การผลิตกลูโคอะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นจากเชื้อ *Aspergillus awamori* ATCC 22342

PRODUCTION OF GLUCOAMYLASE FROM TAPIOCA FLOUR AND CASSAVA BY *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เทียรชัย ชางฉงาเวช

THAINCHAI CHANGCHARWATCH

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-15-1164-7

การผลิตกลูโคอะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นจากเชื้อ *Aspergillus awamori* ATCC 22342

PRODUCTION OF GLUCOAMYLASE FROM TAPIOCA FLOUR AND CASSAVA BY *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เทียรชัย ชาญสง่าเวช
THAINCHAI CHANGCHARWATCH

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2547

ISBN 974 – 15 – 1164 - 7

PRODUCTION OF GLUCOAMYLASE FROM TAPIOCA FLOUR AND CASSAVA BY *Aspergillus awamori* ATCC 22342

THAINCHAI CHANGCHARWATCH

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT 'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2004

ISBN 974 – 15 – 1164 - 7

COPYRIGHT 2004
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT 'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกลูโคอะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นจากเชื้อ *Aspergillus awamori* ATCC 22342
นักศึกษา	นาย เทียรชัย ชาญสง่าเวช
รหัสประจำตัว	42065208
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อใช้เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงกว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ส่วนการหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α-amylase) ที่ใช้ย่อยเพื่อผลิตเด็กทริน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ร้อยละ 5 และความเข้มข้นเอนไซม์ Termanyl (α-amylase)ที่ร้อยละ 0.1 จะให้ผลผลิตเด็กทรินสูงที่สุด คือ ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์เท่ากับ 17.63

ส่วนการหาระยะเวลาการย่อยและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทริน พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาการย่อย 30 นาทีและอุณหภูมิการบ่มเป็น 40 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเด็กทรินสูงที่สุด คือ ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์เท่ากับ 19.61

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 คือ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น $4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ระยะเวลาการบ่มคือ 5 วัน เติมแอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.007 เป็นแหล่งเกลือแร่

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต้องใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 วีวีเอ็ม

การแยกและการทำให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์บางส่วน ได้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 89.90 เมื่อผ่านขั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80

และร้อยละ 67.99 เมื่อผ่านขั้นไดอะไลซีส ซึ่งคิดเป็นความบริสุทธิ์ 1.72 และ 3.98 เท่า ตามลำดับ

ในส่วนการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำเชื่อม หลังจากนั้นนำน้ำเชื่อมไปหมักแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับกากน้ำตาล พบว่าน้ำเชื่อมที่ผลิตได้นั้นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 สามารถใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกับกากน้ำตาล โดยมีค่าดีกรีสุดท้ายใกล้เคียงกัน คือ 7.25 ในกรณีของน้ำเชื่อมและ 7.15 ในกรณีของกากน้ำตาล

Thesis title	Production of glucoamylase from tropica flour and cassava by *Aspergillus awamori* ATCC 22342
Student	Mr. Thainchai Changcharwatch
Student ID	42065208
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Chujan

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study about glucoamylase produces from tropica flour and cassava by *Aspergillus awamori* ATCC 22342. The results were as follows : dextrin from tropica flour was the best carbon source. The optimal concentration of the tropica flour was 5% and 0.1% concentration of enzyme Termanyl (α- amylase) for glucoamylase production. The dextrose equivalent obtained was 17.63. Digestion time and temperature for dextrin production were 30 minute and 40^{o}C respectively. The dextrose equivalent obtained was 19.61. The optimal condition for glucoamylase production by *Aspergillus awamori* ATCC 22342 were : 4 x10^{6} cells/ ml and 4 ml of the initial inoculum size, incubated at 35 ^{o}C The initial pH was 5.0 for 5 days of incubation by adding 0.05% NH_4NO_3 for nitrogen source and 0.007% $MgSO_4$ for mineral salt.

In a 5 liters fermenter, production of glucoamylase was maximized at 200 rpm of the agitation speed and 0.2 vvm of the aeration rate. Glucoamylase was partially purified by precipitation with 80% ammonium sulfate and dialysis. The yield of glucoamylase were 89.90% and 67.99% respectively. The enzyme was purified up to 1.72 and 3.98 folds of initial activity respectively.

Comparision between glucose syrup from glucoamylase hydrolysis of tropica flour and molasses for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90., it was found that the final degree of alcohol from glucose syrup and molasses were 7.25 and 7.15 respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์ ประธานคณะกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา ดร. บุญเทียม พันธ์เพ็ง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา และรองศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ สั่งสอน ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณบริษัท แสงโสม จำกัด โดยเฉพาะ ดร.เจริญ สิริวัฒนภักดี และคุณหญิงวรรณนา สิริวัฒนภักดี ที่ให้ทุนการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณพระคุณ คุณแม่ พี่สาว น้องสาวและคุณพ่อที่คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

สุดท้ายขอขอบคุณฉัตรชัย สุวรรณรัตนกุล ในการเรียบเรียงและตรวจทานเอกสาร สำหรับคุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

เทียรชัย ชาญสง่าเวช

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ..... IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....XI

สารบัญรูป.....XV

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตการวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ความสำคัญของมันสำปะหลัง.....4

2.2 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง.....6

2.3 อายุและฤดูการเก็บเกี่ยว.....6

2.4 การย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล.....7

2.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง.....9

2.5.1 เอนไซม์เอนโด-อะไมเลส(endo-amylase).....9

2.5.2 เอนไซม์เอ็กโซ-อะไมเลส(exo-amylase).....9

2.5.3 เอนไซม์ดีบรานชิงค์(debrancing enzyme).....10

2.6 กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์.....11

2.6.1 การทำให้แป้งเหลว.....12

2.6.2 การเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาล.....12

2.7 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน.....14

2.7.1 กลุ่มเอนไซม์เพื่อลิคิวแฟคชัน.....14

2.7.2 กลุ่มเอนไซม์เพื่อการแซคคาริฟิเคชัน.....15

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.7.2.1 การย่อยเพื่อให้ได้น้ำเชื่อมชนิดที่มีค่าเด็กโทรส อิควิวาเลนซ์ระหว่าง 38-42.....15

2.7.2.2 การย่อยเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์สูง(ค่าเด็กโทสอิควิวาเลนซ์สูงกว่า 95).....15

2.8 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....16

2.8.1 คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....16

2.8.2 แหล่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....16

2.8.3 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....17

2.8.4 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์.....18

2.8.5 อุณหภูมิ พีเอช และเกลือแร่ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....20

2.8.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....22

2.8.6.1 แหล่งคาร์บอน.....22

2.8.6.2 แหล่งไนโตรเจน.....23

2.8.6.3 เกลืออนินทรีย์.....23

2.9 ปัจจัยสำคัญในการควบคุมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะอาหารเหลว..23

2.10 การแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์.....24

2.10.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....25

2.10.1.1 การตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....25

2.10.1.2 การทำ dialization.....27

2.10.1.3 การกำจัดสี.....28

2.11 อิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์.....28

2.11.1 อิทธิพลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์.....28

2.11.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์.....29

2.12 รูปแบบการเตรียมกลูโคอะไมเลสในทางการค้า.....29

2.13 กากน้ำตาล.....29

2.13.1 Blackstrap molasses.....30

2.13.2 Hightest molasses.....30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.14 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์.....31
2.14.1 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์.....32
2.14.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักแอลกอออล์โดยยีสต์.....34

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....35
3.1 อุปกรณ์การทดลอง.....35
3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....36
3.3 จุลินทรีย์.....37
3.3.1 *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....37
3.4 วัตถุดิบ.....37
3.4.1 แป้งมันสำปะหลัง.....37
3.4.2 มันเส้น.....37
3.5 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....37
3.5.1 อาหาร potato dextrose agar.....37
3.5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อราสำหรับผลิตเอนไซม์.....37
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....37
3.6.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....37
3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α-amylase) เพื่อการผลิตเด็กทริน...38
3.6.3 การศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเด็กทริน.....39
3.6.4 การหาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม.....40
3.6.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....40
3.6.6 การศึกษาผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....41
3.6.7 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6.8 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....42

3.6.9 การศึกษาชนิดของเกลือแร่และความเข้มข้นของเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....42

3.6.10 การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....43

3.6.11 การศึกษาผลของอัตราการให้อากศและความเร็วรอบของการกวนในระดับถังหมักขนาด 5ลิตรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....44

3.7 การวางแผนการทดลองทางสถิติ.....45

3.8 การศึกษาการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....45

3.8.1 การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....45

3.8.2 การแยกและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน.....46

3.8.2.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....46

3.8.2.2 การกำจัดเกลือโดยการทำไดอะไลซีส.....46

3.9 การศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90.....46

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....48

4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....48

4.1.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์Termanyl(α-amylase)เพื่อการผลิตเด็กทริน.....50
4.1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทริน 51
4.1.4 ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม.....53
4.1.5 ผลการศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....55
4.1.6 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....56
4.1.7 ผลการศึกษาค่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....57
4.1.8 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....58
4.1.9 ผลการศึกษาชนิดของเกลือแร่และความเข้มข้นของเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....60
4.1.10 ผลการศึกษาอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....61
4.2 ผลการศึกษาการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....63
4.2.1 ผลการศึกษาการตกตะกอนด้วยเอมโมเนียมซัลเฟต.....63
4.2.2 ผลการศึกษา การกำจัดเกลือโดยการทำไดอะไลซีส.....64
4.3 ผลการศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc- 90.....65

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....68

บรรณานุกรม.....69

ภาคผนวก.....77
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....77
ภาคผนวก ข น้ำยาเคมีและวิธีการวิเคราะห์.....78
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan New Multiple-Range Test (DMRT)
ที่ระดับความเชื่อมั่นมั่น 0.01.....92
ภาคผนวก ง ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน.....96

ประวัติผู้เขียน.....97

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ปริมาณการผลิตมันสำปะหลังระหว่างปี 2529-2533.....4

2.2 ปริมาณการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทยปี 2534-2541.....5

2.3 องค์ประกอบของมันสำปะหลัง.....6

2.4 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....21

2.5 ปัจจัยสำคัญสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็งและอาหารเหลว.....24

2.6 การทดลองตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีร้อยละความอิ่มตัวในช่วงต่างๆ.....26

2.7 ช่วงร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....27

2.8 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลอ้อย.....30

2.9 วิตามินที่พบในกากน้ำตาลอ้อย.....31

3.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิด ได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง.....38

3.2 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและความเข้มข้นของเอนไซม์ในการผลิตเด็กทริน.....39

3.3 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินของแป้งมันสำปะหลังและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน.....40

3.4 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียลทดสอบปัจจัย2ชนิดคือปริมาณสปอร์เริ่มต้นและปริมาณมิลลิลิตรของสปอร์เริ่มต้นที่ใส่ลงไป.....41

3.5 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือชนิดแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน.....43

3.6 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือชนิดแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่.....44

3.7 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคืออัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน.....45

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิด ได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง.....49

4.2 แสดงค่า D.E. ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 5 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินตั้งแต่ร้อยละ 0.1ถึงร้อยละ 0.3....50

4.3 ค่า D.E. ที่ได้จากการแปรผันที่ใช้ในเวลาการผลิตเด็กทรินและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน.....52

4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้นและมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไปเพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก.....53

4.5 ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก.....55

4.6 ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก.....56

4.7 ค่าระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....58

4.8 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก.....59

4.9 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยทดสอบปัยจัยสองชนิด คือ ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก.....60

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบการกวนเพื่อศึกษาการแปรผันอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก.....62

4.11 ผลการแยกและการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 4 วัน.....65

4.12 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จาการหมักแอลกอฮอล์ โดยใช้น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....66

4.13 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จาการหมักเอธานอล โดยใช้กากน้ำตาล.....66

4.13 การใช้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังผลิตแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับกากน้ำตาล.....67

ข.1 ค่าแฟกเตอร์เมื่อใช้สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและสารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรทอย่างละ 5 มิลลิลิตรเป็นสารละลายมาตรฐาน ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร.....86

ข.2 การเตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ.....90

ค.1 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....92

ค.2 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมโดยมี 2 ปัจจัยได้แก่ ปริมาณสปอร์และมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไปที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....92

ค.3 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....93

ค.4 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....93

ค.5 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของเระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....94

ค.6 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยมี 2 ปัจจัยได้แก่ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....94

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค.7 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมโดยมี 2 ปัจจัยได้แก่ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....95

ค.8 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของการผลิตกลูโคอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมี 2 ปัจจัยได้แก่ ความเร็วรอบการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....95

ง.1 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน.....96

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของอะไมโลส	8
2.2	โครงสร้างของอะไมโลเปกติน	8
2.3	กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสในการย่อยแป้ง	13
2.4	แสดงกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน	14
	ลของแป้งข้าวโพดต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสโดย *Aspergillus awamori* NRRL 3112	22
2.6	การหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์ผ่านวิถีไกโคไลซีส	33
4.1	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิด ได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง	49
4.2	ค่า D.E. ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งร้อยละ 1 ถึง ร้อยละ 5 และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินตั้งแต่ร้อยละ 0.1ถึง ร้อยละ 0.3	51
4.3	ค่า D.E. ที่ได้จากการแปรผันที่ใช้ในเวลาการผลิตเด็กทรินและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน	52
4.4	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้นและมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไปเพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342	54
4.5	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342	59
4.6	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยทดสอบปัยจัยสองชนิด คือ ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342	61

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.7 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบการกวนเพื่อศึกษาการแปรผันอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342.....63

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ในปัจจุบันการผลิตและการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหารและ เครื่องดื่มมีความสำคัญมากทั้งนี้ เพราะการใช้เอนไซม์ จะช่วยลดต้นทุนการผลิตและ สามารถควบคุมกรรมวิธีการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นการนำเอนไซม์เข้าไปช่วยในปฏิกิริยาต่างๆเอนไซม์จะช่วยเร่งการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบให้เป็น ผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่รุนแรงและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่เราไม่ต้องการในขบวนการผลิต

เนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทแป้งที่มีราคาถูก เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพดอยู่มาก ตามสถิติของผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย

ในส่วนของมันสำปะหลัง ในปี พ.ศ. 2539 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 7.885 ล้านไร่ ผลผลิต 17.388 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,205 กิโลกรัม ในปี พ.ศ.2540 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 7.831 ล้านไร่ ผลผลิต 18.088 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,310 กิโลกรัม ในปี พ.ศ. 2541 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 6.99 ล้านไร่ ผลผลิต 15.96 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,282 กิโลกรัม ในปี พ.ศ. 2542 พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 7.02 ล้านไร่ ผลผลิต 16.69 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,378 กิโลกรัม

ด้านราคาในปี พ.ศ. 2539 ราคาหัวมันสำปะหลังที่เกษตรกรขายได้ทั้งประเทศ ปี พ.ศ. 2539 เฉลี่ยกิโลกรัมละ 0.84 บาท การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 3.5 ล้านตัน มูลค่า 11,500 ล้านบาท สำหรับแป้งมันสำปะหลัง มีปริมาณ 0.85 ล้านตัน มูลค่า 7,300 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2539)

ในปี พ.ศ. 2540 การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 3.850 ล้านตัน มูลค่า 10,800 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2540)

ด้านราคาในปี พ.ศ. 2541 ราคาหัวมันสำปะหลังที่เกษตรกรขายได้ทั้งประเทศ ปี พ.ศ. 2541 เฉลี่ยกิโลกรัมละ 0.71 บาท การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 3.486 ล้านตัน มูลค่า 19,525 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2541)

ด้านราคาในปี พ.ศ. 2542 ราคาหัวมันสำปะหลังที่เกษตรกรขายได้ทั้งประเทศ ปี พ.ศ. 2542 เฉลี่ยกิโลกรัมละ 0.85 บาท การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น,มันอัดเม็ด) มีปริมาณ 4.17 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2542)

ในปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยมีการส่งออกมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกไปสู่ต่างประเทศเป็นปริมาณ 4,676,213 ตัน มีมูลค่า 20,280,129,000 ล้านบาท (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2543)

ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตและ การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบประเภทแป้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส อาจช่วยลดต้นทุนการผลิต และปริมาณการนำเข้าของเอนไซม์ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้เกิดอุตสาหกรรมหลากหลายขึ้นในประเทศอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเด็กทรินซ์ จากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นโดยใช้เอนไซม์ อัลฟาอะไมเลส (Termanyl)

1.2.2 เพื่อศึกษาหาสภาวะและ ปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคอะไมเลส จากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

1.2.3 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกากน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้นำตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณสูง ทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เกิดขึ้น โดยวัดในรูปของ ปริมาณของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สะสม ระหว่างกระบวนการหมักสามารถวิเคราะห์โดยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิค (Dinitrosalicylic acid) ของ Ueda และคณะ (1981) จากนั้นนำเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 มาศึกษาสภาวะที่เหมาสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพื่อดูศักยภาพสูงสุดใน การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยวัดการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ด้วยการหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี ของ Lowry และคณะ (1951) ต่อจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ผลิตได้ (crude enzyme) มาทำการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน จากนั้นนำเอนไซม์ย่อยแป้งเปลี่ยนน้ำตาล แล้วนำไปทำการหมักแอลกอฮอล์ โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 เปรียบเทียบกับแหล่งวัตถุดิบเป็นกากน้ำตาล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ที่ทำการศึกษา

1.4.2 เป็นแนวทางในการใช้วัตถุดิบราคาถูกที่มีอยู่ในประเทศเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า ซึ่งเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต

1.4.3 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนมีการแยกสารเจือปนออกไปบางส่วนทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

1.4.4 เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงขึ้นไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของมันสำปะหลัง (Manihot esculenta Crrantz)

มันสำปะหลังเป็นพืชอาหาร ที่สำคัญของโลกเป็นอันดับ 5 รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวและมันฝรั่ง โดยเฉพาะประเทศเขตร้อน ประเทศต่าง ๆ ในทวีปอัฟริกา และทวีปอเมริกาใต้ ส่วนในทวีปเอเชียประเทศอินโดนีเซียและอินเดีย มีการบริโภคมันสำปะหลังเป็นจำนวนมาก ปริมาณการผลิตในปี พ.ศ. 2529-2533 ทั่วโลกผลิตได้ 133.20-157.66 ล้านตัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณการผลิตมันสำปะหลังระหว่างปี พ.ศ. 2529- 2533 (ล้านตัน)

ทวีป	ปีพ.ศ.				
	2529	2530	2531	2532	2533
อัฟริกา	58.05	58.37	67.01	72.92	73.31
อเมริกาเหนือ-กลาง	2.14	2.20	2.29	2.22	2.18
อเมริกาใต้	25.62	23.46	21.67	23.62	24.61
เอเชีย	42.89	47.65	52.32	54.64	51.45
อื่น ๆ	4.50	5.12	5.43	5.72	6.10
รวมทั้งโลก	133.20	136.80	148.72	159.12	157.66

ที่มา : ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง (2537)

มันสำปะหลังที่ผลิตได้ในแต่ละปีนั้นปริมาณร้อยละ 60 ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ร้อยละ 27.5 ใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ และร้อยละ 12.5 ใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ

จากสถิติปี พ.ศ. 2533 ประเทศที่ผลิตมันสำปะหลังได้มากที่สุดของโลก คือ ประเทศไนจีเรีย ผลิตได้ 26.0 ล้านตัน รองลงมา คือ ประเทศบราซิล 24.6 ล้านตัน ประเทศไทย ผลิตได้มากเป็นอันดับสาม 20.7 ล้านตัน ซึ่งในประเทศไทยมันสำปะหลังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก มีพื้นที่ปลูกมากเป็นอันดับ 4 รองจากข้าว ข้าวโพด และ ยางพารา

ผลผลิตมันสำปะหลังภายในประเทศเกือบทั้งหมดได้นำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรม คือ ประมาณร้อยละ 70 ใช้ทำเป็นมันเส้นและมันอัดเม็ด อีกร้อยละ 30 ใช้แปรรูปเป็นแป้ง(ตารางที่ 2.2) ผลิตภัณฑ์แป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการแปรรูปนี้เป็นสินค้าที่สำคัญของประเทศทำรายได้ให้ประเทศมากถึง 23,173.8 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2534 โดยปริมาณการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทยระหว่าง ปี พ.ศ. 2534-2541 แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2534-2541

ปี พ.ศ.	ผลิตเพื่อ				รวมทั้งสิ้น	
	ใช้ภายในประเทศ		ส่งออกต่างประเทศ			
	แป้ง	หัวมันสดที่ใช้	แป้ง	หัวมันสดที่ใช้	แป้ง	หัวมันสดที่ใช้
2534	559,000	2,795,000	860,681	4,303,405	1,149,681	7,098,405
2535	615,810	3,079,050	946,749	4,733,745	1,562,559	7,812,795
2536	680,358	3,401,790	1,041,422	5,207,110	1,721,780	8,608,900
2537	754,004	3,770,020	936,390	4,681,950	1,690,394	8,451,970
2538	723,269	3,435,527	857,852	4,074,797	1,581,121	7,510,324
2539	759,434	3,607,311	905,136	4,299,396	1,664,570	7,906,707
2540	770,000	3,657,500	1,115,738	5,489,755	1,925,738	9,147,255
2541	650,000	3,087,500	784,835	3,727,966	1,434,835	6,185,466

ที่มา : กล้าณรงค์ (2542)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกมากที่สุดในโลก ทั้งนี้เพราะประเทศ ที่ผลิตมันสำปะหลังได้มาก ๆ คือ ไนจีเรีย บราซิล และประเทศอื่น ๆ ผลิตมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นอาหารของพลเมืองภายในประเทศ ส่วนประเทศไทยใช้มันสำปะหลังเพื่อบริโภคน้อยมาก ประเทศที่ไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันอัดเม็ดไปขายมากที่สุด คือ ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป หรือ EEC (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน และ โปรตุเกส) เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น ส่วนในรูปของแป้งมันสำปะหลังประเทศไต้หวันสั่งซื้อมากที่สุด รองลงมาคือ ญี่ปุ่น สหภาพโซเวียต สหรัฐอเมริกา สิงคโปร์ ฮ่องกง ฯลฯ

2. 2 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง ซึ่งวิเคราะห์ในรูปส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัมของมันสำปะหลังสดมีองค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	เจริญศักดิ์ (2532)	Balagopalan และคณะ (1988)	Beynum และ Roles (1985)
ความชื้น (ร้อยละ)	63.28	59.40	66.00
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	29.73	38.10	38.10
โปรตีน (ร้อยละ)	1.18	0.70	1.00
ไขมัน (ร้อยละ)	0.08	0.30	0.30
เถ้า (ร้อยละ)	0.85	1.00	*
เยื่อใย (ร้อยละ)	0.99	0.60	1.00
โปตัสเซียม (mg/kg)	0.26	*	*
ฟอสฟอรัส (mg/kg)	0.04	4.00	*
กรดไฮโดรเจน (ppm)	173	15-400	*
วิตามินซี (ร้อยละ)	*	252	*

หมายเหตุ * ไม่มีการรายงาน

ที่มา: กล้าณรงค์ (2542)

2.3 อายุและฤดูการเก็บเกี่ยว

มันสำปะหลังเป็นพืชไร่ที่ได้เปรียบพืชไร่ชนิดอื่น ๆ คือ สามารถยืดหยุ่นอายุเก็บเกี่ยวได้ จากที่มีผู้ทำการศึกษา พบว่ามันสำปะหลังจะเริ่มมีหัวเมื่ออายุประมาณ 3 เดือนเป็นต้นไป หัวจะเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ โดยการสะสมแป้งมากขึ้น และหลังจาก 6 เดือนไปแล้ว เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวมันจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แต่ปริมาณแป้งจะเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักหัวสดเพิ่มขึ้นจาก 1.2 ตันต่อไร่ เมื่ออายุ 6 เดือน เป็น 4.1 ตันต่อไร่ เมื่ออายุ 12 เดือน และ 7.2 ตันต่อไร่ เมื่ออายุ 16 เดือน เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละพบว่าการเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 6 เดือน ได้ผลผลิตเพียงร้อยละ 29 หรือ

ประมาณ 1 ใน 3 ของผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยวอายุ 12 เดือน และการเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 8 และ 10 เดือน ก็ได้ผลผลิตเพียงร้อยละ 46 และร้อยละ 70 ของผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุ 12 เดือน และเมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุมากกว่า 12 เดือน ก็พบว่าผลผลิตยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังเมื่ออายุ 12 เดือน จะได้ผลผลิตสูงขึ้น แต่จะทำให้การปลูกรุ่นต่อไปไม่ตรงกับฤดูกาลที่เหมาะสม และหัวมันจะมีขนาดใหญ่ มีเยื่อใย (fiber) มาก ตลาดไม่ต้องการ

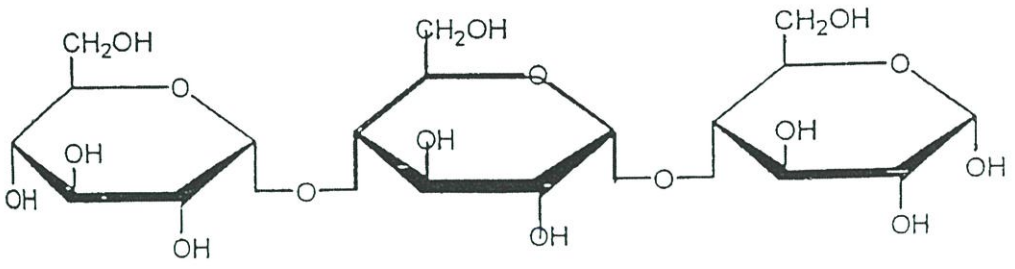
ฤดูกาลเก็บเกี่ยวเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อคุณภาพของหัวมันสำปะหลัง กล่าวคือ การเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้งหรือช่วงที่อากาศแห้งติดต่อกันโดยไม่มีฝนตกหรือดินมีความชื้นต่ำ จะทำให้หัวมันสำปะหลังมีน้ำน้อย เป็นผลให้มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงกว่าการเก็บเกี่ยวในช่วงที่มีฝนตกชุก เนื่องจากราคาหัวมันจะขึ้นกับเปอร์เซ็นต์แป้งในหัว ดังนั้นเกษตรส่วนใหญ่จะเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเมษายน เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงฤดูแล้ง มักจะได้เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวสูง (ร้อยละ 21.4-23.5) ในขณะที่การเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำกว่าร้อยละ 20

2.4 การย่อยหัวมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล

การย่อยหัวมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล ในที่นี้หมายถึงการย่อยแป้งที่ตกค้างอยู่ในหัวมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล (starch saccharification)

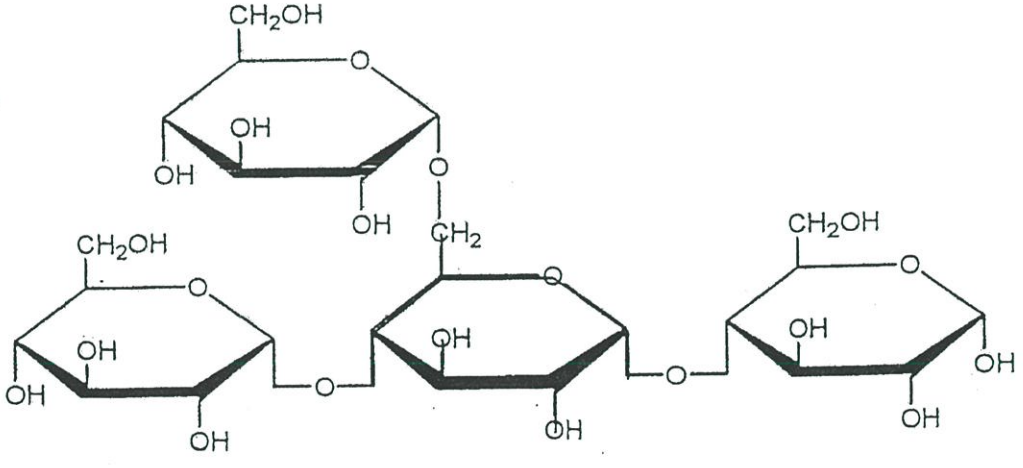
เนื่องจากลักษณะของแป้งที่ได้จากพืชเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) แป้งประกอบไปด้วยโพลิเมอร์ของกลูโคสแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น หรืออะไมเลส (amylose) และโพลิเมอร์เชิงกิ่งหรืออะไมโลเพกทิน (amylopectin) โดยมีอะไมโลสเป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 75-85 เปอร์เซ็นต์ (สมชาย,2537)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1,4) กลูโคซิดิก (α-1,4-glucosidic linkage) มีลักษณะเป็นเส้นยาว ๆ บิดกันเป็นเกลียว (helix) ไม่ละลายน้ำแต่กระจายตัวในลักษณะไมล์เซลล์ (micelle) เมื่อรวมตัวกับไอโอดีนแล้วเกิดสีน้ำเงิน



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของอะไมโลส

อะไมโลเพกตินเป็นโพลิเมอร์เชิงกิ่งที่ประกอบด้วยกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา (1,4) กลูโคซิดิก และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้นเชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา (1,6) กลูโคซิดิก (α-1, 6 – glucosidic linkage) ลักษณะของอะไมโลเพกตินในน้ำจะให้สารแขวนลอย (colloidal solution) เมื่อรวมตัวกับไอโอดีนแล้วเกิดสีม่วงแดง



รูปที่ 2 .2 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน

เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ปกติ จะไม่สามารถใช้แป้งในการหมักแอลกอฮอล์ ได้ในขั้นตอนเดียว จึงต้องทำการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน ซึ่งวิธีที่ใช้ในการย่อยแป้งมีด้วยกัน 2 วิธี คือ การย่อยแป้งโดยใช้กรด และการใช้เอนไซม์ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้นี้เป็นเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลส (amylase) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นแล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (กล้าณรงค์, 2542)

2.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง

ลักษณะการทำงานของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม (กล้าณรงค์ ,2542; มีชัย, 2542) คือ

2.5.1 เอนไซม์เอนโด – อะไมเลส (endo – amylase) หรือ เอนไซม์แอลฟา – อะไมเลส

เอนไซม์แอลฟา – อะไมเลส (α – amylase หรือ amylo (1 – 4) dextrinase หรือ 1,4 – α – glucan – gluconohydrolase EC 3.2.1.1) จัดเป็น extracellar enzyme คือ เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแล้วถูกขับออกมานอกเซลล์ พบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ถ้าแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลสจัดเป็น endo – acting enzyme ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะแอลฟา – 1,4 ไกลโคซิดิก (α – 1,4 glycosidic linkages) ภายในโมเลกุลของแป้งอย่างรวดเร็ว ทำให้ขนาดของลดลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้แตกต่างกันตามความยาวของสายโซ่ เอนไซม์แอลฟา – อะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลส (amylase) ได้ดีเมื่อย่อยต่อเนื่องในเวลาที่เพียงพอจะได้ ผลิตภัณฑ์เป็นมอลโตส (maltose) และ มอลโตไตรโอส (maltotriose) มอลโตไตรโอสจัดเป็นสับสเตรทที่ไม่ดีสำหรับเอนไซม์แอลฟา- อะไมเลส และขั้นสุดท้ายเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลสจะย่อยมอลโตไตรโอสเป็นมอลโตส และกลูโคสอย่างช้าๆ แต่เอนไซม์แอลฟา – อะไมเลสไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิก (α -1,6 glycosidic linkages) ที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ ดังนั้นแอลฟา – ลิมิทเด็กซ์ตรน (α – limit dextrins) จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลส (วชิราพรรณ บุญญาพุพทธิพงศ์. 2543) การย่อยโมเลกุลของแป้งในขั้นที่สองเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เหมือนกับการย่อยอะไมโลส แต่เป็นการย่อยพันธะแอลฟา – 1,4 ไกลโคซิดิกที่ติดกับพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิกของแอลฟา – ลิมิทเด็กซ์ตริน (Kenendy *et. al.* 1987; Leloup *et. al.*1994)

2.5.2 เอนไซม์เอ็กโซ – อะไมเลส (exo – amylase) ประกอบด้วยเอมไซม์เบต้า - อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอนไซม์เบต้า – อะไมเลส (β – amylase หรือ 1,4 – α – D – glucan malto hydrolase EC 3.2.1.2) พบมากในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวสาลี มันฝรั่งหวาน และถั่วเหลือง เป็นต้น และเป็น extracellular enzyme ในเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus cereus* และ *B. polymyxa* เป็นต้น เอนไซม์เบต้า – อะไมเลสจัดเป็น exo – acting enzyme โดยย่อยพันธะแอลฟา – 1,4 ไกลโคซิดิกของแป้งจากตำแหน่ง non – reducing end ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้

หลังจากการย่อยคือเบต้า – มอลโตส (β – maltose) เอนไซม์เบต้า – อะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลสได้เกือบสมบูรณ์ และสามารถย่อยอะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นมอลโตสได้ร้อยละ 50 – 60 แต่เอนไซม์เบต้า – อะไมเลสไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งกิ่งก้านของแป้งได้ ดังนั้นจึงยังคงเหลือเบต้า – ลิมิทเด็กซ์ตริน (β – limit dextrins) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล

<u>เอนไซม์กลูโคอะไมเลส</u> (glucoamylase หรือ 1,4 –α – D – glucan glucohydrolase หรือ glucamylase หรือ amyloglucosidase หรือ γ –amylase EC 3.2.1.3) สามารถ ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในสกุล *Aspergillus, Penicillium* และ *Rhizopus* นอกจากนั้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถผลิตได้จากยีสต์ *Saccharomyces diastaticus* และแบคทีเรีย *Flavobacerium sp.* เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจัดเป็น exo – acting enzyme โดยย่อยพันธะแอลฟา – 1,4 ไกลโคซิดิกและพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิกจากตำแหน่ง non – reducing end ของแป้งทีละหน่วยเป็นกลูโคส อย่างไรก็ตามอัตราการย่อยขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลและโครงสร้างของสับสเตรทโดยอัตราการย่อยพันธะแอลฟา – 1,4 ไกลโคซิดิกมากกว่าพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิก ประมาณ 15 – 30 เท่า ดังนั้นการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงมีการนำเอนไซม์ดีบรานชิงค์ (debranching enzyme) ซึ่งย่อยสามารถพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิก มาใช้ร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อให้สามารถย่อยแป้งได้สมบูรณ์เร็วขึ้น และพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบางชนิดสามารถย่อยแป้งดิบได้ (Kenendy et. al. 1987; Leloup et. al. 1994)

2.5.3 **เอนไซม์ดีบรานชิงค์** (debrancing enzyme) ประกอบด้วยเอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พลูลูลาเนส

เอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase หรือ glucogen – 6 – glucanohydrolase EC 3.2.1.68) และเอนไซม์พลูลูลาเนส (pullulanase หรือ pullulan 6 – glucanohydrolase EC 3.2.1.41) เอนไซม์ไอโซอะไมเลสสามารถย่อยพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคติน ไกลโคเจนเด็กซ์ตรินที่มีกิ่งก้านและสารโอลิโกแซคคาไรด์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิกของพลูลูแลน และเบต้า – ลิมิทเด็กซ์ตรินได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ไอโซอะไมเลสมีความสามารถในการจับกับสายโซ่ที่สั้นต่ำ โดยที่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *Pseudomonas amyloderamosa* สามารถย่อยโมเลกุลที่ประกอบด้วยกลูโคสอย่างน้อยที่สุดสามหน่วยในสายโซ่ที่เป็นกิ่งก้าน มีการเสนอว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลสย่อยแบบ exofasion proceeding จากตำแหน่ง non – reducing end ในการตัดกิ่งก้านของแป้งในการผลิตกลูโคสและมอลโตส ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไอโซอะไมเลสได้ เช่น *Saccharomyces*

cerevisiae, *Escherichia coli*, *Cytophaga sp.*,*Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350, *Lipomyces kononenkoae*, *Flavobacterium sp.*, และ *Pseudomaonas amyloderamosa* SB – 15 เป็นต้น (Vihinen and Mantsala. 1989)

เอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พลูลูลาเนสสามารถย่อยพันธะแอลฟา – 1,6 ไกลโคซิดิก ของแป้งได้เป็นสายโซ่ของสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีความยาวต่างๆ (Saha and Zeikus. 1989)โดยที่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสและเอนไซม์พลูลูลาเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน กล่าวคือ เอนไซม์พลูลูลาเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีโมเลกุลเล็กที่สุดคือมอลโตส แต่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสมีความจำเพาะต่อสับสเตรท ที่มีโมเลกุลเล็กที่สุด คือมอลโตไตรโอสและมอลโตเตตระโอส (maltotetraose) (Allen and Dawson. 1975) แสดงดังรูปที่ 2.2 แต่มีบางรายงานกล่าวว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลส มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีสายโซ่ที่สั้น ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 -3 หน่วย แต่สับสเตรทที่ดีที่สุดคือสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Kennedy et. al. 1987) เอนไซม์พลูลูลาเนสและเอนไซม์ไอโซอะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลเพคติน แป้งและไกลโคเจนได้ แต่มีรายงานว่าเอนไซม์ไอโซอะไมเลสเป็น เอนไซม์ดีบรานชิงค์เพียงชนิดเดียวที่สามารถย่อยไกลโคเจนได้ทั้งหมดและ เอนไซม์พลูลูลาเนสสามารถย่อยพลูลูแลน เป็นมอลโตไตรโอส ได้ แต่เอนไซม์ไอโซอะไมเลสไม่สามารถย่อยพลูลูแลนได้ (Allen and Dawson. 1975)

กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, และ *Rhizopus* spp. เอนไซม์นี้จัดเป็นแอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ชนิดหนึ่งที่ย่อยจากปลายโมเลกุล (exo-hydrolase) ทั้งพันธะ α-(1,4) และ α-(1,6) โดยจะตัดพันธะ α-(1,6) เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor)

นอกจากนี้ยังมีบีต้าอะไมเลส (β-amylase) ย่อยจากปลายโมเลกุล (exo-hydrolase) ครั้งละ 2 โมเลกุลกลูโคสทำให้ได้น้ำตาลมอลโตสเป็นผลผลิต ส่งผลต่อพันธะ α-(1,4) และเมื่อย่อยมาถึงพันธะ α-(1,6) กิจกรรมเอนไซม์จะหยุดลง เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) เป็นโคแฟกเตอร์

2.6 กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์

เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสมีหลายชนิดแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติต่างกัน ดังนั้น เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดจึงแบ่งขั้นตอนในการย่อยแป้งเป็น 2 ขั้นตอน (มีชัย, 2542; Boyce,1986) คือ

2.6.1 การทำให้แป้งเหลว (liquefaction)

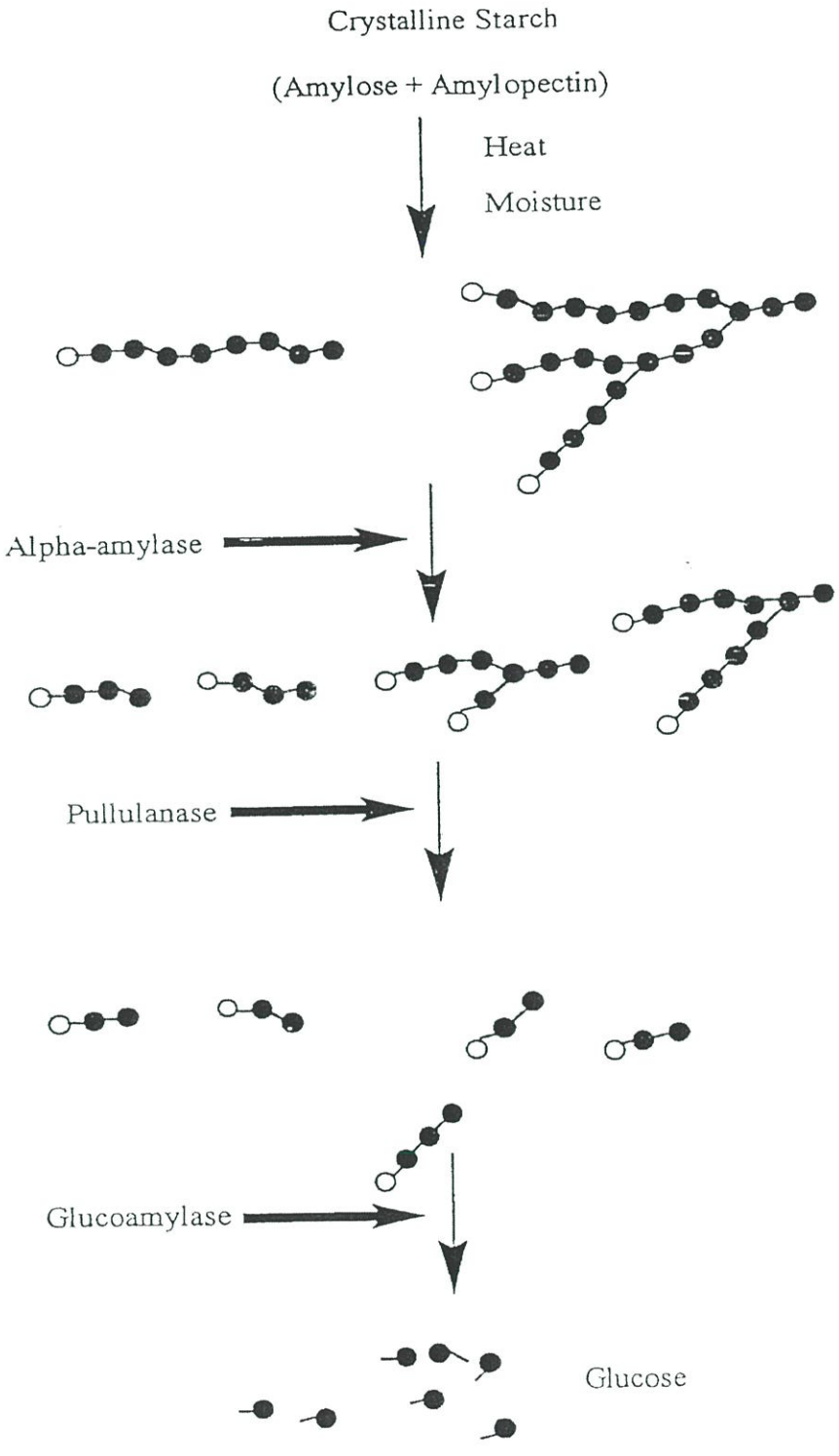
ขั้นตอนนี้เป็นการทำให้แป้งเหลวโดยหลังจากการเจลาติไนซ์ (gelatinize) แป้งจะมีความหนืดสูง การเติมเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟาอะไมเลสลงไปทำให้โมเลกุลของแป้งถูกย่อยให้สั้นลง ความหนืดลดลง ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าในกลุ่มแอลฟาอะไมเลส ได้แก่ เทอร์มามิล (Termamyl) เอนไซม์ดังกล่าวจะเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* การทำงานจะใช้ความเข้มข้นของแป้งร้อยละ 30-40 โดยน้ำหนัก ปรับพีเอชเป็น 6.0-6.5 ใช้แคลเซียมไอออนในรูปแคลเซียมคลอไรด์ 20-80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นโคแฟกเตอร์ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ประมาณ 0.5-0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัมแป้ง เริ่มต้นใช้อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้แป้งเกิดการเจลาติไนซ์อย่างสมบูรณ์ หลังจากนี้ย่อยที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้จะได้แป้งโมเลกุลเล็กและเด็กทริน (dextrin)

Ejiofor และคณะ (1996) รายงานถึงการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ทนความร้อน (thermostable) จาก *Bacillus licheniformis* 0.3 กรัม/กิโลกรัมแป้ง ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้แคลเซียมไอออนเข้มข้นถึง 100 ส่วนในล้านส่วน ในรูปแคลเซียมคลอไรด์เป็นโคแฟกเตอร์ ปรับพีเอชเป็น 6.1-6.3 ควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงซึ่งให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นแป้งโมเลกุลเล็กและเด็กทรินเช่นกัน

2.6.2 การเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาล (saccharification)

ขั้นตอนนี้อาศัยเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะไมเลสในการเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาล ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าที่ใช้ ได้แก่ เด็กโทรไซม์ (Dextrozyme) และเอเอ็มจี (AMG) หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้แป้งเหลวทำการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเป็น 60 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 4-4.5 เติมเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะไมเลส 0.65-0.80 มิลลิลิตรต่อแป้ง 1 กิโลกรัม ใช้เวลาเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง พบว่าการเติมเอนไซม์มากขึ้นจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น

นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูป (glucoamylase immobilized) บน porous diatomaceous earth ในการเปลี่ยนแป้งโมเลกุลเล็กเป็นน้ำตาล โดยอายุการใช้งานของเอนไซม์ตรึงรูปนานถึง 3 สัปดาห์ (Krishnan และคณะ, 2000)

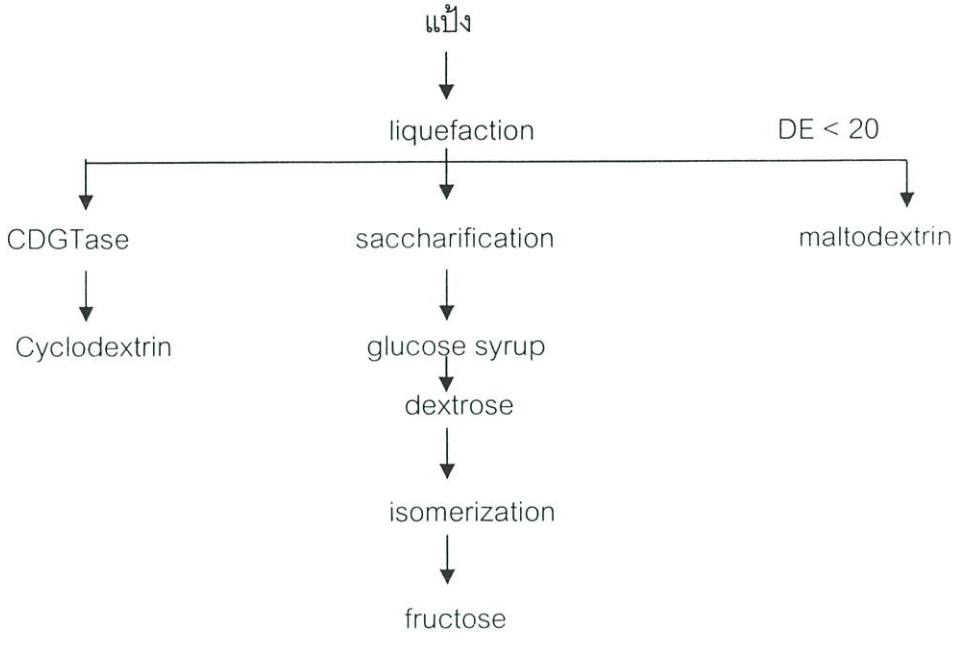


รูปที่ 2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสในการย่อยแป้ง

ที่มา: Boyce (1986)

2.7 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน

เมื่อแบ่งเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งานสามารถแบ่งเอนไซม์ได้เป็น 3 กลุ่มดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการใช้งาน

ที่มา : กล้าณรงค์และเกื้อกูล (2543)

2.7.1 กลุ่มเอนไซม์เพื่อลิคิวแฟคชั่น (liquefaction)

ในการย่อยแป้งเพื่อจะผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง ซึ่งก็คือ กลูโคสนั้น จะต้องมีขั้นตอนที่ทำให้แป้งสุก และของเหลวมีความหนืดต่ำ ก่อนที่จะนำไปทำการผลิตต่อไป ดังนั้นเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับ การทำให้น้ำแป้งเป็นของเหลวที่มีความหนืดน้อย ถือว่าเป็นการย่อยครั้งแรก ของกระบวนการย่อยสลายแป้งเอนไซม์ ควรเป็นประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุ่มภายในเส้นสาย (endo enzyme) คือ ทำงานหรือตัดพันธะภายในโมเลกุลของแป้ง เพื่อที่จะทำให้แป้งถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ เท่าๆ กันในเวลาสั้น (สั้นกว่าเอนไซม์ประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุ่มภายนอกเส้นสาย (exo enzyme) เป็นของเหลวที่ค่อนข้างสมบูรณ์และมีความหนืดต่ำ มีค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (dextrose equivalent; DE) ต่ำกว่า 20 ซึ่งโอกาสที่แป้งจะจับตัวเป็นได้ต่ำ

2.7.2 **กลุ่มเอนไซม์เพื่อการแซคคาริฟิเคชั่น** (saccharification)

แซคคาริฟิเคชั่น หมายถึง ระดับการย่อยแป้งที่มากขึ้น ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น (มีค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (DE) สูงขึ้น) น้ำแป้งเกิดรสหวานเป็นน้ำเชื่อม ปกติพบการใช้เอนไซม์อยู่ 2 กลุ่ม คือ

2.7.2.1 การย่อยเพื่อให้ได้น้ำเชื่อมชนิดที่มีค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ระหว่าง 38-42

น้ำเชื่อมกลูโคสขนาดที่มีค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ระหว่าง 38-42 มีความเหนียว ความหวานพอดี เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไปใช้เอนไซม์ประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุ่มภายในเส้นสาย เพื่อให้แป้งถูกย่อยจนภายในเส้นสาย มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหลืออยู่ต่ำพอที่จะไม่เกิดการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) และเกิดน้ำตาลชนิดต่างๆ (กลูโคส มอลโตส ฯลฯ) ที่สร้างความหวานขึ้น เอนไซม์ที่เหมาะสมกับการผลิตน้ำเชื่อมชนิดนี้ คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่สกัดจากจากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากเชื้อราจะมีคุณสมบัติที่คล้ายๆ กัน คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำแป้งที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 30 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3-8 (ปกติใช้ค่าพีเอชในช่วง 4-5) และต้องใช้ความร้อนในการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์

2.7.2.2 การย่อยเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์สูง (ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์สูงกว่า 95)

ในการผลิตน้ำตาลกลูโคสเพื่อที่จะทำเป็นวัตถุดิบของการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องต่อไป เช่น น้ำตาลฟรักโทส ซอร์บิทอล หรือทำกลูโคสผง (เด็กซ์โทรส) ชนิดต่างๆ จำเป็นต้องใช้น้ำเชื่อมขนาดที่มีความบริสุทธิ์สูง หมายถึงมีจำนวนน้ำตาลกลูโคสต่อของแข็งทั้งหมดสูง หรือ ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์สูงกว่า 95 การย่อยจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ประเภทตัดเส้นสายแป้งแบบสุ่มภายในเส้น สายที่ย่อยจากปลายสายเข้ามาและสามารถย่อยพันธะได้ทั้ง α -1,4 และ α -1,6 ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าว คือเอนไซม์กลูโคอะไมเลสหรืออะไมโลกลูโคสิเดสที่ได้จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* ลักษณะของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ มีความสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส) ค่าพีเอชประมาณ 4-6 (พีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5) ความเข้มข้นของน้ำแป้งประมาณร้อยละ 30-35 ไม่ต้องการแคลเซียมในการร่วมกิจกรรม จำเป็นต้องใช้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมก่อนที่จะดำเนินกระบวนการผลิตต่อไป บางกรณีมีการใช้เอนไซม์ที่ตัดพันธะ α -1,6 เช่น เอนไซม์พูลูลาเนสร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะทำให้การทำงานเร็วขึ้น

2.8 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase , Amyloglucosidase , E.C. 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสที่สลายพันธะอัลฟา (1,3) , (1,4) และ (1,6) ไกลโคซิดิคในแป้ง จากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) โดยทำงานจากปลายนอกสุดเข้ามา (exo-acting) ให้ผลิตภัณฑ์เป็น เบตา-ดี –กลูโคส (β -D- Glucose) ทีละหนึ่งโมเลกุล

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเองยังอาจจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นพวกที่สามารถย่อยแป้งและ เบตาลิมิตเดกซ์ตริน (β- limit dextrin) ได้อย่างสมบูรณ์ กลุ่มที่ 2 สามารถย่อยแป้งได้เพียงร้อยละ 80 และ ย่อยเบตาลิมิตเดกซ์ตรินได้ เพียงร้อยละ 40 ซึ่งกลุ่มที่ 2 นี้ไม่สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ กลูโคอะไมเลสทั้ง 2 กลุ่ม สามารถย่อยน้ำตาลแพนโนส (pantose) และอัลฟาลิมิตเดกซ์ตริน (α- limit dextrin) ได้อย่างสมบูรณ์

2.8.1 คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความคงตัวในช่วงพีเอชต่ำ (Reilly , 1979) ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จาก *Aspergillus* sp. อยู่ระหว่าง 3.5- 5.0 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0 (Pazur, 1972) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะมีพีเอชอยู่ระหว่าง 4.5-5.5สำหรับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus delemar* มีพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.5 (Phillips และ Caldwell, 1951) และที่พีเอช 4.3-4.7 (Adams, 1953)

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส มีขนาดตั้งแต่ 50,000 ถึงมากกว่า 110,000 ซึ่งค่าของน้ำหนักโมเลกุลนี้จะแตกต่างกันในเชื้อราแต่ละชนิด เอนไซม์กลูโคอะไมเลสส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 70,000 (Reilly , 1979)

2.8.2 แหล่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ผลิตได้จากทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในกลุ่มจุลินทรีย์ อาจพบในแบคทีเรียเช่น *Clostidium acetobutylicum* และ *Flavobacterium* sp. พบในยีสต์บางชนิด เช่น *Endomyces* sp , *Endomycopsis* sp , *Saccharomyces diastaticus* และ *Candida pelliculosa* ราที่พบว่าผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เช่น *Aspergillus* spp. , *Rhizopus* spp. , *Mucor* spp. , *Amylomyces* spp , *Chlamydomucor* spp. และ *Penicillum* เป็นต้น สำหรับ เชื้อรา *Aspergillus niger* นอกจากผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแล้วยังสร้างเอนไซม์ trans-glucosidase

ซึ่งเปลี่ยนกลูโคสและไดแซคคาไรด์ไปเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นผลให้เกิดโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งโพลีแซคคาไรด์นี้จะไปขัดขวางการเกิดผลึกกลูโคสทำให้ผลผลิตกลูโคสลดลง ดังนั้นต้องกำจัดเอนไซม์ดังกล่าวก่อนที่จะนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อรานี้ไปใช้ สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* sp. ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยไม่สร้าง trans- glucosidase (Wiseman , 1975)

2.8.3 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

สารที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยในธรรมชาติคือ แป้ง และจะต้องทำให้สารละลายน้ำแป้งนั้นเกิด gelatinization ก่อนซึ่งเป็นการทำให้ ลักษณะทางกายภาพ ของเม็ดแป้งเปลี่ยนแปลงเสียก่อนเอนไซม์จึงจะย่อยได้ดี โดยจะทำให้ glycocidic bond แตก ทำให้ชิ้นส่วนใหญ่ๆ ของเม็ดแป้งแตกกระจาย และความหนืดลดลง จึงดูเหมือนว่าเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างของแป้งกระจัดกระจายไม่เป็นระเบียบ พร้อมทั้งทำให้ความหนืดลดลงได้ ในทำนองเดียวกันกับการย่อยด้วยกรด สำหรับสารละลายแป้งดิบทั้งชนิดเข้มข้นและเจือจางนั้น เอนไซม์จะย่อยได้ช้า (Hockenhull, 1967) Barker และ Fleetwood (1957) ได้อธิบายว่าจุดตัดในโมเลกุลของแป้งที่กลูโคอะไมเลสตัดคือ พันธะระหว่าง คาร์บอนตัวที่หนึ่งกับออกซิเจน (C_1-O) เช่นเดียวกับจุดตัดของแอลฟาอะไมเลส เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของ เอนไซม์กลูโคอะไมเลสและ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส แล้วพบว่ากลูโคอะไมเลสจะย่อยแป้งได้ช้ากว่า โดยจะย่อยจากปลายโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเปกติน ครั้งละหนึ่งหน่วยกลูโคส แต่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะย่อยแบบสุ่มจึงย่อยได้เร็วกว่า ดังจะสังเกตได้จากสีของไอโอดีนที่ทำปฏิกิริยากับแป้งจะหายไปเร็วกว่าที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในทำนองเดียวกับอัตราการลดความหนืดของสารละลายแป้ง เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อราอย่างน้อยประกอบด้วย 2 ชนิด คือ กลูโคอะไมเลส 1 (GA I) และกลูโคอะไมเลส 2 (GA II) GA I มีความสามารถในการย่อย α-1,6-glycosidic linkage และแป้งดิบ ได้ดีกว่า GA II จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะให้ปริมาณและชนิดของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างกัน เช่น เชื้อรา *Aspergillus awamori* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั้งสามชนิด คือ GA I , GAI' และ II GA I เป็นเอนไซม์ชนิดที่ย่อยแป้งดิบได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 90,000 สามารถย่อยแป้งข้าวโพดดิบได้อย่างสมบูรณ์ ย่อยแป้งมันฝรั่งที่ผ่านการ เจลาติไนซ์ และไกโคเจนได้ร้อยละ 90 และร้อยละ 100 ตามลำดับ GA I' เป็นเอนไซม์ชนิดที่ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 83,000 สามารถย่อยแป้งมันฝรั่งที่ ผ่านการเจลาติไนซ์ และ ไกโคเจนได้ร้อยละ 90 และร้อยละ 80 ตามลำดับ สำหรับ GA II เป็นชนิดที่ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 51,000 สามารถย่อยแป้งมันฝรั่งที่ผ่านการเจลาติไนซ์ และไกลโคเจนได้ร้อยละ 60 และร้อยละ 40 ตามลำดับ (Hayashida และ Yoshino, 1977 ; Yoshino และ Hayashida , 1978) ส่วนเชื้อรา *A.niger* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 2 ชนิดคือ GA I และ GA II (Pazur และคณะ, 1971) โดยที่

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรานี้ สามารถย่อยแป้งดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ดีที่พีเอช 3.4 ซึ่งเป็น isoelectric point ของเอนไซม์ (Medda และคณะ, 1982)

2.8.4. การวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์อะไมเลสมีหน้าที่คือ การย่อยโมเลกุลของแป้งให้เล็กลง และนอกจากจะทำให้ลักษณะทางกายภาพของแป้ง เช่น ความหนืดลดลงแล้ว ยังให้ผลิตผลที่ได้จากการย่อย ได้แก่ โมเลกุลของแป้งมีขนาดเล็กลงหลาย ๆ โมเลกุล และโมเลกุลเดี่ยวๆ ของกลูโคส จากรายงานของ Bernfeld (1951, 1955) พบว่า เมื่อสารละลายแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส คุณสมบัติของแป้งจะเปลี่ยนแปลงดังนี้คือ

1. จะมีคุณสมบัติเป็นรีดิวซิ่งเพิ่มขึ้น
2. คุณสมบัติในการเกิดสีกับไอโอดีนเปลี่ยนไปจากสีน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลแดง
3. ความหนืดลดลง
4. ความสามารถในการเบี่ยงเบนแสงลดลง(Optical rotation)

ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ เช่น ตรวจการหลอมเหลวของแป้ง จากความหนืดที่ลดลงและ ตรวจประสิทธิภาพการเปลี่ยนโมเลกุลใหญ่ ๆ ของแป้งให้กลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลงได้ โดยการสังเกตการเกิดสีกับไอโอดีน รวมทั้งตรวจการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส โดยการวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง (Underkofler, 1961) น้ำตาลรีดิวซิ่งนี้เราสามารถวิเคราะห์ หาปริมาณได้หลายวิธี อย่างเช่น วิธีของ A.O.A.C. (1970); วิธีของ Somogyi (1945) ; วิธีใช้กลูโคสออกซิเดส (Kato, 1976) หรือวิธีของ Nelson- Somogyi (Krzechowska และ Urbanek, 1975) และวิธี Saccharification ของ Bernfeld (1951,1955) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Weill (1954) ที่ได้กล่าวถึงการวัดปฏิกิริยา ของเอนไซม์อะไมเลสไว้ว่า สามารถวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์เหล่านั้นได้ 3 วิธีด้วยกันคือ การวัดอัตราของปฏิกิริยาการเกิดน้ำตาล (Saccharogenic activity) หรือวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์โดยตรง (Glucose-Direct activity) และวัดจากปฏิกิริยาการย่อยแป้ง (Amyloelastic actvity) ได้เช่นกัน

วิธีแรกคือ การวัดอัตราปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดน้ำตาลขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหน่วยย่อยๆ ของกลูโคสจะมีหน่วย (-C-OH group) ที่เป็นรีดิวซิ่งอยู่เฉพาะที่ปลายสุดของโมเลกุล เมื่อแขน α-(1,4) glycosidic แยกออกเนื่องจากการย่อยของเอนไซม์ จะทำให้ปริมาณของกรุ๊ฟที่เป็นรีดิวซิ่งเพิ่มขึ้น และจะเพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วนโดยตรงต่อจำนวนแขนที่เอนไซม์ย่อยให้ขาดออกจากกันไป ฉะนั้นโดยวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งที่เกิดขึ้น จากผลการย่อยของเอนไซม์การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซิ่งมักจะใช้วิธีของ Bernfeld (1951,1955) ซึ่งวิธีการนี้เป็นการวัดสีที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างกรุ๊ฟรีดิวซิ่งของน้ำตาลกับกรด 3,5 dinitrosalicylic ซึ่งจะได้สีน้ำตาลแดงและดูดแสงได้สูงสุดที่ 550 nm แสดงผลที่ได้เป็นมิลลิกรัมของกลูโคสต่อมิลลิกรัมของกลูโคสต่อมิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตราฐานของกลูโคส

วิธีที่สอง เนื่องจากเอนไซม์อะไมเลสบางชนิดจะย่อยจากปลายโมเลกุลของแป้ง ฉะนั้นหลังจากการย่อยแล้วจะได้กลูโคสเกิดขึ้น ดังนั้นวิธีนี้จึงอาจจะเกิดน้ำตาลกลูโคสได้โดยตรง โดยวัดออกมาในรูปของน้ำตาลรีดิวซิ่ง เช่นเดียวกันวิธีของ Zerban และ Sattler (Weill, 1945)

วิธีที่สาม เป็นการวัดปฏิกิริยาการย่อยแป้ง โดยวัดจำนวนแป้งที่ถูกย่อยในขอบเขตที่จะทำให้สารละลายที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน แล้วจะให้สีแดง การปฏิบัติในวิธีการนี้จะทำให้สภาพคล้ายวิธีที่ 1 และ 2 ยกเว้นความเข้มข้นของแป้งที่ใช้จะเป็นร้อยละ 1 แล้วแสดงผลที่ได้ออกมาเป็นจำนวนมิลลิกรัมของแป้งที่ย่อยได้โดยเอนไซม์ 1 มิลลิกรัม ในเวลา 30 นาที

วิธีการหาปฏิกิริยาเอนไซม์ของกลูโคอะไมเลสจะกระทำโดยวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ย่อยแป้ง แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการปรับปรุงวิธีการต่างๆ เหล่านี้ตลอดมาตามความเหมาะสมของแต่ละวิธีการ ดังเช่น Kujuwaki (1974) ได้อธิบายวิธีมาตรฐานสำหรับการหาปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากจุลินทรีย์ โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารละลายแป้งที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 วิเคราะห์หากลูโคสที่เกิดขึ้นโดยใช้กลูโคสออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส แล้วคิดเป็นหน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสซึ่งหมายถึงจำนวนเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งแล้วได้กลูโคสออกมา1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

Krzechowska (1975) ได้ทดลองวิธีการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้สารละลายเอนไซม์ และสารละลายแป้งมันเข้มข้นร้อยละ 1 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งโดยวิธีการของ Nelson (1944)

สำหรับในการหาปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีของ Kato และคณะ (1976) ได้ใช้สารละลายของเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแป้งที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร และควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีกลูโคสออกซิเดส โดยกำหนดให้เอนไซม์จำนวน 1 หน่วย หมายถึง จำนวนเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ส่วนความสามารถในการทำให้เกิดการหลอมเหลวตัว (liquefying activity) จะหาโดยวิธีของ Fuwa (1954)

2.8.5 **อุณหภูมิ , พีเอช และเกลือที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

โดยทั่วไปเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากราจะเสถียรที่พีเอช ระหว่าง 3-8 และที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะมีกิจกรรมสูงที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus* sp. จะทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ส่วนมากเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะมีการทำงานสูงสุดที่พีเอชประมาณ 4-5 ดังแสดงในตารางที่ 2.4

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (Co-factor) ในการทำงานหรือช่วยทำให้เสถียร อย่างเช่นในเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสต้องการ Ca^{2+} แต่ Moriyama (1980) พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะเสถียรต่ออุณหภูมิสูง เมื่อเติมกลูโคสและกลูโคโนแลคโตน จะรวมตัวที่ Active site สำหรับแลกโตนและกลีเซอรอลจะช่วยลดค่าคงที่ไดอิเล็กตริคในสารละลาย (dielectric constant)

ตารางที่ 2.4 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของกลูโคอะไมเลส

เชื้อรา	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
Aspergillus awamori *A.awamori var kawachi* I and II	4.5	60
A .niger I	4.5-5.0	-
A. niger II	4.5-5.0	-
A.oryzae A-1 , A-2 , A-3 and B-2	4.1-4.7	-
A.oryzae I	4.5	60
A.oryzae III	4.5	40
A.phoenicis	4.6	60
Cephalosporium charticola Lindau	5.4	60
Coniophora cerebella	4.0-4.5	-
Corticium rolfsii	4.5	40-60
Endomycopsis capsularis	4.5	40-50
Hamicola lanuginosa I	4.9	-
Hamicola lanuginosa II	6.6	65-70
Mucor rouxianus I	4.6	55
Mucor rouxianus II	5.0	55
Penicillium oxalicum I	5.0	55-60
Penicillium oxalicum II	4.5	60
Piricularia oryzae	6.5	50-55
Rhizopus delemar	4.5	40

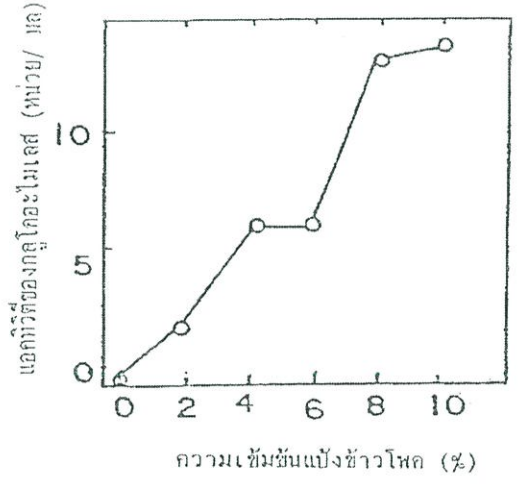
ที่มา : Forgarty และคณะ , 1979

2.8.6. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

2.8.6.1 แหล่งคาร์บอน

ปริมาณการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของราจะตอบสนองต่อโครงสร้างและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารนั้น ๆโดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเป็นสารโมเลกุลเชิงซ้อนของน้ำตาลพวกโพลีแซคคาไรด์เช่น เด็กทริน แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลังในขณะที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่น กลูโคส ไซโลส ฟรุกโตส จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพราะให้พลังงานมากพอแก่การเจริญโดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อยแป้ง

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อปริมาณ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส เช่น *Aspergillus awamori* NRRL 3112 จะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาณสูงเป็น 2 ช่วง เมื่อความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดเพิ่มขึ้น ช่วงแรกคือ เมื่อแป้งข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 4-6 และอีกช่วงคือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8-10 ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ข้อเสียคือความเข้มข้นแป้งข้าวโพดที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 6 จะมีความหนืดสูง (Qadeer, 1971)



รูปที่ 2.5 อิทธิพลของแป้งข้าวโพดต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดย *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (Qadeer, 1971)

การแก้ปัญหาความหนืดทำได้โดย liquefy ด้วยเอนไซม์จากมอลท์หรือโดยเอนไซม์ α-amylase (Aunstrup, 1972; Smiley, 1967; Baribo, 1967) วิธีนี้มีข้อดี คือลดความหนืดของอาหารเหลว ลดพลังงานที่ใช้ในการกวนน้ำหมัก ช่วยให้มีการถ่ายเทความร้อนระหว่างการฆ่าเชื้อราอาหารเหลวได้ดี รวมทั้งลดการเดือดล้น ระหว่างการพ่นไอน้ำฆ่าเชื้อรา นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ใน *A. niger* ได้ (Smith, 1979)

2.8.6.2 แหล่งไนโตรเจน

ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสขึ้นกับความสามารถในการใช้โพลีเปปไทด์หรือสารประกอบไนโตรเจนที่เล็กกว่า เช่น กรดอะมิโน เพราะสารประกอบไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอนไซม์

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ที่จะช่วยให้ราผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูง มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่มักจะเป็นการศึกษากับรา *Aspergillus* sp. เช่น การใช้เส้นใยจากการหมักยาเพนนิซิลิน และ Corn steep liquor เหมาะสำหรับ *Aspergillus awamori* , น้ำสกัด ถั่วเหลือง หรือถั่วเขียวเหมาะสำหรับ *Aspergillus usamii* , กากถั่วเหลือง สกัดน้ำมันและ รำข้าวสำหรับ *Amylomyces* sp. , โปรตีนถั่วลิสงสำหรับ *Aspergillus niger* และ รำข้าวสำหรับ *Rhizopus oryzae* (Sukhumavasi, 1982 ; จตุรพร พรศิลปทิพย์, 2528 ; ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์, 2526) แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์นั้น จะพบว่าเกลือของแอมโมเนียม จะให้ผลผลิตสูงกว่าเกลือไนเตรท (Barton , 1972)

2.8.6.3 เกลืออนินทรีย์

โดยทั่วไปราจะถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์ปล่อยออกมานอกเซลล์มากกว่า เดิมเมื่อใช้เกลือซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่จำเป็นในการเจริญ (Barton, 1972)

นอกจากนี้ PO_4^{2-},Mg^{2+},Fe^{2+} ก็จะกระตุ้นการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่ในอุตสาหกรรม Fe^{2+} อาจไม่จำเป็นต้องเติม เพราะในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจะมีอยู่แล้ว

2.9 ปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนอาหารเหลว

การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวนั้น ปัจจัยความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และความชื้นในอากาศไม่มีความสำคัญ แต่พีเอชในอาหารจะเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก จะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้รวดเร็ว กว่าในอาหารแข็ง อย่างไรก็ตามการหมักในถังหมักสามารถควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ โดยการเติมกรดหรือด่าง หรือใช้บัฟเฟอร์ในอาหาร อุณหภูมิ การให้อากาศและ การกวน เป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถควบคุมได้อย่างแน่นอนกว่า การหมักบนอาหารแข็ง สิ้นเปลืองแรงงานน้อยกว่า และสามารถป้องกันการติดเชื้ออื่นที่มากับอากาศที่ให้ได้ดีกว่า

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นกับชนิดของเชื้อซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์

กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการผลิตในอาหารแข็งแต่ในอาหารเหลวมีข้อได้เปรียบที่การกระจายสารอาหารทั่วถึงดีกว่า และไม่มีปัญหาการควบคุมขนาด รูปร่างของอาหาร

ในการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ไม่มีความสำคัญหลังการหมักเพียงกรองหรือปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วแยกเซลล์ออกเท่านั้น ซึ่งจะเห็นได้ว่า การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในอาหารเหลวมีปัจจัยที่ต้องควบคุมน้อยกว่าในอาหารแข็ง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบที่จะลงทุนโดยค่าใช้จ่ายจะลดลง ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่สำคัญสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็งและอาหารเหลว

การผลิตบนอาหารแข็ง	การผลิตบนอาหารเหลว
1. การปรับความชื้นเริ่มต้นในอาหาร	1. พีเอชของอาหาร
2. การควบคุมขนาดและรูปร่างอาหาร	2. อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง
3. ความชื้นในอากาศ	3. การให้อากาศ
4. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อรา	4. การกวน
5. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	5. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อรา
6. การพลิกกลับอาหารแข็ง	6. ปริมาณสปอร์ที่ใช้
7. ปริมาณสปอร์ที่ใช้	
8. การสกัดเอนไซม์จากอาหารแข็ง	

ที่มา : ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์ (2526)

2.10 การแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จากแหล่งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มักจะมีเอนไซม์อื่นๆ ปะปนอยู่ด้วย เช่น α-glucosidase (Fleming and Stone , 1965; Taylor และคณะ ., 1978) แอลฟาอะไมเลส (Saha และคณะ ., 1979 ; Takahashi และคณะ ., 1978 ; Medda และคณะ ., 1982) เซลลูเลส (Takahashi และคณะ ., 1978) transglucosidase (Barker and Fleetwood, 1957 ; Lineback และคณะ., 1969 ; Qadeer และ Kansar, 1971) Glucooxidase (Barker และ Fleetwood , 1957)โปรติเอส (Miah และ Ueda, 1977, Tsujita และ Endo , 1976) α-mannosidase (Flemingand and Stone, 1965) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้อาจมีผลต่อการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสดังนั้นจึงต้องมีการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ให้

บริสุทธิ์ เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อราส่วนใหญ่ เป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงไม่ยุ่งยากมากนัก เช่น ใช้แป้งเป็นสารดูดซับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Ueda และ Kano, 1975) การตัดเจลของเอนไซม์ที่แยกได้จาก Polyacrylamide eletrophoresis (Takahashi และคณะ ., 1978) ซึ่งไม่เหมาะกับการใช้แยกเอนไซม์ในปริมาณมาก ๆ นอกจากนี้ยังมีการใช้ Column chromatography โดยใช้สาร Bio-Gel 150, Sephadex G-200, Sephadex G-100 , Ultrogel AcA 44 มาใช้เป็นสารแยกเอนไซม์ (Takahashi และคณะ ., 1978)

2.10.1 **การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน** (Enzyne Purification)

การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยหลายกระบวนการ ทั้งนี้เมื่อแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกไป วิธีการนั้นทำได้โดย

2.10.1.1 การตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Salting out)

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นหลักการตกตะกอนโปรตีนในขณะที่มี การละลายของโปรตีนต่ำสุด(Whitaker,1972) โดยการเติมแอมโนเนียมซัลเฟตลงในเอนไซม์ อย่างช้า ๆ แล้วคนอย่างต่อเนื่องจนมีความเข้มข้นร้อยละ 80-100 (Saturation) (King, 1967; Saha และคณะ., 1979) ทั้งนี้ก็เพื่อให้ได้ตะกอนโปรตีนเกือบทั้งหมดและ จะได้เอนไซม์ที่มีสภาพเป็นตะกอน นอกจากนั้นอาจมีการตกตะกอนแยกลำดับส่วน (fractionation) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นต่างกันในแต่ละครั้ง แล้วแยกตะกอนเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละส่วนออกมา เช่น ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 60 และร้อยละ 90 ในการตกตะกอนลำดับส่วนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อรา *A. oryzae* (Ohga และคณะ., 1966) หรือแยกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากการตกตะกอนลำดับส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 50 และร้อยละ 70 จาก crude enzyme ของเชื้อรา *Endomycopsis fibulligera* (Sukhumavasi และคณะ , 1975)หรือใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 55-100 เพื่อตกตะกอนแยกส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก crude enzyme ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา A. oryzae (Mitsue และคณะ., 1979) หรืออาจใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40-80 ในการตกตะกอน Crude enzyme ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. (Tawachapun และคณะ ., 1982) เป็นต้น จากนั้นทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ แยกตะกอนเอนไซม์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงและด้วยความเร็ว 8,500-12,000 รอบต่อนาที (Saha และคณะ., 1979; Mitsue และคณะ 1979) ตะกอนที่ได้อาจนำไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze dried แล้วนำมาละลายในบัฟเฟอร์เพื่อแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยการใช้dializationเป็นขั้นต่อไป(Hayashida and Hor,1981)

การเติมสารละลายเกลือลงไปในปริมาณเล็กน้อย เพื่อทำให้โปรตีนละลายได้ดียิ่งขึ้น เพราะเกลือจะเกาะกับโปรตีนแล้วรวมกับน้ำได้ดี กระบวนการนี้เรียกว่า (salting in) ในขณะเดียวกัน การเติมเกลือในปริมาณที่มาก เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน เรียกว่า (salting out) (มุกดา ฐิตะสุต ; 2527) การตกตะกอนโปรตีนส่วนใหญ่มักใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Scopes, 1978) เนื่องจากเป็นการเพิ่มการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic protein-protein interaction) นอกจากนั้นยังส่งผลให้โปรตีนสามารถละลายได้สูงขึ้น (ประมาณ 4 โมล สารละลายจะอิ่มตัวร้อยละ 100) อีกทั้งการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ความร้อนมีผลเล็กน้อยต่อการละลายและสารละลายอิ่มตัว มีความหนืดต่ำ และมีความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงออกมาได้ง่าย

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ช่วงร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ แสดงดังตารางที่ 2.6 และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตกตะกอนที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ แสดง ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.6 การทดลองตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวในช่วงต่าง ๆ

การทดลองครั้งที่	ช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต(%)	ปริมาณเอนไซม์ที่ตกตะกอน(%)	โปรตีนที่ตกตะกอน(%)
1	0-40	4	25
	40-60	62	22
	60-80	32	32
	80	2*	21*
2	0-45	6	32
	45-70	90	38
	70	4*	30*
3	0-48	10	35
	48-65	75	25
	65	15*	40*

ที่มา: Scopes (1978)

หมายเหตุ * เป็นปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนนั้น ๆ

มีรายงานของ Freedberg et.al. (1975) ศึกษาการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา

Aspergillus niger ให้บริสุทธิ์ โดยขั้นต้นทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ร้อยละ 40 ถึงร้อยละ 60 จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังนี้ เซฟาเด็ก จี 100 (Sephadex G-100) และไบโอเจลพี 150 (Biogel P-150) เก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ร้อยละ 90 นอกจากนี้ Li. et.al. (1998) ทำการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Thermonyces lanuginosus* โดยหลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 90 นำส่วนที่แยกนี้ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนอิออน ดังนี้ ดีอีเออี – โตโยเพิล และบิวทิว – โตโยเพิล ไฮโดรโฟบิก (Butyl- Toyopearl hydrophobic) ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ 11.9 และ 17.7 เท่า ตามลำดับ แล้วสุดท้ายนำไปผ่านคอลัมน์เซฟลาคริลเอส – 300 และ เอฟพีแอลซีโมโนคิว (PLC MonoQ) มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ เป็น 22 และ 26 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ Morita และ Fujio (1997) ได้ศึกษาการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Rhizopus* sp.สายพันธุ์ A-11 ให้บริสุทธิ์ โดยเมื่อนำมาทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80 ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ 3.61 เท่า

ตารางที่ 2.7 ช่วงร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

แหล่งเอนไซม์	ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger	40-80	Freedberg et.al (1975)
Aspergillus niger	70-100	Fogarty และ Benson (1983)
Rhizopus sp. A-11	80	Morita และ Fujio (1997)
Thermomyces lanuginosus	90	Li et.al. (1998)

2.10.1.2 การทำ Dialization

การทำ Dialization เป็นขั้นตอนหนึ่งในการแยกอิออนของเกลือและสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 4,000 ออกไปจาก crude enzyme โดยใช้ dializing tube ที่เป็น cellophane (Takahashi และคณะ ., 1978) หรือใช้ collagen tube (Medda และคณะ ., 1982 ; Razzaque และ Ueda, 1978) ซึ่งรูเล็ก ๆ ที่ผนังของ tube จะยอมให้โมเลกุลเล็กผ่านเข้าออกได้ แต่ไม่ยอมให้เอนไซม์ ซึ่งมีโมเลกุลใหญ่กว่าอิออนของเกลือ ผ่านออกมาได้การแยกอิออนของเกลือออกจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือ crude enzyme อาจใช้เวลาในการแยกอิออนประมาณ 12 ชั่วโมง (Yamasaki และ Suzuki, 1978) 24 ชั่วโมง (Sahaและคณะ., 1979 ; Razzaque และ Ueda, 1978) หรือ 48 ชั่วโมง (Medda และคณะ ., 1982)

โดยการแช่ dializaing tube ในสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น อะซีเตทบัฟเฟอร์ (Miah และ Ueda, 1977) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Takahashi และคณะ ., 1981) เป็นต้น ในระหว่างแช่นั้นจะต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้บ่อย ๆ เพื่อให้อิออนของเกลือซึมออกมาได้เร็วขึ้น ส่วนชนิดของบัฟเฟอร์ ที่ใช้ควรจะมีผลต่อการทำลายเอนไซม์น้อยที่สุด อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองควรจะมีค่าต่ำและเป็นอุณหภูมิที่ให้เอนไซม์มีความคงทนมากที่สุด

2.10.1.3 การกำจัดสี

crude enzyme ที่สกัดได้มักมีสีของอาหารและ สีของสปอร์เชื้อราปะปนอยู่ด้วย ดังนั้นจึงมีการกำจัดสีโดยใช้ Rivanol treatment เช่น นำเอาสารละลายเอนไซม์มา 240 มิลลิลิตร แล้วเติม rivanol ร้อยละ 1 (2-ethoxy-6, 9-diamino-acridinum lactate) ลงไป 15 มิลลิลิตร จะทำให้สีตกตะกอน แยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่มีความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยก rivanol ที่เหลือในเอนไซม์ผสมออก โดยการเติม Kaolin 2 กรัม เขย่าให้กระจายในสารละลายเอนไซม์พร้อมทั้งคนช้าๆ ประมาณ10 นาที แล้วจึงกรอง rivanol ออก กระทำเช่นนี้หลายๆ ครั้งจนกระทั่ง crude enzyme ไม่มีสี (Razzaque และ Ueda , 1978) หรือการแยก rivanol อาจจะใช้ acid clay ได้เช่นเดียวกัน (Yoshino และ Hayashi, 1978)

2.11. อิทธิพลของอุณหภูมิและ พีเอช ต่อความคงตัวของเอนไซม์

2.11.1 อิทธิพลของ พีเอช ต่อความคงตัวของเอนไซม์

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั่วไปมักมีความคงตัวต่อ พีเอช ในช่วงความเป็นกรด คือ อยู่ในช่วง พีเอช 4.0-7.0 เช่น glu I ของ black *Aspergillus* มีความคงตัวที่ พีเอช 4.0-5.0 ที่ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ (Medda และคณะ., 1982) ในขณะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *A. oryzae* มีความคงตัวในช่วง 5.5-7.0 (Lineback และคณะ., 1969) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *A. oryzae* มีความคงตัวในช่วง พีเอช 5.0-6.0 (Mitsue และคณะ ., 1979) หรือมีความคงตัวในช่วง พีเอช 5.6-6.2 (Ohga และคณะ., 1966) ส่วนเอนไซม์จาก *A.awamori* มีความคงตัวที่ 5.5 (Hayashida และคณะ ., 1976) ในขณะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (I,II) จากเชื้อรา *A.awamori* เช่นกัน สามารถทน พีเอช ในช่วงกว้างมากระหว่าง พีเอช 2.0-10.0 และ 4.0-7.0 ตามลำดับ และพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *A.niger* มีความคงตัวในช่วง พีเอช 3.5-6.0 (Lineback และคณะ., 1969)

2.11.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

อุณหภูมิสูงขึ้นมักจะมีผลต่อการทำลายเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทั่วไป มักทนอุณหภูมิได้สูงไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส (Medda และคณะ., 1982; Miah และคณะ., 1977)ในเวลา 30 นาที ที่ พีเอช ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด แต่พบว่ามีเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จาก *A. awamori* var kawachi (Yoshino และ Hayashida, 1978) และจาก A. oryzae (Ohga และคณะ., 1966) บางชนิดที่สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส โดยเกือบจะไม่มีการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์เลยในเวลา 30 นาที

2.12 รูปแบบการเตรียมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในทางการค้า

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีในรูปของเหลวและผง ในการทำเอนไซม์เหลวเข้มข้นอาจใช้วิธีทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศ และเติมโซเดียมคลอไรด์ หรือกรดเบนโซอิคเป็นสารกันบูด (Aunstrup, 1972) นอกจากนี้อาจจะใช้วิธีระเหยเข้มข้นแบบหมุน (rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรือ อุตราฟิลเตรชั่น ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ (membrane) ขนาดโมเลกุล 25,000 และขนาด 60,000 (Andrzejczuk, 1977)

สำหรับเอนไซม์ผงทำการตกตะกอนด้วยร้อยละ 95 แอลกอฮอล์หรือร้อยละ 90 แอมโนเนียมซัลเฟตอิ่มตัว แล้วนำมาทำให้แห้งเก็บในภาชนะกันความชื้น (moisture-proof package) (Andrzejczuk, 1977)

2.13 กากน้ำตาล (molasses)

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย สามารถจัดจำแนกเป็น 3 ชนิดดังนี้ (Paturau,1982; Meade,1985)

1. Blackstrap molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 หรือมีปริมาณของแข็งเมื่อเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:1 อยู่ประมาณ 42 องศาบริกซ์

2. Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48

3. Hightest molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการนำน้ำอ้อยมาย่อยด้วยกรดแล้วระเหยให้เข้มข้นเป็นน้ำเชื่อม อาจเรียกว่า invert molasses มีปริมาณน้ำตาลประมาณร้อยละ 77 นอกจากนี้ยังมีการจำแนกกากน้ำตาลโดยอาศัยปริมาณน้ำและน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์จะใช้ blackstrap molasses ซึ่งมีน้ำตาลซูโครเป็นส่วนประกอบหลัก และ hightest molasses ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลรีดิวซ์

2.13.1. Blackstrap molasses

Blackstrap molasses เป็นผลพลอยได้จากการกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นของเหลวข้น มีความหนืด และมีสีน้ำตาลเข้ม ได้จากการตกผลึกน้ำตาลครั้งสุดท้ายแล้วนำไปปั่นแยกเอาผลึกซูโครสออกของเหลวที่เหลือคือกากน้ำตาล องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลนี้แสดงดังตารางที่ 2.8

องค์ประกอบอย่างหนึ่งในกากน้ำตาลที่สำคัญ คือ วิตามิน ซึ่งเป็นวิตามินที่ทนความร้อนในสภาวะด่าง และมีอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก เช่น ไบโอติน (biotin) ไนอะซิน (niacin) กรดแพนโทธีนิก (pantothenic acid) และ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) วิตามินเหล่านี้มีความสำคัญในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลในอาหารสัตว์ รวมถึงการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการหมักวิตามินหลายชนิดช่วยส่งเสริมการเติบโตและสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์วิตามินที่พบในกากน้ำตาลแสดงดังตารางที่ 2.9

2.13.2. Hightest molasses

Hightest molasses เป็นกากน้ำตาลที่ได้จากการนำน้ำอ้อยมาย่อยด้วยกรดแล้วระเหยให้เข้มข้นเป็นน้ำเชื่อม จึงไม่เรียกว่ากากน้ำตาล ความเข้มข้นที่ได้หลังจากที่ทำการระเหยแล้วมีค่าประมาณ 85 องศาบริกซ์ การใช้ hightest molasses ค่อนข้างกว้างขวางเนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลสูงและมีสารปนเปื้อนต่ำ สามารถใช้ทดแทน blackstrap molasses ได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลอ้อย

กากน้ำตาล		องค์ประกอบ
Usual range (%)	Usual range (%)	
17-25	20	น้ำ
30-40	35	น้ำตาลซูโครส
4-9	7	น้ำตาลกลูโคส
5-12	9	น้ำตาลรีดิวซ์อื่นๆ
1-5	3	คาร์โบไฮเดรทอื่นๆ
7-15	12	เถ้า
2-6	4.5	Nitrogenous compounds
2-8	5	Non nitrogenous acid
0.1-1	0.4	Wax, Sterols, and Phospholipids
		(1-triacontanol, phytosterol, Stigmasterol)
	Varying amounts	วิตามิน

ที่มา :Paturau (1982)

ตารางที่ 2.9 วิตามินที่พบในกากน้ำตาลอ้อย

วิตามิน	ความเข้มข้น(ไมโครกรัม/กรัม)
ไบโอติน (H)	1-3
โคลีน (choline:B_4)	880
กรดโฟลิก (folic acid: B complex)	0.3-0.4
ไนอะซิน (B complex)	17-30
กรดแพนโทธีนิก (B complex)	20-60
ไรโบฟลาวิน (B_2)	2-3
ไพริดอกซีน (pyridoxine: B_6)	1-7
ไทอะมีน (thaiamine: B_1)	0.6-1.0

ที่มา: Paturau (1982)

2.14 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ(anaerobic condition) จุลินทรีย์ที่ใช้กระบวนการหมักแอลกอฮอล์คือยีสต์ โดยทำการหมักแอลกอฮอล์ผ่านวิถี Glycolysis หรือวิถี Embden-Meyerhof-Parnas ยีสต์จะได้พลังงานจากวิถีดังกล่าวเล็กน้อย ผลได้ของแอลกอฮอล์จากกลูโคสตามทฤษฎีเท่ากับร้อยละ 51.1 และเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 48.9 ดังสมการ

$$(C_6H_{12}O_5)_n + H_2O \xrightarrow[\text{or acid}]{\text{enzyme}} n\,C_6H_{12}O_6 \xrightarrow[\text{or bacteria}]{\text{yeast}} 2n\,C_2H_5OH + 2n\,CO_2$$

starch/cellulose/hexan	hexose	ethanol	gas
162 grams	180 grams	92 grams	88 grams
	(100)	(51.1)	(48.9)

การหมักทางอุตสาหกรรม ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ดังสมการ นั่นคือน้ำตาลกลูโคส 1 กิโลกรัม เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ได้ = 92 / 180 กิโลกรัม

= 0.511 กิโลกรัม

= 0.511 / 0.7905 ลิตร

= 0.647 ลิตร

แต่ในทางปฏิบัติกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ น้ำตาลร้อยละ 95 เท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้สำหรับการบำรุงรักษาเซลล์ และสร้างผลพลอยได้ (by product) อื่น ๆ คือ แอลกอฮอล์ร้อยละ 48.4 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 46.5 อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ร้อยละ 0-0.3 กรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ 0.05-0.25 กลีเซอไรด์ (glyceride)ร้อยละ 2.5-3.6 กรดแลกติก (lactic acid)ร้อยละ 0-0.2 กรดซักซินิก (succinic acid) ร้อยละ 0.5-0.77 fusel oil ร้อยละ 0.25-0.5 และเฟอฟูรัล (furfural) เล็กน้อย

2.14.1. **กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์**

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์เกิดขึ้นในสภาวะไม่มีอากาศผ่านวิถี Glycolysis ได้ผลผลิตแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP ปริมาณน้อยกว่าการสร้างพลังงานในสภาวะที่มีอากาศ ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH+2CO_2+2ATP$$

ในสภาวะที่มียีสต์จะใช้กลูโคสในกระบวนการหายใจ (respiration) เพื่อการเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP

$$\mathbf{C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6H_2O + 6CO_2 + 38ATP}$$

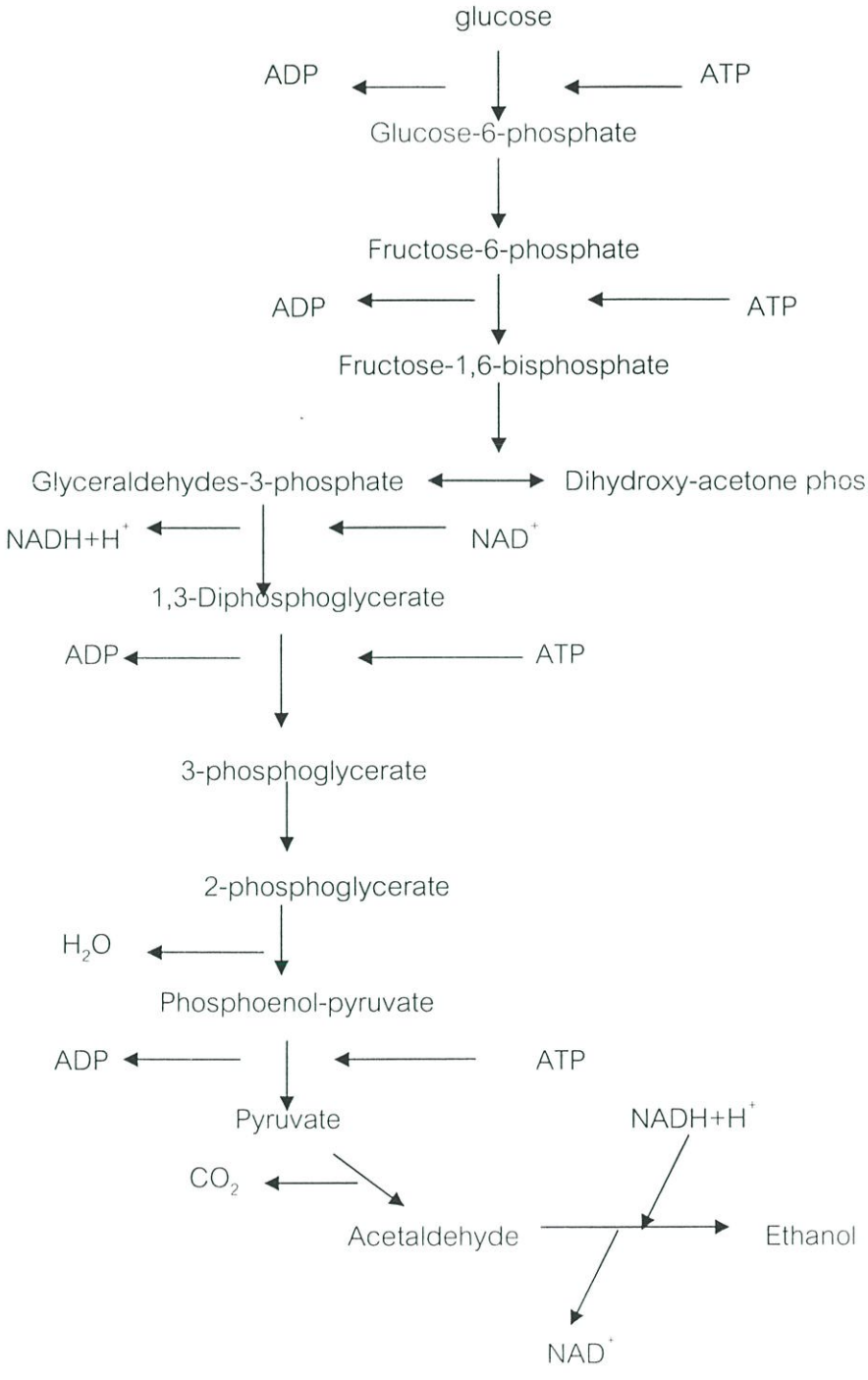
Saccharomyces cerevisia, Saccharomyces uvarum , Kluyveromyces fragilis สามารถใช้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) ทั้งในรูปเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อน เช่น กลูโคส (glucose) ฟรุกโทส (fructose) แมนโนส (mannose) ซูโครส (sucrose) และราฟฟิโนส (raffinose) เป็นต้น

นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดยังสามารถใช้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) ได้ เช่น *Candida utilis* สามารถใช้ไซโลส (xylose) ตามปกติ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถใช้แป้งและเซลลูโลส (cellulose) วัสดุทั้ง 2 อย่างจึงต้องผ่านการย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนนำมาใช้ในการหมัก (Krishnan และคณะ, 2000; McMillan,1997)

Verma และคณะ (2000) ศึกษาการหมักแอลกอฮอล์จากแป้งผ่านขั้นตอนเดียว โดยเปรียบเทียบกระบวนการที่ใช้เชื้อผสมสองชนิดกับ กระบวนการที่ใช้เชื้อชนิดเดียว พบว่าการเพาะเลี้ยง *Saccaromyces diastaticus* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง ร่วมกับ *Saccaromyces cerevisiae* 21 ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้มีความเข้มข้น 24.8 กรัม/ลิตร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 48 เทียบกับเมื่อใช้ *S. diastaticus* เพียงสายพันธุ์เดียว (16.8 กรัม/ลิตร) อย่างไรก็ตาม

ประสิทธิภาพที่ได้ยังต่ำกว่ากระบวนการที่ผ่านสองขั้นตอน

Birol และคณะ (1998) ทำการปรับปรุงยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ให้สามารถเติบโตและหมักแอลกอฮอล์จากแป้ง โดยทำการตัดต่อยีนส์แอลฟาอะมิเลสจาก *Bacillus. subtilis* และกลูโคอะมิเลส จาก *Aspergillus awamori* ใส่เข้าไปในยีสต์



รูปที่ 2.6 การหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์ผ่านวิถี ไกโคไลซีส

ที่มา : Scragg (1999)

2.14.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์

การหมักแอลกอฮอล์อย่างมีประสิทธิภาพต้องอาศัยการวางแผนจัดการกระบวนการหมักให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักแอลกอฮอล์ได้แก่ ธาตุอาหารต่าง ๆ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ปริมาณเชื้ออุณหภูมิ และค่าพีเอช (Jones และคณะ, 1981)

การเตรียมอาหารสำหรับกล้าเชื้อ (inoculum) และอาหารที่ใช้ในการหมัก มีความต้องการธาตุอาหารคล้ายกัน ต่างกันที่การเตรียมกล้าเชื้อต้อง ให้ความสมบูรณ์ของธาตุอาหารมาก เพื่อการเพิ่มเชื้อปริมาณมากอย่างรวดเร็ว สำหรับอาหารที่ใช้ในการหมักต้องการความสมบูรณ์ของธาตุอาหารน้อยกว่า

ธาตุอาหารสำหรับยีสต์แบ่งเป็นธาตุอาหารหลักได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส และธาตุอาหารรองได้แก่ แคลเซียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ ธาตุอาหารหลักเป็นสารที่ยีสต์ต้องการในปริมาณมาก ส่วนธาตุอาหารรองยีสต์ต้องการปริมาณน้อย แต่จำเป็น นอกจากนี้ยีสต์ยังมีความต้องการวิตามินในการเจริญ ได้แก่ ไบโอติน กรดแพนโทธีนิก อิโนซิทอล (inositol) ไทอะมีน กรดนิโคทินิก (nicotinic acid) และไพริดอกซีน ในปริมาณต่าง ๆ กัน (ดุษณี, 2537)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. Hemacytometer ของบริษัท Boeco, Germany รุ่น Neubauer bright
2. เครื่องเขย่า ของบริษัท FIRSTEK SCIENTIFIC รุ่น S103
3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ของบริษัท LAB LINEINSTRUMENTS รุ่น 3527-1
4. เครื่องวัดพีเอชของบริษัท BACKMAN รุ่น 50 pHMETER
5. กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Nikon รุ่น 145377
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge)ของบริษัท Hettich รุ่น Universal 2 S
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) ของบริษัท Hermle-labortech รุ่น Z383 K
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert รุ่น WB 14
9. หม้ออบฆ่าเชื้อราด้วยไอน้ำ(autoclave)ของบริษัท Rexall Industries รุ่น LS-2D
10. เครื่องผสม(mixer)ของบริษัท Scientific Industry รุ่น Vortex- Genie 2
11. เครื่องหมักขนาด 5 ลิตร ของบริษัท New Brunswick Scientific รุ่น BIOFLO III
12. เครื่องอัดลม (air compressor) ขนาด 0.5 แรงม้า ของบริษัท SWAN Industry รุ่น DR-213
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-160 A
14. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท Shimadzu รุ่น LIBROR 4000 H
15. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S
16. ตู้เขี่ยเชื้อ ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123
17. ตู้ดูดควัน ของบริษัท ASTEC รุ่น Astecair 5000 E
18. Hot plate Stirrer ของบริษัท BARNSTAD/THERMOLYNE รุ่น SP46920-26

3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Scharlur
2. เปปโตน (peptone) ของบริษัท Carlo erba Reagenti
3. กลูโคส ของบริษัท Fluka
4. วุ้น (agar) ของบริษัท Scharlau
5. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ($NaH_2PO_4.2H_2O$) ของบริษัท Fluka
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรท($Na_2HPO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck
7. โปแตสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
9. เกลือแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) ของบริษัท Sigma
10. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
11. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
12. ไดโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
13. แมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรท ($MnSO_4.2H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
14. คอปเปอร์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($CuSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Scharlau
15. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
16. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
17. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
18. แอมโมเนียมซัลฟต ($(NH_4)_2SO_4$)ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
19. ยูเรีย (NH_3CONH_3) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
21. สารละลายฟีนอล (C_2H_5OH) ของบริษัท Sigma
22. น้ำกลั่น
23. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCL_2$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
24. โปแตสเซียมไอโอไดร์ (KI) ของบริษัท Sigma
25. กรดไฮโดรคลอริค (HCL) ของบริษัท J.T. Baker
26. กรดซัลฟิวริค(H_2SO_4) ของบริษัท J.T. Baker
27. โซเดียมคลอไรด์ (NaCL) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti

28. โทลูอีน ของบริษัท J.T. Baker

29. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก ของบริษัท Sigma

30. สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน(bovine serum albumin) ของ Fluka

31. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ขององค์การสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัด ฉะเชิงเทรา

32. ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.3 จุลินทรีย์

3.3.1 *Aspergillus awamori* ATCC 22342

จุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เก็บรักษาไว้ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ เดือน

3.4 วัตถุดิบ

3.4.1 แป้งมันสำปะหลัง ตราปลามังกร ของโรงงานแป้งมัน ไทยทำ ชลบุรี

3.4.2 มันเส้นที่ผ่านการบดแล้วจากบริษัท อุตสาหกรรมอาหาร จำกัด

3.5 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

3.5.1 อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342(ภาคผนวก ก)

3.5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 สำหรับผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก ก)

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

3.6.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จำนวน 10^6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ในอาหารเหลวที่ทำการแปรผันชนิดของ

แหล่งคาร์บอน ได้แก่ เด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังและเด็กทรินที่ได้จากมันเส้นความเข้มข้นร้อยละ 3 เปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นชุดควบคุมซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 3 เช่นเดียวกัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 เปปโตนร้อยละ 1 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.01 เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธี Ueda และคณะ(1981) วัดทุก 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 3.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิดได้แก่เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เด็กทรินจากแป้งมันเส้นสำปะหลัง			
เด็กทรินจากมันเส้น			
แป้งมันสำปะหลัง			

3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α-amylase) เพื่อการผลิตเด็กทริน

การหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α-amylase) เพื่อการผลิตเด็กทริน โดยมี 2 ปัจจัยร่วม ได้แก่ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นซึ่งแปรผันตั้งแต่ร้อยละ 1 ร้อยละ 2 ร้อยละ 3 ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 น้ำหนักโดยปริมาตรและความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α-amylase) ชนิด 60 L ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์ตั้งแต่ ร้อยละ 0.1 ร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3 ปริมาตรโดยปริมาตร โดยกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มคือ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการผลิตเด็กทริน 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (D.E.) (ภาคผนวก ข)

การทดลองแบบแฟกตอเรียลทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและความเข้มข้นของเอนไซม์ในการผลิตเด็กทริน ซึ่งแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับดังนี้

ตารางที่ 3.2 แบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและความเข้มข้นของเอนไซม์ในการผลิตเด็กทริน

ความเข้มข้นเอนไซม์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)	ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (D.E.)				
	ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง(ปริมาตรโดยปริมาตร)				
	1%	2%	3%	4%	5%
การทดลองที่ 1	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
การทดลองที่ 2	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%
การทดลองที่ 3	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%

3.6.3 การศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเด็กทริน

การหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเด็กทริน โดยมี 2 ปัจจัยร่วม ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน และเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน จากการทดลองในข้อ 3.6.2 จะได้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและความเข้มข้นของเอนไซม์Termanyl ที่เหมาะสม จะทำการทดลองต่อโดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน ตั้งแต่ 10 , 20 , 30, และ 40 นาที โดยอุณหภูมิที่ใช้มี 3 ระดับคือ 30, 37, 40 องศาเซลเซียส แล้วทำการวิเคราะห์ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (D.E.)(ภาคผนวก ข)

การทดลองแบบแฟกตอเรียล

ทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน และอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับดังนี้

ตารางที่ 3.3 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน และอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (D.E.)			
	เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน (นาที)			
	10 นาที	20 นาที	30 นาที	40 นาที
การทดลองที่ 1	30	30	30	30
การทดลองที่ 2	37	37	37	37
การทดลองที่ 3	40	40	40	40

3.6.4 วิธีการเตรียมเชื้อราเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยถ่ายเชื้อรา จากเชื้อราบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ใน PDA Slant ลงใน PDA agar 3-4 ครั้ง เพื่อให้เชื้อราแข็งแรงพร้อมที่จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ภาคผนวก ก)

เตรียมเชื้อราเริ่มต้น เตรียมเชื้อราจาก PDA Slant บ่มเป็นเวลา 5วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส นำมาใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 5 มิลลิลิตร ที่ผสม Tween 80 0.1 มิลลิลิตร แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อราเขี่ยให้สปอร์กระจายในน้ำกลั่นนำมานับปริมาณ สปอร์ด้วย Hemacytometer ให้ได้ปริมาณสปอร์ 1.0×10^6 ถ่ายเชื้อราลงในอาหารสำหรับผลิตกลูโคอะไมเลส (ภาคผนวก ก) ตามแผนการทดลองตารางที่ 3.4 โดยปริมาตรของอาหารในแต่ละฟลาสก์คือ 100 มิลลิลิตร

3.6.5 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เตรียมเชื้อราจาก PDA Slant ถ่ายลงใน PDA agar 3-4 ครั้ง เพื่อให้เชื้อราแข็งแรง ถ่ายเชื้อราลง PDA slant บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส นำมาใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อราแล้วหลอดละ 5 มิลลิลิตร ที่ผสม Tween 80 0.1 มิลลิลิตร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อราให้สปอร์กระจายลงในน้ำกลั่น ตรวจนับ สปอร์ด้วย Hemacytometer (ภาคผนวก ก) แล้วเจือจางให้ได้ปริมาณสปอร์ตามตารางที่ 3.4

การทดลองแฟกตอเรียลทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ ปริมาณสปอร์เริ่มต้นและปริมาณมิลลิลิตรเริ่มต้นที่ใส่ลงไป ซึ่งแต่ละปัจจัยมี 5 ระดับดังนี้

ตารางที่ 3.4 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ปริมาณสปอร์เริ่มต้นและ ปริมาณมิลลิลิตรเริ่มต้นที่ใส่ลงไป

มิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป (มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)				
	$1x10^6$	$2x10^6$	$3x10^6$	$4x10^6$	$5x10^6$
การทดลองที่ 1	1	1	1	1	1
การทดลองที่ 2	2	2	2	2	2
การทดลองที่ 3	3	3	3	3	3
การทดลองที่ 4	4	4	4	4	4
การทดลองที่ 5	5	5	5	5	5

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ของ Glucoamylase โดยวิธี Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน (ภาคผนวก ข)

3.6.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองข้อ 3.6.5 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ประกอบด้วย เด็กทรินที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 เติมเปปโตนร้อยละ 1, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.02, แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และเฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 0.005 พีเอช 4.5 นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วจึงทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อราข้างต้นแล้วแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ตั้งแต่ 20 , 25 , 30 , 35 ,37 และ 40 องศาเซลเซียสวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ (1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่ 1, 4,และ 5 ของการทดลองจำนวน 5วัน และ ทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองจำนวน 5 วัน (ภาคผนวก ก)

3.6.7 การศึกษาผลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองข้อ 3.6.5 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ประกอบด้วยเด็กทรินที่ได้จากการทดลอง ข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 เติมเปปโตน ร้อยละ 1 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.02 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และเฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 0.005 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วจึงทดลองหาพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิต ตั้งแต่ 3 , 4 , 5 , 6, 7 , 7.5, 8 , 9, 10 วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่1, 4,และ 5 ของการทดลองจำนวน 5 วันและทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองจำนวน 5 วัน (ภาคผนวก ข)

3.6.8 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองข้อ3.6.5ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ประกอบด้วย เด็กทรินที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 เติมเปปโตน ร้อยละ 1 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.02 แมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 0.1 และเฟอรัสซัลเฟต ร้อยละ 0.005 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200รอบต่อนาทีแล้วจึงทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยแปรผันระยะเวลาการบ่มเป็น 1 ,2 ,3 4 , 5 , 6 ,7 และ 8 วัน วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่ 1, 4,และ 5 ของการทดลอง ทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลอง ทุก 12 ชั่วโมง ในวันที่ 6, 7และ 8 ของการทดลอง (ภาคผนวก ข) และวัดน้ำหนักแห้งทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน (A.O.A.C , 1980) (ภาคผนวก ข)

3.6.9 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองข้อ 3.6.5 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับ

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.02 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และเฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 0.005 พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะการบ่ม 5 วัน นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ส่วนแหล่งไนโตรเจน แปรผัน 5 ชนิดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรียและเปปโตน ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0.05 ร้อยละ 0.1 ร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3

การทดลองแบบแฟกตอเรียลทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 3.5 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ชนิดของแหล่งไนโตรเจน				
	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4CL	NH_4NO_3	ยูเรีย	เปปโตน
การทดลองที่ 1	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
การทดลองที่ 2	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
การทดลองที่ 3	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%
การทดลองที่ 4	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%

วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่ 1, 4 และ 5 ของการทดลองจำนวน 5 วัน และ ทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองจำนวน 5 วัน (ภาคผนวก ข)

3.6.10 การศึกษาผลของชนิดของเกลือแร่และความเข้มข้นของเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามผลการทดลองข้อ 3.6.5 ผสมกล้าเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ประกอบด้วย เด็กทรินที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 เติมแอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 0.05, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.02 พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาบ่ม 5 วัน ส่วนแหล่งเกลือแร่แปรผัน 3 ชนิดดังนี้ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟตรวมกับแคลเซียมคลอไรด์ ส่วนความเข้มข้นที่ใช้มี 3 ค่า คือ ร้อยละ 0.005 ร้อย

ละ 0.007 และร้อยละ 0.01 น้ำหนักโดยปริมาตร

การทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิด คือ ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่

ตารางที่ 3.6 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่

ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	ชนิดของแหล่งเกลือแร่		
	$MgSO_4$	$CaCl_2$	$MgSO_4$+$CaCl_2$
การทดลองที่ 1	0.005%	0.005%	0.005%
การทดลองที่ 2	0.007%	0.007%	0.007%
การทดลองที่ 3	0.01%	0.01%	0.01%

วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยวิธีของ Ueda และคณะ(1981) ทุก 8 ชั่วโมงในวันที่ 1, 4 และ 5 ของการทดลองจำนวน 5 วัน และ ทุก 4 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองจำนวน 5 วัน (ภาคผนวก ข)

3.6.11 **การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา** *Aspergillus awamori* ATCC 22342

นำเชื้อราเริ่มต้นของ *Apergillus awamori* ATCC 22342 อายุ 24 ชั่วโมง มาปรับสภาวะตามที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2-3.6.10 ทำการทดลองแบบแฟกทอเรียลทดสอบ 2 ปัจจัย คือ อัตราการให้อากาศ และ ความเร็วรอบของการกวน

ตารางที่ 3.7 แสดงแบบแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิดคือ อัตราการให้อากาศ และ ความเร็วรอบของการกวน

อัตราการให้อากาศ (vvm)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	ความเร็วรอบของการกวน (รอบต่อนาที)			
	100	200	300	400
การทดลองที่ 1	0.1	0.1	0.1	0.1
การทดลองที่ 2	0.15	0.15	0.15	0.15
การทดลองที่ 3	0.2	0.2	0.2	0.2

เก็บตัวอย่างครั้งละ 20 มิลลิลิตร จุดแรกที่ 8 ชั่วโมง และทุกๆ 8 ชั่วโมง ต่อมาจนถึงชั่วโมงที่ 120 นำตัวอย่างไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีนำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์กิจกรรมของกลูโคอะไมเลสตามวิธีของ Ueda และคณะ (1981) (ภาคผนวก ข)

3.7 การวางแผนการทดลองทางสถิติ

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

3.8 การศึกษาการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.8.1. การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อราจากถังหมักที่มีสภาวะที่เหมาะสม(จากข้อ 3.5) จากนั้นนำ อาหารเลี้ยงเชื้อรามาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyne)มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (ภาคผนวก ข)

3.8.2 การศึกษาการแยกและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.8.2.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำ (salt fractionation) เพื่อหาช่วงความอิ่มตัวที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอน แสดงในตารางภาคผนวก ค ขณะเติมจะมีการกวนอย่างช้า ๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 4.0 โดยใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ปริมาณเล็กน้อย ในการละลายโปรตีน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (ภาคผนวก ข)

3.8.2.2 การกำจัดเกลือโดยการทำไดอะไลซีส (dialysis)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต มาทำการแยกเกลือ ออกโดยการไดอะไลซีส โดยใช้ถุงไดอะไลซีสที่ทำให้น้ำหนักโมเลกุล น้อยกว่า 12,000 ดาลตันผ่านได้ ในซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช เท่ากับ 4.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซีสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดตะกอนอื่น ๆ ออกไป เก็บสารละลายเอนไซม์ส่วนใสมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้หลังการกำจัดเกลือแล้ว (ภาคผนวก ข)

3.9 การศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมเพื่อเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6 มา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร ย่อยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เป็นร้อยละ 17 ปริมาตร 5 ลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป 50 กรัม แล้วเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ลงไปปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลาสามวัน ตรวจสอบร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก พีเอช อุณหภูมิ และองศาบริกซ์ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลาสามวัน

เปรียบเทียบกับกากน้ำตาลโดยนำกากน้ำตาลมาวิเคราะห์ความหวานตามวิธีของ Somogyi (1945) ได้ค่าร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์เจือจางให้ได้ค่าร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ของกากน้ำตาลเริ่มต้นเป็นร้อยละ 17 ปริมาตร 5 ลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป 50 กรัม แล้วเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ลงไปปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลาสามวัน ตรวจสอบร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก พีเอช อุณหภูมิ องศาบริกซ์ และ ร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน และ เปรียบเทียบร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก พีเอช อุณหภูมิ องศาบริกซ์ และร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากน้ำเชื่อมที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและกากน้ำตาล

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

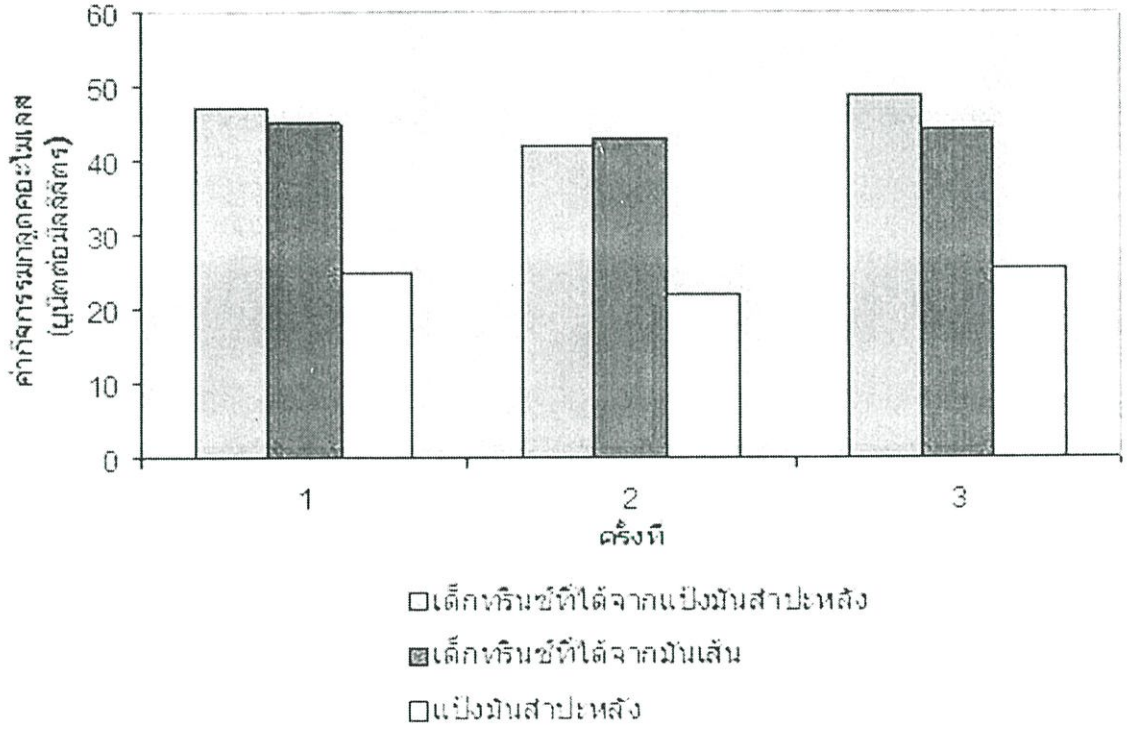
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

4.1.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ เด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังและเด็กทรินที่ได้จากมันเส้นเปรียบเทียบกับ แป้งมันสำปะหลัง ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังและ เด็กทรินซ์ที่ได้จากมันเส้น เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลองและค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง แล้วจะมีค่าคงที่ในวันที่ 5 ของการทดลอง ส่วนแป้งมันสำปะหลังเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง และค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง และคงที่ในวันที่ 5 ของการทดลอง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเมื่อใช้เด็กทรินจากแป้งมันเส้นสำปะหลัง และเด็กทรินจากมันเส้นความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 เปรียบเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดคือ 45.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกเด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.1 ค่ากิจกกรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิดได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง เด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**เฉลี่ย**
เด็กทรินจากแป้งมันเส้นสำปะหลัง	46.98	42.10	48.76	49.95
เด็กทรินจากมันเส้น	45.07	42.95	44.38	44.13
แป้งมันสำปะหลัง(ชุดควบคุม*)	25.01	22.02	25.44	24.16



รูปที่ 4.1 แสดงค่ากิจกกรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นสามชนิด ได้แก่ เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลังเด็กทรินจากมันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง

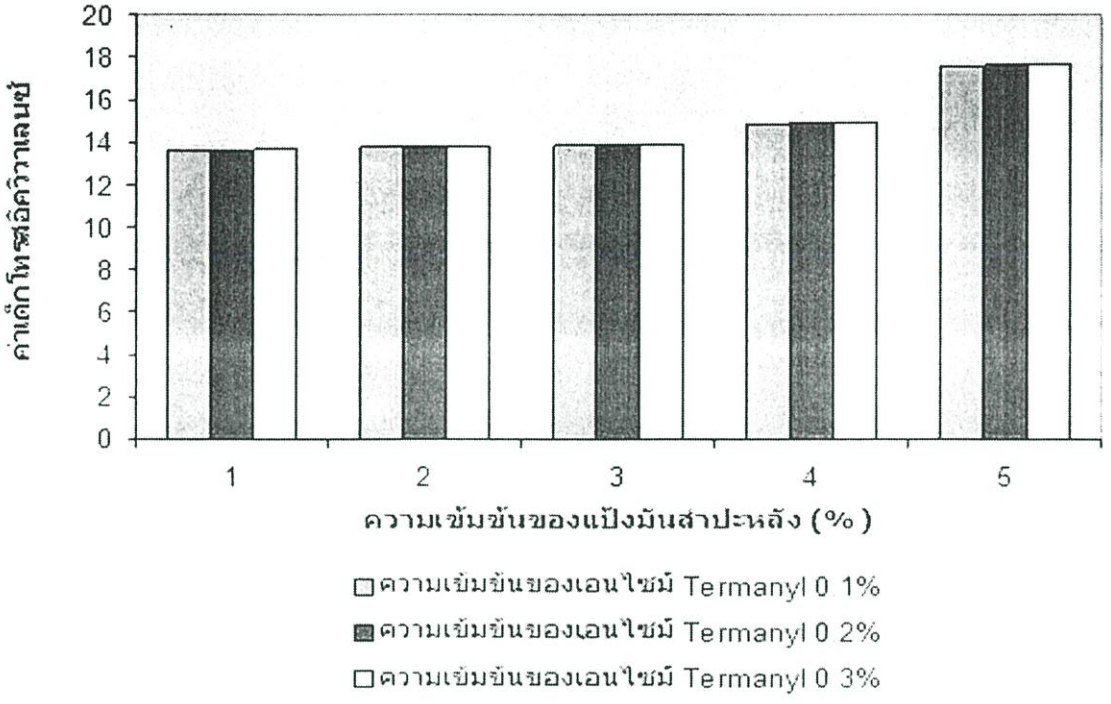
4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α-amylase) เพื่อการผลิตเด็กทริน

ผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมของ การผลิตเด็กทรินของแป้งมันสำปะหลัง โดยมีปัจจัยร่วม 2 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของแป้งมัน ซึ่งแปรผันตั้งแต่ร้อยละ 1 ถึง ร้อยละ 5 น้ำหนักโดยปริมาตร และความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α – amylase) ชนิด 60 L ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของเอนไซม์ตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม คือ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการผลิตเด็กทริน คือ 30 นาที จากผลการทดลองพบว่า การผลิตเด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือความเข้มข้นของน้ำแป้งที่ร้อยละ 5 น้ำหนักโดยปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α – amylase) ชนิด 60 L คือร้อยละ 0.1 ปริมาตรโดยปริมาตร โดยจากการวัดค่า D.E. พบว่า ความเข้มข้นของน้ำแป้งที่ร้อยละ 1 ค่า D.E: ที่ได้มีค่าต่ำ คือ 13.65 ค่า D.E.ที่ร้อยละ 2 มีค่าสูงขึ้นมาเล็กน้อย คือ 13.78 ค่า D.E.ที่ร้อยละ 3 และร้อยละ 4 มีค่าใกล้เคียงกันคือ 13.85 และ 14.90 ตามลำดับ ส่วนค่า D.E. ที่ร้อยละ 5 มีค่าสูงที่สุด คือ 17.63 ความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α – amylase) ที่ใช้ ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3 ให้ค่าไม่แตกต่างกัน คือ ค่า D.E. ที่ได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า D.E. ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 5 และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน ตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3

ความเข้มข้นเอนไซม์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)	ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (D.E.)				
	ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง(น้ำหนักโดยปริมาตร)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0.10%	13.61	13.75	13.84	14.86	17.60
0.20%	13.62	13.77	13.85	14.91	17.63
0.30%	13.65	13.78	13.85	14.90	17.63

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากขึ้นจากร้อยละ 0.1 เป็นร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3 ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (D.E.) จะไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้น ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม คือร้อยละ 0.1 ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงค่า D.E. ที่ได้จากการย่อยน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 5 และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินซ์ ตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึงร้อยละ 0.3

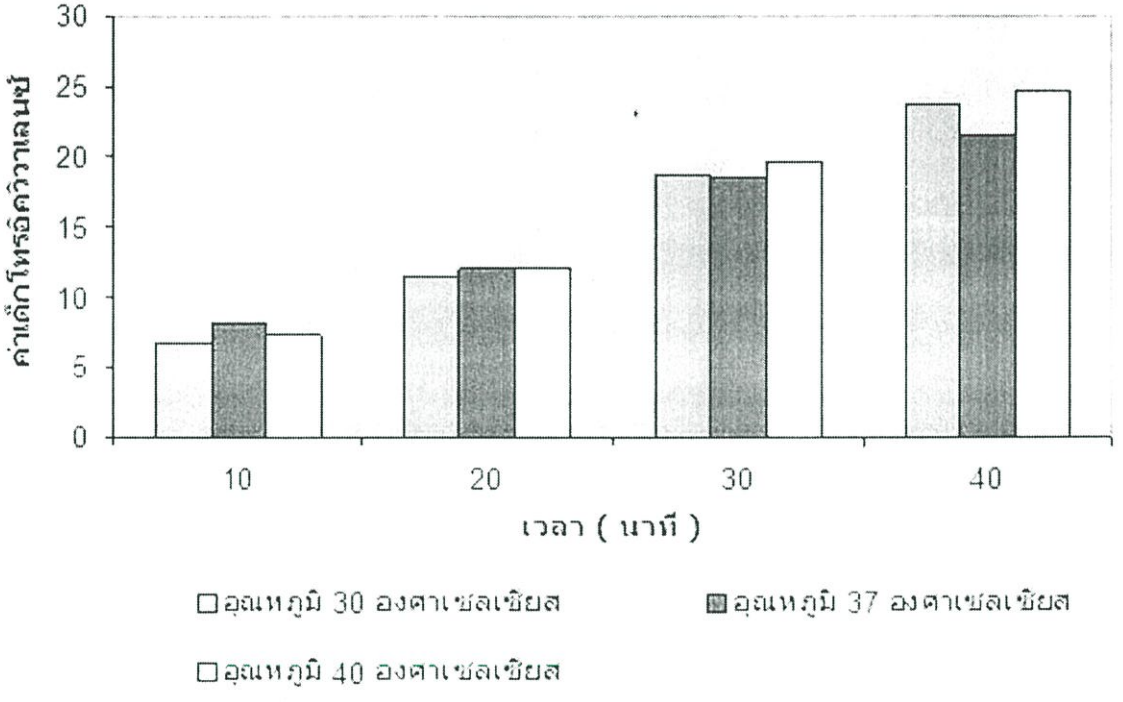
ส่วนปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้งนั้น เมื่อเพิ่มปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้งแล้ว จะทำให้ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์สูงขึ้นตาม เพราะว่าปริมาณสารตั้งต้นสูงขึ้น ดังกราฟที่ 4.2. ซึ่งค่า D.E. ที่ได้ที่ความเข้มข้นของแป้งร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 4 ได้ค่าใกล้เคียงกันไม่แตกต่าง ส่วนที่ร้อยละ 5 ให้ค่าสูงสุด ดังนั้นจึงใช้ค่าความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมคือร้อยละ 5และความเข้มข้นของเอนไซม์Termanyl (α – amylase) คือร้อยละ 0.1 ในการผลิตเด็กทรินเพื่อทำการทดลองต่อไป

4.1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทริน

ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กทริน ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง มี 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 10, 20, 30 และ 40 นาที ส่วนอุณหภูมิมี 3 ระดับ คือ ที่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมของการผลิตเด็กทรินซ์ คือ 30 นาที อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 40 องศาเซลเซียส สำหรับเวลาที่ใช้ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อให้ได้ค่า D.E. ตามต้องการ พบว่าค่า D.E.จะสูงขึ้นตามเวลาที่ใช้ย่อย ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ค่า D.E. ที่เหมาะสม คือ 19.61 ส่วนค่า D.E.ที่ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ 18.53 ที่ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 18.60 ซึ่งค่า D.E. ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่า D.E. ที่ได้จากการแปรผันเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์ (D.E.)			
	เวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน (นาที)			
	10 นาที	20 นาที	30 นาที	40 นาที
30	6.65	11.44	18.60	23.61
37	8.12	12.03	18.53	21.56
40	7.26	12.11	19.61	24.63



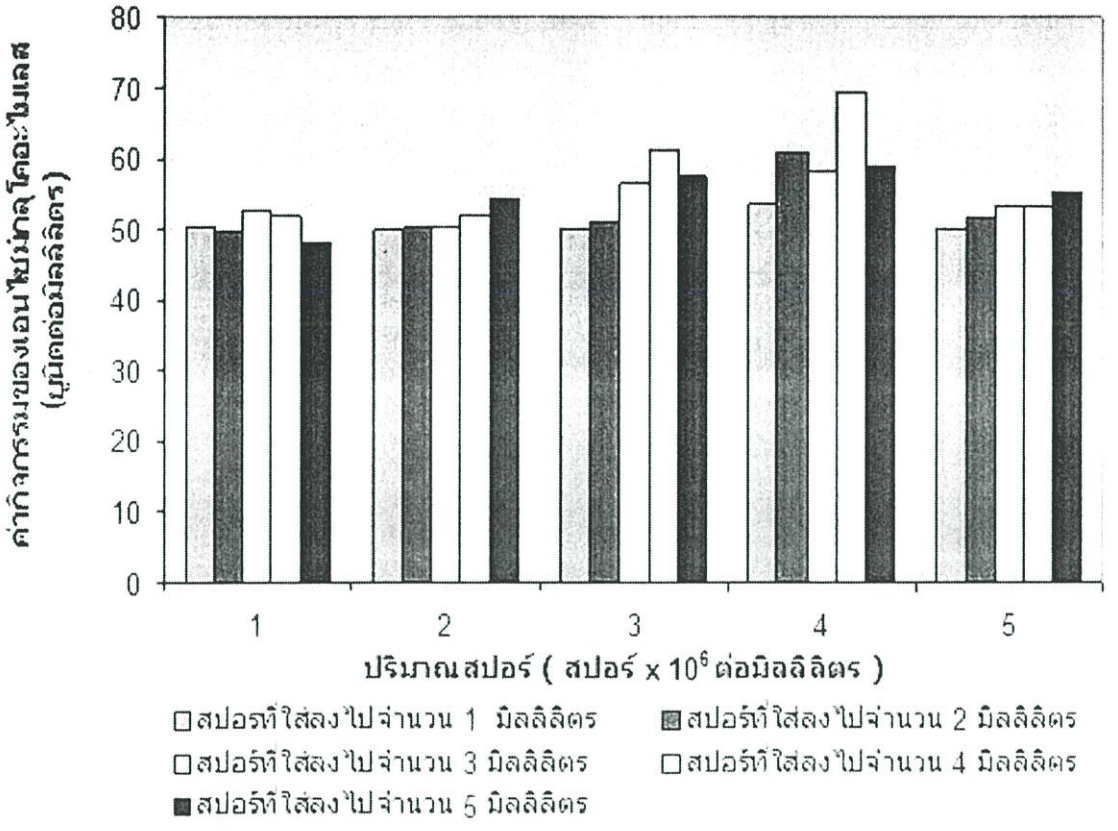
รูปที่ 4.3 แสดงค่า D.E. ที่ได้จากการแปรผันเวลาที่ใช้ในการผลิตเด็กทรินและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเด็กทริน

4.1.4. ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เติมปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นคือ ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ $4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจำนวนมิลลิลิตรที่ปิเปตเท่ากับ 4 มิลลิลิตร โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 69.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 5 ของการหมักซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในทุกความเข้มข้นของปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นกับปริมาณสปอร์เริ่มต้นแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น และมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไปเพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

มิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป (มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)				
	$1x10^6$	$2x10^6$	$3x10^6$	$4x10^6$	$5x10^6$
1	50.37	49.91	50.10	53.48	50.16
2	49.85	50.27	51.06	66.89	51.61
3	52.67	50.36	56.56	65.31	53.36
4	51.90	52.02	61.14	69.31	53.25
5	48.09	54.34	57.42	64.97	55.30



รูปที่ 4.4 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น และมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป เพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณสปอร์เริ่มต้นและมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป ที่ปริมาณสปอร์เริ่มต้น เท่ากับ $4x10^6$ ที่ 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแตกต่างที่ $1x10^6$, $2x10^6$, $3x10^6$และ $5x10^6$ ที่ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และที่ $4x10^6$ ที่ 1 มิลลิลิตร จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า ปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นเท่ากับ $4x10^6$ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 69.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกล้าเชื้อราเริ่มต้นที่ความเข้มข้น $4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อราในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อไป

4.1.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ซึ่งทำการแปรผันอุณหภูมิที่ 20, 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ วันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 และจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 85.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าต่ำ เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่อุณหภูมิ 20, . 25, 30, 37และ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมินี้ในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Jin et. al. (1999) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากน้ำทิ้งในกระบวนการแปรรูปแป้ง (starch processing wastewater) โดยเชื้อรา *Rhizopus oligoporus* DAR 2710 พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เชื้อราชนิดนี้ ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด

ตารางที่ 4.5 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (องศาเซลเซียส)					
	20	25	30	35	37	40
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	55.21	64.53	77.67	85.14	78.65	55.14

4.1.6 ผลการศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ค่าพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus awamori* ATCC 22342ผลการทดลองพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่มีค่าพีเอช 3, 4 และ 5 นั้นให้ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดลองแล้วจะสูงสุดในวันที่ 5 แต่ที่ค่าพีเอช 5.0 เป็น พีเอช ที่ให้ผลค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 102.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 92.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ พีเอช เท่ากับ 6 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะมีค่าสูงรองลงมาจากที่ พีเอช เท่ากับ 5 ส่วนที่ พีเอช 7, 7.5, 8 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในปริมาณที่ไม่มาก ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเสถียรที่ พีเอช อยู่ระหว่าง 3.5 – 5.0 และมีพีเอชเหมาะสมที่ 5.0 (Pazur, 1972)

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

	พีเอชเริ่มต้นของอาหาร								
	3	4	5	6	7	7.5	8	9	10
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	84.70	92.55	102.09	93.21	81.11	79.32	67.01	*	*

* เท่ากับ เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ไม่มีการเจริญ

เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Sadjilhan et.al. (1990) ซึ่งได้รายงานผลการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูง *Myceliophtora thermophila* N14 (ATCC 48104) พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอช เท่ากับ 5.5

4.1.7 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

จากผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 ซึ่งทำการแปรผันระยะเวลาการบ่มเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 วัน ผลการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการบ่มเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 วัน เป็นดังนี้ วันที่ 1 ของการทดลองเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 อยู่ในระยะ lag phase ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 มีการเจริญต่ำ ปริมาณชีวมวลที่คิดได้จากน้ำหนักแห้งมีปริมาณต่ำ ดังนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าต่ำ ต่อมาเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 2 วัน พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาบ่มค่ากิจกรรมที่ได้ของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้น ปริมาณชีวมวลมีค่าสูงขึ้น ส่วนวันที่ 3 และ 4 เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ยังคงอยู่ในช่วง log phase โดยพบว่า การเจริญเติบโตในอัตราสูงปริมาณชีวมวลสูง ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส คือ 69.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการบ่ม และ 89.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการบ่ม ส่วนในวันที่ 5 พบว่าค่าชีวมวลมีค่าเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่ต่ำเมื่อเทียบกับวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการบ่ม ส่วนวันที่ 6, 7 และ 8 มีค่าชีวมวลลดลงและ กิจกรรมเอนไซม์มีค่าน้อยลง ซึ่งจากการศึกษา ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 พบว่า เชื้อรามีการเจริญเติบโตในช่วง lag phase เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและพบว่า *Aspergillus awamori* ATCC22342 มีการเจริญในช่วง log phase เป็นเวลา 15 ชั่วโมง โดยในชั่วโมงที่ 50 ของการทดลองพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 16 กรัมต่อลิตร แล้วจึงเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) อีก 50 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 94 เชื้อราจะเข้าสู่ระยะตาย (death phase) ส่วนการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสนั้นพบว่า เชื้อราจะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสออกมาในชั่วโมงที่ 45 จากนั้นเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณสูงขึ้น และสูงสุดเท่ากับ 101.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร ณ. วันที่ 5 ของการหมัก เป็นที่น่าสังเกตว่า ลักษณะการเจริญของเชื้อราไม่สัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (non-associated) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของFeng et.al.(2002)ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Thermoanaerobactuium thermosaecharolyticum* ATCC 7956 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร เป็นเวลา 46 ชั่วโมง พบว่าเชื้อราชนิดนี้มีระยะ log phase 12 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ระยะพักตัว เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ส่วนการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสนั้นเชื้อราจะปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ในช่วงระยะพักตัว โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด เท่ากับ 101.87 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.7 แสดงระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

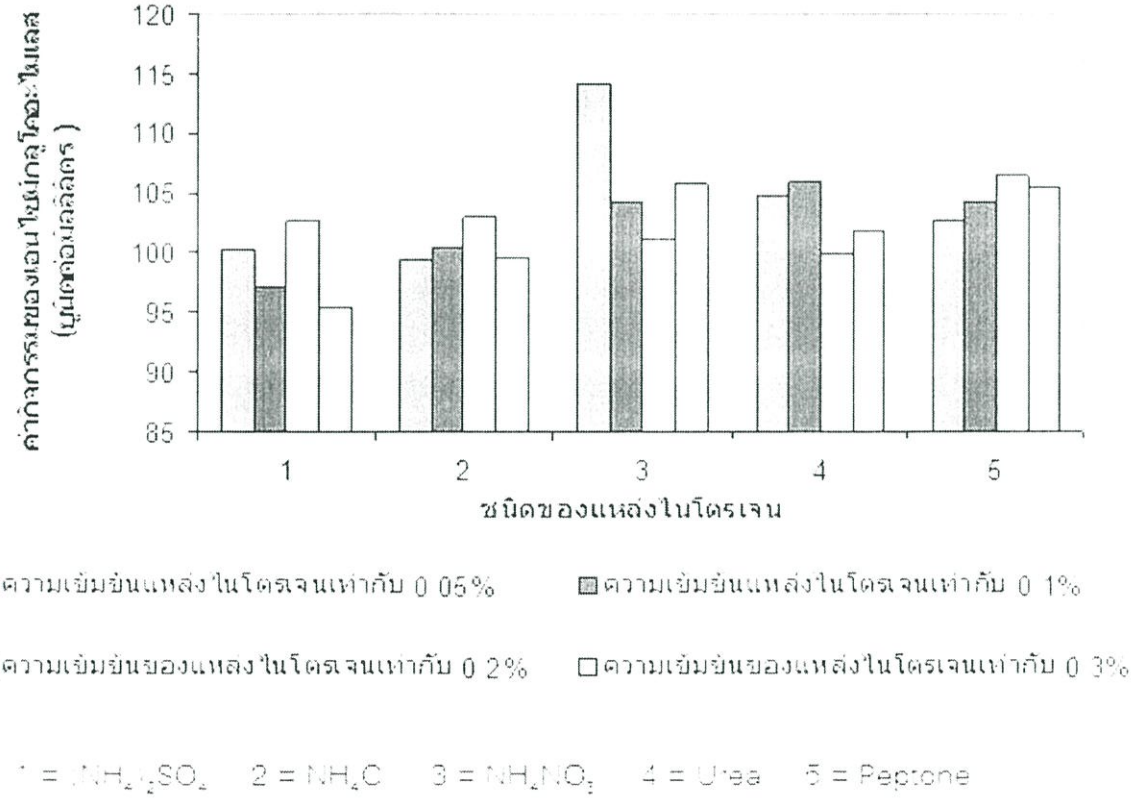
	ระยะเวลาการบ่ม(วัน)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	24.70	33.55	69.85	89.61	101.87	90.32	82.01	75.42

4.1.8 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเราใช้แหล่งไนโตรเจนทั้ง 5 อย่าง อันได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และ เปปโตน ผลปรากฏว่า แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา จากการศึกษาถึงผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยทำการแปรผันชนิดของไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย และ เปปโตน โดยทุกชนิดแหล่งไนโตรเจน ทำการแปรผันความเข้มข้นอีก 4 ค่า คือความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ร้อยละ 0.1 ร้อยละ 0.2 และร้อยละ 0.3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส สูงสุดเท่ากับ 114.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งในวันที่ 5 ของการทดลองจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด

ตารางที่ 4.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะ สม ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน				
	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4CL	NH_4NO_3	ยูเรีย	เปปโตน
0.05%	100.21	99.41	114.17	104.67	102.76
0.10%	97.08	100.36	104.30	105.90	104.23
0.20%	102.65	102.97	101.20	99.84	106.42
0.30%	95.46	99.53	105.77	101.85	105.38



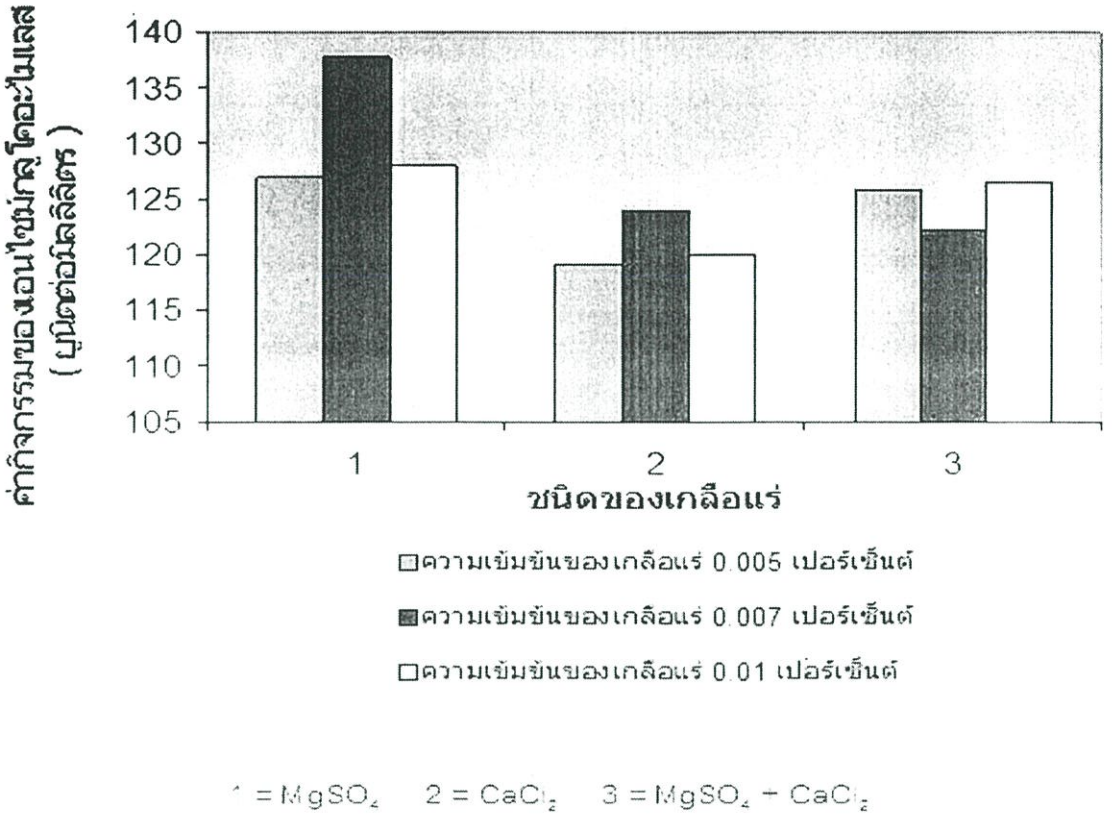
รูปที่ 4.5 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

4.1.9 ผลการศึกษาชนิดของเกลือแร่และความเข้มข้นของเกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

เมื่อทำการทดลองแบบแฟคทอเรียล โดยมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของเกลือแร่ และความเข้มข้นของเกลือแร่นั้น ผลการทดลองปรากฏว่าแมกนีเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.007 มีผลทำให้เชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 137.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดลองในชุดอื่น ๆ จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำกว่า เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เพิ่มแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.007 และร้อยละ 0.01 จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับการทดลองชุดอื่น ๆ ซึ่ง ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.007 มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตน้อยกว่าแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ดังนั้นเราจึงเลือกความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ร้อยละ 0.007 ทำการทดลองต่อไป นอกจากนี้ Sadhukhan et. al. (1990) ได้รายงานถึงผลของชนิด และความเข้มข้นของเกลือแร่ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Myceliophthora thermophica* D14 (ATCC 48104) ผลการทดลองพบว่า Mg^{2+}, Ca^{2+} Co^{2+} และ Zn^{2+} มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ส่วน Mg^{2+} Ca^{2+} และ Mn^{2+} มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้สูง แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราชนิดนี้

ตารางที่ 4.9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งเกลือแร่ และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus awamori* ATCC2234 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	ชนิดของแหล่งเกลือแร่		
	$MgSO_4$	$CaCl_2$	$MgSO_4$+$CaCl_2$
0.005%	126.98	119.08	125.76
0.007%	137.71	123.97	122.21
0.01%	128.01	120.02	126.44



1 = $MgSO_4$ 2 = $CaCl_2$ 3 = $MgSO_4$ + $CaCl_2$

รูปที่ 4.6 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันชนิดของแหล่งเกลือแร่ และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

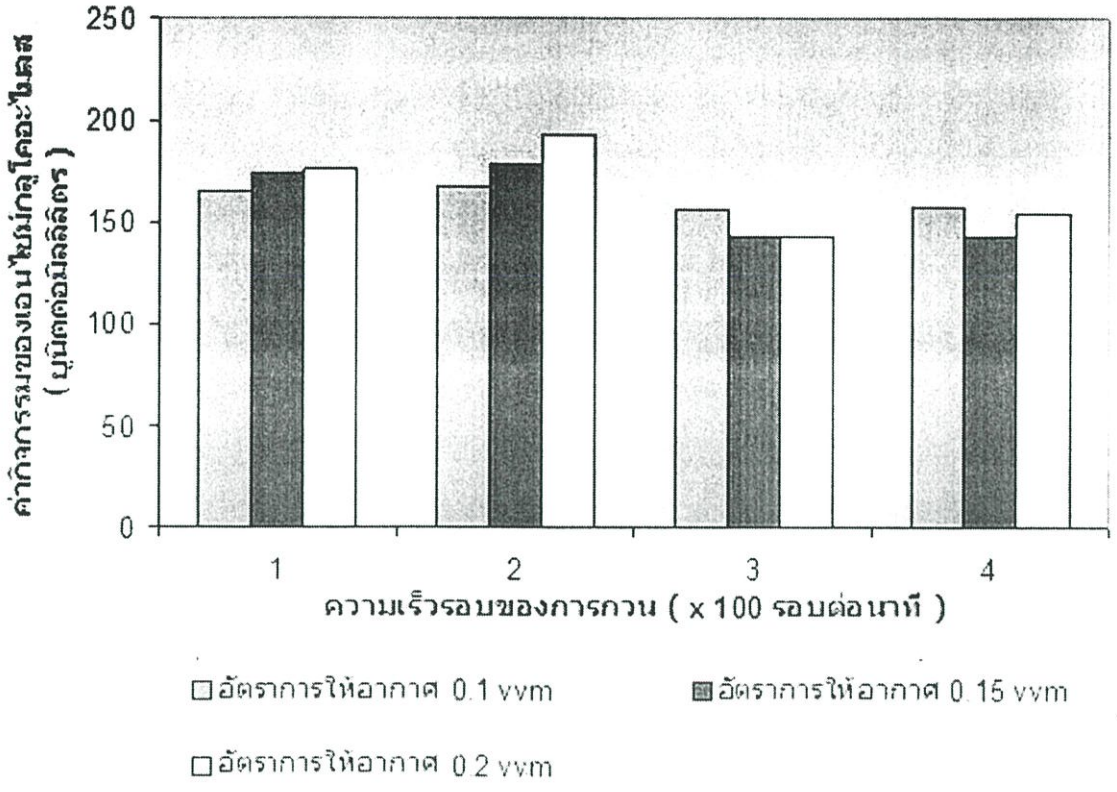
4.1.10 **ผลการศึกษาอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน ในระดับถังหมักขนาด5 ลิตรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา** *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ผลการทดลองแบบแฟคทอเรียลปรากฏว่าปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุด เมื่ออัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาทีและการให้อากาศเป็น 0.2 วีวีเอ็ม ดังแสดงในตารางที่ 4.10 จากผลนี้แสดงว่าการกวนและ การให้อากาศมีอิทธิพลร่วมกันต่อ การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มการให้อากาศจาก 0.1 วีวีเอ็ม 0.15 วีวีเอ็ม และ 0.2 วีวีเอ็ม จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงขึ้น เมื่อใช้อัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนมากกว่า 200 รอบต่อนาที จะเกิดฟองจำนวนมาก ทำให้ต้องใช้สารกันฟอง ซึ่งทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลดลง

ผลการให้อากาศต่อออกซิเจนที่ละลายโดยเพิ่มการให้อากาศจาก 0.1 วีวีเอ็ม 0.15 วีวีเอ็ม และ 0.2 วีวีเอ็ม สำหรับอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที เวลาที่ออกซิเจนหมดจะเลื่อนจาก ชั่วโมงที่ 28 เป็นชั่วโมงที่ 54 และเมื่อใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เวลาที่ออกซิเจนหมดจะเลื่อนจาก ชั่วโมงที่ 32 เป็นชั่วโมงที่ 67 เนื่องจากออกซิเจนในอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการหมักเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความรู้เกี่ยวกับการให้อากาศและการกวนที่มีผลต่อออกซิเจนในอาหารจึงเป็นประโยชน์สำหรับการหมักเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอย่างยิ่ง

ตารางที่ 4.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากการแปรผันอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน เพื่อศึกษาการแปรผัน อัตราการให้อากาศและ ความเร็วรอบของการกวน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ.วันที่ 5 ของการหมัก

อัตราการให้อากาศ (vvm)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	ความเร็วรอบของการกวน (รอบต่อนาที)			
	100	200	300	400
0.1	164.96	167.89	156.43	157.44
0.15	174.31	178.32	142.54	142.60
0.2	175.90	193.29	143.08	154.56



รูปที่ 4.7 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการแปรผันอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบของการกวน เพื่อศึกษาการแปรผัน อัตราการให้อากาศและ ความเร็วรอบของการกวน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ณ. วันที่ 5 ของการหมัก

4.2 ผลการศึกษาการแยกและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC22342 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวโดยใช้ สภาวะที่เหมาะสม (ข้อ4.1) เป็นเวลา 5 วัน สามารถสกัดสารละลายเอนไซม์ได้ปริมาตร 2 ลิตร มีค่ากิจกรรมรวม (total activity) ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 386,580 หน่วย และค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 42.16 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

4.2.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyne) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 386,580 หน่วยและ ค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific actvity) ของเอนไซม์กลูโคอะ

ไมเลส 42.16 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่าง ๆ จากผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 80 ส่งผลให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตกตะกอนได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fredberg et. al.(1975) ที่ทำการตกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 นอกจากนี้ Morita และ Fujio (1997) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 80 ในการตกตะกอนเอนไซม์ ปริมาตร 2 ลิตร มีค่ากิจกรรมรวมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 347,535.42 หน่วย และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 45.43 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ได้ร้อยละ 89.90 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 1.72 เท่า

4.2.2 การกำจัดเกลือโดยการทำไดอะไลซีส (dialysis)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาแยกเกลือแร่ออก โดยการไดอะไลซีลโดยใช้ถุงไดอะไลซีสที่ทำให้น้ำหนักโมเลกุล น้อยกว่า 12,000 ดาลตันผ่านได้ ในซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช เท่ากับ 4.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซีสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดตะกอนอื่น ๆ ออกไป เก็บสารละลายเอนไซม์ส่วนใสมาวิเคราะห์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 111,226.13 หน่วย และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 103.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ได้ร้อยละ 67.99 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 3.48 เท่า

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการแยกและการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 4 วัน

ขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์รวม(ยูนิต)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ (ร้อยละ)	ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)
สารละลายเอนไซม์	2,000	386,580	9169.35	42.16	100	1
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเข้มข้นร้อยละ 80	2,000	347,535.42	7649.91	45.43	89.90	1.72
การกำจัดเกลือ	600	111,226.13	1079.03	103.08	67.99	3.48

4.3 ผลการศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90

ผลการศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลเมื่อนำไปหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 ปรากฏว่าเมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ผลิตได้นำไปผลิตน้ำเชื่อมและ นำไปทดลองหมักแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับกากน้ำตาล ผลการทดลองปรากฏผลว่าน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสสามารถหมักและผลิตแอลกอฮอล์ ได้รวดเร็วกว่ากากน้ำตาล โดยชั่วโมงที่ 48 ค่าร้อยละแอลกอออล์ที่ละลายในน้ำหมักในน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสมีค่าสูงสุด คือ 7.25 แล้วส่วนในกากน้ำตาล ค่าร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมักเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก คือ 7.13 ส่วนค่าพีเอชน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับกากน้ำตาลโดยค่าพีเอชของน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสในชั่วโมงที่ 24 มีค่า 3.85 ในขณะที่พีเอชของกากน้ำตาลมีค่าในชั่วโมงที่ 24 มีค่า 4.76 ส่วนค่าบริกซ์ในน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสลดลงอย่างรวดเร็วกว่าของกากน้ำตาลโดยในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ค่าบริกซ์ของน้ำเชื่อมที่ได้จากกลูโคอะไมเลสมีค่าต่ำที่สุดในส่วนกากน้ำตาลค่าบริกซ์ของกากน้ำตาลยังคงลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นค่าบริกซ์ต่ำที่สุดของกากน้ำตาล

ตารางที่ 4.12 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการหมักแอลกอฮอล์ โดยใช้น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ชั่วโมงที่	น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส				
	ร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์	องศาบริกซ์
24	4.35	3.85	37	16.95	28.65
48	7.25	4.50	32.0	1.94	12.75
72	7.25	4.23	33.5	1.82	12.55

ตารางที่ 4.13 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการหมักเอธานอล โดยใช้กากน้ำตาล

ชั่วโมงที่	กากน้ำตาล				
	ร้อยละแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำหมัก	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์	องศาบริกซ์
24	3.50	4.76	36.5	16.95	28.70
48	6.85	4.70	33.0	4.38	16.35
72	7.15	4.65	33.5	2.56	14.25

ในการผลิตแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม วัตถุดิบที่นำมาผลิตแอลกอฮอล์ ทำให้ต้นทุนต่อลิตรของแอลกอฮอล์ต่ำที่สุด คือ กากน้ำตาล เพราะว่าไม่ต้องมีขั้นตอนซับซ้อนยุ่งยาก เช่น ขั้นตอนเปลี่ยนแป้งซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรทโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นน้ำตาล แต่เมื่อนำกากน้ำตาลไปผลิตแอลกอออล์ จะเกิดน้ำกากส่าปริมาณมาก ซึ่งน้ำกากส่าเป็นน้ำทิ้งที่ยากต่อการกำจัดอย่างสูง เนื่องจากมีสีดำ ทำให้ต้นทุนการกำจัดน้ำกากส่ามีราคาสูง เป็นเหตุให้ต้นทุนสูงในอนาคตส่วนผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง จะให้ต้นทุนต่อลิตรของแอลกอฮอล์ต่ำลงมาเป็นอันดับสองรองจากกากน้ำตาล ซึ่งปริมาณการผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทยสามารถผลิตหัวมันสำปะหลังสดได้ปีละ 20 ล้านตัน (กล้าณรงค์, 2543) ซึ่งมีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการในการผลิตแอลกอฮอล์เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ จึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจอันดับหนึ่ง ข้อเปรียบเทียบการใช้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังผลิตแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับกากน้ำตาล แสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบการใช้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังกับกากน้ำตาลในการผลิตแอลกอฮอล์

ผลผลิตจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง	กากน้ำตาล
1. ขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อนต้องเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลก่อน	1.ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน
2.น้ำทิ้งกำจัดได้ง่าย	2.น้ำทิ้งกำจัดได้ยากมาก
3.ราคาถูก	3.ราคาถูกกว่า

ส่วนในต่างประเทศ เช่น ในทวีปอเมริกาเหนือนิยมใช้ธัญญาพืช เช่น ข้าวโพดในการผลิตแอลกอออล์ ทางประเทศแถบยุโรปจะใช้หัวผักกาดหวานเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ โดยวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด คือ ข้าวโพดและหัวผักกาดหวานมีราคาสูงกว่า กากน้ำตาลและผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง ทำให้ต้นทุนต่อลิตรของแอลกอฮอล์ สูงกว่า การใช้กากน้ำตาลและผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เมื่อใช้เด็กทรินจากแป้งมันสำปะหลังและมันเส้น เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบว่าเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 จะผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงกว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ส่วนความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังรวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ Termanyl (α-amylase) ที่ใช้ย่อยเพื่อผลิตเด็กทริน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นที่ร้อยละ 5 และความเข้มข้นเอนไซม์ Termanyl (α-amylase)ที่ร้อยละ 0.1 จะให้ผลผลิตเด็กทรินสูงที่สุด คือ ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์เท่ากับ 17.63

การหาระยะเวลาการย่อยและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเด็กตริน พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาการย่อย 30 นาทีและอุณหภูมิการบ่มเป็น 40 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเด็กทรินสูงที่สุด คือ ค่าเด็กโทรสอิควิวาเลนซ์เท่ากับ 19.61

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342 คือ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น $4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ระยะเวลาการบ่มคือ 5 วัน เติมแอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.007 เป็นแหล่งเกลือแร่

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต้องใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 วีวีเอ็ม

การแยกและการทำให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์บางส่วน โดยการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 จากนั้นแยกเกลือออกโดยการไดอะไลซีส ซึ่งได้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 89.90 เมื่อผ่านขั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 และร้อยละ 67.99 เมื่อผ่านขั้นไดอะไลซีส ซึ่งคิดเป็นความบริสุทธิ์ 1.72 และ 3.98 เท่า ตามลำดับ

การนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทดสอบประสิทธิภาพ การย่อยแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำเชื่อมหลังจากนั้นนำน้ำเชื่อมไปหมักแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับ กากน้ำตาลพบว่าน้ำเชื่อมที่ผลิตได้นั้นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 สามารถใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกับกากน้ำตาล โดยมีค่าร้อยละแอลกอฮอล์สุดท้ายที่ละลายในน้ำหมักใกล้เคียงกัน คือ 7.25 ในกรณีของน้ำเชื่อมและ 7.15 ในกรณีของกากน้ำตาล

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต . 2542. **เทคโนโลยีของแป้ง**. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับริเคชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ. 225 น.

กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. **เทคโนโลยีของแป้ง**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 292 หน้า.

ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์. 2526. การเลี้ยงรา *Rhizopus oryzae* บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอะไมเลส. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จตุรพร พรศิลปทิพย์. 2528.เอนไซม์ย่อยสลายแป้งดิบจากเชื้อราอะไมโลไมซีส. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2523. มันสำปะหลัง:การปลูก อุตสาหกรรมการแปรรูปและการใช้ประโยชน์. ภาควิชาไร่-นา. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 439 น.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. กรุงเทพฯ. 437 น.

มุกดา ฐิตะสุต. 2527. **สารชีวโมเลกุล**. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

มีชัย ลัดดี. 2542. การศึกษาสภาวะการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์. รายงานเทคนิควิจัย ปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วชิรพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์. 2542. "การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์พลูลูลาเนสเพื่อใช้ในการทำแผ่นฟิลม์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. 2537. เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. สถาบันวิจัยพืชไร่, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.. กรุงเทพฯ.

สมชาย ดอนคงดี. 2537. การหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง โดยใช้ระบบต่อเนื่องในถังหมักทรงสูงพร้อมด้วยระบบหมุนเวียนเซลล์กลับ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Adams, M. 1953. "Amylases their kinds and properties and factors which influence their activity." **Food Technology**. 7: 35-38.

Allen, W.G. and Dawson, H.G. 1975. "Technology and Uses of Debranching Enzyme." **Food Tecnnology**. 52 : 70-80.

Andrzejezuk hybel, J,K. Bartorzervica, J. Kaezkowshi, B. Kujawski ,K. Piller , M. Rekala -zrobro , and A. Zajac. 1977. "Obtaining of Concentrated Glucoamylase Preperations and Control of Their Stability during Storage." **Acta Alimentaria Polinia**. 3(2) , 151-160.

A.O.A.C. 1970. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 11 th ed. Washington, D.C. : The Association of Official Analytical Chemists.

A.O.A.C. 1980. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 13 th ed. Washington, D.C. : The Association of Official Analytical Chemists.

Aunstrup, K., 1972. "Perparation of Amyloglucosidase." U.S. Pat. 3,677,902, July 18, 1972.

Baker, S.A. and J.G. Fleetwood. 1957. "Studies on *Aspegillus niger* part V III The purification of Glucoamylase." **Journal of American Chemistry Association**. 64: 4587.

Balagopalan, C., G. Padmaja, S. K. Nanda, and S.N. Moorthy. 1988. **Cassava in Food, Feed, and Industry**. CRC Press, Inc., Florida. 205 p.

Baribo, L. E., 1967. "Amyloglucosidase Production by *Apergillus phoenicis*." U.S. Pat. 3,298,926, Jan 17, 1967.

Barton, L. L., C. E. Georgi , and D. R., Lineback, 1972. " Effect of Maltose on glucoamylase formation by *Aspergillus niger*." **Journal of Bacteriology**. 111 (3), 771-777.

Bernfeld, P. 1951. **Enzyme of Strach degradation and synthesis, Advances in Enzymelogy**. Edited by F. F. Nord. New York: Interscience Publishers, Inc.

Bernfeld, P. 1955. "**Amylase α and β**, " **Method in Enzymelogy**. (Colowick , P. S. and O. N.. Kaplan. Eds.) 1 : 149 , Academic Press Inc. Publishers , New York.

Beynum, G.M.A. Van and J.A. Roels. 1985. **Strach conversion Technology**. Marcel Dekker, Inc., NewYork. 19 p.

Birol, G., Z.I. Onsan, B. Kirdar and S.G. Oliver. 1998. Ethanol production and fermentation Characteristics of recombinant *Saccaromyces cerevisiae* strains growth on starch. **Enzyme Microbiology Technology**. 22:672-677.

Boyce, C.O.L. 1986. **Novo's Handbook of Practical Biotechnology.** Novo Industri A/S, Denmark. 125 p.

Chambers, J.A.A. and Rickwood, D. 1993. **Buffer Chelating agents and denaturant in Biochemistry LABFOX.** BIOS Scientific Publishers limited. Oxford. 36p.

Ejiofor, A.O., Y. Chisti and M. Moo-Young. 1996. "Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking quality yeast. " **Enzyme Microbiology Technology.** 18: 519-525.

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

Fleming, I. D. and B. A. Stone. 1965. Fractionation of *Aspergillus niger* amyloglucosidase. **Biochem Journal.** 97 : 13.

Fogarty, W.M. and Benson, C.P. 1983. "Purification and properties of thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger.* " **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.** 18 :271-278.

Forgary , W. M., and C. T. Kelly, 1979. "**Strach Degradind Enzyme of Microbial Origin,**" Progess Progress Industrial Microbiology. (Bull, M. J. ed.) 15 , 89-90 Elsevier Scientific. Publishing Co., Netherland.

Freedberg, I.M., Levin, Y., Kay, C.M., McCubbin, W.D. and Katchalski-Katzir, E. 1975. "Purefication and characterization of Aspergillus niger exo-1,4-glucosidase." **Biochimical Biophysical Acta.** 391 : 361-381.

Fuwa , H . 1954. "The specific change of iodine reaction on sweet potato strach caused by some microorganisms." **Journal of Biochemistry.** 41:583.

Hayashida, S ; T. Nomura; E. Yashino and M. hongo. 1976. "The formation and properties of sublilism modified glucoamylase." **Agricultural Biology Chemistry.** 40(1) : 141-146.

Hayashida, S. and E. Yashino . 1977. "Formation of active derivative of glucoamylase I during the digestion with fungal acid protease and manosidase." **Agricultural Biology Chemistry.** 42(5) : 927-933.

Hayasida, S. and P. G. Hor. 1981. "Raw strach digestion glucoamylase productivity of protease less mutant from *Aspergillus awamori* var kawachi." **Agricultural Biology Chemistry**. 45(2) : 2675-2681.

Hockenhull , D. J. D. 1967. "Recent development in the production and industrial application of amylolytic enzyme derived from filamentous fungi." **Progress in Industrial Microbiology**. 63 :97-136.

Jin, B., Leeuwen, van H.J., Patel, B., Doelle, H.W. and Yu, Q. 1999. "Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater." **Process Biochemistry**. 34: 59-65.

Jones, R.P., N. Pamment and P.F. Greenfield. 1981. "Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variabils." **Process Biochemistry**. 16(3): 42-49.

Kato , K. ; K. Kuswanto ; T. Bando ; and T. Harada. 1976. "Identification of *Endomycopsis figuligera* isolated from Ragi in Indonesia and properties of its crystalline glucoamylase." **Journal of Fermentation Technology**. 54(2) : 821-837.

Kenedy, J.F. et. al. 1987. **Strach Biomass : a Chemical Feedstock for Enzyme and Fermentation Process in Strach : Properties and Potential**. vol. 3. New York : Wiley and Sons.

King , N. J. 1976. "The glucoamylase of Coniphora cerebella." **Biochemistry Journal**. 105:577-583.

Krishnan, M.S., F. Taylor, B.H. Davison and N.P. Nghiem. 2000. "Economic analysis of fuel ethanol production from corn starch using fiuidized-bed bioreactors." **Bioresource Technology**. 75: 99-105.

Krzechowska , M. amd H. Urbanek. 1975. "Isolation and some properties of glucoamylase from *C. charticola* Lindau." **Journal of Applied Microbiology**. 30(7) : 160-166.

Kujawski, M. and A. Zajae . 1974 . "A propositon for purified method of glucoamylase activity determination in microbial material." **Microbiology Abstract**. 10A:3784.

Leloup, V. et. al. 1994. **Enzymatic Processing of Carbohydrates in Bioconversion of Cereal Products**. New York : VCH.

Lineback, D.R ; I. J. Russell and Rasmassen. 1969. "Two forms of the glucoamylase of Aspergillus niger." **Archive of Biochemistry Biophysics**. 134: 539-553.

Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. "The determination of enzyme dissociation constants." **Journal of American Chemistry Association.** 56 : 658-666.

Lowry, O. H. ; N. J. Rosebrough ; A. L. Farr ; and R. J. Randall. 1951. "Production measurement with folin phenol reagent." **Journal of Biologyl Chemistry.** 193 : 265-275.

Medda, S ; B. C. Saha and S. Ueda. 1982. Glucoamylase I of black *Aspergillus*. **Journal of Faculty Agricultural Kyyshu University.** 26 (2.3) : 139-149.

McMillan, J.D. 1997. "Bioethanol production: Status and prospects." Renewable Eng. 10(2/3) : 295-302.

Miah, M.N.N. and S.Ueda. 1977. "Multiplication of glucoamylase of *Aspergillus oryzae* Part 2. Enzymatic and physicochemical properties of three forms of glucoamylase." **Die starke.** 29(7) : 235-239.

Mitsue, T ; B. C. Saha and S. Ueda. 1979. "Glucoamylase of *Arpergillus oryzae* cultured on steamed rice." **Journal of Applied Biochemistry.** 1 : 410-422.

Morita, H. and Fujio, Y. 1997. "High specific activity of raw-strach digesting glucoamylase producing *Rhizopus* sp. A-11 in liquid culture." **Strach/starke.** 49 : 293-296.

Moriyama , S ., S. Kataoka , K. Nakamishi , R . Matsumo , T. Kamikuto ., 1980. "Thermal Stability of immobilized Glucoamylase in the Presence of a Substrate." **Agricultural Biology Chemistry.** 44(11) : 2737-2739.

Nelson, N. 1944. "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biology Chemistry.** 154 : 375-380.

Norris, J. R. and D. W. Ribbons. 1971. **Method in Microbiology.** New York : Academic Press.

Ohga, M ; K. Shimizu and V. Monta. 1966. "Studies on amylase of *Aspergillus oryzae* cultured on rice Part II. Some properties of glucoamylase." **Agricultural Biology Chemistry.** 30(10) : 967-972.

Pazur, J. H. 1972. **Glucoamylase from *Aspergillus niger*.** pp. 931-934. In V.Ginsburg (ed.)., Methods in Enzymology Volume 28 Complex Carbohydrate part b. Academic Press Inc., New York.

Paturau, J.M. 1982. **By products of the cane sugar industry.** Elsevic Publishing Co. Ltd., Amsterdams. 223 p.

Pazur, T. H. R. Knull and A. Cepure. 1971. "Glucoenzymes: Structure and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*." **Carbohydrate Reserch.** 20 : 83-96.

Phillips, L.L. and M.L. Caldwell. 1951." A study of the purification and properties of the glucose forming amylase from *Rhizopus delemar* glucoamylase." **Journal of American Chemistry Association.** 73 : 3559-3563.

Qadeer , M. A ., and T. Kansor , 1971." Nutritional Studies of *Aspergillus awamori* for the Production of Amyloglucosidase." **Pakistan Journal Science Industry Reserch.** 14(3) : 247-250.

Razzaque, A . and S. Ueda . 1978. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae.* **Journal of Fermentation Technology.** 56(4) : 256-302.

Rielly, R. J. 1979. **Strach hydrolysis with soluble and immobilized glucoamylase,** pp. 185-207. In L.B. Wingard Jr., E.K. Katzir and L. Goldstien (eds.) Applied Biochemistry and Bioengineering Volume 2 Enzyme Technology. Academic Press Inc., New York.

Sadhukhan, R. K., Manna, S., Roy, S.K. and Chakrabarty, S. L. 1990. "Thermostable amylotytic enzymes from a cellulolytic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104)." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 33 : 692-696.

Saha, B.C ; T. Mitsue ; S. Ueda and Fukuoha . 1979. "Glucoamylase producted by submerged culture of *Aspergillus oryzae*." **Starch/Starke.** 31:307-314.

Saha, B.C. and Zeikus, J.G. 1989. "Novel Highly Thermostable Pullulanase from Thermophlies." **Tibtechnology.** 7: 234-239.

Scopes, R.K. 1978. **Techniques for protein purification.** *In* Techniques in the Life Science : Technique and Enzymes Biochemistry. Elesevier/North-Holland Biochemical Press, Amterdam. pp. 1-42.

Scragg, A. 1999. **Enviromental Biotechnology.** Addison Wssley Longman Singapone (Pte) Co. Ltd., London. 180 p.

Smiley, K. L., 1967. "Amyloglucosidase Production by *Aspergillus awamori.*" US. Pat. 3,301,768. Jan 31, 1967.

Smiley , K. L. : D.E. Hensley; M. J. Smiley and H.J. Gasdorf. 1971. "Kinetic patterns of glucoamylase isozymes isolated from Aspergillus species." **Archive of Biochemistry Bioengineering.** 16:1661-1177.

Smith , J. A ., and J. R. Frankiewiez , " Medium Containing Enzymatically Liquefied Corn Starch " , US. Pat. 4,169,013. Sept 25, 1979.

Somogyi , M. 1945. " A new reagent for the determination of sugar." **Journal of Biology Chemistry.** 160 : 66.

Sukhumavasi, J; K. Kato and T. Harada. 1975. Glucoamylase, a stain *Endomycopsis fibulrigera* isolated from mould bran (Look Pang) of Thailand. **Journal of Fermentation Technology.** 53 (8) : 559-569.

Sukhumavasi, J., and P. Suyanandana. 1982. "Amylase Production by Submerged Culture Method. " Reserch Project No. 19-13 Report No.1 , TISTR , Bangkok.

Takahishi, T ; Y. Tsuchida and M. Iric. 1978. "Purification and some properies of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus*." **Journal of Biochemistry.** 82:1183-1194.

Takahishi, T ; Y. Tsuchida and M. Iric. 1981. "Purification and characterization of a glucoamylase from *Aspergillus saitoi*." **Journal of Biochemistry.** 89 : 125-134.

Taylor, P.M ; E. J. Napier and I.D. Fleming. 1978. "Some properties of a glucoamylase produced by the Thermophilus fungus *Humicola langinosa*". **Carbohydrate Reserch.** 61 : 301-308.

Tawachpun, K; P. Pinphanichukarn and S. Pichyangkura. 1982. Solid state cultivation of *Rhizopus* sp. For glucoamylase production and purification. Bangkok: Master of Science Thesis. Chulalongkorn University.

Townsend, G.E. and A.A. Lindgrem. 1953. "Viable yeast count." **Cytologia.** 18 :183.

Tsujita, Y. and A. Endo. 1976. "Purification and Characterization of the two molecular of *Aspergillus oryzae* and protease." **Biochemical Biophysical Acta.** 445(10)194-204.

Ueda, S., C.T. Zenin, A. Monterio and Y.K. Park. 1981. "Production of ethanol from cassava strach by non convertional method." **Biotechnology and Bioengineering.** 23 : 291-299.

Ueda, S. and S. Kano. 1975. "Multiple forms of glucoamylase of *Rhizopus* species." **Die Starke.** 123-128.

Underkofler , L. A. 1961. "Methods of assay for microbial enzyme. In Rich , S. development." **Industrial Microbiology.** 2:171-181.

Verma, G., P. Nigam, D. Singh and K. Chaudhary. 2000. "Bioconversion of starch to ethanol in a single- step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21." **Bioresource Technology.** 72 : 261-266.

Vihinen, M. and Mantsala, P. 1989. "Microbiol Amylolytic Enzyme." **Biochemical Molecullar Biology.** 24(2) : 329-418.

Weill C. E. and M. L. Caldwell. 1945. "A study of the essential group of beta-amylase." **Journal of American Chemistry Association.** 67 : 212-214.

Weill, C. E., R. J. Burch ; and J. W. Van Dyk. 1954. "An alpha amyloglucosidase that produce β-D-glucose." **Cereal Chemistry.** 31 : 150.

Whitaker, J.R. 1972. **Principle of Enzymology for the food Science.** Marcel dekker, Inc. New York.

Wiseman, A. 1975. **Handbook of Enzyme Biotechnology.** Ellis Horwood, London. 1020 p.

Yamasaki, Y. and Y. Suzuki. 1978. "Purification and properties of α-glucosidase and glucoamylase from Lentinus edodus (Berk) Sing." **Agricultural Biology Chemistry.** 42(5) : 971-980.

Yoshino, E. and S. Hayashida. 1978. "Enzynatic modification of glucoamylase of *Aspergillus awamori* var. kawachi." **Journal of Fermentation Technology.** 56(4) :289-295.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารแข็ง** Potato dextrose agar (PDA)

Potato, infusion from	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Agar	15 กรัม

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร หนัก 200 กรัม ต้มให้เดือดนานจนชิ้นมันนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำ แล้วจึงเติมน้ำตาล Dextrose , Agar และน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันจึงนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อรา** *Aspergillus awamori* ATCC 22342 **สำหรับผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

1. แป้งมันสำปะหลัง	3%
2. peptone	1%
3. Na_2HPO_4	0.02%
4. $MgSO_4$	0.1%
5. $FeSO_4$	0.005%

ปรับ พีเอช เป็น 4.5 แล้วจึงนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
น้ำยาเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Saccharification ของ Bernfeld(Bernfeld,1951 , 1955)

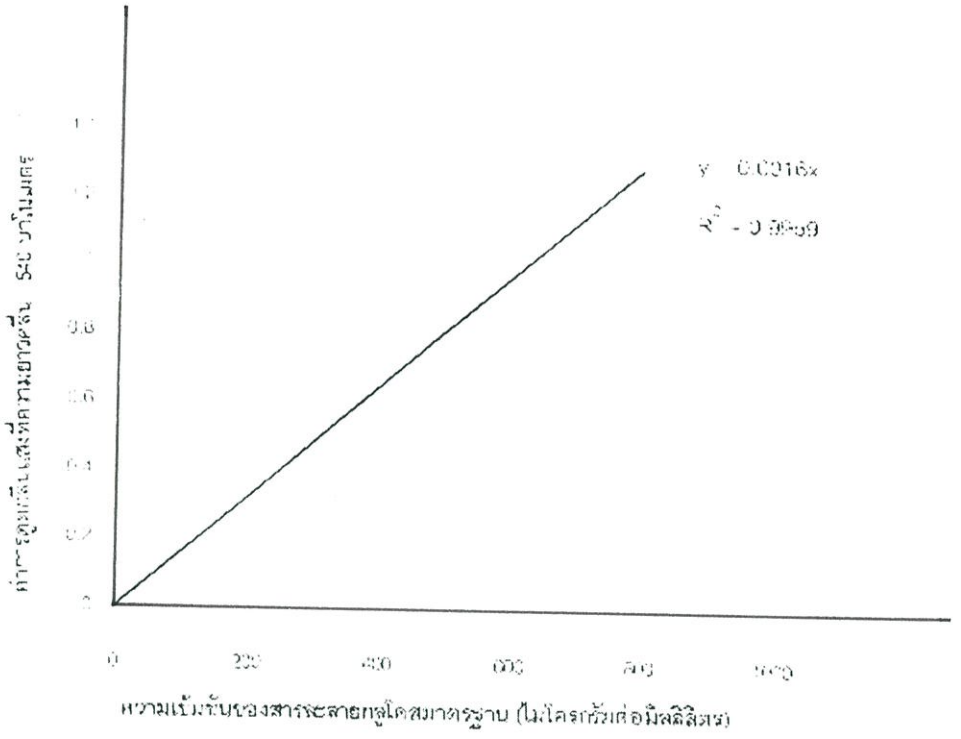
1.1 สารเคมีที่ใช้

(a) โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล

(b) Color reagent ได้แก่ กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5 – dinitrosalisylic acid) 1 กรัม ละลายในสารละลาย (a) 20 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำลงไป 50 มิลลิลิตร คนจนละลายแล้วจึงเติมโปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทต(Rochelle salt) ลงไป 30 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ได้หลายเดือนต้องป้องกันไม่ให้สัมผัสกับคาร์บอนไดออกไซด์

1.2 วิธีการ นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซิ่งจำนวน 1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดสอบที่สะอาด เติมสาร (b) ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัด ค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง Spectronic-20 ที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบ Blank ที่ใช้บัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

1.3 การหากราฟมาตราฐานของกลูโคส เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานให้มีความเข้มข้น $0.09x10^{-3}$ ถึง $0.9x10^{-3}$ กรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย (b) ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่องสเป็คโตรโฟโตมิเตอร์ที่ช่วงคลื่น 540 nm ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและกรัมของกลูโคสจะได้กราฟเส้นตรงดังภาพ



2. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งในตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นโดยวิธีย่อยสลายด้วยกรด (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Association of Official Analytical Chemists (1980))

2.1 สารเคมี

- สารละลายมาตรฐาน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ดี-กลูโคสที่ปราศจากน้ำ.
- Fehling's Solution A
- Fehling's Solution B
- กรดเกลือเข้มข้น (Concentrated Hydrochloric acid)
- สารละลายอินดิเคเตอร์ 1% เมธิลีนบลู.

2.2 การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.2.1 สารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่ง ดี-กลูโคสที่ปราศจากน้ำ. อย่างละเอียด 2.5 กรัม (ซึ่งอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น) ใส่ลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.2 Fehling's Solution A

ชั่ง คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรท ($CuSO_4 . 5H_2O$) 69.28 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.3 Fehling's Solution B

ชั่ง โปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรทเตตระไฮเดรท ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) 346 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์100 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 วัน

2.2.4 สารละลายอินดิเคเตอร์เมธิลีนบลู ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งเมธิลีนบลู 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.3 การหา เฟกเตอร์ ของ Fehling's Solution

2.3.1 ปิเปต Fehling's Solution A และ B อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.3.2 เทสารละลายมาตรฐานกลูโคสใส่ลงในบิวเรท กลั้วบิวเรทด้วยสารละลายนี้ 2 ครั้ง ก่อนใช้ไขสารละลายมาตรฐานกลูโคสจากบิวเรท ประมาณ 19 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี Fehling's Solution อยู่เขย่าให้เข้ากัน นำไปตั้งบนเตาให้ความร้อน (Hot plate) จับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด จนเดือดครบ 2 นาที แล้วรีบหยด สารละลายเมธิลีนบลู ความเข้มข้นร้อยละ1 ลงไป 3 หยดแล้วไทเทรตต่อด้วยสารละลายมาตรฐานกลูโคสจนสีของเมธิลีนบลู หายไปใน 1 นาที (จุดสิ้นสุดปฏิกิริยาจะเห็นตะกอนสีแดงอิฐเกิดขึ้น) อ่านปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกลูโคสทั้งหมด

2.3.3 การคำนวณ

$$\text{เฟกเตอร์ ของ Fehling's Solution} = \frac{G \times V}{1{,}000}$$

เมื่อ G = น้ำหนักของกลูโคสที่ใช้ไป (กรัม)

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

2.4 วิธีการวิเคราะห์

2.4.1 การเตรียมตัวอย่างมันเส้น

บดตัวอย่างมันเส้นให้ผ่าน Test sieve No. 40 หรือมีขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร

2.4.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

a. ชั่งตัวอย่างมันเส้นที่บดและร่อนอย่างละเอียดหรือแป้งมัน 3.5 กรัม ใส่ลงใน ฟล็ากส์ก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดเกลือเข้มข้น 7 มิลลิลิตร และลูกแก้ว 5-6 เม็ด เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากฟล็ากส์ด้วย Air condenser นำไป Reflux 3 ชั่วโมง บนเตาให้ความร้อนโดยใช้ขาตั้งและมือจับ(Clamp) ช่วยในการจับ

b. ทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน

c. กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง " Whatman" No.1 ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 25 มิลลิลิตร แรก

d. ปิเปตสารละลายที่กรองได้ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับสภาพสารละลายตัวอย่างให้มีสภาพเป็นกรดอ่อน ๆ (พีเอช ประมาณ 5) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

e. ปิเปต Fehling's Solution A และ B อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

f. เทสารละลายตัวอย่างจากข้อ d ใส่ลงในบิวเรท กลั้วบิวเรทด้วยสารละลายนี้ 2 ครั้ง ก่อนใช้ไขสารละลายตัวอย่างจากบิวเรทประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงในฟล็ากส์รูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี Fehling's Solution อยู่เขย่าให้เข้ากัน นำไปตั้งบนเตาให้ความร้อนจับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด จนเดือดครบ 2 นาที แล้วรีบหยด สารละลายร้อยละ 1 เมธิลีนบลูลงไป 3 หยด แล้วไทเทรตต่อด้วยสารละลายตัวอย่างจนสีของเมธิลีนบลู หายไปใน 1 นาที (จุดสิ้นสุดปฏิกิริยาจะเห็นตะกอนสีแดงอิฐเกิดขึ้น) อ่านปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ทั้งหมด

2.5 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณแป้ง (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{F \times 500 \times 200 \times 100}{V \times E \times 100} \times 0.9$$

$$\text{ปริมาณแป้งที่หักความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{F \times 500 \times 200 \times 100}{V \times E \times 100} \times 0.9 \times \frac{100}{(100 - M)}$$

เมื่อF = ค่า เฟกเตอร์ของสารละลาย Fehling's (ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน)

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการ Titrate (มิลลิลิตร)

E = น้ำหนักของมันเส้นที่บดและร่อนอย่างละเอียดหรือแป้งมัน (กรัม)

M = ความชื้นของมันเส้นที่บดและร่อนอย่างละเอียดหรือแป้งมัน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสดัดแปลงมาจากวิธีการของ Ueda และคณะ (1981)

3.1 สารเคมี

- กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoic acid (DNS))
- โปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทรท
- โซเดียมไฮดรอกไซด์
- กรดซิตริก
- โซเดียมซิเตรท
- soluble strach

3.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก เตรียมโดยชั่งกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 20 กรัม และโปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทรท 600 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

- สารละลาย 0 1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เตรียมโดยผสมสารละลายกรดซิตริก 0.1 โมลาร์ (กรดซิตริก 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) ปรับพีเอช เป็น 5.0 โดยผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ใช้สารละลายตัวตั้งเป็นสารละลายที่มีพีเอชใกล้กับ 5.0 มากที่สุด ส่วนสารละลายอีกชนิดใช้เป็นตัวปรับ

- สารละลาย gelatinized strach 1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง soluble strach 1 กรัม เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด จนกระทั่งสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

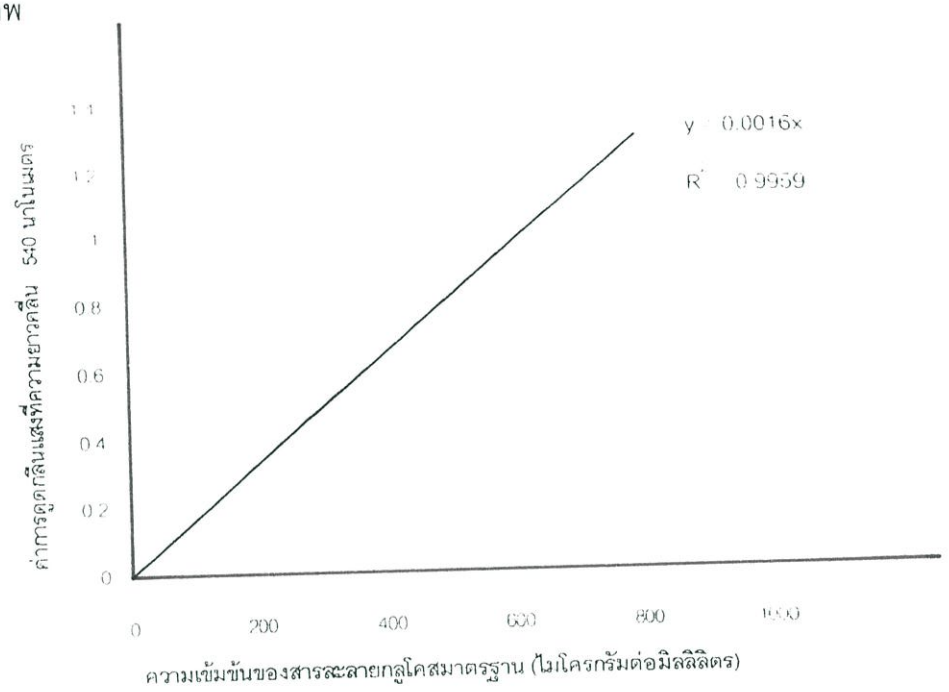
3.3 วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบเติมสารละลาย 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร และสารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย DNS 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แช่น้ำเย็นจัดทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หลอด Blank ใช้น้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์แทนสารละลายตัวอย่าง สำหรับหลอด control ให้เติมสารละลาย DNS ก่อนเติมสารละลายแป้ง

3.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0 , 50 , 100 , 150 , 200 , 250 , 300 และ 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำตามข้อ 3.3 แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐาน

ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสดังแสดงในภาพ



3.5 วิธีการคำนวณ

$$\text{Enzyme unit} = \frac{(\text{OD sample} - \text{OD control}) \times \text{dilution}}{\text{Slope} \times 10} \quad \text{mg/ml/min}$$

3.6 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

1 ยูนิตของกิจกรรมเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิกรัม ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

4. การวิเคราะห์ความชื้นใช้วิธีการของ Association of Official Analytical Chemists (1980)

4.1 วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำมาใส่เดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เมื่อเย็นนำไปชั่งเพื่อทราบน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัมอย่างถูกต้องแน่นอน ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมนำไปอบในตู้ไฟฟ้า อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมาใส่เดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำ ตัวอย่างไปอบซ้ำ จนได้น้ำหนักคงที่

4.2 วิธีการคำนวณ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{100 \times (W_2 - W_1)}{(W_1 - W)}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม (กรัม)

W_1 คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแล้ว (กรัม)

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปค่าสมมูลเด็กซโตส ใช้วิธีของ Association of Official Analytical Chemists (1980)

5.1 สารเคมี

- คอปเปอร์ซัลเฟต
- โพแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรท
- โซเดียมไฮดรอกไซด์
- เมธิลลีนบูล
- ซูโครส
- กรดเกลือ

5.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 โมลาร์ ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 34.639 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร กรองผ่าน glass wool หรือกระดาษกรอง

- สารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรท (alkaline tartrate) เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรท 173 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรทิ้งไว้ 2 วัน ก่อนนำไปใช้

- สารละลายเมธิลลีนบูลร้อยละ 1 เตรียมโดยละลายเมธิลลีนบูล 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้ควรกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

- สารละลายมาตรฐานน้ำตาลอินเวอร์ส (inverst suger standard solution) 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายน้ำตาลซูโครส 9.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง (12-15 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน 20-25 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ก่อนใช้ต้องทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

5.3 วิธีการเทียบมาตรฐานสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและอัลคาไลน์ทาร์เทรท

ปิเปตสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและสารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรท อย่างละ 5 หรือ 12.5 มิลลิลิตรผสมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปล่อยสารละลายมาตรฐานน้ำตาลอินเวอร์สจากบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายประมาณ 23.5 มิลลิลิตร ใส่ ลูกแก้ว(boiling chip) นำไปต้มจนเดือดบน hot plate สารละลายจะมีสีจางลง เติมสารละลายเมธิลลินบูล 3-4 หยด สารละลายจะกลับมามีสีน้ำเงินดังเดิม ค่อย ๆ เติมสารละลายมาตรฐานจากบิวเรตลงไปครั้งละ 2-3 หยด โดยต้องให้ของเหลวเดือดอยู่ตลอดเวลา สังเกตุจุดยุติของการทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นจุดที่ของเหลว เปลี่ยนเป็นสารละลายใส และมีตะกอนสีแดง การไตเตรทควรสิ้นสุดภายใน 60 วินาที

ถ้าสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและสารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรท ที่เตรียมมีความเข้มข้นถูกต้อง ปริมาตรสารละลายมาตรฐานที่ใช้ทั้งหมด เมื่อถึงจุดยุติควรจะได้ประมาณ 24.10 มิลลิลิตร แต่ถ้าไม่ได้ค่านี้ ให้เพิ่มความเข้มข้นของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต โดยเติมคอปเปอร์ซัลเฟตหรือเติมน้ำกลั่นเพื่อลดความเข้มข้นของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต

5.4 วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลายตัวอย่าง ใส่ลงในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร แทนสารละลายมาตรฐาน ดำเนินการตามขั้นตอน เช่นเดียวกับวิธีการเทียบสารละลายมาตรฐาน จดปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่นำไปใช้ แล้วนำไปคำนวณค่าสมมูลเด็กซโตส ตามข้อ 5.5

5.5 วิธีการคำนวณ

$$DE = \frac{250 \times A \times 10}{B \times C \times D}$$

เมื่อ A คือ ค่าแฟคเตอร์จากตารางที่ ข.1

B คือ ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง

C คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

D คือ เปอร์เซ็นต์ Dry solid ในตัวอย่าง

ตารางที่ ข.1 ค่าแฟกเตอร์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ทำปฏิกิริยาพอดีเมื่อใช้สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและสารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรท อย่างละ 5 มิลลิลิตรเป็นสารละลายมาตราฐาน ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร

Titer	Invert Sugar No Sucrose	g Sucrose/100ml Invert Sugar 1	5	10	25	Glucose	Fructose	Moltose Anhyd.	$_{12}H_{22}O_{11}.H_2$	Lactose Anhyd.	$C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$
						Reguired for Reduction of 10 ml Soxhlet Solution					
15	50.5	49.9	47.6	46.1	43.4	49.1	52.2	77.2	81.3	64.9	68.3
16	.6	50.0	.6	.1	.4	.2	.3	.1	.2	.8	.2
17	.7	.1	.6	.1	.4	.3	.3	.0	.1	.8	.2
18	.8	.1	.6	.1	.3	.3	.4	.0	.0	.7	.1
19	.8	.2	.6	.1	.3	.4	.5	76.9	80.9	.7	.1
20	.9	.2	.6	.1	.2	.5	.5	.8	.8	.6	.0
21	51.0	.2	.6	.1	.2	.5	.6	.7	.7	.6	.0
22	.0	.3	.6	.1	.1	.6	.7	.6	.6	.6	.0
23	.1	.3	.6	.1	.0	.7	.7	.5	.5	.5	67.9
24	.2	.3	.6	.1	.9	.8	.8	.4	.4	.5	.9
25	.2	.4	.6	.0	.8	.8	.8	.4	.4	.5	.9
26	.3	.4	.6	.0	.8	.9	.9	.3	.3	.5	.9
27	.4	.4	.6	.0	.7	.9	.9	.2	.2	.4	.9
28	.4	.5	47.7	.0	.7	50.0	53.0	.1	.1	.4	.8
29	.5	.5	.7	.0	.6	.0	.1	.0	.0	.4	.8

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Titer	Invert Sugar No Sucrose	g Sucrose/100ml Invert Sugar 1	Invert Sugar 5	Invert Sugar 10	Invert Sugar 25	Glucose	Fructose	Moltose Anhyd.	Moltose $C_{12}H_{22}O_{11}$.	Lactose Anhyd.	Lactose $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$
					Reguired for Reduction of 10 ml Soxhlet Solution						
30	.5	.5	.7	.0	.5	.1	.2	.0	.0	.4	.8
31	.6	.6	.7	45.9	.5	.2	.2	75.9	79.9	.4	.8
32	.6	.6	.7	.9	.4	.2	.3	.9	.9	.4	.8
33	.7	.6	.7	.9	.3	.3	.3	.8	.8	.4	.8
34	.7	.6	.7	.8	.2	.3	.4	.8	.8	.4	.9
35	.8	.7	.7	.8	.2	.4	.4	.7	.7	.5	.9
36	.8	.7	.7	.8	.1	.4	.5	.6	.6	.5	.9
37	.9	.7	.7	.7	.0	.5	.5	.6	.6	.5	.9
38	.9	.7	.7	.7	.0	.5	.6	.5	.5	.5	.9
39	52.0	.8	.7	.7	41.9	.6	.6	.5	.5	.5	.9
40	.0	.8	.7	.6	.8	.6	.6	.4	.4	.5	.9
41	.1	.8	.7	.6	.8	.7	.7	.4	.4	.6	68.0
42	.1	.8	.7	.6	.7	.7	.7	.3	.3	.6	.0
43	.2	.8	.7	.5	.6	.8	.8	.3	.3	.6	.0
44	.2	.9	.7	.5	.5	.8	.8	.2	.2	.6	.0

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Titer	Invert Sugar No Sucrose	g Sucrose/100ml Invert Sugar 1	5	10	25	Glucose	Fructose	Moltose Anhyd.	Moltose $C_{12}H_{22}O_{11}$.	Lactose Anhyd.	Lactose $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$
		Reguired for Reduction of 10 ml Soxhlet Solution									
45	.3	.9	.7	.4	.4	.9	.9	.2	.2	.7	.1
46	.3	.9	.7	.4	.4	.9	.9	.1	.1	.7	.1
47	.4	.9	.7	.3	.3	51.0	.9	.1	.1	.8	.2
48	.4	.9	.7	.3	.2	.0	54.0	.1	.1	.8	.2
49	.5	.0	.7	.2	.1	.0	.0	.0	.0	.8	.2
50	.5	.0	.7	.2	.0	.1	.0	.0	.0	.9	.3

6. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา

การนับจำนวนสปอร์โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ตามวิธีของ Townsend และ Lindgrem (1953)

6.1 วิธีการ

- วาง cover glass ของ Haemacytometer ให้อยู่กึ่งกลางสไลด์ ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว แตะที่ขอบสไลด์และปล่อยตัวอย่างไหลเข้าไประหว่างช่องใต้ cover glass และสไลด์ให้เต็มพอดี

- นับจำนวนสปอร์โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า นับสปอร์ที่อยู่ในตารางในช่องทะแยงซ้ายและขวา รวม 10 ช่อง และนับทั้งสองตาราง สปอร์ที่คาบเกี่ยวเส้นตารางให้นับเฉพาะที่คาบเกี่ยวเส้นของตารางทางด้านล่างและทางด้านขวา จำนวนสปอร์ที่นับควรอยู่ในช่วง 10-30 สปอร์ใน 1 ช่อง นำมาค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ต่อช่อง

- การคำนวณจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตรบน Haemacytometer มีระยะทางระหว่างสไลด์ถึง cover glass เท่ากับ 1 มิลลิเมตร มีความกว้างและความยาวในแต่ละช่วงเท่ากันคือ 0.2 มิลลิเมตร ดังนั้น ในแต่ละช่องจะมีปริมาตรเท่ากับ 4×10^{-3} ลูกบาศก์มิลลิเมตร

จำนวนสปอร์ต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร = $Y \times \frac{1}{4} \times 10^{6} \times$ ระดับความเจือจาง

เมื่อ Y = จำนวนสปอร์ที่นับได้เฉลี่ยใน 1 ช่อง

7. การเตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : กรดซิตริก 0.1 โมลาร์ (กรดซิตริก 21.01 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : โซเดียมซิเตรท 0.1 โมลาร์ (โซเดียมซิเตรท 29.41 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

ตารางที่ ข.2 การเตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ

พีเอช	สารละลาย A	สารละลาย B	พีเอช	สารละลาย A	สารละลาย B
	(มิลลิลิตร)	(มิลลิลิตร)		(มิลลิลิตร)	(มิลลิลิตร)
3.0	46.5	3.5	4.8	23.0	27.0
3.2	43.7	6.3	5.0	20.5	29.5
3.4	40.0	10.0	5.2	18.5	32.0
3.6	37.0	13.0	5.4	16.0	34.0
3.8	35.0	15.0	5.6	13.7	36.3
4.0	33.0	17.0	5.8	11.8	38.2
4.2	31.5	18.5	6.0	9.5	41.5
4.4	28.0	22.0	6.2	7.2	42.8
4.6	25.5	24.5	-	-	-

8. การหาโปรตีนโดยวิธี Lowry Method (Norris , 1971 , Lowry, 1951)

8.1 สารเคมีที่ใช้

(a) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

(b) 0.5 เปอร์เซ็นต์ คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรท ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ของ โปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทรท (สารละลาย A)

(c) สารละลาย 5% ของ โซเดียมคาร์บอเนต (สารละลาย B)

(d) สารละลายอัลคาไลน์ทาร์เทรท (สารละลาย A 2 มิลลิลิตร + สารละลาย B 50 มิลลิลิตร)

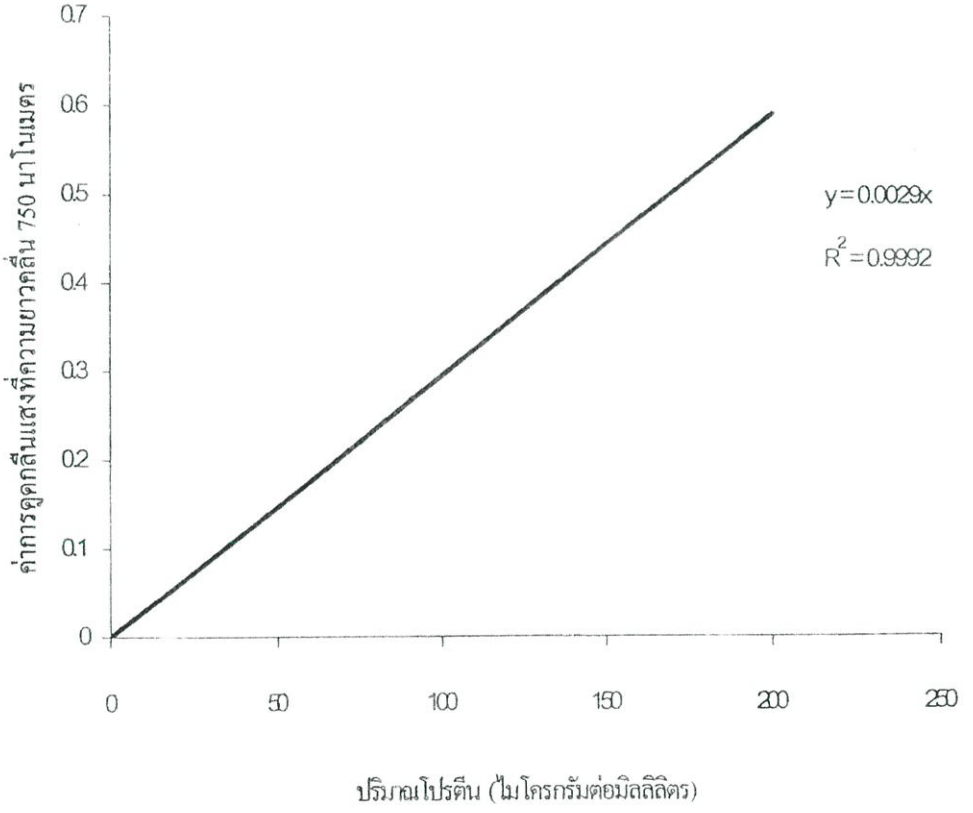
(e) Folin reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (Folin reagent : distilled water = 1:1)

(f) สารละลายโปรตีนมาตรฐาน : ได้แก่ Human albumin ของ Sigma Company 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8.2 วิธีการ ใช้สารละลายตัวอย่าง (ที่มีโปรตีนอยู่ในปริมาณไม่เกิน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดสอบที่ 0.5 มิลลิลิตร เติมสาร (a) 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำไปทำให้เย็น แล้วเติมสาร (d) 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที แล้วรีบเติมสาร (c) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำมาวัดค่า ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เป็น Blank และนำค่า

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของโปรตีนมาตรฐานจะทราบโปรตีนที่มีในสารละลายตัวอย่าง

8.3 การหากราฟมาตราฐานของโปรตีนใช้ Human albumin ของ Sigma Company เป็น Standard protein เตรียมสารละลาย Human albumin ให้มีความเข้มข้น 30 , 60 , 90 , 120 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดสอบที่สะอาด 3 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร แต่ละหลอดเติมสาร (a) 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำไปทำให้เย็น แล้วเติมสาร (d) 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที แล้วรีบเติมสาร (c) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เป็น Blank เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรกับไมโครกรัมของโปรตีนมาตรฐานจะได้กราฟเส้นตรงดังภาพ



ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan New Multiple-Range Test(DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นมั่น 0.01

ตารางที่ ค.1 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ชุดควบคุม*	เด็กทรินที่ได้จากแป้งมันสำปะหลัง	เด็กทรินที่ได้จากมันเส้น
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	24.16^{b}	45.95^{a}	44.13^{a}

ชุดควบคุม* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.2 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมโดยมี 2 ปัจจัย ได้แก่ปริมาณสปอร์และมิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไปที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

มิลลิลิตรของสปอร์ที่ใส่ลงไป (มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				
	$1x10^{6}$	$2x10^{6}$	$3x10^{6}$	$4x10^{6}$	$5x10^{6}$
1	50.37^{b*}	49.91^{b}	50.10^{b}	53.48^{b}	50.16^{b}
2	49.85^{b}	50.27^{b}	51.06^{b}	66.89^{a}	51.61^{b}
3	52.67^{b}	50.36^{b}	56.56^{b}	65.31^{a}	53.36^{b}
4	51.90^{b}	52.02^{b}	61.14^{b}	69.31^{a}	53.25^{b}
5	48.09^{b}	54.34^{b}	57.42^{b}	64.97^{a}	55.30^{b}

* หมายถึง ชุดควบคุมการทดลอง

ตารางที่ ค.3 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม(องศาเซลเซียส)					
	20	25	30	35	37	40
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	55.21[b]	64.53[b]	77.67[b]*	85.14[a]	78.65[b]	55.14[b]

* หมายถึง ชุดควบคุมการทดลอง

ตารางที่ ค.4 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

	พีเอชเริ่มต้นของอาหาร								
	3	4	5	6	7	7.5	8	9	10
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	84.70[b]	92.55[a]*	102.09[a]	93.21[a]	81.11[b]	79.32[b]	67.01[b]	-	-

* หมายถึง ชุดควบคุมการทดลอง

ตารางที่ ค.5 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

	ระยะเวลาการบ่ม(วัน)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	24.70[b]	33.55[b]	69.85[b]	89.61[a]	101.87[a]*	90.32[a]	82.01[b]	75.42[b]

* หมายถึง ชุดควบคุมการทดลอง

ตารางที่ ค.6 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ชนิดของแหล่งไนโตรเจน				
	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4CL	NH_4NO_3	ยูเรีย	เปปโตน
0.05%	100.21[b]	99.41[b]	114.17[a]	104.67[b]	102.76[b]
0.10%	97.08[b]	100.36[b]	104.30[b]	105.90[b]	104.23[b]*
0.20%	102.65[b]	102.97[b]	101.20[b]	99.84[b]	106.42[b]
0.30%	95.46[b]	99.53[b]	105.77[b]	101.85[b]	105.38[b]

* หมายถึง ชุดควบคุมการทดลอง

ตารางที่ ค.7 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมโดยมี 2 ปัจจัยได้แก่ ชนิดของแหล่งเกลือแร่และความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

ความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	ชนิดของแหล่งเกลือแร่		
	$MgSO_4$	$CaCl_2$	$MgSO_4$+$CaCl_2$
0.005%	126.98[a]	119.08[b]	125.76[b]
0.007%	137.71[a]	123.97[b]	122.21[b]
0.01%	128.01[a]*	120.02[b]	126.44[a]

* หมายถึง ชุดควบคุมการทดลอง

ตารางที่ ค.8 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของการผลิตกลูโคอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมี 2 ปัจจัยได้แก่ ความเร็วรอบการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus awamori* ATCC 22342

อัตราการให้อากาศ (vvm)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	ความเร็วรอบของการกวน (รอบต่อนาที)			
	100	200	300	400
0.1	164.96[b]*	167.89[b]	156.43[b]	157.44[b]
0.15	174.31[a]	178.32[a]	142.54[b]	142.60[b]
0.2	175.90[a]	193.29[a]	143.08[b]	154.56[b]

* หมายถึง ชุดควบคุมการทดลอง

ภาคผนวก ง
ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตารางที่ ง.1 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0 องศา . เซลเซียส)	ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย มิลลิลิตร)																	
	10	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	5.6	11.4	14.4	17.6	20.9	24.3	27.7	31.3	35.1	39.0	43.0	47.2	51.6	54.1	56.7	61.1	65.9	70.7
10		5.7	8.6	11.8	15.0	18.3	21.6	25.1	28.8	32.6	36.5	40.6	44.9	45.4	50.3	54.4	58.9	63.6
20			2.9	5.9	9.1	12.3	15.5	18.9	22.5	26.2	30.0	34.0	38.2	42.4	43.3	47.3	51.9	56.5
25				3.0	6.1	9.3	12.5	15.8	19.3	23.0	26.7	30.7	34.8	36.9	39.0	42.9	45.9	48.9
30					3.0	6.2	9.4	12.7	16.2	19.8	23.5	27.3	31.4	34.5	36.7	40.8	45.1	49.5
35						3.1	6.3	9.4	12.9	16.4	20.0	23.8	27.8	29.8	31.9	35.8	38.8	41.8
40							3.1	6.4	9.7	13.2	16.8	20.5	24.5	27.5	30.0	34.0	38.1	42.4
45								3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	21.0	23.1	25.0	29.2	32.3	35.2
50									3.3	6.6	10.1	13.7	17.6	20.4	23.3	27.2	31.2	35.3
55										3.3	6.7	10.3	13.7	17.1	20.5	23.9	27.3	30.7
60											3.4	6.9	10.5	13.5	16.6	20.4	24.2	28.3
65												3.2	6.6	10.3	13.7	17.1	20.5	23.9
70													3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75														3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80															3.3	6.8	10.4	14.1
85																3.4	6.9	10.6
90																	3.4	7.1
95																		3.5
100																		0.0

ที่มา : Chambers and Rickwood(1993)

ประวัติผู้เขียน

นายเทียรชัย ชาญสง่าเวช เกิดวันที่ 1 มกราคม 2518 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2542 จนถึงปีการศึกษา 2547