สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (TISTR 25) โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากขนุน

T035861

โดย นายเทพนิมิตร มะลิพวง รหัส 39054317
นายนคโรจน์ อินทรีย์สังวร รหัส 39054321

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35861
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Studies on optimal conditions in α-amylase production by *Bacillus subtilis* (TISTR 25) from jackfruit wastes.

Name Mr.Thepnimitr Maliphuang 39054317

Mr.Nakharoj Inseesungworn 39054321

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bechelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic year 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (TISTR 25) โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากขนุน

Studies on optimal conditions in α-amylase production by *Bacillus subtilis* (TISTR 25) from jackfruit wastes.

โดย นายเทพนิมิตร มะลิพวง รหัส 39054317

นายนคโรจน์ อินทรีย์สังวร รหัส 39054321

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาค

(รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต)

..... กรรมการ

(ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์)

..... กรรมการ

(รศ.สุขใจ ชูจันทร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (TISTR 25) โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากขนุน

โดย นายเทพนิมิตร มะลิพวง รหัส 39054317

นายนคโรจน์ อินทรีย์สังวร รหัส 39054321

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (TISTR 25) สภาวะที่ทำการทดลองคือ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (10 , 20 และ 30%) ความชื้นเริ่มต้น (50, 60 และ 70%) pH ของอาหาร (4 , 5 , 6 , 7 และ 8) และอุณหภูมิในการบ่ม (20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส) ซึ่งใช้วัสดุเหลือทิ้งจากขนุนเป็นแหล่งวัตถุดิบ (แกนขนุน ซังขนุน และเมล็ดขนุน) เขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการทดลองในระดับฟลาสก์ โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12 , 18 , 24 , 36 และ48 หลังจากทำการหมัก นำไปวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ด้วยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid จากการศึกษาพบว่า ซังขนุนจะมีประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มากกว่าแกนขนุนและเมล็ดขนุน ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (TISTR 25) ให้มีประสิทธิภาพและปริมาณสูงสุดคือ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10% ความชื้นเริ่มต้น 70% pH ของอาหารเท่ากับ 7 และอุณหภูมิในการบ่ม 40 องศาเซลเซียส โดยระยะเวลาในการหมักใช้เวลาถึงชั่วโมงที่ 24 เชื้อ *Bacillus subtilis* (TISTR 25) จะมีประสิทธิภาพของเอนไซม์สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Studies on optimal conditions in α-amylase production by *Bacillus subtilis* (TISTR 25) from jackfruit wastes.
Name	Mr.Thepnimitr Maliphuang code 39054317
	Mr.Nakharoj Inseesoungworn code 39054321
Special Project Advisor	Associate Professor. Sukjai Choojun
Department	Applied Biology
Academic	1999

Abstract

Studies on optimal condition in α-amylase production by *Bacillus subtilis* (TISTR 25). The effects of inoculum size (10, 20 and 30%) , initial moisture content (50, 60 and 70%) , pH (4, 5, 6, 7 and 8) and incubation temperature (20, 25, 30, 35 and 40 °C) were studies. By using jack fruit wastes (seeds, the axis of fruit, and the mesocarp of jack fruit.) as solid substrate. The flasks were shaken at 100 rpm and sampling after 12, 18, 24, 36 and 48 hrs of fermentation. α-Amylase activity was assayed by the method of 3,5-Dinitrosalicylic acid. The experiment showed that the mesocarp of jack fruit was excellent substrate for maximum α-amylase production. The optimal condition that maximal production of α-amylase by *Bacillus subtilis* (TISTR 25) on the mesocarp of jack fruit as solid substrate were determined as: 10% inoculum size, 70% initial moisture content, pH 7 and incubation at 40 °C. After 24 hrs of fermentation by *Bacillus subtilis* (TISTR 25) α-amylase activity increased maximum.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
1. เอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์	2
2. ชนิดของเอนไซม์อะไมเลสโดยแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้ง	2
3. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	3
4. ลักษณะสำคัญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย (*Bacillus subtilis*)	3
5. การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์	5
6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	6
7. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์	7
8. การนำเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม	7
9. ขนุน-องค์ประกอบของขนุน	8
บทที่ 3 วัตถุประสงค์	9
บทที่ 4 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการ	10
1. วัสดุ	10
2. อุปกรณ์และสารเคมี	10
3. วิธีการ	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์	13
1. ผลการเปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	13
2. ผลการเปรียบเทียบความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	17
3. ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	21
4. ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	27
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	35
ก. ตารางผลการทดลอง	36
ข. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	41
ค. อาหารเกลือแร่	42
ง. วิธีการวิเคราะห์	43
จ. การหาปริมาณความชื้นในอาหาร	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยใช้การเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว	5
ตารางภาคผนวกที่	
ก1. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระยะเวลาในการบ่มต่าง ๆ กัน	37
ก2. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาในการบ่มต่าง ๆ กัน	38
ก3. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาในการบ่มต่าง ๆ กัน	39
ก4. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับอุณหภูมิในการบ่มที่ระยะเวลาในการบ่มต่าง ๆ กัน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
	1. ผลผลิตจากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสทั้ง 3 ชนิด	3
	2. ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis*	4
	3. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10%	14
	4. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 20%	15
	5. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 30%	16
	6. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 50%	18
	7. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 60%	19
	8. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 70%	20
	9. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ = 4	22
	10. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ = 5	23
	11. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ = 6	24
	12. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ = 7	25
	13. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ = 8	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
14. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	28
15. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	29
16. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	30
17. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	31
18. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	32
รูปผนวกที่	
ง1. แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมที่ใช้จุลินทรีย์ในการผลิต เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อีกทั้งยังมีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผลิตยาและเคมีบริสุทธิ์ อุตสาหกรรมทอผ้าและอื่นๆ

แอลฟาอะไมเลสคือเอนไซม์อะไมเลสประเภทหนึ่งที่ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก (α-1,4 glucosidic linkages) ของ อะไมโลเพคติน (amylopectin) แต่ไม่ย่อยพันธะ 1,6 กลูโคซิดิก ของอะไมโลเพคติน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโทสและกลูโคส แต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโทส และเดกซ์ทริน

ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนี้ในระดับอุตสาหกรรม พบว่ามีแต่เพียงการนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้นอีกทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนี้ยังมีราคาที่สูงมาก เพราะฉะนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่งในการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนี้โดยการใช้ของเหลือทิ้งจากขนุนเป็นสับเตรทในการผลิตซึ่งจะเป็นการใช้ประโยชน์จากกากของเสียและเป็นการลดมลภาวะอีกด้วย

ซึ่งการทำโครงงานพิเศษนี้ได้อ้างอิงแนวทางในการทดลองจากวารสารภาษาอังกฤษชื่อ Applied Microbiology Biotechnology ฉบับที่ 46 ปี 1996

ในการศึกษานี้จะนำไปสู่การพัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ซึ่งใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

1. เอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ (ดุษณี, 2537)

เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่ขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) คือเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (วราวุฒิ, 2539) สามารถย่อยแป้งได้

2.ชนิดของเอนไซม์อะไมเลสโดยแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้ง (ดวงพร, 2530; Frazier and Westhoff, 1988)

2.1 เอ็นโดอะไมเลส (endoamylase) เป็นอะไมเลสประเภทที่ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ของอะไมโลส หรืออะไมโลเพคตินแต่ไม่ย่อยพันธะ 1,6-กลูโคซิดิกของอะไมโลเพคติน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโตสและกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase)หรืออะไมโล (1-4) เด็กซ์ทรินส (amylo(1-4) dextrinase)

2.2 เอ็กโซอะไมเลส (exoamylase) ย่อยแป้งจากปลายสายด้านที่ไม่เกิดการรีดิวส์ (non-reducing end) เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้า-อะไมเลส (β-amylase) และ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) สำหรับเบต้า-อะไมเลส หรืออะไมโล (1-4) มอลโตซิเดส (amylo(1-4)maltosidase) จะย่อยแป้งที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคซิดิกเข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะที่ต่อแบบพันธะแอลฟา-ดี (1-6) (α-D(1-6) linkage) ได้ ผลที่ได้จากการย่อยจึงเป็นน้ำตาลมอลโตส และ ลิมิตเด็กซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย(ดังรูปที่ 1)

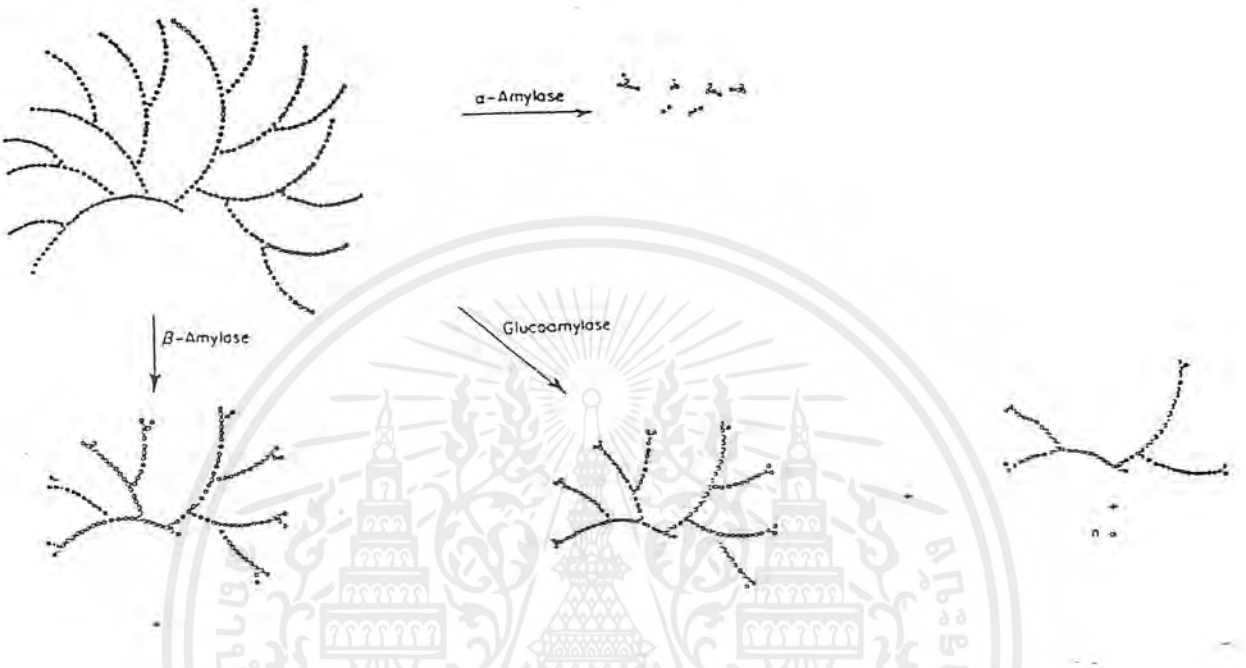
แอลฟาอะไมเลส

ชื่อทางการค้า : Termanyl®

ชื่อสามัญว่า : Diastase

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ผลผลิตจากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสทั้ง 3 ชนิด (Dubnau, 1982)

3. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ดวงพร, 2530)

3.1 จากแบคทีเรียได้แก่ *B. subtilis, B. amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis*

3.2 จากเชื้อราได้แก่ *Aspergillus niger, A. oryzae*

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ไม่เกี่ยวข้องกัน สมบัติของเอนไซม์จะแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียจะทนอุณหภูมิได้สูงกว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา (วราวุฒิ, 2539)

4. ลักษณะสำคัญของ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย (*Bacillus subtilis*) (ขจรและฉัตรชัย, 2536)

4.1 เซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่ง(rod-shaped) (ดังรูปที่ 2)

4.2 เป็นพวกแกรมบวก(gram positive)

4.3 เคลื่อนที่หรือไม่เคลื่อนที่ พวกที่เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลา(flagella)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 มีสปอร์อยู่ภายในเซลล์(endospore) และมีสปอร์ที่ทนความร้อน

4.5 เป็นจุลินทรีย์จำพวกต้องการอากาศหรือไม่ใช้อากาศในการเจริญเติบโตก็ได้(aerobic or facultative aerobic)

4.6 ทนต่อพีเอชและความเค็มได้ดี

4.7 จัดเป็นพวกที่กินซากพืชซากสัตว์ (saprophytes) พบได้ในดิน น้ำและน้ำทะเล

4.8ให้เอนไซม์ที่ขับออกมานอกเซลล์ที่สามารถย่อยโปรตีนหรือโพลีแซคคาไรด์เชิงซ้อน (complex polysaccharides)

4.9 สามารถทำให้อาหารเสีย

รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* (Tortora Case and Funke, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (วราวุฒิ , 2539)

วิธีที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

5.1 การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง

กรรมวิธีในทางปฏิบัตินั้นจะเลี้ยงจุลินทรีย์ซึ่งเป็นพวกเชื้อรามากกว่าแบคทีเรียลงในอาหารที่ประกอบด้วยอาหารแข็งและน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (อัตราส่วนที่ใช้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์) อาหารแข็งโดยมากใช้ ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ถั่วเหลือง หรือธัญพืชอื่นๆ (Hesseline, 1972; Yang, 1988) ในการผลิตทาง
อุตสาหกรรมวิธีนี้จะใช้แรงงานมาก

5.2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย โดยเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่อาหารที่จะใช้เลี้ยงจะฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนชื้น อุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาทีปริมาณหัวเชื้อ 3-5% จะต้องควบคุมการให้อากาศและการกวน วิธีนี้จะใช้ระยะเวลาสั้น ในการเพิ่มปริมาณการผลิตและควบคุมสภาพต่างๆได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ มีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยใช้การเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว

อาหารแข็ง	อาหารเหลว
1.ต้องการเนื้อที่เป็นจำนวนมากเพื่อที่จะใช้วางถาดอาหารเลี้ยงเชื้อ	1.ใช้ถังหมักขนาดใหญ่
2.ใช้แรงงานมาก	2.ใช้แรงงานน้อย
3.ใช้ระบบการควบคุมต่างๆน้อย	3.ระบบการควบคุมต่างๆต้องมีความระมัดระวังอย่างมาก
4.ปัญหาจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อนมีน้อย	4.การปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ง่ายต้องระวัง
5.การแยกเอนไซม์ประกอบด้วยการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย การกรองหรือใช้การเหวี่ยง และบางครั้งทำให้น้ำระเหยหรือทำการตกตะกอนเอนไซม์	5.การแยกเอนไซม์ประกอบด้วยการกรองหรือการเหวี่ยง และบางครั้งทำให้น้ำระเหยหรือทำให้เอนไซม์ตกตะกอน

ที่มา: ดัดแปลงจาก วราวุฒิ ครูส่ง(2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ดุษณี, 2537)

6.1 แป้ง

แป้งจะเหนี่ยวนำทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโต และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของแป้งมากขึ้นจะมีผลทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากขึ้น โดยการเติมแป้งทันทีพร้อมกับการเลี้ยงเชื้อพบว่า เชื้อแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงแรก(ประมาณ 10 ชั่วโมง) และพบว่าการเติมแป้งหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 8 ชั่วโมง (ในอาหารที่เรียกว่า stock medium) การเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเกิดได้ดีที่สุด

นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมและดีที่สุดสำหรับการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ 0.3 เปอร์เซ็นต์

แป้งยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง (ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส) อาจเนื่องมาจากผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้ง(by products)

ความเข้มข้นของแป้ง 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในการเลี้ยง *B. subtilis* ใน stock medium พบว่าภายใน 24 ชั่วโมง เชื้อจะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

6.2 อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เชื้อแต่ละชนิดจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ต่างกัน เช่น ใน *B. subtilis* อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Ensari และคณะ (1995) รายงานว่าประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) : ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1.4; โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 6.0; แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 2.0; แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.2; กลูโคส 5.0; H_2O 1 l; โซเดียมซิเตรด (sodiumcitrate) 1.0 และแป้ง (Ensari, 1995)

6.3 อุณหภูมิ

พบว่าเอนไซม์อะไมเลสจะมีความเสถียรที่สุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสหากอุณหภูมิสูงกว่านี้เอนไซม์จะเกิดการเสียสภาพอย่างช้าๆ

6.4 สภาพพีเอช

พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงสุดของเอนไซม์อะไมเลส คือ 6.4-6.6

6.5 น้ำตาล

น้ำตาลมอลโตสจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสแบบแข่งขันซึ่งจะสังเกตุผลได้ภายใน 4 ชั่วโมง

6.6 ไดเอทธิล ไพโรคาร์บอเนต (Diethyl pyrocarbonate; DEP)

DEP ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.7 ความดัน

ความดันสูงจะทำให้จุลินทรีย์และเอนไซม์มีประสิทธิภาพลดลง ในขณะที่ลักษณะทางคุณภาพ เช่น สี กลิ่น และส่วนประกอบวิตามินบางตัวยังคงอยู่

7. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (สมใจ, 2537)

เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะต้องเก็บเกี่ยวออกจากอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่ใช้โดยอาศัยกรรมวิธีในการเก็บเกี่ยวที่ต้องขึ้นกับวัตถุประสงค์ว่าจะให้เอนไซม์จำหน่ายในรูปแห้งหรือในรูปเหลว

ในกรณีของเอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็งสามารถนำเอนไซม์ในอาหารแข็งที่ใช้ไปอบแห้งเพื่อใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ในรูปแห้ง ในขณะที่ถ้าต้องการเอนไซม์เหลว จำเป็นต้องนำเอนไซม์ในรูปแห้งนั้นไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเอนไซม์ที่สกัดได้สามารถทำให้เป็นเอนไซม์เข้มข้น หรือเอนไซม์ผงโดยเอนไซม์ที่สกัดได้จะต้องผ่านขั้นตอนต่อไปนี้คือ การกรอง การทำให้เข้มข้น การตกตะกอน การทำแห้ง ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์การใช้งาน สำหรับเอนไซม์จากการหมักในอาหารเหลวจะผ่านขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับเอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็ง ยกเว้นขั้นตอนการสกัดตอนแรกเท่านั้น

เอนไซม์ที่ยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ อาจเรียกว่า เอนไซม์ดิบ (crude enzyme) ในทางอุตสาหกรรมจะนำเอนไซม์นั้นไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นแล้ว

กรรมวิธีที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ได้แก่ โครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange) และเจลโครมาโตกราฟฟี (gel chromatography)

8. การนำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส มาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม (ดุษณี, 2537)

8.1 อุตสาหกรรมทอผ้า

ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดง่าย ดังนั้นก่อนที่จะเอามาทอต้องชุบน้ำแป้งเพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึงหลังจากการทอผ้าเป็นผืนเสร็จแล้วต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์ย่อย

8.2 อุตสาหกรรมขนมปัง

ในการเตรียมแป้งที่ใช้ทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปด้วยเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลที่ทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นในแป้งหมักทำให้ขนมปังฟู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.3 อุตสาหกรรมเครื่องดื่มน้ำผลไม้

ปกติน้ำผลไม้คั้นจะมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูงจึงต้องใส่เอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น

8.4 อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์

ในการผลิตแอกอฮอล์จะใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในกระบวนการหมักเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส

8.5 อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรับเพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานในอุตสาหกรรม

ในการผลิตไซรับเหล่านี้จะใช้แป้งจากเมล็ดพืชต่างๆ นำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส

9. ขนุน-องค์ประกอบของขนุน *Artocarpus heterophyllus Lam.* วงศ์ Moraceae มีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ (พาณิชย์, 2540)

		ขนุนแก่	ซังขนุน	เมล็ดขนุนดิบ
ความชื้น	ร้อยละ	72.5	66.6	60.7
ไขมัน	"	0.3	0.0	0.2
คาร์โบไฮเดรต	"	23.7	29.2	30.6
เส้นใย	"	0.9	1.8	1.6
โปรตีน	"	1.7	1.4	5.5
พลังงานความร้อน	กิโลแคลอรีต่อ100 กรัม	94.0	122.0	146.0
แคลเซียม	มิลลิกรัมต่อ100 กรัม	27.0	21.0	0.0
ฟอสฟอรัส	"	38.0	13.0	105.0
เหล็ก	"	0.6	0.2	2.9
วิตามินบี 1	"	0.09	0.08	1.74
วิตามินบี 2	"	0.11	0.15	0.02
วิตามินซี	"	9.0	13.0	3.25
ไนอาซีน	"	0.7	-	24.0
วิตามินเอ	"	392.0	-	22.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (แกนขนุน ซังขนุน และเมล็ดขนุน)

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสให้ได้ปริมาณสูงสุด

3. เพื่อเป็นแนวทางในการส่งเสริมให้มีการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการ

4.1 วัสดุ

4.1.1 วัตถุดิบ

-แกนขนุน

-ซังขนุน

-เมล็ดขนุน

4.1.2 จุลินทรีย์

-*B. subtilis* (TISTR 25)

ซึ่งได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ เก็บรักษาแบบ ไลโอฟีไลเซชั่น (lyophilization) นำมาถ่ายเชื้อลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุกๆ 4 วัน

4.1.3 อาหารเกลือแร่ (minimal-salt medium) Ramesh and Lonsane(1989) ประกอบด้วย

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	11	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	6.1	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม

วิธีการ

นำสารทั้ง 4 ตัวข้างต้นมาผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้ ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บรรจุในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.2 อุปกรณ์และสารเคมี

4.2.1 เครื่องชั่งละเอียด

4.2.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ตู้อบแห้ง

4.2.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

4.2.5 เครื่องปั่น

4.2.6 เครื่องเขย่าชนิดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

4.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง

4.2.8 เทอร์โมมิเตอร์

4.2.9 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

4.2.10 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

4.2.11 โปแตสเซียมคลอไรด์

4.2.12 แมกนีเซียมซัลเฟต

4.2.13 กลูโคส

4.2.14 ซูโครส

4.2.15 แป้ง

4.2.16 มอลโตส

4.3 วิธีการ

4.3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำซังขนุนมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แผ่บนถาดอะลูมิเนียม นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดด้วยเครื่องบดอัตโนมัติแล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรง และนำไปเก็บในถุงโพลีเอทีลีนที่อุณหภูมิห้อง ในโหลดูดความชื้น (desicator) แกนขนุน เตรียมเช่นเดียวกับซังขนุน แต่การเตรียมเมล็ดขนุนจะทำต่างจากแกนขนุน และเมล็ดขนุนโดยเริ่มจากนำเมล็ดขนุนมาต้มเป็นเวลา 15 นาทีหลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1% นาน 30 นาที จากนั้นลอกเปลือกจนเหลือแต่เนื้อสีขาว ล้างน้ำหลาย ๆ ครั้งนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปบดด้วยเครื่องอัตโนมัติ จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงแล้วนำไปเก็บในถุงโพลีเอทีลีน ในโหลดูดความชื้น

4.3.2 เตรียมอาหารเกลือแร่ที่คิดโดย Ramesh และ Lonsane (1989) ตามอัตราส่วนหลังจากนั้นปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้ไฮโดรเจนคลอไรด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์

4.3.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เติมอาหาร Nutrient broth ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 25) ลงไป 1-2 ลูป แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (nm.) (ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.5 ± 0.01-0.02)

4.3.4 วิธีการทดลอง

นำวัตถุดิบ (แกนขนุน ซังขนุน และเมล็ดขนุน) และอาหารเกลือแร่ที่เตรียมไว้ทำการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชั่งวัตถุดิบปริมาณ 10 กรัม ที่มีความชื้นเริ่มต้น 70% ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมอาหารเกลือแร่ที่เตรียมไว้ (ทำการทดลองในตู้ปลอดเชื้อ) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อที่ได้เตรียมไว้ลงในฟลาสก์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้แท่งแก้วคน นำฟลาสก์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หลังจากหมักเป็นเวลา 12, 18, 24 , 36 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์

4.3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปัจจัยต่างๆที่ศึกษามีดังนี้

4.3.5.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำการทดลองตามข้อ 4.3.4 โดยปรับค่าความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อเท่ากับ 10, 20 และ 30% ตามลำดับ

4.3.5.2 ผลของความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำการทดลองตามข้อ 4.3.4 โดยปรับค่าความชื้นอาหารเท่ากับ 50, 60 และ 70 % ตามลำดับ

4.3.5.3 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำการทดลองตามข้อ 4.3.4 โดยปรับค่าพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ

4.3.5.4 ผลของอุณหภูมิในการบ่มต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำการทดลองตามข้อ 4.3.4 โดยปรับค่าความเข้มข้นของอุณหภูมิเท่ากับ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4.3.6 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (Bernfeld, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
ผลการทดลองและวิจารณ์

5.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

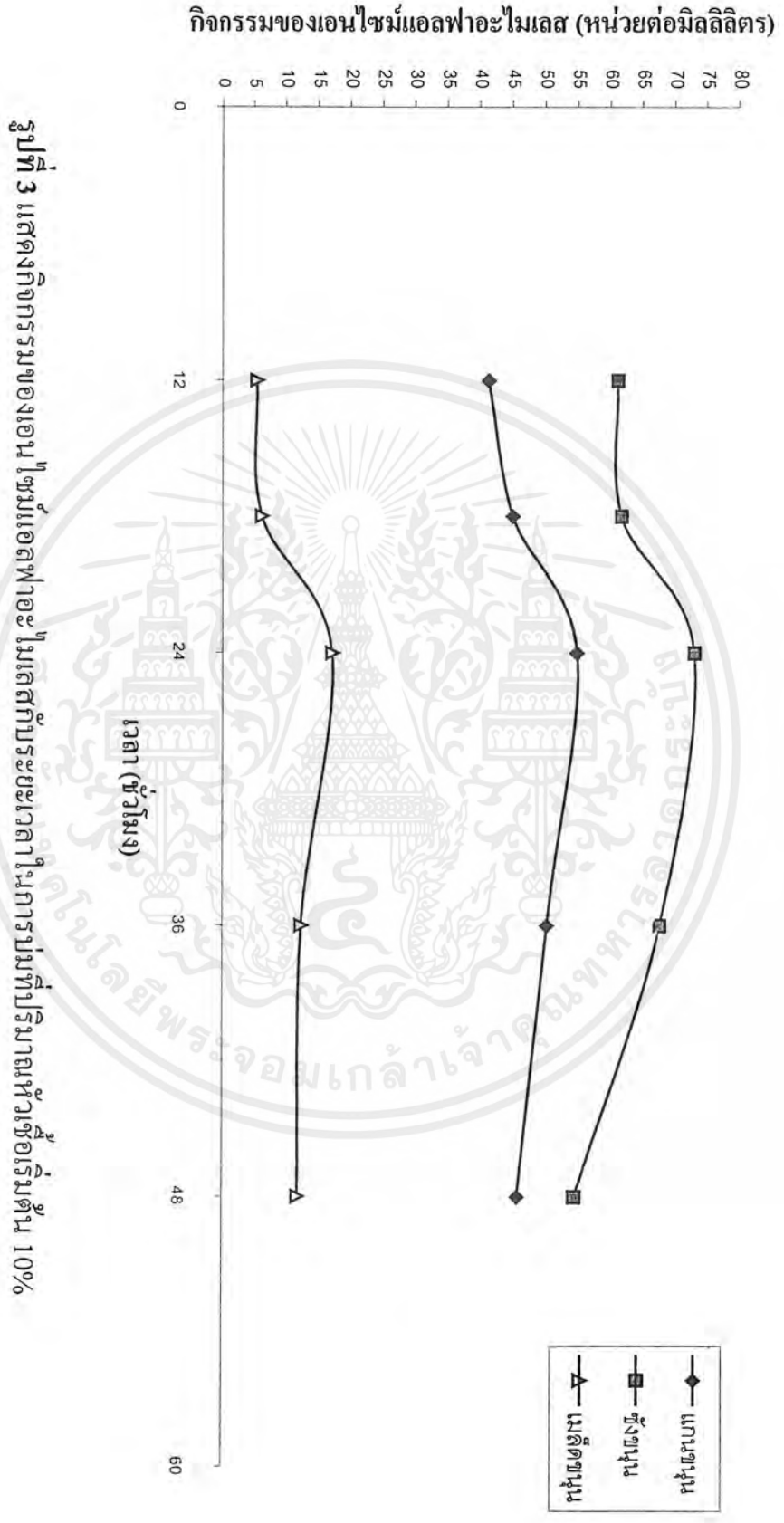
พบว่าเมื่อนำเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 25) มาเลี้ยงในสภาวะที่ความชื้นเริ่มต้น 70% ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้วัตถุดิบในการทดลอง 3 ชนิด คือ แกนขนุน ซังขนุน และเมล็ดขนุน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3, 4 และ 5

วัตถุดิบที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ แกนขนุน ซังขนุน และเมล็ดขนุน ซึ่งปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ทำการทดลองคือ 10, 20 และ 30% พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากซังขนุนจะมากกว่า แกนขนุน และเมล็ดขนุน ตามลำดับ จึงทำการวิเคราะห์ที่ตัวอย่างซังขนุนหลังจากทำการหมัก 24 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะสูงสุด ซึ่งจากปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นทั้งสาม จะมีค่าเท่ากับ 73.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร 77.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 76.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันหลังจากทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะลดลงเท่ากับ 54.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร 49.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 31.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ขนาดของหัวเชื้อเริ่มต้น 10% จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สูงกว่า 20% และ 30%

เพราะฉะนั้นขนาดหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10% จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

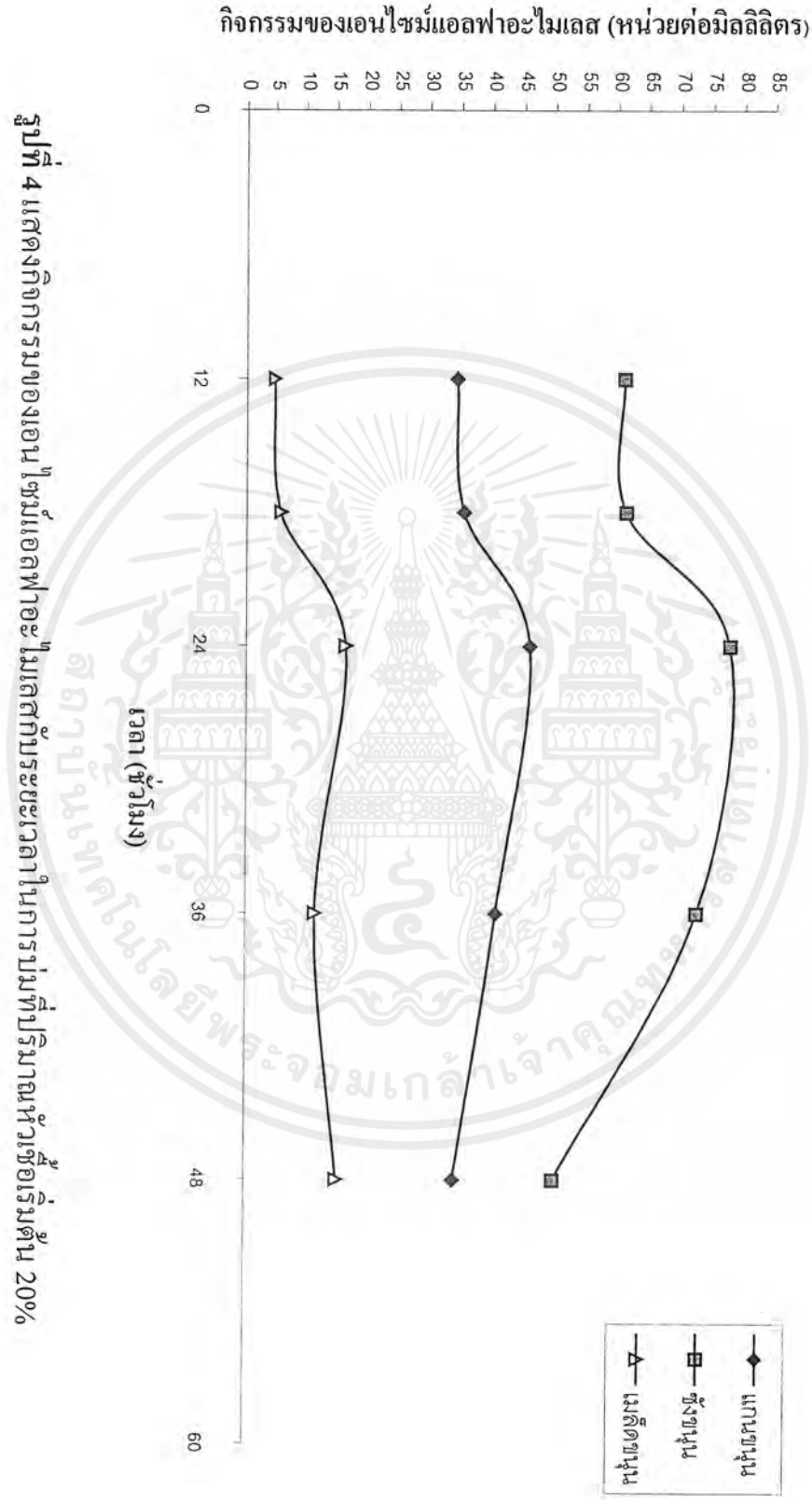
ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปตามรายงานผลการทดลองของ C. Krishna and M. Chandrasekaran(1996) ซึ่งใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ พบว่าขนาดหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10% เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



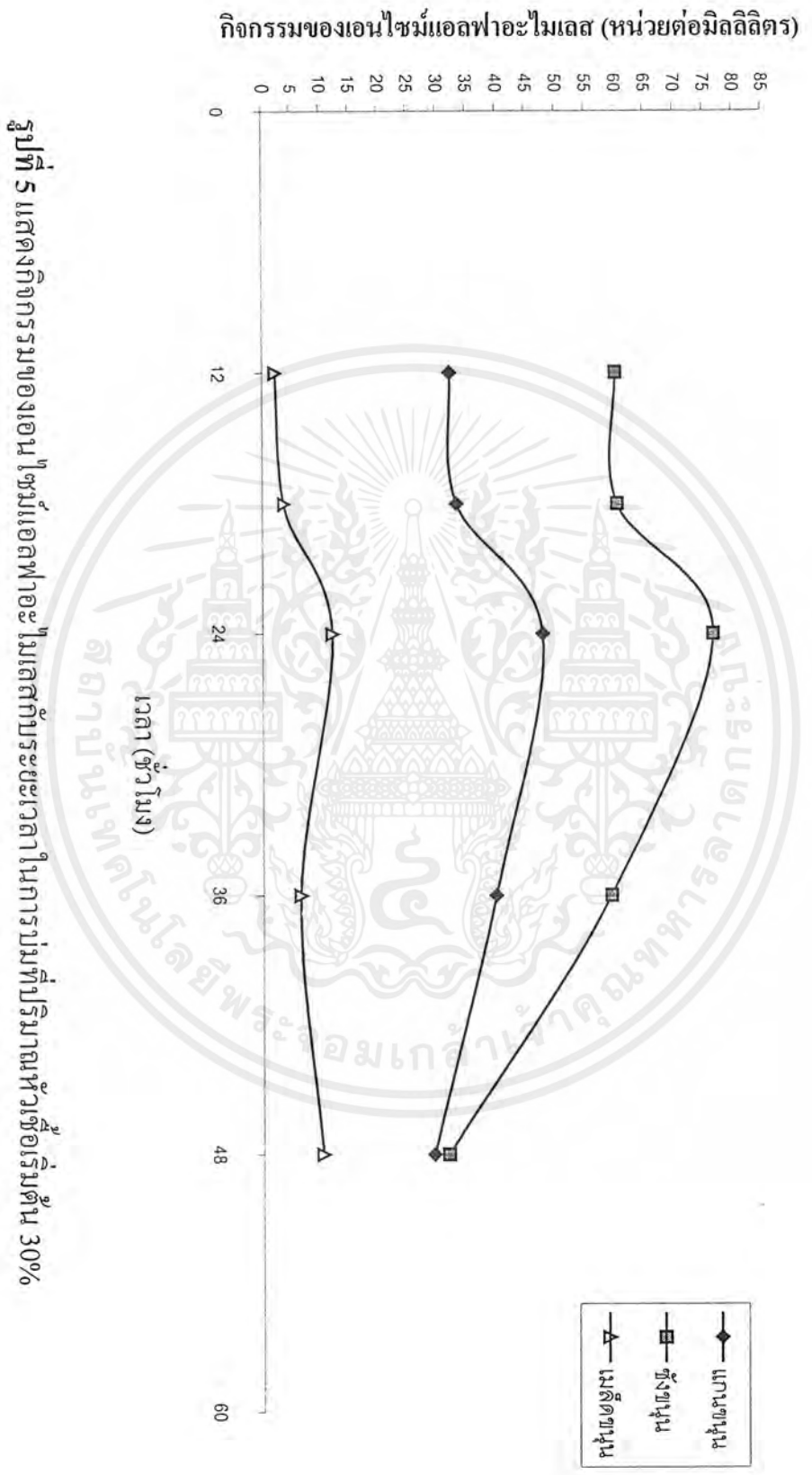
รูปที่ 3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในน้ำหมักเยื่อกาแฟที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ 10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในสารละลายน้ำลายเทียมที่ผสมกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมที่ความเข้มข้นร้อยละ 20%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในกล้วยดิบแต่ละชนิดที่ผ่านการทดสอบด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 30%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

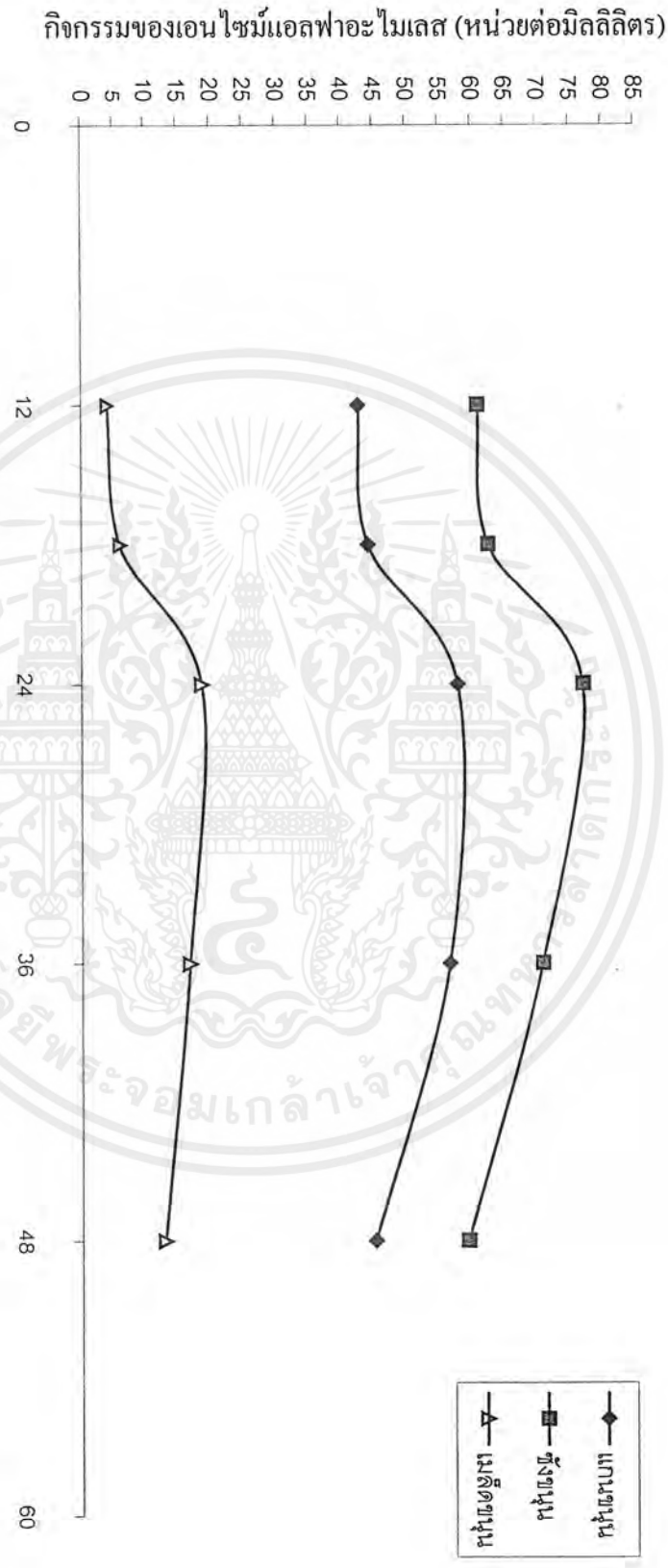
5.2 ผลการเปรียบเทียบความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เมื่อนำเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 25) มาเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10% พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้วัตถุดิบในการทดลอง 3 ชนิดคือ แกนขนุน ซังขนุน และ เมล็ดขนุน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6, 7 และ 8 คือซังขนุนจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากกว่าแกนขนุน และ เมล็ดขนุน ซึ่งความชื้นเริ่มต้นที่ทำการทดลองคือ 50, 60 และ 70 % โดยใช้อาหารเกลือแร่เป็นตัวปรับความชื้น หลังจากหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะสูงสุดที่ความชื้นเริ่มต้น 70% จะมีค่าสูงกว่า 60% และ 50% โดยมีค่าเท่ากับ 77.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร 74.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 72.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เพราะฉะนั้นความชื้นเริ่มต้น 70% จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปตามรายงานผลการทดลองของ C. Krishna and M.Chandrasekaran(1996) ซึ่งใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่ 70% เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
35861

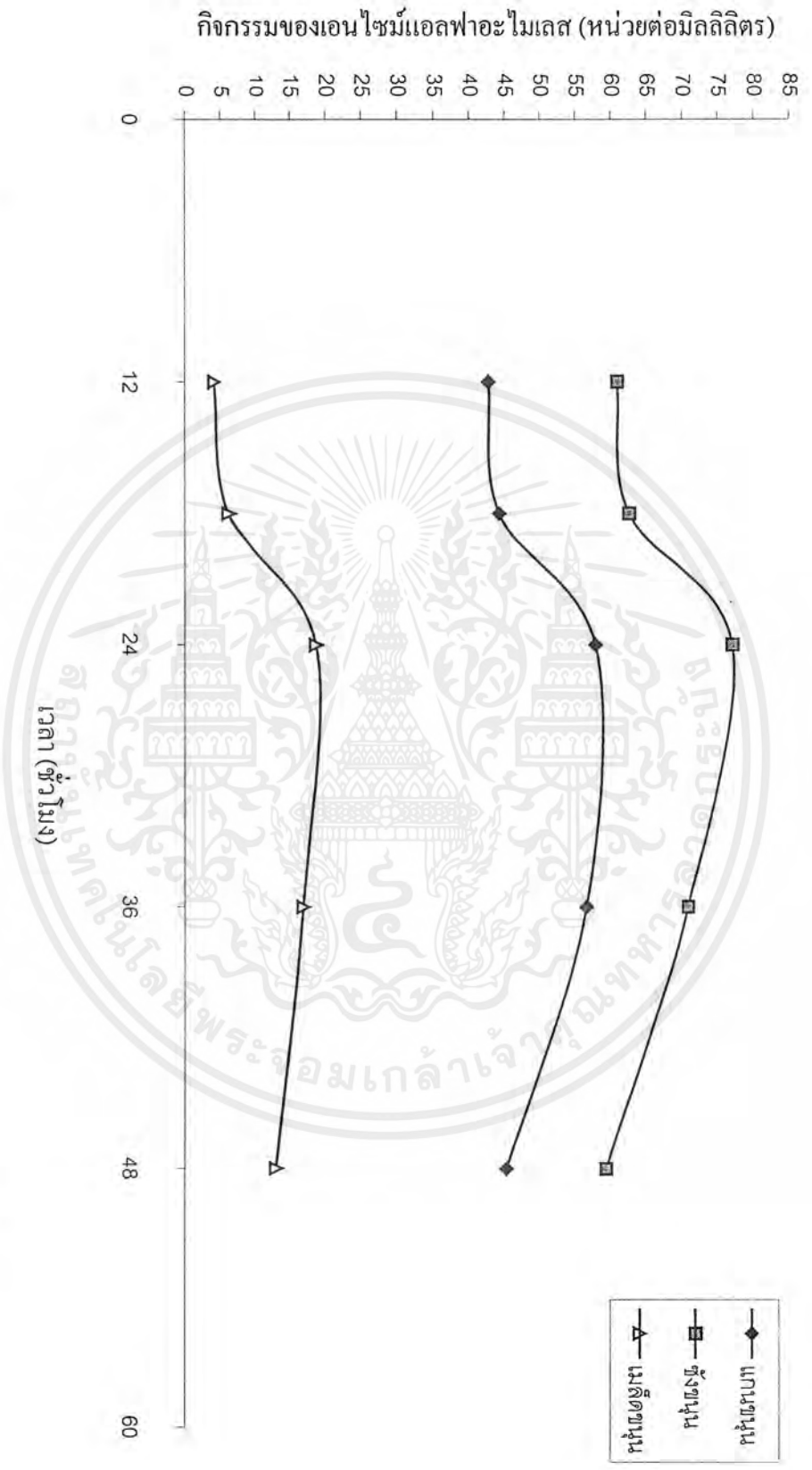


รูปที่ 6 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหน่อไม้ต่างชนิดที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดนาน 5 นาที ที่ความเข้มข้นของเกลือ 50%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา: ดัดแปลงจาก 60%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหน่อไม้ฝรั่ง หน่อไม้ปู และหน่อไม้แขก ของเหลือทิ้งที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำร้อนที่ 70%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

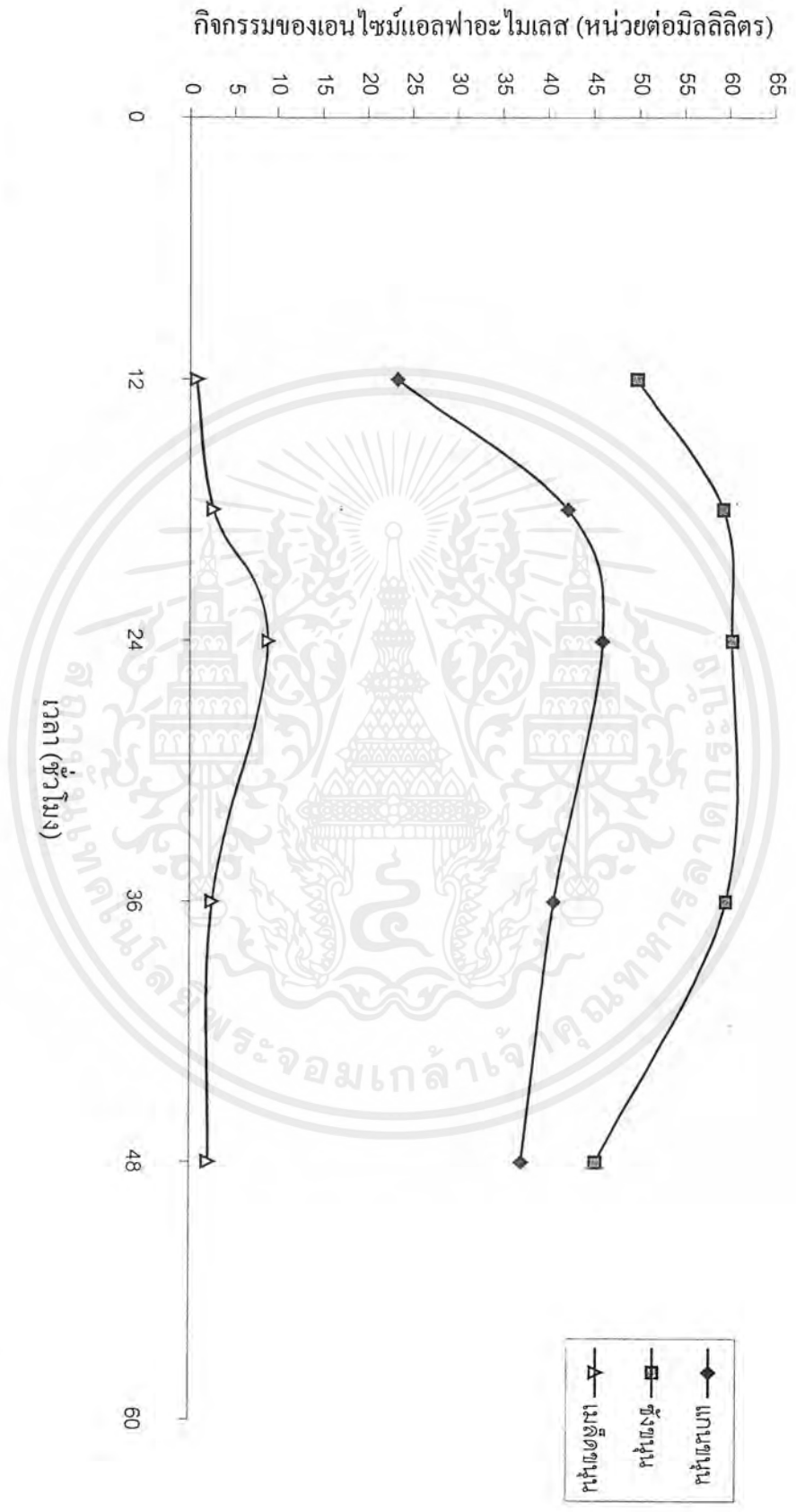
5.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เมื่อนำเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 25) มาเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10% ความชื้นเริ่มต้น 70% และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้วัตถุดิบในการทดลอง 3 ชนิดคือ แกนขนุน ซังขนุน และเมล็ดขนุน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 9, 10, 11, 12 และ 13 คือ อาหารเกลือแร่ที่มีสภาวะที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 จะให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 72.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสภาวะที่ค่าพีเอชเท่ากับ 4, 5, 6 และ 8 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 60.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร 68.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร 68.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 70.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เพราะฉะนั้นสภาวะที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 จึงเป็นสภาวะที่เหมะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

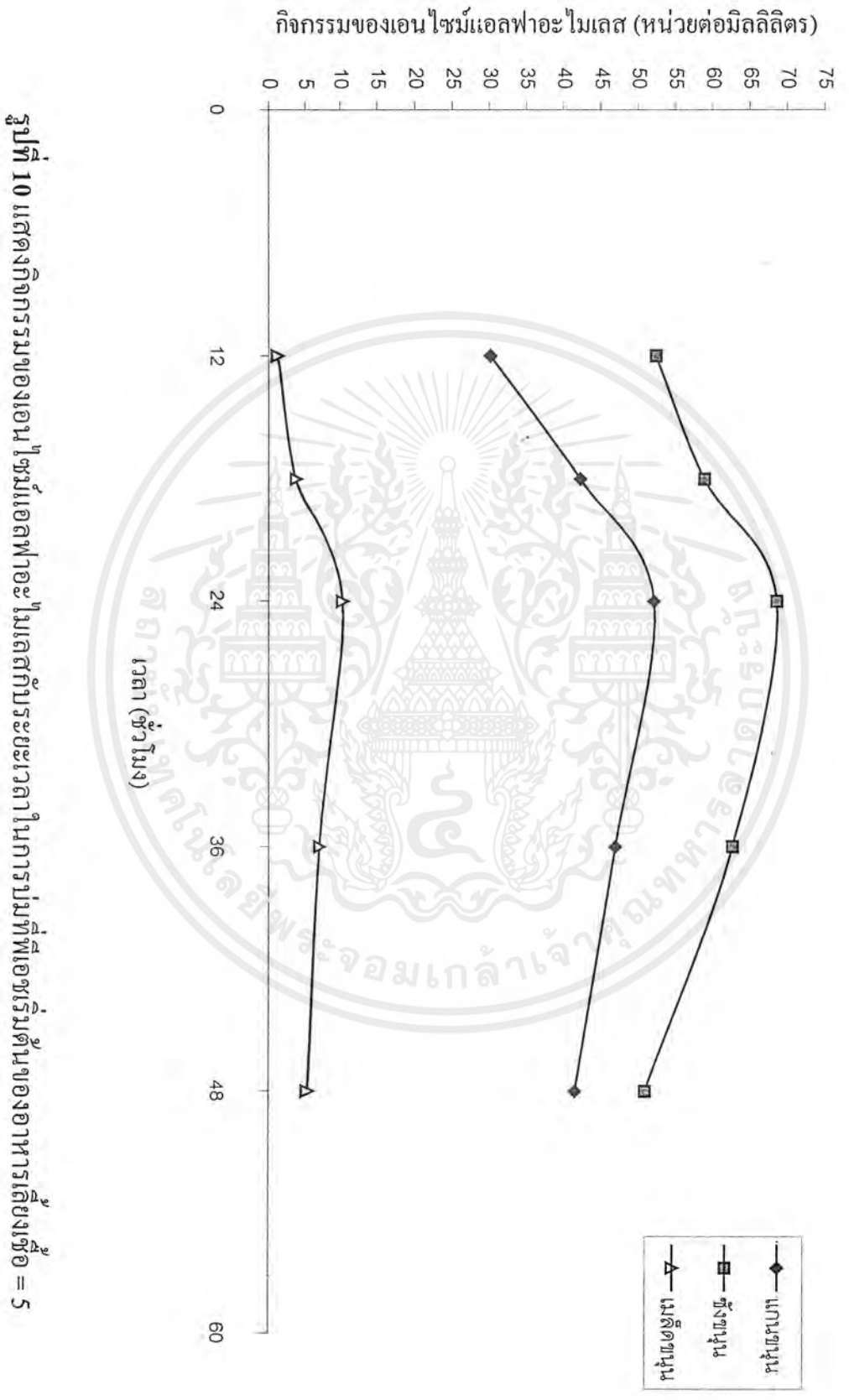
ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปตามรายงานผลการทดลองของ C. Krishna and M.Chandrasekaran(1996) ซึ่งใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



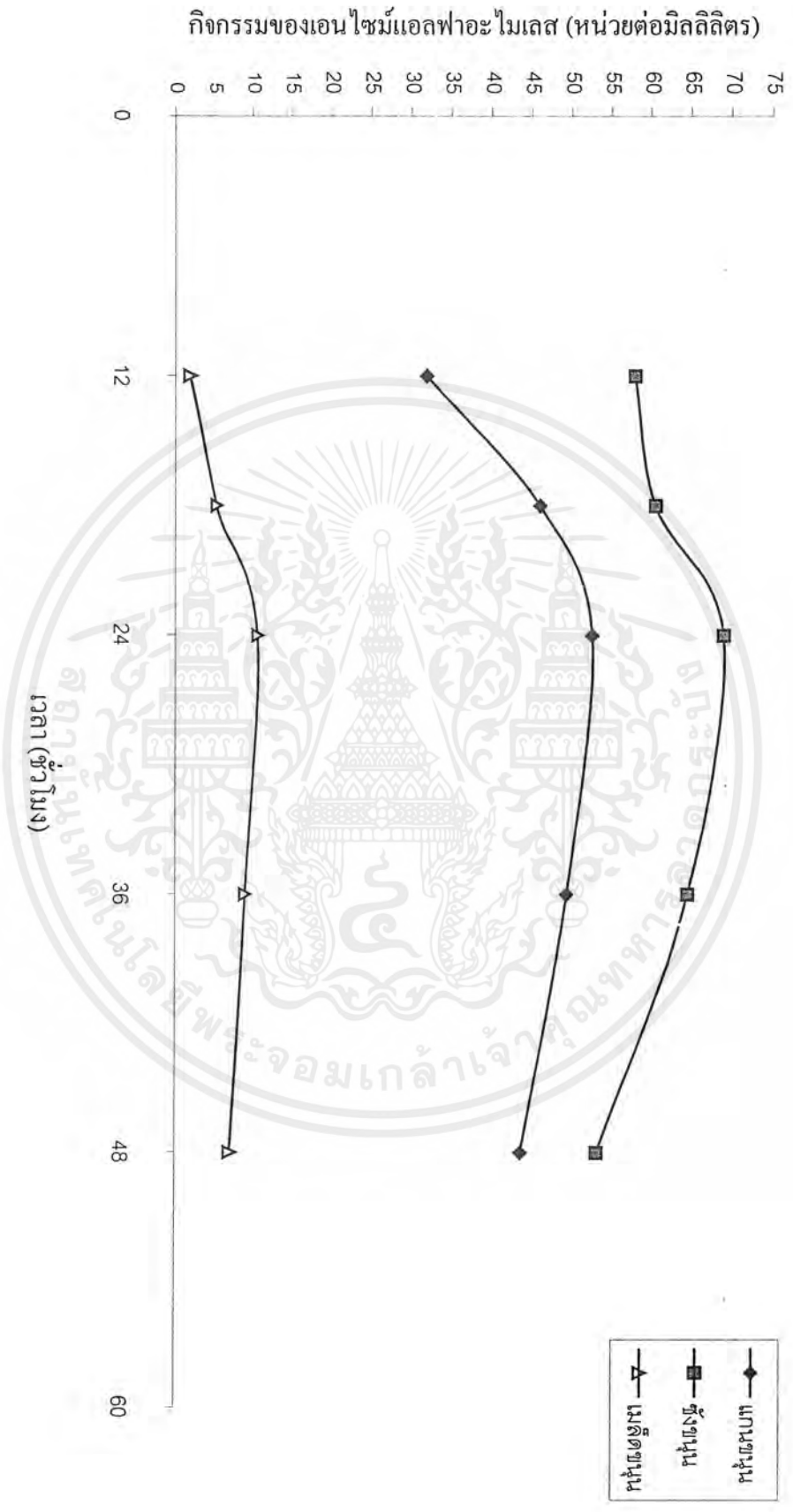
รูปที่ 9 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในน้ำคั้นหน่อไม้ไผ่บง ข้าวโพด และหน่อไม้ฝรั่ง ที่ pH = 4 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



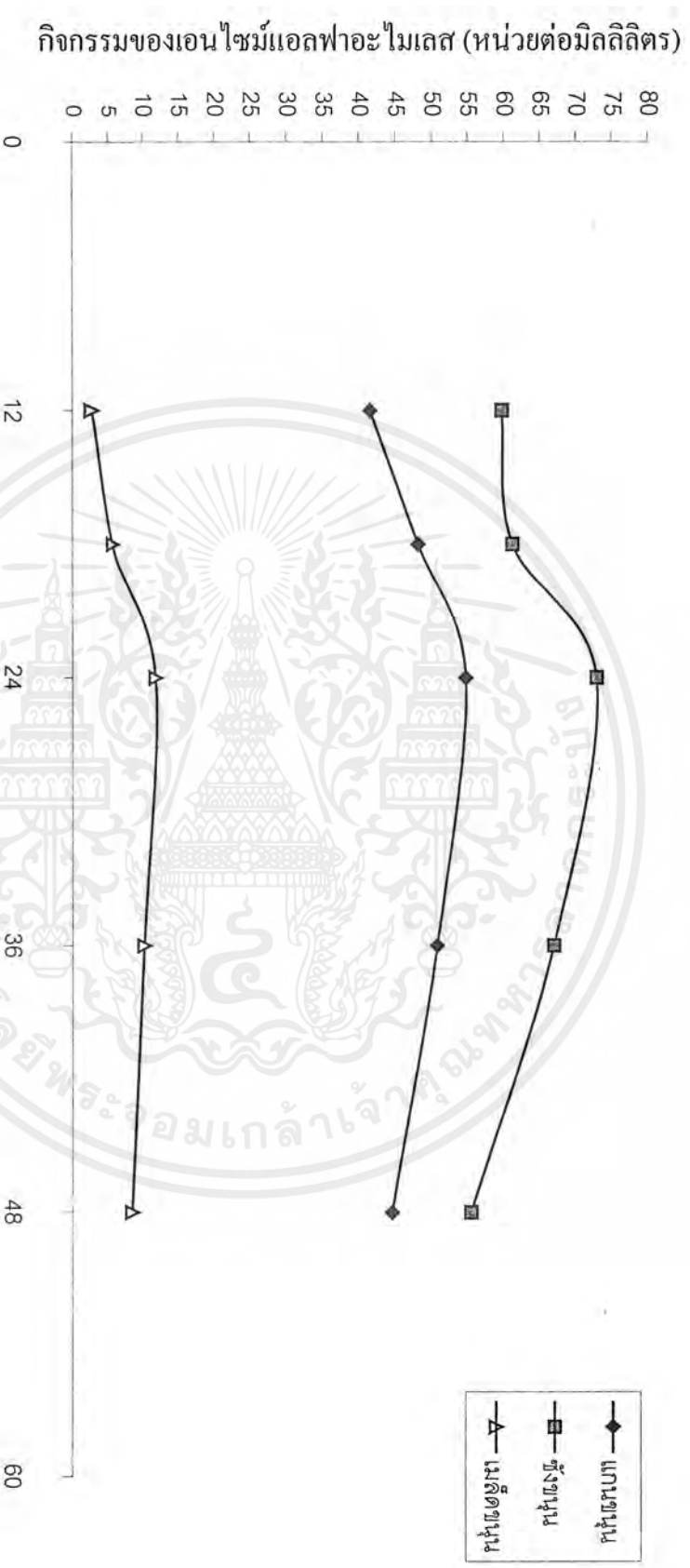
รูปที่ 10 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหัวแหวนนา หัวแหวนใน และหัวแหยงกา ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการงอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



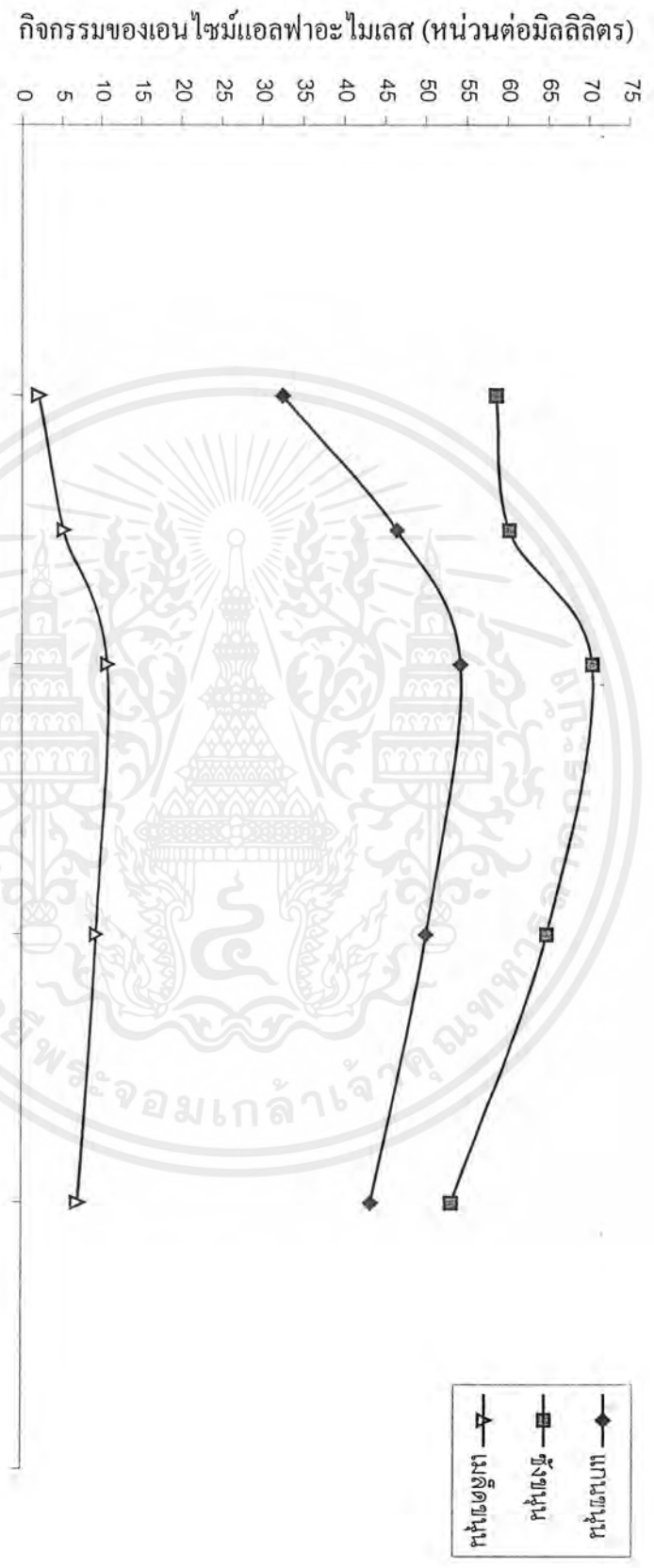
รูปที่ 11 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการผลิตโดยหัวเชื้อผสม หัวเชื้อบี และหัวเชื้อเอ ที่ pH 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากสับปะรดโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ และเชื้อผสม = 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหน่วยที่ 1 หน่วยที่ 2 และหน่วยที่ 3 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 = อัตราส่วนของกิจกรรมของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

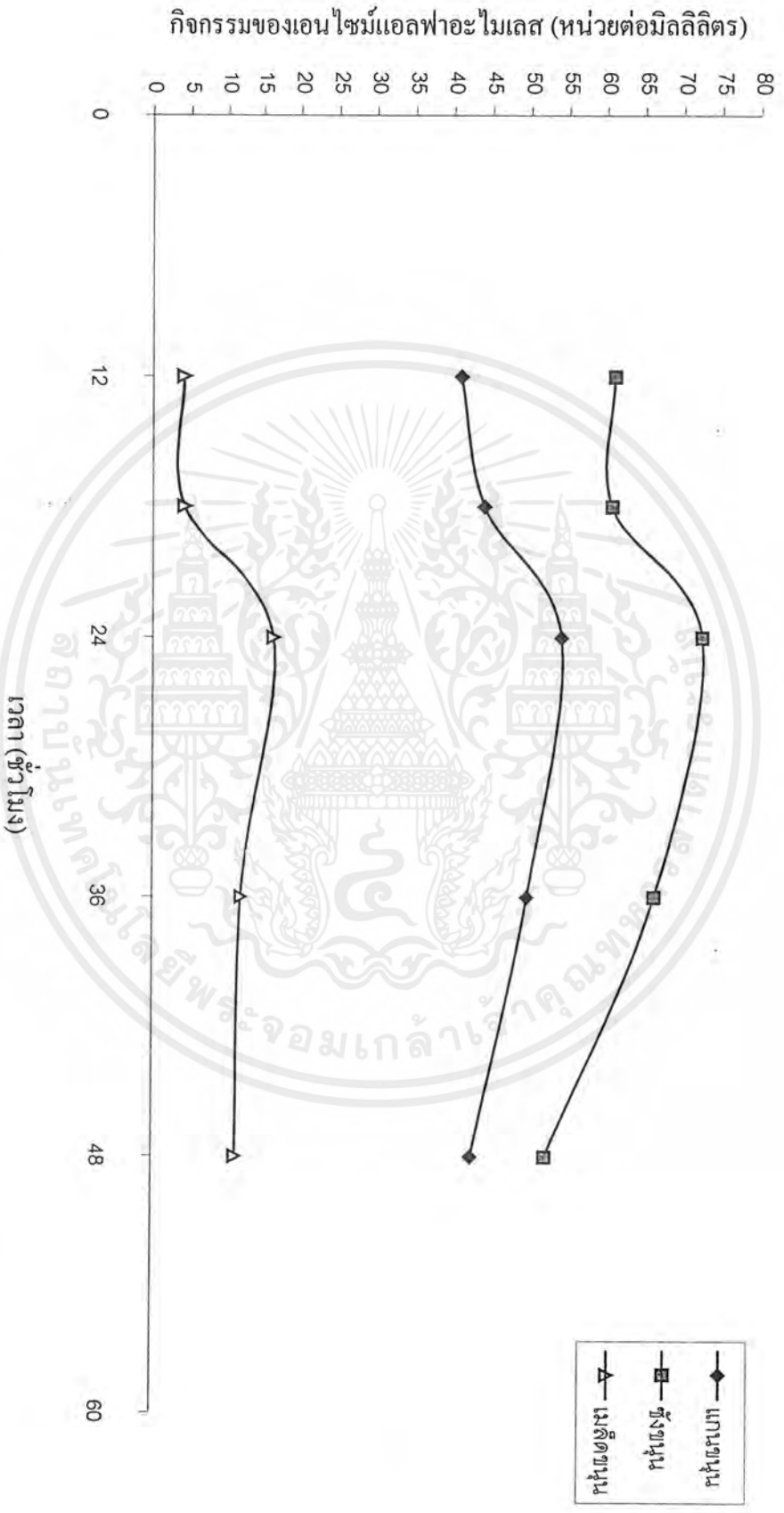
5.4 ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เมื่อนำเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 25) มาเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10% ความชื้นเริ่มต้น 70% และค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0 โดยใช้วัตถุดิบในการทดลอง 3 ชนิดคือ แกนขนุน ซังขนุน และเมล็ดขนุน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 คืออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส จะให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 79.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร และที่อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 72.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร 72.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร 72.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 73.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เพราะฉะนั้นอุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส จึงเป็นสภาวะที่เหมะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

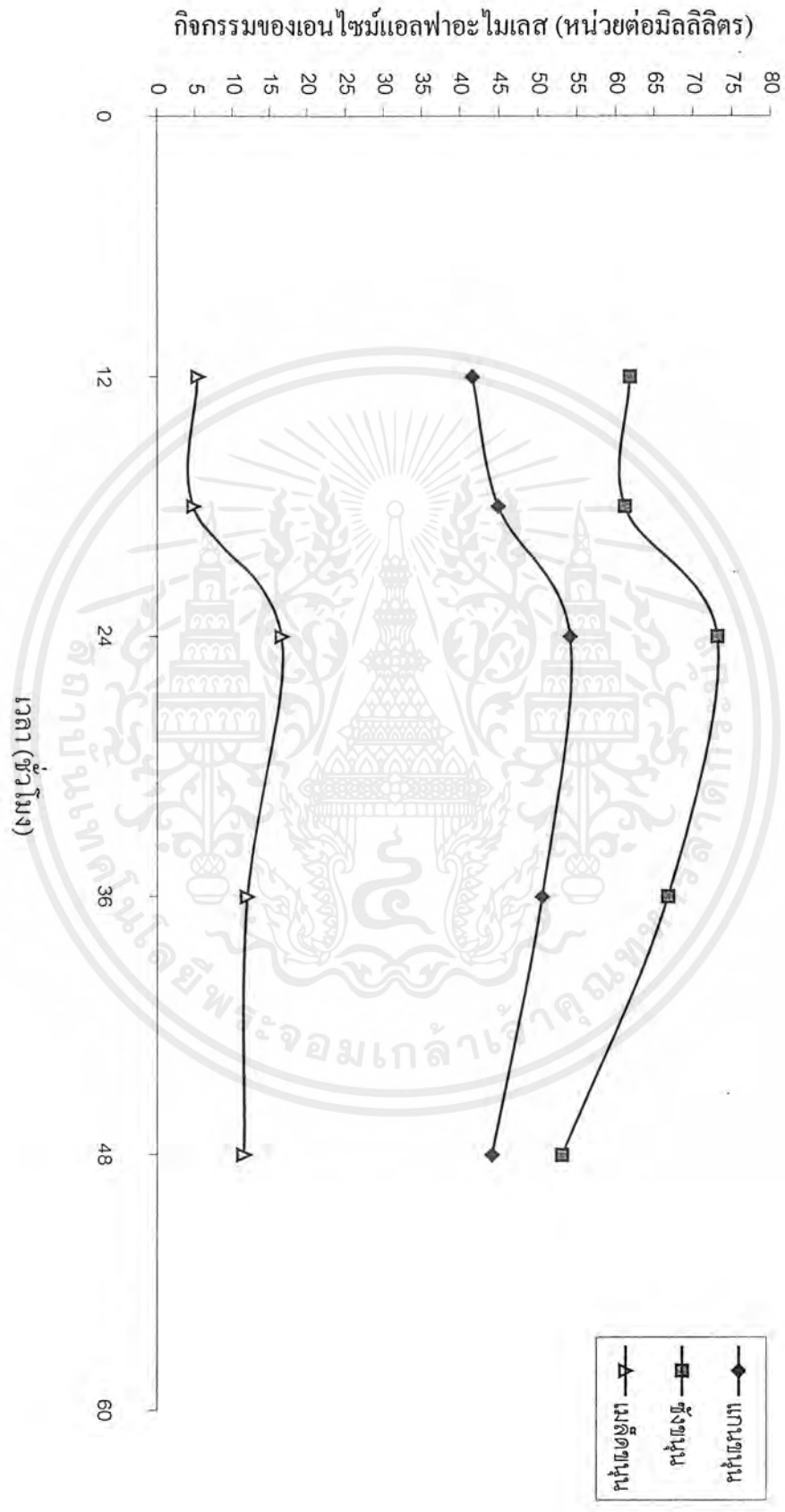
ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องรายงานผลการทดลองของ C.Krishna and M.Chandrasekaran(1996) ซึ่งใช้ก้านของเครือกล้วยเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่าอุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ *B. subtilis* ที่ต่างสายพันธุ์ หรือสภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน โดยในการทำการทดลองเราได้เพิ่มเติมในส่วนของการเขย่าฟลาสก์ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีในขั้นตอนการบ่ม ซึ่ง C. Krishna, M.Chandrasekaran(1996) ไม่ได้ทำการเขย่าฟลาสก์ในขั้นตอนการบ่ม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



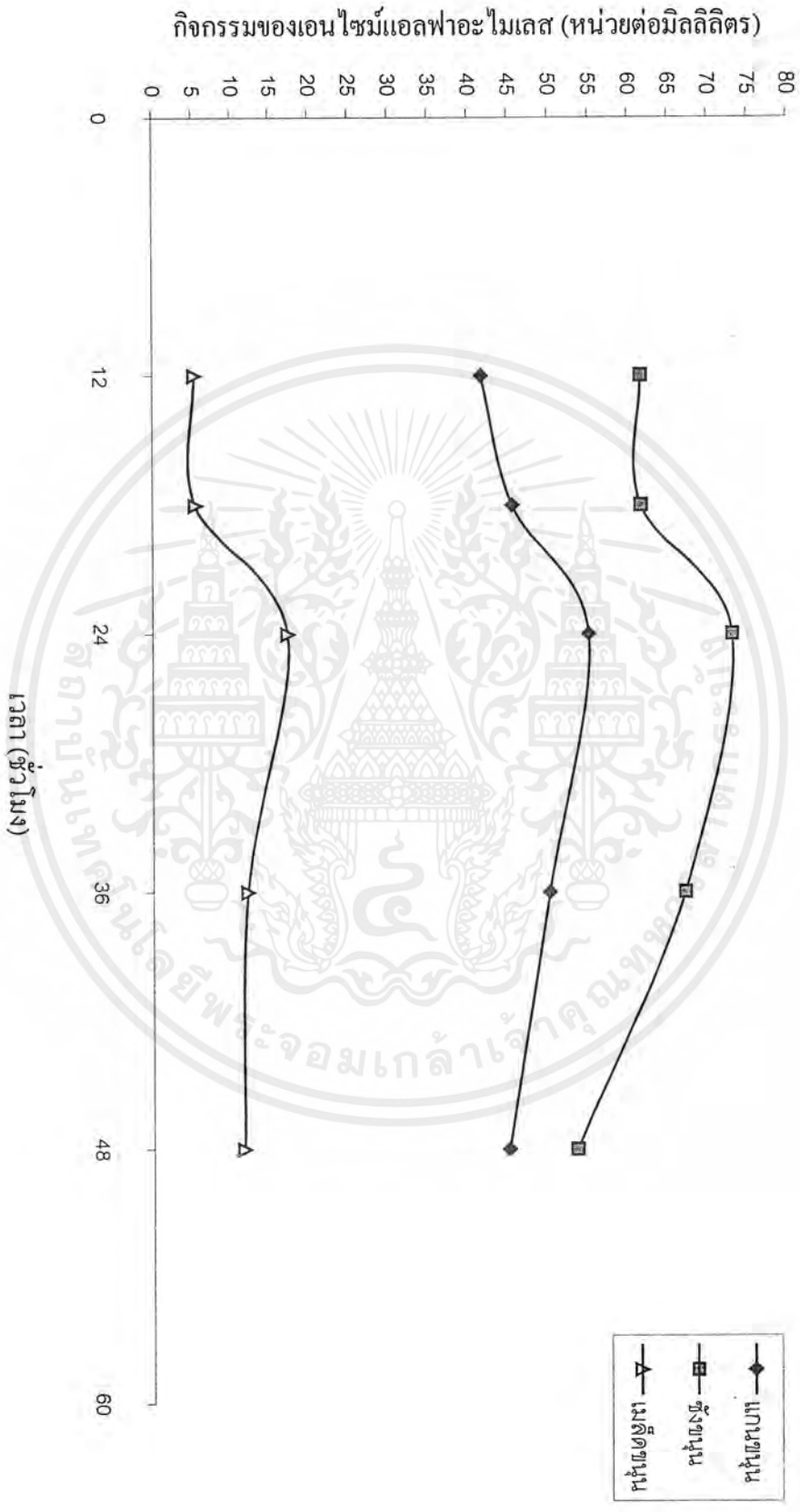
รูปที่ 14 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อหน่อมิ 20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



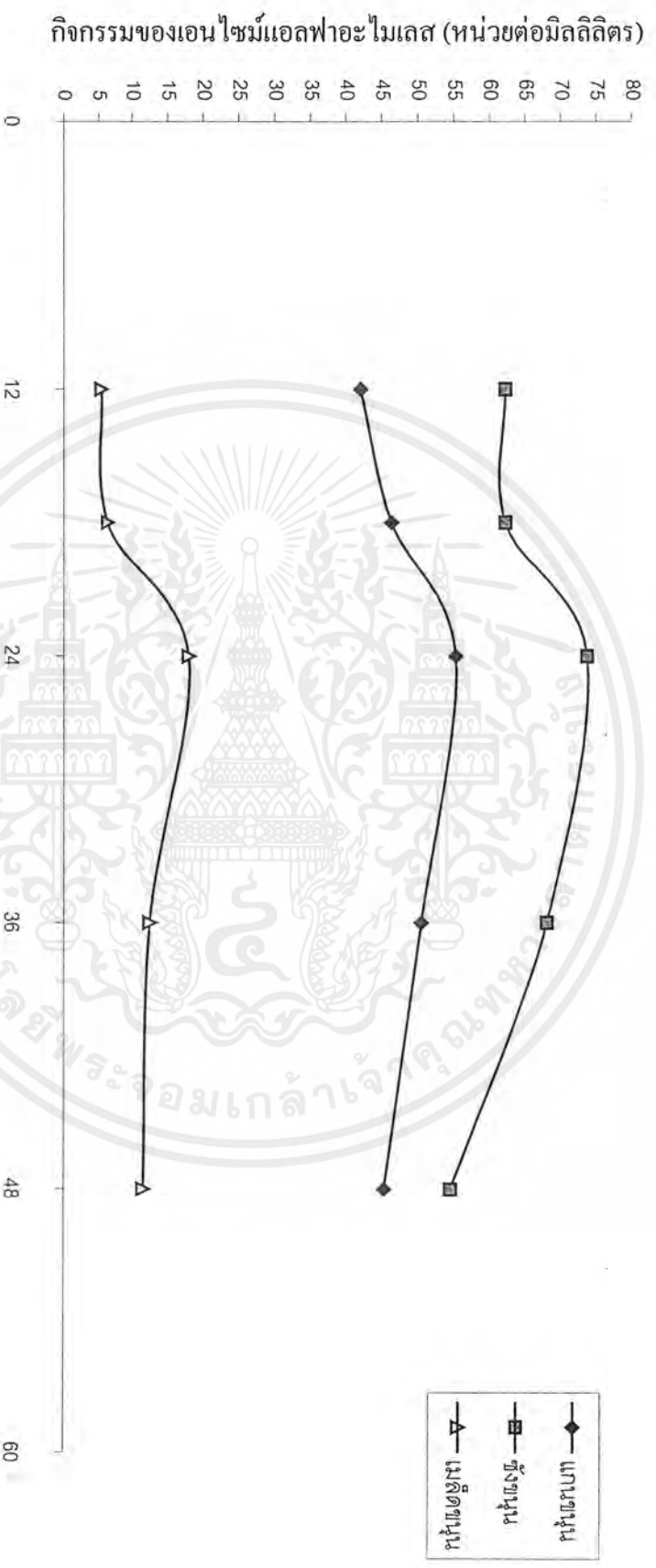
รูปที่ 15 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหน่อไม้ฝรั่ง หน่อไม้ญี่ปุ่น และหน่อไม้ไทย ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



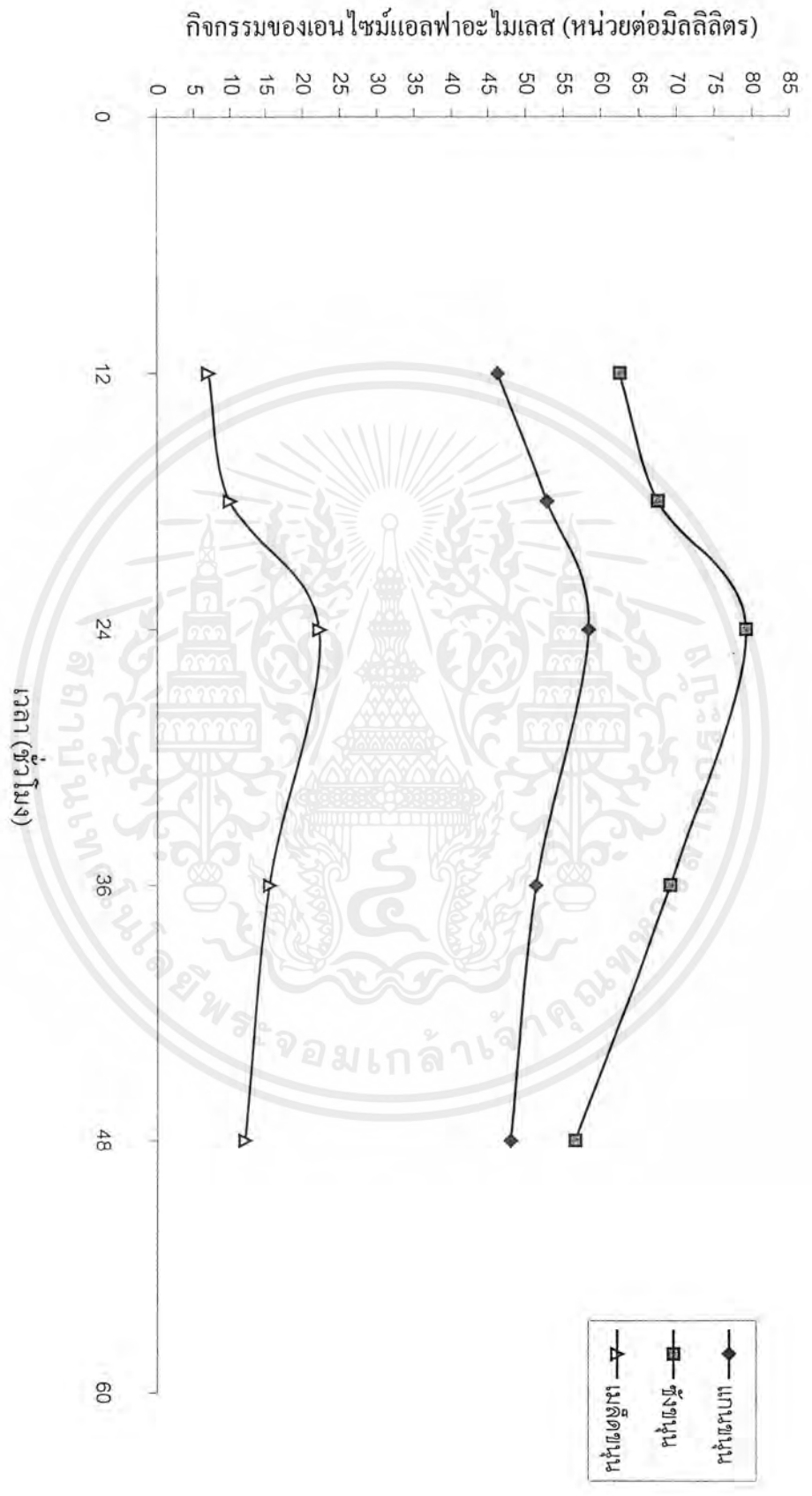
รูปที่ 16 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหน่อไม้ปฏิกูลที่ผ่านการหมักด้วยเกลือ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบของเชื้อราสายพันธุ์ที่แยกได้จากผิวหน้าของผลไม้ 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหน่อไม้ชนิดต่างๆ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 25) ซึ่งได้เปรียบเทียบวัตถุดิบ 3 ชนิด คือ แกนขนุน ซังขนุน และ เมล็ดขนุน พบว่า ซังขนุนจะมีประสิทธิภาพของ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มากกว่าแกนขนุนและเมล็ดขนุน ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ให้มีปริมาณและกิจกรรมสูง คือ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10% ความชื้นเริ่มต้น 70% ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส โดยชั่วโมงที่ 24 เชื้อ *B. subtilis* (TISTR 25) จะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และมีข้อเสนอแนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้าวิจัยต่อไปดังนี้

1. ควรมีการศึกษาถึงสภาวะและปัจจัยอื่นในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เพิ่มเติม เช่น เวลาและอุณหภูมิในการอบแห้งเพื่อเตรียมวัตถุดิบ ขนาดอนุภาคของวัตถุดิบ ปริมาณอาหารเกลือแร่ และความเร็วรอบของการเขย่าในการบ่ม เป็นต้น

2. ควรมีการศึกษาของเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กับของเหลือทิ้งจากขนุน

3. ควรมีการศึกษาถึงวิธีในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ขจร เจริญศิริ และ ฉัตรชัย ศรไชย. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน.มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

พาณิชย์ ยศปัญญา. 2540. ขนุน: ยักษ์ใหญ่แห่งวงการไม้ผล. มติชน, กรุงเทพฯ

วราวุฒิ ครูส่ง. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพ. โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β. Methods Enzymol. 1:149-158

Krishna, C. and Chandrasekaran. M. 1996. Banana waste as substrate for α-amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid state fermentation. J Appl Microbiol Biotechnol. 46:106-111.

Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K. 1989. Solid state fermentation for production of higher titres of thermostable α-amylase with two peaks for pH optima by *Bacillus licheniformis* M 27. J Biotechnol. 11:49-52.

Tortora, J.G., Funke, R.B., Case, L.C. 1992. Microbiology: an introduction. Benjamin/Cummings, California

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
ตารางผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ก1. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระยะเวลาในการบ่มต่าง ๆ กัน

ที่ 12 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความเข้มข้นหัวเชื้อ	หัวเชื้อ 10%	หัวเชื้อ 20%	หัวเชื้อ 30%
แกนขนุน	41.3	34.3	32.3
ซังขนุน	61.1	60.9	60.1
เมล็ดขนุน	5.4	4.7	2.1
ที่ 18 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความเข้มข้นหัวเชื้อ	หัวเชื้อ 10%	หัวเชื้อ 20%	หัวเชื้อ 30%
แกนขนุน	45.0	35.4	33.4
ซังขนุน	61.7	61.2	60.4
เมล็ดขนุน	6.2	5.8	3.7
ที่ 24 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความเข้มข้นหัวเชื้อ	หัวเชื้อ 10%	หัวเชื้อ 20%	หัวเชื้อ 30%
แกนขนุน	54.8	45.9	47.8
ซังขนุน	73.0	77.7	76.5
เมล็ดขนุน	17.2	16.4	12.2
ที่ 36 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความเข้มข้นหัวเชื้อ	หัวเชื้อ 10%	หัวเชื้อ 20%	หัวเชื้อ 30%
แกนขนุน	50.2	40.5	39.9
ซังขนุน	67.6	72.4	59.3
เมล็ดขนุน	12.4	11.5	6.7
ที่ 48 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความเข้มข้นหัวเชื้อ	หัวเชื้อ 10%	หัวเชื้อ 20%	หัวเชื้อ 30%
แกนขนุน	45.7	33.9	29.5
ซังขนุน	54.4	49.8	31.9
เมล็ดขนุน	11.9	15.2	10.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ก2. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาในการบ่มต่าง ๆ กัน

ที่ 12 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความชื้นอาหาร	50%	60%	70%
แกนขนุน	31.4	33.1	42.7
ซังขนุน	58.4	60	60.9
เมล็ดขนุน	2.3	4.2	4.0
ที่ 18 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความชื้นอาหาร	50%	60%	70%
แกนขนุน	33.1	34.7	44.2
ซังขนุน	60.9	61.1	62.5
เมล็ดขนุน	3.5	5.5	6.2
ที่ 24 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความชื้นอาหาร	50%	60%	70%
แกนขนุน	52.6	56.9	57.8
ซังขนุน	72.5	74.7	77
เมล็ดขนุน	15.4	17.5	18.7
ที่ 36 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ/ความชื้นอาหาร	50%	60%	70%
แกนขนุน	53.1	55.1	56.5
ซังขนุน	67	69.5	70.7
เมล็ดขนุน	13.2	14.8	16.9
ที่ 48 ชั่วโมง			
วัตถุดิบ	50%	60%	70%
แกนขนุน	42.5	44.3	45.2
ซังขนุน	51.3	56	59.2
เมล็ดขนุน	12.3	12.4	13.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ารางภาคผนวกที่ ก3. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ กัน

ที่ 12 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/ค่า pH	4	5	6	7	8
แกนขนุน	23.3	30.1	31.9	41.5	32.5
ซังขนุน	49.7	52.3	57.9	59.7	58.5
เมล็ดขนุน	0.7	1.1	1.9	2.6	2.0
ที่ 18 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/ค่า pH	4	5	6	7	8
แกนขนุน	42.1	42.2	46.0	48.1	46.4
ซังขนุน	59.2	58.8	60.4	61.1	60.1
เมล็ดขนุน	2.5	3.8	5.3	5.1	5.2
ที่ 24 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/ค่า pH	4	5	6	7	8
แกนขนุน	45.9	52.0	52.5	54.7	54.2
ซังขนุน	60.2	68.5	68.9	72.8	70.3
เมล็ดขนุน	8.9	10.3	10.7	11.8	10.8
ที่ 36 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/ค่า pH	4	5	6	7	8
แกนขนุน	40.6	46.8	49.3	50.7	50.0
ซังขนุน	59.5	62.5	64.4	66.8	64.7
เมล็ดขนุน	2.4	6.9	8.9	10.2	9.3
ที่ 48 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/ค่า pH	4	5	6	7	8
แกนขนุน	37.1	41.4	43.6	44.5	43.3
ซังขนุน	45.2	50.7	53.0	55.4	53.1
เมล็ดขนุน	2.0	5.3	7.1	8.5	7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ารางภาคผนวกที่ ก4. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวัตถุดิบกับอุณหภูมิในการ
บ่มที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ

ที่ 12 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/องศาเซลเซียส	20	25	30	35	40
แกนขนุน	40.9	41.5	41.7	42.0	46.2
ซังขนุน	60.9	61.7	61.5	62.1	62.4
เมล็ดขนุน	4.1	5.3	5.3	5.4	6.8
ที่ 18 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/องศาเซลเซียส	20	25	30	35	40
แกนขนุน	43.9	44.8	45.5	46.3	52.7
ซังขนุน	60.5	61.0	61.5	62.1	67.4
เมล็ดขนุน	4.2	4.7	5.4	6.3	9.8
ที่ 24 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/องศาเซลเซียส	20	25	30	35	40
แกนขนุน	53.9	53.9	54.9	55.2	58.2
ซังขนุน	72.2	72.9	72.9	73.6	79.0
เมล็ดขนุน	16.3	16.5	17.3	17.9	22.2
ที่ 36 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/องศาเซลเซียส	20	25	30	35	40
แกนขนุน	49.4	50.3	50.0	50.4	51.2
ซังขนุน	66.0	66.5	66.9	67.9	68.9
เมล็ดขนุน	11.8	11.7	11.9	12.4	15.4
ที่ 48 ชั่วโมง					
วัตถุดิบ/องศาเซลเซียส	20	25	30	35	40
แกนขนุน	42.2	43.9	44.9	45.2	47.8
ซังขนุน	51.8	52.8	53.3	54.4	56.3
เมล็ดขนุน	11.0	11.3	11.4	11.5	11.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเหลวเอ็นบี (N.B. หรือ Nutrient broth)

ประกอบด้วย

บีฟเอกซ์แทรกซ์ (beef extract)	3 กรัม
เพปโตน (peptone)	5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

วิธีการ

ละลายอาหารเหลวเอ็นบี 8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121-124 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ปรับค่าพีเอชสุดท้ายให้เท่ากับ 6.8±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
อาหารเกลือแร่

อาหารเกลือแร่ (minimal-salt medium) Ramesh and Lonsane (1989)

ประกอบด้วย

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	11	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	6.1	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม

วิธีการ

นำสารทั้ง 4 ตัวข้างต้นมาผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้ไฮโดรเจนคลอไรด์หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์บรรจุในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์

การหากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid

(Bernfeld, 1955)

สารเคมี

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1% soluble starch)

ละลายแป้ง 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นต้มด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลายปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร

2. บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 5.0

3. สารละลาย 3,5 –Dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย 3,5 –Dinitrosalicylic acid 1.0 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมตาเทรต ($COOK\ (CHOH)_2\ COONa.4H_2O$) 300.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 200.0 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชา หรือขวดทึบแสง

4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

ละลายน้ำตาลมอลโทส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

วิธีการ

5.1 ใส่สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ พีเอชเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

5.2 เติมน้ำแป้งที่อุ่นที่ 50 องศาเซลเซียสลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเอนไซม์หลอดละ 1.0 มิลลิลิตรผสมสารละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

5.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 นำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

5.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน

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

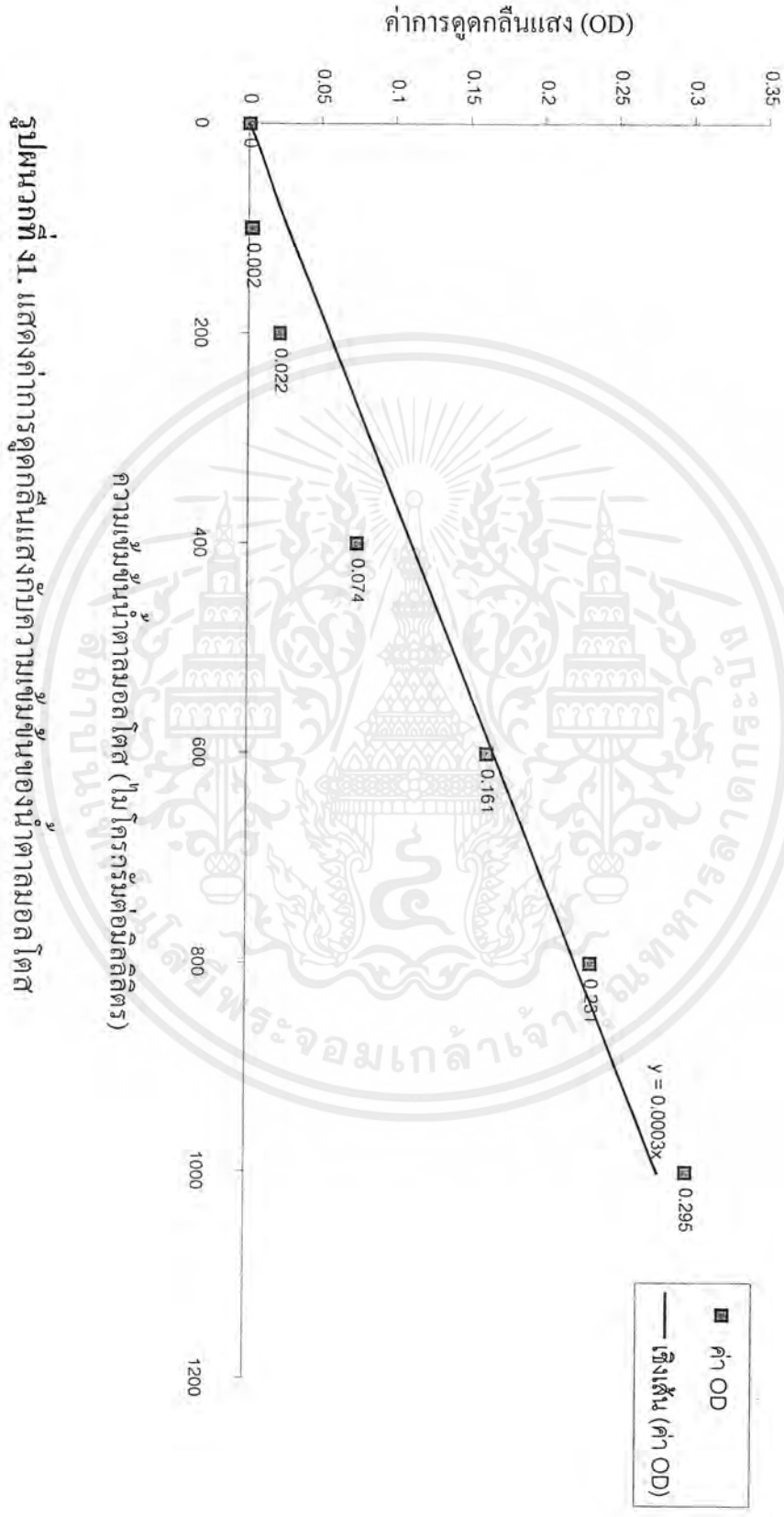
5.7 ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส นำสารละลายน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4-5 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส

5.8 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$

ยูนิต ต่อ มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 54. กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (ในโตรเจนต่ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
การหาปริมาณความชื้นในอาหาร

สารที่ใช้ทดลอง อาหารตัวอย่างประมาณ 100 กรัม

วิธีทดลอง

1. นำอาหารตัวอย่างประมาณ 100 กรัม มาบดให้ละเอียดในเครื่องบด ถ้าลักษณะของอาหารแห้งเกินไปควรเติมน้ำกลั่นลงไปให้เหมาะสม เพื่อให้สัดส่วนต่าง ๆ ในอาหารผสมเข้ากันให้ดีขึ้น แต่ต้องบันทึกปริมาตรของน้ำกลั่นที่เติมลงไปด้วย

2. เทอาหารที่บดละเอียดแล้วเก็บไว้ในภาชนะเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

3. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด นำอาหารที่บดละเอียดแล้ว จากข้อ 2 ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องนี้ 20 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้

4. นำถ้วยกระเบื้องนี้ไปอบในเตาอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5. นำถ้วยกระเบื้องออกจากเตาอบ ทำให้เย็นในขวดโหลดูดความชื้น (desicator) แล้วชั่งน้ำหนักทันที

6. นำไปอบในเตาอบต่ออีก แล้วทำซ้ำวิธีการเดิมจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ (มีค่าน้ำหนักต่างกันไม่เกิน 70 มิลลิกรัม)

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นในอาหารตัวอย่าง (เป็นเปอร์เซ็นต์)

วิธีการคำนวณ

น้ำหนักอาหารตัวอย่างก่อนเข้าเตาอบ	ก	กรัม
น้ำหนักอาหารตัวอย่างที่ออกจากเตาอบ	ข	กรัม
น้ำหนักที่ลดลงของอาหารตัวอย่าง	ก-ข	กรัม

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{(\text{ก-ข}) \times 100}{\text{ก}} \quad \text{เปอร์เซ็นต์}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้