สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# ผลของน้ำตาลบางชนิดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากแป้งข้าวโพดโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

นางสาวจิตรา ลิ้มสืบพงษ์
นางสาววรัญญา อรรคนิตย์
นางสาวศิรินทิพย์ บุญช่วย

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83740
วัน,เดือน,ปี 15 ต.ค. 2551
b 11983A98
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Effect of Some Sugars on Enzyme Amylase Production from Corn Starch by *Aspergillus* sp.REB2

**Miss Jitra Limsuebpong**

**Miss Warunya Ukkanit**

**Miss Sirintip Boonchuay**

**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of Requiment for the**

**Degree of Bachelor of Science**

**Department of Applied Biology**

**Faculty of Science**

**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**

**Academic Year 2007**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงงานพิเศษเรื่อง** ผลของน้ำตาลบางชนิดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพด โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

**นักศึกษา** นางสาวจิตรา ลิ้มสืบพงษ์ รหัส 47050505
นางสาววรัญญา อรรคนิตย์ รหัส 47050527
นางสาวศิรินทิพย์ บุญช่วย รหัส 47050532

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

| คณะกรรมการตรวจสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ประธานกรรมการ รศ.ควงใจ โอชัยกุล<br>กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง<br>กรรมการ อาจารย์ดนึงกานต์ กลั่นบุศย์ | |

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงงานพิเศษเรื่อง** ผลของน้ำตาลบางชนิดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพด โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

**นักศึกษา** นางสาวจิตรา ลิ้มสืบพงษ์ รหัส 47050505
นางสาววรัญญา อรรคนิตย์ รหัส 47050527
นางสาวศิรินทิพย์ บุญช่วย รหัส 47050532

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

## บทคัดย่อ

เชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ กับแป้งข้าวโพดในอาหารชนิดเดียวกัน โดยใช้น้ำตาลและแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งข้าวโพด 20 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,925 หน่วยต่อมิลลิลิตร และน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,305 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ กันที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งข้าวโพด 40 กรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,430 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสอย่างเดียวโดยใช้ความเข้มข้น 20 40 และ 60 กรัมต่อลิลิตร ตามลำดับ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 2,900 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลส 60 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Special Project Title** Effect of some sugars on enzyme Amylase production from corn starch by *Aspergillus* sp.REB2

**Name** Miss Jitar Limseubpong

Miss Warunya Ukkanit

Miss SirintipBoonchuay

**Department** Applied Biology

**Program** Industrial Microbiology

**Year** 2007

**Special Project Advisor** Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

## ABSTRACT

*Aspergillus* sp. REB2 produces amylase activity in medium containing corn starch as carbon source. The comparison of substrate for amylase production between some sugars at the concentration of 20 g/l and corn starch at same concentration was studied. The amylase activities of 1,925 U/ml and 1,305 U/ml were obtained from the medium containing 20 g/l corn starch and 20 g/l xylose, respectively. Combination of 20 g/l sugar and 40 g/l corn starch was evaluated. The maximum amylase yield of 1,430 U/ml was obtained when 20 g/l xylose and 40 g/l corn starch were used. The effect of xylose concentrations of 20, 40 and 60 g/l was also studied. The highest amylase activity of 2,900 U/ml was produced on day 1 of cultivation in the medium containing 60 g/l xylose.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

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

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรม และอาจารย์คนึง กานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการการสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์คณะกรรมการทุกๆท่าน สำหรับการสอบวิชาโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง สำหรับโอกาส ความรัก คำแนะนำ และกำลังใจในการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษ ซึ่งสิ่งที่ท่านมอบให้นั้นมากเกินจะเขียนได้

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน แม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ พี่ เพื่อน น้องทุกคน ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังกายและกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยตลอดมา จนโครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

**จิตรา ลิ้มสืบพงษ์**
**วรัญญา อรรคนิตย์**
**ศิรินทิพย์ บุญช่วย**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ข |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ค |
| กิตติกรรมประกาศ | ง |
| สารบัญ | จ |
| สารบัญตาราง | ช |
| สารบัญรูป | ซ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ | 3 |
| 2.1 องค์ประกอบภายในแป้ง | 3 |
| 2.2 กลไกการย่อยแป้ง | 5 |
| 2.3 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง | 6 |
| 2.3.1 เอนไซม์อะไมเลส | 6 |
| 2.4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลส | 12 |
| 2.4.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตอะไมเลส | 12 |
| 2.4.1.1 เชื้อรา | 12 |
| 2.4.1.2 แบคทีเรีย | 13 |
| 2.4.1.3 ยีสต์ | 13 |
| 2.5 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยจุลินทรีย์ | 14 |
| 2.5.1 แหล่งคาร์บอน | 14 |
| 2.5.2 แหล่งไนโตรเจน | 16 |
| 2.5.3 เกลือของสารอนินทรีย์ | 17 |
| 2.5.4 พีเอชและอุณหภูมิ | 18 |
| 2.6 น้ำตาลต่างๆ | 19 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 21 |
| 3.1 วัสดุอุปกรณ์ | 21 |
| 3.1.1 จุลินทรีย์ | 21 |
| 3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ | 21 |
| 3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมี | 21 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| 3.2 วิธีการทดลอง | 23 |
| 3.2.1 การเตรียมกล้าสปอร์ | 23 |
| 3.2.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้น้ำตาลบางชนิด | 23 |
| 3.2.2.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ | 23 |
| 3.2.2.2 ศึกษาการใช้น้ำตาลร่วมกับแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส | 24 |
| 3.2.2.3 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส | 24 |
| 3.2.3 วิธีวิเคราะห์ | 25 |
| 3.2.3.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ค) | 25 |
| 3.2.3.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ค) | 25 |
| 3.2.3.3 วิเคราะห์ผลทางสถิติ | 25 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ | 26 |
| 4.1 ผลของน้ำตาลบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส | 26 |
| 4.2 ผลของการใช้น้ำตาลบางชนิดร่วมกับแป้งข้าวโพดที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส | 31 |
| 4.3 ผลของปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส | 36 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ | 40 |
| เอกสารอ้างอิง | 42 |
| ภาคผนวก ก | 47 |
| ภาคผนวก ข | 48 |
| ภาคผนวก ค | 49 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่


1 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน 5

2 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ 5

3 แหล่งของจุลินทรีย์และคุณสมบัติบางประการ 7

4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลบางชนิดเปรียบเทียบกับแป้งข้าวโพด 27

5 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 29

6 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 29

7 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ 33

8 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ 34

9 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ 34

10 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ 37

11 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ 38

12 อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความ เข้มข้นต่างๆ 38


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1 โครงสร้างของอะไมโลเพคติน 4
2 โครงสร้างของอะไมโลส 4
4 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 8
5 การทำงานของเอนไซม์บีต้าอะไมเลส 9
6 การทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟรีเลส 9
7 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 10
8 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง 11
3 แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส 11
12 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลบางชนิดเปรียบเทียบกับแป้งข้าวโพด 30
13 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ 35
14 แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ 39
ค-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ($A_{540}$) 51
ค-2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ($A_{490}$) 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล โดยจะทำการย่อยแป้งหรือสับสเตรทแบบสุ่มที่พันธะ แอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ($\alpha$-1,4 glucosidic bond) ของสายอะไมโลส (amylose) และ อะไมโลเพคติน (amylopectin) ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาล กลูโคส มอลโตส หรือเด็กซ์ตริน (ในกรณีที่เกิดการย่อยไม่สมบูรณ์) เป็นต้น สำหรับ อะไมโลเพคติน เอนไซม์อะไมเลสจะไม่สามารถย่อยบริเวณพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก ($\alpha$-1,6 glucosidic bond) ได้ เอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่พบได้ทั่วไปใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืชและสัตว์จะได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ เพราะเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมแล้วจะเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมาได้ดี เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย โดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรียเนื่องจากจุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสับสเตรทให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมทำไปใช้ได้

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรม ได้นำเอนไซม์อะไมเลสนี้มาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตกันอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมขนมปัง อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมการผลิตยาและเคมีบริสุทธิ์ อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสและกลูโคสไซรัป เป็นต้น นอกจากนี้ เอนไซม์อะไมเลสยังนำมาใช้เป็นยาช่วยในการย่อยอาหารอีกด้วย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ มากมาย เช่น การผลิตแป้งชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง อีกทั้งในระดับอุตสาหกรรม เอนไซม์อะไมเลสมีความสำคัญและนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ทางผู้จัดทำจึงมีความคิดในการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้แป้งข้าวโพดมาเป็นสับสเตรทในการผลิต เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาทางอุตสาหกรรมต่อไป แต่การใช้แป้งเพียงอย่างเดียวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูง ดังนั้น ถ้าใช้น้ำตาลแทนแป้งหรือใช้น้ำตาลร่วมกับแป้งเป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ**

1.2.1 ศึกษาการใช้น้ำตาลบางชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1.2.2 ศึกษาการใช้น้ำตาลบางชนิดร่วมกับแป้งข้าวโพดในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1.2.3 ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

**1.3 ขอบเขตของการวิจัย**

1.3.1 ศึกษาการใช้น้ำตาลบางชนิด 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้แป้งข้าวโพด 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

1.3.2 ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสระหว่างแป้งข้าวโพด 4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำตาลบางชนิด 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

1.3.3 หาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

**1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1.4.1 เพื่อทราบว่ามีน้ำตาลชนิดใดบ้างที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส เมื่อไม่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน

1.4.2 สามารถใช้น้ำตาลร่วมกับแป้งในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้เชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 โดยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและหลักการ

แป้งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ข้าว ข้าวโพด และข้าวสาลี ในอุตสาหกรรมการผลิตแป้ง นอกจากจะนำแป้งมาใช้ประโยชน์โดยตรง แล้วยังนำแป้งมาเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาลกลูโคส เดกโตรส และน้ำตาลฟรักโตส เป็นต้น เมื่อสิบกว่าปีที่ผ่านมามีการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยแป้งเพื่อผลิต maltodextrin แทนการใช้กรด เนื่องจากการย่อยแป้งด้วยกรดต้องทำปฏิกิริยาร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิสูง ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของกรด เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย ทั้งนี้ยังก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เช่น เกิดสารเฟอร์ฟูรอล ดังนั้นในปัจจุบันการย่อยแป้งด้วยกรดจึงถูกแทนที่ด้วยการใช้เอนไซม์เพราะสภาวะที่ไม่รุนแรง การเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อชนิดผลิตภัณฑ์ ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาง่าย ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง รวมทั้งไม่ต้องการอุปกรณ์ที่มีความทนทานต่อการกัดกร่อนสูงเช่นเดียวกับการใช้กรด (พักตร์ประไพ, 2546)

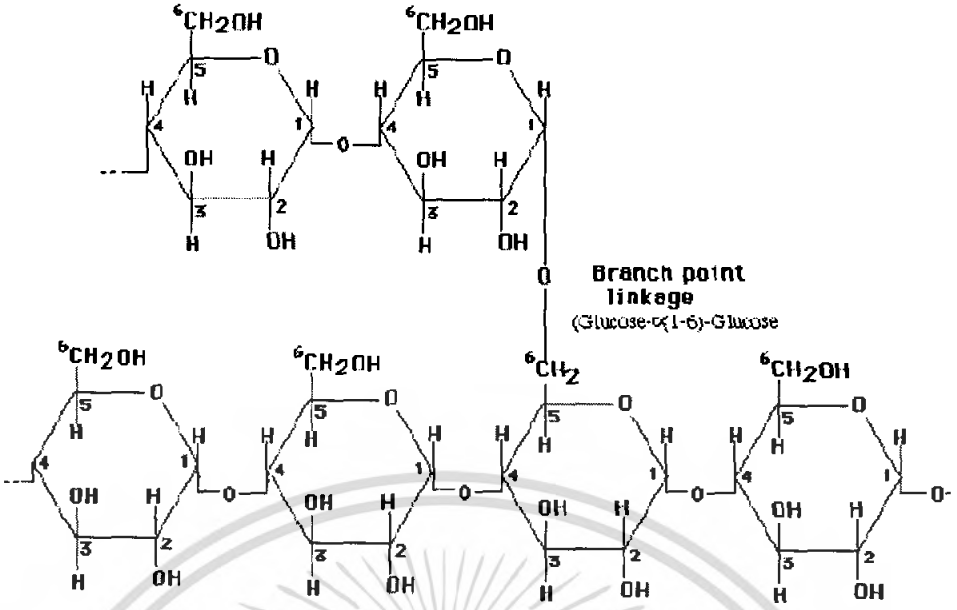
## 2.1 องค์ประกอบภายในแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 : 10 : 5 มีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_6)_n$ แป้งจัดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหน่วยแอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซ์ซิง (reducing end group) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิดคือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพคติน)

**อะไมโลเพคติน (amylopectin)**

อะไมโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด $\alpha$-1,4 และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้น มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด $\alpha$-1,6 (Chaplin, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

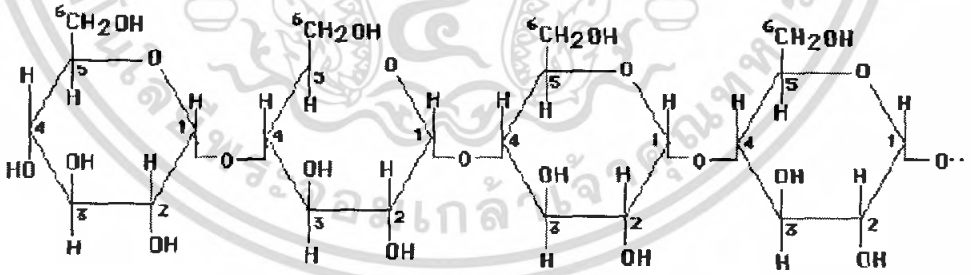



**รูปที่ 1** โครงสร้างของอะไมโลเพคติน

ที่มา : Chaplin, 2001

**อะไมโลส (amylose)**

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก ชนิด α-1,4 (Chaplin, 2001)



**รูปที่ 2** โครงสร้างของอะไมโลส

ที่มา : Chaplin, 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 1** สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

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

ที่มา : Beynum and Roels (1985)

**ตารางที่ 2** องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ

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

ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกูล (2543)

## 2.2 กลไกการย่อยแป้ง

การย่อยแป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

- การเกิดเจลาติไนเซชัน (gelatinization)

เป็นขั้นตอนที่ทำให้เม็ดแป้งพองตัว โดยเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำในขณะที่ได้รับความร้อนทำให้เม็ดแป้งพองตัว เรียกอุณหภูมิช่วงนี้ว่า อุณหภูมิการเกิดเจล (gelatinization temperature)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การเกิดลิเคอแฟคชัน (liquefaction)

เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจล โดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของลูกโซ่กลูโคส ทำให้แยกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีความหนืดลดลงกว่า 30 ปีที่ผ่านมามีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแทนการใช้กรดย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า

- การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (saccharification)

เป็นขั้นตอนการย่อยแป้ง ให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลภายหลังการย่อยจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่า ผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส มอลโตส หรือมอลโตไตรโอส

## 2.3 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง

แหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้ง สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีข้อดี คือ จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณมาก ๆ ได้ในระยะเวลาสั้น โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็กจึงใช้พื้นที่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก และผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล และการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการทำได้โดยวิธีการง่าย ๆ และใช้เวลาไม่นานนัก และสามารถปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มผลผลิตได้ง่าย รายละเอียดของเอนไซม์อะไมเลสมีดังนี้ คือ

### 2.3.1 เอนไซม์อะไมเลส

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสับสเตรทจำพวกแป้ง ไกลโคเจน ให้ได้เด็กซ์ตริน (dextrin) โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นเอนไซม์ประเภทปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น

เอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ในการย่อยสลายแป้งแบ่งออกตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์ได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. เอนไซม์ย่อยภายนอก (exo-enzyme)

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตัดหน่วยของกลูโคสที่เหลืออยู่บริเวณภายนอกของสายพอลิเมอร์ของอะไมเลสและอะไมโลเพคทิน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น กลูโคส หรือ มอลโตส และเด็กซ์ทรินที่มีความยาวจำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3** แหล่งของจุลินทรีย์และคุณสมบัติบางประการ

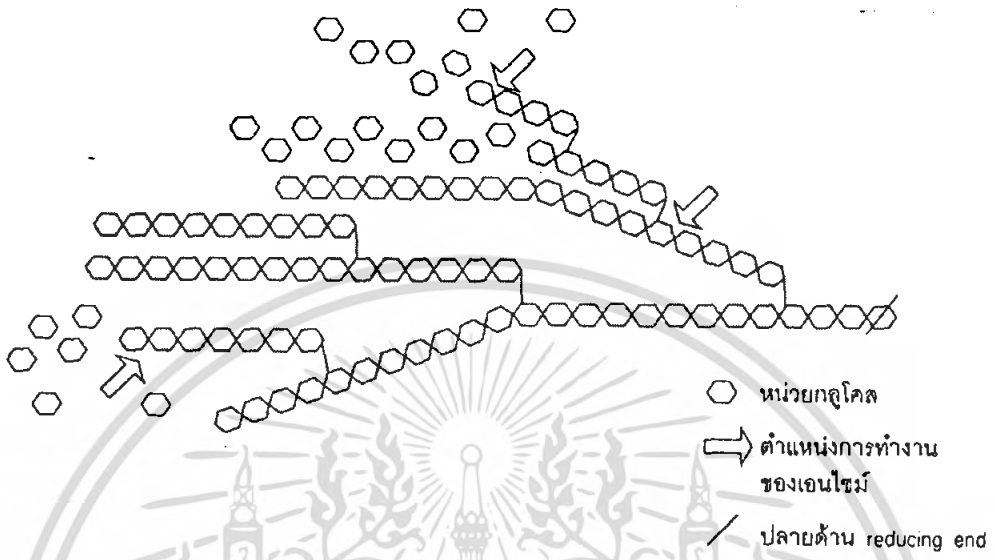
| Microbial sources | Molecular weight | Optimum temp. (°C) |
|---|---|---|
| **α- amylase** | | |
| *Bacillus subtilis* | 41,000 | |
| *B. amyloliquefaciens* | 49,000 | 70 |
| *B. licheniformis* | 62,000 | 90 |
| **β- amylase** | | |
| *B. cereus* | 35,000 | 50 |
| *B. circulans* | 53 - 63,000 | 60 |
| *Pseudomonas* sp. BQ 6 | 37,000 | 45 – 55 |
| **Glucoamylase** | | |
| *Aspergillus awamori* | 83,700 – 88,000 | 60 |
| *A. niger* I | 99,000 | |
| *A. oryzae* I | 76,000 | 60 |
| *A. oryzae* II | 38,000 | 40 |
| *Penicillium oxalicum* I | 84,000 | 55 - 60 |
| *Rhizopus delemar* | 100,000 | 40 |
| **Pullulanases** | | |
| *Aerobacter aerogenes* | 1,143,000 | 50 |
| *B. polymyxa* | 48,000 | 60 |
| *Streptomyces* sp. No. 280 | | 5 |

ที่มา : Nigam and Singh (1995)

- แกมมาอะไมเลส หรือ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase ; EC 3.2.1.3 ; α(1,4)-glucanglucohydrolase) หรือเรียกว่า อะมิโลกลูโคสิเดส (amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่ จับกันของน้ำตาลกลูโคส ทั้งพันธะแอลฟา-1,4 และพันธะกิ่ง แอลฟา-1,6 โดยที่การตัดพันธะกิ่งจะช้ากว่าการตัดพันธะแอลฟา-1,4 (กล้าณรงค์, 2546) การตัดสายพอลิเมอร์จะทำการตัดปลายสายเข้าไปทีละหนึ่งหน่วยกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่รูปร่างต่างไปจากเดิม คือ ได้เบต้าคอนฟิกูเรชัน หรือ เบต้าดีกลูโคส และส่วนของกลูแคน และลิมิตเด็กซ์ตรินในการย่อยแป้งให้ได้กลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำกิจกรรม เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-110 กิโลดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

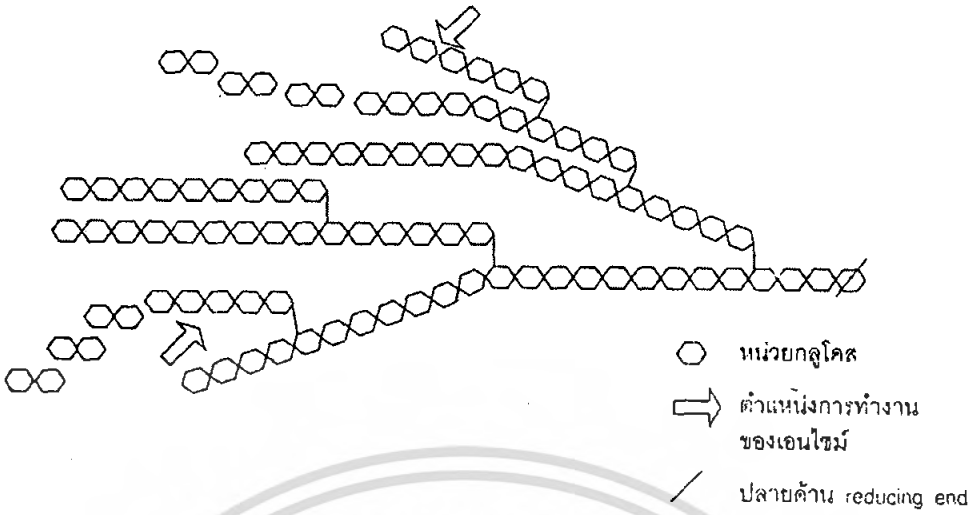
มีความเสถียรที่พีเอช 3.5-5 และที่อุณหภูมิ ± 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบในจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus niger* , *Aspergillus orysae* และ *Rhizopus* spp. (ปราณี , 2543)




**รูปที่ 3** การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส
ที่มา : Bruinenberg (1996)

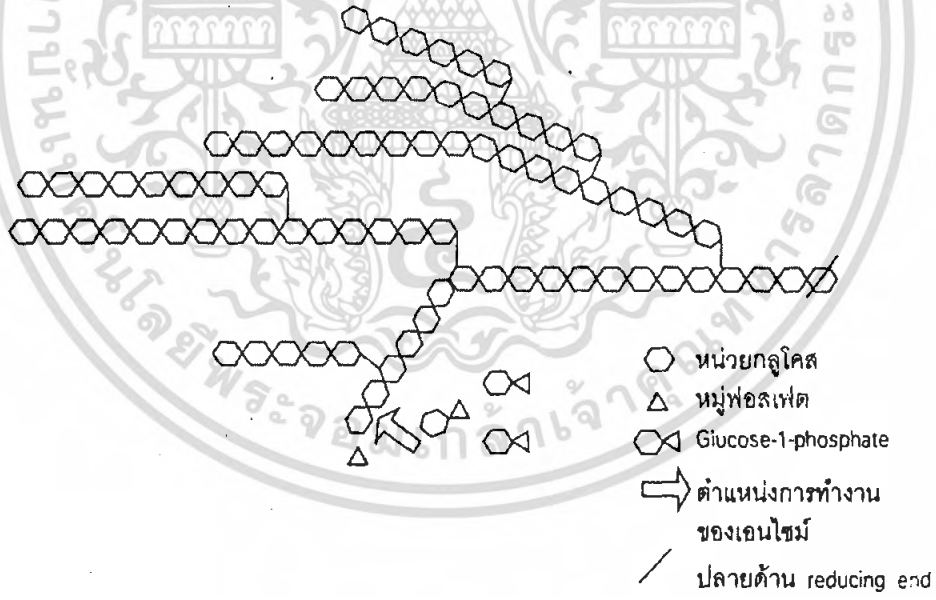
- เบต้าอะไมเลส (beta-amylase ; EC 3.2.1.2 ; α-(1,4)-glucan maltohydrplase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกโมเลกุลของแป้ง แล้วค่อยตัดจากภายนอกเข้ามา โดยเริ่มจากปลายสายของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน (ปลายด้าน non-reducing end) เอนไซม์จะตัดพันธะ แอลฟา-1,4 ของโมเลกุลกลูโคสเป็นคู่ๆไป (กล้าณรงค์, 2546) ผลที่ได้จะได้เป็นกลูแคน ลิมิตเด็กซ์ตริน และส่วนใหญ่เป็นมอลโตสที่รูปร่างต่างไปจากเดิม คือได้เบต้าคอนฟีกูเรชั่น หรือ เบต้ามอลโตส แต่เมื่อปฏิกิริยาเข้าใกล้จุดที่เป็นกิ่งก้านหรือพันธะแอลฟา-1,6 ของอะไมโลเพคตินเอนไซม์จะหยุดกิจกรรม ทำให้เหลือโมเลกุลใหญ่ๆ ไว้มาก เบต้าอะไมเลสต้องการ $Ca^{++}$ ในการทำปฏิกิริยา เบต้าอะไมเลสพบได้ในพืชชั้นสูง เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และพบได้ในถั่ว หรือมันฝรั่งหวาน นอกจากนี้ยังสามารถสกัดเอนไซม์อะไมเลสได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacilli Pseudomonas* เอนไซม์จากพืชมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 125 - 150 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 4-9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4** การทำงานของเอนไซม์บีต้าอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)




**รูปที่ 5** การทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟรีเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ฟอสฟอรีเลส (phosphorylase ; EC 2.4.1.1 ; α (1,4)-glucan : orthophosphate glucosyltransferase) เป็นทั้งเอนไซม์สังเคราะห์และย่อยสลาย พบในพืชและสัตว์ ในสภาวะที่มีอนินทรีย์ฟอสเฟต ใช้เอนไซม์ตัวนี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาผันกลับของ

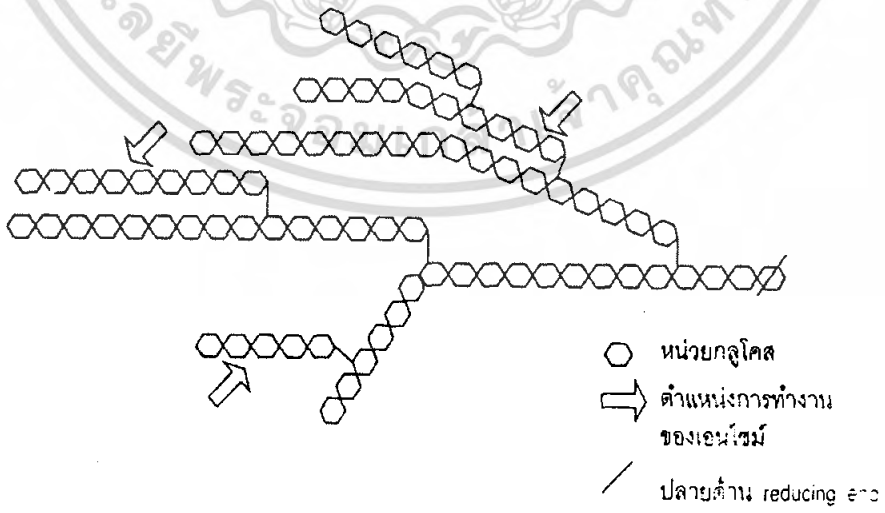
แป้ง + ฟอสเฟต ⟷ กลูโคส - 1 - ฟอสเฟต

เอนไซม์ตัวนี้จะทำหน้าที่ในการตัดหน่วยกลูโคสออกจากสาย โดยเริ่มตัดจากด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ซิง ไม่สามารถย่อยพันธะกิ่งได้ (กล้าณรงค์, 2546)

2. เอนไซม์ย่อยภายใน (endo-enzyme)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะกลูโคสิดิกที่ตำแหน่ง แอลฟา-1,4 ภายในสายพอลิเมอร์ของสายอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ได้แก่

- แอลฟาอะไมเลส (α - amylase ; EC 3.2.1.1 ; α(1,4) – glucan glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานอยู่ภายในโมเลกุลของแป้ง โดยจะตัดพันธะ แอลฟา-1,4 ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จับอยู่เท่านั้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็น โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่ความยาวต่างๆกัน ไม่สามารถตัดพันธะแอลฟา- 1,6 ได้ การทำงานเป็นลักษณะแบบสุ่มตัดภายในสายของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคตินและต้องการ $Ca^{++}$ ร่วมทำกิจกรรม เอนไซม์นี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน และมีความเสถียรที่พีเอช 5.5-9 อุณหภูมิ 25-115 องศาเซลเซียส อะไมเลสนี้สามารถผลิตได้ทั้งจากพืช สัตว์ เชื้อรา และแบคทีเรีย ในอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียมักมีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงได้ เมื่อใช้แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสลายแป้งจะช่วยลดความหนืดและทำให้ความสามารถในการย้อมติดสีไอโอดีนลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้ reducing power เพิ่มขึ้น (กล้าณรงค์ , 2546) เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อทางการค้าว่า Termamtl ® และมีชื่อสามัญว่า ไดเอสเทส (diastase) (ปราณี , 2543)



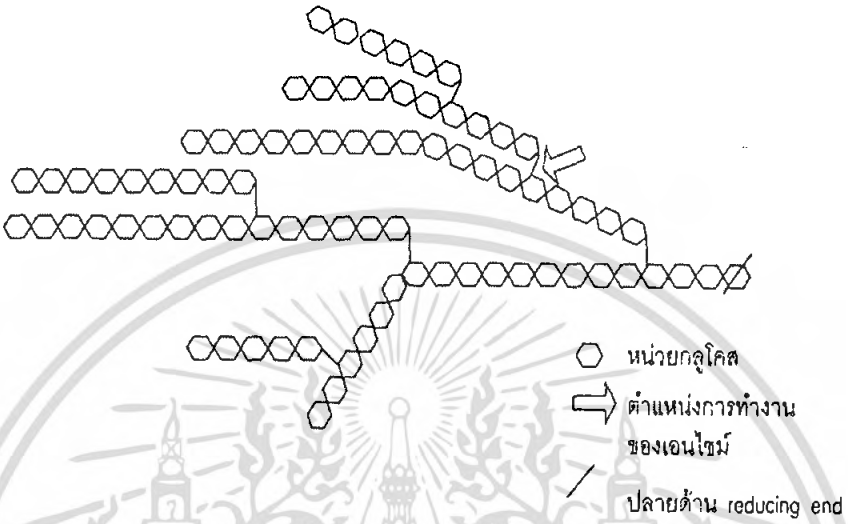

**รูปที่ 6** การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

**ที่มา** : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

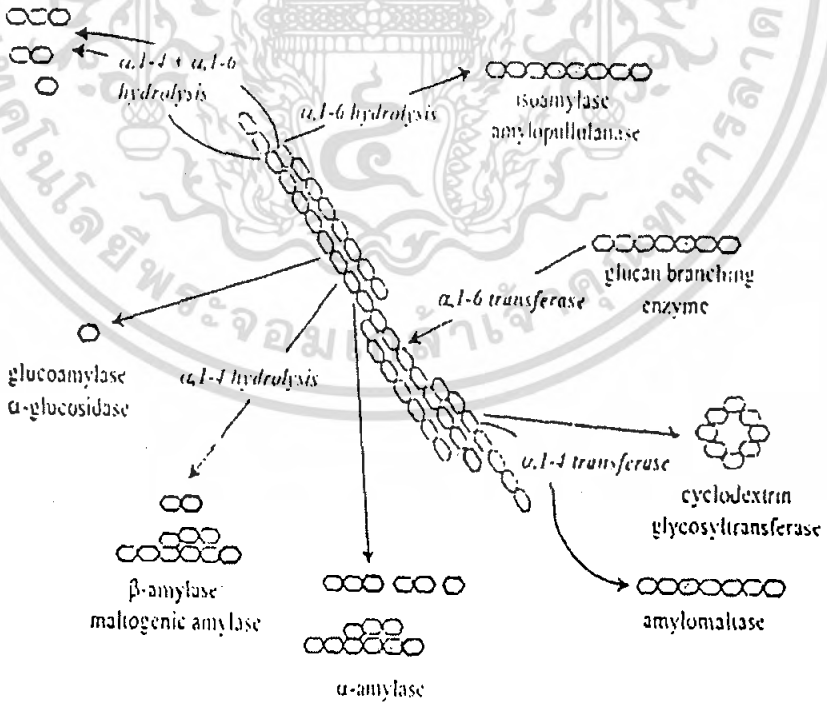
3. เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (debranching enzyme)

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้เฉพาะพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิกของสายอะไมโลเพคทิน ไกลโคเจนเด็กซ์ตรินที่มีกิ่งก้านสาขา โอลิโกแซคคาไรด์หรือพูลลูแลน เท่านั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นโพลีแซคคาไรด์ เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซอะไมเลส และพูลูแลนเนส




**รูปที่ 7** การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง

ที่มา : Bruinenberg (1996)




**รูป 8** แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส

ที่มา : Van der Maarel (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลส

### 2.4.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตอะไมเลส

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ จุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืชและสัตว์ จะได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ เพราะจุลินทรีย์สามารถทำการเพิ่มจำนวนได้ง่าย และเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมแล้วจะเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมาได้ดีสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย

#### 2.4.1.1 เชื้อรา

Olama และ Sabry (1989) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้ออะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *Penicillium purpurescence* ในอาหารเหลวที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 7 โดยเติมหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 15 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อได้เป็นเวลา 7 วัน

Moreira และคณะ (1999) ได้ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Aspergillus tamari* ซึ่งแยกได้จากดิน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้งหรือมอลโตส หลังจากเลี้ยงเชื้อพบว่าสามารถให้ผลผลิต ที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในเครื่องเขย่า โดยเอนไซม์อะไมเลสที่ได้สามารถทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง คือ 4-10 และอุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาแยกแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสออกจากกันโดยใช้วิธีโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

Cherry และคณะ (2004) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งแยกได้จากกระเพาะแพะ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พีเอช 7 ใช้แหล่งคาร์บอนคือแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 เปอร์เซ็นต์

Ramachandran และคณะ (2004) รายงานว่า เชื้อ *Aspergillus orysae* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วยกากของเหลือจากการสกัดน้ำมันมะพร้าว (coconut oil cake) เป็นวัตถุดิบหลัก ซึ่งจะให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 1,327 หน่วยต่อกรัมของสับสเตรทแห้ง และเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีความชื้นเริ่มต้นเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส 1,827 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง เมื่อเติมกลูโคสและแป้งลงในอาหารพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1,911 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง และเมื่อมีการเติมเปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ จะให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดถึง 3,388 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง

**2.4.1.2 แบคทีเรีย**

Hamilton และคณะ (1999) ทำการศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของแป้งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. IMD 435 พบว่าการผลิตจะให้กิจกรรมอะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำตาลแลกโตส 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามชีวมวลที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำตาลแลกโตสก็จะน้อยกว่าเลี้ยงในแป้ง หรือ เบต้า-ไซโคลเฮกซิน และผลผลิตจากการไฮโดรไลซีสของสารละลายน้ำแป้ง และแป้งข้าวโพด จะได้น้ำตาลกลูโคส และมอลโตส

Yang และคณะ (1999) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Streptomyces rimosus* TM-55 ในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว และแบบอาหารแข็ง พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวโดยใช้แป้ง 691.3 กรัม ตรวจพบครั้งแรกหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และสูงสุด เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง สำหรับการเลี้ยงในอาหารแข็งสามารถตรวจพบครั้งแรกเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 180 ชั่วโมง โดยใช้อาหารแข็ง 2,642.7 กรัม นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6-7 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 – 45 องศาเซลเซียส

Soni และคณะ (2003) พบว่าจากการคัดแยก *Bacillus* sp.AS-1 และ *Aspergillus* sp.AS-2 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ได้ตามลำดับในปริมาณที่มาก โดยใช้อาหารแข็ง คือเมล็ดข้าวสาลีในการหมัก เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถกระตุ้น คงสภาพได้ช่วงอุณหภูมิและพีเอชในช่วงกว้าง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะแสดงประสิทธิภาพในการลดความหนืดของแป้งได้ 96 เปอเซ็นต์ ขณะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสแสดงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ 87 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายน้ำแป้ง 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถที่จะย่อยแป้งสาลีได้สูงสุดถึง 96 เปอร์เซ็นต์

**2.4.1.3 ยีสต์**

Sukhumavasi และคณะ (1975) ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เช่นเดียวกับ Kato และคณะ (1976) ซึ่งได้ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* จากลูกแป้ง Ragi ของประเทศอินโดนีเซีย ก็สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เช่นกัน

Saha และ Ueda (1983) พบว่า เชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* IFO 0111 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมโลสย่อยแป้งดิบได้ โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 4.5 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบเท่ากับ 3.5

Wanderley และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อยีสต์ *Cryptococcus flavus* ซึ่งแยกได้จากผลไม้บลาซิล และนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของแป้งเมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีบน SEphecryl S-100 columm เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้เป็นไกลโคเจนโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 75 และ 84.5 กิโลดาลตัน ซึ่งหาได้จากวิธี sodium dodesyl sulfate – polyacrylamine gel electrophoresis และ gel filtration ตามลำดับ ผลผลิตที่ได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อยีสต์บนแป้ง คือ มอลโตส และมอลโตรไตรโอส ซึ่งมีค่า $K_m$ ของเอนไซม์บริสุทธิ์เท่ากับ 0.056 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

## 2.5 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารและสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบชนิดต่างๆได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ทุกชนิดมีความต้องการน้ำ แหล่งพลังงานคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่บางอย่าง ส่วนออกซิเจนนั้นขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์

### 2.5.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการสร้างองค์ประกอบต่างๆของเซลล์ ปกติจุลินทรีย์จัดเป็นพวกที่ได้รับพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานก็เป็นแหล่งคาร์บอนไปด้วย โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในการนำไปใช้สร้างองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์ (สมใจ , 2537)

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ต้องการตัวเหนี่ยวนำ และโดยทั่วไปแล้วนิยมใช้แหล่งคาร์บอนเป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิต ได้แก่ แป้ง หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง เช่น มอลโตส กลูโคส หรือ ฟรักโตส เป็นต้น แต่ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่ไม่เหมาะสมหรือมากเกินไป จะมีผลทำให้การกดดันการสลายคาร์บอน นอกจากนี้ยังสามารถนำวัสดุที่เหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกด้วย เช่น รำข้าวสาลี รำข้าว เป็นต้น

Sadhukhan และคณะ (1990) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมโลไลติกโดยเชื้อรา เมื่อใช้แป้ง เซลลูโลส และน้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์จะมีมากที่สุดเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shatta และคณะ (1990) ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *Streptomyces aureofaciens* 77 พบว่าการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 300 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตร ในขณะที่เด็กซ์ตรินให้กิจกรรมของเอนไซม์ 245 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตร

Li และคณะ (1998) ได้ทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูง โดยพบว่า เอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยแป้งอะไมโลส อะไมโลเพคติน เด็กซ์ตริน ไกลโคเจน และมอลโตสได้ ซึ่งพบว่าแป้งเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

Selvakumar และคณะ (1998) พบว่ากากชาสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* NCIM 1248 โดยให้กิจกรรมกลูโคอะไมเลสได้เท่ากับ 198.41 หน่วยต่อสับสเตรท ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Mulimani และคณะ (2000) ได้ทำการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็งและพบว่ารำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยใช้ในปริมาณที่เหมาะสม คือ 20 กรัม จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ 42 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ใช้หัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยมีแลคโตส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารชักนำ และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมและให้กิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด 34 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท

Jin (2001) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp.JF จะผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้แป้งข้าวโพดและแป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

Feng (2001) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ATCC 7966 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1,2 และ 3 กับกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้แป้งเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด

Pandey และคณะ (2003) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 และใช้เศษเหลือทิ้งจากโรงเหล้าเป็นสับสเตรท พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณหัวเชื้อ $1 \times 10^7$ สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.5.2 แหล่งไนโตรเจน**

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป โดยทั่วไปมักจะแบ่งแหล่งไนโตรเจนเป็น 2 ประเภท คือ

อนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แก๊สแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น เกลือแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องด้วยแอมโมเนียมไอออน ถูกใช้ไป และเหลือซัลเฟตไอออนไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อินทรีย์ไนโตรเจน อาจจะอยู่ในรูปโปรตีน กรดอะมิโน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน วัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง และรำข้าวเป็นต้น

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดจะต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ การเลือกใช้ไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ว่าสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี (สมใจ, 2537)

Sadhukhan และคณะ (1990) ได้ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราโดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ กัน ดังนี้ โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย และกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 พบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทกับโพแทสเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้การเจริญของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์จะมีลักษณะคล้ายกันคือ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างสูง ในส่วนของกรดอะมิโนพบว่าฟีนิลอะลานีนและฮีสติดีน จะกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลสแต่จะให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ค่อนข้างน้อย

Pandey และคณะ (1994) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญบนอาหารแข็งที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมฟอสเฟตปริมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และน้ำแช่ข้าวโพด กับเปปโตน ปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ผลการทดลองพบว่าน้ำแช่ข้าวโพด เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟตส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าสูงขึ้น

Lodato และคณะ (1997) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aureobasidium pullalans* จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่างๆที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันพบว่าแอสพาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดทั้งต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

Morita และ Fujio (2000) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งดิบโดยใช้เชื้อรา *Rhizopus* sp. MKU 40 ในอาหารเหลวที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเติมแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ นีโอเปปโตน เคซีนจากนม และเนื้อสกัด ผลการทดลองพบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. MKU40 มีค่าลดลง

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

**2.5.3 เกลือของสารอนินทรีย์**

จุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และเป็นองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ ซึ่งแร่ธาตุหลักที่สำคัญที่ต้องเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสเฟต ($PO_4^{3-}$) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอไรด์ (Cl) ส่วนแร่ธาตุรองที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ โคบอลท์ (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) และซิงค์ (Zn) Stanbury และคณะ (1995)

Falin (1998) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแร่ธาตุหนักที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Geotrichum capitatum* และ *Geotrichum candidum* โดยทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวสูตร Czapex – Dox ที่มีความเข้มข้นของ แคดเมียม (Cd) โคบอลท์ (Co) ทองแดง (Cu) แมงกานีส (Mn) นิเกิล (Ni) และตะกั่ว (Pb) ต่างกัน พบว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตและรอดชีวิตได้ในอาหารที่มีส่วนผสมของแร่ธาตุ 400 ไมโครกรัมต่อลิตร และการใส่แร่ธาตุหลักเพิ่มเข้าไปจะมีผลต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ *Geotrichum candidum* จะลดลงขณะที่ความเข้มข้นของแร่ธาตุหลักเพิ่มขึ้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83740

**2.5.4 พีเอชและอุณหภูมิ**

พีเอชเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เนื่องจากมีผลต่อการแยกไอออนของ prototropic group ที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งจะมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเตรท หรือการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ พีเอชยังมีผลต่อการเกิด ES การแตกตัวของสับสเตรท โคแฟคเตอร์ซึ่งจะนำไปสู่การจับกับเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปด้วย บางกรณีพีเอชอาจมีผลทำให้ผลผลิตตกต่ำ เนื่องจากการแตกตัวไอออนของผลผลิต ดังนั้นปฏิกิริยาต้องควบคุมพีเอชให้เหมาะสมที่สุด (ปราณี, 2543)

สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อราไม่สามารถเจาะจงได้ว่าพีเอชที่เท่าใดเป็นช่วงที่เหมาะสม เนื่องจากสายพันธุ์ของรามีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน

ผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จะมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง คือ ระหว่างอุณหภูมิที่ 25-37 องศาเซลเซียส การเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ที่โมเลกุลของสารปฏิกิริยา แล้วมีผลให้เกิดการชนกันได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลให้เกิดค่าความเร็วเพิ่มขึ้น เนื่องจากไปเพิ่มอัตราเร็วในการชนกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะไปเพิ่มอัตราเร็วในการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ได้ด้วย (ปราณี, 2543)

Uguru และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีความคงทนต่ออุณหภูมิจาก *Thermoactinomyces thalpophilus* ซึ่งแยกได้จากกากของเสียจากโรงงานผลิตแป้งโดยใช้อาหารที่มีน้ำตาลจากข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์นั้นยังคงเหลืออยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Cordeio และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยสารละลายน้ำแป้ง พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ 7.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์คือ 75 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จะคงตัวที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 60 70 และ 90 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมไป 4 เปอร์เซ็นต์ 13 เปอร์เซ็นต์ และ 83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Fossi และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตแป้ง พบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ 4.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งทั้งสองปัจจัยนี้สามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Goyal และคณะ (2005) เชื้อ *Bacillus* sp. I-3 ได้มาจากการคัดแยกเชื้อในดินตัวอย่าง นั้นสามารถย่อยมันฝรั่งดิบได้ในปริมาณที่สูง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนั้นผลผลิตของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้คือ 642 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเอนไซม์ที่ได้นี้มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ในสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ 10 มิลลิโมล หลังจากเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมงครึ่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถรักษาสภาพของเอนไซม์ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงครึ่ง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะสามารถรักษาสภาพของเอนไซม์ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากเวลาผ่านไปครึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส จะสามารถรักษาสภาพของเอนไซม์ได้ 59 และ 26 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ที่ได้นี้สามารถย่อยมันฝรั่งดิบที่ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 12 ชั่วโมง

## 2.6 น้ำตาลต่างๆ

น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นในการสร้างองค์ประกอบและให้พลังงานแก่เซลล์

Cristina และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Aspergillus fumigates* และการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบว่ากลูโคสให้ผลการเจริญของเชื้อสูงแต่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่าแป้ง มอลโตส และแหล่งคาร์บอนอื่นๆ

Ely และคณะ (2002) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูง ได้แก่ แลคโตส มอลโตส และไซโลส ตามลำดับ

Aiyer (2004) ได้ศึกษาน้ำตาลชนิดต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Bacillus licheniformis* SPT 27 ที่เจริญบนอาหารที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนและเติมน้ำตาลชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าฟรัคโตสจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 424 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มอลโตสให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์รองลงมาเป็นอันดับสองคือ 420 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำตาล อะราบิโนส ราฟิโนส ซูโครส และกาแล็คโตส ไม่มีส่วนช่วยในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

Kathiresan และ Manivannan (2006) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Penicillum fellanum* โดยวิธีแหล่งคาร์บอนต่างๆกันดังนี้ กลูโคส กาแล็คโตส แล็คโตส มอลโตส ซูโครส และไซโลส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่ามอลโตสจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 146 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ไซโลส กลูโคส แล็คโตส กาแล็คโตส และซูโครส ตามลำดับ

Al-Qodah และคณะ (2007) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อเชื้อ *Bacillus sphaericus* ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เมื่อใช้แป้งกรดซิตริ กลีเซอรอล น้ำมันมะกอก และน้ำตาลชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์จะมากสุดเมื่อกรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือ แป้งและน้ำตาลซูโครส ตามลำดับ

Alva และคณะ (2007) รายงานว่า การผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. JGI12 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงขึ้น

Sekar และคณะ (2007) ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เป็นโมโนแซคคาไรด์ (ไซโลส กาแล็คโตส และฟรักโตส) และไดแซคคาไรด์ (แล็คโตส ซูโครส และมอลโตส) พบว่าแล็คโตสจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือ ซูโครส กาแล็คโตส และไซโลส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 วัสดุอปกรณ์

### 3.1.1 จุลินทรีย์

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

### 3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นสูตรดัดแปลงจาก Omenu และคณะ (2005) มีส่วนประกอบดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| แหล่งคาร์บอน | 20.0 | กรัม |
| ยีสต์สกัด (yeast extract) | 3.0 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) | 1.0 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟส ($KH_2PO_4$) | 1.0 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) | 0.5 | กรัม |
| เฟอรัสซัลเฟต ($Fe\ SO_4.7H_2O$) | 0.5 | กรัม |
| น้ำ | 1.0 | ลิตร |
| พีเอช | 4.0 | |

### 3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมี

**อุปกรณ์**

1. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) ; EUTECT instruments
2. เครื่องผสมสารละลาย (vortex) ; JULABO
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ; CLIFTON unstirred bath
4. เตาอบไมโครเวฟ ; SAMSUNG
5. ตู้เย็น ; SANYO
6. หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ; HIRAYAMA HA-300 M IV
7. เตาอบความร้อน (hot air oven) ; WIT binder
8. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ; SHIMADZU UV-1607

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. เครื่องชั่ง ; SHIMADZU
10. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ; NEW BRUNSWICK , U.S.A.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ; SANYO FALCON 6/300
12. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ; OLYMPUS CH3oRF200
13. แผ่นนับเม็ดเลือด (Heamacytometer) ; BOECO Germany
14. ฟลาสก์
15. กรวยแก้ว
16. บีกเกอร์
17. หลอดทดลอง
18. หลอดปั่นเหวียง
19. ช้อนตักสาร
20. แท่งแก้วคน
21. กระบอกตวง
22. ปิเปต
23. หลอดหยดสาร
24. ขวดเก็บสารพลาสติก
25. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
26. ตะเกียงแอลกอฮอล์

**สารเคมี**

1. แป้งข้าวโพด ; ตราปลาคราฟ
2. แฮลกอฮอล์ 95 % ; องค์การสุรา(กรมสรรพสามิต)
3. กรดแอซิติก ; Carlo Erba
4. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) ; Univar
5. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ; Sigma Aldrich
6. โซเดียมไนเตรต ($Na\ NO_3$) ; Univar
7. แอมโมเนียมไนเตรต($NH_4NO_3$) ; Fluka
8. เฟอรัสซัลเฟต ($Fe\ SO_4.7H_2O$) ; Carlo Erba
9. แคลเซียมคลอไรด์($CaCl_2$) ; Carlo Erba
10. 3,5-Dinitrosalicylic (DNS) ; Sigma Aldrich
11. Yeast Extract ; Himedia
12. Potato Dextrose Agar ; Himedia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 วิธีการทดลอง

### 3.2.1 การเตรียมกล้าสปอร์ (Inoculum)

ทำการเลี้ยง *Aspergillus* sp. REB2 บนอาหารแข็ง PDAในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้สร้างสปอร์ เตรียมกล้าสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) เขี่ยสปอร์ให้กระจายจากนั้นนำไปกรองเอาเส้นใยออก ได้สปอร์แขวนลอย นับจำนวนสปอร์ด้วยแผ่นนับเม็ดเลือด (haemacytometer) (ภาคผนวก ข) และใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง โดยปรับให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น $10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.2.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้น้ำตาลบางชนิด

#### 3.2.2.1 ศึกษาการใช้น้ำตาลบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลงจาก Omenu และคณะ (2005) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แมนนิทอล มอลโตส ไซโลส และแป้งข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารเดิม โดยแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นมีอาหารทั้งหมด 6 สูตร คือ

- สูตรที่หนึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวโพด 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่สองมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่สามมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลแมนนิทอล 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่สี่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่ห้ามีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่หกมีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร

ใส่อาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาตร 70 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติมกล้าสปอร์จากข้อ 3.2.1 ลงไป แต่ละฟลาสก์ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น $10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดค่าพีเอช จากนั้นนำไปกรองด้วยชุดกรองโดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยแต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.2.2 ศึกษาการใช้น้ำตาลร่วมกับแป้งในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส**

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลงจาก Omenu และคณะ (2005) โดยแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลบางชนิดมาผสมกับแป้งข้าวโพดในอัตราส่วนแป้ง 40 กรัม ต่อน้ำตาล 20 กรัม ในอาหาร 1 ลิตร ดังนั้นจะมีอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันทั้งหมด 5 สูตรด้วยกัน คือ

- สูตรที่หนึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้ง 40 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่สองมีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้ง 40 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอล 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่สามมีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้ง 40 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่สี่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้ง 40 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร
- สูตรที่ห้ามีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้ง 40 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร

ใส่อาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาตร 70 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติมกล้าสปอร์จากข้อ 3.2.1 ลงไป ให้แต่ละฟลาสก์มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น $10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดค่าพีเอช จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำไปกรองด้วยชุดกรองโดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ

**3.2.2.3 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส**

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลงจาก Omemu และคณะ (2005) โดยใช้น้ำตาลที่ให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดจากข้อ 3.2.2.1 มาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20 40 และ 60 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ ใส่อาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาตร 70 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติมกล้าสปอร์จากข้อ 3.2.1 ลงไปในอาหารให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น $10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดค่าพีเอช จากนั้นนำไปกรองด้วยชุดกรองโดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

**3.2.3 วิธีวิเคราะห์**

**3.2.3.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส** (ภาคผนวก ค)

**3.2.3.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด** (ภาคผนวก ค)

**3.2.3.3 วิเคราะห์ผลทางสถิติ**

วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มสมบูรณ์ (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 ผลของน้ำตาลบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 โดยมีสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ แป้งข้าวโพด กลูโคส ซูโครส แมนนิทอล ไซโลส และมอลโตส ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ 1,925 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 962.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 3.34 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชจะลดลงและคงที่ระหว่าง 2.14-2.70 ดังรูปที่ 12 ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 6

อาหารที่ใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาคือ 1,305 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,305 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวลดลง เหลือ 8.43 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของอาหารจะค่อย ๆ ลดลง และคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ดังรูปที่ 12 ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 6

อาหารที่ใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์ คือ 860 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 860 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวลดลงเหลือ 1.92 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของอาหารจะค่อย ๆ ลดลง และคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ดังรูปที่ 12 ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 6

อาหารที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์ คือ 530 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 530 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวลดลง เหลือ 0.42 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของอาหารจะค่อย ๆ ลดลง และคงที่ระหว่าง 2.18 – 2.58 ดังรูปที่ 12 ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 6

อาหารที่ใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์ คือ 130.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะลดลง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 130.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวลดลงเหลือ 1.49 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของอาหารจะค่อย ๆ ลดลง และคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ดังรูปที่ 12 ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์ คือ 110 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสค่าเท่ากับ 110 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวลดลงเหลือ 7.81 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของอาหารจะค่อย ๆ ลดลง และคงที่ระหว่าง 2.26 – 2.66 ดังรูปที่ 12 ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 6

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารของ Omenu และคณะ (2005) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้ กลูโคส แมนนิทอล ซูโครส มอลโตส และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลเปรียบเทียบดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 4** การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลบางชนิดเปรียบเทียบกับแป้งข้าวโพด

| แหล่งคาร์บอน | วันที่ | ค่าพีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| แป้งข้าวโพด | 0 | 4.00 | 24.05 | - |
| | 1 | 2.70 | 3.30 | 1,335 |
| | 2 | 2.24 | 3.34 | 1,925 |
| | 3 | 2.16 | 0.60 | 942.5 |
| | 4 | 2.14 | 0.44 | 362.5 |
| | 5 | 2.43 | 0.41 | 34 |
| กลูโคส | 0 | 4.00 | 20.00 | - |
| | 1 | 2.66 | 7.81 | 110 |
| | 2 | 2.35 | 1.97 | 42.5 |
| | 3 | 2.26 | 0.89 | 27 |
| | 4 | 2.59 | 0.40 | 21 |
| | 5 | 2.53 | 0.38 | 17.2 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4** การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลบางชนิดเปรียบเทียบกับแป้งข้าวโพด (ต่อ)

| แหล่งคาร์บอน | วันที่ | ค่าพีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| แมนนิทอล | 0 | 4.00 | 8.50 | - |
| | 1 | 3.26 | 1.49 | 130.5 |
| | 2 | 2.17 | 0.75 | 99.5 |
| | 3 | 2.03 | 0.52 | 87 |
| | 4 | 2.11 | 0.42 | 74 |
| | 5 | 2.10 | 0.40 | 63 |
| ซูโครส | 0 | 4.00 | 13.72 | - |
| | 1 | 2.47 | 9.17 | 530 |
| | 2 | 2.49 | 5.19 | 135 |
| | 3 | 2.18 | 0.42 | 44.5 |
| | 4 | 2.33 | 0.40 | 25.3 |
| | 5 | 2.58 | 0.39 | 19.7 |
| มอลโตส | 0 | 4.00 | 23.55 | - |
| | 1 | 3.04 | 1.92 | 860 |
| | 2 | 2.35 | 1.66 | 196 |
| | 3 | 2.08 | 1.36 | 34.5 |
| | 4 | 2.17 | 0.45 | 28 |
| | 5 | 2.39 | 0.41 | 19.1 |
| ไซโลส | 0 | 4.00 | 15.29 | - |
| | 1 | 3.31 | 8.43 | 1,305 |
| | 2 | 2.58 | 4.21 | 995 |
| | 3 | 2.25 | 0.44 | 618 |
| | 4 | 2.66 | 0.41 | 593 |
| | 5 | 2.46 | 0.40 | 421 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 5** การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

| แหล่งคาร์บอน | แป้งข้าวโพด | กลูโคส | แมนนิทอล | ซูโครส | มอลโตส | ไซโลส |
|---|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 1,925[a] | 110[e] | 130.5[e] | 530[d] | 860[c] | 1,305[b] |

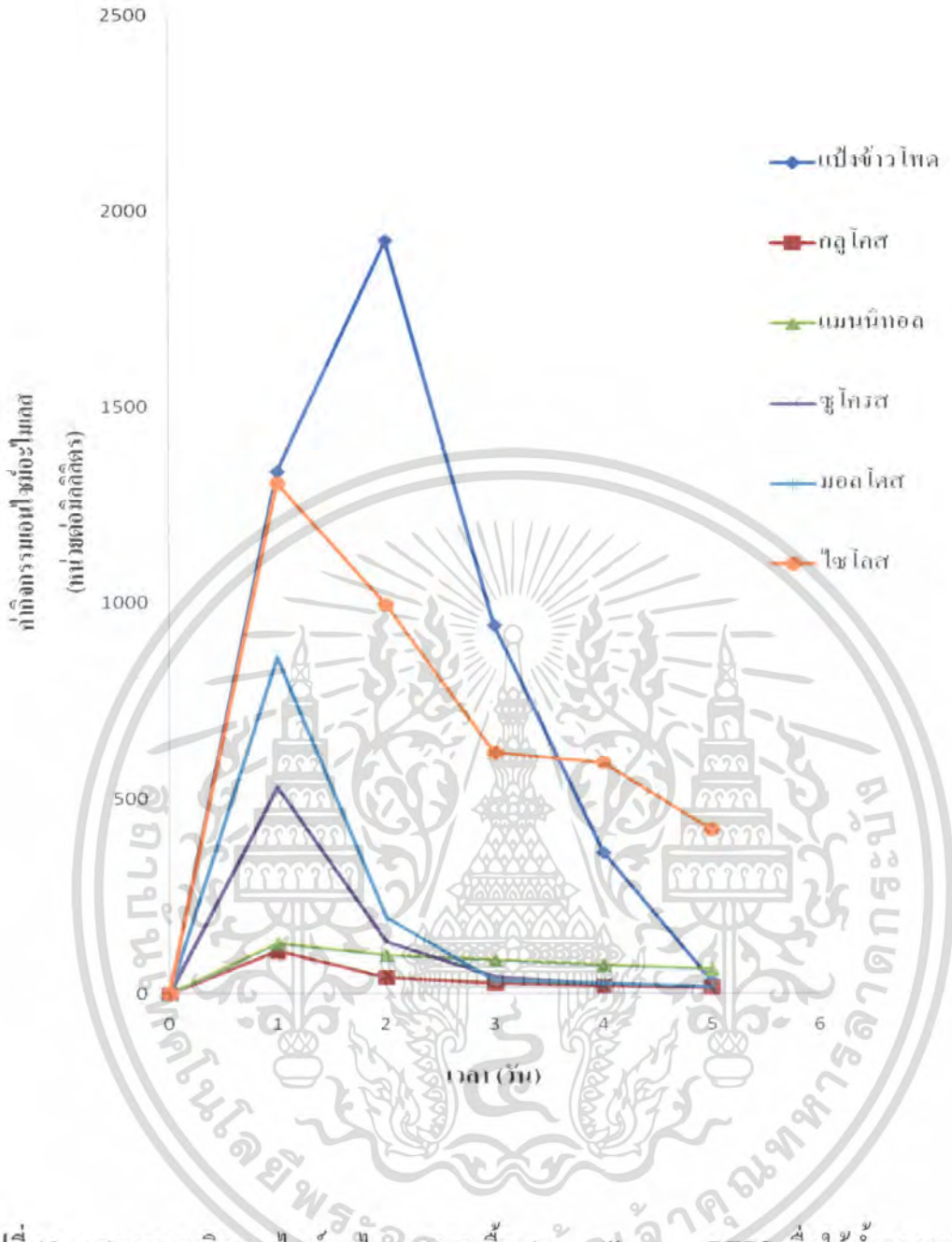
*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ
อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**ตารางที่ 6** อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

| แหล่งคาร์บอน | อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน) |
|---|---|
| แป้งข้าวโพด | 962.5 |
| กลูโคส | 110 |
| แมนนิทอล | 130.5 |
| ซูโครส | 530 |
| มอลโตส | 860 |
| ไซโลส | 1,305 |

เมื่อศึกษาถึงอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้อัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 1,305 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ซึ่งสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 12** แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลบางชนิดเปรียบเทียบกับแป้งข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) ให้ผลผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Konsoula และ Liakopoulou-Kyriakides (2007) ที่กล่าวว่าในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน และจะผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ต่ำสุดเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ Al-Qodah และคณะ (2007) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพบว่าแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการเจริญของเชื้อ *Bacillus sphaericus* และดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เนื่องจากแป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดพอลิแซคคาไรด์ และประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นกลูโคสทั้งหมด โมเลกุลของแป้งประกอบ ด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิดปนกันอยู่ คือ อะไมโลส (amylose) เป็นกลูโคสพอลิเมอร์ที่ต่อกันเป็นแบบเส้นตรงมีประมาณร้อยละ 15 – 20 มีกลูโคสอยู่ประมาณ 250 -300 โมเลกุลต่อกัน ส่งผลให้เชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 มีการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ มากกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นมีความเข้มข้นเท่าๆกัน

น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสรองลงมาจากแป้งข้าวโพด คือ 1,305 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน แสดงว่าน้ำตาลไซโลสสามารถชักนำให้เชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้

ดังนั้นการใช้แป้งข้าวโพดมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีข้อเสีย คือ การใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้อาหารหนืดและการเจริญของเชื้อในช่วงแรกไม่ดี ถ้าต้องการใช้น้ำตาลในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสแทนการใช้แป้งข้าวโพด พบว่าน้ำตาลไซโลสมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จึงเลือกใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการทดลองต่อไป

## 4.2 ผลของการใช้น้ำตาลร่วมกับแป้งข้าวโพดในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 โดยมีสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสร่วมกับแป้ง น้ำตาลซูโครสร่วมกับแป้ง น้ำตาลแมนนิทอลร่วมกับแป้ง น้ำตาลไซโลสร่วมกับแป้ง และน้ำตาลมอลโตสร่วมกับแป้ง ซึ่งกำหนดให้ใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารดัดแปลงมาจาก Omenu และคณะ (2005) โดยให้ผลการทดลองดังนี้

อาหารที่ใช้น้ำตาลไซโลสร่วมกับแป้งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด คือ 1,430 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,430 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวจะลดลงจนถึงวันที่ 3 ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงจากนั้นจึงเริ่มคงที่ ค่าพีเอชของอาหารจะค่อยๆลดลงและคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ดังรูปที่ 13 ตารางที่ 7 และ ตารางที่ 9

อาหารที่ใช้น้ำตาลมอลโตสร่วมกับแป้งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสรองลงมา คือ 563.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่อวันมีค่าเท่ากับ 563.2 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวจะลดลงเหลือ 27.11 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชจะลดลงและคงที่ระหว่าง 2.17-2.58 ดังรูปที่ 13 ตารางที่ 7 และตารางที่ 9

อาหารที่ใช้น้ำตาลแมนนิทอลร่วมกับแป้งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส คือ 545 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่อวันมีค่าเท่ากับ 272.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวจะลดลงเหลือ 17.19 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 จากนั้นจึงเริ่มคงที่ ค่าพีเอชจะลดลงและคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ดังรูปที่ 13 ตารางที่ 7 และ ตารางที่ 9

อาหารที่ใช้น้ำตาลซูโครสร่วมกับแป้งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส คือ 513.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่อวันมีค่าเท่ากับ 256.9 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวเท่ากับ 29.91 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชจะค่อยๆลดลงและคงที่ระหว่าง 2.72-2.93 ดังรูปที่ 13 ตารางที่ 7 และ ตารางที่ 9

อาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโครสร่วมกับแป้งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส คือ 337.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่อวันมีค่าเท่ากับ 168.7 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวจะค่อยๆลดลงและคงที่ตั้งแต่วันที่ 1 ค่าพีเอชจะลดลงจนถึงวันที่ 3 จากนั้นเริ่มคงที่ระหว่าง 2.25-2.77 ดังรูปที่ 13 ตารางที่ 7 และ ตารางที่ 9

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลบางชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารของ Omenu และคณะ (2005) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลเปรียบเทียบดังตารางที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 7** การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ

| แหล่งคาร์บอน | วันที่ | ค่าพีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| แป้ง + กลูโคส | 0 | 4.06 | 65.70 | - |
| | 1 | 3.54 | 40.91 | 175 |
| | 2 | 3.05 | 40.49 | 337.4 |
| | 3 | 2.77 | 37.10 | 191 |
| | 4 | 2.43 | 30.16 | 134 |
| | 5 | 2.25 | 14.16 | 62 |
| แป้ง + แมนนิทอล | 0 | 4.02 | 68.68 | - |
| | 1 | 2.52 | 17.19 | 352 |
| | 2 | 2.14 | 15.51 | 545 |
| | 3 | 2.09 | 11.99 | 440 |
| | 4 | 2.16 | 9.09 | 369.2 |
| | 5 | 2.20 | 0.5 | 305 |
| แป้ง + ซูโครส | 0 | 4.04 | 49.83 | - |
| | 1 | 3.09 | 42.39 | 481 |
| | 2 | 2.93 | 29.91 | 513.8 |
| | 3 | 2.78 | 27.93 | 137 |
| | 4 | 2.77 | 27.73 | 95 |
| | 5 | 2.72 | 18.76 | 32 |
| แป้ง + มอลโตส | 0 | 4.04 | 64.71 | - |
| | 1 | 2.58 | 27.11 | 563.2 |
| | 2 | 2.71 | 23.39 | 314.6 |
| | 3 | 2.17 | 16.94 | 236 |
| | 4 | 2.26 | 15.29 | 157 |
| | 5 | 2.30 | 7.03 | 83 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 7** การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ (ต่อ)

| แหล่งคาร์บอน | วันที่ | ค่าพีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| แป้ง + ไซโลส | 0 | 4.03 | 69.83 | - |
| | 1 | 3.73 | 57.27 | 1,430 |
| | 2 | 2.99 | 43.55 | 1,039.1 |
| | 3 | 2.85 | 39.67 | 781 |
| | 4 | 2.78 | 31.24 | 472 |
| | 5 | 2.38 | 23.30 | 245.9 |

**ตารางที่ 8** การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

| แหล่งคาร์บอน | แป้งกับกลูโคส | แป้งกับแมนนิทอล | แป้งกับซูโครส | แป้งกับมอลโตส | แป้งกับไซโลส |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 337.4[d] | 545[b] | 513.8[c] | 563.2[b] | 1,430[a] |

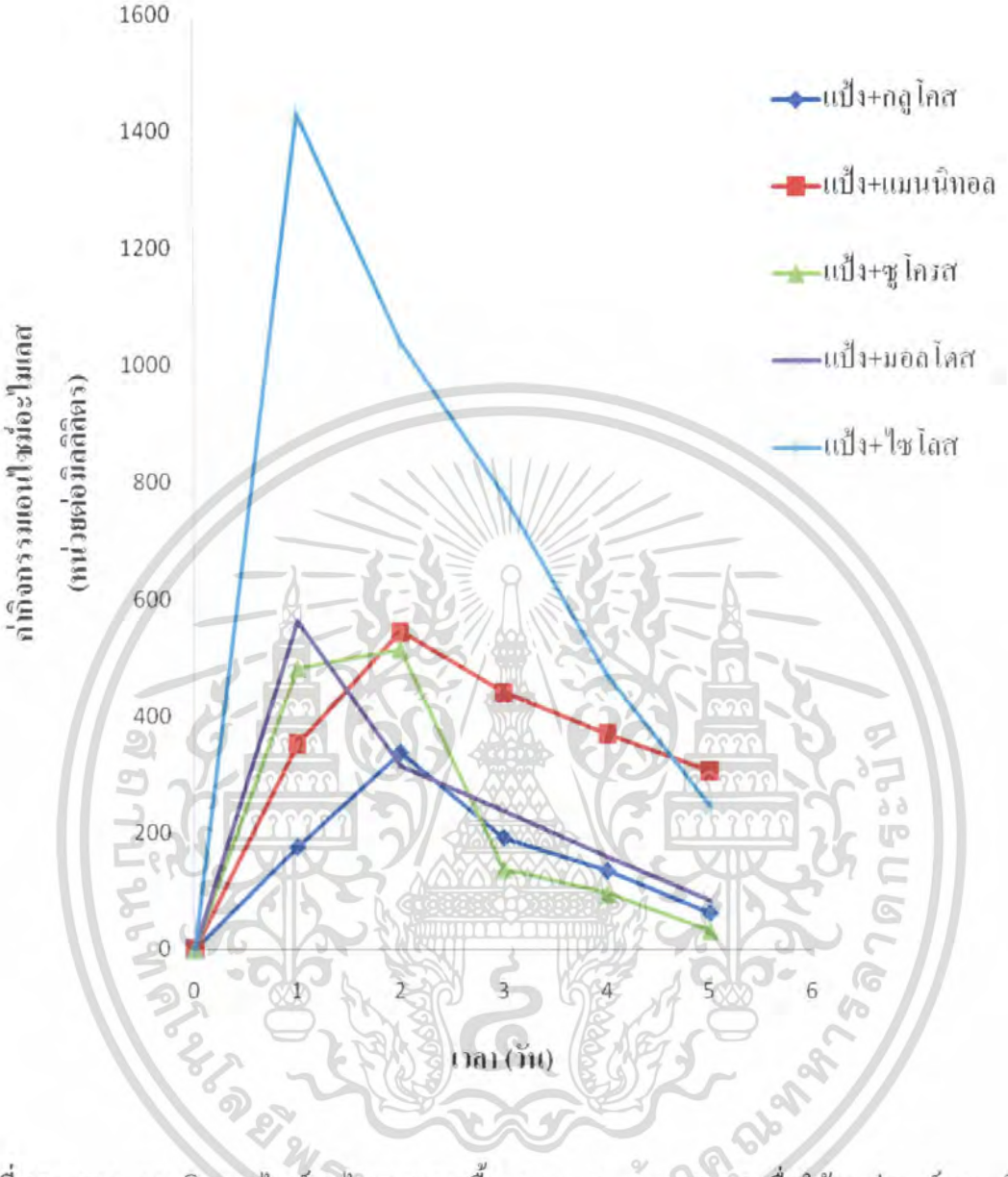
*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**ตารางที่ 9** อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ

| แหล่งคาร์บอน | อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน) |
|---|---|
| แป้งข้าวโพดร่วมกับกลูโคส | 168.7 |
| แป้งข้าวโพดร่วมกับแมนนิทอล | 272.5 |
| แป้งข้าวโพดร่วมกับซูโครส | 256.9 |
| แป้งข้าวโพดร่วมกับมอลโตส | 563.2 |
| แป้งข้าวโพดร่วมกับไซโลส | 1,430 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 13** แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 7 พบว่าการใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดคือ 1,430 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ การใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลมอลโตส แป้งข้าวโพดร่วมกับแมนนิทอล แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลซูโครส และแป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ

จากนั้นนำมาหาอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 ในอาหารที่มีการใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ น้ำกลูโคส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลแมนนิทอล เมื่อใช้ร่วมกับแป้งข้าวโพดจะให้อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงขึ้นกว่าการใช้น้ำตาลเพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 9 เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนโมเลกุลเล็กเชื้อจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ได้ก่อนแป้งซึ่งมีโมเลกุลที่ใหญ่กว่า เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนก็จะทำให้มีปริมาณเซลล์มากพอที่จะใช้แป้งเป็นสับสเตรตต่อไปได้

สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ การใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับน้ำตาลไซโลส โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากให้ผลใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลไซโลสอย่างเดียวในตอนที่ 4.1 ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างได้ง่ายกว่าการใช้ร่วมกับแป้งข้าวโพดในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 และนำไปหาอัตราส่วนความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลไซโลสในตอนต่อไป

## 4.3 ผลของปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 โดยมีสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ คือ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงมาจาก Omenu และคณะ (2005) โดยให้ผลการทดลองดังนี้

อาหารที่ใช้น้ำตาลไซโลสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส สูงที่สุด คือ 2,900 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 2,900 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวจะลดลงเหลือ 0.60 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจนถึงวันที่ 2 และจะค่อยๆเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 14 ตารางที่ 10 และ ตารางที่ 12

อาหารที่ใช้น้ำตาลไซโลสเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส รองลงมา คือ 2,300 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์จะลดลง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 2,300 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวจะลดลงจนถึงวันที่ 3 เหลือ 1.30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชจะลดลงต่ำสุดในวันที่ 3 และค่อยๆเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 14 ตารางที่ 10 และ ตารางที่ 12

อาหารที่ใช้น้ำตาลไซโลสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส น้อยที่สุด คือ 1,850 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะลดลง อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,850 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวจะลดลงเหลือ 41.90 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชจะลดลงจาก 3.51 จนถึง 2.22 และจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 14 ตารางที่ 10 และ ตารางที่ 12

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติ Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสที่ปริมาณ 60 กรัมต่อลิตรให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ผลการเปรียบเทียบดังตาราง ที่ 11

**ตารางที่ 10** การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ

| น้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร) | วันที่ | ค่าพีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 20 | 0 | 4.05 | 20.74 | - |
| | 1 | 3.29 | 16.78 | 1,850 |
| | 2 | 2.19 | 13.55 | 495 |
| | 3 | 2.20 | 0.60 | 28.5 |
| | 4 | 3.14 | 0.45 | 13.5 |
| | 5 | 3.58 | 0.30 | 11 |
| 40 | 0 | 4.03 | 39.50 | - |
| | 1 | 3.09 | 23.81 | 2,300 |
| | 2 | 2.61 | 24.38 | 560 |
| | 3 | 2.50 | 1.30 | 170 |
| | 4 | 3.28 | 0.57 | 40.5 |
| | 5 | 3.30 | 0.17 | 21 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 10** การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

| น้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร) | วันที่ | ค่าพีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 60 | 0 | 4.01 | 61.32 | - |
| | 1 | 3.51 | 58.84 | 2,900 |
| | 2 | 3.11 | 52.15 | 1,950 |
| | 3 | 2.22 | 48.93 | 950 |
| | 4 | 3.12 | 41.90 | 515 |
| | 5 | 3.18 | 36.61 | 335 |

**ตารางที่ 11** การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ

| แหล่งคาร์บอน | ไซโลส 20 กรัมต่อลิตร | ไซโลส 40 กรัมต่อลิตร | ไซโลส 60 กรัมต่อลิตร |
|---|---|---|---|
| กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 1,850[c] | 2,300[b] | 2,900[a] |

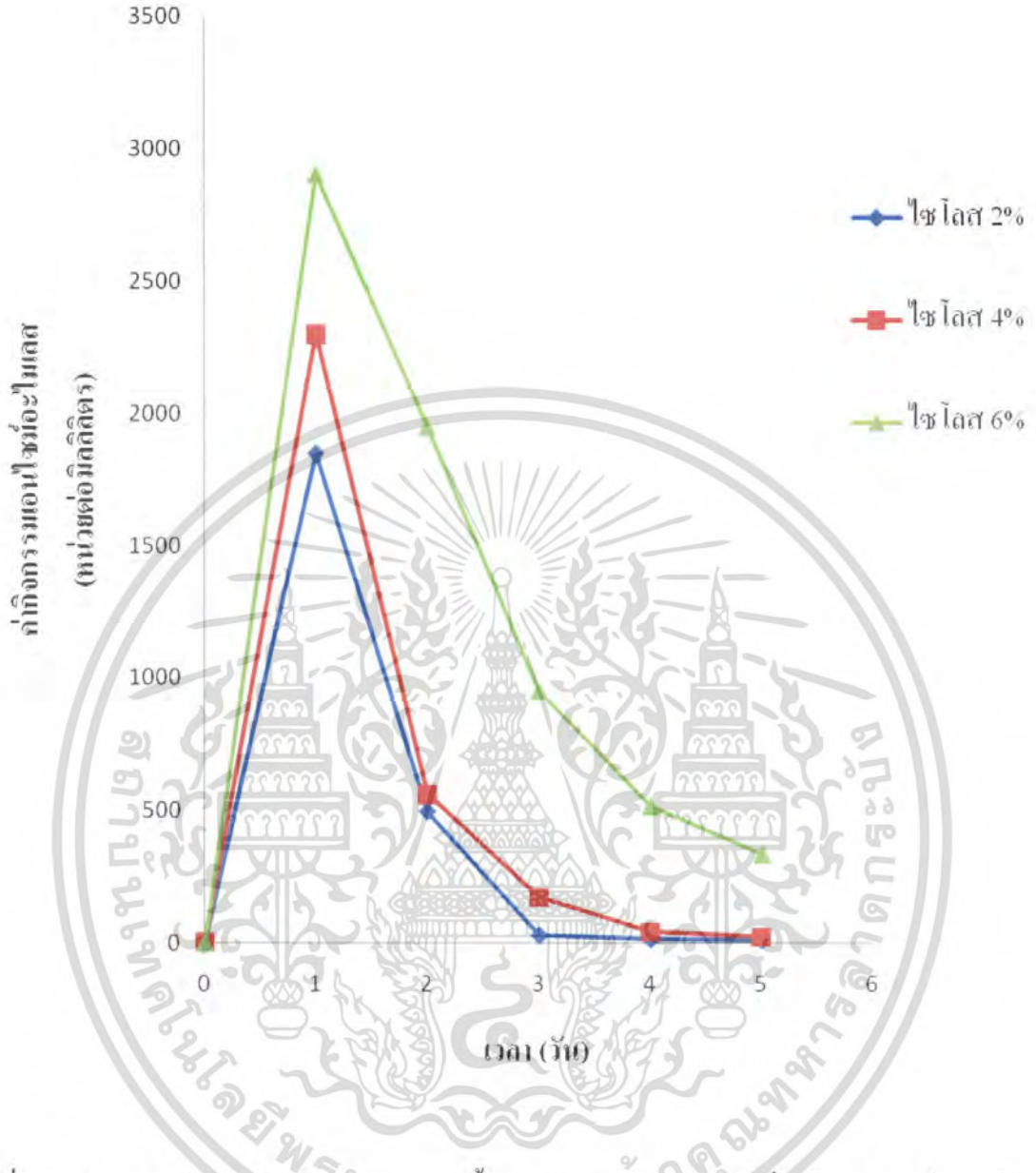
*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**ตารางที่ 12** อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร) | อัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน) |
|---|---|
| 20 | 1,850 |
| 40 | 2,300 |
| 60 | 2,900 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 14** แสดงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ศึกษาผลของน้ำตาลบางชนิดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ Omenu และคณะ (2005) โดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ กัน คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อใช้แป้งข้าวโพดอย่างเดียวผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,925 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ น้ำตาลไซโลสจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1,305 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ผสมกับแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสร่วมกับแป้งข้าวโพดจะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,430 หน่วยต่อมิลลิลิตร และอัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1,430 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อวัน

เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสอย่างเดียวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ คือ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2,900 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง

ดังนั้นถ้าต้องการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ควรเลือกใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร โดยสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 .7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 2,900 หน่วยต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสตามผลการทดลองนี้ไม่เหมาะสม เนื่องจากน้ำตาลไซโลสมีราคาแพง

2. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง เช่น อุณหภูมิ พีเอช ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีขึ้น

3. ควรคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในปริมาณสูงและใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกได้หลายชนิด เช่น *Bacillus* sp.

4. ควรศึกษาชนิดของเอนไซม์ย่อยแป้งว่ามีชนิดใดบ้าง หรือผลผลิตของน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus* sp. REB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกูล ปียะจอมขวัญ. 2546. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3.กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กิตติศักดิ์ ธนรัตนพัฒนกิจ นัฐ ภัทรศิริน และ วีระ แก้วสมนึก. 2547. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp.REB2 จากลูกแป้ง. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

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

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์

พักตร์ประไพ ประจำเมือง. 2546. การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ระดับโรงงานต้นแบบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

อัญชลินทร์ สิงห์คำ และ ทศพร นามโฮง. 2008. เคมีอาหาร1. [online] March 19. Available form http://courseware.rmutl.ac.th/courses/103/unit1000.html

Aiyer, D. 2004. Effect of C:N ratio on α-amylase production by *Bacillus lichenformis* STP 27. African Journal of Biotechnology. 3: 519-522.

Al-Qodah, Z., Daghstani, H., Geople, Ph. and Lafi, W. 2006. Determination of kinetic parameters of α-amylase producing thermophile *Bacillus sphaericus*. African Journal of Biotechnology. 6(6): 699-706.

Alva, S., Anupama, J., Savla, J., Chiu, Y.Y., Vyshali, P., Shruti, M., Yogeetha, B.S., Bhavya, D., Purvi, J., Ruchi, K., Kumudini, B.S. and Varalashmi, K.N. 2007. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated form *Aspergillus* sp. JGl 12 in solid state culture. African Journal of Biotechnology. 6(5): 576-581.

Baysal, Z., Uyar, F. and Aytekin, C. 2002. Solid state fermentation for production of α-amylase by a Thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. Process Biochemistry. 38:1665-1668.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bernfeld, P. 1955. Amylase alpha and beta method in enzymology. New York : Academic Press, Inc.

Beynum, van G.M.A. and Roels, J.A. 1985. Starch conversion technology. New York :Marrod Dekker, Inc.

Bruinenberg, P. 1996. Bioconversion of starch by enzymes. In Advanced Post-Academic Course on Tapioca Starch Technology, Bangkok, Thailand.

Chaplin, M. 2001. Production of glucose syrup. [online] Jan 17. Available form http://www.sbu. ac.uk/biology/enztech/glucose.html

Cherry, H.M., Towhid Hossain, M.D. and Anwer, M.N. 2004. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. Pakistan Journal of Biological Science. 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. Brazialian Journal of Microbiology. 33: 57 – 61.

Cristina, E.G., Elisangela, P.B., Lais, C.L.K., Fabiana, G.M., Varidiana L. and Rosane, M.P. 1998. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing alpha-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. FEMS Microbiology Lettars. 167: 139 – 143.

Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton, J.K., Rebers P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28: 350–356.

Ely, N. and Mirela, M.W. 2002. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 44: 5 – 10.

Falin, A.M. 1998. Effect of heavy-metals on amylolytic activity of the soil yeasts *Geotrichum capitatum* and *Geotrichum candidum*. Bioresourse Technology. 66 : 213 – 217.

Feng, P.H., Berensmeier, S., Buchholz, K. and Reilly, P.J. 2002. Production purification and characterization of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* glucoamylase. Starch/Starke. 54: 328 – 337.

Fossi, B.T., Tavea, F. and Ndjouenkeu, R. 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of Biotechnology. 4(1) : 14 – 18.

Goyal, N., Gupta, J.K. and Soni, S.K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology. 37: 723 – 734.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hamilton, L.M., Kelly, C.T., and Fogarty, W.M. 1999. Production and properties of the raw starch-digesting α-amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. Process Biochemistry. 35: 27 – 31.

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

Jin, F. 2001. Thermostable α-amylase α-galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. JF stain. Process Biochemistry. 36: 229 – 564.

Kathiresan, K. and Manivannan, S. 2005. α-amylase production by *Pennicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. Afcican Journal of Biotechnology. 5(10): 829 – 832.

Konsoula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides, M. 2007. Co-production of α-amylase and β-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. Bioresource Technology. 98 : 150 – 157.

Li, D.C., Yang, Y.J., Peng, Y.L. and Shen, C.Y. 1998. Purification and characterization of extracellular glucoamylase from the thermophilic *Thermomyces lanuginosus*. Mycological Research. 102 : 568 – 572.

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

Moreira, F.G., Lima, F.A., Pedrinho, S.R.F., Lenartovicz, V., Souza, G.M. and Peralta, R.M. 1999. Production of amylase by *Aspergillus tamari.* Revista de Microbiology. 30 : 157-162.

Morita, H. and Fujio, Y. 1997. High specific of raw-starch digesting-glucoamylase producing *Rhizopus* sp. A-11 in liquid culture. Starch/Starke. 49 : 293 – 296.

Mulimani, V.H., Patil, G.N. and Ramalingam, 2000. α-amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. Biochemical Education. 28 : 161 – 163.

Mussatto, I.S. and Roberto, C.I. 2008. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrosate for xylitol production by *Candida guilliermondii.* Process Biochemisty. 43 : 540 – 546.

Nigam, P. and Singh, D. 1995. Enzyme and microbial system involved in starch processing. Enzyme and Microbial Technology. 17: 770 – 778.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Olama, Z.A. and Sabry, S.A. 1989. Extracellular amylase synthesis by *Aspergillus flavus* and *Penicillium purpurescence*. Journal of Islamic Academy of Science. 2 (4) : 272 – 276.

Pandey, A., Selvakumar, P. and Ashakumary, L. 1994. glucoamylase production by *Aspergillus niger* on rice bran is improved by adding nitrogen sourse. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10 : 348 – 349.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., and Moham, R. 2000. Review advances in microbial amylase. Biotehcnology and Applied Biochemistry. 31:135 – 152.

Pandey, A., Sabu, A., Nampoothiri, M., Ramachadran, S., Ghosh, S., Szakacs, G. and Francis, F. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α-amylase by *Aspergillus oryzhae*. Biochemical Engineering Journal. 15 : 107 – 115.

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

Sadhukhan, R.K., Manna, S., Roy, S.K. and Chakrabarty, S.L. 1990. Thermostable amylolytic enzyme from a cellulolytic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48 104). Applied Microbiology and Biotechnology. 33 : 692 – 696.

Saha, C. and Ueda, S. 1983. Raw starch adsorption, elution and digestion behavior of glucoamylase of *Rhizopus niveus*. Journal of Fermentation Tachnology. 61 (1) : 67 – 72.

Selvakumar, P., Ashakumary, L. and Pandey, A. 1998. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using tea waste as the basic of a solid substrate. Bioresource Technology. 65 : 83 – 85.

Soni, S.K., Kaur, A. and Gupta, J.K. 2003. A solid state fermentation based bacterial α-amylase fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. Process Biochemistry. 39 : 185 – 192.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sekar, S., Sivaprakasam, S. and Karunasena, R. 2007. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* sp. isolated from spoiled food waste. African Journal of Biotechnology. 6(4): 430 – 435.

Sukhumavasi, J., Kato, K. and Harada, T. 1975. Glucoamylase, a stain *Endomycopsis fibuligera* isolate from mould bran (Look Pang) of Thailand. Journal of Fermentation and Technology. 53(8) : 559 – 565.

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

Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and application of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal of Biotechnology. 94 : 137 – 155.

Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P. and Ulhoa, C.J. 2004. Biochemical characterization of α-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiology Letters. 231 : 156 – 169.

Yang, S.S. and Wang, J.Y. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. Botanical Bullatin of Academic Sinica. 40 : 259 – 265.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

**การตรวจนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer**

**วิธีการ**

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

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

กำหนดให้ A คือ จำนวนสปอร์ที่นับได้จาก 5 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

# สูตรอาหารและสารละลายบัฟเฟอร์

**1. อาหาร PDA, Potato Dextrose Agar สำเร็จรูป**

ทำการเตรียมอาหาร PDA สำเร็จรูป แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 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 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค
# วิธีการวิเคราะห์

**การหากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (Bernfeld, 1955)**

**สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส**

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1 % soluble starch)

ละลายแป้ง 1.0 กรัมในน้ำกลั่นด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลาย ปรับปริมาตรเป็น 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 และโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 250.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 16 กรัม ในน้ำ 200.0 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง

4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

สารละลายน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วย ฟลาสก์ปรับปริมาตรสารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

**วิธีการ**

1. ใส่สารละลายอะไมเลส (ที่ความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตร และ ซิเทรตฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2. เติมน้ำแป้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเอนไซม์หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
3. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที
4. นำสารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณกิจกรรมเอนไซม์จากกราฟมาตรฐาน

6. ทำหลอดควบคุม (Control) ทำเช่นเดียวกัน แต่นำสารละลายเอนไซม์ต้ม 5 นาที ก่อนใส่น้ำแป้งและบัฟเฟอร์ ทำแบลงค์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

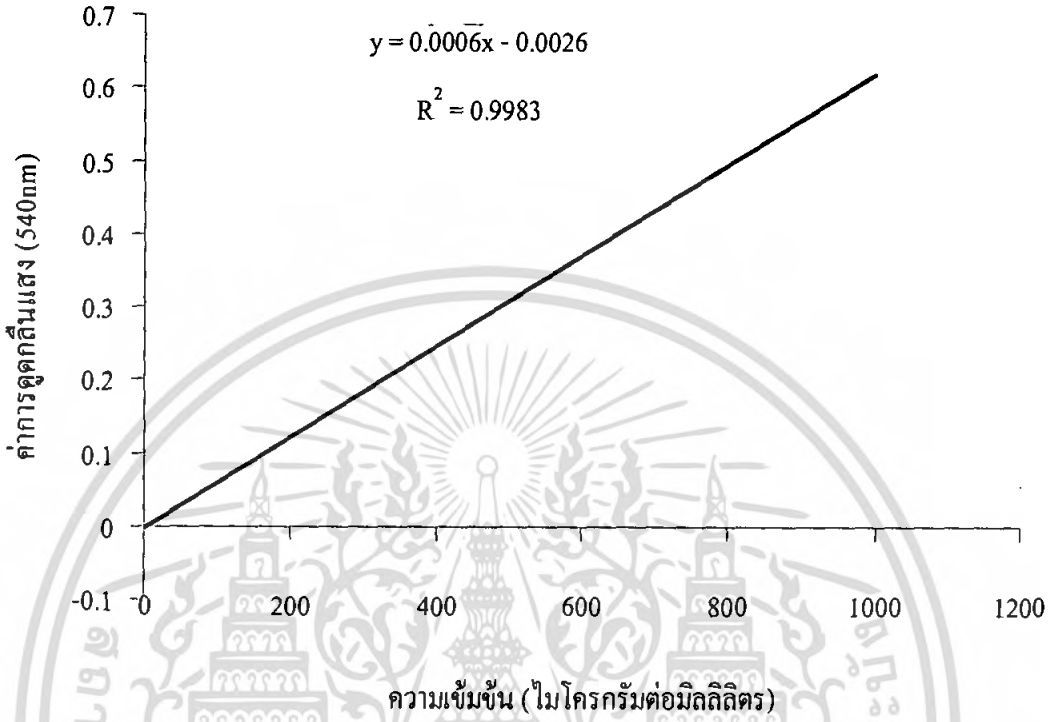
7. ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 200 400 600 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 4 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

8. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x ปริมาตรทั้งหมด x ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน x เวลา}}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งและให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าในน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ค-1** กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1956)**

วิธีการนี้เป็นการใช้กรดเข้มข้นย่อยให้พอลิแซคคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสามารถวัดน้ำตาลได้ประมาณ 1 – 100 ไมโครกรัม และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอย่างไม่เฉพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์หรือ neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็นโมโนแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้

**สารเคมี**

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ($H_2SO_4$)
2. สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยสารละลายฟีนอล ($C_6H_5OH$) 5 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

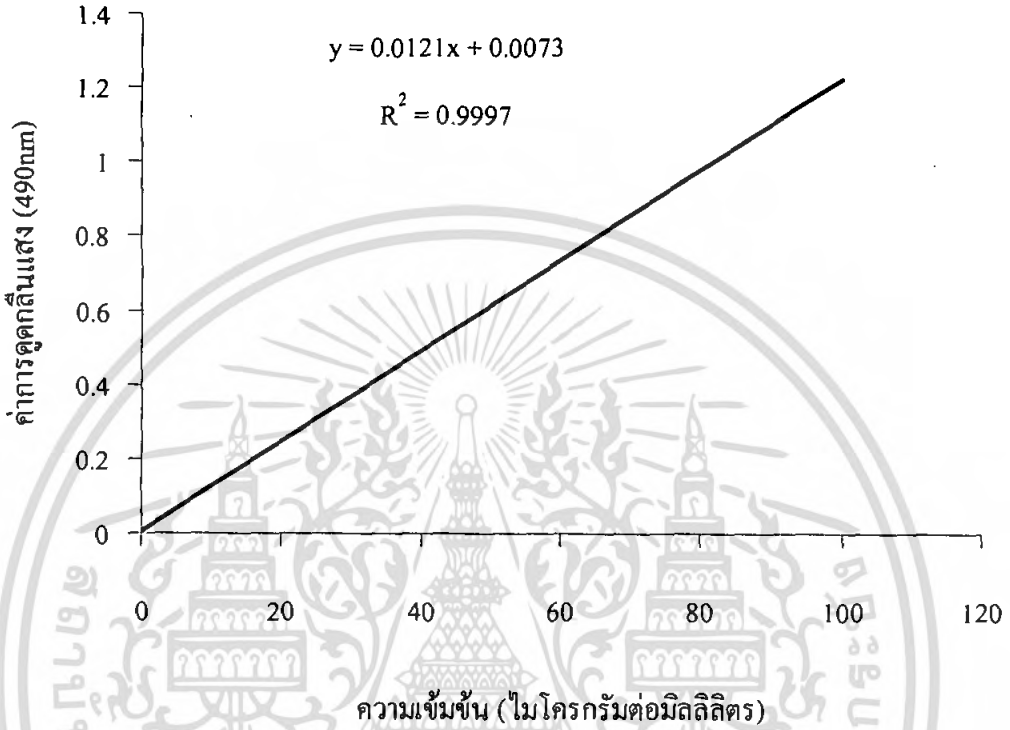
3. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

**วิธีการ**

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไป โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่หลอดทดสอบในน้ำเย็น
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าอีกครั้ง
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 1 – 4 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง ($A_{490}$) และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้