สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# รายงานการวิจัย

เรื่อง

# การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็งและอาหารเหลวโดยเชื้อรา

RCH
QP
607
.A45
Q6589
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 50449
วัน,เดือน,ปี 14 พ.ค. 2547
b 11306762
i.....

ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

ปีงบประมาณ 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
b11306762

# บทคัดย่อ

จากการศึกษาศักยภาพในการย่อยแป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้าของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Aspergillus oryzae* TISTR 3019, *A. phoenicis* TISTR 3252, *A. phoenicis* TISTR 3253, *A. niger* TISTR 3254 และ *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 เปรียบเทียบกับการย่อย soluble starch พบว่าเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยแป้งได้แตกต่างกัน นอกจากนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อรา 5 สายพันธุ์ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่าเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในสภาวะอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารแข็งที่มีรำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวได้ในปริมาณมากกว่าอาหารแข็งถึง 5 เท่า สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมมีดังต่อไปนี้ ใช้แป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เติมเปปโตนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเมื่อเติมเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิดได้แก่ แคลเซียม-คลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ผลผลิตของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงกว่าการเติมเกลือแร่เพียงชนิดเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Abstract

From the studies of the potential of starch hydrolysis from corn starch , cassava starch , sticky-rice starch and rice starch of 5 species of molds, i.e. *Aspergillus oryzae* TISTR 3019 , *A. phoenicis* TISTR 3252 , *A. phoenicis* TISTR 3253 , *A. niger* TISTR 3254 and *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 comparision with soluble starch found that the results were different. Moreover, when the 5 species of molds were grown in liquid media of the 5 types of starch, it was found that *A. niger* TISTR 3254 produced the highest amount of glucoamylase when rice iquid medium was used as carbon source. When the production of glucoamylase from *A. niger* TISTR 3254 in a liquid culture was compared with that in a solid culture, the glucoamylase activity in the liquid culture was 5 times higher than that in the solid culture. The optimal liquid culturecondition for obtaining maximum glucoamylase studied were as follows : 2 % (w/v) rice starch, (carbon source) was mixed with 1% (w/v) peptone (as nitrogen source) and the pH was adjusted to 7.0 followed by shaking in a 30 $^{\circ}$ C shaking incubator at the speed of 200 rpm ; in addition , when the three types of minerals , i.e. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ were added together in the above culture , the glucoamylase produced was higher than those when each of the three minerals was added separately.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| สารบัญ | ค |
| สารบัญตาราง | ง |
| สารบัญรูป | จ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| 2.1 การย่อยสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ | 6 |
| 2.2 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน | 11 |
| 2.3 ความสำคัญของแป้ง | 13 |
| 2.4 ปัจจัยที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยจุลินทรีย์ | 17 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | 21 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 27 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง | 46 |
| เอกสารอ้างอิง | 48 |
| ภาคผนวก | 52 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส | 5 |
| 2. | สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน | 14 |
| 3. | องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ | 16 |
| 4. | แสดงค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) กับ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี | 28 |
| 5. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 58 |
| 6. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 58 |
| 7. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 59 |
| 8. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 59 |
| 9. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 60 |
| 10. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 60 |
| 11. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 61 |
| 12. | แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา A. niger TISTR 3254 | 61 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | แสดงการย่อยสลายแป้งของเอนไซม์ชนิดต่างๆ | 4 |
| 2. | การทำงานของเอนไซมแอลฟาอะไมเลส | 6 |
| 3. | การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส | 7 |
| 4. | การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส | 8 |
| 5. | การทำงานของเอนไซม์ไอโซอะไมเลส | 9 |
| 6. | แสดงกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน | 11 |
| 7. | โครงสร้างของอะไมโลส | 15 |
| 8. | โครงสร้างของอะไมโลเพคติน | 15 |
| 9. | แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3019 | 30 |
| 10. | แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3252 | 30 |
| 11. | แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3253 | 31 |
| 12. | แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 | 31 |
| 13. | แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 | 32 |
| 14. | แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ด้วยอาหารเหลวและอาหารแข็ง | 33 |
| 15. | แสดงชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 | 35 |
| 16. | แสดงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 | 36 |
| 17. | แสดงชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 | 38 |
| 18. | แสดงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 | 39 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)

19. แสดงค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 41

20. แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 42

21. แสดงความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 44

22. แสดงผลของเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 45

ก. แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีแป้งซึ่งเป็นผลผลิตจากธัญพืชหลายชนิด เช่น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด แป้งถั่วเหลือง แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งแป้งชนิดต่างๆ เหล่านี้สามารถนำมาเป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์กลุ่มอะไมโลไลติก (amylolytic enzymes) โดยทั่วไปการผลิตเอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (Metabolites) สามารถสกัดได้จากเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์หรือผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งในกรณีจากแหล่งของจุลินทรีย์นั้นสามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากโดยที่ผลผลิตสามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม หรือการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการผ่าเหล่าและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

แป้งเป็นพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่สำคัญในธรรมชาติ และมนุษย์นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ซึ่งคาร์โบไฮเดรตจะต้องถูกย่อยให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ ที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลนี้อาจกระทำได้โดยใช้กรดหรือเอนไซม์ การย่อย (saccharification) แป้งด้วยกรดนั้นจะไม่สามารถควบคุมหรือผันแปรชนิดของน้ำตาลให้ได้ตามความต้องการ แต่การนำเอนไซม์มาใช้จะทำให้สามารถควบคุมกรรมวิธีการผลิตชนิดของน้ำตาลได้ตามวัตถุประสงค์ เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนี้ได้จากแหล่งต่างๆ กันคือ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การผลิตเอนไซม์จากพืชและสัตว์โดยตรงมีปัญหาหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณวัตถุดิบที่ใช้และต้นทุนการผลิต จึงหันมาผลิตเอนไซม์จากแหล่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตได้ในปริมาณไม่จำกัด อย่างไรก็ตามในขบวนการย่อยนั้นต้องใช้ความร้อนสูง หากสามารถหลีกเลี่ยงการใช้ความร้อนในการทำให้แป้งสุกจะสามารถลดต้นทุนการผลิตลงไปได้อย่างมาก ฉะนั้นการใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้โดยไม่ต้องใช้ความร้อน จะเป็นหนทางในการคลี่คลายปัญหานี้ได้

กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่เซลล์ของจุลินทรีย์ผลิตได้แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ซึ่งจะพบในเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ และเอนไซม์ที่ใช้กันมากในทางการค้าจะผลิตจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* และ *Rhizopus* (Inshik และ Chung , 1989) และพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสจากแป้ง เช่น อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสผง อุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสและฟรุคโตส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมการผลิตลูกกวาด อุตสาหกรรมการทำขนมอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ( brewing ) เครื่องดื่ม ( soft drinks ) ลูกอม ( soft-candy ) และเบเกอรี่ ( bakery ) ( Norman , 1979 ; Manjunath และคณะ , 1983 ; Schrickx และคณะ , 1993 ) เป็นต้น เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีกว่าการใช้น้ำตาลทราย การใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอุตสาหกรรมอื่นๆ นอกเหนือจากนี้ เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมน้ำตาล โดยเฉพาะการผลิตโดยวิธีทางชีวเคมีจากวัตถุดิบประเภทแป้งหรือน้ำตาล

การทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา อาจเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยสนับสนุนให้มีการผลิตเอนไซม์ประเภทนี้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อประเทศในด้านเศรษฐกิจ ทำให้ไม่จำเป็นที่จะต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศแต่เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยสนับสนุนให้มีการใช้วัตถุดิบภายในประเทศที่มีราคาถูกให้เป็นประโยชน์มากขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ soluble starch โดยการเลี้ยงเชื้อราซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เก็บรักษาตามหน่วยงานต่างๆ ในประเทศไทย

1.2.2 ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวและอาหารแข็ง

1.2.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อราที่คัดเลือกได้ตามข้อ 1 และข้อ 2

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เก็บรักษาตามหน่วยงานต่างๆ ในประเทศไทยที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ย่อยสลายแป้งชนิดต่างๆ ได้

1.3.2 ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ทำการศึกษา

1.3.3 เป็นแนวทางในการใช้วัตถุดิบราคาถูกที่มีในประเทศเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า ซึ่งเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต

1.3.4 เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงขึ้นไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.4 ขอบเขตการวิจัย

นำตัวอย่างสายพันธุ์เชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นสับเตรท ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เกิดขึ้น โดยวัดในรูปของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สะสมระหว่างกระบวนการหมักสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Dinitrosalicyclic acid ของ Miller (1959) และวัดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้สายพันธุ์เชื้อราตามที่ต้องการนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวและอาหารแข็ง จากนั้นนำเชื้อราและสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกได้ข้างต้นมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพื่อดูศักยภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา

## 1.5 ขั้นตอนการวิจัย

1.5.1 คัดเลือกชนิดของสายพันธุ์เชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในประเทศไทยที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท

1.5.2 ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อราที่คัดเลือกได้ตามข้อ 1 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวและอาหารแข็ง

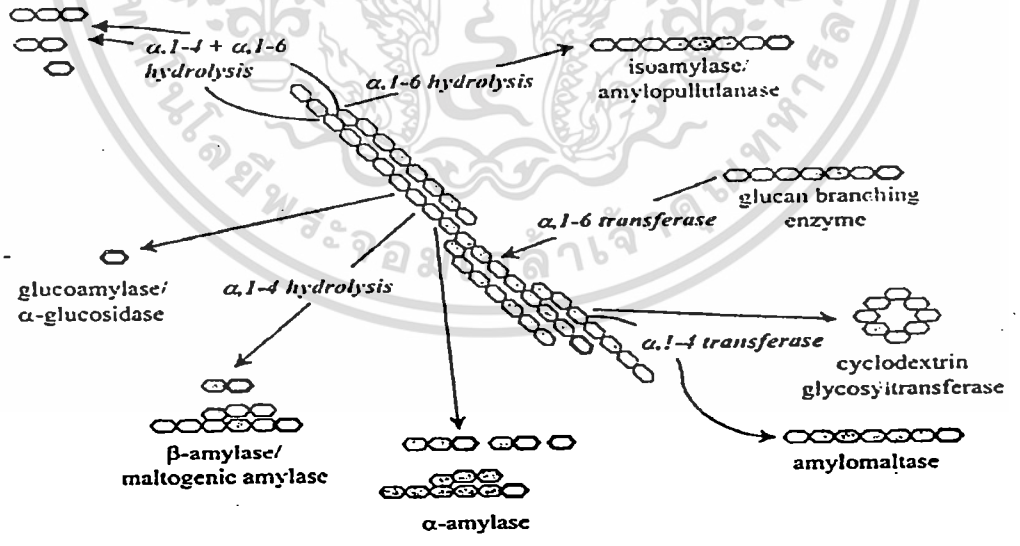
1.5.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่คัดเลือกได้ตามข้อที่ 1 สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในข้อ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2

# การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อะไมเลส (amylase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งสามารถย่อยโมเลกุลแป้งให้ได้เดกซ์ตริน (dextrin) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) จะย่อยสลายแป้งที่พันธะ α-1,4 แบบสุ่ม (random) แต่จะไม่สามารถย่อยสลายที่พันธะ α- 1,6 ในขณะที่ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และพูลูแลนเนส (pullulanase) จะย่อยสลายได้เฉพาะตำแหน่งพันธะ α- 1,6 เท่านั้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ต่างๆ เบตาอะไมเลส (β-amylase) จะย่อยสลายพันธะ α-1,4 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) ให้ได้มอลโตส (maltose) สำหรับกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จะย่อยแป้งที่พันธะ α- 1,3 , α- 1,4 และ α- 1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์เข้าไปทีละโมเลกุล ผลการย่อยจะได้กลูโคส ( glucose ) แม้ว่าอะไมเลสจะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ก็ตาม แต่ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ทุกชนิดในกลุ่มนี้จะย่อยแป้งดิบได้ ทั้งนี้เพราะการย่อยเม็ดแป้งจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีสารจำพวกเฮมิเซลลูโลส ( hemicellulose ) ไขมัน ( fat ) อะไมโลเพคติน ( amylopectin ) และโปรตีน ( protein ) ห่อหุ้มเม็ดแป้งไว้ ( Fogarty , 1983 )




**รูปที่ 1** แสดงการย่อยสลายแป้งของเอนไซม์ชนิดต่างๆ

**ที่มา :** Maarel, J.E.C. van der Marc และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 1** แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส

| คุณสมบัติ | แอลฟา-อะไมเลส | เบตา-อะไมเลส | กลูโคอะไมเลส |
|---|---|---|---|
| กลไกการย่อยแป้ง | ที่กลางโมเลกุลแป้ง (Endo-attack) | ที่ปลายโมเลกุลแป้ง (Exo-attack) | ที่ปลายโมเลกุลแป้ง (Exo-attack) |
| ผลิตภัณฑ์ที่ได้ | โอลิโกแซคคาไรด์ | มอลโตส | กลูโคส |
| ความเร็วในการลดลงของความหนืด | เร็ว | ช้า | ช้า |
| ความเร็วในการเปลี่ยนสีเมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน | เร็ว | ช้า | ช้า |
| ปฏิกิริยาที่จุดแยกแขนง | ไม่ย่อยพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic linkage | ไม่ย่อยพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic linkage | สามารถตัดพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic linkage |
| ความจำเพาะของพันธะ | $\alpha$ -1,4 | $\alpha$ -1,4 | $\alpha$ -1,4<br>$\alpha$ -1,3<br>$\alpha$ -1,6 |

**ที่มา** : Manjunath และคณะ (1983)

## การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์

โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1. Submerged culture (liquid culture) เป็นวิธีที่นิยมใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรีย และกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา โดยเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้เลี้ยงจะฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนชื้น อุณหภูมิ 110-115 °C นาน 15-30 นาที ปริมาณกล้าเชื้อ 3-5 เปอร์เซ็นต์ จะต้องควบคุมการให้อากาศด้วยการกวน วิธีนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิตและควบคุมสภาพต่างๆได้ง่าย แต่มีข้อเสีย คือมีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่ายและประสิทธิภาพของเชื้อลดลง จึงจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงๆอยู่เสมอ

2. Surface culture วิธีนี้นิยมใช้กับเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย โดยจะเลี้ยงเชื้อในสภาพที่เป็น mold bran คือมีรำข้าวและน้ำอยู่ มีความชื้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และจะแบ่งเป็นวิธีย่อยต่างๆกันขึ้นกับภาชนะที่ใช้ เช่นท่อกระบอก ( drum method ) หรือถาด ( Tray-chamber method ) วิธีนี้เป็นที่

เอกสารนี้ได้รับการคุ้มครองลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

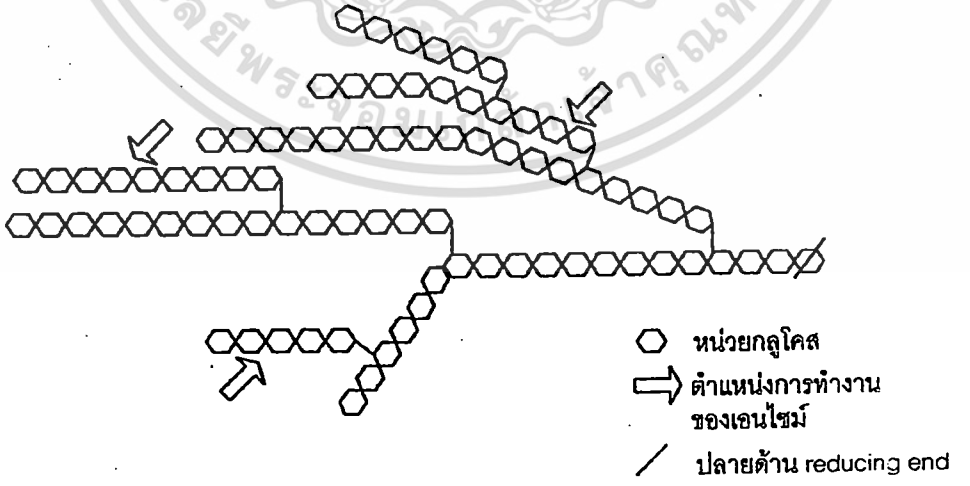
นิยมเพราะสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดแต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้แรงงานจำนวนมากกว่าแบบ submerged culture แต่เหมาะสำหรับประเทศที่มีค่าแรงงานถูก มีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นง่ายกว่าการเลี้ยงแบบ submerged culture

## การย่อยสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ (enzymatical hydrolysis)

เมื่อพิจารณาตามลักษณะของการทำงานของเอนไซม์ จะแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

### 1. เอนไซม์ย่อยภายในเส้นสายของกลูโคส (endo-enzyme)

1.1 แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase ; EC 3.2.1.1 ; $\alpha$ (1,4)-glucan glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลแป้ง โดยจะตัดโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จับกันด้วยพันธะ $\alpha$ -1,4 เท่านั้นไม่สามารถตัดพันธะ $\alpha$ -1,6 ได้ ลักษณะการทำงานเป็นการสุ่มตัดภายในเส้นสายของกลูโคสดังแสดงในรูปที่ 2 เอนไซม์ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน การทำงานของเอนไซม์ต้องการ $Ca^{++}$ ร่วมทำกิจกรรม เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5.5-9 และที่อุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส แอลฟาอะไมเลสสามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ เชื้อรา และแบคทีเรีย ในทางอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะเอนไซม์จากแบคทีเรียซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เมื่อใช้แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสารละลายแป้งจะทำให้ความหนืดและความสามารถในการย้อมติดสีไอโอดีนลดลงอย่างรวดเร็ว



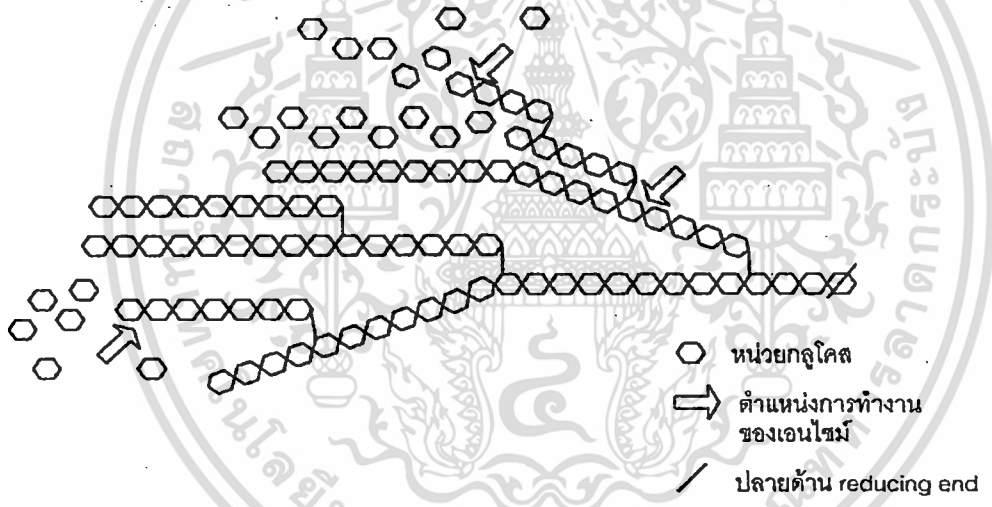

**รูปที่ 2** การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

**ที่มา** : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2. เอนไซม์ย่อยปลายสายของกลูโคส (exo-enzyme)**

2.1 กลูโคอะไมเลส (glucoamylase ; EC 3.2.1.3 ; α (1,4)-glucan glucohydrolase) หรือเรียกว่า อะไมโลกลูโคสิเดส (amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดน้ำตาลกลูโคสที่จับกันด้วยพันธะ α -1,4 และ พันธะกิ่ง α -1,6 โดยการตัดพันธะกิ่งจะเกิดขึ้นช้ากว่าการตัดพันธะ α -1,4 ดังแสดงการทำงานในรูปที่ 3 ในการย่อยแป้งให้ได้โมเลกุลของกลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการ cofactor ในการทำกิจกรรม เอนไซม์ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-110 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 3.5-5 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส กลูโคอะไมเลสพบในจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus niger A. oryzae* และ *Rhizopus* spp.



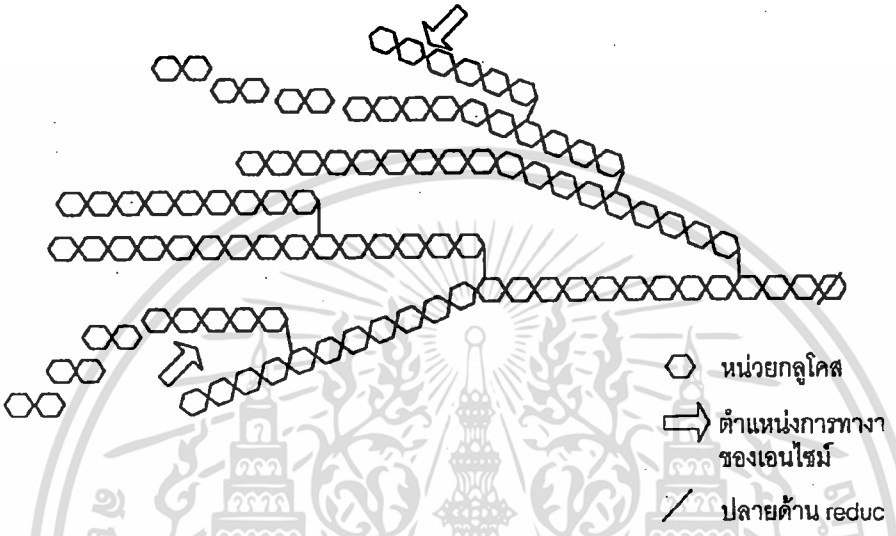

**รูปที่ 3** การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

**ที่มา :** Bruinenberg (1996)

2.2 เบต้าอะไมเลส (beta-amylase ; EC 3.2.1.2 ; α (1,4)-glucan maltohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะจากภายนอกเข้ามาภายใน โดยเริ่มจากปลายของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคติน (ปลายด้าน non- reducing end) เอนไซม์จะตัดพันธะ α -1,4 ของโมเลกุลกลูโคสเป็นคู่ๆ ไป ผลที่ได้จะเป็นน้ำตาลมอลโตส แต่เมื่อปฏิกิริยาเข้าใกล้จุดที่เป็นกิ่งก้านหรือพันธะ α -1,6 ของอะไมโลเพคติน เอนไซม์จะหยุดกิจกรรมทำให้เหลือโมเลกุลใหญ่ๆ ไว้มาก ดังแสดงในรูปที่ 4 เบต้าอะไมเลสต้องการ $Ca^{++}$ ในการทำกิจกรรม พบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในพืชชั้นสูง เมล็ดธัญพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และพบได้ในถั่วหรือมันฝรั่งหวาน นอกจากนี้ยังสามารถสกัดเอนไซม์เบต้าอะไมเลสได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 4-9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส



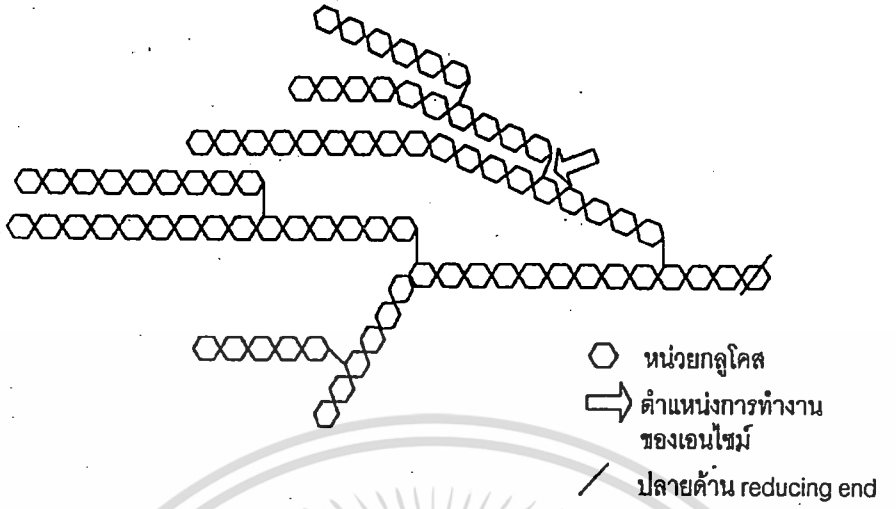

**รูปที่ 4** การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส
**ที่มา :** Bruinenberg (1996)

3. เอนไซม์ย่อยสายโซ่ข้าง (debranching enzyme)

3.1 ไอโซอะไมเลส (isoamylase ; EC 3.2.1.68 ; glucogen-6-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยจุดที่เป็นกิ่งก้านของไกลโคเจนและอะไมโลเพคตินได้ดี แสดงการทำงานแสดงดังรูปที่ 5 ไม่ต้องการ cofactor ในการทำกิจกรรม สามารถดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอช 3-4 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้สามารถแยกได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas amylodermosa*

3.2 พูลูลาเนส (pullulanase ; EC 3.2.1.41 ; pullulan 6- glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะ $\alpha$ -1,6 ของพูลูแลน (pullulan) อะไมโลเพคติน แต่การทำกิจกรรมไม่สมบูรณ์เท่ากับการย่อยโดยไอโซอะไมเลส และทำกิจกรรมกับไกลโคเจนได้ยาก สามารถย่อยได้สายกลูโคสที่มีความยาว 2-3 หน่วย ไม่สามารถย่อยจนได้กลูโคส 1 หน่วย เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในพืช สัตว์ และแบคทีเรีย เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 4.5-5.5 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 5** การทำงานของเอนไซม์ไอโซอะไมเลส
**ที่มา :** Bruinenberg (1996)

## สารให้ความหวานและอนุพันธ์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง

การผลิตสารให้ความหวานที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง เริ่มตั้งแต่การผลิตน้ำหวานจากหัว arrowroot ในประเทศญี่ปุ่น ในศตวรรษที่ 9 รวมถึงการผลิตน้ำหวานจากการย่อยแป้งมันฝรั่งด้วยกรด การผลิตน้ำหวานจากการย่อยแป้งโดยกรดได้พัฒนาเป็นอย่างมากในช่วงปี 1880-1920 ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า "starch sugar" หรือ "starch syrup" โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวย่อย สามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายได้ดีพอสมควร ต่อมาสามารถตกผลึกน้ำตาลกลูโคสได้เรียกว่า "solid starch sugar" ส่วนของเหลวที่ได้ออกมาเรียกว่า "hydrol" ในระยะแรกเรียกผลิตภัณฑ์ solid starch sugar ว่า chip sugar และที่มีการจดลิขสิทธิ์ในรุ่นแรก เช่น US 259794 (Schenck และ Hebeda,1992) ในช่วง ค.ศ. 1940 ความต้องการ starch syrup หรือ solid starch sugar ซึ่งต่อมาเรียกว่า เดกซ์โทรสโมโนไฮเดรต (dextrose monohydrate) มีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าความสามารถในการผลิตถึง 10 เท่าตัว การพัฒนากรรมวิธีการผลิตเป็นไปอย่างลำบากเพราะการย่อยด้วยกรดมีปัญหาเกี่ยวกับปฏิกิริยาต่อเนื่องและเกิดปรากฏการณ์ เช่นการรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่ (polymerization) และการเกิดสารให้สีพวก 5-hydroxy methylfurfural (HMF) ทำให้การผลิต starch syrup หรือ "glucose syrup" หรือ "corn syrup" (ในอเมริกาทำจากแป้งข้าวโพด) หรือที่ในภาษาไทยเรียกว่า "น้ำเชื่อมกลูโคส" (มอก. 268-2521) ที่มีค่าความหวานสูงสุดทำได้ยาก จึงได้ให้ความสนใจกับการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้เอนไซม์ย่อยแป้งเป็นที่รู้จักกันดีในแถบเอเชีย เช่น ข้าวหมาก สาเก ซึ่งถูกหมักในกระบวนการผลิตแบบพื้นฐาน มีการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อรา ซึ่งมีการศึกษากันมากในช่วงปี 1950-1957 มีการสร้างโรงงานแห่งแรกที่ผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสโดยเอนไซม์อะไมโลกลูโคสิเดสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* (Schenck และ Hebeda,1992) และ Marshall และ Kooi (1957) ค้นพบเอนไซม์ไอโซเมอเรสที่สามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสได้ (จาก *Pseudomonas hydrophila*) และจดลิขสิทธิ์ครั้งแรกในปี 1960 ซึ่งมีการพยายามผลิตน้ำตาลผสมหรือน้ำเชื่อมกลูโคสที่มีน้ำตาลฟรักโทสผสมอยู่ ในปี 1965 บริษัท Clinton Corn Processing ร่วมมือกับหน่วยงานทางวิทยาศาสตร์ของประเทศญี่ปุ่นผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสชนิดมีฟรักโทสผสมอยู่ด้วย ในปี 1967 น้ำเชื่อมกลูโคสที่มีฟรักโทสผสม (ฟรักโทสประมาณ 14-16 เปอร์เซ็นต์) ถูกส่งมาจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อจำหน่ายในสหรัฐอเมริกา ในช่วงแรกเรียกน้ำเชื่อมชนิดนี้ว่า "Isoglucose syrup" หรือ "Iso-syrup" หมายถึงน้ำเชื่อมที่มีไอโซเมอร์ของกลูโคสผสมอยู่ (โดยในกระบวนการผลิตใช้ทั้งเอนไซม์อะไมเลสและไอโซอะไมเลส) จนกระทั่งปี 1968 ได้นำเอนไซม์ไอโซอะไมเลสมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมสามารถผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสที่มีน้ำตาลฟรักโทสอยู่ปริมาณสูงสุดในเชิงการค้า ซึ่งในลักษณะสมดุลมีฟรักโทสอยู่ถึง 42 เปอร์เซ็นต์ของของแข็งทั้งหมด (ใน 100 เปอร์เซ็นต์ ของของแข็งทั้งหมดมีน้ำตาลกลูโคส 51 เปอร์เซ็นต์) และเป็นที่มาของการเรียกน้ำเชื่อมชนิดนี้ว่า high fructose syrup เพราะมีฟรักโทสสูงกว่าที่เคยมีในระดับ 14-16 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ในสหรัฐอเมริกาใช้แต่แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ จึงเรียกน้ำเชื่อมชนิดนี้ว่า high fructose corn syrup (HFCS) สำหรับประเทศไทยเรียกว่า น้ำเชื่อมฟรักโทส หรือ high fructose syrup เพราะการผลิตในประเทศไทยไม่ได้ใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus เช่น *Bacillus subtilis* ทำให้ช่วงปี 1970 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสถือได้ว่าเป็นกระบวนการผลิตโดยการใช้เอนไซม์ทั้งหมด (ผสมขั้นตอนระหว่างการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียและเชื้อราเรียกว่า enzyme/enzyme process) และถือได้ว่าในช่วงปี ค.ศ.1970 เป็นปีของการเจริญเติบโตในเรื่องของเทคโนโลยีการย่อยแป้งอย่างแท้จริง การใช้เอนไซม์ในขบวนการผลิตสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น การผลิตกลูโคสผง (dextrose monohydrate หรือ dextrose anhydrous) ทำได้ง่ายขึ้น เพราะน้ำเชื่อมกลูโคสมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นกว่าระบบเดิม ในช่วงของปี 1978 เริ่มมีการนำเทคโนโลยีการแยกแบบโครมาโทรกราฟฟิก (chromatographic seperation) มาใช้ ทำให้สามารถแยกน้ำตาลฟรักโทสส่วนใหญ่ออกจากน้ำเชื่อมได้ และผลิตน้ำเชื่อม HFCS ชนิดมีน้ำตาลฟรักโทสสูงถึง 55 % ได้ บางครั้งเรียกว่า enriched fructose syrup ซึ่งในระดับที่มีน้ำตาลฟรักโทสอยู่ 42% ความหวานของ HFCS จะมีค่าเท่ากับความหวานของสารละลายน้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) ในความเข้มข้นของสารละลายที่เท่ากัน (สารละลาย 10 % ที่อุณหภูมิห้อง ) ฉะนั้น HFCS ที่มีน้ำตาลฟรักโทสอยู่ 55% จะมีความหวานที่สูงกว่า ในปี 1980 บริษัทโคคาโคล่าในสหรัฐอเมริกาทดแทนการใช้น้ำตาลทราย 50% โดย HFCS ชนิด 55% ฟรักโทส ในปี 1983 ทั้งบริษัทโคคาโคล่าและเปปซี่ในสหรัฐอเมริกาทดแทนการใช้น้ำตาลทราย 50%

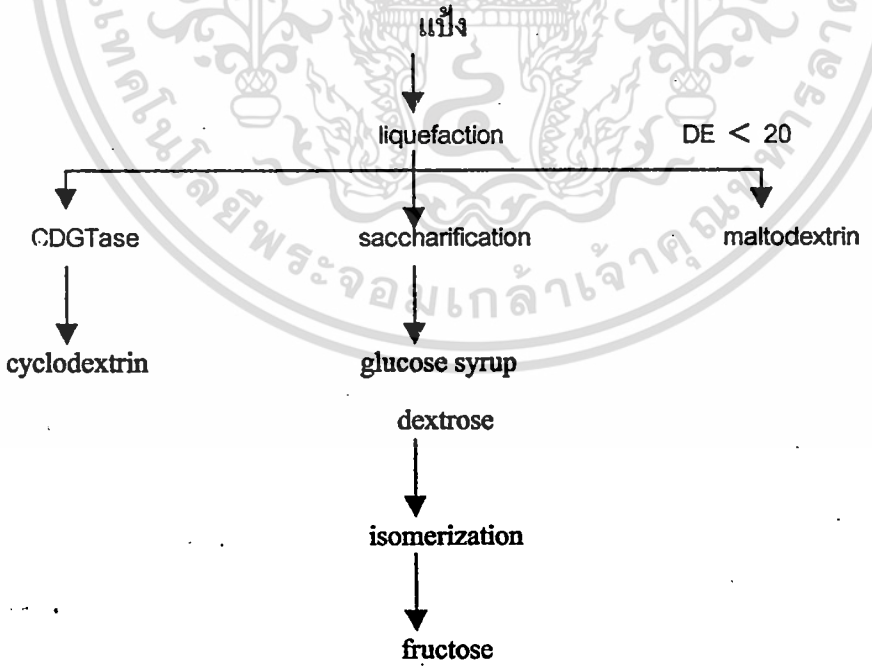
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และในปี 1984 ทั้งสองบริษัทใช้น้ำหวาน HFCS ชนิด 55% ฟรักโทสทดแทนการใช้น้ำตาลทรายทั้งหมด (Schenck และ Hebada, 1992) เทคโนโลยีการแยกแบบโครมาโทรกราฟฟีกได้ทำการผลิตน้ำตาลฟรักโทสบริสุทธิ์หรือในรูปผงทำได้ง่ายขึ้น การพัฒนาน้ำเชื่อมจากแป้งถือได้ว่ามาถึงจุดสูงสุดของการวิวัฒนาการ

สำหรับประเทศไทยมีการผลิตผลิตภัณฑ์จากการย่อยแป้งมานาน เช่น ข้าวหมาก หรือเหล้าโรง ซึ่งใช้เอนไซม์จากเชื้อราในลูกแป้งเป็นตัวย่อยแป้งในข้าวเหนียว ในระดับพื้นบ้านมีการผลิตแบะแซโดยใช้เอนไซม์จากต้นข้าวสาลี ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยปลายข้าวเหนียว ในระดับอุตสาหกรรมน้ำเชื่อมกลูโคสถือได้ว่าเริ่มเกิดขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2492 โดยบริษัท ประเสริฐชัย จำกัด ปัจจุบันมีการย่อยแป้งเพื่อเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสทั่วประเทศมากกว่า 200,000 ตันต่อปี โดยประมาณ 100,000 ตันต่อปี ใช้เป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมผงชูรสและแอล-ไลซีน (L-lysine) TDRI (1992) ประมาณความต้องการทั้งหมดของอุตสาหกรรมย่อยแป้งในปี พ.ศ. 2544 ว่าจะเพิ่มขึ้นถึงเกือบ 300,000 ตัน การผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องมีเฉพาะซอร์บิทอล ส่วนกรดกลูโคนิกและแมนนิทอลไม่มีรายงาน การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสที่ใช้แป้งมากที่สุดในประเทศไทยใช้สำหรับการหมักต่อเนื่อง เช่น การผลิตผงชูรสและแอล-ไลซีนของบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด

## การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน

เมื่อแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งานสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ดังรูปที่ 6




**รูปที่ 6** แสดงกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน
**ที่มา :** กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**กลุ่มเอนไซม์เพื่อการ liquefaction**

ในการย่อยแป้งเพื่อจะผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง ซึ่งก็คือกลูโคสนั้นจะต้องมีขั้นตอนที่ทำให้น้ำแป้งสุกแล้วเป็นของเหลวมีความหนืดต่ำก่อนที่จะนำไปทำการผลิตต่อไป ดังนั้นเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการทำให้น้ำแป้งเป็นของเหลวที่มีความหนืดน้อย (liquefaction) ถือว่าเป็นการย่อยครั้งแรกของกระบวนการย่อยสลายแป้ง เอนไซม์ควรเป็นประเภท endo-enzyme คือทำงานหรือตัดพันธะภายในโมเลกุลของแป้ง เพื่อที่จะทำให้แป้งถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ เท่าๆ กันในเวลาสั้น (สั้นกว่า exo-enzyme) เป็นของเหลวที่ค่อนข้างสมบูรณ์และมีความหนืดต่ำ มีค่า DE (dextrose equivalent) ต่ำกว่า 20 โอกาสที่แป้งจะจับตัวเป็นไปได้ต่ำ

**กลุ่มเอนไซม์เพื่อการ saccharification**

saccharification หมายถึง ระดับการย่อยแป้งที่มากขึ้น ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น (DE สูงขึ้น) น้ำแป้งเกิดรสหวานเป็นน้ำเชื่อม ปกติจะพบการใช้เอนไซม์อยู่ 2 กลุ่ม คือ

**การย่อยเพื่อให้ได้น้ำเชื่อมชนิด 38-42 DE**

น้ำเชื่อมกลูโคสขนาด 38-42 DE มีความเหนียว ความหวานพอดี เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไปใช้ endo-enzyme เพื่อให้แป้งถูกย่อยจากภายในเส้นสาย มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหลืออยู่ต่ำพอที่จะไม่เกิดการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) และเกิดน้ำตาลชนิดต่างๆ (กลูโคส มอลโตส ฯลฯ) ที่สร้างความหวานขึ้น เอนไซม์ที่เหมาะสมกับการผลิตน้ำเชื่อมชนิดนี้ คือ แอลฟา-อะไมเลส ที่สกัดจากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อราจะมีคุณสมบัติที่คล้ายๆ กันคือ อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำแป้งที่เหมาะสมเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชอยู่ที่ 3-8 (ปกติใช้ที่ 4-5) และต้องใช้ความร้อนในการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์

**การย่อยเพื่อให้ได้เอนไซม์ DE สูง (DE > 95)**

ในการผลิตน้ำตาลกลูโคสเพื่อที่จะทำเป็นวัตถุดิบของการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องต่อไป เช่น น้ำตาลฟรักโทส ซอร์บิทอล หรือทำกลูโคสผง (เดกซ์โทรส) ชนิดต่างๆ จำเป็นต้องใช้น้ำเชื่อมขนาดที่มีความบริสุทธิ์สูง หมายถึงมีจำนวนน้ำตาลกลูโคสต่อของแข็งทั้งหมดสูง หรือ DE สูงกว่า 95 · การย่อยจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ประเภท exo-enzyme ที่ย่อยจากปลายสายเข้ามาและสามารถย่อยพันธะได้ทั้ง $\alpha$ -1,4 และ $\alpha$ -1,6 ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวคือ กลูโคอะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคสิเดส ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* ลักษณะของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือมีความสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส) ค่าพีเอชประมาณ 4-6 (พีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5) ความเข้มข้นของน้ำแป้ง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือมีความสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส) ค่าพีเอชประมาณ 4-6 (พีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5) ความเข้มข้นของน้ำแป้งประมาณ 30-35 เปอร์เซ็นต์ ไม่ต้องการแคลเซียมในการร่วมกิจกรรม จำเป็นต้องใช้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมก่อนที่จะดำเนินกระบวนการผลิตต่อไป บางกรณีมีการใช้เอนไซม์ที่ตัดพันธะ $\alpha$-1,6 เช่น เอนไซม์พูลูลาเนสร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะทำให้การทำงานเร็วขึ้น

## ความสำคัญของแป้ง

แป้งเป็นพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่สำคัญในธรรมชาติ และมนุษย์นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชชั้นสูง พบในคลอโรพลาสต์ (ในใบ) และในส่วนที่พืชใช้เป็นแหล่งเก็บอาหาร เช่น เมล็ด หัว และราก มนุษย์ได้รับแป้งจากพืชแตกต่างกันตามภูมิประเทศในโลก ทางด้านทวีปอเมริกาเหนือและกลางจะมีข้าวโพด ข้าวสาลี เป็นแหล่งให้แป้งที่สำคัญ ทางยุโรปมีมันฝรั่ง และแถบเอเชีย แอฟริกามีข้าวและมันสำปะหลัง เป็นต้น จะเห็นได้ว่าแป้งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในโภชนาการของมนุษย์ อาหารทั้งหมดส่วนใหญ่จะมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักของทุกชนชาติ

ถึงแม้ว่าบทบาทที่สำคัญของแป้งคือ ใช้เป็นแหล่งอาหารพลังงานสูงของมนุษย์ แต่จากคุณสมบัติเฉพาะของแป้งจึงได้มีการนำแป้งมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของอาหาร ทำให้เกิดเจล ควบคุมความคงตัวและเนื้อสัมผัสของอาหารจำพวกซอส ซุปและน้ำปรุงรสอาหาร ป้องกันเนื้อสัมผัสของอาหารเสียรูปเนื่องจากกระบวนการแช่แข็งและคืนรูป (freeze-thaw) สภาวะกรด เป็นต้น นอกจากใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว ยังมีการนำแป้งมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมกาว และอุตสาหกรรมแป้งดัดแปร (modified starch) เป็นต้น

คำว่า "แป้ง" ในการผลิตนั้นหมายถึงคาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ มีสิ่งอื่นเจือปนเช่น โปรตีน ไขมันและเกลือแร่ในปริมาณที่น้อยมาก ส่วนแป้งที่ผลิตโดยทั่วไปที่ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อยู่มาก จะเรียกว่า ฟลาว (flour) ตัวอย่างเช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาลี ถ้ายังมีส่วนประกอบของโปรตีนสูงก็จะจัดอยู่ในประเภทฟลาว เรียกว่า corn flour wheat flour เช่นเดียวกันกับแป้งข้าวเจ้าที่ยังมีปริมาณโปรตีน 7 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ ก็เรียกว่า rice flour แต่เมื่อสิ่งเจือปนอันหมายถึงโปรตีน ไขมัน เกลือแร่อื่นๆ ถูกสกัดออกไปจนเหลือแป้งบริสุทธิ์เป็นส่วนใหญ่ จึงเรียกว่าเป็นแป้งสตาร์ช (starch) เช่น corn starch wheat starch เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับแป้งที่ผลิตในประเทศไทย ปัจจุบันโดยกรรมวิธีการผลิตที่ทันสมัย ทำให้แป้งที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์สูง จึงจัดเป็นแป้งสตาร์ช และเนื่องจากแป้งสตาร์ชมีความบริสุทธิ์สูง จึงถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในรูปของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาต่างๆ มากมาย ในบางครั้งแป้งสตาร์ชที่ยังไม่ได้ถูกทำการดัดแปรหรือแปรรูป นิยมเรียกว่า แป้งดิบ (raw starch หรือ native starch) ซึ่งจะตรงกันข้ามกับแป้งที่ถูกดัดแปรหรือแปรรูปแล้ว ที่เรียกว่า โมดิไฟด์สตาร์ช (modified starch) หรือแป้งดัดแปร (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล , 2543)

## องค์ประกอบภายในแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 ต่อ 10 ต่อ 5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วย anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่า reducing end group แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือพอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพคติน)

**ตารางที่ 2** สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

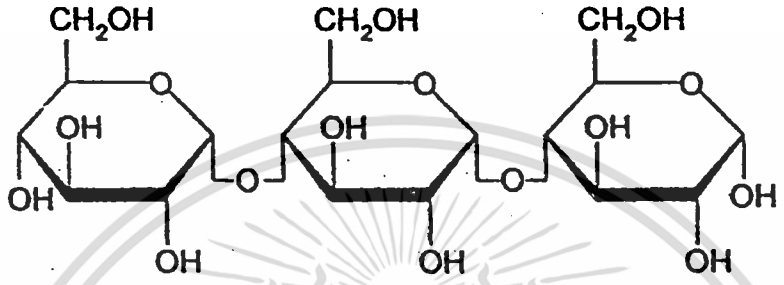
| คุณสมบัติ | อะไมโลส | อะไมโลเพคติน |
|---|---|---|
| ลักษณะโครงสร้าง | กลูโคสต่อกันเป็นเส้นตรง | กลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน |
| พันธะที่จับ | $\alpha$-1,4 | $\alpha$-1,4 และ $\alpha$-1,6 |
| ขนาด | 200-2,000 หน่วยกลูโคส | มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส |
| การละลาย | ละลายน้ำได้น้อยกว่า | ละลายน้ำได้ดีกว่า |
| การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน | ให้สีน้ำเงิน | ให้สีม่วงแดง |
| การจับตัว | เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง | ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง |

ที่มา : Beynum และ Roels (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**อะไมโลส (amylose)**

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-glucosidic linkage แสดงดังรูปที่ 7 อะไมโลสมีอยู่ในแป้ง 15 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์

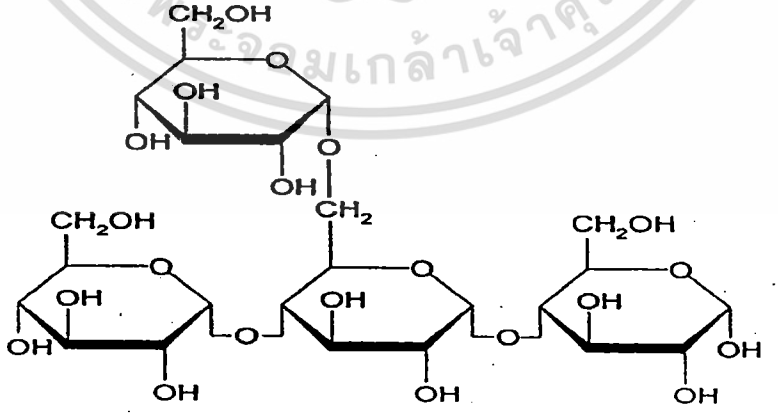


**รูปที่ 7** โครงสร้างของอะไมโลส

**ที่มา :** กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

**อะไมโลเพคติน (amylopectin)**

อะไมโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-glucosidic linkage และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้น เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,6-glucosidic linkage แสดงดังรูปที่ 8



**รูปที่ 8** โครงสร้างของอะไมโลเพคติน

**ที่มา :** กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ

| ชนิดแป้ง | ปริมาณอะไมโลส (%) | ปริมาณอะไมโล-เพคติน (%) | ความชื้น 65% RH, 20°C | ไขมัน (%) | โปรตีน (%) | เถ้า (%) | ฟอสฟอรัส (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| แป้งข้าวโพด | 28 | 72 | 13 | 0.6 | 0.35 | 0.1 | 0.015 |
| แป้งมันสำปะหลัง | 17 | 83 | 13 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.01 |
| แป้งสาลี | 28 | 72 | 14 | 0.8 | 0.4 | 0.15 | 0.06 |
| แป้งมันฝรั่ง | 21 | 79 | 19 | 0.05 | 0.06 | 0.4 | 0.08 |
| แป้งข้าวเจ้า | 17 | 83 | 13 | 0.8 | 0.45 | 0.5 | 0.1 |

ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

## ผลที่เกิดจากเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้ง

เมื่อแป้งถูกย่อยด้วยอะไมเลสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ดังนี้

1. มีความเป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น
2. การให้สีกับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป
3. ความหนืดลดลง
4. ความสามารถในการเบี่ยงเบนแสง ( optical rotation ) ลดลง

จากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนำมาใช้ในการตรวจหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ เช่น ตรวจจากความหนืดที่ลดลง ดูการเปลี่ยนจากโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็กโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของไอโอดีน และการตรวจหากลูโคสจากการวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น วิธีของ A.O.A.C. ( 1990 ) วิธีของ Nelson Somogyi ( 1944 ) และวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller ( 1959 ) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



## การนำเอนไซม์อะไมเลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

1. อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงบนเครื่องทอ ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดได้ง่าย ดังนั้นก่อนที่จะเอามาทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้ง เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนจึงต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อน เพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีการที่กล่าวมาใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม

2.อุตสาหกรรมทำขนมปัง แป้งที่ใช้ในการทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิด dextrinoinic enzyme ลงไปเพื่อย่อยโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลง แล้วเติมชนิด saccharogenic enzyme ลงไปเพื่อเปลี่ยนแป้งบางส่วนให้เป็นน้ำตาล

3. การทำน้ำผลไม้ให้ใส ปกติผลไม้ดิบจะมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่อะไมเลสลงไปบ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 - 90 องศาฟาเรนไฮต์ หลังจากนั้นก็กรองน้ำตาลออกสามารถนำไปทำเยลลี่ได้

4. การผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ใช้เป็นครั้งแรกในประเทศจีน โดยผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นญี่ปุ่นก็นำหลักการนี้มาผลิตแอลกอฮอล์ประมาณ 1,700 ปี มาแล้ว ซึ่งแตกต่างจากยุโรปและอเมริกาที่จะใช้ข้าวมอลท์กันในระยะแรก แต่ปัจจุบันทั้งยุโรปและอเมริกาต่างก็หันมาใช้เอนไซม์จากราแทนเอนไซม์จากข้าวมอลท์

5. การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง ระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆ จะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด เกิดการย่อยแบบสุ่มจึงได้สารหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส และเตตราแซคคาไรด์ ทำให้เกิดสารเจนติโอไบโอส (gentiobiose) กรดลีวูลินิค (levulinic acid) และสารพวกเฟอฟิวรัส (ferfurus) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดีเกิดขึ้น ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคส เป็นต้น ( เต็มศิริ และคณะ ,2543 )

## ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยจุลินทรีย์

โดยทั่วไปเอนไซม์สามารถสกัดได้จากเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ หรือผลิตได้จากแหล่งของจุลินทรีย์ ซึ่งในกรณีจากแหล่งของจุลินทรีย์นั้นสามารถผลิตได้ในปริมาณมากโดยที่ผลผลิตสามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ (ประวิทย์และสาโรจน์, 2538) ซึ่ง Bergmann และคณะ (1988) ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ อาหารที่ประกอบด้วยแป้งที่ไม่ละลายน้ำ และยากต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50449

แอลฟา อะไมเลส ผลการทดลองพบว่าคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus* sp. K-27 (เชื้อรา) และ *Hansenula* sp. K-28 (ยีสต์) ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ สามารถย่อยแป้งแล้วได้เฉพาะกลูโคสเท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ที่ 3 ได้แก่ *Bacillus* sp. K-2 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส แล้วได้ผลผลิตเป็นกลูโคสและมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายแป้งข้าวโพดได้อย่างรวดเร็ว และ Elegado และ Fujio (1993) ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* sp. จำนวน 48 สายพันธุ์ และ *Aspergillus niger* อีก 2 สายพันธุ์ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งดิบ ผลการคัดเลือกได้ *Rhizopus* sp. 39 สายพันธุ์ และ *Rhizopus* sp. แท้จริง 9 สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหารแข็งรำข้าวสาลี เมื่อทำการวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้ง (soluble starch) และแป้งดิบ พบว่า *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ IFO 4697 และสายพันธุ์ F 75 และ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ K-20 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด นอกจากนั้น Sukara และ Doelle (1989) สามารถแยกเชื้อรา *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ใหม่ จากเทมเป้ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวอินโดนีเซีย คือ *R. oligosporus* สายพันธุ์ UQM 186F โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีนเซลล์เดียวด้วยการย่อยแป้งจากหัวมันสำปะหลังโดยตรง อีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณสูงอีกด้วย

สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดย Soccol และคณะ (1994) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ในสภาวะอาหารแข็งที่ใช้แป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. จำนวน 19 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ที่เจริญบนแป้งมันสำปะหลังดิบได้ ส่วนการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในแป้งมันสำปะหลังดิบมีปริมาณมากกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราบนแป้งมันสำปะหลังที่สุกแล้ว ส่วน Alazard และ Raimbault (1981) ทำการรายงานการผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมโลไลติก โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งโดยการใช้แป้งมันสำปะหลัง พบว่า *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สภาวะ นอกจากนี้จากการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะของการเลี้ยงเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. 48 สายพันธุ์ (Morita และคณะ , 1998) บนพื้นฐานของปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ใช้ พบว่าสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวจะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมากกว่าสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง ซึ่งมีค่ามากกว่า 2.3 ถึง 4.6 เท่า นอกจากนั้นปริมาณความชื้นที่มีต่อการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็งถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ เนื่องจากหากมีปริมาณความชื้นมากเกินไปจะลดรูพรุนของสับสเตรท ทำให้จับตัวกันจนเหนียวหนืด ส่งผลให้การถ่ายเทออกซิเจนลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่การละลายได้ของสารอาหารจะต่ำเมื่อปริมาณความชื้นลดลง (Lonsan และ Remesh , 1990) นอกจากนี้ Ramadas และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง โดยแปรผันปริมาณความชื้นระหว่าง 40 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไม-เลสสูงสุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 60 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์

แหล่งคาร์บอน (carbon source) และแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ถือเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส มีรายงานของ Sadhukhan และคณะ (1990) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมโลไลติกโดยเชื้อรา เมื่อใช้แป้ง เซลลูโลส และน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์จะมีมากที่สุดเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือ น้ำตาลมอลโตส ส่วนแหล่งไนโตรเจน มีการใช้ไนโตรเจนความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทกับโพแทสเซียมไนเตรท การเจริญของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์จะมีลักษณะคล้ายกัน คือให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างสูง ในส่วนของกรดอะมิโนพบว่าฟีนิลอะลานีน และฮีสติดีนจะกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลสแต่จะให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ค่อนข้างน้อย มีรายงานของ Li และคณะ (1998) ได้ทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยผลการทดลองพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยแป้ง (soluble starch) อะไมโลส อะไมโลเพคติน เดกซตริน ไกลโคเจน และมอลโตส โดยพบว่าแป้งเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส นอกจากนี้ Pandey และคณะ (1994) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญบนอาหารแข็งรำข้าวสาลีโดยเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมฟอสเฟต ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor)กับเปปโตน (peptone) ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปอันได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้ Morita และ Fujio (2000) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งดิบ ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ MKU 40 ในอาหารเหลวที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ นีโอเปปโตน (Neopeptone) เคซีนจากนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Milk casein) และเนื้อสกัด (Meat extract) ผลการทดลองพบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นสูงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของ *Rhizopus* sp. มีค่าลดลง

นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจะมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแล้วยังมีผลของอุณหภูมิและค่าพีเอชเข้ามาเกี่ยวข้องโดย Sadhukhan และคณะ(1990) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อราสังเคราะห์เอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และสังเคราะห์ได้ต่ำเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสและมากกว่า 55 องศาเซลเซียส และมีรายงานของ Sukara และ Doelle (1989) แสดงผลของอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากหัวมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *R. oligosporus* สายพันธุ์ UQM 186F พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมได้แก่ ค่าพีเอชระหว่าง 4.5 ถึง 5.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิระหว่าง 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Li และคณะ (1998) ได้ทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ผลการทดลองพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

ผลของอิออนของโลหะ (metal ion) ต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยศึกษาผลของ $Ca^{2+}$ $Mn^{2+}$ $Mg^{2+}$ $Cu^{2+}$ $Cd^{2+}$ $Co^{2+}$ $Zn^{2+}$ และ $Ba^{2+}$ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมอิออนของโลหะ พบว่า $Cu^{2+}$ $Cd^{2+}$ $Co^{2+}$ และ $Zn^{2+}$ จะยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ ส่วน $Ba^{2+}$ จะกระตุ้นการเจริญพอสมควรและจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ แต่ $Mg^{2+}$ จะกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดแต่ไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อรา (Sadhukhan และคณะ, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 จุลินทรีย์

3.1.1 *Aspergillus oryzae* TISTR 3019

3.1.2 *Aspergillus phoenicis* TISTR 3252

3.1.3 *Aspergillus phoenicis* TISTR 3253

3.1.4 *Aspergillus niger* TISTR 3254

3.1.5 *Rhizopus oryzae* TISTR 3165

จุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้รับจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บรักษาไว้ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการ sub culture ทุกๆ เดือน

## 3.2 แป้ง

3.2.1 soluble starch

3.2.2 แป้งข้าวโพด ตราไมซินา

3.2.3 แป้งมันสำปะหลัง ตราปลาไทย 5 ดาว

3.2.4 แป้งข้าวเหนียว ตราทานตะวัน

3.2.5 แป้งข้าวเจ้า ตราทานตะวัน

แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้าเป็นแป้งที่ผลิตในประเทศไทย

## 3.3 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา

3.3.1 อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 ชนิด เพื่อเป็น stock culture (ภาคผนวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 อาหารแข็งสูตร chemical defined meium เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราในการศึกษาศักยภาพในการย่อยสลายแป้งชนิดต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับอาหารสูตร starch agar (ภาคผนวก)

3.3.3 อาหารเหลว chemical defined meium ทำการแปรผันแหล่งคาร์บอน โดยใช้แป้ง 5 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งชนิดต่างๆ (ภาคผนวก)

3.3.4 อาหารแข็งรำข้าวเจ้า เป็นอาหารแข็งที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งทำการเลี้ยงในอาหารแข็งเปรียบเทียบกับอาหารเหลว (chemical defined meium) (ภาคผนวก)

## 3.4 ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ soluble starch โดยการเลี้ยงเชื้อราซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เก็บรักษาตามหน่วยงานต่างๆ ในประเทศไทย

**3.4.1 คัดเลือกชนิดของสายพันธุ์เชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในประเทศไทยที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งมีแป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท**

ทำการเลี้ยงเชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ 5 ชนิด ในอาหาร PDA เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นทำการ cork เส้นใยเชื้อราด้วย cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร chemical defined medium ซึ่งใช้แป้ง 5 ชนิดเป็นสับสเตรท นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุกวัน เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) ด้วยสารละลายไอโอดีน(ภาคผนวก) ทำการคำนวณอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกับเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดที่สามารถย่อยแป้งที่เป็นสับสเตรท 5 ชนิดได้

**3.4.2. คัดเลือกชนิดของสายพันธุ์เชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในประเทศไทยที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีแป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท**

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เด็มที่ จากนั้นใช้สปอร์ของเชื้อราจำนวน $10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (โดยฮีมาไซโตมิเตอร์) ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มี ทวิน 80 (tween 80) ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ แล้วกำจัดเส้นใยเชื้อราออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการกรองสารละลายสปอร์ด้วยแผ่นกรองซิลเทอร์กลาส ใช้สารละลายสปอร์ที่กรองได้มาเลี้ยงลงในอาหารเหลว chemical defined medium ที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นสับสเตรท จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน มาทำการวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ภาคผนวก)

## 3.5 ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3254 ที่คัดเลือกได้ ในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็ง

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 70 มิลลิลิตรที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นสับสเตรท โดยเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเลี้ยงในอาหารแข็งรำข้าวเจ้า ซึ่งมีการปรับความชื้นเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างโดยนำมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (น้ำหนักต่อปริมาตร)แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าพีเอช วัดเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาคผนวก) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

## 3.6 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3254

### 3.6.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคสและแป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งมีชุดควบคุม คือทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเลย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

**3.6.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้ (3.6.1) เป็นสับสเตรท โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เลือกได้ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

**3.6.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (3.6.1), (3.6.2) เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ เปปโตน (peptone)และน้ำแช่คาร์บอน (corn steep liquor) ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีชุดควบคุม คือทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเลย

**3.6.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (3.6.1), (3.6.2) และแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ (3.6.3) จากนั้นทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ทำการคัดเลือกได้ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 0.73 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.6.5 ค่าพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (3.6.1), (3.6.2) เป็นแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือก (3.6.3), (3.6.4) เป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นทำการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.0 แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

**3.6.6 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (3.6.1), (3.6.2) เป็นแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ (3.6.3), (3.6.4) เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งค่าพีเอชเริ่มต้นที่คัดเลือกได้ (3.6.5) แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการแปรผันที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

**3.6.7 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (3.6.1), (3.6.2) เป็นแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ (3.6.3), (3.6.4) เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งค่าพีเอชเริ่มต้นที่คัดเลือกได้ (3.6.5) และอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ (3.6.6) แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่มีการแปรผันความเร็วรอบดังนี้ ที่ความเร็วรอบ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.6.8 ผลของเกลือแร่ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

ทำการเลี้ยงสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ (3.6.1), (3.6.2) เป็นแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ (3.6.3), (3.6.4) เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งค่าพีเอชเริ่มต้นที่คัดเลือกได้ (3.6.5) และอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ (3.6.6) แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่คัดเลือกได้ (3.6.7) จากนั้นทำการแปรผันชนิดของเกลือแร่ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแมงกานีสคลอไรด์ ความเข้มข้น 3.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีชุดควบคุม คือทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร chemical defined medium ทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรมาทำการวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

## 3.7 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan 'new Multiple-Range Test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ soluble starch โดยการเลี้ยงเชื้อราซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เก็บรักษาตามหน่วยงานต่างๆ ในประเทศไทย

### 4.1.1 คัดเลือกชนิดของสายพันธุ์เชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในประเทศไทยที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งมีแป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท

ทำการเลี้ยงเชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ 5 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus oryzae* TISTR 3019 *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 *A. phoenicis* TISTR 3252 *A. phoenicis* TISTR 3253 และ *A. niger* TISTR 3254 ซึ่งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดนี้มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้แป้ง 5 ชนิด ได้แก่ soluble starch แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า เป็นสับสเตรท จากผลการทดลองที่แสดงดังตารางที่ 4 แสดงค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) กับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ soluble starch พบว่าศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งทั้ง 5 ชนิด ของเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์เป็นดังนี้ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3019 สามารถย่อยแแป้งข้าวเหนียวได้ดีที่สุดเท่ากับ 94.78 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 และเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3252 สามารถย่อยแป้งข้าวโพดได้ดีที่สุดเท่ากับ 98.33 และ 83.45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3253 และเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 สามารถย่อยแป้งข้าวเจ้าได้ดีที่สุดเท่ากับ 86.39 และ 79.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่4** แสดงค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) กับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

| ชนิดแป้ง<br>เชื้อรา | Soluble starch | แป้งข้าวโพด | แป้งมันสำปะหลัง | แป้งข้าวเหนียว | แป้งข้าวเจ้า |
|---|---|---|---|---|---|
| *Aspergillus oryzae* TISTR 3019 | 100% | 85.07% | 81.34% | 94.78% | 90.30% |
| *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 | 100% | 98.33% | 93.33% | 86.67% | 96.67% |
| *A. phoenicis* TISTR 3252 | 100% | 83.45% | 80.00% | 75.86% | 80.69% |
| *A. phoenicis* TISTR 3253 | 100% | 80.27% | 85.03% | 77.55% | 86.39% |
| *A. niger* TISTR 3254 | 100% | 70.47% | 79.19% | 77.85% | 79.69% |

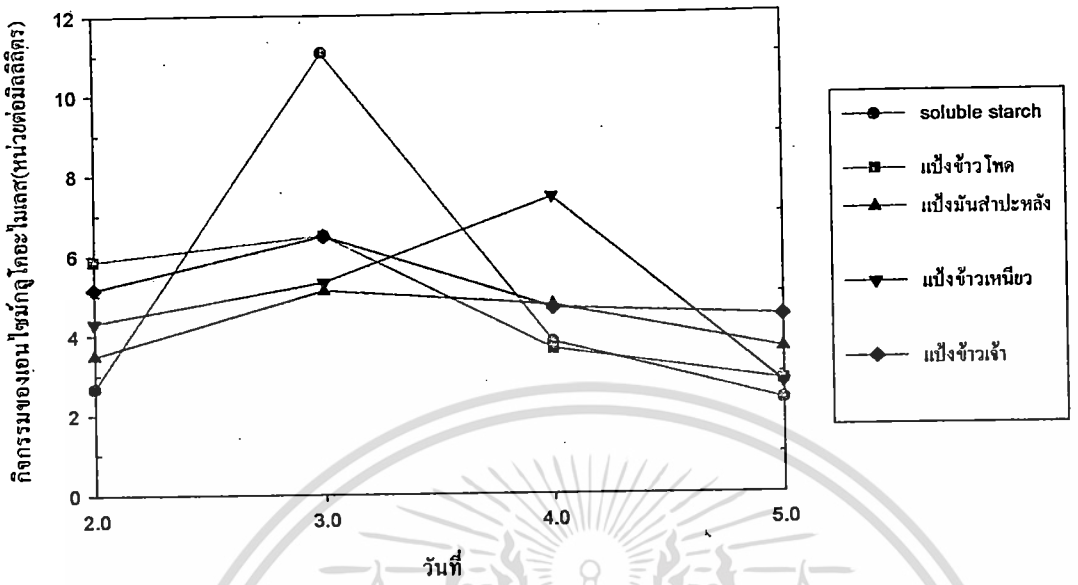
**4.1.2 คัดเลือกชนิดของสายพันธุ์เชื้อราที่เก็บรักษาตามหน่วยงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในประเทศไทยที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีแป้งชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท**

จากการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3019 ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน มีสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 9 ผลการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เชื้อชนิดนี้ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะมีค่าลดต่ำลง โดยมีลักษณะของการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเหมือนกันในอาหารเหลวที่มีแป้งทั้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งในอาหารเหลว soluble starch เชื้อราชนิดนี้ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 11.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3252 และ *A. phoenicis* TISTR 3253 ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน มีสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 10 และ 11 ผลการทดลองพบว่า เชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะของการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคล้ายกันในอาหารเหลวที่มีแป้งทั้ง 5 ชนิดเป็นแหล่ง

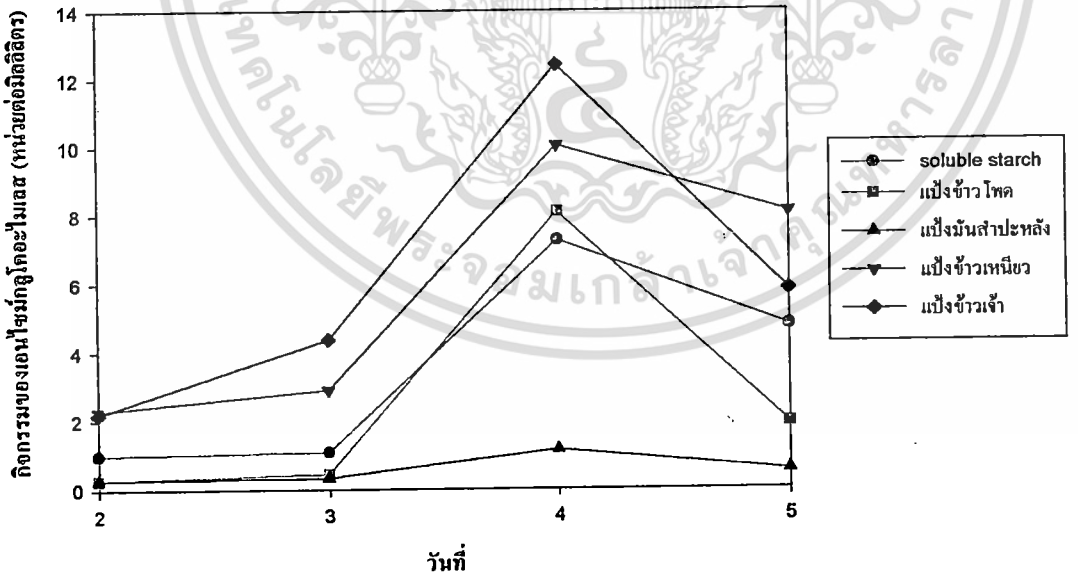
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอน คือ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 และมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง แต่สำหรับเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3252 ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะยังมีค่าเพิ่มขึ้นจนมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 12.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน *A. phoenicis* TISTR 3253 ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะยังมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่นกัน โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 10.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน มีสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 12 พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์บอน นั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะมีค่าลดลงในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ เป็นที่น่าสังเกตว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตได้มีค่าน้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน มีสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 13 ผลการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ยกเว้นในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าต่ำมาก อีกทั้งยังพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด soluble starch และแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าสูงมาก โดยเฉพาะในแป้งข้าวเจ้านั้นเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 22.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

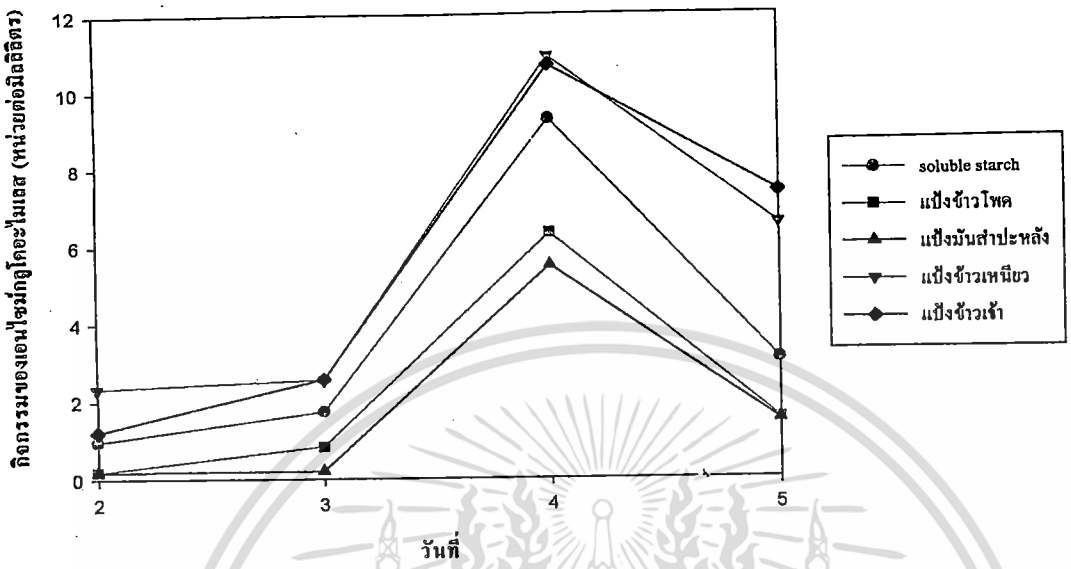



**รูปที่ 9** แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3019

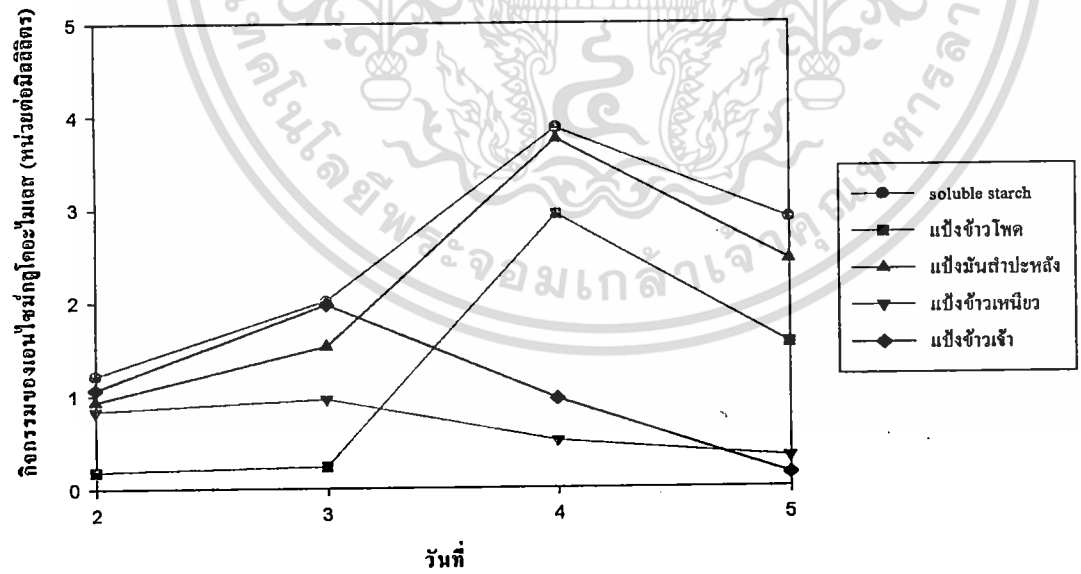



**รูปที่ 10** แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3252

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 11** แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3253



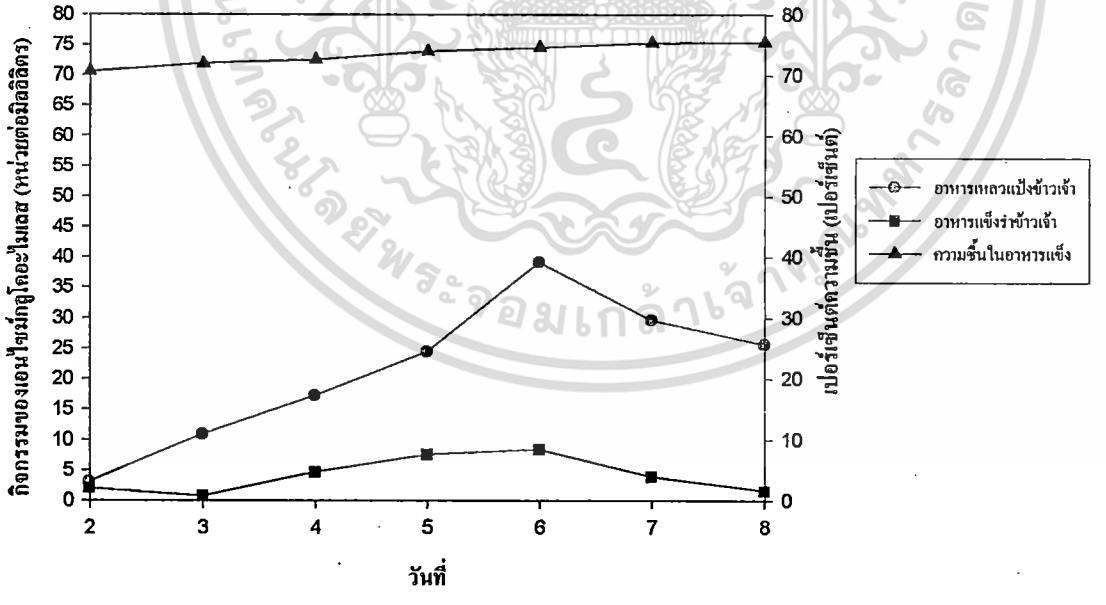

**รูปที่ 12** แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3165

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง จากผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็งนั้นสามารถกล่าวได้ว่าในอาหารเหลวนั้นเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณมากกว่าในสภาวะอาหารแข็งถึง 5 เท่า

ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Ramadas และคณะ (1996) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergilus niger* ภายใต้สภาวะอาหารแข็งเปรียบเทียบกันกับอาหารเหลว ซึ่งผลการทดลองพบว่า ในสภาวะอาหารเหลวเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้มากกว่าสภาวะอาหารแข็ง อีกทั้งยังพบว่าประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (productivity) ในอาหารเหลวมีค่ามากกว่าอาหารแข็ง 1 เท่า

นอกจากนี้ Morita และคณะ (1998) ได้รายงานถึงผลการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากการย่อยแป้งดิบในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ A-11 พบว่า ในอาหารเหลวเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณมากกว่าอาหารแข็งถึง 4.4 เท่า




**รูปที่ 14** แสดงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ด้วยอาหารเหลวและอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

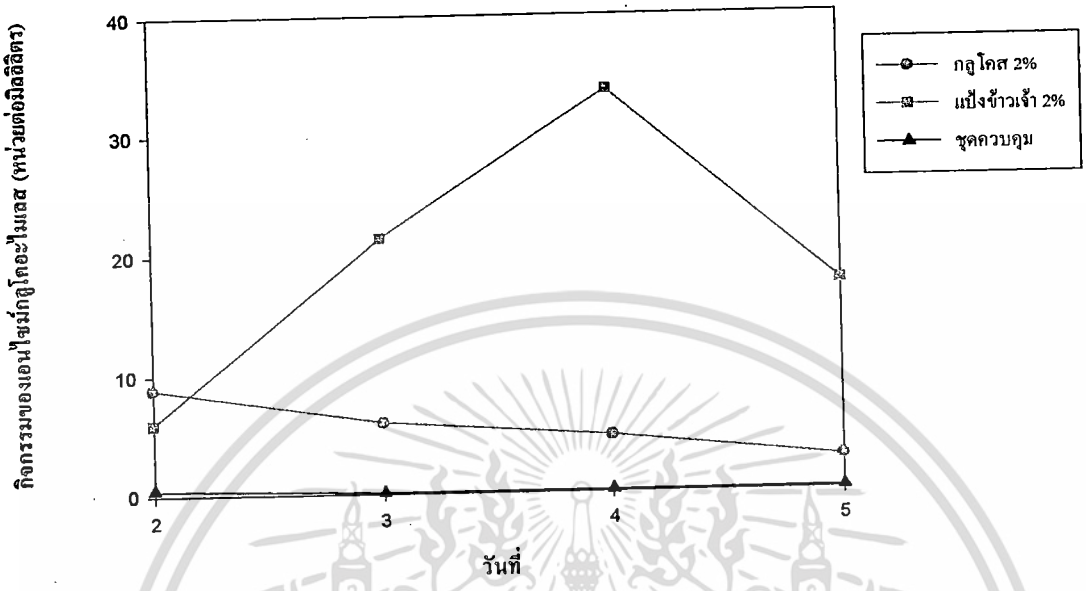
## 4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3254

### 4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคสและแป้งข้าวเจ้า ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุม คือ ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลอง หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง แล้วจะมีค่าลดลงในวันที่ 5 ของการทดลอง อีกทั้งยังพบว่าในแป้งข้าวเจ้านั้นมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 33.65 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนในชุดควบคุมนั้นเชื้อราผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณที่ต่ำมาก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 15 เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนดังนั้นจึงเลือกแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

มีรายงานของ Sadhukhan และคณะ (1990) ซึ่งทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อรา *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104) ผลการทดลองพบว่า แป้ง เซลโลไบโอสและมอลโตสเป็นตัวชักนำ (inducer) ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในขณะที่กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส แลคโตสและอะราบิโนสไม่ได้เป็นตัวชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



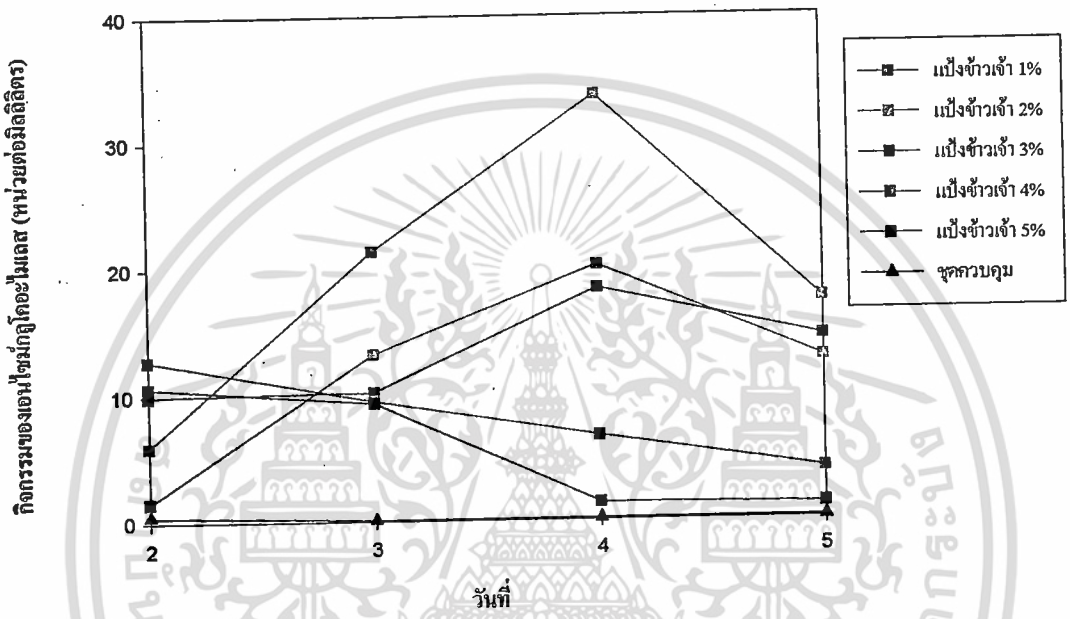

**รูปที่15** แสดงชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

### 4.3.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งข้าวเจ้าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโอะไมเลสเมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของแป้งข้าวเจ้าที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอรเซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16 พบว่าอาหารเหลวที่เติมแป้งข้าวเจ้าลงไปที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์มีผลทำให้เชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อซึ่งมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 33.65 หน่วยต่อมิลลิลิตร และรองลงมาคืออาหารที่เติมแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นได้ว่าในอาหารที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ลงไปนั้นมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตั้งแต่วันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อจึงสามารถกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของแป้งข้าวเจ้าที่มีค่ามากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ส่งผลทำให้เชื้อราชนิดนี้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ลดน้อยลง เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้แป้งข้าวเจ้าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 1, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงเลือกแป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป




**รูปที่ 16** แสดงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

### 4.3.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

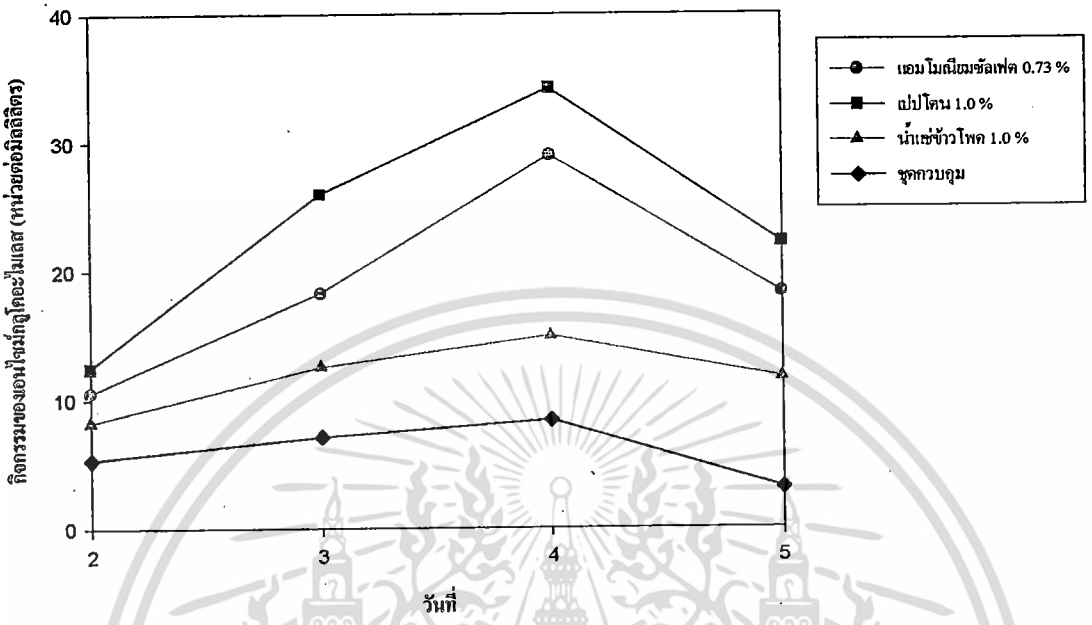
เมื่อทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนดังแสดงในรูปที่ 17 อันได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 0.73 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน (peptone) และ น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุมคือ ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน และใช้แป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 34.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง รองลงมาคือเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.73 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนมีผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 29.06 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง และผลของน้ำแช่ข้าวโพดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบว่าน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่สูงมากนัก ซึ่งในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 14.88 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนนั้นพบว่ามีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลอง หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าลดลง เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงเลือกเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

มีรายงานของ Pandey และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* เมื่อเลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้า ผลการทดลองพบว่า น้ำแช่ข้าวโพด เปปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าสูงขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้เป็นเวลา 96 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 17** แสดงชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลว โดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

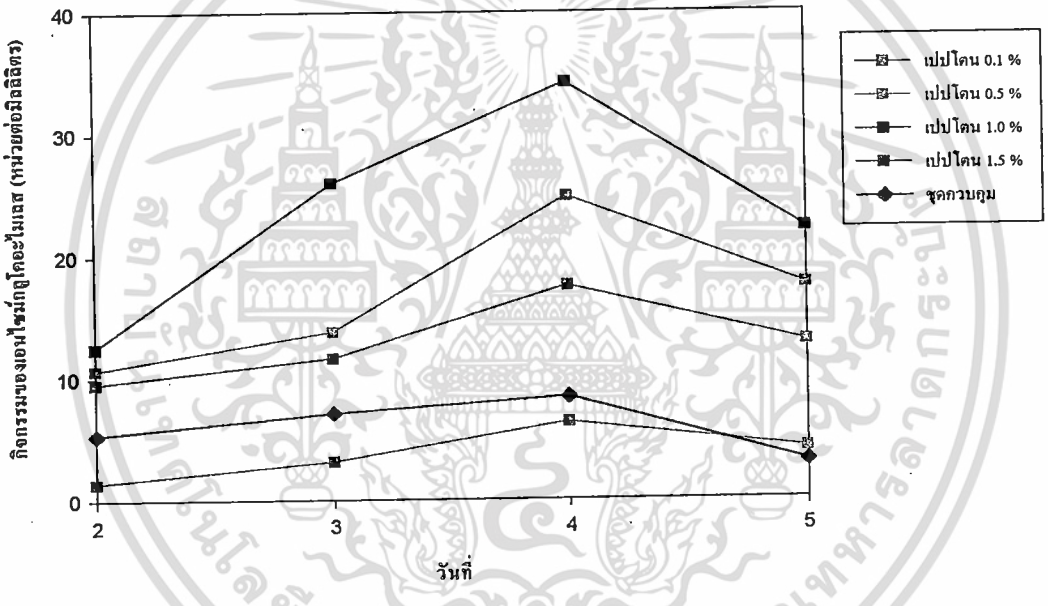
### 4.3.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

จากการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของเปปโตนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยทำการแปรผันเปปโตนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 18 พบว่าเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งในวันที่ 4 ของการทดลองจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 34.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเมื่อใช้เปปโตนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 24.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร และจากผลการทดลองใช้เปปโตนความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์จะพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเลย และเมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้เปปโตนความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกเปปโตนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

นอกจากนี้ Morita และ Fujio (2000) ได้ทำการทดลองถึงผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งดิบโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ MKU 40 พบว่าเมื่อเติมนีโอเปปโตน (neopeptone) เคซีนจากนม (casein from milk) และเนื้อสกัด (meat extract) ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เชื้อราชนิดนี้มีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเลย




**รูปที่ 18** แสดงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

### 4.3.5 ค่าพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

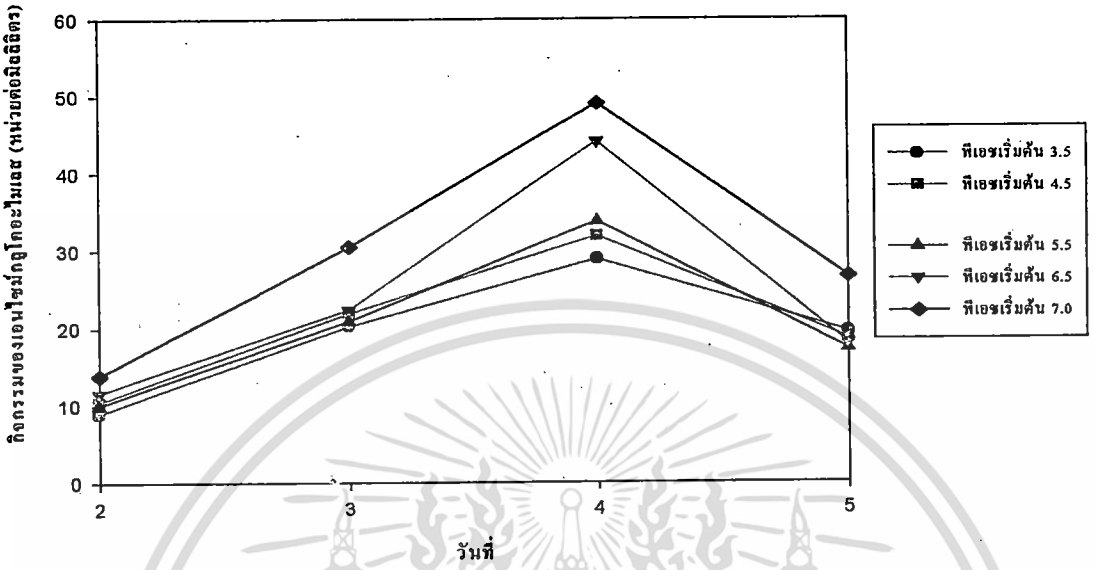
จากรูปที่ 19 แสดงผลการทดลองที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งทำการเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ค่าพีเอช 3.5, 4.5 และ 5.5 นั้นจะมีค่าใกล้เคียงกันโดยมีค่าเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งแต่วันที่ 2 และ 3 ของการทดลอง หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง ส่วนที่ค่าพีเอช 6.5 และ 7.0 นั้นมีผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดลองแล้วจะลดลงในวันที่ 5 อีกทั้งยังพบว่าที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 มีผลทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 49.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคอที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 ซึ่งม่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 44.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าผลของค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยในฟลาสก์ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 นั้น ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 4.5 ซึ่งส่งผลให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด จึงอาจกล่าวได้ว่าที่ค่าพีเอชในช่วง 4.0 ถึง 4.5 นั้นเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 และเมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 7.0 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4.5, 5.5 และ 6.5 ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชที่ 7.0 เป็นค่าพีเอชเริ่มต้นเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

มีรายงานของ Sadhukhan และคณะ (1990) ได้รายงานถึงผลของการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูง *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48 104) ซึ่งพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 นอกจากนี้ Jin และคณะ (1999) ได้ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากน้ำทิ้งในกระบวนการแปรรูปแป้ง (starch processing wastewater) โดยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* DAR 2710 พบว่าที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 มีผลทำให้เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 19** แสดงค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

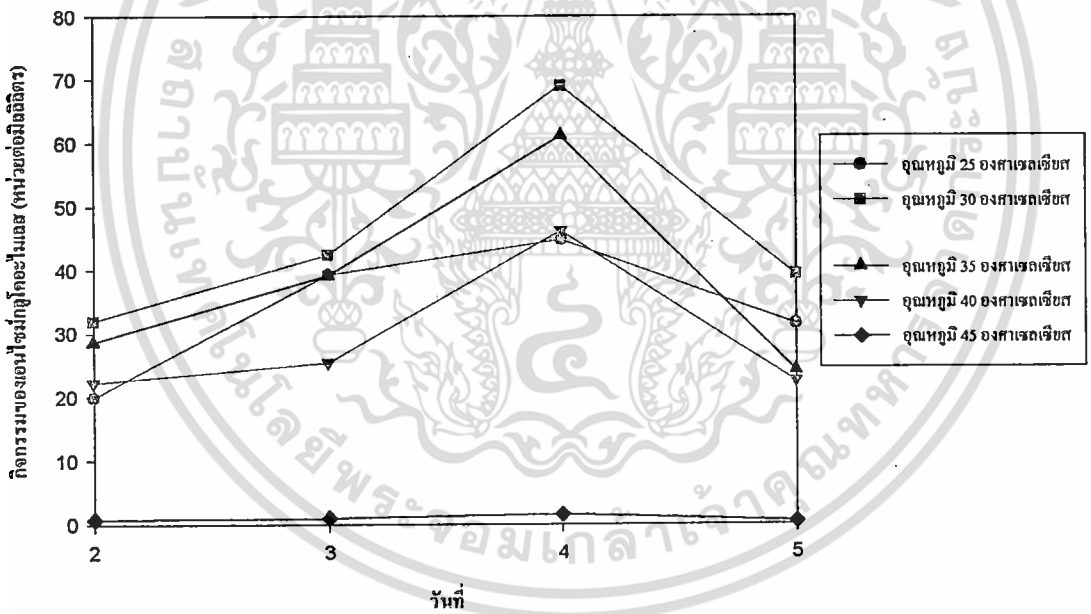
### 4.3.6 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสซึ่งทำการแปรผันอุณหภูมิที่ 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้แป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 20 พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส จะมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง แล้วจะมีค่าลดลงในวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 69.02 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มีอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือในสภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีคากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 61.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสของการเพาะเลี้ยงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำมาก เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางพบว่าในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเลี้ยงเชื้อใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะอุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศา-เซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและใช้อุณหภูมินี้ในการทดลองขั้นต่อไป

ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Withers และคณะ (1998) ซึ่งทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด แต่ Jin และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากน้ำทิ้งในกระบวนการแปรรูปแป้ง (starch processing wastewater) โดยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* DAR 2710 พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เชื้อราชนิดนี้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด



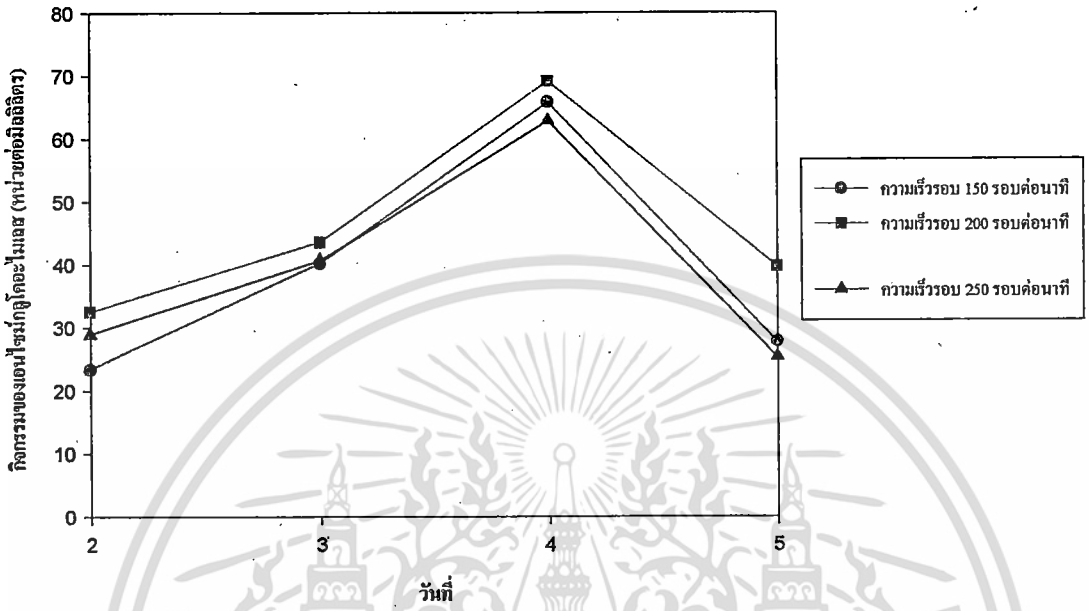

**รูปที่ 20** แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.3.7 ความเร็วรอบในการเขย่าที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254**

จากการศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งมีการแปรผันความเร็วรอบดังนี้ ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที โดยใช้แป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ทำการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 21 พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ในลักษณะที่คล้ายกันทั้ง 3 ความเร็วรอบ โดยจะมีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง จะสังเกตได้ว่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีนั้นจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ คือมีค่าเท่ากับ 69.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เทากับ 65.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร จึงกล่าวได้ว่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 150 และ 250 รอบต่อนาที ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่มีความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



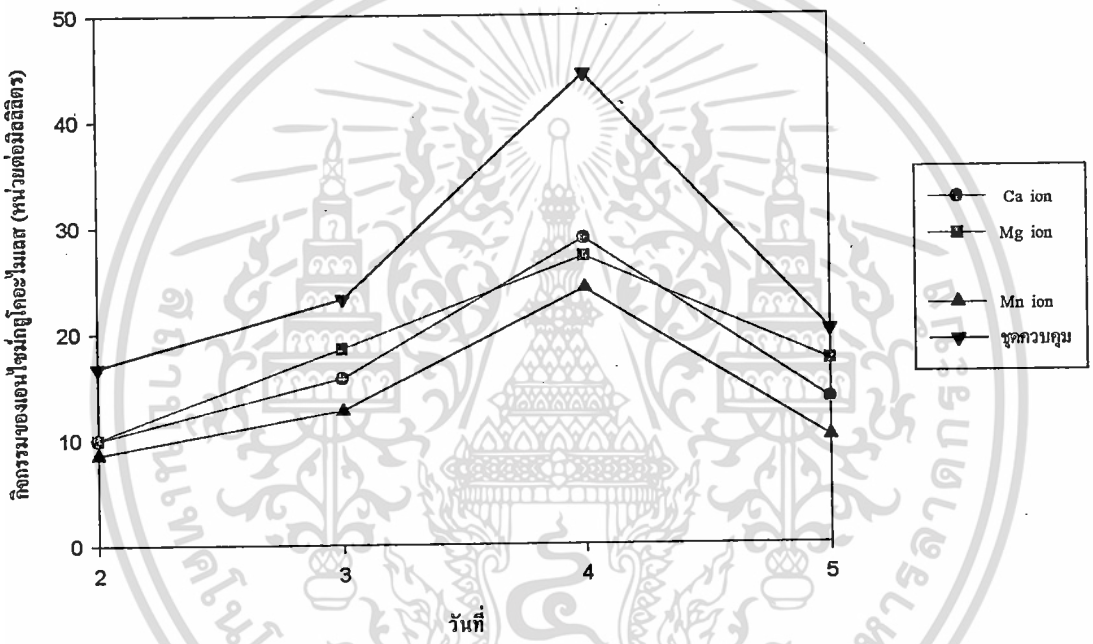

**รูปที่ 21** แสดงความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

### 4.3.8 ผลของเกลือแร่ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

ผลของเกลือแร่ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยทำการแปรผันชนิดของเกลือแร่ ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแมงกานีสคลอไรด์ความเข้มข้น 3.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีชุดควบคุม คือทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร chemical defined medium ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 22 พบว่า ในชุดควบคุมที่มีเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิดข้างต้นเป็นส่วนประกอบมีผลทำให้เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 44.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเป็นที่น่าสังเกตว่าในการใช้เกลือแร่ชนิดใดชนิดหนึ่งมาเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้จะส่งผลทำให้มีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีค่ากิจกรรมไม่สูงมากนัก เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 ในอาหารเหลวสูตร chemical defined medium ซึ่งเป็นชุดควบคุมในการทดลองครั้งนี้จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้เกลือแร่ชนิดใดชนิดหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้น Sadhukhan และคณะ (1990) ได้รายงานถึงผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลือแร่ที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48 104) ผลการทดลองพบว่า $Cu^{2+}$ $Cd^{2+}$ $Co^{2+}$ และ $Zn^{2+}$ มีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ส่วน $Mg^{2+}$ $Ca^{2+}$ และ $Mn^{2+}$ มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงแต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราชนิดนี้




**รูปที่ 22** แสดงผลของเกลือแร่ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะอาหารเหลวโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5

# สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาศักยภาพในการย่อยแป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า เปรียบเทียบกับ soluble starch ของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้ง ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3019 สามารถย่อยแแป้งข้าวเหนียวได้ดีที่สุดเท่ากับ 94.78 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3165 และเชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3252 สามารถย่อยแป้งข้าวโพดได้ดีที่สุดเท่ากับ 98.33 และ 83.45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เชื้อรา *A. phoenicis* TISTR 3253 และเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254 สามารถย่อยแป้งข้าวเจ้าได้ดีที่สุดเท่ากับ 86.39 และ 79.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนกับสภาวะอาหารแข็งที่มีรำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะอาหารเหลวนั้นเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณมากกว่าในสภาวะอาหารแข็งถึง 5 เท่า

ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบว่า เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบว่าเชื้อราจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอาหารเหลวที่เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าเมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 1, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ การเติมเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารให้ผลผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน และการเติมเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้ผลผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารที่เติมเปปโตนความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 ให้ผลผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 3.5, 4.5, 5.5 และ 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 30 องศาเซลเซียสซึ่งให้ผลผลิตเอนไซม์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 250 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าเมื่อเติมเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิดได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียม-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัลเฟต และแมงกานีสคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโค-อะไมเลสได้สูงกว่าในอาหารที่มีการเติมเกลือแร่เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง


กล้าณรงค์ ศรีรอดและเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. **เทคโนโลยีของแป้ง.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 292 หน้า.

เต็มศิริ ศรีทาถุ่ง, ปริญญา เสนานอกและอุมาพร เมืองสอน. 2543. การคัดเลือกเชื้อราจากลูกแป้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูง. โครงการพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประวิทย์ ดงคาเทพและสาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ.

A.O.A.C. 1990. **Official Methods of Analysis by the Association of official Analytical Chemists.** 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Alazard, D. and Raimbault, M. 1981. Comparative Study of Amylolytic Enzymes Production by *Aspergillus niger* in Liquid and Solid-State Cultivation. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 12 : 113-117.

Bergmann, W.F., Abe, J. and Hizukuri, S. 1988. Selection of Microorganisms which produce raw-starch degrading enzymes. Applied Microbiology and Biotechnology. 27 : 443-446.

Beynum, van G.M.A. and Roels, J.A. 1985. **Starch Conversion Technology.** Marcel Dekker, Inc., New York. 326 p.

Bruinenberg, P. 1996. Bioconversion of starch by enzymes. *In* Advanced Post-Academic Course on Tapioca Starch Technology (I). January 22-26 & February 19-23, 1996. Asain Institute of Technology, Bangkok, Thailand.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Elegado, F. B. and Fujio, Y. 1993. Selection of Raw-Starch digestive glucoamylase-producing *Rhizopus* strain. Journal of General Applied Microbiology. 39 : 541-546.

Fogarty, W.M. 1983. **Microbial amylases.** *In* Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers, London. pp. 1-92.

Green, S.B., Salkind, N.J. and Akey, T.M. 2001. **Using SPSS for Window.** 2nd ed. Prentice-Hall, Inc.

Inshik, P. and Chung, Y. 1989. Some factors affecting glucoamylase production from *Aspergillus* sp. Korean Journal of Applied Microbiology and Bioengineering. 17 : 519-523.

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.

Li, D.C., Yang, Y.J., Peng, Y.L. and Shen, C.Y. 1998. Purification and characterization of extracellular glucoamylase from the thermophilic *Thermomyces lanuginosus*. Mycological Research. 102 : 568-572.

Losane, B.K. and Ramesh, M.V. 1990. Production of bacterial thermostable α-amylase by solid-state fermentation, a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. Advances in Applied Microbiology. 35 : 1-55.

Maarel, van der J. E. C. M., Veen, van der B., Uitdehaag, C.M. J., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal of Biotechnology. 94 : 137-155.

Manjunath, P., Shenoy, B. C. and Zao, M. R. 1983. Review : fungal glucoamylase. Jornal of Applied Biochemistry. 5 : 235-260.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31 : 426-428.

Morita, H. and Fujio, Y. 2000. Effect of Organic Nitrogen Sources on Raw Starch-Digesting Glucoamylase Production of *Rhizopus* sp. MKU 40. Starch/starke. 52 : 18-21.

Morita, H., Matsunuga, M., Mizuno, K. and Fujio, Y. 1998. A comparision of Raw Starch-Digesting Glucoamylase Production in Liquid and Solid Cultures of *Rhizopus* strain. Journal of General Applied Microbiology. 44 : 211-216.

Nelson,N. 1994. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal Biochemistry. 153 : 375-380.

Pandey, A., Selvakumar, P. and Ashakumary, L. 1994. Glucoamylase Production by *Aspergillus niger* on rice bran is improved by adding nitrogen sources. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10 : 348-349.

Pedersen, H., Beyer, M. and Nielsen, J. 2000. Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivation by and industrial strain of *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology. 53 : 272-277.

Ramadas, M., Holst, O. and Mattiasson, B. 1996. Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regimens. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 12 : 267-271.

Sadhukhan, R. K., Manna, S., Roy, S.K. and Chakrabarty, S. L. 1990. Thermostable amylolytic enzymes from a cellulolytic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48 104). Applied Microbiology and Biotechnology. 33 : 692-696.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schenck, F. W. and Hebada, R. E. 1992. **Starch hydrolysis products** : Worldwide Technology, Production and Applications. VCH Publishers, New York. Pp. 1-21.

Schrickx, M. J., Krave, S. A. and Verdose, C. J. 1993. Growth and Product formatiom in chemostat and recycling cultures by *Aspergillus niger* N402 and a glucoamylase overproducing transformant, provided with multiple copies of the *gla* A gene. Journal of General Microbiology. 139 : 2801-2810.

Soccol, C. R., Marin, B., Raimbault, M. and Lebeault, J. M. 1994. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 41 : 330-336.

Sukara, E. and Doelle, H. W. 1989. A one-step process for the production of single-cell protein and amyloglucosidase. Applied Microbiology and Biotechnology. 30 : 135-140.

Weber, R. W. S., Pitt, D. and Webster, J. 1998. Teaching Techniques for Mycology : Amylase secretion by *Aspergillus oryzae*. Mycologist. 12 : 8-9.

Withers, J. M., Swift, R. J., Wiebe, M. G., Robson, G. D., Punt, P. J., Hondel, van den C. A. M. J. J. and Trinci, A. P. J. 1998. Optimization and Stability of Glucoamylase Production by Recombinant Strains of *Aspergillus niger* in Chemostat Culture. Biotechnology and Bioengineering. 59 : 407-418.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

**สูตรอาหาร potato dextrose agar (PDA)** ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| potato dextrose agar | 39 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

**สูตรอาหาร chemical defined medium (Pederson และคณะ,2000)** ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| แป้ง (soluble starch) | 20 | กรัม |
| แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ | 7.3 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $(KH_2PO_4)$ | 1.5 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$ | 1.0 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 1.0 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์ $(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$ | 0.1 | กรัม |
| ซิงค์ซัลเฟต $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$ | 7.2 | มิลลิกรัม |
| คอปเปอร์ซัลเฟต $(CuSO_4 \cdot 5H_2O)$ | 1.3 | มิลลิกรัม |
| นิเกิลคลอไรด์ $(NiCl_2 \cdot 6H_2O)$ | 0.3 | มิลลิกรัม |
| แมงกานีสคลอไรด์ $(MnCl_2 \cdot 4H_2O)$ | 3.5 | มิลลิกรัม |
| เฟอรัสซัลเฟต $(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ | 6.9 | มิลลิกรัม |

**หมายเหตุ** : ทำการดัดแปลงสูตรอาหารโดยใช้แป้งเป็นสับสเตรทแทนน้ำตาลกลูโคส ในกรณีอาหารแข็งให้เติมวุ้น (agar) ลงไปปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สูตรอาหาร Starch agar (Didier และ Maurice , 1981)** ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| แป้ง (soluble starch) | 10 | กรัม |
| แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ | 0.97 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $(KH_2PO_4)$ | 0.50 | กรัม |
| แอมโมเนียมไนเตรท $(NH_4NO_3)$ | 0.24 | กรัม |

**การเตรียมอาหาร :** ทำการละลายส่วนผสมดังกล่าวในน้ำกลั่น แล้วละลายแป้งหลังสุด จากนั้นปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สูตรอาหารแข็งรำข้าวเจ้า (Ramadas และคณะ, 1996)** ประกอบด้วย

รำข้าวเจ้ากับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1.5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยใช้รำข้าวเจ้าเปียกน้ำหนัก 5 กรัมใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีจากนั้นนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

**สารละลายไอโอดีน (Weber และคณะ, 1998)** ประกอบด้วย

ทำการละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) น้ำหนัก 6 กรัม และไอโอดีน (iodine) น้ำหนัก 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรและทำการเจือจางสารละลายข้างต้นให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Ramadas และคณะ, 1996)**

**การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (ค.ศ. 1959)**

**สารเคมี**

1. สารละลายน้ำแป้งเตรียมโดยละลายแป้ง (soluble starch) น้ำหนัก 1 กรัมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดแล้วทำให้เย็น
2. โซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0
3. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรแล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ฟีนอล 2 กรัม โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรท 200 กรัมและโซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัมลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

**การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน**

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 200 – 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองโดยเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองและเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง แสดงดังรูป ก

**การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

เติมสารละลายน้ำแป้งเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ในการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่

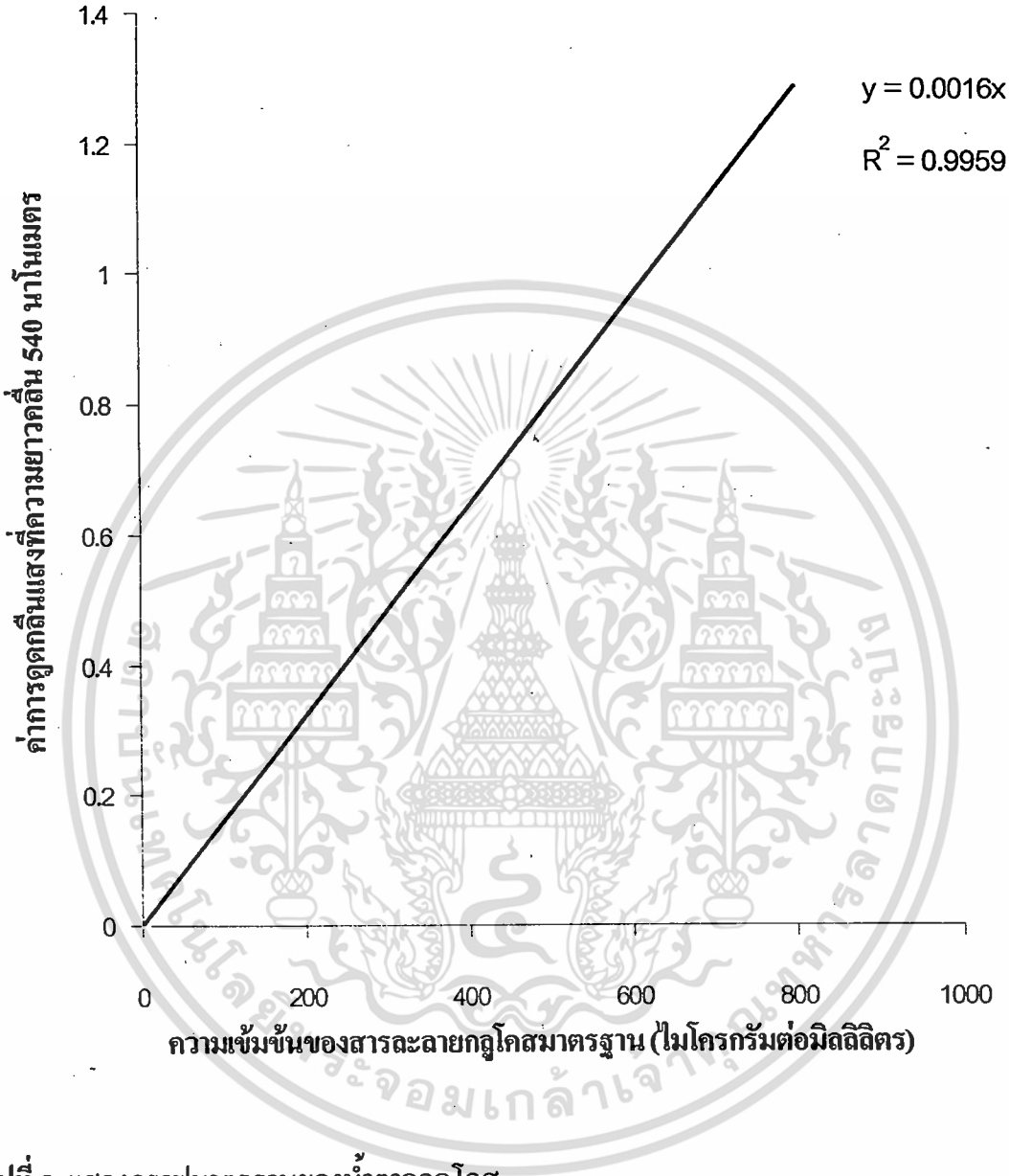
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในหน่วย

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากปฏิกิริยา}}{\text{ระยะเวลาในการบ่ม} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์}}$$

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ก** แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (A.O. A.C., 1990)

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
3. โถดูดความชื้น (desicator)
4. เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. อบภาชนะอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบแล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้น เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักของภาชนะอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิด
2. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 5 กรัม ใส่ลงในภาชนะอะลูมิเนียมซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว
4. อบตัวอย่างในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบและทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก
5. อบซ้ำอีกครั้ง ครั้งละประมาณ 30 นาทีและทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.05**

**ตารางที่ 5** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน | ชุดควบคุม | กลูโคส | แป้งข้าวเจ้า |
|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 0.11[c] | 9.90[b] | 18.54[a] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 6** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของความเข้มข้นของแป้งข้าวเจ้าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| ความเข้มข้นของแป้งข้าวเจ้า (เปอร์เซ็นต์) | ชุดควบคุม | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 0.11[d] | 12.43[bc] | 21.25[a] | 12.83[b] | 12.74[b] | 11.84[c] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 7** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| ชนิดของแหล่งไนโตรเจน | ชุดควบคุม | น้ำแช่ข้าวโพด | แอมโมเนียมซัลเฟต | เปปโตน |
|---|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 8.27$^{d}$ | 14.88$^{c}$ | 29.06$^{b}$ | 34.20$^{a}$ |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 8** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของความเข้มข้นของเปปโตนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| ความเข้มข้นของเปปโตน (เปอร์เซ็นต์) | ชุดควบคุม | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 1.5 |
|---|---|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 8.27$^{d}$ | 17.74$^{c}$ | 24.76$^{b}$ | 34.20$^{a}$ | 6.59$^{d}$ |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 9** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| ค่าพีเอชเริ่มต้น | 3.5 | 4.5 | 5.5 | 6.5 | 7.0 |
|---|---|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 28.88$^{d}$ | 31.87$^{c}$ | 33.82$^{c}$ | 44.04$^{b}$ | 49.40$^{a}$ |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 10** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 |
|---|---|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 44.74$^{c}$ | 69.02$^{a}$ | 61.08$^{b}$ | 45.34$^{c}$ | 1.58$^{d}$ |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 11** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| ความเร็วรอบของการเขย่า (รอบต่อนาที) | 150 | 200 | 250 |
|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 65.76[b] | 69.42[a] | 62.81[c] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 12** แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3254

| ชนิดของเกลือแร่ | ชุดควบคุม | แคลเซียมคลอไรด์ | แมกนีเซียมซัลเฟต | แมงกานีสคลอไรด์ |
|---|---|---|---|---|
| ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 44.49[a] | 15.23[b] | 13.97[b] | 12.10[b] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้