การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

Glucoamylase Production from Agricultural Wastes by *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

สุขใจ ชูจันทร์ และศุภร เกียรติมานะโรจน์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง กรุงเทพฯ 10520

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 โดยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์เป็นซับสเตรตสำหรับผลิตเอนไซม์ ได้แก่ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดคือ 179.32 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตเมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นซับสเตรตภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นซับสเตรต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ยูเรียที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ปรับความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรต ร้อยละ 60 ใช้กากมันสำปะหลังโดยไม่คัดขนาด อัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมคือ 1 : 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 พบว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 โดยการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นไปพร้อมๆ กับการเจริญของเชื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเท่ากับ 185.49 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต

คำสำคัญ : กลูโคอะไมเลส วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

This research is about production of glucoamylase of *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 under the solid state fermentation using agricultural wastes (potato waste, rice bran and cassava waste) as substrates. Different substrates were studied to optimize the best substrate and the results were different. Cassava waste showed the highest glucoamylase activity after incubation for 96 hours at 30^{O}C. The maximum enzyme activity under optimum conditions was 179.32 U/g cassava waste. The optimum conditions were 10% (v/w) inoculum size, 0.15% (w/w) urea as the nitrogen source, 60% moisture content of solid substrate, mixed size substrate particles, the ratio of salt solution to weight of cassava waste was 1/10, and the incubation temperature was 30^{O}C. Moreover, from the studies on cell growth and glucoamylase production by *S. fibuligera* CBS 6310, the results showed that glucoamylase production increasd directly with the increase of cell growth and the activity of glucoamylase was about 185.49 U/g of cassava waste.

Keywords : glucoamylase agricultural wastes

1. บทนำ

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรือแกมมาอะไมเลส (Υ - amylase) หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายแป้งให้เป็นกลูโคส [3] เอนไซม์นี้มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสจากแป้ง เช่น อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสผง อุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสและฟรักโทส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม การผลิตลูกกวาด การทำขนมอบรวมทั้งเบเกอรี่ เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีกว่าน้ำตาลทราย การใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ [13, 25]

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้ง เดกซ์ทรินและมอลโทสให้เป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์มีชื่อเรียกตามระบบว่า exo-1,4-a-D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้ง คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งที่พันธะไกลคอซิดิกที่เป็น แอลฟา -1, 4 และ แอลฟา –1, 6 จากตำแหน่ง non-reducing end ของแป้ง ทีละหน่วยเป็นกลูโคส โดยอัตราการย่อยพันธะแอลฟา-1, 4 ไกลคอซิดิก จะมากกว่าพันธะแอลฟา -1, 6 ประมาณ 15 – 30 เท่า ในระดับอุตสาหกรรมจึงมีการนำเอนไซม์ดีบรานซิงค์ (debranching enzyme) ซึ่งสามารถย่อยพันธะแอลฟา -1, 6 ไกลคอซิดิกมาใช้ร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อให้สามารถย่อยแป้งได้สมบูรณ์เร็วขึ้น [4, 17]

พบเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ทั่วไปในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ แต่แหล่งผลิตเอนไซม์ที่น่าสนใจมากคือ จุลินทรีย์เพราะสามารถผลิตได้ปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ ใช้แหล่งวัตถุดิบได้หลายชนิดและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะใช้เนื้อที่น้อย ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล [1] แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้แก่ *Bacillus stearothermophilus, Clostridium acetobutylicum* และ *Halobactrium sodamense.* [20] เป็นต้น เชื้อรา เช่น *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Amylomyces* sp. และ *Penicillium* sp. [21] และเชื้อยีสต์ เช่น *Endomycopsis capsularis* [15], *Saccharomycopsis fibuligera* [14], *Saccharomyces cerevisiae* [11], *Streptosporangium* sp. และ *Endomycopsis fibuligera* [22]

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการทำเกษตรกรรมเป็นหลัก ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการ เกษตรเป็นจำนวนมาก ดังนั้น การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอนไซม์จะทำให้มีมูลค่าสูงกว่าการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ [4] อีกทั้งการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรยังมีข้อดี คือปราศจากสารพิษและมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว มาใช้เป็นซับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibluligera* CBS 6310 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณมากและสามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ต้นทุนในการผลิตต่ำและยังให้ปริมาณของผลผลิตร่วม เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและออกซิเดสน้อย [14] ซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจอีกทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าได้อีกด้วย

2. วิธีดำเนินการ

2.1 วัตถุดิบ

2.1.1 เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง

เศษเหลือทิ้งมันฝรั่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานผลิตมันฝรั่งทอดกรอบเทสโต้ บริษัทเบอรียุคเกอร์ ฟู้ด จำกัด นิคมอุตสาหกรรมบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

การเตรียมวัตถุดิบทำโดยนำเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งมาอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นบดด้วยเครื่องบดอัตโนมัติแล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงร่อน ให้มีขนาดอยู่ในช่วง 80 – 850 ไมโครเมตร ใส่ในถุงพลาสติกเก็บไว้ในโถดูดความชื้น

2.1.2 กากมันสำปะหลัง

ใช้กากมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังโดย ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแป้งมันอุตสาหกรรม อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา

2.1.3 รำข้าว

ใช้รำข้าวที่ซื้อมาจากร้านค้าย่อยในตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว (YM broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อยู่ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลว YM broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

2.3 การศึกษาเปรียบเทียบซับสเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

โดยใช้ซับสเตรตชนิดต่างๆ ดังนี้ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง รำข้าว กากมันสำปะหลัง และแป้งที่ละลายได้ (soluble starch) ตามลำดับ โดยมีสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 2 : รำข้าว + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 4 : แป้งที่ละลายได้ + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่ (ชุดควบคุม)

ชั่งซับสเตรตจำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก จากนั้นเติมสารอาหารต่างๆ ตามสูตรอาหารดังกล่าวข้างต้น โดยใช้ยูเรียปริมาณร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักซับสเตรต) สารละลายเกลือแร่ ประกอบด้วย โซเดียมไนเตรต 0.5 กรัม โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.05 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.05 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 70 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 ในปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักซับสเตรต) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

2.4 การสกัดและวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ทำการสกัดเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (ซับสเตรต 1 กรัมต่อน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันและเทส่วนผสมจากถุงพลาสติกลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในตู้บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตามวิธีของ Ramadas *et al.* [24]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของซับสเตรต

นำซับสเตรตที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดจากการทดลองที่ 2.3 มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method; [6] ความชื้นโดยวิธี A.O.A.C. [7] น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson-Somogyi [19] น้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol – sulphuric [12] และปริมาณแป้งโดยวิธี A.O.A.C. [5]

2.6 การศึกษาการเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

สูตรที่ 1 : แป้งที่ละลายได้ + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่ (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 : ซับสเตรต + น้ำกลั่น

สูตรที่ 3 : ซับสเตรต + สารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 4 : ซับสเตรต + ยูเรีย

สูตรที่ 5 : ซับสเตรต + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก จากนั้นเติมสารอาหารต่างๆ ตามสูตรอาหารดังกล่าวข้างต้น โดยใช้ปริมาณสารอาหารและสภาวะตามการทดลองในข้อ 2.3 สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.4

2.7 การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยการหมักแบบอาหารแข็งในถุงพลาสติก

ทำการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 และใช้ซับเสตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3

2.7.1 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติมปริมาณสารอาหารและสภาวะตามการทดลองในข้อ 2.3 เติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 ในปริมาณ ร้อยละ 5, 10, 15, 20 และ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักซับสเตรต) ตามลำดับ สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.4

2.7.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

2.7.2.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติมแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย เปปโตน สารสกัดจากยีสต์และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ชุดควบคุม) ในปริมาณร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักซับสเตรต) เติมปริมาณสารอาหารอื่นๆ และสภาวะตามการทดลองในข้อ 2.3 เติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลอง ข้อ 2.3 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักซับสเตรต) ตามลำดับ เติมปริมาณสารอาหารอื่นๆ และสภาวะตามการทดลองในข้อ 2.3 จากนั้น เติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.3 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.2 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ร้อยละ 50 60 70 80 และ 90 ตามลำดับ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

2.7.4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกเติมแหล่งคาร์บอนดังนี้ กลูโคส ซูโครส แป้งที่ละลายได้ ฟรักโทสและไม่เติมแหล่งคาร์บอน (ชุดควบคุม) ตามลำดับในปริมาณ 0.05 กรัม เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.3 เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกเติมแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.1 ในปริมาณร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซับสเตรต) ตามลำดับ เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณที่ได้จาการทดลองข้อ 2.7.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักซับสเตรต) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.3 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.5 การศึกษาขนาดของซับสเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 ตามขนาดต่างๆ ดังนี้ เล็กกว่าหรือเท่ากับ 80, 80-500, 500-850, 850-1700 ไมโครเมตรและไม่คัดขนาด ตามลำดับ จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.2 และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.2 เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.6 การศึกษาอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.2 และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.2 เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วน 1.0 : 10, 1.5 : 10, 2.5 : 10 และ 3.0 : 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักซับสเตรต เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน ตามด้วยการนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ถุงพลาสติก เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.2 เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.6 และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.3 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.8 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

2.7.8.1 การศึกษาชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกเติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.2 และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.2 เติมเกลืออนินทรีย์ ดังนี้ ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ (ชุดควบคุม) แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคอลไรด์ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักซับสเตรต)

เติมสารละลายเกลือแร่ในอาหารในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.6 (ปริมาตรต่อน้ำหนักซับสเตรต) และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.3 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.7 เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม

ชั่งซับสเตรตที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2.2 และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.4.2 เติมเกลืออนินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง 2.7.8.1 ในปริมาณร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักซับสเตรต) ตามลำดับ เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.6 และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.3 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.1 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.7 เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4

2.7.9 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ด้วยการนับจำนวนเซลล์โดยวิธี direct microscopic count โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 2.7.1 ถึง 2.7.8 เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน และศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 2.4

2.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

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

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบซับสเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน (ตารางที่ 3.1) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด ซึ่งกากมันสำปะหลังให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 179.32 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเมื่อใช้เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง รำข้าว และแป้งที่ละลายได้เป็นซับสเตรต โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 128.08, 119.36 และ 140.46 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากกากมันสำปะหลังมีส่วนประกอบคาร์โบไฮเดรตมากกว่าคือมีปริมาณร้อยละ 18 [8] และองค์ประกอบทางเคมีของแป้งจากกากมันสำปะหลังส่วนใหญ่จะประกอบด้วยอะไมโลเพคติน (ร้อยละ 83) ซึ่งย่อยสลายง่ายกว่าอะไมโลส (ร้อยละ 17) [2] ส่วนเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งและรำข้าวมีส่วนประกอบคาร์โบไฮเดรตคือร้อยละ 16.8 และร้อยละ 16 ตามลำดับ [23] ดังนั้นกากมันสำปะหลังจึงเป็นซับสเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสซึ่งใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของซับสเตรตต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ชนิดของซับสเตรต	เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง	กากมันสำปะหลัง	รำข้าวเจ้า	แป้งที่ละลายได้
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	128.08_{b}	179.32_{a}	119.36_{b}	140.46_{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของซับสเตรต พบว่ากากมันสำปะหลังมีปริมาณ โปรตีนทั้งหมดร้อยละ 2.45 ความชื้นร้อยละ 7.10 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.03 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.95 และปริมาณแป้งร้อยละ 18.95

3.3 ผลขององค์ประกอบอาหารสูตรต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อ *S. fubuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักในทุกสูตรอาหาร โดยอาหารสูตรที่ 5 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 186.37 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารอื่นๆ (ตารางที่ 3.2) รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 4 สูตรที่ 3 และสูตรที่ 2 โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 173.11, 170.82 และ 169.70 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตตามลำดับ ทั้งนี้อาหารสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) ซึ่งใช้แป้งที่ละลายได้เป็นซับสเตรตให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำสุด คือ 138.05 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต ดังนั้น ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจึงจำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนและสารละลายเกลือแร่ลงในอาหาร เนื่องจากในกากมันสำปะหลังอาจมีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310

ตารางที่ 3.2 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

สูตรอาหาร	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	138.05_{b}	169.70_{a}	170.82_{a}	173.11_{a}	186.37_{a}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นซับสเตรตภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งในถุงพลาสติก

3.4.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 180.35 ยูนิตต่อกรัมซับเสตรต (ตารางที่ 3.3) ซึ่งมีกิจกรรมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 และ 5 คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 174.93 และ 168.29 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต ตามลำดับ แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารเติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 20 และ 25 ซึ่งมีปริมาณของเอนไซม์เท่ากับ 160.53 และ 155.05 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ellaiah *et al.* [13] ที่ได้ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในปริมาณร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซับสเตรต โดยพบว่าการเติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส สูงสุดโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 153.0 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)	ร้อยละ 5	ร้อยละ 10	ร้อยละ 15	ร้อยละ 20	ร้อยละ 25
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	168.29_{bbc}	180.35_{a}	174.93_{ab}	160.53_{bc}	155.05_{c}

3.4.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.4.2.1 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนทุกสูตรที่ชั่วโมงที่96ของการหมักโดยสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 187.58 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ดังตารางที่ 3.4 โดยสอดคล้องกับ Ellaiah *et al.* [13] ที่ได้รายงานว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซับสเตรตและเช่นเดียวกับ Bertolin *et al.* [9] ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Aspergillus awamori* ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซับสเตรตซึ่งพบว่ายูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ดังนั้น จึงเลือกใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)
แอมโมเนียมซัลเฟต	156.03_{b}
แอมโมเนียมคลอไรด์	150.88_{b}
แอมโมเนียมไนเตรต	151.37_{b}
ยูเรีย	187.58_{a}
เปปโตน	124.77_{c}
สารสกัดจากยีสต์	130.74_{c}
ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ชุดควบคุม)	144.00_{b}

3.4.2.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส

พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างทางสถิติจากอาหารที่เติมยูเรียที่มีความเข้มข้น 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารที่เติมยูเรียที่ความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 3.5) ซึ่ง Ellaiah *et al.* [13] ได้รายงานผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซับสเตรต พบว่าเมื่อใช้ยูเรียที่ร้อยละ 0.1 – 0.15 มีผลทำให้ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Selvakumar [26] ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1248 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากชาเป็นซับสเตรต และพบว่าการเติมยูเรียที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 226 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตภายหลังการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้ยูเรียที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.5 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของยูเรียต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ความเข้มข้นของยูเรีย (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)	ร้อยละ 0.05	ร้อยละ 0.1	ร้อยละ 0.15	ร้อยละ 0.2	ร้อยละ 0.3
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	175.47_{b}	177.21_{a}	182.04_{ab}	164.89_{c}	161.58_{c}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักในอาหารทุกระดับความชื้น โดยสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 และมีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 186.89 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 ดังตารางที่ 3.6 แต่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50, 80 และ 90 ตามลำดับ ซึ่ง Ellaiah *et al.* [13] ได้รายงานว่าความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของซับสเตรตในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ความชื้นที่เพิ่มขึ้นจะช่วยลดความพรุนของซับสเตรตและจำกัดการส่งผ่านออกซิเจน เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเป็นการหมักที่ไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ แต่จะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับซับสเตรต ซึ่งส่งผลต่อการพองตัวของอนุภาคของซับสเตรต จึงจำเป็นต้องปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเข้าไปใช้ประโยชน์จากสารอาหารได้ง่ายขึ้น ดังนั้นจึงเลือกระดับความชื้นเริ่มต้นที่ร้อยละ 60 ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.6 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ปริมาณความชื้นเริ่มต้น	ร้อยละ 50	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ80	ร้อยละ 90
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	140.24_{b}	186.89_{a}	181.93_{a}	98.94_{c}	98.17_{d}

3.4.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส

3.4.4.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิด ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมักโดยอาหารที่เติมแป้งที่ละลายได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด คือ มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 207.79 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต (ตารางที่ 3.7) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังโดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 205.48 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต รองลงมาคืออาหารที่เติมกลูโคส และซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 199.71 และ 198.57 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตตามลำดับ อาหารที่เติมฟรักโทสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำที่สุด ซึ่งแตกต่างจากอาหารที่เติมแป้งที่ละลายได้ อาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน กลูโคส และซูโครส อย่างมีนัยสำคัญโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 182.55 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต ซึ่ง De Mot [10]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รายงานว่า แป้ง กลูโคส มอลโตส และเดร็กทรินซ์ เป็นตัวชักนำในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *A. monospora*, *Debaryomyces polymorphus*, *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, *S. fibuligera* และ *S. capsularis* สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงได้โดยไม่ต้องมีแหล่งคาร์บอนเป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.7 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ไม่เติมแหล่งคาร์บอน	กลูโคส ร้อยละ 0.1	ซูโครส ร้อยละ 0.1	แป้งที่ละลายได้ ร้อยละ 0.1	ฟรักโทส ร้อยละ 0.1
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	205.48_{bb}	199.71_{ab}	198.57_{b}	207.79_{a}	182.55_{c}

3.4.5 ผลของขนาดกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารที่มีขนาดของกากมันสำปะหลังทุกขนาดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังขนาด 81 – 500 ไมโครเมตร ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังขนาด 501-850 ไมโครเมตรและอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังไม่คัดขนาด คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 188.25, 187.03 และ 184.57 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตตามลำดับ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้กากมันสำปะหลังขนาด 851 – 1700 ไมโครเมตรและเล็กกว่าหรือเท่ากับ 80 ไมโครเมตร โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 150.90 และ 179.3 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตตามลำดับ ซึ่งในกรณีการหมักแบบอาหารแข็งขนาดของซับสเตรตที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวและบ่งบอกถึงช่องว่างที่ปริมาณออกซิเจนสามารถส่งผ่านไปถึงเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ Molony *et al.* [18] และ Pandey [22] ได้ศึกษาขนาดของรำข้าวสาลีที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* พบว่าซับสเตรตที่มีขนาดเล็กจะให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าซับสเตรตขนาดใหญ่โดยจะให้กิจกรรมเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสูงสุดในซับสเตรตขนาด 425 – 500 ไมโครเมตร และค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 39.61 และเมื่อลดขนาดของซับสเตรตลงกิจกรรมของเอนไซม์ก็จะลดลงด้วย แต่จากผลการทดลองที่ได้ คือ กากมันสำปะหลังขนาด 81 – 500 ไมโครเมตร, 501 – 850 ไมโครเมตรและกากมันสำปะหลังไม่คัดขนาดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกันมากและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตและไม่เสียเวลาในการคัดขนาดของซับสเตรต จึงเลือกใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นซับสเตรตในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.8 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของขนาดอนุภาคของกากมันสำปะหลังต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ขนาดอนุภาคของกากมันสำปะหลัง (ไมโครเมตร)	เล็กกว่าหรือเท่ากับ 80	81-500	501-850	851-1700	ไม่คัดขนาด
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	179.3_{b}	188.25_{a}	187.03_{a}	150.90_{c}	184.57_{a}

3.4.6 ผลของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอาหารที่เติมสารละลายเกลือแร่ทุกอัตราส่วนได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คืออาหารที่เติมสารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 1 : 10, 1.5 : 10, 2 : 10, 2.5 : 10 และ 3 : 10 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 187.96, 188.51, 188.09, 187.54 และ 187.46 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตตามลำดับ (ตารางที่ 3.9) ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดสารเคมีและลดต้นทุนในการผลิต จึงเลือกใช้อัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ 1 : 10ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่น้อยที่สุดในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.9 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

อัตราส่วน (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)	1.0 : 10	1.5 : 10	2.0 : 10	2.5 : 10	3.0 : 10
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	187.96_{b}	188.51_{a}	188.09_{a}	187.54_{c}	187.46_{a}

3.4.7 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารที่บ่มทุกอุณหภูมิในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักโดยสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 186.91 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ (ตารางที่ 3.10) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Ellaiah *et al.* [13] ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซับสเตรตซึ่งพบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 142 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต และ Soni *et al.* [27] ศึกษาการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส. โดยเชื้อ *Saccharomycopsis capsularis* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะสูงสุดในวันที่ 4 และ 5 ของการหมักซึ่งเป็นช่วงวัฏภาคนิ่งและมีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในช่วง 28 – 32 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.10 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	20	25	30	35	40	50
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)	15.26_{d}	144.30_{b}	186.91_{a}	130.33_{b}	78.87_{c}	7.27_{d}

3.4.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารที่เติมเกลืออนินทรีย์และอาหารที่ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกสูตรอาหาร (ตารางที่ 3.11) ซึ่ง Hang *et al.* [16] ได้รายงานว่า Ca^{2+} จะช่วยรักษาความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ดีขึ้นภายใต้สภาวะที่ควบคุม โดย Ca^{2+} จะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่การเปลี่ยนแปลงของพีเอชมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นเพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมจึงมักมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต หรือฟอสเฟตลงไปด้วยเสมอ และ Vallee *et al.* [28] ได้รายงานว่า Ca^{2+} จะทำหน้าที่เสมือนสารให้ความคงตัวและเป็นโคแฟคเตอร์ให้แก่เอนไซม์เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์จากสภาวะที่รุนแรงต่างๆ ดังนั้นจากเหตุผลดังกล่าวจึงเลือกใช้อาหารที่ไม่มีการเติมเกลืออนินทรีย์ เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตเพื่อการศึกษาต่อไป

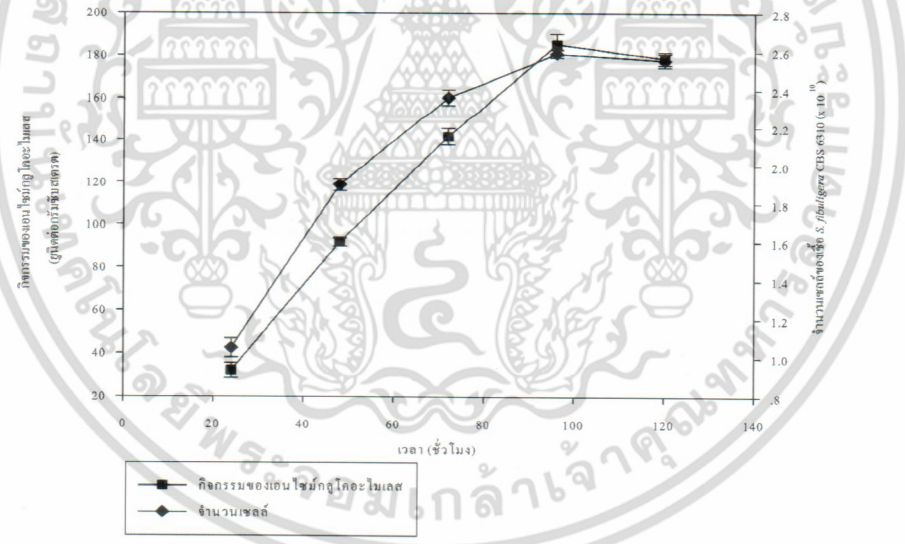
ตารางที่ 3.11 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ชนิดของเกลืออนินทรีย์	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต)
ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ (ชุดควบคุม)	183.79_{a}
แคลเซียมคลอไรด์	184.17_{a}
แมกนีเซียมซัลเฟต	183.55_{a}
โซเดียมคลอไรด์	184.10_{a}
แคลเซียมคลอไรด์ + แมกนีเซียมซัลเฟต	184.80_{a}
แคลเซียมคลอไรด์ + โซเดียมคลอไรด์	182.62_{a}
แมกนีเซียมซัลเฟต + โซเดียมคลอไรด์	183.63_{a}
แคลเซียมคลอไรด์ + แมกนีเซียมซัลเฟต + โซเดียมคลอไรด์	183.63_{a}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ผลของการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

พบว่าเชื้อยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 24 – 48 ของการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก กล่าวคือเชื้อมีการเจริญสูงสุดโดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.51×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะค่อยๆ ลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์ โดยที่ในช่วงต้นๆ ของการหมักเชื้อจะมีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน จนมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเท่ากับ 185.49 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตดังภาพที่ 3.1 ผลของการทดลอง สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของเบญจพร [2] ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. ซึ่งพบว่ามีลักษณะการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคสอะไมเลส โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วยแสดงว่าเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบปฐมภูมิ เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตออกมาในช่วงการเจริญมีส่วนช่วยในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล เพื่อใช้ในการเจริญของเชื้อยีสต์ เชื้อยีสต์จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะวัฏภาคนิ่ง และพบว่าเชื้อยีสต์โดยทั่วไป เช่น *Endomycopsis capsulalis, Endomycopsis fibuligera, Schwanniomyces alluvis* และ *Schwanniomyces castellii* มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะวัฏภาคนิ่ง เช่นกัน



ภาพที่ 3.1 แสดงผลของการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นซับสเตรตและเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) อัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ 1 : 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันกำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าเมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นซับสเตรตจะทำให้เชื้อยีสต์ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 179.32 ยูนิตต่อกรัม ซับสเตรต ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง รำข้าว และแป้งที่ละลายได้เป็นซับสเตรต จากนั้นนำกากมันสำปะหลังมาวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ พบว่ามีแป้งอยู่ ร้อยละ 18.95 น้ำตาลรีดิวซ์ ร้อยละ 0.03 น้ำตาลทั้งหมด ร้อยละ 1.95 โปรตีน ร้อยละ 2.45 ของน้ำหนักแห้งและความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 7.10

ผลการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลังเป็นซับสเตรตและมีการเติมแหล่งไนโตรเจนและสารละลายเกลือแร่ (0.5 มิลลิลิตร) รวมทั้งได้ปรับความชื้นเริ่มต้นให้ได้ร้อยละ 60 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 186.37 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็น ซับสเตรตปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น ร้อยละ 60 โดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน ใช้อัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ต่อซับสเตรตเป็น 1.0 : 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 พบว่ามีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นไปพร้อมกับการเจริญของเชื้อ และจะผลิตเอนไซม์สูงสุด เมื่อการเจริญอยู่ในระยะวัฏภาคนิ่ง คือในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 185.49 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตและมีจำนวนเซลล์ของเชื้อเท่ากับ 2.51×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 พบว่ามีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นไปพร้อมๆ กับการเจริญของเชื้อ และจะผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะวัฏภาคนิ่ง คือในช่วงที่ 96 ของการหมัก โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 185.49 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรตและมีจำนวนเซลล์ของเชื้อเท่ากับ 2.51×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เอกสารอ้างอิง

[1] ดวงพร คันธโชติ. 2530. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์.** สำนักพิมพ์ โอ. เอส พริ้นติ้งเฮ้า, กรุงเทพฯ.

[2] เบญจพร บัวบาน. 2542. การผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[3] ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอ็นไซม์ทางอาหาร.** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

[4] สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2545. **ส่งเสริมเทคโนโลยี : เอนไซม์ทางอุตสาหกรรม.** ปีที่ 28. ฉบับที่ 161 : 91 – 92.

[5] A.O.A.C. 1975. **Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

[6] A.O.A.C. 1980. **Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

[7] A.O.A.C. 1990. **Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

[8] Barker, S.A. and Fleetwood, J.A. 1975. "Studies on *Aspergillus niger* Part VIII. The purification of glucoamylase". **Journal of the American Chemical Society.** 4857 – 4864.

[9] Bertolin, T.E. *et al.* 2003. "Influence of carbon, nitrogen and phosphours on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation". **Bioscience.** 58(9-10) : 708 – 712.

[10] De Mot, R. and Verachtert, H. 1985. "Purification and characterization of extracellular amylolytic enzyme from the yeast *Filogasidium capsuligenum*". **Applied Environmental andMicrobiology**. 50 : 1475 – 1482.

[11] De Mot, R. 1990. Conversion of starch by yeasts. *In* H. Verachtert and R. De Mot (eds). **Yeast : Biotechnology and Biocatalyst.** Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. 163 – 222.

[12] Dobois, M. *et al.* 1956. "Colorimetric method for determination of sugar and related substance". **Analytical Chemisty.** 28 : 350 – 356.

[13] Ellaiah, P. *et al.* 2002. "Optimication of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species" **Process Biochemistry.** 38 : 615 – 620.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[14] Futatsugi, M., Ogawa,T. and H, Fukuda. 1993b. "Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera*". **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 63 : 373 – 379.

[15] Gogoi, B.K., Bezbaruah, R.L., Pilai, K.R. and Baruah, J.N. 1987. "Production, purification and characterization of a - amylase produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. **Journal of Applied Bacteriology**. 63 : 373 – 379.

[16] Hang, Y.D. and Woodams, E.E. 1993. "Themophilic glucoamylase from *Talaromyces flavus*". **Letter and Applied Microbiology**. 17 : 156 – 157.

[17] Klanarong, S. *et al.* 2000. "Processing of cassava waste for improved biomass utilization". **Bioresource Technology.** 71 : 63 – 69.

[18] Molony, A.P., O'Rorke, A., Conidine, P.J. and Coughlan, M.P. 1984. "Enzymatic saccharification of sugae beet pulp". **Journal of Biotechnology and Bioengineering.** 26 : 714 – 718.

[19] Nelson, N. 1944. "Photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose". **Journal Biochemistry.** 153 : 375 – 380.

[20] Pandey, A. 1995. "Glucoamylas research : and overview". **Starch/Starke.** 47 : 439 – 445.

[21] Pandey, A., Nigam, P., Succol, C.R., Roccol, V.T., Singh, D., and Moham, R. 2002. Review Advances in Microbial Amylase" **Biotechnology and Applied Biochemistry.** 31 : 135 – 152.

[22] Pandey, A. and Radhakrishnan, S. 1993. "The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCIM 1245". **Biochemistry**. 28 : 305 – 309.

[23] Potato raw. 2003. [online]. http://www.doggieconnection.com

[24] Ramadas, M., Holst, O. and Mattiasson, B. 1996. "Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regiment". **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 12 : 267 – 271.

[25] Schrickh, M.J., Krave, S.A. and Verdose, C.J. 1993. "Growth and product formation in chemostat and recycling cultures by *Aspergillus niger* N402 and glucoamylase overproducing transformant, provided with multiple copies of the gla A gene." **Journal of General Microbiology.** 139 : 2801 – 2810.

[26] Selvakumar, P., Ashakumary, L. and Pandry, 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 – 85.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[27] Soni, S.K. *et al.* 1996. "Extracellular amylase production by *Saccahromycopsis capsularis* and its evaluation for starch saccharification". **Folia Microbiology.** 41(3) : 243 – 248.

[28] Vallee, B.L. *et al.* 1959. "Metal content of a - amylase of various origins". **Journal Biology and Chemistry.** 231 : 2901 – 2905.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้