ผลของความชื้นและไอออนโลหะบางชนิดในการผลิตโคจิจากรำข้าวเจ้า

Effect of moisture content and some metal ions on polished rice bran koji production

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของความชื้นและไอออนโลหะบางชนิดในการผลิตโคจิจากรำข้าวเจ้า

Effect of moisture content and some metal ions on polished rice bran koji production

T148852

คณิศร รอดการทุกข์
สุธินันท์ สมศรี

b.12876616
.1.....

สพม.....
เลขทะเบียน 148852
วัน.เดือน.ปี 30 พ.ย. 2560

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของความชื้นและไอออนโลหะบางชนิดในการผลิตโคจิจากรำข้าวเจ้า

Effect of moisture content and some metal ions on polished rice bran koji production

จัดทำโดย

คณิศร รอดการทุกข์ รหัสนักศึกษา 55080077

สุธินันท์ สมศรี รหัสนักศึกษา 55080135

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 14 / กค. / 59

(ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อหัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของความชื้นและไอออนโลหะบางชนิดในการผลิตโคจิจากรำข้าวเจ้า
ชื่อนักศึกษา	คณิศร รอดการทุกข์ รหัสนักศึกษา 55080077
	สุธินันท์ สมศรี รหัสนักศึกษา 55080135
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้าที่ผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. และผลของไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) โดยศึกษาความชื้นจากการเติมน้ำเริ่มต้นที่สภาวะ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร พบว่าการเติมน้ำ 7.5 และ10 มิลลิลิตร ค่าความชื้นเฉลี่ยอยู่ในช่วงที่ 40 ถึง 45 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงกว่าการเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร การเติมน้ำที่ 7.5 มิลลิลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุดคือ 14.77 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกิจกรรมกลูโคอะไมเลสคือ 3.74 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อได้สภาวะความชื้นที่ดีที่สุดแล้ว จึงทำการศึกษาผลของไอออนโลหะต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส โดยการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 2 มีค่าเท่ากับ 29.21 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกิจกรรมกลูโคอะไมเลสคือ 7.56 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 26.98 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกิจกรรมกลูโคอะไมเลส 8.84 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยแป้งสำหรับผลิตไวน์ข้าว จึงคัดเลือกแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นโลหะที่ดีที่สุดในการผลิตโคจิรำข้าวจ้าว

คำสำคัญ: โคจิรำข้าวเจ้า แอลฟ่าอะไมเลส กลูโคอะไมเลส *Amylomyces* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title Effect of moisture content and some metal ions on polished rice bran koji production

Student name Khanisorn Rodkarntuk Student ID 55080077

Suthinan Somsri Student ID 55080135

Program Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology

Year 2016

Advisor Assist.Prof. Dr. Aphacha Jindaprasert

ABSTRACT

The aim of this project is to study moisture content of polished rice bran koji which effect to growth and enzyme activities of *Amylomyces* spp. and effect of metal ions magnesium sulfate ($MgSO_4$) and potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4). Firstly, study effect of moisture content which different water content addition 5, 7.5 and 10 ml. The result showed 7.5 and 10 ml were suitable of moisture in polished rice bran koji which range of moisture was 40-50% and produced higher enzyme activities than 5 ml. 7.5 ml could produce the highest alpha-amylase was 14.77 unit/gram dry weight and glucoamylase activity was 3.74 unit/gram dry weight. So the best condition of water content to produce prolished rice bran koji was 7.5 ml. Addition of magnesium sulfate ($MgSO_4$) at 0.025% and potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) at 0.125% were studied oneffect of metal ions and cultured at 32 ^{o}C for 7 days. The results found that magnesium sulfate 0.025% on day 2 produced the highest alpha-amylase activity was 29.21 unit/gram dry weight and glucoamylase activity was 7.56 unit/gram dry weight.potassium dihydrogen phosphate 0.125% on day 2 produced alpha-amylase activity 26.98 unit/gram dry weight and glucoamylase activity 8.84 unit/gram dry weight. Moreover, in this study emphasize alpha-amylase activity to digest starch for rice wine production. SoMagnesium sulfate is the best metal ion for polished rice bran koji production.

Keywords: polished rice bran koji, glucoamylase, alpha-amylase, *Amylomyces* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ตามเป้าหมายเพราะได้รับความร่วมมือช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าอย่างยิ่ง จากผู้มีพระคุณหลายท่าน อาทิ

คุณพ่อ คุณแม่ ที่สนับสนุนปัจจัยในการส่งเสริมการเรียน คอยให้กำลังใจมาโดยตลอด

ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโดยเฉพาะของปัญหาพิเศษนี้โดยเฉพาะ คอยแนะนำการทำงาน ช่วยแก้ปัญหาในด้านต่างๆ รวมถึงกำลังใจและอาหารที่สนับสนุนลูกศิษย์เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ศาสตราจารย์วราวุฒิ ครูส่ง เป็นที่ปรึกษากิตติมศักดิ์ คอยให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการทำงานและช่วยเหลืออุปกรณ์ในงานวิจัยมากมาย

และสิ่งสำคัญต้องขอขอบคุณเพื่อนๆ ในกลุ่ม (ชมพูนุท,ชมพูนุช,เขมิกา,ภัทราภรณ์,สมิทธิ์ชญา, วริศร และจีรภัทร) ที่คอยซื้ออาหารและน้ำ รอจนกระทั่งปฏิบัติการเสร็จไม่ว่าจะดึกแค่ไหนก็ตาม และยังคอยให้กำลังใจเสมอมา

คณิศร รอดการทุกข์
สุธินันท์ สมศรี
6 พฤษภาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทาเนโคจิ	3
2.2 โคจิ	3
2.3 เอนไซม์ที่พบในโคจิ	7
2.4 งายวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	12
3.2 อุปกรณ์	12
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	
3.3.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces* spp.	13
3.3.2 การ sub culture เชื้อรา	14
3.3.3 การศึกษาผลของความชื้นในโคจิรำข้าวเจ้า	14
3.3.4 การศึกษาผลของไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)และโพแทนเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)ในการผลิตโคจิรำข้าวเจ้า	14
3.3.5 การตรวจวิเคราะห์	
3.3.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส	15
3.3.5.2 การวิเคราะห์ทางเคมี	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 การเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	21
4.2 ผลของความชื้นต่อการเจริญของเชื้อรา ค่าทางเคมีและกิจกรรมของเอนไซม์ในโคจิรำข้าวเจ้า	
4.2.1 ผลของความชื้นต่อการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2 ผลของความชื้นต่อพีเอช วอเตอร์แอคทิวีตี้(Aw)ของโคจิรำข้าวเจ้า 25

4.2.3 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้า 25

4.3 ผลของไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญของเชื้อรา กิจกรรมเอนไซม์ และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคจิรำข้าวเจ้า

4.3.1 ผลของไอออนโลหะต่อการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า 27

4.3.2 ผลของไอออนโลหะต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า 31

4.3.3 ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า 33

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล 36

5.2 ข้อเสนอแนะ 37

บรรณานุกรม 38

ภาคผนวก 40

ภาคผนวก ก 41

ภาคผนวก ข 43

ภาคผนวก ค 48

ประวัติผู้เขียน 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เชื้อราที่ใช้ผลิตทาเนโคจิสำหรับอาหารหมักชนิดต่างๆ	5
2.2 เปรียบเทียบแอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิด ต่อหน่วยหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น	9
4.1 ความชื้นต่อพีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ และความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้า บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 และ 6 วัน	24
4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา Amylomyces spp. บนโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไอออนโลหะ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	28
4.3 พีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ และความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะบ่มที่อุณหภูมิ32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ผลผลิตการย่อยสลายแป้งด้วยอะไมเลสทั้ง 3 ชนิด	9
3.1 สีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยแป้งของเอนไซม์	16
3.2 สารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน	20
4.1 การเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน (ก) และการ subculture เชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหาร PDA จำนวนมาก (ข)	21
4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้แก่ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน	23
4.3 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกันที่ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเป็นเวลา 3 วัน	26
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกันที่ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเป็นเวลา 6 วัน	26
4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะ แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไอออนโลหะ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	30
4.6 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	34
4.7 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาปัญหาพิเศษ

โคจิ เป็นการเลี้ยงเชื้อราบนวัตถุดิบประเภทธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวฟ่าง เป็นต้น เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์สำหรับการผลิตอาหารของชาวตะวันออกและเปรียบเทียบได้กับการผลิตข้าวมอลต์เพื่อใช้ในการผลิตเบียร์และสุราในประเทศตะวันตก จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการจัดเตรียมโคจิคือ กลุ่ม *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus oryzae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากทาเนโคจิเหล้าสาเกและส่วนใหญ่จะเป็น *A. oryzae* โคจิที่ผลิตมาส่วนใหญ่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทสาเก (สุราแช่) สุราขาว ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น เอนไซม์ที่พบในโคจิ ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ย่อยแป้ง ได้แก่ แอลฟ่าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอนไซม์โปรติเอส สำหรับปริมาณและชนิดของเอนไซม์แตกต่างกันไปตามประเภทโคจิและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโคจิ รวมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ อุณหภูมิ และความชื้นเริ่มต้นของโคจิ ซึ่งความชื้นในโคจิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

สุมัลลิกา โมรากุล (2545)พบว่า ความชื้นมีผลต่อการเจริญเติบโของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า พบว่าความชื้นส่งผลให้เชื้อราเจริญได้ดีในวันที่ 5 โดยความชื้นโคจิที่สูงทำให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่าความชื้นโคจิที่ต่ำ โดยความชื้นที่เหมาะสมอยู่ที่ 38.63% ทำให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงถึง 13.10 มิลลิกรัมต่อกรัม

การผลิตเอนไซม์ของเชื้อราในโคจิ หากต้องการได้กิจกรรมเอนไซม์ในปริมาณที่สูงจะต้องมีการเติมสารบางชนิดในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดี และส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง โดยนภา โล่ทอง (2535) กล่าวว่า การเติมไอออนโลหะ คือ Mg, NH_4, CO_3, SO_4, PO_4, Ce และ NO_3 ลงไปในข้าว มีผลทำให้เชื้อราเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ *Aspergillus* spp. ได้ดีขึ้น โดยทำการทดลองเปรียบเทียบการงอกสปอร์ในทาเนโคจิ ที่เก็บไว้ในเป็นระยะเวลา 6 เดือนและ 1 ปี พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในทาเนโคจิที่เก็บไว้โดยเติมไอออนโลหะต่างๆ พบว่ามีสปอร์ที่งอกและเจริญได้ถึง 90 และ 80% ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเก็บทาเนโคจิที่ผลิตโดยไม่เติมไอออนโลหะเป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณเชื้อจะลดลงถึง 50% จากการทดลองนี้พบว่า ฟอสเฟต (PO_4) ให้ผลดีที่สุด

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการทดลองศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า คือ ความชื้นของโคจิเริ่มต้น และการเติมไอออนโลหะสองชนิด ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ต่อการเจริญของเชื้อรา ปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส อีกทั้งยังมีการศึกษาเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมีที่เกิดขึ้น ได้แก่ พีเอช (pH) ความชื้น และวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity) เพื่อนำมาใช้ในการผลิตโคจิรำข้าวเจ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

(1) เพื่อศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในการผลิตโคจิรำข้าวเจ้า

(2) เพื่อศึกษาผลของไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตและนิกเกิลคลอไรด์ต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในโคจิรำข้าวเจ้า

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

(1) ทราบความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในการผลิตโคจิรำข้าวเจ้า

(2) ทราบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ในโคจิรำข้าวเจ้าที่มีการเติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตและนิกเกิลคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทาเนโคจิ (นภา โล่ทอง, 2535)

เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อที่มีมาแต่โบราณอีกรูปแบบหนึ่ง ได้แก่ การผลิต “ทาเนโคจิ” ในประเทศญี่ปุ่น คำว่า “โคจิ” มาจากอักขระจีนซึ่งอ่านออกเสียงตามภาษาจีนว่า “ชุ” ภาษาเกาหลีอ่านว่า “กุ๊ก” และอ่านออกเสียงตามภาษาญี่ปุ่นว่า “โคจิ” หมายถึงเมล็ดธัญพืชที่มีเชื้อราปกคลุม ส่วนคำว่า “ทาเน” นั้น ในภาษาญี่ปุ่นแปลว่ากล้า ดังนั้น “ทาเนโคจิ” จึงได้แก่กล้าเชื้อสำหรับผลิตโคจิ ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสปอร์เชื้อราผสมกับข้าวซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยง

การผลิตอาหารหมักและเครื่องดื่มประเภทเมรัยหลายชนิดของญี่ปุ่น เช่น ซีอิ๊ว มิโซ และเหล้าสาเก กระบวนการหมักจะประกอบด้วยสองขั้นตอน ขั้นตอนแรก ได้แก่ การผลิตโคจิซึ่งเป็นการหมักแบบแห้ง (solid substrate fermentation) โดยเพาะเชื้อราให้เจริญบนเมล็ดธัญพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งจะต่างกันไปตามชนิดของผลิตภัณฑ์ ในขณะที่มีการเจริญเชื้อราจะสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติย่อยวัตถุดิบ (digestive enzyme) ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้ในกระบวนการหมัก

การผลิตโคจิเป็นเทคโนโลยีที่มีกำเนิดในประเทศจีน โดยได้พัฒนาเทคโนโลยีขึ้นมาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน นอกเหนือจากการผลิตอาหารหมักแล้ว ญี่ปุ่นได้ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักอีกหลายชนิดเช่นการผลิตเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ และทอกซิน โดยได้พัฒนาระบบการผลิตมาเป็นเทคโนโลยีขั้นสูง ใช้อุปกรณ์ทันสมัยที่ประกอบด้วยเครื่องควบคุมอัตโนมัติทุกขั้นตอน ดังนั้นในวงการเทคโนโลยีชีวภาพ จึงใช้คำว่า “โคจิ” กันอย่างกว้างขวาง โดยให้ความหมายเดียวกับคำว่า “solid substrate fermentation”

ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีการผลิตโคจิจะได้รับมาจากจีน แต่ในเรื่องกล้าเชื้อที่ใช้นั้น ญี่ปุ่นได้พัฒนากรรมวิธีการผลิตขึ้นเองตั้งแต่ศตวรรษที่ 14 อาจกล่าวได้ว่า ญี่ปุ่นเป็นเพียงประเทศเดียวในภูมิภาคเอเชียที่ไม่ใช้ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อในการหมักอาหาร การผลิตกล้าเชื้อในรูปแบบทาเนโคจินี้ นอกจากญี่ปุ่นแล้วเกาหลีก็เป็นอีกประเทศหนึ่งที่มีกล้าเชื้อในลักษณะคล้ายคลึงกันเรียกว่า “จองกุ๊ก”

2.2 โคจิ

2.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมโคจิ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2557 และ Agro Industry, Mae Fah Luang Univesity, 2558)

ในการผลิตโคจิโดยทั่วไปมักจะใช้วัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี เป็นต้น

ข้าวเหนียว มีลักษณะเนื้อของเมล็ดข้าวสารสีขุ่น เมื่อนำมานึ่งให้สุก ข้าวจะจับตัวกันติดแน่นเหนียวติดมือ จึงเรียกว่า ข้าวเหนียว เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเมล็ดข้าว ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทสตาร์ช (starch) จะประกอบด้วย อะไมโลแพกทิน (amylopectin) เกือบทั้งหมด (99-100%) ที่ให้ลักษณะเหนียวแก่ข้าวเหนียว

ข้าวเจ้า มีลักษณะเนื้อของเมล็ดข้าวสารใส เมื่อหุงหรือนึ่งจนสุก ข้าวสุกจะไม่เกาะติดกันจะร่วนสีขาวขุ่น เนื่องจากองค์ปะกอบทางเคมีของเนื้อเมล็ดข้าวที่เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทสตาร์ช (starch) ซึ่งประกอบด้วยอะไมโลแพกทิน (amylopectin) และอะไมโลส (amylose) เมื่อรวมกันแล้วคิดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันจะให้ลักษณะเนื้อข้าวสุก มีความร่วน แข็ง หรือนุ่มต่างกัน โดยถ้ามีปริมาณอะไมโลสต่ำ (เช่น 7-10%) ข้าวสุกจะนุ่ม มีความเหนียว แต่ถ้ามีปริมาณอะไมโลสสูงขึ้น (เช่น 33%) ก็จะมีความร่วน และแข็งเพิ่มขึ้น

รำข้าวเจ้า มีองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีที่สำคัญ โดยพบว่าในรำข้าวจะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก (25-43%) รองลงมาคือ ไขมัน (13-20%) โปรตีน (12-14) เถ้า (12%) และกากใย (8-14%) และเมื่อสกัดไขมันออกแล้วองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีมากเป็นอันดับที่ 2 ในรำข้าวรองจากคาร์โบไฮเดรตคือ โปรตีน (13-18%)

2.2.2 การเตรียมโคจิ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

โคจิเป็นหัวเชื้อที่ผลิตโดยชาวญี่ปุ่น ทำเป็น ทาเน-โคจิ (Tane-koji) ก่อน ด้วยการทำให้เชื้อราเจริญบนข้าวนึ่งที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 หรือ 6 วัน จนมีสปอร์เกิดขึ้นมากเพียงพอ จึงนำไปทำการผลิตโคจิ โดยใช้ ทาเนโคจิ 60-100 กรัม ต่อข้าวนึ่งที่เย็นแล้วจำนวน 100 กิโลกรัมเลี้ยงให้เจริญโดยการกองบนพื้นห้อง อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอุณหภูมิภายในกองข้าวประมาณ 30-31 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง สปอร์จะเจริญเป็นเชื้อราที่มีสายใย (mycelium) สม่ำเสมอ โดยการควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และการผสมข้าวกับเชื้อราให้สม่ำเสมอเป็นระยะ จนเกิดการสะสมเอนไซม์เต็มที่เหมาะสมในการบ่อยสตาร์ช เพื่อใช้ในการหมักต่อไปได้ดี นอกจากเอนไซม์แล้ว โคจิยังมีวิตามิน และแร่ธาตุซึ่งจะเป็นอาหารของยีสต์ ทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดีด้วย (Wang, 1980)

2.2.3 สายพันธุ์เชื้อราในการผลิตทาเนโคจิ (นภา โล่ทอง, 2535)

นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน ได้แก่ *O. Korchelf* และ *H. Ahrburg* ได้แยกเชื้อจากทาเนโคจิเหล้าสาเก พบจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการเตรียมโคจิได้แก่เชื้อรา *Eurotium oryzae* แต่จากการจำแนกชนิดของเชื้อราภายหลังพบว่าเชื้อดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus flavus oryzae* ซึ่งในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อราที่ได้จากทาเนโคจิเหล้าสาเกโดยทั่วไปจะเป็นสายพันธุ์ *A. oryzae* ดังนั้นจากข้อมูลการศึกษาทาเนโคจิเหล้าสาเกได้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ญี่ปุ่นศึกษาจุลินทรีย์ในทาเนโคจิชนิดอื่นๆในระยะต่อมา ซึ่งผลที่ได้มิใช่เพียงแต่จะทราบว่า เชื้อใดมีบทบาทที่สำคัญในการผลิตอาหารหมักแต่ละชนิดเท่านั้น การศึกษายังได้ครอบคลุมไปถึงการคัดสายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ให้เหมาะกับกรรมวิธีการผลิตโคจิ ซึ่งได้มีการพัฒนาไปพร้อมกัน ส่วนการผลิตทาเนโคจินั้นได้เปลี่ยนมาใช้เชื้อบริสุทธิ์แทนการต่อเชื้อที่เคยปฏิบัติมาแต่เดิม ปัจจุบันญี่ปุ่นใช้เชื้อราหลายชนิด (species) ด้วยกันในการผลิตทาเนโคจิ โดยขึ้นกับประเภทของผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.1 เชื้อราที่ใช้ผลิตทาเนโคจิสำหรับอาหารหมักชนิดต่างๆ

ผลิตภัณฑ์	เชื้อรา
ซี่อิ๊ว (shoyu)	*A. oryzae, A. sojae, A. tamarii*
มิโซ	*A. oryzae, A. sojae*
อามาซาเกะ (ข้าวหมาก)	*A. oryzae*
โชชิว (สุราจากข้าว)	*A. awamori, A. kawachii*
อาวามอริ (สุราจากข้าว)	*A. awamori*
เหล้าสาเก	*A. oryzae*
มิริน	*A. oryzae*

ที่มา : นภา โล่ห์ทอง (2535)

จะเห็นว่าการใช้เชื้อราหมักอาหารของญี่ปุ่น ไม่ว่าจะเป็นการหมักเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล หรือเพื่อย่อยสลายโปรตีน จะใช้เฉพาะเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ซึ่งต่างจากประเทศอื่นๆในเอเชีย ที่ส่วนใหญ่ใช้ *Rhyzopus* spp. ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล

เชื้อรา *Aspergillus* spp. แต่ละชนิดที่ใช้ในการผลิตทาเนโคจิ ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด ดังตัวอย่างต่อไปนี้

(1) เชื้อราโคจิเหล้าสาเก

เชื้อ *A. oryzae* ที่ใช้ผลิตโคจิข้าว สำหรับหมักเหล้าสาเกมีคุณสมบัติทั่วๆไปในการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์สามารถเปลี่ยนลูซีนในข้าวขณะหมักโคจิให้เป็นกรดลูซินิกเพื่อเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของเอทธิลลูซิเนท ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมเฉพาะของเหล้าสาเก เส้นใยประกอบด้วยสารที่ให้ยีสต์ทนและผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง เหล้าสาเกเป็นเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์อยู่สูงถึง 20-22% ซึ่งนับว่าสูงมากเมื่อเทียบกับเครื่องดื่มประเภทเดียวกัน ที่ได้จากการหมักโดยไม่ได้ผ่านการกลั่น การหมักในสภาวะปกติโดยทั่วๆไปนั้น เมื่อแอลกอฮอล์สะสมสูงขึ้นถึง 15-18% ยีสต์จะหยุดกิจกรรมการหมัก หรืออาจตายได้ การที่ยีสต์สารถผลิตและทนต่อระดับแอลกอฮอล์สูงกว่าปกติในการหมักเหล้าสาเกนั้น นอกจากจะต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์สูง และการหมักดำเนินอยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำแล้วยังเป็นผลจากสารพวก โปรติโอไลปิด ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเส้นใยของเชื้อราและเปลือกนอกของเมล็ดข้าวในโคจิอีกด้วย โปรติโอไลปิดที่พบเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่โปรติโอไลปิดและอัลบูมิน หรือฟอสฟอไลปิดและเมทธิลเซลลูโลส ซึ่งที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ฟอสฟอไทดิลโคลีน

(2) เชื้อราโคจิซีอิ๊ว

สายพันธุ์ *A. oryzae* และ *A. sojae* ที่ใช้ในการผลิตทาเนโคจิสำหรับการหมักซีอิ๊วนั้น คุณสมบัติที่สำคัญจะแตกต่างจากสายพันธุ์สำหรับหมักเครื่องดื่มมึนเมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

protease)และโปรตีเอสที่มี pH ต่ำประมาณ 3 (acid protease) ในบรรดาเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ โปรตีเอสที่ย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่ pH 9-10 มีบทบาทในการหมักซีอิ๊วมากที่สุด ดังนั้นเชื้อราที่คัดเลือกเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อจึงควรผลิตเอนไซม์นี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตคาร์บอกซิเปบติเดสและอะมิโนเปบติเดส เพื่อย่อยสลายเปปไตด์ให้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งในบรรดาเปบติเดสที่เชื้อราซีอิ๊วผลิตนั้น ลูซีนอะมิโนเปบติเดสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ

ประสิทธิภาพการผลิตกลูตามีเนส เป็นคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่ง โดยที่เอนไซม์นี้จะมีผลทำให้กลูตามีนเปลี่ยนเป็นกรดกลูตามิกซึ่งเป็นสารชูรสในซีอิ๊ว

มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อพืช (macerating enzyme) เช่น เซลลูเลสและเพคติเนส ซึ่งมีบทบาทเสริมการทำงานของโปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน นอกจากนั้นเอนไซม์เหล่านี้ยังมีผลทำให้น้ำหมักมีความหนืดลดลง จึงง่ายต่อการกรองน้ำซีอิ๊ว

สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีพอสมควร เพื่อย่อยแป้งเป็นน้ำตาล ซึ่งยีสต์และแบคทีเรียแลคติก จะใช้เป็นสับสเตรทในการสร้างสารที่ให้กลิ่นรสของซีอิ๊ว การที่เชื้อรามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงเกินไป มีผลทำให้แป้งถูกใช้โดยเชื้อราในขณะบ่มโคจิ การปลดปล่อยน้ำตาลระหว่างกระบวนการหมักในถังหมักจึงไม่สูงเท่าที่ควร

ผลิตกรดได้ในปริมาณต่ำ เพื่อรักษาระดับ pH ของโคจิให้เป็นกลาง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่ง กล่าวคือ สายพันธุ์ที่มีเส้นใยยาว จะเหมาะกับการหมักโคจิที่ไม่มีระบบการให้อากาศ ทั้งนี้เพื่อที่เชื้อราจะสามารถชอนไชเส้นใยภายในก้อนโคจิได้อย่างทั่วถึง ส่วนการผลิตโคจิในห้องบ่ม (koji chamber) ซึ่งมีระบบการกวนและการให้อากาศ เชื้อที่มีเส้นใยสั้นจะเจริญได้ดี โดยที่การกวนจะไม่ทำให้เส้นใยขาด นอกจากนั้นเชื้อราที่ใช้สำหรับผลิตทาเนโคจิซีอิ๊ว ควรจะเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้ในปริมาณมาก

ในขณะเตรียมโคจิจะต้องใช้คาร์โบไฮเดรทน้อยที่สุด

(3) เชื้อราผลิตสาโท

สาโทจัดเป็นไวน์ข้าว การหมักหรือวิธีการผลิตใช้วิธีการแบบดั้งเดิมโดยใช้ลูกแป้งที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด เมื่อนำมาผสมกับข้าวสุก เซลล์และสปอร์จะเจริญและเกิดการย่อยแป้งและหมักเป็นแอลกอฮอล์ตามลำดับทำให้เกิดข้าวหมักจนผลสุดท้ายเปลี่ยนสภาพเป็นเครื่องที่มีแอลกอฮอล์ราที่พบในลูกแป้ง ได้แก่ อะไมโลไมซิส รอกซิไอ (*Amylomyces rouxii*) และไรโซปัส (*Rhizopus oryzae*) ซึ่งเป็นราสีขาว ในการหมักช่วงแรก เชื้อราจะสร้างเส้นใย ชอนไชไปทั่วข้าว และย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล แต่เนื่องจากเป็นราสีขาว จึงไม่ทำให้ข้าวเปลี่ยนสี เนื่องจากมองไม่เห็นเส้นใยชัดเจน ต่างจากการหมักซีอิ๊วเต้าเจี้ยว ที่ใช้ราสีเขียว เมื่อแป้งในข้าวถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาล จึงไม่สามารถอุ้มน้ำเอาไว้ได้ และน้ำที่มีอยู่จะซึมออกมา เป็นน้ำเชื่อมข้าว ในช่วงนี้ ราจะสร้างกรด ทำให้ข้าวมีความเป็นกรด คือมีค่า pH ต่ำลง ทำให้เกิดสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ และยับยั้งแบคทีเรียที่จะทำให้ข้าวบูดเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะซึมออกมา เป็นน้ำเชื่อมข้าว ในช่วงนี้ ราจะสร้างกรด ทำให้ข้าวมีความเป็นกรด คือมีค่า pH ต่ำลง ทำให้เกิดสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ และยับยั้งแบคทีเรียที่จะทำให้ข้าวบูดเน่า

2.2.4 การประยุกต์ใช้ของโคจิ (Yasuda,2010)

โดยทั่วไปโคจิจะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมัก เช่น สาเก ไวน์ข้าว น้ำส้มสายชู ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว มิโซะ เป็นต้น นอกจากนี้โคจิแดงถูกนำมาใช้ในการผลิตสารสีธรรมชาติและอาหารหมักเช่น ไวน์ข้าวสีแดง น้ำส้มสายชูและเต้าหู้หมักและเป็นสารเติมแต่งในปลาเนื้อและผัก นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพรในประเทศจีน ที่ช่วยส่งเสริมการดูดซึมและการย่อยอาหารรวมถึงการไหลเวียนของเลือด มีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิต ลดคลอเลสเตอรอล ต้านจุลชีพ ต้านอนุมูลอิสระและช่วยในการต้านมะเร็ง

2.3 เอนไซม์ที่พบในโคจิ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

เอนไซม์ที่พบในโคจิส่วนใหญ่จะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลซึ่งเชื้อราต้องการที่จะใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญ นอกจากนั้นยังพบเอนไซม์โปรติเอสที่ย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนที่สร้างสารให้กลิ่นรสกับผลิตภัณฑ์ รวมถึงเอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อพืช เช่น เซลลูเลสและเพคติเนส ที่มีบทบาทในการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน

2.3.1 ชนิดของอะไมเลส

2.3.1.1 แอลฟาอะไมเลส (α -Amylase)

มีชื่อทางการค้าเป็นที่รู้จักกันว่า Termamyl® และมีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) และมีชื่อตามระบบว่า α-1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 พบทั่วไปทั้งในอาณาจักรพืชและสัตว์ตลอดทั้งในคน จะพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิโกและไดแซกคาไรด์ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกาย

ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายก็คือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิสของแป้งที่ 1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์อย่างได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงรูปเดิม (α-configuration)

2.3.1.2 บีตา-อะไมเลส (β-Amylase)

มีชื่อเรียกตามระบบว่า β-1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 ซึ่งพบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลต์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ และมักพบร่วมกับแอลฟ่าอะไมเลส ซึ่งโดยทั่วไปจะมีค่าสูงกว่าแอลฟ่าอะไมเลสมี pH optimum ที่ 5.6 จากการพิจารณาจาก pH activity profile มีลักษณะแบบรูประฆังคว่ำที่มีหมู่ที่แตกไอออนได้ที่บริเวณเร่งอยู่ 2 หมู่ คือ ที่ pK_1 = 2.5 – 3.5 และ pK_2 = 8.0 – 8.5 นอกจากนี้มีสารพวกซัลไฟดริล(sulfhydrly reagents) เป็นตัวยับยั้ง

เป็นปฏิกิริยาย่อยสลายของบีตาอะไมเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคไลซิสของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปทีละ 1 หน่วยของมอลโทส หรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคไลซิสที่ α-1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็น กลูแคน, ลิมิตเดกซ์ทริน และส่วนใหญ่จะเป็นมอลโทสที่มีดครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้ β-configuration หรือบีตามอลโทส

2.3.1.3 แกมมา-อะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลส หรืออะมิโลกลูโคซิเดส (γ-Amylase,Glucoamy;ase,Amyloglucosidase)

มีชื่อเรียกตามระบบว่า γ-1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา มี pH optimum ที่ 4.0-4.4 และมีหมู่ไวปฏิกิริยา 2 หมู่ คือ ที่ pK_1 =2.9 และ pK_2 = 5.9

ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้ง ก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคไลซิสที่เป็น α-1,4, α-1,6, และ α-1,3 แต่จะช้ากว่า α-1,4 การตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับบีตาอะไมเลส แต่ตัดปลายสายเข้าทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้ β-configuration หรือบีตา-ดี-กลูโคส และส่วนของกลูแคน และลิมิตเดกทรินซ์

2.3.2 ลักษณะของซับเสตรทและผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย

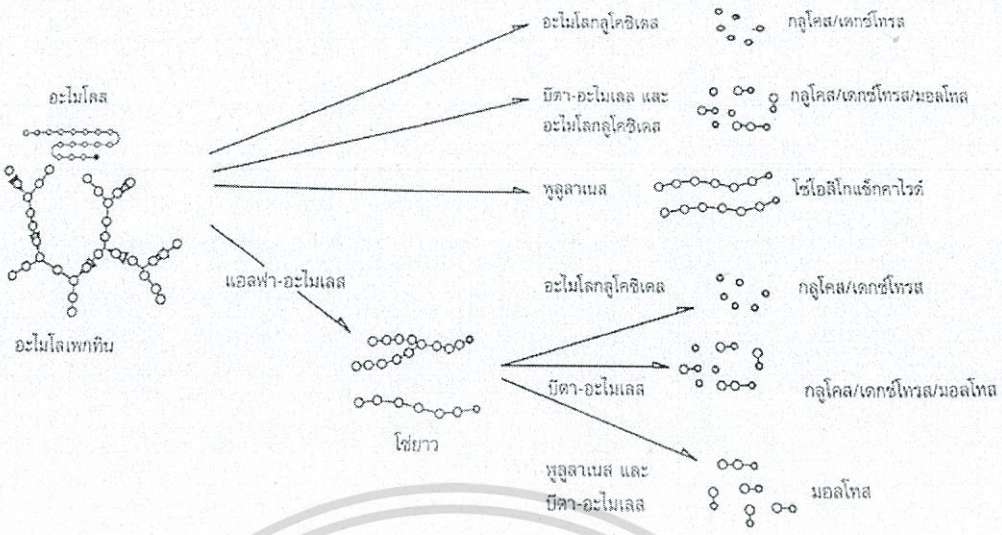
ซับเสตรทของอะไมเลสเป็นแป้ง ซึ่งประกอบด้วยสัดส่วนของอะไมเลสและอะไมโลเพกทิน ดังลักษณะความแตกต่างที่แสดงในตารางที่ 2.2 ส่วนผลผลิตของการย่อยสลายด้วยอะไมเลสชนิดต่างๆ ดังปรากฏ ตามภาพที่ 2.1

2.3.3 วิเคราะห์แอกทิวิตี้ของอะไมเลส

เมื่อเปรียบเทียบแอกทิวิตี้ของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดในย่อยสลายแป้งจะได้ผลดังตารางที่ 2.2 แอลฟา-อะไมเลสทำให้เกิดพอลิเมอร์สายสั้นได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากการตัดสายภายในอย่างไม่เป็นระเบียบ พิจารณาจากค่าความหนืดและสีไอโอดีนจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งต่างไปจากบีตาและแกมมา-อะไมเลส ที่มีลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์แบบตัดจากปลายสายสู่ในสายไปเรื่อยๆ เป็นระเบียบ

ค่าการลดความหนืดและสีไอโอดีนที่หายไปไม่ได้บ่งบอกจำนวนพันธะไกลโคไลซิสในแป้งที่ถูกย่อยสลาย ด้วยเหตุนี้ในการติดตามแอกทิวิตีของอะไมเลสจึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบจากหน่วยของหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 ผลผลิตการย่อยสลายแป้งด้วยอะไมเลสทั้ง 3 ชนิด
ที่มา : ปราณี อ่านเปรื่อง (2543)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบแอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดต่อหน่วยหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

ปฏิกิริยา	แอคทิวิตี้สัมพันธ์ คิดต่อหน่วยของหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น		
	แอลฟ่าอะไมเลส	บีตาอะไมเลส	แกมมาอะไมเลส
หมู่รีดิวซ์ที่เกิด(ขึ้นกับองเอนไซม์)	คงที่	คงที่	คงที่
การลดความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
การลดสีม่วงของไอโอดีน	เร็ว	ช้า	ช้า
การเกิดมอลโทส	ช้า	1(เร็ว)	0(ไม่มี)
การเกิดกลูโคส	0(ไม่มี)	0(ไม่มี)	1(เร็ว)

ที่มา : ปราณี อ่านเปรื่อง (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yoshizaki และคณะ (2010) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสรวมถึงความบริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ โดยใช้วัตถุดิบที่แตกต่างกันคือ ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวธรรมดา และข้าวเหนียว บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าข้าวบาร์เล่ย์เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา แต่การผลิตแอลฟ่าอะไมเลส (alpha amylase) และ กลูอะไมเลส (glucoamylase) ต่อพื้นที่การเจริญไม่มีความแตกต่างกันตามวัตถุดิบที่ใช้ และในการศึกษาผลของอุณหภูมิพบว่าเชื้อรามีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสจะสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์พบว่าแอลฟ่าอะไมเลสจะไม่มีความเสถียรที่ค่าพีเอช เป็นกรดและมีความต้านทานต่อความร้อนน้อยกว่ากลูโคอะไมเลส (คงตัวที่ < 40 องศาเซลเซียส) เมื่อสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ถูกนำไปผลิตเอนไซม์ในโคจิแดงโดยการลดอุณหภูมิจาก 35 ถึง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในช่วงการเจริญขั้นสุดท้ายของเชื้อรา เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และแอลฟ่าอะไมเลส จะถูกผลิตออกมาได้สูง (1.4 และ 18 ครั้ง ตามลำดับ) รวมถึงความคงตัวของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น

Shoji และคณะ (2006) ทำการพัฒนาระบบเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) ที่ใช้วัตถุดิบต่างๆได้แก่ กลูโคส แป้ง ข้าวบาร์เลย์หยาบ และข้าวบาร์เลย์บด โดย *Aspergillus kawachii* NBRC4308 บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าข้าวบาร์เลย์หยาบมีกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและแอลฟ่าอะไมเลสที่ทนกรดสูงที่สุด อีกทั้งยับยั้งพบน้ำตาลที่เหลือรอดในโคจิต่ำด้วย รองลงมาได้แก่ ข้าวบาร์เลย์บด ดังนั้นสรุปได้ว่าข้าวบาร์เลย์หยาบเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในโคจิ โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 7.7 U/ml และกลูโคอะไมเลส 150.8 U/ ml

Amutha และ Jaya Priya (2011) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของพีเอช อุณหภูมิและชนิดไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจาก *Bacillus subtillis* KCX006 อีกทั้งยังศึกษาผลของไอออนโลหะที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสบริสุทธิ์พบว่า นิกเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2$) มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 117.5% รองลงมาคือ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)

สุมัลลิกา โมรากุล (2545) ทำการศึกษาการพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว โดยทำการศึกษาเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและโปรติเอส ที่ใช้เชื้อรา *Amylomyces* sp. M2 รวมถึงปริมาณกลูโคซามีน พบว่าปริมาณความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้ามีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส รวมถึงปริมาณกลูโคซามีนด้วย โดยโคจิรำข้าวเจ้าที่มีความชื้นต่ำ (37.8%) จะมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส กลูโคอะไมเลส และโปรติเอสที่สูงกว่าโคจิรำข้าวเจ้าที่มีความชื้นสูง (49.52% และ 50.89%)

วีระสิทธิ์ กัลป์บากฤต และคณะ (2559) ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่แปรผันตามขนาดของการเพาะเลี้ยง พบว่า ในระดับฟลาสก์สัดส่วนข้าวต่อน้ำ 40:10 g/ml (ความชื้น 38.6%) ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดเท่ากับ 24.84, 214.12 และ 37.36 μg/ml ตามลำดับ และใน Koji Machine ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัดส่วนของข้าวต่อน้ำ 45:5 g/ml (ความชื้น 31.7%) กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่าสูงสุดเท่ากับ 29.86 และ 15.90 unit/ml ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าความชื้นเริ่มต้นของข้าวที่แตกต่างกันมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและกลูโคซามีน

Naidu และ Saranraj (2013) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* พบว่าการเติมไอออนโลหะ K^{+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Mo^{2+}, Cl^{+}, SO_4^{2+} ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ขณะที่ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ยับยั้งการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา เมื่อไม่มีการเติมแมกนีเซียมไอออนพบว่า กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ การเติมแมกนีเซียมไอออนรวมกับโซเดียมไอออนช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจาก *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

รำข้าวเจ้าหยาบ, โรงสีฉะเชิงเทรา, ประเทศไทย
รำข้าวเจ้าละเอียด, โรงสีฉะเชิงเทรา, ประเทศไทย
น้ำสิงห์ปริมาตร 6 ลิตร, สิงห์คอเปอเรชั่น, ประเทศไทย

3.1.2 สารเคมี

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), ALDRICH, India
Acetyl acetone ($C_5H_8O_2$), CARLO ERBA, Italy
Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6$), CARLO ERBA, France
Glucose ($C_6H_{12}O_6$), Merck, Germany
Glacial acetic acid ($C_2H_4O_2$), ACI Labscan, Thailand
Hydrochloric acid (HCl), ACI Labscan, Thailand
Iodine (I), CARLO ERBA, France
Sodium hydroxide (NaOH), CARLO ERBA, France
Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$), Merck, Germany
Starch ($(C_6H_{10}O_5)_n$), (9005-84-9), Merck, Germany
Glucosamine $C_6H_{13}NO_5$. HCl), (101547721), Sigma-Aldrich, USA
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), UNIVAR, New Zealand
Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), Merck, Germany
Magnesium sulphate ($MgSO_4 .7H_2O$), (F2D055), UNNIVAR, Australia
Potassium iodide (KI), CARLO ERBA, France
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), 471687, CARLO ERBA, France
Sulfuric acid (H_2SO_4), ACI Labscan, Thailand
Ethanol 95%, ITALMAR.CO,LTD.,Thailand
Enrlich reagent, (101328790), Fluka, Switzerland
para-dimethylanimobenzaldehyde, (444604), CARLO ERBA, France

3.2 อุปกรณ์

เครื่องเขย่า, GFL 3017, Orbital Shaker, Germany
เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์, Genesys 20, Thermo scientific, UK
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง, SevenEasy, Mettler Toledo, China
เครื่องปั่นเหวี่ยง Vortex, BEC Thai, Thailand
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ, Eppendorf, Germany
เครื่องชั่งชนิดละเอียด, SI 234, Denver Instrument, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง, Mettler toledo, Switzerland
ตู้บ่มเชื้อ, Heraeus, Germany
ตู้เขี่ยเชื้อ, Laminar flow Abs 1200, Microflow, Germany
ตู้อบเครื่องแก้ว, 7.200 Tuttlingen,WTB binder, Germany
ตู้เย็น, LG, South Korea
ไมโครเวฟ, ME109MSTD, Samsung, Malaysia
หม้อนึ่งความดันไอ, ES-315, Tomy, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ, Memmert, Germany
โถดูดความชื้น, Simax, Germany
ไมโครปิเปต ขนาด 250, 1000 และ 10000 ไมโครลิตร, Gilson, France
ทิป ขนาด 250, 1000 และ 10000 ไมโครลิตร, Gilson, France
หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติก ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, Falcon, USA
ฟอยด์ ขนาด 7.62 x 45.7 เซนติเมตร , Diamond, USA
ฟอยด์ถ้วย เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร, รวินท์พร เบเกอร์มาร์ท, ประเทศไทย
กระดาษกรองเบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร , Whatman, UK
กระบอกตวงแก้ว ขนาด 100 มิลิลิตร
ขวดปรับปริมาตร ขนาด 25, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร
บีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
ผ้าขาวบาง ขนาด 30 x 50 เซนติเมตร
ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
กรวยแก้วกลาง
ตะเกียงแอลกอฮอล์
แท่งแก้ว
ลูกแก้ว
ลูปเขี่ยเชื้อ
ช้อนตักสารสแตนเลส

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces* spp.

การเตรียมกล้าเชื้อรา *Amylomyces* spp. ที่เลี้ยงใน Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ โดยการใช้เข็มเขี่ยเส้นใยเชื้อราสีขาวจากหลอดอาหาร PDA ขนาดเส้นใย 3 มิลลิเมตร ประมาณ 3-4 เส้น ใส่ลงในอาหาร PDA ใหม่ ที่บรรจุในหลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร โดยวางตำแหน่งตรงกลาง slant และให้เส้นใยจุ่มเข้าไปอยู่ในวุ้นอาหารประมาณ 3 เซนติเมตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การ sub culture เชื้อรา

การ sub culture เชื้อรานั้น โดยการใช้เข็มเขี่ยเส้นใยเชื้อราจากหลอดอาหาร PDA จากข้อ 3.3.1 ขนาดเส้นใยรวมกันเป็นก้อน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร (ขนาดเท่าเม็ดแมงลักแห้ง) จิ้มลงในอาหาร PDA ใหม่ ที่บรรจุในหลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร บริเวณตรงกลางข้างในวุ้นอาหาร 3 เซนติเมตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยเชื้อจาก PDA 1 หลอด สามารถ sub culture ลงในอาหาร PDA ใหม่ ได้ 10 หลอด

3.3.3 การศึกษาผลของความชื้นในโคจิรำข้าวเจ้า

3.3.3.1 ชั่งรำข้าวเจ้าหยาบ 5 กรัม และรำข้าวเจ้าละเอียด 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ทราบน้ำหนักของฟลาสก์ เติมน้ำดื่มตราสิงห์ ลงในฟลาสก์ เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้น โดยแบ่งสภาวะในการเติมน้ำดังนี้

(1) สภาวะที่ 1 เติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร
(2) สภาวะที่ 2 เติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร
(3) สภาวะที่ 3 เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที รอจนเย็น (เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีอีกครั้ง รอจนเย็น

3.3.3.2 เติมกล้าเชื้อ *Amylomyces* spp. จากข้อ 3.3.2 โดยใช้ลูปเขี่ยกล้าเชื้อ *Amylomyces* spp. 1 หลอดต่อฟลาสก์ ลงในฟลาสก์ที่ได้จากข้อ 3.3.3.1

3.3.3.3 เติมน้ำดื่มตราสิงห์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรดังนี้

(1) สภาวะที่ 1 เติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร
(2) สภาวะที่ 2 เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร
(3) สภาวะที่ 3 เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร

จากนั้นใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อกวนรำข้าวเจ้าให้เข้ากัน โดยการคนวนเป็นวงกลมไปทางซ้าย 10 ครั้ง และทางขวา10 ครั้ง

3.3.3.4 ทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เก็บตัวอย่างหลังจากการบ่มในวันที่ 3 และ 6 เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสกลูโคซามีน และตรวจวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ พีเอช ความชื้น และค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity) ตามวิธีการในข้อ 3.3.5

3.3.4 การศึกษาผลของไอออนโลหะแมกนีเซียม ($MgSO_4$) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟต (KH_2PO_4) ในการผลิตโคจิรำข้าวเจ้า

3.3.4.1 ชั่งรำข้าวเจ้าหยาบ 5 กรัม และรำข้าวเจ้าละเอียด 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนักของฟลาสก์ เติมน้ำดื่มตราสิงห์ลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟลาสก์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที รอจนเย็น แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีอีกครั้ง รอจนเย็น

3.3.4.2 ใช้ลูปเขี่ยกล้าเชื้อ *Amylomyces* spp. 1 หลอดต่อฟลาสก์ ลงในฟลาสก์ที่ได้จากข้อ 3.3.4.1

3.3.4.3 เติมสารละลายไอออน $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.025% โดยชั่งสาร $MgSO_4$ ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง 0.0087 กรัม และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.125% โดยชั่งสาร KH_2PO_4 ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง 0.0218 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อกวนรำข้าวเจ้าให้เข้ากันโดยการคนวนไปทางซ้าย 10 ครั้งและวนไปทางขวา 10 ครั้ง

3.3.4.4 ทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างหลังจากการบ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส กลูโคซามีน และตรวจวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ พีเอช ความชื้น และค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity) ตามวิธีการในข้อ 3.3.5

3.3.5 การตรวจวิเคราะห์

3.3.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

3.3.5.1.1 การสกัดเอนไซม์ (ดัดแปลงจากสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา, 2546)

(1) ชั่งน้ำหนักโคจิรำข้าวเจ้า ด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง

(2) เติม 1.0 M phosphate buffer (pH 7.0) (Chuenjit et al, 2012) ที่แช่เย็นในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้คนให้เข้ากันเบาๆด้วยช้อนตักสารสแตนเลส ทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิในห้องควบคุมความเย็น 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อสกัดเอนไซม์ออกจากโคจิรำข้าวเจ้า

(3) กรองด้วยผ้าข้าวบาง 2 ชั้น ขนาด 30 × 50 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการเทโคจิลงไปบนผ้าขาวบางที่วางบนบีกเกอร์ที่การฆ่าเชื้อจากนั้นบีบเพื่อแยกส่วนใสออกมาลงบนบีกเกอร์จนได้ส่วนใสที่กรองได้ ปริมาตร 30 ถึง 35 มิลลิลิตร

(4) นำส่วนที่กรองได้บรรจุใส่หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์

(5) เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง มาทำการวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

(1) นำเอนไซม์ที่สกัดได้ 5 มิลลิลิตร โดยปิเปตเอนไซม์ลงในหลอดทดลองปิดหลอดด้วยลูกแก้ว แล้วนำไปต้มลงบนอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นเจือจางเอนไซม์ด้วย 1.0 M phosphate buffer (pH 7.0) แช่เย็น ที่ระดับความเจือจาง 5, 10, 20 และ 50 เท่า (ภาคผนวก ก)

(2) ชั่งแป้ง 0.5 กรัม ละลายใน 0.2 M acetate buffer (pH 5.0) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ละลายน้ำแป้งจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟนาน 3 นาที รอให้เย็นลง จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำแป้งลงในหลอดทดสอบ 2 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางด้วย1.0 M phosphate buffer (pH 7.0) ทั้งเอนไซม์ที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยาและที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยาจากข้อ (1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) เตรียมสารละลายไอโอดีน ชั่งสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.5 กรัมและไอโอดีน 0.05 กรัม ผสมกัน เติมน้ำปราศจากไอออน 5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ละลายและปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็น stock solution จากนั้นปิเปตจาก stock solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ (ภาคผนวก ก)

(5) ปิเปตสารละลายน้ำแป้งที่เติมสารละลายเอนไซม์แล้วในข้อ (3) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายไอโอดีนที่ได้จากการเตรียมในข้อ (4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้สีน้ำเงิน (ดังภาพ 3.1)

ภาพที่ 3.1 สีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยแป้งของเอนไซม์

(6) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร โดยค่า blank ใช้น้ำปราศจากไอออน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สูตรการคำนวณ

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

โดยที่

B = ค่าดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ผ่านการต้มเพื่อหยุดปฏิกิริยา ที่ 700 นาโนเมตร

S = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 700 นาโนเมตร

dil_n = ค่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์

d = ปริมาตรน้ำที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

dry wt. = น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

3.3.5.1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

(1) นำเอนไซม์ที่สกัดได้ 5 มิลลิลิตร ไปต้ม 5 นาที โดยปิเปตเอนไซม์ลงในหลอดทดลองปิดหลอดด้วยลูกแก้ว แล้วนำไปต้มลงบนอ่างน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นเจือจางเอนไซม์ด้วยด้วย 1.0 M phosphate buffer (pH 7.0) แช่เย็น ที่ระดับความเจือจาง 5, 10 และ 20 เท่า (ภาคผนวก ก)

(2) ชั่งแป้ง 1 กรัม ละลายใน 0.2 M acetate buffer (pH 4.5) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน ละลายน้ำแป้งจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟนาน 3 นาที รอให้เย็นลง

(3) ปิเปตสารละลายน้ำแป้งลงในหลอดทดสอบ 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 0.5 มิลลิลิตร และ 0.2 M acetate buffer (pH 4.5) 0.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นทั้งเอนไซม์ที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยาและที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจากข้อ (1) ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(5) ปิเปตสารละลายจากข้อ (4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และทำให้เย็น 5 นาที

(6) เติมน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบจากข้อ (5) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดย blank ใช้น้ำปราศจากไอออน แทนสารละลายเอนไซม์

(7) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยได้โดยอ่านค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
148852

สูตรการคำนวณ

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

โดยที่

Rs = ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ย่อยละลายในน้ำแป้งเป็นเวลา 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)

t = เวลาที่เอนไซม์เกิดปฏิกิริยาในที่นี้คือ 10 นาที

Dry wt. = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

3.3.5.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.5.2.1 การเตรียมตัวอย่างโคจิ

ชั่งน้ำหนักโคจิรำข้าวเจ้าด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ได้โคจิรำข้าวเจ้าประมาณ 11 ถึง 13 กรัม ใช้ช้อนสแตนเลสคนโคจิรำข้าวเจ้าจนกระทั่งโคจิรำข้าวเจ้าร่วนและแตกออกจากกัน คนไปทางซ้าย 10 ครั้งและทางขวา 10 ครั้ง จากนั้นสุ่มตัวอย่างโคจิเพื่อมาวิเคราะห์ความชื้นและความเป็นกรดด่าง อย่างละ 2 กรัม วอเตอร์แอคทิวิตี้ 1 กรัม และกลูโคซามีน 5 กรัม

3.3.5.2.2 การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 1990)

(1) อบถ้วยฟอยด์ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

(2) ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำไปชั่งน้ำหนัก

(3) บันทึกผลน้ำหนักหลังอบแห้งที่มีน้ำหนักคงที่ถือเป็นน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.2.3 การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้

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

(2) ทำการ calibrate เครื่องโดยน้ำ ultrapure ให้อยู่ในค่าที่พร้อม 1.000±0.003

(3) ชั่งโคจิรำข้าวสาลีด้วยช้อนตักสารลงในตลับ ประมาณ 2.00 กรัม ด้วยเครื่องชั่งสองตำแหน่ง

(4) นำเข้าเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ รอเครื่องแสดงผลและบันทึกผลค่าที่ได้

3.3.5.2.4 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (Chuenjit และคณะ, 2012)

ชั่งโคจิรำข้าวเจ้า 2 กรัม และเติมน้ำปราศจากไอออน 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดพลาสติก 50 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ช้อนตักสารคนให้เข้ากันและบีบโคจิรำข้าวเจ้าเพื่อนำส่วนใสออกมา จะได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัด pH meter

3.3.5.2.5 การวิเคราะห์กลูโคซามีน (Sakurai, 1997)

การเตรียมตัวอย่าง

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

(2) แล้วชั่งตัวอย่างโคจิรำข้าวเจ้า ปริมาณ 2.00 กรัม ด้วยเครื่องชังทศนิยม 4 ตำแหน่ง ลงในถ้วยฟอยด์

(3) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (เก็บตัวอย่างใส่ถ้วยฟอยด์ที่พับให้มิดชิด แล้วเก็บใส่ถุงซิปล็อคแล้วแช่แข็งที่ -18 องศาเซลเซียส)

(4) บดให้ละเอียดโดยใช้ขวดแก้วทุบตัวอย่างโคจิรำข้าวเจ้า

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

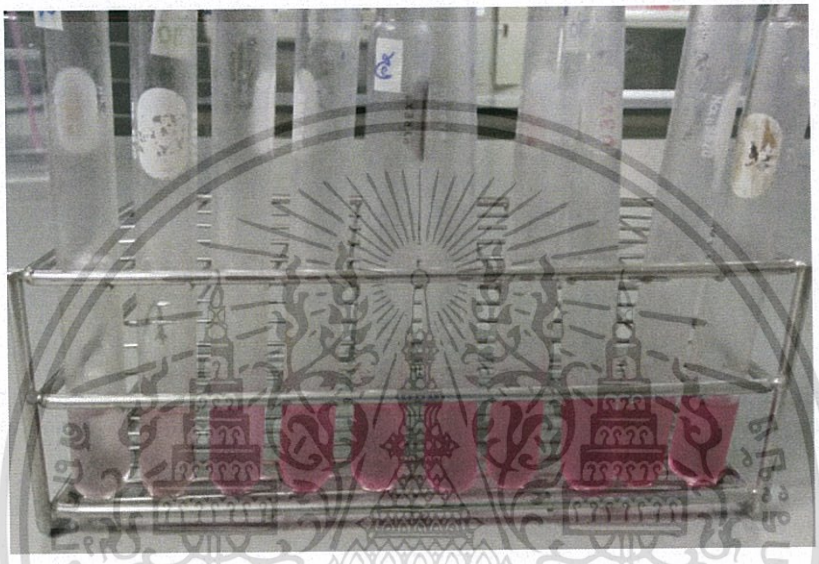
(4) นำสารละลายที่ได้มาทำให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 1 นอร์มอล NaOH ปรับ pH เท่ากับ 7 โดยการค่อยๆ ปิเปต 1 นอร์มอล NaOH แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้ววัด pH หลังจากปรับ pH เท่ากับ 7 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Ultrapure กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(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 ทำให้เย็น และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่ากราฟมาตรฐานกลูโคซามีน (ภาคผนวก ข)



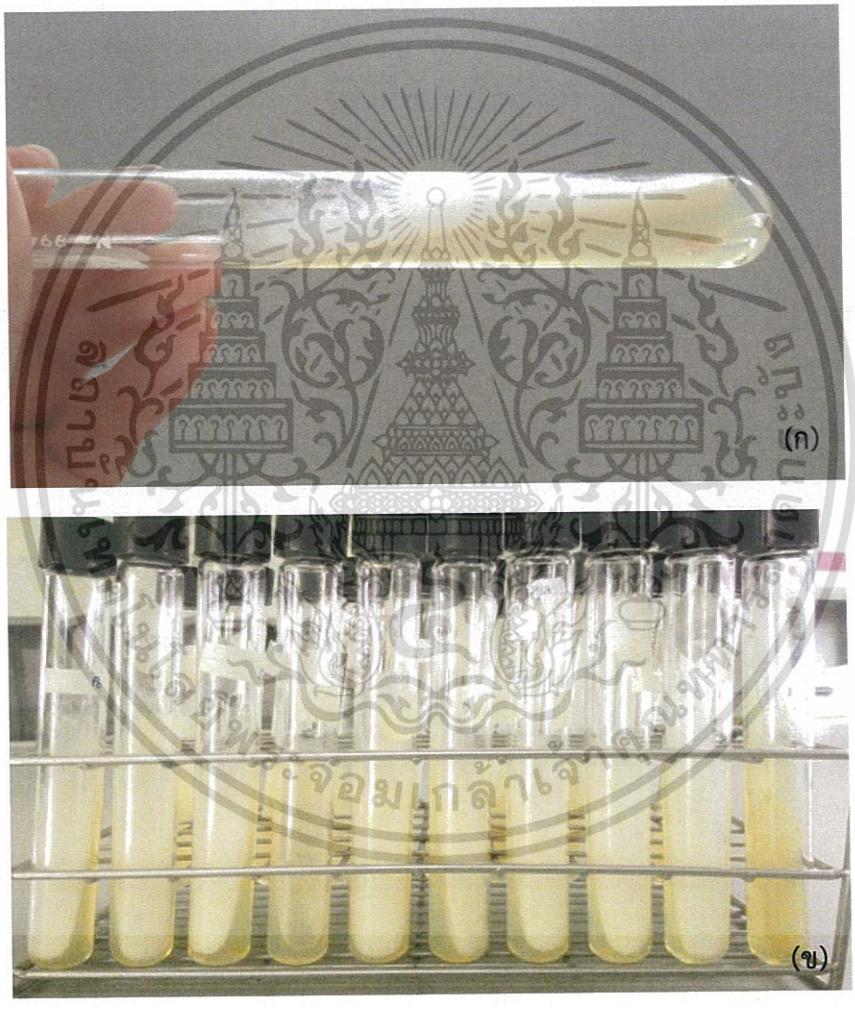
ภาพที่ 3.2 สารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextose agar (PDA) เป็นเวลา 3 วัน พบว่า วันที่ 1 เชื้อราเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหารเพียงเล็กน้อย ไม่ทั่วถึงผิวหน้าอาหาร โดยลักษณะเส้นใยสีขาวบาง ไม่ฟู วันที่ 2 เชื้อราเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหาร โดยลักษณะเส้นใยสีขาวหนาและฟูมากกว่าวันที่ 1 และวันที่ 3 เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เส้นใยมีลักษณะหนาสีขาว ฟู ปกคลุมทั่วพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน (ก) และการ subculture เชื้อรา *Amylomyces* spp. บนอาหาร PDA จำนวนมาก (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

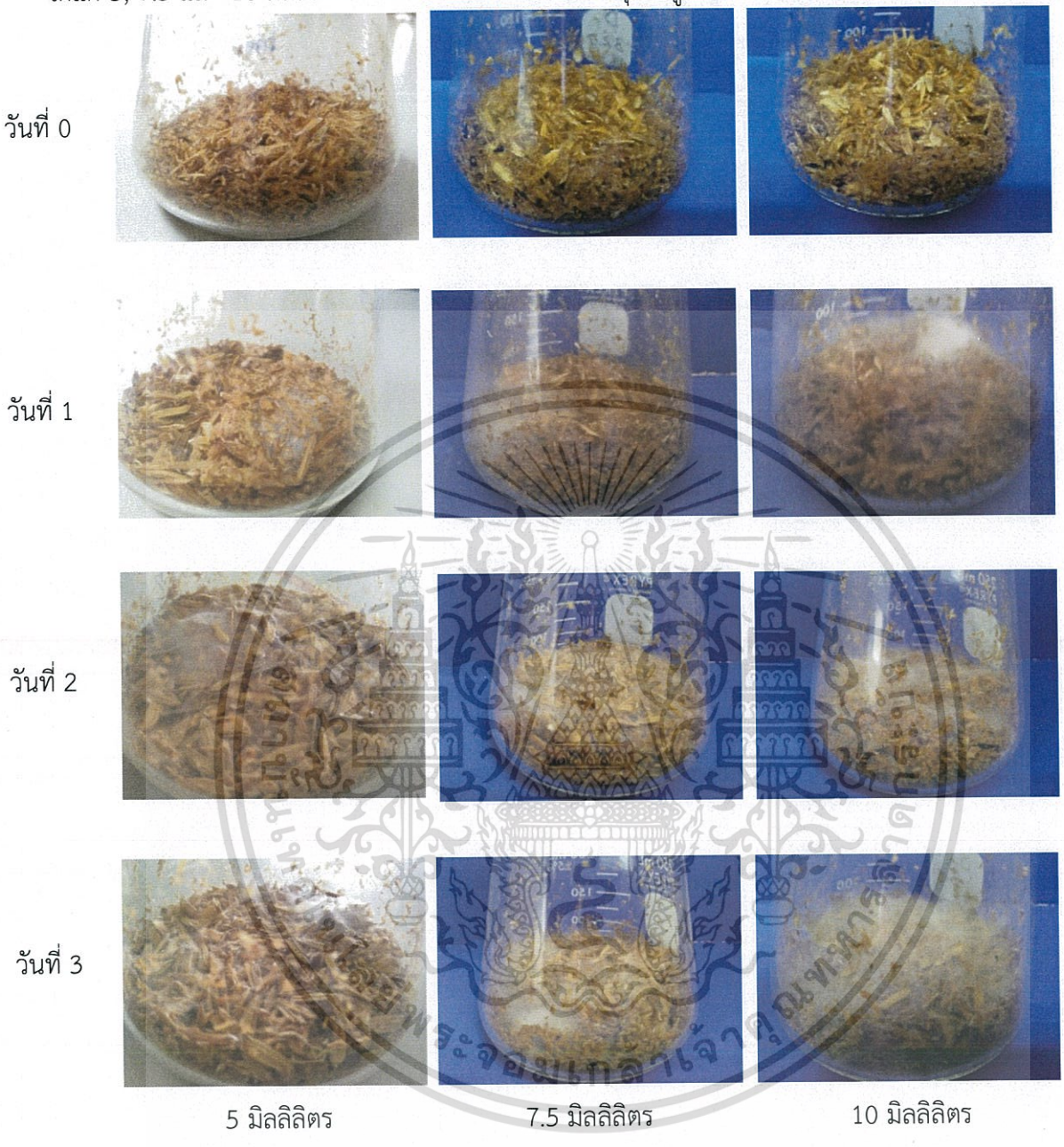
4.2 ผลของความชื้นต่อการเจริญของเชื้อรา ค่าทางเคมีและกิจกรรมของเอนไซม์ในโคจิรำข้าวเจ้า

4.2.1 ผลของความชื้นต่อการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อราในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกัน คือ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร ผสมลงในรำข้าวเจ้า บ่มที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 และ 6 วัน ส่งผลให้ความชื้นของรำข้าวเริ่มต้น (วันที่ 0) มีค่า 30.49, 41.97 และ 48.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าวันที่ 0 โคจิที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร มีลักษณะชื้นมากและมีสีน้ำตาลเข้มมากกว่าโคจิที่เติมน้ำเริ่มต้น 7.5 และ 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 1 พบว่าโคจิรำข้าวเจ้า มีเชื้อราเจริญเกิดเป็นกลุ่มก้อนสีขาวบนรำ ข้าวเจ้า โดยโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำมาก (10 และ 7.5 มิลลิลิตร) พบเส้นใยของเชื้อรากระจายทั่ว โคจิรำข้าวเจ้ามากกว่าโคจิที่เติมน้ำน้อย (5 มิลลิลิตร) ในวันที่ 2 โคจิรำข้าวเจ้าที่เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร พบว่าเส้นใยเชื้อราเจริญและกระจายตัวปกคลุมทั่วด้านบนทั่วรำข้าวเจ้ามากที่สุด รองลงมาคือ โคจิรำข้าวเจ้าที่เติมน้ำ 7.5 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ วันที่ 3 โคจิรำข้าวเจ้าที่เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร เชื้อราเจริญเติบโตครอบคลุมโคจิรำข้าวเจ้า โดยมีลักษณะเส้นใยสีขาว ฟู ปริมาณของเส้นใยสูงสุด รองลงมาคือโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำ 7.5 และ 5 มิลลิลิตร ซึ่งโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร พบว่าเส้นใยไม่สามารถเจริญได้ทั่วผิวหน้ารำข้าวเจ้าได้ในวันที่ 4 โคจิรำข้าวเจ้าที่เติมน้ำแตกต่างกันพบว่า ความฟูของเส้นใยเชื้อราลดลงเมื่อเทียบกับวันที่ 3 ของการบ่ม โดยความฟูของเส้นใยเชื้อราของโคจิที่เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร ลดลงมากและลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งถึงวันที่ 6 ของการบ่ม และความฟูของเส้นใยเชื้อราของโคจิที่เติมน้ำ 7.5 และ 10 มิลลิลิตร ค่อยๆลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งถึงวันที่ 6 ของการบ่ม (ภาพที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราพบว่า การเจริญของเชื้อราดีที่สุดในวันที่ 3 และการเติมน้ำ 7.5 และ 10 มิลลิลิตร ทำให้เชื้อราเจริญสูงสุด (ภาพที่ 4.2) เมื่อตรวจวัดปริมาณเส้นใยของเชื้อราในรูปกลูโคซามีน พบว่าการเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมาการเติมน้ำ 7.5 และ 5 มิลลิลิตร มีปริมาณกลูโคซามีน 5.65 และ 5.32 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และในวันที่ 6 ปริมาณกลูโคซามีนมีเพิ่มขึ้น โดยโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำ 10 มิลลิลิตร มีปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุด คือ 6.98 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมาคือ การเติมน้ำ 7.5 และ 5 มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 6.60 และ 6.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1

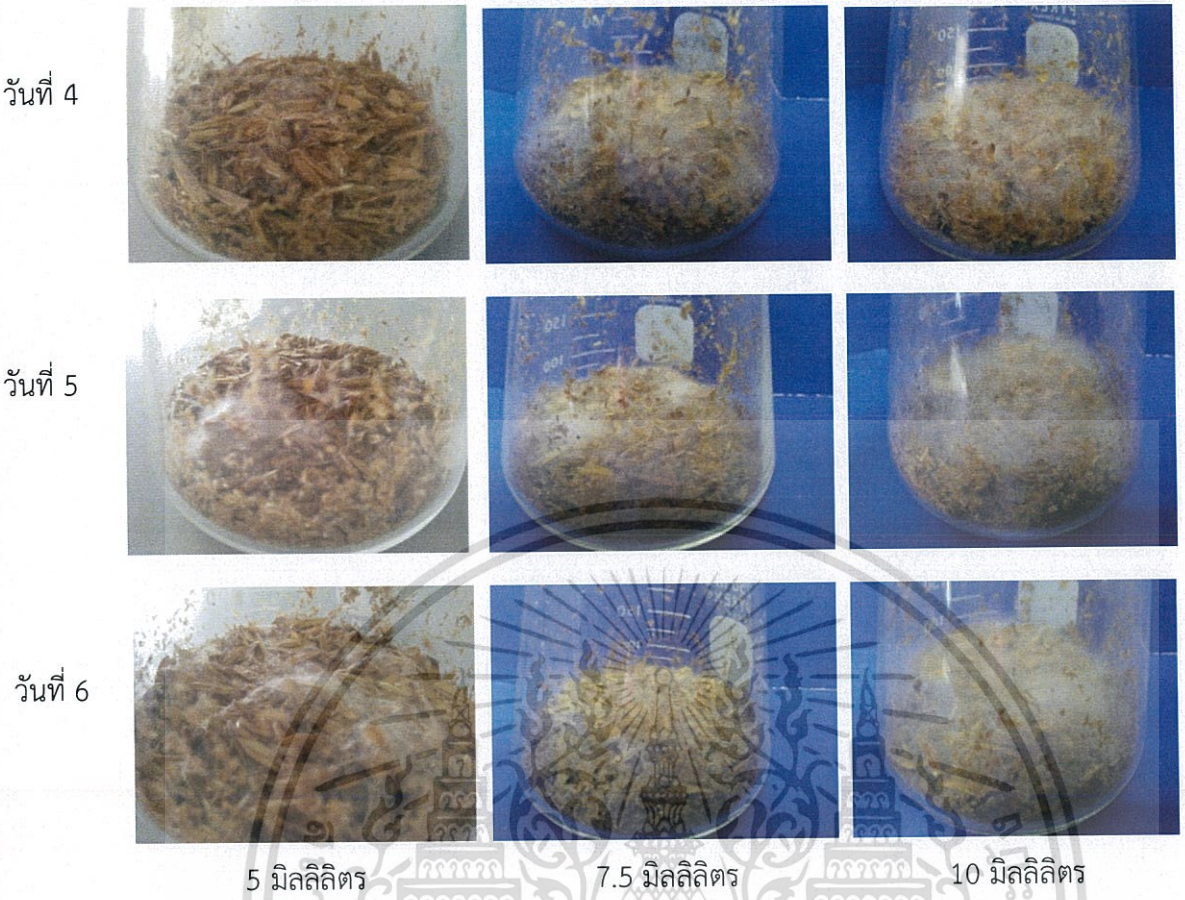
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้แก่ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 6 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้แก่ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 (ต่อ)

ตารางที่ 4.1 ความชื้นต่อพีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ และความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้า บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันและ 6 วัน

วัน	ปริมาณน้ำ (มิลลิลิตร)	กลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)	พีเอช	วอเตอร์แอคทิวิตี้	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)
3	5	5.32(±0.29)	5.64(±0.28)	0.987(±0.003)	28.41(±0.13)
	7.5	5.65(±0.42)	5.88(±0.06)	0.992(±0.002)	39.93(±1.95)
	10	6.25(±0.78)	6.45(±0.08)	0.996(±0.001)	45.28(±2.57)
6	5	6.02(±0.27)	5.98(±0.06)	0.989(±0.001)	25.04(±2.25)
	7.5	6.60(±0.69)	6.32(±0.01)	0.993(±0.002)	34.28(±3.39)
	10	6.98(±0.50)	6.55(±0.01)	0.994(±0.000)	41.03(±1.65)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

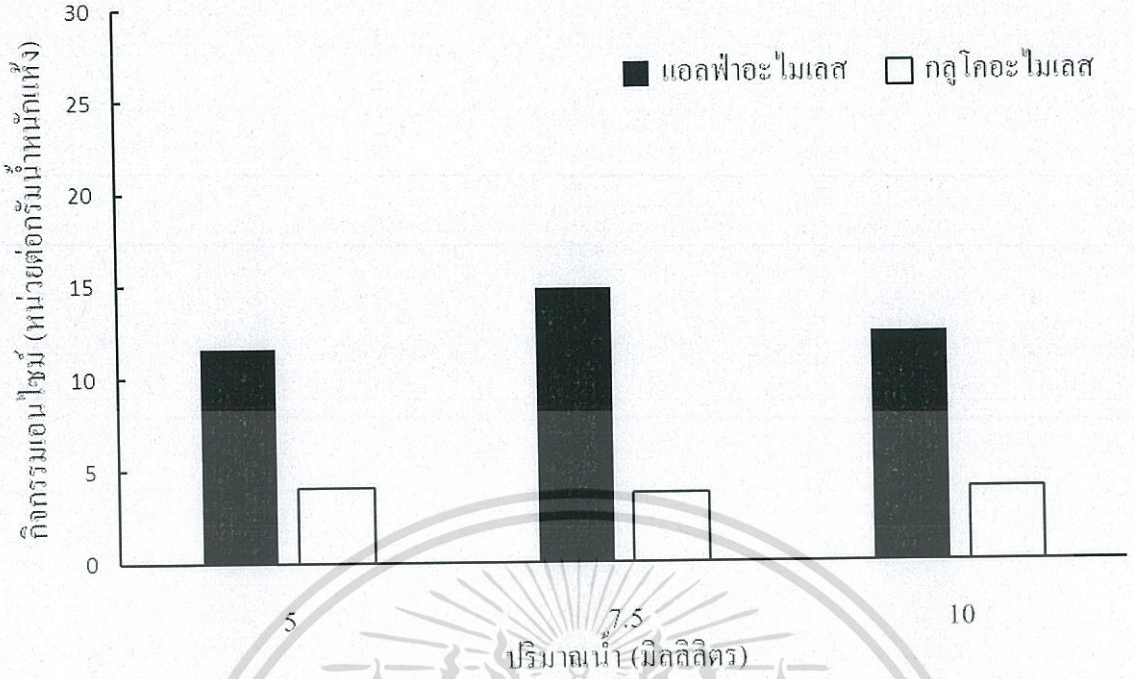
4.2.2 ผลของความชื้นต่อพีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) ของโคจิรำข้าวเจ้า

จากการศึกษาผลของการเติมน้ำเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของรำข้าวเจ้าต่อพีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ (A_w) และความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้าดังตารางที่ 4.1 พบว่าพีเอชเริ่มต้นของโคจิที่เติมน้ำแตกต่างกันคือ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 5.32, 5.29 และ 6.11 ตามลำดับ ในวันที่ 3 และ 6 ของการบ่ม พบว่าพีเอชมีแนวโน้มสูงขึ้น โคจิที่เติมน้ำ 5 มิลลิลิตรมีค่ามีเอชต่ำกว่าโคจิที่เติมน้ำ 7.5 และ 10 มิลลิลิตร แต่ยังคงมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 5.64 - 6.55 วอเตอร์แอคทิวิตี้ของโคจิรำข้าวเจ้าพบว่า ปริมาณวอเตอร์แอคทิวิตี้หรือปริมาณน้ำอิสระในโคจิรำข้าวเจ้าทั้ง 3 สภาวะ มีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 0.987 - 0.996 ส่วนความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้า พบว่าวันที่ 0 ความชื้นในโคจิรำข้าวสูงสุดและลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการบ่มที่เพิ่มขึ้น โดยโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร มีความชื้นสูงที่สุด รองลงมาคือ โคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้น 7.5 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ

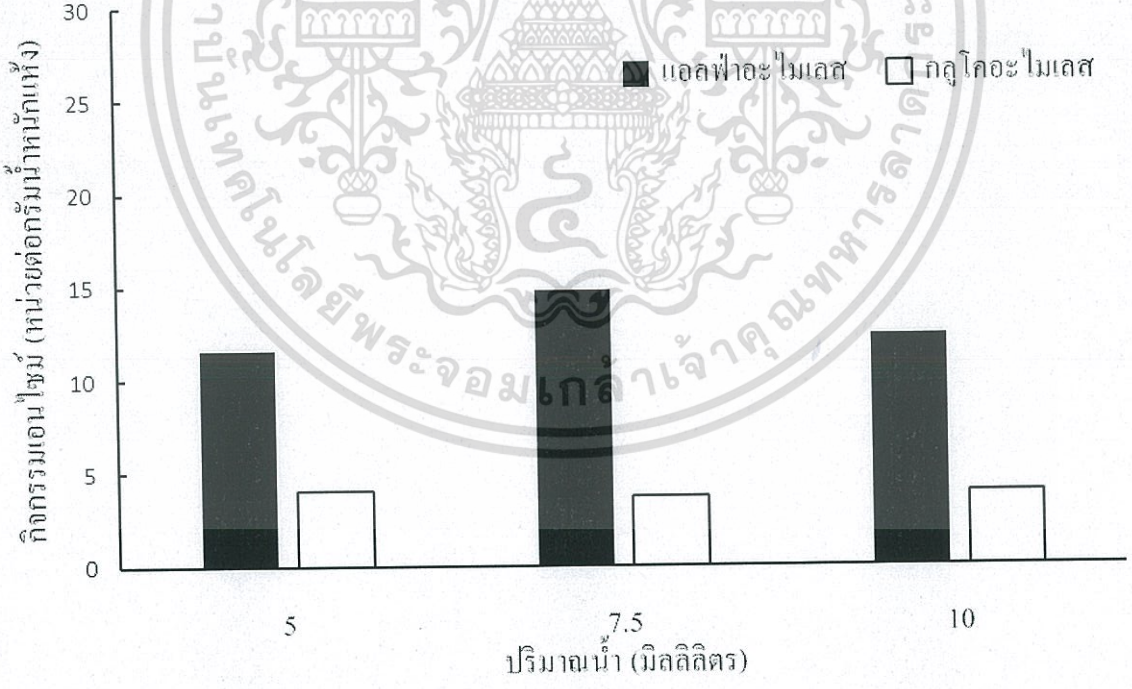
4.2.3 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้า

จากการศึกษาผลของการเติมน้ำเริ่มต้นที่ปริมาณ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร ในรำข้าวเจ้าต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้า(ดังภาพที่ 4.3 และ 4.4) พบว่าวันที่ 3 ของการบ่มโคจิรำข้าวเจ้าการเติมน้ำ 7.5 มิลลิลิตร ส่งผลให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสได้สูงที่สุดคือ 14.77 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาเป็นการเติมน้ำ 10 และ 5 มิลลิลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส คือ 12.39 และ 11.61 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย พบว่าการเติมน้ำ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร ให้ปริมาณกลูโคอะไมเลส 4.08 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ 10 และ 7.5 มิลลิลิตร คือ 3.90 และ 3.74 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3) ในวันที่ 6 แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 โดยโคจิที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุด 9.81 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาเป็นการเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร และ 7.5 มิลลิลิตร ให้กิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลส 7.89 และ 5.64 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนกิจกรรมกลูโคอะไมเลสพบว่า โคจิที่เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ให้กิจกรรมกลูโคอะไมเลสสูงที่สุดคือ 5.06 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ การเติมน้ำ 7.5 และ 5 มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 4.34 และ 3.95 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกันที่ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมปริมาณน้ำเริ่มต้นแตกต่างกันที่ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเป็นเวลา 6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาพบว่าการเติมน้ำในรำข้าวเจ้าเริ่มต้นทำให้ความชื้นของรำข้าวเริ่มต้นแตกต่างกันที่มีผลต่อค่าทางเคมีและกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส กลูโคซามีนและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในโคจิรำข้าวเจ้าพบว่า การเติมน้ำ 7.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้น 41.97 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 3 คือ 14.77 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแอลฟ่าอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยข้าวหรือข้าวเหนียวเพื่อหมักไวน์ข้าว น้ำหมักที่ได้จากการย่อยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้หรือน้ำตาล (น้ำต้อย) สอดคล้องกับงานวิจัยของสุมัลลิกา โมรากุล (2545) พบว่าปริมาณความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้ามีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยโคจิที่มีความชื้นต่ำ 37.80 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสสูงกว่าในวันที่ 3 คือ 3.00 และ 0.70 หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก mold bran แห้ง และโคจิรำข้าวเจ้าที่มีความชื้น 49.52 และ 50.89 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสคือ 1.40 และ 0.30 หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก mold bran แห้ง ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเติมน้ำเริ่มต้นที่ 7.5 มิลลิลิตร เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการเตรียมโคจิรำข้าวเจ้า

4.3 ผลของไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญของเชื้อรา กิจกรรมของเอนไซม์ และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคจิรำข้าวเจ้า

4.3.1 ผลของไอออนโลหะต่อการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า

ลักษณะการเจริญของเชื้อราที่มีการติมไอออนโลหะ 2 ชนิด ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะ เป็นระยะเวลา 7 วัน แสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.5 ดังนี้

จากการสังเกตการเจริญของเส้นใยเชื้อราพบว่าในวันที่ 3 ของทุกไอออนโลหะรวมถึงชุดควบคุมเชื้อรามีการเจริญดีที่สุด มีลักษณะเป็นเส้นใยฟู มีสีขาว ครอบคลุมโคจิรำข้าวเจ้า (ภาพที่ 4.3) และหลังจากนั้นเส้นใยของเชื้อราเจริญลดลงจนถึงวันที่ 7 โดยโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญของเชื้อรามากกว่าชุดควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อราในสภาวะที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตมีการเจริญที่ดีกว่าโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ภาพที่ 4.5)

ผลของไอออนโลหะต่อปริมาณกลูโคซามีน พบว่าปริมาณกลูโคซามีนของโคจิรำข้าวเจ้าที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตพบว่า มีแนวโน้มไม่แตกต่างดังภาพที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไอออนโลหะ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

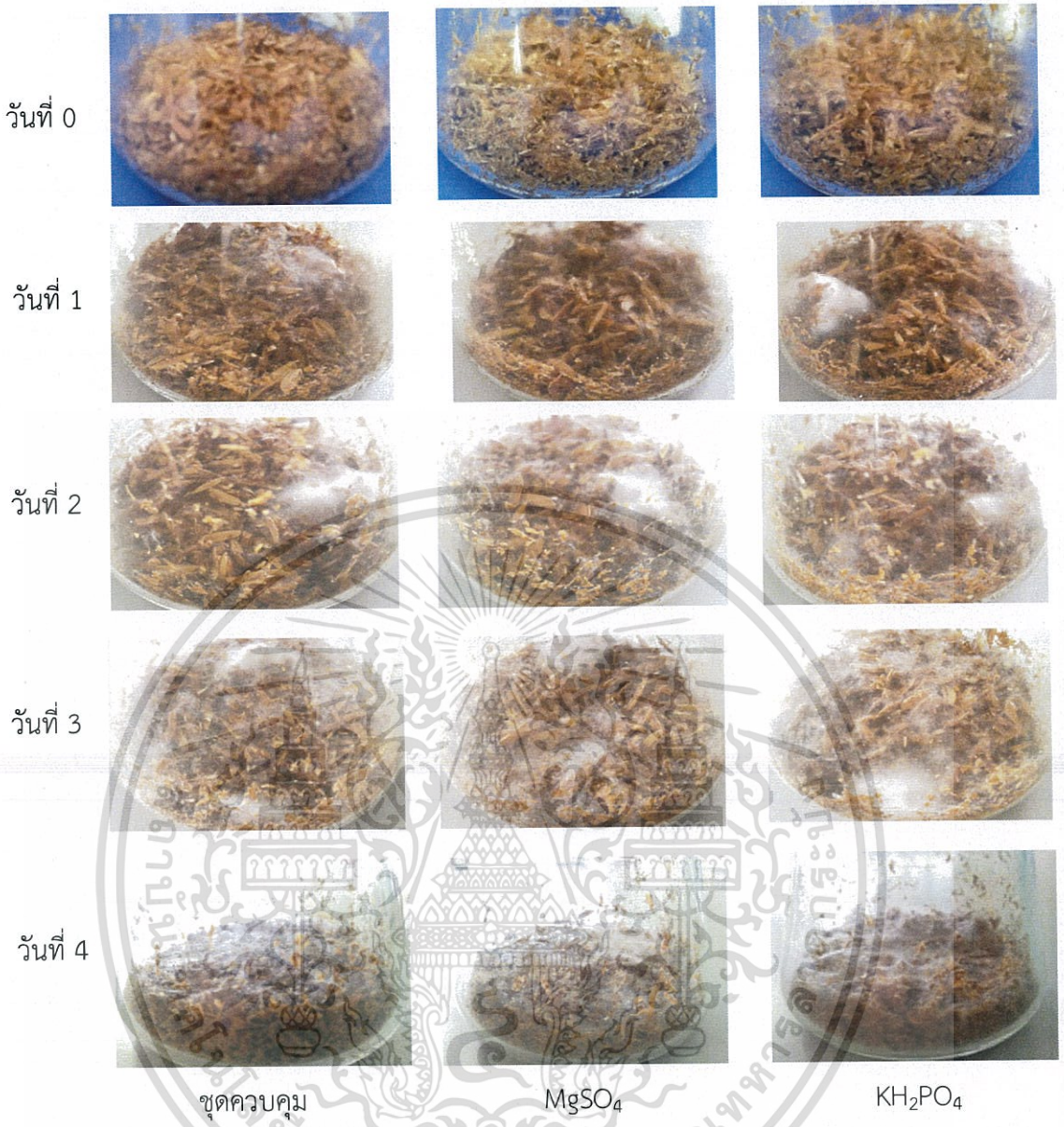
วัน	ชุดควบคุม ที่ไม่เติมไอออนโลหะ	แมกนีเซียมซัลเฟต	โพแทสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
0	ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา เหมือนกับชุดควบคุม	ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา เหมือนกับชุดควบคุม	ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา เหมือนกับชุดควบคุม
1	เชื้อราเจริญขึ้นมาที่ผิวหน้ารำข้าวเจ้าเป็นกลุ่มก้อนเส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย มีกลิ่นเหมือนรำข้าวเจ้าเปียก	เชื้อราเจริญขึ้นมาที่ผิวหน้ารำข้าวเจ้าเป็นกลุ่มก้อนเส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย มีกลิ่นเหมือนรำข้าวเจ้าเปียก	เชื้อราเจริญขึ้นมาที่ผิวหน้ารำข้าวเจ้าเป็นกลุ่มก้อนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่าชุดควบคุมและแมกนีเซียมซัลเฟต เส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย มีกลิ่นเหมือนรำข้าวเจ้าเปียก
2	เส้นใยเชื้อรามีการเจริญเพิ่มมากขึ้นซึ่งจะแผ่จากกลุ่มก้อนเชื้อราสีขาวออกมาบริเวณรอบข้างบนผิวหน้ารำข้าวเจ้าบางๆ และบริเวณด้านล่างฟลาสก์พบเส้นใยเชื้อราสีขาวเพียงเล็ก	เส้นใยเชื้อรามีการเจริญเพิ่มมากขึ้นซึ่งจะแผ่จากกลุ่มก้อนเชื้อราสีขาวออกมาบริเวณรอบข้างบนผิวหน้ารำข้าวเจ้าบางๆและแผ่กระจายได้มากกว่าชุดควบคุมบริเวณด้านล่างฟลาสก์พบเส้นใยเชื้อราสีขาวเพียงเล็กน้อย	เส้นใยเชื้อรามีการเจริญเพิ่มมากขึ้นซึ่งจะแผ่จากกลุ่มก้อนเชื้อราสีขาวออกมาบริเวณรอบข้างบนผิวหน้ารำข้าวเจ้าบางๆและแผ่กระจายได้มากกว่าชุดควบคุม บริเวณด้านล่างฟลาสก์พบเส้นใยเชื้อราสีขาวเพียงเล็กน้อย
3	เส้นใยเชื้อราเจริญครอบคลุมผิวหน้ารำข้าวเจ้าเพิ่มมากขึ้นปกคลุมรำข้าวเจ้า เส้นใยมีลักษณะสีขาว ฟูมาก และพบเส้นใยชอนไชลงไปจนถึงด้านล่างของฟลาสก์ มีกลิ่นของรำข้าวเปียกเพิ่มมากขึ้น	เส้นใยเชื้อราเจริญครอบคลุมผิวหน้ารำข้าวเจ้าเพิ่มมากขึ้นปกคลุมรำข้าวเจ้า เส้นใยมีลักษณะสีขาว ฟูมาก และพบเส้นใยชอนไชลงไปจนถึงด้านล่างของฟลาสก์ มีกลิ่นของรำข้าวเปียกเพิ่มมากขึ้น	เส้นใยเชื้อราเจริญครอบคลุมผิวหน้ารำข้าวเจ้าเพิ่มมากขึ้นปกคลุมรำข้าวเจ้า เส้นใยมีลักษณะสีขาวฟูมากกว่าชุดควบคุมและแมกนีเซียมซัลเฟต และพบเส้นใยชอนไชลงไปจนถึงด้านล่างของฟลาสก์ มีกลิ่นของ รำข้าวเปียกเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

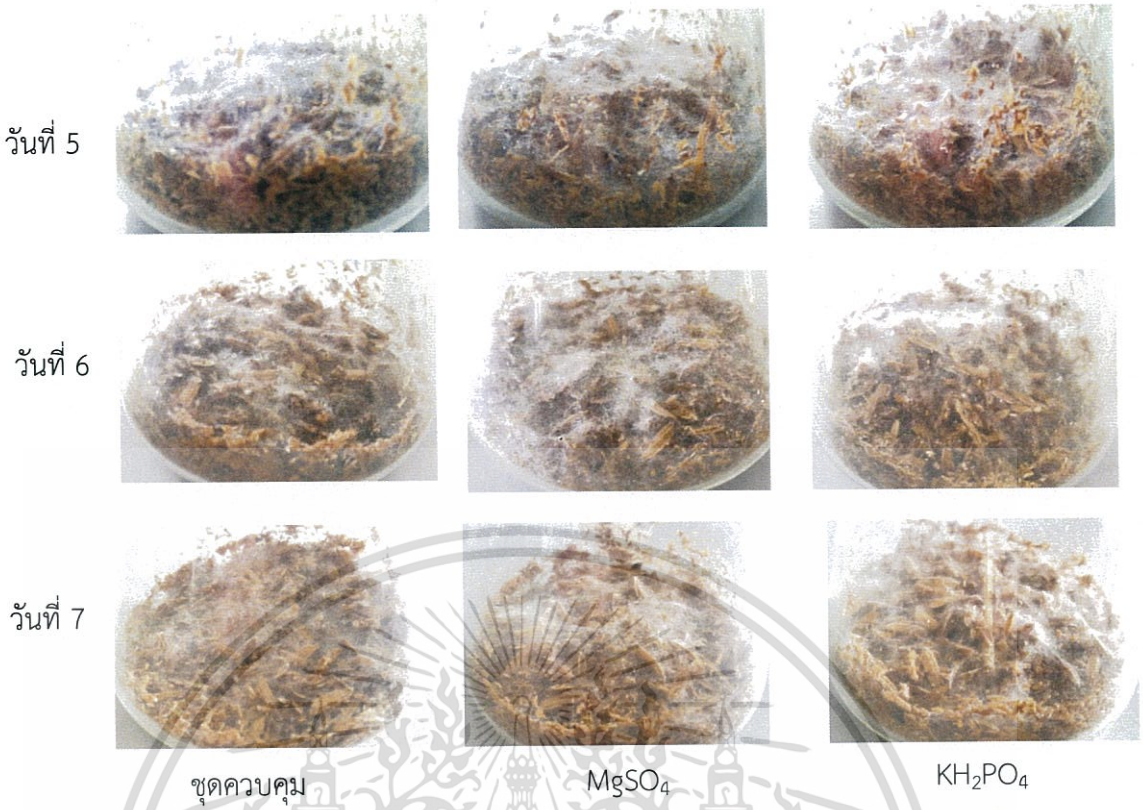
วัน	ชุดควบคุม ที่เติมไอออนโลหะ	แมกนีเซียมซัลเฟต	โพแทสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
4	การเจริญเส้นใยที่ผิวหน้ารำข้าวเจ้ายังคงเดิมพบการเจริญเพิ่มของเส้นใยรอบๆฟลาสก์ที่มี รำข้าวเจ้าติดอยู่และเส้นใยเชื้อราชอนไชรำข้าวเจ้าด้านล่างของฟลาสก์ได้มากขึ้น	การเจริญเส้นใยที่ผิวหน้ารำข้าวฟูมากกว่าชุดควบคุมและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟตพบการเจริญเพิ่มของเส้นใยรอบๆฟลาสก์ที่มีรำข้าวเจ้าติดอยู่และเส้นใยเชื้อราชอนไชรำข้าวเจ้าด้านล่างของฟลาสก์ได้มากขึ้น	การเจริญเส้นใยที่ผิวหน้ารำข้าวเจ้ายังคงเดิม พบการเจริญเพิ่มของเส้นใยรอบๆฟลาสก์ที่มีรำข้าวเจ้าติดอยู่และเส้นใยเชื้อราชอนไชรำข้าวเจ้าด้านล่างของฟลาสก์ได้มากขึ้น
5	ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นของเชื้อรา เส้นใยเชื้อราตรงบริเวณที่เป็นกลุ่มก้อนและทั่วรำข้าวเจ้ามีการยุบตัวลง กลิ่นรำข้าวสเจ้าเปียกอ่อนลงจากวันที่ 3	ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นของเชื้อรา เส้นใยเชื้อราตรงบริเวณที่เป็นกลุ่มก้อนและทั่วรำข้าวเจ้ามีการยุบตัวลง กลิ่นรำข้าวเจ้าเปียกอ่อนลงจากวันที่ 3	ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นของเชื้อรา เส้นใยเชื้อราตรงบริเวณที่เป็นกลุ่มก้อนและทั่วรำข้าวเจ้ามีการยุบตัวลง กลิ่นรำข้าวเจ้าเปียกอ่อนลงจากวันที่ 3
6	ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นของเส้นใยและเส้นใยเชื้อรายุบตัวลงอย่างเห็นได้ชัด	ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นของเส้นใยและเส้นใยเชื้อรายุบตัวลงน้อยกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะ	ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นของเส้นใย เส้นใยเชื้อรายุบตัวลงน้อยกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะ
7	เส้นใยเชื้อราบริเวณผิวหน้ารำข้าวเจ้ายุบตัวลงอย่างเห็นได้ชัด ไม่มีความฟูของเส้นใยเชื้อรา	เส้นใยเชื้อราบริเวณผิวหน้ารำข้าวเจ้ายุบตัวลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 6 และเส้นใยยุบตัวน้อยกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	เส้นใยเชื้อราบริเวณผิวหน้ารำข้าวเจ้ายุบตัวลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 6 และเส้นใยยุบตัวน้อยกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะ แต่มากกว่าแมกนีเซียม-ซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Amylomyces* spp. บนโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไอออนโลหะ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 (ต่อ)

4.3.2 ผลของไอออนโลหะต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า

การเติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียม-ไดไฮโดเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อค่าพีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ และความชื้นในโคจิรำข้าวเจ้า ดังตารางที่ 4.3

ผลของไอออนโลหะต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชพบว่า การเติมไอออนโลหะทั้ง 2 ชนิดและชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะมีแนวโน้มค่าพีเอชเพิ่มขึ้น จาก 5.29 เป็น 6.54 ไม่แตกต่างกัน ซึ่งเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสทำงานได้ดีที่พีเอช 5.0 – 7.0 (Amutha และ Jaya Priya, 2011) ผลของไอออนโลหะต่อการเปลี่ยนแปลงวอเตอร์แอคทิวิตี้ พบว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตมีค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้เริ่มต้นที่ 0.997 และมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่บ่ม และในวันที่ 7 มีค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ที่ 0.992 ขณะที่โพแทสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมโลหะไอออน พบว่ามีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในช่วงวันแรก และเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 7 มีค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ที่ 0.993 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ผลของไอออนโลหะต่อการเปลี่ยนแปลงความชื้น พบว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะไม่แตกต่างกันและมีความชื้นสูงสุดในวันที่ 1 อยู่ในช่วง 42.87-42.52 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงอยู่ในช่วง 33.47-35.16 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 พีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ และความชื้นของโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติม ไอออนโลหะ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

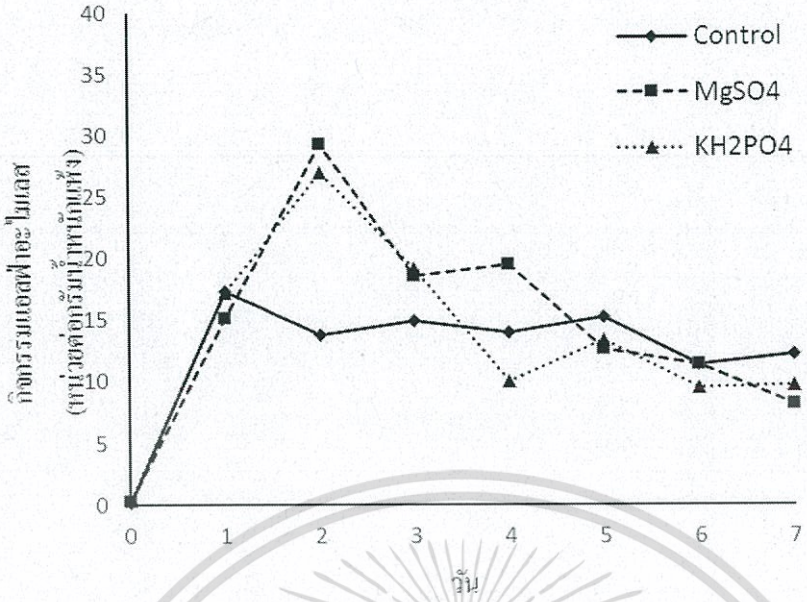
วัน	พีเอช (pH)			วอเตอร์แอคทิวิตี้ (AW)			ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)			กลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัม)		
	ชุดควบคุม	$MgSO_4$	KH_2PO_4	ชุดควบคุม	$MgSO_4$	KH_2PO_4	ชุดควบคุม	$MgSO_4$	KH_2PO_4	ชุดควบคุม	$MgSO_4$	KH_2PO_4
0	5.29±0.13	5.25±0.04	5.30±0.11	0.998±0.000	0.997±0.001	0.997±0.002	42.87±0.89	43.04±0.00	43.52±0.68	4.92± 1.17	5.10± 1.09	4.84± 0.99
1	4.94±0.15	5.14±0.43	5.01±0.28	0.993±0.001	0.995±0.002	0.994±0.004	43.33±0.40	43.32±1.52	44.13±2.68	5.05± 0.70	4.52± 0.97	4.57± 1.20
2	5.69±0.26	5.63±0.08	5.60±0.07	0.995±0.005	0.995±0.004	0.990±0.002	44.71±2.74	42.65±0.18	43.68±1.28	4.69± 0.79	5.67± 1.79	5.69± 2.10
3	5.93±0.09	5.97±0.06	6.12±0.08	0.995±0.004	0.995±0.004	0.995±0.003	43.31±1.09	42.47±0.94	42.46±2.29	4.84± 1.62	4.77± 1.34	4.45± 1.71
4	**5.66**±1.13	6.26±0.24	6.06±0.39	0.995±0.004	0.994±0.003	0.995±0.002	42.47±8.23	39.99±2.70	38.51±0.17	4.65± 0.94	4.57± 0.63	4.62± 1.39
5	5.93±0.46	6.31±0.09	6.35±0.00	0.993±0.001	0.994±0.003	0.994±0.001	38.18±0.11	37.70±1.64	37.61±0.49	4.69± 0.92	4.49± 0.74	4.83± 0.89
6	5.59±0.03	6.33±0.00	6.31±0.05	0.993±0.003	0.994±0.001	0.993±0.001	36.35±0.47	37.24±2.68	34.25±2.08	5.85± 2.56	5.68± 2.50	5.32± 2.23
7	6.50±0.12	6.45±0.04	6.54±0.04	0.993±0.001	0.992±0.004	0.993±0.001	35.16±2.29	36.08±0.09	33.47±3.41	5.17± 0.30	5.39± 0.21	5.53± 0.05

4.3.3 ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้า

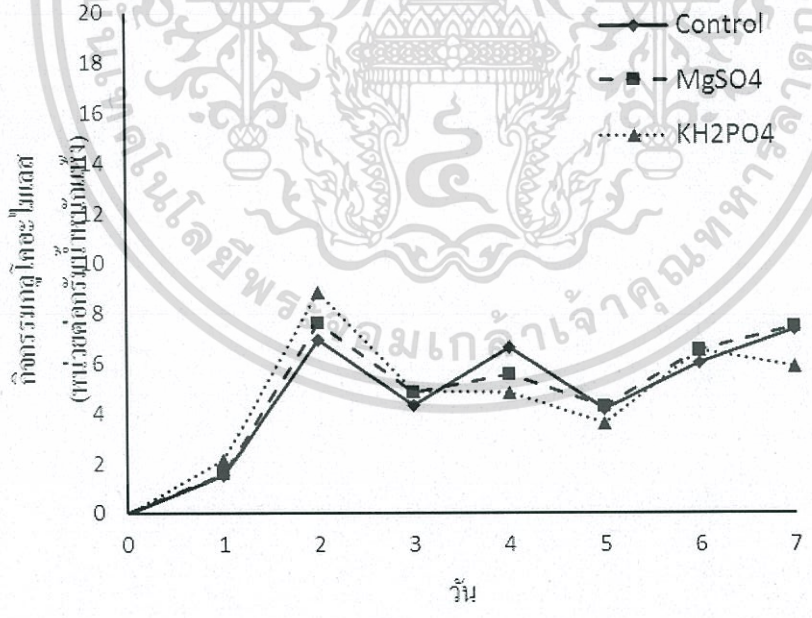
จากการศึกษาการเติมไอออนโลหะทั้ง 2 ชนิดคือ แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ลงในโคจิรำข้าวเจ้าบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดเอนไซม์จากโคจิรำข้าวเจ้าและวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสทุกวัน พบว่าในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน การเติมแมกนีเซียมซัลเฟตส่งผลให้เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ โพแทสเซียม และชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะ กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสใน โคจิรำข้าวเจ้าที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟตให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือ แมกนีเซียม-ซัลเฟตและชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะ และหลังจากวันที่ 2 – 7 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสมีแนวโน้มลดลงและกลูโคอะไมเลสมีแนวโน้มลดลงและเพิ่มขึ้นในช่วงหลัง (ภาพที่ 4.6 และ 4.7)

เมื่อเปรียบเทียบการเติมไอออนโลหะทั้งสองชนิดกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะ พบว่าการเติมไอออนโลหะส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงกว่าชุดควบคุม ในวันที่ 2 ของทุกไอออนโลหะมีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงที่สุด และชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะมีค่ากิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 1 และกลูโคอะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 7 โดยการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุดคือ 29.21 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกิจกรรมกลูโคอะไมเลส 7.56 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟตให้กิจกรรมกิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลส 26.98 หน่วยต่อน้ำหนักแห้ง และกิจกรรมกลูโคอะไมเลสสูงที่สุดคือ 8.84 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะมีกิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุด คือ 17.29 หน่อยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกิจกรรมกลูโคอะไมเลสสูงที่สุด คือ 7.32 เนื่องจากไอออนโหละสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราได้ ดังนั้นการเติมไอออนโลหะจึงช่วยในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (M. A. Naidu and P. Saranraj, 2013) งานวิจัยของ Amutha และ Jaya Priya (2011) ที่ทำการศึกษาผลของไอออนโลหะที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสบริสุทธิ์ พบว่าการเติม นิกเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2$) ให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสมากที่สุด รองลงมาคือ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.7 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสของโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมไอออนโลหะมีกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะ โดยการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุดคือ 29.21 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 68.94 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมกลูโคอะไมเลส 7.56 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟตให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 26.98 หรือเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 56.04 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมกลูโคอะไมเลส 8.84 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะมีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 17.29 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกลูโคอะไมเลส 7.32 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

5.1.1 จากการศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นของรำข้าวเจ้าโดยการเติมน้ำ 5, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร ต่อการเจริญของเชื้อราและกิจกรรมของเอนไซม์บนโคจิรำข้าวเจ้า พบว่าการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในโคจิรำข้าวเจ้าที่เติมน้ำ 7.5 มิลลิลิตร เชื้อราสามารถเจริญได้ทั่วผิวรำข้าวเจ้าและวันที่ 3 เชื้อรามีลักษณะเส้นใยฟู สีขาว และสามารถชอนไชลงในรำข้าวเจ้าได้ ส่งผลให้กิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลสสูงที่สุดในวันที่ 3 คือ 14.77 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีกิจกรรมกลูโคอะไมเลส 3.73 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือการเติมน้ำ 10 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยค่าพีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ ความชื้น และปริมาณกลูโคซามีน มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 สภาวะ

5.1.2 จากการศึกษาการเติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไอออนโลหะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในการผลิตโคจิรำข้าวเจ้า พบว่าการเติมไอออนโลหะส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูงขึ้น การเติมแมกนีเซียมซัลเฟตให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส สูงที่สุดในวันที่ 2 คือ 29.21 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือมีค่ากิจกรรมสูงกว่าชุดควบคุม 68.94 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคอะไมเลส 7.56 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือมีค่ากิจกรรมสูงกว่าชุดควบคุม 3.27 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้ค่ากิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลส 26.98 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือมีค่ากิจกรรมสูงกว่าชุดควบคุม 56.04 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคอะไมเลส 8.84 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือมีค่ากิจกรรมสูงกว่าชุดควบคุม 20.76 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมที่ไม่เติมไอออนโลหะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส 17.29 และ 7.32 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยค่าพีเอช วอเตอร์แอคทิวิตี้ ความชื้น และปริมาณกลูโคซามีน มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 สภาวะ

5.1.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโคจิรำข้าวเจ้าจากเชื้อ *Amylomyces* spp. คือการเติมปริมาณน้ำเริ่มต้น 7.5 มิลลิลิตร ในรำข้าวจ้าว ให้มีความชื้นเริ่มต้น 41.97 เปอร์เซ็นต์ และเติมไอออนโลหะแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสสและกลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ก่อนการเก็บรำข้าวเจ้า ควรนำไปรอบรำข้าวเจ้าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อป้องกันมอด จากนั้นแบ่งใส่ถุงซิปล๊อคตามปริมาณที่ต้องการใช้แต่ละครั้ง และนำเข้าตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

5.2.2 ในการศึกษาการเตรียมโคจิรำข้าวเจ้า ต้องใช้เทคนิคที่ปลอดเชื้อควบคุมสภาวะต่างๆไม่ให้เกิดการปนเปื้อน ตั้งแต่การถ่ายเชื้อรา การบ่มเลี้ยงเชื้อราในตู้บ่ม ตลอดจนควบคุมสภาวะในทุกขั้นตอนให้คงที่ เช่น ปริมาณเชื้อราเริ่มต้น และปริมาณน้ำที่เติมลงในรำข้าวจ้าว

5.2.3 ปริมาณความชื้นในโคจิรำข้าวเจ้า มีความสำคัญมากต่อการเจริญของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์ และต้องควบคุมความชื้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นควรทราบความชื้นของวัตถุดิบเริ่มต้นก่อน จากนั้นศึกษาหาปริมาณน้ำที่เติม และความชื้นเริ่มต้นเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา เพื่อคัดเลือกสภาวะที่มีความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราต่อไป

5.2.4 การวัดการเจริญของเชื้อราโดยวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนนั้น ต้องทำการสุ่มตัวอย่างโคจิรำข้าวเจ้ามาวิเคราะห์ให้เหมาะสมและเลือกวิธีที่เหมาะสมกับตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของเชื้อราที่เจริญในโคจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นภา โล่ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ: ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง.

นิรนาม. 2558. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักสาโท. [ออนไลน์] สืบค้นได้จาก: https://surathai.wordpress.com/2007 15 ตุลาคม 2558

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ, นิอร โฉมศรี และ ณัฐธญาณ์ ศรีสุวอ. 2558. เต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว. [ออนไลน์]. สืบค้นได้จาก: http://www.lartc.rmutl.ac.th/atri2/updown/%E0%B8%81% E0%B8% B2%E0%B8%A3%E0%B8%97%E0%B8%B3%E0%B9%80%E0%B8%95%E0%B9%89% E0% B8%B2...pdf. 18 ตุลาคม 2558

วีระสิทธิ์ กัลบากฤต, ภาสกร วิเวกพรมราช, สรวิศ ยอดอินทร์ และมังกร โรจน์ประภากร. 2558. ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่แปรผันตามขนาดการเพาะเลี้ยง. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Agro Industry Mae Fah Luang University. 2558. รำข้าว จากอาหารหมูสู่อาหารเพื่อสุขภาพของคน. [ออนไลน์] สืบค้นได้จาก: http://www.mfu.ac.th/school/agro2012/events/298 26 ตุลาคม 2558

Amutha, K. and Priya, K. Jaya. 2011. Effect of pH, temperature and metal ions on amylase activity from *Bacillus subtilis* KCX 006. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2 (Apr - June 2011): 407-413.

A.O.A.C. 2000. Official method of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washingtan, D.C. 1298

A.O.A.C. 1995. Official method of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washingtan, D.C. 1298

Naidu, M.A. and Saranraj P., . 2013. Bacterial amylase : a review. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. 4(2): 274-287.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shoji, B., Sugimoto, T., Hosoi, K., Shibata, K., Tanabe, M. and Kawatsura, K. 2007. Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable α-amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* NBRC4308. Journal Bioscience and Bioengineering. 103(2). 203-205.

Yasuda. M, Tachibana. S, Kuba-Miyara. M. 2012. Biochemical aspects of red koji and tofuyo prepared using *Monascus* fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 96(1): 49-60.

Yoshizaki, Y., Susuki, T., Takamine, K., Tamaki, H., Ito, K. and Sameshima Y. 2010. Characterization of glucoamylase and α-amylase from *Monascus anka*: enhanced production of α-amylase in red koji. Journal Bioscience and Bioengineering. 110 (6) : 670-674.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar สำเร็จรูป	39 กรัม
น้ำกรอง	1000 มิลลิลิตร

1. ชั่ง Potato Dextrose Agar สำเร็จรูป 39 กรัม
2. ละลายข้อที่ 1. ด้วยน้ำกรองปริมาตร 600 มิลลิลิตร
3. นำเข้าไมโครเวฟ ละลายจนสารละลายใส
4. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรอง
5. ปิเปตสารละลายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร
6. นำไปฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
7. นำมาวางบนพื้นเอง รอจนวุ้นอาหารแข็ง
8. เก็บเข้าให้ตู้แช่เย็น

ก2. การสกัดเอนไซม์ (Chuenjit et al, 2012)

ก2.1 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7

Stock 1 ชั่ง Sodium phosphate monohydrate 13.801 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

Stock 2 stock2 ชั่ง Sodium hydrogen phosphate 14.196 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

นำสารละลาย Stock 1 และ Stock 2 มาผสมกันจนได้พีเอช 7

ก3. การเตรียมสารเคมีเพื่อหากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (Fuwa, 1954)

ก3.1 เตรียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยเตรียมสาร stock1 ปิเปตแกลเซียล อะซีติก แอซิด 2.86 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร จดบันทึกพีเอชของสารละลาย เตรียมสาร stock2 ชั่งโซเดียมอะซีเตตไตรไฮดัส 6.8 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร จดบันทึกพีเอชของสารละลาย จากนั้นนำstock1และ stock2 มาผสมกันจนได้พีเอช 5

ก3.2 เตรียมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง soluble starch 0.5 กรัม ละลายด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5 นำเข้าไมโครเวฟจนน้ำแป้งเดือด ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ก3.3 เตรียมสารละลายไอโอดีน ชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 3-4 มิลลิลิตร เติมเกล็ดไอโอดีน 0.05 กรัม คนให้ละลาย ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายไอโอดีน 1 : 100 ก่อนใช้ โดยปิเปตสารละลายไอโอดีน 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก4. การสารเคมีเพื่อหากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

ก4.1 เตรียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยเตรียมสารstock1 ปิเปตแกลเซียล อะซีติก แอซิด 2.86 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร จดบันทึกพีเอชของสารละลาย เตรียมสารstock2 ชั่งโซเดียมอะซีเตตไตรไฮดัส 6.8 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร จดบันทึกพีเอชของสารละลาย จากนั้นนำstock1 และstock2 มาผสมกันจนได้พีเอช 4.5 และปริมาตรที่ต้องการ

ก4.2 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) เตรียมโดยละลาย DNS 20 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างลงไปทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ละลายในน้ำ 300 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันนำไปอังบนอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส แล้วเติมโพแทสเซียมทาเทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 600 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 2,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรเก็บในขวดสีชาที่อุณภูมิห้อง

ก4.3 เตรียมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง soluble starch 1.0 กรัม ละลายด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 4.5 นำเข้าไมโครเวฟจนน้ำแป้งเดือด ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ก5. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545 และ Blix, 1994)

ก5.1 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

ก5.2 เตรียมสารละลายอะซิติล อะซิโตน ชั่งโซเดียมไบคาร์บอเนต 13.04 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Ultrapure เติมอะซิติล อะซิโตน 4 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

ก5.3 เตรียม Enrlich reagent ชั่ง para-dimethylanimobenzaldehyde 1.6 กรัม ละลายด้วย เอทานอล 95% และ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์และกราฟมาตรฐาน

ข1. การวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (Fuwa, 1954)

ข1.1 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

กิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 1 หน่วย หมายถึงกิจกรรมเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ 1 มิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

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

โดยที่ B = ค่าดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ผ่านการต้มเพื่อหยุดปฏิกิริยา ที่ 700 นาโนเมตร

S = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 700 นาโนเมตร

dil_n = ค่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์

d = ปริมาตรน้ำที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

dry wt. = น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณหาค่าแอลฟ่าอะไมเลส

จากการศึกษาผลของกิจกรรมแอลฟ่าอะไมเลส จากการสกัดเอนไซม์จากรำข้าวสาลีที่บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เมื่อนำเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำแป้ง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร พบว่าเมื่อทำการเจือจางเอนไซม์ 20 เท่า (dil_n) ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา มีค่าเท่ากับ 0.3680 (B) ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่ผ่านการหยุดปฏิกิริยา มีค่าเท่ากับ 0.2900 (S) ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์ 50 มิลลิลิตร (d) และมีค่าน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง เท่ากับ 9.0569 กรัม (dry wt)

จากสูตร

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

แทนค่า

$$\text{หน่วยของเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลสต่อมิลลิลิตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(0.3680 - 0.2900) \times 20 \times 50}{0.3680 - 9.0569}$$

$$= 23.4028$$

ข2. การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

ข2.1 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส 1 หน่วยเท่ากับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น 1 มิลลิกรัม ใน 1 นาที ที่ พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง = $\frac{(Rs- Rs_0)x\ b\ xc\ xd}{Rs_s\ xe\ xt \times a \times Dry.wt}$

(หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

โดยที่ Rs = ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ย่อยละลายในน้ำแป้งเป็นเวลา 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)

t = เวลาที่เอนไซม์เกิดปฏิกิริยาในที่นี้คือ 10 นาที

Dry wt. = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณกิจกรรมของกลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาผลของกิจกรรมกลูโคอะไมเลสจากการสกัดเอนไซม์จากรำข้าวสาลีที่บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อนำเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับ DNS ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร พบว่าเมื่อทำการเจือจางเอนไซม์ 10 เท่า (c) ค่าที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ย่อยละลายในน้ำแป้งเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.1425 (Rs) ส่วนค่าที่วัดได้เมื่อหยุดกิจกรรมเอนไซม์ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาการย่อย มีค่าเท่ากับ 0.0355 (Rs_0) ค่าคงที่ที่ได้จากกราฟความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 0.665 (Rs_s) ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์ 50 มิลลิลิตร (d) และน้ำหนักแห้งของตัวอย่างโคจิในฟลาสก์ เท่ากับ 9.0569 กรัม (dry wt)

จากสูตร

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

(หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

แทนค่า

หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง = $\frac{(0.1425 - 0.0355) \times 4.5 \times 10 \times 50}{0.665 \times 1 \times 10 \times 1 \times 9.0479}$

(หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

= 4.0761

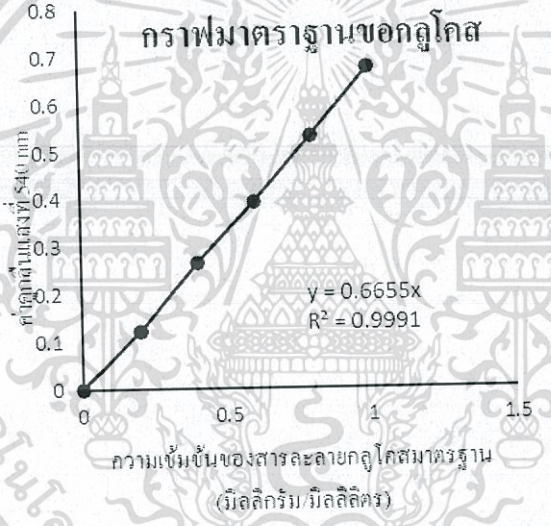
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปริมาตร นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นดังตารางภาคผนวก ข1. นำมาวิเคราะห์ แล้วจึงนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ข1.

ตารางที่ ข1. 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



ภาพภาคผนวกที่ ข1. กราฟมาตราฐานกลูโคส

ข3. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

ข3.1 การคำนวณความเข้มข้นของกลูโคซามีน

- 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

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 $C1V1 = C2V2$

  โดย C1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่มีอยู่ คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

  C2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ คือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

  V1 = ปริมาตรของสารละลายที่มีอยู่ที่ต้องใช้

  V2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ คือ 1 มิลลิลิตร

แทนค่า $V1 = \frac{(10 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}) \times (1 \text{ มิลลิลิตร})}{(100 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร})} = 0.1$ มิลลิลิตร

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

<u>ตัวอย่างการคำนวณปริมาณกลูโคซามีน</u>

จากการศึกษาผลของการเจริญของเชื้อรา *Amylomyces* spp. โดยวัดการเจริญของเชื้อราจากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนจากโคจิข้าวสาลี บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 0.358 น้ำหนักแห้งของตัวอย่างโคจิที่ผ่านการอบ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ 0.5013 กรัม และค่าความชันของกราฟมีค่าเท่ากับ 0.0142

จากสูตร

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

แทนค่า

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีน} = \frac{0.358}{0.0142} \times 100 = 2521.1267 \text{ µg/100ml}$$

เมื่อน้ำหนักโคจิแห้งมีค่า 0.5005 กรัม ดังนั้น

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีน} = \frac{2521.1267}{0.5013} = 5029.1775 \text{ µg/g dry wt.}$$

$$= \frac{5029.1775}{1000} = 5.0292 \text{ mg/g}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

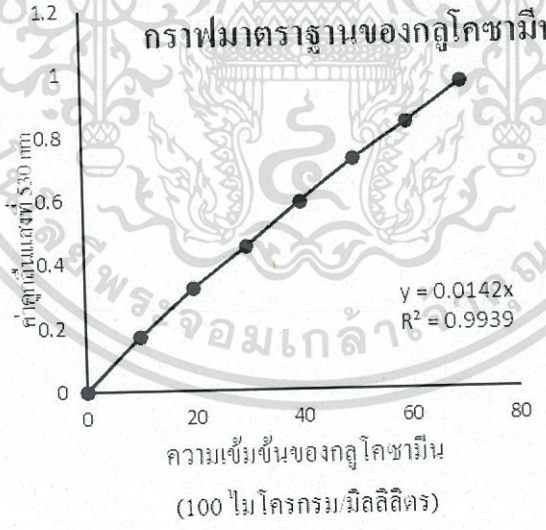
ข3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคซามีน

เตรียมสารละลายกลูโคซามีนที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายกลูโคซามีน 0.005 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์สูง ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร นำสารละลายมาตราฐานกลูโคซามีนมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังตารางภาคผนวก ข 2. นำมาวิเคราะห์แล้วจึงนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ข2.

ตารางภาคผนวกที่ ข2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน

ความเข้มข้นของกลูโคซามีน (100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำบริสุทธิ์สูง (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกลูโคส (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	0.1
100	1.0	0.0

ที่มา : สุมัลลิกา (2545)

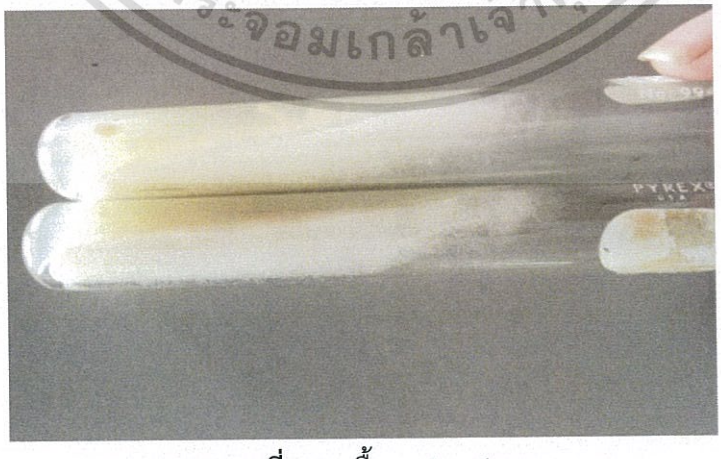


ภาพที่ ข2. กราฟมาตรฐานกลูโคซามีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ภาพผลการทดลอง

ภาพภาคผนวกที่ ค1. รำข้าวเจ้าหยาบ (ก) และรำละเอียด (ข).



ภาพภาคผนวกที่ ค.2 เชื้อรา *Amylomyces* spp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล คณิศร รอดการทุกข์

วัน เดือน ปี เกิด 10 สิงหาคม 2537

ประวัติการศึกษา พ.ศ.2540- 2548 ศึกษาระดับชั้นอนุบาล 1 จนถึงประถมศึกษาชั้นปีที่ 6

โรงเรียนปัฐวิกรณ์วิทยา

พ.ศ.2549-2554 ศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1จนถึงปีที่ 6

โรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี)๒

พ.ศ.2555-2558 ศึกษาระดับปริญญาตรี

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงาน ฝึกงานที่บริษัท เนสท์เล่ (ไทย) จำกัด

และผลงานวิจัย ปัญหาพิเศษเรื่องผลของความชื้นและไอออนโลหะบางชนิดในการผลิตโคจิจากรำข้าวเจ้า

ชื่อ-นามสกุล สุธินันท์ สมศรี

วัน เดือน ปี เกิด 6 พฤศจิกายน 2536

ประวัติการศึกษา พ.ศ.2540- 2548 ศึกษาระดับชั้นอนุบาล 1 จนถึงประถมศึกษาชั้นปีที่ 6

โรงเรียนสุขเจริญผล

พ.ศ.2549-2554 ศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1จนถึงปีที่ 6

โรงเรียนราชวินิตบางแก้ว

พ.ศ.2555-2558 ศึกษาระดับปริญญาตรี

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงาน ฝึกงานที่บริษัท ไทยสพิริท อินดัสทรี จำกัด

และผลงานวิจัย ปัญหาพิเศษเรื่องผลของความชื้นและไอออนโลหะบางชนิดในการผลิตโคจิจากรำข้าวเจ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้