สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 จากลูกแป้ง

T 061811

นายกิตติศักดิ์ ธนรัตนพัฒนกิจ
นายนัฐ ภัทรศิรินิ
นายวีระ แก้วสมนึก

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 61811
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549

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

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A study on optimal conditions in α-amylase production by *Aspergillus* sp. REB2

Mr. Kittisak Tanaratpattanakit

Mr. Nat Pattarasirin

Mr. Weera Kaewsomnuek

A Special Project Submitted in Partial Fullfillment of Requiment for the

Degee of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Facalty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Acadamic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 จากลูกแป้ง

นักศึกษา นายกิตติศักดิ์ ธนรัตนพัฒนกิจ รหัส 44050156

นายนัฐ ภัทรศิริน รหัส 44050181

นายวีระ แก้วสมนึก รหัส 44050209

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 จากลูกแป้ง			
โดย	นายกิตติศักดิ์	ธนรัตนพัฒนกิจ	รหัสนักศึกษา	44050156
	นายนัฐ	ภัทรศิริน	รหัสนักศึกษา	44050181
	นายวีระ	แก้วสมนึก	รหัสนักศึกษา	44050209
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง			
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์			
ปีการศึกษา	2548			

บทคัดย่อ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Czapek ดัดแปลง ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยปัจจัยที่ใช้ทดลองได้แก่ แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้น จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ จะให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 35.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท และยีสต์สกัด ที่ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดจะได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และยังพบอีกว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 46.59 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะสูงเมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 จะเจริญในสภาวะที่เหมาะสมและจะผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุดที่ 47.64 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้เท่ากับ 81.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title A study on optimal conditions in α-amylase production by *Aspergillus* sp. REB2

Name Mr. Kittisak Tanaratpattanakit
Mr. Nat Pattarasirin
Mr. Weera Kaewsomnuek

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Year 2004

Special Project Advisor Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Optimal conditions for α-amylase production by *Aspergillus* sp. REB2 using modified Czapek's medium were studied and carried out by incubation on a rotary shaker at 200 rpm for 5 days at 30 °C. The tested parameters were : cassava starch concentration of 2 4 6 and 8 % (w/v), types and concentration of nitrogen sources and different levels of initial pH. From the results, it was found that the maximum α-amylase activity of 35.42 U/ml was produced in the modified medium containing 8 % cassava starch on day 3 of cultivation. The effect of various nitrogen sources on the enzyme production was investigated using 3 gm/l of ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonum sulfate, sodium nitrate and yeast extract. The maximum α-amylase was obtained when yeast extract was used as a nitrogen source. It was found that the fungus required 1 gm/ l of yeast extract for the enzyme production with the activity of 46.59 U/ml on day 3 of cultivation. Moreover, the highest α-amylase production occurred at pH 4.0. *Aspergillus* sp. REB2 grown in modified Czapek's medium under optimum conditions, produced 47.64 U/ml of α-amyalse on day 3 in shake flask culture. In 5-l fermenter, the fungus produced 81.35 U/ml of of α-amylase on day 4 of cultivation when when the fermenter was carried out at the agitation speed of 200 rpm and the aeration rate of 1.0 vvm at 30 °C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง เป็นอย่างยิ่ง ที่ได้ให้โอกาส คำแนะนำ แนวทางในการค้นคว้าวิจัย การทำวิจัย การเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์และการให้คำแนะนำปรึกษาทุกๆอย่าง ไม่ว่าจะเป็นเรื่องใดก็ตามตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ประธานคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์คณะกรรมการทุกๆ ท่าน สำหรับการสอบวิชาโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง สำหรับโอกาส ความรัก คำแนะนำ และกำลังใจในการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษ ซึ่งสิ่งที่ท่านมอบให้นั้นมากเกินที่จะเขียนได้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน แม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ พี่ เพื่อน น้อง ทุกคน ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังกายและกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยตลอดมา จนโครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

กิตติศักดิ์ ธนรัตนพัฒนกิจ
นัฐ ภัทรศิริน
วีระ แก้วสมนึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง	3
2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส	8
2.3 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต	12
2.4 การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์	18
2.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	19
2.6 การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลส	19
2.7 การนำเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ประโยชน์	20
2.8 แป้งและองค์ประกอบภายในแป้ง	21
2.9 แป้งมันสำปะหลัง	23
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	25
3.1 วัสดุอุปกรณ์	25
3.2 วิธีการทดลอง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	29
4.1 ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	29
4.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	31
4.3 ผลของปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	34
4.4 ผลของค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	36
4.5 ผลของการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	47
ภาคผนวก ก.	47
ภาคผนวก ข. วิธีการวิเคราะห์	48
ภาคผนวก ค. การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer	50
ภาคผนวก ง. สูตรอาหารและสารละลายบัฟเฟอร์	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส 4

ตารางที่ 2 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน 21

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ 22

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป 23

ตารางที่ 5 ผลของแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ 30

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ 31

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ 33

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ 34

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัด ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ 35

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบปริมาณยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ 36

ตารางที่ 11 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 38

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบพีเอชเริ่มต้นของอาหารในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ 39

ตารางที่ 13 ผลของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ใน อาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ ใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตรและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 การทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการย่อยแป้ง 3

รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 5

รูปที่ 3 การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส 6

รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 7

รูปที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ไอโซอะไมเลส 7

รูปที่ 6 แสดงลักษณะเส้นใยและ conidiophores ของ *Aspergillus* sp. 13

รูปที่ 7 โครงสร้างของอะไมโลส 21

รูปที่ 8 โครงสร้างของอะไมโลเพคติน 22

รูปที่ 9 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ 29

รูปที่ 10 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ 32

รูปที่ 11 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 1 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตร 34

รูปที่ 12 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 5 6 และ 7 37

รูปที่ 13 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ ใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตรและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 39

รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

แอลฟาอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญในการย่อยแป้ง โดยสามารถย่อยแป้งแบบสุ่มที่พันธะแอลฟา -1,4 กลูโคซิดิก (α-1.4 glucosidic bond) ของอะไมโลเพคติน (amylopectin) แต่ไม่ย่อยพันธะ1,6 กลูโคซิดิกของอะไมโลเพคติน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโทสและกลูโคสแต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโตส และเดกซ์ทริน เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสส่วนใหญ่พบได้ทั่วไปใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น พบในน้ำลายของสัตว์ ตับอ่อน ข้าวมอลต์ และจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Bacillus subtilis* (ปิยนุช,2524) ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์อะไมเลสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมขนมปัง อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมการผลิตยาและเคมีบริสุทธิ์ อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกที่ใช้กับเครื่องล้างจานอัตโนมัติ อุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาถูก โดยเฉพาะแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลัง และยังได้ผลผลิตของเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้ดีสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในประเทศ

ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการนำเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีมาศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารและหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในประเทศต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารเหลว

1.2.2 ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ในถังหมักแบบใบพัดกวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาถึงการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 รวมทั้งแหล่งไนโตรเจนและพีเอชที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณของเอนไซม์มากที่สุด หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้ถังหมักแบบใบพัดกวน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายการผลิตในระดับถังหมักต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อนำแป้งมันสำปะหลังซึ่งมีราคาถูกมาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ และเป็นการเพิ่มคุณค่าของมันสำปะหลังให้มากขึ้น

1.4.2 ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

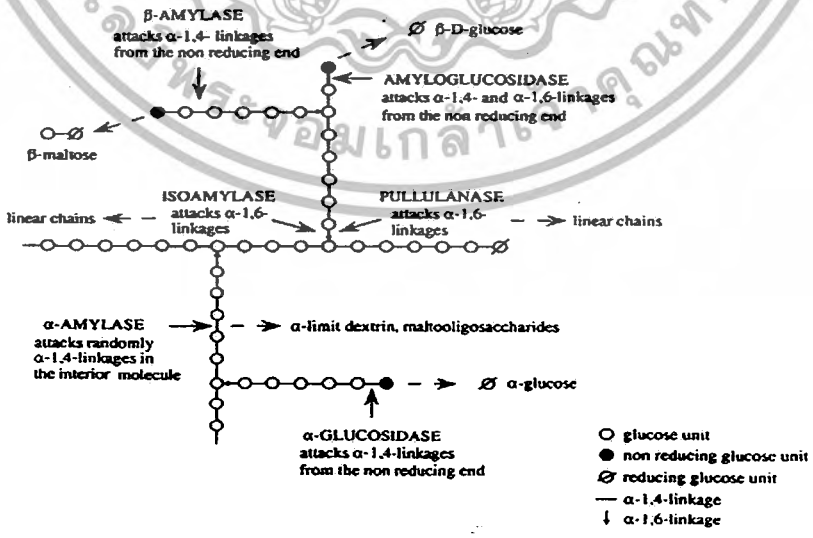
1.4.3 เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง

เอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการย่อยแป้ง คือ เอนไซม์อะไมเลส (amylase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งโดยย่อยโมเลกุลแป้งให้ได้เดกซ์ตริน (dextrin) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) จะย่อยแป้งที่พันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random hydrolysis) แต่ไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก ในขณะที่ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และพูลูแลนเนส (pullulanase) จะย่อยสลายได้เฉพาะตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิกเท่านั้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ต่างๆ เบต้าอะไมเลส (β-amylase) จะย่อยแป้งที่พันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิกจากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) ให้ได้มอลโตส (maltose) สำหรับกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จะย่อยแป้งที่พันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งแอลฟา-1,3 แอลฟา-1,4 และ แอลฟา-1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์เข้าไปทีละโมเลกุล ผลการย่อยจะได้กลูโคส (glucose) แม้ว่าเอนไซม์อะไมเลสจะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ก็ตามแต่ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ทุกชนิดในกลุ่มนี้จะย่อยแป้งดิบได้ ทั้งนี้เพราะการย่อยเม็ดแป้งจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีสารจำพวกเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ไขมัน (fat) อะไมโลเพคติน (amylopectin) และโปรตีน (protein) ห่อหุ้มเม็ดแป้งไว้ (Forgarty , 1983)



รูปที่ 1 การทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการย่อยแป้ง

ที่มา : Lam and Malikin (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส

คุณสมบัติ	แอลฟาอะไมเลส	เบตาอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส
กลไกการย่อยแป้ง	ที่กลางโมเลกุลแป้ง (Endo-attack)	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง (Exo-attack)	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง (Exdo-attack)
ผลิตภัณฑ์ที่ได้	โอลิโกแซคคาไรด์	มอลโตส	กลูโคส
ความเร็วในการลดลงของความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
ความเร็วในการเปลี่ยนสีเมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน	เร็ว	ช้า	ช้า
ปฏิกิริยาที่จุดแยกแขนง	ไม่ย่อยพันธะ α-1,4 -ไกลโคซิดิก	ไม่ย่อยพันธะ α-1,6 -ไกลโคซิดิก	สามารถย่อยพันธะα-1,6-ไกลโคซิดิก
ความจำเพาะของพันธะ	α-1,4	α-1,4	α-1,4 α-1,3 α-1,6

ที่มา : Manjunath *et al.* (1983)

เมื่อพิจารณาตามลักษณะของการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 1 จะแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ เอนไซม์เอนโดอะไมเลส(endo-amylase) เอนไซม์เอ็กโซอะไมเลส (exo-amylase) และเอนไซม์ย่อยแขนง (debranching enzyme)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 เอนไซม์เอนโด-อะไมเลส (endo-amylase)

แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase ; endo-1,4-α-D-glucan glucohydrolase E.C. 3.2.1.1) จัดเป็น extracellular enzyme คือเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแล้วถูกขับออกมานอกเซลล์พบได้ในสัตว์ พืชและจุลินทรีย์หลายชนิด เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลแป้งโดยจะย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก ดังแสดงใน รูปที่ 2 แต่ไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งคือ มอลโตส (maltose) กลูโคส (glucose) และลิมิตเดกซ์ตริน (limitdextrin) เอนไซม์ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน การทำงานของเอนไซม์ต้องการแคลเซียมไอออนร่วมทำกิจกรรม เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5.5 ถึง 9 และที่อุณหภูมิห้องถึง 150 องศาเซลเซียส ในทางอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราและแบคทีเรีย เมื่อใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้งจะทำให้ความหนืดและความสามารถในการย้อมติดสีไอโอดีนลดลงอย่างรวดเร็ว (Uhlig, 1998)

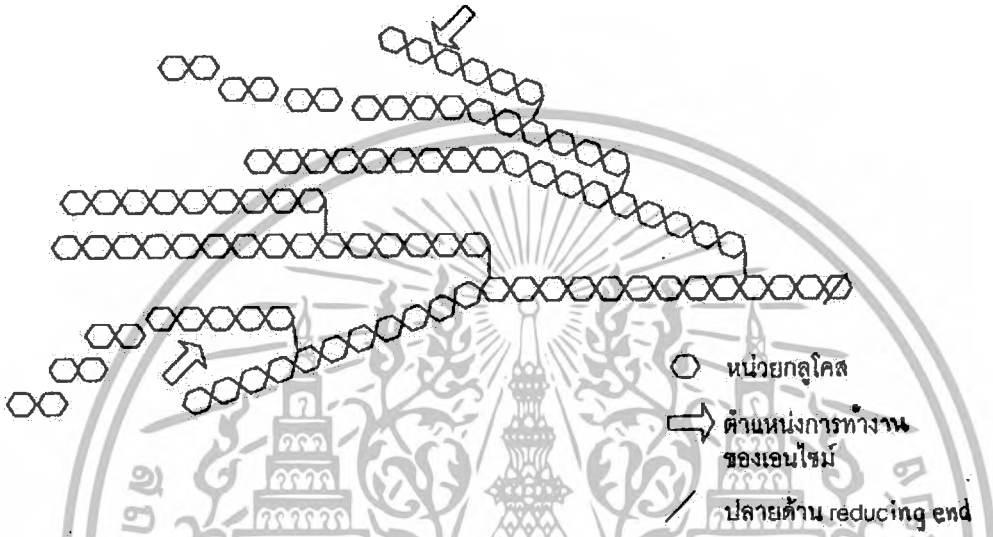
รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส
ที่มา : Bruinenberg (1996)

2.1.2 เอนไซม์เอ็กโซ-อะไมเลส (exo-amylase)

เบตาอะไมเลส (β-amylase ; 1,4-α-D-glucan maltohydrolase E.C. 3.2.1.2) เอนไซม์นี้พบในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ถั่วและมันฝรั่งหวาน เป็นต้น จัดเป็น extracellular enzyme และพบในเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus cereus* เป็นต้น เอนไซม์เบตาอะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

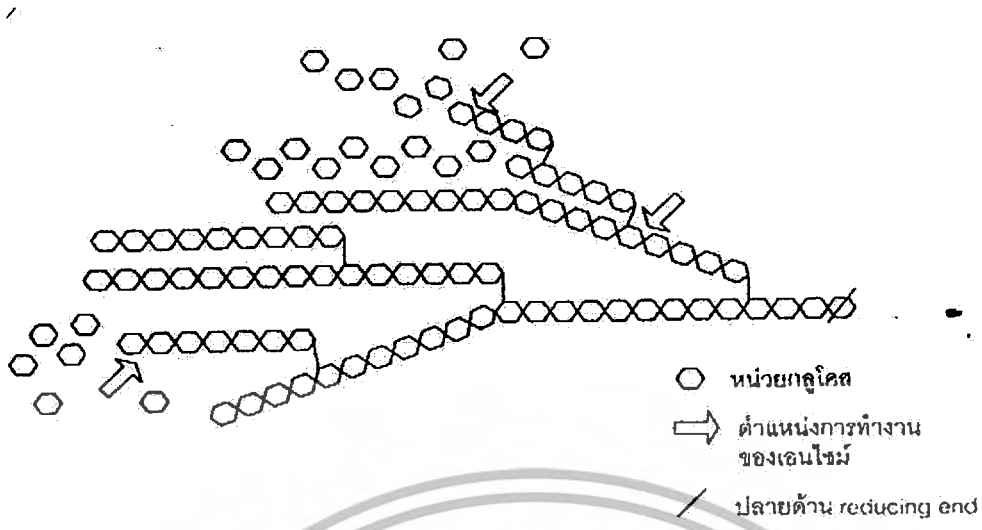
ไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะจากด้านนอกเข้ามาด้านในโดยเริ่มจากปลายของอะไมโลสหรืออะไมโล เพคตินจากปลายด้านที่ไม่คุณสมบัติรีดิวซ์ เอนไซม์จะตัดพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิกของโมเลกุลกลูโคสเป็นคู่ๆไป ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลมอลโตสดังรูปที่ 3 เอนไซม์ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน การทำงานของเอนไซม์ต้องการแคลเซียมไอออนร่วมทำกิจกรรม เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 4 ถึง 9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (Uhlig, 1998)



รูปที่ 3 การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส
ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase; 1,4-α-D-glucan glucohydrolase E.C. 3.2.1.3) สามารถผลิตได้จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus, Penicillium* และ *Rhizopus* ยีสต์ และแบคทีเรีย เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ตัดน้ำตาลกลูโคสที่จับกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก และพันธะกิ่งแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก โดยการตัดพันธะกิ่งจะเกิดขึ้นช้ากว่าการตัดพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก ถ้าการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กลูโคส ดังรูปที่ 4 เอนไซม์ชนิดนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 ถึง 110 กิโลดาลตัน (Uhlig, 1998)

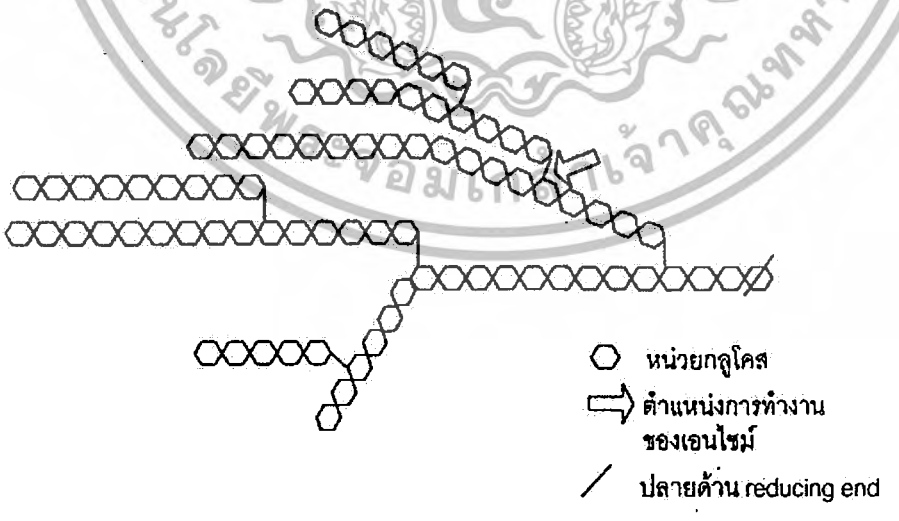
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส
ที่มา : Bruinenberg (1996)

2.1.3 เอนไซม์แยกแขนง (debranching enzyme)

ไอโซอะไมเลส (isoamylase ; glucogen-6-glucanohydrolase E.C. 3.2.1.68) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยจุดที่เป็นกิ่งก้านของโมเลกุลไกลโคเจนและอะไมโลเพคตินได้ดี แสดงการทำงานดังรูปที่ 5 ไอโซอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟคเตอร์ในการทำงานสามารถดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอช 3 ถึง 4 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 ถึง 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้สามารถแยกได้จากพืช สัตว์ รวมทั้งจากจุลินทรีย์ด้วย (Uhlig, 1998)



รูปที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ไอโซอะไมเลส
ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พูลูลาเนส (pullulanase ; Pullulan 6-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิกของพูลูแลนและอะไมโลเพคติน แต่การทำกิจกรรมไม่สมบูรณ์เท่ากับการย่อยโดยไอโซอะไมเลส และทำกิจกรรมกับไกลโคเจนได้ยาก สามารถย่อยได้สายกลูโคสที่มีความยาว 2 ถึง 3 หน่วย ไม่สามารถย่อยจนได้กลูโคส 1 หน่วย เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในพืช สัตว์ และแบคทีเรีย เอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 4.5 ถึง 5.5 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Uhlig, 1998)

2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันนิยมการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ เพราะเป็นแหล่งที่มีปริมาณเอนไซม์ไม่จำกัดและใช้เวลาในการผลิตไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเลี้ยงได้ง่าย เจริญเติบโตเร็ว ต้องการอาหารที่ไม่ซับซ้อน อีกทั้งยังสะดวกในการเก็บรักษาเชื้อได้นานหลายเดือนโดยไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อ (subculture) บ่อย และมีการแปรผันทางพันธุกรรม (mutation) ของสายพันธุ์เชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์น้อยกว่าเชื้อรา (Uhlig, 1998)

2.2.1 กลุ่มของเชื้อรา

Kekos และ Marcris (1987) รายงานว่า *Calvatia gigantea* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยศึกษาจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ซึ่งสูตรอาหารที่ประกอบด้วย แป้งจากผลต้นโอ๊ต (acorn starch) ที่มีแทนนินอยู่ 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Calvatia gigantea* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่พีเอชระหว่าง 5-5.5 และอุณหภูมิระหว่าง 29-32 องศาเซลเซียส ซึ่งชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.60-0.88 กรัมต่อลิตร สำหรับอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือพีเอชระหว่าง 6.0-6.5 และอุณหภูมิระหว่าง 29-30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 68,250 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Ramachandran *et al.* (2004) รายงานว่า *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงในสูตรอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วยกากของเหลือจากการสกัดน้ำมันมะพร้าว (coconut oil cake) เป็นวัตถุดิบหลักเพียงอย่างเดียวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,372 หน่วยต่อกรัมของสับสเตรทแห้ง (U/g dry substrate) และจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ 1.827 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีความชื้นเริ่มต้น 68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมกลูโคสและแป้งลงไปในอาหาร พบว่าสามารถชักนำให้ผลิตเอนไซม์สูงถึง 1,911 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง และเมื่อมีการเติมเปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดถึง 3,388 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Goto *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aspergillus fumigatus* โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วย แอลฟา-เมทิล-ดี-ไกลโคไซด์(α-methyl-D-glycoside) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Aspergillus fumigatus* สามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสได้ถึง 60 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8-10 วัน และยังพบอีกด้วยว่า แอลฟา-เมทิล-ดี-ไกลโคไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพดีกว่าแป้งและมอลโตส เมื่อใช้ในความเข้มข้นที่เท่ากัน

2.2.2 กลุ่มของยีสต์

Sandhu *et al.* (1987) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida tropicalis, Hansenula anomala, Lipomyces* sp., *Pichia membranfaciens, Saccharomyces fibuligera, Saccharomyces cerevisiae* และ *Trichosporaon pullalans* โดยเลี้ยงในอาหารที่ทำจากธัญพืช จากการศึกษาพบว่า เชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุด คือ *Saccharomyces fibuligera* ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 6.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ *Sacharomyces cerevisiae* ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้น้อยที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1.93 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า

Fossi *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตและและคุณสมบัติบางส่วนของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์แอสโคมัยเซตีส (Ascomycetes yeast stain) ที่แยกได้จากดินบริเวณโรงงานแป้ง ตลาดแป้งและมันสำปะหลังที่มีการแปรรูป จากการศึกษาพบว่าเชื้อยีสต์นี้สามารถให้กิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ชนิดนี้ใกล้เคียงกับค่าความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากแบคทีเรีย

2.2.3 กลุ่มของแบคทีเรีย

Shatta *et al.* (1990) ศึกษาผลของสารอาหารและปัจจัยแวดล้อมที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Steptomyces aureofaciens* 77 จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 7.0 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่า ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยให้ค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับ 580 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Babu และ Satayanarayana (1995) ศึกษาการผลิตแอลฟาอะไมเลส *Bacillus coagulans* B49 โดยการหมักบนอาหารแข็งที่ทำจากรำข้าวสาลี พบว่า *Bacillus coagulans* สามารถให้กิจกรรมอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 26,350 หน่วยต่อกรัมมวลหมักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Milner *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* โดยให้อากาศในอัตราที่สูง พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีเมื่อมีการให้อากาศในอัตรา 1.7 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเร็วรอบในการกวน 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 4,800 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Uguru *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีความคงทนต่ออุณหภูมิจาก *Thermoactinomyces thalpophilus* ซึ่งแยกได้จากกากของเสียจากโรงงานผลิตแป้งโดยใช้อาหารที่มีน้ำตาลจากข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์นั้นยังคงเหลืออยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Ferreya *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยหางนม จากการผลิตเนย เป็นคาร์บอนในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชและอากาศแบบอัตโนมัติโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* NRRL 3411 พบว่า เมื่อควบคุมพีเอช 7.5 มีการกวนและให้อากาศตลอดเวลา สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 10000 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Ajayi and Fagade (2003) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ เบต้าอะไมเลส (β-Amylase) ของเชื้อ *Bacillus* หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากดิน น้ำเสีย และแหล่งอาหารต่างๆ ซึ่งได้แก่ *Bacillus licheiniformis, Bacillus circulanns, Bacillus coagulans, Bacillus megatorium, Bacillus polymyza, Bacillus subtitilis* และ *Bacillus cereus* ATCE 11778 โดยเลี้ยงเชื้อในแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus licheiniformis* และ *Bacillus subtitilis* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้เท่ากับ 4.2 และ 6.24 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

Baysal *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ของ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน โดยใช้อาหารแข็งที่ใช้รำข้าวสาลีและแกลบจากข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบพื้นฐาน จากการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่าเท่ากับ 159,520 และ 21,760 หน่วยต่อกรัมเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่ทำจากรำข้าวสาลีและแกลบจากข้าวเจ้าตามลำดับ

Aiyer (2004) อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *Bacillus licheniformis* SPT 27 จากการศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้สูงสุดเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 1:1 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 498 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร (IU/m l)

Haq *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากสายพันธุ์กลายของ *Bacillus subtilis* ที่ผ่านกระบวนการทางเคมี จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุดถึง 2,210 หน่วยต่อมิลลิลิตรเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วยโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 7.5 แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อโมลาร์ และฟอตเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลาย

Sodhi *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตแอลฟาอะไมเลสที่คงทนต่ออุณหภูมิสูง จาก *Bacillus* sp. PS7 ซึ่งแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศอินเดียและใช้การหมักบนอาหารแข็งที่ได้จากรำข้าวสาลี พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตและให้กิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดถึง 464,000 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ 60 องศาเซลเซียสและพีเอช 6.5

2.2.4 ลักษณะที่สำคัญของเชื้อ *Aspergillus* sp. (บัญญัติ, 2537)

2.2.4.1 เส้นใยมีผนังกั้น

2.2.4.2 สปอร์ไม่เคลื่อนที่

2.2.4.3 สปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual spore) สร้างภายในแอสคัส (ascus) มีจำนวน 8 แอสโคสปอร์ (ascospore)

2.2.4.4 สปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) ไม่สร้างภายในแอสคัส (ascus)

2.2.4.5 ไม่ต้องการความชื้นมากในการเจริญ

2.2.4.6 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดได้หลายวิธีดังนี้ คือ fission budding fragmentation chlamydospore และ conidia

2.2.4.7 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์มีหลักการโดยนิวเคลียสเข้าไปอยู่ในเซลล์เดียวกันแต่ยังไม่รวมกัน ทำให้เป็นลักษณะ 1 เซลล์มี 2 นิวเคลียส ที่เรียกว่า diakaryon และนิวเคลียสแบ่งตัวหลายๆครั้งได้ dikaryotic cell ใหม่อีกหลายอัน ต่อมานิวเคลียสทั้ง 2 อันในเซลล์จะรวมกันในส่วนที่จะเจริญเป็นแอสคัส (ascus) จากนั้นนิวเคลียสจะเกิดการแบ่งตัวไมโอซิสและได้นิวเคลียส 4 อันต่อมา haploid nucleus ทั้ง 4 นี้จะแบ่งแบบไมโตซิสอีกครั้งหนึ่งได้ 8 นิวเคลียสซึ่งจะเจริญไปเป็นแอสโคสปอร์ (ascospore) 8 อันอยู่ภายในแอสคัส

2.2.5 ประโยชน์ของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

2.2.5.1 ด้านอุตสาหกรรม ได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่นทำเต้าเจี้ยวใช้ *Aspergillus wendtii* ผลิตกรดซิตริคและกรดกลูโคนิก ใช้ *Aspergillus* sp. เหล้าสาเกจากข้าวใช้ *Aspergillus oryzae*

2.2.5.2 ใช้ทดสอบธาตุโลหะโดยเฉพาะทองแดงในดินใช้ *Aspergillus niger* ซึ่งถ้าในดินขาดทองแดง สีของราจะอ่อน ถ้ามีทองแดงสีจะคล้ำ ถ้าไม่มีทองแดงเลยจะมีสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 โทษของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

ทำให้อาหารเป็นพิษ เชื้อ *Aspergillus* sp. หลายชนิดโดยเฉพาะ *A. flavus* เมื่อเจริญในอาหารพวกถั่วต่างๆจะสร้างสารพิษที่เรียกว่า อัลฟาทอกซินทำให้เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ได้ ทำให้เกิดโรค และทำลายอาหารและผลผลิตต่างๆทางเกษตรกรรม เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ทำลายอาหารพวกเนื้อสัตว์และไขมันได้ดี (Uhlig, 1998)

2.3 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต

2.3.1 การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง (solid state fermentation)

การผลิตบนอาหารแข็ง หรือเรียกอีกอย่างว่าการหมักแบบอาหารแห้ง หมายถึงระบบการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารในสภาพที่ไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามน้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับกับวัตถุดิบเท่านั้น ดังนั้นระบบการหมักแบบอาหารแข็งนี้จึงไม่รวมถึงการหมักของแข็งในอาหารข้นเหลว การหมักบนอาหารแข็งนิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย โดยเชื้อรามีความสำคัญในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและมีการศึกษากันมาก คือเชื้อราในสกุล *Aspergillus* โดยจะใช้รำข้าวสาลีหรือรำข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบ ในบางครั้งอาจมีอาหารเสริมพวกโปรตีน หรือเกลือแร่ที่จำเป็น การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งต้องมีการปรับความชื้นเริ่มต้นให้เหมาะสม เพื่อให้เชื้อเจริญได้ดีและเกิดการพองตัวของอนุภาคอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์นำอาหารไปใช้ได้ง่าย และมีการถ่ายเทของน้ำและออกซิเจนได้ดี (ดุษณี, 2534)

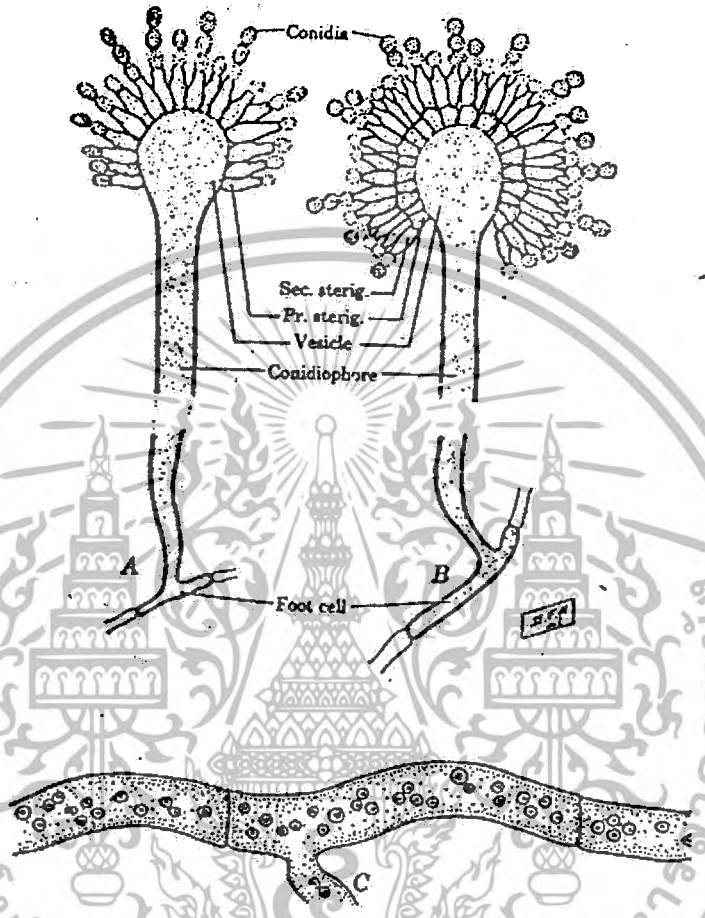
ข้อดีของการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง

1. สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด
2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณสูงและคงที่
3. ผลิตภัณฑ์สามารถสกัดได้โดยตรง ใช้วิธีที่ง่ายและสะดวก
4. สภาพการเจริญของจุลินทรีย์มีลักษณะใกล้เคียงกับธรรมชาติ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ง่าย ใช้เนื้อที่น้อย
6. อาหารมีปริมาณความชื้นต่ำทำให้ลดปัญหาในการปนเปื้อน

ข้อเสียของการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง

1. มีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าอาหารเหลว
2. ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นมาก ดังนั้นการเตรียมสปอร์จึงต้องใช้วิธีปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงลักษณะเส้นใยและ conidiophores ของ *Aspergillus* sp.

A : conidiophore ที่เรียงอยู่บน sterigma แบบแถวเดียว

B : conidiophore ที่เรียงอยู่บน sterigma แบบสองแถว

C : แสดงจำนวนนิวเคลียสหลายอันในเส้นใย

ที่มา : Alexopolous and Mims (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว (submerged fermentation)

การหมักในอาหารเหลวนิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรีย และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา โดยทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้เลี้ยงจะนำไปฆ่าเชื้อด้วยการให้ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 110 ถึง 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 ถึง 30 นาที โดยมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณร้อยละ 3 ถึง 5 น้ำหนักต่อปริมาตร ต้องควบคุมการให้อากาศและการกวน (ดุษณี, 2534)

ข้อดีของการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

1. ใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิต
2. ควบคุมสภาวะการผลิตได้ง่าย

ข้อเสียของการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว

1. มีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย
2. ประสิทธิภาพของหัวเชื้อเริ่มต้นจะลดลงจึงจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงอยู่เสมอ

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

2.3.3.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน ทำหน้าที่เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์อะไมเลส แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน และมอลโตไตรโอส เป็นต้น

แป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ดีที่สุด ส่วนกลูโคส ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลเล็กกว่า จะให้เอนไซม์ออกมาน้อย ทั้งนี้เนื่องจากการที่จุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์อะไมเลสออกมานั้นต้องรับการกระตุ้นด้วยสารที่มีพันธะแอลฟา- 1, 4-กลูโคซิดิก

น้ำตาลแลคโตสและกาแลคโตสนั้นมีความสำคัญที่สุดในการกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ส่วนน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสไม่ได้ส่งเสริมให้มีการสร้างเอนไซม์ อีกทั้งยังยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลสด้วยถ้าใช้ความเข้มข้นสูงๆ นอกจากนั้นแหล่งคาร์บอนไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่านั้น แต่ยังเกี่ยวข้องกับอัตราเร็วในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ด้วย โดยถ้าอัตราเร็วในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตสูงจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์อะไมเลส การใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้การเจริญเติบโตดีแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอนไซม์อะไมเลสลดลง ในขณะเดียวกันการใช้ไกลโคเจน น้ำตาลแลคโตส กาแลคโตส และไซโลส ทำให้การเจริญไม่ค่อยดีแต่ส่งเสริมการสร้างเอนไซม์อะไมเลสให้เพิ่มมากขึ้น

Ferreya *et al.* (1978) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* NRRL 3411 ในอาหารที่มีหางนมจากการผลิตเนยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้หางนมจากการผลิตเนยนั้นสามารถกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงถึง 10,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาของ Bajpai *et al.* ซึ่งได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดย *Bacillus* sp. และใช้หางนมจากการผลิตเนยเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกัน พบว่าสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 2,690 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Kekos และ Maeris (1987) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อรา *Calvati gigantea* โดยใช้แป้งที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 68,250 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Shatta *et al.* (1990) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสของ *Streptomyces aureofaciens* 77 พบว่าการใช้แป้ง (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 300 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตร ในขณะที่เดกซ์ตรินให้กิจกรรมของเอนไซม์ 245 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตร

Uguru *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Thermoactinomyces thalpophilus* และใช้น้ำตาลจากข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาพบว่าการใช้น้ำตาลจากข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าการใช้แป้ง (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอน

Goto *et al.* (1998) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Aspergillus oryzae* จากการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นเท่ากัน การใช้ α-methyl-D-glucoside เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ให้มีการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้แป้งและมอลโตส โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 60 หน่วยต่อมิลลิกรัม

Souza และ Peralta (2001) ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aspergillus tamarii* โดยศึกษาการยับยั้งแบบคาตาบอไลต์จากการใช้กลูโคส ไซโลส ฟรุคโตส มอลโตส เซลโลไบโอส แลคโตสและซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเติมที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ไม่มีการยับยั้งเกิดขึ้น และยังสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ และจะเกิดการยับยั้งแบบคาตาบอไลต์ขึ้นเมื่อเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า และจากการศึกษาของ Lodato *et al.* (1997) พบว่ากลูโคสส่งผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ramachandron *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *Aspergillus oryzae* โดยใช้อาหารแข็งที่เกิดจากกากของเหลือจากการผลิตน้ำมันมะพร้าว (coconut oil cake) ซึ่งสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์ได้ถึง 1,827 หน่วยต่อกรัมของหมักแห้ง และเมื่อเติมกลูโคสและแป้งจะกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์มากขึ้นได้ โดยพบว่า เมื่อเติมแป้งความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์ 1,911 หน่วยต่อกรัมของมวลหมักแห้ง

Santos และ Martins (2003) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Bacillus* sp. พบว่าเมื่อใช้แป้ง มอลโตสหรือซิเตรท เป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ แต่ในทางตรงข้าม ถ้าใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสลดลง

2.3.3.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้ต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญและให้ผลผลิตสูงในอาหารที่ใช้ไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ แต่บางชนิดสามารถใช้ไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ได้ดีกว่า ทางเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารประกอบไนโตรเจน

Lodato *et al.* (1997) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aureobasidium pullalans* จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่างๆที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าแอสพาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดทั้งต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

Rani *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2PO_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ยูเรีย และแอมโมเนียมคาร์บอเนต ($(NH_4)_2HPO_4$) พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ซึ่งให้กิจกรรม 2,210 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Aiyer (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus licheniformis* SPT 27 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด เคซีน ทริปโตน และโปรติเอสเปปโตน ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_4SO_4) และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าการใช้ เปปโตนและแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและยังพบอีกด้วยว่า การใช้เปปโตนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ กระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Ramachandran *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนไซม์เอนโดอะไมเลสของ *Aspergillus oryzae* โดยใช้อาหารแข็งที่เกิดจากกากของเหลือจากการผลิตน้ำมันมะพร้าว (coconut oil cake) พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือ เปปโตน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมเอนไซม์ 3,388 หน่วยต่อกรัมมวลหมักแห้ง

2.3.3.3 เกลือของสารอนินทรีย์

จุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และเป็นองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ ซึ่งแร่ธาตุหลักที่สำคัญที่ต้องเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอไรด์ (Cl) ส่วนแร่ธาตุรองที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่เล็กน้อย ได้แก่ โคบอลท์ (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) และ ซิงค์ (Zn) (Stanbury *et al.*, 1995)

Bajpai *et al.* (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *Bacillus* sp. จากการศึกษาพบว่า สูตรอาหารที่ทำจากหางนมจากการผลิตเนย (cheese whey) มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งมีการเติมแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.02 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์ 2,690 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Rani *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลายในสูตรอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1.0 ถึง 7.0 มิลลิโมลาร์ พบว่า การเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

Haq *et al.* (2003) ศึกษาส่วนประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่า *Bacillus licheniformis* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 1.25 เปอร์เซ็นต์ อาหาร Nutrient Broth 0.5 เปอร์เซ็นต์ แป้งข้าวฟ่าง 1 เปอร์เซ็นต์ แลคโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.5 เปอร์เซ็นต์ กับแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากกว่าการใช้อาหารเลี้ยงที่สามารถหาได้โดยทั่วไปซึ่งมีราคาสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
61811

2.3.3.4 พีเอชและอุณหภูมิ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญและสร้างผลผลิตได้ที่พีเอชและอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 3-6 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส (Alexopoulos and Mims, 1992)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Calvatia gigantea* โดย Kekos และ Macris (1987) พบว่า อุณหภูมิที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อยู่ระหว่าง 19-30 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อยู่ระหว่าง 6.0-6.5 โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 68,250 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Shatta *et al.* (1990) รายงานว่าปัจจัยที่สำคัญสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Streptomyces aureofaciens* 77 คือ พีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง จากการปรับพีเอชของอาหารให้อยู่ระหว่าง 5.0-9.0 พบว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุดอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 730 หน่วยต่อมิลลิลิตร และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ 550 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Uguru *et al.* (1997)ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจาก *Thermoactinomyces thalpophilus* ในอาหารที่ใช้น้ำตาลซึ่งได้จากข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ ที่พีเอช 5.0 และ อุณหภูมิเท่ากับ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากที่สุด

Fossi *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์สายพันธุ์แอสโคมัยซีตีส (Ascomycetes yeast strain) ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตแป้ง พบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ 4.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งทั้งสองปัจจัยนี้สามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากที่สุด

2.4 การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะต้องเก็บเกี่ยวออกจากอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่ใช้โดยอาศัยกรรมวิธีในการเก็บเกี่ยวที่ต้องขึ้นกับวัตถุประสงค์ว่าจะให้เอนไซม์จำหน่ายอยู่ในรูปแห้งหรือรูปเหลว

ในกรณีของเอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็งสามารถนำเอนไซม์ในอาหารแข็งที่ใช้ไปอบให้แห้งเพื่อใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ในรูปแห้ง ในขณะที่ถ้าต้องการเอนไซม์เหลว จำเป็นต้องนำเอนไซม์ในรูปแห้งนั้นไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เอนไซม์ที่สกัดสามารถทำให้เป็นเอนไซม์เข้มข้น หรือเอนไซม์ผง โดยเอนไซม์ที่สกัดได้จะต้องผ่านขั้นตอนต่อไปนี้คือ การกรอง การทำให้เข้มข้น การตกตะกอน การทำแห้ง ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเอนไซม์จากการหมักในอาหารเหลวจะต้องผ่านขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับเอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็ง ยกเว้นขั้นตอนการสกัดตอนแรกเท่านั้น (ดวงพร, 2530)

2.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Enzyme Purification)

สารละลายเอนไซม์ที่แยกเอาเซลล์ออกไป เช่น crude enzyme จะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหย หรือนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เอทานอล อะซิโตน และตัวทำละลายอื่นๆ โดยที่จะต้องทำในที่อุณหภูมิต่ำ แล้วนำไปไดอะไลซิส (dialysis) จากนั้นทำให้แห้งเติมสารที่ศึกษาแล้วว่ารักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไว้ได้ และเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำ ในทางการค้าอาจส่งเอนไซม์ขายในรูปของสารละลาย การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ส่วนมากนิยมใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบ molecular sieve เช่น DEAE-cellulose และ Sephadex G100 CM-cellulose เป็นต้น ซึ่งรายละเอียดขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ เชื้อจุลินทรีย์ และประสบการณ์ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยที่สมบัติและประสิทธิภาพของเอนไซม์ยังคงอยู่ ทำให้ได้เอนไซม์ในรูปที่บริสุทธิ์ขึ้น (ดวงพร, 2530)

2.6 การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลส

การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลสให้กิจกรรมคงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อย ต้องคำนึงถึงอุณหภูมิและพีเอช ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีพีเอชและอุณหภูมิที่คงตัวแตกต่างกัน ดังนั้นต้องเลือกพีเอชและอุณหภูมิในการเก็บรักษาให้เหมาะสม มิฉะนั้นเอนไซม์อาจเสียสภาพได้ โดยอาจเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำดังนี้

2.6.1 ตู้เย็นธรรมดา (อุณหภูมิ 4 ถึง 10 องศาเซลเซียส) อาจมีการเติมอนุมูลสารบางอย่างลงไปเพื่อรักษากิจกรรมของเอนไซม์ เก็บได้นานประมาณ 1 ถึง 2 เดือน

2.6.2 แช่แข็ง นิยมใช้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 ถึง 20 องศาเซลเซียส

2.6.3 ทำ freeze dry หรือ lyophilized เป็นการระเหิดน้ำออกจากสารละลายของเอนไซม์ในสภาพที่เป็นน้ำแข็ง ทำในสภาพสุญญากาศ เมื่อเสร็จแล้วสามารถเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิต่ำๆ ก็ได้

2.6.4 ทำเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) โดยให้เอนไซม์เกาะกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น แก้วที่มีรูพรุน และ พอลิอะคริลาไมด์เจล เป็นต้น (ดวงพร, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การนำเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ประโยชน์

ปัจจุบันเอนไซม์อะไมเลสถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เป็นส่วนใหญ่ เช่น ในอุตสาหกรรมทอผ้า กรรมวิธีในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอซึ่งจะทำให้ผ้าดิบขาดง่าย ดังนั้นก่อนที่จะนำมาทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้งเพื่อให้เส้นด้ายมีความทนต่อแรงตึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนแล้วใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งที่ติดอยู่บนผ้าทอแล้วจึงนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีนี้ใช้ได้กับผ้าที่ทอจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม ในอุตสาหกรรมทำขนมปัง จะเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิดเด็กทริโนจีนิก (dextrinogenic enzyme) ลงไปในแป้งเพื่อย่อยโมเลกุลของแป้งที่ใหญ่ให้เล็กลง แล้วเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิดแซคคาโรจีนิก (saccharogenic enzyme) ลงไปเพื่อเปลี่ยนแป้งบางส่วนให้เป็นน้ำตาล ช่วยให้ขนมปังนุ่มและไม่มีรูพรุนของอากาศ ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ ใช้เอนไซม์อะไมเลสสำหรับกำจัดของแข็งที่มีลักษณะเป็นก้อนที่เกิดจากแป้ง (cloudiness) ปกติน้ำผลไม้ที่คั้นมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงใส่เอนไซม์อะไมเลสลงไป บ่มไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 ถึง 90 องศาฟาเรนไฮต์ หลังจากนั้นก็กรองเอาน้ำตาลออกซึ่งสามารถนำเอาไปทำเป็นเยลลี่ได้ สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ ในอดีตประเทศจีนเป็นประเทศแรกที่ผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ส่วนในยุโรปและอเมริกาใช้เอนไซม์อะไมเลสจากข้าวมอลต์ในระยะแรกของการผลิตแอลกอฮอล์ แต่ในปัจจุบันได้ใช้เอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราแทน และในการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง ระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆจะใช้วิธีย่อยแป้งด้วยกรด ทำให้ได้น้ำตาลหลายชนิด แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดี ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมกลูโคส รวมถึงน้ำเชื่อมมอลโตส และน้ำเชื่อมฟรุคโตส ทั้งนี้เนื่องจากน้ำเชื่อมจากแป้งเหล่านี้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมผลิตขนมปัง อุตสาหกรรมผลิตลูกอม ลูกกวาด และขนมหวาน เป็นต้น โดย กระบวนการย่อยแป้งไปเป็นน้ำตาล ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่เกิดการเจลาติไนเซชันแล้ว (Liquefaction)โดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของโซ่กลูโคสโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เมื่อการย่อยเกิดขึ้นจะทำให้โมเลกุลของแป้งแยกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดเล็กลงและความหนืดลดลงด้วย และ การย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล (Saccharification) ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนั้นหลังการย่อยแล้วจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าเล็กน้อยซึ่งอาจเป็น กลูโคส มอลโตส หรือมอลโตไตรโอส (Gupta *et al*., 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 แป้งและองค์ประกอบภายในแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 ต่อ 10 ต่อ 5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งจะประกอบด้วยแอนไฮโดรกลูโคส (anhydroglucose unit) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายโพลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่ากลุ่มปลายด้านที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (reducing end group) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือพอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพคติน)

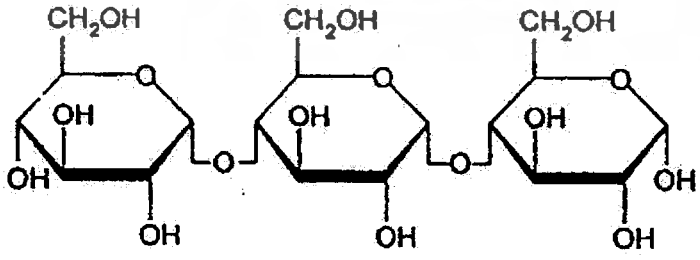
ตารางที่ 2 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

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

ที่มา : Beynum and Roels (1985)

2.8.1 อะไมโลส (amylose)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-กลูโคซิดิก แสดงดังรูปที่ 8 อะไมโลสมีอยู่ในแป้งร้อยละ 15 ถึง 25



รูปที่ 8 โครงสร้างของอะไมโลส

ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

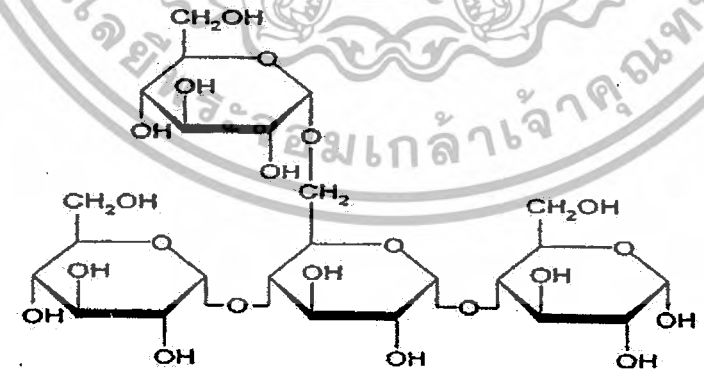
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ

ชนิดของแป้ง	ปริมาณอะไมโลส (ร้อยละ)	ปริมาณอะไมโลเพคติน (ร้อยละ)	ความชื้นร้อยละ 65 (20 องศา-เซลเซียส)	ไขมัน (ร้อยละ)	โปรตีน (ร้อยละ)	ฟอสฟอรัส (ร้อยละ)
แป้งข้าวโพด	28	72	13	0.6	0.35	0.015
แป้งมันสำปะหลัง	17	83	13	0.1	0.1	0.01
แป้งสาลี	28	72	14	0.8	0.4	0.06
แป้งมันฝรั่ง	21	79	19	0.05	0.06	0.08
แป้งข้าวเจ้า	17	83	13	0.8	0.45	0.1

ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

2.8.2 อะไมโลเพคติน (amylopectin)

อะไมโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-กลูโคซิดิก และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-กลูโคซิดิก แสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน

ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 แป้งมันสำปะหลัง

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

2.9.1 โครงสร้างของโมเลกุลแป้งมันสำปะหลัง

โดยทั่วไปแป้งประกอบด้วยโมเลกุลโพลีแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพกติน ซึ่งทั้งอะไมโลสและอะไมโลเพกตินนี้เป็นโฮโมไกลแคนของดี-กลูโคส ต่างกันที่โมเลกุลของอะไมโลสเป็นสายตรง กลูโคสแต่ละหน่วยมีอะไมโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-กลูโคซิดิก ส่วนโมเลกุลของอะไมโลเพกตินมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา บริเวณที่แตกสาขาเกิดจากการเชื่อมต่อกันของหน่วยกลูโคสด้วยพันธะแอลฟา-1,6-กลูโคซิดิก (Schoonhoven, 1974) ในโมเลกุลของแป้งมันสำปะหลังจะมีอะไมโลส และอะไมโลเพกติน ประกอบอยู่ในอัตราส่วน 17 ต่อ 33 Degree of Polymerization (D.P.) โดยเฉลี่ยของอะไมโลส และอะไมโลเพกตินเท่ากับ 3,000 และ 2×10^6 ตามลำดับ (Lyon, 1974)

องค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลัง (Lyon, 1974)

แป้งมันสำปะหลังมีไขมันต่ำกว่าแป้งธัญพืชโดยทั่วไป ส่วนองค์ประกอบอื่นนั้นมีปริมาณใกล้เคียงกับแป้งชนิดอื่น องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไปแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป

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

ที่มา : Lyon (1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 ลักษณะเฉพาะของการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งมันสำปะหลัง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 จุลินทรีย์

Aspergillus sp. REB2 ได้รับจากลูกแป้งเหล้า เก็บรักษาเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสบนอาหารวุ้นผิวเอียง (PDA) ถ่ายเชื้อทุกๆ 1 เดือน

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสูตร Czapek ดัดแปลง มีส่วนประกอบดังนี้

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	3	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	8	% (w/v)
พีเอช	7	

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. บีกเกอร์
3. ปิเปต
4. แท่งแก้วคน
5. กระบอกตวง
6. ฟลาสก์หลุม ขนาด 250 มิลลิลิตร
7. ฟลาสก์ปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ช้อนตักสาร
11. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter)
12. เตาอบไมโครเวฟ
13. ตู้เย็น
14. หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)
15. เตาอบความร้อน (hot air oven)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
18. ตู้บ่มแบบเขย่า (shaker)
19. เครื่องผสมสารละลาย (vortex)
20. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
21. ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตรพร้อมชุดควบคุม

3.1.4 สารเคมี

1. กรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
2. สารละลาย 3,5 – Dinitrosalicylic (DNS)
3. แอมโมเนียมซัลเฟต
4. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
5. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
6. โพแทสเซียมคลอไรด์
7. เฟอริกคลอไรด์
8. แป้งมันสำปะหลัง (ตราปลามังกร)
9. น้ำตาลมอลโตส

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมกล้าสปอร์ (inoculum)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 บนอาหารแข็ง PDA ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้สร้างสปอร์ ทำให้สปอร์อยู่ในรูปสปอร์แขวนลอย โดยการเติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) เขี่ยสปอร์ให้กระจายจากนั้นนำไปกรองเอาเส้นใยออก ได้สปอร์อยู่ในรูปสารละลาย ทำการตรวจนับสปอร์ด้วยเครื่อง Haemacytometer (ภาคผนวก ค) สปอร์แขวนลอยนี้ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นเพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

3.2.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

เตรียมอาหารสูตร Czapek ดัดแปลง 4 สูตร โดยใส่แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใส่อาหารปริมาตร 70 มิลลิลิตร ลงใน ฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยด้วยหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติมกล้าสปอร์ที่เตรียมจากข้อ 1 ลงไปแต่ละฟลาสก์ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรทุกๆ 24 ชั่วโมงวัดค่าพีเอช จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้วิธี dinitrosalicylic acid (DNS) ของ Bernfe1d (ภาคผนวก ข)

3.2.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารสูตร Czapek ดัดแปลง 5 สูตร โดยใช้ความเข้มข้นของของแป้งมันสำปะหลังที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดจากข้อ 3.2.2.1 มาเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) และยีสต์สกัด (yeast extract) ที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.2.1

3.2.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เตรียมอาหารสูตร Czapek ดัดแปลง 4 สูตร โดยใช้ความเข้มข้นของของแป้งมันสำปะหลังและใช้แหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดจากข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2 ปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเป็น 1 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.2.1

3.2.2.4 ศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

เตรียมอาหารสูตร Czapek ดัดแปลง 4 สูตร โดยใช้ความเข้มข้นของของแป้งมันสำปะหลังและใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดจากข้อ 3.2.2.3 ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4 5 6 และ 7 จากนั้นทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.5 ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตามข้อที่ 3.2.2.4 ปริมาตร 3 ลิตร ลงไปในถังหมักที่มีปริมาตร 5 ลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เมื่ออาหารเย็น เติมหัวเชื้อของราที่เลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในถังหมัก 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้วิธี dinitrosalicylic acid (DNS) ของ Bernfe1d (ภาคผนวก ข)

3.2.2.6 วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้ dinitrosalicylic acid (DNS) ของ Bernfe1d (ภาคผนวก ข)

วิธีวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Duncan 'Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

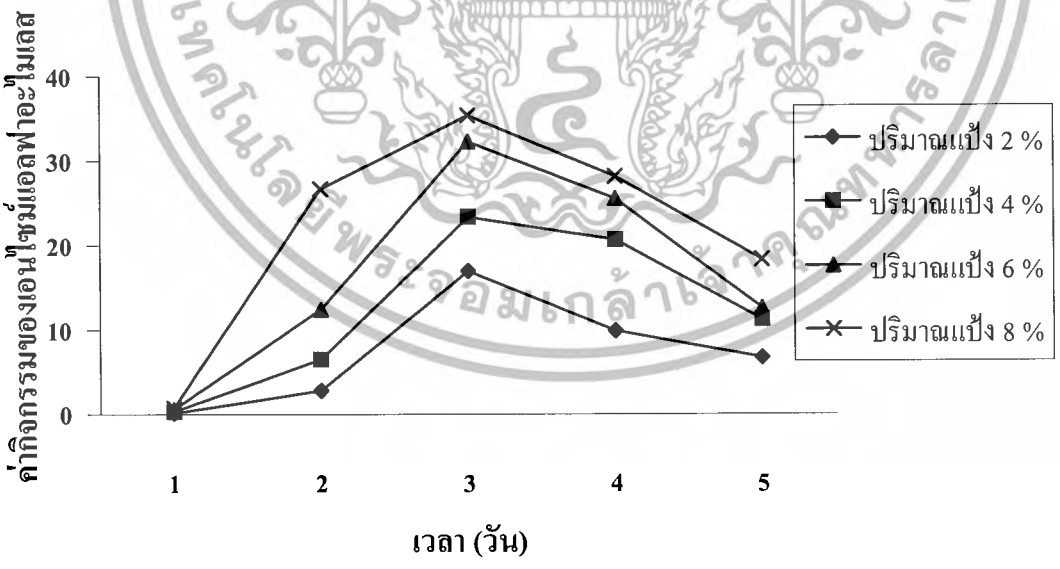
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 35.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 6 4 และ 2 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 32.34 23.40 และ 17.03 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง หลังจากวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 9 และ ตารางที่ 5 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชพบว่าอาหารทุกสูตรมีค่าพีเอชลดลง และจะมีค่าพีเอชคงที่ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 2.3-2.5 ดังตารางที่ 5

จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่แตกต่างกันจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 9 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลของแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณแป้ง เปอร์เซ็นต์ (w/v)	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
2	1	6.93	0.10
	2	6.09	2.80
	3	3.65	17.03
	4	2.78	9.93
	5	2.38	6.77
4	1	6.89	0.32
	2	4.04	6.52
	3	2.57	23.40
	4	2.38	20.72
	5	2.34	11.27
6	1	6.97	0.58
	2	3.78	12.45
	3	2.51	32.34
	4	2.42	25.55
	5	2.34	12.62
8	1	6.72	0.71
	2	2.71	26.78
	3	2.52	35.42
	4	2.40	28.19
	5	2.35	18.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง	2 เปอร์เซ็นต์	4 เปอร์เซ็นต์	6 เปอร์เซ็นต์	8 เปอร์เซ็นต์
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	17.03[d]	23.40[c]	32.34[b]	35.42[a]

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการทดลองของ Haq *et al.* (2003) รายงานว่าเมื่อใช้รำข้าวสาลี (wheat bran) 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus lichemiformis* โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ เก็บตัวอย่างที่ 28 ชั่วโมง จะทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 434 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตรต่อนาที (IU/ml/min)

มีการนำเอาเนื้อมะพร้าวที่คั้นน้ำออกแล้วมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* IFO-10301 โดยเลี้ยงในอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้เชื้อจะสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 3388 หน่วยต่อกรัมของมวลสับสเตรทแห้ง (Ramachandran *et al.*, 2004)

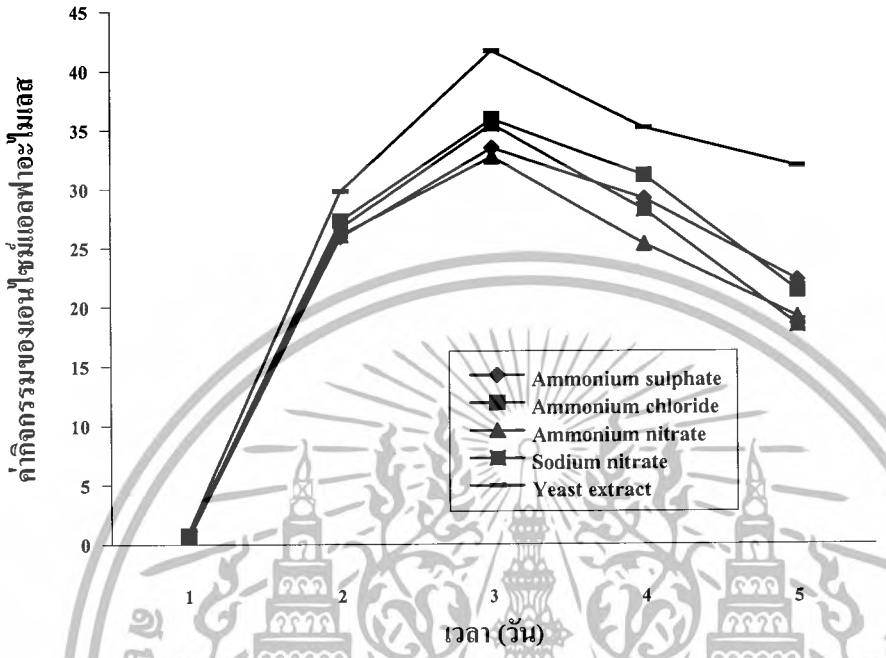
4.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเทรต และยีสต์สกัด พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 41.64 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเทรต ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 35.87 35.42 33.42 และ 32.69 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงหลังจากวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ระหว่าง 2.6 – 2.8 ดังแสดงในรูปที่ 10 และตารางที่ 7

จากผลการทดลองจะสรุปได้ว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากที่สุดเนื่องจากในยีสต์สกัดนอกจากจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วยังมีแร่ธาตุต่างๆรวมอยู่ด้วยซึ่งจะช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 10 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Tanyildizi *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่ใช้ แป้ง 17.58 กรัมต่อลิตร กลีเซอรีน 12.37 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ ใช้เปปโตน 8.77 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* IMG 22 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้มากที่สุด โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 30 ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 17.04 หน่วยสากล (IU)

ได้มีการนำเอาเปปโตนมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนรวมกับน้ำเสียที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์ และ กระบวนการผลิตเนื้อ ในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* UO-1 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 88 ซึ่งทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดที่ 89.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Hernández *et al.*, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

แหล่งไนโตรเจน	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1	5.73	0.63
	2	3.02	25.92
	3	2.93	33.42
	4	2.68	29.14
	5	2.61	22.21
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	1	6.03	0.75
	2	2.94	27.29
	3	2.77	35.87
	4	2.50	31.09
	5	2.45	21.31
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	1	6.45	0.67
	2	3.11	26.08
	3	2.88	32.69
	4	2.75	25.27
	5	2.59	19.10
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1	6.75	0.72
	2	2.87	26.70
	3	2.50	35.42
	4	2.39	28.19
	5	2.33	18.40
ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	1	6.36	1.10
	2	2.92	29.81
	3	2.62	41.64
	4	2.40	35.11
	5	2.24	31.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

แหล่งไนโตรเจน	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl	NH_4NO_3	$NaNO_3$	ยีสต์สกัด
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	33.42^{d}	35.87^{b}	32.69^{e}	35.42^{c}	41.64^{a}

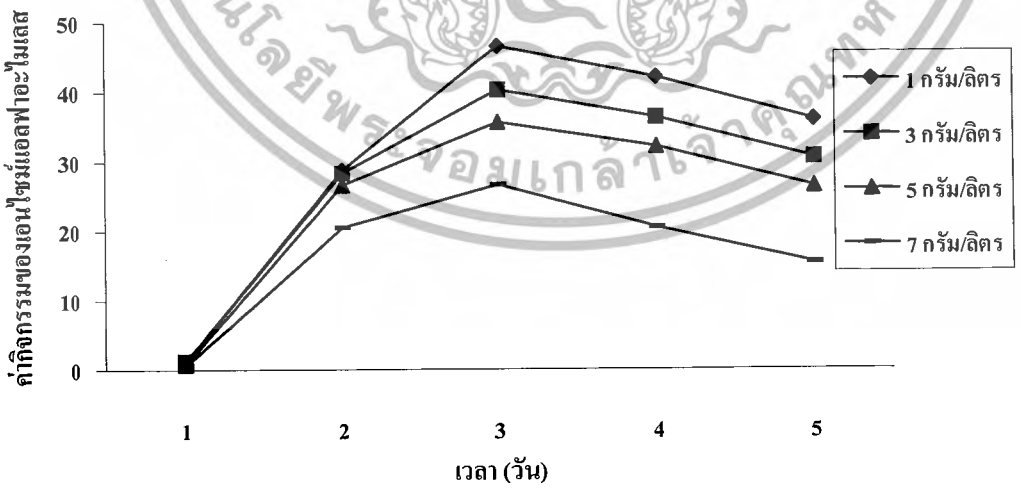
* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 ผลของปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. ในอาหาร Czapek ดัดแปลงโดยใช้ แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 1 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 46.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 2.48 รองลงมาคือ 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 40.27 35.65 และ 26.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงหลังจากวันที่ 3 โดยพีเอชของอาหารจะอยู่ระหว่าง 2.46 - 2.60 ดังแสดงในรูปที่ 11 และตารางที่ 9

จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่แตกต่างกันจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 11 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 1 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัด ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
1	1	6.48	1.18
	2	3.36	28.80
	3	2.48	46.59
	4	2.27	42.11
	5	2.24	36.00
3	1	6.44	1.20
	2	3.42	28.37
	3	2.50	40.28
	4	2.46	36.37
	5	2.25	30.59
5	1	6.85	0.76
	2	3.40	26.66
	3	2.46	35.66
	4	2.37	32.19
	5	2.26	26.44
7	1	6.78	0.54
	2	4.11	20.52
	3	2.60	26.71
	4	2.48	20.51
	5	2.36	15.43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบปริมาณยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

ปริมาณยีสต์สกัด (กรัม/ลิตร)	1	3	5	7
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	46.59[a]	40.28[b]	35.66[c]	26.71[d]

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

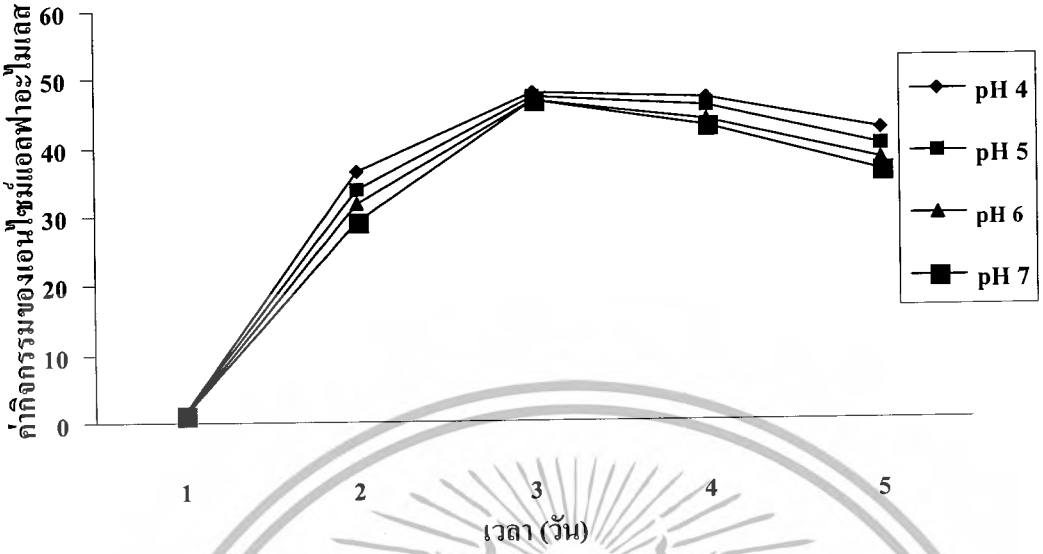
4.4 ผลของค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. ในอาหาร Czapek ดัดแปลงโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 4 5 6 และ 7 พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 4 ซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 47.64 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 2.21 รองลงมาคือที่พีเอชเท่ากับ 5 6 และ 7 ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 47.21 46.72 และ 46.70 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยพีเอชจะอยู่ระหว่าง 2.2 - 2.5 ดังแสดงในรูปที่ 12 และตารางที่ 11

จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าเมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองที่ได้มานั้นจะคล้ายกับการทดลองของ Santoyo *et al.* (2003) ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 ที่พีเอช 3.5 – 6.0 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด คือ พีเอช 4 โดยได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 3.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของที่เราทำการทดลองจะได้ค่ามากกว่าเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อคนละตัวกัน โดยที่ปกติแล้วเชื้อราจะให้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากกว่าเชื้อแบคทีเรียจึงทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของที่เราทำการทดลองมีค่ามากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 5 6 และ 7

4.5 ผลของการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชเริ่มต้น 4 ทำการเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 81.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอช 2.12

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในถังหมักจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ 1.71 เท่า เนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักนั้นมีการควบคุมการใส่สารป้องกันการเกิดฟอง ควบคุมอุณหภูมิ และมีการให้อากาศอย่างทั่วถึงเนื่องจากมีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์ในการควบคุมจึงทำให้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักมีความคงตัวมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ ทำให้เชื้ออยู่ในสภาวะที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้เหมาะสมกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และใช้ ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

พีเอช	วันที่	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
4	1	3.28	1.58
	2	2.28	36.50
	3	2.21	47.64
	4	2.20	46.83
	5	2.05	42.32
5	1	5.06	1.38
	2	2.68	33.65
	3	2.42	47.21
	4	2.38	45.78
	5	2.36	39.89
6	1	5.68	1.19
	2	2.39	31.79
	3	2.32	46.72
	4	2.28	43.65
	5	2.28	37.87
7	1	6.89	1.14
	2	3.72	39.19
	3	2.50	46.71
	4	2.46	42.83
	5	2.39	36.06

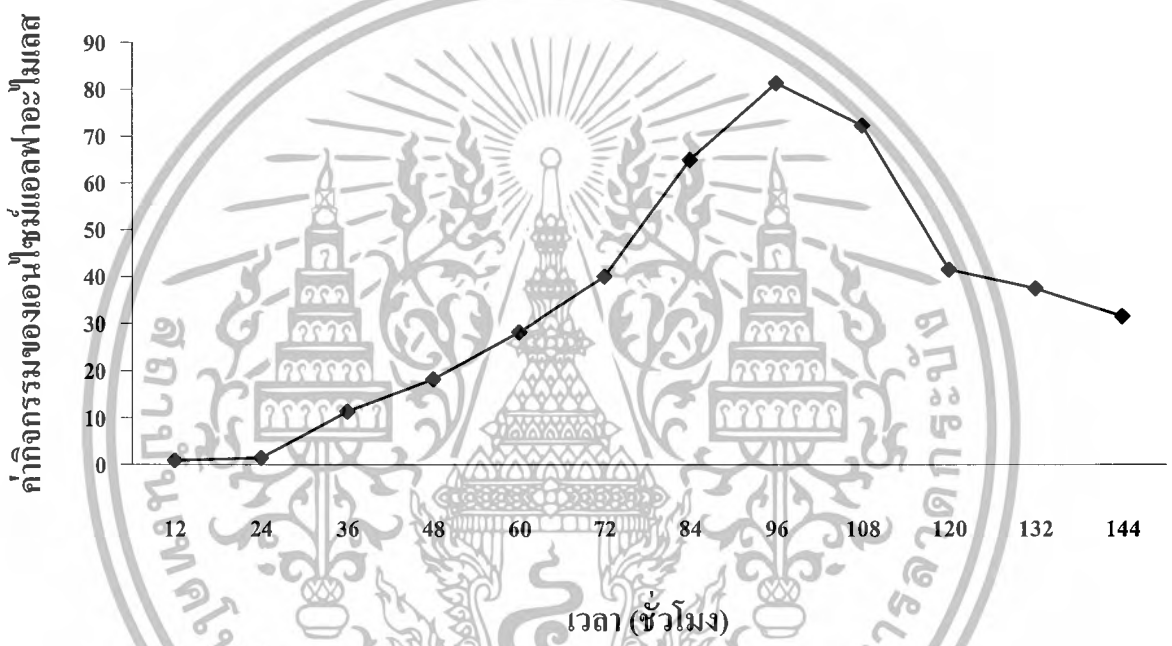
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบพีเอชเริ่มต้นของอาหารในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

พีเอชเริ่มต้น	4	5	6	7
กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	47.64[a]	47.21[b]	46.72[c]	46.71[d]

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 13 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ ใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตรและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ผลของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ใน อาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ ใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
12	3.78	0.93
24	3.35	1.44
36	2.95	11.34
48	2.22	18.22
60	2.19	28.17
72	2.15	40.05
84	2.13	65.01
96	2.12	81.35
108	2.10	72.37
120	2.08	41.57
132	2.05	37.50
144	2.01	31.58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Czapek ดัดแปลง สภาวะที่ทำการทดลอง คือ ปริมาณของแหล่งคาร์บอนโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท และยีสต์สกัด ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 1 3 5 และ 7 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 4 5 6 และ 7 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสด้วยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid

จากการศึกษาถึงปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพบว่าอาหาร Czapek ดัดแปลงที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 35.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เมื่อเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร Czapek ดัดแปลงโดยใช้ แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 46.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะลดลง

เมื่อทำการทดลองปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหาร Czapek ดัดแปลงโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเท่ากับ 4 ซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 47.64 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 3 วัน

ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 คือ ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) 3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.5 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.01 กรัมต่อลิตร และค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ในถังหมักโดยใช้อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 จะสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ 81.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง

ข้อเสนอแนะ

1. เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงๆ จะมีปัญหาว่าอาหารหนืดมากเมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (batch) ถ้าทำการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ (fed-batch) จะสามารถแก้ปัญหาได้โดยค่อยๆ เติมแป้งไปที่ละส่วนจะช่วยลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

2. ควรหาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นร่วมกับแป้งมันสำปะหลังในการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง เพื่อที่จะได้ลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

ปิยนุช คชภักดี. 2524. การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากรา *Aspergillus oryzae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

ปรามสยบ ภูมิพาณิชย์ สุพีร์ สาณะเสน และอนุวัฒน์ วัดวงค์. 2543. การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

Aiyer, P.V.D. 2004. "Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27." African J. Biotechnol. 3(10) : 519-522.

Ajayi, A.O. and Fagade, O.E. 2003. "Utilization of corn starch as substrate for β-amylase by *Bacillus* spp." African J. Biomedical Research. 6(1) : 37-42.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. 1992. "Introductory Micrology." John Wiley & Sons.

Babu, K.R. and Satyanarayana, T. 1995. "alpha;-Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation." Process Biochem. 30(4) : 305-309.

Bajpai, P., Gera, R.K. and Bajpai, P.K. 1992. "Optimization studies for the production of α-amylase using cheese whey medium." Enzyme Microb. Technol. 14(8) : 679-683.

Bajpai, P., Verma, N., Neer, J. And Bajpai, P.K. 1991. "Utilization of cheese whey for production of α-amylase enzyme." J. Biotechnol. 18(3) : 265-270.

Baysal, Z., Uyar, F. and Aytekin, C. 2003. "Solid state fermentation for production of α-amylase by thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water." Process Biochem. 38(12) :1665-1668.

Bermfeld, P. 1955. "Amylase alpha and beta Method in Enzymology." New York :Academic press, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beynum, van G.M.A. and Roels, J.A. 1985. "Starch Conversion Technology." New York : Marrod Dekker, Inc.

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

Carlsen, M., Sphor, A.B., Nielsen, J. and Villadsen, J., 1995. "Morphology and physiology of an amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations". Biotechnol. Bioengineering In Press.

Crabb, WD. and Mitchinson, C. 1997. "Enzymes involved in the processing of starch to sugars." Trends Biotechnol. 15 : 349-352.

Ferreyra, R., Lorda, G. and Balatti, A. 1998. "Production of α-amylase in acid cheese whey culture media with automatic pH control." Rev. Microbial. 29(4).

Forgarty, WM. 1983. Microbial amylases. "*In* Microbial Enzyme and Biotechnology." Appl. Sci. Publishers, London. 91-92.

Fossi, B.T., Tavea, F. and ndjouenkeu, R. 2005. "Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils." African J. Biotechnol. 4(1) : 14-18.

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

Goto, C.E., Barbosa, E.P., Kistner, L.C.L, Moreira, F.G.Lenartovicz, L. And Peralta, R.M. 1998. "Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing alpha;-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate." FEMS Microbiol. Let. 167(2) : 139-143.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, VK. and Chaunhan, B. 2003. "Microbial α-amylase : a biotechnologcal perspective." Process Biochem. 38 : 1599-1616.

Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J. and Qadeer, M.A. 2002. "Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*." J. Biol. Sci. 2(2) : 73-75.

Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J. and Qadeer, M.A. 2003. "Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium." Bioresource Technol. 87 : 57-61

Hernández, M.S., Rodríguez, M., Guerra, N.P. and Rosés, R.P. 2005. "Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries." J. Food Engineering In Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kekos, D. and Macris, B.J. 1987. "Effect of tannins on growth and amylase production by *Calvatia gigantea*." Enzyme Microb. Technol. 9(2) : 94-96.

Lam, S. and Malikin, G. 1994. "Analytical Application of Immobilized Enzyme Reaction." Cornwall : T.J. Press (Padstow) Ltd., Padstow.

Lodato, P.B., Forchiassin, F. and Segovia de Huergo, M.B. 1997. "Amylase production by *Aureobasidium pullulans* in liquid and solid media." Rev. Argent. Microbiol. 29(3) : 115-121.

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

Manjunath, P., Shenoy, BC. and Zao, MR. 1983. Review : fungal glucoamylase. J. Appl. Biochem. 5 : 235-260.

Miller, G.L., 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Anal. Chem. 31 : 426-429.

Milner, J.A., Martin, D.J. and Smith, A. 1996. "Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*." Enzyme Microb. Technol. 18(7) : 507-512.

Tanyildizi, M.S., Özer, D. and Elibol, M. 2005. "Optimization of α-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology." Process Biochem. 40 : 2291-2296

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

Nigam, P. and Singh, D. 1995. "Enzyme and microbial system involved in starch processing." Enzyme Microb. Technol. 17 : 770-778.

Okolo, B.N., Ezeogu, L.I. and Mba, C.N. 1995. "Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources." J. Sci. Food Agri. 69 : 109-115.

Pederson, H. and Nielsen, J. 2000. "The influence of nitrogen sources on the alpha amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures." Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(3) : 278-281.

Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Francis, F., Nagy, V., Szakacs, G. and Pandey, A. 2004. "Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α-amylase." Bioresource Technol. 93 : 169-174.

Sandhu, D.K., Vilkhu, K.S. and Soni, S.K. 1987. "Production of α-amylase by *Saccharomyces fibuligera* (Syn. *Endomycopsis fibuligera*)." J. Ferment. Technol. 65(4) : 387-394.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Santos, E.O. and Martins, M.L.L. 2003. "Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp." Braz. Arch. Biol. Technol. 46(1).

Santoyo, M.C., Loiseau,G., Rodriguez Sanoja, R. and Guyot, J.P. 2003. "Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and α-amylase production at pH 4.0." International J. Food Microbiol. 80 : 77-87.

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

Shatta, A.M., El-Hamahmy, A.F., Ahmed, F.H., Ibrahim, M.M.K. and Arafa, M.A.I. 1990. "The influence of certain nutritional and environmental factors on the production of amylase enzyme by *Streptomyces aureofaciens* 77." J. Islamic Academy of Sciences. 3(2) : 134-138.

Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K. and Soni, S.K. 2005. "Production of a thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production." Process Biochem. 40(2) : 525-534.

Souza, D.F. and Peralta, R.M. 2001. "Production of amylases by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations." J. Microbial Biotechnol., Maringa. 23(2) : 599-602.

Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1995. "Principles of fermentation technology." Oxford : Elsevier Science.

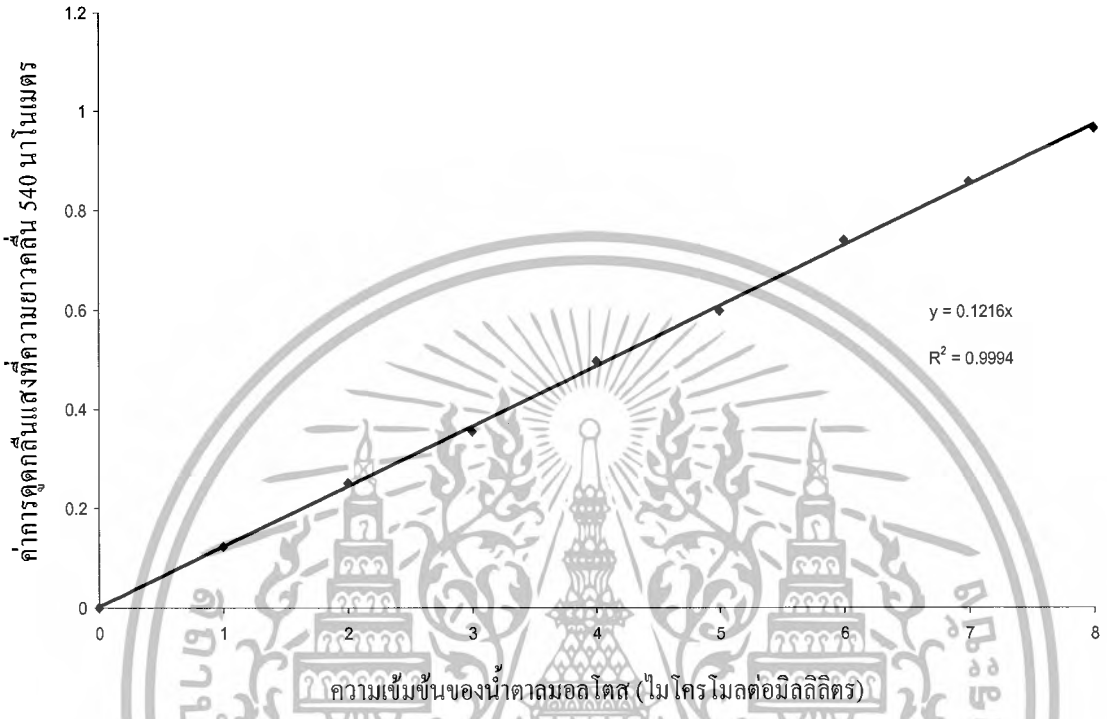
Townsend, G.E. and A.A. Lindgren. 1953. "Viable Yeast Count." Cytologia. 18 : 183.

Uguru, G.C., Akinyanju, J.A. and Sani, A. 1997. "The use of sorghum for thermostable amylase production from *Thermoactinomyces thalpophilus*." Let. Appl. Microbiol. 25(1) :13.

Uhlig, H. 1998. "Industrial enzymes and their application." New York : John Wiley & Sons, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

วิธีการวิเคราะห์

การหากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (Bernfe1d, 1955)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1 % soluble starch)

ละลายแป้ง 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลายปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร

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)$_2$ COONa.4H$_2$O) 300.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0โมลาร์ 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

วิธีการ

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

2 เติมน้ำแป้งที่อุ่นที่ 50 องศาเซลเซียส ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเอนไซม์หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ผสมการละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. หยุดปฏิกริยาของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. นำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน

6. ทำหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์ต้ม 5 นาที ก่อนใส่น้ำแป้งและบัฟเฟอร์ ทำแบลงค์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

7. ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส นำสารละลายน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 และ 1,000 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4 - 5 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส

8. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

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

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังและให้น้ำตาลรีดิวส์เทียบเท่าน้ำตาลมอลโตสมอลโตส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

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 และตรงกลางของช่องใหญ่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า
4. เมื่อนับสปอร์ครบ 5 ช่องแล้วให้นำสปอร์ทั้ง 5 ช่องมารวมกันเพื่อคำนวณตามสูตร

$$\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมดทั้งหมด} = 5A \times 10^4 \times \text{ความเจือจาง}$$

กำหนดให้ A คือ จำนวนสปอร์ที่นับได้จาก 5 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

สูตรอาหารและสารละลายบัฟเฟอร์

1. สูตรอาหาร PDA, Potato Dextrose Agar ประกอบด้วย

มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
เด็กโตรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม

หั่นมันฝรั่งเป็นก้อนขนาด 1 ลูกบาสก์เซนติเมตร หนัก 200 กรัม ต้มให้เดือดจนก้อนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเอาแต่น้ำ เติมน้ำตาลเด็กโตรส วุ้น และน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายบัฟเฟอร์ (Gomori, 1955)

2.1 Citrate-Phosphate Buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 5.0

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

B: 0.1 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 มิลลิลิตร (ของสารละลาย A) กับ Y มิลลิลิตร (ของสารละลาย B) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

X (มิลลิลิตร)	Y (มิลลิลิตร)	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