สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068

T 039902

นายปรามสยบ ภูมิพาณิชย์
นายสุพีร์ สาณะเสน
นายอนุวัฒน์ วัดวงค์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 39902
วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544

.b.....
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of amylase from cassava starch by *Aspergillus oryzae* TISTR 3068

Mr. Pramsayob Poompanich
Mr. Supee Sanasane
Mr. Anuwat Watwong

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Reguirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068		
นักศึกษา	นายปรามสยบ	ภูมิพาณิชย์	รหัส 40053041
	นายสุพีร์	สาณะเสน	รหัส 40053074
	นายอนุวัฒน์	วัดวงค์	รหัส 40053079
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ประสิทธ์	ดีวัฒนวงศ์	

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

..... กรรมการ

(ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ประสิทธ์ ดีวัฒนวงศ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาคาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068

โดย นายปรามสยบ ภูมิพาณิชย์ รหัส 40053041
นายสุพีร์ สาณะเสน รหัส 40053074
นายอนุวัฒน์ วัดวงค์ รหัส 40053079

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง
อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอริกคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์เขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 1,665 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์อะไมเลส พบว่า พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 5.0 และ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 5.0 และที่อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

Special Project Title	Production of amylase from cassava starch by *Aspergillus oryzae* TISTR 3068
Students	MisterPramsayob Poompanich 40053041
	MisterSupee Sanasane 40053074
	MisterAnuwat Watwong 40053079
Special Project Advisor	Assistant Professor Dr. Nuanphan Naranong
	Lecturer Prasite Deewattanawong
Department	Applied biotechnology
Year	2000

ABSTRACT

An optimized medium for amylase production by *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 contained (g/l) cassava starch 30, $(NH_4)_2SO_4$ 4.5, KH_2PO_4 1.0, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5, KCl 0.5, $FeCl_3$ 0.1 and initial pH of 5.0. In the shake flask culture, the maximum activity of amylase with the yield of 1,665 U/ml was obtained on day 3 of cultivation with the shaking speed of 250 rpm at 30 °C. Some properties of the crude enzyme were studied. The optimum pH and temperature for amylase activity were 5.0 and 60 °C, respectively. Tne enzyme was stable at pH 5.0 and at temperature range between 50-60 °C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง คณะกรรมการโครงงานพิเศษ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และ อาจารย์ ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ยิ่ง ทางคณะผู้จัดทำขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน แม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ พี่ๆเพื่อนๆน้องๆทุกคน ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ มีส่วนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังกายกำลังใจตลอดมา จนโครงงานพิเศษเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการ	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก ก	42
ภาคผนวก ข	47
ภาคผนวก ค	49
ภาคผนวก ง	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยใช้การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง และอาหารเหลว 9

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป 15

ตารางที่ 3 แสดงผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์ 26

ตารางที่ 4 แสดงผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์ 29

ตารางที่ 5 แสดงผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์ 32

ตารางที่ 6 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์ 35

ตารางภาคผนวกที่

ตารางภาคผนวกที่ ก1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ในอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร 42

ตารางภาคผนวกที่ ก2 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ในอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 45 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร 43

ตารางภาคผนวกที่ ก3 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ในอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร 44

ตารางภาคผนวกที่ ก4 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับพีเอชที่ใช้บ่มต่างๆ กัน 45

ตารางภาคผนวกที่ ก5 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับอุณหภูมิที่ใช้บ่มต่างๆ กัน 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ตารางภาคผนวกที่ ก6 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับความคงตัว ที่พีเอชต่างๆ กัน 46

ตารางภาคผนวกที่ ก7 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับความคงตัว ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะเส้นใย และ conidiophores ของ *Aspergillus* 7

รูปที่ 2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* ในอาหารเหลว ที่มีปริมาณแป้ง 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร 22

รูปที่ 3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* ในอาหารเหลว ที่มีปริมาณแป้ง 45 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร 23

รูปที่ 4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* ในอาหารเหลว ที่มีปริมาณแป้ง 60 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร 24

รูปที่ 5 แสดงผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 27

รูปที่ 6 แสดงผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 30

รูปที่ 7 แสดงผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส 33

รูปที่ 8 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส 36

รูปภาคผนวกที่

รูปภาคผนวกที่ ง1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตทุกอย่างไม่ว่า พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ จะมีเอนไซม์อยู่มากมายหลายชนิด และเอนไซม์เหล่านี้ก็สามารถสกัดออกมาจากเซลล์ และทำงานได้โดยอิสระ การใช้เอนไซม์โดยตรงในการผลิตอาหาร อาจเป็นเทคโนโลยีใหม่สำหรับประเทศไทย แต่แท้จริงแล้วการใช้เอนไซม์ในอาหารและอุตสาหกรรมในประเทศไทย ได้มีการกระทำมาช้านานแล้วเช่น การผลิตอาหารหมักดองต่างๆ ได้แก่ ปลาร้า ปลาเจ่า ข้าวหมาก แบะแซ และเหล้าเป็นต้น เหล่านี้เกิดจากผลของเอนไซม์ทั้งสิ้น แต่เพื่อประสิทธิภาพของการผลิต และการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่แน่นอน จึงได้หันมาใช้ในรูปของเอนไซม์โดยตรงแทน ถึงแม้ว่าการผลิตเอนไซม์เพื่ออุตสาหกรรมยังไม่ได้ทำกันอย่างเป็นล่ำเป็นสันภายในประเทศก็ตาม แต่มีแนวโน้มว่าจะสามารถผลิตออกมาได้ในอนาคต

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ จะเห็นว่าเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีความสำคัญมากขึ้นทุกที เนื่องจากพืช และสัตว์ นั้นมีการเจริญเติบโตเป็นไปอย่างช้ามาก ระยะเวลาการขยายพันธุ์นาน ต้องใช้พื้นที่ปลูกหรือเลี้ยงมาก ความสามารถในการใช้อาหารไม่กว้างขวางนัก แต่ในทางตรงกันข้าม จุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบเป็นอาหารได้อย่างกว้างขวาง ทั้งที่เป็นของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรม ต้องพื้นที่ในการผลิตน้อย สามารถผลิตได้ทุกแห่งทั่วโลก ผลิตได้ครั้งละปริมาณมากๆ โดยใช้เวลาสั้น ซึ่งการผลิตระยะสั้นๆ นี้ ไม่สามารถจะทำได้ถ้าใช้พืชหรือสัตว์ นอกจากนี้อาจเพิ่มความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ ในการสร้างเอนไซม์ให้มีปริมาณสูงขึ้นได้ โดยการดัดแปลงสภาพแวดล้อม หรือทำให้ตัวจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) หรือการใส่สารประเภทที่กระตุ้นการผลิต (inducer) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และขั้นสุดท้าย ไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ชนิดใดที่พืชหรือสัตว์สามารถผลิตได้ จุลินทรีย์ก็ผลิตได้แทบทุกชนิด (เพียงแต่อาจต้องใช้เวลาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมเท่านั้น)

อะไมเลส เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้งเป็นส่วนใหญ่ พบได้ทั่วไป ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น พบในน้ำลายของสัตว์ ตับอ่อน ข้าวมอลล์ และจากเชื้อ *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* (ปิยนุช, 2524) ฯลฯ ในงานวิจัยนี้เราจะหันมาสนใจอะไมเลส จากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ซึ่งคาดว่าผลที่ได้รับจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส เพื่อนำไปใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนเพิ่มคุณค่าของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงของโครงงานพิเศษ

- เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน
- เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

- ศึกษาถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเชื้อรา ในฟลาสก์แบบเขย่า เพื่อให้ได้ปริมาณของเอนไซม์มากที่สุด และทำการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งมีราคาถูกเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3068
- ทราบถึงคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- เพื่อนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ และเป็นการเพิ่มคุณค่าของแป้งมันสำปะหลังให้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

เอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่ขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) คือ เอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ (ดุษณี, 2537) สามารถย่อยแป้งได้

ชนิดของเอนไซม์อะไมเลสโดยแบ่งตามตำแหน่งการย่อย (ดวงพร, 2530)

เอ็นโดอะไมเลส (endoamylase) เป็นอะไมเลสประเภทที่ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะ1,4 กลูโคซิดิก ของอะไมเลส หรืออะไมโลเพคตินแต่ไม่ย่อยพันธะ 1,6-กลูโคซิดิก ของอะไมโลเพคติน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโตสและกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) หรืออะไมโล (1-4) เด็กซ์ทริเนส (amylo(1-4)dextrinase)

เอ็กโซอะไมเลส (exoamylase) ย่อยแป้งจากปลายสายด้านที่ไม่เกิดการรีดิวซ์ (non-reducing end) เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้า-อะไมเลส (β-amylase)และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) สำหรับเบต้า-อะไมเลส หรือ อะไมโล(1-4)มอลโตซิเดส (amylo(1-4) maltosidase) จะย่อยแป้งที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคซิดิก เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะที่มีต่อแบบพันธะดี (1-6) (α-D(1-6)linkage) ได้ ผลที่ได้จากการย่อยจึงเป็นน้ำตาลมอลโตส และ ลิมิตเด็กซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย การผลิตเอนไซม์อะไมเลสในทางการค้าจะใช้จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น

การผลิตอะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแบคเรียที่ใช้ในการผลิตอะไมเลสในทางการค้าส่วนใหญ่จะใช้ *Bacillus subtilis* แต่แบคทีเรียตัวอื่นก็สามารถนำมาใช้ในการผลิตได้ เช่น *B. amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis* ซึ่งการผลิตเอนไซม์อาจเป็นการเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนผิวหน้าของอาหารแข็งหรือเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ submerged culture

วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตอะไมเลส จาก *B. subtilis* ในอาหารเหลว ได้แก่ ของเหลือจากการหมักแอลกอฮอล์หรือแป้งที่ถูกย่อยแล้ว หรือแป้งที่ละลายน้ำได้กับแอมโมเนียมและบัฟเฟอร์ ในกรณีของอาหารแข็งจะใช้กากถั่วเหลืองหรือกากถั่วลิสงที่ย่อยแล้ว หรือเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้แป้งที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งพลังงานและเกลือแร่อื่นๆนอกจากนี้ยังสามารถนำรำข้าวสาลีใช้ในการผลิตได้ด้วยในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำและเกลือแร่ การหมักเอนไซม์ในอาหาร-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แข็งจะใช้เวลา 2-6 วันที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ในกรณีของอาหารเหลว

การผลิตอะไมเลสจากเชื้อรา เชื้อราหลายชนิดสามารถนำมาผลิตเอมไซม์นี้ได้ โดยกระบวนการหมักที่ใช้เป็นกระบวนหมักในอาหารแข็ง ตัวอย่างการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อราเพื่อใช้ในการค้า ได้แก่

ก. Takamine process เป็นกระบวนการหมักที่เก่าแก่ในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นกระบวนการหมักในอาหารแข็ง โดยนำรำข้าวสาลีที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำมาฆ่าเชื้อและใส่ สปอร์ของเชื้อ *A. oryzae* สายเชื้อที่คัดเลือกไว้ ทิ้งไว้ให้เกิดการหมักในถาดตื้นๆ หรือถังหมักทรงกระบอกหมุนได้ หมักไว้เป็นเวลา 4 วันที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โดยการสกัดและทำให้เข้มข้นโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียสจะได้เอนไซม์ในรูปของเหลวหรือนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ และทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านี้

ข. Amylo process เป็นกระบวนการหมักเอนไซม์ในอาหารแข็งจากเชื้อ *Rhizopus delemer, Mucor rouxii* และเชื้อราอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเชื้อราเหล่านี้ โดยใช้เมล็ดพืชที่มีแป้งมาหมักกับเชื้อราเหล่านี้ เชื้อราจะปล่อยเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยแป้งเพื่อใช้ในการเจริญ ซึ่งกระบวนการผลิตอะไมเลสโดยวิธีนี้ใช้หลักการเดียวกับการเตรียม mash ในการผลิตแอลกอฮอล์ ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เป็นปริมาณมากอาจใช้เชื้อ *A. oryzae* แทน

นอกเหนือจากกระบวนการหมักในอาหารแข็งแล้วยังสามารถผลิตเอนไซม์นี้จากเชื้อรา *A. niger* โดยใช้อาหารได้ด้วย อาหารเหลวที่ใช้จะประกอบด้วยแป้งและเกลือแร่ การหมักในอาหารเหลวมีประสิทธิภาพดีกว่าและมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้น้อยกว่าการหมักในอาหารแข็ง

ชื่อทางการค้า : Termanty

ชื่อสามัญว่า : Diastase

ชื่อตามระบบ : α-1,4 glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1

ผลที่เกิดจากอะไมเลสย่อยแป้ง

แป้งเป็นสารคาร์โบไฮเดรตพวกโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วยอะไมโลส (amylose) และอะมิโลเพคติน (amylopectin) โดยที่อะไมโลสประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic linkage ไม่มีการแตกแขนง ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1,100-4,400 โมเลกุล คุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่กระจายตัวอยู่ในน้ำในลักษณะที่เป็น micelle ให้สี น้ำเงินกับสารละลายไอโอดีน ส่วนอะไมโลเพคตินเกิดจากกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-glycosidic linkage ที่มีการแตกแขนงทุกๆ 25 หน่วยของกลูโคส ตรงตำแหน่งที่แตกแขนงต่อกันด้วย α-1,6 glycosidic linkage พันธะแบบ α-1,3 ก็พบเช่นกัน น้ำหนักโมเลกุลสูงถึงเป็นล้านละลายน้ำอยู่ในรูปสารละลายคอลลอยด์ ให้สีน้ำตาลกับสารละลายไอโอดีน (Reed และ Underkeofler,1966)

Bernfeld (1955) พบว่าเมื่อแป้งถูกย่อยด้วยอะไมเลส จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังนี้

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

การวิเคราะห์ปฏิกิริยาทางเคมีของอะไมเลส

จากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่ออะไมเลสย่อยแป้ง นำมาใช้ในการตรวจหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ เช่น ตรวจหากลูโคสจากการวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์เราสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้หลายวิธี เช่น วิธีของ A.O.A.C.(1975) วิธีของ Nelson-Somogyi (Nelson,1944)

จุลินทรีย์ที่ผลิตอะไมเลส

จุลินทรีย์ที่ผลิตอะไมเลสมีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์

แบคทีเรีย มีแบคทีเรียมากมายหลายชนิดที่สามารถสร้างอะไมเลสได้ เช่น *Pseudomonas saccharophila Ps. stutzeri* (Robyt และ Ackerman,1972); *Clostridium acetobutylicum* (Hockenhull และ Herbert,1945) และอื่นๆอีก โดยเฉพาะพวก *Bacillus sp.* ซึ่งมีทั้งหมด 48 species ที่จำแนกโดย Buchanan และ Gibbon (1974) มีถึง 32 species ที่สร้างอะไมเลสได้ สำหรับพวก actionmycetes มีหลายชนิดที่สร้าง อะไมเลสได้ เช่น *Streptomyces aureofaciens* (Hostinova และคณะ,1979); *Thermoactionmyces vulgaris* (Kuo และ Hartman,1966) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ ตัวที่รู้จักกันดีก็คือ *Endomycopsis fibuligera* (Phaff และคณะ,1948) นอกจากนี้ก็มี *E. hordei, E. capsularis, Trichosporon variable, Candida sp., Pichia sp.* และ *Saccharomyces diastaticus* (จิราภรณ์, 2518) เป็นต้น

เชื้อรา เป็นที่ทราบกันดีว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่ย่อยแป้งได้ดี เช่น *A. niger* (กฤติกานต์, 2523) *A. oryzae* (Mense และคณะ,1948) ส่วนราในกลุ่ม mucoraceous ได้แก่ *Rhizopus sp.* และ *Mucor sp. M. rouxii Amylomyces rouxii* (Ellis และคณะ,1974) ส่วนราอื่นๆ ที่สร้าง เช่น *Penicillium sp.*(Mense และคณะ,1947)

ลักษณะที่สำคัญของเชื้อ *Aspergillus oryzae* (บัญญัติ, 2538)

1. เส้นใยมีผนังกั้น
2. สปอร์ไม่เคลื่อนที่
3. sexual spore สร้างภายใน ascus มีจำนวน 8 ascospores
4. asexual spore ไม่สร้างภายใน ascus
5. ไม่ต้องการความชื้นมากในการเจริญ

การสืบพันธุ์

ก. การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ เกิดได้หลายดังวิธีนี้

1 fission
2 budding
3 fragmentation
4 chlamydospore
5 conidia

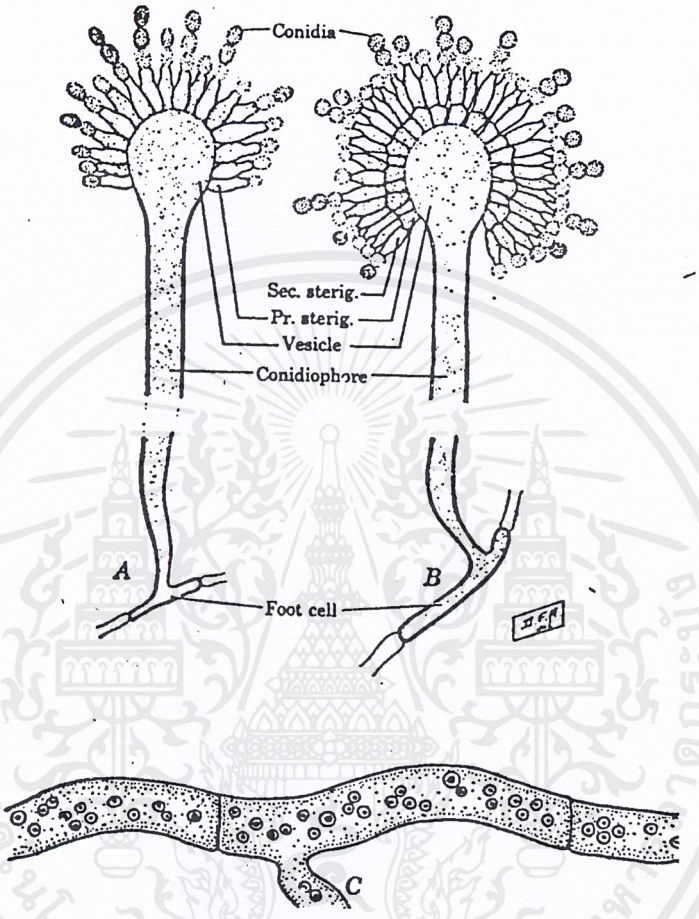
ซึ่งการจะสร้างสปอร์แบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของราหรือสภาพแวดล้อมขณะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ

ข. การสืบพันธุ์แบบมีเพศ

การสืบพันธุ์แบบมีเพศโดยวิธีนี้มีหลักการโดยที่นิวเคลียสเข้าไปอยู่ในเซลล์เดียวกันแต่ยังไม่รวมกัน ทำให้เป็นลักษณะ 1 เซลล์มี 2 นิวเคลียส ที่เรียกว่า dikaryon และนิวเคลียสแบ่งตัวหลายๆครั้งได้ dikaryotic cell ใหม่อีกหลายอัน ต่อมานิวเคลียสทั้ง 2 อันในเซลล์จะรวมกันในส่วนที่จะเจริญเป็น ascus จากนั้นนิวเคลียสซึ่งเป็น diploid zygote nucleus จะเกิดไมโอซิสและได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวเคลียส 4 อัน ต่อมา haploid nucleus ทั้ง 4 นี้จะแบ่งแบบไมโตซิสอีกครั้งหนึ่งได้ 8 นิวเคลียส ซึ่งจะเจริญไปเป็น ascospore 8 อันอยู่ภายใน ascus



รูปที่ 1 แสดงลักษณะเส้นใยและ conidiophores ของ *Aspergillus*

A : conidiophore ที่เรียงอยู่บน sterigmata แบบแถวเดียว

B : conidiophore ที่เรียงอยู่บน sterigmata แบบสองแถว

C : แสดงจำนวนนิวเคลียสหลายอันในเส้นใย

(ที่มา : Alexopoious C.J. 1961 Introductory Mycology p.272)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์เชื้อรา *Aspergillus sp.*

1. ด้านอุตสาหกรรม ได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น

- ทำเต้าเจี้ยวใช้ *Aspergillus wendtii*
- ผลิตกรดซิตริกและกรดกลูโคนิก ใช้ *Aspergillus sp.*
- เหล้า sake จากข้าวใช้ *Aspergillus oryzae*

2. ใช้ทดสอบ trace element โดยเฉพาะทองแดงในดินใช้ *Aspergillus niger* ซึ่งถ้าในดินขาดทองแดงบ้าง สีของราจะอ่อน ถ้ามีทองแดงจะสีคล้ำ ถ้าไม่มีทองแดงเลยจะมีสีเหลือง

โทษของเชื้อรา *Aspergillus sp.*

ทำให้อาหารเป็นพิษ เชื้อ *Aspergillus sp.* หลายชนิดโดยเฉพาะ *A. flavus* เมื่อเจริญในอาหารพวกถั่วต่างๆจะสร้างสารพิษที่เรียกว่า aflatoxin ทำให้เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ได้ ทำให้เกิดโรค และทำลายอาหารและผลิตผลต่างๆทางเกษตรกรรม เช่น *Aspergillus sp.* และ *Penicillium sp.* ทำลายอาหารพวกเนื้อสัตว์และไขมันได้ดี

การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์

วิธีที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

1. การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง

กรรมวิธีในการปฏิบัตินั้นจะเลี้ยงจุลินทรีย์ซึ่งเป็นพวกเชื้อรามากกว่าแบคทีเรียลงในอาหารที่ประกอบด้วยอาหารแข็งและน้ำด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (อัตราส่วนที่ใช้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์) อาหารแข็งโดยมากใช้ ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ถั่วเหลือง หรือธัญพืชอื่นๆในการผลิตทางอุตสาหกรรมนั้นวิธีนี้ต้องใช้แรงงานมาก

2. การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย โดยเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่อาหารที่จะใช้เลี้ยงจะฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนชื้น อุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที ปริมาณหัวเชื้อ 3-5 เปอร์เซ็นต์ จะต้องควบคุมการให้อากาศและการกวน วิธีนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิต และควบคุมสภาพต่างๆได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ มีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยใช้การเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว (ดวงพร 2530)

อาหารแข็ง	อาหารเหลว
1. ต้องการเนื้อที่เป็นจำนวนมากเพื่อจะใช้วางถาดอาหารเลี้ยงเชื้อ	1. ใช้ถังหมักขนาดใหญ่
2. ใช้แรงงานมาก	2. ใช้แรงงานน้อย
3.ใช้ระบบการควบคุมต่างๆ น้อย	3. ระบบการควบคุมต่างๆ ต้องมีความระมัดระวังอย่างมาก
4. ปัญหาจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อนมีน้อย	4. การปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ง่าย
5. การแยกเอนไซม์ประกอบด้วยการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย การกรองหรือใช้การเหวี่ยง และบางครั้งทำให้น้ำระเหยหรือทำการตกตะกอนเอนไซม์	5. การแยกเอนไซม์ประกอบด้วยการกรองหรือการเหวี่ยง และบางครั้งทำให้น้ำระเหยหรือทำให้เอนไซม์ตกตะกอน

วิชชุพร (2529) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่แยกได้จากโรงงานแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทยสามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบได้ดี และให้ผลผลิตเอนไซม์ในสภาพอาหารแข็งสูงกว่าอาหารเหลวถึง 3 เท่า

Nishise และคณะ (1988) แยกเชื้อจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย ได้เชื้อ *Rhizopus* sp, MB64 มีความสามารถสูงในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

แหล่งคาร์บอน ทำหน้าที่เป็นสารกอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของราและเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างอะไมเลส แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน มอลโตไตรโอส

แป้งจะทำหน้าที่เป็นแหล่งของคาร์บอนในการผลิตอะไมเลสได้ดีที่สุด ส่วนกลูโคส ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลเล็กกว่า จะให้เอนไซม์ออกมาน้อย ทั้งนี้เนื่องจากการที่เชื้อราจะสร้างอะไมเลสออกมานั้นจะต้องได้รับการกระตุ้นด้วยสารประกอบที่มี 1,4 กลูโคซิดิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fukumoto และคณะ, (1958) พบว่า น้ำตาลแลคโตสและกาแลคโตสสำคัญที่สุดในการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ส่วนน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสไม่ได้ส่งเสริมให้มีการสร้างเอนไซม์ ทั้งยังยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลสถ้าใช้ความเข้มข้นสูงๆ นอกจากนั้นแหล่งคาร์บอนไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเท่านั้น ยังเกี่ยวกับความเร็วในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ ถ้าความเร็วในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตสูงจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลส Welker และ Campbell (1963) ได้รายงานถึงผลของคาร์บอนต่อการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *B. stearothermophilus* เขาพบว่าแหล่งคาร์บอนบางชนิดทำให้เซลล์เจริญดีแต่สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้น้อย ยกเว้นมอลโตส แป้ง และฟรุคโตส

Windish และ Mhatre(1965) ได้ศึกษาเชื้อ *B. subtilis* พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนกลูโคส ฟรุค-โตส และซูโคส ทำให้การเจริญดีแต่การสร้างอะไมเลสลดลง ในขณะเดียวกันการใช้ไกลโคเจน แลคโตส กาแลคโตส และไซโลส ให้การเจริญไม่ค่อยดีแต่ส่งเสริมการสร้างเอนไซม์อะไมเลสให้เพิ่มมากขึ้น

<u>แหล่งไนโตรเจน</u> ทำหน้าที่เป็น precursor ของกรดอะมิโนที่ราจะนำไปใช้ในการสร้างเอนไซม์และโปรตีน สำหรับการเจริญเติบโตของรา ตลอดจนเป็นตัวทำให้เกิดสภาวะสมดุลย์ของอาหารเสริมในการผลิตเอนไซม์และพีเอชอย่างถูกต้อง

แหล่งของไนโตรเจนที่สามารถใช้ได้อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์หรืออนินทริย์ เช่น ของเสียจากโรงงานกลั่นเหล้า เบียร์ น้ำแช่ข้าวโพด เมล็ดถั่ว เป็นต้น เหล่านี้ล้วนอยู่ในรูปอินทรีย์สาร ส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์มี แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท และยูเรีย เป็นต้น คุณภาพของแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ก็จะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ (Adam และ Balankma,1947)

Nomura และคณะ, (1956) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่เร่งการสร้างเอนไซม์อะไมเลส คือ เคซีนไฮโดรไลเสส Windish และ Mhatre (1965) รายงานว่า เคซีน กากถั่วเหลือง เยลาติน ผสมกับแอคแทรก เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับผลิตเอนไซม์

Shinke และคณะ, (1977) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนกับเชื้อ *B. cereus* เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรท ยูเรีย แอสพาราจิน เคซีน บีฟ-แอคแทรก โพลีเปปโตน โพลีเปปโตนผสมกับบีฟแอคแทรก แหล่งที่ให้เอนไซม์ดีที่สุดคือ โพลี-เปปโตนผสมกับบีฟแอคแทรก ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ไม่ได้ช่วยในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อะไมเลสเลย แสดงว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์จะเป็นตัวกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลส นอกจากนั้นพบว่า ยูเรียสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้

เกลือของสารอนินทรีย์

Wallerstein (1937) รายงานว่า ฟอสเฟตเป็นสารกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์อะไมเลส ความเข้มข้นเหมาะสมของฟอสเฟตสำหรับสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *B. amzloliquefaciens* คือ 0.1 M ซึ่งความเข้มข้นขนาดนี้มากเกินพอสำหรับการเจริญ

อนุมูลอื่นๆที่เป็นตัวเร่งในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้แก่ Mn^{++} Zn^{++} Na^{+} Fe^{+++} (Stockton และ Wyss, 1947)

อุณหภูมิ แบคทีเรียและราส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์มักจะเจริญได้ดีในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่บางพวกก็ต้องการอุณหภูมิสูงในการเจริญ คือ เจริญได้ดีที่ 45-65 องศาเซลเซียส (ทนง , 2522)

อะไมเลสซึ่งมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จะสามารถทนทานความร้อนได้ดีกว่าเบต้า-อะไมเลส โดยเฉพาะอะไมเลสจาก *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* เป็นเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้ดีกว่าอะไมเลสจากแหล่งอื่นๆ ในการย่อยแป้งเอนไซม์อะไมเลสจาก *B. stearothermophilus* จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 55 - 70 องศาเซลเซียส (Campbell และ Cleveland, 1961)

พีเอช จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่แตกต่างกัน พบว่า อะไมเลสส่วนใหญ่จะคงทนต่อพีเอช ซึ่งมีช่วงจาก 4.0 – 10.0 อะไมเลสจากแบคทีเรียจะทำงานได้ดีอยู่ในช่วงพีเอช 3.0 – 9.5 และ พีเอชที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.0 (Fukumoto, 1958) ดังนั้นจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้คงที่เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์อย่างเต็มที่

การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (ดวงพร, 2530)

เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะต้องเก็บเกี่ยวออกจากอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่ใช้โดยอาศัยกรรมวิธีในการเก็บเกี่ยวที่ต้องขึ้นกับวัตถุประสงค์ว่าจะให้เอนไซม์จำหน่ายในรูปแห้งหรือในรูปเหลว

ในกรณีของเอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็งสามารถนำเอนไซม์ในอาหารแข็งที่ใช้ไปอบแห้งเพื่อใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ในรูปแห้ง ในขณะที่ถ้าต้องการเอนไซม์เหลว จำเป็นต้องนำเอนไซม์ในรูปแห้งนั้นไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เอนไซม์ที่สกัดได้สามารถทำให้เป็นเอนไซม์เข้มข้น หรือเอนไซม์ผง โดยเอนไซม์ที่สกัดได้จะต้องผ่านขั้นตอนต่อไปนี้คือ การกรอง การทำให้เข้มข้น การตกตะกอน การทำแห้ง ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน สำหรับเอนไซม์จากการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารเหลวจะผ่านขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับ เอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็ง ยกเว้นขั้นตอนการสกัดตอนแรกเท่านั้น

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

สารละลายเอนไซม์ที่แยกเอาเซลล์ออกไป เช่น Crude enzyme จะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหย หรือนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เมทานอล อะซีโตน หรือตัวทำลายอื่นๆ โดยที่จะต้องทำขณะที่อุณหภูมิต่ำ แล้วนำไป dialysis จากนั้นทำให้แห้ง เติมสารที่ศึกษาแล้วว่าจะรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไว้ได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ในทางการค้าอาจส่งขายในรูปของสารละลายได้ วิธีการที่จะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ส่วนมากจะใช้วิธีการทางโครมาโตกราฟฟีแบบ molecular seive เช่น ใช้ DEAE cellulose Sephadex G-100 CM – cellulose เป็นต้นซึ่งรายละเอียดที่ใช้จะขึ้นกับชนิดเชื้อเอนไซม์และประสบการณ์ที่มีอยู่ในด้านการทำให้สารบริสุทธิ์ โดยที่คุณสมบัติและประสิทธิภาพของเอนไซม์ยังคงอยู่ และทำให้ได้เอนไซม์ในรูปที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (ดวงพร, 2530)

Horikoshi (1971) ศึกษาการทำให้เอนไซม์อะไมเลสซึ่งสร้างโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* NO, A-40-2 บริสุทธิ์ นำสารละลายใสที่ได้จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าเครื่องเหวี่ยง 6,000 g นาน 10 นาที มาผ่าน column ซึ่งบรรจุ DEAE cellulose elute ออกด้วยบัฟเฟอร์ นำไปผ่าน hydroxy apatite column แล้วชะ (elute) ออกด้วยบัฟเฟอร์ นำไปผ่าน Sephadex G-100 column อีกครั้ง จะได้เอนไซม์อะไมเลสบริสุทธิ์ขึ้น 80 เท่า

Upton และ Fogarty (1976) นำเอนไซม์ที่สร้างจาก *Thermomonospora viridis* มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วย n-propyl alcohol นำตะกอนมาละลายแล้ว dialysis ใน tap water นำไปผ่าน column ซึ่งบรรจุ $Ca_3(PO_4)_2$ แล้วชะออกมาด้วยฟอตเฟสบัฟเฟอร์ นำไปผ่าน Sephadex G-100 เอนไซม์อะไมเลสจะบริสุทธิ์ขึ้น 313 เท่า

การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลส (ดวงพร, 2530)

การเก็บรักษาอะไมเลสให้มีกิจกรรมคงที่หรือลดลงก็เพียงเล็กน้อย จะต้องเกี่ยวข้องทั้งพีเอชและอุณหภูมิต้องให้เหมาะสม มิฉะนั้นก็เก็บไว้ในที่เย็น ได้แก่

1. ตู้เย็นธรรมดา (4-10 องศาเซลเซียส) อาจมีการเติมอนุมูลสารบางอย่างลงไปเพื่อรักษา activity ของเอนไซม์ เก็บได้นาน 1-2 เดือน

2. แช่แข็ง นิยมอุณหภูมิต่ำกว่า 0 ถึง –20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. freeze dry หรือ lyophilized เป็นการระเหิดน้ำออกจากสารละลายเอนไซม์ในสภาพที่เป็นน้ำแข็ง ทำในสภาพสุญญากาศ เมื่อเสร็จแล้วสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิต่ำๆก็ได้

4. immobilized enzyme โดยให้เอนไซม์เกาะกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อย่างเช่น polyacrylamide gel และ แก้วที่มีรูพรุน เป็นต้น

การนำเอนไซม์อะไมเลส มาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม (ดุษณี, 2537)

อุตสาหกรรมทอผ้า

ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดง่าย ดังนั้นก่อนที่จะเอามาทอต้องชุบน้ำแป้งเพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากการทอผ้าเป็นผืนเสร็จแล้ว ต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์ย่อยและนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์

อุตสาหกรรมขนมปัง

ในการเตรียมแป้งที่ใช้ทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปด้วย เพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นในแป้งหมัก ทำให้ได้โด (dough) เอนไซม์ที่ใช้มีทั้งอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา เนื่องจากว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถทนความร้อน ดังนั้นเอนไซม์นี้จะถูกทำลายไปหลังจากการอบขนมปังแล้ว

อุตสาหกรรมเครื่องดื่มน้ำผลไม้

ปกติน้ำผลไม้คั้นจะมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูงจึงต้องใส่เอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น โดยการบ่มน้ำผลไม้ที่มีเอนไซม์อะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90 ฟาเรนไฮต์ หลังจากนั้นจึงกรองเอาน้ำตาลออก

อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์

ในการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และเบียร์จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อราและเอนไซม์อะไมเลสในกระบวนการหมักเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส หรือกำจัดเดกซ์ทรินออกจากวอร์ต เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง จึงต้องเติมลงไปในถังหมักในขณะที่เย็น

อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรับเพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานในอุตสาหกรรม

ในการผลิตไซรับเหล่านี้จะใช้แป้งจากเมล็ดพืชต่างๆ นำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส

มันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 7 ของโลกรองจากธัญพืชชนิดต่างๆ ปลูกได้ทั่วไปในแถบเมืองร้อน คือประเทศที่อยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 30 องศาเหนือ และใต้ ระดับความสูงไม่เกิน 2,000 เมตร (6,500 ฟุต) อุณหภูมิระหว่าง 18–35 องศาเซลเซียส มีน้ำฝนตกชุก เฉลี่ย 50-300 ม.ม.ต่อปี (20-200 นิ้ว) ระดับความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ระหว่าง 5-9

สำหรับในประเทศไทย เมื่อมองดูสินค้าออกจากประเทศไทยในอดีตปี 2500 จะเห็นได้ว่าสินค้าชาวไร่ที่เราส่งออกสำคัญที่สุดได้แก่ ข้าว ยางพารา เป็นสินค้าที่มีความสำคัญต่อประเทศในแง่การส่งออก สินค้าอื่นๆ เช่น ข้าวโพด น้ำตาล ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังและปอ แทบจะไม่มีความสำคัญเลย

ตั้งแต่ยี่สิบกว่าปีที่ผ่านมาแล้วผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญอยู่ในอันดับ 4-5 ตลอดมา ทั้งมูลค่าและปริมาณการส่งออกได้เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังมากที่สุดในโลก โดยการส่งออกจากในประเทศนั้นทำรายได้สูงเป็นที่สามรองจากข้าวและยาง สูงกว่ารายได้จากการส่งออกข้าว สำหรับในปี 2525 ที่ผ่านมาประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังสูงถึง 19,770 ล้านบาท โดยส่งออกเป็นปริมาณสินค้าทั้งสิ้น 7,607,324 ตัน ซึ่งนับว่าสูงกว่าทุกปีที่เคยเป็นมา พื้นที่ซึ่งใช้ปลูกมันสำปะหลังรวมทั้งประเทศในปัจจุบันมีประมาณ 7 ล้านไร่ ส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกและตะวันออกเฉียงเหนือ

แป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลังผลิตได้จากรากที่มีลักษณะคล้ายหัวของต้นมันสำปะหลัง มีชื่อเรียกทางวิทยาศาตร์ว่า *Manihot utilisisma* ในภาษาอังกฤษจะเรียกแป้งมันสำปะหลังว่า Tapioca starch, Cassava starch หรือ Manioc starch (Lyon, 1974)

1. โครงสร้างของโมเลกุลแป้งมันสำปะหลัง

โดยทั่วไปแป้งประกอบด้วยโมเลกุลโพลีแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส และ อะไมโลเพกติน ซึ่งทั้งอะไมโลสและอะไมโลเพกตินนี้เป็นโฮโมไกลแคนของดี-กลูโคส ต่างกันที่โมเลกุลของอะไมโลสเป็นสายตรง กลูโคสแต่ละหน่วยในอะไมโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-(1-4)-glucosidic linkage ส่วนโมเลกุลของอะไมโลเพกตินมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา บริเวณที่แตกสาขาเกิดจากการเชื่อมต่อของหน่วยกลูโคสด้วยพันธะ α-(1-6)–glucosidic linkage (Schoorıhoven, 1974) ในโมเลกุลของแป้งมันสำปะหลังจะมีอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ประกอบอยู่ในอัตราส่วน 17 ต่อ 83 Degree of Polymerization (D.P) โดยเฉลี่ยของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินเท่ากับ 3,000 และ 2×10^6 ตามลำดับ (Lyon, 1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สมบัติทางกายภาพของและเคมีของแป้งมันสำปะหลัง

2.1 โครงสร้างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

เม็ดแป้งมันสำปะหลังมีลักษณะคล้ายรูปถ้วย (Schoonhoven, 1974) มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ถึง 35 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยจำนวน (Number average diameter) เท่ากับ 20 ไมครอน (Lyon, 1974) เมื่อตรวจดูเม็ดแป้งด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์จะเห็นลักษณะกากบาทสีดำ เรียกว่า Birefringence

ภายในเม็ดแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ซึ่งมีการเรียงตัวต่างกัน แบ่งได้เป็น 2 แบบ แบบแรก สายโพลีเมอร์ของอะไมโลสเรียงตัวขนานกันอย่างเป็นระเบียบ มีอะไมโลสบางส่วนเรียงขนานกับส่วนที่เป็นสายตรงส่วนนอกของอะไมโลเพกติน และยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้โมเลกุลบริเวณนี้จับกันอย่างหนาแน่น และมีแรงยึดเหนี่ยวสูงบริเวณนี้เรียกว่า Crytalline regions หรือ Micelles เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดลักษณะ Birefringence ของเม็ดแป้ง Crytalline regions นี้มีความสามารถในการดูดน้ำและพองตัวต่ำมาก ส่วนแบบที่สอง โมเลกุลเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ แรงดึงดูดระหว่างสายโพลีเมอร์ของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินต่ำกว่าแบบแรก บริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบนี้เรียกว่า Amorphous regions เป็นส่วนที่ดูดน้ำได้ดีและพองตัวได้ง่าย (Schoonhoven, 1974)

2.2 **องค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลัง** (Lyon, 1974)

แป้งมันสำปะหลังมีไขมันต่ำกว่าแป้งจากธัญพืชโดยทั่วไป ส่วนองค์ประกอบอื่นนั้นมีในปริมาณใกล้เคียงกันกับแป้งชนิดอื่น องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไปแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2: องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป

องค์ประกอบ	ปริมาณ(ร้อยละ)
ความชื้น	13.0
แป้ง	87.0
ไขมัน	0.1
โปรตีน	0.1
เถ้า	0.2
ฟอสฟอรัส	0.01
สารที่ให้กลิ่นรส	ต่ำมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ลักษณะเฉพาะของการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งมันสำปะหลัง

ในโมเลกุลแป้งโดยทั่วไปจะมีกลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic group) ใน Amorphous regions ซึ่งสามารถจับน้ำจากสิ่งแวดล้อมได้ ด้วยเหตุนี้แป้งโดยทั่วไปจึงมีความชื้นอยู่ร้อยละ 12 ถึง 14 และถ้าผสมน้ำเย็นลงในแป้ง อาจทำให้แป้งมีความชื้นได้ถึงร้อยละ 30 โดยที่ไม่ปรากฏลักษณะที่แยกชั้นของน้ำกับแป้ง การผสมน้ำในปริมาณที่มากกว่านี้โดยไม่มีการคนตลอดเวลาจะทำให้แป้งตกตะกอน ถ้ามีการให้ความร้อนพร้อมทั้งคนตลอดเวลาเม็ดแป้งจะเริ่มพองตัวจนเมื่อถึงอุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนเซชัน แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลภายในเม็ดแป้งจะถูกทำลาย เม็ดแป้งจะพองตัวมากกว่าเดิมและสูญเสียลักษณะ Birefringence เรียกว่าเกิดเจลาติไนเซชันของแป้ง อุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งมันสำปะหลังจะอยู่ในช่วง 65 ถึง 70 องศาเซลเซียสและความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) ของแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 อยู่ในช่วง 500 ถึง 1,500 Brabender units ส่วน Swelling power และ Solubillity ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 71 และร้อยละ 48 ตามลำดับ (Lyon, 1974)

ประโยชน์มันสำปะหลัง

1. เป็นแหล่งแคลอรีที่สำคัญของมนุษย์
2. ใช้ทำแป้ง
3. ใช้ทำอาหารสัตว์
4. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. ฟลาสก์ปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มล.
3. ฟลาสก์หลุมขนาด 250 มล.
4. ปิเปตต์
5. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
6. เครื่องผสมสารละลาย (vortex)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
8. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotorneter)
9. ตู้บ่มแบบเขย่า (shaker)
10. บิกเกอร์ ขนาด 500 มล.

สารเคมี

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์
2. ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลลาร์ พีเอช 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0
   ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลลาร์ พีเอช 8.0
   ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ 0.1 โมลลาร์ พีเอช 9.0 และ 10.0
3. สารละลาย 3,5 – Dinitrosalicylic (DNS)
4. แอมโมเนียมซัลเฟต
5. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
6. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต
7. โพแทสเซียมคลอไรด์
8. เฟอริกคลอไรด์
9. แป้งมันสำปะหลัง
10. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
39902

วิธีการ

1. การเตรียมกล้าสปอร์ (inoculum)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนอาหารแข็ง PDA ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้สร้างสปอร์ ทำให้สปอร์อยู่ในรูปสารละลาย (suspension) โดยการเติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.5%) เขี่ยสปอร์ให้กระจายจากนั้นนำไปกรองเอาเส้นใยออก ได้สปอร์อยู่ในรูปสารละลาย ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่อง Haemacytometer (ภาคผนวก ค)

2. การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ดัดแปลงมาจาก Ghosh และคณะ (1991) โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในภาคผนวกที่ ข โดยศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจาก *Aspergillus oryzae* เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งมันสำปะหลังจำนวน 30 45 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยในแต่ละความเข้มข้นจะใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร หลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละสูตรแล้ว ปรับพีเอชเท่ากับ 5 ด้วย 0.1 N HCl หรือ 0.1 N NaOH จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 60 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที หลังจากอาหารเย็นแล้ว เติมกล้าสปอร์ลงไปในอาหารเหลวในแต่ละฟลาสก์ โดยให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นำฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสทุกวันเป็นเวลา 5 วัน

3. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์อะไมเลส

3.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

3.1.1 ใส่สารละลายเอนไซม์อะไมเลส (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) ลงในหลอดทดลอง 1.0 มล. เติมบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ (พีเอช 3-7 ใช้ citrate-phosphate buffer, พีเอช 8 ใช้ phosphate buffer , พีเอช 9-10 ใช้ glycine-NaOH buffer) ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

3.1.2 เติมน้ำแป้งที่ละลายในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ หลอดละ 1.0 มล. ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.1.3 หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 นำสารละลายเอนไซม์ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS (ภาคผนวก ง)และคำนวนกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ พีเอช ต่างๆ รายงานผลในรูปกิจกรรมสัมพันธ์

3.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

3.2.1 ใส่สารละลายเอนไซม์อะไมเลส (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) ลงในหลอดทดลอง 7 หลอด เติมบัฟเฟอร์ ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด (optimum pH) ปริมาตร 1.0 มล.ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด

3.2.2 เติมสารละลายน้ำแป้ง 1.0 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน พีเอช ที่เหมาะสม ลงในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ ในข้อ 3.2.1 หลอดละ 1.0 มล. ผสมสารละลายให้เข้ากัน

3.2.3 นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 10 20 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

3.2.4 นำสารละลายเอนไซม์ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS และคำนวนกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ รายงานผลในรูปกิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity)

3.3 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส

3.3.1 นำสารละลายเอนไซม์อะไมเลส ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2.0 จำนวน 8 หลอด เติมบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ (พีเอช 3-7 ใช้ citrate-phosphate buffer, พีเอช 8 ใช้phosphate buffer, พีเอช 9-10 ใช้ glycine-NaOH buffer) ลงในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ หลอดละ 2.0 มล. ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.3.2 นำสารละลายจากข้อ 3.3.1 มาปรับพีเอช ให้ได้พีเอชที่เอนไซม์อะไมเลสมีกิจกรรมสูงสุด (optimum pH)

3.3.3 นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละหลอดมาเจือจางให้มีความเข้มข้มที่เหมาะสม นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ โดยบ่มสารละลายเอนไซม์อะไมเลส 1.0 มล. บัฟเฟอร์ 1.0 มล. และน้ำแป้ง 1.0 มล. ในสภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์อะไมเลสมีกิจกรรมสูงสุด จากข้อ 3.1 และ 3.2

3.3.4 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากการบ่มที่พีเอชต่างๆ และรายงานผลในรูปกิจกรรมสัมพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส

3.4.1 นำสารละลายเอนไซม์อะไมเลส ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2.0 จำนวน 7 หลอด เติมบัฟเฟอร์ พีเอชที่เอนไซม์อะไมเลสมีกิจกรรมสูงสุด ปริมาตร 2.0 มล. ลงในหลอดทดลองทุกหลอดเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10 20 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.4.2 เมื่อครบเวลาทำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละหลอดให้เย็นทันที โดยนำหลอดทดลองแช่ในอ่างน้ำแข็ง

3.4.3 นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละหลอดมาเจือจางให้มีความเข้มข้มที่เหมาะสม นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ โดยบ่มสารละลายเอนไซม์อะไมเลส 1.0 มล. บัฟเฟอร์ 1.0 มล. และน้ำแป้ง 1.0 มล. ในสภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์อะไมเลสมีกิจกรรมสูงสุด

3.4.4 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

3.4.5 รายงานผลในรูปกิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม

4.วิธีการวิเคราะห์

4.1 ทำการวิเคราะห์วัดค่า พีเอช ในน้ำหมักด้วยเครื่อง พีเอชมิเตอร์ รุ่น cyberscan 2000

4.2 การหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

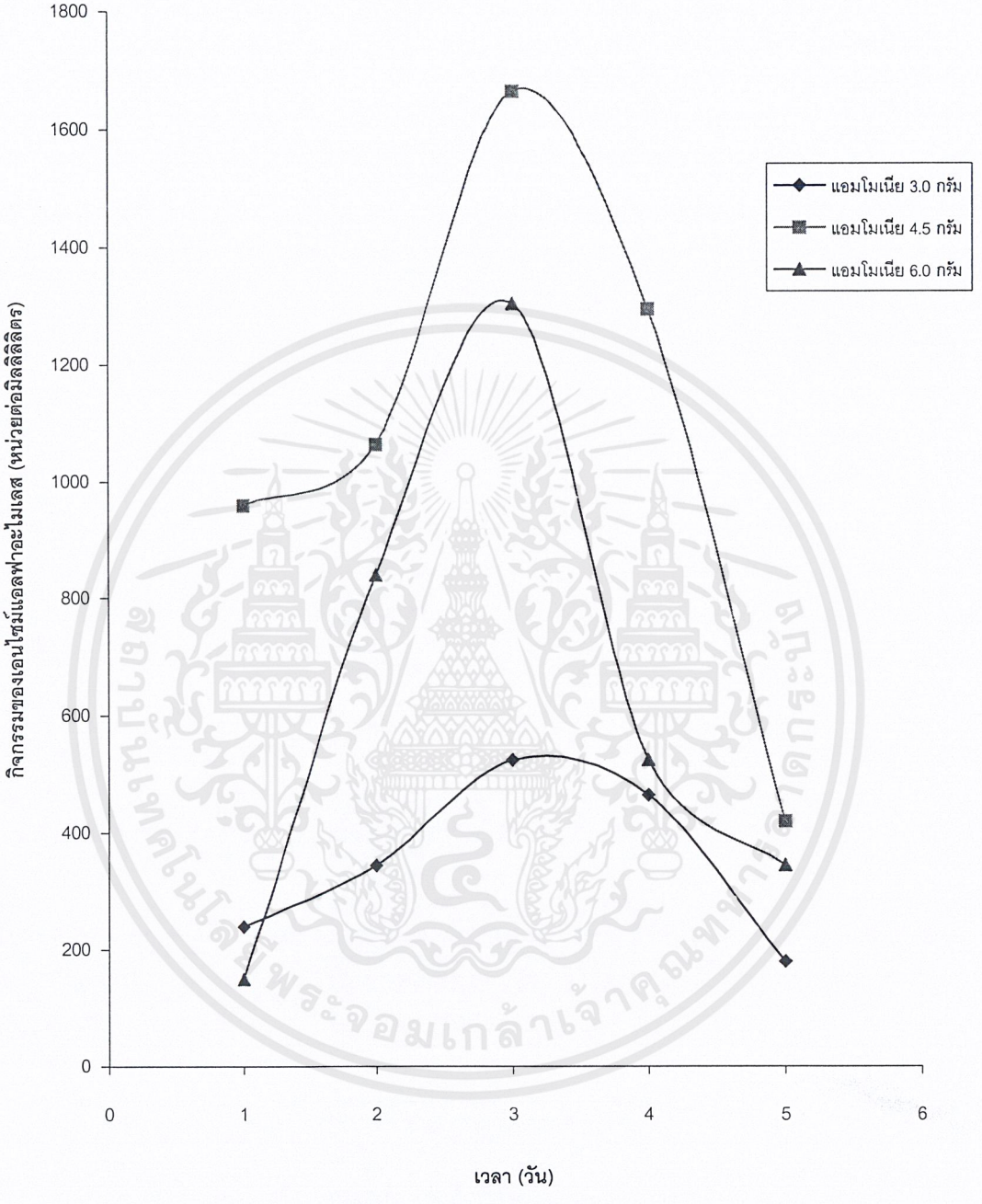
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ผลของการเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว ซึ่งใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 30 45 และ 60 กรัมต่อลิตร และใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3 4.5 และ 6 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นแป้ง 30 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 4.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1,665 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ ที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 6.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร จะให้กิจ-กรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1,305 และ 525 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2 สำหรับที่ปริมาณความเข้มข้นแป้ง 45 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 4.5 กรัมต่อลิตร จะได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,200 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ ที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 และ 6.0 กรัมต่อลิตร โดยจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากันคือ 480 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 3 และสำหรับที่ปริมาณความเข้มข้นแป้ง 60 กรัมต่อลิตร ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 975 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ ที่ปริมาณแอมโมเนียม 4.5 และ 6.0 กรัม โดยจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 345 และ 600 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4

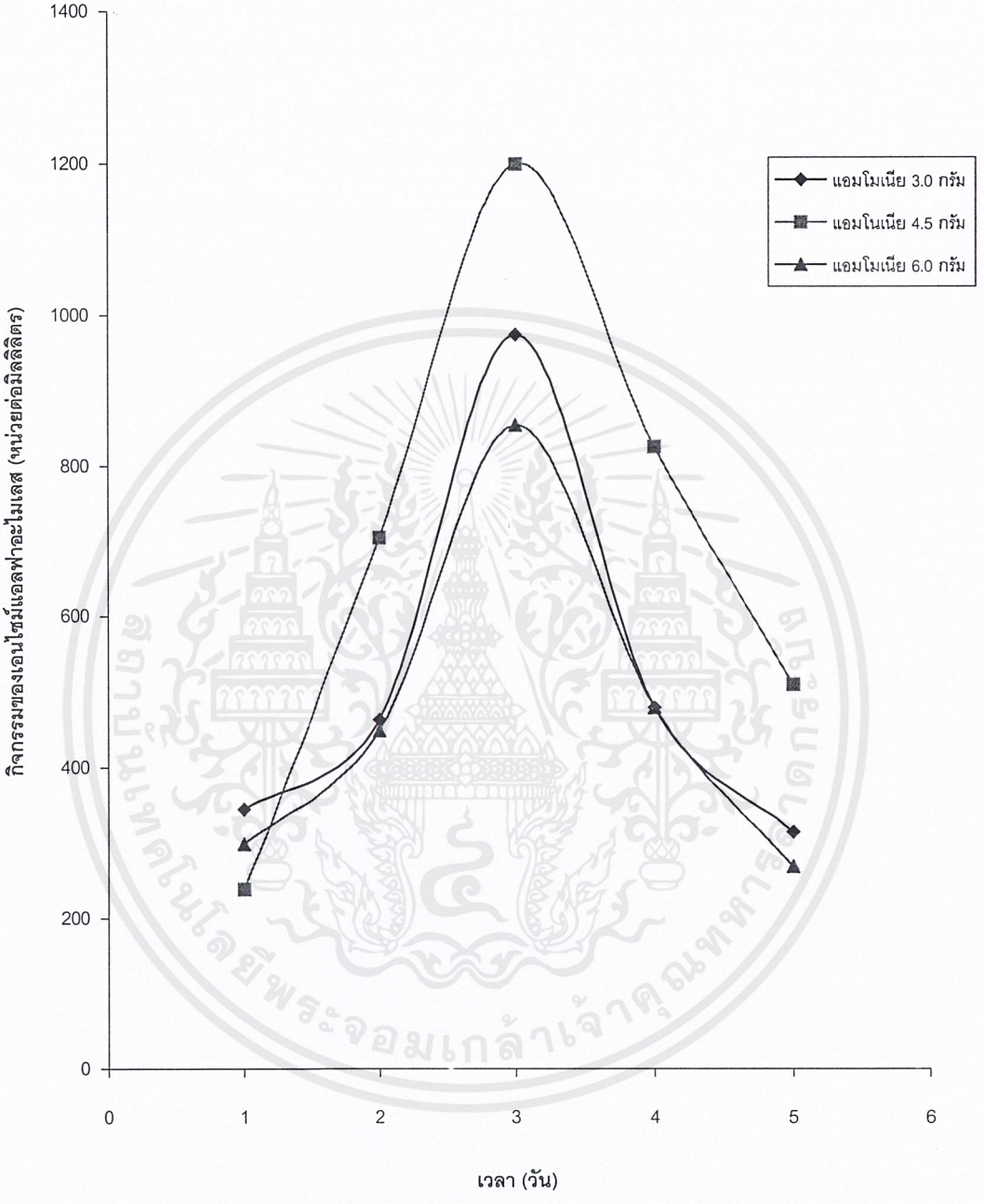
ดังนั้นปริมาณแป้งมันสำปะหลัง และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3068 คือ 30 กรัมต่อลิตร และ 4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 1,665 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากการทดลองของ ปิยนุช คชภักดี (2524) พบว่า การผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *A. oryzae* ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่สุดคือ 20 กรัม โดยที่ใช้ปริมาณยีสต์แห้ง 4 กรัม โดยที่ใช้ส่วนประกอบของอาหารอื่นๆคือ K_2HPO_4 0.1 กรัม KH_2PO_4 0.1 กรัม $MgHO_4.7H_2O$ 0.05 กรัม และ $FeSO_4$ 0.001 กรัม จะได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 170.80 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



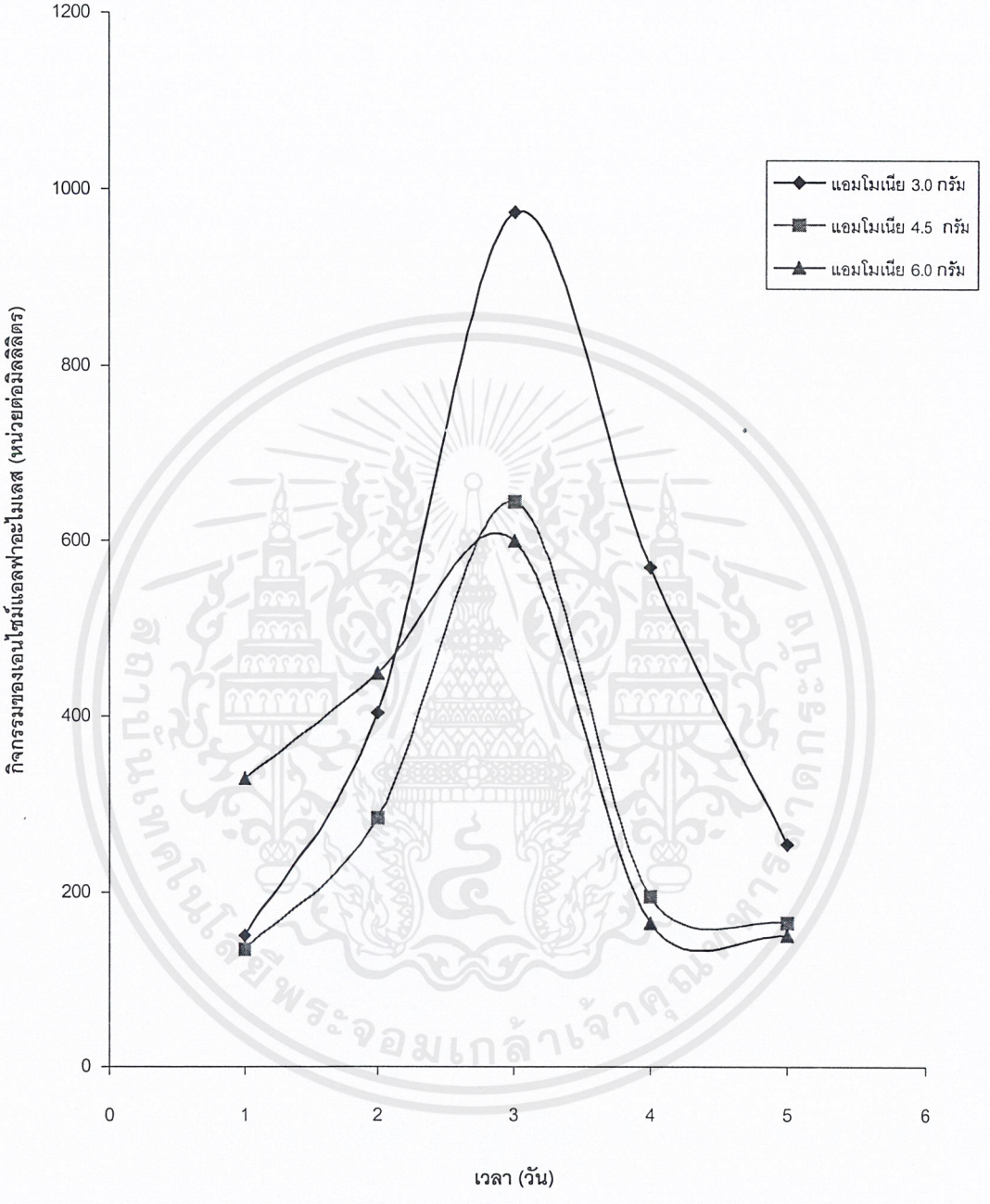
รูปที่ 2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณแป้ง 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>รูปที่ 3</u> แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณแป้ง 45 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>รูปที่ 4</u> แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ *A. oryzae* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณแป้ง 60 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ทำงานได้ดีที่สุดที่ พีเอช 5.0 โดยมีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาที่ พีเอช 6.0 กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสลดลงเหลือ 86.53 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่ พีเอช อื่นๆ จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ คือ ที่ พีเอช 4.0 มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 51.92 เปอร์เซ็นต์ ที่ พีเอช 7.0 และ 8.0 กิจกรรมจะลดลงเหลือ 36.53 เปอร์เซ็นต์ และ 26.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ พีเอช 3.0 กิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเหลือ 23.07 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่ พีเอช 9.0 มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 21.15 เปอร์เซ็นต์ และที่ พีเอช 10.0 จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์น้อยที่สุด คือ จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์เพียง 19.23 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 5

แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 นี้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 5.0 ซึ่งจะพบว่ามีความใกล้เคียงกับ เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 พบว่ามี พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.0-5.0 (Chang และคณะ, 1995)

Selvakumar และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาคคุณสมบัติของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้จะมี พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ พีเอช 4.4

Ali และ Hossain (1990) ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus terreus* พบว่า เอนไซม์จะมี พีเอช ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ พีเอช 4.0

จากการทดลองของ Dey และ Agarwal (1999) ซึ่งทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์อะ-ไมเลสที่ผลิตได้จาก *Streptomyces megasporus* สายพันธุ์ SD12 พบว่า พีเอช ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ พีเอช 6.0

เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* และ *A. oryzae* ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จะมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.0-6.0 จากการทดลองของ Windish และ Mhatre (1965) และยังพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* B_{1512} และ *B. subtilis* PR_1 จะมีพีเอชเหมะสมที่ 6.0 (สัตถาพร, 2524)

Amund และ Orunsina (1987) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยมันสำปะหลัง ในกระบวนการหมักหัวมันสำปะหลังพบเชื้อ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ

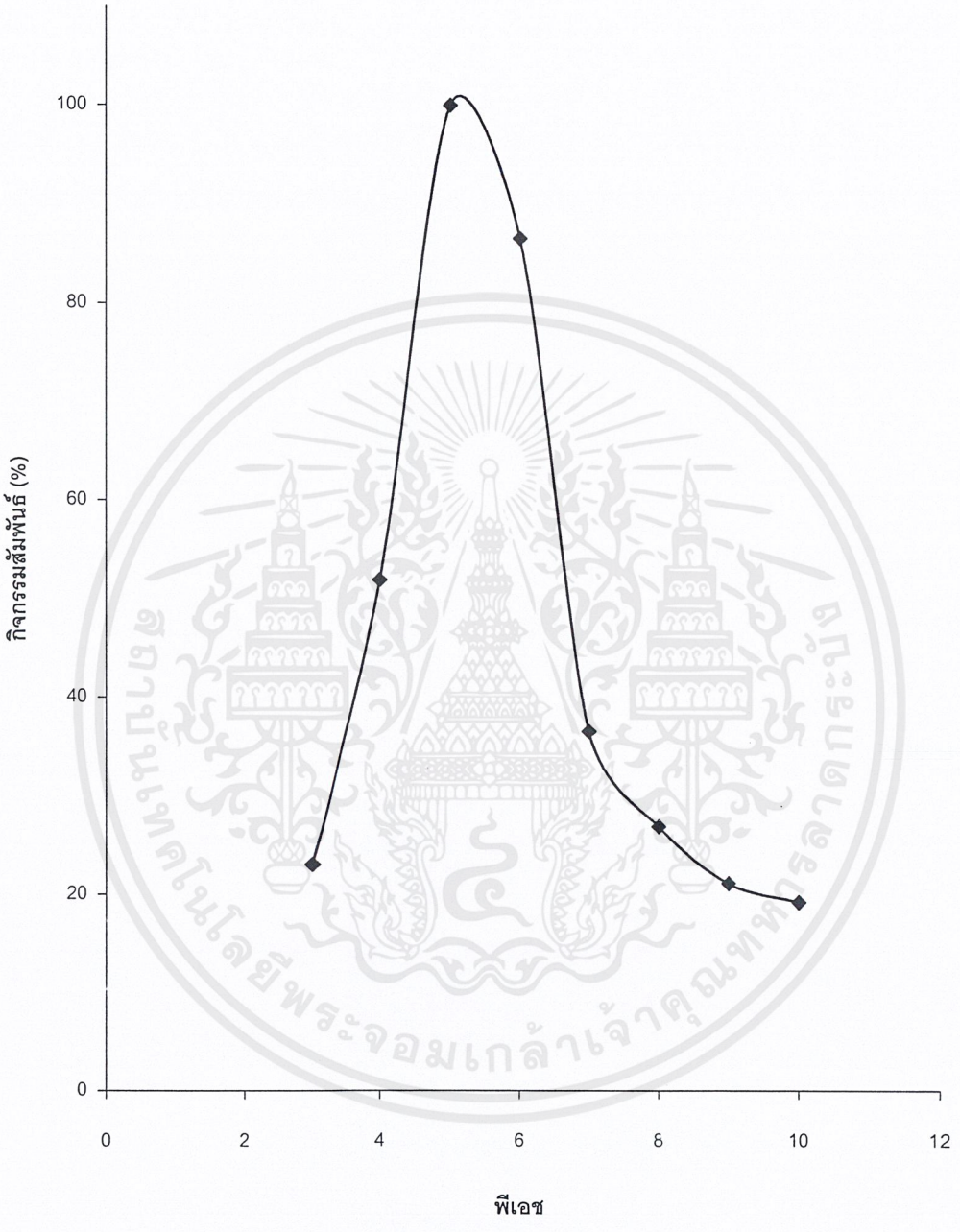
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B. cerius ผลิตเอนไซม์อะไมเลส เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่า พีเอช ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ พีเอช 7.0, 5.5 และ 7.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์

พีเอช	กิจกรรมสัมพันธ์ (เปอร์เซ็นต์)
3.0	23.07
4.0	51.92
5.0	100.00
6.0	86.53
7.0	36.53
8.0	26.92
9.0	21.15
10.0	19.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์อะไมเลส ที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 87.25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 10 20 30 40 และ 70 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ลดลงตามลำดับดังนี้ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 64.70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 49.01 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมลดลงเหลือ 44.11 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์จะลดลงเหลือ 38.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุดโดยจะมีกิจกรรมสัมพันธ์ลดลงเหลือ 32.23 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 6

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3068 จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าคล้ายกับผลการทดลองของ Selvakumar และคณะ (1996) ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* โดยใช้อาหารแข็ง พบว่า เอนไซม์ที่ได้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจ-กรรมของเอนไซม์ที่ 60 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของ Ali และ Hossian (1990) พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตจาก *Aspergillus terreus* จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

แต่จากการศึกษาของ สัตถาพร (2524) โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* PR_1 และ *Bacillus amyloliquefaciens* B_{1512} ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ

Kobayashi และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. MS300 พบว่า จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 40 องศา-เซลเซียส

จากการศึกษาของ Ilori และคณะ (1997) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการหมัก จาก *Micrococcus luteus* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

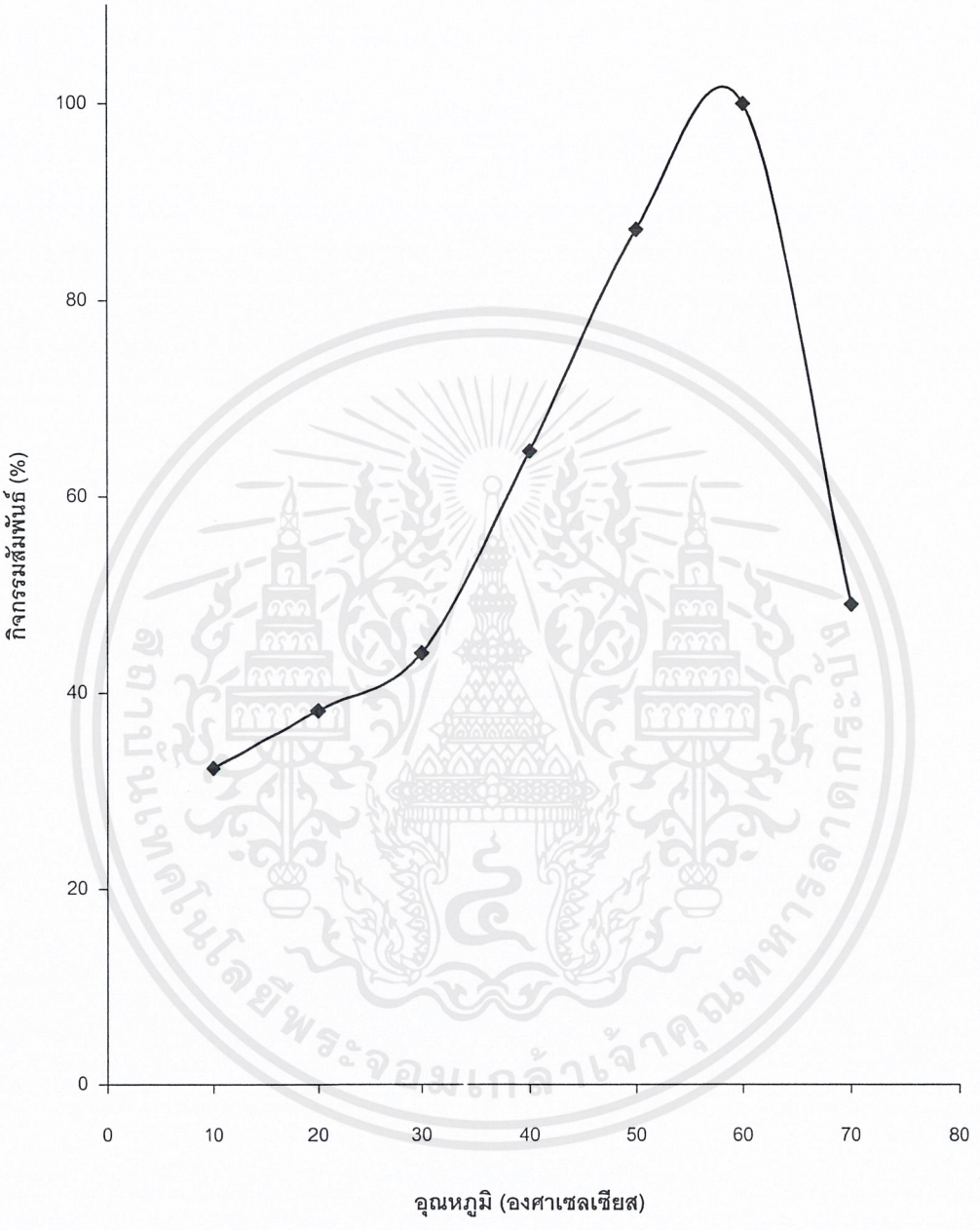
จากการเปรียบเทียบผลการวิจัยอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพันธ์ (เปอร์เซ็นต์)
10	32.35
20	38.23
30	44.11
40	64.70
50	87.25
60	100.00
70	49.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>รูปที่ 6</u> แสดงผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ต่อ พีเอชต่างๆ ที่ใช้ในการบ่มเป็นระยะเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์อะไมเลสจะมีความคงตัวในช่วง พีเอช 5.0 โดยจะมีความคงตัวสูงสุดที่ พีเอช 5.0 โดยจะมีกิจกรรมสัมพันธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ พีเอช 6.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 86.66 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7.0 พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 70.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ พีเอช อื่นๆ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามลำดับดังนี้ คือ พีเอช 4.0 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 56.66 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 จะมีกิจกรรมเหลือ 50.00 เปอร์เซ็นต์ และที่ พีเอช 3.0 และ 9.0 จะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 48.33 และ 45.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับ พีเอช 10.0 จะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุดโดยจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 36.66 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 7

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 จะมีความคงตัวของเอนไซม์อยู่ในช่วง 5.0 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ พบว่า ความคงตัวของเอนไซม์จะในช่วงพีเอชที่แตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ เช่น

Ghosh และคณะ (1991) รายงานว่า เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตจาก *Aspergillus terreus* NA-170 จะมีความคงตัวที่ พีเอช ในช่วง 3.0-7.0

Dey และ Agarwal ได้ทำการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสจาก *Streptomyces megasporus* สายพันธุ์ SD12 พบว่า เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ มีความคงตัวอยู่ในช่วง พีเอช ระหว่าง 5.5-8.5 จากการทดลองของ สัตถาพร (2524) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* PR_1 และ *Bacillus amyloliquefaciens* B_{1512} จะมีความคงตัวในช่วง พีเอช 6.0-7.5

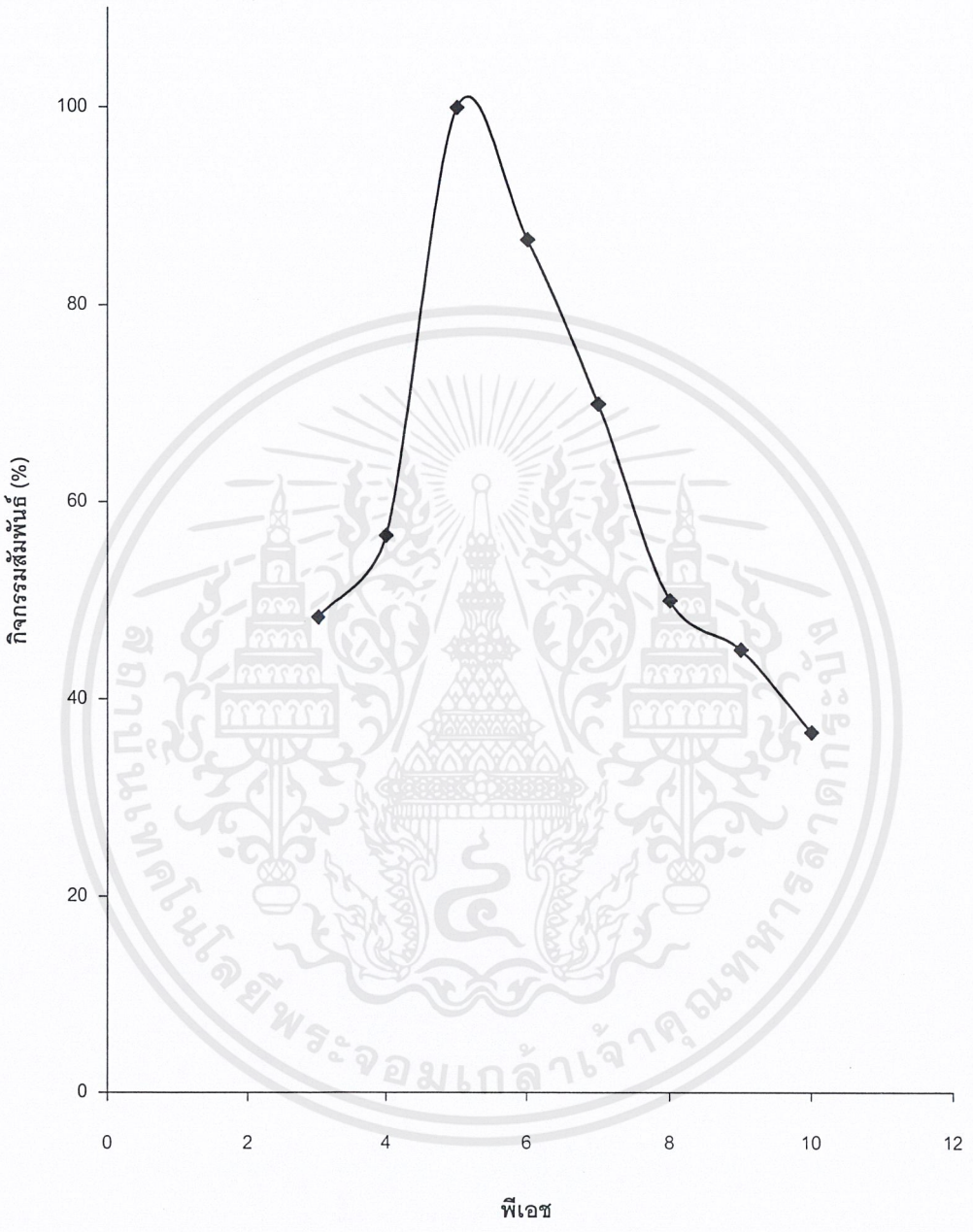
Kobayashi และคณะ (1992) ได้มีการศึกษาถึงความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส ที่ผลิตจากเชื้อ *Natronococcus sp.* สายพันธุ์ Ah-36 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความคงตัวในช่วงพีเอช 6.0-8.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์

พีเอช	กิจกรรมสัมพันธ์ (เปอร์เซ็นต์)
3.0	48.33
4.0	56.66
5.0	100.00
6.0	86.66
7.0	70.00
8.0	50.00
9.0	45.00
10.0	36.66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ต่ออุณหภูมิต่าง ๆ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 10 20 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่า เอนไซม์จะมีความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจะมีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจะมีกิจกรรมสัมพันธ์ 95.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือ 62.33 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือ 32.46 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 25.54 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 17.17 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่างที่สุดโดยจะเหลือกิจกรรมเพียง 15.00 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 8

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 จะมีความคงตัวของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ พบว่าเอนไซม์จะมีความคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ ดังเช่น

Ghosh และคณะ (1991) รายงานว่า เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตจาก *Aspergillus terreus* NA-170 จะมีความคงตัวที่ อุณหภูมิ ในช่วง 30-75 องศาเซลเซียส

การทดลองของ Dey และ Agarwal ได้ทำการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสจาก *Streptomyces megasporus* สายพันธุ์ SD12 พบว่า เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ มีความคงตัวอยู่ในช่วง อุณหภูมิระหว่าง 40-85 องศาเซลเซียส

จากการทดลองของ สัตถาพร (2524) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* PR_1 และ *Bacillus amyloliquefaciens* B_{1512} จะมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส

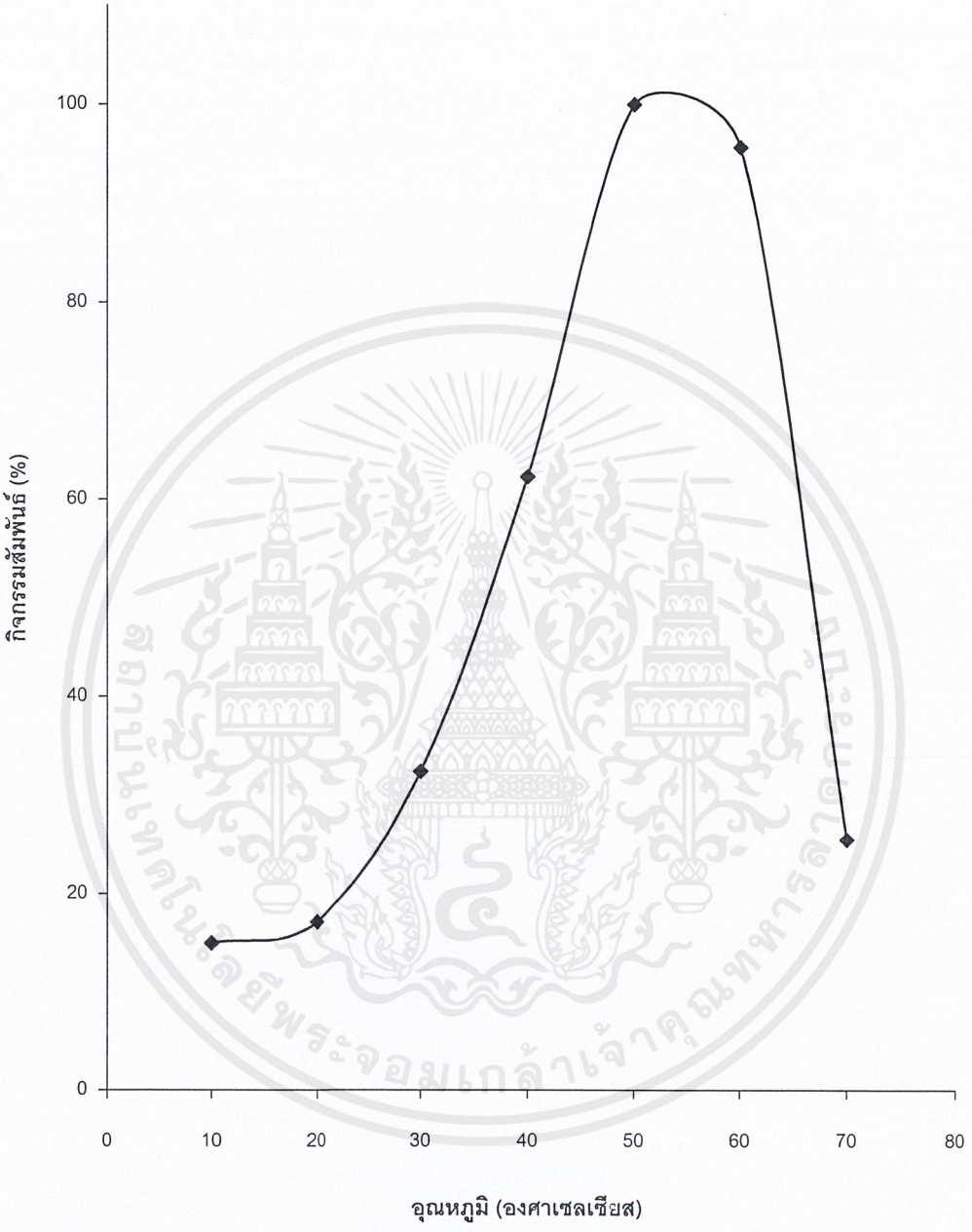
Kobayashi และคณะ (1992) ได้มีการศึกษาถึงความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส ที่ผลิตจากเชื้อ *Natronococcus sp.* สายพันธุ์ Ah-36 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพันธ์ (เปอร์เซ็นต์)
10	15.00
20	17.17
30	32.46
40	62.33
50	100.00
60	95.67
70	25.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 แสดผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอริกคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์เขย่า โดยใช้ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด โดยจะมีค่าเท่ากับ 1,665 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่ พีเอช เท่ากับ 5.0 และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สภาวะที่เอนไซม์มีความคงตัวจะอยู่ในช่วง พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษานี้ ควรที่จะมีศึกษาถึงอิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสให้มากขึ้น เพื่อที่จะให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ยกตัวอย่างเช่น

- ศึกษาถึงวัตถุดิบที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ เช่น ของเหลือจากการเกษตร กากถั่วเหลือง
- ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ เช่น พีเอชของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง ความเร็วรอบที่ใช้เพาะเลี้ยง
- ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงในถังหมักเพื่อขยายการผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฤติกานต์ มหาวรรณ. 2533. การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

จิราภรณ์ สุขุมาวาลี. 2518. การศึกษาทางชีววิทยาของแป้งข้าวหมาก. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาครั้งที่ 14 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม: ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตส์ พิมพ์ครั้งที่ 1.

ทนง ภัครัชพันธุ์. 2522. เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2537. จุลชีววิทยา เล่ม 2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน.

ปิยนุช คชภักดี. 2524. การผลิตแอลฟาอะไมเลส จากรา *Aspergillus oryzae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

วิชชุพร ว่องสุวรรณเลิศ. 2529. การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* N2 และคุณสมบัติ.งานวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับมันสำปะหลังของประเทศไทย. สถาบันวิทยาศาตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.

สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524. การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Ali, S. and Z. Hossian. 1991. Chracteristics of glcoamylase from *Aspergillus terreus*. J. Appl. Bacteriol. 71:144-146.

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β. Method in Enzymology. New York: Academic press, Inc.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore: The William and Wilkins, Co.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cambell, L. L. and P. D. Cleveland. 1961. Thermostable α-amylase of *B. stearothermophilus*. I. Crystallization and some general properties. J. Biol. Chem. 236:2952.

Chang, C.T., Tang, M.S. and C.F. Lin. 1995. Purification and properties of α-amylase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. Biochem. Mol. Biol. Int. 36(1):185-193.

Dey, S. and S.O. Agarwal. 1999. Characterization of a thermostable α-amylase from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD12. J. Biochem. Biophys. 36(3):150-157

Ellis, J.H., Wang, J. and C. W. Hesseltine. 1974. Rhizopus and chlamydomucor strain surveyed for milk-clothing, amylolytic and antibiotic activities. Mycologia. 66:593-599

Fukumoto, J., Yamamoto, T. and D. Tsuru. 1958. Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem. Kyoto: Marugen. Cited in Windish, W. and N. S. Mhatre. 1965. Microbial amylases. Adv. Appi. Microbiol. 7:288.

Ghosh, A., Chatterjee, B. and A. Das. 1991. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. J. Ferment. Bioeng. 71:162-169.

Gomori, G. 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods Enzymology New York: Academic press, Inc.

Hockenhull, D. J. D. and D.Herbert. 1945. The amylase and maltose of *Clostridium acitobutylicum*. J. Biol. Chem. 39:102-106.

Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganisms. Agric. Biol. 35:1782-1791.

Hostinova, E., Bacava M., Polivka L., Gasperik J., and J. Zelinka. 1979. Studies on Amylase from *Streptomyces aureofacians*. Micro. Abstr. 15(8):9.

Ilori, M.O., Amund, O.O. and O. Omidiji. 1997. Purification and properties of an α - amylase produces by a cassava-fermenting strain of *Micrococcus luteus*. Folia. Microbiol. (Praha). 42(5):445-449.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kern, M.,Nidezky, B., D.Kulbe, K.and D. Haltrich. 1998. Effect of nitrogen source on the level of aldose reductase and xylitiol dehydrogenase activities in the xylose-fermenting yeast *Candida tenuis*. J. Ferment. Bioeng. 85:196-202.

Kobayashi, H., Takaki, Y., Kobata, K., Takami, H. and A. Inoue. 1998. Characterization of α-moltotetraohydrolase produced by *Pseudomonas sp.* MS300 isolated from the deepest site of the mariana trench. Extremophiles. 2(4):401-407.

Kobayashi, T., Kanai, H., Hayashi, T., Akiba, T., Akaboshi, R. and K. Horikoshi. 1992. Holoalkaliphilic maltotriose-forming α-amylase from the archaebacterium *Natronococcus sp.* Strain Ah-36. J. Bacteriol. 174(11):3439-3444.

Kuo, M.J. and P.A. Hartman. 1966. Isolation of amylolitic strain of *Thermoactinomyces valgaris* and production of thermophillic actinomycete amylase. J. Bacteriol. 92:723-726.

Lyon, W.E. 1974. A green cassava mite recently found in Africa. FAO Plant Protection Bulletin. 22(1):11-13

Mense, E.H., Corman, L.J., Van Lamen, J.M., and A.F. Langlykke. 1947 Production of mold amylase in submerged culture. J. Bacteriol. 54:144-159.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determenation of glucose. J. Biol. Chem. 153:375-380.

Nomura ,M., Maruo, B. and S. Akaboris. 1956. J. Biochem. 43:143. Cited in Windish, W.W. and N.S. Mhatre. 1965. Microbial amylase. Adv. Appl. Microbiol. 7:287

Phaff, H.J., Miller, M.W. and E.H. Mark. 1948. The life of Yeast: Their, Activity, Ecology and Relation of Mankind. Harvard: Harvard University Press.

Reed, G. and L.A. Underkofler. 1966. Enzyme in food processing. New York: Academic Press.

Robyt, J.F.and R.J. Ackerman.1972. Complex carbohydrates Prat B. Method in Enzymeology. New York: Academic Press.

Schoonhoven, A. Van. 1974. Resistance to thrips damage in cassava. J. Eco. Entomol. 67(6):428-430.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Selvakumar, P., Ashakumary, L., Helen, A., and A. Pandey. 1996. Purification and characterization of glucoamlase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermention. Lett. Appl. Microbiol. 23:403-406.

Shink, R., Kunimi, Y., Aoki, K. and H. Nishira. 1977. Filamentation in *B. cereus* during β-amylase production. J. Ferment. Technol. 55(2):103-109.

Stockton, J. R. and O. Wyss. 1947. J. of Bact. 52:227. Cited in Windish, W. W. and Mhatre, N. S. 1965. Microbial amylase. Adv. Appl. Microbiol. 7:290.

Townsed, G.E. and A.A. Lindgren. 1953."Viable Yeast Court" Cytologia. 18:1831.

Upton, M. E. and W. M. Forgarty. 1977. Production and purification of the thermostable amylase and protease of *Thermomonospora viridis*. Appl. Environ. Microbiol. 33:59-64.

Wallerstein, L. 1937. Enzymes preparation from microorganisms. Int. Eng. Chem. 31:1218-1224.

Welker, N.E. and L.L. Chambell. 1963. Induced biosynthesis of α-amylase by growing cultures of *B. stearothemophilus*. J. Bacteriol. 86:1196-1201.

Windish, W.W. and N.S. Mhatre. 1965. Microbial amylase. Adv. Appl. Microbiol. 7:273-283.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ ก1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ในอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร

แป้ง (กรัม/ลิตร)	แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)
30	3.0	1	2.82	240
	3.0	2	2.23	345
	3.0	3	2.13	525
	3.0	4	2.03	465
	3.0	5	2.01	180
30	4.5	1	2.83	960
	4.5	2	2.32	1,065
	4.5	3	2.20	1,665
	4.5	4	2.14	1,275
	4.5	5	2.10	420
30	6.0	1	2.73	150
	6.0	2	2.24	840
	6.0	3	2.17	1,305
	6.0	4	2.16	525
	6.0	5	2.12	345

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ก2 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ในอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 45 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร

แป้ง (กรัม/ลิตร)	แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)
45	3.0	1	3.30	345
	3.0	2	2.65	465
	3.0	3	2.25	975
	3.0	4	2.25	480
	3.0	5	2.20	315
45	4.5	1	3.34	240
	4.5	2	2.71	705
	4.5	3	2.33	1,200
	4.5	4	2.32	825
	4.5	5	2.21	510
45	6.0	1	3.38	300
	6.0	2	2.51	450
	6.0	3	2.38	855
	6.0	4	2.35	480
	6.0	5	2.01	270

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางภาคผนวกที่ ก3</u> แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 ในอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 4.5 และ 6.0 กรัมต่อลิตร

แป้ง (กรัม/ลิตร)	แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)
60	3.0	1	2.82	150
	3.0	2	2.23	405
	3.0	3	2.13	945
	3.0	4	2.03	570
	3.0	5	2.01	255
60	4.5	1	2.83	135
	4.5	2	2.32	285
	4.5	3	2.20	645
	4.5	4	2.14	195
	4.5	5	2.10	165
60	6.0	1	2.73	330
	6.0	2	2.24	450
	6.0	3	2.17	600
	6.0	4	2.16	165
	6.0	5	2.12	150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ก4 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับพีเอชที่ใช้บ่มต่างๆ กัน

พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)
3	180
4	405
5	780
6	675
7	285
8	210
9	165
10	150

ตารางภาคผนวกที่ ก5 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับอุณหภูมิที่ใช้บ่มต่างๆ กัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)
10	330
20	390
30	450
40	660
50	890
60	1,020
70	500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ก6 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับความคงตัวที่พีเอชต่างๆ กัน

พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)
3	290
4	340
5	600
6	520
7	420
8	300
9	270
10	220

ตารางภาคผนวกที่ ก7 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มิลลิลิตร)
10	208
20	238
30	450
40	860
50	1,386
60	1,326
70	354

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารและสารละลายบัฟเฟอร์

สูตรอาหาร (Ghosh และคณะ, 1991)

แป้ง (soluble strach)	5.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	3.0	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.1	กรัม
พีเอช (pH)	5.0	

สารละลายบัฟเฟอร์ (Gomori, 1955)

1. Citrate-Phosphate Buffer

A: 0.1 M citric acid (ละลาย citric acid 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B: 0.2 M dibasic sodium phosphate (ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มล.(ของสารละลาย A) กับ Y มล. (ของสารละลาย B) ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
39.8	10.2	3.0
30.7	19.3	4.0
24.3	25.7	5.0
17.9	32.1	6.0
6.5	43.6	7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Phosphate Buffer

A: 0.2 M monobasic sodium phosphate (ละลาย $NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B: 0.2 M dibasic sodium phosphate (ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มล.(ของสารละลาย A) กับ Y มล.(ของสารละลาย B) ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
5.3	94.7	8.0

3. Glycine-NaOH Buffer

A: 0.2 M glycine (ละลาย glycine 15.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B: 0.2 M NaOH (ละลาย NaOH 8.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม 50.0 มล. (ของสารละลาย A) กับ X มล. (ของสารละลาย B) ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

A (มล.)	X (มล.)	พีเอช
50.0	8.8	9.0
50.0	32.0	10.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer (Townsed and Lindegren, 1953)

วิธีการ

1. วางกระจกปิดสไลด์ (cover slip)บนฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ที่ใช้นับสปอร์

2. บรรจุสารละลายสปอร์ที่เจือจางให้เหมาะสมแล้วบนฮีมาไซโตมิเตอร์ด้วยปิเปตต์

3. นับสปอร์ 5 ช่องบนตำแหน่ง บนซ้าย ล่างซ้าย บนขวา ล่างขวา และ ตรงกลาง ของช่องใหญ่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า

4. เมื่อนับสปอร์ครบ 5 ช่องแล้วให้นำสปอร์ทั้ง 5 ช่องมารวมกันเพื่อคำนวณตามสูตร

จำนวนสปอร์ทั้งหมด = $5A \times 10^4 \times$ ความเจือจาง

กำหนดให้ A คือ จำนวนสปอร์ที่นับได้จาก 5 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
วิธีการวิเคราะห์

การหากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (Bernfeld,1955)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1% soluble starch)

ละลายแป้ง 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลายปรับปริมาตรเป็น 100.0มิลลิลิตร

2. อะซิเทรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 5.0
3. สารละลาย 3,5- Dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย 3,5- Dinitrosalicylic acid 1.0 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมตาเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 300.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 200.0 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง

4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

ละลายน้ำตาลมอลโตส 9.0 กรัม ในน้ำกลั่น 20.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25.0 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1000.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

5. เอนไซม์อะไมเลส

วิธีการ

5.1 ใส่สารละลายอะไมเลส(ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตรและบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

5.2 เติมน้ำแป้งที่อุ่นที่ 50 องศาเซลเซียส ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเอนไซม์หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5.0 นาที

5.4 นำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน

5.6 ทำหลอดควบคุม(control) ทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์ต้ม 5 นาที ก่อนใส่น้ำแป้งและบัฟเฟอร์ ทำแบลงค์(blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

5.7 ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส นำสารละลายน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 5.4 – 5.5 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส

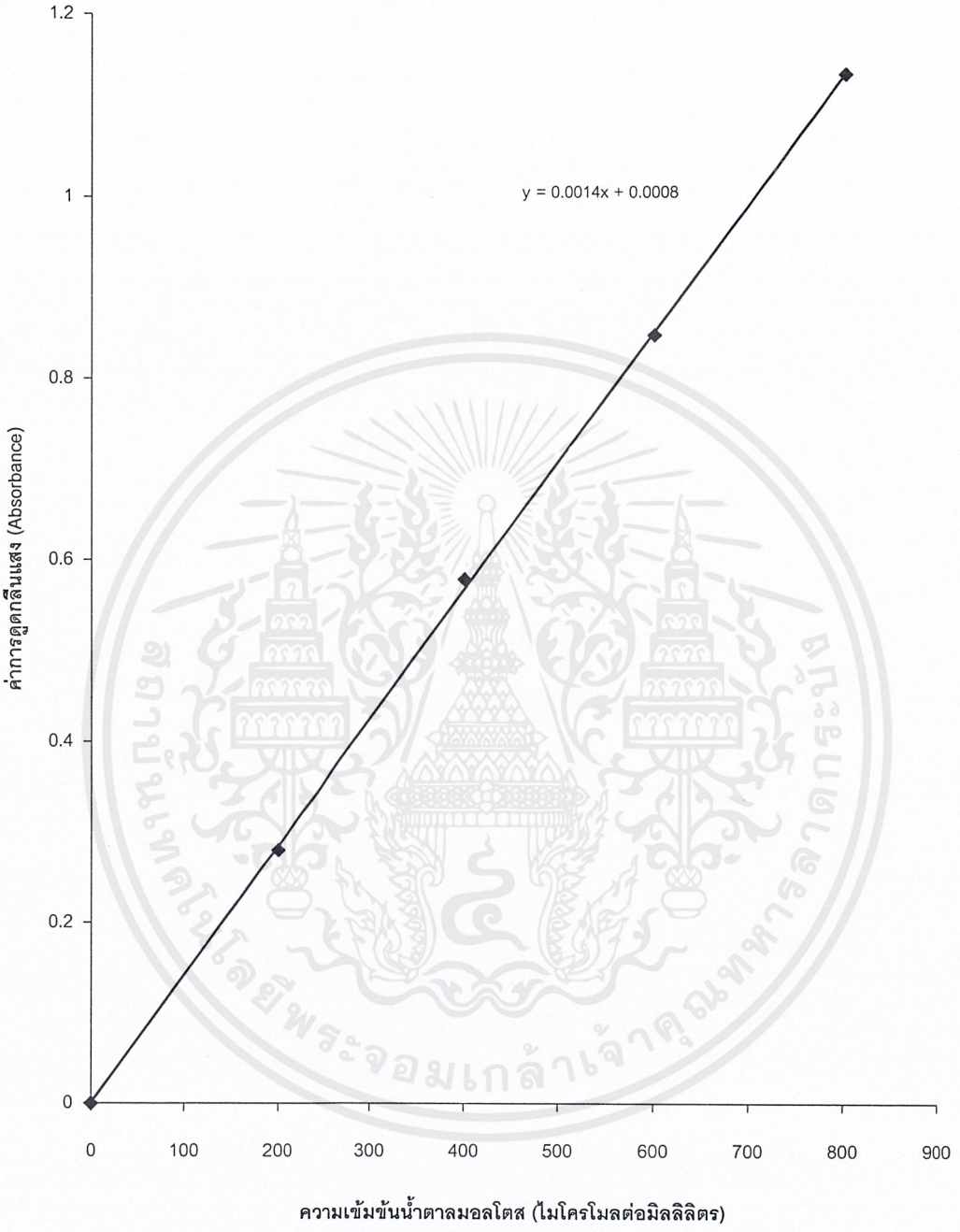
5.8 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง X ปริมาตรทั้งหมด X ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน X เวลา}}$$ หน่วยต่อมิลลิลิตร

1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเทรต และให้น้ำตาลมอลโตส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ง1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้