สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพดโดย *Aspergillus* sp. REB2

นางสาวณัฏยา ดิลกศรี
นางสาวธราภรณ์ พินิจจันทร์
นางสาวนฤมล ชุมทอง

วพ.
ล63ก
2549

เลขหมู่ 72583
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

.b 11764695
.i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Amylase production from corn starch by *Aspergillus* sp. REB2

Miss Nuthaya Dilogsri

Miss Taraporn Pinichan

Miss Narumon Chumthong

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for

The Degree of Bachelor of Science in Industrial Microbiology

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพดโดย *Aspergillus* sp. REB2	
นักศึกษา	นางสาวณัฏยา	ดิลกศรี
	นางสาวธราภรณ์	พินิจจันทร์
	นางสาวนฤมล	ชุมทอง
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ	ผศ.วีนา ชูโชติ	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพดโดย *Aspergillus* sp. REB2

โดย นางสาวณัฏยา ดิลกศรี

นางสาวธราภรณ์ พินิจจันทร์

นางสาวนฤมล ชุมทอง

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2549

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งข้าวโพด 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1 กรัมต่อลิตร และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีพีเอชเท่ากับ 4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 4,568.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 1,391.67 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อทำการศึกษาการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จาก *Aspergillus* sp. REB2 โดยหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์อะไมเลสสามารถย่อยแป้งที่ละลายน้ำได้ดีที่สุด โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1,053.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที รองลงมาคือแป้งข้าวจ้าวและแป้งมันสำปะหลัง โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 900.00 และ 859.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Amylase production from corn starch by *Aspergillus* sp. REB2
Name	Miss Nuthaya Dilogsri
	Miss Taraporn Pinichan
	Miss Narumon Chumthong
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic year	2006
Special Project Advisor	Assoc.Prof. Nuanphan Naranong

Abstract

The production of amylase by *Aspergillus* sp. REB2 from corn starch as a sole carbon source was studied. The optimum production medium was as follows (g/l) : corn starch, 60.0; yeast extract, 3.0; KH_2PO_4, 1.0; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5; $CaCl_2$, 1.0; $FeSO_4.7H_2O$, 0.5; pH 4. The highest amylase production in shake flasks was 4,568.75 unit/ml on day 3 with the productivity of 1,391.67 unit/ml/day when the flasks were incubated at 30°C in shaker with the shaking speed of 200 rpm. The different types of starch were hydrolyzed by amylase from *Aspergillus* sp. REB2, and the reducing sugar concentrations were determined. From the results, it was found that the highest concentration of reducing sugar was produced from soluble starch, followed by rice starch and cassava starch with respective values of 1,053.33 , 900.00 and 859.44 µg/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่อง การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพดโดย *Aspergillus* sp. REB2 โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้คำแนะนำ แนวทางในการค้นคว้าและจัดทำงานวิจัย รวมทั้งสละเวลาในการแก้ไขและตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มาลีนี ตันติยาภรณ์ ประธานกรรมการ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์วีนา ชูโชติ กรรมการ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์สารเคมี และให้คำแนะนำวิธีการใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน รวมทั้งพี่ๆปริญญาโทที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในทุกๆด้าน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นทั้งกำลังกายและกำลังใจให้กับคณะผู้จัดทำจนกระทั่งก้าวมาถึงวันนี้ได้ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

ณัฏยา ดิลกศรี

ธราภรณ์ พินิจจันทร์

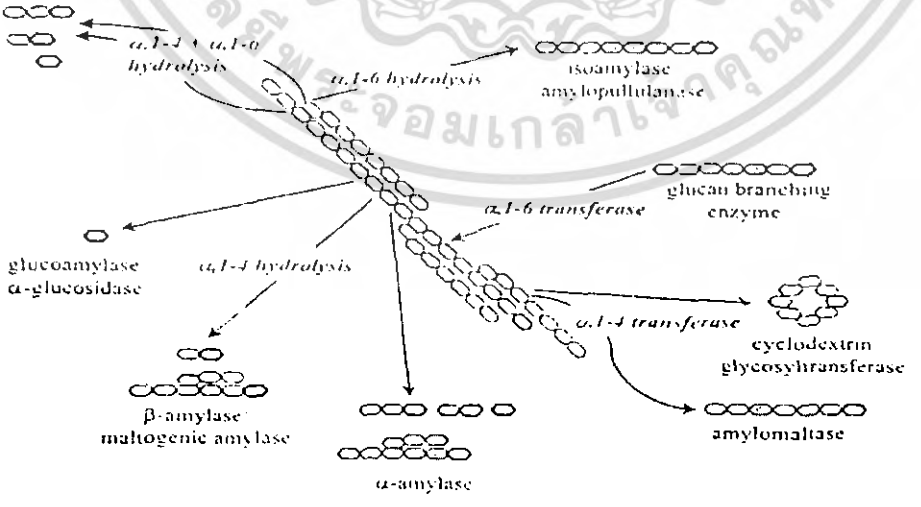
นฤมล ชุมทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง

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



รูปที่ 2.1 แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส

ที่มา : Van der Maarel (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส

คุณสมบัติ	แอลฟาอะไมเลส	เบต้าอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส
กลไกการย่อยแป้ง	ที่กลางโมเลกุลแป้ง (Endo-attack)	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง (Exo-attack)	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง (Exo-attack)
ผลิตภัณฑ์ที่ได้	โอลิโกแซคคาร์ไรด์	มอลโตส	กลูโคส
ความเร็วในการลดลงของความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
ความเร็วในการเปลี่ยนสีเมื่อเกิดปฏิกิริยาสารละลายไอโอดีน	เร็ว	ช้า	ช้า
ปฏิกิริยาที่จุดแยกแขนง	ไม่ย่อยพันธะ α-1,4- ไกลโคซิดิก	ไม่ย่อยพันธะ α-1,6- ไกลโคซิดิก	สามารถย่อยพันธะ α-1,6- ไกลโคซิดิก
ความจำเพาะของพันธะ	α-1,4	α-1,4	α-1,4 α-1,3 α-1,6

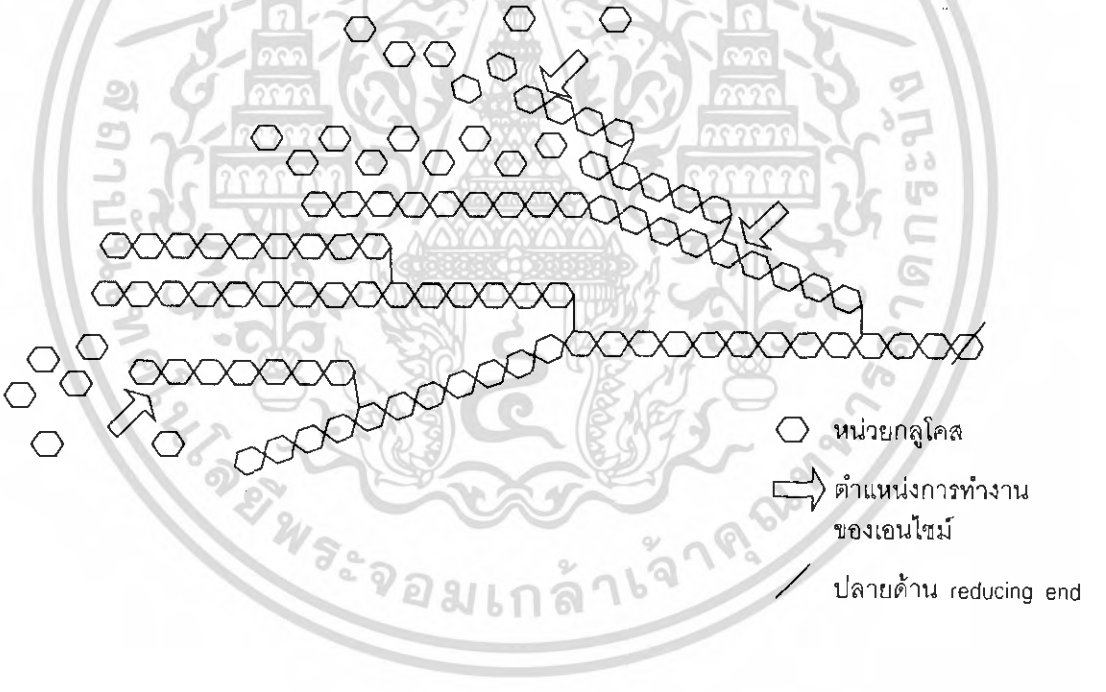
ที่มา : Manjunath และคณะ (1983)

เมื่อพิจารณาตามลักษณะของการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 2.1 จะแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ เอนไซม์ย่อยภายนอก (exo-enzyme) เอนไซม์ย่อยภายใน (endo-enzyme) และเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (debranching enzyme)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 เอนไซม์ย่อยภายนอก (exo-enzyme)

กลูโคอะไมเลส (glucoamylase ; E.C. 3.2.1.3 ; α -1,4 -glucan glucohydrolase) หรือเรียกว่า อะมิโลกลูโคสิเดส (amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของน้ำตาลกลูโคสทั้งพันธะ α-1,4 และพันธะกิ่ง α-1,6 โดยที่การตัดพันธะกิ่งจะเกิดขึ้นช้ากว่าการตัดพันธะ α-1,4 ดังแสดงการทำงานในรูปที่ 2.2 ในการย่อยแป้งให้ได้โมเลกุลของกลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำกิจกรรม เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-110 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 3.5-5 และที่อุณหภูมิ ± 55 องศาเซลเซียส กลูโคอะไมเลสพบในจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus niger* *Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus* spp.

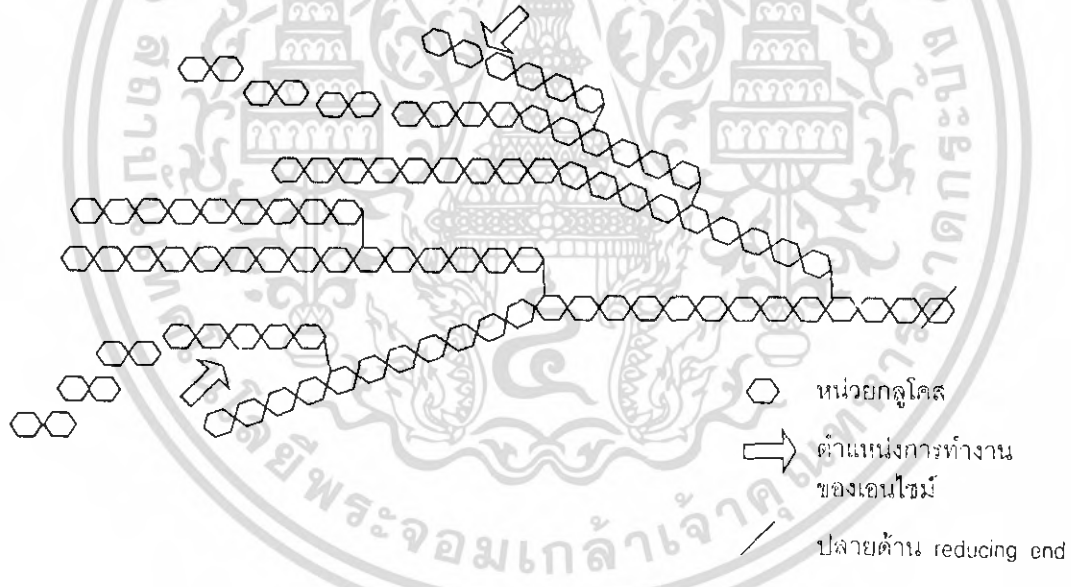


รูปที่ 2.2 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบต้าอะไมเลส (beta-amylase ; E.C. 3.2.1.2 ; α -1,4 - glucan maltohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกโมเลกุลของแป้ง แล้วค่อยตัดจากนอกเข้ามาใน โดยเริ่มจากปลายของอะไมเลสหรืออะไมโลเพกทิน (ปลายด้าน non-reducing end) เอนไซม์จะตัดพันธะ α-1,4 ของโมเลกุลกลูโคสเป็นคู่ๆไป ผลที่ได้จะได้เป็นน้ำตาลมอลโตส แต่เมื่อปฏิกิริยาเข้าใกล้จุดที่เป็นกิ่งก้านหรือพันธะ α-1,6 ของอะไมโลเพกทิน เอนไซม์จะหยุดกิจกรรม ทำให้เหลือโมเลกุลใหญ่ๆไว้มาก ดังแสดงในรูปที่ 2.3 เบต้าอะไมเลสต้องการแคลเซียม ในการทำกิจกรรม เบต้าอะไมเลสพบได้ในพืชชั้นสูง เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และพบได้ในถั่วหรือมั่นฝรั่งหวาน นอกจากนี้ยังสามารถสกัดเอนไซม์เบต้าอะไมเลสได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus Pseudomonas* เอนไซม์จากพืชมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 125-150 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 4-9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส



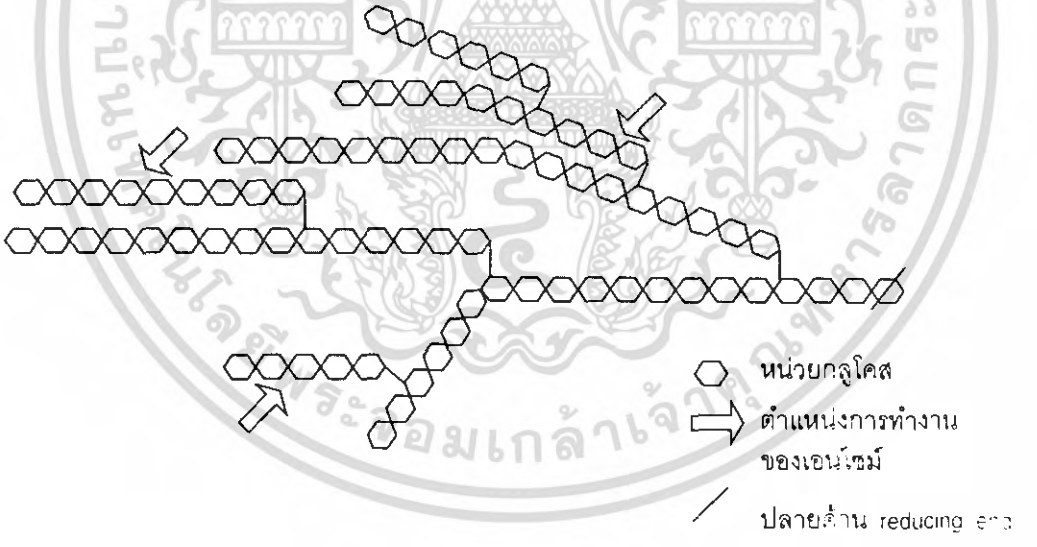
รูปที่ 2.3 การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 เอนไซม์ย่อยภายใน (endo-enzyme)

เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อทางการค้าว่า Termamyl ® และมีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) (ปราณี,2543)แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase ; E.C. 3.2.1.1 ; α -1,4 - glucan glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานในโมเลกุลแป้ง โดยจะตัดพันธะ α-1,4 ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จับอยู่เท่านั้น ไม่สามารถตัดพันธะ α-1,6 ได้ ลักษณะการทำงานเป็นการสุ่มตัดภายใน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 เอนไซม์มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน การทำงานของเอนไซม์ต้องการแคลเซียมร่วมทำกิจกรรม เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5.5-9 และที่อุณหภูมิห้องถึง 115 องศาเซลเซียส แอลฟาอะไมเลส สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ เชื้อรา และแบคทีเรีย ในทางอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะเอนไซม์จากแบคทีเรียซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เมื่อใช้แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสารละลายแป้งจะทำให้ความหนืดและความสามารถในการย้อมติดสีไอโอดีนลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้ reducing power เพิ่มขึ้นอีกด้วย



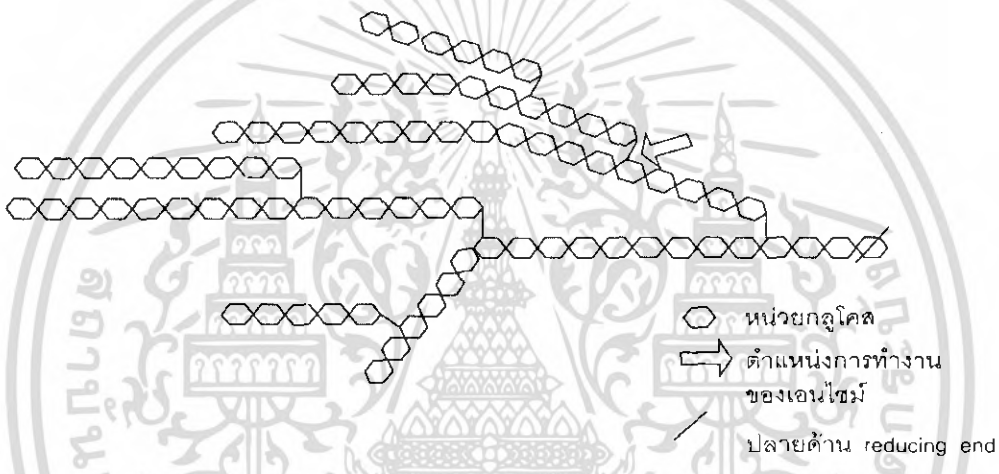
รูปที่ 2.4 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (debranching enzyme)

ไอโซอะไมเลส (isoamylase ; E.C. 3.2.1.68 ; glucogen -6-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยจุดที่เป็นกิ่งก้านของไกลโคเจนและอะไมโลเพกทินได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำกิจกรรม สามารถดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอช 3-4 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้สามารถแยกได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas amyloderamosa*



รูปที่ 2.5 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง
ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

Aspergillus พบในธรรมชาติตามผัก ผลไม้ เจริญได้ดีบนอาหารแทบทุกชนิด มีทั้งประโยชน์และโทษ บางชนิดทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้สิ่งของเครื่องใช้พวกเครื่องหนัง เสื้อผ้าเสียหาย บางชนิดทำให้เกิดโรค ส่วนผลดีเนื่องจากมีเอนไซม์หลายชนิดจึงมีประโยชน์ในอุตสาหกรรม การผลิตกรดต่าง ๆ การทำเบียร์ การทำสารปฏิชีวนะ สำหรับรูปร่างเป็นเส้นใยแขนงและมีผนังกั้น แต่ละส่วนที่กั้นแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน โคนิดิโอฟอร์เกิดจากฟุตเซลล์ (foot cell) โคนิดิโอฟอร์อาจมีผนังกั้นหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ ที่ส่วนปลายของโคนิดิโอฟอร์จะโป่งออกเป็นเวสิเคิล (vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสเตอริกมา (sterigma) ซึ่งอาจมีชั้นเดียวหรือสองชั้นก็ได้ โคนิเดียจะถูกสร้างขึ้นภายในสเตอริกมา โคนิเดียที่สร้างขึ้นภายหลังจะดันโคนิเดียอันแรก ๆ ออกมาและยังติดต่อกันอยู่ จึงเกิดเป็นสายโคนิเดีย โคนิเดียมีสีต่าง ๆ กัน และเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิด ส่วนใหญ่มีสีดำ สีน้ำตาล สีเขียว

Saccharomyces สกุลนี้มีประมาณ 30 ชนิด ที่รู้จักกันดีคือ *Saccharomyces cerevisiae* ใช้ในการทำเบียร์ ไวน์ ขนมปัง ตามธรรมชาติพบในผลไม้สุก ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์รูปไข่ ขนาดความยาว 6-8 ไมโครเมตร กว้าง 5 ไมโครเมตร สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ได้ดิพลอยด์เซลล์จำนวนมาก บางเซลล์เจริญไปเป็นแอสคัส ภายในมี 4 แอสโคสปอร์ เมื่อแอสโคสปอร์หลุดออกจากแอสคัสกลายเป็นแฮพลอยด์เซลล์ ซึ่งจะเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแตกหน่อด้วย (นงลักษณ์และปรีชา, 2544)

จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดอยู่ในคลาสแอสโคไมซีตีส (Class Ascomycetes) ซึ่งคลาสนี้มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดในราคลาสอื่น ๆ ลักษณะสำคัญคือ ไม่มีเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้เลย เส้นใยมีผนังกั้น ผนังจะมีช่องว่างตรงกลางให้ออร์แกเนลล์และนิวเคลียสติดต่อกันได้ ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารไคติน คลาสนี้บางทีเรียกว่า ราถุง (sac fungi) เพราะสปอร์แบบอาศัยเพศเกิดอยู่ในถุงแอสคัส (ascus) ซึ่งภายในมีแอสโคสปอร์อยู่ (ascospore) จำนวนแอสโคสปอร์อาจมี 4 หรือ 8 สปอร์ ถุงแอสคัสอาจเกิดอยู่ในฟรุตติงบอดี ที่เรียกว่า แอสโคคาร์ป (ascocarp) ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สปอร์จะเกิดที่ปลายไฮฟา เรียกว่า โคนิเดีย ก้านชูโคนิเดียเรียกว่า โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ซึ่งมีรูปร่างต่างกันหลายแบบ ตัวอย่างราในคลาสนี้ เช่น *Neurospora, Claviceps, Aspergillus, Penicillium, Dendrophoma* เป็นต้น (นงลักษณ์และปรีชา, 2544)

2.2.1.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อราเส้นใย

การเจริญเติบโตของราเส้นใยในอาหารแข็ง จะแตกต่างกับการเจริญเติบโตของราเส้นใยในอาหารเหลว โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในถังหมักที่มีใบพัดกวนนั้น เชื้อราจะเพิ่มจำนวนโดยการแตกหักของเส้นใยรา แต่ในบางครั้งเส้นใยของเชื้อราอาจจะรวมกันเป็นกลุ่มทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดลักษณะที่เรียกว่า pellet ซึ่งลักษณะนี้จะเกิดขึ้นกับเส้นใยของเห็ดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ลักษณะ pellet นั้น ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อัตราส่วนของคาร์บอน ต่อ ไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของสปอร์ ใน inoculum อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยราในรูป pellet จะมีความหนืดน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราเจริญเป็นเส้นใย และปัญหาเกี่ยวกับ mixing และ gas transfer ก็จะน้อยกว่าด้วย แต่ปัญหาที่พบในราที่ form pellet ก็คือการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ (โดยทั่วไปจะเกิดโดยวิธี diffusion) ซึ่งอยู่ข้างใน pellet ก็จะขนส่งได้ยากกว่า โดยการเจริญเติบโตของเส้นใยจะเกิดขึ้นที่เส้นใยด้านนอกของ pellet สำหรับการเจริญเติบโตของราเส้นใยในอาหารแข็ง ส่วนของปลายเส้นใยทั้งสองด้านจะมีการเจริญเติบโตยืดออก แต่ทิศทางของการเจริญเติบโตและอัตราการเจริญเติบโตนั้นจะขึ้นอยู่กับสารอาหารและชนิดของสับสเทรต โดยทั่วไปพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารแข็งจะต่ำกว่าอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลวมาก โดยค่าเฉลี่ยของ Doubling time ของราจำพวกเห็ดในอาหารเหลวที่เลี้ยงในถังหมักจะมีค่าประมาณ 4-8 ชั่วโมง ขณะที่ค่า Doubling time ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง จะมีค่าประมาณ 5.5 วัน

2.2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของราเส้นใย

สภาพแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโตของราเส้นใย ตลอดจนคุณภาพของผลผลิต เช่น ชนิดของสับสเทรต พีเอช อุณหภูมิ ฯลฯ สับสเทรตสำหรับ กระบวนการหมักแบบใช้อาหารแข็ง ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ขี้เลื่อย ฟาง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง โดย สับสเทรตเหล่านี้จะมีแหล่งคาร์บอนซึ่งก็คือคาร์โบไฮเดรตเป็นอาหารหลัก ราจะเจริญได้แตกต่างกันบนสับสเทรตแต่ละชนิด สำหรับค่าพีเอช และอุณหภูมิ ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของราเส้นใยเพราะพีเอช และอุณหภูมิจะมีผลต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ โดยทั่วไป พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างเส้นใยรา คือ พีเอชประมาณ 5.5 - 6.0 สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส

2.2.1.3 ข้อดีของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์

แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันนิยมการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณมากๆได้ในระยะเวลาสั้น โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็กจึงใช้พื้นที่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกและผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล และการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการทำได้โดยวิธีการง่ายๆ และใช้เวลาไม่นานนัก และสามารถปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มผลิตได้ง่าย (สมใจ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.4 การคัดเลือกสายพันธ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม (สมใจ ,2537)

- เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเอนไซม์นั้นจะต้องมีความคงตัวทางสายพันธุ์
- ไม่เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรค และไม่สร้างสารพิษ (toxin)
- เชื้อจุลินทรีย์ต้องมีความสามารถในการสร้างผลผลิตซึ่งวัดได้จากความสามารถในการแปลงสับสเทรตไปเป็นผลผลิตต่อหน่วยเวลา
- การเก็บเกี่ยวผลผลิตควรทำได้ง่าย
- เลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสในกระบวนการหมักขนาดใหญ่จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการทำเย็นได้อย่างมาก
- เชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้อาหารราคาถูกหรืออาหารที่ต้องการให้ใช้ได้
- เชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับเครื่องมือที่ใช้และมีความเหมาะสมกับกระบวนการผลิตที่ใช้

2.2.2 กระบวนการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมมี 2 วิธี

2.2.2.1 การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง (Solid state หรือ Koji culture method)

วิธีนี้ใช้ผลิตเอนไซม์เป็นการค้า ที่นิยมใช้เลี้ยงพวกเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย ส่วนผสมของอาหารแข็งประกอบด้วยวัสดุที่เป็นของแข็งแห้งและน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของเชื้อรา อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งส่วนใหญ่ใช้รำข้าวสาลี หรือรำข้าวเจ้าและเสริมอาหารพวกโปรตีน และเกลือที่จำเป็นด้วย รำข้าวที่เติมน้ำและเกลือแร่อาหารเสริม เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำมาผสมกับสปอร์ของเชื้อราจากนั้นเกลี่ยใส่ถาดให้ความหนาประมาณ 5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางเป็นชั้น ๆ ในห้องบ่มเชื้อซึ่งปรับอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการเจริญของเชื้อราและเป็นการป้องกันการปะปนของเชื้ออื่นอีกด้วย บ่มประมาณ 3 วัน จะเห็นเส้นใยของเชื้อราเจริญแทรกเข้าไปอยู่ในอาหารแข็งพร้อมกับการผลิตเอนไซม์ออกมาสูงสุด (ดุษณี, 2534)

งานวิจัยต่าง ๆ ที่มีการกล่าวถึงการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง เช่น

Baysal และคณะ (2003) รายงานว่า การผลิตเอนไซม์α-อะไมเลส ซึ่งเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตและขับออกมาภายนอกเซลล์ จากเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อทำการศึกษาโดยกระบวนการหมักแบบใช้อาหารแข็งและใช้รำข้าวสาลี และ ข้าวแกลบเป็นสับสเทรต จากการทำการวิเคราะห์พบว่าจะได้ผลิตเอนไซม์จะสูงที่สุดเท่ากับ 159,520 และ 21,760 หน่วยต่อกรัมที่สภาวะการหมักที่พีเอช 7 มีความชื้นร้อยละ 30 ทำการบ่มเป็นเวลา 24 และ48 ชั่วโมง เมื่อใช้ขนาดอนุภาค 1000 ไมโครเมตร และเติมหัวเชื้อร้อยละ 20 และขนาดอนุภาค 500 ไมโครเมตร และเดิมหัวเชื้อร้อยละ20 เมื่อใช้รำข้าวสาลี และ ข้าวแกลบเป็นสับสเทรตตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Soni และคณะ (2003) รายงานว่า จากการคัดแยก *Bacillus* sp. AS-1 และ *Aspergillus* sp. AS-2 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ได้ตามลำดับในปริมาณที่มาก โดยใช้อาหารแข็งคือเมล็ดข้าวสาลีในการหมัก เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถ กระตุ้น คงสภาพได้ในช่วงอุณหภูมิและพีเอช ที่กว้าง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะแสดงประสิทธิภาพในการลดความหนืดของแป้งได้ร้อยละ 96 ขณะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสแสดงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ร้อยละ 87 ในสารละลายน้ำแป้งร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถที่จะย่อยแป้งสาลีได้สูงสุดถึงร้อยละ 96

Ramachandran และคณะ (2004) รายงานว่า เชื้อ *Aspergillus orysae* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วยกากของเหลือจากการสกัดน้ำมันมะพร้าว (coconut oil cake) เป็นวัตถุดิบหลัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 1,327 หน่วยต่อกรัมของสับสเทรตแห้ง และเมื่อลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 68 จะสามารถให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส 1,827 หน่วยต่อกรัมสับสเทรตแห้ง เมื่อเติมกลูโคสและแป้งลงในอาหารพบว่าสามารถผลิดเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด 1,911 หน่วยต่อกรัมสับสเทรตแห้ง และเมื่อมีการเติมเปปโตนร้อยละ 1 จะให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดถึง 3,388 หน่วยต่อกรัมสับสเทรตแห้ง

2.2.2.2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว (submerged culture method)

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

- การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบครั้งคราว (batch process)
- การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous process)
- การเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวแบบ static
- การเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวแบบ shake flask
- การเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวแบบ fed-batch

งานวิจัยต่าง ๆ ที่ได้ทำการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว ดังนี้ Mabel และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *A.niger*ในอาหารเหลวจากของเสียในโรงงานอาหาร โดยใช้สายพันธุ์ UO-1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งต่าง ๆ กันและเติมของเสียจากโรงงานเครื่องดื่มและโรงงานเนื้อสัตว์ โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้สูงสุดในอาหารที่เติมของเสียจากโรงงานเครื่องดื่มและโรงงานเนื้อสัตว์เท่ากับ 70.29 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 60.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้สูงสุดในอาหารที่เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเสียจากโรงงานเครื่องดื่มและโรงงานเนื้อสัตว์เท่ากับ 6.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 6.03 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ ค่า COD ของของเสียทั้ง 2 ชนิดลดลงมากกว่า 92 เปอร์เซ็นต์

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลือแร่ รวมทั้งพีเอชและอุณหภูมิ

2.2.3.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการสร้างองค์ประกอบต่าง ๆของเซลล์ ปกติจุลินทรีย์จัดเป็นพวกที่ได้รับพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานก็เป็นแหล่งคาร์บอนไปด้วย โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการนำไปใช้สร้างองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์ (สมใจ ,2547)

2.2.3.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8 -10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป โดยทั่วไปมักจะแบ่งแหล่งไนโตรเจนเป็น 2 ประเภท คือ

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แก๊สแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท เป็นต้น เกลือแอมโมเนีย เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องด้วยแอมโมเนียมไอออน ถูกใช้ไป และเหลือซัลเฟตไอออนไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจจะอยู่ในรูปโปรตีน กรดอะมิโน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน วัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง และรำข้าว เป็นต้น

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดจะต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ การเลือกใช้ไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ว่าสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี (สมใจ, 2547)

2.2.3.3 เกลือของสารอนินทรีย์

จุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และเป็นองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ ซึ่งแร่ธาตุหลักที่สำคัญที่ต้องเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S)แคลเซียม (Ca) และคลอไรด์ (Cl) ส่วนแร่ธาตุรองที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่เล็กน้อย ได้แก่ โคบอลท์(Co) คอปเปอร์(Cu)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหล็ก(Fe) แมงกานีส(Mn) และซิงค์ (Zn) (สมใจ, 2547) แร่ธาตุเหล่านี้ล้วนมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ ซึ่งได้มีการรายงานไว้ในงานวิจัยต่าง ๆ เกี่ยวกับการเติมแร่ธาตุเพื่อเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์

2.2.3.4 พีเอชและอุณหภูมิ

พีเอชเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เนื่องจากมีผลต่อการแตกอิออนของ prototropic group ที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งจะมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเทรต หรือการเร่งปฏิกิริยา บางกรณี พีเอชอาจมีผลทำให้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากการแตกตัวอิออนของผลผลิต ดังนั้นปฏิกิริยาต้องควบคุมพีเอชให้เหมาะสมที่สุด (ปราณี, 2547)

มีการรายงานไว้ในงานวิจัยต่าง ๆ เกี่ยวกับความสำคัญของการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ดังนี้

Carlos และ Meire (2000) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ทนความร้อนสูง โดยใช้ *Bacillus* sp. ซึ่งแยกได้จากดินตัวอย่าง และนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมเกลือแร่และมีแป้งที่ละลายได้เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว การเติมแคลเซียม 10 มิลลิโมลหรือเปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารจะทำช่วยลดระยะ lag period ได้และจะเพิ่มการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส การเดิมกลูโคสลงไปพบว่าจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แสดงว่ากลูโคสมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส และพีเอชในอาหารเริ่มต้นสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์คือ 7 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมเอนไซม์คือ 60 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์จะมีอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อนำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และ จะเหลือ 40 เปอร์เซ็นต์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Cherry และคณะ (2004) รายงานว่าในการคัดแยกเชื้อ *Aspergillus fumigatus* จากกระเพาะของแพะ ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากที่ทำการบ่มในอาหารที่มีค่าพีเอช 7 เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้แป้ง (starch) 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ร้อยละ 0.25 เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอยู่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 โดยใช้แป้งร้อยละ 4 เป็นสับสเทรต

Rahardjo และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งซึ่งอาหารแข็งที่ใช้คือ แป้งสาลีโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* ซึ่ง *A. oryzae* จะสร้างเส้นใยที่มีความสำคัญต่อการหายใจในระหว่างการเจริญบนอาหารแข็งและการผลิตเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่าการเจริญของเชื้อ *A. oryzae* บนแป้งสาลีจะเพิ่มปริมาณเส้นใย ส่งผลให้มีน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น และปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oshoma และ Ikenebomeh (2005) ได้ศึกษาการผลิตมวลเซลล์ของ *Aspergillus niger* จากรำข้าว โดยศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนประกอบโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ และค่าพีเอชสุดท้ายในการเจริญของ *Aspergillus niger* บนรำข้าวแบบกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยมีการเติมกลูโคส แอมโมเนียมไดซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โพแทสเซียมไฮโดรเจนไดฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) และ ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารด้วย และจากการทดลองพบว่าอาหารที่มีการเติมกลูโคสลงไปจะให้ผลผลิตสูงสุด คือ 2.03 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารที่ไม่มีการเติมส่วนประกอบอื่นๆลงไปจะให้ผลผลิตที่น้อยสุด คือ 0.97 ± 0.00 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่นำมาทดลองพบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตสูงสุด คือ 1.95 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และ โซเดียมไนเตรทจะให้ผลผลิตต่ำสุด คือ 0.97 ± 0.02 กรัมต่อลิตร เพราะฉะนั้นการเติมกลูโคสและไนโตรเจน จะทำให้เพิ่มปริมาณของมวลเซลล์ได้

Aiyer (2004) ศึกษาผลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SPT 27 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือแป้งมันฝรั่ง (potato soluble starch) และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือเปปโตน โดยอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมามากที่สุดคือ 1 : 1 ซึ่งมีการรายงานเอาไว้ว่าปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่น้อยเกินไปอาจไม่เพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์ แต่ถ้ามีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มากเกินไปก็จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้

Bertolin และคณะ (2003) ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus awamori* ภายใต้สภาวะการหมักบนอาหารแข็ง ซึ่งแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้คือ รำข้าวสาลี แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ $(NH_4)_2SO_4$ ยูเรีย แหล่งฟอสฟอรัสที่ใช้ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ซึ่งใช้กลูโคส และมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนรอง พบว่าการผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อแทน โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ด้วยยูเรีย อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 ต่อ 8 เมื่อใช้มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งฟอสฟอรัสตั้งแต่ 5.1 ถึง 28.7 พบว่าไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

Ajayi และ Fagade (2003) ได้ศึกษาการใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์เบต้าอะไมเลสโดย *Bacillus* spp. 10 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดิน น้ำเสีย และ แหล่งอาหาร โดยพบว่าสายพันธุ์ *Bacillus* สามารถเจริญได้มากที่สุดในแหล่งอาหารที่มีแป้งข้าวโพด นับจำนวนได้ 11.58×10^2 CFU/ml และพบว่า *B. licheniformis* และ *B. subtilis* สามารถผลิตเอนไซม์ 4.2 และ 6.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ การเติมแคลเซียมจะช่วยเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-อะไมเลสด้วย

Ashher และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* JS-2004 ในอาหารที่มีแป้งมันฝรั่ง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของแคลเซียม ยีสต์สกัด และกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีผลในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่ามีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม Co^{2+} Cu^{2+} และ Hg^{2+} จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์อย่างรุนแรง แต่การเติม Mg^{2+} Zn^{2+} Ni^{2+} Fe^{2+} และ Mn^{2+} จะมีผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* JS-2004 พบว่ามีลักษณะเฉพาะที่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแป้งและอุตสาหกรรมอาหาร

Pambouukian และคณะ (1998) รายงานว่าในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus awamori* ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ จะมีบทบาทสำคัญต่อลักษณะโครงสร้างของเซลล์สิ่งมีชีวิตและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในกระบวนการหมัก การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ที่ค่าพีเอช 2.5 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงที่สุด ที่ค่าพีเอชต่ำนั้นจะไม่มีผลต่อการเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนของสปอร์ในระหว่างระยะการเจริญเป็นสปอร์ หัวเชื้อจะประกอบด้วยสปอร์ที่กระจายตัวซึ่งอาจเจริญเป็นเส้นใยในถังหมักทำให้ขัดขวางการสร้างตัวเป็น pellet และการเพิ่มการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนั้นลักษณะโครงสร้างของเซลล์ในกระบวนการหมักจะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติในอาหารที่ใช้กระบวนการหมัก

Carlos และ Meire (2002) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและคุณสมบัติของเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SMIA-2 ที่ชอบอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งที่ละลายน้ำ พบว่ามีการผลิตเอนไซม์สูงสุดจำนวน 57 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง การศึกษาลักษณะของเอนไซม์พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมเอนไซม์คือ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 60 70 และ 90 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีการสูญเสียกิจกรรม 4 13 และ 38 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์คือ 7.5 เอนไซม์ถูกยับยั้งโดย Co^{2+} Cu^{2+} และ Ba^{2+} แต่มีผลเล็กน้อยใน Ca^{2+} Mg^{2+} Ni^{2+} Sr^{2+} และ Mn^{2+}

2.3 การเก็บเกี่ยวเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์โดยการหมักแบบอาหารแข็ง หลังจากการหมักสิ้นสุดลง อาจนำอาหารที่ผ่านการหมักแล้วไปลดความชื้นให้เหลือประมาณร้อยละ 10-12 บดให้เป็นผง แล้วนำไปใช้ได้โดยตรง หรืออาจเติมน้ำหรือสารละลายเกลือที่เหมาะสมลงไปในอาหารที่ผ่านการหมักแล้วเพื่อสกัดเอาเอนไซม์ออกมา จากนั้นจึงนำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการต่างๆที่เหมาะสม

สำหรับการผลิตเอนไซม์โดยการหมักแบบอาหารเหลวนั้น หลังจากการหมักเสร็จแล้วต้องนำไปกรองหรือเหวี่ยงเซลล์ออกจากส่วนอาหารเหลว ถ้าเอนไซม์ที่ต้องการเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ จะต้องเก็บส่วนที่เป็นเซลล์ไปทำให้แตกก่อน โดยอาจใช้เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ความดันสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือเครื่องบด หรือใช้เอนไซม์ หรือคลื่นความถี่สูง แต่ถ้าเป็นเอนไซม์ภายนอกเซลล์จะต้องเก็บส่วนของเหลวเพื่อนำไปแยกเอนไซม์ (สมใจ, 2547)

2.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การแยกเอนไซม์โดยการตกตะกอนโปรตีน ตามปกติจะยังคงมีสารอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์ปนเปื้อนอยู่ด้วย ดังนั้นถ้าต้องการเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ก็ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการแยกสารอื่นที่ไม่ต้องการออกด้วยวิธีที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี อิเลคโตรโฟริซิส ไดอะไลซิส (dialysis) (สมใจ, 2547)

2.5 การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลส

การเก็บรักษาอะไมเลสให้มีกิจกรรมคงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อย จะต้องเกี่ยวข้องทั้งเรื่องพีเอชและอุณหภูมิต้องให้เหมาะสม มิฉะนั้นเอนไซม์จะเสียสภาพ โดยอาจเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำดังนี้

2.5.1 ตู้เย็นธรรมดา (อุณหภูมิ 4 -10 องศาเซลเซียส) อาจมีการเติมอนุมูลสารบางอย่างลงไป เพื่อรักษากิจกรรมของเอนไซม์ เก็บได้นาน 1 - 2 เดือน

2.5.2 แช่แข็ง นิยมใช้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 ถึง -20 องศาเซลเซียส

2.5.3 freeze dry หรือ lyophilized เป็นการระเหิดน้ำออกจากสารละลายเอนไซม์ในสภาพที่เป็นน้ำแข็ง ทำในสภาพสุญญากาศ เมื่อเสร็จแล้วสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิต่ำก็ได้

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

2.6 ประโยชน์ของเอนไซม์อะไมเลส

2.6.1 ในอาหารประเภทอบ มักใช้อะไมเลส จากพวกเชื้อรา เช่น *Aspergillus oryzae* เชื้อ bacteria (*Bacillus subtilis*) และธัญพืช (malted wheat, malted barley)

2.6.2 อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำวัตถุดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ซึ่งทำให้ด้ายขาดง่ายและเพื่อให้เส้นด้ายสามารถทนต่อแรงดึงได้ดีจะต้องนำด้ายมาชุบน้ำแป้งก่อนที่จะนำไปใช้ทอผ้า และเมื่อทอผ้าเป็นผืนเรียบร้อยแล้วจะเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72583

ในการย่อย และนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีการนี้จะใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะและแพรเทียม

2.6.3 อุตสาหกรรมทำขนมปัง ในการเตรียมแป้งที่ใช้ทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปด้วยเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลนี้ทำให้เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในแป้งหมัก ทำให้ได้โด (dough) เอนไซม์ที่ใช้มีทั้ง แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา เนื่องจากว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถทนความร้อนได้ ดังนั้นเอนไซม์นี้จะถูกทำลายไปหลังจากการอบขนมปังแล้ว จึงไม่สามารถย่อยแป้งในขนมปังได้อีก ทำให้ได้ขนมปังที่ฟูดี

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

2.6.5 อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ในการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และเบียร์จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในกระบวนการหมักเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส หรือเพื่อกำจัดเดกซ์ทรินออกจากเวิร์ท เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง จึงต้องเติมลงไปในถังหมักในขณะที่เย็น นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังใช้ในการทำไวน์และเบียร์ให้ใสด้วย

2.6.6 อุตสาหกรรมผลิตกลูโคสไซรับเพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ ในการผลิตไซรับเหล่านี้จะใช้แป้งที่ได้จากเมล็ดพืชต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี นำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส

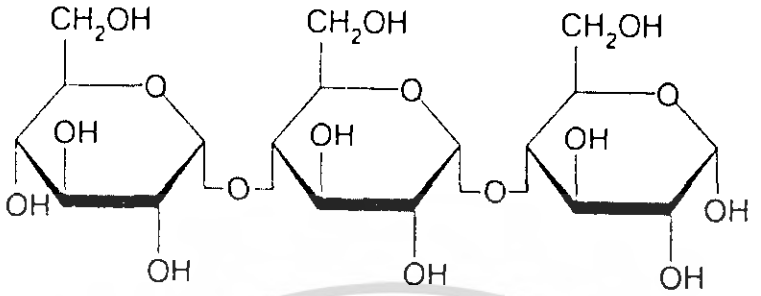
2.7 แป้งและองค์ประกอบภายในแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 ต่อ 10 ต่อ 5 มีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_6)_n$ แป้งจัดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหน่วยแอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซ์ซิง (reducing end group) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพคทิน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 อะไมโลส (amylose)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 -กลูโคซิดิก ดังแสดงในรูปที่ 2.6

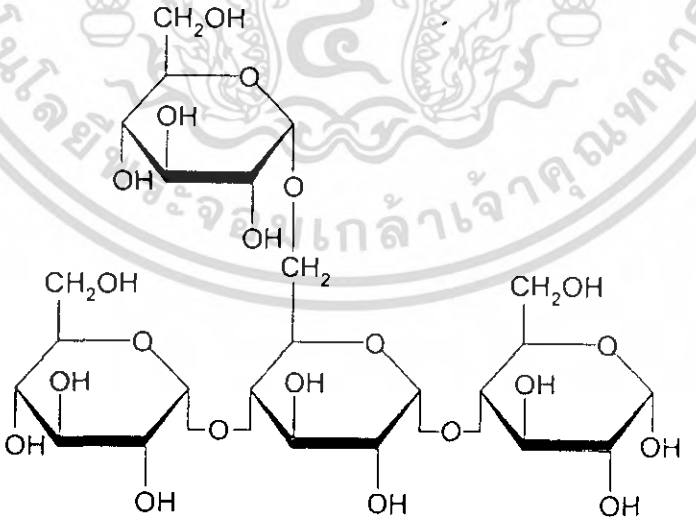


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของอะไมโลส

ที่มา : กล้าณรงค์ (2546)

2.7.2 อะไมโลเพกทิน (amylopectin)

อะไมโลเพกทินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด α-1,4 และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด α-1,6 ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของอะไมโลเพกทิน

ที่มา : กล้าณรงค์ (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 คุณสมบัติของแป้ง

โดยปกติเมื่อแป้งผสมอยู่ในน้ำแป้งจะแตกตัวเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ในน้ำ แต่จะไม่ละลายน้ำเนื่องจากอนุภาคของแป้งจะมีขนาดใหญ่เกินที่จะละลายน้ำได้แป้งจะมีความหนาแน่นค่อนข้างสูงประมาณ 1.45-1.64 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร (ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) ดังนั้นแป้งจึงพร้อมที่จะตกตะกอนหลังจากแขวนลอยอยู่ แต่เมื่ออุณหภูมิของสารแขวนลอยสูงขึ้นประมาณ 60-70°C (ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) น้ำจะเข้าไปใน amorphous region และพลังงานความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจน ใน crystalline region ทำให้สามารถเข้าไปในเม็ดแป้งมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เม็ดแป้งเกิดบวมอย่างรวดเร็ว ความหนาแน่นจะลดลงความหนืดจะสูงขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นผิวของเม็ดแป้งจะเปิดมากขึ้น จนเม็ดแป้งเกิดการแตกด่างฉับพลัน ทำให้อะไมโลส ออกจากเม็ดแป้งเกิดเป็น เจลขึ้นซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า การเกิดเจล (gelatinization) (http://www.kmutt.ac.th/rippc/prog17t.htm)

2.7.4 การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

แป้งแต่ละชนิดนั้นจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดยในแป้งดิบจะมีโครงสร้างเป็นแบบ semi-crystalline คือ มีส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และมีส่วนที่เป็นอสัณฐาน(amorphous) ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของอะมิโลสและอะมิโลเพกทิน โดยสายพอลิเมอร์ของกลูโคสในส่วนที่เป็นเส้นตรงของอะมิโลเพกทินจะสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นผลึกที่มีความแข็งแรง ลักษณะเช่นนี้ของเม็ดแป้งจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นเอนไซม์จะสามารถย่อยแป้งที่เกิดเจลลาทิไนซ์แล้วได้ดีกว่าแป้งดิบ เนื่องจากโครงสร้างของแป้งดิบจะถูกทำลายในแป้งที่เกิดเจลลาทิไนซ์แล้ว สำหรับในการย่อยแป้งดิบนั้น เอนไซม์จะทำงานในโครงสร้างที่แข็งแรงน้อยกว่าหรือ amorphous ได้ดีกว่าส่วน crystalline ดังนั้นจึงทำให้ความสามารถในการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของเม็ดแป้งจะแตกต่างกันด้วย (กล้าณรงค์, 2546)

2.8 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่าง ๆ

อะไมโลเพกทินถือว่ามีความสำคัญมากกว่าอะมิโลสทั้งด้านโครงสร้าง หน้าที่ และการนำไปใช้ ดังนั้นเมื่อมีอะมิโลเพกทินเพียงอย่างเดียวสามารถรวมตัวเพื่อสร้างเม็ดแป้งได้ โดยในการจับกันเป็นกลุ่มของอะมิโลเพกทินทำให้เกิดเป็นเกลียวคู่ (double helix) ซึ่งช่วยให้เม็ดแป้งมีความคงทนต่อการทำปฏิกิริยาด้วยกรดและเอนไซม์ ดังนั้นปริมาณของอะมิโลสและอะมิโลเพกทินที่แตกต่างกันทำให้สมบัติของแป้งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยได้แสดงปริมาณและสัดส่วนของอะไมโลสและอะมิโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิด ในตารางที่ 2.1 (กล้าณรงค์, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ปริมาณและสัดส่วนของอะไมโลสและอะมิโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิด

คุณสมบัติ	แป้งมันฝรั่ง	แป้งข้าวโพด	แป้งสาลี	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวโพดเหนียว
อะไมโลส (%น้ำหนักแห้ง)	21	28	28	17	0
อะไมโลเพกทิน (%น้ำหนักแห้ง)	79	72	72	83	100
ขนาดโมเลกุล(DP)ของอะไมโลส (หน่วยน้ำตาลกลูโคส)	3,000	800	800	3,000	-
ขนาดโมเลกุล(DP)อะไมโลเพกทิน (หน่วยน้ำตาลกลูโคส)	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6
จำนวนโมเลกุลอะไมโลส ($\times10^{20}$) ในแป้ง 1 กรัม	30	130	130	20	0
จำนวนโมเลกุลอะไมโลเพกทิน ($\times10^{17}$) ในแป้ง 1 กรัม	150	130	130	150	190
สัดส่วนจำนวนโมเลกุลของอะไมโลสต่ออะไมโลเพกทิน	200	1,000	1,000	150	0
ขนาดโมเลกุล(DP)เฉลี่ยของโมเลกุลแป้ง (หน่วยน้ำตาลกลูโคส)	14,000	3,000	3,000	18,000	2,000,000

ที่มา : Swinkels (1985a)

ส่วนประกอบอื่นที่มีผลต่อลักษณะและคุณสมบัติของเม็ดแป้งที่สำคัญ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน เถ้า และฟอสฟอรัส ซึ่งปริมาณแตกต่างกันในแป้งแต่ละชนิดดังตาราง ที่ 2.2 (กล้าณรงค์, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่าง ๆ

ชนิดแป้ง	ความชื้น 65 เปอร์เซ็นต์ RH, 20°ซ	เปอร์เซ็นต์ไขมัน	เปอร์เซ็นต์โปรตีน	เปอร์เซ็นต์เถ้า	เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัส
แป้งข้าวโพด	13	0.6	0.35	0.1	0.015
แป้งมันฝรั่ง	19	0.05	0.06	0.4	0.08
แป้งสาลี	14	0.8	0.4	0.15	0.06
แป้งมันสำปะหลัง	13	0.1	0.1	0.2	0.01
แป้งข้าวโพดเหนียว	13	0.2	0.25	0.07	0.007
แป้งข้าวฟ่าง	13	0.7	0.3	0.08	ไม่มีรายงาน
แป้งข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	0.8	0.45	0.5	0.1
แป้งสาคู	ไม่มีรายงาน	0.1	0.1	0.2	0.02
แป้งข้าวโพดอะมิโลเมส	13	0.4	ไม่มีรายงาน	0.2	0.07
แป้งมันเทศ	13	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน	0.1	ไม่มีรายงาน

ที่มา : Swinkels (1985b)

2.8.1 ไขมัน

โดยส่วนใหญ่แป้งจะมีองค์ประกอบของไขมันอยู่ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ชนิดของไขมันที่อยู่ในแป้งมีผลต่อคุณสมบัติของแป้ง เช่น มีผลต่อความหนืดของแป้ง โดยไขมันที่รวมตัวอยู่ในเม็ดแป้งจะส่งผลกระทบต่อ ความสามารถในการพองตัว การละลาย และการจับตัวกับน้ำของแป้ง และกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเม็ดแป้งจะก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ โดยแป้งจากธัญพืช เช่น แป้งข้าวโพด แป้งข้าวสาลี จะมีกลิ่นแรงกว่าแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลังและแป้งมั่นฝรั่ง เนื่องจากมีองค์ประกอบของไขมันสูง

2.8.2 ไนโตรเจน (โปรตีน)

ภายในแป้งมีส่วนประกอบของโปรตีนอยู่ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่อยู่ที่ผิวของเม็ดแป้ง ทำให้เกิดผลกระทบต่อลักษณะของแป้ง คือ ทำให้เกิดประจุบนพื้นผิวเม็ดแป้ง มีผลต่อการกระจายของเม็ดแป้ง ทำให้แป้งมีอัตราการดูดซับน้ำ อัตราการพองตัว และอัตราการเจลาทิไนซ์เปลี่ยนแปลงไปทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) ระหว่างการทำปฏิกิริยาของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะมิโนกับน้ำตาลรีดิวซิง สีและกลิ่นของผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนแปลงไป (โดยส่วนใหญ่ปฏิกิริยาเช่นนี้เกิดขึ้นกับแป้งจากธัญพืช เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง)

2.8.3 เถ้า

แป้งโดยทั่วไปมีองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม และแคลเซียม โดยปริมาณเถ้าในแป้งมันฝรั่งจะสัมพันธ์กับหมู่ฟอสฟอรัสในแป้ง สำหรับเถ้าในแป้งจากธัญพืชจะสัมพันธ์กับปริมาณฟอสฟอลิพิด

2.8.4 ฟอสฟอรัส

แป้งส่วนใหญ่มีองค์ประกอบของฟอสฟอรัสอยู่น้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยแป้งจากธัญพืชมีฟอสฟอรัสในรูปฟอสฟอลิพิด (phospholipids) ประมาณ 0.02 ถึง 0.06 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับแป้งจากพืชหัวและราก เช่น แป้งจากมันฝรั่ง จึงทำให้มีประจุพื้นผิวเป็นลบแรงผลักระหว่างประจุลบจะทำให้แป้งมันฝรั่งมีคุณสมบัติพองตัวง่าย และมีความหนืดสูงกว่าแป้งชนิดอื่น ๆ

2.9 แป้งข้าวโพด

แป้งข้าวโพดจัดได้ว่าเป็นแป้งที่มีมากที่สุดในโลก ผลิตจากข้าวโพด ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* L. อยู่ในวงศ์ Gramineae ข้าวโพดมีองค์ประกอบต่างๆแสดงในตารางที่ 2.4 (กล้าณรงค์, 2546)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวโพด

องค์ประกอบ (ร้อยละ)	Kerr (1950)	Knight (1969)
ความชื้น	18.5	16.2
แป้ง	55.5	59.4
โปรตีน	8.2	8.2
ไขมัน	3.0	4.0
ไฟเบอร์	2.4	2.2
เถ้า	1.5	1.2
น้ำตาล	5.1	2.2
อื่นๆ	5.8	6.6

ที่มา : กล้าณรงค์ (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติของแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสต่างกัน

ชนิดแป้ง	ปริมาณอะไมโลส (%)	คุณสมบัติ
ข้าวโพดเหนียว (waxy maize)	0-1	แป้งเปียกใส มีการคืนตัวหลังสุก (setback) น้อย ไม่เกิดเจล และเจลมีการสูญเสียน้ำ (syneresis) น้อย ยืดหยุ่นได้
ข้าวโพด (maize)	27	เกิดเจลที่แข็งแรง แป้งเปียกขุ่น
ข้าวโพดอะมิโลเมส (amylomaize)	50-70	เม็ดแป้งพองตัวได้ยาก เกิดเจลที่แข็ง แป้งเปียกขุ่น อุณหภูมิการเกิดแป้งเปียกสูง

ที่มา : Oates (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญ (ต่อ)	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญตาราง (ต่อ)	ช
สารบัญรูป	ซ
สารบัญรูป (ต่อ)	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง	3
2.2 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์	9
2.3 การเก็บเกี่ยวเอนไซม์	16
2.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	17
2.5 การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลส	17
2.6 ประโยชน์ของเอนไซม์อะไมเลส	17
2.7 แป้งและองค์ประกอบภายในแป้ง	18
2.8 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่าง ๆ	20
2.9 แป้งข้าวโพด	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์	25
3.2 วิธีการทดลอง	27
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 ผลของความเข้มข้นแป้งข้าวโพดที่เหมาะสม	30
4.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม	36
4.3 ผลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม	42
4.4 ผลของการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. วิธีการวิเคราะห์	67
ภาคผนวก ข. การตรวจนับสปอร์โดยใช้แผ่นนับเม็ดเลือด	70
ภาคผนวก ค. สูตรอาหารและสารละลายบัฟเฟอร์	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส 4

ตารางที่ 2.2 ปริมาณและสัดส่วนของอะไมโลสและอะมิโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิด 22

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่าง ๆ 23

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวโพด 24

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติของแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสต่างกัน 25

ตารางที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 33

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 34

ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 35

ตารางที่ 4.4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ 39

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ 41

ตารางที่ 4.6 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ 41

ตารางที่ 4.7 ผลของการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ 44

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ 46

ตารางที่ 4.9 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากการเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ 47

ตารางที่ 4.10 ผลของการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 51

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 57

ตารางที่ 4.13 ผลของอัตราเร็วเริ่มต้นในการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ในช่วงเวลา 60 นาทีแรกโดย เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส 3

รูปที่ 2.2 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 5

รูปที่ 2.3 การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส 6

รูปที่ 2.4 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 7

รูปที่ 2.5 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง 8

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของอะไมเลส 19

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของอะไมโลเพกทิน 19

รูปที่ 4.1 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ 32

รูปที่ 4.2 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ 38

รูปที่ 4.3 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ 43

รูปที่ 4.4 แสดงผลของการย่อยแป้งข้าวจ้าวโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 48

รูปที่ 4.5 แสดงผลของการย่อยแป้งสาลีโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 49

รูปที่ 4.6 แสดงผลของการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 49

รูปที่ 4.7 แสดงผลของการย่อยแป้งข้าวโพดโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 4.8	แสดงผลของการย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch)โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2	50
รูปที่ 4.9	แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งข้าวจ้าวด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2	54
รูปที่ 4.10	แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งสาลีด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ*Aspergillus* sp. REB2	54
รูปที่ 4.11	แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2	55
รูปที่ 4.12	แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งข้าวโพดด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2	56
รูปที่ 4.13	แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งที่ละลายน้ำด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2	56
รูปที่ ก-1	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล โดยจะทำการย่อยแป้งหรือสับสเทรตตรงบริเวณพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก (α-1,4 glucosidic bond) ของสายอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกทิน (amylopectin) ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส มอลโตส หรือเด็กซ์ตริน เป็นต้น แต่สำหรับอะไมโลเพกทิน (amylopectin) เอนไซม์อะไมเลสจะไม่สามารถย่อยบริเวณพันธะแอลฟา -1,6 กลูโคซิดิก (α-1,6 glucosidic bond)ได้

ในปัจจุบันโรงงานได้นำเอาคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสนี้มาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตกันอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมการทอผ้า อุตสาหกรรมขนมปัง อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสและกลูโคสไซรัป เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์อะไมเลสยังนำมาใช้เป็นยาช่วยย่อยอาหาร

เอนไซม์อะไมเลสสามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืชและสัตว์ จะได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ เพราะจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมแล้วจะเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมาได้ดี สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย โดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรียเนื่องจากจุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสับสเทรตให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ สับสเทรตที่ใช้ในกระบวนการหมักได้แก่ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น รำข้าว รำข้าวสาลี ซังข้าวโพด เป็นต้น

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรต่าง ๆ มากมาย เช่น การผลิตแป้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น อีกทั้ง ในระดับอุตสาหกรรม เอนไซม์อะไมเลสมีความสำคัญและนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ทางผู้จัดทำจึงมีความคิดในการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีมากมายภายในประเทศ อันได้แก่ แป้งชนิดต่างๆ มาเป็นสับสเทรตในการผลิต เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาทางอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาปริมาณแป้งข้าวโพดและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus* sp.REB2 ในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งข้าวโพดที่ใช้เป็นสับสเทรตต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

2. ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

3. ศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

4. ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลส ที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp.REB2 ที่ใช้ย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ คือ แป้งสาลี แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวจ้าว และแป้งที่ละลายน้ำ จากนั้นศึกษาอัตราเร็วเริ่มต้นที่ได้จากการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. สามารถนำแป้งข้าวโพดมาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ และเป็นการเพิ่มคุณค่าของข้าวโพดให้มากขึ้น

2. ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพด โดยใช้เชื้อ *Aspergillus* sp.REB2 โดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

3. สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 จุลินทรีย์

Aspergillus sp. REB2 ได้รับจากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เก็บรักษาเชื้อในตู้เย็น บนอาหารวุ้นผิวเอียง (PDA) ทำการถ่ายเชื้อทุก 4 เดือน

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นสูตรดัดแปลงมาจาก Omenu และคณะ (2005) มีส่วนประกอบดังนี้

รำข้าว	10.0	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	3.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	1.0	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	3.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	3.0	กรัม
น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor)	3.0	กรัม
พีเอช	4.0	

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) ; EUTECT instruments

เครื่องผสมสารละลาย (vortex) ; JULABO

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ; CLIFTON unstirred bath

เตาอบไมโครเวฟ ; SAMSUNG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตู้เย็น ; SANYO

หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ; HIRAYAMA HA-300 M IV

เตาอบความร้อน (hot air oven) ; WIT binder

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ; SHIMADZU UV-1607

เครื่องชั่ง ; SHIMADZU

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) ; NEW BRUNSWICK , U.S.A

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ; SANYO FALCON 6/300

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ; OLYMPUS CH30RF200

แผ่นนับเม็ดเลือด (Heamacytometer) ; BOECO Germany

ฟลาสก์

กรวยแก้ว

บีกเกอร์

หลอดทดลอง

หลอดปั่นเหวี่ยง

ช้อนตักสาร

แท่งแก้วคน

กระบอกตวง

ปิเปต

หลอดหยดสาร

ขวดเก็บสารพลาสติก

กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

ตะเกียงแอลกอฮอล์

สารเคมี

แป้งข้าวโพด ; ตราปลาคราฟ

แป้งสาลีอเนกประสงค์ ; ตราว่าว

แป้งมันสำปะหลัง ; ตราปลาไทยห้าดาว

แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) ; Carlo Erba

แป้งข้าวจ้าว ; ตราทานตะวัน

น้ำแช่ข้าวโพด ; Carlo Erba

แอลกอฮอล์ 95 % ; องค์การสุรา(กรมสรรพสามิต)

กรดแอซิติก ; Carlo Erba

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ; Univar

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ; Sigma Aldrich

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ; Univar

แอมโมเนียมไนเตรต(NH_4NO_3) ; Fluka

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ; Carlo Erba

แคลเซียมคลอไรด์($CaCl_2$) ; Carlo Erba

3,5-Dinitrosalicylic (DNS) ; Sigma Aldrich

Yeast Extract ; Himedia

Potato Dextrose Agar ; Himedia

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมกล้าสปอร์ (inoculum)

ทำการเลี้ยง *Aspergillus* sp.REB2 บนอาหารแข็ง PDA ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้สร้างสปอร์ ทำสปอร์ให้อยู่ในรูปแขวนลอย โดยเติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) เขี่ยสปอร์ให้กระจายจากนั้นนำไปกรองเอาเส้นใยออก ได้สปอร์อยู่ในรูปสารละลาย นับจำนวนสปอร์ด้วยแผ่นนับเม็ดเลือด (haemacytometer) (ภาคผนวก ข.) และใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง โดยปรับให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

3.2.2.1 ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลงจาก Omemu และคณะ (2005) โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนแทนรำข้าวและแป้งถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 3 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยแต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ใส่อาหารปริมาตร 60 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติมกล้าสปอร์จากข้อ 3.2.1 ลงไปแต่ละฟลาสก์ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าพีเอช จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปกรองด้วยชุดกรองโดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดจากข้อ 3.2.2.1 มาเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือ แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมไนเตรต ยีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.2.1 โดยแต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ

3.2.2.3 ศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดและแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดจากข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2 มาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยมีอัตราส่วนดังนี้ 30 ต่อ 1 20 ต่อ 1 15 ต่อ 1 12 ต่อ 1 และ 10 ต่อ 1 และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.2.1 โดยแต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ

3.2.2.4 ศึกษาการย่อยแป้งชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์อะไมเลส

ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมมาหาประสิทธิภาพในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวจ้าว และแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) โดยเตรียมสารละลายแป้งแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ละลายในซิเทรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 4.0) และเติมสารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นลงไปเพื่อให้ได้กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าทุก ๆ 15 นาที ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยชั่วโมงแรกเก็บตัวอย่างที่เวลา 2 4 6 8 10 15 20 30 45 และ 60 นาที หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที จนครบ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 ถึงชั่วโมงที่ 12 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 นาที จนครบ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างทั้งหมดมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วง ทำการคำนวณหาอัตราเร็วเริ่มต้นของการย่อยแป้งแต่ละชนิดโดยเอนไซม์อะไมเลส จาก *Aspergillus sp.* REB2 โดยแต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 วิธีวิเคราะห์

3.2.3.1 พีเอช

ใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ ; Denver Instrument รุ่น 215

3.2.3.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ก.)

3.2.3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ก.)

3.2.3.4 วิธีวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มสัมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของความเข้มข้นแป้งข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 โดยมีสภาวะในการหมักแบบอาหารเหลวโดยใช้แป้งข้าวโพดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ คือ 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงมาจาก Omenu และคณะ (2005) โดยให้ผลการทดลองดังนี้

อาหารที่เติมแป้งข้าวโพด 60 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดคือ 3,730 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือ 26.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชของอาหารเหลวมีค่าคงที่อยู่ประมาณ 2 เมื่อคำนวณหาอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 1,243.33 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.3

อาหารที่เติมแป้งข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสรองลงมา คือ 2,917.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง คือ 26.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 972.50 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.3

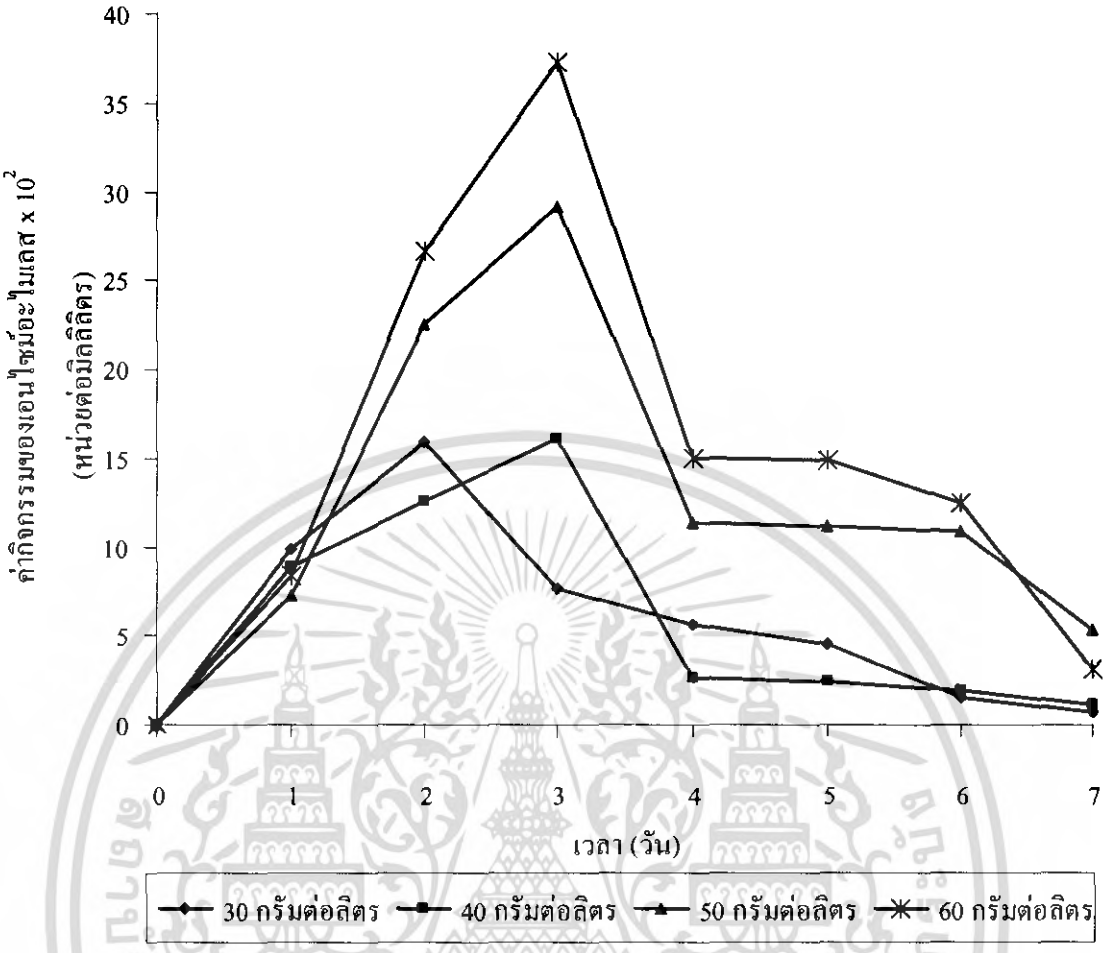
อาหารที่เติมแป้งข้าวโพด 40 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,608.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง คือ 15.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 536.25 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.3

อาหารที่เติมแป้งข้าวโพด 30 กรัมต่อลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,589.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง คือ 10.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 794.79 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดคือ 3,730.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่างจากการรายงานของ Kekos และ Maeris (1987) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อรา *Clavati gigantea* โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 68,250 หน่วยต่อมิลลิลิตร Mabel และคณะ(2005) พบว่าการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Aspergillus niger* สายพันธุ์ UO-1 ภายใต้สภาวะอาหารเหลวที่เตรียมจากน้ำทิ้งจากกระบวนการในโรงงานเครื่องดื่มและโรงงานเนื้อสัตว์ มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแป้ง(starch) ซึ่งระดับการผลิตเอนไซม์โดยอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้ง 40 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 70.29 หน่วยต่อมิลลิลิตร Aiyer (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *Bacillus licheniformis* SPT 27 ซึ่งใช้แป้งมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร โดยจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 382 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของแป้งที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส 60 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากถ้าใช้ปริมาณแป้งมากกว่านี้ จะทำให้อาหารมีความหนืดส่งผลให้การเจริญของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์ลดลง เนื่องจากการส่งถ่ายออกซิเจนในอาหารน้อยลง อภิชญา (2548) ผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่าโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 พบว่าอาหารสูตร starch medium ที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 11.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ถ้าใช้ความเข้มข้นของแป้งมากกว่านี้อาหารจะมีความหนืดมาก Li และคณะ(1998) ได้ทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยผลการทดลองพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยแป้ง (soluble starch) อะไมโลส อะไมโลเพคติน เด็กซ์ตริน ไกลโคเจน และมอลโตสได้ ซึ่งพบว่าแป้งเป็นสับสเทรตที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส และ Shatta และคณะ(1990) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสของ *Streptomyces aureofaciens* 77 พบว่าการใช้แป้ง (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดโดยให้กิจกรรมเอนไซม์ อะไมเลส 300 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตร ในขณะที่เดกซ์ตรินให้กิจกรรมเอนไซม์ 245 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นแป้งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	วันที่	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
30	1	2.52	7.01	986.67
	2	1.99	10.06	1,589.58
	3	1.96	3.16	760.41
	4	2.05	0.57	558.75
	5	2.15	0.44	448.33
	6	2.27	0.46	155.25
	7	2.44	0.35	75.50
40	1	2.43	4.82	888.33
	2	2.02	15.77	1,253.75
	3	1.96	12.45	1,608.75
	4	1.99	1.84	261.25
	5	2.05	0.80	240.25
	6	2.17	0.73	187.75
	7	2.08	0.48	109.5
50	1	2.46	4.28	720.00
	2	2.07	26.16	2,246.25
	3	1.98	20.11	2,917.50
	4	1.97	9.17	1,135.00
	5	1.99	8.76	1,119.17
	6	2.19	4.75	1,090.00
	7	2.02	1.02	535.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นแป้งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	วันที่	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
60	1	2.52	3.92	830.83
	2	2.06	21.37	2,664.58
	3	2.01	26.32	3,730.00
	4	2.03	13.48	1,500.83
	5	2.03	12.01	1,485.83
	6	2.23	9.07	1,247.50
	7	2.09	2.17	315.41

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าความเข้มข้นแป้งข้าวโพดที่ปริมาณ 60 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้นแป้งข้าวโพด 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	30	40	50	60
กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	760.42[d]	1,589.58[c]	2,917.50[b]	3,730.00[a]

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร นั้นมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน)
30	794.79
40	536.25
50	972.50
60	1,243.33

จากผลการทดลองการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดต่าง ๆ โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 794.79 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 536.25 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 972.50 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน และแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1243.33 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน

จากการทดลองพบว่า ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมากขึ้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเพิ่มมาจากความเข้มข้นของแป้งที่สูงขึ้น ทำให้มีแหล่งคาร์บอนเพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เมื่อทำการเปรียบเทียบผลจากอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากการใช้แป้งข้าวโพด ทั้ง 4 ความเข้มข้นทางสถิติพบว่า มีผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และตารางที่ 4.3

ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งข้าวโพด 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส และใช้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับ การผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 และมีสภาวะในการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้แป้งข้าวโพดที่มีความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ดังนี้ น้ำแช่ข้าวโพด ยีสต์สกัด โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมไนเตรท จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงมาจาก Omenu และคณะ (2005) โดยให้ผลการทดลองดังนี้

อาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ 4,568.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือ 30.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 1,522.92 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 4.2 ตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.6

อาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรท ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสรองลงมา คือ 4,305.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง คือ 24.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 2,152.50 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 4.2 ตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.6

อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพด ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 3,111.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือ 20.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 1,037.22 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 4.2 ตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.6

อาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรท ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,645.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวจะเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง คือ 10.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีค่าเท่ากับ 822.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.2 ตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.6

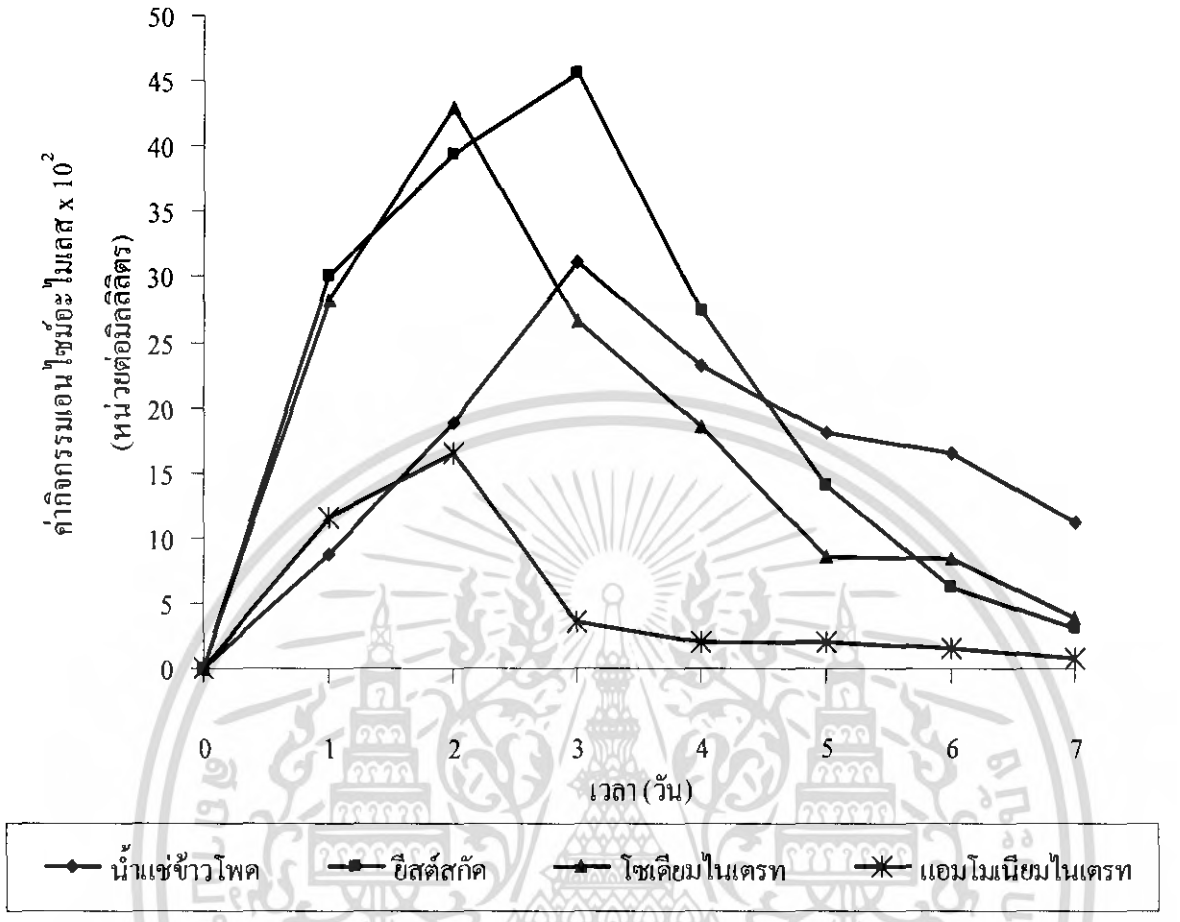
จากผลการทดลองที่ได้พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด ซึ่งได้สอดคล้องกับการรายงานของ โดย Mahmoud (1993) กล่าวว่าในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus fumigatus* จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากขึ้นเมื่อใช้ ไกลซีนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน และจากรายงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Norton และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการเติมยีสต์สกัดในการผลิตกรดแลกติกจากหางนม โดยเซลล์ตรึงของเชื้อ *Lactobacillus helveticus* พบว่าปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ในถังหมักจะให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงที่สุดเท่ากับ 41.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รวมทั้งรายงานของ Teodoro และ Martins(2000) ที่ได้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งพบว่าเมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด ในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะลดระยะ lag phase และช่วยในการเจริญรวมไปถึงการสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์

แต่จากผลการทดลองพบว่ามีความแตกต่างจากรายงานของ Kundu Das และ Grupta (1973) ได้รายงานว่าแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ อะไมเลสเพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด รวมทั้งรายงานของ Sadhukhan และคณะ (1990) ได้ทำการทดลองศึกษาการใช้โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรา พบว่า เมื่อใช้โซเดียมไนเตรทกับโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้การเจริญของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์จะมีลักษณะคล้ายกัน คือ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างสูง ในส่วนของกรดอะมิโนพบว่าฟีนิลอะลานีลและฮีสติดีน จะกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส แต่จะให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ Omemu และคณะ(2005) ได้ศึกษาการย่อยแป้งดิบโดยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* AM07 ที่แยกได้จากดินโดยใช้แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไตซัลเฟต ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 806 หน่วยต่อมิลลิลิตร Sarikaya และ Gürgün (1999) ศึกษาถึงการเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสใน*Bacillus subtilis* และ *B. amyloliquefaciencs* II คือ ยีสต์สกัด ในขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟต มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสใน *B.amyloliquefaciencs* I รวมทั้งรายงานของ Hensley และคณะ (1980) ได้มีการรายงานว่าสายพันธุ์ของ *Bacillus* บางสายพันธุ์ เช่น *B. marcerans* สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าอะไมเลสได้ดีขึ้นเมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนเช่นเดียวกับ Srivastava และ Baruah (1986) ที่มีการรายงานว่าน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้ แต่น้ำแช่ข้าวโพดมีข้อเสีย คือ น้ำแช่ข้าวโพดประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีการใช้ธาตุอาหารสังเคราะห์ที่รู้ส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอนแทนน้ำแช่ข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

แหล่งไนโตรเจน	วันที่	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
น้ำแช่ข้าวโพด	1	2.48	43.33	872.50
	2	2.14	13.32	1,885.83
	3	2.31	20.92	3,111.67
	4	2.40	16.60	2,321.25
	5	2.26	15.67	1,800.00
	6	2.23	15.28	1,654.16
	7	2.18	10.05	1,125.00
ยีสต์สกัด	1	2.19	9.85	3,010.00
	2	2.11	12.13	3,934.17
	3	2.26	30.97	4,568.75
	4	2.50	18.00	2,740.00
	5	2.38	10.48	1,409.17
	6	2.37	3.39	628.33
	7	2.36	0.66	307.50
โซเดียมไนเตรท	1	2.80	8.54	2,815.00
	2	2.60	24.22	4,305.00
	3	2.99	11.80	2,667.50
	4	3.09	1.18	1,858.33
	5	3.05	0.16	862.92
	6	6.22	0.15	845.00
	7	6.06	0.11	387.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งไนโตรเจน	วันที่	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
แอมโมเนียมไนเตรท	1	2.17	4.77	1,152.67
	2	1.94	10.18	1,645.00
	3	3.00	2.12	362.50
	4	2.87	1.21	204.50
	5	2.86	1.16	204.00
	6	5.89	1.61	154.50
	7	1.98	0.69	74.00

จากตารางที่ 4.4 พบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด เนื่องจาก ยีสต์สกัดจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนไลซีน วิตามินบี และเกลือแร่ ได้แก่ โครเมียมและซิลิเนียม ซึ่งมีส่วนในการช่วยลดระยะ lag phase อีกทั้งยังเพิ่มปริมาณเซลล์แห้งส่งผลให้มีการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีการรายงานไว้ในงานวิจัยของ Carlos และ Miere (2000) ที่ได้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus* sp. และยังกล่าวไว้ว่ายีสต์สกัดจะช่วยในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้ น้ำแช่ข้าวโพด โซเดียมไนเตรท และ แอมโมเนียมไนเตรท ผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

แหล่งไนโตรเจน	น้ำแช่ข้าวโพด	ยีสต์สกัด	โซเดียมไนเตรท	แอมโมเนียมไนเตรท
กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	3,111.67[b]	4,568.75[a]	2,667.50[c]	362.50[d]

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าการใช้ยีสต์สกัดนั้นมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

จากนั้นนำมาหาอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ผลแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

แหล่งไนโตรเจน	อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน)
น้ำแช่ข้าวโพด	1,037.22
ยีสต์สกัด	1,522.92
โซเดียมไนเตรท	2,152.50
แอมโมเนียมไนเตรท	822.50

จากผลการทดลองการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า น้ำแช่ข้าวโพดให้อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1037.22 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ยีสต์สกัดจะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1522.92 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน โซเดียมไนเตรท จะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 2152.50 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน และแอมโมเนียมไนเตรท มีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 822.50 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน

ดังนั้นจากผลการทดลองการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมพบว่าการใช้ยีสต์สกัดนั้นมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

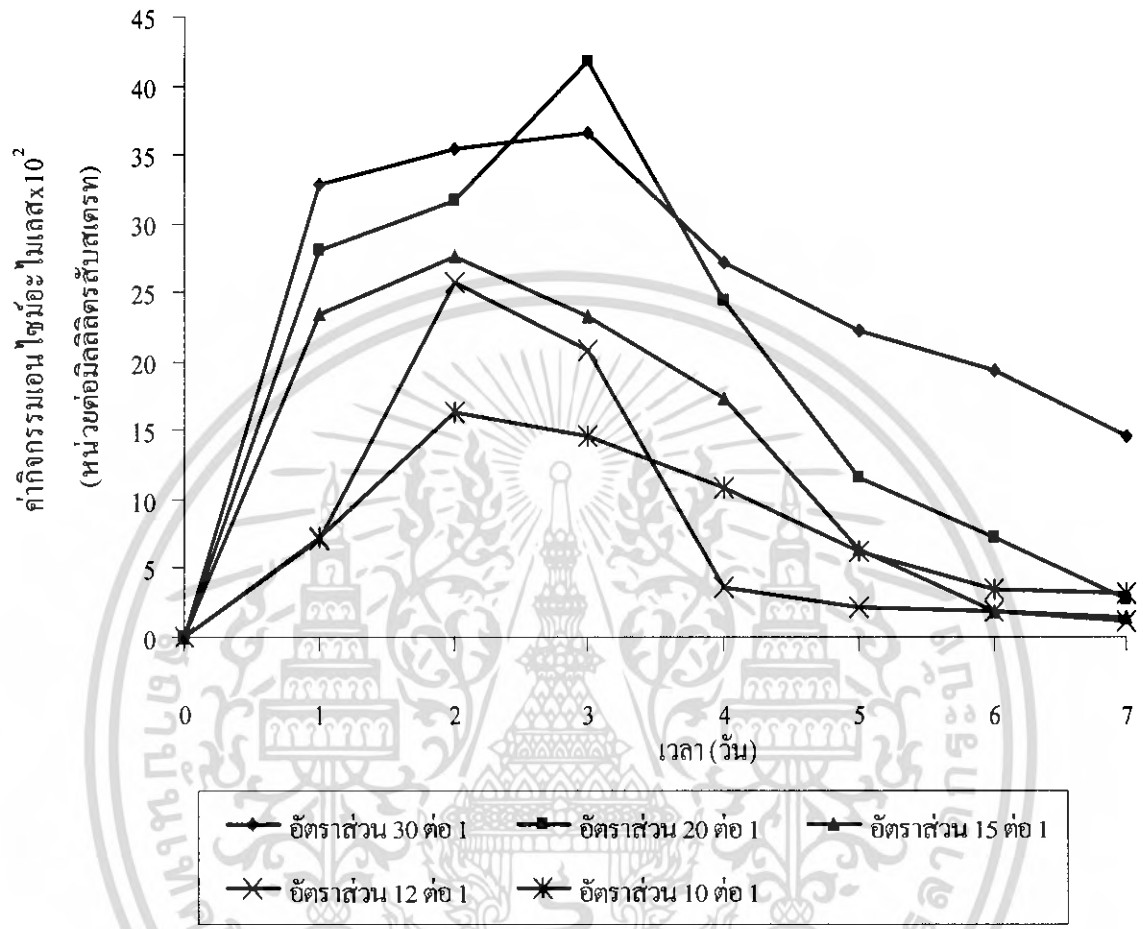
4.3 ผลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ผลการศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 และมีสภาวะในการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ยีสต์สกัด เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อ ยีสต์สกัด ดังนี้คือ 30 ต่อ 1 20 ต่อ 1 15 ต่อ 1 12 ต่อ 1 และ 10 ต่อ 1 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงมาจาก Omenu และคณะ (2005) ที่ใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อยีสต์สกัด 20 ต่อ 1 จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 4,175 หน่วยต่อมิลลิลิตรและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 40,866.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ 30 ต่อ 1 15 ต่อ 1 12 ต่อ 1 และ 10 ต่อ 1 ตามลำดับซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 3,664.58 2,331.67 2,086.67 และ 1,456.25 หน่วยต่อมิลลิลิตรและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 34,619.44 19,983.33 19,425.00 และ 11,326.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยค่าพีเอชของอาหารอยู่ระหว่าง 2-4 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.7

จากผลการทดลองที่ได้ต่างจากการรายงานของ Aiyer (2004) ศึกษาผลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* SPT 27 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือแป้งมันฝรั่ง และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือเปปโตน โดยอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดคือ 1 ต่อ 1 ซึ่งมีการรายงานเอาไว้ว่าปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่น้อยเกินไปอาจไม่เพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์ แต่ถ้ามีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มากเกินไปก็จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้ และรายงานว่าอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ทำให้มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส มากที่สุดคือ 1 ต่อ 1 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือแป้ง และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือยีสต์สกัด



รูปที่ 4.3 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลของการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน	วันที่	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
30 ต่อ 1	1	2.17	14.75	3,287.50
	2	1.93	15.17	3,545.83
	3	2.04	34.62	3,664.58
	4	2.24	25.64	2,718.75
	5	2.18	22.80	2,222.92
	6	2.08	9.73	1,945.00
	7	2.02	9.66	1,458.89
20 ต่อ 1	1	2.66	10.27	2,800.00
	2	1.95	19.45	3,175.00
	3	2.13	40.87	4,175.00
	4	2.26	20.08	2,448.33
	5	2.19	9.01	1,152.50
	6	2.08	4.79	730.00
	7	2.00	1.86	279.00
15 ต่อ 1	1	2.84	15.66	2,341.25
	2	1.90	19.98	2,770.00
	3	2.12	18.33	2,331.67
	4	2.25	11.23	1,736.25
	5	2.21	4.18	635.00
	6	2.04	0.97	185.50
	7	2.05	0.69	140.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน	วันที่	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
12 ต่อ 1	1	3.91	5.25	703.75
	2	1.97	19.43	2,581.67
	3	2.22	15.14	2,086.67
	4	2.27	7.99	359.17
	5	2.28	1.40	212.00
	6	2.12	0.78	194.67
	7	2.12	0.56	122.00
10 ต่อ 1	1	4.21	5.26	717.50
	2	2.00	11.33	1,630.00
	3	2.25	9.80	1,456.25
	4	2.25	1.81	1,087.50
	5	2.30	1.96	624.17
	6	2.33	0.85	344.17
	7	3.51	0.43	313.33

จากตารางที่ 4.7 พบว่าการใช้อัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อยีสต์สกัด 20 ต่อ 1 ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด ซึ่งให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับในงานวิจัยของ Kaur และ Worgan (1982) ที่ได้มีการรายงานเกี่ยวกับอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ในการเพิ่มปริมาณเส้นใยของรา *Aspergillus oryzae* ว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเพิ่มเส้นใยรามีตั้งแต่ 20 ต่อ 1 ไปจนถึง 200 ต่อ 1 และในงานวิจัยของ Carlos และ Miere (2000) ได้กล่าวไว้ว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ คือ เมื่อมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นก็จะส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย

นอกจากนี้ Gao และคณะ(2006) พบว่าสิ่งที่มีอิทธิผลต่ออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับ การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการพิจารณาถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมและความหลากหลายของธาตุอาหารที่เชื้อราต้องการจึงจำเป็นสำหรับการพัฒนาผลได้ของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการใช้อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน คืออัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อยีสต์สกัด 20 ต่อ 1 ในสูตรอาหารให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนคือ อัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อ ยีสต์สกัด ดังนี้ 30 ต่อ 1 20 ต่อ 1 15 ต่อ 1 12 ต่อ 1 และ 10 ต่อ 1 ผลการเปรียบเทียบตังตาราง ที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน	30 ต่อ 1	20 ต่อ 1	15 ต่อ 1	12 ต่อ 1	10 ต่อ 1
กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	3,664.58[b]	4,175.00[a]	2,331.67[c]	2,086.67[d]	1,456.25[e]

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าการใช้อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนคือ อัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อยีสต์สกัด 20 ต่อ 1 มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนแป้งต่อยีสต์สกัด 20 ต่อ 1 สำหรับการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

จากนั้นนำมาหาอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ผลแสดงดังตารางที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากการเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ

อัตราส่วนแหล่งคาร์บอน ต่อแหล่งไนโตรเจน	อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน)
30 ต่อ 1	1,221.53
20 ต่อ 1	1,391.67
15 ต่อ 1	1,385.00
12 ต่อ 1	1,290.84
10 ต่อ 1	815.00

จากผลการทดลองการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 30 ต่อ 1 จะมีอัตราการผลิตเอนไซม์ อะไมเลสเท่ากับ 1,221.53 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 20 ต่อ 1 จะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,391.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร ต่อวัน อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 15 ต่อ 1จะมีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,385.00 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 12 ต่อ 1 มีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,290.84 หน่วย ต่อมิลลิลิตรต่อวัน และอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 10 ต่อ 1 มีอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 815.00 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน

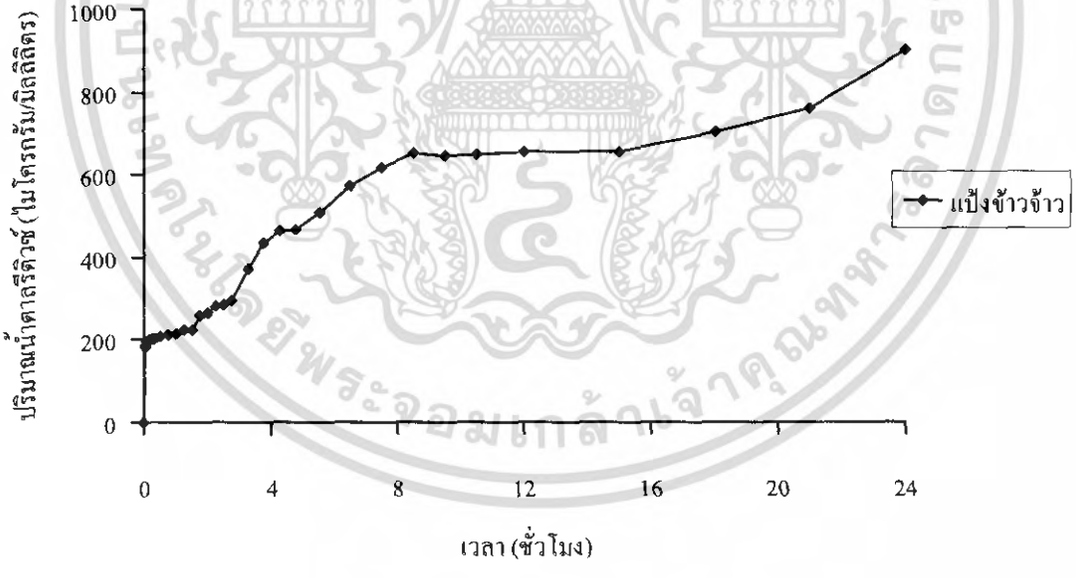
ดังนั้นจากผลการทดลองการหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมพบว่าการใช้อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 20 ต่อ 1 มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 20 ต่อ 1 สำหรับการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของการศึกษาการย่อยแป้งชนิดต่างๆโดยเอนไซม์อะไมเลส

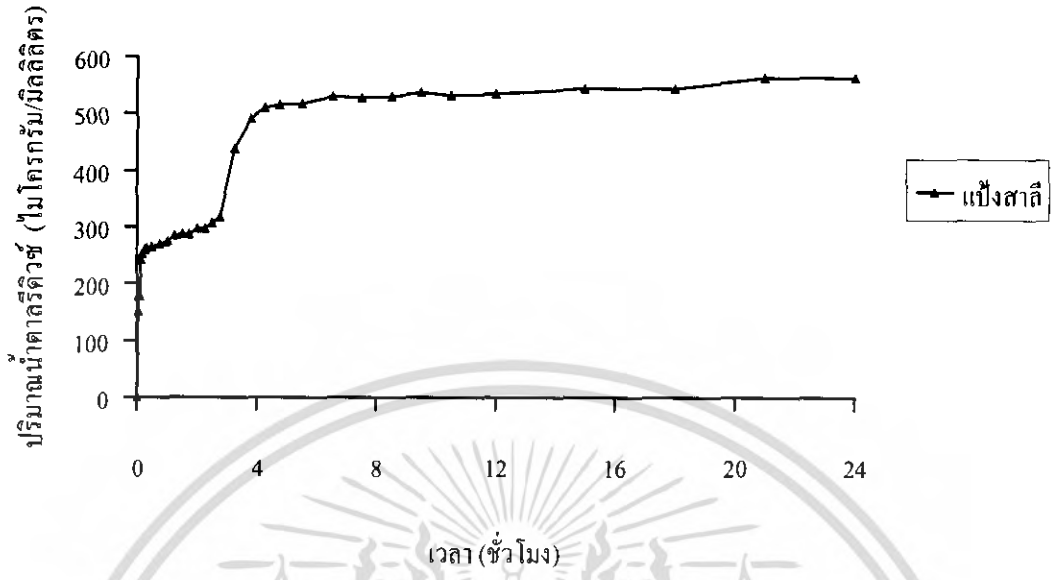
จากการศึกษาการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารเหลว โดยแป้งที่นำมาทดสอบ ได้แก่ แป้งข้าวจ้าว แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) โดยใช้แป้งแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นลงไป เพื่อให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นจำนวน 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองดังนี้

เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) ได้ดีที่สุด โดยจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1053.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง รองลงมาคือ แป้งข้าวจ้าว แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งสาลี โดยจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 900.00 859.44 830.67 และ 565.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังในรูปที่ 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 และตารางที่ 4.10

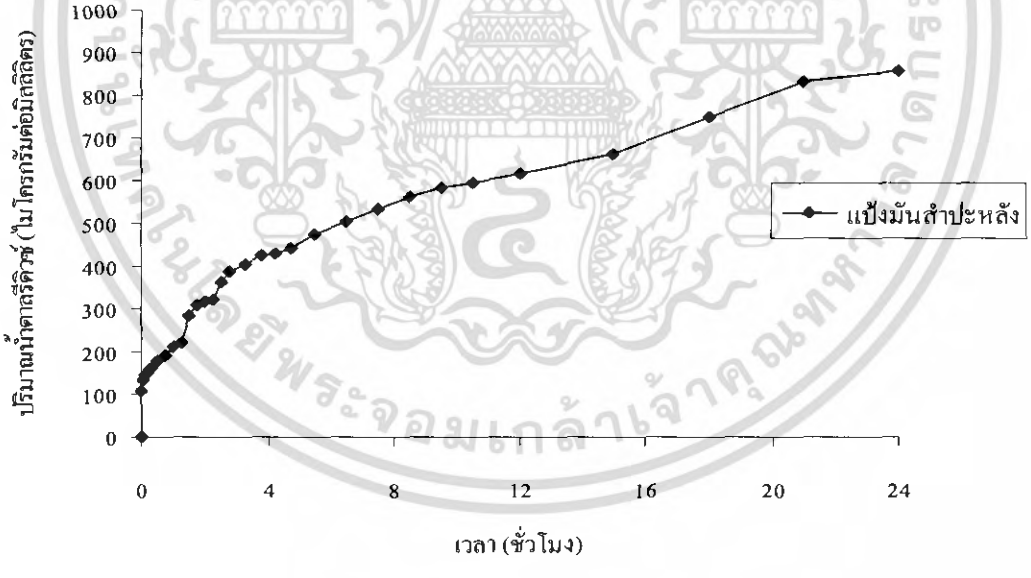


รูปที่ 4.4 แสดงผลของการย่อยแป้งข้าวจ้าวโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



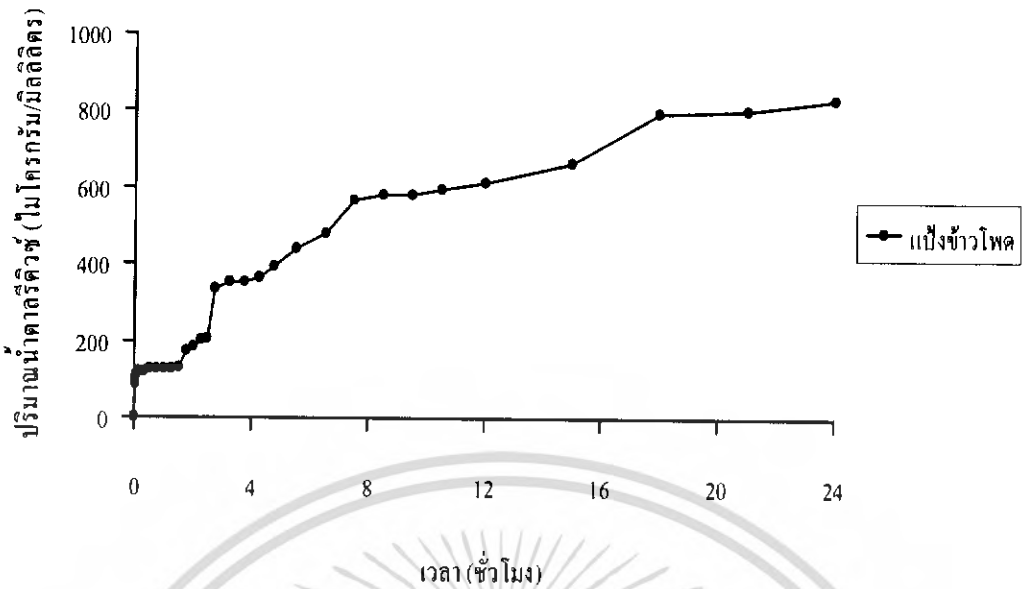
รูปที่ 4.5 แสดงผลของการย่อยแป้งสาลีโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2



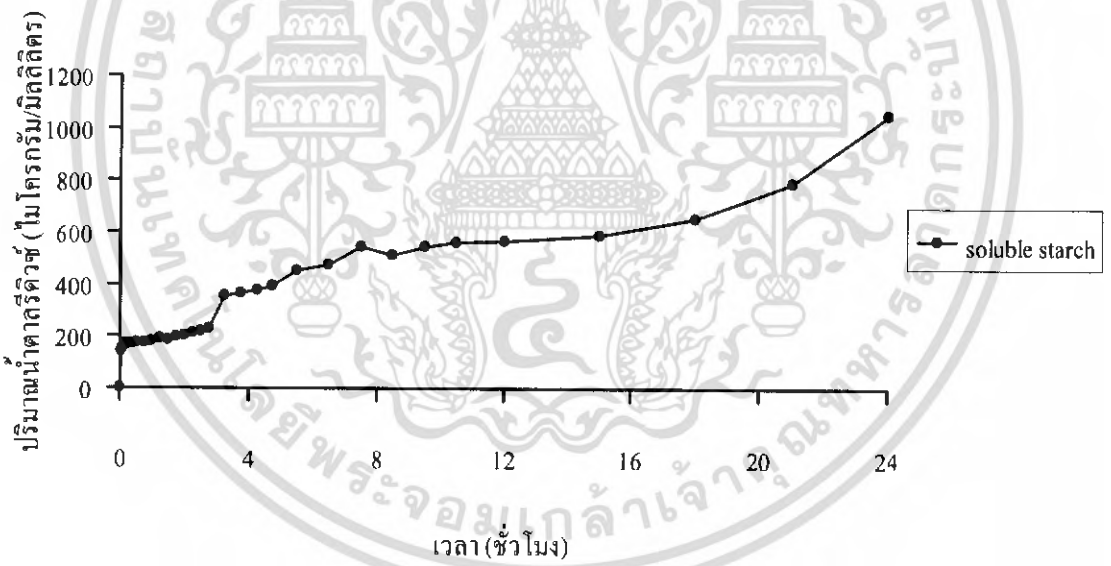
รูปที่ 4.6 แสดงผลของการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 แสดงผลของการย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จาก



รูปที่ 4.7 แสดงผลของการย่อยแป้งข้าวโพดโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2



รูปที่ 4.8 แสดงผลของการย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลของการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

ชนิดแป้ง	ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
แป้งข้าวจ้าว	1	214.17
	4	461.67
	8	653.06
	12	653.61
	16	654.17
	20	758.89
	24	900.00
แป้งสาลี	1	276.39
	4	510.56
	8	517.53
	12	535.83
	16	545.83
	20	565.00
	24	565.00
แป้งมันสำปะหลัง	1	178.61
	4	430.56
	8	561.67
	12	614.72
	16	617.78
	20	833.33
	24	859.44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดแป้ง	ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
แป้งข้าวโพด	1	126.94
	4	363.61
	8	581.95
	12	614.72
	16	663.33
	20	801.11
	24	830.67
แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch)	1	178.61
	4	378.05
	8	513.06
	12	570.00
	16	587.50
	20	792.22
	24	1,053.33

จากตารางที่ 4.10 การย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารเหลว พบว่า เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้สามารถย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) ได้ดีที่สุด เนื่องจากการย่อยแป้งของเอนไซม์ ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบและโครงสร้างของแป้ง ได้แก่ อะไมโลส อะไมโลเพกทิน ซึ่งแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) เป็นแป้งที่ได้ผ่านกระบวนการย่อยมาบางส่วนแล้ว จึงทำให้เอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) ได้ดีกว่าแป้งชนิดอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแป้งข้าวจ้าวกับแป้งข้าวโพดจะพบว่าแป้งข้าวจ้าวจะมีขนาดเม็ดแป้ง 3-5 ไมครอน ส่วนแป้งข้าวโพดมีขนาดเม็ดแป้ง 5-25 ไมครอน ดังนั้นเอนไซม์อะไมเลสจะย่อยแป้งข้าวจ้าวได้ดีกว่าแป้งข้าวโพดเนื่องจากมีขนาดเม็ดแป้งเล็กกว่า (กล้าณรงค์, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่าความไวของแป้งที่มีต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับแหล่งเอนไซม์ ซึ่งมีการรายงานไว้ในงานวิจัยของ Abu และคณะ (2005) และความไวของแป้งแต่ละชนิดที่มีต่อเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับรูพรุนบริเวณพื้นผิวของเม็ดแป้งที่สามารถให้น้ำและโมเลกุลผ่านได้ เนื่องจากลักษณะของเม็ดแป้งจะมีอิทธิพลต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ โดยบริเวณช่องหรือรูพรุนดังกล่าวจะเป็นจุดเริ่มต้นในการย่อย

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า จากการย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) ในชั่วโมงที่ 24 โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารเหลวจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากแป้งชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

ชนิดของแป้ง	แป้งข้าวจ้าว	แป้งสาลี	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวโพด	แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch)
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	900^{b}	565^{d}	859.44^{bc}	830.67^{c}	$1,053.33^{a}$

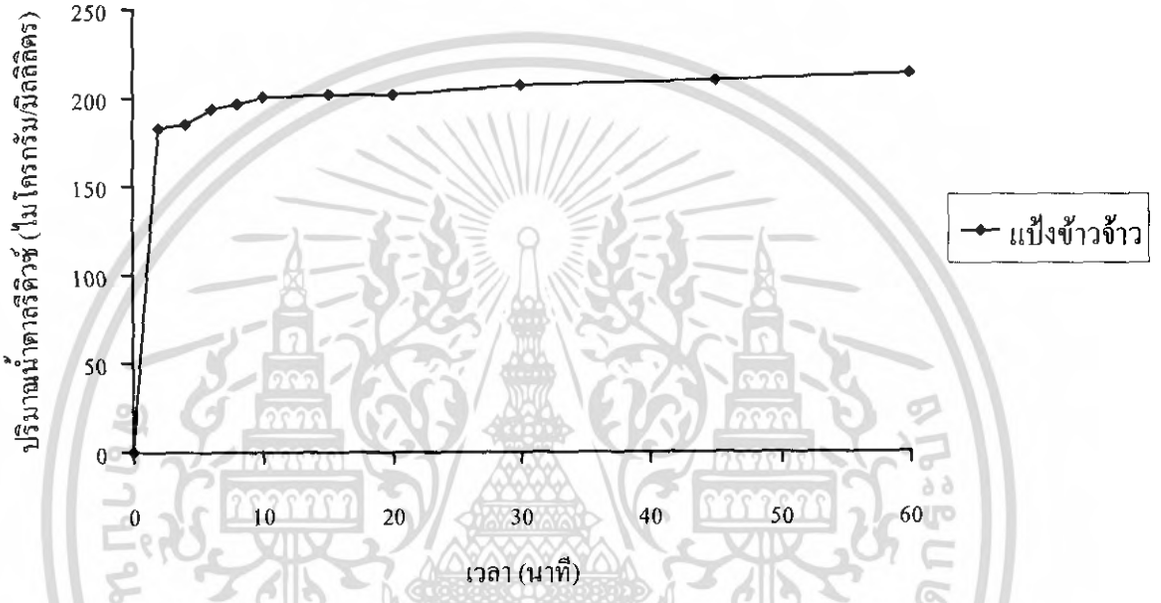
*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) ได้ดีที่สุดเมื่อใช้เวลาในการย่อยแป้ง 24 ชั่วโมง

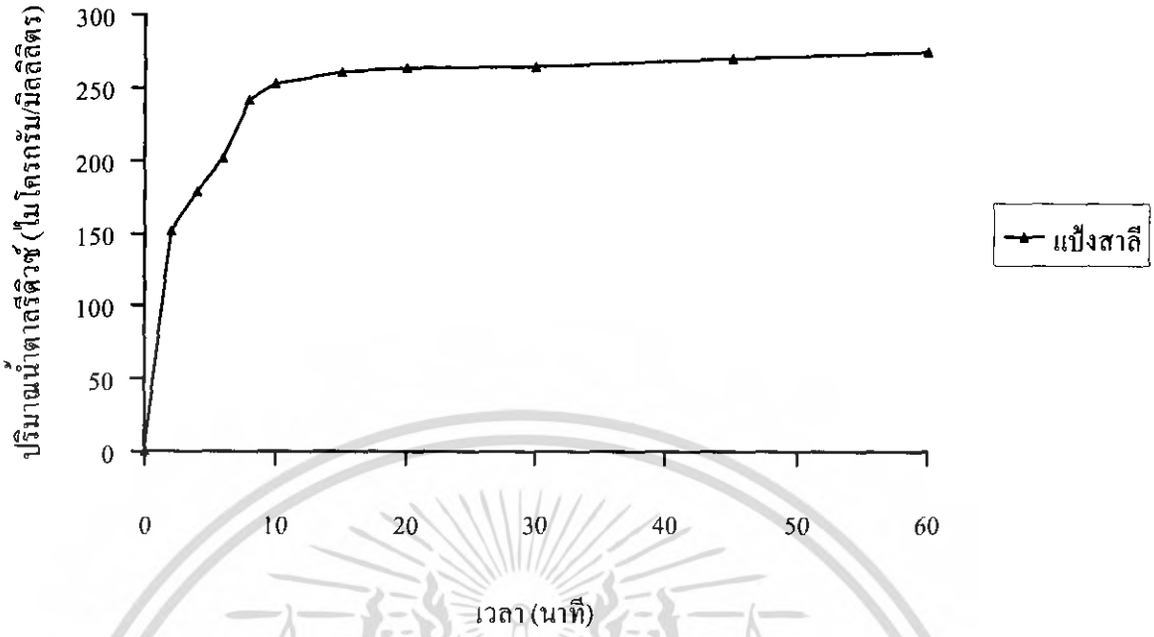
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองการย่อยแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารเหลว ในการหาอัตราเร็วเริ่มต้นที่ได้จากการย่อยแป้งชนิดต่างๆ จะวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นภายในช่วงเวลา 60 นาทีแรก แสดงดังในรูปที่ 4.9 4.10 4.11 4.12 4.13 และตารางที่ 4.12

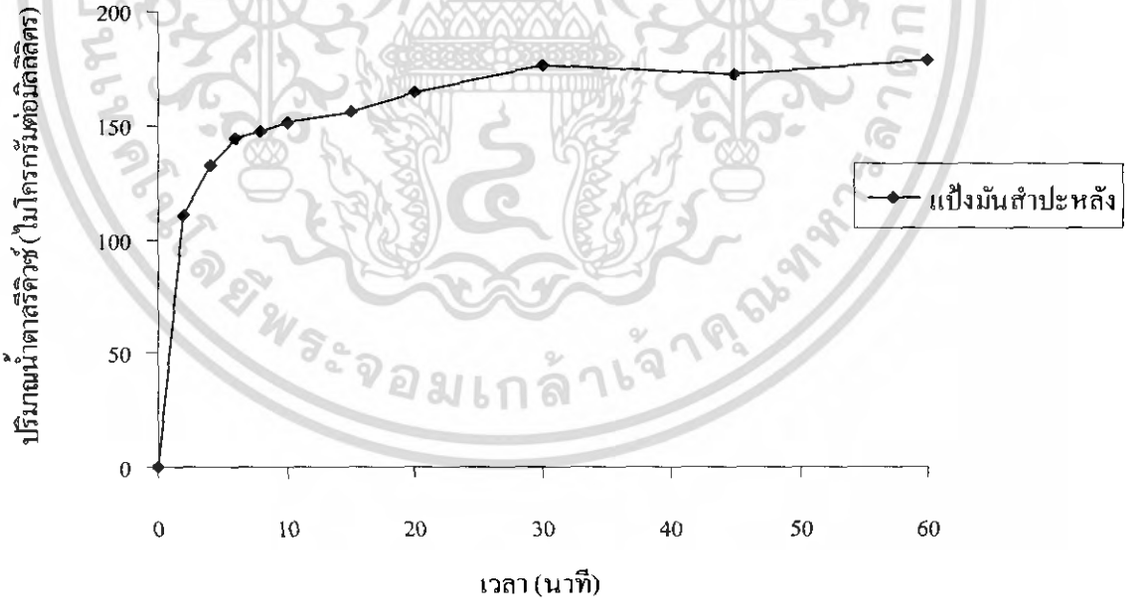


รูปที่ 4.9 แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งข้าวจ้าวด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

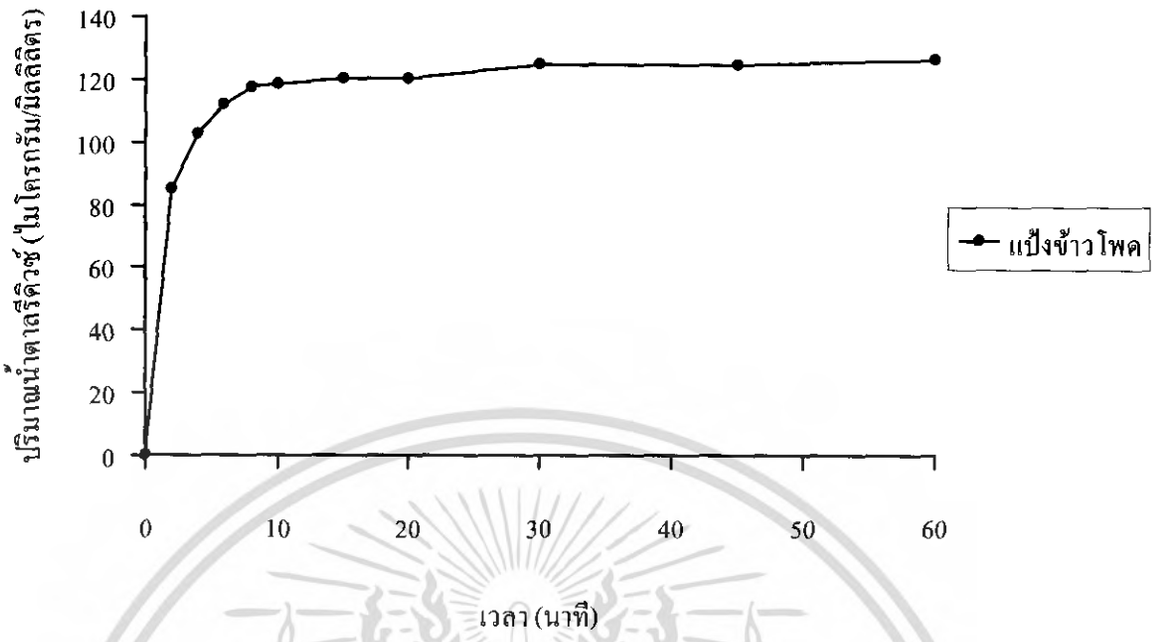


รูปที่ 4.10 แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งสาลีด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

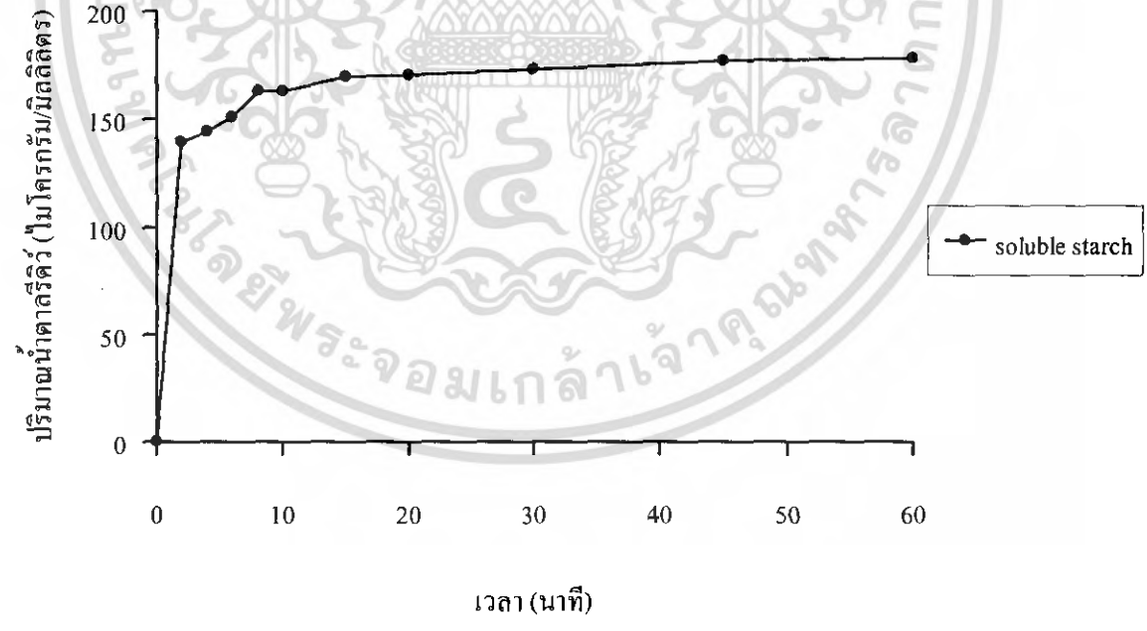


รูปที่ 4.11 แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งข้าวโพดด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2



รูปที่ 4.13 แสดงผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งที่ละลายน้ำด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

ชนิดแป้ง	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
แป้งข้าวจ้าว	0	0.00
	2	183.06
	4	185.28
	6	193.33
	8	196.94
	10	200.56
	15	202.22
	20	202.22
	30	206.94
	45	210.56
	60	214.17
แป้งสาลี	0	0.00
	2	151.11
	4	178.61
	6	202.00
	8	242.22
	10	252.78
	15	260.83
	20	263.88
	30	264.44
	45	270.83
	60	276.39
แป้งมันสำปะหลัง	0	0.00
	2	110.27
	4	132.50
	6	144.44
	8	147.80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดแป้ง	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
แป้งมันสำปะหลัง	10	151.11
	15	156.39
	20	164.44
	30	176.30
	45	172.49
	60	178.61
แป้งข้าวโพด	0	0.00
	2	85.00
	4	102.50
	6	111.95
	8	117.50
	10	118.33
	15	120.56
	20	120.56
	30	124.99
	45	125.28
	60	126.94
แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch)	0	0.00
	2	139.17
	4	143.89
	6	150.56
	8	171.11
	10	163.06
	15	170.00
	20	170.56
	30	172.78
	45	177.22
	60	178.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ผลของอัตราเร็วเริ่มต้นในการย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ในช่วงเวลา 60 นาทีแรกโดยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

ชนิดแป้ง	อัตราเร็วเริ่มต้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที)
แป้งข้าวจ้าว	92.00
แป้งสาลี	76.00
แป้งมันสำปะหลัง	53.33
แป้งข้าวโพด	41.60
แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch)	66.67

จากการคำนวณข้างต้นพบว่าเอนไซม์อะไมเลสมีอัตราเร็วเริ่มต้นในการย่อยแป้งข้าวจ้าวสูงสุด เท่ากับ 92.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที รองลงมาคือ แป้งสาลี แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด โดยมีอัตราเร็วเริ่มต้นในการย่อยแป้งเท่ากับ 76.00 66.67 53.33 และ 41.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 3,730.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเท่ากับ 26,322.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 4,568 .75 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 30,972.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อ ยีสต์สกัด ดังนี้คือ 30 ต่อ 1 20 ต่อ 1 15 ต่อ 1 12 ต่อ 1 และ 10 ต่อ 1 พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้อัตราส่วนแป้งข้าวโพด ต่อ ยีสต์สกัด 20 ต่อ 1 ซึ่งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 4,175.00 หน่วยต่อมิลลิลิตรและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 40,866.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งข้าวโพด 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1 กรัม เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7\ H_2O$) 0.5 กรัม

ศึกษาการย่อยแป้งชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวจ้าว และแป้งที่ละลายน้ำ เมื่อใช้เอนไซม์จำนวน 40 ยูนิตต่อ 1 มิลลิลิตรสับสเทรต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ย่อยแป้งที่ละลายน้ำได้ดีที่สุด โดยจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1053.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง

ศึกษาอัตราเร็วเริ่มต้นที่ได้จากการย่อยแป้งชนิดต่างๆ ในช่วงเวลา 60 นาทีแรกของการทดลอง พบว่าเอนไซม์อะไมเลสมีอัตราเร็วเริ่มต้นในการย่อยแป้งข้าวจ้าวสูงสุด เท่ากับ 92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลส เช่น อุณหภูมิ พีเอช และความคงตัวของเอนไซม์ เพื่อจะได้นำไปใช้ประโยชน์ได้ดีขึ้น

2. ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิดเอนไซม์ให้สูงขึ้น เช่น พีเอชเริ่มต้น ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และแร่ธาตุบางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
วิธีการวิเคราะห์

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

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1% soluble starch)

ละลายแป้ง 1.0 กรัมในน้ำกลั่นด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลายปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร

2. ซิเทรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 4.0

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

ละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid 1 กรัม และโพแทสซียมโซเดียมตาเทรด (COOK $(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 250.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 16 กรัมในน้ำ 200.0 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง

4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

สารละลายน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ใส่สารละลายอะไมเลส(ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตร และซิเตรทฟอสเฟต บัฟเฟอร์พีเอช 4.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

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

3. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. นำสารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน

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

7. ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

8. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

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

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งและให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1. สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid 1 กรัม และโพแทสซียมโซเดียมดาเทรต (COOK $(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 250.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 16 กรัมในน้ำ 200.0 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง

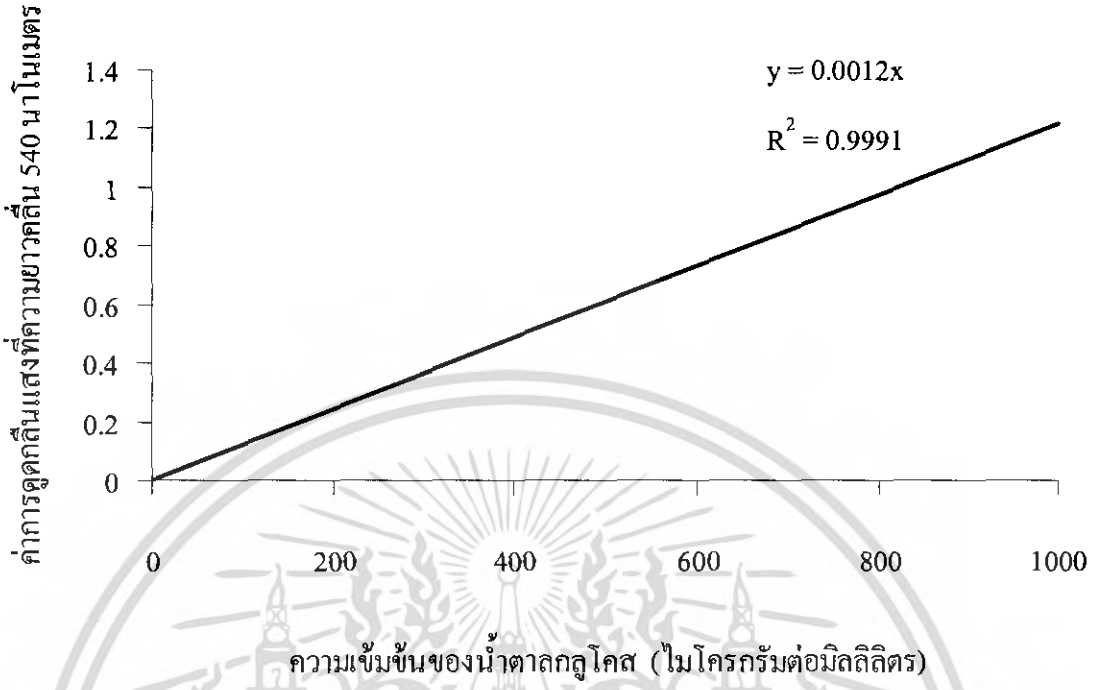
วิธีการ

1. ใส่สารละลายอะไมเลส(ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาดรฐาน

3. ทำหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer (Townsed and Lindegren , 1953)

วิธีการ

1. วางกระจกปิดสไลด์บนฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ที่ใช้นับสปอร์
2. บรรจุสารละลายสปอร์ที่เจือจางให้เหมาะสมแล้วบนฮีมาไซโตมิเตอร์ด้วยปิเปต
3. นับสปอร์ 5 ช่องบนตำแหน่ง บนซ้าย ล่างซ้าย บนขวา ล่างขวา และตรงกลางของช่องใหญ่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า
4. เมื่อนับสปอร์ครบ 5 ช่องแล้วให้นำสปอร์ทั้ง 5 ช่องมารวมกันเพื่อคำนวณตามสูตร

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

กำหนดให้ A คือ จำนวนสปอร์ที่นับได้จาก 5 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

สูตรอาหารและสารละลายบัฟเฟอร์

1. อาหาร PDA , Potato Dextrose Agar สำเร็จรูป

ทำการเตรียมอาหาร PDA สำเร็จรูปแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายบัฟเฟอร์ (Gomori , 1955)

2.1 Citrate-Phosphate Buffer

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

B : 0.1 M dibasic sodium phosphate (ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มิลลิลิตร (ของสารละลาย A) กับ Y มิลลิลิตร (ของสารละลาย B) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

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

3. สารละลายเกลือแร่ (salt solution)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	1.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม

ผสมสารเคมีลงในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. เทคโนโลยีแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอเดียร์สโตร์.

ดุษณี ธนะบริพัฒธ์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 3. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. เทกซ์แอนด์เจอนัลพับลิเคชัน จำกัด. กรุงเทพฯ.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2532. จุลชีววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2542. จุลชีววิทยาการหมัก วิตามิน และสารสี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรามสยบ ภูมิพาณิชย์ สุพีร์ สาณะเสน และอนุวัฒน์ วัดวงค์. 2543. การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วชิรภรณ์ คำยัง วริสิณีย์ แซ่เตียว และอาภากร ทรงสุมนัส. 2548. การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 โดยใช้เปลือกมันฝรั่งเป็นสับสเทรต. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

โสภิดา บุญอเนกทรัพย์ สุชาดา ไชยสวัสดิ์ สุวิทย์ เตีย และจิระพันธุ์ เนื่องจากนิล. 2542. การสกัดแป้งจากหัวมันสำปะหลัง. [online]. Available : http://www.kmutt.ac.th/rippc/prog17t.htm.

อภิชญา ทองทับ. 2548. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Aspergillus sp.* BR1. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Abu, E.A., Ado, S.A. and Jame, D.B. 2005. Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cereivisae* grown on sorghum pomace.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Journal of Biotechnology. 4 (8) : 785-790.

Aiyer, P.V.D. 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. African Journal Biomedical Research. 6(1) : 37-42.

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

Anto, H., Trivedi, U.B. and Patel, K.C. 2006. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresource Technology. 97 : 1161-1166.

Asgher, M., Asad M.J., Rahman, S.U. and Legge, R.L. 2007. A thermostable α- amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering. 79 : 950-955.

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

Bernfield, P. 1955. Amylase, alpha and beta. Methods of Enzymology. 1 : 149 – 158.

Bertolin, T.E., Schmidell, W., Maiorano, A.E., Casara, J. and Costa, J.A.V. Influence of carbon, nitrogen and phosphorus sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. Zeitschrift fure Naturforschung section C Biosciences. 58 : 708-712.

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

Cherry, H.M., Towhid Hossain, Md. and Anwar, M.N. 2004. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11 : 1988-1992.

Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. and Luciano, A.B. 2002. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. 33 (1).

Gao, L., Sun, M.H., Liu, X.Z. and Che, Y.S. 2006. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth an sporulation of several biocontrol fungi. Mycological Research. 111 : 87-92.

Gomori, G. 1995. Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods Enzymology. New York : Academic press. 138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kaur, P. and Worgan, J.T. 1982. Lipid production by *Aspergillus oryzae* from starch substrates. Appiled Microbiology and Biotechnology. 16 : 126-130.

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

Kundu, A. K., Das, S., and Grupta, T.K. 1973. Influence of culture and nutritional conditions on the production of amylase by the submerged culture of *Aspergillus oryzae.* Journal of Fermentation Technology. 51 : 142–150.

Li, X., Lin, W., Gao, P. and Chen, F. 1998. Endoglucanase S, a novel endocellulase exhibiting exoglucanase activity from a newly isolated *Streptomyces* sp. LX. Journal of Applied Microbiology. 85 : 347-356.

Mabel, S.H., Marilú, R.R., Nelson, P.G. and Renato, P.R. 2006. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. Journal of Food Engineering. 73 : 93-100.

Mahmoud, A. L. E. 1993. Different factors affecting growth and amylase production by fungi inhabiting poultry feeds. Journal of Basic Microbiology. 33 : 187–192.

Manjunath, P., Shenoy, B.C. and Zao, M.R. 1983. Fungal glucoamylase. Journal of Applied Biochemistry. 5 : 235-260.

Oates, C.G. 1996. Physical modification of starch. In Advanced Post Academic Course on Tapioca starch technology. Jan 22-26 & Feb. 19-23, 1996. AIT Center, Bangkok.

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

Omenu, A.M., Akpan, I, Bankole, M.O. and Teniola, O.D. 2005. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. African Journal of Biotechnology. 4 (1) : 19-25.

Oshoma, C.E. and Ikenebomeh, M.J. 2005. Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. Pakistan Journal of Nutrition. 4 (1) : 32-36.

Pambokian, C.R.D., Facciotti, M.C.R and Schmidell 1998. Relationship between morphology , Rheology and glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged culture. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 15 : 1-9.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rahardjo, Y.S.P., Weber, F.J., Haemers, S., Tramper, J. and Rinzema, A. 2005. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α-amylase production in model solid-state fermentation system. Enzyme and Microbial Technology. 36 : 900-902.

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

Sadhukhan, R.K., Manna S., Roy S.K., Chakrabarty S.L. 1990. Thermostable amylolytic amylase enzyme from a celluolytic fungus *Myceliophthora thermophilia* D14 (ATCC 48104). Applied Microbiology and Biotechnology. 33 : 692–696.

Sarikaya, E. and Gürgün, V. 1999. Increase of the alpha amylase yield by some *Bacillus* Strains. Turkey Journal of Biology. 24(2000) : 299-308.

Shatta, A.M., E1-Hamahmy, A.F., Ahmed, F.H., Ibrahim, M.M.K. and Arafa, M.A.I. 1990. The influence of certain nutritional and environmental factors on the production of amylase enzyme by *Streptomyces aureofaciens* 77. Journal Islamic Academy of Sciences. 3(2) : 134-138.

Soni, S. 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.

Srivastava, R.A.K. and Baruah, J.N. 1986. Culture condition for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 52 :179-184.

Swinkels, J.J.M. 1985a. Composition and properties of commercial native starch, Starch/ Starke. 37 : 1-5.

Swinkels, J.J.M. 1985b. Source of starch, its chemistry and physics. In G.M.A. van Beynum, and J.A. Roels (Eds.). Starch conversion technology. Jan. 22-26 & Feb. 19-23, 1996. AIT Center, Bangkok.

Teodoro, C.E.S. and Martins, M.L.L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. 31(4).

Townsend, G.E. and Lindgren, A.A. 1953. Viable yeast count. Cytologia. 18 : 183.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Uguru, G.C., Akinyanju, J.A. and Sani, A. 1997. The use of sorghum for thermostable amylase production from *Thermoactinomyces thalpophilus*.. Letters in Applied Microbiology. 25 : 13-16.

Van der Maarel, M.J.E.C. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α- amylase family. Journal of Biotechnology. 94 : 137-155.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้