สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

PRODUCTION OF GLUCOAMYLASE FROM CASSAVA WASTES BY *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

T060240

กาญจนา ทวีการ

KANCHANA TAWEEKARN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 60240
วัน,เดือน,ปี 27 มิ.ย. 2549

.b 11584816
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2548

ISBN 974-15-1651-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF GLUCOAMYLASE FROM CASSAVA WASTES BY *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

KANCHANA TAWEEKARN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2005

ISBN 974-15-1651-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2005

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584
นักศึกษา	นางสาวกาญจนา ทวีการ
รหัสประจำตัว	45064566
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2548
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ร่วมกับการเติมสารละลายเกลือแร่ และยูเรียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณสูงสุด จากนั้นทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าสภาวะที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมยูเรียร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับปริมาณความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 ด้วยสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วน 0.5 : 5 (ปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และน้ำกลั่น ในสับสเตรทกากมันสำปะหลังที่ไม่ต้องทำการคัดขนาด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด ในวันที่ 5 ของการหมัก โดยการผลิตเอนไซม์จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญของเชื้อยีสต์อยู่ในระยะคงที่ มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 229.14 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เอนไซม์ที่ผลิตได้นำมาศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 60 และสารละลายตะกอนที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยกรองผ่านเยื่อกรอง (amicon regenerated cellulose ultrafiltration membrane) ที่คัดขนาดตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ขนาด 30,000 ดาลตัน พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 1.40 เท่า และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 39.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.5 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 3.0-7.5 และความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Production of Glucoamylase from Cassava Wastes by *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584
Student	Miss Kanchana Taweekarn
Student ID	45064566
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2005
Thesis Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

The study on formulation of medium for the production of glucoamylase in solid culture from *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 under solid state fermentation, the highest of amount glucoamylase was achieved by employing cassava wastes as substrate supplemented with mineral salt solution and urea as nitrogen sources. The condition for produced glucoamylase was optimized. The optimum condition are 10% (v/w) inoculum size, 0.1% (w/w) urea (as nitrogen source) and 70% initial moisture content of solid medium was adjusted by mineral salt solution 0.5 : 5 (v/w) ratio of mineral salt solution to weight of cassava wastes and distilled water in cassava wastes as substrate which mixed particle sizes and incubated at 30 °C, it showed the highest glucoamylase activity at 5 days of fermentation. The glucoamylase production was coupled with the growth of *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 and became maximal in the stationary phase of growth. The maximum enzyme activity under optimum conditions was 229.14 unit/g of cassava wastes. A studied on some propertied of glucoamylase by precipitating with 60% saturated ammoniumsulfate and precipitates was through a amicon regenerated cellulose ultrafiltration membrane molecular weight cut off 30,000 dalton by ultrafiltration. The enzyme was purified up to 1.40 fold of initial activity. The specific activity of glucoamylase was 39.60 unit/mg protein. The optimum pH and temperature of this enzyme were 5.5 and 50 °C respectively. The enzyme was stable in a pH range of 3.0-7.5 and its stability rapidly decreased at higher temperature.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มาลินี ตันติยาภรณ์ ประธานคณะกรรมการผู้ช่วยศาสตราจารย์ลินจง สุขลำภู ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา รองศาสตราจารย์อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา และรองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คอยแนะนำ และตรวจทานแก้ไขจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความอนุเคราะห์ของท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำสั่งสอน ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาที่ดีมาตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องที่คอยให้กำลังใจ และกำลังทรัพย์เพื่อการศึกษามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ และนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในทุกๆ เรื่อง

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโททุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กาญจนา ทวีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญรูป.....XI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตการวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 มันสำปะหลัง.....4

2.2 ความสำคัญของมันสำปะหลัง.....4

2.3 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง.....5

2.4 ความสำคัญของแป้ง.....6

2.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง.....7

2.6 กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์.....12

2.7 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....16

2.8 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....20

2.9 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....24

2.10 อิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์.....27

2.11 การนำเอนไซม์อะไมเลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม.....29

2.12 ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger* 30

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....33

3.1 อุปกรณ์การทดลอง.....33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....33

3.3 วัตถุดิบ.....34

3.4 จุลินทรีย์.....35

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง.....35

3.6 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 36

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 36

3.7.1 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....36

3.7.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....37

3.7.3 การศึกษาหาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....38

3.7.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....38

3.7.5 การศึกษาหาขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....39

3.7.6 การศึกษาหาอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....40

3.7.7 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....40

3.7.8 การศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....41

3.8 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....42

3.9 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....42

3.9.1 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....42

3.9.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....43

3.9.4 การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....43

3.9.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....43

3.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ....44

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์....45

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง....45

4.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584....46

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584....49

4.3.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....49

4.3.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....51

4.3.3 ผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....56

4.3.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....58

4.3.5 ผลของขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....61

4.3.6 ผลของอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....63

4.3.7 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....67

4.4 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....70

4.5 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....71

4.5.1 ผลการเตรียมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....71

4.5.2 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....74

4.5.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....75

4.5.4 ผลการศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....77

4.5.5 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....78

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและเสนอแนะ.....80

บรรณานุกรม.....82

ภาคผนวก ก.....88

ภาคผนวก ข.....91

ภาคผนวก ค.....104

ภาคผนวก ง.....112

ประวัติผู้เขียน.....113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงองค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง.....5

2.2 แสดงสมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน.....7

2.3 กิจกรรมของอะไมโลไลติกเอนไซม์จากเชื้อยีสต์และรา.....8

2.4 แสดงลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์.....17

2.5 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการหมักในอาหารเหลวและอาหารแข็ง.....20

4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง.....45

4.2 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....48

4.3 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....51

4.4 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 53

4.5 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....55

4.6 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....58

4.7 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....60

4.8 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....62

4.9 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมัน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....64

4.10 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....66

4.11 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.12 แสดงผลการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน.....72

ค.1 แสดงปริมาณของร้อยละความชื้นของกากมันสำปะหลังตามอัตราส่วนของน้ำหนักกากมันสำปะหลังต่อปริมาตรน้ำกลั่นตามวิธีของ (A.O.A.C., 1990).....104

ค.2 ผลของการเปรียบเทียบทางสถิติขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....105

ค.3 แสดงผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....105

ค.4 แสดงผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....105

ค.5 แสดงผลของปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....106

ค.6 แสดงผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....106

ค.7 แสดงผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....106

ค.8 แสดงผลของขนาดกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....107

ค.9 แสดงผลของอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....107

ค.10 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....107

ค.11 แสดงผลชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....108

ค.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....108

ค.13 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....109

ค.14 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....109

ค.15 ผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....110

ค.16 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584.....110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค.17 ผลของการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์
Saccharomycopsis fibuligera JCM 3584 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างหยาบ.....111
ค.18 ผลของการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์
Saccharomycopsis fibuligera JCM 3584 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละเอียด.....111
ง.1 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว) ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน.....112

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง....8

2.2 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส....9

2.3 การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส....10

2.4 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส....10

2.5 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....11

2.6 การทำงานของเอนไซม์พลูลูลาเนส....12

2.7 กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาล....13

2.8 กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสชนิดต่างๆ....14

2.9 แสดงลักษณะของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*....31

4.1 แสดงผลของการเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....47

4.2 แสดงผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....49

4.3 แสดงผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....52

4.4 แสดงผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....54

4.5 แสดงผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....56

4.6 แสดงผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.7 แสดงผลของขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง 61

4.8 แสดงผลของอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง 63

4.9 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง 65

4.10 แสดงผลของชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง 67

4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 70

4.12 แสดงผลของการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....74

4.13 แสดงผลของการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....76

4.14 แสดงผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....77

4.15 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....79

ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส.....94

ข.2 แสดงกราฟมาตรฐานของอัลบูมิน.....96

ข.3 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Nelson-Somogyi.....101

ข.4 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมดตามวิธี Phenol-sulphuric 103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศที่ทำการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังมากที่สุดในโลก ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญคือแป้งมันสำปะหลัง ในแต่ละปีประเทศไทยผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ประมาณ 2 ล้านตัน ใช้หัวมันสดประมาณ 9-10 ล้านตัน โดยใช้ในประเทศประมาณร้อยละ 35 และอีกร้อยละ 65 จะส่งออกขายต่างประเทศ อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังสามารถทำรายได้ให้กับประเทศมีมูลค่ากว่า 10,000 ล้านบาทต่อปี (สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2543) ซึ่งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังจะมีกากมันสำปะหลังที่เป็นผลพลอยได้ออกมาด้วยประมาณร้อยละ 10-15 ในการผลิตแป้งมันสำปะหลังในระดับโรงงานอุตสาหกรรมจากการใช้หัวมันสด 10 ล้านตัน จะมีกากมันเป็นผลพลอยได้ออกมาอย่างน้อย 1 ล้านตัน (Srirot *et. al.*, 2000) กากมันที่ได้นี้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นทุกปี เนื่องจากไม่มีวิธีการนำไปใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ โดยปกติจะนำกากมันไปทำแห้ง แล้วนำไปทำอาหารสัตว์มูลค่าต่ำ หรือนำไปทำปุ๋ย ซึ่งถ้าหากไม่สามารถนำกากมันเหล่านี้ไปทำแห้งได้ทันหรือนำออกจากโรงงานได้ทั้งหมดก็จะก่อให้เกิดการเน่าเสีย เกิดกลิ่นเหม็นขึ้นเนื่องจากกากมันมีความชื้นสูง จึงควรมีการพัฒนาการใช้ประโยชน์กากมันนี้ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกากมันนี้พบว่ายังมีปริมาณแป้งเหลืออยู่ในกากมันสูงถึงปริมาณร้อยละ 50-60 ในน้ำหนักเปียก (นิทรรศการมันสำปะหลังและการแปรรูปผลิตภัณฑ์. 2540 ; Srirot *et. al.*, 2000) ตัวอย่างการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากกากมันนี้เช่น การใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพทำการสกัดแป้งออกจากกากมัน ทำให้มีแป้งกลับเข้าสู่ระบบการผลิตมากขึ้น การพัฒนาการใช้ประโยชน์อีกทางหนึ่งที่น่าสนใจคือ การใช้กากมันเหล่านี้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้งเช่น เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เนื่องจากองค์ประกอบของกากมันยังมีสารอาหารที่เหลืออยู่ในปริมาณมากพอสมควร จึงคาดว่าจะสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้ผลิตเอนไซม์ได้

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมที่มีการย่อยแป้งเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำขนมปัง อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรัป (glucose syrup) เพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ (Ellaiah *et. al.*, 2002) จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสส่วนใหญ่จะใช้เชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. แต่มีการศึกษาพบว่ามียีสต์บางสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เช่น *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ผลผลิตเอนไซม์ที่สูง นำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ และมีจำนวนผลพลอยได้ที่เป็นเอนไซม์ชนิดอื่นเช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) และเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ปริมาณน้อย (Futatsugi *et. al.*, 1993a)จากข้อดีเหล่านี้ทำให้มีแนวโน้มที่เป็นไปได้ในการนำยีสต์มาผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในทางการค้า

การทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการสนับสนุนให้มีการผลิตเอนไซม์ประเภทนี้ได้ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น และยังลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ลงอีกด้วย เนื่องจากใช้สับสเตรทกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งที่มีราคาถูกและมีปริมาณมาก จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลังอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

1.2.3 เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในกากมัน ได้แก่ ปริมาณแป้งด้วยวิธี A.O.A.C. (1957) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีของ Dubois *et. al.* (1956) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1994) ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl Method (A.O.A.C., 1980) ปริมาณความชื้นเริ่มต้นด้วยวิธี A.O.A.C. (1990) จากนั้นนำมาศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid) ของ Ramadas *et. al.* (1996) ต่อจากนั้นนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และคาร์บอน ปริมาณความชื้นเริ่มต้น ขนาดของกากมัน อัตราส่วนของเกลือแร่ อุณหภูมิ และชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แล้วทำการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากนั้นนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้โดยการนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน และศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งค่าความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิและพีเอช

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

1.4.2 ทราบถึงสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ที่ผลิตได้

1.4.3 เป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้ที่มีราคาถูก

1.4.4 เป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์

1.4.5 เป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีชื่อเรียกที่หลากหลาย ในภาษาอังกฤษเรียกมันสำปะหลังว่า Cassava ในทวีปอเมริกาใต้แถบประเทศบราซิล ปารากวัย อาร์เจนตินา เรียกว่า Madioca ขณะที่ประเทศในทวีปแอฟริกาที่ใช้ภาษาฝรั่งเศสเรียกว่า Manioc ส่วนประเทศที่ใช้ภาษาสเปนเรียกว่า Yuca สำหรับในทวีปเอเชียเรียกว่า Tapioca ในทางพฤกษศาสตร์มันสำปะหลังเป็นพืชในวงศ์ (Class) ใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledoneae) ตระกูล (Family) Euphobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz. มีแหล่งกำเนิดอยู่ที่เขตร้อนในอเมริกาใต้แถบประเทศกัวเตมาลา เม็กซิโก เปรู ฮอนดูรัส แพร่ขยายพันธ์มาสู่ประเทศในแถบเอเชียในคริสต์ศตวรรษที่ 17 เมื่อชาวสเปนนำพันธุ์จากประเทศเม็กซิโกมาปลูกในฟิลิปินส์ สำหรับในประเทศไทยคาดกันว่ามันสำปะหลังเข้ามาจากทางประเทศมาเลเซียเมื่อประมาณ พ.ศ. 2329 และขยายไปยังจังหวัดภาคตะวันออกแถบชลบุรี ระยองและจังหวัดใกล้เคียง เมื่อความต้องการของตลาดมีเพิ่มมากขึ้นจึงมีการขยายพื้นที่ปลูกมันไปยังจังหวัดอื่นๆ โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2542 ; กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546)

2.2 ความสำคัญของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชไร่ที่นิยมปลูกกันมากในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากมันสำปะหลังมีข้อได้เปรียบหากเปรียบเทียบกับพืชไร่ชนิดอื่นๆ คือ สามารถปลูกได้ในทุกสภาพดิน เป็นพืชที่มีความทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี การปลูกและการขยายพันธ์ทำได้ง่าย และมีต้นทุนการผลิตไม่สูงมากนักจัดได้ว่าเป็นพืชไร่ที่มีความเหมาะสมต่อเกษตรกรที่มีฐานะยากจนหรือมีทุนน้อยและยังชีพด้วยการผลิตพืชในพื้นที่ที่มีสภาพฝนแปรปรวนมีปัญหาความแห้งแล้ง และดินเลวซึ่งสภาพดังกล่าวไม่เอื้อต่อการปลูกพืชชนิดอื่นๆ ได้

จากรายงานปี 2542/43 ของสมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย รายงานว่าประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลัง ทั้งหมดประมาณ 7,663,386 ไร่ สามารถให้ผลผลิตหัวมันสดประมาณ 20,264,748 ตัน หัวมันสดประมาณร้อยละ 50 จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปมันเส้น มันอัดเม็ด และอีกประมาณร้อยละ 50 ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์แป้งมันสำปะหลัง ในปัจจุบันประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศที่ทำการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังมากที่สุดในโลก แป้งมันสำปะหลังเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศมากขึ้น ปัจจุบันมีการส่งออกกว่า 1 ล้านตันต่อปี ซึ่งในแต่ละปีประเทศไทยผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ล้านตัน โดยใช้หัวมันสดประมาณ 9-10 ล้านตัน โดยใช้ในประเทศประมาณร้อยละ 35 ส่งออกประมาณร้อยละ 65 อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังสามารถทำรายได้ให้กับประเทศมีมูลค่ากว่า 10,000 ล้านบาทต่อปี (สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2542)

2.3 ความสำคัญของกากมันสำปะหลัง

จากผลผลิตหัวมันสำปะหลังสดประมาณ 18 ล้านตันต่อปี หัวมันประมาณ 10 ล้านตันจะถูกนำมาแปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งในกระบวนการผลิตนั้นจะมีกากมันซึ่งเป็นผลพลอยได้ออกมาด้วยอย่างน้อย 1 ล้านตัน หรือประมาณร้อยละ 10-15 ขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้นในกากมัน องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ร้อยละน้ำหนักแห้ง	ร้อยละน้ำหนักเปียก
แป้ง	17.80 ± 1.24	68.89 ± 4.00
ความชื้น	72.00 ± 0.08	-
เถ้า	0.44 ± 0.00	1.70 ± 0.01
โปรตีน	0.40 ± 0.00	1.55 ± 0.03
เส้นใย	7.17 ± 0.06	27.75 ± 0.20
ไขมัน	0.03 ± 0.00	0.12 ± 0.01
พีเอช	4.99	4.99

ที่มา : Sriroth *et. al.* (2000)

กากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งในแต่ละปีจึงมีปริมาณมาก ส่วนใหญ่จะนำกากไปทำแห้งแล้วนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ที่มีมูลค่าต่ำหรือทำปุ๋ย การใช้ประโยชน์กากมันมีปัญหาเนื่องจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทยนั้นยังคงมีปริมาณแป้งที่เหลือในกากปริมาณมากถึงร้อยละ 50-60 ของน้ำหนักแห้ง และมีความชื้นสูงถึงร้อยละ 60-70 ปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้กระบวนการทำแห้งทำได้ยาก การที่ยังมีแป้งอยู่ทำให้เป็นปัญหาในการถ่ายเทความร้อนระหว่างการอบแห้ง เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงแป้งและน้ำจะยึดเกาะกันแน่น การให้ความร้อนจึงทำได้ยาก ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน ค่าใช้จ่ายและการทำแห้งไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร กากมันที่ทำแห้งไม่ดีจะเสื่อมเสียได้เร็วในสภาพแวดล้อมที่ร้อนชื้น ซึ่งจุลินทรีย์จะเพิ่มจำนวนได้เร็วบนสับสเตรทชนิดนี้เนื่องจากมีสารอาหารสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงได้มีการนำวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยลดอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม โดยสามารถสกัดแป้งออกจากกากมัน ทำให้มีแป้งกลับเข้าสู่กระบวนการผลิตแป้งหรือเป็นน้ำตาลได้มากขึ้น โดยการใช้เอนไซม์หลายๆ ชนิด การพัฒนาการใช้ประโยชน์กากมันนี้ ช่วยให้มีประสิทธิภาพการผลิตแป้งเพิ่มขึ้น เพิ่มมูลค่าของกากมัน และมีผลให้ราคาหัวมันสำปะหลังมีเสถียรภาพขึ้นด้วย (นิทรรศการมันสำปะหลังและการแปรรูปผลิตภัณฑ์, 2540; Sriroth *et. al.*, 2000)

2.4 ความสำคัญของแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชชั้นสูง พบในคลอโรพลาสต์ (ในใบ) และในส่วนที่พืชใช้เป็นแหล่งเก็บอาหาร เช่น เมล็ดและหัว เป็นแหล่งพลังงานจากพืชเพื่อให้พลังงานกับสัตว์และมนุษย์ แหล่งที่สำคัญเช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง หรือในพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง

คำว่า "แป้ง" ในการผลิตนั้น หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ มีสิ่งอื่นเจือปน เช่น โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ น้อยมาก ส่วนแป้งที่ผลิตโดยทั่วไปที่ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อยู่มากจะเรียกว่า ฟลาวร์ (flour) ตัวอย่างเช่น แป้งข้าวโพด แป้งข้าวสาลี ถ้ายังมีส่วนประกอบของโปรตีนสูง ก็จะจัดอยู่ในประเภทฟลาวร์ เรียกว่า corn flour wheat flour เช่นเดียวกันกับแป้งข้าวเจ้าที่ยังมีโปรตีนร้อยละ 7 ถึง 8 ก็เรียกว่า rice flour แต่เมื่อสิ่งเจือปนอันหมายถึงโปรตีน ไขมัน เกลือแร่อื่นๆ ถูกสกัดออกไป จนเหลือแป้งบริสุทธิ์เป็นส่วนใหญ่ จึงเรียกว่าเป็นแป้งสตาร์ช (starch) เช่น corn starch wheat starch เป็นต้น (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546)

แป้งเป็นแหล่งพลังงานสำหรับสิ่งมีชีวิตที่สามารถนำมาใช้ได้รวดเร็วและมีอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ เม็ดแป้ง (starch granules) มีลักษณะโมเลกุลเป็นก้อนผลึกยึดเกาะกันแน่น มีการเชื่อมพันธะภายในและภายนอกด้วยพันธะไฮโดรเจน เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์กลูโคสที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 2 ชนิดคือ อะไมโลส (amylose) เป็นโซ่สายตรง (ประกอบด้วย D-glucose เชื่อมต่อด้วย α-1,4 linkage) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) ที่มีกิ่ง (ประกอบด้วย D-glucose เชื่อมต่อด้วย α-1,4 linkage และมีโซ่กิ่งเพิ่มขึ้นโดยมี α-1,6 linkage เป็นตัวเชื่อม) อัตราส่วนอะไมโลส : อะไมโลเพกติน สามารถเปลี่ยนแปลงตามชนิดแป้งในธรรมชาติ แต่โดยปกติจะอยู่ในช่วง 1: 3 ถึง 1 :4 องค์ประกอบของแป้งโดยปกติในธรรมชาติจะประกอบโครงสร้างผลึกชนิดอื่นๆ เช่น เซลลูโลส (Bentley and Williams, 1996)

แป้งจะมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำเย็น และไม่ไวต่อปฏิกิริยาทางเคมีและเอนไซม์ จึงมีการนำแป้งมาทำการเจลาติไนซ์โดยการให้น้ำและความร้อนก่อน เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติการทำปฏิกิริยาทางเคมี หรือการนำไปเปลี่ยนแปลงโดยใช้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินแสดงดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงสมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน

คุณสมบัติ	อะไมโลส	อะไมโลเพกติน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	$\alpha - 1,4$	$\alpha - 1,4$ และ $\alpha - 1,6$
ขนาด	200 – 2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

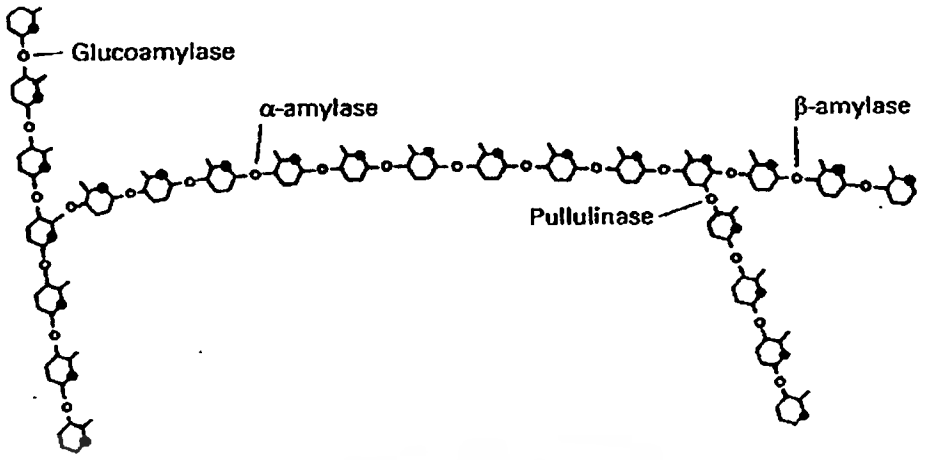
ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2546)

ถึงแม้ว่าบทบาทที่สำคัญของแป้งคือ ใช้เป็นแหล่งอาหารพลังงานสูงของมนุษย์ แต่จากคุณสมบัติเฉพาะของแป้งจึงได้มีการนำแป้งมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของอาหาร เช่น ทำให้เกิดเจล ควบคุมความคงตัวและเนื้อสัมผัสของอาหาร ผลิตเป็นสารเคลือบ (coating) สารยึดติด (adhesive) และน้ำเชื่อม (syrups) ที่มีความหวานแตกต่างกันในแต่ละชนิด น้ำตาล ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม นอกจากใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว ยังมีการนำแป้งมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมกาว เป็นต้น (Bentley and Williams, 1996)

2.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง

เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนในการทำเจลาติไนซ์ และทำให้กระบวนการเปลี่ยนรูปของแป้งหรือในกระบวนการหมักทำได้ง่ายขึ้น จึงนำเอนไซม์มาศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งดิบ โดยเรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า อะไมโลไลติกเอนไซม์ (amylolytic enzyme) โดยสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ เอนไซม์ย่อยภายใน เอนไซม์ย่อยภายนอก และเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง ดังแสดงในรูปที่ 1 มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตอะไมโลไลติกเอนไซม์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง

ที่มา : Wayman and Parekh (1990)

ตารางที่ 3 กิจกรรมของอะไมโลไลติกเอนไซม์จากเชื้อยีสต์และรา

	กิจกรรมของเอนไซม์		
	อะไมเลส	กลูโคอะไมเลส	ย่อยพันธะกิ่ง
S. diastaticus	-	+++	-
Endomycopsis fibuligera	++	+++	-
Pichia burtonii	++	++	+/-
Sch. occidentalis	++	+++	++
Sch. castelli	++	+++	-
Aspergillus oryzae	+++	+	-

หมายเหตุ *S.* = *Saccharomyces* ; *Sch.* = *Schwanniomyces*

+++ = กิจกรรมสูง ; ++ = กิจกรรมปานกลาง ;

\+ = กิจกรรมต่ำ ; - = ไม่มีกิจกรรม

ที่มา : Wayman and Parekh (1990)

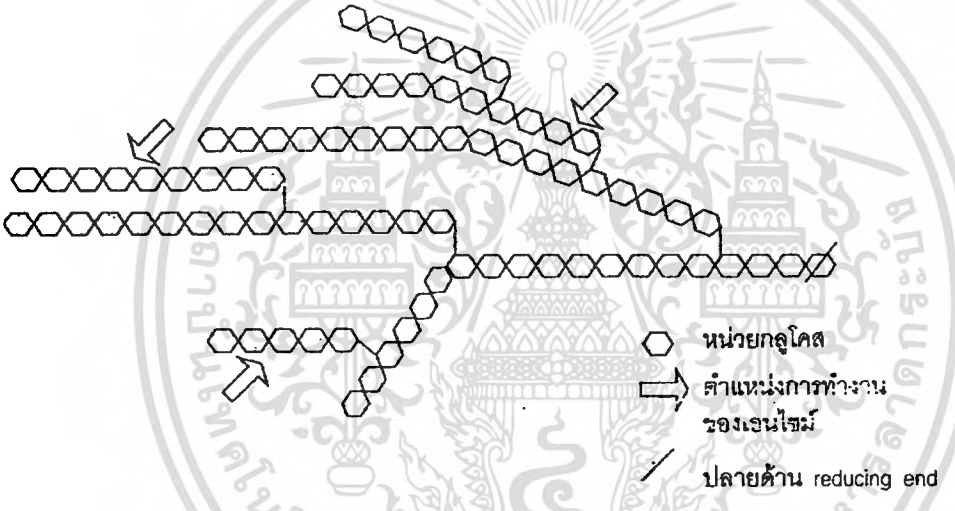
2.5.1 เอนไซม์ย่อยภายใน (Endoamylases)

เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา-1,4 ไกลโคซิดิก (α-1,4 glycosidic) ภายในโซ่ของอะไมโลส และอะไมโลเพกติน เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่

แอลฟาอะไมเลส (α-amylase ; endo-1,4- α-D-glucan glucohydrolase; EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานในโมเลกุลแป้ง โดยจะตัดพันธะแอลฟา-1,4 (α-1,4) ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จับอยู่เท่านั้น ไม่สามารถตัดพันธะแอลฟา-1,6 (α-1,6) ได้ ลักษณะการทำงานเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสุ่มตัดภายใน ดังแสดงในรูปที่ 2 เอนไซม์มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน การทำงานของเอนไซม์ต้องการแคลเซียม (Ca^{2+}) ร่วมทำกิจกรรม เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5.5-9 และที่อุณหภูมิห้องถึง 115 องศาเซลเซียล สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger Aspergillus oryzae* แบคทีเรีย เช่น *Bacillus licheniformis Bacillus subtilis* (Pandey *et. al.*, 2000) ในทางอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะเอนไซม์จากแบคทีเรียซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อย ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้ มอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose) ถ้าไม่สมบูรณ์เนื่องจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6ไกลโคซิดิก (α-1,6 glycosidic linkage) ที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ จะได้มอลโทส กลูโคส และแอลฟา-ลิมิตเดกซ์ทริน (α-limit dextrins) สายสั้นๆ ที่ละลายน้ำได้ด้วย (กล้าณรงค์ และเกื้อกลู, 2546)



รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

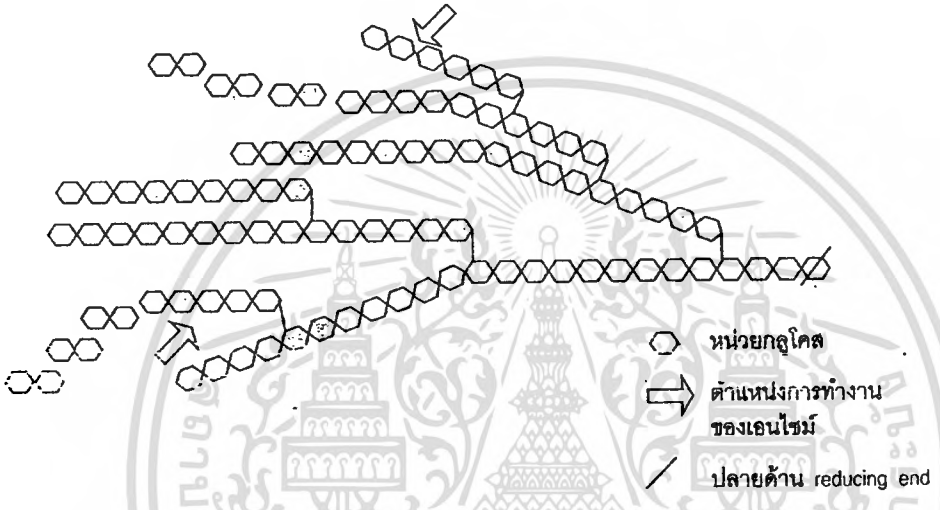
2.5.2 เอนไซม์ย่อยภายนอก (Exoamylases)

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งจาก non-reducing end เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่

2.5.2.1 เอนไซม์เบต้าอะไมเลส (β-amylase ; exo-1,4- α-D-glucan maltohydrolase ; EC 3.2.1.2) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกโมเลกุลของแป้ง แล้วค่อยตัดจากนอกเข้ามาใน โดยเริ่มจากปลายของอะไมโลสหรืออะไมโลเพกทิน (ปลายด้าน non-reducing end) เอนไซม์จะตัดพันธะแอลฟา-1,4 ของโมเลกุลกลูโคสเป็นคู่ๆ ผลที่ได้จะเป็นน้ำตาลมอลโทส ดังแสดงในรูปที่ 3 แต่เมื่อปฏิกิริยาเข้าใกล้จุดที่เป็นกิ่งก้านหรือพันธะแอลฟา-1,6 ของอะไมโลเพกทิน เอนไซม์จะหยุดกิจกรรม ทำให้เหลือแอลฟา-ลิมิตเดกซ์ทริน (α-limit dextrins) ซึ่งเป็นโมเลกุลใหญ่ๆ ไว้มาก

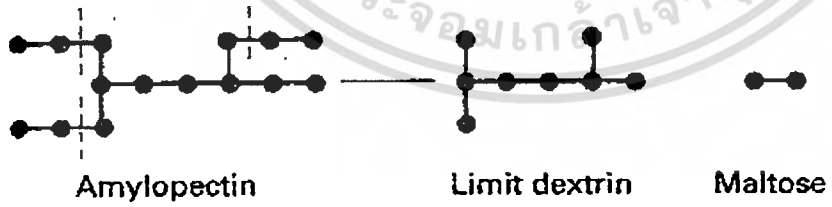
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังแสดงในรูปที่ 4 เอนไซม์เบต้าอะไมเลสต้องการแคลเซียม (Ca^{2+}) ในการทำกิจกรรม เบต้าอะไมเลสพบได้ในพืชชั้นสูง เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และพบได้ในถั่ว นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น *Bacillus cereus* *Bacillus megaterium* เอนไซม์จากพืชมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 125-150 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 4-9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (กล้าณรงค์ และเกื้อกลู, 2546 ; Pandey *et. al.*, 2000)



รูปที่ 3 การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

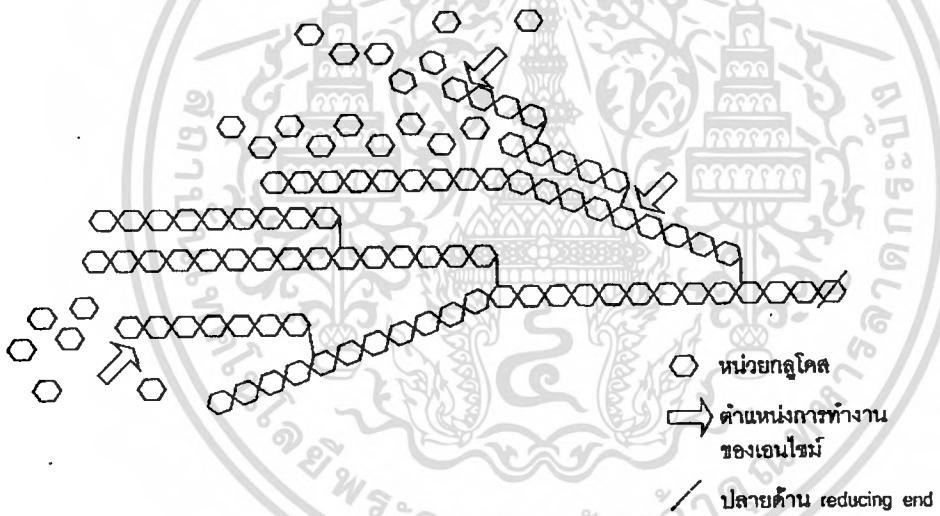


รูปที่ 4 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส

ที่มา : Bentley and Williams (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase ; exo-1,4- α-D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งอย่างสมบูรณ์จากทางด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ (non-reducing end) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะตัดพันธะที่จับกันของน้ำตาลกลูโคสได้ทั้งพันธะแอลฟา-1,4 และพันธะกิ่งแอลฟา-1,6 ได้ทีละหน่วยกลูโคส โดยการตัดพันธะกิ่งจะมีอัตราที่ช้ากว่าการตัดพันธะแอลฟา-1,4 แสดงการทำงานดังรูปที่ 5 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor) ในการทำกิจกรรม จากการย่อยทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสโดยไม่มีมอลโทส และแอลฟา-ลิมิตเดกซ์ทริน ปนมาด้วย จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้พวกเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus awamori Rhizopus oryzae* พวกแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus stearothermophillus Clostridium* sp. และพวกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น *Endomycopsis fibuligera Endomycopsis capsularis* (Pandey *et. al.*, 2000) เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-110 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 3.5-5.0 อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส (กล้าณรงค์ และเกื้อกลู, 2546)



รูปที่ 5 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

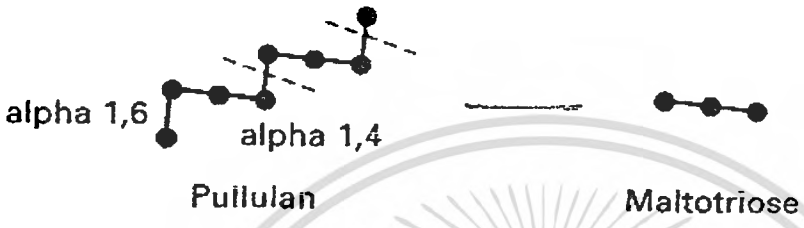
ที่มา : Bruinenberg (1996)

2.5.3 เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (Debranching enzymes)

2.5.3.1 เอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase ; EC 3.2.1.68 ; glucogen-6-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยจุดกิ่งก้านของไกลโคเจนและอะไมโลเพกติน (amylopectin) ได้ดี และไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor) ในการทำกิจกรรม สามารถดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอช 3-4 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้แยกได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas amyloderamosa*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.2 เอนไซม์พลูลูลาเนส (pullulanases ; EC 3.2.1.41 ; glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะแอลฟา-1,6 ของพลูลูแลน และอะไมโลเพกติน แต่การทำกิจกรรมไม่สมบูรณ์เท่ากับการย่อยโดยไอโซอะไมเลส และทำกิจกรรมกับ ไกลโคเจนได้ยาก สามารถย่อยได้สายกลูโคสที่มีความยาว 2-3 หน่วย ไม่สามารถย่อยจนได้กลูโคส 1 หน่วย แสดงดังรูปที่ 6 เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในพืช สัตว์ และแบคทีเรีย เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 4.5-5.5 อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546)



รูปที่ 6 การทำงานของเอนไซม์พลูลูลาเนส

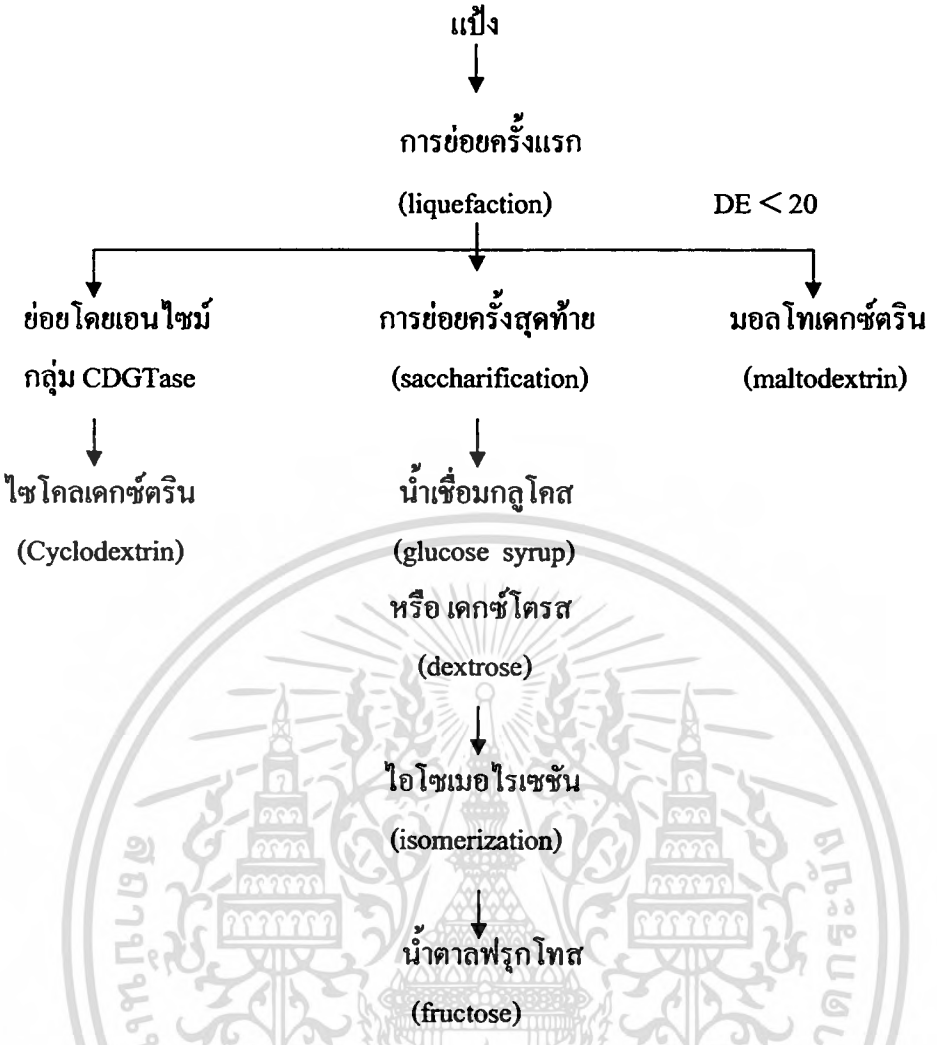
ที่มา : Bentley and Williams (1996)

ข้อแตกต่างระหว่างเอนไซม์พลูลูลาเนสและเอนไซม์ไอโซอะไมเลสคือ เอนไซม์พลูลูลาเนสสามารถย่อยสลายพลูลูเลน (pullulan) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีหน่วยของมอลโตไตรโอส (maltotriose) ซ้ำๆ กันเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 โดยเอนไซม์พลูลูลาเนสจะย่อยพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก (α-1,6 glycosidic) ในพลูลูเลนและอะไมโลเพกติน (amylopectin) ส่วนเอนไซม์ไอโซอะไมเลสสามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6 ในอะไมโลเพกตินได้เท่านั้น เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถย่อยพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก ได้จึงได้ผลิตภัณฑ์เป็นสายพอลิเมอร์ที่เป็นสายตรงยาว (van der Maarel *et. al.*, 2002)

2.6 กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์

ส่วนใหญ่กระบวนการแปรรูปแป้งจะเป็นการย่อยแป้งเพื่อผลิตกลูโคส (glucose) ต่อมามีการผลิตเป็นผลึกเดกซ์โทรส (crystalline dextrose) น้ำเชื่อมเดกซ์โทรส (dextrose syrups) และน้ำเชื่อมฟรุกโทส (high-fructose corn syrups ; HFCS) นอกจากนี้กลูโคสยังนำไปหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อื่นด้วยเช่น เอทานอล กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาลแสดงดังรูปที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

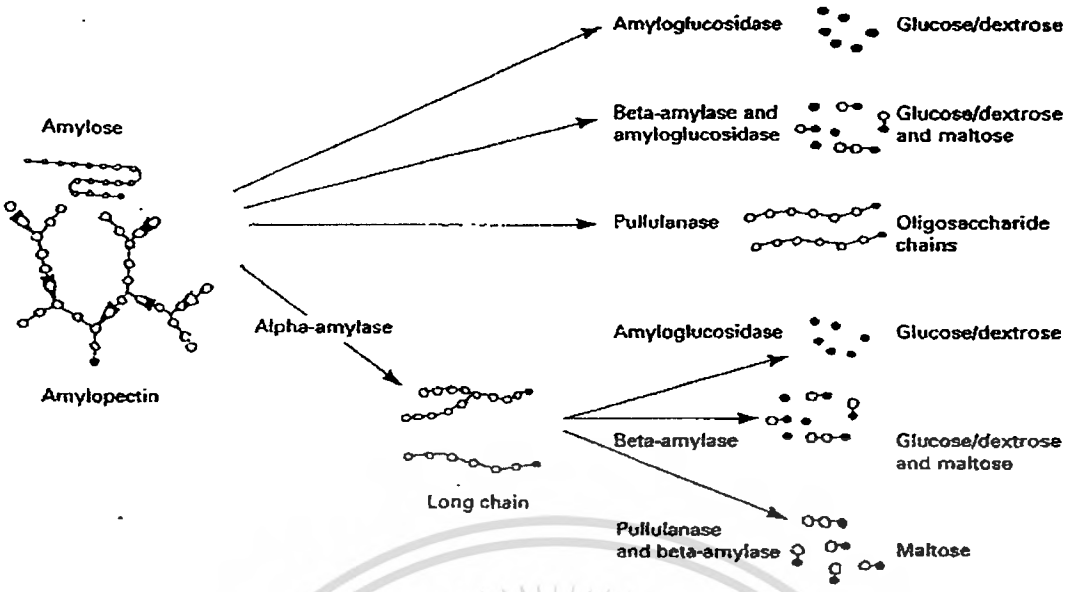


รูปที่ 7 กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาล

ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกลู (2546)

กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์จะประกอบด้วยเอนไซม์ 3-4 กลุ่ม คือ เอนไซม์ย่อยภายใน (endoamylase) เอนไซม์ย่อยภายนอก (exoamylase) เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (debranching amylase) และไอโซเมอเรส (isomerases) ดังรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสชนิดต่างๆ

ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอนไซม์แต่ละชนิดที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาลจะให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายแตกต่างกัน ดังนี้

ชนิดของเอนไซม์		ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้
เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	→	มอลโทเดกทรินซ์ (maltodextrins)
เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	→	กลูโคส (เดกซ์โตรส)
เอนไซม์เบต้าอะไมเลส	→	มอลโทส (maltose)
เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส	→	ฟรุกโทส (fructose)

(Godfrey and West, 1996)

2.6.1 การย่อยครั้งแรก : การทำให้ใส (Liquefaction)

จุดมุ่งหมายของการย่อยแป้งครั้งแรกเป็นกระบวนการลดความหนืดของแป้ง ซึ่งในการย่อยแป้งเพื่อให้ได้กลูโคสจะต้องมีขั้นตอนที่ทำให้น้ำแป้งสุก โดยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 140-155 องศาเซลเซียส จะเกิดเจลอย่างสมบูรณ์ พร้อมกับมีการย่อยสลายบางส่วน ถ้าในขั้นตอนนี้ใช้เอนไซม์แทนการเพิ่มอุณหภูมิก็จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ (ปราณี, 2543) เอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการทำให้น้ำแป้งเป็นของเหลวที่มีความหนืดน้อย (liquefaction) ซึ่งเป็นการย่อยครั้งแรกของกระบวนการย่อยสลายแป้งควรเป็นเอนไซม์ประเภท เอนโดเอนไซม์ (endo-enzyme) คือทำงานหรือมีกิจกรรมภายในโมเลกุลของแป้ง เพื่อที่จะทำให้แป้งถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลขนาดย่อมๆ หรือเล็กๆ เท่าๆ กันในเวลาสั้นกว่าเอนไซม์ย่อยภายนอก (exo-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

enzyme) เป็นของเหลวที่ค่อนข้างสมบูรณ์และมีความหนืดต่ำ มีค่า DE (dextrose equivalent) ต่ำกว่า 20 ทำให้โอกาสที่แป้งจะจับตัวกันเป็นไปได้ต่ำ เอนไซม์ในกลุ่มนี้คือแอลฟาอะไมเลส (α-amylase) (กล้าณรงค์ และเกื้อกลู, 2546) โดยจะย่อยพันธะแอลฟา-1,4 ไกลโคซิดิก (α-1,4 glycosidic) ภายในโมเลกุลแป้งแบบสุ่ม ผลผลิตส่วนใหญ่จะเป็นมอลโตเดกซ์ทริน (maltodextrins) สั้นๆ เนื่องจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัดพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิล ไม่ได้ ยังคงรูปเป็นลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีกลูโคส 2-6 หน่วย (maltodextrins) นำมาใช้ประโยชน์เป็นสารเติมเนื้อ (filler) และสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer) ในอาหารได้ (ปราณี, 2543) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens B. stearothermophilus B. licheniformis* ซึ่งจะให้เอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้เกินอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยครั้งแรกคือ 5.8-6.5 และเติมแคลเซียม (Ca^{2+}) เพื่อปรับปรุงความเสถียรของเอนไซม์ (Crabb and Mitchinson, 1997)

2.6.2 การย่อยครั้งสุดท้าย : การทำให้หวาน (Saccharification)

การย่อยครั้งสุดท้าย หมายถึงระดับการย่อยแป้งที่มากขึ้น ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น (DE สูงขึ้น) น้ำแป้งเกิดรสหวาน เป็นน้ำเชื่อม ซึ่งถือว่าเป็นการย่อยครั้งสุดท้ายของระบบการผลิต (กล้าณรงค์ และเกื้อกลู, 2546) มีกระบวนการปลดปล่อยหน่วยย่อยกลูโคส (single glucose residues) จากโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนไซม์เบตาอะไมเลส (β-amylase) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เพื่อไฮโดรไลซ์ผลผลิตจากการทำให้ใส (liquefaction) ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลมอลโตส กลูโคส ขั้นตอนนี้อาจจะต้องเสริมด้วยเอนไซม์ย่อยกิ่งก้านของแป้ง (debranching enzyme) เพื่อย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 และพันธะแอลฟา-1,3 (ปราณี, 2543) โดยจะปลดปล่อยหน่วยกลูโคสจากปลายทางด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ (non-reducing) ของโอลิโกแซคคาไรด์ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ เช่น *Aspergillus awamori Aspergillus niger* เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.2 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถให้ผลผลิตปริมาณสูงในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม

ในการย่อยครั้งสุดท้ายต้องมีการปรับพีเอชให้ต่ำประมาณ 4.2-4.5 การปรับพีเอชนี้เพื่อการทำงาน 2 ประการ ประการแรกเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเพื่อปรับค่าพีเอชให้ใกล้เคียงกับการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในกระบวนการนี้อาจพบปัญหาได้ เนื่องจากสับสเตรทแป้งจากแหล่งธรรมชาติประกอบด้วยทั้งอะไมโลส (1-4 linkages) และอะไมโลเพกติน (branched 1-6 links) ซึ่งเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีประสิทธิภาพในการย่อยพันธะ-1,4 (1-4 links) แต่เมื่อถึงกิ่งโซ่ (1-6 branch) เอนไซม์จะย่อยพันธะได้ช้ากว่า ซึ่งทำให้เกิดไอโซมอลโทส (isomaltose) วิธีแก้ปัญหาทำได้โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์พลูลูลาเนส (pullulanase ; EC 3.2.1.41) ซึ่งสามารถย่อยพันธะ 1-6 linkages ได้ ข้อดีของเอนไซม์พลูลูลาเนส คือมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งการใช้เอนไซม์ผสมนี้สามารถเพิ่มผลผลิตกลูโคสจากร้อยละ 94 เป็นมากกว่าร้อยละ 95.5 (Crabb and Mitchinson, 1997)

2.6.3 การเปลี่ยนไอโซเมอร์ (Isomerization)

หลังจากการย่อยครั้งสุดท้าย (saccharification) จะมีการใช้เอนไซม์ไอโซเมอเรส (isomerases) เพื่อเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุกโทส หรือเปลี่ยนไซโลสเป็นฟรุกโทส จะได้เป็นฟรุกโทสไซรัป หรือไอโซกลูโคส (ปราณี, 2543) โดยกำจัดเดกซ์โทส และคาร์บอนออก ทำให้มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 40 ของน้ำหนักแห้ง ปรับพีเอชให้ใกล้กลางคือ 7-8 และใช้เอนไซม์กลูโคไอโซเมอเรส (glucose isomerase; D-xylose-ketol isomerase; EC 5.3.1.5) เปลี่ยนรูปไอโซเมอร์น้ำตาลอัลดีไฮด์ (D-glucose) ไปอยู่ในรูปคีโต (D-fructose) (Crabb and Mitchinson, 1997)

2.7 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือแกมมา-อะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (Glucoamylase ; γ-Amylase ; Amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) มีชื่อเรียกตามระบบว่าแอลฟา-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเลส (α-1,4-glucan glucohydrolase ; EC 3.2.1:3) สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากทางด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ (non-reducing end) ที่ตำแหน่งแอลฟา-1,4 (α-1,4) แอลฟา-1,6 (α-1,6) แอลฟา-1,3 (α-1,3) แต่จะช้ากว่าแอลฟา-1,4 (α-1,4) โดยจะตัดสายพอลิเมอร์ที่ปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้เบต้า-ดี-กลูโคส (ปราณี, 2543) เอนไซม์นี้พบครั้งแรกในจุลินทรีย์ ต่อมาในเนื้อเยื่อสัตว์ก็พบด้วย จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ เช่น *Aspergillus oryzae* *A. niger* และ *Endomycopsis fibuligera* เป็นต้น (ดวงพร, 2530)

2.7.1 ลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์

โดยปกติเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะมีมวลโมเลกุล (relative molecular mass ; M_r) อยู่ระหว่าง 40,000-80,000 ดาลตัน ดังแสดงในตารางที่ 4 ยกเว้นเอนไซม์จากสายพันธุ์ *Schwanniomyces occidentalis* และ *S. cerevisiae var. diastaticus* มีมวลโมเลกุลประมาณ 70,000 – 670,000 ดาลตัน เอนไซม์ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูงนี้ ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตสูงถึงประมาณร้อยละ 80 ซึ่งคาดว่ามีผลช่วยเพิ่มความคงตัวที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์

สปีชีส์	สายพันธุ์	เอนไซม์	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	มวลโมเลกุลสัมพัทธ์ (x 10^{-3})[b]
A. monospora		Glucoamylase I	5.5	65	47.8 (A)
		Glucoamylase II	5.5	60	50.1 (A)
C. antarctica	CBS 6678	Glucoamylase	4.2	57	48.5 (A B C)
C. tsukubaensis	CBS 6389	Glucoamylase	2.4-4.8	55	56 (B)
F. capsuligenum	CCY 64-5-1	Glucoamylase I	5-5.6	55	60 (B)
		Glucoamylase II	4.8-5.3	50	60 (B)
L. kononenkoae	CBS 5608	Glucoamylase	4.5	50	81.5 (A)
S. cerevisiae	5206-1B	Glucoamylase II	5.1		300 (B)
var. diastaticus	(STA2)				670 (C)
Sacch. capsularis	311/1	Glucoamylase	4.5	40-50	
Sacch. fibuligera					
	IFO 0111	Glucoamylase	4.5-5.0		40 (A)
		Glucoamylase	4.8-5.0		
		Glucoamylase	5.0		55
	IFO 1665	Glucoamylase	5.5	60	58 (A)
	R1	Glucoamylase	5-6	50-60	57 (B)
	Sp. 20-9	Glucoamylase			53 (A)
Schw. occidentalis	LCC 241	Glucoamylase	5.2-6.5	50	
	UCD 54-83	Glucoamylase	5.0	50	155 (B)
	ATCC	Glucoamylase I	4-6	40-50	155 (B)
		Glucoamylase II	4.5-5.2	40-48	135 (B)
	IGC 2829	Glucoamylase	4.5	50	117 (A)

หมายเหตุ : *A. = Ambrosiozyma; C. = Candida; F. = Filobasidium; L. = Lipomyces;*

S. = Saccharomyces; Sacch. = Saccharomycopsis; Schw. = Schwanniomyces

[b] หมายถึง วิธีการหาค่า relative molecular mass (M_r) :

A = gel filtration;

B = sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis;

C = fast protein liquid chromatography

ที่มา : De mot (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
60240

2.7.2 แหล่งของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Sources of glucoamylases)

แหล่งที่ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีทั้งในจุลินทรีย์ สัตว์ พืช แต่แหล่งใหญ่คือในจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะ *Aspergillus* และ *Rhizopus* จะเป็นสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในทางการค้า

2.7.2.1 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้อากาศ (aerobic bacteria) ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เช่น *Bacillus stearothermophillus Flavobacterium* sp. และ *Halobacterium sodamense* และแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium thermosaccharolyticum Clostridium acetobutylicum* (Pandey, 1995) มีรายงานการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในแบคทีเรีย *Clostridium thermohydrosulfuricum* พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จะมีลักษณะที่เสถียรและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีความเสถียรอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร และยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 50 หลังจากให้ความร้อน 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Fogarty and Kelly, 1990)

2.7.2.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา

เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เช่น *Aspergillus phoenicis* (Lineback and Baumann, 1970) *Aspergillus niger Aspergillus oryzae Rhizopus. delemar Rhizopus javanicuse Rhizopus niveus Humicola lanuginose* (Pandey *et. al.*, 2000) *Thermomyces lanuginosus* (Li *et. al.*, 1998)

2.7.2.3 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์

ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เช่น *Filobasidium capsuligenum Candida tsukubaensis* CBS 6389 *Lipomyces kononenkoae Lipomyces starkeyi Candida fennica Saccharomycopsis bispora Saccharomycopsis capsularis Schwanniomyces alluvius Schwanniomyces castellii Trichosporon pullulans* (Gogoi *et. al.*, 1987) *Saccharomycopsis fibuligera* (Futatsugi *et. al.*, 1993b) *Schwanniomyces occidentalis Saccharomyces diastaticus* (Pandey, 1995) *Hansenula* sp. K-28 (Bergmann *et. al.*, 1988)

2.7.3 การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Production of glucoamylase)

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอาจผลิตได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ แต่แหล่งผลิตเอนไซม์ที่น่าสนใจมากก็คือ จุลินทรีย์ เพราะสามารถผลิตได้เป็นปริมาณสูง เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็ว นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ ใช้แหล่งวัตถุดิบได้หลายชนิด การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะใช้พื้นที่น้อย และไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งที่ควรพิจารณาในการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์คือ สายพันธุ์ของเชื้อ (แบคทีเรีย ยีสต์ รา) หลังจากที่คัดเลือกได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงแล้ว จึงนำมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ จากนั้นก็ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต โดยทั่วไปจะศึกษาปัจจัยเหล่านี้คือ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจน รูปแบบของกระบวนการหมัก และนำไปผ่านขั้นตอนต่างๆ เพื่อทำให้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ (ดวงพร, 2530)

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยการหมักที่มีการใช้จุลินทรีย์มี 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation; SSF) และการหมักในอาหารเหลว (liquid or submerged fermentation; SmF) ซึ่งโดยส่วนใหญ่ใช้ในกระบวนการผลิตในทางการค้า แต่เทคนิคการหมักในอาหารแข็งได้มีการสนใจนำมาศึกษาใหม่สำหรับการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากประหยัดกว่า (Pandey, 1995)

2.7.3.1 การหมักในอาหารเหลว (liquid or submerged fermentation; SmF)

นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้เลี้ยงจะฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนชื้นอุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 3-5 จะต้องควบคุมการให้อากาศและการกวน วิธีนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิตและควบคุมสภาพต่างๆ ได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือมีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย ประสิทธิภาพของเชื้อจะลดลง จึงจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงๆ อยู่เสมอ และมีต้นทุนในการผลิตสูง (ดวงพร, 2530; Ellaiah *et. al.*, 2002)

2.7.3.2 การหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation; SSF)

กระบวนการหมักในอาหารแข็งได้รับความสนใจมากขึ้นมีการกลับมาทำการศึกษาวิจัยใหม่ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการหมักในอาหารเหลวคือ ประหยัดกว่าและมีข้อได้เปรียบทางการผลิตหลายด้าน (Pandey, 1995) อาหารแข็งที่ใช้เป็นสับสเตรทในการหมักควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- เป็นอาหารแข็งที่มีรูพรุน อาจจะย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ มีพื้นที่ผิวต่อหน่วยปริมาตรมากอยู่ในช่วง 10^3 ถึง 10^6 มิลลิเมตรต่อเซนติเมตร เพื่อให้มีพื้นที่ผิวระหว่างของแข็งกับก๊าซเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์
- อาหารแข็งควรดูดซับน้ำได้ปริมาณหนึ่ง
- อาหารแข็งควรมีคุณสมบัติที่ทนต่อการกด หรือดนอย่างเบาๆ ซึ่งในกระบวนการหมักต้องการอาหารแข็งที่เป็นเม็ดเล็กๆ (small granular) หรือเส้นใยที่ไม่แตกง่ายหรือเหนียวมากเกินไป
- อาหารแข็งต้องไม่มีการปนเปื้อนโดยสารที่ยับยั้งกิจกรรมจุลินทรีย์ และควรสามารถดูดซับ หรือมีองค์ประกอบอาหารที่จำเป็นของจุลินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต พวกเซลลูโลส (cellulose) แป้ง (starch) น้ำตาล แหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย ยูเรีย เพบไทด์ (peptides) และเกลือแร่ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักในอาหารแข็งมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักในอาหารเหลวแต่ก็มีข้อจำกัดหลายอย่าง ซึ่งจะเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของการหมักทั้ง 2 แบบ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการหมักในอาหารเหลวและอาหารแข็ง

ปัจจัย	การหมักในอาหารเหลว	การหมักในอาหารแข็ง
สับสเตรท	ใช้สับสเตรทละลายน้ำได้	สับสเตรทเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น แป้ง เซลลูโลส เพคติน ลิกนิน
ปริมาณน้ำ	ใช้น้ำปริมาตรมาก และมีการปล่อยน้ำทิ้งมาก	มีการจำกัดการใช้น้ำ (มีค่า Aw ต่ำ) และไม่มีการปล่อยน้ำทิ้ง
สภาวะปลอดเชื้อ	ให้ความร้อนระดับสเตอไรซ์	ให้ความร้อนระดับไอน้ำ
การให้ความร้อน	ควบคุมอุณหภูมิได้ง่าย	ความสามารถในการถ่ายเทความร้อนต่ำ
การให้อากาศ	จำกัดโดยความสามารถในการละลายได้ของออกซิเจน	การให้อากาศทำได้ง่าย มีพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนระหว่างอากาศกับสับสเตรทสูง
การควบคุมพีเอช	ควบคุมพีเอชได้ง่าย	ควบคุมพีเอชสับสเตรทอาหารแข็งโดยใช้บัฟเฟอร์
การกวน	ผสมเป็นเนื้อเดียวกันดี	ส่วนใหญ่จะหมักในสภาวะนิ่ง
การเพาะเลี้ยง	สามารถทำในระบบต่อเนื่อง	ทำในระบบแบบกะ
พลังงานที่ใช้	ใช้พลังงานสูง	ใช้พลังงานต่ำ
เครื่องมือที่ใช้	เครื่องมือราคาสูง	เครื่องมือราคาต่ำ
ปริมาณของเสีย	มีปริมาณของเสียมาก	มีปริมาณของเสียน้อย
ความเข้มข้น สับสเตรท/ผลิตภัณฑ์	30-80 กรัม/ลิตร	100-300 กรัม/ลิตร

ที่มา : Raimbault (1998)

2.8 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

2.8.1 ปริมาณความชื้น

น้ำเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด น้ำช่วยละลายสารอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดต่างๆ ทำให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมเข้าไปใช้ภายในเซลล์ได้ (สมใจ, 2001) ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เป็นการเจริญของจุลินทรีย์บนอนุภาคอาหารแข็งที่ปราศจากน้ำอิสระ น้ำในกระบวนการหมักในอาหารแข็งจะอยู่ร่วมกันภายในอาหารแข็ง หรือดูดซับเป็นชั้นบางๆ บนพื้นผิวของอนุภาค ระดับความชื้นที่เหมาะสมจะแตกต่างกันตามชนิดของสับสเตรท เช่น การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. NCIM 1248 ในสภาวะอาหารแข็งโดยใช้กากชาเป็นสับสเตรท พบว่ามีปริมาณความชื้นที่เหมาะสม ร้อยละ 60 (Selvakumar *et. al.*, 1998) และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. A3 ในสภาวะอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท มีปริมาณความชื้นที่เหมาะสมร้อยละ 80 (Ellaiah *et. al.*, 2002)

ปริมาณน้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงเชื้อที่ใช้สับสเตรทที่เป็นของแข็ง ปริมาณน้ำที่มากเกินไปจะลดรูพรุนของสับสเตรท เปลี่ยนโครงสร้างของสับสเตรททำให้เหนียวมากขึ้น มีผลลดการถ่ายเทออกซิเจน แต่ปริมาณน้ำที่น้อยเกินไปจะลดความสามารถในการละลายน้ำของสารอาหารในสับสเตรทได้ (Ramadas *et. al.*, 1996)

2.8.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์และถ้าใช้อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ในการผลิตเอนไซม์จะทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพไป (Estrela *et. al.*, 1982) มีการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus* sp. A3 พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มากที่สุด (Ellaiah *et. al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 (Futatsugi *et. al.*, 1993) อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 (Sukhumavasi *et. al.*, 1975) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces alluvius* (Simoes-Mendes. 1984) ในการบ่มเอนไซม์เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อมามีการพัฒนาเอนไซม์อะไมเลสให้ทนอุณหภูมิสูงได้มากขึ้นอยู่ในช่วง 60-70 องศาเซลเซียส จากเชื้อ *Candida antarctica* และ *Lipomyces staekeyi* เอนไซม์อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงได้อย่างแท้จริงสามารถผลิตได้ทั่วไปในแบคทีเรีย แต่ในยีสต์ยังไม่มีรายงานการศึกษา ลักษณะการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โดยความร้อนมีความสำคัญ โดยเฉพาะการเตรียมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์เพื่อจุดมุ่งหมายในการผลิตเบียร์คาร์โบไฮเดรตต่ำ ซึ่งเอนไซม์ที่เติมลงไปควรจะถูกยับยั้งได้ในขั้นตอนการพาสเจอไรซ์ โดยส่วนใหญ่พีเอชและอุณหภูมิของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ค่อนข้างใกล้เคียงกับเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราทั่วไป (De mot, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 พีเอช

ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 4-6.5 ในการผลิตสารบางอย่างจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง พีเอชของอาหารอาจเปลี่ยนแปลงตามกิจกรรมเมทาบอลิกของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่เนื่องจากมีการปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาทำให้พีเอชลดลง หรือการย่อยสลายกรดอินทรีย์อาจจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น ส่วนการย่อยสลายยูเรียจะเป็นสาเหตุทำให้พีเอชเป็นด่าง การเปลี่ยนแปลง พีเอชมีผลอย่างสูงต่อจุลินทรีย์ การควบคุมพีเอชทำได้โดยเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ตัวอย่างเช่น การเติมเกลือแอมโมเนียมและยูเรีย เพื่อควบคุมการลดลงของพีเอชในระหว่างการเจริญของ *Aspergillus niger* ที่ใช้แป้งเป็นสับสเตรท โดยยูเรียจะสลายให้เกลือแอมโมเนียมซึ่งจะมีผลขัดขวางการเกิดกรด ในระดับอุตสาหกรรมควบคุมพีเอชในอาหารแข็งโดยการพ่นฝอยสารละลายยูเรีย กิจกรรมยูรีเอส (urease activity) ของจุลินทรีย์จะเพิ่มพีเอชได้โดยการผลิตแอมโมเนีย และในการเลี้ยงราหรือยีสต์ในอาหารแข็งสามารถป้องกันหรือลดการปนเปื้อนได้โดยการใช้สภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่ำๆ (Raimbault, 1998)

2.8.4 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจน มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมทาบอไลท์ การให้ออกซิเจนมีจุดมุ่งหมายที่สำคัญ 4 ประการคือ เพื่อรักษาสภาวะการให้อากาศ ละลายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ควบคุมอุณหภูมิของสับสเตรท และควบคุมระดับความชื้น อากาศที่แวดล้อมอาจมีผลต่อระดับชีวมวลและการผลิตเอนไซม์ ในการใช้ออกซิเจนในสภาวะอาหารเหลว ปัจจัยที่จำกัดการเจริญคือ การละลายของออกซิเจนในน้ำได้ต่ำ แต่ในสภาวะอาหารแข็งออกซิเจนในบรรยากาศสามารถเข้าไปในสับสเตรทได้อย่างอิสระ ดังนั้นการให้อากาศอาจจะทำได้ง่ายกว่าในอาหารแข็ง มีพื้นที่ผิวที่สัมผัสระหว่างอากาศ สับสเตรทและไมซีเลียมสูง การควบคุมการให้อากาศและการถ่ายเทอากาศทำได้ง่าย เนื่องจากโดยทั่วไปในสภาวะอาหารแข็งไม่มีการจำกัดปริมาณออกซิเจน (Raimbault, 1998)

2.8.5 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีมากและนิยมใช้ได้แก่ แป้งจากธัญพืชชนิดต่างๆ แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง การใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถเมทาบอไลท์ได้อย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นสูงๆ พบว่าจะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว แต่สร้างผลผลิตที่เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิได้ต่ำ (สมใจ, 2001) แหล่งคาร์บอนที่มีผลชักนำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ได้ เช่น แป้ง มอลโทส (maltose) เดกซ์ทริน (dextrins) ส่วนกลูโคสพบว่าไม่มีผลชักนำการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (De mot, 1990)

โดยทั่วไปสับสเตรทที่มีมวลโมเลกุลสูงซึ่งประกอบด้วยพันธะแอลฟา-1,4 (α-1,4 linkages) จะเป็นสับเสตรทที่ดีสำหรับทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส นอกจากนี้ ไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งมีจำนวนของกิ่งพันธะแอลฟา-1,6 (α-1,6 branch points) มากยังเป็นสับสเตรทที่ดีสำหรับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ (De mot and Verachtert, 1987)

2.8.6 แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เพื่อนำไปสร้างโปรตีน และยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียมไอออนได้ ความสามารถในการใช้ไนเตรทและไนไตรต์ และความสามารถดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน ช่วยแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547) แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน (สมใจ, 2001) ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาไม่แพง ที่สามารถส่งเสริมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในยีสต์ได้ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *Schwanniomyces occidentalis* *Trichosporon pullulans* รำข้าวสาลีและรำข้าวจ้าว เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ส่วนเชื้อราโดยทั่วไปสามารถใช้เกลือแอมโมเนียมได้ดี (De mot, 1990)

2.8.7 เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์อาจช่วยให้มีการสะสมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์มากขึ้น หรืออาจจะช่วยให้เซลล์ปลดปล่อยเอนไซม์อะไมเลสที่เกาะอยู่กับเซลล์ออกมาในอาหารได้ง่ายขึ้น (Verachtert and De mot, 1990) แร่ธาตุที่ยีสต์ต้องการเพื่อการเจริญ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม สารที่ต้องการในปริมาณเล็กน้อย (trace element) คือ โบรอน ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ไอโอดีน และโมลิบดีนัม เพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตมากที่สุด (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547) แร่ธาตุโลหะที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำเกินไปจะไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ หรือสูงเกินไปจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ได้ ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะถูกยับยั้งโดยไอออนปรอท (Hg^{2+}) และจะถูกกระตุ้นโดยไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) และเหล็ก (Fe^{2+}) (Pandey, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน (Enzyme Purification)

การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยหลายประการ ทั้งนี้เมื่อแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกไป วิธีการนั้นทำได้โดย

2.9.1 การตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Salting out)

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นหลักการตกตะกอนโปรตีนในขณะที่มีการละลายของโปรตีนต่ำสุด โดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในเอนไซม์อย่างช้าๆ แล้วคนอย่างต่อเนื่องจนมีความเข้มข้นร้อยละ 80-100 (saturation) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ตะกอนโปรตีนเกือบทั้งหมด และจะได้เอนไซม์ที่มีสภาพเป็นตะกอน นอกจากนั้นอาจมีการตกตะกอนแยกลำดับส่วน (fractionation) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นต่างกันในแต่ละครั้ง แล้วแยกตะกอนเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละส่วนออกมา เช่น ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 60 - 90 ในการตกตะกอนลำดับส่วนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* (Ohga *et. al.*, 1966) ร้อยละ 50- 70 จากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* (Sukhumavasi *et. al.*, 1975) ร้อยละ 40-80 สำหรับเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* (De mot and Verachtert, 1985) ร้อยละ 75 สำหรับเชื้อยีสต์ *Candida antarctica* CBS 6678 (De mot and Verachtert, 1987) ร้อยละ 90 สำหรับเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 (Nguyen *et. al.*, 2002) และ ร้อยละ 80 สำหรับเชื้อ *Acremonium* sp. YT-78 (Mase *et. al.*, 1996) จากนั้นทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ แยกตะกอนเอนไซม์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว ตะกอนที่ได้อาจนำไปทำให้แห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำมาละลายในบัฟเฟอร์เพื่อแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยการใช้ไดอะไลเซชัน (dialization) เป็นขั้นต่อไป (Hayashida and Hor, 1981)

การเติมสารละลายเกลือลงไปในปริมาณเล็กน้อย เพื่อทำให้โปรตีนละลายได้ดียิ่งขึ้น เพราะเกลือจะเกาะกับโปรตีนแล้วรวมกับน้ำได้ดี กระบวนการนี้เรียกว่า salting in ในขณะเดียวกันการเติมเกลือในปริมาณที่มาก เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน เรียกว่า salting out (มุกดา, 2527) การตกตะกอนโปรตีนส่วนใหญ่มักใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเป็นการเพิ่มการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ นอกจากนั้นยังส่งผลให้โปรตีนสามารถละลายได้สูงขึ้น อีกทั้งการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ความร้อนมีผลเล็กน้อยต่อการละลายและสารละลายอิ่มตัว มีความหนืดและความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงออกมาได้ง่าย (Scopes, 1978)

2.9.2 การทำไดอะไลซิส (Dialization)

เป็นขั้นตอนหนึ่งในการแยกอิออนของเกลือออกจากครูดเอนไซม์ (crude enzyme) โดยการแช่ในบัฟเฟอร์ เช่น อะซิเตทบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นต้น ในระหว่างแช่นั้นจะต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้บ่อยๆ เพื่อให้อิออนของเกลือซึมออกมาได้เร็วขึ้น ส่วนชนิดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัฟเฟอร์ที่ใช้ควรจะมีผลต่อการทำลายเอนไซม์น้อยที่สุด อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองควรจะต่ำและเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงทนมากที่สุด

2.9.3 อัลตราฟิวเตรชัน (Ultrafiltration)

เป็นกระบวนการแยกเซลล์โดยวิธีการกรอง ซึ่งการแยกเซลล์เป็นกระบวนการแรกของกระบวนการเก็บเกี่ยวเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ในกระบวนการหมักขนาดเล็กสามารถกรองผ่านผ้าหรือเมมเบรน (membrane) ได้ แต่ถ้าเป็นกระบวนการหมักขนาดใหญ่ต้องกรองผ่านเครื่องกรองสุญญากาศแบบหมุน (rotary drum vaccum filters) ในกระบวนการกรองมี 3 วิธี คือ รีเวอร์ออสโมซิส (reverse osmosis) อัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration) และไมโครฟิวเตรชัน (microfiltration)

2.9.3.1 รีเวอร์ออสโมซิส (reverse osmosis) ใช้แยกอนุภาคขนาด 0.0001-0.001 ไมโครเมตร หรือคัดแยกขนาดโมเลกุลที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 1,000 ดาลตัน

2.9.3.2 อัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration) ใช้แยกอนุภาคที่มีขนาด 0.001-0.1 ไมโครเมตร หรือคัดแยกขนาดโมเลกุลที่มีน้ำหนัก 10^3 - 10^6 ดาลตัน

2.9.3.3 ไมโครฟิวเตรชัน (microfiltration) ใช้แยกอนุภาคที่มีขนาด 0.02-10 ไมโครเมตร หรือคัดแยกขนาดโมเลกุลที่มีน้ำหนักมากกว่า 10^5 ดาลตัน

อัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration) สามารถแยกองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10^3 ถึง 10^6 ดาลตัน ซึ่งขนาดและรูปร่างของอนุภาคมีความสำคัญ โดยเฉพาะโพลีเมอร์ที่มีกิ่ง เช่น โพลีแซคคาไรด์ ดังนั้นเส้นผ่านศูนย์กลางจึงเป็นตัวแปรสำคัญสำหรับอัลตราฟิวเตรชัน ข้อได้เปรียบของอัลตราฟิวเตรชันคือเป็นวิธีที่ประหยัดกว่าการกรองในระบบสุญญากาศ (Byong, 1996)

มีรายงานเกี่ยวกับการทำเอนไซม์อะไมเลสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ เช่น Singh and Soni (2001) นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* HS-3 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยการกรองผ่านอะมิคอน เมมเบรน (Amicon membrane) คัดขนาดโมเลกุล 10 และ 30 กิโลดาลตัน

Campos and Felix (1995) นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Humicolo grisea* นำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยการกรองผ่านอะมิคอน พีเอ็ม เมมเบรน (Amicon PM membrane) คัดขนาดโมเลกุล 10 กิโลดาลตัน

Marlida (2000) นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. นำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยการกรองผ่านเซลลูโลส อะซิเตท เมมเบรน (cellulose acetate membrane) คัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nguyen *et. al.* (2002) นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 นำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยการกรองผ่านอะมิคอน พีเอ็ม เมมเบรน (Amicon PM membrane) คัดขนาดโมเลกุล 10 กิโลดาลตัน

Wilson and Ingledew (1982) นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces alluvius* มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยกรองผ่านพีเอส เอสซี เพลลิคอน เมมเบรน (PSAC pellicon membrane) คัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความดันไนโตรเจน 60 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ดีอีเออี-เซฟลาเซล (DEAE-Sephacel) และคอลัมน์เจลฟิวเตรชันเซฟลาเด็กซ์ จี-150 (Sephadex G-150) นำมาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต โพลีอะคลิลาไมล์เจล อิเลกโทรโฟรีซิส (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 155,000 $\pm$ 3,000 ดาลตัน มีพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 5 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Sukhumavasi *et. al.* (1975) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 ที่แยกได้จากลูกแป้งในประเทศไทย นำสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 50-70 แยกส่วนที่เป็นตะกอนโดยนำไปปั่นเหวี่ยง นำตะกอนที่ได้ไปละลายในบัฟเฟอร์แล้วนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีดีอีเอดี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) นำมาแยกโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่พีเอช 8.3 เพื่อให้ได้แถบเดี่ยว (single band) ของเอนไซม์บริสุทธิ์ คำนวณหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิวเตรชัน ผ่านคอลัมน์เซฟทาเด็กซ์ซี-100 (sephadex G-100) มีค่าน้ำหนักมวลโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 5.8×10^4 ดาลตัน เอนไซม์ที่ได้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Spencer-Martins and Van Uden (1979) พบว่าเชื้อยีสต์ *Lipomyces kononenkoae* CBS 5608 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสได้ เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ที่ได้โดยการตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) และผ่านคอลัมน์ดีอี-เซลลูโลส(DE-cellulose) และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันโดยผ่านเมมเบรนเอสเอ็ม-13200 (Sartorius membranfilter Gmb H; SM-13200) พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 38,000 ดาลตัน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เหมาะสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพีเอชที่ 5.5 ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุล 81,500 ดาลตัน อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5

De mot and Verachtert (1985) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 พบว่าสามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส นำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-80 แยกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง นำตะกอนที่ได้ไปละลายในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6 นำสารละลายที่ได้มาผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ดีอีเอ-เซฟลาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) และคอลัมน์เจลฟิวเตรชันเซฟลาเด็กซ์ จี-25 และเซฟลาเด็กซ์ จี-100 เอสเอฟ (Sephadex G-25, Sephadex G-100 sf) คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต โพลีอะคลิลาไมล์เจล อิเลกโทรโฟรีซิส (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 64,000 ดาลตัน มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.6 ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I และ II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 60,000 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส I มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส และพีเอช 5-5.6 ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลส II มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.8-5.3

Simoes-Mendes (1984) ศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces alluvius* พบว่ายีสต์ชนิดนี้สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีดีอีเอดี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันโดยผ่านเมมเบรนเอสเอ็ม-13200 (Sartorius membranfilter Gmb H; SM-13200) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 117,000 ± 2300 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5 ช่วงพีเอชที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดคือ 4 – 7

Futatsugi *et. al.* (1993a) ศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 โดยการตกตะกอนด้วยโพรพานอล และผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี จากนั้นนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันโดยผ่านเมมเบรนไดอะโฟล วายเอ็ม 10 (Diaflo YM 10 membrane) พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I และ II มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 และ 57,000 มีพีเอชที่เหมาะสม 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากันคือ 40 องศาเซลเซียส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส II มีความคงตัวต่อความร้อนมากกว่ากลูโคอะไมเลส I

2.10 อิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์

จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความคงตัวต่อความร้อน และพีเอชในสภาวะกรดมากกว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แต่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะมีความคงตัวจะลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่พีเอชเป็นด่าง ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อราและยีสต์จะสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในช่วงพีเอช 4 - 6 (De mot and Verachtert, 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อพีเอชและอุณหภูมิ Spencer-Martins and van Uden (1979) รายงานผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Lipoyces kononenkoae* โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ที่พีเอช 2.8-6.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากบ่มแล้วปรับพีเอชเป็น 4.5 และหากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือ (residual activity) พบว่าที่พีเอช 4.5 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีกิจกรรมสูงสุด และมีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 4 - 6.5

Sukhumavas *et. al.* (1975) รายงานว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 มีความคงตัวต่อพีเอชอยู่ในช่วง 4.0– 9.0 เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์ที่อุณหภูมิในช่วง 10–80 องศาเซลเซียส ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 เป็นเวลา 30 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังมีความคงตัวสูง แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์อย่างสมบูรณ์

Futatsugi *et. al.* (1993a) รายงานผลการศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I และ II มีความคงตัวต่อพีเอชเท่ากันคือ 5.0-7.0

Wilson and Ingledew (1982) รายงานว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces alluvius* มีความคงตัวต่อพีเอชอยู่ในช่วงกว้าง โดยยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 80 ที่ พีเอช 4-8 และยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 88 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แต่ความคงตัวลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

De mot and Verachtert (1985) ได้ศึกษาผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 ที่ช่วงอุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-30 นาที ในบัฟเฟอร์พีเอช 5.6 พบว่า เอนไซม์กลูโคอะไมเลส I มีความคงตัวต่อความร้อนมากกว่า โดยยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 20 จากกิจกรรมเริ่มต้น หลังจากบ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลส II จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 20

โดยทั่วไปพบว่าสับสเตรทสามารถป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์โดยการเพิ่มอุณหภูมิได้ พวกเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเพียงหน่วยเดียวที่มีพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลจะทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ที่ประกอบขึ้นด้วยหลายหน่วยย่อย และโดยทั่วไปเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพที่ยังไม่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ คือมีโปรตีนชนิดอื่นๆ ปนอยู่จะทนต่อความร้อนได้ดีกว่าโปรตีนชนิดเดียวกันถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว (พัชรา, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การนำเอนไซม์อะไมเลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

2.11.1 อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงเครื่องบนเครื่องทอ ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดได้ง่าย ดังนั้นก่อนที่จะเอามาทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้ง เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึงหลังจากทอผ้าเป็นผืน จึงต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีการที่กล่าวมาใช้กับการทอผ้าจากฝ้ายขนแกะและแพรเทียม

2.11.2 อุตสาหกรรมทำขนมปัง ในการเตรียมแป้งที่ใช้ทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปด้วยเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลนี้ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นในแป้งหมัก ทำให้ได้โด (dough) เอนไซม์นี้ไม่ทนความร้อน จึงจะถูกทำลายไปหลังจากการอบขนมปังแล้วจึงไม่สามารถย่อยแป้งในขนมปังได้อีก ทำให้ได้ขนมปังที่ฟูดี

2.11.3 อุตสาหกรรมเครื่องดื่มน้ำผลไม้ ปกติน้ำผลไม้คั้นจะมีความขุ่น เพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่เอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น โดยการบ่มน้ำผลไม้ที่มีเอนไซม์อะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาฟาเรนไฮต์ หลังจากนั้นจึงกรองเอาน้ำตาลออก น้ำตาลที่กรองได้สามารถนำไปใช้ทำเยลลี่ได้

2.11.4 อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ใช้เป็นครั้งแรกในประเทศจีน โดยผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นญี่ปุ่นก็นำหลักการนี้มาผลิตแอลกอฮอล์เมื่อประมาณ 1700 ปีมาแล้ว ซึ่งแตกต่างจากยุโรปและอเมริกาที่จะใช้ข้าวมอลท์กันในระยะแรก แต่ปัจจุบันทั้งยุโรปและอเมริกาต่างก็หันมาใช้เอนไซม์จากราแทนเอนไซม์จากข้าวมอลท์

2.11.5 อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรัป การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้งระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆ จะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด เกิดการย่อยแบบสุ่มจึงได้สารหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโทส มอลโตไตรโอส และเดตระแซคคาไรด์ ทำให้เกิดสารเจนติโอไบโอส กรดลีวูลินิค และสารพวกเฟอฟิวรัล ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดีเกิดขึ้น ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคส เป็นต้น (ดวงพร, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12 ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ดีที่สุดสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ บางสายพันธุ์สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ใช้ย่อยแป้ง (starch saccharification) ในกระบวนการหมักอาหาร และผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นแป้ง หรือใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single-cell protein) (Eva, 2000)

เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* มีชื่อเรียกอื่นๆ ที่มีความหมายเหมือนกันคือ

Botryoascus cladosporoides A.T. Martinez *et. al.*

Candida lactosa Dwidjoseputro

Endomyces fibuliger Lindner

Endomyces hordei Saito

Endomyces lindneri Saito

Endomycopsis fibuliger (Lindner) Dekker var. fibuliger

Pichia fibuligera (Lindner) Boidin *et. al.*

Saccharomycopsis hordei (Saito) Klocker

Saccharomycopsis lindneri (Saito) Klocker

Trichosporon bancangense Lu & Li

(Barnett *et. al.*, 2000)

2.12.1 การจัดจำแนกยีสต์

ยีสต์ถูกจำแนกออกเป็น 2 ชนิด โดยอาศัยลักษณะที่สำคัญคือ การสร้างสปอร์ ชนิดที่สร้างสปอร์ เรียกว่า แอสโคไมซีตีส (Ascomycetes) โดยมีชื่อทั่วๆ ไปว่า ยีสต์แท้ (True-Yeast) และอีกชนิดหนึ่งคือ ชนิดที่ไม่สร้างสปอร์ เรียกว่า ฟังไจอิมเพอร์เฟคไท (Fungi-imperfecti) หรือที่เรียกว่า ยีสต์เทียม (False-yeast)

การจัดระบบและอนุกรมวิธานของยีสต์ มีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ มีลักษณะใหม่ๆ ที่นำมาใช้ในการจัดอนุกรมวิธาน โดยทั่วไปสามารถจัดจำแนกยีสต์แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.12.1.1 ยีสต์ที่มีการสร้างแอสโคสปอร์ (ascosporogenous หรือ ascomycetous yeast) สปอร์เกิดจากการรวมตัวของนิวเคลียส แล้วแบ่งไมโอซิสภายในแอสคัส

2.12.1.2 ยีสต์ที่มีการสร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiomycetous yeast) สปอร์เกิดจากการรวมตัวกันของนิวเคลียสแล้วแบ่งไมโอซิสบนเบสิเดียม

2.12.1.3 ยีสต์ที่ไม่มีการสร้างสปอร์แบบมีเพศ จัดอยู่ในพวกฟังไจอิมเพอร์เฟคไท (fungi imper-fecti, Deuteromycetes) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

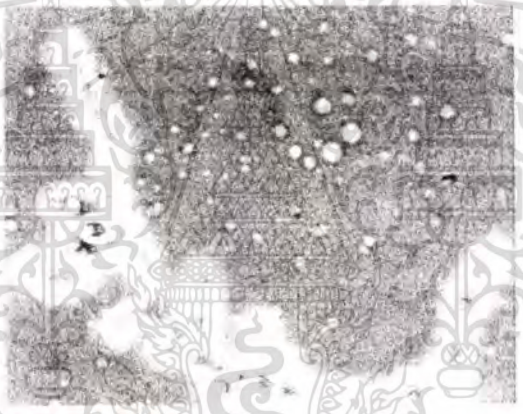
เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จัดอยู่ใน

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Hemiascomycetes
Order	Saccharomycetales
Family	Saccharomycopsidaceae
Genus	Saccharomycopsis

(Barnett *et. al.*, 2000)

2.12.2 รูปร่างลักษณะของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* พบใน ขนมปัง มักกะโรนี ราจิ (ragi) ฟางข้าว หรือหญ้าแห้ง ลักษณะของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* แสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

ที่มา : ภาควิชาจุลชีววิทยา (2544)

โคโลนีของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* มีลักษณะเป็นเยื่อแผ่นสีขาวครีม มีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ (budding) การสร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น (septate hyphae) หรือสร้างแอสคัย (asci) ประกอบด้วย 4 แอสโคสปอร์ (ascospores) ที่มีรูปร่างคล้ายหมวก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารมอลต์ ร้อยละ 5 (Difco malt agar) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Barnett *et. al.*, 2000)

เชื้อยีสต์ในตระกูลนี้มีลักษณะสำคัญคือสร้างทัลลัส (thallus) ที่เป็นแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular) แต่บางครั้งก็พบว่ามีการสร้างซูโดมัยซีเลียม (pseudomycelium) ได้ด้วย ซึ่งก็คือเซลล์ของยีสต์ที่มีลักษณะยาวต่อเรียงกันเป็นแถว เกิดจากการแตกหน่อของเซลล์นั่นเอง ทำให้ดูคล้ายกับว่าเป็นเส้นใย โดยปกติแล้วหลังการแตกหน่อเซลล์ที่เกิดใหม่ มักแยกหลุดออกจากเซลล์ที่ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำเนิด แต่ในบางครั้งก็พบว่าเซลล์ที่แตกออกมายังคงติดอยู่ไม่แยกออกจากกัน และเมื่อแตกหน่อต่อๆ ไปอีก จึงทำให้ได้ลักษณะที่เป็นซูโดมัยซีเลียม ข้อแตกต่างระหว่างซูโดมัยซีเลียม และไมซีเลียมที่แท้จริงก็คือ เซลล์ปลายสุดของซูโดมัยซีเลียม เป็นเซลล์ที่สั้นกว่าเซลล์อื่น ในขณะที่เซลล์ปลายสุดของไมซีเลียมที่แท้จริงนั้นจะยาวกว่าเซลล์อื่นๆ (วิจัย, 2546)

2.12.3 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

ในปี ค.ศ. 1944 Wickerham ทำการทดสอบให้เห็นว่า *Saccharomycopsis fibuligera* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยนำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นที่มีแป้งร้อยละ 1 และทดสอบเคลียร์โซน (clear zone) โดยทดสอบกับสารละลายไอโอดีน

สำหรับช่วงการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของ *Saccharomycopsis fibuligera* จะเริ่มสร้างเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะตอนปลายของช่วงระยะการเจริญ (log phase) แต่ยังสร้างในปริมาณน้อยมาก การสร้างเอนไซม์จะเกิดสูงสุดเมื่อเซลล์อยู่ในระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) (Gogoi *et. al.*, 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของบริษัท HACA รุ่น DR/4000V
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert รุ่น BE600
3. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท WTB binder รุ่น ED53
4. ตู้บ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ของบริษัท Gallenkamp
5. เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ของบริษัท Sciencetific industries รุ่น MS 115
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Hermle รุ่น z383k
7. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 MIV
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท Shimadzu รุ่น LIBROR EB-4000 H
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A200s
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Clifton รุ่น unstirred bath
11. เครื่องผสมสาร (vortex) ของบริษัท IKA® รุ่น MS 1 Minishaker
12. ไมโครปิเปต (micropipet) ของบริษัท Eppendorf
13. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215
14. ตู้เขี่ยเชื้อ ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123
15. ตู้ดูดควัน ของบริษัท ASTEC รุ่น Astecair 5000 E
16. เครื่องร่อนคัดขนาด (sieve test)
17. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท Pyrex
18. ฟลาสก์ (flask) ของบริษัท Pyrex
19. โถดูดความชื้น
20. ถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด ปริมาตร 8.8 x 31.5 x 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร
21. คอขวด

3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Scharlau
2. เปปโตน (peptone) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. มอลต์สกัด (malt extract) ของบริษัท ของบริษัท Scharlau
4. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Riedel-deHaen
5. แป้ง soluble starch ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
6. วุ้น (agar) ของบริษัท Scharlau
7. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
8. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
10. โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
11. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
12. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
13. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
14. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
15. ยูเรีย (NH_3CONH_3) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
16. ฟรุกโทส (fructose) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
17. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก ของบริษัท Sigma
18. สารละลายฟีนอล (C_2H_5OH) ของบริษัท Sigma
19. โปแตสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
21. โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ของบริษัท Scharlau
22. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
23. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
24. น้ำตาลทราย
25. น้ำกลั่น
26. กรดอะซิติก (CH_3COOH) ของบริษัท Merck
27. กรดไฮโดรคลอริด (HCl) ของบริษัท J.T. Baker
28. โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ของบริษัท AnalaR
29. เอทานอล ร้อยละ 95 ขององค์การสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.3 วัตถุดิบ

กากมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง จากบริษัท แป้งมันอุตสาหกรรม อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 จุลินทรีย์

3.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

ใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 มาลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง YM agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อทุก 2 สัปดาห์

3.4.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 จากข้อ 3.3.2 มา 2 ลูป ลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง

นำกากมันสำปะหลังมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl Method ; A.O.A.C., 1980) ความชื้น (A.O.A.C., 1990) น้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson-Somogyi ; Nelson, 1944) น้ำตาลทั้งหมด (Phenol-sulphuric ; Dubois *et. al.*, 1956) และแป้ง (A.O.A.C., 1975) ตามวิธีในภาคผนวก ข

3.6 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

3.6.1 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด

ทำการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหาร 5 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : แป้ง soluble starch 5 กรัม เติมยูเรียร้อยละ 0.1 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น

สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรียร้อยละ 0.1 เติมน้ำกลั่น

สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรียร้อยละ 0.1 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด จากนั้นเติมสารอาหารต่างๆ ตามสูตรข้างบน โดยเติมยูเรียร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นแหล่งไนโตรเจน เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นของอาหารทั้ง 5 สูตรให้ได้ร้อยละ 70 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ในปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

สกัดเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้น้ำกลั่น ในอัตราส่วนกากมันสำปะหลังต่อน้ำกลั่น 1:10 (น้ำหนักกากมันต่อปริมาตรน้ำกลั่น) นำไปสกัดโดยเครื่องบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตามวิธีของ Ramadas *et. al.* (1996) ในภาคผนวก ข

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

3.7.1 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมยูเรียร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นของอาหารให้ได้ร้อยละ 70 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 โดยการแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 10 15 20 และ 25 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง ตามสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรีย 0.005 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10.0 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 5 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง)

สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรีย 0.005 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9.8 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง)

สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรีย 0.005 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9.6 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 15 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรีย 0.005 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9.3 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 20 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง)

สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรีย 0.005 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9.1 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร (ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 25 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง)

ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.7.2.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) โดยผันแปรชนิดแหล่งไนโตรเจนดังนี้

สูตรที่ 1 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม (ชุดควบคุมไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)
สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.005 กรัม
สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 0.005 กรัม
สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) 0.005 กรัม
สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยูเรีย (urea) 0.005 กรัม
สูตรที่ 6 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมเปปโตน (peptone) 0.005 กรัม
สูตรที่ 7 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมยีสต์สกัด (yeast extract) 0.005 กรัม

เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นของอาหารในแต่ละสูตรให้ได้ร้อยละ 70 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2.1 โดยผันแปรความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณร้อยละ 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.30 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารแต่ละสูตรให้ได้ร้อยละ 70 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.3 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารแต่ละสูตร โดยผันแปรปริมาณความชื้นเริ่มต้นดังนี้

สูตรที่ 1 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 3.6 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50)
สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 5.8 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60)
สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 9.8 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70)
สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 17.8 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80)
สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 38.8 มิลลิลิตร (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90)

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.7.4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารแต่ละสูตรตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมแหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) โดยผันแปรชนิดแหล่งคาร์บอน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 1 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม (ชุดควบคุมไม่เติมชนิดแหล่งคาร์บอน)
สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมกลูโคส (glucose) 0.005 กรัม
สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมซูโครส (sucrose) 0.005 กรัม
สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมแป้งที่ละลาย (soluble starch) 0.005 กรัม
สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมฟรุกโทส (fructose) 0.005 กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารแต่ละสูตรตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองข้อ 3.7.4.1 โดยผันแปรความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในปริมาณร้อยละ 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.30 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.5 การศึกษาหาขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด โดยผันแปรขนาดของกากมันสำปะหลังขนาดต่างๆ คือ ชุดควบคุม (ไม่มีการคัดขนาดกากมัน) เล็กกว่า 80 ไมโครเมตร 80-500 ไมโครเมตร 501-850 ไมโครเมตร และ 851-1700 ไมโครเมตร เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.6 การศึกษาหาอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด ขนาดของกากมันตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมสารละลายเกลือแร่ โดยผันแปรตามอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมัน (0.5 : 5 0.75 : 5 1 : 5 1.25 : 5 1.5 : 5 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ดังนี้

สูตรที่ 1 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร
สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เกลือแร่ 0.8 มิลลิลิตร
สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เกลือแร่ 1.0 มิลลิลิตร
สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เกลือแร่ 1.3 มิลลิลิตร
สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม เกลือแร่ 1.5 มิลลิลิตร

และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.7 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด ขนาดของกากมันตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมเกลือแร่ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.6 และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20 25 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.8 การศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.7.8.1 การศึกษาชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด ขนาดของกากมันสำปะหลังตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมเกลืออนินทรีย์ในปริมาณร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) โดยผันแปรชนิดเกลืออนินทรีย์ ดังนี้

สูตรที่ 1 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม (ชุดควบคุมไม่เติมเกลืออนินทรีย์)

สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.005 กรัม

สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.005 กรัม

สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.005 กรัม

สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) + แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.005 กรัม

สูตรที่ 6 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) + โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.005 กรัม

สูตรที่ 7 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) + โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.005 กรัม

สูตรที่ 8 : กากมันสำปะหลัง 5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) + แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) + โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.005 กรัม

เติมเกลือแร่ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.7 และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้ตามผลการทดลองข้อ 3.7.7 เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.7.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ชั่งกากมันสำปะหลัง 5 กรัมลงในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด ขนาดของกากมันสำปะหลังตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.5 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.2 เติมชนิดเกลืออนินทรีย์ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.7.8.1 โดยผันแปรความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ในปริมาณร้อยละ 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.30 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมเกลือแร่ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.7 และเติมน้ำกลั่นเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมเกลือแร่ตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.7 และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.3 เติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.7.1 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้ตามผลการทดลองข้อ 3.7.7 เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2 ของการบ่ม ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.8 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในอาหารแข็งตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.7 (3.7.1-3.7.8) ทำการสกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 พร้อมทั้งศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ยีสต์โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ (direct microscopic method) โดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ตรวจนับปริมาณเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 6 วัน

3.9 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.9.1 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.9.1.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เตรียมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.6 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 3.7.1-3.7.8 แล้วนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาทำ salt fractionation เพื่อหาช่วงความอิ่มตัวที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 0-30, 30-50, 50-70 และ 70-90 ตามลำดับ ขณะเติมจะมีการกวนอย่างช้าๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนที่ได้แต่ละช่วงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ชนิดโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 5.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ปริมาณเล็กน้อยในการละลายโปรตีน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ เมื่อได้ช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด นำมาทำการศึกษาอีกครั้ง โดยแบ่งระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในแต่ละช่วงให้มีความละเอียดมากขึ้นเพื่อหาระดับความอิ่มตัวที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.1.2 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น

นำสารละลายตะกอนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดมากรองผ่านเครื่องอัลตร้าฟิวเตรชัน (ultrafiltration) ที่มีเยื่อกรองตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ขนาด 30,000 ดาลตัน (Amicon Regenerated Cellulose Membranes : 30,000 molecular weight cut off) แล้วนำสารละลายส่วนที่อยู่ด้านบนมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนตามวิธีในภาคผนวก ข เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน

3.9.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.9.1 มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ โดยนำมาละลายในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ คือ ใช้บัฟเฟอร์ชนิดซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 3.0 และ 3.5 อะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 และใช้บัฟเฟอร์ชนิดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ramadas *et. al.* (1996)

3.9.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.9.1 มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.9.2 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 20 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ramadas *et. al.* (1996)

3.9.4 การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.9.1 มาบ่มที่พีเอชต่างๆ ดังข้อ 3.8.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.9.2 และ 3.9.3 ตามลำดับ เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการบ่มที่พีเอชต่างๆ โดยรายงานในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

3.9.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.9.1 มาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.9.4 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังข้อ 3.9.3 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.9.2 และ 3.9.3 ตามลำดับ เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยรายงานในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 วางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลังแห้งที่ใช้เป็นสับสเตรท พบว่ามีปริมาณแป้งร้อยละ 18.95 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.93 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.03 โปรตีนร้อยละ 1.04 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 7.10 แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นสับสเตรท

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)	วิธีวิเคราะห์
แป้ง	18.95	(A.O.A.C., 1975)
น้ำตาลทั้งหมด	1.93	Phenol-sulphuric (Dubois *et. al.*, 1956)
น้ำตาลรีดิวซ์	0.03	Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)
โปรตีน	1.04	Kjeldahl Method (A.O.A.C., 1980)
ความชื้นเริ่มต้น	7.10	(A.O.A.C., 1990)

Padonou *et. al.* (2005) รายงานผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณโปรตีนในมันสำปะหลังชนิดหวานและชนิดขม พบว่าในมันสำปะหลังชนิดหวานมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 2.19 และมีโปรตีนร้อยละ 2.62 ส่วนมันสำปะหลังชนิดขมมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 5.46 และมีโปรตีนร้อยละ 3.23 Sriroth *et. al.* (2000) รายงานผลการศึกษาปริมาณโปรตีนและแป้งในกากมันสำปะหลังแห้ง พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.40 และปริมาณแป้งร้อยละ 17.80 พีรพจน์ และกฤตพล (2547) รายงานปริมาณโปรตีนในผลพลอยได้จากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังพบว่า ในเปลือกมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 3.24 กากมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.64 กากมันสำปะหลังยังไม่รีดน้ำออกมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.84 และมันสำปะหลังเส้นมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.49 และทรงศักดิ์ (2545) รายงานปริมาณโปรตีนในกากมันสำปะหลังแห้ง พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.40 จากผลการทดลองเห็นได้ว่าปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในมันสำปะหลังมีความแตกต่างกันตามพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่ปลูก

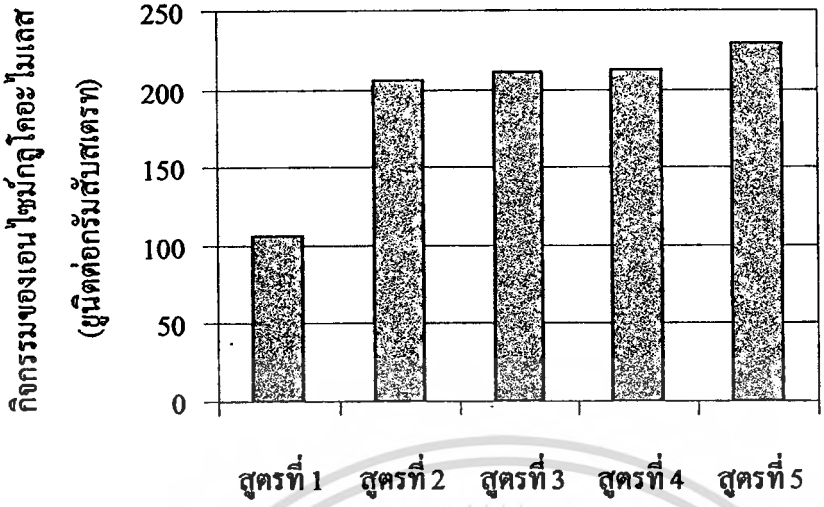
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger* JCM 3584

ผลการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger* JCM 3584 แสดงดังรูปที่ 4.1 จากการทดลองพบว่าในอาหารสูตรที่ 5 ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท และมีการเติมยูเรียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ร่วมกับการเติมสารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 0.5 : 5 (ปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และปรับความชื้นเป็นร้อยละ 70 ด้วยน้ำกลั่น สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณสูงสุดคือ 229.44 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 4 สูตรที่ 3 สูตรที่ 2 และสูตรที่ 1 ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 212.99 210.97 206.47 และ 105.93 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger* JCM 3584 โดยการใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทจำเป็นต้องมีการเติมทั้งแหล่งไนโตรเจนและสารละลายเกลือแร่ลงในสูตรอาหาร ดังจะเห็นจากผลการทดลองในสูตรที่ 2 ที่เติมเพียงน้ำกลั่นจะให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำกว่าในสูตรที่ 5 ซึ่งเติมครบทั้งสององค์ประกอบ เช่นเดียวกับในสูตรที่ 3 ที่เติมเพียงสารละลายเกลือแร่ และสูตรที่ 4 ที่เติมยูเรียเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกสูตรอาหารที่ 5 ไปใช้ศึกษาในขั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger* JCM 3584 ต่อไป เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะพัฒนาให้มีผลผลิตของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงมากยิ่งขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Navaratnam *et. al.* (1996) ทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* IMI 334891 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นแป้งมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียวจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำเพียง 280 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมันสำปะหลังมีสารอาหารไม่เพียงพอ โดยมีปริมาณไนโตรเจนต่ำเพียง 0.16 กรัมต่อลิตร จึงได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารโดยการเติมแอมโมเนียมฟอสเฟต เปปโตน ไตร-โพแทสเซียมฟอสเฟต แคลเซียมคาร์บอนเนต และถั่วเหลืองผง ปรับพีเอชให้ได้ 6.0 จะช่วยให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 1,950 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมัน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

กำหนดให้

สูตรที่ 1 : แป้งที่ละลาย soluble starch เติมยูเรีย เติมสารละลายเกลือแร่
สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง เติมน้ำกลั่น
สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง เติมสารละลายเกลือแร่
สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง เติมยูเรีย เติมน้ำกลั่น
สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง เติมยูเรีย เติมสารละลายเกลือแร่

การกำหนดสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในกระบวนการหมัก ต้องมีองค์ประกอบต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญ การสร้างผลผลิต และการเก็บรักษาสภาพของเซลล์ การกำหนดสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีองค์ประกอบของ แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แหล่งไนโตรเจน และอื่นๆ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดต้องการธาตุอาหารชนิดอื่นอีกเล็กน้อย นอกจากอาหารเริ่มต้น เพื่อชักนำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการ หรือสับสเตรทที่ใช้ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมจึงมักมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอ จึงต้องมีการเติมบางองค์ประกอบเพิ่มเข้าไป ซึ่งในกระบวนการผลิตนอกจากผลผลิตที่เราต้องการแล้ว ยังได้ตัวเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และความร้อนจากกระบวนการหมักด้วย (สมใจ, 2001) จึงต้องกำหนดองค์ประกอบของสูตรให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ต้องการมากที่สุด

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าในอาหารสูตรที่ 5 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่ 1 และ 2 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่ 3 และ 4 และอาหารสูตรที่ 1 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

สูตรอาหาร	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	105.93^{c}	206.47^{b}	210.97^{ab}	212.99^{ab}	229.44^{a}

กำหนดให้ ^{a,b,c} ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เนื่องจากในอาหารสูตรที่ 5 เป็นสูตรที่ใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท และเติมองค์ประกอบทั้งแหล่งไนโตรเจนและสารละลายเกลือแร่ซึ่งเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 สามารถนำไปใช้ในการเจริญและใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ จึงส่งผลให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าในสูตรอาหารอื่นซึ่งเติมเพียงบางองค์ประกอบ ส่วนในอาหารสูตรที่ 1 ถึงแม้จะเติมทั้งสององค์ประกอบลงในสูตรอาหารเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากใช้แป้งที่ละลาย (soluble starch) เป็นสับสเตรทเมื่อนำไปฆ่าเชื้อจะเกิดการรวมตัวกันเป็นเจล (gelatinization) และเมื่อเย็นลงจะเกาะตัวกันเป็นก้อนแข็ง เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสับสเตรททำให้มีความเหนียวมากขึ้น จึงมีผลลดการถ่ายเทออกซิเจน ลดความสามารถในการละลายน้ำของสารอาหารในสับสเตรท (Ramadas *et. al.*, 1996) ทำให้เชื้อยีสต์ไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้ทั้งหมด จึงให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำกว่าในสูตรที่ 5

ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสูตรที่ 5 ซึ่งประกอบด้วยกากมันสำปะหลัง เติมยูเรียร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นแหล่งไนโตรเจน เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วน 0.5 : 5 (ปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารให้ได้

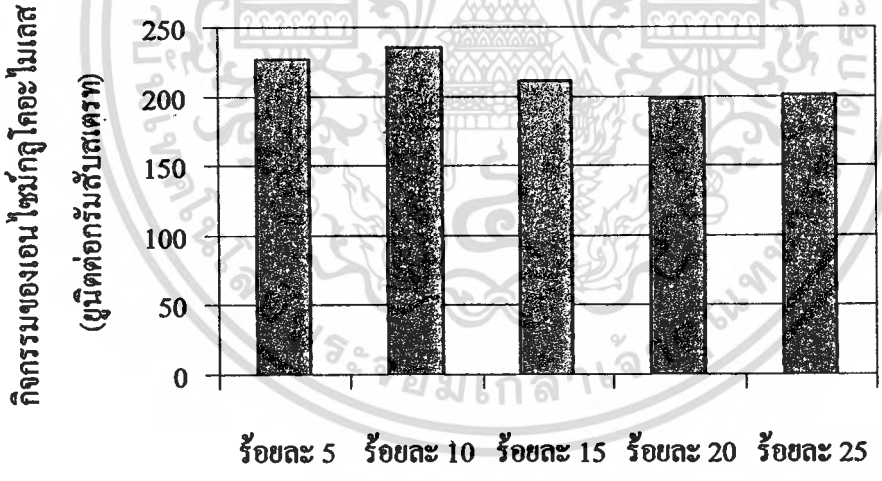
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 70 ด้วยน้ำกลั่น เพื่อนำไปใช้ในขั้นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ต่อไป

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

4.3.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.2 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 234.85 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 15 25 และ 20 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 226.63 210.29 201.56 และ 198.68 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก



รูปที่ 4.2 แสดงผลปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมักภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Ellaiah *et. al.* (2002) รายงานว่าการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าวสาลี) เป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. A3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท Selvakumar *et. al.* (1998) รายงานว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากชา) เป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1248 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากชาเป็นสับสเตรท

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม จะทำให้เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณสูง ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มากเกินไปจะยึดเกาะกับพื้นผิวสับสเตรทในปริมาณที่หนาแน่นมากเกินไป ทำให้มีผลขัดขวางการหายใจและการใช้อากาศของจุลินทรีย์ และมีการแย่งสารอาหารจากสับสเตรท ทำให้มีสารอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ มีผลทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณน้อย ส่วนปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่น้อยเกินไป ถึงแม้มีสารอาหารเพียงพอแต่เนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อยเกินไป จึงมีผลทำให้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณน้อยเช่นเดียวกัน

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าในสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 20 และ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 และ 20 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.3

ดังนั้นจึงเลือกปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ซึ่งเป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 เพื่อเติมลงในสูตรอาหารสำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมัน)	ร้อยละ 5	ร้อยละ 10	ร้อยละ 15	ร้อยละ 20	ร้อยละ 25
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	226.63[a]	234.85[a]	210.29[b]	198.68[b]	201.56[b]

กำหนดให้ [a,b] ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

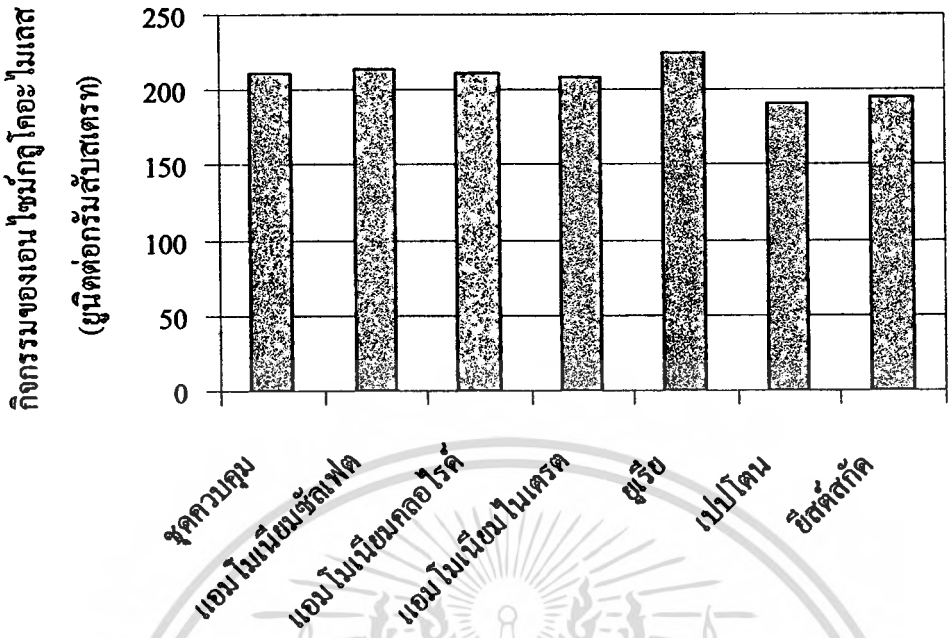
4.3.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.3.2.1 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.3 จากผลการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือยูเรีย ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 224.51 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน) แอมโมเนียมไนเตรต ยีสต์สกัด และเปปโตน มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 213.73 211.57 210.97 208.54 195.12 และ 191.52 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Ellaiah *et. al.* (2002) รายงานว่ายูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. A3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง รองลงมาคือน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) และเปปโตน Nguyen *et. al.* (2002) รายงานว่าการเติมยูเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 ได้มากขึ้น และ Oboh and Akindahunsi (2003) ยังมีการเติมยูเรียร่วมกับสารละลายเกลือแร่อื่นๆ เพื่อให้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisae* ใช้เป็นอาหารในการย่อยมันสำปะหลังให้เป็นแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน (สมใจ, 2001) ดังนั้นเชื้อยีสต์อาจนำยูเรียซึ่งเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนไปใช้ได้เร็วกว่าจึงนำไปใช้ชักนำให้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เร็วและง่ายกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น และในการใช้แหล่งไนโตรเจนจากอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต อาจทำให้มีการสะสมของซัลเฟตไอออนที่เหลือ (residue of sulfate ion) จากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตของเซลล์ร่วมกับกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้น ทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดต่ำลงมากจนทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้เกิดการเสียสภาพ หรือทำให้ค่าพีเอชของอาหารไม่เหมาะสมต่ำการเจริญของเชื้อ ซึ่งการลดลงของพีเอชสามารถป้องกันได้โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yang and Wang, 1999) โดยยูเรียจะทำให้จุลินทรีย์มีกิจกรรมยูรีเอส (urease activity) สามารถเพิ่มค่าพีเอชได้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ายูเรีย ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนชนิดอื่น และเปปโตนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สกัด ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

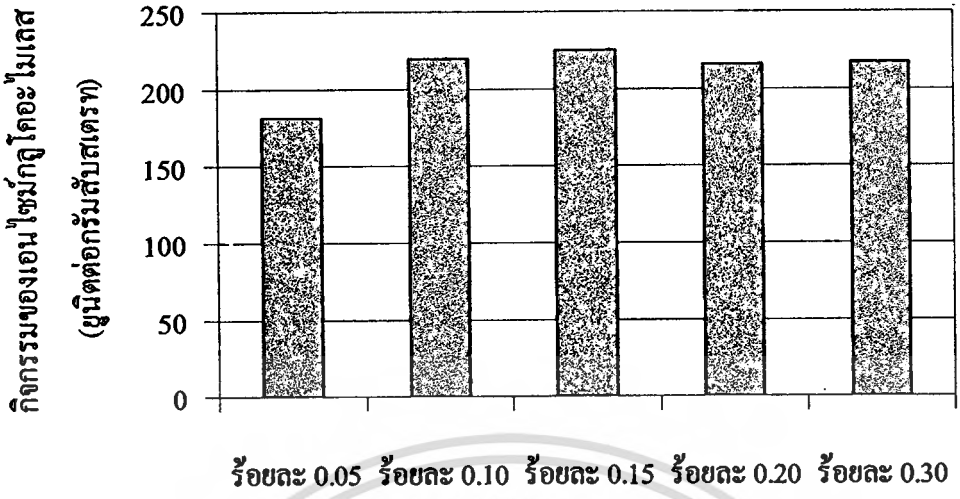
แหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกาก)	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
ชุดควบคุม	210.97[b]
แอมโมเนียมซัลเฟต	213.73[b]
แอมโมเนียมคลอไรด์	211.57[b]
แอมโมเนียมไนเตรต	208.54[b]
ยูเรีย	224.51[a]
เปปโตน	191.52[c]
ยีสต์สกัด	195.12[c]

กำหนดให้ [a,b,c] ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3.2.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.4 จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของยูเรียที่ร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 224.36 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมยูเรียร้อยละ 0.10 0.30 0.20 และ 0.05 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 219.68 216.47 215.58 และ 182.09 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger*a JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าไม่สอดคล้องกับรายงานของ Ellaiah *et. al.* (2002) ซึ่งรายงานว่าการใช้ยูเรียปริมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักรำข้าวสาลี) เป็นความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. A3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เช่นเดียวกับ Singh and Soni (2001) รายงานว่าการใช้กากถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักรำข้าวสาลี) เป็นความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* HS-3 และ Cherry, Md. *et. al.* (2004) รายงานว่าการใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ร้อยละ 0.25 เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumagatus* จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด ผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องกันอาจเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน ซึ่งสับสเตรทที่ใช้ในการหมักแบบอาหารแข็งส่วนใหญ่เป็นกากเหลือใช้ที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร มีการผ่านการสกัดเอาสารอาหารบางองค์ประกอบออกไป ปริมาณไนโตรเจนที่ต้องเติมเพิ่มเข้าไปจึงแตกต่างกัน ในสับสเตรทกากมันสำปะหลังพบว่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนปริมาณร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) มากเกินไปเมื่อทำการทดลองโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger*a JCM 3584 ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณความเข้มข้นที่มากเกินไปนี้จะมีต่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าในสูตรอาหารที่เติมยูเรียร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมยูเรียร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมยูเรียร้อยละ 0.10 0.20 และ 0.30 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และในสูตรอาหารที่เติมยูเรียร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรอาหารอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

ความเข้มข้นของยูเรีย (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมัน)	ร้อยละ 0.05	ร้อยละ 0.10	ร้อยละ 0.15	ร้อยละ 0.20	ร้อยละ 0.30
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	182.09[b]	219.68[a]	224.36[a]	215.58[a]	216.47[a]

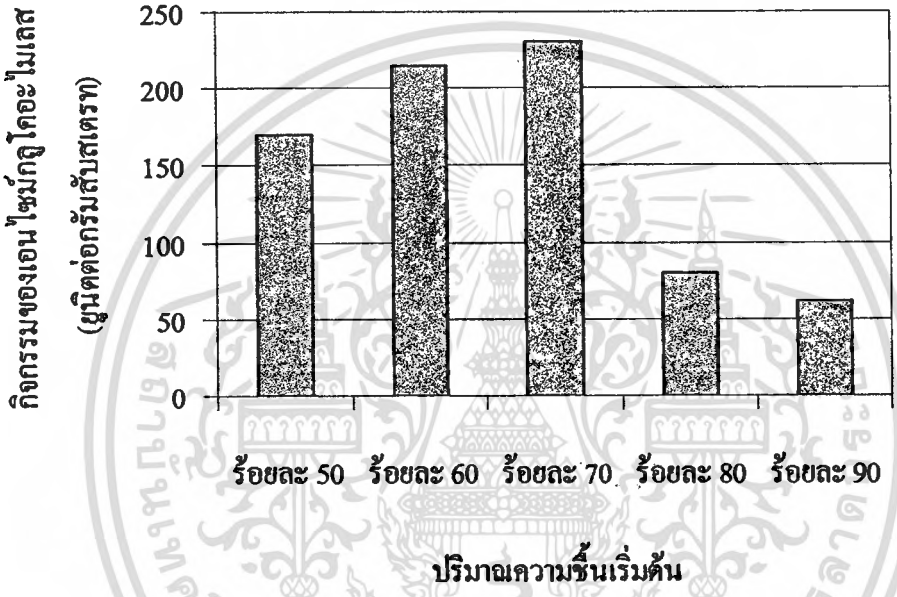
กำหนดให้ [a,b] ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของยูเรียร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของยูเรียร้อยละ 0.10 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ดังนั้นจึงควรเลือกความเข้มข้นของยูเรียร้อยละ 0.10 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เพื่อเติมลงในสูตรอาหารสำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูงใกล้เคียงกันและยังเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาหาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.5 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 230.00 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือปรีมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 50 80 และ 90 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 214.73 170.05 80.46 และ 61.93 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก



รูปที่ 4.5 แสดงผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Ramadas *et. al.* (1996) รายงานว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ถึง 75 เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* CISIR N4 โดยใช้รำข้าวสาลีและข้าวโอ๊ตเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง นอกจากนี้ Selvakumar *et. al.* (1998) รายงานว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1248 โดยใช้กากชาเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง Ellaiah *et. al.* (2002) รายงานว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Aspergillus* sp. A3 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ซึ่งเห็นได้ว่าแตกต่างกับผลการทดลองที่ได้ เนื่องจากมีความแตกต่างกันของชนิดเชื้อและสับสเตรทที่ใช้ในการทดลอง เชื้อแต่ละชนิดต้องการปริมาณความชื้นในการเจริญและผลิตเอนไซม์แตกต่างกันเล็กน้อย รวมทั้งชนิดของสับสเตรทแต่ละชนิดมีลักษณะทางกายภาพและเคมีแตกต่างกัน เมื่อเติมปริมาณน้ำแล้วนำไปฆ่าเชื้อหลังจากทิ้งไว้ในเย็นจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างต่างกัน

ปริมาณความชื้นเริ่มต้นมีความสำคัญมากในการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ซึ่งอาจจะมีผลส่งเสริมหรือขัดขวางเชื้อในการนำสารอาหารจากอนุภาคของสับสเตรทไปใช้ได้ ถ้าให้ปริมาณความชื้นที่มากเกินไปจะลดรูพรุนของสับสเตรท ทำให้โครงสร้างของสับสเตรทเหนียวมากขึ้น ลดปริมาณอากาศในอนุภาคของสับสเตรท และลดความสามารถในการแพร่ผ่านของอากาศผ่านอนุภาคสับสเตรท ซึ่งทำให้มีอัตราการถ่ายเทอากาศต่ำลง (Lonsane *et. al.*, 1985) แต่ถ้าให้ปริมาณความชื้นต่ำเกินไปจะลดความสามารถในการละลายได้ของสารอาหารที่เชื้อจะนำไปใช้ได้ เนื่องจากลดอัตราการพองตัวและเพิ่มแรงตึงผิวของน้ำ (Zadrazil and Brunnert, 1981) ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสม ทำให้มีอัตราการแพร่ผ่านของน้ำและอากาศเข้าไปในเซลล์ไม่ดี ทำให้เมทาบอลิซึมของเซลล์ช้าและหยุดลงเนื่องจากขาดแคลนสับสเตรท หรือมีความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินไปบริเวณใกล้พื้นผิว ทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าในสูตรอาหารที่ปรับปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ปรับปริมาณความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50 60 80 และ 90 และในสูตรอาหารที่ปรับปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำสุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.6

ดังนั้นจึงเลือกปรับปริมาณความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 70 ซึ่งเป็นปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 เพื่อเติมลงในสูตรอาหารสำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

ความชื้นเริ่มต้น	ร้อยละ 50	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ 80	ร้อยละ 90
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	170.05^{c}	214.73^{b}	230.00^{a}	80.46^{d}	61.93^{e}

กำหนดให้ ^{a,b,c,d,e} ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

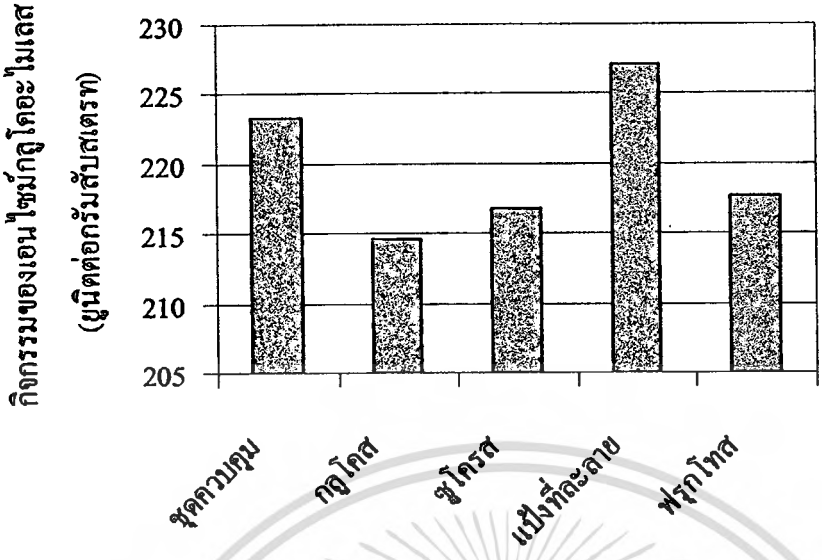
4.3.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.3.4.1 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.6 จากผลการทดลองพบว่าแป้งที่ละลาย (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 227.12 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือ ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน) ฟรุกโทส ซูโครส และกลูโคส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 223.37 217.70 216.76 และ 214.64 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับในวันที่ 5 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Sukhumavasi *et. al.* (1975) รายงานว่ากลูโคส มอลโทส และแป้งที่ละลาย (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 แต่มีเพียงมอลโทสและแป้งที่ละลาย (soluble starch) ที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ส่วนกลูโคสไม่มีผลส่งเสริมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยแป้งที่ละลาย (soluble starch) จะเป็นตัวชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ดีกว่ามอลโทส Ellaiah *et. al.* (2002) รายงานว่าฟรุกโทส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเป็นตัวชักนำให้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. A3 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง Selvakumar *et. al.* (1998) รายงานว่าซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1248 โดยใช้กากชาเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ส่วนกลูโคสไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger*a JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท

โดยปกติสับสเตรทที่มีมวลโมเลกุลสูงจะเป็นสับสเตรทที่ดี สำหรับในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส De mot and Verachtert. (1985) รายงานว่าไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งโครงสร้างมีจำนวนกิ่งของแอลฟา-1,6 (α-1,6) มาก เป็นแหล่งสับสเตรทที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Candida antarctica* CBS 6678 และ Marlida *et. al.* (2000) รายงานผลการเปรียบเทียบสับสเตรทที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ต่อผลของกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium sp.* พบว่าอะไมโลเพกทินให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือ อะไมโลส และพลูลูแลน (pullulan) ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งชนิดต่างๆ คือ แป้งที่ละลาย (soluble starch) แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งข้าวจ้าว แป้งสาลี แป้งสาคู พบว่าโพลีแซคคาไรด์เหล่านี้ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าแป้งชนิดต่างๆ ทั้งสิ้น เนื่องจากองค์ประกอบของแป้งมีปริมาณอะไมโลเพกทินน้อยกว่า อะไมโลสจึงมีผลทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำกว่า นอกจากนี้อัตราการเมทาบอไลซ์สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนมักมีอิทธิต่อการสร้างมวลเซลล์ หรือผลผลิต การใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถเมทาบอไลซ์ได้รวดเร็ว ที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็วแต่สร้างผลผลิตได้ต่ำ (สมใจ, 2001) จึงมีความเป็นไปได้ว่าในสูตรอาหารที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่สูงมากนัก อาจเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเชื้อยีสต์ใช้กลูโคสในการเจริญเป็นส่วนใหญ่ จนไม่มีผลในการเป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส De mot and Verachtert (1987) รายงานว่ากลูโคสมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Candida antarctica* CBS 6678

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง พบว่ายังคงมีปริมาณแป้งเหลืออยู่มาก ดังนั้นกากมันสำปะหลังจึงมีปริมาณแป้งเพียงพอต่อการเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้พลังงานแก่เซลล์ และมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ได้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าแป้ง (soluble starch) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซูโครส และฟรุกโทส และกลูโคสให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งที่ละลาย (soluble starch) ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

แหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกาก)	ชุดควบคุม	กลูโคส	ซูโครส	แป้งที่ละลาย (soluble starch)	ฟรุกโทส
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	223.37^{ab}	214.64^{b}	216.76^{ab}	227.12^{a}	217.70^{ab}

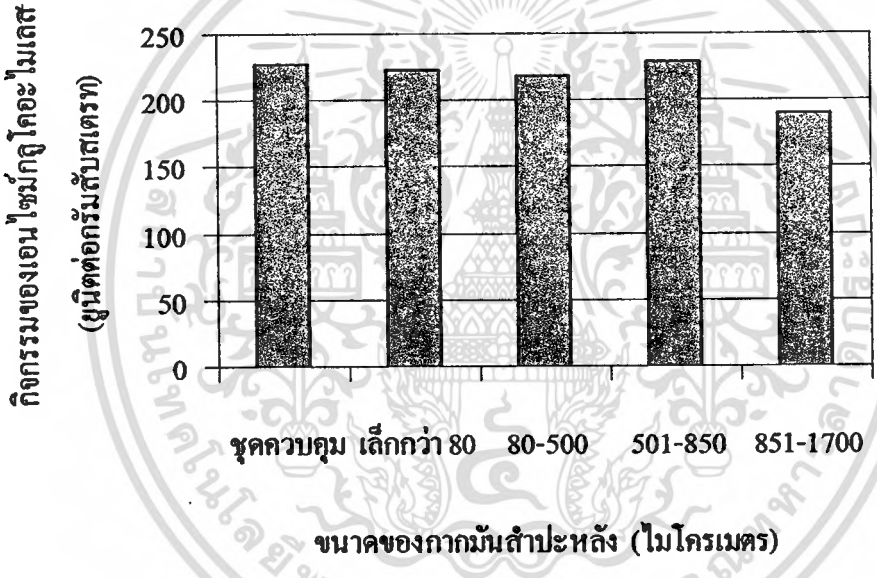
กำหนดให้ ^{a,b} ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าแป้งที่ละลาย (soluble starch) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แสดงว่าการใช้สับสเตรทกากมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยไม่ต้องเติมแหล่งคาร์บอนอื่นเพิ่มเพื่อเป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงควรเลือกชุดควบคุม เพื่อใช้สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูงใกล้เคียงกันและยังเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตด้วย

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ผลของขนาดกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.7 จากผลการทดลองพบว่ากากมันสำปะหลังขนาด 501-850 ไมโครเมตร ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 228.29 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือ ชุดควบคุม (ไม่มีการคัดขนาดกากมันสำปะหลัง) กากมันสำปะหลังขนาดเล็กกว่า 80 ไมโครเมตร กากมันสำปะหลังขนาด 80-500 ไมโครเมตร และกากมันสำปะหลังขนาด 851-1700 ไมโครเมตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 227.47 222.50 218.73 และ 190.20 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก



รูปที่ 4.7 แสดงผลของขนาดกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท

จากผลการทดลองสอดคล้องกับ Pandey (1991) รายงานว่าขนาดอนุภาคของรำข้าวสาลีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งคือ 425-500 ไมโครเมตร และ 500-600 ไมโครเมตร ส่วนในสูตรอาหารที่ไม่มีการคัดขนาดอนุภาคของรำข้าวสาลีให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ปานกลาง และในสูตรอาหารที่ใช้ขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 850 ไมโครเมตร จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสค่อนข้างต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Molony *et. al.* (1984) รายงานว่าสับสเตรทที่มีขนาดอนุภาคเล็กจะช่วยส่งเสริมการย่อยสลาย เนื่องจากเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับอากาศ

ในการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง ขนาดของอนุภาคสับสเตรทจะเป็นตัวกำหนดพื้นที่ว่าง ซึ่งกักเก็บอากาศ ซึ่งอัตราการผ่านของออกซิเจนเข้าไปในพื้นที่ว่างนี้มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นสับสเตรทที่ใช้ควรจะมีขนาดอนุภาคที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมการถ่ายเทมวลสารซึ่งมีผลต่อการนำไปใช้ผลิตเอนไซม์ สับสเตรทที่มีขนาดเล็ก จะมีพื้นที่ผิวมากสำหรับให้จุลินทรีย์มายึดเกาะ แต่ถ้าอนุภาคสับสเตรทมีขนาดเล็กมากเกินไป ก็จะทำให้สับสเตรทเกาะติดกัน อาจมีผลรบกวนต่อการหายใจและการใช้อากาศของจุลินทรีย์ เป็นผลให้จุลินทรีย์เจริญได้ไม่ดี ในทางกลับกันขนาดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ก็จะมีการเพิ่มพื้นที่ว่างระหว่างอนุภาคมากขึ้น ทำให้มีประสิทธิภาพของการหายใจและการใช้อากาศของจุลินทรีย์ดีกว่า แต่ก็มีพื้นที่ผิวจำกัดต่ำการยึดเกาะของจุลินทรีย์

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ากากมันสำปะหลังขนาด 501-850 ไมโครเมตร ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกากมันสำปะหลังขนาด 851-1700 ไมโครเมตร แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีการคัดขนาดกากมันสำปะหลัง) เล็กกว่า 80 ไมโครเมตร และ 80-500 ไมโครเมตร และกากมันสำปะหลังขนาด 851-1700 ไมโครเมตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้ขนาดกากมันขนาดอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของขนาดกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

ขนาดของกากมันสำปะหลัง (ไมโครเมตร)	ชุดควบคุม	เล็กกว่า 80	80-500	501-850	851-1700
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	227.47[a]	222.50[a]	218.73[a]	228.29[a]	190.20[b]

กำหนดให้ [a,b] **ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95**

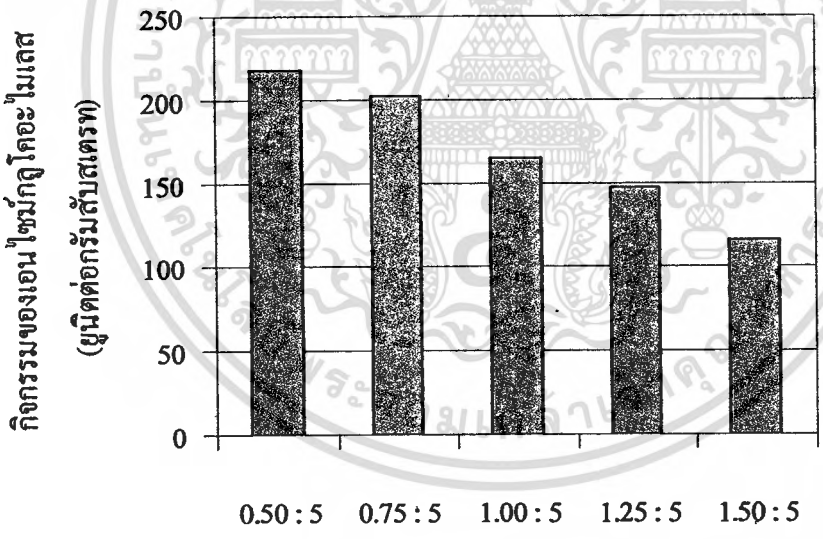
จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่ากากมันสำปะหลังขนาด 501-850 ไมโครเมตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไม่มีการคัดขนาดกากมันสำปะหลัง ดังนั้นจึงควรเลือกชุดควบคุม

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อใช้สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูงใกล้เคียงกันและยังเป็นการประหยัดพลังงานและต้นทุนในการผลิตด้วย

4.3.6 ผลของอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาหาอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.8 จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 0.50 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 217.94 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคืออัตราส่วน 0.75 : 5 1.00 : 5 1.25 : 5 และ 1.50 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 201.59 165.36 147.57 และ 115.57 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก



รูปที่ 4.8 แสดงผลของอัตราส่วนเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ellaiah *et. al* (2002) รายงานอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักรำข้าวสาลีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. A3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับ 2 : 10 (ปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักรำข้าวสาลี) ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ อาจเนื่องจากในกากมันสำปะหลังมีแร่ธาตุ เช่น สังกะสี เหล็ก แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม (Oboh and Akindahunsi, 2003) อยู่ปริมาณหนึ่ง ซึ่งการเติมอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 0.50 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เพียงพอแล้วในการชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อเติมเกลือแร่ปริมาณมากเกินไปจึงส่งผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าพบว่าอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 0.50 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 1.00 : 5 1.25 : 5 และ 1.50 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 0.75 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 1.50 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้อัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

อัตราส่วนเกลือแร่ต่อกากมัน (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมัน)	0.50 : 5	0.75 : 5	1.00 : 5	1.25 : 5	1.50 : 5
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	217.94[a]	201.59[a]	165.36[b]	147.57[b]	115.57[c]

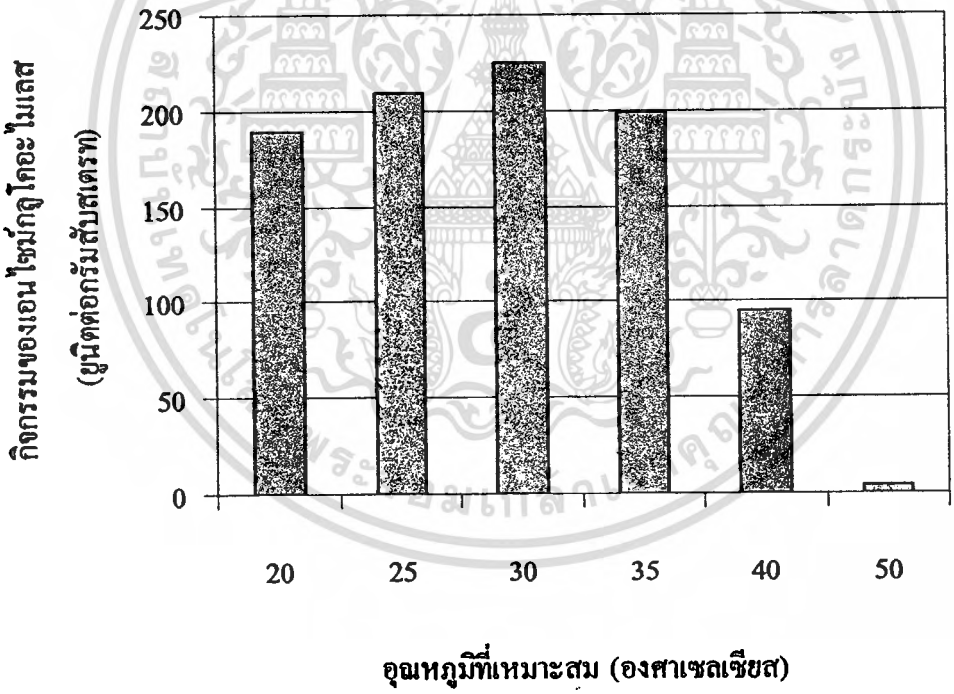
กำหนดให้ [a,b,c] ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง 0.50 : 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 เพื่อเติมลงในสูตรอาหารสำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

4.3.7 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.9 จากผลการทดลองพบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 225.15 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 25 35 20 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 209.57 198.25 189.32 95.07 และ 3.98 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก



รูปที่ 4.9 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Ellaiah *et. al.* (2002) รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. A3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส Selvakumar *et. al.* (1998) รายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* NICM 1248 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากชาเป็นสับสเตรทได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Fossi *et. al.* (2005) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ BA_3 ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ที่แยกได้จากดินที่ทำการเพาะปลูกมันสำปะหลังมีค่าเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ Singh and Soni (2001) รายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* HS-3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้ได้มากที่สุดอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งการใช้อุณหภูมิต่ำที่สุดที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูง จะมีข้อได้เปรียบคือช่วยลดอัตราการระเหยของน้ำออกไปในระหว่างการบ่มได้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มที่อุณหภูมิ 25 35 20 40 และ 50 องศาเซลเซียส และการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	20	25	30	35	40	50
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	189.32^{c}	209.57^{b}	225.15^{a}	198.25^{bc}	95.07^{d}	3.98^{e}

กำหนดให้ ^{a,b,c,d,e} ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

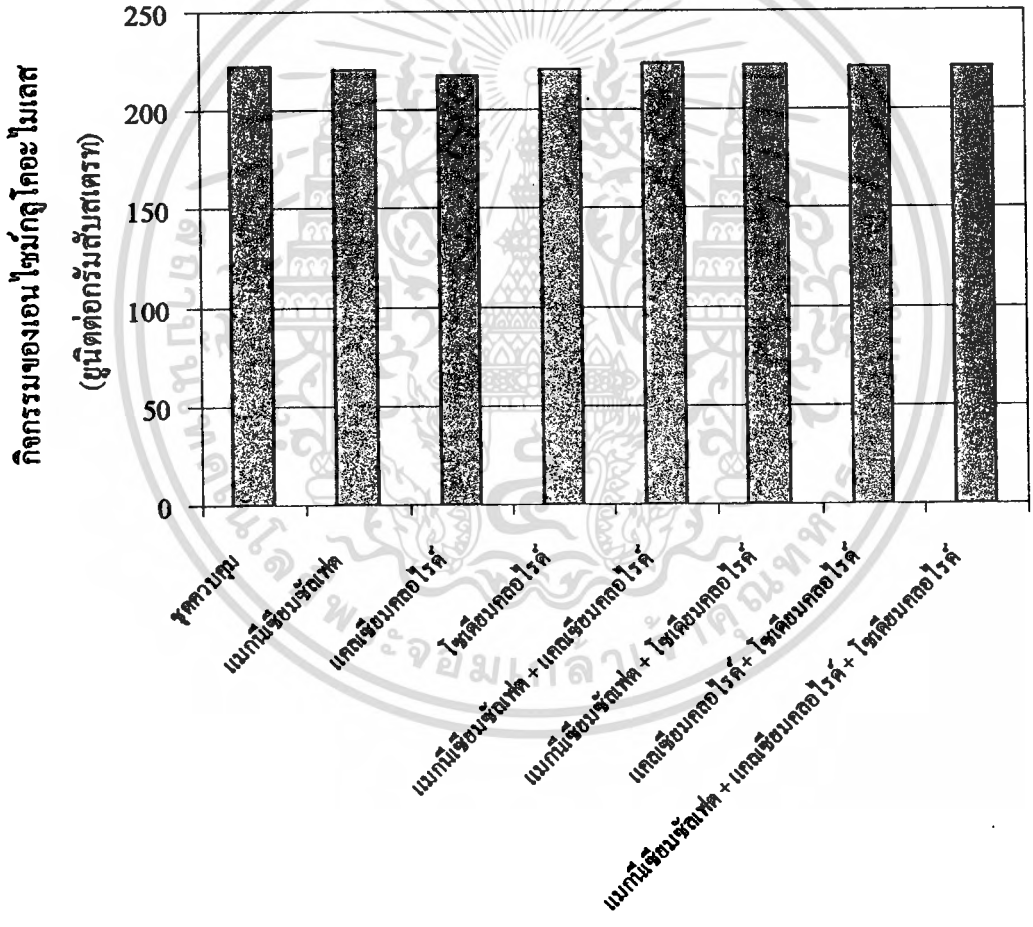
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 เพื่อบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

4.3.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.3.8.1 ผลของชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ผลการศึกษาหาชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท แสดงดังรูปที่ 4.10



ชนิดแหล่งเกลืออนินทรีย์ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมัน)

รูปที่ 4.10 แสดงผลของชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในวันที่ 5 ของการหมัก ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ ($MgSO_4$ + $CaCl_2$) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 223.94 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือ ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือนินทรีย์) แมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ ($MgSO_4$ + NaCl) แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ + NaCl) แมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ($MgSO_4$ + $CaCl_2$+ NaCl) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 223.06 222.82 221.50 221.47 221.03 220.96 และ 217.27 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Singh and Soni (2001) รายงานว่าแมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ เป็นชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* HS-3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง Soni *et. al.* (2003) รายงานว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ ชนิดละ 1 มิลลิโมลาร์ จะส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยสลายแป้งสาลีและเพิ่มผลผลิตน้ำตาลของเชื้อ *Aspergillus* sp. AS-2 De mot and Verachtert (1985) รายงานว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 ไม่มีผลส่งเสริมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส Futatsugi *et. al.* (1993) รายงานว่าไอออนของ Mg^{2+} (แมกนีเซียม) Ca^{2+} (แคลเซียม) Ba^{2+} (แบเรียม) Fe^{3+} (เหล็ก) Co^{2+} (โคบอลต์) Mn^{2+} (แมงกานีส) Zn^{2+} (สังกะสี) Cd^{2+} (แคดเมียม) Ni^{2+} (นิกเกิล) Cu^{2+} (ทองแดง) Pb^{2+} (ตะกั่ว) Ag^{2+} (เงิน) และ Hg^{2+} (ปรอท) มีผลเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 Marlida *et. al.* (2000) รายงานผลของไอออนโลหะต่างๆ และ EDTA ต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. ในการย่อยแป้งสาคู พบว่าไอออนของ Cu^{2+} (ทองแดง) Ca^{2+} (แคลเซียม) และ Mn^{2+} (แมงกานีส) มีผลส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และไอออนของ Al^{3+} (อะลูมิเนียม) Co^{2+} (โคบอลต์) Zn^{2+} (สังกะสี) Mg^{2+} (แมกนีเซียม) และ Fe^{2+} (เหล็ก) มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนไอออนของ Fe^{3+} (เหล็ก) มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปานกลาง EDTA Sr^{2+} (สทรอนเซียม) Hg^{2+} (ปรอท) Ni^{2+} (นิกเกิล) และ Ba^{2+} (แบเรียม) มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูง และ Nguyen *et. al.* (2002) รายงานผลของไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 พบว่า Zn^{2+} (สังกะสี) มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ส่วนไอออนของ Mn^{2+} (แมงกานีส) และ Fe^{2+} (เหล็ก) มีผลส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเห็นได้ว่าชนิดของเกลืออนินทรีย์มีผลต่อในแต่ละการทดลองแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและสับสเตรทที่ใช้ จากรายงานของ Oboh and Akindahunsi (2003) พบว่าในมันสำปะหลังมี Zn (สังกะสี) Mg (แมกนีเซียม) Fe (เหล็ก) Ca (แคลเซียม) Na (โซเดียม) K (โพแทสเซียม) ส่วน Cu (ทองแดง) Ni (นิกเกิล) และ Pb (ตะกั่ว) ไม่พบ แสดงให้เห็นว่าในสับสเตรทกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลอง อาจมีชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่จำเป็นสำหรับเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ในการชักนำให้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างเพียงพอ จึงไม่จำเป็นต้องเติมเพิ่มซึ่งการเติมเพิ่มในปริมาณมากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรที่มีการเติมเกลืออนินทรีย์ชนิดอื่น และชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลืออนินทรีย์) ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

แหล่งเกลืออนินทรีย์ ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมัน)	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
ชุดควบคุม	223.06[a]
แมกนีเซียมซัลเฟต	220.96[a]
แคลเซียมคลอไรด์	217.27[a]
โซเดียมคลอไรด์	221.03[a]
แมกนีเซียมซัลเฟต + แคลเซียมคลอไรด์	223.94[a]
แมกนีเซียมซัลเฟต + โซเดียมคลอไรด์	222.82[a]
แคลเซียมคลอไรด์ + โซเดียมคลอไรด์	221.50[a]
แมกนีเซียมซัลเฟต + แคลเซียมคลอไรด์ + โซเดียมคลอไรด์	221.47[a]

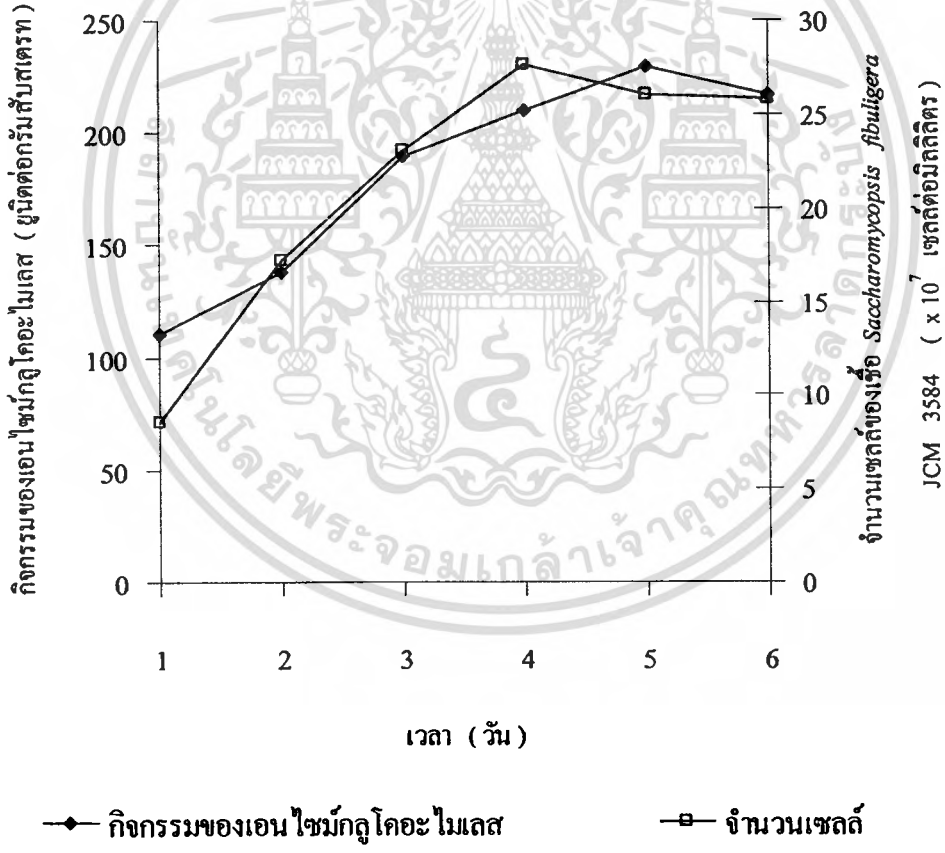
กำหนดให้ [a] ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับแคลเซียม คลอไรด์ ($MgSO_4$ + $CaCl_2$) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมเกลืออนินทรีย์ ดังนั้นจึงควรเลือกชุดควบคุม เพื่อใช้สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูงใกล้เคียงกันและยังเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตด้วย

4.4 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 เป็นระยะเวลา 6 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Gogoi *et. al.* (1987) รายงานผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ST 2 พบว่าการหลั่งของเอนไซม์อะไมเลสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเริ่มหลั่งในช่วงท้ายของระยะการเจริญ (exponential phase) และต่อเนื่องไปถึงช่วงเริ่มต้นของระยะการเจริญคงที่ (early stationary phase)

Shimada *et. al.* (1998) รายงานผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 พบว่าจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง และในวันที่ 2 จะเป็นช่วงที่เชื้อมีระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) แต่เซลล์ยังคงผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อไป จนถึงวันที่ 5 เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสูงอยู่

De mot and Verachtert (1985) รายงานผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 พบว่าการย่อยแป้งจะมีอัตราเร็วในช่วงแรกของระยะการเจริญ (exponential phase) ซึ่งในตอนแรกมีปริมาณกลูโคสในอาหารมาก ในช่วงนี้จะมีปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสปริมาณต่ำ อาจเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตออกมายังคงเกาะอยู่กับเซลล์ยีสต์ (cell-bound activity) ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่วัดได้มีค่าต่ำในช่วงแรกของกระบวนการย่อยสลายแป้ง กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะเพิ่มขึ้นหลังช่วงระยะการเจริญ (exponential phase) ของเซลล์

4.5 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.5.1 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.5.1.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (crude enzyme) มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ จากผลการทดลองพบว่าระดับความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 50-70 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 48.54 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 4.31 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) เท่ากับ 11.27 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ค 17 สอดคล้องกับรายงานของ Sukhumavasi *et. al.* (1975) รายงานผลการตกตะกอนลำดับส่วนของเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงที่สุดคือ ร้อยละ 50 – 70 และ De mot and Verachtert. (1985) รายงานผลการตกตะกอนลำดับส่วนของเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลสสูงที่สุดคือร้อยละ 40-80 จากนั้นทำการทดลองแบ่งระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงร้อยละ 50-70 ให้มีความละเอียดมากขึ้น โดยนำสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (crude enzyme) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 1,701.75 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 60.04 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 28.35 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มาทำการตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 60 และร้อยละ 70 พบว่าระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุดคือร้อยละ 60 ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 18.42 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.68 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 27.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน

ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (ร้อยละ)
เอนไซม์สกัด	150	1,701.75	60.04	28.35	1	100
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 60	15	18.42	0.68	27.06	0.95	1.08
อัลตราฟิวเตรชัน	20	22.57	0.57	39.60	1.40	1.33

จากนั้นนำตะกอนของสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากการตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 60 มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยนำมากรองผ่านเยื่อกรองที่คัดขนาดตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ขนาด 30,000 ดาลตัน (Amicon Regenerated Cellulose Membranes : 30,000 molecular weight cut off) นำสารละลายส่วนที่อยู่ด้านบนมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน พบว่าหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันแล้ว เอนไซม์มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 22.57 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.57 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 39.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิตที่ได้ร้อยละ 1.33 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.40 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ เบญจพร (2542) รายงานผลการตกตะกอนลำดับส่วนของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงที่สุดคือ ร้อยละ 60 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 7.74 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิตที่ได้ร้อยละ. 55.55 และมีความบริสุทธิ์ 17.20 เท่า

Marlida *et. al.* (2000) รายงานผลการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 135 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิตที่ได้ร้อยละ 27 และมีความบริสุทธิ์ 1.4 เท่า

Martins-Spencer and van Uden (1979) รายงานผลการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Lipomyces kononenkoae* CBS 5608 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิตที่ได้ร้อยละ 64 และมีความบริสุทธิ์ 1 เท่า

Sukhumavasi *et. al.* (1975) รายงานผลการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibiligera* Y1 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 50-70 พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 8.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

De mot and Verachtert. (1985) รายงานผลการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-80 พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 12.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิตที่ได้ร้อยละ 97.1 และมีความบริสุทธิ์ 1.9 เท่า

Wilson and Ingledew (1982) รายงานผลการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces alluvius* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 236.3 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิตที่ได้ร้อยละ 95.6 และมีความบริสุทธิ์ 1.71 เท่า

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีหลายวิธี การนำสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (crude enzyme) มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำมาผ่านเครื่องอัลตราฟิวเตรชัน เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำให้เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สรุปว่าการนำสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 60 และนำไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน สามารถทำให้เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเล็กน้อย ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยการใช้เชื้อยีสต์จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำกว่าการใช้เชื้อรา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ใช้ทั่วไปในทางการค้า เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เอนไซม์บางส่วนอาจเสียสภาพไปในระหว่างทำการทดลอง ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีค่าต่ำลง ซึ่งเอนไซม์

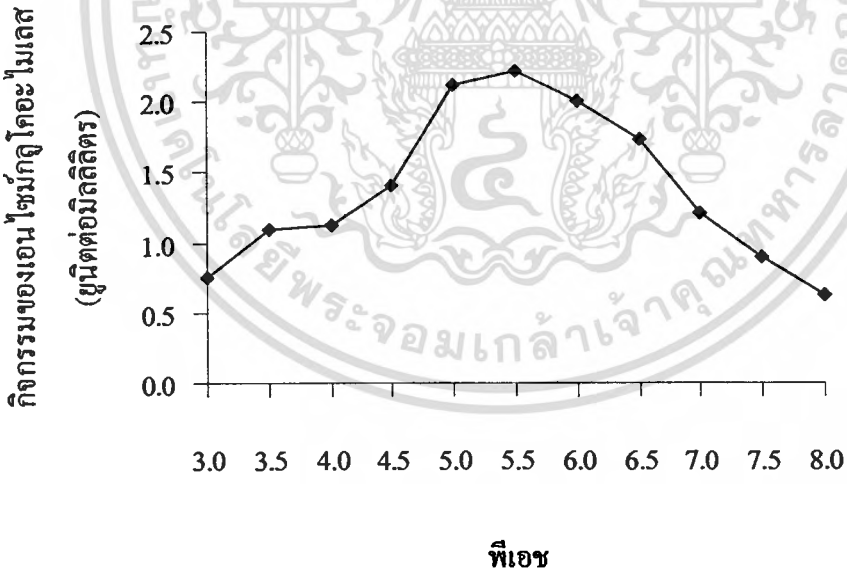
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคอะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้ สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นได้โดยการนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี เช่น เซฟลาเด็ก จี-25 (Sephadex G-25) ดีอีเอดี-เซฟลาเด็ก เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) จะทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้ไปศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อไป

4.5.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.5 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 2.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่พีเอช 5.0 6.0 6.5 4.5 7.0 4.0 3.5 7.5 3.0 และ 8.0 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.12 2.01 1.73 1.41 1.21 1.13 1.10 0.89 0.76 และ 0.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางภาคผนวก ค 13 เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจากพีเอช 5.5 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเริ่มลดลง จนถึงพีเอช 8.0 ซึ่งมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดคือ 0.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Sukhumavasi *et. al.* (1975) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งในประเทศไทย พบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 5.5 Futatsugi *et. al.* (1993) รายงานผลของพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส I จากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 เท่ากับ 5.5 Hostinova (2002) รายงานผลของพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* สายพันธุ์ KZ และ IFO 0111 เท่ากับ 5-6 และ 5.5 ตามลำดับ De mot and Verachtert (1985) รายงานผลของพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I จากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 เท่ากับ 5.0-5.6 Marlida (2003) รายงานผลของพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. เท่ากับ 5.5 Nguyen *et. al.* (2002) รายงานผลของพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 เท่ากับ 4.5-6.6 โดยปกติช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะอยู่ในช่วง 4.4-5.6 De mot and Verachtert (1987) รายงานว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อยีสต์และรามีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงพีเอช 4-6 De mot (1990) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4.0-6.5

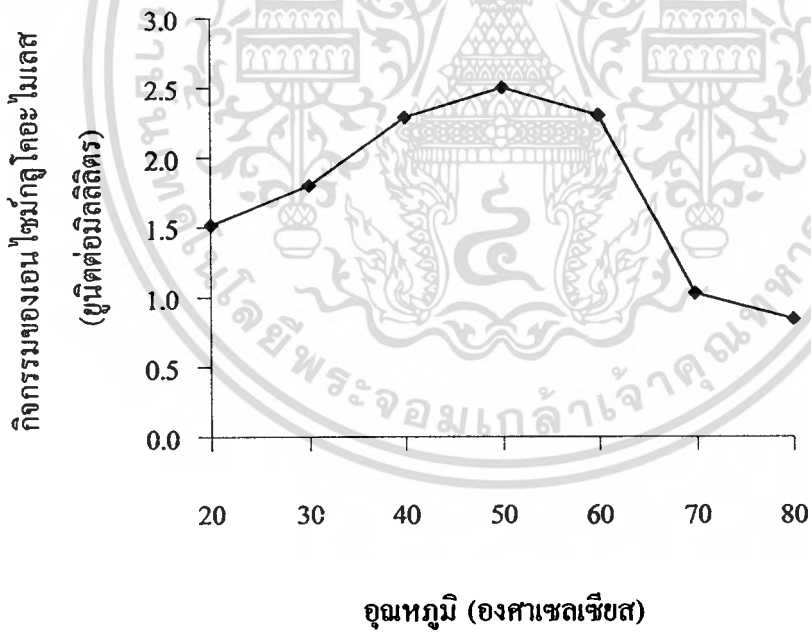
4.5.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 2.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 60 40 30 20 70 และ 80 มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.30 2.29 1.80 1.52 1.03 และ 0.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางภาคผนวก ค 14 เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเริ่มลดลง โดยหลังจากอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนถึงอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดคือ 0.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.13

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ เบญจพร (2542) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส Hostinova (2002) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* KZ อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส Kato

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et. al. (1976) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* R1 อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส De mot and Verachtert (1985) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส II จากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส Singh and Soni (2001) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* HS-3 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส Martin and van Uden (1979) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Lipomyces kononenkoae* CBS 5608 เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส Simoes-Mendes (1984) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Schwanniomyces alluvius* เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส Mase *et. al.* (1996) รายงานผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Acremonium* sp. YT-78 เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ De mot (1990) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส

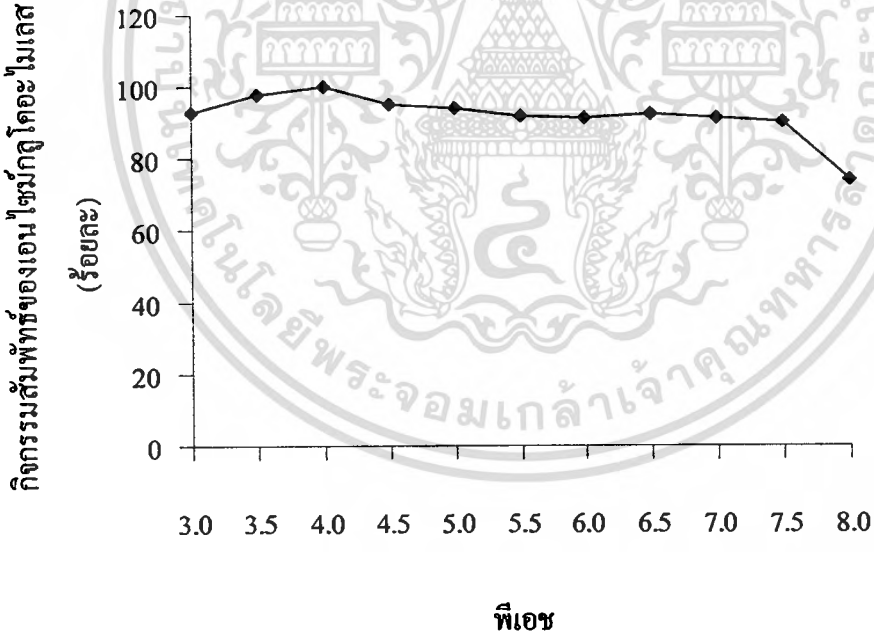


รูปที่ 4.13 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.4 ผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการทดลองเมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ในพีเอช 3.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตามพีเอชและอุณหภูมิที่ได้จากขั้นตอนการหาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ผลการทดลองแสดงดังตารางในภาคผนวก ค 15 พบว่าที่พีเอช 4.0 เอนไซม์มีความคงตัวสูงสุด มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 100 รองลงมาคือที่พีเอช 3.5 4.5 5.0 3.0 6.5 5.5 6.0 7.0 7.5 และ 8.0 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เท่ากับ ร้อยละ 97.74 95.05 93.87 92.58 92.15 91.94 91.29 90.86 90.11 และ 73.66 ตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าในช่วงพีเอช 3.0 ถึง 7.5 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอยู่ในช่วงร้อยละ 90-100 ซึ่งถือว่ามีความคงตัวสูง และที่พีเอช 8.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลดลงต่ำสุดคือร้อยละ 73.66 ดังแสดงในรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 แสดงผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ เบญจพร (2542) รายงานผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 3.0-7.0 De mot and Verachtert (1985) รายงานผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าที่พีเอช 3.5 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส I และ II จากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 ยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์แต่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ Martin and van Uden (1979) รายงานผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Lipomyces kononenkoae* CBS 5608 พบว่ามีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-6.5 Marlida *et. al.* (2000) รายงานผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. พบว่ามีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 3.0-7.0 Sukhumavasi *et. al.* (1975) รายงานผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งในประเทศไทย พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-9.0 และ Fossi *et. al.* (2005) รายงานผลการศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ทนอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ BA_3 ซึ่งแยกได้จากดินที่ทำการเพาะปลูกมันสำปะหลัง พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 3.0-8.0 เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

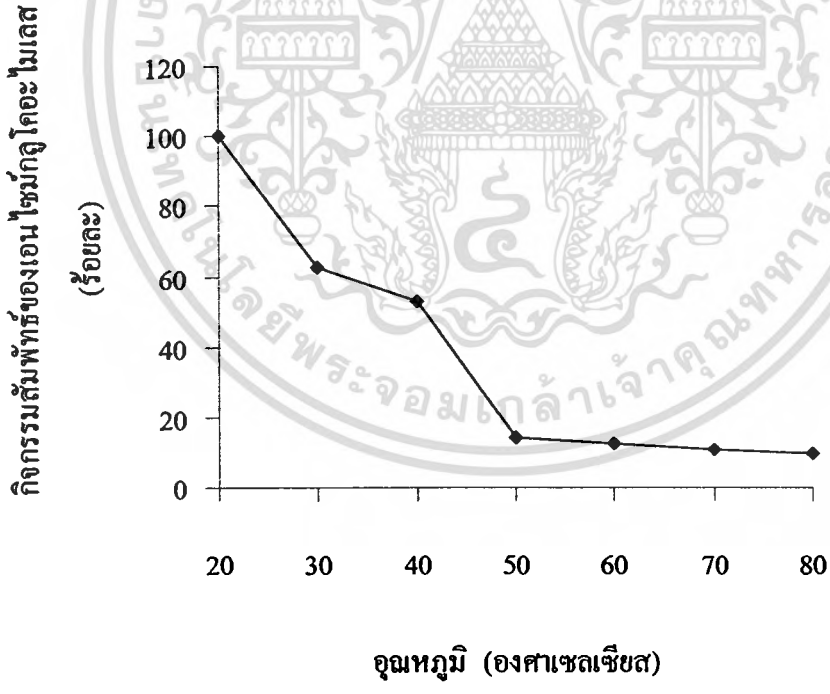
4.5.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการทดลองเมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ในพีเอช 4.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตามพีเอชและอุณหภูมิที่ได้จากขั้นตอนการหาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ผลการทดลองแสดงดังตารางในภาคผนวก ค 16 พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวสูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 100 รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 70 และ 80 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เท่ากับ ร้อยละ 62.39 52.70 13.97 12.74 10.91 และ 9.79 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะลดลงเหลือประมาณร้อยละ 10 และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำสุดคือร้อยละ 9.79 ดังแสดงในรูปที่ 4.15

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ เบญจพร (2542) รายงานผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย พบว่าเมื่อทำการบ่มเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ที่ได้จะมีความคงตัวลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยจะมีความคงตัวสูงอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และจะถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป Yongsmith *et. al.* (2000) รายงานว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Monascus* sp. KB9 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ข้าวจ้าวเป็นสับสเตรท และ Mase *et. al.* (1996) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. YT-78 มีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส และ Fossi *et. al.* (2005) รายงานผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากดินที่ทำการเพาะปลูกมันสำปะหลัง พบว่าเอนไซม์จะมีความคงตัวลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยในช่วงอุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียส เอนไซม์อะไมเลสยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความคงตัวจะลดลง แนวโน้มของผลการศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ จะมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับความคงตัวต่อความร้อนของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Bacillus licheniformis* ซึ่งโดยปกติเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราและยีสต์จะไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูง ยกเว้นในสายพันธุ์ที่มีการปรับแต่งทางพันธุกรรม



รูปที่ 4.15 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลัง ซึ่งใช้เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่ามีปริมาณแป้งร้อยละ 18.95 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.93 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.03 โปรตีนร้อยละ 1.04 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 7.10

จากการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 พบว่า ในสูตรอาหารที่ 5 ซึ่งมีการใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทร่วมกับการเติมสารละลายเกลือแร่ และยูเรียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งเติมเพียงบางองค์ประกอบ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 229.44 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 พบว่าการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ปรับปริมาณความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นร้อยละ 70 เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วน 0.5 : 5 (ปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ทำการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 229.14 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

ส่วนการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งเกลืออนินทรีย์ และการคัดขนาดกากมันสำปะหลัง พบว่าในสูตรอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอน แหล่งเกลืออนินทรีย์ และสูตรอาหารที่ทำการคัดขนาดกากมันสำปะหลัง ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการให้สภาวะดังกล่าว ดังนั้นจึงไม่เติมแหล่งคาร์บอน แหล่งเกลืออนินทรีย์ และไม่ทำการคัดขนาดกากมันสำปะหลัง เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 พบว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของเชื้อ และจะผลิตเอนไซม์ได้มากในช่วงที่เชื้ออยู่ในระยะการเจริญคงที่ (stationary phase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้ โดยนำเอนไซม์ (crude enzyme) มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 60 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน โดยกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 30,000 ดาลตัน พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 22.57 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.57 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 39.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิตที่ได้ร้อยละ 1.33 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.40 เท่า เมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้พบว่า มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 5.5 ตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ต่อพีเอชต่างๆ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง คือเอนไซม์ยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 90-100 ในช่วงพีเอช 3.0-7.5 และเอนไซม์จะมีความคงตัวลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเหลือเพียงร้อยละ 13.97

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้เมื่อนำมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย หากต้องการให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นอาจนำเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนอื่นๆ อีกเช่น นำไปผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี (Wilson and Ingledew, 1982) และการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้ไปใช้ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมของคุณสมบัติของเอนไซม์กับสภาวะของงานด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ. 2546. **เทคโนโลยีของแป้ง.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้า.

ทรงศักดิ์ จำปาวะดี. 2545. **โภชนศาสตร์สัตว์ประยุกต์.** สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอน เจอร์นัล พับลิเคชัน.

นิทรรศการมันสำปะหลังและการแปรรูปผลิตภัณฑ์. 2540. นิทรรศการมันสำปะหลังและการแปรรูปผลิตภัณฑ์ ระหว่างวันที่ 26-28 มิถุนายน 2540. กรุงเทพฯ : อักษรสยามการพิมพ์.

เบญจพร บัวบาน. 2542. การผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอ็นไซม์ทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรา วีระกะลัส. 2541. **เอนไซม์.** กรุงเทพฯ : ด่านสุทธาการพิมพ์.

พีรพจน์ นิติพจน์ และกฤตพล สมมาตย์. 2547. การประเมินคุณค่าทางโภชนะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องของผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง อาหารพลังงาน และอาหารหยาบในหลอดทดลอง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2544. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์.

มุกดา ฐิตะสุต. 2527. **สารชีวโมเลกุล.** กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. **ราวิทยาเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2001. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : พิมพ์ดี.

โสภณ สินธุประมา. 2523. **มันสำปะหลัง.** กรุงเทพฯ : งานทะเบียนและประมวลสถิติ กองแผนงานและวิชาการ.

A.O.A.C. 1975. **Official Methods of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** Washington. D.C. : The Association of Official Analytical Chemistry.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A.O.A.C. 1980. **Official Methods of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** 13th ed. Washington. D.C. : The Association of Official Analytical Chemistry.

A.O.A.C. 1990. **Official Methods of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** 14th ed. Washington. D.C. : The Association of Official Analytical Chemistry.

Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. 2000. **Yeasts : Characteristics and Identification.** 3th ed. United Kingdom : United Kingdom at The University Press.

Bergmann, F. W., Abe, J. and Hizukuri, S. 1988. "Selection of Microorganisms which Produce Raw-starch Degrading Enzymes." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 27 : 443-446.

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

Byong, H. L. 1996. **Fundamentals of Food Biotechnology.** New York : VCH Publishers.

Campos, L and Felix, C. R. 1995. "Purification and Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea.*" **American Society for Microbiology.** 61(6) : 2436-2438.

Cherry, Md. H. M., Hossain, T. and Anwar, M. N. 2004. "Extracellular Glucoamylase from the Isolate *Aspergillus fumagatus.*" **Pakistan Journal of Biological Sciences.** 7(11) : 1988-1992.

Crabb, W. D. and Colin. M. 1997. "Enzymes Involved in The Processing of Starch to Sugars." **Tibtech September.** 15 : 349-352.

De mot, R. 1990. **Conversion of Starch by Yeasts.** *In* Yeast Biotechnology and Biocatalysis. New York : Marcel Dekker. pp. 173-175.

De mot, R. and Verachtert, H. 1985. "Purification and Characterization of Extracellular Amylolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum.*" **Applied and Environmental Microbiology.** 50(6) : 1474-1482.

De mot, R. and Verachtert, H. 1987. "Purification and Characterization of Extracellular α-amylase and Glucoamylase from the Yeast *Candida antarctica* CBS 6678." **European Journal of Biochemistry.** 164 : 643-654.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substance." **Analytical Chemistry.** 28(3) : 350-356.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P. and Srinivasulu, B. 2002. "Optimization of Process Parameters for Glucoamylase Production Under Solid State Fermentation by A Newly Isolated *Aspergillus* species." **Process Biochemistry.** 38 : 615-620.

Fogarty, W. M. and Kelly, C. T. 1990. **Microbial Enzymes and Biotechnology.** 2nd ed. New York : Elsevier science.

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 Journal of Biotechnology.** 4(1) : 14-18.

Futatsugi, M., Ogawa, T. and Fukuda, H. 1993a. "Purification and Properties of Two Froms of Glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera.*" **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 76(6) : 521-523.

Futatsugi, M., Ogawa, T. and Fukuda, H. 1993b. "Scale-Up of Glucoamylase Production by *Saccharomycopsis fibuligera.*" **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 76(5) : 419-422.

Godfrey, T. and West, S. 1996. **Industrial Enzymology.** 2nd ed. New York : The Macmillan Press.

Gogoi, B. K., Bezbaruah, R. L., Pillai, K. R. and Baruah, J. N. 1987. "Production, Purification and Characterization of an α-amylase Produced by *Saccharomycopsis fibuligera.*" **Journal of Applied Bacteriolohgy.** 63 : 373-379.

Hayasida, S. and P. G. Hor. 1981. "Raw Starch Digestion Glucoamylase Productivity of Protease Less Mutant from *Aspergillus awamori* var kawachi." **Agricultural and Biological Chemistry.** 45(2) : 2675-2681.

Hostinova, E. 2002. "Amylolytic Enzyme Produced by the Yeast *Saccharomycopsis fibuligera.*" **Biologia, Bratislava,.** 57 : 247-251.

Kato, K., Kuswanto, K., Banno, I., and Harada, T. 1976. "Identification of *Endomycopsis fibuligera* isolated from Ragi in Indonesia and properties of its crystalline glucoamylase." **Journal of Fermentation Technology.** 54 : 831-837.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Li, D. C., Yang, Y. J., Peng, Y. L. and Shen, C. Y. 1998. "Purification and Characterization of Extracellular Glucoamylase from the Thermophilic *Thermomyces lanuginosus*." **Mycological Research.** 102 : 568-572.

Lineback, D. R. and Baurmann, W. E. 1970. "Properties of a Glucoamylase from *Aspergillus phoenicis*." **Carbohydrate Research.** 14 :341-353.

Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiatman, S. and Ramakrishna, S. V. 1985. "Engineering Aspects of Solid State Fermentation." **Enzyme Microbiology Technology.** 7 : 258-265.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. "Protein Measurement with the Folin-ciocaiteu' s Phenol Reagent." **Journal of Biological Chemistry.** 193 : 265-275.

Marlida, Y., Saari, N., Hassan, Z., Radu, S. and Bakar, J. 2000. "Pulification and Characterization of Sago Starch-degrading Glucoamylase from *Acremonium* sp. Endophytic Fungus." **Food Chemistry.** 71 : 221-227.

Mase, T., Masumiya, Y., Mori, S. and Matsuura, A. 1996. "Purification and Characterization of a Novel Glucoamylase from *Acremonium* sp. YT-78." **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 81(4) : 347-350.

Molony, A. P., O'Rorke, A., Considine, P. J. and Coughlan, M. P. 1984. "Enzymatic Saccharification of Sugar Beet Pulp." **Biotechnology and Bioengineering.** 26 : 714-718.

Navaratnam, P., Arasaratnam, V., Mahendran, S. and Balasubramaniam, K. 1996. "Formulation of Medium and Recycling of Biomass for Glucoamylase Production by *Botryodiplodia theobromae*." **Process Biochemistry.** 31(1) : 77-80.

Nelson, N. J. 1944. "Photometric Adeptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose." **Journal of Biological Chemistry.** 153 : 375-380.

Nguyen, Q. D., Rezessy-Szabo, J. M., Claeyssens, M., Stals, I. and Hoschke, A. 2002. "Purification and Characterization of Amylolytic Enzymes from Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626." **Enzyme and Microbial Technology.** 31 : 345-352.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oboh, G. and Akindahunsi, A. A. 2003. "Biochemical Changes in Cassava Products (Flour & Gari) Subjected to *Saccharomyces cerevisae* Solid Media Fermentation." **Food Chemistry.** 82 : 599-602.

Padonou, W., Mestres, C. and Nago, M. C. 2005. "The Quality of Boiled Cassava Roots : Instrumental Characterization and Relationship with Physicochemical Properties and Sensorial Properties." **Food Chemistry.** 89 : 261-270.

Pandey, A. 1991. "Effect of Particle Size of Substrate on Enzyme Production in Solid-State Fermentation." **Bioresource Technology.** 37 : 169-172.

Pandey, A. 1995. "Glucoamylase Research: An Overview." **Starch/Starke.** 47(11) : 439-445.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., and Moham, R. 2000. " Review Advances in Microbial amylases." **Biotechnology and Applied Biochemistry.** 31 : 135-152.

Raimbault, M. 1998. **General and Microbiological aspects of Solid Substrate Fermentation.** [Online]. Available : http://www. ejb.org.

Ramadas, M., Holst, O. and Mattiasson, B. 1996. "Production of Amyloglucosidase by *Aspergillus niger* Under Different Cultivation Regimens." **World Journal of Microbiology Biotechnology.** 12 : 267-271.

Scopes, R. K. 1978. **Technique for protein purification.** *In* Techniques in The Life Science : Technique and Enzymes Biochemistry. Amterdam : Elesevier/North-Holland Biochemical Press.

Selvakumar, P., Ashakumary, L. and Pandey, A. 1998. "Biosynthesis of Glucoamylase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation using Tea Waste as The Basis of A Solid Substrate." **Bioresource Technology.** 65 : 83-58.

Shimada, A., Koda, T. and Nakamura, I. 1998. Concanavalin A-Agarose Gel System Capable of Accumulating Extracellular Glucoamylase Produced by Immobilized *Saccharomycopsis fibuligera*." **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 85(5) : 542-545.

Simoes-Mendes, B. 1984. "Pulification and Characterization of the Extracellular Amylases of the Yeast *Schwanniomyces alluvius*." **Canadian Journal of Microbiology.** 30 : 1163-1170.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, H. and Soni, S. K. 2001. "Production of Starch-gel Digesting Amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in Solid State Fermentation." **Process Biochemistry.** 37 : 453-459.

Soni, S. K., Kaur, A. and Gupta, J. K. 2003. "A Solid State Fermentation Based Bacterial α-amylase and fungal Glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of Wheat Starch." **Process Biochemistry.** 39 : 185-192.

Spencer-Martins, I. and van Uden, N. 1979. "Extracellular Amylolytic System of the Yeast *Lipomyces kononenkoae*." **European Journal of Applied Microbiology.** 6 : 241-250.

Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K. and Oates, C. G. 2000. "Processing of Cassava Waste for Improved Biomass Utilization." **Bioresource Technology.** 71 : 63-69.

Sukhumavasi, J., Kato, K., and Harada, T. 1975. "Glucoamylase of a Strain of *Endomycopsis fibuligera* Isolated from Mould Bran (Look pang) of Thailand." **Journal of Fermentation Technology.** 53(8) : 559-565.

Van der Maarel, M. et. al. 2002. "Properties and Applications of Starch-converting Enzymes of The α-amylase Family." **Journal of Biotechnology.** 94 : 137-155.

Wayman, M. and Parekh, S. R. 1990. **Biotechnology of Biomass Conversion.** London : The Institute of Biology.

Wilson, J. J. and Ingledew, W. M. 1982. "Isolation and Characterization of *Schwanniomyces alluvius* Amylolytic Enzymes." **Applied and Environmental Microbiology.** 44(2) : 301-307.

Yang, S. S. and Wang, J. Y. 1999. "Protease and Amylase Production of *Streptomyces rimosus* in Submerged and Solid State Cultivations." **Botanical Bulletin of Academia Sinica.** 40 : 259-265.

Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C. and Budda, N. 2000. "Color Mutants of *Monascus* sp. KB9 and their Comparative Glucoamylases on Rice Solid Culture." **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** 10 : 263-272.

Zadrazil, F. and Brunnert, H. 1981. "Investigations on Physical Parameters Important for the SSF of Straw by White Rot Fungi." **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.** 11 : 183-188.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและการเตรียมสารในการวิเคราะห์

1. สูตรอาหาร Yeast extract malt extract broth (YM)

ประกอบด้วย

กลูโคส	10	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร : ทำการละลายส่วนผสมดังกล่าวในน้ำกลั่น คนให้ละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

2.1 สารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) พีเอช 3.0-3.5 ตามวิธีของ Gomori (1955)

สารละลาย ก : โซเดียมซิเตรท ($C_5H_5O_7Na_3$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

(ชั่งโซเดียมซิเตรท จำนวน 2.101 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย ข : ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

(ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 5.365 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

วิธีการ

ผสมสารละลาย ก ปริมาตร X มิลลิลิตร และสารละลาย ข ปริมาตร Y แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ดังพีเอชที่แสดง

X มล. ของสารละลาย ก	Y มล. ของสารละลาย ข	พีเอช
39.8	10.2	3.0
30.7	19.3	4.0
24.3	25.7	5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดอะซิเตรตบัฟเฟอร์ (acitate buffer) พีเอช 4.0-5.5 ตามวิธีของ Stoll และ Blanchard (1990)

สารละลาย ก : โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

(ชั่งโซเดียมอะซิเตต จำนวน 1.64 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย ข : กรดอะซิติก (acitic acid) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

(ชั่งกรดอะซิติก จำนวน 1.144 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น)

วิธีการ

ผสมสารละลาย ก ปริมาตร X มิลลิลิตร และสารละลาย ข ปริมาตร Y แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้อะซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ดังพีเอช ที่แสดง

X มล. ของสารละลาย ก	Y มล. ของสารละลาย ข	พีเอช
50	30	4.0
50	25	4.5
50	10	5.0
50	8	5.5

2.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 6.0-8.0 ตามวิธีของ Gomori (1955)

สารละลาย ก : ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

(ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 3.12 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย ข : โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

(ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.7H_2O$) 5.365 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

ผสมสารละลาย ก ปริมาตร X มิลลิลิตร และสารละลาย ข ปริมาตร Y มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ดังพีเอช ที่แสดง

X มล. ของสารละลาย ก	Y มล. ของสารละลาย ข	พีเอช
87.7	12.3	6.0
39.0	61.0	7.0
5.3	94.7	8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารละลายเกลือแร่

ตามวิธีของ Futatsugi et. al. (1993)

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	0.5	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

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

วัสดุอุปกรณ์

1. กระทงอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
3. โถดูดความชื้น (desicator)
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
5. คีมจับ (forceps)

วิธีวิเคราะห์

1. อบกระทงอะลูมิเนียมในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระทงออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิของกระทงเย็นลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง และไม่ควรปล่อยให้กระทงอยู่ในโถดูดความชื้นนานเกิน 2 ถึง 3 ชั่วโมง

2. ชั่งน้ำหนักของกระทง (W1) จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่แน่นอน โดยมีผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งแต่ละครั้งไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม จดบันทึกไว้

3. ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในกระทงที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (W2) ประมาณ 1 ถึง 2 กรัม เขย่ากระทงเบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างแผ่กระจายทั่วกระทงแล้วนำไปอบในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

4. นำกระทงตัวอย่างออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิเย็นลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

5. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการอบแล้วพร้อมกระทง (W3) จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่แน่นอน โดยมีผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งแต่ละครั้งไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม จดบันทึกไว้

6. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{W2 - W3}{W2 - W1} \times 100$$

เมื่อ W1 หมายถึง น้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียม (กรัม)

W2 หมายถึง ผลรวมของน้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียมและน้ำตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W3 หมายถึง ผลรวมของน้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียมและน้ำตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Ramadas et. al. (1996)

สารเคมี

1. สารละลายน้ำแป้งเตรียมโดยละลายแป้ง (soluble starch) น้ำหนัก 1 กรัม ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดแล้วทำให้เย็น
2. โซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0
3. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรแล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ฟีนอล 2 กรัม โพแทสเซียมโซเดียมตาร์เตรท 200 กรัม และโซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 200-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองโดยเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองและเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในรูปภาคผนวก ข 1

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เติมสารละลายน้ำแป้งเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ในการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในหน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตภายใต้สภาวะอาหารเหลว มีหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร

กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = ไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากปฏิกิริยา / ระยะเวลาในการบ่ม x ปริมาตรเอนไซม์

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตภายใต้สภาวะอาหารแข็ง มีหน่วย ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)

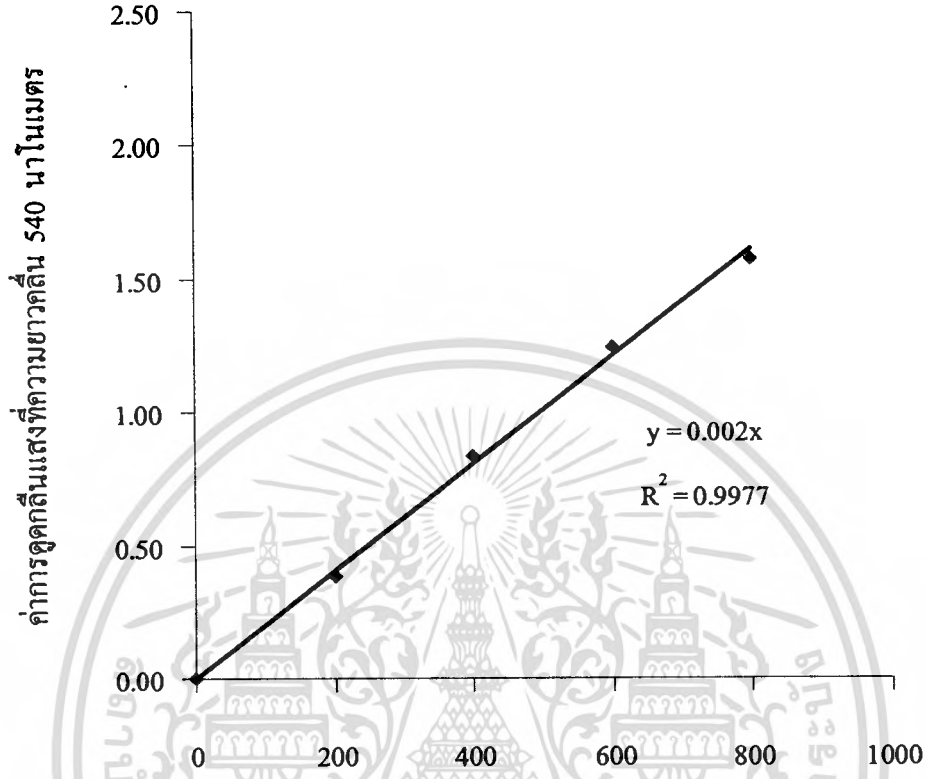
= กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลว x (ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด + ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมัก) / น้ำหนักสับสเตรท

โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะการทดลอง

การคำนวณปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมัก

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการเก็บตัวอย่างทุกวัน (เก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 2-6) มาหาปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมักโดยวิเคราะห์ความชื้นตามวิธีของ (A.O.A.C. 1990) ในภาคผนวก ข โดยคำนวณเป็นร้อยละความชื้น (ร้อยละของน้ำที่เหลือจากการหมัก) จากนั้นนำค่าร้อยละที่ได้ไปเปรียบเทียบกับร้อยละความชื้นของกากมันสำปะหลัง แสดงดังตารางที่ ค (ภาคผนวก ค) จากนั้นคำนวณเป็นปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมัก ซึ่งการหาปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมักต้องทำควบคู่ไปกับการทดลองทุกครั้งตลอดงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข 1 แสดงกราฟมาตรฐานของกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry et. al., 1951)

สารเคมี

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

โซเดียมโพแทสเซียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$)

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)

Folin-Ciocalteu reagent

สารละลาย ก

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 2.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ข

ละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาเทรต จำนวน 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ค

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร**สารละลาย ง**

ผสมสารละลาย ก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลาย ข ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและสารละลาย ค ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน (ควรเตรียมสารผสมนี้เมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent

นำสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (ควรเตรียมสารละลายนี้เมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin

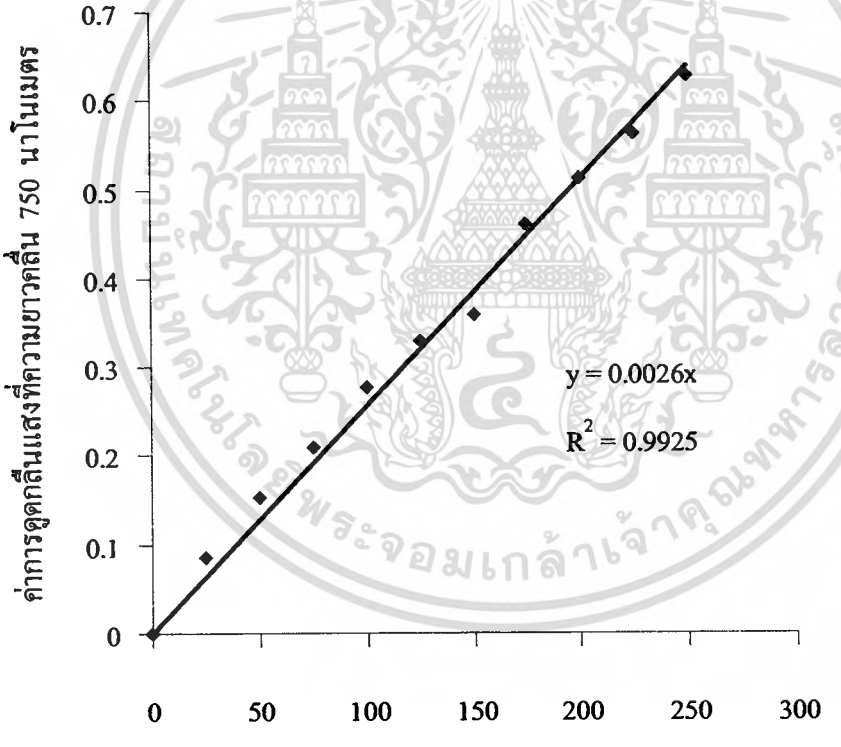
เตรียมสารละลาย bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วดูดสารละลาย bovine serum albumin แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลาย ง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และค่าความเข้มข้นของสารละลาย bovine serum albumin มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปภาคผนวก ข 2

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร เติมสารละลาย ง ลงไปปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 750 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin



รูปที่ ข 2 แสดงกราฟมาตรฐานของอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Kjeldahl Method (A.O.A.C., 1980)

สารเคมี

1. ของผสมตัวเร่ง (catalyst mixture) ประกอบด้วย
   Anhydrous potassium sulfate (K_2SO_4) 3.5 กรัม และ Anhydrous copper sulfate ($CuSO_4 5H_2O$) 0.4 กรัม โดยน้ำหนัก (เป็นเม็ดสำเร็จรูป)
2. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง methyl red, methylene blue และ bromcresol green
3. กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (conc. H_2SO_4)
4. กรดบอริคความเข้มข้นร้อยละ 4 (4% H_3BO_3)
5. กรดซัลฟิวริคความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (0.1 N H_2SO_4)
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (40% NaOH)

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ชั่งตัวอย่างเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งจำนวน 1.0 กรัม บนกระดาษกรอง แล้วพับกระดาษกรองห่อตัวอย่างใส่ลงในขวดย่อย (เตรียม blank โดยทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ไม่มีตัวอย่าง) จากนั้นเติมตัวเร่งผสมระหว่างโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต (เป็นเม็ดสำเร็จรูป) ลงไป 1 เม็ด ใส่ glass beed ลงไป 5-10 เม็ด (เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงขณะย่อย) แล้วเติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นลงไป 25 มิลลิลิตร ทำการย่อยด้วยเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ถ่ายสารละลายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างขวดย่อยด้วยน้ำกลั่นแล้วเทรวมลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เปิดสวิทซ์เครื่องกลั่น และเปิดก๊อกน้ำที่หล่อเย็นเครื่องควบแน่น แล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว นำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกลั่นไล่แก๊สแอมโมเนีย (NH_3) ให้ผ่านคอนเดนเซอร์ นำฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (ซึ่งบรรจุกรดบอริคความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ลงไป 2 หยด) ไปรองรับ NH_3 ที่ถูกกลั่นไล่ออกมาทางปลายท่ออีกด้านหนึ่งของคอนเดนเซอร์ เมื่อเครื่องดำเนินการกลั่นเสร็จเรียบร้อยแล้วให้นำสารละลายในฟลาสก์ (ซึ่งมีส่วนผสมระหว่างกรดบอริคและ NH_3) ไปไตเตรทกับกรดซัลฟิวริคความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดสิ้นสุดจะได้สารละลายเป็นสีม่วงอ่อน จากนั้นนำค่าปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้จริงไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนตามสูตรการคำนวณด้านล่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$\text{โปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{1.40 \times (A-B) \times N \times F^{*}}{W}$$

A = ปริมาตรของกรดที่ใช้ติเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรของกรดที่ใช้ติเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการติเตรท (นอร์มัล)

F^{*} = ค่าโปรตีนแฟคเตอร์

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

หมายเหตุ ค่าโปรตีนแฟคเตอร์ที่นิยมใช้กันมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์หาโปรตีนในอาหาร คือ 6.25*

5. การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (A.O.A.C., 1975)

สารเคมี

สารละลายกรดไฮโดรคลอริค (HCl) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

วิธีวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

นำตัวอย่างเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งที่ผ่านการอบแห้งแล้วตามวิธีการทดลองในข้อ 1 ใส่ในกระทงอะลูมิเนียมแล้วนำมาอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในโถดูดความชื้นจนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งตัวอย่างจำนวน 0.5 กรัมใส่ใน ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 19.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารผสมตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1994)

$$\text{ปริมาณแป้ง (กรัม)} = 0.9 \times \text{ปริมาณกลูโคส}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1994)

สารเคมี

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)

โซเดียมโพแตสเซียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)

ไดโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)

แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)

กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)

การเตรียม copper reagent

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 71 กรัม และโซเดียมโปแตสเซียมทาเทรต จำนวน 40 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร (คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน เติมโซเดียมซัลเฟต จำนวน 180 กรัม ลงไปแล้วคนจนละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง

การเตรียม Nelson reagent

ละลายเกลือแอมโมเนียมโมลิบเดท จำนวน 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ลงไป คนให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออก

การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายกลูโคสแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร เติม copper reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปในภาคผนวก ข 3

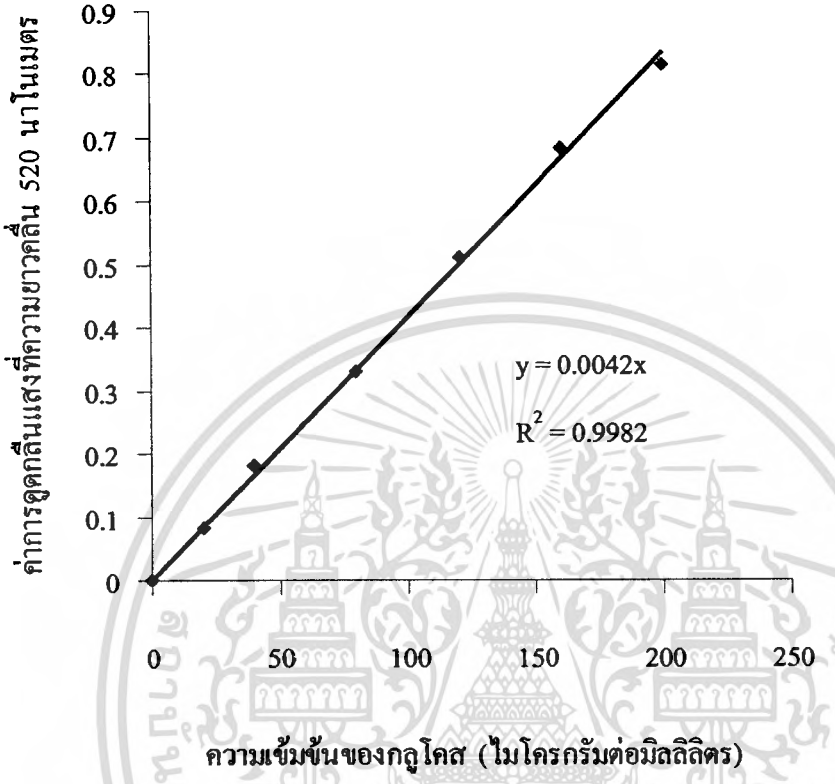
การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งที่ผ่านการอบแห้งแล้วตามวิธีการทดลองในข้อ 1 ใส่ในกระทงอะลูมิเนียมแล้วนำมาอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในโถดูดความชื้นจนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยเขย่าสารสกัดทุก ๆ 30 นาที กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 541 จากนั้นดูดสารสกัดปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ดูดสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร เติม copper reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที (ทำชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นแทน) ทำให้เย็นลงทันทีโดยการแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเติม Nelson reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข 3 แสดงกราฟมาตรฐานของกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามวิธี Phenol-sulphuric (Dubois et. al., 1956)

สารเคมี

สารละลายฟีนอล (C_2H_5OH) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายกลูโคสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ตามลำดับ เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สารละลายตัวอย่างเข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงดังรูปในภาคผนวก ข 4

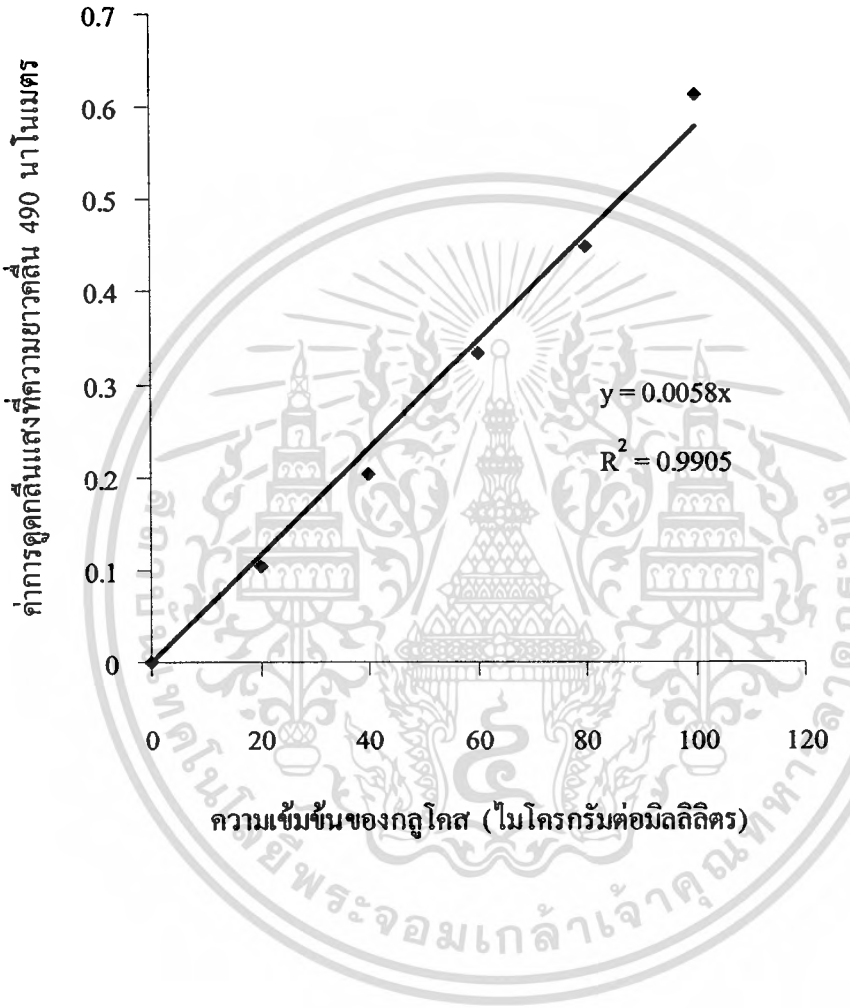
การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งที่ผ่านการอบแห้งแล้วตามวิธีการทดลองในข้อ 1 ใส่ในกระทงอะลูมิเนียมแล้วนำมาอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในโถดูดความชื้นจนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยเขย่าสารสกัดทุก ๆ 30 นาที กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 541 จากนั้นดูดสารสกัดปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน) เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าสารผสมตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่ออีกเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐานกลูโคส และคำนวณออกมาเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข 4 แสดงกราฟมาตรฐานของกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูล

ตารางที่ ค 1 แสดงปริมาณของร้อยละความชื้นของกากมันสำปะหลัง ตามอัตราส่วนของน้ำหนักกากมันสำปะหลังต่อปริมาตรน้ำกลั่น ตามวิธีของ (A.O.A.C., 1990)

อัตราส่วนของกากมันสำปะหลังต่อน้ำกลั่น (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ร้อยละความชื้น
1 : 0.0	7.10
1 : 0.5	34.13
1 : 1.0	52.93
1 : 1.5	62.45
1 : 2.0	68.52
1 : 2.5	73.04
1 : 3.0	77.52
1 : 3.5	78.65
1 : 4.0	81.25
1 : 4.5	82.77
1 : 5.0	84.04
1 : 5.5	85.30
1 : 6.0	86.75
1 : 6.5	87.10
1 : 7.0	88.52
1 : 7.5	89.48
1 : 8.0	90.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2 ผลของการเปรียบเทียบทางสถิติขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

สูตรอาหาร	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
1	15.45	39.54	66.47	84.83	105.93	93.33	79.58
2	52.59	113.94	169.91	204.75	206.47	192.54	184.06
3	49.19	114.11	168.26	208.06	210.97	199.71	190.19
4	48.31	120.11	174.43	202.28	212.99	217.14	195.08
5	56.47	124.71	180.59	216.16	229.44	216.54	194.02

ตารางที่ ค 3 แสดงผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ปริมาณกล้าเชื้อ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
ร้อยละ 5	160.45	187.24	225.13	226.63	220.02
ร้อยละ 10	179.60	194.09	222.53	234.85	207.82
ร้อยละ 15	176.33	207.64	220.14	210.29	211.14
ร้อยละ 20	175.02	209.08	213.72	198.68	201.80
ร้อยละ 25	168.40	193.13	204.91	201.56	187.95

ตารางที่ ค 4 แสดงผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
ชุดควบคุม	114.11	168.26	208.06	210.97	199.71
แอมโมเนียมซัลเฟต	148.34	187.73	190.42	213.73	194.66
แอมโมเนียมคลอไรด์	142.30	189.39	199.27	211.57	195.33
แอมโมเนียมไนเตรต	163.41	175.73	192.51	208.54	199.73
ยูเรีย	170.41	183.22	209.66	224.51	202.32
เปปโตน	164.31	168.43	181.76	191.52	184.80
ยีสต์สกัด	134.22	176.00	186.59	195.12	188.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 5 แสดงผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ความเข้มข้น (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
ร้อยละ 0.05	116.10	137.60	173.89	182.09	181.51
ร้อยละ 0.10	156.99	191.14	215.29	219.68	207.00
ร้อยละ 0.15	159.66	211.25	219.36	224.36	183.60
ร้อยละ 0.20	154.99	214.12	212.15	215.58	196.47
ร้อยละ 0.30	163.88	204.71	205.73	216.47	204.25

ตารางที่ ค 6 แสดงผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ความชื้นเริ่มต้น	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
ร้อยละ 50	73.86	146.18	157.38	170.05	159.81
ร้อยละ 60	161.13	193.98	206.46	214.73	214.36
ร้อยละ 70	169.58	213.49	217.15	230.00	223.43
ร้อยละ 80	73.32	106.43	86.98	80.46	71.57
ร้อยละ 90	52.74	53.33	53.51	61.93	56.23

ตารางที่ ค 7 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

แหล่งคาร์บอน (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
ชุดควบคุม	161.24	210.22	219.49	223.37	220.12
กลูโคส	155.23	207.84	212.51	214.64	211.53
ซูโครส	152.69	212.50	215.76	216.76	212.75
แป้ง (soluble starch)	148.97	214.83	217.22	227.12	213.82
ฟรุกโทส	147.22	206.84	213.22	217.70	205.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 8 แสดงผลของขนาดกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ขนาดกากมัน	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
(ไมโครเมตร)	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
ชุดควบคุม	170.60	193.76	223.07	227.47	223.90
เล็กกว่า 80	154.89	203.43	214.06	222.50	212.96
80-500	171.83	214.34	226.44	218.73	208.46
500-850	172.72	213.70	221.55	228.29	229.89
850-1700	156.84	189.51	194.15	190.20	180.63

ตารางที่ ค 9 แสดงผลของอัตราส่วนของปริมาตรเกลือแร่ต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

อัตราส่วนเกลือแร่ต่อกากมัน	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
(ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมัน)	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
0.50 : 5	143.33	190.93	211.25	217.94	194.07
0.75 : 5	108.16	159.13	174.43	201.59	192.88
1.00 : 5	70.09	115.43	150.73	165.36	158.33
1.25 : 5	47.38	78.18	127.67	147.57	147.70
1.50 : 5	34.45	52.54	108.19	115.57	123.22

ตารางที่ ค 10 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

อุณหภูมิ	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
(องศาเซลเซียส)	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
20	95.77	141.78	163.25	189.32	180.85
25	132.26	176.46	187.27	209.58	188.45
30	165.68	201.86	216.50	225.16	192.50
35	134.55	175.28	186.40	198.25	171.78
40	89.25	125.10	130.93	95.07	72.54
50	6.26	4.96	4.39	3.98	3.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 11 แสดงผลของชนิดเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

แหล่งเกลืออนินทรีย์	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)				
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
ชุดควบคุม	104.91	139.90	196.52	223.06	207.43
แมกนีเซียมซัลเฟต	105.34	137.57	194.46	220.97	211.87
แคลเซียมคลอไรด์	99.06	128.82	203.47	217.27	208.24
โซเดียมคลอไรด์	52.21	82.96	193.28	221.03	215.64
แมกนีเซียมซัลเฟต + แคลเซียมคลอไรด์	75.65	123.87	200.42	223.94	212.78
แมกนีเซียมซัลเฟต + โซเดียมคลอไรด์	85.82	132.05	201.85	222.82	213.83
แคลเซียมคลอไรด์ + โซเดียมคลอไรด์	101.88	139.50	199.05	221.50	220.16
แมกนีเซียมซัลเฟต + แคลเซียมคลอไรด์ + โซเดียมคลอไรด์	108.69	136.29	201.07	221.47	201.21

ตารางที่ ค 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

เวลา (วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)	จำนวนเซลล์ของ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 (x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
1	110.08	8.5
2	138.15	17.2
3	189.94	23.1
4	210.29	27.5
5	229.14	26.1
6	216.82	25.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 13 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
3.0	0.76
3.5	1.10
4.0	1.13
4.5	1.41
5.0	2.12
5.5	2.22
6.0	2.01
6.5	1.73
7.0	1.21
7.5	0.89
8.0	0.63

ตารางที่ ค 14 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
20	1.52
30	1.80
40	2.29
50	2.50
60	2.30
70	1.03
80	0.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 15 ผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

พีเอช	กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ร้อยละ)
3.0	92.58
3.5	97.74
4.0	100.00
4.5	95.05
5.0	93.87
5.5	91.94
6.0	91.29
6.5	92.15
7.0	90.86
7.5	90.11
8.0	73.66

ตารางที่ ค 16 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ร้อยละ)
20	100.00
30	62.39
40	52.70
50	13.97
60	12.74
70	10.91
80	9.79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 17 ผลของการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างหยาบ

ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (ร้อยละ)
เอนไซม์สกัด	318	3,773.85	634.69	5.95	1	100
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ						
0-30	20	73.14	21.72	3.37	0.62	1.94
30-50	20	43.57	18.06	2.41	0.41	1.15
50-70	20	48.54	4.31	11.27	1.89	1.29
70-90	20	27.87	3.09	9.02	1.52	0.74

ตารางที่ ค 18 ผลของการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* JCM 3584 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละเอียด

ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (ร้อยละ)
เอนไซม์สกัด	150	1,701.75	60.03	28.35	1	100
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว						
ร้อยละ 60	15	18.42	0.68	27.06	0.95	1.08
ร้อยละ 70	15	16.32	0.82	19.85	0.70	0.96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตารางที่ ง 1 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว) ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน (Chambers, 1993)

ความเข้มข้นเริ่มต้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0°C)	ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0°C) กรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร											
	20	30	40	50	60	70	75	80	85	90	95	100
0	10.7	16.6	21.9	29.5	36.6	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7
10	5.4	11.1	17.1	23.6	30.5	37.9	41.8	45.8	50.0	54.4	58.9	63.6
20	0	5.6	11.5	17.7	24.4	31.6	35.4	39.2	43.3	47.5	51.9	56.5
30		0	5.7	11.9	18.4	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5
40			0	5.9	12.2	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4
50				0	6.1	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3
60					0	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3
70						0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75							0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80								0	3.3	6.8	10.4	14.1
85									0	3.4	6.9	10.6
90										0	3.4	7.1
95											0	3.5
100												0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกาญจนา ทวีการ เกิดเมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2523 ที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร จากมหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้