# การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

# GLUCOAMYLASE PRODUCTION FROM AGRICULTURAL WASTES BY *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310


สุกร เกียรติมานะโรจน์

SUKORN KIATMANAROJ


วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548


ISBN 974-15-1610-9

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

# GLUCOAMYLASE PRODUCTION FROM AGRICULTURAL WASTES BY *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

T060942

ศุภร เกียรติมานะโรจน์

SUPORN KIATMANAROJ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 60942
วัน,เดือน,ปี - 7 ก.ค. 2549

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2548

ISBN 974-15-1616-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

.b.....
.i.....

# GLUCOAMYLASE PRODUCTION FROM AGRICULTURAL WASTES BY *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

SUPORN KIATMANAROJ

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

2005

ISBN 974-15-1616-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**COPYRIGHT 2005**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 |
| **นักศึกษา** | นางสาวศุภร เกียรติมานะโรจน์ |
| **รหัสประจำตัว** | 45064563 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| **พ.ศ.** | 2548 |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** | รศ.สุขใจ ชูจันทร์ |

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 โดยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์โดยนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับผลิตเอนไซม์ ได้แก่ เศษเหลือทิ้งจากมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ โดยที่เชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดคือ 179.32 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทเมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมมีดังต่อไปนี้ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ยูเรียที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรทร้อยละ 60 ใช้กากมันสำปะหลังโดยไม่มีการคัดขนาดก่อนนำมาใช้ อัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมคือ 1.0:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) และบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบว่าการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 โดยมีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นไปพร้อมๆ กับการเจริญของเชื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าเท่ากับ 185.49 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และในการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และกรองเอนไซม์โดยใช้อัลตร้าฟิวเตรชันโดยใช้ ultrafiltration membrane cut off 30,000 ดาลตัน ยี่ห้อ Millipore เพื่อทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้น พบกิจกรรมจำเพาะของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เท่ากับ 51.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ 1.3 เท่า พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 3.5-5.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Glucoamylase Production from Agricultural Wastes by *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 |
| **Student** | Miss Suporn Kiatmanaroj |
| **Student ID.** | 45064563 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Programme** | Biotechnology |
| **Year** | 2005 |
| **Thesis Advisor** | Assoc. Prof. Sukjai Choojun |


## ABSTRACT

This thesis is about production of glucoamylase of *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 under the solid state fermentation using agricultural wastes (potato waste, rice bran and cassava waste) as substrates. Different substrates were studied to optimize the best substrate and the results were different. Cassava waste showed the highest glucoamylase activity after incubation for 96 hours at 30°C . The maximum enzyme activity under optimum conditions was 179.32 U/g in cassava waste. The optimum conditions were 10 % (v/w) inoculum size, 0.15% (w/w) urea as the nitrogen source, 60% moisture content of solid substrate , used mixed substrate particle size, the ratio of salt solution to weight of cassava waste was 1/10, and the incubation temperature was 30°C. Moreover, from the studies on cell growth and glucoamylase production by *S. fibuligera* CBS 6310, the results showed that glucoamylase production increased directly with the increase of cell growth. The activity of glucoamylase was about 185.49 U/g of cassava waste. When glucoamylase from *S. fibuligera* CBS 6310 was purified by 40 percents saturated ammonium sulfate precipitation, and ultrafiltration with a molecular weight cut off 30,000 Da ultrafiltration membrane. The enzyme produced 51.19 $Umg^{-1}$ protein with 1.30 folds purification. The optimal pH and temperature for glucoamylase activity were 3.5-5.0 and 40°C, respectively. The enzyme was stable at pH 6 and 20°C.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์อรุณี คงศักดิ์ไพศาลและรองศาสตราจารย์มาลินี ตันติยาภรณ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดมาและรองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาให้เสมอมา

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆที่คอยให้กำลังใจน้องคนนี้เสมอมาตลอดจนกำลังทรัพย์และคำปรึกษาในการศึกษาเล่าเรียนมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการและนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ตลอดจนบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกในทุกเรื่อง

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโททุกท่านที่คอยให้กำลังและคอยช่วยเหลือเสมอมา

ขอขอบคุณบริษัทเบอรียุคเกอร์ ฟู้ด จำกัด นิคมอุตสาหกรรมบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ และบริษัทแป้งมันอุตสาหกรรม อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทราที่ให้ความอนุเคราะห์เศษเหลือทิ้งมันฝรั่งและกากมันสำปะหลังมาใช้ในงานวิจัยนี้

ศุภร เกียรติมานะโรจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง..... VIII

สารบัญรูป.....XI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 เอนไซม์อะไมเลส.....4

2.2 การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลส.....7

2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....8

2.4 กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....9

2.5 วัตถุดิบ.....10

2.6 ความสำคัญของแป้ง.....15

2.7 การนำเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม.....19

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยจุลินทรีย์.....19

2.9 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์.....22

2.10 คุณลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....24

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....26

3.1 อุปกรณ์.....26

3.2 เคมีภัณฑ์.....27

3.3 วัตถุดิบ.....28

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....28



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....29
3.6 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆในวัตถุดิบ.....30
3.7 การศึกษาการเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ.....30
3.8 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสใน.....31
สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด
3.9 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....38
3.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....40

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....41
4.1 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....41
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆในวัตถุดิบ.....43
4.3 ผลขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิต.....43
เอนไซม์กลูโคอะไมเลส
4.4 ผลการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....45
โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบ
อาหารแข็งในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด
4.4.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....45
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
4.4.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....47
ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
4.4.3 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....50
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
4.4.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต.....52
เอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
4.4.5 ผลของขนาดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....53
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
4.4.6 ผลของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....55
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


4.4.7 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....56
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

4.4.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม.....58
ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

4.4.9 ผลของ การเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310.....60
กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.5 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....62

4.5.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 62

4.5.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....63

4.5.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....64

4.5.4 ผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....66

4.5.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....66

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....69

บรรณานุกรม.....71

ภาคผนวก.....77

ภาคผนวก ก.....78

ภาคผนวก ข.....81

ภาคผนวก ค.....93

ประวัติผู้เขียน.....110



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส....5

2.2 เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยการเลี้ยงในอาหารแข็ง (solid state fermentation)....10
และอาหารเหลว (submerged process)

2.3 ส่วนประกอบทางเคมีของมันสำปะหลังสดและแห้ง....11

2.4 ส่วนประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง....12

2.5 แสดงส่วนประกอบทางเคมีในรำข้าว....14

2.6 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของมันฝรั่ง....15

2.7 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน....16

2.8 สมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์....25

4.1 แสดงปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว....42

4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆในกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นสับสเตรท....43
ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.3 แสดงผลของการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis*....63
*fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งให้บริสุทธิ์บางส่วน

ข-1 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละอิ่มตัว) ที่ใช้ตกตะกอน....92

ค-1 แสดงผลของปริมาณความชื้นของเศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง....93

ค-2 แสดงผลของปริมาณความชื้นของกากมันสำปะหลัง....94

ค-3 แสดงผลของปริมาณความชื้นของรำข้าว....95

ค-4 แสดงผลการเปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....95
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-5 แสดงผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....96
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-6 แสดงผลของปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....96
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-7 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....97
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-8 แสดงผลความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส....97
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**ตารางที่** **หน้า**


ค-9 แสดงผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....98
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-10 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....98
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-11 แสดงผลของขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส...99
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-12 แสดงผลของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....99
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-13 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....100
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-14 แสดงผลของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส .....101
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-15 แสดงผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์.....102
*Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ค-16 แสดงผลการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ.....102

ค-17 แสดงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์.....103
*Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ค-18 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์....103
*Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ค-19 แสดงความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์.....104
*Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่พีเอชต่างๆ

ค-20 แสดงความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์.....104
*Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิต่างๆ

ง-1 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์.....105
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

ง-2 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ.....105
ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**ตารางที่** **หน้า**

ง-3 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อ.....105
การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-4 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....106
ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-5 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของยูเรีย.....106
ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-6 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิต.....106
เอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-7 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต.....107
เอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-8 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของขนาดของกากมันสำปะหลังต่อการผลิต.....107
เอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-9 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ต่อ.....107
การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-10 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....108
โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310
ง-11 แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิต.....109
เอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


**รูปที่** **หน้า**

2.1 ผลผลิตการย่อยสลายแป้งด้วยอะไมเลสทั้งสามชนิด.....7

2.2 แสดงขั้นตอนกระบวนการสีข้าว.....13

2..3 แสดงส่วนประกอบของเมล็ดข้าว.....13

2.4 โครงสร้างของอะไมโลส.....17

2.5 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน.....17

2.6 แสดงการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ในการย่อยแป้ง.....18

2.7 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำผลิตผลให้บริสุทธิ์.....23

4.1 แสดงผลการเปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....42
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.2 แสดงผลขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....44
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.3 แสดงผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....46
โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.4 แสดงผลชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....48
โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


**รูปที่** **หน้า**

4.5 แสดงผลของความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....49
โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กาก
มันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน สารละลายเกลือแร่ 0.5
มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อ
น้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.6 แสดงผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....51
โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้
กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ
0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร
ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.7 แสดงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....53
โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้
กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ
0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร
ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก
กากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.8 แสดงผลของขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....55
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของ
กากมันสำปะหลัง)ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร
ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ
30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.9 แสดงผลของอัตราส่วนสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....56
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความ
เข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ
60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ
30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


**รูปที่** **หน้า**

4.10 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....57
โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่ง
ไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง)
สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อ
เริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.11 แสดงผลของชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์.....59
กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมัก
แบบอาหารแข็ง ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท เติมยูเรีย
เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกาก
มันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60
ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง)
เป็นเวลา 120 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.12 แสดงผลของการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis. fibuligera* CBS 6310.....61
กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง
โดยใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่ง
ไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง)
สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น
ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.13 แสดงผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....64
ที่ผลิตโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310

4.14 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....65
ที่ผลิตโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310

4.15 แสดงผลของความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ.....67
*S. fibuligera* CBS 6310 ต่อพีเอชต่างๆ

4.16 แสดงผลของความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ.....68
*S. fibuligera* CBS 6310 ต่ออุณหภูมิต่างๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)

**รูปที่** **หน้า**

ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส.....84
ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีน.....86
ข-3 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส.....90
ข-4 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส.....91




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือแกรมมา - อะไมเลส (γ- amylase) เป็นเอนไซม์ที่เซลล์ของจุลินทรีย์ผลิตได้แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายแป้งให้เป็นกลูโคส (ปราณี, 2543) เอนไซม์นี้จึงมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสจากแป้ง เช่น อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสผง อุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสและฟรุกโตส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ผลิตลูกกวาด การทำขนมอบ อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (brewing) เครื่องดื่ม (soft drink) ลูกอม (soft-candy) และเบเกอรี่ (bakery) (Manjunath *et.al.*, 1983 ; Schrickx *et.al.*, 1993) เป็นต้น เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีกว่าการใช้น้ำตาลทราย การใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอุตสาหกรรมอื่นๆ นอกเหนือจากนี้ เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมน้ำตาล

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้ง เดกซ์ทรินและมอลโทสให้เป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ มีชื่อเรียกตามระบบว่า α-1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้ง ก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ ไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิลที่เป็น α-1,4, α-1,6 และ α-1,3 แต่จะช้ากว่า α-1,4

กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่แหล่งผลิตเอนไซม์ที่น่าสนใจมาก คือ จุลินทรีย์ เพราะสามารถผลิตได้เป็นปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ ใช้แหล่งวัตถุดิบได้หลายชนิด และการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะใช้เนื้อที่น้อย ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล (ดวงพร, 2530) โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้แก่ *Halobacterium sodamense* ราได้แก่ *Aspergillus* และ *Rhizopus* (Pandey, 1995) และยีสต์ที่รู้จักกันดี คือ *Saccharomycopsis fibuligera* (Futatsugi *et.al.*, 1993 a, b) นอกจากนี้ก็มี *Saccharomyces cerevisiae* (De Mot, 1990) และ *Streptosporangium* sp. (Stamford *et.al.*, 2002)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการทำเกษตรกรรมเป็นหลัก ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ฉะนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอนไซม์จะทำให้มีมูลค่าสูงกว่าการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ (สาโรจน์, 2545) อีกทั้งการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรยังมีข้อดี คือปราศจากสารพิษและมีอยู่มากเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบของจุลินทรีย์ได้ ประเทศที่กำลังพัฒนาอย่างประเทศไทยจะนิยมใช้วัตถุดิบเช่น กากน้ำตาล แป้งหรือไซรับ (syrup) ที่ได้จากแป้ง ผลิตผลจากธัญพืช พวกข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี รำข้าวและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่นๆ พืชหัวเช่น มันฝรั่งและมันสำปะหลัง และของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ของเสียจากโรงงานกาแฟ เป็นต้น

การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว มาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ปริมาณมาก สามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ต้นทุนในการผลิตต่ำ และยังให้ปริมาณของผลผลิตร่วม เช่น เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และออกซิเดสน้อย (Futatsugi *et.al*., 1993 a, b) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจอีกทั้งยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์และยังช่วยเพิ่มมูลค่าได้อีกด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

1.2.3 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลังและรำข้าว มาใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ทดลองเพื่อหาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากทั้งสามชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด และวิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ได้แก่ ปริมาณโปรตีน แป้ง น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และความชื้นเริ่มต้น การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลืออนินทรีย์ อัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมและขนาดอนุภาคของสับสเตรท การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ โดยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

1.4.2 ทราบถึงสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นสับสเตรทโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

1.4.3 ทราบถึงคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้

1.4.4 เป็นการศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ โดยใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งจากห้องปฏิบัติการ และเป็นแนวทางการศึกษาและพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป อีกทั้งเป็นแนวทางในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นๆมาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ (enzyme) คือกลุ่มโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีน และมหชีวโมเลกุลทั่วไป กล่าวคือ มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์เป็นหลายล้านเท่าด้วยปริมาณเอนไซม์เพียงระดับไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรง ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับสภาวะภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่า สับสเตรท (substrate) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น ตลอดจนทั้งเอนไซม์จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้ สิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นมนุษย์ สัตว์ พืช จุลินทรีย์ มีกระบวนการของสิ่งมีชีวิตที่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบทั้งสิ้น เช่น กระบวนการสังเคราะห์สารอาหาร ย่อยสลายสารอาหาร กระบวนการสร้างพลังงาน เป็นต้น (ปราณี, 2543) เอนไซม์อาจผลิตได้จากพืช สัตว์ แต่แหล่งผลิตเอนไซม์ที่น่าสนใจมาก คือ จุลินทรีย์ เพราะสามารถผลิตได้เป็นปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ ใช้แหล่งวัตถุดิบได้หลายชนิด และการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะใช้เนื้อที่น้อย ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล (ดวงพร, 2530)

## 2.1 เอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลสเป็น extracellular enzyme ที่สามารถย่อยแป้งได้หลายลักษณะขึ้นอยู่กับว่าจะย่อยแป้งที่ตำแหน่งใด แป้งจะประกอบด้วยกลูแคน (glucan) 2 ชนิดคือ อะไมโลส (ประกอบด้วยหน่วย D-glucose เชื่อมต่อกันด้วย $\alpha$-1,4 linkage) และ อะไมโลเพคติน (เป็นอะไมโลสที่มีโซ่กิ่งเพิ่มขึ้นโดยมี $\alpha$-1,6 linkage เป็นตัวเชื่อม) เอนไซม์อะไมเลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามตำแหน่งการย่อยแป้ง ได้แก่

ก. endoamylase เป็นอะไมเลสประเภทที่ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง $\alpha$-1,4 glucosidic linkage ของอะไมโลส หรืออะไมโลเพคติน แต่ไม่ย่อย $\alpha$-1,6 glucosidic linkage ของอะไมโลเพคติน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโทส กลูโคส และเดกซ์ทริน เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่แบคทีเรียพวก *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas saccharophila* และ *Clostridium* sp. และเชื้อราพวก *Aspergillus oryzae* และ *A. niger*

ข. exoamylase เป็นอะไมเลสประเภทที่ย่อยแป้งจาก non-reducing end เข้าไปเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ เบตา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส (amyloglucosidase) โดยเบตา-อะไมเลสจะย่อยแป้งที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำแหน่ง α-1,4 glucosidic linkage เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทสและลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย เช่น *B. cereus* และ *B. megaterium* สำหรับกลูโคอะไมเลสนั้นสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จาก non-reducing end ที่ตำแหน่งต่างๆ คือ α-1,6 และ α-1,4 glucosidic linkage ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสโดยไม่มีมอลโทสและเดกซ์ทรินปนมาด้วย จุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในปริมาณมากคือเชื้อราพวก *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. นอกจากเชื้อราแล้วก็มียีสต์และแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ เช่น *Endomycopsis fibuligera*, *Aerobacter* และ *Clostidium*

**ตารางที่ 2.1** แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส

| คุณสมบัติ | แอลฟา-อะไมเลส | เบตา-อะไมเลส | กลูโคอะไมเลส |
|---|---|---|---|
| กลไกการย่อยแป้ง | ทีกลางโมเลกุลแป้ง (Endo-attack) | ทีปลายโมเลกุลแป้ง (Exo-attack) | ทีปลายโมเลกุลแป้ง (Exo-attack) |
| ผลิตภัณฑ์ที่ได้ | โอลิโกแซคคาไรด์ | มอลโทส | กลูโคส |
| ความเร็วในการลดลงของความหนืด | เร็ว | ช้า | ช้า |
| ความเร็วในการเปลี่ยนสีเมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน | เร็ว | ช้า | ช้า |
| ปฏิกิริยาที่จุดแยกแขนง | ไม่ย่อยพันธะ α−1,6 glycosidic linkage | ไม่ย่อยพันธะ α−1,6 glycosidic linkage | สามารถตัดพันธะ α−1,6 glycosidic linkage |
| ความจำเพาะของพันธะ | α-1,4 | α-1,4 | α-1,4<br>α-1,3<br>α-1,6 |

**ที่มา** : Manjunath *et. al.* (1983)

**เอนไซม์อะไมเลส (The Amylases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสับสเตรทจำพวกแป้ง ไกลโคเจน แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดดังนี้**

1. แอลฟา-อะไมเลส (α-Amylase)

**มีชื่อทางการค้าเป็นที่รู้จักกันว่า** Termamyl $^{R}$ **และมีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) และมีชื่อตามระบบว่า α-1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 พบทั่วไปทั้งในพืชและสัตว์ ตลอดทั้งในคนจะพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิ-**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โกแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกาย เป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน มี $Ca^{+2}$ 1 ตัวต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล จะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนอิออน เช่น $Cl^-$ , $Br^-$ , $F^-$ ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายคือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ $\alpha$-1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ทรินที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงสร้างเดิม ($\alpha$-configuration)

2. เบตา-อะไมเลส ($\beta$- Amylase)

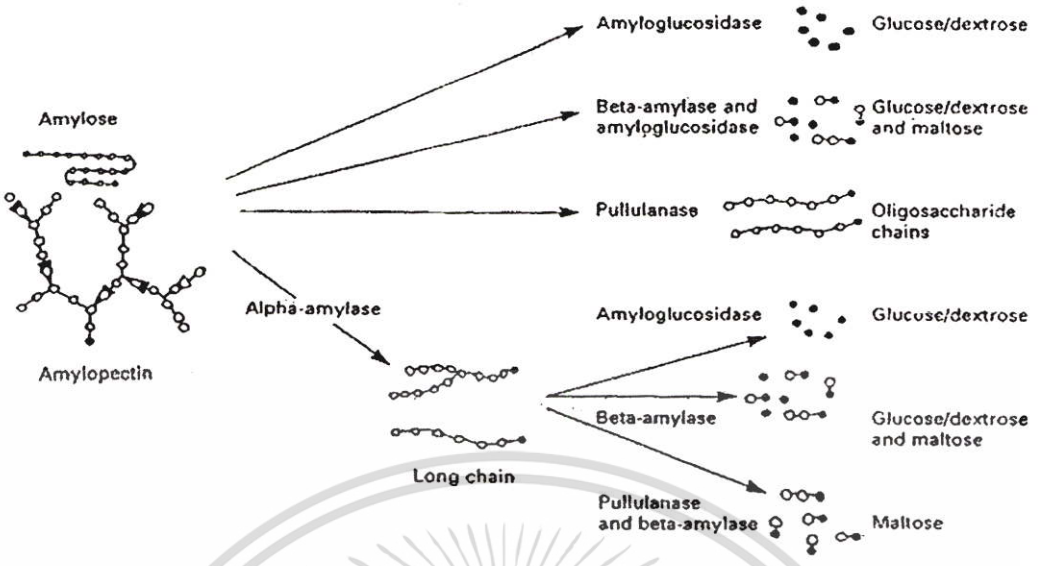
มีชื่อเรียกตามระบบว่า $\alpha$-1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 ซึ่งพบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลล์, ข้าวสาลี, ข้าวไรย์, ถั่วเหลืองและมันเทศ และมักพบร่วมกับแอลฟา-อะไมเลสมีมวลโมเลกุล 152,000 ดาลตัน (กรณีจากมันเทศ) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีค่าสูงกว่าแอลฟา-อะไมเลสมีพีเอชเหมาะสมที่ 5.6 ปฏิกิริยาการย่อยสลายของเบตา-อะไมเลส จะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ $\alpha$-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของมอลโทส หรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะ $\alpha$-1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจน จะเป็นกลูแคนลิมิตเดกซ์ทรินและส่วนใหญ่เป็นมอลโทสที่มีโครงสร้างต่างไปจากเดิม คือได้ $\beta$-configuration หรือเบตา-มอลโทส

3. แกมมา-อะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคซิเดส ($\gamma$-Amylase, Glucoamylase, Amyloglucosidase )

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้ง เดกซ์ทริน และมอลโทสให้เป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ มีชื่อเรียกตามระบบว่า $\alpha$-1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ มีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ 4.0-6.0

ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้ง ก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ ไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิลที่เป็น $\alpha$-1,4, $\alpha$-1,6 และ $\alpha$-1,3 แต่จะช้ากว่า $\alpha$-1,4 การตัดสายโพลิเมอร์จะเหมือนกับเบตา-อะไมเลส แต่ตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังแสดงการทำงานในรูปที่ 1 ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงสร้างต่างไปจากเดิม คือได้ $\beta$ - configuration หรือ เบตา-ดี-กลูโคส และส่วนของกลูแคนและลิมิตเดกซ์ทริน (ปราณี , 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.1** ผลผลิตการย่อยสลายแป้งด้วยอะไมเลสทั้ง 3 ชนิด

**ที่มา :** ปราณี (2543)

## 2.2 การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลส (ดวงพร, 2530)

การเก็บรักษาเอนไซม์อะไมเลสให้มีกิจกรรมเอนไซม์คงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อย จะต้องเกี่ยวข้องทั้งเรื่องพีเอชและอุณหภูมิต้องให้เหมาะสม มิฉะนั้นเอนไซม์จะเสียสภาพ (denature) จากนั้นก็เก็บไว้ในที่เย็น ได้แก่

1. ตู้เย็นธรรมดา (อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส) อาจมีการเติมอนุมูลสารบางอย่างลงไปเพื่อรักษากิจกรรมของเอนไซม์ เก็บได้นาน 1-2 เดือน

2. แช่แข็ง นิยมอุณหภูมิต่ำกว่า 0 ถึง -20 องศาเซลเซียส

3.Freeze dry หรือ lyophilized เป็นการระเหิดน้ำออกจากสารละลายเอนไซม์ในสภาพที่เป็นน้ำแข็ง ทำในสภาพสุญญากาศ เมื่อเสร็จแล้วสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิต่ำๆ ก็ได้

4. immobilized enzyme โดยให้เอนไซม์เกาะกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อย่างเช่น polyacrylamide gel และแก้วที่มีรูพรุน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่

-แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญที่สามารถผลิตได้ ได้แก่ *Bacillus stearothermophillus Flavobacterium* sp. และ *Halobacterium sodamense* (Pandey, 1995) แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ได้แก่ *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Hyun and Zeikus, 1985) *Clostridium acetobutylicum* (Chojecki and Blaschek, 1986)

-ยีสต์ เช่น *Saccharomycopsis fibuligera* (Futatsugi *et.al.*, 1993 a, b) นอกจากนี้ก็มี *Saccharomyces cerevisiae Candida Antarctica Filobasidium capsuligenum Saccharomycopsis capsularis Schwanniomyces cestellii* (De Mot, 1990) *Streptosporangium* sp. (Stamford *et.al.*, 2002)

-รา เช่น *Aspergillus* sp. *Talaromyces flavus* (Hang and Woodams, 1993) และมีราอยู่ 2 ชนิดที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในทางการค้า คือ *Aspergillus* และ *Rhizopus* (Pandey , 1995)

Pazua *et.al.* (1990) ได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จาก *Rhizopus niveus* และ *Aspergillus niger* พบว่า เอนไซม์จาก *R. niveus* ประกอบด้วยแมนโนส และกลูโคซามีนเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ ซึ่งเอนไซม์จาก *A. niger* ประกอบด้วยแมนโนส กลูโคส และกาแลกโตส เอนไซม์ที่ได้จาก *R. niveus* และ *A. niger* มีกรดอะมิโนไลซีน ไทโอนีน ซีรีน กรดกลูตามิก ไทโรซีนและฟีนิลอะลานีนเป็นองค์ประกอบแตกต่างกันเป็น 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งคาร์โบไฮเดรตของ *R. niveus* จะเชื่อมกันโดยพันธะ O-glycosidic และโปรตีนจะเชื่อมกันโดยพันธะ N- glycosidic สำหรับ *A. niger* จะเชื่อมกันโดยพันธะ O-glycosidic เท่านั้น

Selvakumar *et.al.* (1996) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซ์กลูโคอะไมเลส โดยเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสนั้นเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งที่สำคัญในอุตสาหกรรมเอนไซม์ ซึ่งสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดตั้งแต่แบคทีเรีย เชื้อรา ตลอดจนยีสต์ ที่มีการนำมาใช้กันมากก็คือเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* และ *Rhizopus* ในกระบวนการหมักแบบเลี้ยงในอาหารแข็งสามารถนำวัสดุทางการเกษตรมาใช้เป็นสับสเตรทได้ เช่น รำข้าวสาลี รำข้าว แกลบ แป้งข้าวโพด เป็นต้น และต้นทุนที่น้อยกว่ากระบวนการหมักแบบเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้กระบวนการหมักแบบเลี้ยงในอาหารแข็งเป็นอีกวิธีที่กำลังเป็นที่นิยม

Sukhumavasi *et.al.* (1975) ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เช่นเดียวกันกับ Kato *et.al.* (1976) ซึ่งได้ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* จากลูกแป้ง Ragi ของประเทศอินโดนีเซีย ก็สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เช่นกัน เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saha and Ueda (1983) พบว่าเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* IFO 0111 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบได้ โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์เท่ากับ 4.5 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบเท่ากับ 3.5

## 2.4 กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ

1. การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง (solid culture) ซึ่งไม่มีน้ำอิสระเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ น้ำที่มีอยู่ในระบบการหมักแบบนี้จะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับอาหารแข็ง เช่นการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็น mold bran คือมีรำข้าวและน้ำอยู่มีความชื้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และจะแบ่งเป็นวิธีย่อยต่างๆ กันขึ้นกับภาชนะที่ใช้ เช่น drum method (ใช้ท่อกระบอก) Tray-Chamber method (ใช้ถาด) การหมักในอาหารแข็งส่วนใหญ่จะใช้กับเชื้อราที่สร้างเส้นใย ยีสต์บางชนิด ได้แก่ ยีสต์พวก *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis* และ *Candida* หรือแบคทีเรียพวก *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Bacillus*

2. การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว (submerge culture, liquid culture) เป็นวิธีที่นิยมใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรีย และกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา โดยเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้เลี้ยงจะฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อน อุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 3-5 จะต้องควบคุมการให้อากาศด้วยการกวน (ดวงพร, 2530)

ซึ่งการเลือกใช้อาหารชนิดใดขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสายพันธุ์ที่จะสร้างเอนไซม์ให้มีปริมาณและคุณสมบัติตามต้องการ (Saha *et.al.*, 1979) ในการผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ ระดับของส่วนประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะทางเคมีและกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละชนิด ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และคุณสมบัติเฉพาะตัวของเชื้อแต่ละชนิด (Feniksova, 1957)

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา โดยการเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.2

ในอุตสาหกรรมจะผลิตโดยการเลี้ยงในอาหารเหลว เป็นวิธีการที่ต้องการการลงทุนสูงมาก จำเป็นต้องมีระบบการกวน การพ่นอากาศลงไปในถังหมักอย่างดีและมีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งยังมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงในอาหารเหลวนี้ อาจหลีกเลี่ยงได้โดยใช้วิธีการเลี้ยงบนอาหารแข็ง เพราะการผลิตเอนไซม์โดยวิธีการนี้มีข้อดีคือ การลงทุนในด้านเครื่องมือต่ำกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว และระบบควบคุมต่างๆมีน้อย อีกทั้งปัญหาด้านการปนเปื้อนอาจหลีกเลี่ยงได้ง่าย เนื่องจากปริมาณน้ำมีน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.2** เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยการเลี้ยงในอาหารแข็ง (solid-state fermentation) และอาหารเหลว (submerged process)

| อาหารแข็ง (solid-state fermentation) | อาหารเหลว (submerged process) |
|---|---|
| 1.ต้องการเนื้อที่ในการผลิตเอนไซม์จำนวนมาก เพื่อใช้วางถาดเลี้ยงเชื้อ | ใช้ถังหมักและใช้พลังงานมากกว่า |
| 2.ใช้แรงงานมาก | ใช้แรงงานน้อย |
| 3.ระบบควบคุมต่างๆมีน้อย | ระบบควบคุมต่างๆต้องระมัดระวังอย่างมาก |
| 4.ปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นมีน้อย | ปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นมีมาก |
| 5.การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ต้องทำการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย กรองหรือแยกด้วยเครื่องเหวี่ยง สำหรับเอนไซม์เข้มข้นทำได้โดยการระเหยหรือการตกตะกอนเอนไซม์ | การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ด้วยการกรองหรือแยกด้วยเครื่องเหวี่ยง สำหรับเอนไซม์เข้มข้นทำได้โดยการระเหยหรือทำการตกตะกอนเอนไซม์ |

**ที่มา** : Feniksova (1957)

## 2.5 วัตถุดิบ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการทำเกษตรกรรมเป็นส่วนใหญ่ ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ฉะนั้นการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอนไซม์จะทำให้มีมูลค่าสูงกว่าการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ (สาโรจน์, 2545) อีกทั้งการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรยังมีข้อดี คือ ปราศจากสารพิษและมีอยู่มากเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบของจุลินทรีย์ได้ และนี่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์

### 2.5.1 มันสำปะหลัง (cassava)

มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยพิจารณาจากการผลิตมันสำปะหลังมีความสำคัญเป็นอันดับ 5 รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง ในประเทศไทยได้มีการนำมันสำปะหลังมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ให้พลังงานสูง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนการผลิตที่ต่ำจึงทำให้มันสำปะหลังถูกนำมาใช้ในการบริโภคโดยตรง อีกทั้งยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อาหารสัตว์ อุตสาหกรรมหมักต่างๆ การพิจารณาในการนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้เนื่องจากมีราคาถูก มีความบริสุทธิ์สูงและหาได้ง่าย นอกจากนี้รัฐบาลไทยยังให้ความสนใจในฐานะเป็นพืชเศรษฐกิจและส่งเสริมให้มีการพัฒนาเทคโนโลยี และงานวิจัยต่างๆจากมันสำปะหลัง (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2539) ส่วนประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางเคมีของมันสำปะหลังแสดงดังตารางที่ 2.3 (บุษบา, 2540) อุตสาหกรรมการแปรรูปมันสำปะหลังมีอยู่ 3 ประเภทคือ แป้งมันสำปะหลัง มันเส้น มันเม็ด ส่วนอุตสาหกรรมหมักต่อเนื่องที่ใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในประเทศไทย เช่น โรงงานผลิตผงชูรส (โมโนโซเดียมกลูตาเมต) ผลิตไลซีน ผลิตสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งใช้กระบวนการหมักในอาหารเหลว ในขณะที่การผลิตกรดมะนาว (กรดซิตริก) ใช้กระบวนการหมักในอาหารแข็ง การผลิตแอลกอฮอล์ โดยแป้งที่เป็นองค์ประกอบหลักของมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์ได้ นอกจากนี้แป้งมันสำปะหลังยังเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัยในการทดลองหมักเป็นเอนไซม์

**ตารางที่ 2.3** แสดงส่วนประกอบทางเคมีของมันสำปะหลังสดและแห้ง

| ส่วนประกอบทางเคมี | หัวมันสด (%) | หัวมันแห้ง (%) |
|---|---|---|
| ความชื้น | 63.28 | 10.36 |
| คาร์โบไฮเดรต | 29.73 | 70.63 |
| โปรตีน | 1.18 | 2.63 |
| ไขมัน | 0.08 | 0.51 |
| เถ้า | 0.85 | 2.20 |
| เยื่อใย | 0.99 | 1.73 |
| โพแทสเซียม (มก./กก.) | 0.26 | 0.43 |
| ฟอสฟอรัส (มก./กก.) | 0.04 | 0.08 |
| กรดไฮโดรไซยานิก (ล้านในล้านส่วน) | 173.00 | 100.00 |

**ที่มา** : เจริญศักดิ์ (2532)

ผลพลอยได้ที่ได้จากการผลิตแป้งมันสำปะหลังคือกากมันสำปะหลัง โดยปริมาณกากมันสำปะหลังนั้นจะมีปริมาณมาก โดยจากหัวมันสำปะหลัง 47.8 ตันต่อชั่วโมง จะได้แป้งมันสำปะหลัง 12.43 ตันต่อชั่วโมง และจะได้กากมันสำปะหลังถึง 12.86 ตันต่อชั่วโมง (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ,2536) ส่วนประกอบของกากมันสำปะหลังแสดงดังตารางที่ 2.4 ในอดีตโรงงานจะนำกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตต่างๆไปใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่ในปัจจุบันความต้องการในการนำกากมันสำปะหลังไปใช้ประโยชน์มีมากขึ้น เช่น นำไปใช้ศึกษาการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ทั้ง โดยวิธีทางเคมีและการใช้เอนไซม์ ทั้งนี้เพราะกากมันสำปะหลังมีแป้งอยู่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.4** ส่วนประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

| ส่วนประกอบทางเคมี | เปอร์เซ็นต์ |
|---|---|
| ความชื้น | 12.21 |
| โปรตีน | 3.39 |
| ไขมัน | 0.24 |
| ไฟเบอร์ | 15.26 |
| คาร์โบไฮเดรต | 17.80 |

**ที่มา :** Klanarong (2000)

สุนีย์ (2539) ทำการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลัง โดยการใช้เอนไซม์และอัลตราฟิวเทรชัน โดยใช้แผ่นกรองมีขนาด Molecular weight Cut off 10,000 ดาลตัน พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 285.6 MWU (Modified Wohlgemuth Unit) ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ผสมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.21 DU (Diazyme Unit) ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง และเซลลูเลส 15.48 NCU (Novo Celluclast Unit) ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 39.02

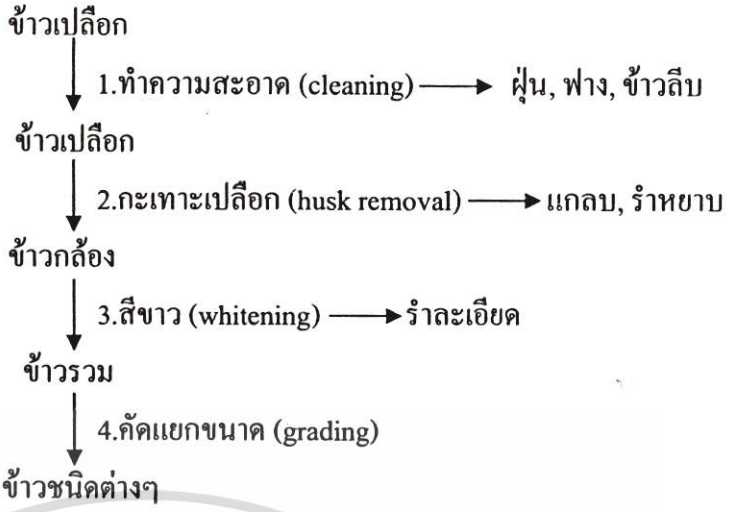
สุภาวดี (2543) ผลิตน้ำตาลกลูโคสจากกากมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ 4 ชนิด คือ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 48.6 AGU (Novo Amyloglucosidase Unit) แอลฟาอะไมเลส 0.6 KNU (Kilo Novo $\alpha$ - amylase Unit) เซลลูเลส 75 NCU (Novo Cellulase Unit) และเพคติเนส 130 PG ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 64.37 เปอร์เซ็นต์

**2.5.2 รำข้าว (rice bran)**

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากขั้นตอนการสีข้าว (whitening) ในกระบวนการสีข้าว (milling process) ดังรูปที่ 2.2 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองปนน้ำตาล ประกอบด้วยส่วนต่างๆของเมล็ดข้าวได้แก่ เปอร์ริคาป (pericarp) ซีดโคท (seed coat) หรือเทกเมน (tegmen) อลิวโรน เลเยอร์ (aleurone layer) เยิม (germ) หรือเอมบริโอ (embryo) และบางส่วนของสตาร์ชี เอนโดสเปอร์ม (starchy endosperm) (Barber and Benedito, 1980) ดังรูปที่ 2.3

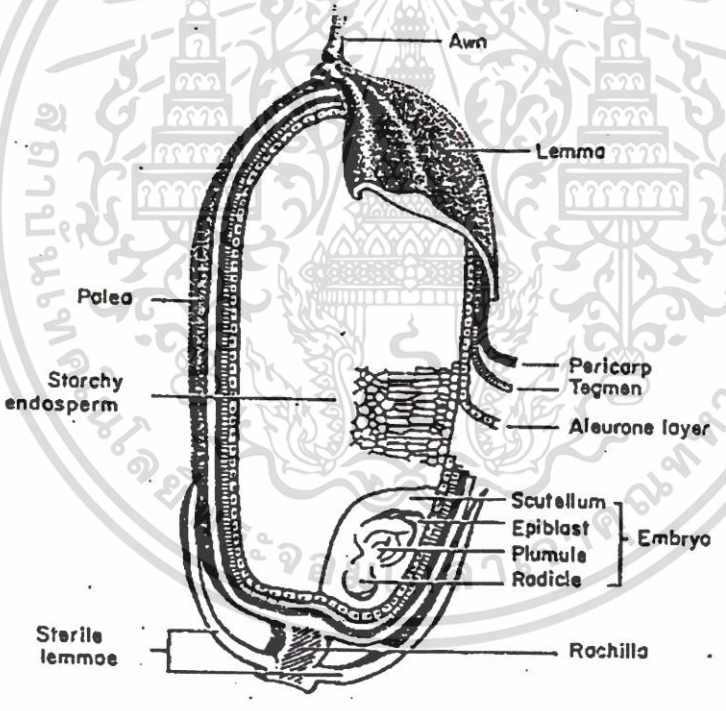
รำข้าวที่สีตามโรงสีข้าวนั้นยังแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ รำข้าวกล้องหรือรำหยาบ ซึ่งมีปริมาณน้ำมันน้อยใช้สำหรับเลี้ยงสัตว์ และรำข้าวขาวหรือรำละเอียด ซึ่งมีปริมาณน้ำมันประมาณร้อยละ 17.0-22.9 จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.2** แสดงขั้นตอนกระบวนการสีข้าว

**ที่มา** : Barber and Benedito (1980)




**รูปที่ 2.3** แสดงส่วนประกอบของเมล็ดข้าว

**ที่มา** : Barber and Benedito (1980)

อนุภาคของรำข้าวมีขนาดที่แตกต่างกันอยู่ในช่วงกว้างขึ้นโดยขึ้นอยู่กับกระบวนการสีข้าว องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในรำข้าว ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน แร่ธาตุ วิตามิน และเอนไซม์ แสดงดังตารางที่ 2.5 นอกจากนี้รำข้าวยังมีคุณสมบัติในการดูดซับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(absorption) และคาย (desorption) ความชื้น ดังนั้นค่าความชื้นในรำข้าวจึงเปลี่ยนแปลงไปตามค่าความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity) ของบรรยากาศ ทำให้มีผลต่อความเสถียรของรำข้าวในระหว่างการเก็บรักษา

**ตารางที่ 2.5** แสดงส่วนประกอบทางเคมีในรำข้าว

| ส่วนประกอบทางเคมี | เปอร์เซ็นต์ |
|---|---|
| โปรตีน | 13.2-17.3 |
| ไขมัน | 17.0-22.9 |
| เส้นใย | 9.5-13.2 |
| เถ้า | 9.2-11.5 |
| Nitrogen-free extract | 39.6-60.8 |
| คาร์โบไฮเดรต | 16.1 |
| น้ำตาลอิสระ | 3.0-6.5 |

**ที่มา** : United Nation (1985)

ข้าวนอกจากจะใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์แล้วนั้นส่วนที่เหลือทิ้งก็คือ รำข้าวนั้นยังนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสุกร เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนและไขมัน เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์กินพืช เช่น โค กระบือ เนื่องจากรำข้าวมีปริมาณเส้นใยสูง และเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส ซึ่งมีน้อยในอาหารสัตว์ทั่วไป อีกทั้งยังมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม

**2.5.3 มันฝรั่ง (potato)**

สำหรับประเทศไทยแล้วมันฝรั่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในภาคเหนือ ให้ผลตอบแทนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่นๆ แหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ และตาก ซึ่งมีผลผลิตรวมกันประมาณร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีการผลิตมันฝรั่งในจังหวัดลำพูน เชียงราย สกลนคร และเลย การปลูกมันฝรั่งในประเทศไทยมี 2 ประเภทคือ มันฝรั่งสำหรับบริโภคสดและมันฝรั่งแปรรูปส่งโรงงาน ซึ่งร้อยละ 90 เป็นการผลิตมันฝรั่งเพื่อเป็นวัตถุดิบแปรรูปส่งโรงงาน

ลักษณะทั่วไปของมันฝรั่ง คือ เป็นพืชหัวที่เกิดจากลำต้นส่วนที่อยู่ใต้ดิน (rhizomes) ทำหน้าที่สะสมอาหาร และขยายพันธุ์ จะเริ่มสร้างหัวหลังจากที่ปลูกไปแล้ว 2 สัปดาห์โดยเฉลี่ยจะให้ผลผลิตระหว่าง 6 ถึง 10 หัวต่อต้น จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 15-18 องศาเซลเซียสในดินที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการระบายน้ำได้ดี โดยมีระดับพีเอชของดินอยู่ระหว่าง 5.5-6.5 ในส่วนของลำต้นที่เกิดจากการเพาะเมล็ดจะมีระบบรากแก้วที่บอบบาง และมีรากแขนง แต่ถ้าเป็นลำต้นที่เจริญมาจากหัวจะมีแต่รากแขนง (adventitious roots) ลำต้นมีลักษณะตั้งตรงสูงระหว่าง 50-100 เซนติเมตร ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบ (compound leaves) ประกอบด้วยเส้นกลางใบกับใบย่อยอีกหลายคู่และอีกหนึ่งใบยอด ดอกมีลักษณะเป็นช่อดอก (inflorescences) ประกอบด้วยเกสรตัวผู้ 5 อัน และเกสรตัวเมียอีก 1 อัน กลีบดอกมี 5 กลีบ มีทั้งสีขาว น้ำเงิน แดง และม่วง ส่วนผลของมันฝรั่งมีลักษณะกลมเล็ก (berries) คล้ายผลมะเขือเทศมีสีเขียว และใน 1 ผลอาจมีเมล็ดมากกว่า 200 เมล็ด (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541) องค์ประกอบในมันฝรั่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำถึงร้อยละ 90 นอกจากนั้นมีองค์ประกอบอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 2.6

**ตารางที่ 2.6** แสดงส่วนประกอบทางเคมีของมันฝรั่ง

| ส่วนประกอบทางเคมี | เปอร์เซ็นต์ |
|---|---|
| น้ำ | 77.50 |
| โปรตีน | 2.00 |
| คาร์โบไฮเดรต | 16.80 |
| ไขมัน | 0.00 |
| เส้นใย | 1.80 |
| เถ้า | 0.83 |

**ที่มา** : Potato raw (2003) [online]. http://www.doggieconnection.com

## 2.6 ความสำคัญของแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชชั้นสูง พบในคลอโรพลาสต์ (ในใบ) และในส่วนที่พืชใช้เป็นแหล่งเก็บอาหาร มนุษย์ได้รับแป้งจากพืชแตกต่างกันตามภูมิประเทศของโลกแต่ที่สำคัญที่มีการใช้กันทั่วโลกคือ แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวสาลีและแป้งมันสำปะหลัง แป้งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในโภชนาการของมนุษย์ อาหารทั้งหมดส่วนใหญ่จะมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ถึงแม้ว่าบทบาทที่สำคัญของแป้งคือ ใช้เป็นแหล่งอาหารพลังงานสูงของมนุษย์ แต่จากคุณสมบัติเฉพาะของแป้งคือ ใช้เป็นแหล่งอาหารพลังงานสูงของมนุษย์ แต่จากคุณสมบัติเฉพาะของแป้ง จึงได้มีการนำแป้งมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของอาหาร เช่น ทำให้เกิดเจล ควบคุมความคงตัวและเนื้อสัมผัสของอาหารจำพวกซอส ซุปและน้ำปรุงรสอาหาร ป้องกันเนื้อสัมผัสของอาหารเสียรูปเนื่องจากกระบวนการแช่แข็งและคืนรูปจากเยือกแข็ง (freeze-thaw) สภาวะกรด การทำพาสเจอไรเซชัน (pasteurization) และสเทอริไรเซชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(sterillization) เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมกาว และอุตสาหกรรมแป้งดัดแปร เป็นต้น

คำว่า "แป้ง" ในการผลิตนั้น หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ มีสิ่งอื่นเจือปน เช่น โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ น้อยมาก ส่วนแป้งที่ผลิตโดยทั่วไปที่ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อยู่มากจะเรียกว่า ฟลาวร์ (flour) ตัวอย่างเช่น แป้งข้าวโพด แป้งข้าวสาลี ถ้ายังมีส่วนประกอบของโปรตีนสูง ก็จะจัดอยู่ในประเภทฟลาวร์ เรียกว่า corn flour, wheat flour เช่นเดียวกันกับแป้งข้าวเจ้าที่ยังมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 7 ถึง 8 ก็เรียกว่า rice flour แต่เมื่อสิ่งเจือปนอันหมายถึงโปรตีน ไขมัน เกลือแร่อื่นๆถูกสกัดออกไป จนเหลือแป้งบริสุทธิ์เป็นส่วนใหญ่จึงเรียกว่าแป้งสตาร์ช (starch) เช่น corn starch, wheat starch เป็นต้น

**2.6.1 องค์ประกอบภายในแป้ง**

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 ต่อ 10 ต่อ 5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{12}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซ์ซิง (reducing end group) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพกติน) วางตัวในแนวรัศมี

**ตารางที่ 2.7** สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน

| คุณสมบัติ | อะไมโลส | อะไมโลเพกติน |
|---|---|---|
| ลักษณะโครงสร้าง | กลูโคสต่อกันเป็นเส้นตรง | กลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน |
| พันธะที่จับ | $\alpha$-1,4 | $\alpha$-1,4 และ $\alpha$-1,6 |
| ขนาด | 200-2,000 หน่วยกลูโคส | มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส |
| การละลาย | ละลายน้ำได้น้อยกว่า | ละลายน้ำได้ดีกว่า |
| การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน | สีน้ำเงิน | สีแดงม่วง |
| การจับตัว | เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง | ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง |

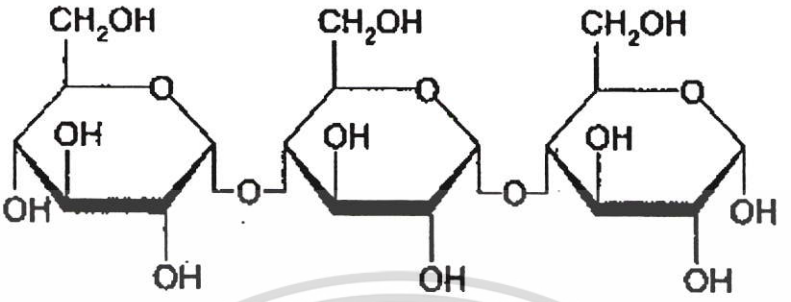
**ที่มา** : Beynum and Roels (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


2.6.1.1 อะไมโลส (amylose)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2000 หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ชนิดแอลฟา-1,4 ($\alpha$-1,4) ดังรูปที่ 2.4

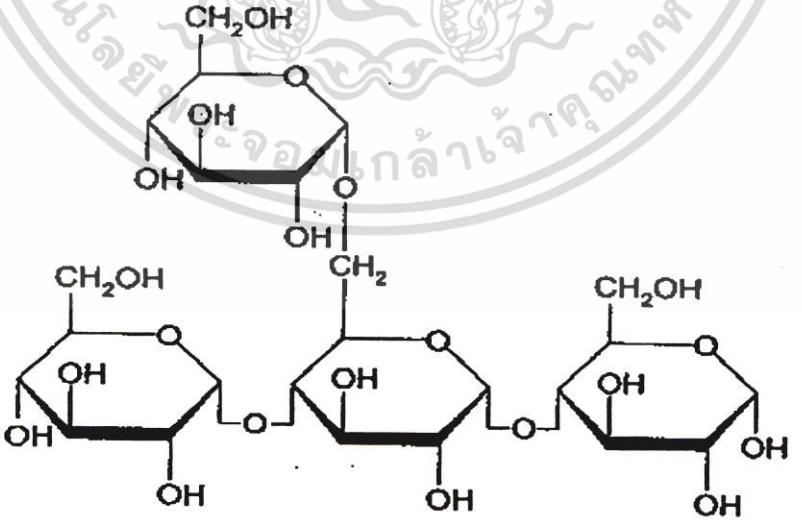


**รูปที่ 2.4** โครงสร้างของอะไมโลส

**ที่มา** : กล้าณรงค์และเกื้อกูล (2543)

2.6.1.2 อะไมโลเพกติน (amylopectin)

อะไมโลเพกตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ชนิดแอลฟา-1,4 ($\alpha$-1,4) และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้น มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด $\alpha$-1,6 ดังรูปที่ 2.5



**รูปที่ 2.5** โครงสร้างอะไมโลเพกติน

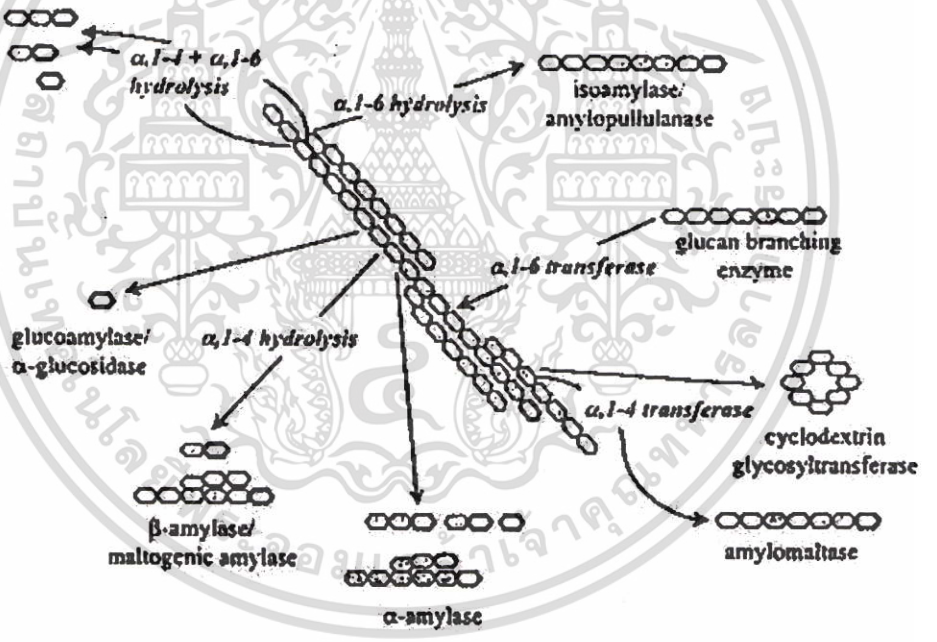
**ที่มา** : กล้าณรงค์และเกื้อกูล (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

60942

**2.6.2 ผลที่เกิดจากเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้ง**

การย่อยสลายแป้งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้กรด ใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ หรือการใช้เอนไซม์ร่วมกับเอนไซม์ สำหรับอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหารนิยมใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง การทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งแสดงดังรูปที่ 2.6 เมื่อแป้งถูกย่อยด้วยอะไมเลสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ คือ มีความเป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น นอกจากนั้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนเกิดการเปลี่ยนสี อีกทั้งยังส่งผลให้สารละลายแป้งมีความหนืดลดลง และมีผลให้แป้งที่ถูกย่อยมีความสามารถในการเบี่ยงเบนแสง (optical rotation) ลดลง จากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนำมาใช้ในการตรวจหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ เช่น การตรวจหากลูโคสจากการวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น วิธีของ A.O.A.C. (1990) วิธีของ Nelson and Somogyi (1944) และวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก ของ Miller (1959) เป็นต้น




**รูปที่ 2.6** แสดงการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ในการย่อยแป้ง

**ที่มา** : Van der Maarel *et.al.* (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 การนำเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

1. อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ซึ่งทำให้ด้ายขาดง่ายและเพื่อให้เส้นด้ายสามารถทนต่อแรงดึงได้ดี จะต้องนำด้ายมาชุบน้ำแป้งก่อนที่จะนำไปใช้ทอผ้า และเมื่อทอผ้าเป็นผืนเรียบร้อยแล้วจะต้องนำแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสในการย่อย และนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีการนี้จะใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม

2. อุตสาหกรรมทำขนมปัง ในการเตรียมแป้งที่ใช้ทำขนมปังจะเตรียมเอนไซม์อะไมเลสลงไปด้วยเพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลนี้ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นในแป้งหมัก ทำให้ได้โด (dough) เอนไซม์ที่ใช้มีทั้งแอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส เนื่องจากว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถทนความร้อนได้ ดังนั้นเอนไซม์นี้จะถูกทำลายไปหลังจากการอบ จึงไม่สามารถย่อยแป้งในขนมปังได้อีกทำให้ได้ขนมปังฟูที่ดี

3. อุตสาหกรรมเครื่องดื่มน้ำผลไม้ ปกตินำผลไม้คั้นจะมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่เอนไซม์อะไมเลสลงไปเพื่อทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น โดยการบ่มน้ำผลไม้ที่มีเอนไซม์อะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาฟาเรนไฮด์ หลังจากนั้นจึงกรองเอาน้ำตาลออก น้ำตาลที่กรองได้สามารถนำไปใช้ทำเยลลี่ได้

4. อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ในการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และเบียร์ จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในกระบวนการหมัก เพื่อช่วยย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสเนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง จึงต้องเติมลงไปในถังหมักขณะที่เย็น นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังใช้ในการทำให้เบียร์และไวน์ใสอีกด้วย โดยจะช่วยแยกแป้งออกจากสารละลายเพื่อช่วยลดความขุ่นและความหนืด

5. อุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรับเพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ในการผลิตไซรับเหล่านี้จะใช้แป้งที่ได้จากเมล็ดพืชต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี นำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส

## 2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยจุลินทรีย์

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในทางการค้านั้นต้องอาศัยปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมเพื่อการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ต้องการนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ ปัจจัยเหล่านี้ ได้แก่ แหล่งแร่ธาตุที่จำเป็น ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม อัตราการให้อากาศ อุณหภูมิ และการควบคุมการปนเปื้อนตลอดระยะเวลาที่ทำการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ต้องมีปัจจัยต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้อง คือ ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารเพาะเลี้ยง สภาวะทางเคมีและกายภาพที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และคุณสมบัติเฉพาะตัวของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตเอนไซม์ จะมีผลต่อปริมาณและชนิดของเอนไซม์ เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุด แต่ไม่ได้หมายความว่าจะได้ปริมาณของเอนไซม์สูงสุด อาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต้องมีส่วนประกอบคือ

1. มีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและมีสารอาหารที่ให้พลังงานด้วย
2. มีความสมดุลของธาตุอาหารเพื่อความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์
3. มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์
4. มีสารเหนี่ยวนำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ดี (inducer)

ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปพบว่า แป้งและสับสเตรทที่เกี่ยวข้องจะเป็นตัวชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ ส่วนสับสเตรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น มอลโทสและเด็กซ์ทริน สามารถชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้เช่นกัน กลีเซอรอลและน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการผลิตเอนไซม์ แต่กลับมีสับสเตรทที่เป็นแป้งแลผลิตภัณฑ์ที่เป็นมอลโทสและไอโซมอลโทสทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการผลิตเอนไซม์

แหล่งคาร์บอน (carbon source) โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ถึง 55 ในการสร้างเซลล์ โดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีมากและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ แป้ง แป้งจากธัญพืชชนิดต่างๆ หรืออาจใช้เมล็ดธัญพืชที่บดเป็นชิ้นเล็กๆ (สมใจ, 2544) กลูโคสและแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ สามารถเกิดการกดดัน (repression) การสร้างเอนไซม์ได้โดยกระบวนการที่เรียกว่า catabolic repression ซึ่งกระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส การใช้วิธีการทางเคมีหรือ ultraviolet visible mutagenesis สามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น Pandey (1995) ได้รายงานว่าสับสเตรทที่นำมาใช้ในการผลิตก็สำคัญ สับสเทรตที่สามารถย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้มีการรายงานไว้ ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน อะไมโลส อะไมโลเพกติน เด็กซ์ทริน มอลโตเด็กซ์ทริน มอลโทส ไอโซมอลโทส เด็กซ์แทรน เป็นต้น Ramadas *et.al.* (1996) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus niger* โดยใช้รำข้าวสาลีและรำข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่ารำข้าวโอ๊ตให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่ารำข้าวสาลี ซึ่งสัมพันธ์กันกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สับสเตรท ซึ่งรำข้าวโอ๊ตมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่รำข้าวสาลีมีเพียง 21 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1245 ของ Pandey and Radhakrishnan (1993) ใช้รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า พบว่ารำข้าวสาลีให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าในรำข้าวเจ้า และเมื่อใช้รำข้าวสาลีร่วมกับสับสเตรทอื่นๆ ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า รำข้าวเจ้า แป้งสาลี แป้งข้าวโพด พบว่าการใช้รำข้าวสาลีร่วมกับแป้งข้าวโพดให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด Selvakumar *et.al.* (1998) พบว่ากากชาสามาถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้โดยเชื้อรา *A. niger* NCIM 1248 โดยให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 198.41 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดของสับสเตรทก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะอาหารแข็ง โดยสับสเตรทขนาดเล็กกว่าจะให้กิจกรรมเอนไซม์ได้สูงกว่า โดยสับสเตรทขนาด 425-500 ไมโครเมตร จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด และจะให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงในสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยกิจกรรมเอนไซม์จะต่ำที่สุดในสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่กว่า 1.4 มิลลิเมตร (Selvakumar *et.al.*, 1996)

แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ คือ เกลือแอมโมเนียม, เปปโตน, ยีสต์สกัด หรือ yeast nitrogen base แต่แหล่งไนโตรเจนที่สามารถนำมาทดแทนได้และมีราคาไม่แพง คือ น้ำแช่ซังข้าวโพด (corn steep liqour) ไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในแหล่งไนโตรเจนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ คือ สามารถทำหน้าที่เป็นตัวนำในการผลิตเอนไซม์ได้ การเติมเกลือหรือสารประกอบของเกลือลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้เอนไซม์มีสภาพคงตัวอยู่ในอาหารได้โดยไม่มีการสูญเสียสภาพไปและช่วยทำให้ปลดปล่อยเอนไซม์สะดวกขึ้น (De Mot, 1990) แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ในสภาวะอาหารแข็ง เช่น น้ำแช่ซังข้าวโพด กากถั่วเหลือง เปปโตน จะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ (Selvakumar *et.al.*, 1996)

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ และถ้าใช้อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ในการผลิตเอนไซม์จะทำให้เอนไซม์นั้นเกิดการสูญเสียสภาพไป (Estrela *et.al.*, 1982) มีรายงานของ Sukara and Doelle (1989) ถึงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากหัวมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *R. oligosporus* สายพันธุ์ UQM 186F พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมได้แก่อุณหภูมิในช่วง 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส

การขยายการผลิต (scale-up) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 โดยหาความสัมพันธ์ระหว่าง oxygen transfer rate (OTR) กับปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้ซึ่งไม่คำนึงถึงขนาดและชนิดของถังหมักที่ใช้ พบว่า OTR ที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงถึง 61 หน่วยต่อมิลลิลิตร คือ $3.5 \times 10^{-8}$ กรัมโมลต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งมีผลทำให้ dissolved oxygen (D.O) ลดต่ำถึงศูนย์ และทำให้เชื้อยีสต์มีการเจริญสูงสุด พบว่า เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้มี 2 ชนิด คือ glucoamylase I (น้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดาลตัน) และ glucoamylase II (น้ำหนักโมเลกุล 56,000 ดาลตัน) ค่า Isoelectric point เท่ากับ 6.5 และ 6.1 ตามลำดับ (Futatsugi *et.al.*, 1993 a, b)

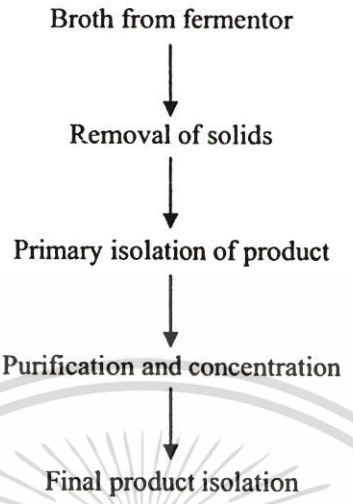
ผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงที่เป็นกรดโดยจะอยู่ระหว่างพีเอช 4.0-6.6 Futatsugi *et.al.* (1993b) ได้รายงานถึงผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* เมื่อใช้แป้งที่ละลายได้ เป็นสารตั้งต้นได้ค่าพีเอชในช่วง 5.5- 6.0 นอกจากนี้ De Mot (1990) ได้รายงานพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* เช่นกันพบว่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.0- 6.5

## 2.9 การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์

กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้จากแหล่งจุลินทรีย์ต่างๆ มักจะมีเอนไซม์อื่นๆ ปะปนอยู่ด้วย ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้อาจมีผลต่อการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนั้นจึงต้องมีการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์ ซึ่งเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ที่ขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงไม่ยุ่งยากมากนัก เช่น การแยกเอนไซม์โดยการตกตะกอนโปรตีน ตามปกติแล้วในขั้นตอนนี้จะยังคงมีสารอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์ปนเปื้อนอยู่ด้วย ดังนั้นถ้าต้องการเอนไซม์บริสุทธิ์ก็จะต้องนำไปผ่านขั้นตอนการแยกสารอื่นที่ไม่ต้องการออก ด้วยวิธีที่เหมาะสมซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี อิเลคโตรโฟริซิส ไดอะไลซิส (dialysis) หรือ เจล ฟิวเตรชัน (gel filtration) (สมใจ, 2544) สารละลายเอนไซม์ที่ได้มาจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิต่ำ หรืออาจใช้อัลตร้าฟิวเตรชันซึ่งเหมาะกับการผลิตปริมาณมากๆ โดยมีประสิทธิภาพมากกว่าแบบแรก เพราะสามารถกำจัดโมเลกุลเล็กๆ ออกไปได้ เช่น สารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (M.W.) ต่ำกว่า 10,000 สารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นจะนำมาทำให้ใส โดยผ่านการกรองด้วยวิธีการปราศจากเชื้อ อาจจะต้องเติมสารที่เป็น stabilizer ก่อนหรือหลังการกรองก็ได้ โดยทั่วไป stabilizer ที่ใช้ก็คือเกลือแคลเซียมโปรตีน แป้งที่ผ่านการไฮโดรไลส์ และน้ำตาลแอลกอฮอล์ ถ้าทำในรูปผลิตภัณฑ์เหลวจะใช้โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18 ถึง 20 อาจใช้สาร preservative เช่น benzoate parabens หรือ soabate นิยมผลิตเอนไซม์ในรูปของเหลวเพราะต้นทุนถูก มีความปลอดภัยมากกว่าและใช้สะดวก แต่บางกรณีก็ผลิตในรูปของแข็งโดยการตกตะกอนเอนไซม์ที่เข้มข้น หรือใช้วิธีการ spraydrying ถ้าต้องการให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจะตกตะกอนด้วยอะซิโตน แอลกอฮอล์ หรือเกลืออนินทรีย์ เช่นแอมโมเนียมซัลเฟต การตกตะกอนแบบเป็นส่วนๆ ให้ความบริสุทธิ์สูงกว่าการตกตะกอนเพียงครั้งเดียว (ดวงพร, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อะไมเลสเป็น extracellular enzyme ดังนั้นขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตผลและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 2.7




**รูปที่ 2.7** ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำผลิตผลให้บริสุทธิ์

**ที่มา** : Stanbury and Whitaker (1984)

De Mot and Verachtert (1985) ได้ศึกษาการทำเอนไซม์อะไมเลสให้บริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Filobasidium capsuligenum* โดยทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 ถึง 80 อิ่มตัว นำตะกอนโปรตีนมาละลายแล้วทำไดอะไลซิส (dialysis) ข้ามคืน นำสารละลายเอนไซม์มาผ่าน Sephadex G-50 gel filtration column และ DEAE-Sephadex A-50 ion exchange column สามารถแยกเอนไซม์ได้ 2 ชนิดคือ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากนั้นนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมาทำบริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 ion exchange column จะสามารถแยกได้เป็น glucoamylase I และ glucoamylase II ส่วนเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสนำมาทำบริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-100 gel filtration column ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส

การทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* โดยเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำน้ำหมักมาตกตะกอนด้วยสารละลายโพรพานอล (propanol) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนที่ได้และทำไดอะไลซิส (dialysis) ข้ามคืน นำสารละลายโปรตีนมาผ่าน CM-Cellulose ion exchange column และ DEAE-Sephadex A-50 ion exchange column สามารถแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ 2 ชนิด คือ glucoamylase I และ glucoamylase II นำเอนไซม์แต่ละชนิดมาผ่าน Sephadex G-100 gel filtration column ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี disc gel electrophoresis (Futatsugi *et.al.*, 1993 b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.10 คุณลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ในการเปลี่ยนแปลงพีเอชหรือความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน ทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของเอนไซม์และสับสเตรท ซึ่งมีผลต่อการจัดรูปร่างและสภาวะอิออนของเอนไซม์และสับสเตรท (มุกดา, 2527) การเปลี่ยนแปลงพีเอชมากๆ อาจทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติซึ่งจะมีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชหนึ่งหรือช่วงพีเอชหนึ่ง เรียกว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุด พีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์และความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆนั้นมีความแตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิด เอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0- 6.5

การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง จะทำให้เพิ่มหรือลดลง เพราะอุณหภูมิที่สูงจะช่วยเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา ขณะเดียวกันอุณหภูมิที่สูงมากๆจะทำให้เอนไซม์เปลี่ยนสภาพ (denaturation) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงลดลง จึงมีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด สมบัติทางกายภาพของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ จากการศึกษาพบว่า relative molecular mass ($M_r$) ของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์อยู่ระหว่าง 40,000 ถึง 80,000 ดาลตัน เอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงส่วนใหญ่จะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีส่วนช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง (De Mot, 1990) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.8** สมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อยีสต์

| สปีชีส์[a] | สายพันธุ์ | เอนไซม์ | พีเอชที่เหมาะสม | อุณหภูมิที่เหมาะสม |
|---|---|---|---|---|
| *F. capsuligenum* | CCY 6451 | Glucoamylase I | 5-5.6 | 55 |
| | | Glucoamylase II | 4.8-5.3 | 50 |
| *L. kononenkoae* | CBS 5608 | Glucoamylase | 4.5 | 50 |
| *S .cerevisiae* | 5206-1B | Glucoamylase II | 5.1 | 60 |
| *var.diasticus* | SPX-101-C | Glucoamylase | 5.5 | 60 |
| | 5301-14D | Glucoamylase III | 4.8-5.4 | 50 |
| *Sacch. capsularis* | 311/1 | Glucoamylase | 4.5 | 40-50 |
| *Sacch. fibuligera* | IFO 0111 | Glucoamylase | 4.5-5.0 | 40-50 |
| | | Glucoamylase | 4.8-5.0 | 40-50 |
| | | Glucoamylase | 5.0 | 40-50 |
| *Sacch. fibuligera* | IFO 1665 | Glucoamylase | 5.5 | 60 |
| | R1 | Glucoamylase | 5.0-6.0 | 50-60 |
| | sp. 20-9 | Glucoamylase | 5.0-6.0 | 50-60 |
| | LCC 241 | Glucoamylase | 5.2-6.5 | 50 |
| *Schw. occidentalis* | UC 5483 | Glucoamylase | 5.0 | 50 |
| | IGC 2829 | Glucoamylase | 4.5 | 50 |

**หมายเหตุ** a คือ genera : *F.* = *Filobasidium*, *L.* = *Lipomyces*, *S.* = *Saccharomyces*, *Sacch.* = *Saccharomycopsis*, *Schw.* = *Schwanniomyces*

**ที่มา** : De Mot (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์กลูโคอะไมเลส การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การหาปริมาณโปรตีน การหาปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ดูในภาคผนวก

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HSCA รุ่น DR/4000V

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ (incubator) ของบริษัท Memmert รุ่น BE600

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ของบริษัท WTB binder รุ่น ED53

เครื่องบ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ของบริษัท GALLENKAMP

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Hermle รุ่น z383k

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท HIRAYAMA รุ่น HA-300MIV

เครื่องบดแบบอัตโนมัติ (blender)ของบริษัท Moulinex

เครื่องร่อนคัดขนาด (sieve mesh)

โหลดูดความชื้น (desicator)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB-4000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องอังน้ำอุ่น (water bath) ของบริษัท Clifton รุ่น unstirred bath

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องผสมสาร (vortex mixer) ของบริษัท IKA$^{R}$ รุ่น MS 1 Minishaker

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ตู้ดูดควัน ของบริษัท ASTEC รุ่น Astecair 500 E

เครื่องย่อยวิเคราะห์โปรตีน ของบริษัท VELP Scientica รุ่น DK 20

เครื่องกลั่นวิเคราะห์โปรตีน ของบริษัท Gerhardt Bonn รุ่น VAP 000466

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX$^{R}$

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX$^{R}$

กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท PYREX$^{R}$

บิกเกอร์ (beaker) ของบริษัท PYREX$^{R}$

ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ของบริษัท GIBTHAI

ปิเปตต์ทิป (pipette tip)

ปิเปตต์ (pipette) ของบริษัท KTG

ดิวเวต (แก้ว)

ถุงพลาสติกก้นจีบทนร้อนสำหรับเพาะเห็ด จากร้านชมรมเห็ดสากล

คอขวดพลาสติก จากร้านชมรมเห็ดสากล

หนังยาง

**3.2 เคมีภัณฑ์**

เปปโตน (peptone)

แป้ง (Soluble starch)

วุ้น (agar)

น้ำกลั่น

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$)

แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$)

ยูเรีย (urea)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

กลูโคส (glucose monohydrate)

ซูโครส (sucrose)

ฟรุกโทส (fructose)

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalisylic acid)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$)

ฟีนอล ($C_6H_5OH$)

## 3.3 วัตถุดิบ

3.3.1 เศษเหลือทิ้งจากมันฝรั่ง

ใช้เศษเหลือทิ้งจากมันฝรั่งซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานผลิตมันฝรั่งทอดกรอบเทสโต้ บริษัทเบอรียุคเกอร์ ฟู้ด จำกัด นิคมอุตสาหกรรมบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

การเตรียมวัตถุดิบทำโดยนำเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งมาอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดอัตโนมัติ (blender) แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงร่อน (sieve mesh) ให้มีขนาดอยู่ในช่วง 80-850 ไมโครเมตร ใส่ในถุงพลาสติกเก็บไว้ในโถดูดความชื้น

3.3.2 กากมันสำปะหลัง

ใช้กากมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแป้งมันอุตสาหกรรม อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.3.3 รำข้าว

ใช้รำข้าวที่ซื้อมาร้านค้าย่อยในตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

## 3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

ใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป แล้วลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง (nutrient agar slant) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันจุกสำลีที่ปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติก แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว (YM broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

### 3.5 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ทำการทดลองโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ดังนี้ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง รำข้าว กากมันสำปะหลัง และแป้งที่ละลายได้ ตามลำดับ โดยมีสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่
สูตรที่ 2 : รำข้าว + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่
สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่
สูตรที่ 4 : แป้งที่ละลายได้ + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่

ชั่งสับสเตรทจำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด จากนั้นเติมสารอาหารต่างๆ ตามสูตรอาหารดังกล่าวข้างต้น โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) สารละลายเกลือแร่ (ภาคผนวก ก) 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 70 (โดยปริมาตรของน้ำกลั่นหรือสารละลายเกลือแร่ที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการสกัดเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (สับสเตรท 1 กรัมต่อน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันและเทส่วนผสมจากถุงเพาะเห็ดลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าในตู้บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตามวิธีของ Ramadas *et.al.* (1996) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในวัตถุดิบ

นำวัตถุดิบที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดจากการทดลองที่ 3.5 มาหาปริมาณโปรตีน (Kjeldahl Method; A.O.A.C. 1980) ความชื้น (A.O.A.C. 1990) น้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson-Somogyi; Nelson, 1944) น้ำตาลทั้งหมด (Phenol-sulphuric; Dubois *et.al.*, 1956) และแป้ง (A.O.A.C. 1975) ตามวิธีในภาคผนวก ข

### 3.7 การศึกษาการเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ

โดยมีสูตรอาหารทั้งหมด 5 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 : แป้งที่ละลายได้ + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่
สูตรที่ 2 : สับสเตรท + น้ำกลั่น
สูตรที่ 3 : สับสเตรท + สารละลายเกลือแร่
สูตรที่ 4 : สับสเตรท + ยูเรีย
สูตรที่ 5 : สับสเตรท + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด จากนั้นเติมสารอาหารต่างๆ ตามสูตรอาหารดังกล่าวข้างต้น โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) สารละลายเกลือแร่ (ภาคผนวก ก) 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 70 (โดยปริมาตรของน้ำกลั่นหรือสารละลายเกลือแร่ที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการสกัดเอนไซม์กลูโคอะไมเลสด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (สับสเตรท 1 กรัมต่อน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันและเทส่วนผสมจากถุงเพาะเห็ดลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าในตู้บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตามวิธีของ Ramadas *et.al.* (1996) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.8 การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด

ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger*a CBS 6310 และใช้สับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 เป็นสับสเตรท

### 3.8.1 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมยูเรียร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ร้อยละ 70 (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณร้อยละ 5 10 15 20 และ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ตามลำดับ โดยมีสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 : สับสเตรท 5 กรัม + ยูเรีย 0.005 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + กล้าเชื้อ 0.25 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 : สับสเตรท 5 กรัม + ยูเรีย 0.005 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + กล้าเชื้อ 0.50 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 : สับสเตรท 5 กรัม + ยูเรีย 0.005 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + กล้าเชื้อ 0.75 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 20 : สับสเตรท 5 กรัม + ยูเรีย 0.005 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + กล้าเชื้อ 1.00 มิลลิลิตร

สูตรที่ 5 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 25 : สับสเตรท 5 กรัม + ยูเรีย 0.005 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + กล้าเชื้อ 1.25 มิลลิลิตร

ทั้ง 5 สูตรจะถูกปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ร้อยละ 70 ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.8.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

**3.8.2.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจน (ไม่เติม (ชุดควบคุม) แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ตามลำดับ) ในปริมาณร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) โดยมีสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 : สับสเตรท 5 กรัมไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ชุดควบคุม)
สูตรที่ 2 : สับสเตรท 5 กรัม + แอมโมเนียมซัลเฟต 0.005 กรัม
สูตรที่ 3 : สับสเตรท 5 กรัม + แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.005 กรัม
สูตรที่ 4 : สับสเตรท 5 กรัม + แอมโมเนียมไนเตรต 0.005 กรัม
สูตรที่ 5 : สับสเตรท 5 กรัม + ยูเรีย 0.005 กรัม
สูตรที่ 6 : สับสเตรท 5 กรัม + เปปโตน 0.005 กรัม
สูตรที่ 7 : สับสเตรท 5 กรัม + สารสกัดจากยีสต์ 0.005 กรัม

เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตรในอาหารทั้ง 7 สูตรและปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ร้อยละ 70 (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) ตามลำดับ เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตรและปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ร้อยละ 70 (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.3 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ร้อยละ 50 60 70 80 และ 90 ตามลำดับ (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) โดยมีสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 3.6 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 5.8 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 9.8 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 16.5 มิลลิลิตร

สูตรที่ 5 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 34.1 มิลลิลิตร

แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

**3.8.4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอน (ไม่เติม (ชุดควบคุม) กลูโคส ซูโครส แป้งที่ละลายได้และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟรุกโทส ตามลำดับ) เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.3 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) โดยมีสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 : สับสเตรท 5 กรัม ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (ชุดควบคุม)
สูตรที่ 2 : สับสเตรท 5 กรัม + กลูโคส 0.005 กรัม
สูตรที่ 3 : สับสเตรท 5 กรัม + ซูโครส 0.005 กรัม
สูตรที่ 4 : สับสเตรท 5 กรัม + แป้งที่ละลายได้ 0.005 กรัม
สูตรที่ 5 : สับสเตรท 5 กรัม + ฟรุกโทส 0.005 กรัม

แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.1 ในปริมาณร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) ตามลำดับ เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.3 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไป เพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.8.5 การศึกษาขนาดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 ตามขนาดต่างๆ ดังนี้ เล็กกว่าหรือเท่ากับ 80 80-500 500-850 850-1700 ไมโครเมตรและที่ไม่คัดขนาด ตามลำดับ จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.3 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไป เพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.6 การศึกษาอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วน 1.0:10 1.5:10 2.0:10 2.5:10 และ 3.0:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) โดยมีสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 1.0:10 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.50 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 1.5:10 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 0.75 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 2.0:10 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 1.00 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 2.5:10 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 1.25 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 5 สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 3.0:10 : สับสเตรท 5 กรัม + สารละลายเกลือแร่ 1.50 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.3 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.6 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.3 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.8 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

**3.8.8.1 การศึกษาชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมเกลืออนินทรีย์ (ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ (ชุดควบคุม) แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์) ในปริมาณร้อยละ0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) โดยมีสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : สับสเตรท 5 กรัม ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ (ชุดควบคุม)
สูตรที่ 2 : สับสเตรท 5 กรัม + แคลเซียมคลอไรด์ 0.0075 กรัม
สูตรที่ 3 : สับสเตรท 5 กรัม + แมกนีเซียมซัลเฟต 0.0075 กรัม
สูตรที่ 4 : สับสเตรท 5 กรัม + โซเดียมคลอไรด์ 0.0075 กรัม
สูตรที่ 5 : สับสเตรท 5 กรัม + แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟต 0.0075 กรัม
สูตรที่ 6 : สับสเตรท 5 กรัม + แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 0.0075 กรัม
สูตรที่ 7 : สับสเตรท 5 กรัม + แมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 0.0075 กรัม
สูตรที่ 8 : สับสเตรท 5 กรัม + แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์ 0.0075 กรัม

เติมสารละลายเกลือแร่ในอาหารทั้ง 8 สูตร ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.6 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.3 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.7 เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.8.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม**

ชั่งสับสเตรทที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 ตามขนาดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.5 จำนวน 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.2.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.1 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.4.2 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) เติมเกลืออนินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง 3.8.8.1 ในปริมาณร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 (น้ำหนักต่อน้ำหนักสับสเตรท) ตามลำดับ เติมสารละลายเกลือแร่ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.6 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.3 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) เพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสม (โดยปริมาตรของสารละลายเกลือแร่และน้ำกลั่นที่เติมลงไปเพื่อปรับความชื้นจะคิดรวมกับปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปในการหมัก) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ในปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) ผสมกล้าเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.7 เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.5

**3.8.9 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 3.8.1-3.8.8 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน สกัดและวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเช่นเดียวกับข้อ 3.5

ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ด้วยการนับจำนวนเซลล์โดยวิธี direct microscopic count เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

## 3.9 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

**3.9.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน**

เตรียมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตามวิธีการทดลองข้อ 3.8.1-3.8.8 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำ salt fractionation เพื่อหาช่วงความอิ่มตัวที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 0-30 30-50 50-70 และ 70-90 ตามลำดับ ขณะเติมจะมีการกวนอย่างช้าๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงมาปั่นเหวี่ยงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ชนิดอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ปริมาณเล็กน้อยในการละลายโปรตีน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ จากการทดลองข้างต้นจะเลือกช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด มาทำการศึกษาเพื่อหาระดับความอิ่มตัวที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดอีกครั้ง เมื่อได้ระดับความอิ่มตัวที่เหมาะสมที่สุดแล้ว จะนำมากรองแบบอัลตร้าฟิวเตรชัน โดยใช้ ultrafiltration membrane cut off 30,000 ดาลตัน ยี่ห้อ Millipore เพื่อทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Baker and Fleetwood, 1975)

**3.9.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์**

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.9.1 มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ คือ ใช้บัฟเฟอร์ชนิดซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 3.0 3.5 อะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 และใช้บัฟเฟอร์ชนิดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 (Stoll and Blanchard, 1990) คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

**3.9.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์**

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.9.1 มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.9.2 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 20 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส (Fogarty and Benson, 1983) คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

**3.9.4 การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.9.1 มาบ่มที่พีเอชต่างๆ ดังข้อ 3.9.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Fogarty and Benson, 1983) จากนั้นนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.9.2 และ 3.9.3 ตามลำดับ เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

**3.9.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.9.1 มาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.9.4 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังข้อ 3.9.3 เป็นเวลา 30 นาที (Fogarty and Benson, 1983) แล้วนำไปทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไปคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.9.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 3.9.3 ตามลำดับ เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

## 3.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 การศึกษาเปรียบเทียบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

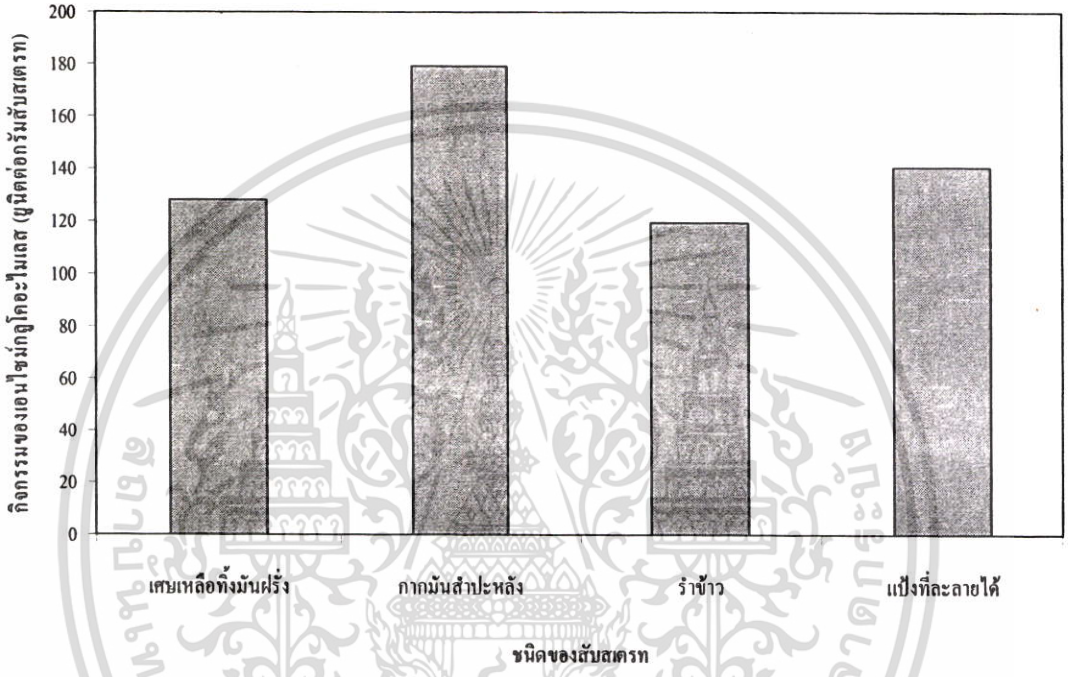
ผลการศึกษาเปรียบเทียบหาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลส โดยเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง รำข้าว และแป้งที่ละลายได้เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.1 จากการทดลองพบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน โดยพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 179.32 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับเมื่อใช้เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง รำข้าว และแป้งที่ละลายได้เป็นสับสเตรท แสดงดังตารางที่ ง-1 (ภาคผนวก ง) รองลงมาคือการใช้แป้งที่ละลายได้ เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง และรำข้าวเป็นสับสเตรทตามลำดับ โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือเท่ากับ 140.46 128.08 และ 119.36 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว สามารถที่จะนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ ซึ่งเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ได้เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าซึ่งแต่เดิมนั้นจะนิยมนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์เป็นส่วนใหญ่ แต่สับสเตรททั้งสามชนิดนี้จะให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้แตกต่างกัน โดยกากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงกว่าการใช้วัสดุชนิดอื่นๆเป็นสับสเตรทในสภาวะเดียวกัน โดยกากมันสำปะหลังมีส่วนประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตเป็นปริมาณ 17.80 เปอร์เซ็นต์ (Klanarong *et.al.*, 2000) ส่วนเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งและรำข้าวมีส่วนประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่น้อยกว่ากากมันสำปะหลัง คือ 16.8 (Potato raw, 2003) และ 16.1 เปอร์เซ็นต์ (United Nation, 1985) ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.1 ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะย่อยสับสเตรทจำพวกแป้งและไกลโคเจน กากมันสำปะหลังจึงเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนั้นจึงเลือกใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** แสดงปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง และรำข้าว

| ชนิดของสับสเตรท | เปอร์เซ็นต์ | อ้างอิง |
|---|---|---|
| เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง | 16.8 | Potato raw. (2003) |
| กากมันสำปะหลัง | 17.80 | Klanarong (2000) |
| รำข้าว | 16.1 | United Nation (1985) |




**รูปที่ 4.1** แสดงผลการเปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักสับสเตรท) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆในวัตถุดิบ

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆในกากมันสำปะหลัง ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ความชื้น น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และแป้ง พบว่า ในกากมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดร้อยละ 2.45 ความชื้นร้อยละ 7.10 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.03 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.95 และปริมาณแป้งอยู่ร้อยละ 18.95 แสดงดังตารางที่ 4.2

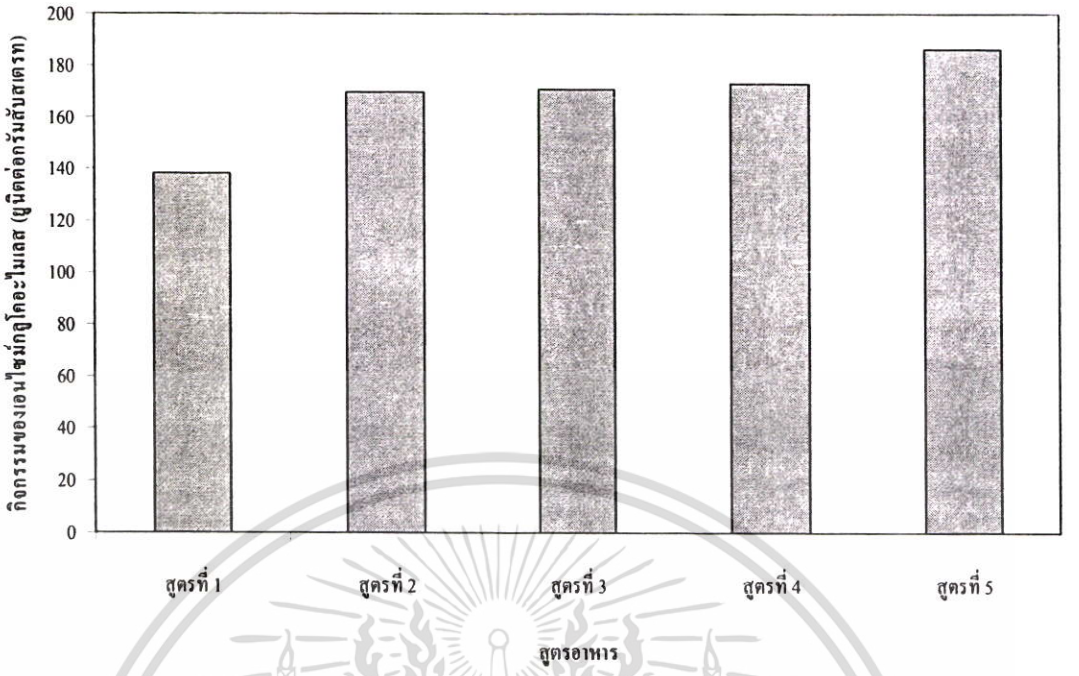
**ตารางที่ 4.2** แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ในกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

| องค์ประกอบต่างๆ | ปริมาณ (ร้อยละ) | วิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| โปรตีน | 2.45 | Kjeldahl Method (A.O.A.C. 1980) |
| ความชื้น | 7.10 | A.O.A.C. (1990) |
| น้ำตาลรีดิวซ์ | 0.03 | Nelson-Somogyi. (1944) |
| น้ำตาลทั้งหมด | 1.95 | Phenol-sulphuric acid (1956) |
| แป้ง | 18.95 | A.O.A.C. (1975) |

## 4.3 ผลขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.2 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในอาหารสูตรที่ 5 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 186.37 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารสูตรอื่นๆ แสดงดังตารางที่ ง-2 (ภาคผนวก ง) รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 4 สูตรที่ 3 และสูตรที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 173.11 170.82 และ 169.70 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก และอาหารสูตรที่ 1 ที่ใช้แป้งที่ละลายได้เป็นสับสเตรทให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารสูตรอื่นๆ คือมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 138.05 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.2** แสดงผลขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทจึงจำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนลงในสูตรอาหาร เนื่องจากในกากมันสำปะหลังอาจมีสารอาหารที่ไม่เพียงพอแก่การเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจึงต้องเติมแหล่งของธาตุอาหารเสริมดังกล่าวลงในสูตรอาหาร

กำหนดให้

สูตรที่ 1 : แป้งที่ละลายได้ + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่ (ชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 : กากมันสำปะหลัง + น้ำกลั่น

สูตรที่ 3 : กากมันสำปะหลัง + สารละลายเกลือแร่

สูตรที่ 4 : กากมันสำปะหลัง + ยูเรีย

สูตรที่ 5 : กากมันสำปะหลัง + ยูเรีย + สารละลายเกลือแร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-2 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่ 2 3 และ 4 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สูตรอาหารทั้ง 4 สูตรจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่างจากสูตรอาหารที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสูตรอาหารที่ 5 ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) และเติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 70 ทำให้เชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารที่ 5 ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ต่อไป

## 4.4 ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งในถุงพลาสติกสำหรับเพาะเห็ด

### 4.4.1 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสโดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 10 15 20 และ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.3 จากการทดลองนั้นพบว่าเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 180.35 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งมีกิจกรรมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 และ 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) คือมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 174.93 และ 168.28 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมักตามลำดับ แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 20 และ 25 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) แสดงดังตารางที่ ง-3 (ภาคผนวก ง) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 160.53 และ 155.05 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Ellaiah *et al.* (2002) ที่ได้ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในปริมาณร้อยละ 5 10 15 และ 20 ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ newly isolated *Aspergillus* species ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท พบว่าการเติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 153.0 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 4.3** แสดงผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

Yadav (1988) ได้รายงานถึงการใช้หัวเชื้อรูปแบบต่างๆ สำหรับการหมักแบบอาหารแข็งจะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ แต่ขึ้นกับปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ โดยการใช้ปริมาณหัวเชื้อสูงๆ จะไม่ส่งผลดีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เช่นเดียวกับ Alazard (1980) พบว่าการใช้หัวเชื้อปริมาณสูงๆจะช่วยให้การเจริญของเชื้อในช่วงแรกเป็นไปอย่างรวดเร็วแต่การเจริญนั้นจะถูกจำกัด

Pandey (1990) พบว่าปริมาณกล้าเชื้อที่ร้อยละ 5 เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท ในขณะที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 และ 15 จะให้อัตราการผลิตเอนไซม์ในช่วงแรกของการหมักสูงกว่าการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 5 แต่ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ทั้งหมดจะน้อยกว่าเมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 5

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-3 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมลงในสูตรอาหารในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อไป

**4.4.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

**4.4.2.1 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม**

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลส โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.4 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ แสดงดังตารางที่ ง-4 (ภาคผนวก ง) คือมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 187.57 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และน้ำกลั่น (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 156.03 151.37 150.88 และ 144.00 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ตามลำดับ และสูตรอาหารที่เติมเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และน้ำกลั่น (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 130.74 และ 124.77 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

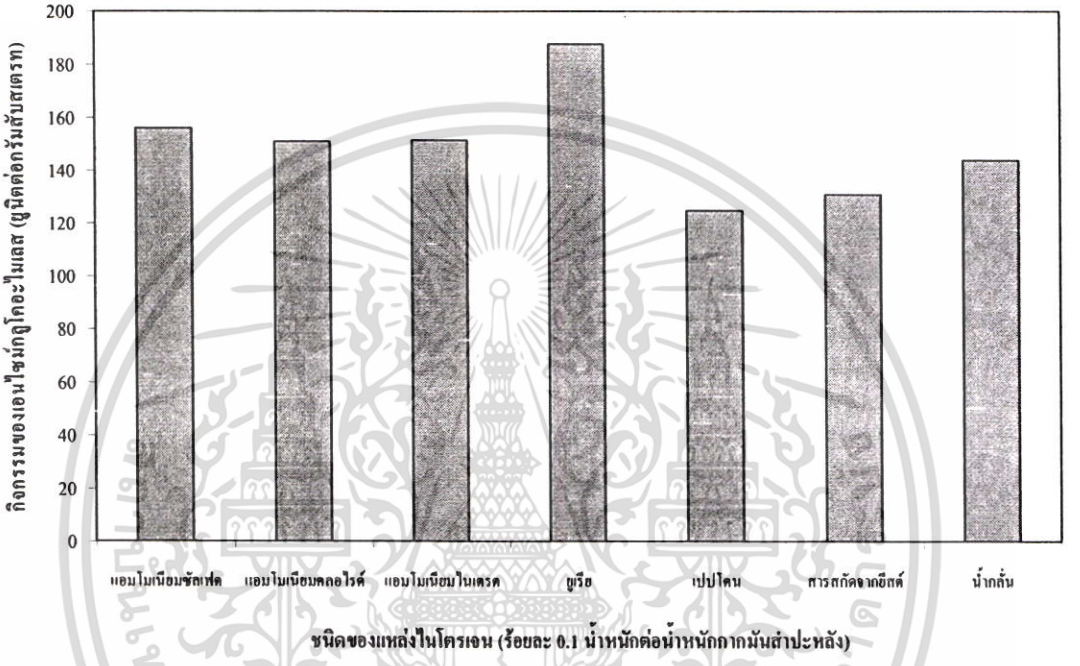
ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Ellaiah *et.al.* (2002) ที่ได้รายงานว่า ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ newly isolated *Aspergillus* species ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท เช่นเดียวกับ Bertolin *et.al.* (2003) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus awamori* ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ แต่ยูเรียจะให้กิจกรรมเอนไซม์ที่สูงกว่าแอมโมเนียมมาก

Pandey (1990) รายงานถึงสารอินทรีย์แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง Pandey *et al.* (1995) ได้รายงานถึงสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ข้าวโพด ถั่วเหลือง เปปโตน จะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอนไซม์ และ Selvakumar (1998) ได้ศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1248 ในสภาวะการหมักแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็งโดยใช้กากชาเป็นสับสเตรท พบว่ามอลล์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 226 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ภายหลังการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-4 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะอื่นๆที่เหมาะสมต่อไป



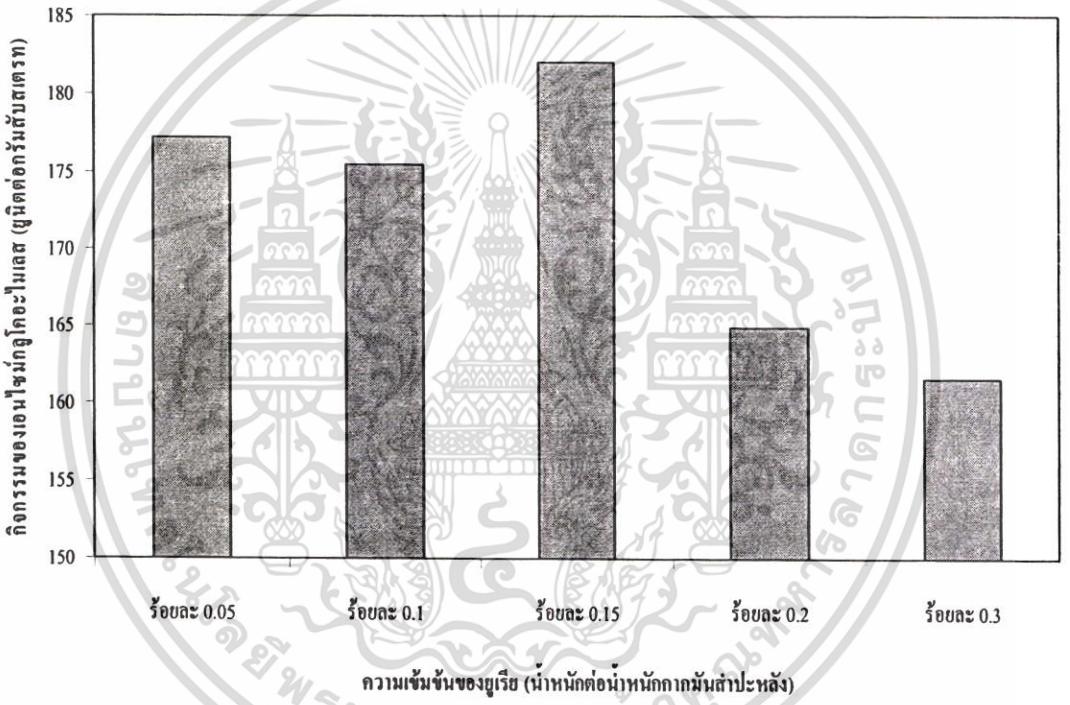

**รูปที่ 4.4** แสดงผลชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

#### 4.4.2.2 ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.5 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมยูเรียความเข้มข้น 0.05 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมยูเรียที่ความเข้มข้นอื่นๆ แสดงดังตารางที่ ง-5 (ภาคผนวก ง) คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 182.04 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมยูเรียในปริมาณร้อยละ 0.05 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ตามลำดับ โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ คือมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 177.21 และ 175.46 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ตามลำดับ และให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำสุดโดยจะให้กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในสูตรอาหารที่เติมยูเรียในปริมาณร้อยละ 0.2 และ 0.3 คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 164.89 และ 161.58 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ตามลำดับ




**รูปที่ 4.5** แสดงผลของความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

Ellaiah *et.al.* (2002) ได้รายงานผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ newly isolated *Aspergillus* species ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อเติมยูเรียที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 มีผลทำให้เชื้อรานี้ผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Selvakumar (1998) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1248 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากชาเป็นสับสเตรท พบว่าการเติมมอลล์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 226 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ภายหลังการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-5 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่เติมยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากสูตรอาหารที่เติมยูเรียที่ความเข้มข้นอื่นๆ ดังนั้นจึงใช้ยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมลงในสูตรอาหารในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

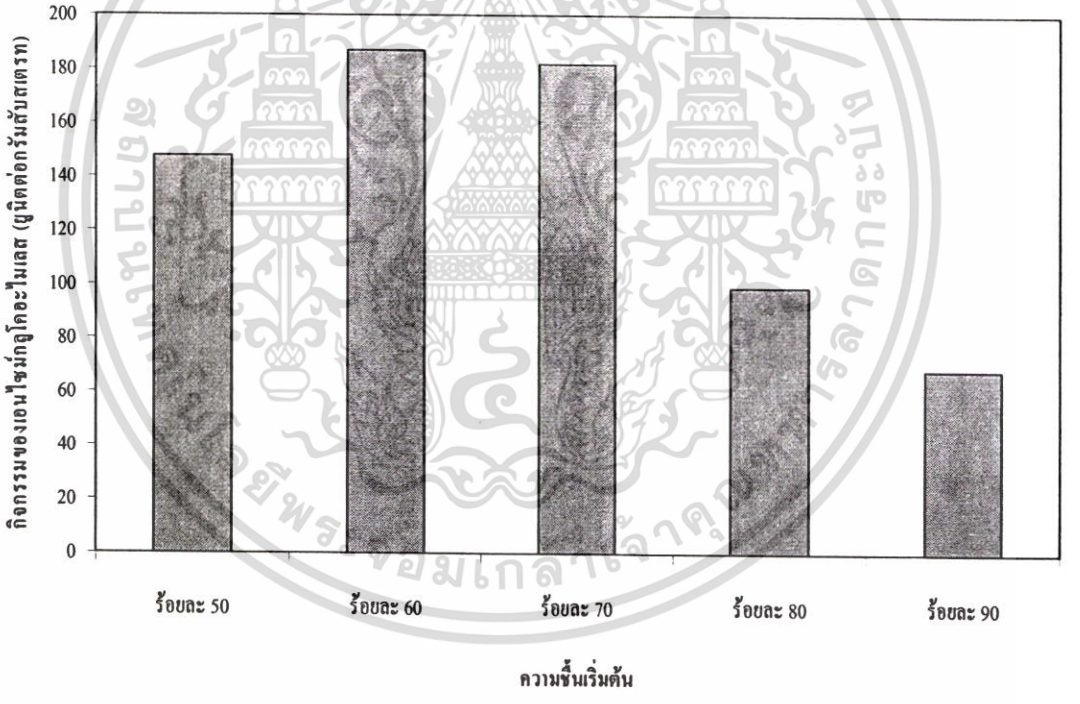
**4.4.3 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของกากมันสำปะหลังต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.6 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็นร้อยละ 60 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 186.89 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็นร้อยละ 70 แสดงดังตารางที่ ง-6 (ภาคผนวก ง) คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 181.93 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็นร้อยละ 50 80 และ 90 ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือเท่ากับ 147.73 98.94 และ 68.17 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ตามลำดับ

เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ในบริเวณใกล้ๆ พื้นผิวหน้าของสับสเตรทซึ่งเป็นที่ที่มีความชื้นต่ำๆ โดยน้ำจะมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสับสเตรทซึ่งจะส่งผลต่อการผลิต โดยค่า water activity ($a_w$) ของสับสเตรทซึ่งแสดงถึงปริมาณน้ำซึ่งจุลินทรีย์ต้องการใช้ในกิจกรรมต่างๆ เป็นปัจจัยที่สำคัญของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งโดยจะส่งผลต่อการเจริญและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ (Selvakumar, 1996) โดยเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดที่ค่า $a_w$ เท่ากับ 0.936 โดยเมื่อลดค่า $a_w$ ลงการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสก็ลดลงด้วย ยีสต์บางชนิดสามารถเจริญที่ค่า $a_w$ ต่ำๆ คือประมาณ 0.6-0.7 Ellaiah *et.al.* (2002) ได้รายงานถึงความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของรำข้าวสาลีในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ newly isolated *Aspergillus* species อยู่ที่ร้อยละ 80 โดยความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญซึ่งจะส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของสับสเตรทใน กระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักแบบอาหารแข็ง ความชื้นที่เพิ่มขึ้นจะช่วยลดความพรุนของสับสเตรทและจำกัดการส่งผ่านออกซิเจน เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งเป็นการหมักที่ไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ แต่จะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับสับสเตรทซึ่งจะส่งผลต่อการพองตัวของอนุภาคของสับสเตรท ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเข้าไปใช้ประโยชน์จากสารอาหารได้ง่ายขึ้น และ Pandey (1992a)ได้รายงานถึงความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของรำข้าวสาลีในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Aspergillus niger* อยู่ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50-55 และจากผลการทดลองความชื้นเริ่มต้นที่ร้อยละ 60 เป็นปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท ทำให้เชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด รวมทั้ง จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-6 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรทเป็นร้อยละ 60 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดจึงเลือกระดับความชื้นนี้ไปใช้เพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป




**รูปที่ 4.6** แสดงผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.4.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

**4.4.4.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม**

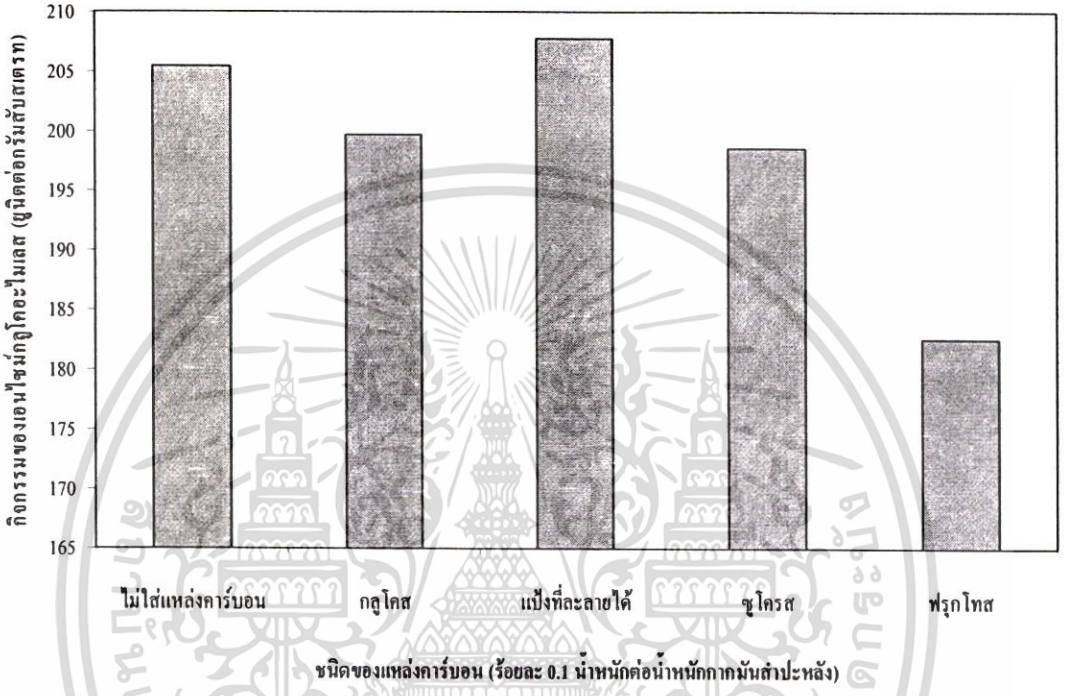
ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.7 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมแป้งที่ละลายได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นแหล่งคาร์บอน คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 207.79 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนคือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 205.48 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 199.71 และ 198.57 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก และสูตรอาหารที่เติมฟรุกโทสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่ำที่สุดซึ่งแตกต่างจากสูตรอาหารที่เติมกลูโคสและซูโครสอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 182.55 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

De Mot (1990) ได้รายงานว่า แป้ง กลูโคส มอลโตส และเด็กทรินซ์ เป็นตัวชักนำ (inducer) ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *A. monospora* *Debaryomyces polymorphus* *S. cerevisiae* var. *diastaticus* *S. fibuligera* และ *S. capsularis* สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สูงได้ โดยไม่ต้องมีแหล่งคาร์บอนเป็นตัวชักนำ และ Gogoi *et.al.* (1987) พบว่าเชื้อ *S. fibuligera* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณสูงเมื่อใช้เด็กทรินซ์และแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน Selvakumar (1998) พบว่าซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด เมื่อใช้กากชาเป็นสับสเตรท และ Soni *et.al.* (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Saccharomycopsis capsularis* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะสูงสุดในวันที่ 4 และ 5 ของการหมักซึ่งเป็นช่วง stationary phase และการใช้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีอยู่มากและราคาถูก เช่น รำข้าวสาลี ข้าวโพด สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ได้โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างสูง

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-7 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่เติมแป้งที่ละลายได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งคาร์บอน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน ซึ่งการทดลองได้ยืนยันผลการทดลองในข้อ 4.3 คือสูตรอาหารที่ 5 เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป




**รูปที่ 4.7** แสดงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

### 4.4.5 ผลของขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.8 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังขนาด 81-500 ไมโครเมตร คือมีกิจกรรมของเอนไซม์

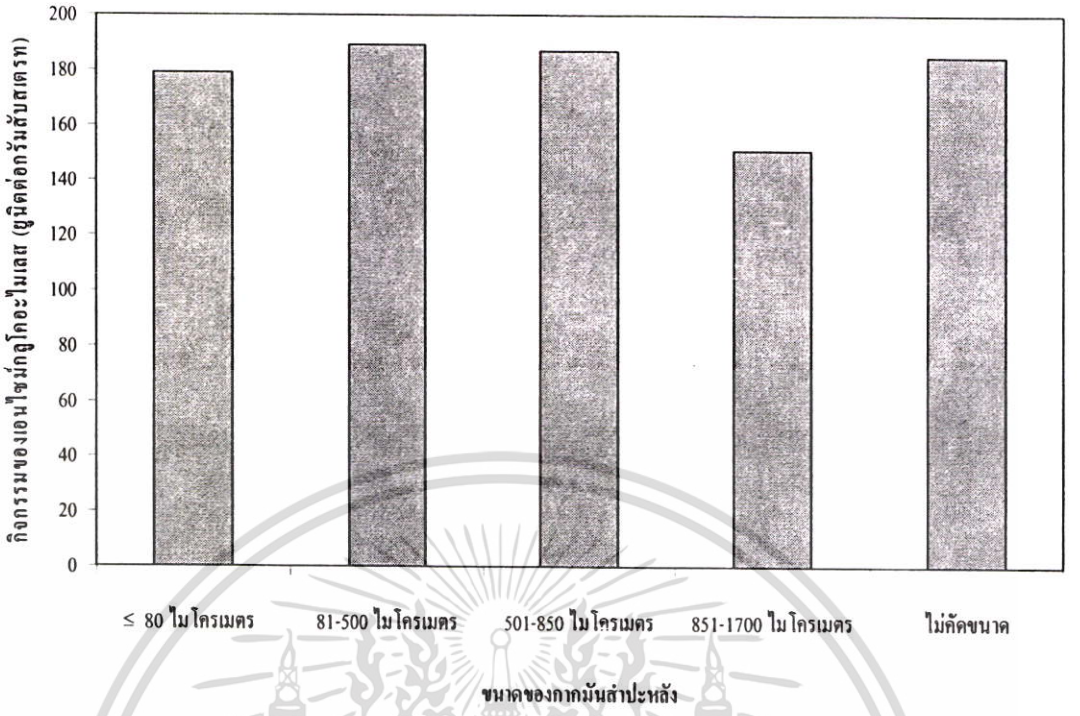
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 188.28 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังขนาด 501-850 ไมโครเมตร และสูตรอาหารที่มีการใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 187.03 และ 184.57 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือเท่ากับ 150.9 และ 179.3 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก เมื่อใช้กากมันสำปะหลังขนาด 851- 1700 ไมโครเมตร และเล็กกว่าหรือเท่ากับ 80 ไมโครเมตร โดยกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังขนาดอื่นๆ

ขนาดของสับสเตรทที่เหมาะสมเนื่องจากช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว ในกรณีของการหมักแบบอาหารแข็ง ขนาดของสับสเตรทบ่งบอกถึงช่องว่างซึ่งแสดงถึงปริมาณของออกซิเจน ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นขนาดอนุภาคของสับสเตรทควรจะเป็นขนาดที่พอเหมาะ (Molony *et.al.*, 1984) และ Pandey (1991) ได้ศึกษาขนาดของรำข้าวสาลีที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *Aspergillus niger* พบว่าสับสเตรทที่มีขนาดเล็กจะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าสับสเตรทขนาดที่มีใหญ่ โดยจะให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดในสับสเตรทขนาด 425-500 ไมโครเมตร โดยให้ค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) 39.61 และเมื่อลดขนาดของสับสเตรทลง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้ก็จะลดลงด้วย และกิจกรรมเอนไซม์จะต่ำที่สุดในสับสเตรทขนาดใหญ่กว่า 1.4 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามสับสเตรทที่ไม่ได้คัดขนาดจะมีขนาดของสับสเตรทตั้งแต่เล็กกว่า 180 ไมโครเมตรจนถึงขนาดใหญ่กว่า 1.4 มิลลิเมตรก็สามารถใช้ได้เช่นกัน

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-8 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังขนาด 81-500 ไมโครเมตร เป็นสับสเตรท ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรทในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



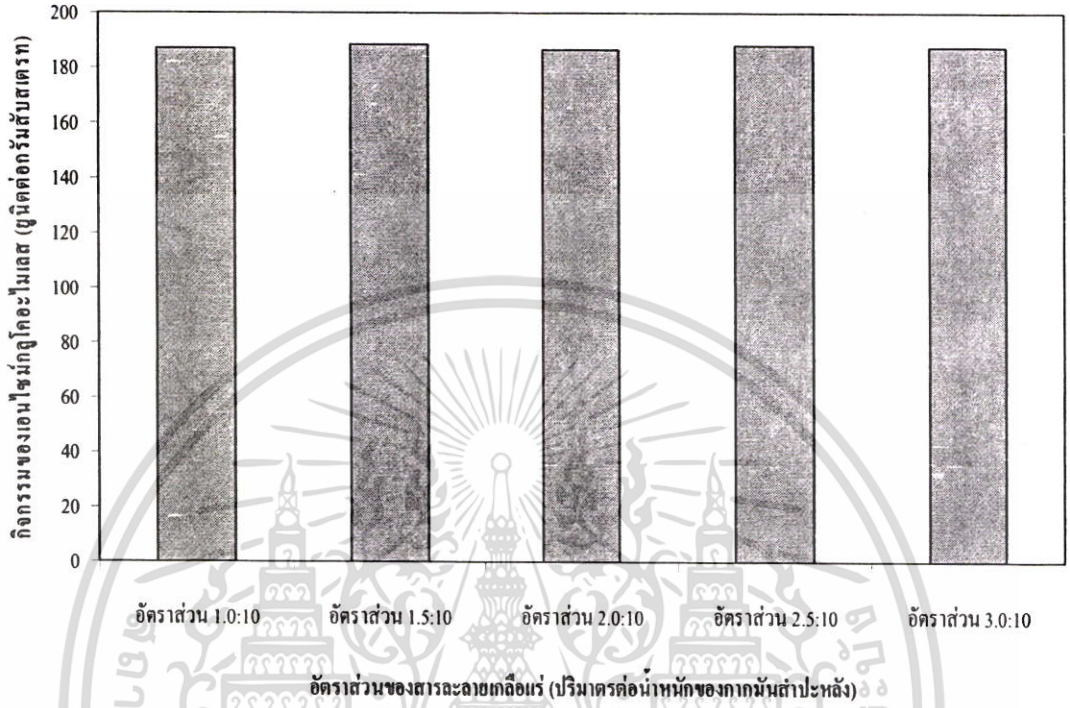

**รูปที่ 4.8** แสดงผลของขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

**4.4.6 ผลของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

ผลการศึกษาอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.9 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่ใช้สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 1.5:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) คือมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 188.51 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่ใช้สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 1.0:10 2.5:10 และ 3.0:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) แสดงดังตารางที่ ง-9 (ภาคผนวก ง)โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 187.06 188.09 และ 187.46 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะต่ำสุดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารที่ใช้สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 2.0:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) คือเท่ากับ 186.54 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่ใช้สารละลายเกลือแร่อัตราส่วนอื่นๆ




**รูปที่ 4.9** แสดงผลของอัตราส่วนสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

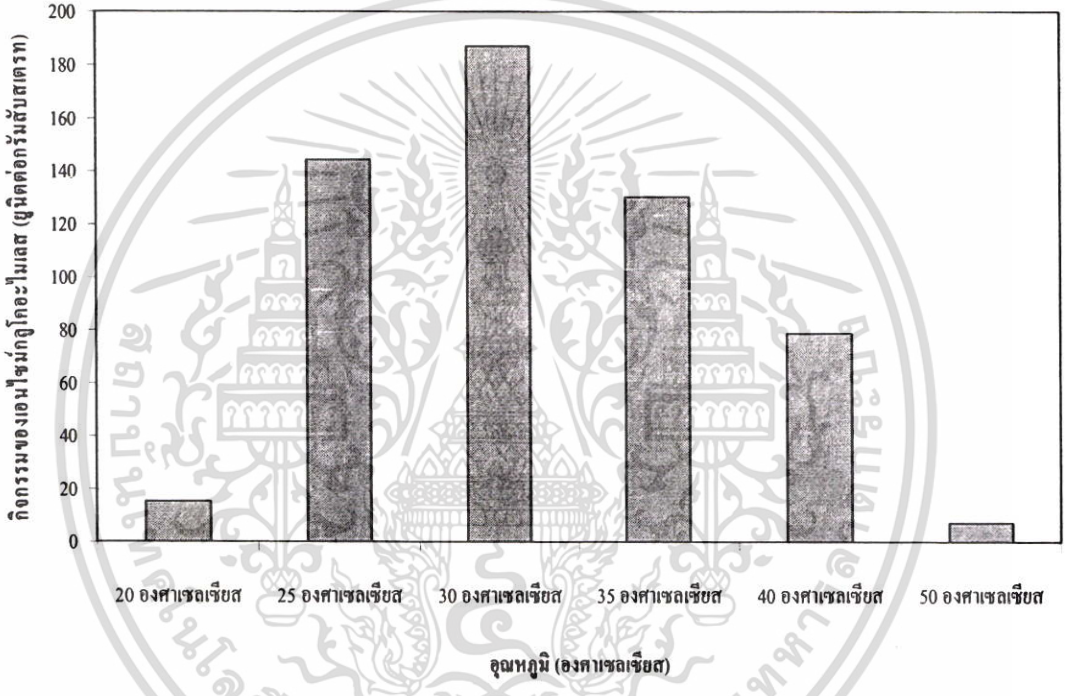
จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-9 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่เติมสารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 1.5:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมสารละลายเกลือแร่อัตราส่วนอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายเกลือแร่อัตราส่วน 1.0:10 ในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆที่เหมาะสมต่อไป

#### 4.4.7 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แข็งเป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.10 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิอื่นๆ แสดงดังตารางที่ ง-10 (ภาคผนวก ง) ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 186.91 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก รองลงมาคือการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 35 40 20 และ 50 องศาเซลเซียส โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือเท่ากับ 144.30 130.33 78.87 15.26 และ 7.27 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก




**รูปที่ 4.10** แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมัน-สำปะหลัง) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

จากผลการทดลองได้สอดคล้องกับ Ellaiah *et.al.* (2002) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ newly isolated *Aspergillus* species โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุด คือเท่ากับ 142 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ Pandey (1990) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานว่าในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ในการใช้สับสเตรทของจุลินทรีย์ พลังงานความร้อน การหายใจของจุลินทรีย์จะทำให้เกิดการสะสมอุณหภูมิภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นผลให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น และ Soni *et.al.* (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสโดยเชื้อ *Saccharomycopsis capsularis* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะสูงสุดในวันที่ 4 และ 5 ของการหมักซึ่งเป็นช่วง stationary phase และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส

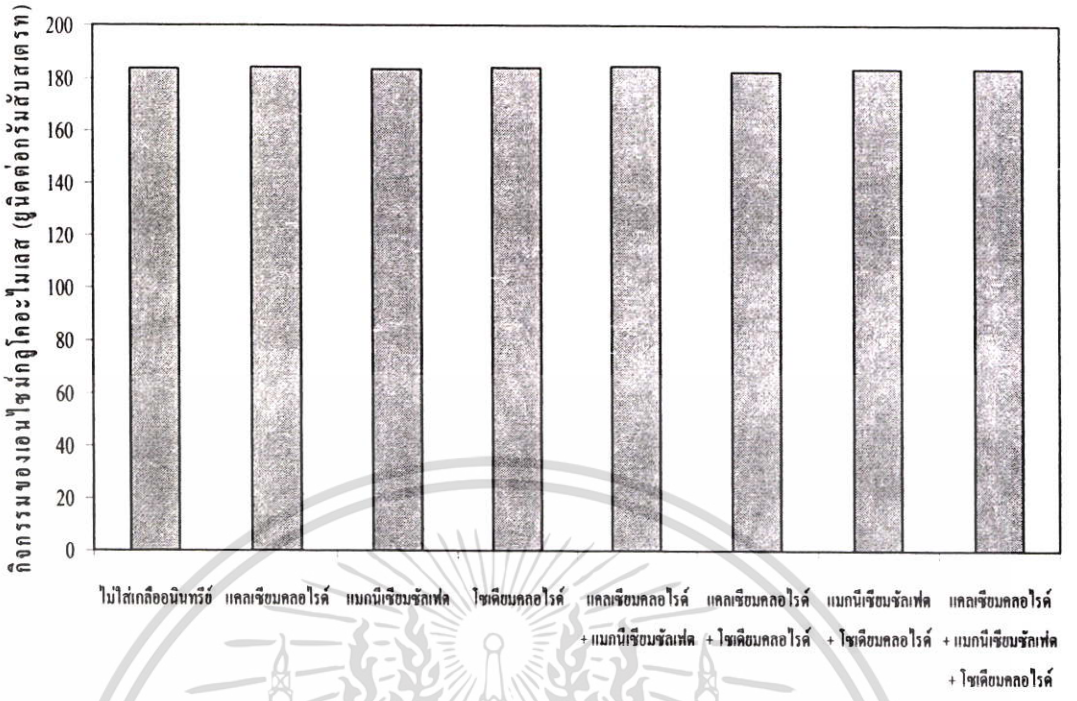
จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-10 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิในการบ่มเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส ในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

**4.4.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

**4.4.8.1 ผลของชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสม**

ผลการศึกษาชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลส โดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.11 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมทั้งเกลือแคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 184.79 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้นี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารที่ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ และสูตรอาหารที่เติมเกลืออนินทรีย์ชนิดอื่นๆ แสดงดังตารางที่ ง-11 (ภาคผนวก ง) โดยสูตรอาหารที่ไม่เติมเกลืออนินทรีย์ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 183.79 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก สูตรอาหารที่เติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 184.17 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 183.55 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 184.10 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 182.62 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สูตรอาหารที่เติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 183.63 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และสูตรอาหารที่เติมทั้งแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 183.63 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ทั้งหมดให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.11** แสดงผลของชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Hockenhull (1967) ได้รายงานปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวของกับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้แก่ แหล่งของเอนไซม์ ระดับความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของสารที่เอนไซม์จะย่อยได้ รวมทั้งแร่ธาตุบางชนิด เช่น $Ca^{2+}$ จะช่วยรักษาความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ดีขึ้นภายใต้สภาวะที่ควบคุม แต่ $Ca^{2+}$ จะไม่มีผลต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเลย และการเปลี่ยนแปลงของพีเอชมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นเพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมจึงมักมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหรือฟอสเฟตลงไปด้วยเสมอ เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้การใส่เกลือแคลเซียมคลอไรด์ไม่ได้ช่วยให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น และ Vallee *et.al.* (1959) ก็ได้รายงานถึง $Ca^{2+}$ ไว้ว่าจะทำหน้าที่เสมือนสารให้ความคงตัว และเป็นโคแฟคเตอร์ให้แก่เอนไซม์เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์จากสภาวะที่รุนแรงต่างๆ

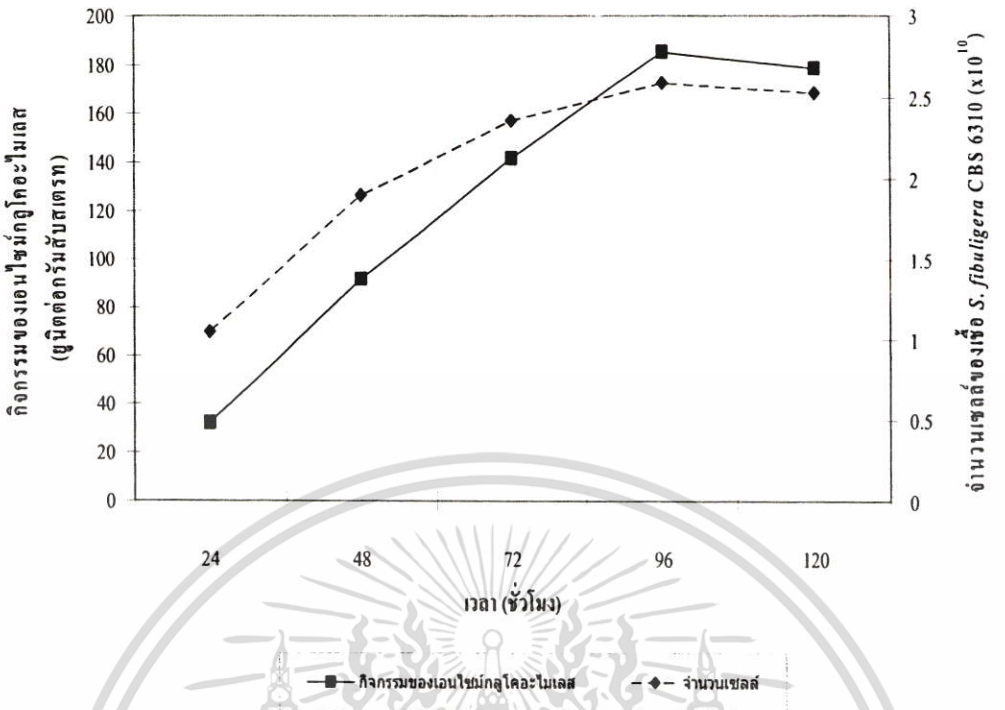
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติ แสดงดังตารางที่ ง-11 (ภาคผนวก ง) พบว่าสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมเกลืออนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรอาหารที่เติมเกลืออนินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารที่ไม่มีการเติมเกลืออนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

**4.4.9 ผลของการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis. fibuligera* CBS 6310 กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 โดยการนับจำนวนเซลล์โดยวิธี direct microscopic count และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แสดงดังรูปที่ 4.12 จากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 24-48 ของการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก เชื้อมีการเจริญสูงสุดโดยมีจำนวนเซลล์ของเชื้อเท่ากับ $2.49 \times 10^{10}$ เซลล์ หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะค่อยๆ ลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์ โดยที่ในช่วงต้นๆของการหมักเชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และการผลิตเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน จนมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก คือเท่ากับ 185.49 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท แสดงดังตารางที่ ค-15 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของเบญจพร (2542) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. พบว่ามีลักษณะการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วยแสดงว่าเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบปฐมภูมิ (primary metabolism) เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตออกมาในช่วงของการเจริญมีส่วนช่วยในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล เพื่อใช้ในการเจริญของเชื้อยีสต์ และเชื้อยีสต์จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase และพบว่าเชื้อยีสต์โดยทั่วไป เช่น *Endomycopsis capsulalis*, *Endomycopsis fibuligera*, *Schwanniomyces alluvis* และ *Schwanniomyces castellii* เป็นต้น มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อมีการเจริญอยู่ในระยะ stationary phase เช่นเดียวกัน (Sandhu *et. al.*, 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.12** แสดงผลของการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis. fibuliger* CBS 6310 กับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับเตรท เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักของกากมันสำปะหลัง) สารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

### 4.5.1 ผลการเตรียมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน

ผลการเตรียมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งให้บริสุทธิ์บางส่วน แสดงดังตารางที่ 4.3 นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 6245.614 ยูนิต และค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 39.27 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มาตกตะกอนเอนไซม์ด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ แสดงดังตารางที่ ค-16 (ภาคผนวก ค) จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 40 ส่งผลให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตกตะกอนได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 82.4 ยูนิต และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 45.65 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ได้ร้อยละ 1.32 และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 1.16 เท่า Sukhumavasi *et.al.* (1975) ได้แยกตะกอนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* จากการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 50 และ 70 ส่งผลให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตกตะกอนได้ดีที่สุด

จากผลการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ พบว่าที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด ดังนั้นจึงนำสารละลายตะกอนของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 มาทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยวิธีอัลตร้าฟิวเตรชันโดยใช้ ultrafiltration membrane cut off 30,000 ดาลตัน หลังจากทำอัลตร้าฟิวเตรชันแล้วพบกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 38.60 ยูนิต ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.754 มิลลิกรัม มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 51.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 1.3 เท่า และมีผลผลิตร้อยละ 0.62 จากปริมาตรเอนไซม์หลังจากทำอัลตร้าฟิวเตรชัน 40 มิลลิลิตร

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้ ตกตะกอนออกมาได้สูงสุดที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 40 ดังนั้นจึงนำสารละลายตะกอนของเอนไซม์ที่ตกอยู่ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 มาทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยวิธีอัลตร้าฟิวเตรชันโดยใช้ ultrafiltration membrane cut off 30,000 ดาลตัน พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.3 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** แสดงผลของการทำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger*a CBS 6310 ภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็งให้บริสุทธิ์บางส่วน

| ขั้นตอน | กิจกรรมทั้งหมด (หน่วย) | โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | กิจกรรมจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) | ความบริสุทธิ์ (เท่า) | ผลผลิต (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|
| เอนไซม์สกัด | 6245.61 | 159.04 | 39.27 | 1.0 | 100 |
| ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 40 | 82.40 | 1.81 | 45.65 | 1.16 | 1.32 |
| สารละลายตะกอนเอนไซม์ทำอัลตร้าฟิวเตรชัน ด้วย ultrafiltration membrane Cut off 30,000 ดาลตัน | 38.60 | 0.75 | 51.19 | 1.3 | 0.62 |

**4.5.2 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

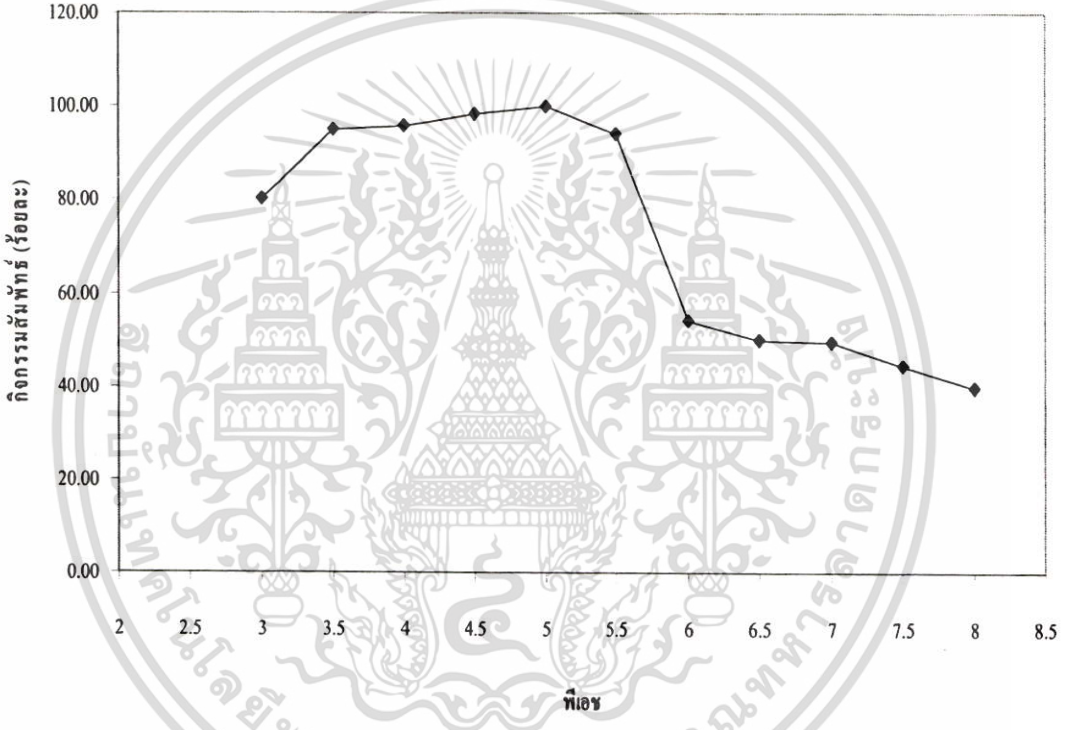
จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนและนำมาศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ แสดงดังรูปที่ 4.13 จากการทดลองพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเป็นกรด คือที่พีเอช 5.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับร้อยละ 100 แสดงดังตารางที่ ค-17 และที่พีเอชต่างๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ดังนี้

ที่พีเอช 3.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 80.08 ที่พีเอช 3.5กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 94.92
ที่พีเอช 4.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 95.76 ที่พีเอช 4.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 98.31
ที่พีเอช 5.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 94.07 ที่พีเอช 6.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 54.24
ที่พีเอช 6.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 50.00 ที่พีเอช 7.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 49.58
ที่พีเอช 7.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 44.49 ที่พีเอช 8.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 39.83

จากผลการทดลองพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่พีเอช 3.5-5.0 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ De Mot (1990) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อยีสต์ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือที่พีเอช 4.0-6.5 และสอดคล้องกับรายงานของ Sukhumavasi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*et.al.* (1975) ที่พบว่าที่พีเอช 5.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* ที่คัดเลือกจากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย และจากรายงานของ Futatsugi *et.al.* (1993b) ที่ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I และ II ที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้แป้งที่ละลายได้เป็นสับสเตรท คือที่พีเอช 5.5 และ 6.0 และสอดคล้องกับรายงานของเบญจพร (2542) ที่ศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือที่พีเอช 5.0




**รูปที่ 4.13** แสดงผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

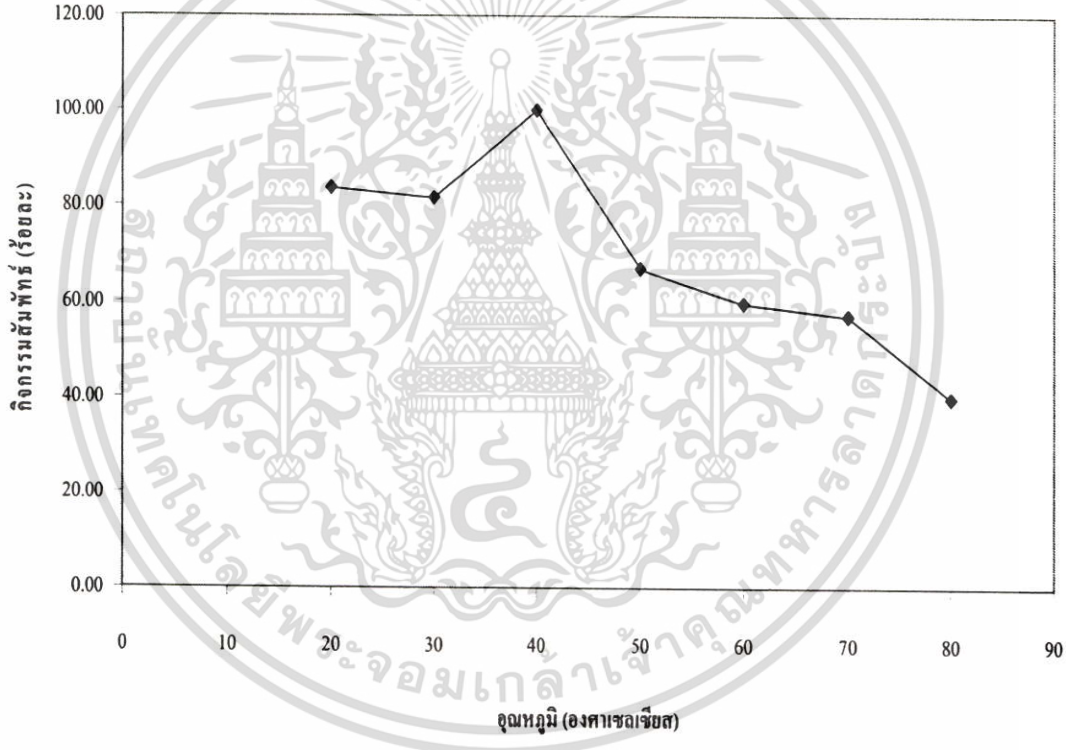
### 4.5.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน แสดงดังรูปที่ 4.14 จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับร้อยละ 100 แสดงดังตารางที่ ค-18 (ภาคผนวก ค) และที่อุณหภูมิต่างๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ดังนี้ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 83.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 81.52 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 66.85อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 59.67 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 57.07 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 39.78

จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Futatsugi *et.al.* (1993b) ที่ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I และ II ที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้แป้งที่ละลายได้เป็นสับสเตรท คือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในทั้งกลูโคอะไมเลส I และ II ขณะที่ De Mot (1990) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อยีสต์ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือ 50-60 องศาเซลเซียส




**รูปที่ 4.14** แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *S. fibuliger*a CBS 6310 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.5.4 ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่พีเอชต่างๆ**

ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่พีเอชต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 4.15 จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้มีความคงตัวสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับร้อยละ 100 แสดงดังตารางที่ ค-19 (ภาคผนวก ค) ซึ่งที่

พีเอช 3.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 46.60 พีเอช 3.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 73.18

พีเอช 4.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 73.87 พีเอช 4.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 86.59

พีเอช 5.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 89.55 พีเอช 5.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 93.89

พีเอช 6.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 87.77 พีเอช 7.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 94.48

พีเอช 7.5 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 94.28 พีเอช 8.0 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 70.61

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้มีความคงตัวที่พีเอช 5.5-6.0 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Futatsugi *et.al.* (1993b) ที่ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I และ II ที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้แป้งที่ละลายได้เป็นสับสเตรท คือที่พีเอช 5.5 และ 6.0 แต่เอนไซม์มีความคงตัวอยู่ที่พีเอช 5.0-7.0 ในทั้งกลูโคอะไมเลส I และ II และสอดคล้องกับรายงานของเบญจพร (2542) ที่ศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-7.0 ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 3.0-7.0

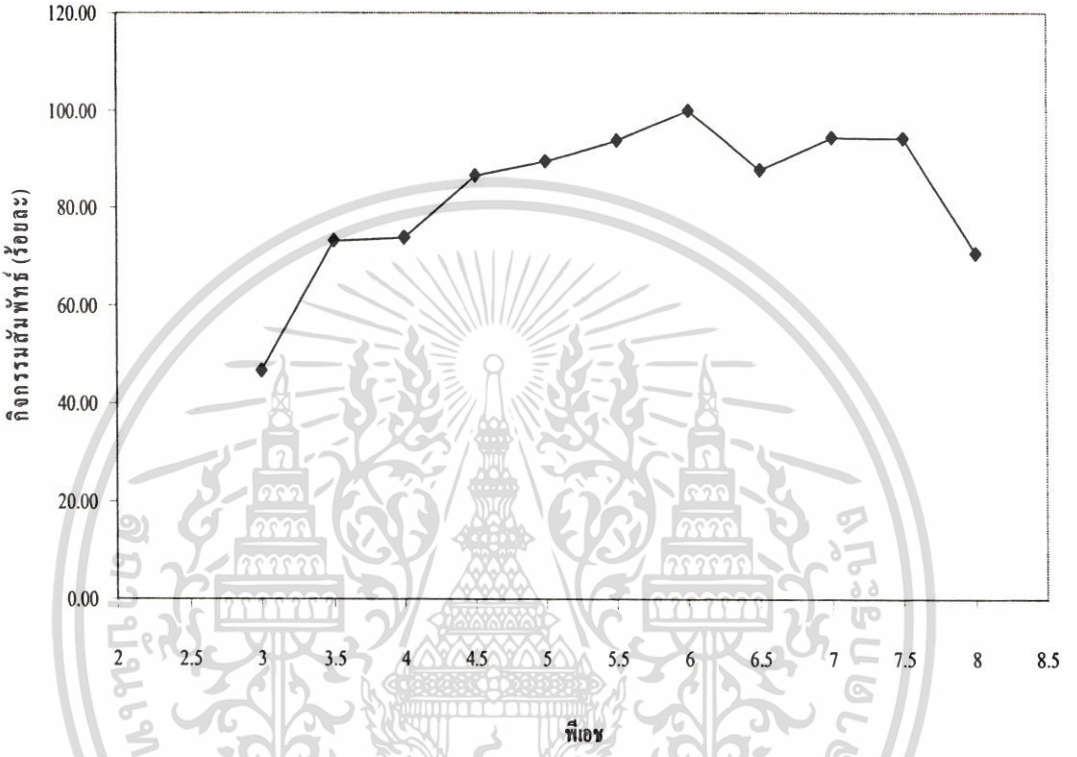
**4.5.5 ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ**

ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่ออุณหภูมิต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 4.16 จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้มีความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับร้อยละ 100 แสดงดังตารางที่ ค-20 (ภาคผนวก ค) และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 84.76 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 41.85 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 34.33 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 22.10 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 18.03 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 14.81

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของเบญจพร (2542) ที่ศึกษาการผลิตและสมบัติของ

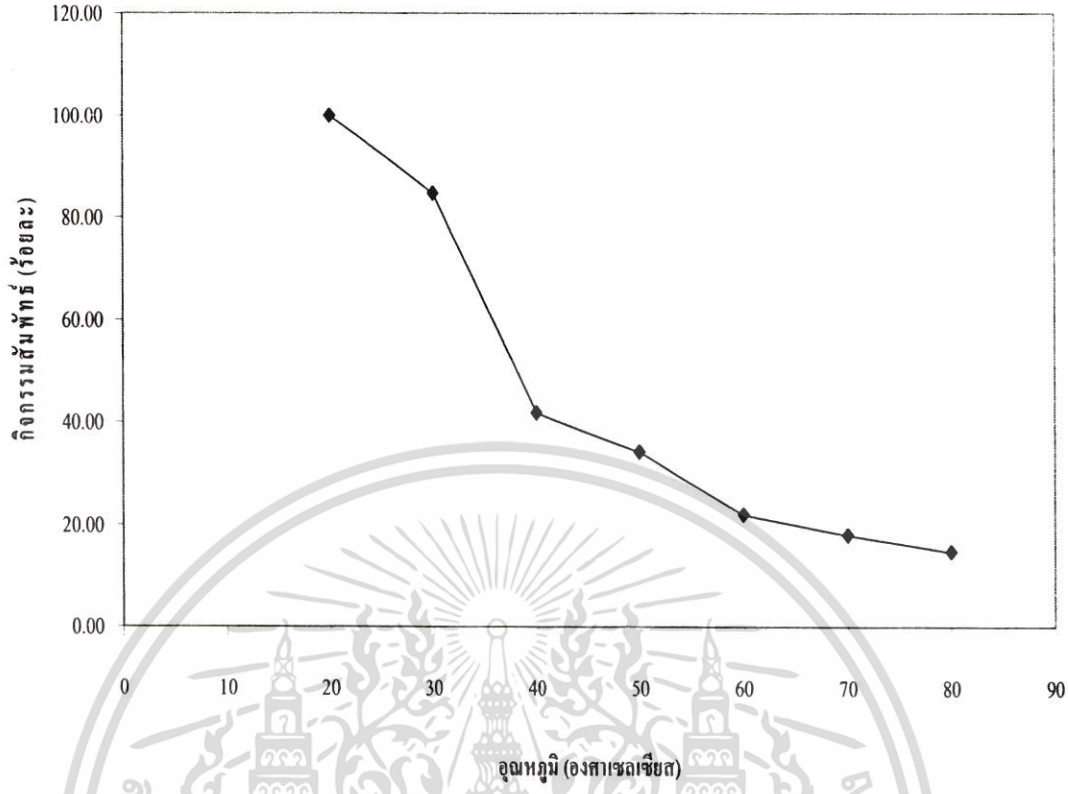
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมีความคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และ Miah *et.al.* (1988) ที่รายงานว่าอุณหภูมิสูงมักจะมีผลต่อการทำลายเอนไซม์ ดังนั้นกลูโคอะไมเลสทั่วไปมักทนอุณหภูมิสูงได้ไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส




**รูปที่ 4.15** แสดงผลของความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ต่อพีเอช เมื่อบ่มที่พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.16** แสดงผลของความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *S. fibuligera* CBS 6310 ต่ออุณหภูมิ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าเมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทมีผลให้เชื้อยีสต์ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 179.32 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง รำข้าว และแป้งที่ละลายได้เป็นสับสเตรท จากนั้นจะนำกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์มาวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ พบว่ามีแป้งอยู่ร้อยละ 18.95 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.03 น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.95 โปรตีนร้อยละ 2.45 ของน้ำหนักแห้ง และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 7.10

ผลการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทและมีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในสูตรอาหาร เติมสารละลายเกลือแร่ 0.5 มิลลิลิตร และปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ร้อยละ70 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 186.37 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 พบว่าเมื่อใช้กากมันสำปะหลังที่ไม่ได้คัดขนาดเป็นสับสเตรท เติมปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เติมยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นร้อยละ 60 ไม่เติมแหล่งคาร์บอน ใช้อัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ต่อสับสเตรทเป็น 1.0 : 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลัง) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* CBS 6310 พบว่ามีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นไปพร้อมๆกับการเจริญของเชื้อ และจะผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่ คือในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 185.49 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และมีจำนวนเซลล์ของเชื้อเท่ากับ $2.49 \times 10^{10}$ เซลล์

ในการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า crude enzyme มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 39.27 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 45.65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.16 เท่า จากนั้นนำสารละลายตะกอนของเอนไซม์ที่ตกตะกอนในความเข้มข้นร้อยละ 40 มาผ่านการทำอัลตร้าฟิวเตรชันด้วย ultrafiltration membrane cut off 30,000 ดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 51.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.3 เท่า และจากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 3.5-5.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความคงตัวของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยนี้ในการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น คอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีแบบเจลฟิวเตรชัน คอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน ตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE การทำอัลตร้าฟิวเตรชัน เป็นต้น การจะเลือกใช้วิธีใดขึ้นกับความเหมาะสมของเอนไซม์และผู้วิจัย และควรจะเลือกใช้มากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อช่วยในการตรวจสอบ แต่ทั้งนี้ไม่ว่าจะใช้วิธีใดๆ ควรจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลา เพื่อป้องกันการเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์ เพราะเอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งจะเสียสภาพได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงขึ้น และในงานวิจัยนี้ใช้วิธีอัลตร้าฟิวเตรชันในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งการควบคุมอุณหภูมิทำได้ยากทำให้เอนไซม์เสียสภาพไปมาก จึงมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดต่ำลงมาก และจากงานวิจัยนี้เป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งอาจจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งต้องมีการค้นคว้าวิจัยต่อไป และนอกจากนี้ควรศึกษาการนำเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้ไปทดลองใช้ประโยชน์ เพื่อจะได้ทราบถึงประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้ว่าสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมเทียบเท่ากับเอนไซม์ที่ผลิตทางการค้าได้หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม


กล้าณรงค์ ศรีรอตและเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. **เทคโนโลยีของแป้ง**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 292 หน้า.

เจริญศักดิ์ โรจน์ฤทธิ์พิเชษฐ์. 2532. **มันสำปะหลัง การปลูก อุตสาหกรรมแปรรูป และการใช้ประโยชน์**. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์**. สำนักพิมพ์ โอ. เอส พริ้นติ้งเฮ้า, กรุงเทพฯ.

บุษบา ยงสมิทธิ์. 2540. **จุลินทรีย์และสารสี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เบญจพร บัวบาน. 2542. การผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp.. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอ็นไซม์ทางอาหาร**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

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

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. 2539. รายงานประจำปี 2539.

สมใจ ศิริโภค. 2544. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. บริษัทพิมพ์ดี จำกัด, กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2545. **ส่งเสริมเทคโนโลยี : เอนไซม์ทางอุตสาหกรรม**. ปีที่ 28. ฉบับที่ 161 : 91-92.

สุนีย์ โชตินีรนาท. 2539. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์และอัลทราฟิวเทรชัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาวดี ดิสโร. 2543. การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมในเครื่องปฏิกรณ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติและมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. 2540. **การจัดการน้ำในโรงงานแป้งมันสำปะหลัง, การประชุมวิชาการแห่งชาติเรื่องเทคโนโลยีกับการพัฒนาอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง, กรุงเทพฯ.**

A.O.A.C. 1975. **Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

A.O.A.C. 1980. **Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists.** 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A.O.A.C. 1990. **Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists**. 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Alazard, D. 1980. Scale-up studies on continuous production of alcohol using cassava. Regional Research Laboratory (CSIR) Trivandrum, India. 60 p.

Barber, S. and Benedito, D.B. 1980. Rice Bran : Chemistry and Technology. In Luh, B. S., "Rice : Production and Utilization." Connecticut, The AVI Publishing Company. 790-862.

Barker, S.A. and Fleetwood, J.A. 1975. "Studies on *Aspergillus niger* Part VIII. The purification of glucoamylase". **Journal of the American Chemical Society.** 4857-4864.

Bertolin, T.E. *et.al.* 2003. "Influence of carbon, nitrogen and phosphorus on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation". **Bioscience**. 58(9-10) : 708-712.

Beynum, van G.M.A. and Roels, J.A. 1985. **Starch Conversion Technology**. Marcel Dekker, Inc., New York. 326 p.

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

Chojecki, A. and Blaschek, P. 1986. "Effect of carbohydrate source on alpha-amylase and glucoamylase formation by *Clostridium acetobutylicum* SA-1". **Journal of Industial Microbiology**. 1 : 63-67.

De Mot, R. and Verachtert, H. 1985. "Purification and characterization of extracellular amylolytic enzyme from the yeast *Filobasidium capsuligenum*". **Applied Environmental and Microbiology**. 50 : 1474-1482.

De Mot, R. 1990. Conversion of starch by yeasts. *In* H. Verachtert and R. De Mot (eds.). **Yeast : Biotechnology and Biocatalyst**. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. 163-222.

Dobois, M. *et.al.* 1956. "Colorimetric method for determination of sugar and related substance". **Analytical Chemistry**. 28 : 350-356.

Ellaiah, P. *et.al.* 2002. "Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species". **Process Biochemistry**. 38 : 615-620.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Estrela, A. I., M. Lemos and Martins, S. 1982. "A note on the effect of growth temperature on the production of amylase by the yeast *Lipomyces kononenkoae*". **Journal of Applied Bacteriology**. 52 : 465-467.

Feniksova, R. V. 1957. "Physiology and nutritional of *Aspergillus oryzae* in relation to the fermentation of active amylase by this fungus". **Proc. Int. Sym. Enzyme. Chem**. 2 : 248-485.

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.

Futatsugi, M., T. Ogawa and H, Fukuda. 1993a. "Scale-up glucoamylase production by *Saccharomycopsis fibuligera*". **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 76(5) : 419-422.

_____. 1993b. "Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera*". **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 76(6) : 521-523.

Gogoi, B.K.,Bezbaruah, R.L., Pillai, K.R. and Baruah, J.N. 1987. "Production, purification and characterization of an α-amylase produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. **Journal of Applied Bacteriology.** 63 : 373-379.

Hang, Y.D. and Woodams, E.E. 1993. "Themophilic glucoamylase from *Talaromyces flavus*". **Letter and Applied Microbiology**. 17 : 156-157.

Hyun, H.H. and Zeikus, J.G. 1985. "General biochemical characterization of themostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*". **Applied Environmental Microbiology.** 49 (5) : 1168-1173.

Kato, K.K., Kuswanto, I.,Banno and Harada, T. 1976. "Identification of *Endomycopsis fibuligera* isolated from ragi in Indonesia and properties and its crystalline glucoamylase". **Journal of Fermentation Technology.** 54(2) : 831-837.

Klanarong, S. *et. al.* 2000. "Processing of cassava waste for improved biomass utilization". **Bioresource Technology**. 71 : 63-69.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. "Protein measurement with the Folin-ciocaiteu' s phenol reagent". **Journal Biology and Chemistry**. 193 : 265-275.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Manjunath, P., Shenoy, B.C. and Zao, M.R. 1983. "Review : Fungal gucoamylase." **Journal Applied Biochemistry**. 5 : 235-260.

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

Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". **Analytical chemistry**. 31 : 426-428.

Molony, A.P., O'Rorke, A., Considine, P.J. and Coughlan, M.P. 1984. "Enzymatic saccharification of sugae beet pulp". **Journal of Biotechnology and Bioengineering**. 26 : 714-718.

Nelson, N. 1944. "Photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose". **Journal Biochemistry**. 153 : 375-380.

Pandey, A. 1990. "Improvements in solid state fermentation for glucoamylase production". **Biological Wastes**. 34 : 11-19.

————. 1991. "Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation". **Bioresource Technology**. 37 : 169-172.

————. 1992a. "Production of starch saccharifying enzyme (glucoamylase) in solid cultures". **Starch/Starke**. 44 : 75-77.

————. 1992b. "Recent process developments in solid-state fermentation". **Process Biochemistry**. 27 : 109-117.

————. 1995. "Glucoamylase research : and overview". **Starch/Starke**. 47 : 439-445.

Pandey, A. and Radhakrishnan, S. 1993. "The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCIM 1245". **Biochemistry**. 28 : 305-309.

Pazur, J. H. *et. al.* 1990. "Comparison of the properties of glucoamylase from *Rhizopus niveus* and *Aspergillus niger*". **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 12 : 63-78.

Potato raw. 2003. [online]. http://www.doggieconnection.com

Ramadas, M., Holst, O. and Mattiasson, B. 1996. "Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regiment". **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 12 : 267-271.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saha, B.C. and Ueda, S. 1979. "Raw starch adsorption , elution and digestion behavior of glucoamylase of *Rhizopus niveus*". **Journal of Fermentation Technology.** 61(1) : 67-72.

Sanhu, D.K., Vilkhu, K.S. and Soni, S.K. 1987. "Production of α-amylase by *Saccharomycopsis fibuligera*" . **Journal of Fermentation Technology.** 65(4) : 387-394.

Schrickh, M.J., Krave, S.A. and Verdose, C.J. 1993. "Growth and product formation in chemostat and recycling cultures by *Aspergillus niger* N402 and glucoamylase overproducing transformant, provided with multiple copies of the *gla* A gene." **Journal of General Microbiology**. 139 : 2801-2810.

Selvakumar, P., Ashakumary, L. and Pandey, A. 1996. "Microbial synthesis of starch saccharifying enzyme in solid cultures". **Journal of Scientific and Industrial Research**. 55 : 443-449.

_____. 1998. "Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate". **Bioresource Technology**. 65 : 83-85.

Soni, S.K. *et.al.* 1996. "Extracellular amylase production by *Saccahromycopsis capsularis* and its evaluation for starch saccharification". **Folia Microbiology**. 41(3) : 243-248.

Stamford, T. L. M. *et. al.* 2002. "Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. Endophyte of maize leaves". **Bioresource Technology**. 83 : 105-109.

Stanbury, P.F. and Whitaker. 1984. **Principle of Fermentation Technology**. Pergamon Press, Oxford. 215 p.

Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. **Buffer : principles and practice**. *In* Method in Enzymology Vol. 182. Academic Press, New York. Pp. 24-38.

Sukara, E. and Doelle, H. W. 1989. "A one-step process for the production of single-cell protein and amyloglucosidase." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 30 : 135-140.

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

United Nation. 1985. **The storage of rice bran.** "In rice Bran : an under utilized raw material." Vienna, United Nation Industrial Development Organization. 216-251.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vallee, B. L. *et.al.* 1959. "Metal content of α-amylase of various origins". **Journal Biology and Chemistry**. 231 : 2901-2905.

Yadav, J. S. 1988. "SSF of wheat straw with *alcaliphilic coprinus*". **Journal of Biotechnology and Bioengineering**. 34 : 414-417.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

## 1.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

**1.1 อาหารเหลว yeast extract-malt extract broth (YM broth)** ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| ยีสต์สกัด (yeast extract) | 3 | กรัม |
| มอลล์สกัด (malt extract) | 3 | กรัม |
| เปปโตน (peptone) | 5 | กรัม |
| กลูโคส (glucose) | 10 | กรัม |

**วิธีการ**

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**1.2 อาหารแข็ง yeast extract-malt extract agar (YM agar)** ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| ยีสต์สกัด (yeast extract) | 3 | กรัม |
| มอลล์สกัด (malt extract) | 3 | กรัม |
| เปปโตน (peptone) | 5 | กรัม |
| กลูโคส (glucose) | 10 | กรัม |
| วุ้น (agar) | 20 | กรัม |

**วิธีการ**

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้นึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. สารเคมี

**2.1 สารละลายเกลือแร่** (Futatsugi *et.al.*, 1993a)

| | |
|---|---|
| โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) | 0.50 กรัม |
| โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) | 1.00 กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) | 0.05 กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.05 กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 4.00 กรัม |

**วิธีการ**

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา

**2.2 สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดอะซิเตรตบัฟเฟอร์ (acitrate buffer)** (Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : โซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (โดยชั่งโซเดียมอะซิเตรต 82 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : กรดอะซิติก (acitic acid) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

| สารละลาย A (มิลลิลิตร) | สารละลาย B (มิลลิลิตร) | พีเอช |
|---|---|---|
| 50 | 43 | 3.0 |
| 50 | 38 | 3.5 |
| 50 | 30 | 4.0 |
| 50 | 25 | 4.5 |
| 50 | 10 | 5.0 |
| 50 | 8 | 5.5 |

**2.3 สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer)**

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : โซเดียมซิเตรต ($C_6H_5O_7Na_3$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (โดยชั่งโซเดียมซิเตรต 5.88 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (โดยชั่ง กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.72 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.4 สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)**

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (โดยชั่งไดโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

# วิธีวิเคราะห์

**1. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น** (A.O.A.C., 1990)

**วัสดุอุปกรณ์**

1.กระทงอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น

2.ตู้อบความร้อน (hot air oven)

3.โถดูดความชื้น (desicator)

4.เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

5.คีมจับ (forceps)

**วิธีวิเคราะห์**

1. อบกระทงอะลูมิเนียมในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระทงออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิของกระทงเย็นลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง และไม่ควรปล่อยให้กระทงอยู่ในโถดูดความชื้นนานเกิน 2 ถึง 3 ชั่วโมง

2. ชั่งน้ำหนักกระทง (W1) จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่แน่นอน โดยมีผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม จดบันทึกไว้

3. ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่กระทงที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (W2) ประมาณ 1 ถึง 2 กรัม เขย่ากระทงเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างแผ่กระจายทั่วกระทง แล้วนำไปอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

4. นำกระทงตัวอย่างออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิเย็นลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

5. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการอบแล้วพร้อมกระทง (W3) จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่แน่นอน โดยมีผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม จดบันทึกไว้

**6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร**

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{W2-W3}{W2-W1} \times 100$$

**เมื่อ W1 หมายถึง น้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียม (กรัม)**

**W2 หมายถึง ผลรวมของน้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียมและน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)**

**W3 หมายถึง ผลรวมของน้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียมและน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส** (Ramadas *et.al.*, 1996)

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (ค.ศ. 1959)

**สารเคมี**

1. สารละลายน้ำแป้งเตรียมโดยละลายแป้ง (soluble starch) น้ำหนัก 1 กรัมลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดแล้วทำให้เย็น

2. โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0

3. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) เตรียมโดยละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 2 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ฟีนอล 2 กรัม โพแทสเซียมโซเดียม ทาร์เตรท 200 กรัมและโซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัมลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร

**การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน**

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองโดยเติมสารละลาย น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

**การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส**

เติมสารละลายน้ำแป้งเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ในการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในหน่วยเป็นยูนิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**กิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะการผลิตแบบอาหารเหลว มีหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร**

$$= \frac{\text{ไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากปฏิกิริยา}}{\text{ระยะเวลาในการบ่ม x ปริมาตรเอนไซม์}}$$

**กิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะการผลิตแบบอาหารแข็ง มีหน่วยยูนิตต่อกรัมสับสเตรท**

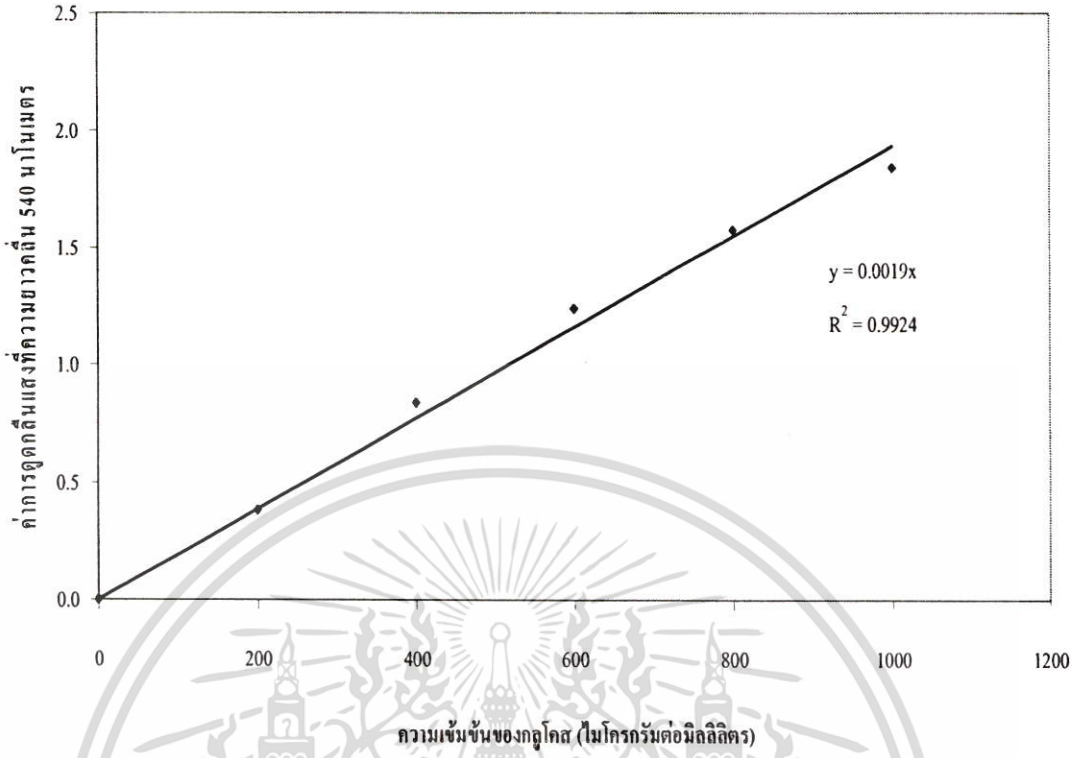
$$= \frac{\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร}_x \text{ (ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด+ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการปรับความชื้น )}}{\text{น้ำหนักของสับสเตรท}}$$

โดยกำหนด 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะการทดลอง

**การคำนวณหาปริมาตรน้ำที่เหลือจากการหมัก**

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมักทุกครั้ง ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ในภาคผนวก ข โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าความชื้น (ร้อยละ) ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความชื้น (ร้อยละ) ของสับสเตรท แล้วคำนวณกลับเป็นปริมาตรของน้ำที่เหลือจากการหมัก โดยการหาปริมาตรของน้ำที่เหลือจากการหมักจะต้องทำควบคู่ไปกับการทดลองทุกครั้งในการหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตลอดงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ข-1** แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. การหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ตามวิธีของ** Lowry *et.al.* (1951)

**สารเคมี**

**สารละลาย ก**

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) จำนวน 2.0 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**สารละลาย ข**

ละลายโพแทสเซียมโซเดียมตาร์เตรท ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$) จำนวน 2.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**สารละลาย ค**

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 .5H_2O$) จำนวน 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**สารละลาย ง**

เติมสารละลาย ข ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย ค ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย ก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที (สารละลายนี้ผสมเมื่อใช้เท่านั้น)

**สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent**

นำสารละลาย Folin-ciocateu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (สารนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

**การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน**

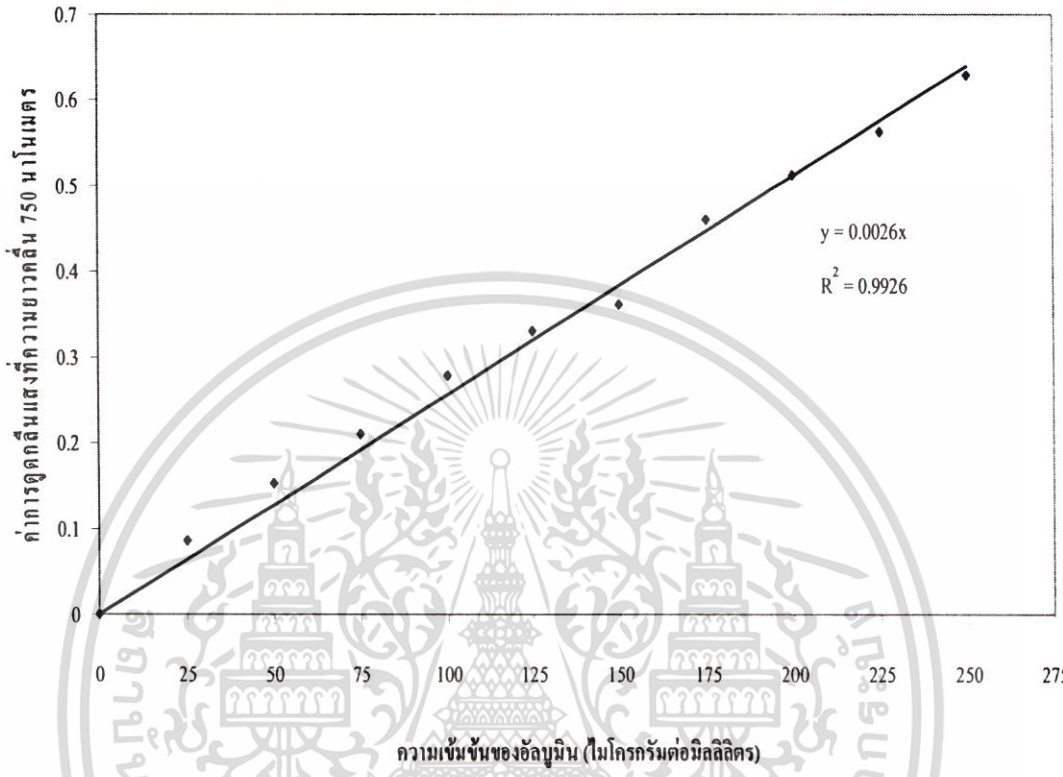
เตรียมโดยใช้ bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลาย bovine serum albumin ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม Folin-ciocateu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง

**วิธีวิเคราะห์**

ใส่สารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน) เติมสารละลาย ง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม Folin-ciocateu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง




**รูปที่ ข-2** แสดงกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

## 4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Kjeldahl Method (A.O.A.C., 1980)

**สารเคมี**

1.ของผสมตัวเร่ง (catalyst mixture) ประกอบด้วย Anhydrous potassium sulfate ($K_2SO_4$) 3.5 กรัม และ Anhydrous copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) 0.4 กรัม โดยน้ำหนัก (เป็นเม็ดสำเร็จรูป)

2. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง methyl red, methylene blue และ bromcresol green

3. กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (conc. $H_2SO_4$)

4. กรดบอริคความเข้มข้นร้อยละ 4 (4% $H_3BO_3$)

5. กรดซัลฟิวริคความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (0.1 N $H_2SO_4$)

6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (40% NaOH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน**

ชั่งตัวอย่างสับสเตรทจำนวน 1.0 กรัม บนกระดาษกรอง แล้วพับกระดาษกรองห่อตัวอย่างใส่ลงในขวดย่อย (เตรียมแบลงค์โดยทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ไม่มีตัวอย่าง) จากนั้นเติมตัวเร่งผสมระหว่างโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต (เป็นเม็ดสำเร็จรูป) ลงไป 1 เม็ด ใส่ glass bead ลงไป 5-10 เม็ด (เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงขณะย่อย) แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 25 มิลลิลิตร ทำการย่อยด้วยเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงทิ้งให้เย็น ถ่ายสารละลายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างขวดย่อยด้วยน้ำกลั่นแล้วเทรวมลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เปิดสวิทซ์เครื่องกลั่น และเปิดก๊อกน้ำที่หล่อเย็นเครื่องควบแน่น แล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว นำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นเป็นเวลา 15 นาที เพื่อกลั่นไล่ก๊าซแอมโมเนีย ($NH_3$) ให้ผ่านคอนเดนเซอร์ นำฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (ซึ่งบรรจุกรดบอริคความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ลงไป 2 หยด) ไปรองรับก๊าซแอมโมเนีย ที่ถูกกลั่นไล่ออกมาทางปลายท่ออีกด้านหนึ่งของคอนเดนเซอร์ เมื่อเครื่องดำเนินการกลั่นเสร็จเรียบร้อยแล้วให้นำสารละลายในฟลาสก์ (ซึ่งมีส่วนผสมระหว่างกรดบอริคและแอมโมเนีย) ไปไตเตรทกับกรดซัลฟิวริคความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดสิ้นสุดจะได้สารละลายเป็นสีม่วงอ่อน จากนั้นนำค่าปริมาตรของกรดซัลฟิวริคที่ใช้จริงไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนตามสูตรการคำนวณดังนี้

**สูตรที่ใช้ในการคำนวณ**

$$\text{โปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{1.40 \times (A-B) \times N \times F^{*}}{W}$$

A = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการไตเตรท (นอร์มอล)

$F^{*}$ = ค่าโปรตีนแฟคเตอร์

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

**หมายเหตุ** ค่าโปรตีนแฟคเตอร์ที่นิยมใช้กันมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์หาโปรตีนในอาหาร คือ $6.25^{*}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (A.O.A.C., 1975)

**สารเคมี**

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

**วิธีวิเคราะห์ปริมาณแป้ง**

นำตัวอย่างสับสเตรทที่ผ่านการอบแห้งแล้วใส่ในกระทงอะลูมิเนียมแล้วนำมาอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไว้ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งตัวอย่างจำนวน 0.5 กรัมใส่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 19.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารผสมตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

ปริมาณแป้ง (กรัม) = 0.9 x ปริมาณกลูโคส

## 6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

**สารเคมี**

1. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)
2. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($COOK(CHOH_2)COONa.4H_2O$)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
4. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)
5. ไดโซเดียมซัลเฟต ($Na_2SO_4$)
6. แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)
7. กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (Conc. $H_2SO_4$)

**การเตรียม copper reagent**

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 71 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาเทรต จำนวน 40 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร (คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 8 กรัมละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน เติมไดโซเดียมซัลเฟต จำนวน 180 กรัม ลงไปแล้วคนให้ละลายเข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง

**การเตรียม Nelson reagent**

ละลายเกลือแอมโมเนียมโมลิบเดท จำนวน 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ลงไปคนให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออก

**การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน**

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองโดยเติมสารละลาย น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

**การเตรียมตัวอย่าง**

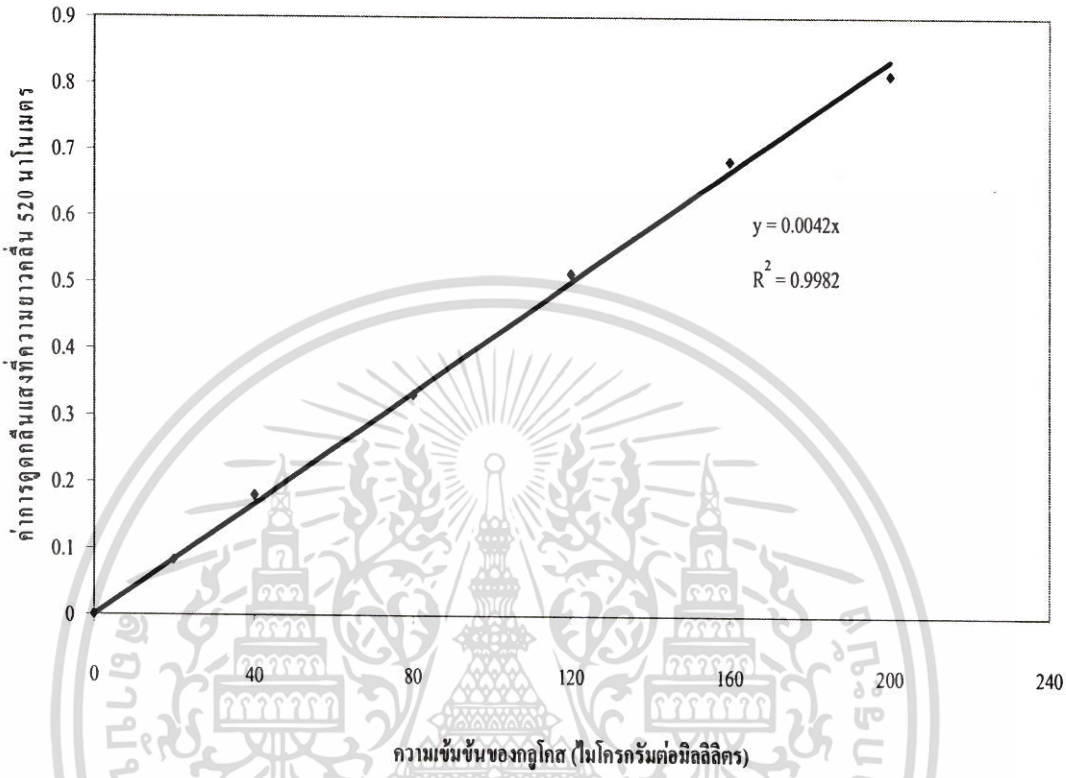
นำสับสเตรทที่ผ่านการอบแห้งแล้วใส่ในกระทงอะลูมิเนียม แล้วนำมาอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไว้ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัมใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยเขย่าสารสกัดทุกๆ 30 นาทีกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 541 จากนั้นดูดสารสกัดปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

**วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์**

ดูดสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม copper reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มให้เดือด เป็นเวลา 10 นาที (ชุดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่าง) ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่น้ำแข็ง จากนั้นเติม Nelson reagent ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.0 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับค่าจากกราฟกลูโคสมาตรฐาน




**รูปที่ ข-3** แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

## 7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามวิธี Phenol-sulphuric (Dubois *et.al.*, 1956)

**สารเคมี**

สารละลายฟีนอล ($C_2H_5OH$) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (conc. $H_2SO_4$)

**การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส**

เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายกลูโคสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สารละลายตัวอย่างเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงดังรูปที่ ข-4

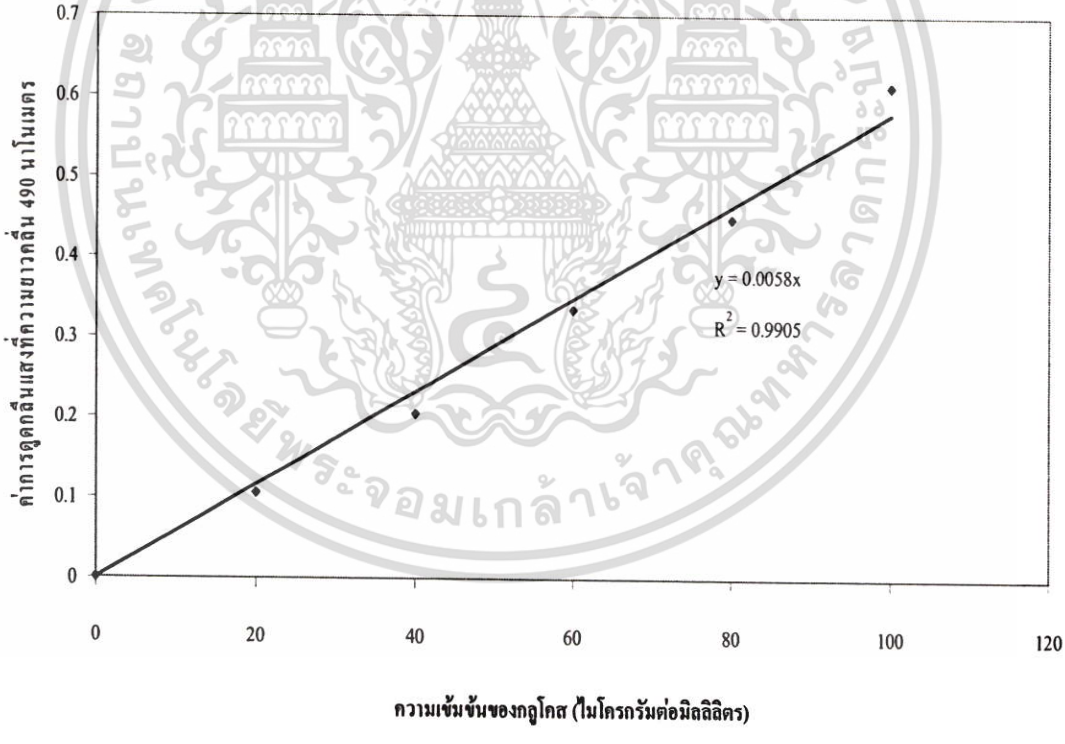
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเตรียมตัวอย่าง**

นำตัวอย่างสับสเตรทจำนวน 10 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยเขย่าสารสกัดทุกๆ 30 นาที กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 541 จากนั้นดูดสารสกัดปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

**วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด**

ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน) เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าสารผสมตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่ออีกเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐานกลูโคส




**รูปที่ ข-4** แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ข-1** แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน

| ความเข้มข้นเริ่มต้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0°C | ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0°C) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 |
| | กรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร | | | | | | | | | | | |
| 0 | 10.7 | 16.6 | 21.9 | 29.5 | 36.6 | 44.2 | 48.3 | 52.3 | 56.7 | 61.1 | 65.9 | 70.7 |
| 10 | 5.4 | 11.1 | 17.1 | 23.6 | 30.5 | 37.9 | 41.8 | 45.8 | 50.0 | 54.4 | 58.9 | 63.6 |
| 20 | 0 | 5.6 | 11.5 | 17.7 | 24.4 | 31.6 | 35.4 | 39.2 | 43.3 | 47.5 | 51.9 | 56.5 |
| 30 | | 0 | 5.7 | 11.9 | 18.4 | 25.3 | 28.9 | 32.8 | 36.7 | 40.8 | 45.1 | 49.5 |
| 40 | | | 0 | 5.9 | 12.2 | 19.0 | 22.5 | 26.2 | 30.0 | 34.0 | 38.1 | 42.4 |
| 50 | | | | 0 | 6.1 | 12.7 | 16.1 | 19.7 | 23.3 | 27.2 | 31.2 | 35.3 |
| 60 | | | | | 0 | 6.3 | 9.6 | 13.1 | 16.6 | 20.4 | 24.2 | 28.3 |
| 70 | | | | | | 0 | 3.2 | 6.6 | 10.0 | 13.6 | 17.3 | 21.2 |
| 75 | | | | | | | 0 | 3.2 | 6.7 | 10.2 | 13.9 | 17.6 |
| 80 | | | | | | | | 0 | 3.3 | 6.8 | 10.4 | 14.1 |
| 85 | | | | | | | | | 0 | 3.4 | 6.9 | 10.6 |
| 90 | | | | | | | | | | 0 | 3.4 | 7.1 |
| 95 | | | | | | | | | | | 0 | 3.5 |
| 100 | | | | | | | | | | | | 0 |

**ที่มา :** Chambers and Rickwood (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค

# ข้อมูล

**ตารางที่ ค-1** แสดงผลของปริมาณความชื้น (ร้อยละ) ของเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งตามวิธีของ A.O.A.C. (1990)

| อัตราส่วนของเศษเหลือทิ้งมันฝรั่งต่อปริมาตรน้ำกลั่น (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) | ความชื้น (ร้อยละ) |
|---|---|
| 1:0.0 | 10.49 |
| 1:0.5 | 36.91 |
| 1:1.0 | 53.44 |
| 1:1.5 | 63.96 |
| 1:2.0 | 72.64 |
| 1:2.5 | 73.52 |
| 1:3.0 | 73.87 |
| 1:3.5 | 76.43 |
| 1:4.0 | 82.58 |
| 1:4.5 | 85.69 |
| 1:5.0 | 86.24 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-2** แสดงผลของปริมาณความชื้น (ร้อยละ) ของกากมันสำปะหลังตามวิธีของ A.O.A.C. (1990)

| อัตราส่วนของกากมันสำปะหลังต่อปริมาตรน้ำกลั่น (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) | ความชื้น (ร้อยละ) |
|---|---|
| 1:0.0 | 7.10 |
| 1:0.5 | 34.13 |
| 1:1.0 | 52.93 |
| 1:1.5 | 62.45 |
| 1:2.0 | 68.52 |
| 1:2.5 | 73.04 |
| 1:3.0 | 77.52 |
| 1:3.5 | 78.65 |
| 1:4.0 | 81.25 |
| 1:4.5 | 82.77 |
| 1:5.0 | 84.04 |
| 1:5.5 | 85.30 |
| 1:6.0 | 86.75 |
| 1:6.5 | 87.10 |
| 1:7.0 | 88.52 |
| 1:7.5 | 89.48 |
| 1:8.0 | 90.04 |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-3** แสดงผลของปริมาณความชื้น (ร้อยละ) ของรำข้าว ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990)

| อัตราส่วนของรำข้าวต่อปริมาตรน้ำกลั่น (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) | ความชื้น (ร้อยละ) |
|---|---|
| 1:0.0 | 14.97 |
| 1:0.5 | 39.41 |
| 1:1.0 | 48.61 |
| 1:1.5 | 62.03 |
| 1:2.0 | 70.45 |
| 1:2.5 | 75.12 |
| 1:3.0 | 76.38 |
| 1:3.5 | 79.76 |
| 1:4.0 | 81.48 |
| 1:4.5 | 81.85 |
| 1:5.0 | 84.88 |

**ตารางที่ ค-4** แสดงผลการเปรียบเทียบชนิดของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| ชนิดของสับสเตรท | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง | กากมันสำปะหลัง | รำข้าว | แป้งที่ละลายได้ |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | |
| 24 | 41.23 | 57.30 | 47.16 | 49.51 |
| 48 | 85.35 | 106.80 | 94.71 | 102.26 |
| 72 | 105.01 | 122.65 | 103.24 | 116.71 |
| 96 | 128.08 | 179.32 | 119.36 | 140.45 |
| 120 | 85.69 | 143.27 | 108.74 | 136.78 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-5** แสดงผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| สูตรอาหาร | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | สูตรที่ 1 | สูตรที่ 2 | สูตรที่ 3 | สูตรที่ 4 | สูตรที่ 5 |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
| 24 | 36.02 | 45.47 | 44.05 | 45.54 | 46.51 |
| 48 | 65.41 | 122.95 | 121.22 | 131.10 | 138.39 |
| 72 | 116.56 | 148.33 | 146.85 | 152.92 | 167.71 |
| 96 | 138.05 | 169.70 | 170.82 | 173.11 | 186.37 |
| 120 | 127.74 | 169.47 | 153.18 | 166.94 | 180.82 |

**ตารางที่ ค-6** แสดงผลของปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| หัวเชื้อเริ่มต้น (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ร้อยละ 5 | ร้อยละ 10 | ร้อยละ 15 | ร้อยละ 20 | ร้อยละ 25 |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
| 24 | 41.01 | 44.48 | 46.67 | 46.56 | 47.32 |
| 48 | 123.62 | 126.09 | 113.86 | 117.66 | 115.09 |
| 72 | 150.90 | 153.81 | 148.89 | 147.25 | 138.07 |
| 96 | 168.28 | 180.35 | 174.92 | 160.53 | 155.05 |
| 120 | 159.26 | 160.53 | 141.79 | 138.84 | 121.37 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-7** แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| แหล่งไนโตรเจน | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | แอมโมเนียมซัลเฟต | แอมโมเนียมคลอไรด์ | แอมโมเนียมไนเตรต | ยูเรีย | เปปโตน | สารสกัดจากยีสต์ | ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | |
| 24 | 43.87 | 42.42 | 40.92 | 40.44 | 40.68 | 39.22 | 40.48 |
| 48 | 109.43 | 92.54 | 105.44 | 109.66 | 96.28 | 81.83 | 101.58 |
| 72 | 123.70 | 112.14 | 135.03 | 136.49 | 109.88 | 110.18 | 111.06 |
| 96 | 156.04 | 150.88 | 151.37 | 187.58 | 124.77 | 130.74 | 144.01 |
| 120 | 147.58 | 145.83 | 143.93 | 174.88 | 116.21 | 123.93 | 134.32 |

**ตารางที่ ค-8** แสดงผลความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| ความเข้มข้นของยูเรีย (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ร้อยละ 0.05 | ร้อยละ 0.1 | ร้อยละ 0.15 | ร้อยละ 0.2 | ร้อยละ 0.3 |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
| 24 | 43.64 | 41.02 | 41.37 | 41.49 | 43.59 |
| 48 | 114.29 | 119.51 | 121.08 | 119.06 | 111.48 |
| 72 | 160.01 | 166.89 | 167.25 | 159.79 | 159.04 |
| 96 | 177.21 | 175.47 | 182.04 | 164.89 | 161.58 |
| 120 | 164.07 | 166.77 | 163.97 | 161.78 | 158.30 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-9** แสดงผลความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| ความชื้นเริ่มต้น | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ร้อยละ 50 | ร้อยละ 60 | ร้อยละ 70 | ร้อยละ 80 | ร้อยละ 90 |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
| 24 | 38.06 | 41.73 | 42.49 | 22.72 | 12.75 |
| 48 | 95.34 | 125.59 | 114.82 | 46.78 | 33.29 |
| 72 | 140.24 | 171.96 | 168.32 | 91.25 | 47.29 |
| 96 | 147.73 | 186.89 | 181.93 | 98.93 | 68.17 |
| 120 | 132.86 | 175.64 | 169.98 | 83.90 | 61.79 |

**ตารางที่ ค-10** แสดงผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| แหล่งคาร์บอน | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ไม่เติมแหล่งคาร์บอน | กลูโคส ร้อยละ 0.1 | ซูโครส ร้อยละ 0.1 | แป้งที่ละลายได้ ร้อยละ 0.1 | ฟรุกโทส ร้อยละ 0.1 |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
| 24 | 42.92 | 42.71 | 42.65 | 42.31 | 42.21 |
| 48 | 137.32 | 142.88 | 135.11 | 132.26 | 127.94 |
| 72 | 180.22 | 182.89 | 153.26 | 178.54 | 168.09 |
| 96 | 205.48 | 199.71 | 198.57 | 207.79 | 182.55 |
| 120 | 204.05 | 196.56 | 190.27 | 197.63 | 181.14 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-11** แสดงผลของขนาดของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะ-ไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| ขนาดอนุภาค (ไมโครเมตร) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | เล็กกว่าหรือเท่ากับ 80 | 81-500 | 501-850 | 851-1700 | ไม่คัดขนาด |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
| 24 | 37.82 | 37.74 | 37.44 | 36.48 | 37.27 |
| 48 | 125.09 | 131.60 | 122.61 | 105.57 | 120.69 |
| 72 | 164.07 | 164.41 | 161.05 | 129.97 | 159.72 |
| 96 | 179.19 | 189.25 | 187.03 | 150.90 | 184.97 |
| 120 | 168.07 | 175.24 | 167.40 | 149.63 | 172.12 |

**ตารางที่ ค-12** แสดงผลของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| อัตราส่วน (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1.0:10 | 1.5:10 | 2.0:10 | 2.5:10 | 3.0:10 |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
| 24 | 46.51 | 46.40 | 45.90 | 45.98 | 45.47 |
| 48 | 115.46 | 120.73 | 113.99 | 115.44 | 114.77 |
| 72 | 142.23 | 143.53 | 135.96 | 136.33 | 132.70 |
| 96 | 187.06 | 188.51 | 186.54 | 188.09 | 187.46 |
| 120 | 152.02 | 155.77 | 148.25 | 162.98 | 151.98 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-13** แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอไมเลสโดย เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 50 |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | |
| 24 | 5.03 | 32.16 | 37.27 | 32.09 | 26.81 | 1.40 |
| 48 | 8.61 | 97.75 | 116.77 | 88.44 | 67.21 | 5.72 |
| 72 | 13.18 | 115.37 | 145.23 | 109.61 | 72.57 | 6.61 |
| 96 | 15.26 | 144.30 | 186.91 | 130.33 | 78.87 | 7.18 |
| 120 | 16.76 | 145.7 | 176.17 | 130.78 | 81.97 | 6.70 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-14** แสดงผลของเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| เกลืออนินทรีย์ | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ไม่เติม | แคลเซียมคลอไรด์ | แมกนีเซียมซัลเฟต | โซเดียมคลอไรด์ | แคลเซียมคลอไรด์+ แมกนีเซียมซัลเฟต | แคลเซียมคลอไรด์+ โซเดียมคลอไรด์ | แมกนีเซียมซัลเฟต+ โซเดียมคลอไรด์ | แคลเซียมคลอไรด์+ แมกนีเซียมซัลเฟต+ โซเดียมคลอไรด์ |
| เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | | |
| 24 | 23.57 | 37.73 | 37.68 | 37.85 | 37.67 | 37.74 | 37.73 | 37.59 |
| 48 | 121.56 | 123.88 | 124.15 | 123.35 | 122.42 | 122.22 | 123.29 | 120.83 |
| 72 | 160.29 | 162.68 | 163.18 | 161.49 | 161.79 | 161.79 | 161.69 | 162.78 |
| 96 | 183.79 | 184.17 | 183.55 | 184.10 | 184.80 | 182.62 | 183.63 | 183.63 |
| 120 | 170.57 | 172.69 | 172.43 | 173.89 | 172.76 | 170.43 | 173.16 | 170.50 |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ตารางที่ ค-15** แสดงผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310

| เวลา (ชั่วโมง) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | จำนวนเซลล์ x $10^{10}$ |
|---|---|---|
| 24 | 32.35 | 1.05 |
| 48 | 91.87 | 1.90 |
| 72 | 141.72 | 2.36 |
| 96 | 185.49 | 2.59 |
| 120 | 178.86 | 2.53 |

**ตารางที่ ค-16** แสดงผลการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ

| ขั้นตอน | กิจกรรมทั้งหมด (หน่วย) | โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | กิจกรรมจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) | ความบริสุทธิ์ (เท่า) | ผลผลิต (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|
| **เอนไซม์สกัด** | 6245.61 | 159.04 | 39.27 | 1.0 | 100 |
| **ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ** | | | | | |
| **0-30** | 67.76 | 2.62 | 25.91 | 0.66 | 1.08 |
| **30-50** | 71.40 | 1.65 | 43.25 | 1.10 | 1.14 |
| **50-70** | 52.40 | 1.38 | 37.99 | 0.97 | 0.84 |
| **70-90** | 13.20 | 0.57 | 23.16 | 0.59 | 0.21 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-17** แสดงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

| พีเอช | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) |
|---|---|---|
| 3.0 | 0.69 | 80.08 |
| 3.5 | 0.82 | 94.92 |
| 4.0 | 0.83 | 95.76 |
| 4.5 | 0.85 | 98.31 |
| 5.0 | 0.86 | 100.00 |
| 5.5 | 0.81 | 94.07 |
| 6.0 | 0.47 | 54.24 |
| 6.5 | 0.43 | 50.00 |
| 7.0 | 0.43 | 49.58 |
| 7.5 | 0.38 | 44.49 |
| 8.0 | 0.34 | 39.83 |

**ตารางที่ ค-18** แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) |
|---|---|---|
| 20 | 1.12 | 83.59 |
| 30 | 1.10 | 81.52 |
| 40 | 1.35 | 100.00 |
| 50 | 0.90 | 66.85 |
| 60 | 0.80 | 59.67 |
| 70 | 0.77 | 57.07 |
| 80 | 0.54 | 39.78 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค-19** แสดงความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger*a CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่พีเอชต่างๆ

| พีเอช | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) |
|---|---|---|
| 3.0 | 0.35 | 46.60 |
| 3.5 | 0.54 | 73.18 |
| 4.0 | 0.55 | 73.87 |
| 4.5 | 0.64 | 86.59 |
| 5.0 | 0.66 | 89.55 |
| 5.5 | 0.70 | 93.89 |
| 6.0 | 0.74 | 100.00 |
| 6.5 | 0.65 | 87.77 |
| 7.0 | 0.70 | 94.48 |
| 7.5 | 0.70 | 94.28 |
| 8.0 | 0.52 | 70.61 |

**ตารางที่ ค-20** แสดงความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuliger*a CBS 6310 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิต่างๆ

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) |
|---|---|---|
| 20 | 0.68 | 100.00 |
| 30 | 0.58 | 84.76 |
| 40 | 0.29 | 41.85 |
| 50 | 0.23 | 34.33 |
| 60 | 0.15 | 22.10 |
| 70 | 0.12 | 18.03 |
| 80 | 0.10 | 14.81 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

# ข้อมูลทางสถิติ

**ตารางที่ ง-1** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ชนิดของสับสเตรท | เศษเหลือทิ้งมันฝรั่ง | กากมันสำปะหลัง | รำข้าวเจ้า | แป้งที่ละลายได้ |
|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $128.08_{b}$ | $179.32_{a}$ | $119.36_{b}$ | $140.46_{b}$ |

**ตารางที่ ง-2** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติขององค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| สูตรอาหาร | สูตรที่ 1 | สูตรที่ 2 | สูตรที่ 3 | สูตรที่ 4 | สูตรที่ 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $138.05_{b}$ | $169.70_{a}$ | $170.82_{a}$ | $173.11_{a}$ | $186.37_{a}$ |

**ตารางที่ ง-3** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) | ร้อยละ 5 | ร้อยละ 10 | ร้อยละ 15 | ร้อยละ 20 | ร้อยละ 25 |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $168.29_{abc}$ | $180.35_{a}$ | $174.93_{ab}$ | $160.53_{bc}$ | $155.05_{c}$ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ง-4** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ชนิดของแหล่งไนโตรเจน | แอมโมเนียมซัลเฟต | แอมโมเนียมคลอไรด์ | แอมโมเนียมไนเตรต | ยูเรีย | เปปโตน | สารสกัดจากยีสต์ | ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $156.03_{b}$ | $150.88_{b}$ | $151.37_{b}$ | $187.58_{a}$ | $124.77_{c}$ | $130.74_{c}$ | $144.00_{b}$ |

**ตารางที่ ง-5** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของยูเรียต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ความเข้มข้นของยูเรีย (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) | ร้อยละ 0.05 | ร้อยละ 0.1 | ร้อยละ 0.15 | ร้อยละ 0.2 | ร้อยละ 0.3 |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $177.21_{ab}$ | $175.47_{b}$ | $182.04_{a}$ | $164.89_{c}$ | $161.58_{c}$ |

**ตารางที่ ง-6** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ปริมาณความชื้นเริ่มต้น | ร้อยละ 50 | ร้อยละ 60 | ร้อยละ 70 | ร้อยละ 80 | ร้อยละ 90 |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $140.24_{b}$ | $186.89_{a}$ | $181.93_{a}$ | $98.94_{c}$ | $68.17_{d}$ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ง-7** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน | ไม่เติมแหล่งคาร์บอน | กลูโคส ร้อยละ 0.1 | ซูโครส ร้อยละ 0.1 | แป้งที่ละลายได้ ร้อยละ 0.1 | ฟรุกโทส ร้อยละ 0.1 |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $205.48_{ab}$ | $199.71_{b}$ | $198.57_{b}$ | $207.79_{a}$ | $182.55_{c}$ |

**ตารางที่ ง-8** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของขนาดอนุภาคของกากมันสำปะหลังต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ขนาดอนุภาคของกากมันสำปะหลัง (ไมโครเมตร) | เล็กกว่าหรือเท่ากับ 80 | 81-500 | 501-850 | 851-1700 | ไม่คัดขนาด |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $179.3_{b}$ | $188.25_{a}$ | $187.03_{a}$ | $150.90_{c}$ | $184.57_{a}$ |

**ตารางที่ ง-9** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอัตราส่วนของสารละลายเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| อัตราส่วน (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) | 1.0:10 | 1.5:10 | 2.0:10 | 2.5:10 | 3.0:10 |
|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $187.06_{ab}$ | $188.51_{a}$ | $186.54_{b}$ | $188.09_{ab}$ | $187.46_{ab}$ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ง-10** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| **อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)** | **20** | **25** | **30** | **35** | **40** | **50** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $15.26_{e}$ | $144.30_{b}$ | $186.91_{a}$ | $130.33_{c}$ | $78.87_{d}$ | $7.27_{e}$ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ง-11** แสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติของชนิดของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* CBS 6310 ณ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก

| ชนิดของเกลืออนินทรีย์ | ไม่เติม | แคลเซียมคลอไรด์ | แมกนีเซียมซัลเฟต | โซเดียมคลอไรด์ | แคลเซียมคลอไรด์+แมกนีเซียมซัลเฟต | แคลเซียมคลอไรด์+โซเดียมคลอไรด์ | แมกนีเซียมซัลเฟต+โซเดียมคลอไรด์ | แคลเซียมคลอไรด์+แมกนีเซียมซัลเฟต+โซเดียมคลอไรด์ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | $183.79_a$ | $184.17_a$ | $183.55_a$ | $184.10_a$ | $184.80_a$ | $182.62_a$ | $183.63_a$ | $183.63_a$ |

**กำหนดให้** ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

**หมายเหตุ** เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan New Multiple-Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

# ประวัติผู้เขียน

นางสาวศุภร เกียรติมานะโรจน์ เกิดเมื่อวันที่ 16 ธันวาคม 2521 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายจากโรงเรียนบุรีรัมย์พิทยาคม สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้