ผลของนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิตโคจิจากรำข้าวสาลี

Effect of nickel chloride and potassium dihydrogen phosphate on wheat bran koji production

วรรณิสา อารมณ์
วิลาวัลย์ ใจมะเริง

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิตโคจิจากรำข้าวสาลี

Effect of nickel chloride and potassium dihydrogen phosphate on wheat bran koji production

T148869

วรรณิสา อารมณ์
วิลาวัลย์ ใจมะเริง

ลายพิมพ์ 148869
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี 30 มิ.ย. 2560

b 12876792
l

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิตโคจิจากรำข้าวสาลี

Effect of nickel chloride and potassium dihydrogen phosphate on wheat bran koji production

จัดทำโดย

วรรณิสา อารมณ์ รหัสนักศึกษา 55080117

วิลาวัลย์ ใจมะเริง รหัสนักศึกษา 55080121

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 14/ กค./ 59

(ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ ผลของนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิตโคจิจากรำข้าวสาลี

ชื่อนักศึกษา วรรณิสา อารมณ์ รหัสนักศึกษา 55080117
วิลาวัลย์ ใจมะเริง รหัสนักศึกษา 55080121

หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิจากรำข้าวสาลี และผลของการเติมไอออนโลหะต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมี โดยใช้ไอออนโลหะ 2 ชนิด คือ นิกเกิลคลอไรด์ (nickel chloride, $NiCl_2$) ความเข้มข้น 0.15% และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.125% ขั้นตอนการทำใช้วัตถุดิบรำข้าวสาลี 12 กรัม เติมน้ำ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทำการฆ่าเชื้อต่อด้วยหม้อนึ่งความดันไอจำนวน 2 และ 3 ครั้ง ตามลำดับ ถ่ายเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDB ทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลีมาตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี ได้แก่ ความชื้น, ความเป็นกรดด่าง, กลูโคชามีน และ วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) และตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ผลการทดลอง พบว่าการเตรียมรำข้าวสาลีด้วยฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 3 ครั้ง พบการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. น้อย และให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสต่ำกว่าการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 2 ครั้ง และการเติมไอออนโลหะ 2 ชนิด คือ $NiCl_2$ ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.125% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมไอออนโลหะ พบว่าโลหะที่ดีที่สุดที่ทำให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงที่สุดคือ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.125%

คำสำคัญ: โคจิ อะไมเลส กลูโคอะไมเลส รำข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Effect of nickel chloride and potassium dihydrogen phosphate on of wheat bran koji production
Student name	Wanisa arom Student ID 55080117
	Wilawan Jaimaroeng Student ID 55080121
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2016
Advisor	Assist.Prof.Dr. Aphacha Jindaprasert

ABSTRACT

The study of effect of the material preparation for wheat bran koji and effect of metal ions nickel chloride ($NiCl_2$) concentration of 0.15% and potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) concentration of 0.125% to the changes of the enzyme alpha-amylase glucoamylase and chemical properties. In the procedure, wheat bran 12 grams, were added with water 7 ml sterilized by autoclave at 121 degree celsius for 60 minutes. and then continue to sterilize with autoclave for 2 and 3 times, respectively. *Amylomyces* spp. cultured on PDB were inoculated on koji and incubated at 32 degree celsius in a incubator for 7 days. Wheat bran koji samples were collected for the chemical analysis; moisture, pH, glucosamine and water activity (A_w) and analyzed alpha-amylase and glucoamylase activities. The results showed that wheat bran that sterilized with autoclave 3 times was not suitable for growth of *Amylomyces* spp. and produce alpha-amylase and glucoamylases activities lower than under sterilized with autoclave 2 times. The result of the addition of 2 metal ions $NiCl_2$ concentration of 0.15% and KH_2PO_4 concentration of 0.125% found that the best metal was KH_2PO_4 concentration of 0.125% produced highest enzyme activities when compared with the control without addition of metal ion.

Keywords: Koji, Amylase, Glucoamylases, Wheat bran

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำปัญหาพิเศษ เรื่อง ผลของนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิตโคจิจากรำข้าวสาลี สำเร็จลุล่วงได้ดีโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ และ รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง ซึ่งได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวคิดรวมถึงการแก้ปัญหาต่างๆ และเสียสละเวลาอันมีค่าคอยให้คำปรึกษาด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา และเป็นผู้คอยสนับสนุนด้านต่างๆ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

วรรณิสา อารมณ์
วิลาวัลย์ ใจมะเริง
14 กรกฎาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 รำข้าวสาลี	3
2.2 ที่มาและความหมายโคจิ (Koji)	5
2.3 กระบวนการหมักโคจิ	6
2.4 เชื้อรา *Amylomyces* spp.	7
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	10
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	11
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	19
4.1 กล้าเชื้อรา *Amylomyces* spp.	19
4.2.การเตรียมวัตถุดิบในการผลิตโคจิรำข้าวสาลี	20
4.2.1 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อการเจริญของเชื้อราและปริมาณกลูโคซามีน	20
4.2.2 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส	25
4.2.3 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อความชื้น A_w และความเป็นกรดด่างในโคจิรำข้าวสาลี	27
4.3 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิต โคจิรำข้าวสาลี	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.1 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญของเชื้อราและปริมาณกลูโคซามีน	29
4.3.2 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส	37
4.3.3 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อความชื้น A_w และความเป็นกรดด่างในโคจิรำข้าวสาลี	39
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	42
5.1 สรุปผล	42
5.1.1 การเตรียมวัตถุดิบในการผลิตโคจิรำข้าวสาลี	42
5.1.2 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิตโคจิรำข้าวสาลี	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	46
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์และการเตรียมสารละลาย	47
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง	57
ภาคผนวก ค ภาพการทดลอง	63
ประวัติผู้เขียน	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 21

4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 22

4.3 ปริมาณความชื้น A_w และค่าความเป็นกรดด่าง ของโคจิรำข้าวสาลี เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 27

4.4 ปริมาณความชื้น A_w และค่าความเป็นกรดด่าง ของโคจิรำข้าวสาลี เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 27

4.5 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีที่ไม่มีการเติมโลหะ (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 30

4.6 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีมีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 32

4.7 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีมีการเติมโลหะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 34

4.8 ปริมาณความชื้น ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15%, KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 39

4.9 วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% , KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 40

4.10 ความเป็นกรดด่าง ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15%, KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะของรำข้าวสาลี	3
2.2 รูปร่างและภาพตัดขวางของเมล็ดข้าวสาลี	4
2.3 ลักษณะของ Kome (rice) Koji (ก), Muji (barley) Koji (ข) และSoy bean koji (ค)	6
2.4 การเจริญของรา *Amylomyces* sp. ไอโซเลทที่ M2 บนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน	8
2.5 ลักษณะโครงสร้างของรา M2 ผ่านกล้องจุลทรรศน์	8
4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่เจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ก) และ Potato dextrose broth (PDB) (ข) และกล้าเชื้อรา *Amylomyces* spp. ก่อนนำไปเลี้ยงในรำข้าวสาลี (ค)	19, 24
4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบ ที่ 1 ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส วันที่ 0, วันที่ 3 และ วันที่ 5	25
4.3 ปริมาณกลูโคซามีนในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 (♦) และการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 (■) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	26
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 (♦) และ การฆ่าเชื้อแบบที่ 2 (■) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	26
4.5 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 (♦) และ การฆ่าเชื้อแบบที่ 2 (■) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	26
4.6 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากชุดควบคุม(ไม่เติมโลหะ) และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส วันที่ 0, วันที่ 3 และ วันที่ 5	36
4.7 ปริมาณกลูโคซามีนในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% (■) และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% (▲) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) (♦) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.8 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ 38
ที่ความเข้มข้น 0.15% (■) และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% (▲) เมื่อ
เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) (♦) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp.
ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.9 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ 39
ที่ความเข้มข้น 0.15% (■) และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% (▲) เมื่อ
เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) (♦) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp.
ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โคจิ (Koji) คือ การเลี้ยงเชื้อราบนวัตถุดิบประเภทธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวสาลีข้าวโพด หรือ ถั่วเหลือง เป็นต้น โดยวัตถุประสงค์ของการทำโคจิ คือให้เชื้อราเจริญและมีการผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส กลูโคอะไมเลส และโปรติเอส มาย่อยองค์ประกอบที่อยู่ในรำข้าวสาลีให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง เพื่อเป็นสารอาหารแก่ รา ยีสต์และแบคทีเรียในขั้นตอนการหมักขั้นต่อไป (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2559) โดยเชื้อราที่ใช้ในการผลิตโคจิจากรำข้าวสาลีในครั้งนี้ ได้แก่ *Amylomyces* spp. และเนื่องจากรำข้าวสาลีมีราคาถูกและมีสารอาหารสูง ปัจจุบันจึงนิยมใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบในการผลิตโคจิ (สุมัลลิกา, 2545)

จากงานวิจัยของวีระสิทธิ์ และคณะ (2557) ได้ทำงานวิจัยเพื่อคัดเลือกเอนไซม์ที่สกัดจากโคจิเชื้อรา *Rhizopus* sp.(KUPR4) *Aspergillus* oryzae และ *Aspergillus* awamori บริสุทธิ์ เพื่อลดระยะเวลาในการบ่มเต้าหู้ยี้แดง โดยได้ทำการเปรียบเทียบการใช้สับสเตรทข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และถั่วเหลืองในการผลิตโคจิ พบว่า การใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทนั้น ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูง เนื่องจากรำข้าวสาลี ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต 50.7-59.2% โปรตีน 14.5-15.7% ไขมัน 2.9-4.3% รวมทั้งวิตามินและแร่ธาตุชนิดต่างๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา ถึงแม้ว่าข้าวเจ้ามีองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรต 78.9% โปรตีน 6.7% ไขมัน 1.1% และ ถั่วเหลืองมีคาร์โบไฮเดรต 31.1% โปรตีน 38.8% ไขมัน 18.0% แต่มีแร่ธาตุและวิตามินที่น้อยกว่า จึงส่งเสริมอัตราการเจริญได้น้อยกว่าการเลี้ยงบนรำข้าวสาลี ในการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อราผลิตขึ้นนั้น นอกจากสับเสตรทที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อราแล้ว โคแฟกเตอร์ซึ่งเป็นไอออนโลหะก็มีความสำคัญต่อเชื้อราที่จะทำให้เชื้อรามีประสิทธิภาพการทำงานที่สูงและสามารถสร้างกิจกรรมเอนไซม์ได้สูง โดยวจีมาศ และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบการเติมไอออนโลหะ 4 ชนิด ลงไปในโคจิรำข้าวสาลี ได้แก่ โพแทสไดไฮโดเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4), แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$), นิกเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2$) และ ซิลเวอร์ซัลเฟต ($AgSO_4$) เพื่อช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยใช้เชื้อรา *Amylomyces* spp. บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ผลในวันที่ 3 และ 6 ของการบ่ม พบว่าการเติม KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% พบกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีสูงถึง144.61% และ 128.65% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะ อีกทั้ง วัลย์ศิริ และคณะ (2558) ยังได้ทำการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของไอออนโลหะต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและปริมาณกลูโคซามีนในโคจิรำข้าวสาลี โดยใช้ไอออนโลหะ รวมถึงสภาวะการบ่มเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น พบว่าการเติม KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% ทำให้เชื้อรามีการเจริญและให้ปริมาณกลูโคซามีนและน้ำตาลรีดิวซ์ของไอออนทั้ง 2 ชนิดสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่น และมีปริมาณสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงได้สนใจทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิ และผลของการเติมไอออนโลหะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% ในการผลิตโคจิจากรำข้าวสาลี เพื่อช่วยให้เชื้อรามีประสิทธิภาพในการทำงานสูงของและสร้างเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงขึ้น นอกจากนี้สามารถนำโคจิที่ได้ไปเป็นกล้าเชื้อราในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิต่อการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการเติมโลหะ KH_2PO_4 และ $NiCl_2$ ต่อการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทำโคจิ

1.3.2 ทราบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ KH_2PO_4 และ $NiCl_2$

1.3.3 ได้การฝึกกระบวนการคิดวิเคราะห์การวางแผนการทำวิจัยและการลงมือปฏิบัติการวิจัย รวมถึงการทำงานร่วมกับผู้อื่นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รำข้าวสาลี

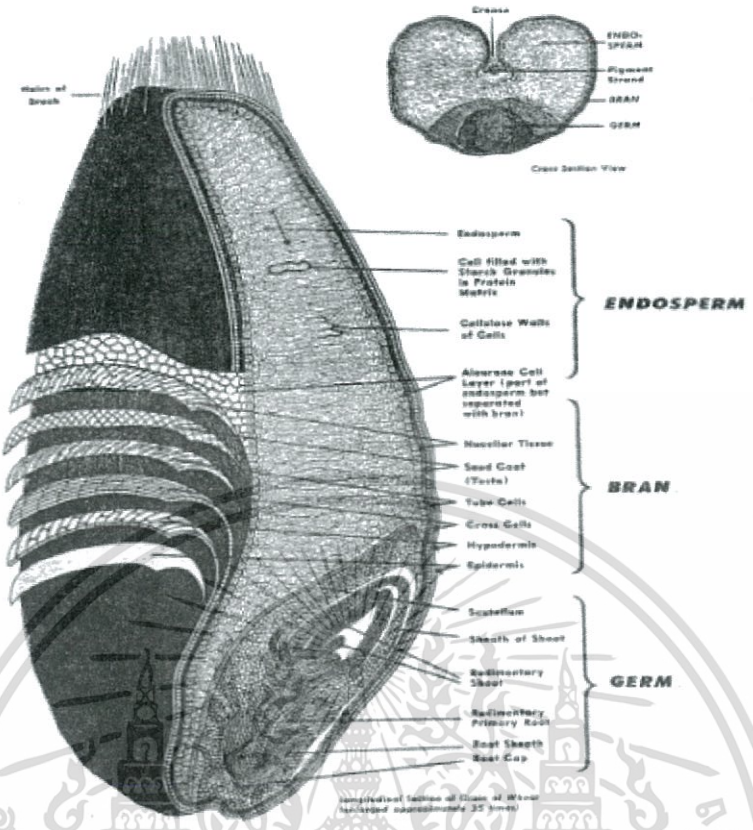
รำข้าวสาลี (Wheat bran) ดังภาพที่ 2.1 เป็นชั้นเปลือกห่อหุ้มเมล็ดข้าวสาลีไว้ โดยชั้นนอกสุดเป็นแกลบ (husk) ซึ่งเป็นเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ดังภาพที่ 2.2 ต้องทำการแยกออกในกระบวนการบดข้าวสาลีให้เป็นแป้งและจัดเป็นผลพลอยได้ สามารถขายเป็นอาหารสัตว์ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของรำข้าวสาลีโดยละเอียดพบว่า (อรอนงค์, 2540)

- มีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 12 - 14% โดยในปริมาณโปรตีนทั้งหมดนี้มีกรดอะมิโนพวกกลูทามิกเป็นองค์ประกอบมากที่สุด ประมาณ 3%
- มีปริมาณเถ้าและแร่ธาตุต่างๆ ประมาณ 5 – 9% โดยเฉพาะพวกโพแทสเซียม และฟอสฟอรัส
- มีไขมันประมาณ 5% แยกได้เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันอิ่มตัว
- มีคาร์โบไฮเดรตประกอบไปด้วยเส้นใยหยาบประมาณ 10% เพนโทแซนแทนและเซลลูโลสประมาณ 21 – 26% นอกจากนั้นมีสตาร์ชและน้ำตาล 9 และ 5% ตามลำดับ
- พบวิตามินจำพวกวิตามินบีต่างๆ รวมทั้ง ไบโอติน อิโนซิทอล และโทโคเฟอรอล
- มีรงควัตถุ เป็นพวกแคโรทีนอยด์ ฟลาโวนและสารที่สลายตัวมาจากคลอโรฟิลล์ ซึ่งจะทำให้สีของเมล็ดที่ปรากฏแตกต่างกันไป กลายเป็นชนิดของข้าวสาลีสีต่างๆ เช่น ข้าวสาลีสีแดง (red wheat)
- มีเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่น ไดเพปทิเดส โปรตีเนส และเอนไซม์ที่ย่อยไขมัน คือ ไลเพส

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของรำข้าวสาลี

ที่มา : http://sport.mthai.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 รูปร่างและภาพตัดขวางของเมล็ดข้าวสาลี

ที่มา : http://elearning2.utcc.ac.th/officialtcu/econtent/SD207/doc1.pdf

2.1.1 การใช้ประโยชน์รำข้าวสาลี

รำข้าวสาลี นำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ดังนี้

- อาหารสัตว์ รำข้าวสาลีเป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากการสีข้าวสาลี ทำให้มีลักษณะฟ่าม (bulky) สามารถนำไปอัดเม็ดได้ คุณสมบัติเป็นยาระบายอ่อน ๆ สามารถใช้ทดแทนรำข้าวเจ้าได้ นอกจากนี้ยังใช้ในการผสมอาหารเลี้ยงสัตว์จำพวกหมูแล้ว สามารถนำไปผสมอาหารเลี้ยงสัตว์จำพวกกุ้ง และใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสำเร็จรูป สุนัข แมว อื่นๆ หรือสามารถนำไปเลี้ยงหนอนได้ (นิรนาม, 2558)

- อาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์ เนื่องจากเป็นส่วนที่ใยอาหารสูง เมื่อรับประทานเข้าไป จะช่วยเพิ่มปริมาณอุจจาระ และเส้นใยมีคุณสมบัติดูดน้ำได้ดีมาก ช่วยให้อุจจาระนุ่ม ถ่ายง่าย ระบบขับถ่ายจึงทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาของประเทศอังกฤษ พบว่า การรับประทานอาหารที่ปนรำข้าวสาลี 3 ช้อนโต๊ะต่อวัน เป็นการเพิ่มปริมาณอุจจาระขึ้นถึงเท่าตัว ช่วยในการป้องกันความเสี่ยงที่อาจเกิดจากโรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคท้องผูกและโรคมะเร็งลำไส้ นอกจากนี้รำข้าวสาลีสามารถนำไปใส่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร เช่น เพิ่มลงใน สลัด, ซุป, ธัญพืช, อาหารจานหลัก เช่นเดียวกับในเครื่องดื่ม เช่น ค็อกเทล, เจลลี่, เครื่องดื่มผลไม้ เป็นต้น (นิรนาม, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การวิจัยและพัฒนารำข้าวสาลีมาเป็นวัตถุดิบชนิดใหม่ในการทำขนมปัง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการทำงานของเทคโนโลยีการหมักรำข้าวสาลีในขนมปัง ขนมปังที่หมักจากรำข้าวสาลีชนิดที่ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มเมล็ดจะช่วยเพิ่มระดับของโฟเลท (folates), กรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acids), สาร arabinoxylans (AX) ที่ละลายน้ำได้รวมไปถึงปริมาตรและความนุ่มของขนมปังอีกด้วย (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2557)

- การใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ ในปัจจุบันรำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบที่นิยมมากในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีราคาต่ำ และมีคุณค่าทางอาหารสูงเหมาะในการนำมาเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีการศึกษาการแยกเชื้อรา *Amylomyces* sp. จากลูกแป้งและนำเชื้อรามาใช้ในการผลิต mold bran เพื่อทำเป็นกล้าเชื้อในการผลิตไวน์ข้าว (สุมัลลิกา, 2545)

2.2 ที่มาและความหมายโคจิ (Koji)

เมื่อ 300 ปีก่อนคริสตกาล ประเทศจีนได้นำโคจิมาใช้เป็นครั้งแรกในพิธีกรรมของราชวงศ์โจว (Zhouli) เป็นเหตุการณ์สำคัญที่นำมาซึ่งการพัฒนาความก้าวหน้าทางด้านอาหารของจีน ทำให้เกิดกรอบแนวคิดสำหรับเครื่องปรุงสำคัญที่หมักจากถั่วเหลือง คือ ซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว ต่อมาประเทศในแถบเอเชียได้มีการพัฒนาวิธีการทำโคจิอย่างกว้างขวางมาก โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นได้พัฒนาและคิดค้นกรรมวิธีทางเทคโนโลยีชั้นสูงโดยใช้อุปกรณ์ที่ทันสมัยขึ้น (Evans, 2556)

คำว่า โคจิ มีที่มาจากอักขระจีน โดยอ่านออกเสียงตามภาษาจีนว่า “ชุ” ซึ่งหมายถึง “ธัญพืชขึ้นรา” ต่อมาได้เพี้ยนเป็นคำว่า ซุย (Shui) ส่วนในภาษาเกาหลี จะอ่านว่า คูหรือกุ๊ก (Ku ; nurukgyun) ในภาษาญี่ปุ่น ใช้คำว่า “โคจิ หรือ ทาเนโคจิ” (Tanekoji) ซึ่งมีความหมายว่า กล้าเชื้อราสำหรับผลิตโคจิ มีลักษณะเป็นผงสปอร์เชื้อราผสมกับเมล็ดธัญพืชและแป้งสาลี เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา (ฟาฮัน, 2549)

โคจิมาจากภาษาจีนมีความหมายว่า “เมล็ดที่ปกคลุมไปด้วยรา (moldy grains)” กล้าเชื้อราจะถูกนำมาใช้ในขั้นตอนของการหมักโคจิ ในช่วงของการผลิตโคจิอยู่สภาพที่ต้องการใช้อากาศ (aerobic condition) เพื่อการเจริญของเชื้อราสร้างเส้นใยและสปอร์ ซึ่งในระยะนี้ก็มีเอนไซม์ชนิดต่างๆ ผลิตออกมาย่อยสับเสตรท (substrate) ซึ่งเป็นพวก แป้ง โปรตีน ไขมัน ส่วนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ โปรติเอส (protease) อะไมเลส (amylase) และ ไลเปส (lipase) เป็นต้น (ภัทราภรณ์ และคณะ, 2559)

โคจิสามารถจำแนกชนิดออกตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ดังภาพที่ 2.3 เช่น Kome (rice) Koji หมายถึง โคจิที่ทำจากข้าว (ก), Muji (barley) Koji หมายถึง โคจิที่ทำจากข้าวบาร์เลย์ (ข), Soy bean koji เป็นโคจิที่ทำจากถั่วเหลือง (ค) หรืออาจเรียกตามสีของสปอร์หรือเม็ดสี (pigment) ที่เชื้อราสร้างขึ้น เช่น Ki-Koji (สีดำ) เป็นโคจิจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* และ beni-koji (สีแดง) เป็นโคจิจากเชื้อรา *Monascus purpurens* นอกจากนี้อาจมีชื่อเรียกตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เช่น Miso-koji, Shoyu-koji และ Sake-koji เป็นต้น (ฟาฮัน, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะของ Kome (rice) Koji (ก), Muji (barley) Koji (ข) และ Soy bean koji (ค)
ที่มา : http://miso.co.nz/wp-content/uploads/2012/09/Rice-Koji (ก),
http://nordicfoodlab.org/blog/2012/03/hello-sweetness (ข) และ
https://timogarden.files.wordpress.com/2014/03/20140323-105408 (ค)

2.3 กระบวนการหมักโคจิ

การทำโคจิ ใช้การหมักแบบแห้ง (solid state) หมายถึง กระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมีเป็นการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาพซึ่งไม่มีน้ำอิสระ (free water) อยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามน้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซึมกับวัตถุดิบเท่านั้น (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

2.3.1 ปัจจัยสำคัญในกระบวนการหมักแบบแห้ง (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

1) วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักแบบแห้งมักเป็นพวกธัญพืช ถั่ว ซึ่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสูง

2) วัตถุดิบที่ใช้ต้องควบคุมขนาดให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อก่อให้เกิดช่องว่างในระหว่างอนุภาคของวัตถุดิบเพียงพอให้อากาศถ่ายเทหมุนเวียนได้เป็นอย่างดี

3) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ น้ำ

4) ในระหว่างการหมักแบบแห้งมักเกิดปัญหาความร้อนสะสมดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกินกวาระดับที่จะเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่ใช้

5) หัวเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจำเป็นต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของสปอร์

6) ระดับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต้องปรับให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะต้องควบคุมให้อยู่ในระดับที่กำหนดตลอดเวลา

2.3.2 ขั้นตอนในการหมักโคจิแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

1) การเตรียมวัตถุดิบ วัตถุดิบที่ถูกนำมาใช้ในการหมักนั้นมีหลากหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด รำข้าวสาลี และ ถั่วเหลืองเป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้ จะถูกนำมาผ่าน 7 กรรมวิธีต่างๆเพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก เช่น การบด ย่อย เพิ่มสารอาหารที่จำเป็นบางชนิด หรือนำมาแช่น้ำ เป็นต้น จากนั้นนำมาฆ่าเชื้อ เพื่อลดการปนเปื้อน จากจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบ โดยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การหมัก เริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อซึ่งเป็นการเตรียมจุลินทรีย์ ให้มีความแข็งแรงและมีปริมาณที่เพียงพอต่อการหมัก จากนั้นจุลินทรีย์จะถูกถ่ายลงบนวัสดุหมักแล้วนำไปบรรจุในภาชนะเพื่อนำไปบ่ม มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการหมักแบบแห้งนี้ คือ เชื้อราที่สร้างเส้นใย เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ ตัวอย่าง เชื้อราที่ใช้เช่น *Rhizopus* sp. ใช้ในการผลิตเอนไซม์ กรดอินทรีย์ และอาหารหมัก *Aspergillus* sp. ใช้ในการทำอาหารหมักและในบางสายพันธุ์ เช่น *Aspergillus oryzae* ใช้ในการหมักโคจิสำหรับทำเต้าเจี้ยวและซีอิ้ว

3) การแยกผลิตภัณฑ์และทำให้บริสุทธิ์ เมื่อครบระยะเวลาหมักผลิตผลที่ถูกสังเคราะห์ ขึ้นจะถูกแยกออกมาโดยวิธีต่างๆเช่น การกรอง บีบ หรือสกัดด้วยน้ำหรือตัวทำลาย เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ถูกแยกออกมานี้จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ เช่น การกรองเอากากถั่วเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวและ เมื่อนำเอากากถั่วที่หมักครบกำหนดระยะเวลามาบีบสกัดเป็นของเหลวและผ่านการกรอง และต้มฆ่าเชื้อ จะได้ผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ้ว

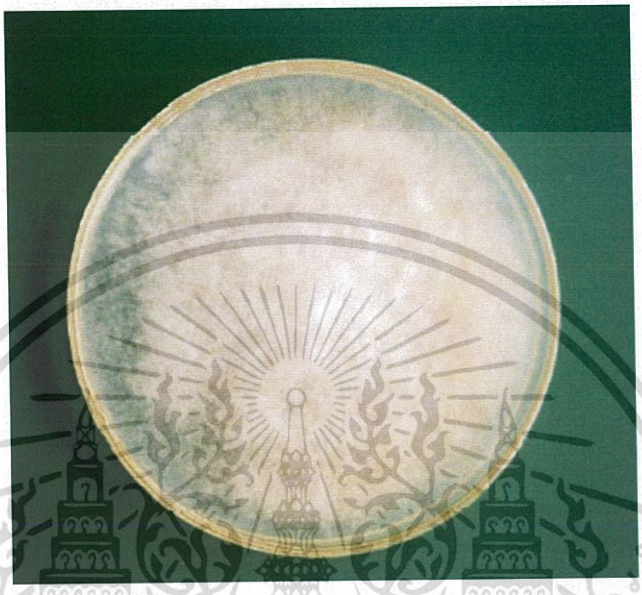
2.4 เชื้อรา *Amylomyces* spp.

Amylomyces เป็นสกุลของเชื้อราซึ่งมีสมาชิกเพียงชนิดเดียว (monotypic genus) *Amylomyces rouxii* โดย Calmette พบครั้งแรกในปี ค.ศ.1892 โดยทดลองแยกเชื้อราหลายชนิดจากลูกแป้งของจีน (เป็นสายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae*) (วีระสิทธ์ และทรงศักดิ์, 2548)

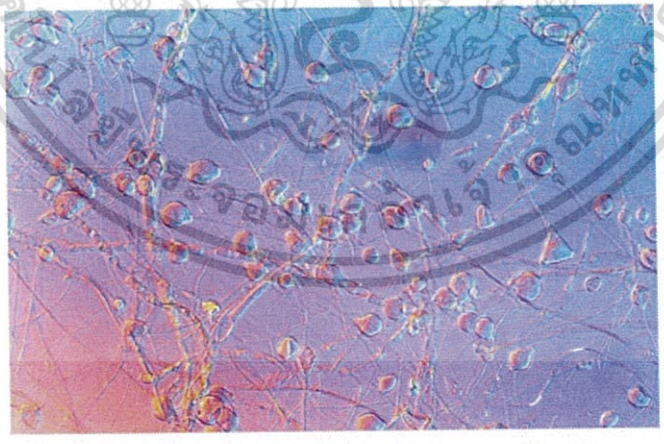
ลักษณะทั่วไปของราในสกุล *Amylomyces* เป็นราที่จัดอยู่ใน Class Phycomycetes Order Mucorales เส้นใยไม่มีผนังกั้น เจริญได้รวดเร็ว ภายในเส้นใยมี chlamydospore อยู่เป็นจำนวนมาก ไม่สร้าง sporangium หรือสร้าง sporangium ที่ไม่สมบูรณ์ มี apophysis เล็ก sporangiophore มีลักษณะตรงอาจมีหรือไม่มี rhizoid ก็ได้ เมื่อเลี้ยงบน synthetic mucor medium (SMA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เจริญได้อย่างรวดเร็ว โคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน เส้นใยมีสีขาวจนถึงสีเทาอ่อน ไม่มี rhizoid sporangiophore มีลักษณะเรียวแหลมตรงจุดที่เกิด sporangia มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 150 µm สร้าง chlamydospore อย่างมากภายในเส้นใย ลักษณะของ chlamydospore มีลักษณะต่างๆ กัน จากรูปทรงกระบอก, รูปไข่ และกลม ขนาดของ chlamydospore มีตั้งแต่ 12-55 x 8-30 µm สปอร์อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นหมู่ก็ได้ นอกจากจะเจริญบน SMA แล้วยังสามารถเจริญบน potato dextrose agar (PDA) และ malt extract agarแต่เจริญได้ช้ามากบน Czapek solution agar ลักษณะการเจริญบน PDA เส้นใยมีสีเทา น้ำตาลอ่อน จนถึงสีขาว chlamydospore ส่วนมากมีลักษณะกลม และมีขนาดใหญ่กว่าการเจริญบน SMA มีขนาดตั้งแต่ 60 x 30 µm จนถึง 127 x 60 µm ส่วนการเจริญบน malt extract agar ลักษณะโคโลนีจะบางกว่าที่เลี้ยงบน PDA และบน SMA เส้นใยมีสีขาวจนถึงสีน้ำตาลเทา (สุมัลลิกา, 2545 อ้างถึง Ellis et al., 1976) และ สุมัลลิกา (2545) นำเชื้อรา *Amylomyces* sp. ไอโซเลท M2 ที่คัดเลือกได้ มาศึกษาลักษณะการเติบโตและลักษณะของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมซีเลียม (mycelium) โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีการเติบโตอย่างรวดเร็ว เส้นใยมีสีขาวฟู สร้าง sporangium น้อยมาก ดังภาพที่ 2.4 เมื่อศึกษาลักษณะของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการทำ slide culture พบว่ามีเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้น (nonseptate mycelium) ภายในเส้นใยมี chlamydospore อยู่เป็นจำนวนมาก ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.4 การเจริญของรา *Amylomyces* sp. ไอโซเลทที่ M2 บนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน
ที่มา : สุมัลลิกา (2545)



ภาพที่ 2.5 ลักษณะโครงสร้างของรา M2 ผ่านกล้องจุลทรรศน์
ที่มา : สุมัลลิกา (2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Asghar et al. (2545) งานวิจัยนี้ศึกษาเรื่องการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสของเชื้อ *Arachniotus* sp. จากน้ำเหลือทิ้งจากขนมปัง ภายใต้สภาวะการให้อากาศอย่างต่อเนื่องและเติมโลหะต่างๆ กัน ดังนี้ $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ และ KH_2PO_4 ที่สามารถส่งผลต่อการหมักและการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส พบว่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสูงสุดที่ผลิตได้ คือ 11.16 IU/มิลลิลิตร/นาที ในสภาวะการหมักเมื่อครบ 48 ชั่วโมง โดยให้มีการเข่าอย่างต่อเนื่องที่ 120 รอบ/นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 2.5% และน้ำเหลือทิ้งจากขนมปังที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 0.2%, $MgSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้น 0.04%, $CaCl_2.2H_2O$ ความเข้มข้น 0.04% และ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.2% ที่พีเอช 4 และอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

Varalakshmi et al. (2552) งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรามา 5 สายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส โดยใช้สภาวะในการหมัก 2 แบบ คือ การหมักแบบแห้ง และการหมักแบบอาหารเหลว โดยสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี คือ *Aspergillus niger JGI 24* ซึ่งคัดเลือกจากการผลิตเอนไซม์ในสภาพการหมักแบบแห้งบนรำข้าวสาลี โดยศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันและแหล่งไนโตรเจน เพื่อส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ และผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดโดยใช้ น้ำแป้ง กับ beef extract 1% พบว่าไอออนโลหะ Ca^{2+} และ Co^{2+} ทำให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสเพิ่มสูงขึ้น และเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 9.5

Jha et al. (2556) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา 11 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้อาหาร starch agar medium และการเกิดปฏิกิยากับสารละลายไอโอดีน พบเชื้อรา 3 สายพันธุ์ สร้างโซนใสมากที่สุด อยู่ในจีนัส *Aspergillus* จากนั้นนำทั้ง 3 สายพันธุ์ มาศึกษาผลของไอออนโลหะต่างๆ 5 ชนิด ได้แก่ $CuSO_4$, $MgSO_4$, KNO_3, NaCl และ $CaCO_3$ ต่อการสร้างและการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส จากการทดลองจะเห็นได้ว่า $MgSO_4$ ซึ่งมีไอออน Mg^{2+} มีผลต่อการเจริญของเชื้อรามากที่สุด เป็นไอออนที่ดีและเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตและเร่งการทำงานของเอนไซม์และการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราได้สูงที่สุด ส่วนไอออน Ca^{2+} แสดงผลถึงการลดลงของการทำงานของเอนไซม์แสดงว่า Ca^{2+} อาจมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

วีระสิทธิ์ และคณะ (2557) การทดลองมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเชื้อรา *A. oryzae*, *A. awamori* และ *Rhizopus sp.* บนสับสเตรท 3 ชนิด คือ ข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และถั่วเหลือง ที่ความชื้นเริ่มต้น 70% และ พีเอช 7.0 บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่สภาวะเป็นกลาง (พีเอช 7.0) และสภาวะเป็นกรด (พีเอช 4.0) พบว่า *A. oryzae* ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลีให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แอลฟ่าอะไมเลส และโปรติเอสสูงที่สุดในสภาวะเป็นกลาง (พีเอช 7.0) มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 267.33, 104.98 และ 199.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่สภาวะเป็นกรด (พีเอช 4.0) มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 606.34, 92.69 และ 3.78 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

รำข้าวสาลี ร้านเจ๊หงษ์, จตุจักร ประเทศไทย

น้ำดื่มตราสิงห์ ขนาด 6 ลิตร, สิงห์ คอร์เปอร์เรชั่น, ประเทศไทย

เชื้อ *Amylomyces* spp. เลี้ยงใน potato dextrose agar (PDA) จากห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง คณะอุตสาหกรรมเกษตร

3.1.2 สารเคมี

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), Sigma-Aldrich, USA

Absolute Ethanol 99.8%, Merck, Germany

Acetyl acetone ($C_5H_8O_2$), Carlo, Italy

Enrlich reagent, Fluka, Switzerland

Ethanol 95%, Italmar, Thailand

Glacial acetic acid ($C_2H_4O_2$), RCI Labscan, Thailand

Glucosamine G4875-25G, Sigma-Aldrich, USA

Glucose ($C_6H_{12}O_6$) K40352037 947, Merck, Germany

Hydrochloric acid (HCl), RCI Labscan, Thailand

Iodine (I_2), Carlo erba, France

Nickel (ll) chloride hexahydrate ($NiCl_2$ *$6H_2O$) K44646117 446, Merck, Germany

p-Dimethylamino benzaldehyde 444604, Carlo erba, France

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 471687, Carlo erba, France

Potassium iodide (KI)472737 , Carlo erba, France

Potato Dextose Agar, Himedia Laboratories, India

Sodium acetate trihydrate (CH_3COONa*$3H_2O$), Merck, Germany

Sodium Carbonate (Na_2CO_3), Univar, Australia

Sodium hydroxide (NaOH), Carlo erba, France

Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6$), Univar, New Zealand

Starch ($(C_6H_{10}O_5)_n$) 9005-84-9, Merck, Germany

Sulfuric acid (H_2SO_4), RCI Labscan, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเขย่า, GFL 3017, Orbital, Germany
เครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง, SI 234, Denver Instrument, Germany
เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง, Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ, Eppendorf 5804R, Germany
เครื่องผสมสาร, Vortex-Genie® 2, BEC THAI, USA
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง, SevenEasy, Mettler Toledo, China
เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์, Genesys 20, Thermo scientific, UK
ตู้เขี่ยเชื้อ, Larminar flow Abs 1200, Microflow, Germany
ตู้บ่มเชื้อ, Heraeus, Germany, Memmert, USA
ตู้เย็น, GR282-MVF LG, South Korea
ตู้อบเครื่องแก้ว, 7.200 Tuttlingen, WTB binder, Germany
โถดูดความชื้น, Simax, Germany
ไมโครปิเปต ขนาด 200, 1000 และ10000 ไมโครลิตร, Gilson, France
ไมโครเวฟ, MR30A, Hitachi, Thailand
หม้อนึ่งความดันไอ, ES-315, Tomy, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ, Memmert, Germany
กระดาษกรองเบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร, Whatman, UK
กระดาษฟอยด์, Diamond, USA
กระบอกตวงแก้ว ขนาด 100 มิลลิลิตร, Witeg, Germany
ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100, 250 และ1000 มิลลิลิตร, Schott, Germany
ขวดสีชา ขนาด 100 และ1000 มิลลิลิตร
ถ้วยฟอยด์, Rawinporn, Thailand
ทิป ขนาด 200, 1000 และ10000 ไมโครลิตร, Gilson, France
บีกเกอร์ ขนาด 25, 50, 250, 600 และ1000 มิลลิลิตร, Pyrex, Germany
ปิเปต ขนาด 1, 5 และ10 มิลลิลิตร, Hbg, Germany
ฟลากส์ ขนาด 250 มิลลิลิตร, Pyrex, Germany
หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร, Pyrex, Germany
หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกขนาด 15 และ50 มิลลิลิตร, Falcon, USA
หลอดฝาเกลียว ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร, Pyrex, Germany
ผ้าขาวบาง ขนาด 30 x 50 เซนติเมตร
กรวยแก้วขนาดกลาง
ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แท่งแก้ว
ลูปเขี่ยเชื้อ

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces* spp.

การทดลองเริ่มจากการเตรียมเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่เลี้ยงใน Potato Dextrose Agar (PDA) ในตู้บ่มอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยการใช้เข็มเขี่ยเส้นใยเชื้อราลงในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) ที่ผ่านการ autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันจนเส้นใยเชื้อราเจริญขึ้นฟูปกคลุมทั่วทั้งผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีลักษณะเส้นใยสีขาว

3.3.2 การศึกษาการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

1) ชั่งรำข้าวสาลี 12 กรัมด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนักของฟลาสก์ แล้วทำการศึกษาการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลี 2 แบบ คือ

- แบบที่ 1 ฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง คือ ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที 1 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น 4-5 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อีก 1 ครั้ง
- แบบที่ 2 ฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง คือ ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที 2 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น 4-5 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อีก 1 ครั้ง

ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ก่อนเติมกล้าเชื้อรา

2) นำเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDB จากข้อ 3.3.1 มาทำการเขี่ยเส้นใยให้กระจายมาทั่วอาหารPDB ในแต่ละหลอดด้วยการ vortex 30 วินาที จากนั้นเทเชื้อราในอาหาร PDB ลงในบีกเกอร์ที่ผ่านการ autoclave แล้ว และใช้เข็มเขี่ย (needle) เขี่ยเส้นใยให้แยกออกจากกันจนได้ลักษณะกล้าเชื้อราที่เป็นเนื้อเดียวกัน เส้นใยเชื้อรากระจายอยู่ในน้ำ มีสีขาวขุ่น แล้วปิเปตเชื้อราที่เตรียมได้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่มีรำข้าวสาลี และคนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยคนให้ไปในทิศทางเดียวกัน ประมาณ 30 วินาที หรือประมาณ 30 รอบ

3) ทำการบ่มเชื้อราในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวัดอุณหภูมิในตู้บ่มระหว่างการบ่มเชื้อทุกวัน เก็บตัวอย่างหลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลี มาวิเคราะห์ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง ทำการวิเคราะห์ความชื้น ความเป็นกรดด่าง (pH) วัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดกลูโคซามีน ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity) และตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและแอลฟ่าอะไมเลส นำผลการทดลองที่ได้มาใช้ในการเลือกวิธีที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการเตรียมวัตถุดิบเพื่อผลิตโคจิรำข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การศึกษาผลของไอออนโลหะ $NiCl_2$ และ KH_2PO_4 ในการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

1) ชั่งรำข้าวสาลี 12 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนักของฟลาสก์ ทำการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีตามวิธีที่คัดเลือกได้ จากข้อ 3.3.2 โดยนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (รอบที่ 1) รอจนเย็นประมาณ 4-5 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก

2) ศึกษาผลของไอออนโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายไอออนโลหะ ต้องการศึกษา โดยชั่ง $NiCl_2$ 0.0660 กรัม และKH_2PO_4 0.0300 กรัม ด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง ทำการเตรียมสารละลายไอออนโลหะขณะรอรำข้าวสาลีเย็นที่ 4-5 ชั่วโมง เตรียมโดยละลายไอออนโลหะที่ชั่งมาแล้วข้างต้นทำการละลายด้วยน้ำตราสิงห์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายไอออนโลหะ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงในรำข้าวสาลีนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (รอบที่ 1) เพื่อให้มีความเข้มข้นของ $NiCl_2$ 0.15 และ KH_2PO_4 0.125 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นทำการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อีกครั้ง (รอบที่ 2) รอจนเย็น

3) นำเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDB จากข้อ 3.3.1 มาทำการเขี่ยเส้นใยให้กระจายมาทั่วอาหาร PDB ในแต่ละหลอดด้วยการ vortex 30 วินาที จากนั้นเทเชื้อราในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ลงในบีกเกอร์ที่ผ่านการ autoclave แล้วและใช้เข็มเขี่ย (needle) เขี่ยเส้นใยให้แยกออกจากกันได้ลักษณะกล้าเชื้อราที่เป็นเส้นใยเล็กๆเกาะกันอยู่ แต่ไม่หนาแน่น แล้วปิเปตเชื้อราที่เตรียมได้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่มีรำข้าวสาลีที่ผ่านการ autoclave แล้ว 2 รอบ จากข้อ 2 และคนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้ว โดยคนให้ไปในทิศทางเดียวกัน ประมาณ 30 วินาที หรือประมาณ 30 รอบ

4) ทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างหลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจวัดอุณหภูมิในตู้บ่มระหว่างการบ่มเชื้อทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลี มาวิเคราะห์ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ7 วัน ตามลำดับ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง ทำการวิเคราะห์ความชื้น ความเป็นกรดด่าง (pH) วัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดกลูโคซามีน ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ และตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและแอลฟ่าอะไมเลส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การวิเคราะห์

3.3.4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.3.4.1.1 การสกัดเอนไซม์จากโคจิ (ดัดแปลงจาก สร้อยสุดา, 2546)

1) ชั่งน้ำหนักโคจิรำข้าวสาลีหลังบ่ม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง

2) เติมน้ำสิงห์ autoclave เย็น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อสกัดแยกเอนไซม์ โดยทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อสกัดเอนไซม์ออกจากโคจิรำข้าวสาลี

3) กรองด้วยผ้าขาวบาง ขนาด 30x50 เซนติเมตร 2 ชั้น ที่ผ่านการ autoclave แล้ว จากนั้นสวมถุงมือยางแล้วฉีดแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เพื่อฆ่าเชื้อ ใช้มือบีบโคจิออกจากผ้าขาวบางเพื่อกรองเอาส่วนใสออก ได้ส่วนที่กรองได้ปริมาตร 40-45 มิลลิลิตร

4) นำส่วนที่กรองได้บรรจุใส่หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์

5) เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงทำการวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และตรวจวัดความเป็นกรดด่าง

3.3.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (สุมัลลิกา, 2545; Fuwa, 1954)

1) นำเอนไซม์ที่สกัดได้ 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดขนาด 16x150 ปิดฝาหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นเจือจางเอนไซม์ด้วยน้ำ DI ที่ผ่านการ autoclave แล้ว และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเจือจางเอนไซม์ที่ระดับความเจือจาง 0, 50,100 และ200 เท่า (ภาคผนวก ก)

2) ชั่งแป้ง 0.5 กรัม ละลายใน 0.2 M acetate buffer (pH 5.0) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ละลายน้ำแป้งจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเขย่าให้ละลาย และให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 30 วินาที อีกครั้ง สังเกตว่าแป้งละลายหมดจะมีลักษณะสีใส รอให้เย็น จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำแป้ง 0.5% ลงในหลอดทดสอบใหม่หลอดละ 2 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3) ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้ว ทั้งเอนไซม์ที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยาและที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร จากข้อ1) และข้อ 3.3.4.1.1 ใส่หลอดทดลองที่มีน้ำแป้งที่ผ่านการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากข้อ2) ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง

4) ปิเปตสารละลายน้ำแป้งที่เติมสารละลายเอนไซม์แล้วใน ข้อ 3) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายไอโอดีนที่เตรียมใหม่ (ชั่งสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.5000 กรัมและ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโอดีน 0.0500 กรัม ผสมกันและปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร) ที่ทำการเจือจางไอโอดีน 100 เท่า ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ที่ผ่านการ autoclave แล้วปิเปตไอโอดีนที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำแป้งที่เติมสารละลายเอนไซม์แล้วจะได้สีของไอโอดีนเมื่อทำปฏิกิริยากับแป้งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

5) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร โดย blank set 0 ใช้น้ำกลั่นที่ไม่ทำปฏิกิริยา แทนสารละลายเอนไซม์

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส

กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส 1 หน่วย หมายถึงกิจกรรมเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ 1 มิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

$$\text{หน่วยของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสต่อมิลลิลิตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(B - S) \times dil^{n} \times d}{B \times \text{dry wt.}}$$

โดยที่ B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา ที่ 700 นาโนเมตร

S = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา ที่ 700 นาโนเมตร

dil^{n} = ค่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์

d = ปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

dry wt. = น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

3.3.4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (สุมัลลิกา, 2545: Ueda, 1990)

1) นำเอนไซม์ที่สกัดได้ 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดขนาด 16x150 ปิดฝาหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเจือจางเอนไซม์ที่สกัดได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ที่ผ่านการ autoclave แล้ว ที่แช่เย็น ที่ระดับความเจือจาง 0,10 และ20 เท่า (ภาคผนวก ก)

2) เตรียมสารละลายแป้ง 1 กรัม ใน 0.2 M acetate buffer (pH 4.5) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ละลายน้ำแป้งจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเขย่าให้ละลายจากนั้นให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 30 วินาที อีกครั้ง สังเกตว่าแป้งละลายหมดจะมีลักษณะสีใส รอให้เย็น จากนั้น ปิเปตสารละลายน้ำแป้งปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร น้ำ DI ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 0.2 M, pH 4.5) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้ว ทั้งเอนไซม์ที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยาและที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร จากข้อ1) และข้อ 3.3.4.1.1 ลงไปในหลอดทดสอบที่มีน้ำแป้งที่ผ่านการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากข้อ 2) ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง

4) ปิเปตสารละลาย จากข้อ 3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร

5) นำหลอดทดสอบ จากข้อ 4) ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็น (โดยทำการแช่หลอดทดสอบในน้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

6) เติมน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบจากข้อ 5) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดย blank set 0 ใช้น้ำ DI autoclave (ที่ทำปฏิกิริยา)แทนสารละลายเอนไซม์

7) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยได้โดยอ่านค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ก)

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส

กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส 1 หน่วยเท่ากับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น 1 มิลลิกรัมใน 1 นาที ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

$$\text{หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(Rs - Rs_0) \times b \times c \times d}{Rs_s \times e \times t \times a \times Dry.wt}$$

โดยที่ Rs = ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่ วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ย่อยละลายในน้ำแป้งเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Rs_0= ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่ วัดได้เมื่อหยุดกิจกรรมในการย่อยของเอนไซม์ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาการย่อย

Rs_s = ค่าคงที่ที่ได้จากกราฟความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

a = ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในการทดลองใช้ 1 มิลลิลิตร

b = ปริมาตรรวมของสารละลายที่เกิดขึ้นทั้งหมดเท่ากับ 4.5 มิลลิลิตร

c = จำนวนเท่ากับการเจือจางสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

e = ปริมาตรของสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร

d= ปริมาณที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

t= เวลาที่เอนไซม์เกิดปฏิกิริยาในที่นี้คือ 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Dry wt.= น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

3.3.4.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่างโคจิ

ชั่งน้ำหนักฟาสก์ที่มีโคจิรำข้าวสาลีหลังบ่มที่ 32 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เพื่อไว้ใช้คำนวณหาค่าความชื้นและน้ำหนักแห้งของโคจิ แล้วคนตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลีด้วยแท่งแก้วในทิศทางเดียวกันจำนวน 30 รอบ เพื่อให้โคจิรำข้าวสาลีกระจายออกออกจากกัน จนมีลักษณะร่วนซุย และสีของโคจิมีลักษณะเหมือนกันทั้งฟลาสก์ (เนื่องจากผิวหน้าโคจิรำข้าวสาลีมีลักษณะแห้งแต่บริเวณด้านล่างของฟาสก์มีลักษณะชื้น จึงทำให้เห็นสีของโคจิรำข้าวสาลีที่ต่างกัน) จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างโคจิโดยการคนตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลีให้ทั่วก่อนทำการตักตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.4.2.2 การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 2000)

1) อบถ้วยฟอยด์ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2) ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 , 3 , 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำไปชั่งน้ำหนัก

3) บันทึกผลน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของกระป๋องอะลูมิเนียมและตัวอย่างที่อบแห้งแล้วคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

3.3.4.2.3 การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้

1) เปิดเครื่องวัด วอเตอร์แอคทิวิตี้ (รุ่น 3TE, Charpa, Thailand) ไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง เพื่อทำการเตรียมเครื่องให้พร้อม

2) ทำการ Calibrateเครื่อง โดยน้ำUltrapureให้อยู่ในค่าที่พร้อม 1.000±0.003

3) ชั่งโคจิรำข้าวสาลีด้วยช้อนตักสารลงในตลับ ประมาณ 2.00 กรัม ด้วยเครื่องชั่งสองตำแหน่ง

4) นำเข้าเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ รอเครื่องแสดงผลและบันทึกผลค่าที่ได้

3.3.4.2.4 การวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (pH) (AOAC, 1995)

นำสารสกัดเอนไซม์ในโคจิที่ได้จากข้อ 3.3.4.1.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยเครื่อง pH meter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148869

3.3.4.2.5 การวิเคราะห์กลูโคซามีน (Sakurai, 1997)

การเตรียมตัวอย่าง

1) นำถ้วยฟอยด์ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง

2) แล้วชั่งตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลี ปริมาณ 2.0000 กรัม ด้วยเครื่องชังทศนิยม 4 ตำแหน่ง ลงในถ้วยฟอยด์

3) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (กรณีเก็บตัวอย่างให้เก็บใส่ถ้วยฟอยด์ที่พับให้มิดชิด แล้วใส่ถุงซิปล็อคแล้วแช่แข็งที่ -18 องศาเซลเซียส)

4) บดให้ละเอียดโดยใช้ขวดแก้วทุบตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลี

วิธีวิเคราะห์

1) นำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส มาบดละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัมและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ผสมกับกรดซัลฟูริกเข้มข้น 60 % ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง

2) นำมาเจือจางด้วยน้ำ Ultrapure ปริมาตร 44.9 มิลลิลิตร ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มอล (ภาคผนวก ก)

3) นำเข้าหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) นำสารละลายที่ได้มาทำให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 1 N NaOH ปรับ pH เท่ากับ 7 โดยการค่อยๆ ปิเปต 1 N NaOH แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้ววัด pH หลังจากปรับ pH เท่ากับ 7 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Ultrapure กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

5) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ acetyl acetone 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มเดือดนาน 20 นาที

6) ทำให้เย็นจากนั้นใส่ absolute Ethanol 99.8% และ Enrlich reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

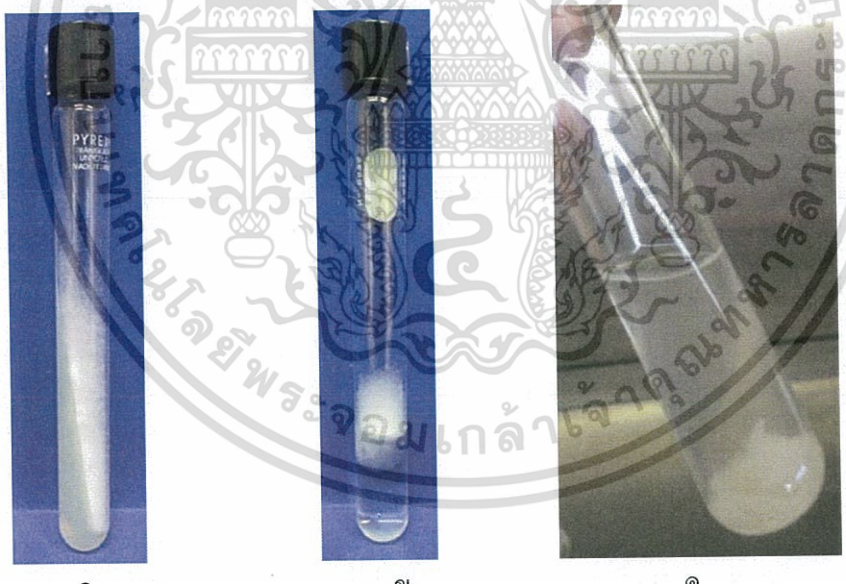
7) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้เย็นและนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่ากราฟมาตรฐานกลูโคซามีน (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 กล้าเชื้อรา *Amylomyces* spp.

การเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. เริ่มจากการเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ถ่ายเชื้อลงบนอาหาร PDA จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ได้เชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ดังภาพที่ 4.1 ก การเจริญของเชื้อราจะมีลักษณะฟู เป็นเส้นใย มีสีขาว เจริญคลุมทั่วทั้งผิวหน้าของอาหาร หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหาร Potato dextrose broth (PDB) เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำโคจิรำข้าวสาลี โดยการเขี่ยเส้นใยเชื้อรา ที่เจริญบนอาหาร PDA ลงบนอาหาร PDB บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ดังภาพที่4.1 ข จะเห็นว่า เส้นใยมีลักษณะฟู มีสีขาว และเจริญคลุมผิวหน้าของอาหาร PDB และการเตรียมกล้าเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDB โดยทำการเขี่ยเส้นใยให้กระจายเพื่อให้เส้นใยมีความสม่ำเสมอก่อนเลี้ยงในรำข้าวสาลี ดังภาพที่4.1 ค



ก ข ค

ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่เจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ก) และ Potato dextrose broth (PDB) (ข) และกล้าเชื้อรา *Amylomyces* spp. ก่อนนำไปเลี้ยงในรำข้าวสาลี (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเตรียมวัตถุดิบในการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

การศึกษาการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิรำข้าวสาลีโดยศึกษาผลของการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีออกเป็น 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 ฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที 1 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น 4-5 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อีก 1 ครั้ง และ

แบบที่ 2 ฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที 2 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น 4-5 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อีก 1 ครั้ง

ผลิตโคจิรำข้าวสาลี โดยการใช้เชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDB เป็นกล้าเชื้อในการเลี้ยง จากข้อ 4.1 จากนั้นทำการบ่มเชื้อราในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างหลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างโคจิรำข้าวสาลี มาวิเคราะห์ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ7 วัน ตามลำดับ

พบว่าการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีทั้งสองแบบ ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา ปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส,กลูโคอะไมเลส ความเป็นกรดด่าง (pH) ความชื้น และค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity, A_W) ในการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

4.2.1 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อการเจริญของเชื้อราและปริมาณกลูโคซามีน

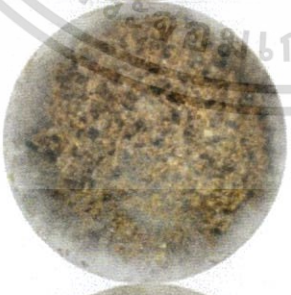
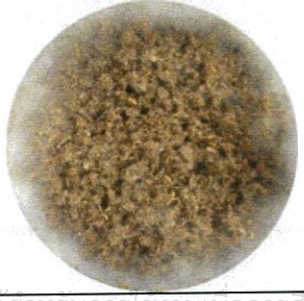
การฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวสาลี ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 และภาพที่ 4.2 พบว่าการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 การเจริญของเชื้อราในโคจิรำข้าวสาลีในวันที่ 0 กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล และยังไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Amylomyces* spp. ส่วนวันที่ 1-2 พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล ในวันที่ 3 จะมีลักษณะของเส้นใยเชื้อราฟูขึ้นมาก และเส้นใยของเชื้อราจะมีปริมาณมากเจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด รำข้าวสาลีมีสีน้ำตาลอ่อน และวันที่ 4-7 เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะยุบตัวลง ไม่ฟูมาก แต่มีการเจริญของเชื้อราไชเส้นใยลงไปในรำข้าวสาลี เมื่อเขี่ยดูจะเห็นเป็นลักษณะเส้นใยเชื้อราแทรกลงบนชั้นของรำข้าวสาลีและทำให้รำข้าวสาลีมีความแห้ง และเกาะกันเหมือนปุยนุ่น ในวันที่ 7 พบลักษณะการยุบตัวของเส้นใยมากที่สุด (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.2)

การฆ่าเชื้อแบบที่ 2 การเจริญของเชื้อราในโคจิรำข้าวสาลี ในวันที่ 0 กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาลเข้ม และยังไม่พบการเจริญของส้นใยเชื้อรา *Amylomyces* spp. ส่วนวันที่ 1-2 พบว่าเส้นใยของเชื้อราเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล ในวันที่ 3 จะมีลักษณะของเส้นใยเชื้อราฟูขึ้น สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล และเส้นใยของเชื้อรามีปริมาณมาก และมากกว่าวันที่ 0-2 เจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด และวันที่ 4-7 เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะยุบตัวลง ไม่ฟู มีการเจริญของเชื้อราไชเส้นใยลงไปในรำข้าวสาลี แต่เส้นใยของเชื้อราที่เจริญลงไปในรำข้าวสาลีแบบที่ 2 มีการชอนไชของเส้นใยน้อยกว่าแบบที่ 1 และสีของโคจิแบบที่ 2 มีลักษณะเป็นสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลเข้มกว่าแบบที่ 1 และปริมาณเส้นใยของเชื้อราแบบที่ 2 มีน้อยกว่าแบบที่ 1 และในวันที่ 7 พบลักษณะการยุบตัวของเส้นใยมากที่สุด (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
0	33.6 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี ยังไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
1	33.8 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวขึ้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเล็กน้อย เส้นใยเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว
2	34.7 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวขึ้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรามาก
3	35.4 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยเชื้อราฟูปกคลุมทั่วรำข้าว เส้นใยมีปริมาณมาก และเจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด
4	36.0 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะการเจริญของเชื้อรา Amylomyces spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
5	36.2 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงไม่มาก
6	36.6 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมาก
7	35.6 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมากขึ้น

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
0	32.1 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวอับชื้น คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี ยังไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
1	32.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเล็กน้อย เส้นใยเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว
2	34.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับ คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรามาก
3	34.5 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กมาก คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เส้นใยเชื้อราฟูปกคลุมทั่วรำข้าว เส้นใยมีปริมาณมากขึ้น และเจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด
4	36.9 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เส้นใยที่ยุบตัวลง
5	36.6 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย กลิ่นคล้ายฟางข้าวเปียกน้ำ เส้นใยที่ยุบตัวลงมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
6	35.8 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เส้นใยที่ยุบตัวลงมากขึ้น
7	35.1 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เส้นใยที่ยุบตัวลงมากที่สุดเส้นใยยุบตัวแนบกับผิวหน้ารำข้าวสาลี

วันที่ 0

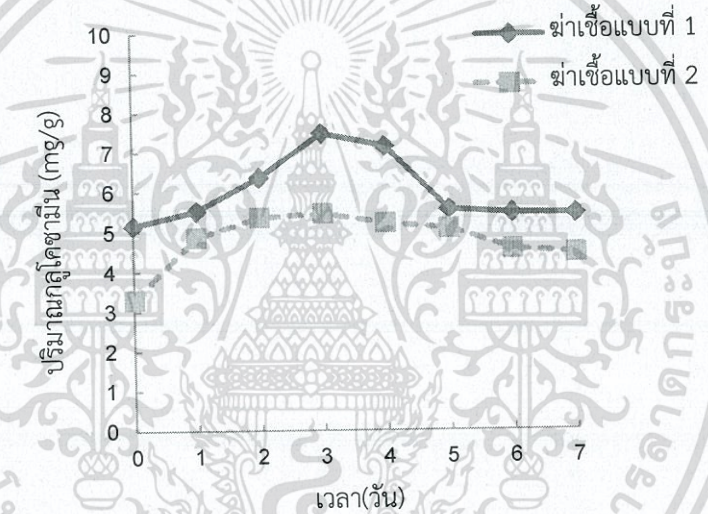
วันที่ 3

วันที่ 5

ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส วันที่ 0, วันที่ 3 และ วันที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อราโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน ดังภาพที่ 4.3 การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 การเจริญของเส้นใยเชื้อราบนโคจิรำข้าวสาลี เป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 5.1564-7.4686 มิลลิกรัมต่อกรัม พบว่าแบบที่ 1 วันที่ 0 มีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้น 5.1564 มิลลิกรัมต่อกรัม วันที่ 1-2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น วันที่ 3 มีปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดคือ ปริมาณ 7.4686 มิลลิกรัมต่อกรัม วันที่ 4-7 ปริมาณกลูโคซามีนมีแนวโน้มลดลง ส่วนการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 พบว่าวันที่ 0 มีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้น 3.3067 ไมโครกรัมต่อกรัม วันที่ 1-2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น วันที่ 3 มีปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดเพียง 5.4522 มิลลิกรัมต่อกรัม และเนื่องจากวันที่ 4-7 ปริมาณกลูโคซามีนมีแนวโน้มลดลง สอดคล้องกับลักษณะการเจริญของเชื้อรา (ตารางที่ 4.1 และ 4.2) ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าแบบที่ 1 เนื่องจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 มีจำนวนรอบการฆ่าเชื้อมากกว่าจึงส่งผลให้สารอาหารที่อยู่ในรำข้าวสาลีถูกทำลายด้วยความร้อนทำให้สารอาหารในรำข้าวสาลีลดลง



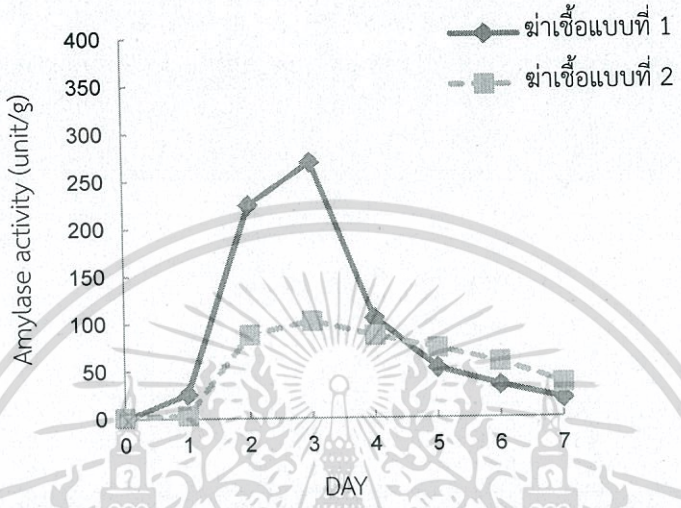
ภาพที่ 4.3 ปริมาณกลูโคซามีนในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 (♦) และการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 (■) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2.2 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

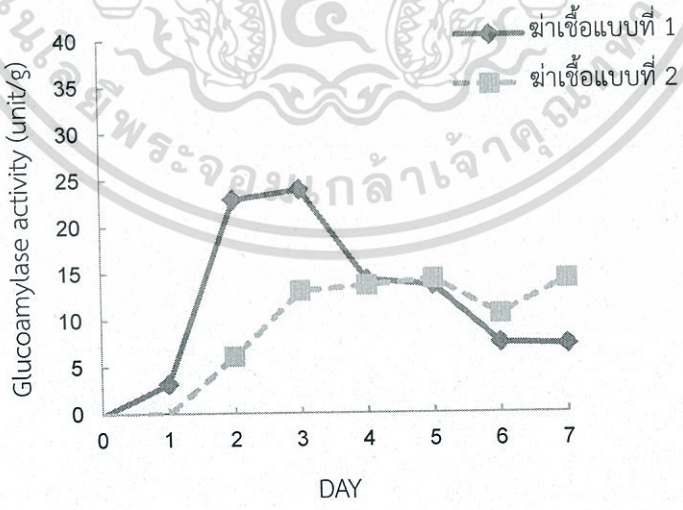
จากการศึกษาผลของการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีแบบที่ 1 และ 2 ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำโคจิที่ได้ไปสกัดเอนไซม์และหากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส พบว่า การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 ในวันที่ 0 ของการบ่มยังตรวจไม่พบกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส พบมีกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 1-2 มีแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองเพิ่มสูงขึ้น และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 ในวันที่ 4-7 มีแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองที่ลดลง และ การฆ่าเชื้อแบบที่ 2 ในวันที่ 0 ของการบ่มยังไม่พบกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส พบมีกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 1-2 มีแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สองสูงขึ้น และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 ในวันที่ 4-7 มีแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองที่ลดลง ผลการทดลองพบว่า วันที่ 3 ของการบ่มการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีแบบที่ 1 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงสุด คือ 269.9032 และ 23.9923 หน่วยกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีแบบที่ 2 คือ 102.2661 และ 13.0807 หน่วยกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ดังภาพที่ 4.4 และ 4.5



ภาพที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 (♦) และ การฆ่าเชื้อแบบที่ 2 (■) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 (♦) และการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 (■) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อความชื้น A_w และความเป็นกรดด่างในโคจิรำข้าวสาลี

การฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีโดยการใช้หม้อนึ่งความดันไอ แบบที่ 1 และ 2 มีผลต่อความชื้น A_w และความเป็นกรดด่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 ปริมาณความชื้น A_w และค่าความเป็นกรดด่าง ของโคจิรำข้าวสาลี เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	ปริมาณความชื้น(%)	A_w	ความเป็นกรดด่าง
0	53.5663±1.4380	0.999±0.002	5.35±0.50
1	53.8546±1.5267	0.996±0.002	5.30±0.34
2	56.5568±0.5809	0.993±0.002	6.08±0.18
3	57.5796±0.6032	0.993±0.005	6.94±0.19
4	58.0074 ±0.0741	0.992±0.005	7.30±0.38
5	58.1308±0.1935	0.992±0.003	7.32±0.15
6	58.8306±3.2109	0.992±0.002	7.75±0.07
7	57.4963±0.0557	0.991±0.001	7.84+0.17

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณความชื้น A_w และค่าความเป็นกรดด่าง ของโคจิรำข้าวสาลี เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	ปริมาณความชื้น(%)	A_w	ความเป็นกรดด่าง
0	52.8254±0.1813	0.998±0.010	5.41±0.06
1	52.9800±0.0724	0.996±0.006	5.51±0.09
2	56.2888±0.5935	0.992±0.006	5.81±0.14
3	56.5004±0.0755	0.993±0.006	6.39±0.14
4	58.9607±0.1013	0.992±0.000	6.83±0.11
5	58.6731±0.2834	0.992±0.020	7.04±0.07
6	57.9010±0.2641	0.992±0.020	7.36±0.16
7	57.1537±0.1763	0.991±0.006	7.54±0.14

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 ของการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 พบว่า ความชื้นในโคจิรำข้าวสาลีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ความชื้นอยู่ที่ 53.5663% เป็น 57.4963% ในวันที่ 7 ส่วน A_w มีแนวโน้มลดลงจากวันที่ 0 อยู่ที่ 0.998 แล้วลดลงจนถึง 0.991 ในวันที่ 7 นอกจากนี้ยังพบว่า ความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 5.35 ไปถึง 7.84

จากตารางที่ 4.4 ของการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 พบว่า ความชื้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 0-5 และลดลงในวันที่ 6-7 จากวันที่ 0 ความชื้นอยู่ที่ 52.8254% ไปจนถึง 58.6731% และลดลงเป็น 57.1537% ในวันที่ 7 ส่วน A_w จากวันที่ 0 อยู่ที่ 0.999 แล้วลดลงจนถึง 0.991 ในวันที่ 7 นอกจากนี้ยังพบว่า ความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 5.41 ไปถึง 7.54

เมื่อเปรียบเทียบการฆ่าเชื้อทั้งแบบที่ 1 และแบบที่ 2 มีแนวโน้มทำให้ปริมาณความชื้นที่เพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ปริมาณความชื้น ของโคจิรำข้าวสาลีที่วัดได้มีค่าที่สูงขึ้นเนื่องจากในระหว่างการเติบโตเชื้อรา มีการหายใจและทำให้เกิดความร้อนทำให้น้ำที่อยู่ในรำข้าวระเหยและควบแน่นเป็นหยดน้ำเกาะภายในฟลาสก์ ซึ่งลักษณะของฟลาสก์เป็นระบบที่ปิดไม่สามารถถ่ายเทความชื้นได้ดีทำให้หยดน้ำ ยังคงอยู่ภายใน และเมื่อมีหยดน้ำเพิ่มมากขึ้น จะหยดกลับลงมาบนรำข้าว ทำให้รำข้าวมีความชื้นสูงขึ้น (วีระสิทธิ์ และคณะ, 2559) ในส่วนของ A_w การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 และแบบที่ 2 มีแนวโน้มทำให้ค่า A_w ลดลงและแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ส่วนค่าความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และต่างต่างกันเพียงเล็กน้อย

ดังนั้นจึงได้เลือกใช้การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 เนื่องจากแบบที่ 1 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและกลูโคซามีนในปริมาณที่สูง เพราะมีการฆ่าเชื้อเพียง 2 ครั้ง จึงไม่ทำลายสารอาหารที่อยู่ในรำข้าวสาลี เชื้อราสามารถใช้สารอาหารได้และมีการเจริญที่ดี นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาในขั้นตอนการฆ่าเชื้อได้ด้วย เนื่องจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 มีการฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง และยังส่งผลต่อสีของโคจิ ลักษณะการเจริญของเชื้อรา รวมถึงกลิ่น ปัจจัยต่างๆเหล่านี้ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและกลูโคซามีนให้มีแนวโน้มที่ลดลง

4.3 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

ทำการชั่งรำข้าวสาลี 12 กรัม จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที 1 ครั้ง แล้วพักให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำสิงห์ (ชุดควบคุม) หรือสารละลายโลหะที่ต้องการศึกษา คือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อีก 1 ครั้ง (การฆ่าเชื้อแบบที่ 2) แล้วเลี้ยงโคจิรำข้าวสาลีโดยใช้กล้าเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDB บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญของเชื้อราและปริมาณกลูโคซามีน

การเลี้ยงเชื้อราบนรำข้าวสาลีที่ไม่มีการเติมโลหะ(ชุดควบคุม) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการเจริญของเชื้อราในโคจิรำข้าวสาลี ในวันที่ 0 กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล และยังไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Amylomyces* spp. ส่วนวันที่ 1-2 พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล ในวันที่ 3 มีลักษณะของเส้นใยเชื้อราฟูขึ้นมาก และเส้นใยของเชื้อรามีปริมาณมากเจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด รำข้าวสาลีมีสีน้ำตาลอ่อน และวันที่ 4-7 เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะยุบตัวลง ไม่ฟูมาก แต่มีการเจริญของเชื้อราไชเส้นใยลงไปในรำข้าวสาลี เมื่อเขี่ยดูจะเห็นเป็นลักษณะที่แทรกลงบนชั้นของรำข้าวสาลีและทำให้รำข้าวสาลีมีความแห้ง และเกาะกันเหมือนปุยนุ่น และลักษณะการยุบตัวของเส้นใยเชื้อรามากที่สุดในวันที่ 7 ดังตารางที่ 4.5

จากการเลี้ยงเชื้อราบนรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในวันที่ 0 กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล และยังไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Amylomyces* spp. ส่วนวันที่ 1-2 พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล วันที่ 3 จะมีลักษณะของเส้นใยเชื้อราฟูขึ้นแต่มีปริมาณไม่มาก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และKH_2PO_4 และวันที่ 4-7 เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะยุบตัวลง ไม่ฟูมาก มีการชอนไชของเส้นใยเชื้อราลงไปในรำข้าวสาลีน้อย และลักษณะการยุบตัวของเส้นใยเชื้อรามากที่สุดในวันที่ 7 ดังตารางที่ 4.6

ส่วนที่มีการเติมโลหะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในวันที่ 0 กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล และยังไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Amylomyces* spp. ส่วนวันที่ 1-2 พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวเริ่มมีการฟูขึ้นมากคล้ายสำลี มีสีขาว สีของรำข้าวสาลีมีสีน้ำตาล วันที่ 3 มีลักษณะของเส้นใยเชื้อราฟูขึ้นและมีปริมาณมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และ $NiCl_2$ และวันที่ 4-7 เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะยุบตัวลงเล็กน้อย แต่ยังมีการฟูของเส้นใยอยู่ และมีการชอนไชของเส้นใยเชื้อราลงไปในรำข้าวสาลีมาก วันที่ 4 เส้นใยเจริญยังมีการเจริญ และฟู มากกว่าวันที่ 7 ดังตารางที่ 4.7

จากการศึกษาผลของไอออนโละ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และKH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ต่อการเจริญของเชื้อรา พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญกับชุดควบคุม พบว่าวันที่ 0-2 ชุดควบคุมและ $NiCl_2$ มีการเจริญในช่วงแรกที่คล้ายกัน แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ส่วนKH_2PO_4 มีการเจริญที่ดีกว่า มีปริมาณเส้นใยมาก และลักษณะฟูมากกว่า วันที่ 3 ชุดควบคุม มีการเจริญคล้ายกับ KH_2PO_4 คือมีปริมาณเส้นใยมาก และมีลักษณะฟูมาก แต่ KH_2PO_4 มีการชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้มากกว่าชุดควบคุม ส่วน $NiCl_2$ มีการเจริญของเส้นใยน้อย เส้นใยเชื้อรามีลักษณะไม่ฟูมาก วันที่ 4-7 ชุดควบคุม และ KH_2PO_4 เริ่มมีการเจริญลดลงตามระยะเวลาเพิ่มขึ้น และลักษณะของเส้นใยเริ่มมีการยุบตัวลงตามวันที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แตกต่างกันตรงที่การชอนไชของ KH_2PO_4 มีการชอนไชได้มากกว่า ชุดควบคุม ส่วน$NiCl_2$

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

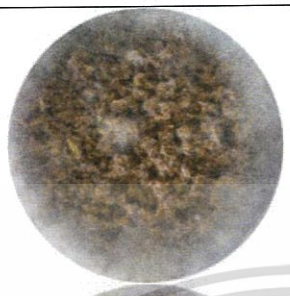
วันที่ 4 เริ่มมีการเจริญที่ลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด ลักษณะของเส้นใยไม่ฟูและมีลักษณะยุบตัวลงไปกับรำข้าวสาลี ดังตารางที่ 4.5-4.7 และภาพที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีที่ไม่มีการเติมโลหะ (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
0	33.6 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี ยังไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
1	33.8 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเล็กน้อย เส้นใยเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว
2	34.7 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรามากขึ้น
3	35.4 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยเชื้อราฟูปกคลุมทั่วรำข้าว เส้นใยมีปริมาณมาก และเจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีที่ไม่มีการเติมโลหะ (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
4	36.0 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลง การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้น้อย
5	36.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงไม่มาก การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้น้อย
6	36.6 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมาก การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้น้อย
7	35 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมากขึ้น การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีมีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
0	32.3 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวอับชื้นเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี ยังไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
1	33.4 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเล็กน้อย เส้นใยเริ่มมีการฟูขึ้นคล้ายสำลี มีสีขาว
2	35.6 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรามากขึ้น
3	36.4 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวมีกลิ่นอับเล็กน้อย คล้ายกลิ่นฟางข้าวชื้น เส้นใยเชื้อราฟูปกคลุมทั่วรำข้าว เส้นใยมีปริมาณมาก และเจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด เส้นใยไม่ฟูมาก
4	36.8 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลง ไม่ฟูมาก การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีมีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
5	37.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงไม่มาก การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้น้อย
6	36.3 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมาก การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้น้อยมาก เส้นใยเจริญราบบนรำข้าวสาลี
7	35.5 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมากขึ้น เส้นใยเจริญราบบนรำข้าวสาลี ไม่ฟู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีมีการเติมโลหะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

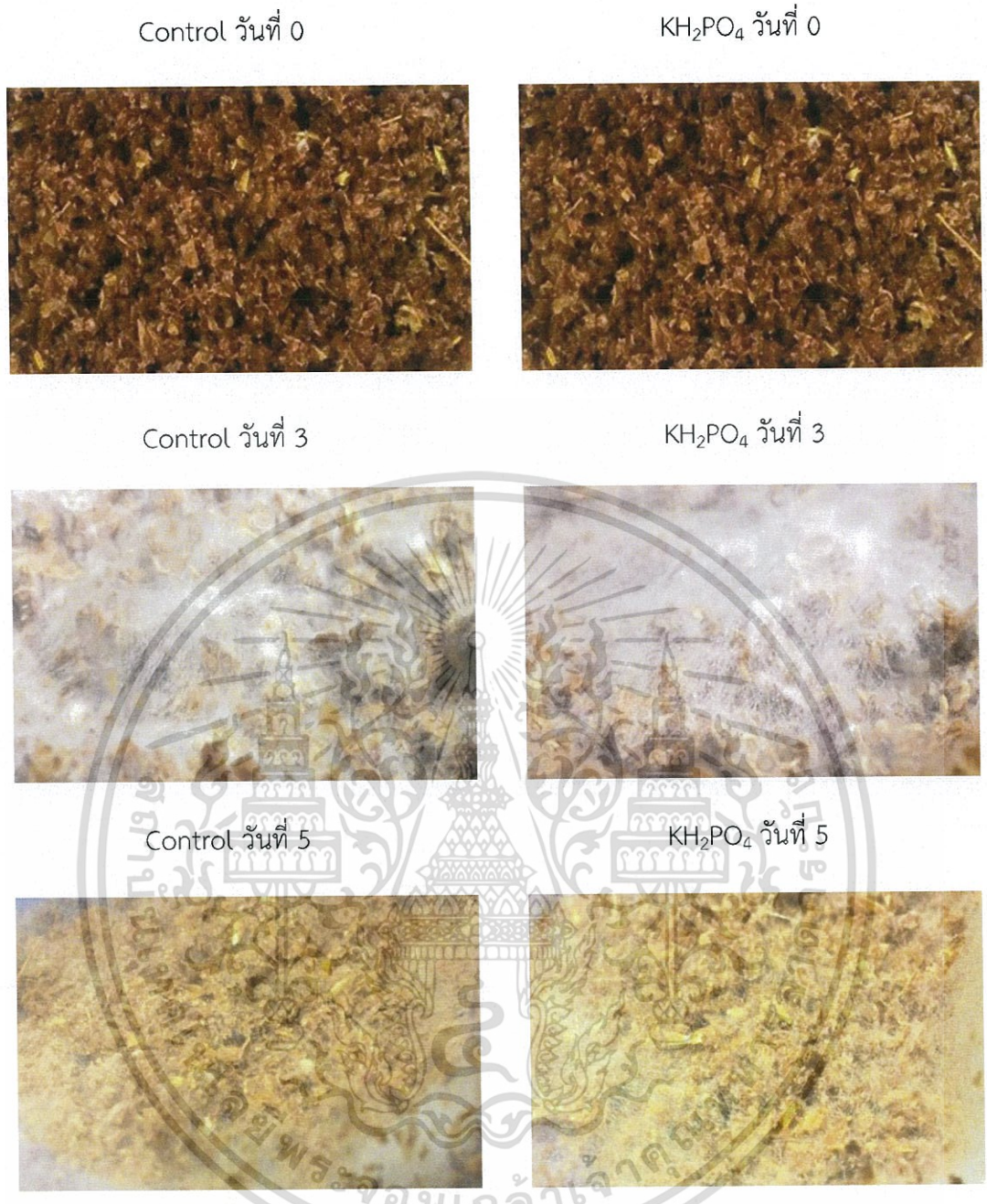
วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
0	32.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว กล้าเชื้อราผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับรำข้าวสาลี ยังไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
1	35.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเล็กน้อย เส้นใยเริ่มมีการฟูขึ้น มีสีขาว
2	36.7 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอมอ่อนๆ คล้ายกลิ่นฟางข้าว เริ่มมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรามาก
3	37.4 °C		สีน้ำตาลอ่อน กลิ่นรำข้าวหอม คล้ายกลิ่นฟางข้าวเส้นใยเชื้อราฟูปกคลุมทั่วรำข้าว เส้นใยมีปริมาณมากที่สุด และเจริญปกคลุมทั่วรำข้าวทั้งหมด การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้มาก
4	37.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอม คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงไม่มาก การชอนไชลงในรำข้าวสาลีได้มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวสาลีมีการเติมโลหะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	อุณหภูมิที่วัดได้จากการบ่มเชื้อ	ภาพการเจริญของเชื้อรา	ลักษณะโคจิรำข้าวสาลี
5	36.1 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอม คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงเพียงเล็กน้อย การซอนไชลงในรำข้าวสาลีได้มากขึ้น
6	36.4 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอม คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมาก ไม่ฟู
7	35.2 °C		สีน้ำตาล กลิ่นรำข้าวหอม คล้ายกลิ่นฟางข้าว เส้นใยที่ยุบตัวลงมากขึ้น เส้นใยเจริญราบบนรำข้าวสาลี ไม่ฟู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

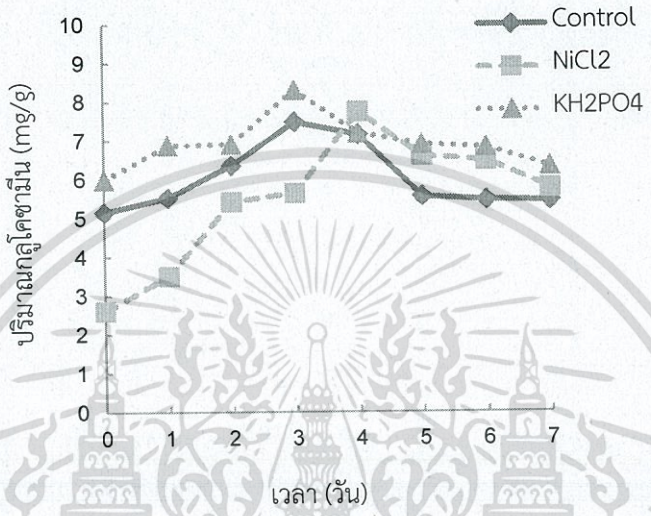


ภาพที่ 4.6 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนรำข้าวสาลีที่เตรียมจากชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) และKH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส วันที่ 0, วันที่ 3 และวันที่ 5

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อราโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน ดังภาพที่ 4.6 พบว่าชุดควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนโคจิรำข้าวสาลี เป็นเวลา 7 วัน พบว่าชุดควบคุม วันที่ 0 มีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้น 5.1564 มิลลิกรัมต่อกรัม วันที่ 1-2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น วันที่ 3 มีปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดคือปริมาณ 7.4686 มิลลิกรัมต่อกรัม วันที่ 4-7 ปริมาณกลูโคซามีนมีแนวโน้มลดลง ส่วน $NiCl_2$ พบว่าวันที่ 0 มีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้น 2.6058 มิลลิกรัมต่อกรัม วันที่ 1-3 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น วันที่ 4 มีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคซามีนสูงที่สุด 7.7326 มิลลิกรัมต่อกรัม และเนื่องจากวันที่ 5-7 ปริมาณกลูโคซามีนมีแนวโน้มลดลง ซึ่ง KH_2PO_4 พบว่า วันที่ 0 มีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นสูงถึง 5.9856 มิลลิกรัมต่อกรัม วันที่ 1-2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น วันที่ 3 มีปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดคือ ปริมาณ 8.2932 มิลลิกรัมต่อกรัม วันที่ 4-7 ปริมาณกลูโคซามีนมีแนวโน้มลดลง แต่ก็ยังมีค่าปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วงที่สูงกว่าชุดควบคุมและ $NiCl_2$ เมื่อเปรียบเทียบแล้วพบว่า $NiCl_2$ มีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 4 และ KH_2PO_4 สูงสุดในวันที่ 3



ภาพที่ 4.7 ปริมาณกลูโคซามีนในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% (■) และKH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% (▲) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) (◆) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.3.2 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

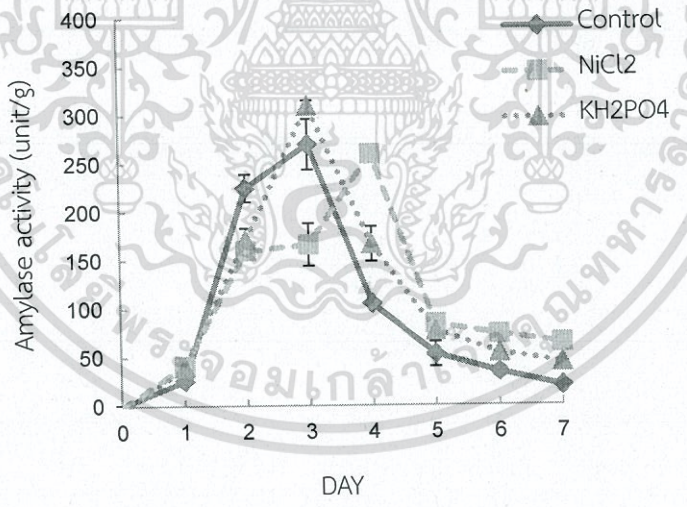
จากการศึกษาการเติมโลหะทั้ง 2 ชนิด คือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ลงในโคจิรำข้าวสาลี บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำโคจิรำข้าวสาลีที่ได้ มาเตรียมสารสกัดเอนไซม์และไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส พบว่า

กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส ของชุดควบคุม วันที่ 0 ยังไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ วันที่ 3 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 269.9032 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วน KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% วันที่ 0 ยังไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ วันที่ 3 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 309.6702 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% พบว่า วันที่ 0 ยังไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ วันที่ 4 $NiCl_2$ มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 259.6123 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

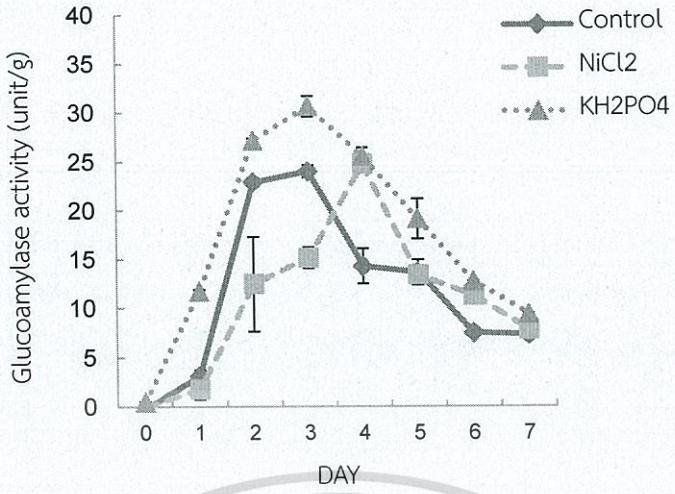
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของชุดควบคุม วันที่ 0 ยังไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ วันที่ 3 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 23.99 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วน KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% วันที่ 0 ยังไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ วันที่ 3 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 30.63 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% พบว่า วันที่ 0 ยังไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ วันที่ 4 $NiCl_2$ มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 24.77 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสของชุดควบคุม, $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และKH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% พบว่า $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% มีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 4 ส่วน KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% มีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งจะเห็นได้ว่า KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% สามารถสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงกว่า $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% นอกจากนี้ยังใช้ระยะเวลาในการสร้างเอนไซม์ที่สั้นกว่า ซึ่งเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นได้ดี เนื่องจากเป็นการลดต้นทุนการผลิต หรือ ได้ผลิตภัณฑ์สูงในเวลาที่รวดเร็ว ทั้งนี้ยังพบว่าการเติมโลหะไอออน $NiCl_2$ มีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในช่วงแรก (Otludil และคณะ, 2005) รวมถึง KH_2PO_4 เป็นโคแฟคเตอร์ส่งเสริมการเจริญและผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสได้สูง (Kokab และคณะ, 2005)



ภาพที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% (■) และKH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% (▲) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) (♦) ทำเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% (■) และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% (▲) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) (◆) ทำเลี้ยงเชื้อรา Amylomyces spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.3.3 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อความชื้น A_w และความเป็นกรดด่างในโคจิรำข้าวสาลี

การเติมโลหะทั้ง 2 ชนิด คือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม มีผลต่อความชื้น A_w และความเป็นกรดด่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.8-4.10

ตารางที่ 4.8 ปริมาณความชื้น ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% , KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	ปริมาณความชื้น(%)		
	Control	$NiCl_2$	KH_2PO_4
0	53.5663±1.4380	52.3610±0.5571	52.8616±0.6195
1	53.8546±1.5267	53.3570±0.7716	54.9960±1.6083
2	56.5568±0.5809	57.6246±0.5522	59.4176±2.6596
3	57.5796±0.6032	59.0560±0.8974	60.4614±2.6766
4	58.0074±0.7641	59.2897±0.4268	60.2347±1.0261
5	58.1308±0.1935	60.8629±1.6993	59.7641±0.6674
6	58.8306±3.2109	58.3402±0.8632	59.1553±1.3810
7	57.4963±0.0557	57.0911±0.8817	58.0577±0.2389

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15%, KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w)		
	Control	$NiCl_2$	KH_2PO_4
0	0.999±0.002	0.998±0.003	0.999±0.002
1	0.996±0.002	0.997±0.001	0.997±0.001
2	0.993±0.002	0.997±0.001	0.997±0.001
3	0.993±0.005	0.997±0.001	0.997±0.001
4	0.992±0.005	0.996±0.001	0.994±0.001
5	0.992±0.003	0.996±0.001	0.993±0.001
6	0.992±0.002	0.994±0.001	0.992±0.001
7	0.991±0.001	0.991±0.002	0.992±0.001

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.10 ความเป็นกรดด่าง ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15%, KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	ความเป็นกรดด่าง		
	Control	$NiCl_2$	KH_2PO_4
0	5.35±0.50	5.68±0.02	5.65±0.19
1	5.30±0.34	5.70±0.46	5.76±0.18
2	6.08±0.18	5.96±0.16	5.92±0.27
3	6.94±0.19	6.65±0.14	6.98±0.03
4	7.30±0.38	6.79±0.07	7.21±0.18
5	7.32±0.15	7.09±0.03	7.25±0.13
6	7.75±0.07	7.50±0.18	7.49±0.03
7	7.84±0.17	7.50±0.10	7.61±0.35

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตาราง พบว่า ปริมาณความชื้นของชุดควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นวันที่ 0-6 อยู่ในช่วง 53.5663-58.8306% และลดลงในวันที่ 7 ส่วน $NiCl_2$ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นวันที่ 0-5 อยู่ในช่วง 52.3610-60.8629 % และลดลงในวันที่ 6-7 และ KH_2PO_4 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นวันที่ 0-3 อยู่ในช่วง 52.8616-60.4614% และลดลงในวันที่ 4-7

วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) ทั้งชุดควบคุม, $NiCl_2$ และKH_2PO_4 มีแนวโน้มลดลง แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งชุดควบคุมลดลงอยู่ในช่วง 0.999-0.991 ส่วน $NiCl_2$ ลดลงอยู่ในช่วง 0.998-0.991 และ KH_2PO_4 ลดลงอยู่ในช่วง 0.999-0.992

ความเป็นกรดด่าง ทั้งชุดควบคุม, $NiCl_2$ และKH_2PO_4 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งชุดควบคุมเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 5.35-7.84 ส่วน $NiCl_2$ เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 5.68-7.50 และ KH_2PO_4 เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 5.65-7.61

เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุม, $NiCl_2$ และKH_2PO_4 ปริมาณความชื้นของชุดควบคุม และ$NiCl_2$ พบว่าความชื้นเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน ส่วน KH_2PO_4 มีการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ความชื้นอยู่ในช่วงที่สูงกว่าและเร็วกว่า ปริมาณความชื้นของโคจิรำข้าวสาลีที่วัดได้มีค่าที่สูงขึ้นเนื่องจากในระหว่างการเติบโตเชื้อรา มีการหายใจและทำให้เกิดความร้อนทำให้น้ำที่อยู่ในรำข้าวระเหยและควบแน่นเป็นหยดน้ำเกาะภายในฟลาสก์ ซึ่งลักษณะของฟลาสก์เป็นระบบที่ปิดไม่สามารถถ่ายเทความชื้นได้ดีทำให้หยดน้ำ ยังคงอยู่ภายใน และเมื่อมีหยดน้ำเพิ่มมากขึ้น จะหยดกลับลงมาบนรำข้าวทำให้รำข้าวมีความชื้นสูงขึ้น (วีระสิทธิ์และคณะ, 2559) ซึ่งจะส่งเสริมให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา จึงทำให้ KH_2PO_4 มีการเจริญที่ดีกว่า รวมถึงผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณที่สูง และส่วนของวอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) และ ความเป็นกรดด่าง มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

ดังนั้นการเติมไอออนโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ปริมาณกลูโคซามีน ปริมาณความชื้น วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) และ ความเป็นกรดด่าง ซึ่งการเติมไอออนโลหะเปรียบเสมือนเป็นโคแฟคเตอร์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อราและสามารถผลิตกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งไอออนโลหะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% มีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงมากที่สุด ในวันที่ 3 ดีกว่าการเติมไอออนโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% มีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสต่ำกว่า และจะมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นที่สุดในวันที่ 4 ซึ่งใช้เวลาในการสร้างกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

5.1.1 การเตรียมวัตถุดิบในการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

จากการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิรำข้าวสาลีโดยการฆ่าเชื้อ 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส 60 นาที จำนวน 2 ครั้ง และแบบที่ 2 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121องศาเซลเซียส 60 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากผลการทดลองคัดเลือกการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 มาใช้ในการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตรำข้าวสาลี ซึ่งลดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ ไม่ทำลายสารอาหารที่อยู่ในรำข้าวสาลี และให้การเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. เจริญได้สูงที่สุด และปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 3 คือ 7.4686 มิลลิกรัมต่อกรัม รวมทั้งให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ในปริมาณที่สูงในวันที่ คือ 269.9032 และ 23.9923 หน่วยกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

5.1.2 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิตโคจิรำข้าวสาลี

จากการศึกษาการเติมไอออนโลหะทั้ง 2 ชนิด คือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ลงในโคจิรำข้าวสาลี บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อรา คือ 309.6702 และ 30.6341 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และปริมาณกลูโคซามีนสูงถึง 8.2932 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วน $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% พบว่ามีปริมาณเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส สูงที่สุด ในวันที่ 4 คือ 259.6123 หน่วย และ 24.7723 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และและปริมาณกลูโคซามีนสูงถึง 7.7326 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะ ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 คือ 269.9032 และ 23.9923 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และปริมาณกลูโคซามีนสูงถึง 7.4686 มิลลิกรัมต่อกรัม ดังนั้นการเติมไอออนโลหะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% จึงเป็นโลหะที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และชุดควบคุมที่ไม่เติมโลหะ เนื่องจาก KH_2PO_4 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดและใช้เวลาสั้นที่สุด เพื่อเป็นการลดระยะเวลา และต้นทุนด้านอื่นๆ ที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณมากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ทำการศึกษาไอออนโลหะชนิดอื่นที่สามารถให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูง เช่น $MgSO_4$ หรือ $CaCl_2$ และการศึกษาไอออนโลหะชนิดผสมระหว่าง $MgSO_4$, $CaCl_2$ และ KH_2PO_4 ที่สามารถส่งเสริมให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นิรนาม. 2558. คุณประโยชน์จากข้าวสาลี(wheat). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http :// iorganicpetshop. com /article/5/คุณประโยชน์จากข้าวสาลี(wheat). 17 กรกฎาคม 2559

นิรนาม. 2559. รำข้าวสาลี: การใช้คุณสมบัติของรำข้าวสาลี. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http :// club beautys.com/th/pages/610328. 17 กรกฎาคม 2559

ภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ นิอร โฉมศร และณัฐธญาณ์ ศรีสุวอ. 2559. เต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.lartc.rmutl.ac.th/atri2/updown/การทำเต้า...pdf. 17 กรกฎาคม 2559

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2559. เอนไซม์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www. foodnetworksolution.com/wiki/word/0680/enzyme%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0 %B8%99%E0%B9%84%E0%B8%8B%E0%B8%A1%E0%B9%8C. 5 พฤษภาคม 2559

ฟาฮัน ไดนะดะ. 2549. โคจิ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: web.yru.ac.th/~dolah/notes/4605-2-49G20/.../R_404941015.doc. 14 ธันวาคม 2558

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต ขัตติยา ใหญ่ผล ปราโมทย์ ศิริโรจน์ วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และประมุข ภระกูลสุข สถิตย์. 2557. การคัดเลือกเอนไซม์จากโคจิเชื้อราบริสุทธิ์และคัดแยกยีสต์ทนเกลือเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้แดง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52. หน้า 475-482 . กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต ภาสกร วิเวกพรมราช สรวิศ ยอดอินทร์ และมังกร โรจน์ประภากร. 2558. ผลของความชื้น เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่แปรผันตามขนาดของการเพาะเลี้ยง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต และ ทรงศักดิ์ บูรณเศวตธรรม. 2548. การจัดจำแนกยีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งเพื่ออุตสาหกรรมสาโท. หน้า 419-426. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 : สาขาสัตว์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2557. การนำรำข้าวสาลีมาเป็นส่วนผสมในการหมักขนมปัง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:http://siweb.dss.go.th/article/show_atricle.asp?article_ID=1758. 17 กรกฎาคม 2559

สุมัลลิกา โมรากุล. 2545. การพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. เทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา. 2546. การผลิตไวน์ข้าวนาปรัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2540. ข้าวสาลี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

A.O.A.C. 1995. Official method of Analysis. 16th ed., Association of Official Analytical Chemist, Washingtan, D.C.

A.O.A.C. 2000. Official method of Analysis. 17th ed., Association of Official Analytical Chemist, Washingtan, D.C.

Asghar, M., Azhar, U., Rafiq, S., Sheikh, M.A. and Asad, M.J. 2002. Production of α-Amylase by *Arachinotus* sp. using waste bread medium. International Journal of Agriculture and Biology. 4(1): 26-28

Evans, J. 2556. Koji – history and process. [Online]. Available: http://nordicfoodlabhorg. /2013/8/koji-history-and-process. 14 December 2015

Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate.The Journal of Biochemistry. 41(5): 583–585.

Jha, S., Rai, H., Chattopadhyay, R., Kaur, V.P., Indupriya, M. and Shanti, V. 2013. Effect of metal ions on amylase production. Research in Science and Technology. 5(2): E52-53

Kokab, S., Ashgar, M., Rehman, K., Asad, M.J. and Aedeyo O. 2003. Bio-Processing of banana peel for α-Amylase production by *Bacillus subtilis*. International Journal of Agriculture and Biology. 5: 36–39.

Otludil, B., Aguloglu, O.B., Demir, R., Tolan, V. and Temel, H.2005 The effect of extracellular and membrane in amylase production of the tetradentate Schiff base, its Mn(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes and metal ions in *Bacillus subtilis*, Biotechnology & Biotechnological Equipment. 19 (2): 105–110.

Sakurai, Y., Lee, T.H. and Shiota, H. 1997. On the convenient method for glucosamine estimation in koji. Agricultural and Biological Chemistry. 41(4): 619-624.

Ueda, S., Ueki, T., Ohba, R., Teramoto, Y. and Yoshizawa, K.. 1990. Ethanol fermentation of aromatic red rice wine without cooking studies on red wine brewing (Part I). Journal of Fermentation and Bioengineering. 70(5): 326-328.

Varalakshmi, K.N., Kumudini, B.S., Nandini, B.N., Solomon, J., Suhas, R., Mahesh, B. and Kavitha, A.P. 2009. Production and characterization of α-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. Polish Journal of Microbilogy. 58(1): 29-36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1.1 Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง 200 กรัม
Dextrose 15 กรัม
น้ำกรอง 1 ลิตร

1) ปอกเปลือกมันฝรั่ง และล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม
2) ต้มในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร จนสุกไม่เละจนเกินไป กรองเนื้อมันฝรั่งออก
3) เติม dextrose แล้วคนละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ได้ 1 ลิตร
4) ปิเปตใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ก.1.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDA (Himedia Laboratories, India) 39 กรัม
น้ำกรอง 1 ลิตร

1) ชั่งน้ำหนัก อาหารสำเร็จรูป PDA 39 กรัม
2) เติมน้ำกรองให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
3) นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนอาหารละลายจนหมดเป็นสีเหลืองใส
4) ปิเปตใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 การเตรียมสารละลายไอออนโลหะ

การคำนวณ

เตรียม $NiCl_2$ ความเข้มข้นของ 0.15 เปอร์เซ็นต์ และ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เติมลงรำข้าวสาลี 12 กรัม เติมน้ำ (ที่ใช้เตรียมสารละลายไอออนโลหะ) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร และกล้าเชื้อรา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รวมทั้งหมดเป็น 24 กรัม คำนวณได้จาก

- $NiCl_2$ ความเข้มข้นของ 0.15 เปอร์เซ็นต์

น้ำหนักรวมโคจิทั้งหมดเป็น 24 กรัม แต่ต้องการ $NiCl_2$ ความเข้มข้นของ 0.15 เปอร์เซ็นต์

ใน 100 กรัม ⟶ จะใช้ $NiCl_2$ 0.15 กรัม

มีน้ำหนักรวมทั้งหมด 24 กรัม ⟶ $\frac{24 \times 0.15}{100}$ = 0.036 กรัม

จากนั้นนำมาคำนวณน้ำหนักของ $NiCl_2*6H_2O$ ที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

$NiCl_2*6H_2O$ มีมวลโมเลกุล 237.66 และ $NiCl_2$ มีมวลโมเลกุล 129.66

ถ้า $NiCl_2$ 1 โมล (129.66) ⟶ ใช้สาร 0.036

$NiCl_2*6H_2O$ 1 โมล (237.66) ⟶ ใช้สาร $\frac{237.66 \times 0.036}{129.66}$ = 0.0660 กรัม

- KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์

น้ำหนักรวมโคจิทั้งหมดเป็น 24 กรัม แต่ต้องการ KH_2PO_4 ความเข้มข้นของ 0.15 เปอร์เซ็นต์

ใน 100 กรัม ⟶ จะใช้ KH_2PO_4 0.125 กรัม

มีน้ำหนักรวมทั้งหมด 24 กรัม ⟶ $\frac{24 \times 0.125}{100}$ = 0.0300 กรัม

- การเตรียมไอออนโลหะที่เติมลงในรำข้าวสาลี $NiCl_2$ ความเข้มข้นของ 0.15 เปอร์เซ็นต์ จะชั่ง $NiCl_2$ ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง 0.0660 กรัม และKH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง 0.0300 กรัม ละลายในน้ำดื่มตราสิงห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 การเจือจางเอนไซม์

ใช้สูตร $\frac{1}{\text{การเจือจางที่ต้องการ}} = \frac{\text{ปริมาตรที่ต้องใช้ (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรทั้งหมดที่ต้องการ (มิลลิลิตร)}}$

ตัวอย่าง

การเจือจางเอนไซม์ 100 เท่า (100x)

$$\frac{1}{100} = \frac{\text{ปริมาตรที่ต้องใช้}}{10}$$

ปริมาตรเอนไซม์ที่ต้องใช้ = 0.1 มิลลิลิตร

ปริมาตรน้ำที่ต้องใช้ = 9.9 มิลลิลิตร

ดังนั้น การเตรียมเอนไซม์ 100 เท่า ทำโดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์ (1x) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน (DI) ที่เย็น ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวก ก. 1 การเจือจางสารละลายเอนไซม์

การเจือจางที่ต้องการ	สารละลายที่ใช้ในการเจือจาง	ปริมาตรที่ต้องใช้ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำ (มิลลิลิตร)
5x	1x	2.00	8.00
10x	1x	1.00	9.00
20x	1x	0.50	9.50
50x	1x	0.20	9.80
100x	1x	0.10	9.90
200x	1x	0.05	9.95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (สุมัลลิกา, 2545: Ueda, 1990)

ก.4.1 สารเคมี

1) สารละลายน้ำแป้งเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง soluble starch 1.0 กรัม ละลายในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 4.5 ต้มจนเดือด ทิ้งให้เย็นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2) 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ 250 มิลลิลิตร (ใช้ NaOH 20 กรัม ละลายในน้ำ DI ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร) แล้วชั่ง DNS 10 กรัม ลงในสารละลาย 2โมลาร์ NaOH ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วตั้งบน hot plate เปิด กวน และให้ความร้อนจน DNS เริ่มละลายแล้ว เติมโพแทสเซียมทาเทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 300 g (ถ้าข้นให้เติมน้ำ DI ได้แต่ห้ามเกิน 500 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3) สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 4.5 เตรียมโดยละลายสารแกลเซียล อะซีติก แอซิดความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กับ สารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ผสมกันและปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.5 แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

ก.4.2 วิธีคำนวณกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส 1 หน่วยเท่ากับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น 1 มิลลิกรัมใน 1 นาที ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) $= \dfrac{(Rs - Rs_0) \times b \times c \times d}{Rs_s \times e \times t \times a \times Dry.wt}$

โดยที่

Rs = ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ย่อยละลายในน้ำแป้งเป็น เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Rs_0 = ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่วัดได้เมื่อหยุดกิจกรรมในการย่อยของเอนไซม์ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาการย่อย

Rs_s = ค่าคงที่ที่ได้จากกราฟความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

a = ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในการทดลองใช้ 1 มิลลิลิตร

b = ปริมาตรรวมของสารละลายที่เกิดขึ้นทั้งหมดเท่ากับ 4.5 มิลลิลิตร

c = จำนวนเท่ากับการเจือจางสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

e = ปริมาตรของสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร

d= ปริมาณที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

t= เวลาที่เอนไซม์เกิดปฏิกิริยาในที่นี้คือ 10 นาที

Dry wt.= น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณกิจกรรมของกลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาผลของกิจกรรมกลูโคอะไมเลสจากการสกัดเอนไซม์จากรำข้าวสาลีที่บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อนำเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับ DNS ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร พบว่าเมื่อทำการเจือจางเอนไซม์ 10 เท่า ค่าที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ย่อยละลายในน้ำแป้งเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.587 ส่วนค่าที่วัดได้เมื่อหยุดกิจกรรมเอนไซม์ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาการย่อย มีค่าเท่ากับ 0.0680 ค่าคงที่ที่ได้จากกราฟความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 0.7290 ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์ 50 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งของตัวอย่างโคจิในฟลาสก์ เท่ากับ 8.8262 กรัม

จากสูตร

$$\text{หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(Rs - Rs_0) \times b \times c \times d}{Rs_s \times e \times t \times a \times Dry.wt}$$

แทนค่าในสูตร

$$\text{หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(0.587 - 0.0680) \times 4.5 \times 10 \times 50}{0.7290 \times 1 \times 10 \times 1 \times 8.8262}$$

$$= 18.1488$$

ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (สุมัลลิกา, 2545; Fuwa, 1954)

2.1 สารเคมี

1) สารละลายน้ำแป้งเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง soluble starch 0.5 กรัม ละลายในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 5 ต้มจนเดือด ทิ้งให้เย็นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2) สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 5 เตรียมโดยละลายสารแกลเซียล อะซีติก แอซิดความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กับ สารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ผสมกันและปรับ พีเอช ให้ได้เท่ากับ 5 แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

3) ชั่งสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.5000 กรัมและไอโอดีน 0.0500 กรัม ผสมกันและปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ที่ทำการเจือจางไอโอดีน 100 เท่า ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ที่ผ่านการ autoclave (ควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีคำนวณกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส 1 หน่วย หมายถึงกิจกรรมเอนไซม์ที่ย่อย แป้งได้ 1 มิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

$$\text{หน่วยของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสต่อมิลลิลิตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(B - S) \times dil^{n} \times d}{B \times \text{dry wt.}}$$

โดยที่

B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา ที่ 700 นาโนเมตร

S = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา ที่ 700 นาโนเมตร

dil^{n} = ค่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์

d = ปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

dry wt. = น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

<u>ตัวอย่างการคำนวณกิจกรรมของแอลฟ่าอะไมเลส</u>

จากการศึกษาผลของกิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลส จากการสกัดเอนไซม์จากรำข้าวสาลีที่บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เมื่อนำเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำแป้ง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร พบว่าเมื่อทำการเจือจางเอนไซม์ 50 เท่า ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา มีค่าเท่ากับ 0.3580 ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา มีค่าเท่ากับ 0.1620 ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์ 50 มิลลิลิตร และมีค่าน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง เท่ากับ 8.8262 กรัม

จากสูตร

$$\text{หน่วยของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสต่อมิลลิลิตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(B - S) \times dil^{n} \times d}{B \times \text{dry wt.}}$$

แทนค่า

$$\text{หน่วยของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสต่อมิลลิลิตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(0.3580 - 0.1620) \times 50 \times 50}{0.3580 \times 8.8262}$$

$$= 155.0741$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตราฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นดังตาราง ภาคผนวก ก.7 แล้วนำมาวิเคราะห์ดังนี้

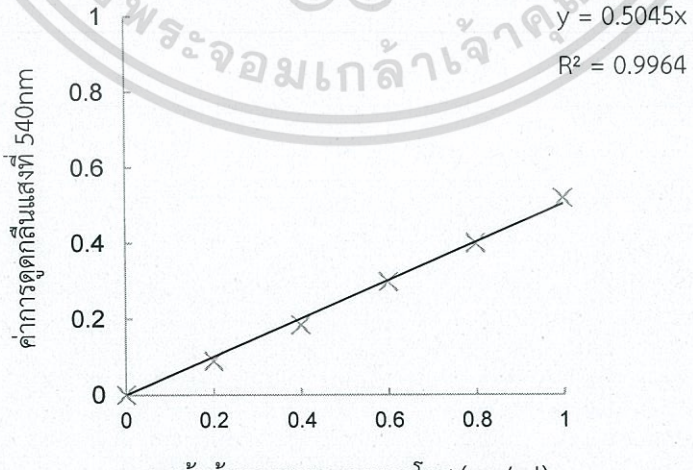
1) ปิเปตมาตรฐานกลูโคสที่ทำการเจือจางดังตาราง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร

2) นำหลอดทดสอบ จากข้อ 1. ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็น (โดยทำการแช่หลอดทดสอบในน้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

3) เติมน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบ จากข้อ 2) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดย blank set 0 ใช้น้ำ DI autoclave (ที่ทำปฏิกิริยา) แทนสารละลายเอนไซม์

ตารางภาคผนวก ก.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกลูโคส (มิลลิลิตร)
0.2	0.8	0.2
0.4	0.6	0.4
0.6	0.4	0.6
0.8	0.2	0.8
1.0	0	1.0



ภาพภาคผนวก ก.7 กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน (สุมัลลิกา, 2545)

การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคซามีนสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

1) เตรียมสารละลายกลูโคซามีนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคซามีน 0.0050 กรัม ละลายในน้ำ Ultrapure 50 มิลลิลิตร (ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร)

2) นำสารละลายกลูโคซามีนมาทำตามความเข้มข้น ตารางภาคผนวก ก.7

3) นำสารละลายมาตรฐานกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทำการวิเคราะห์กลูโคซามีนตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.3.4.2.5

ตารางภาคผนวก ข.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน

ความเข้มข้นของกลูโคซามีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำ Ultrapure (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน (มิลลิลิตร)
10	0.9	0.1
20	0.8	0.2
30	0.7	0.3
40	0.6	0.4
50	0.5	0.5
60	0.4	0.6
70	0.3	0.7
80	0.2	0.8
90	0.1	0.9
100	0	1.0

ที่มา : สุมัลลิกา (2545)

วิธีการคำนวณความเข้มข้นของกลูโคซามีน

- ความเข้มข้นของกลูโคซามีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณจาก

  จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

  โดย C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่มีอยู่ คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

  C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

  V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่มีอยู่ที่ต้องใช้ คือ ?

  V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ คือ 1 มิลลิลิตร

  แทนค่า $V_1 = \frac{(100 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}) \times (1 \text{ มิลลิลิตร})}{(100 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร})} = 1$ มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น หากต้องการสารละลายกลูโคซามีนที่ความความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายกลูโคซามีนที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- ความเข้มข้นของกลูโคซามีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณจาก

  จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

  โดย C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่มีอยู่ คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

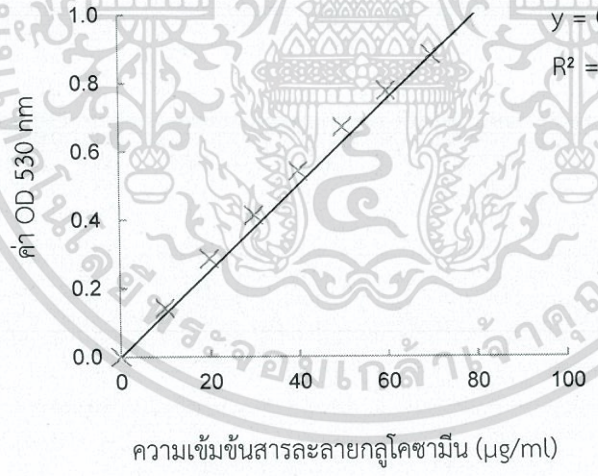
  C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ คือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

  V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่มีอยู่ที่ต้องใช้ คือ ?

  V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ คือ 1 มิลลิลิตร

  แทนค่า $V_1 = \frac{(10 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}) \times (1 \text{ มิลลิลิตร})}{(100 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร})} = 0.1$ มิลลิลิตร

ดังนั้น หากต้องการสารละลายกลูโคซามีนที่ความความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายกลูโคซามีนที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับน้ำ Ultrapure ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร



ภาพภาคผนวก ก.7 กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณกลูโคซามีน

จากการศึกษาผลของการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. โดยวัดการเจริญของเชื้อราจากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนจากโคจิข้าวสาลี บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 0.361 น้ำหนักแห้งของตัวอย่างโคจิที่ผ่านการอบ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ 0.5005 กรัม และค่าความชันของกราฟมีค่าเท่ากับ 0.0125

จากสูตร

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีน (หน่วย µg/100ml)} = \frac{\text{ค่า OD ที่ 530 nm}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}} \times 100$$

แทนค่า

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีน} = \frac{0.361}{0.0125} \times 100 = 2888.0000 \text{ µg/100ml}$$

เมื่อน้ำหนักโคจิแห้งมีค่า 0.5005 กรัม ดังนั้น

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีน} = \frac{2888.0000}{0.5005} = 5770.2298 \text{ µg/g dry wt.}$$

$$= \frac{5770.2298}{1000} = 5.7702 \text{ mg/g}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการทดลอง

ข.1 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาผลของการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิโดยศึกษาผลของการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีแบบที่ 1 และ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ดังตารางภาคผนวกที่ ข.1

ตารางภาคผนวก ข.1 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่ที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 และ การฆ่าเชื้อแบบที่ 2 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	แอลฟ่า-อะไมเลส (U/Dry wt.)		กลูโคอะไมเลส (U/Dry wt.)	
	การฆ่าเชื้อแบบที่ 1	การฆ่าเชื้อแบบที่ 2	การฆ่าเชื้อแบบที่ 1	การฆ่าเชื้อแบบที่ 2
0	0.3953	1.5034	0.2577	0.1767
1	25.7630	3.7697	3.1580	0.0348
2	224.6244	88.2382	22.9140	6.0990
3	269.9032	102.2661	23.9923	13.0807
4	105.1937	86.8529	14.2818	13.6518
5	52.4556	73.5401	13.6611	14.3234
6	34.1311	58.6833	7.4841	10.5516
7	19.7030	36.1473	7.3037	14.2999

หมายเหตุ : : การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 มาจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 2 ซ้ำ และการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 มาจากผลการทดลอง 1 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 ผลของการเตรียมวัตถุดิบต่อปริมาณกลูโคซามีน

จากการศึกษาผลของการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิโดยศึกษาผลของการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีแบบที่ 1 และ2 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลของการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ดังตารางภาคผนวกที่ ข.2

ตารางภาคผนวก ข.2 ปริมาณกลูโคซามีนในโคจิรำข้าวสาลีที่เตรียมจากการฆ่าเชื้อแบบที่ 1 และ การฆ่าเชื้อแบบที่ 2 ทำเลี้ยงเชื้อรา Amylomyces spp. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัม)					
	การฆ่าเชื้อแบบที่ 1			การฆ่าเชื้อแบบที่ 2		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
0	5.7702	4.5426	5.1564	3.5145	3.0989	3.3067
1	4.8586	5.0540	5.5201	5.6702	4.0509	4.8606
2	7.1654	5.5477	6.3566	6.2500	4.4567	5.3534
3	5.0545	8.9268	7.4686	6.7280	4.1764	5.4522
4	7.2335	7.0504	7.1420	5.5200	4.8980	5.2090
5	5.5810	5.5172	5.5491	4.7563	5.3813	5.0688
6	5.8240	5.0790	5.4515	5.0236	4.0720	4.5478
7	4.8941	5.9690	5.4316	4.8787	4.0085	4.4436

หมายเหตุ : : การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 มาจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 2 ซ้ำ และการฆ่าเชื้อแบบที่ 2 มาจากผลการทดลอง 1 ซ้ำ

ข.3 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาการเติมโลหะทั้ง 2 ชนิด คือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และKH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ลงในโคจิรำข้าวสาลี บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ดังตารางภาคผนวกที่ ข.3 และ ข.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข.3 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ไม่เติมโลหะ) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	แอลฟ่าอะไมเลส (U/Dry wt.)		
	Control	$NiCl_2$	KH_2PO_4
0	0.3953±0.9594	1.6447±0.3912	7.0312±1.8775
1	25.7630±1.4878	40.8402±5.5668	39.7113±0.3243
2	224.6244±14.2999	159.6153±7.1912	171.1937±11.8933
3	269.9032±26.1525	165.9744±21.9524	309.6702±5.6187
4	105.1937±3.4569	259.6124±3.2690	166.4532±18.0109
5	52.4556±12.7113	83.6474±0.0000	76.7476±0.6539
6	34.1311±0.0000	73.1337±0.0000	54.1346±0.0000
7	19.7030±0.0000	64.1557±0.0000	43.9550±0.0000

หมายเหตุ : การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 มาจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 2 ซ้ำ และการฆ่าเชื้อแบบที่ 2มาจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวก ข.4 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ไม่เติมโลหะ) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	กลูโคอะไมเลส (U/Dry wt.)		
	Control	$NiCl_2$	KH_2PO_4
0	0.2577±0.2769	0.0607±0.1390	0.4734±0.0296
1	3.1580±0.5586	1.7848±1.0359	11.7341±0.1825
2	22.9140±0.4513	12.4591±4.8165	27.1486±0.2236
3	23.9923±0.6241	15.1569±1.0532	30.6342±1.0533
4	14.2818±1.7821	24.7724±0.1607	25.5549±0.8738
5	13.6611±1.2915	13.3931±0.0000	19.1151±2.0521
6	7.4841±0.0000	11.2843±0.0000	12.7641±0.0000
7	7.3037±0.0000	7.8212±0.0000	9.4136±0.0000

หมายเหตุ : การฆ่าเชื้อแบบที่ 1 มาจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 2 ซ้ำ และการฆ่าเชื้อแบบที่ 2มาจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.5 ผลของไอออนโลหะนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อปริมาณกลูโคซามีน

จากการศึกษาผลของการเตรียมวัตถุดิบในการทำโคจิโดยศึกษาผลของการฆ่าเชื้อรำข้าวสาลีแบบที่ 1 และ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลของการเจริญของเชื้อราในรูปกลูโคซามีน ดังตารางภาคผนวกที่ ข.5

ตารางภาคผนวก ข.5 ปริมาณกลูโคซามีนในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะคือ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ไม่เติมโลหะ) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัม)								
	Control			$NiCl_2$			KH_2PO_4		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
0	5.7702	4.5426	5.1564	2.9099	2.3017	2.6058	6.4621	5.5090	5.9856
1	4.8586	5.0540	5.5201	3.3123	3.6835	3.4979	6.8129	6.9324	6.8727
2	7.1654	5.5477	6.3566	5.5477	5.2758	5.4118	6.8939	6.9089	6.9014
3	5.0545	8.9268	7.4686	5.5282	5.7470	5.6376	8.5711	8.0152	8.2932
4	7.2335	7.0504	7.1420	7.8107	7.6545	7.7326	7.0976	7.2663	7.1820
5	5.5810	5.5172	5.5491	6.4222	6.7686	6.5954	7.7906	5.9939	6.8923
6	5.8240	5.0790	5.4515	7.1536	5.7860	6.4698	7.4415	6.1883	6.8149
7	4.8941	5.9690	5.4316	5.8147	5.7029	5.7588	6.1709	6.4661	6.3185

หมายเหตุ : ปริมาณกลูโคซามีนมาจากการทดลอง 2 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข.6 ปริมาณความชื้น ในโคจิรำข้าวสาลีที่เติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15%, KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วัน	ปริมาณความชื้น(%)								
	Control			$NiCl_2$			KH_2PO_4		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
0	54.148	54.622	51.928	52.711	52.652	51.718	52.279	53.512	52.792
1	54.839	54.628	52.096	52.910	52.912	54.248	53.139	55.886	55.962
2	56.103	56.355	57.211	57.127	57.526	58.219	61.077	60.825	56.350
3	58.002	56.888	57.848	59.962	59.037	58.167	62.159	61.848	57.376
4	57.440	57.706	58.876	58.940	59.765	59.163	61.138	60.447	59.119
5	58.350	57.986	58.055	62.277	61.333	58.978	60.038	60.251	59.003
6	62.530	57.194	56.766	58.708	58.958	57.353	58.640	58.105	60.719
7	57.490	57.444	57.554	57.742	57.443	56.087	58.324	57.984	57.864

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวก ข.7 วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% , KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วัน	วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w)								
	Control			$NiCl_2$			KH_2PO_4		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
0	1.000	0.999	0.997	0.997	1.001	0.995	1.001	0.997	0.999
1	0.998	0.994	0.997	0.996	0.996	0.998	0.996	0.996	0.998
2	0.995	0.992	0.992	0.998	0.996	0.997	0.998	0.998	0.996
3	0.999	0.990	0.991	0.997	0.996	0.997	0.996	0.998	0.997
4	0.997	0.989	0.989	0.997	0.996	0.996	0.994	0.994	0.995
5	0.996	0.991	0.990	0.996	0.996	0.995	0.993	0.994	0.993
6	0.994	0.992	0.991	0.994	0.994	0.995	0.991	0.993	0.993
7	0.991	0.990	0.991	0.989	0.992	0.993	0.993	0.993	0.991

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข.7 ความเป็นกรดด่าง ในโคจิรำข้าวสาลีที่มีการเติมโลหะ $NiCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15%, KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% และชุดควบคุม (ไม่เติมโลหะ) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วัน	ความเป็นกรดด่าง								
	Control			$NiCl_2$			KH_2PO_4		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
0	5.92	5.15	4.98	5.70	5.66	5.67	5.43	5.75	5.78
1	4.91	5.55	5.45	6.23	5.43	5.45	5.56	5.88	5.85
2	6.26	5.91	6.08	6.15	5.86	5.88	6.24	5.76	5.77
3	7.15	6.79	6.89	6.81	6.57	6.58	7.01	6.95	6.99
4	7.73	7.04	7.13	6.87	6.75	6.75	7.41	7.07	7.15
5	7.49	7.25	7.22	7.13	7.08	7.07	7.40	7.17	7.19
6	7.67	7.78	7.79	7.29	7.60	7.60	7.52	7.47	7.47
7	7.65	7.94	7.94	7.39	7.55	7.57	7.21	7.82	7.81

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ภาพการทดลอง

ก ข

ภาพภาคผนวก ค.1 กล้าเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA (ก) และ PDB(ข)

ก ข

ภาพภาคผนวก ค.2 ลักษณะโคจิที่ถูกสกัดด้วยน้ำบนเครื่องเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา1 ชั่วโมง (ก) และสารสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ได้จากการสกัดแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพภาคผนวก ค.3 การเลี้ยงโคจิรำข้าวสาลี ในตู้บ่มอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววิลาวัลย์ ใจมะเริง
วัน เดือน ปี เกิด	19 มิถุนายน 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนเสาไห้ “วิมลวิทยานุกูล”
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
	หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (IFRPD)
และผลงานวิจัย	ผลของนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิต
	โคจิจากรำข้าวสาลี

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววรรณิสา อารมณ์
วัน เดือน ปี เกิด	31 ตุลาคม 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนชัยนาทพิทยาคม
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
	หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (IFRPD)
และผลงานวิจัย	ผลของนิกเกิลคลอไรด์และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิต
	โคจิจากรำข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้