโนโลยีของแป้ง. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับริเคชัน จำกัด.
กรุงเทพฯ. 225 น.
- กล้าณรงค์ ศรีรอดและเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2.
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 292 หน้า.
- ไกรฤกษ์ ธวัชพันธ์. 2526. การเลี้ยงรา *Rhizopus oryzae* บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอะไมเลส.
วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จตุรพร พรศิลป์พิพย์. 2528. เอนไซม์ย่อยสลายแป้งดิบจากเชื้อราอะไมโลไมซีส.
วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2523. มั่นสำปะหลัง: การปลูก อุตสาหกรรมการแปรรูปและการใช้
ประโยชน์. ภาควิชาไร่-นา. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 439 น.
- ดุชนี ธนะบริพัตน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.
กรุงเทพฯ. 437 น.
- มุกดา รัฐตะสุด. 2527. สารชีวโมเลกุล. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.
- มีชัย ลัดดี. 2542. การศึกษาสภาวะการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์. รายงานเทคนิควิจัย
ปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วชิรพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์. 2542. "การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ฟลูกลานเนสเพื่อ
ใช้ในการทำแผ่นฟิล์ม." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภยวิชัยพีชไร่ระยอง. 2537. เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการ
เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- สมชาย ดอนคงดี. 2537. การหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง โดยใช้ระบบต่อเนื่องในถังหมัก
ทรงสูงพร้อมด้วยระบบหมุนเวียนเซลล์กลับ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Adams, M. 1953. "Amylases their kinds and properties and factors which influence
their activity." Food Technology. 7: 35-38.
- Allen, W.G. and Dawson, H.G. 1975. "Technology and Uses of Debranching Enzyme."
Food Technology. 52: 70-80

70
Andrzejczak, J., K. Bartorzewicz, J. Kaezowski, B. Kujawski, K. Piller, M. Rekalakozbro, and A. Zajac. 1977. "Obtaining of Concentrated Glucoamylase Preparations and Control of Their Stability during Storage." *Acta Alimentaria Polinia*. 3(2), 151-160.

A.O.A.C. 1970. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11th ed. Washington, D.C.: The Association of Official Analytical Chemists.

A.O.A.C. 1980. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th ed. Washington, D.C.: The Association of Official Analytical Chemists.

Aunstrup, K., 1972. "Preparation of Amyloglucosidase." U.S. Pat. 3,677,902, July 18, 1972.

Baker, S.A. and J.G. Fleetwood. 1957. "Studies on *Aspergillus niger* part V. III The purification of Glucoamylase." *Journal of American Chemistry Association*. 64: 4587.

Balogopalan, C., G. Padmaja, S. K. Nanda, and S.N. Moorthy. 1988. *Cassava in Food, Feed, and Industry*. CRC Press, Inc., Florida. 205 p.

Baribo, L. E., 1967. "Amyloglucosidase Production by *Aspergillus phoenicis*." U.S. Pat. 3,298,926, Jan 17, 1967.

Barton, L. L., C. E. Georgi, and D. R. Lineback. 1972. "Effect of Maltose on glucoamylase formation by *Aspergillus niger*." *Journal of Bacteriology*. 111 (3), 771-777.

Bernfeld, P. 1951. Enzyme of Starch degradation and synthesis; *Advances in Enzymology*. Edited by F. F. Nord. New York: Interscience Publishers, Inc.

Bernfeld, P. 1955. "Amylase α and β ." *Method in Enzymology*. (Colowick, P. S. and O. N. Kaplan Eds.) 1: 149, Academic Press, Inc. Publishers, New York.

Beynum, G.M.A. Van and J.A. Roels. 1985. *Starch conversion Technology*. Marcel Dekker, Inc., New York. 19 p.

Biröl, G., Z.I. Onsan, B. Kirdar and S.G. Oliver. 1998. Ethanol production and fermentation Characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains growth on starch. *Enzyme Microbiology Technology*. 22:672-677.

- Boyce, C.O.L. 1986. *Novo's Handbook of Practical Biotechnology*. Novo Industri A/S, Denmark. 125 p.
- Chambers, J.A.A. and Rickwood, D. 1993. *Buffer Chelating agents and denaturant in Biochemistry LABFOX*. BIOS Scientific Publishers limited. Oxford. 36p.
- Ejiofor, A.O., Y. Chisti and M. Moo-Young. 1996. "Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking quality yeast." *Enzyme Microbiology Technology*. 18: 519-525.
- Feng, P.H., Berensmeier, S., Buchholz, K. and Reilly, P.J. 2002. "Production, purification, and characterization of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* glucoamylase." *Starch/starke*. 54: 328-337.
- Fleming, I.D. and B. A. Stone. 1965. Fractionation of *Aspergillus niger* amyloglucosidase. *Biochem Journal*. 97: 13.
- Fogarty, W.M. and Benson, C.P. 1983. "Purification and properties of thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger*." *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 18: 271-278.
- Forgary, W.M., and C. T. Kelly. 1979. "Starch Degrading Enzyme of Microbial Origin," *Progress Industrial Microbiology*. (Bull. M. J. ed.) 15: 89-90 Elsevier Scientific Publishing Co., Netherland.
- Freedberg, I.M., Levin, Y., Kay, C.M., McCubbin, W.D. and Katchalski-Katzir, E. 1975. "Purification and characterization of *Aspergillus niger* exo-1,4-glucosidase." *Biochimical Biophysical Acta*. 391: 361-381.
- Fuwa, H. 1954. "The specific change of iodine reaction on sweet potato starch caused by some microorganisms." *Journal of Biochemistry*. 41:583.
- Hayashida, S., T. Nomura, E. Yashino and M. hongo. 1976. "The formation and properties of subillism modified glucoamylase." *Agricultural Biology Chemistry* 40(1): 141-146.
- Hayashida, S. and E. Yashino. 1977. "Formation of active derivative of glucoamylase I during the digestion with fungal acid protease and mannosidase." *Agricultural Biology Chemistry*. 42(5): 927-933.

- Hayasida, S. and P. G. Hor. 1981. "Raw starch digestion glucoamylase productivity of protease less mutant from *Aspergillus awamori* var kawachi." *Agricultural Biology Chemistry*. 45(2) : 2675-2681.
- Hockenull, D. J. D. 1967. "Recent development in the production and industrial application of amylolytic enzyme derived from filamentous fungi." *Progress in Industrial Microbiology*. 63 :97-136.
- Jin, B., Leeuwen, van H.J., Patel, B., Doelle, H.W. and Yu, Q. 1999. "Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater." *Process Biochemistry*. 34: 59-65.
- Jones, R.P., N. Pamment and P.F. Greenfield. 1981. "Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variabils." *Process Biochemistry*. 16(3): 42-49.
- Kato, K.; K. Kuswanto; T. Bando; and T. Harada. 1976. "Identification of *Endomycopsis figuligera* isolated from Ragi in Indonesia and properties of its crystalline glucoamylase." *Journal of Fermentation Technology*. 54(2) : 821-837.
- Keñedy, J.F. et. al. 1987. *Starch Biomass : a Chemical Feedstock for Enzyme and Fermentation Process in Starch : Properties and Potential*, vol. 3. New York : Wiley and Sons.
- King, N. J. 1976. "The glucoamylase of *Coniphora cerebella*." *Biochemistry Journal*. 105:577-583.
- Krishnan, M.S., F. Taylor, B.H. Davison and N.P. Nghiem. 2000. "Economic analysis of fuel ethanol production from corn starch using fluidized-bed bioreactors." *Bioresource Technology*. 75: 99-105.
- Krzecowska, M. amd H. Urbanek. 1975. "Isolation and some properties of glucoamylase from *C. charticola* Lindau." *Journal of Applied Microbiology*. 30(7) : 160-166.
- Kujawski, M. and A. Zajae. 1974. "A propositon for purified method of glucoamylase activity determination in microbial material." *Microbiology Abstract*. 10A:3784.
- Leloup, V. et. al. 1994. *Enzymatic Processing of Carbohydrates in Bioconversion of Cereal Products*. New York : VCH.
- Lineback, D.R; I. J. Russell and Rasmassen. 1969. "Two forms of the glucoamylase of *Aspergillus niger*." *Archive of Biochemistry Biophysics*. 134: 539-553.

- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. "The determination of enzyme dissociation constants." *Journal of American Chemistry Association*. 56 : 658-666.
- Lowry, O. H. ; N. J. Rosebrough ; A. L. Farr ; and R. J. Randall. 1951. "Production measurement with folin phenol reagent." *Journal of Biological Chemistry*. 193 : 265-275.
- Medda, S ; B. C. Saha and S. Ueda. 1982. Glucoamylase I of black *Aspergillus*. *Journal of Faculty Agricultural Kyushu University*. 26 (2,3) : 139-149.
- McMillan, J.D. 1997. "Bioethanol production: Status and prospects." *Renewable Eng*. 10(2/3) : 295-302.
- Miah, M.N.N. and S.Ueda. 1977. "Multiplication of glucoamylase of *Aspergillus oryzae* Part 2. Enzymatic and physicochemical properties of three forms of glucoamylase." *Die starke*. 29(7) : 235-239.
- Mitsue, T ; B. C. Saha and S. Ueda. 1979. "Glucoamylase of *Aspergillus oryzae* cultured on steamed rice." *Journal of Applied Biochemistry*. 1 : 410-422.
- Morita, H. and Fujio, Y. 1997. "High specific activity of raw-strach digesting glucoamylase producing *Rhizopus* sp. A-11 in liquid culture." *Strach/starke*. 49 : 293-296.
- Moriyama, S., S. Kataoka, K. Nakamishi, R. Matsumo, T. Kamikuto., 1980. "Thermal Stability of immobilized Glucoamylase in the Presence of a Substrate." *Agricultural Biology Chemistry*. 44(11) : 2737-2739.
- Nelson, N. 1944. "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose." *Journal of Biological Chemistry*. 154 : 375-380.
- Norris, J. R. and D. W. Ribbons. 1971. *Method in Microbiology*. New York : Academic Press.
- Ohga, M ; K. Shimizu and V. Monta. 1966. "Studies on amylase of *Aspergillus oryzae* cultured on rice Part II. Some properties of glucoamylase." *Agricultural Biology Chemistry*. 30(10) : 967-972.
- Pazur, J. H. 1972. Glucoamylase from *Aspergillus niger*. pp. 931-934. In V. Ginsburg (ed.), *Methods in Enzymology Volume 28 Complex Carbohydrate part b*. Academic Press Inc., New York.

- Paturau, J.M. 1982. By products of the cane sugar industry. Elsevic Publishing Co. Ltd., Amsterdams. 223 p.
- Pazur, T. H. R. Knull and A. Cepure. 1971. "Glucoenzymes: Structure and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*." Carbohydrate Reserch. 20 : 83-96.
- Phillips, L.L. and M.L. Caldwell. 1951." A study of the purification and properties of the glucose forming amylase from *Rhizopus delemar* glucoamylase." Journal of American Chemistry Association. 73 : 3559-3563.
- Qadeer, M. A. and T. Kansor, 1971." Nutritional Studies of *Aspergillus awamori* for the Production of Amyloglucosidase." Pakistan Journal Science Industry Reserch. 14(3) : 247-250.
- Razzaque, A. and S. Ueda. 1978. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Journal of Fermentation Technology. 56(4) : 256-302.
- Rielly, R. J. 1979. Starch hydrolysis with soluble and immobilized glucoamylase, pp. 185-207. In L.B. Wingard Jr., E.K. Katzir and L. Goldstien (eds.) Applied Biochemistry and Bioengineering Volume 2 Enzyme Technology. Academic Press Inc., New York.
- Sadhukhan, R. K.; Manna, S.; Roy, S.K. and Chakrabarty, S. L. 1990. "Thermostable amylolytic enzymes from a cellulolytic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104)." Applied Microbiology and Biotechnology. 33 : 692-696.
- Saha, B.C., T. Mitsue, S. Ueda and Fukuoha. 1979. "Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*." Starch/Starke. 31:307-314.
- Saha, B.C. and Zeikus, J.G. 1989. "Novel Highly Thermostable Pullulanase from Thermophiles." Tibtechnology -7. 234-239.
- Scopes, R.K. 1978. Techniques for protein purification. *In* Techniques in the Life Science : Technique and Enzymes Biochemistry. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amterdam. pp. 1-42.
- Scragg, A. 1999. Enviromental Biotechnology. Addison Wssley Longman Singapone (Pte) Co. Ltd. London. 180 p.
- Smiley, K. L., 1967. "Amyloglucosidase Production by *Aspergillus awamori*." US Pat. 3,301,768. Jan 31, 1967.

- Smiley, K. L. : D.E. Hensley; M. J. Smiley and H.J. Gasdorf. 1971. "Kinetic patterns of glucoamylase isozymes isolated from *Aspergillus* species." *Archive of Biochemistry Bioengineering*. 16:1661-1177.
- Smith, J. A., and J. R. Frankiewicz, "Medium Containing Enzymatically Liquefied Corn Starch", US. Pat. 4,169,013. Sept 25, 1979.
- Somogyi, M. 1945. "A new reagent for the determination of sugar." *Journal of Biology Chemistry*. 160 : 66.
- Sukhumavasi, J; K. Kato and T. Harada. 1975. Glucoamylase, a stain *Endomycopsis fibulrigera* isolated from mould bran (Look Pang) of Thailand. *Journal of Fermentation Technology*. 53 (8) : 559-569.
- Sukhumavasi, J., and P. Suyanandana. 1982. "Amylase Production by Submerged Culture Method." Reserch Project No. 19-13 Report No.1, TISTR, Bangkok.
- Takahishi, T.; Y. Tsuchida and M. Iric. 1978. "Purification and some properies of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus*." *Journal of Biochemistry*. 82:1183-1194.
- Takahishi, T.; Y. Tsuchida and M. Iric. 1981. "Purification and characterization of a glucoamylase from *Aspergillus saitoi*." *Journal of Biochemistry*. 89 : 125-134.
- Taylor, P.M; E. J. Napier and I.D. Fleming. 1978. "Some properties of a glucoamylase produced by the Thermophilus fungus *Humicola langinosa*". *Carbohydrate Reserch*. 61 : 301-308.
- Tawachpun, K; P. Pinphanichukarn and S. Pichyangkura. 1982. Solid state cultivation of *Rhizopus* sp. For glucoamylase production and purification. Bangkok: Master of Science Thesis. Chulalongkorn University.
- Townsend, G.E. and A.A. Lindgrem. 1953. "Viable yeast count." *Cytologia*. 18 :183.
- Tsujita, Y. and A. Endo. 1976. "Purification and Characterization of the two molecular of *Aspergillus oryzae* and protease." *Biochemical Biophysical Acta*. 445(10)194-204.
- Ueda, S., C.T. Zenin, A. Monterio and Y.K. Park. 1981. "Production of ethanol from cassava strach by non convertional method." *Biotechnology and Bioengineering*. 23 : 291-299.
- Ueda, S. and S. Kano. 1975. "Multiple forms of glucoamylase of *Rhizopus* species." *Die Starke*. 123-128.

Underkofler, L. A. 1961. "Methods of assay for microbial enzyme. In Rich, S. development." *Industrial Microbiology*. 2:171-181.

Verma, G., P. Nigam, D. Singh and K. Chaudhary. 2000. "Bioconversion of starch to ethanol in a single- step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21." *Bioresource Technology*. 72 : 261-266.

Vihinen, M. and Mantsala, P. 1989. "Microbiol Amylolytic Enzyme." *Biochemical Molecullar Biology*. 24(2) : 329-418.

Weill C. E. and M. L. Caldwell. 1945. "A study of the essential group of beta-amylase." *Journal of American Chemistry Association*. 67 : 212-214.

Weill, C. E., R. J. Burch ; and J. W. Van Dyk. 1954. "An alpha amyloglucosidase that produce β -D-glucose." *Cereal Chemistry*. 31 : 150.

Whitaker, J.R. 1972. *Principle of Enzymology for the food Science*. Marcel dekker, Inc. New York.

Wiseman, A. 1975. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ellis Horwood, London. 1020 p.

Yamasaki, Y. and Y. Suzuki. 1978. "Purification and properties of α -glucosidase and glucoamylase from *Lentinus edodus* (Berk) Sing." *Agricultural Biology Chemistry*. 42(5) : 971-980.

Yoshino, E. and S. Hayashida. 1978. "Enzynatic modification of glucoamylase of *Aspergillus awamori* var. kawachi." *Journal of Fermentation Technology*. 56(4) :289-295.