บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. <u>การแยกและคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้สูง</u>

จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 17 ตัวอย่าง และ ลูกแป้งสุรา 11 ตัวอย่าง ซึ่งได้มาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศ เมื่อนำมาแยกเชื้อแล้วพบเชื้ออะไมโลไมซีสในลูกแป้ง 18 ตัวอย่าง โดยพบในลูกแป้งข้าวหมาก 13 ตัวอย่าง และ ลูกแป้งสุรา 5 ตัวอย่าง จีนัสอะไมโลไมซีสนี้เป็นราสายใยที่พบมากที่สุดในลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pichyangkura and Kulprecha (1980) จากการคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสโดยวิธีการดิสค์คัลเจอร์ (รูปที่ 4) พบว่า อะไมโลไมซีสทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้ อย่างไรก็ตาม แอคติวิตีต่อแป้งดิบของเชื้ออะไมโล-ไมซีสนี้จะแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 ในขั้นต้นนี้ เชื้ออะไมโลไมซีสหมายเลข 1, 5, 14, 16, 17 และ 18 มีแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบสูงและ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ปรากฏว่า เชื้อหมายเลข 16 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งสุรา จังหวัด-ชัยภูมิ มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบสูงกว่าเชื้อหมายเลขอื่น ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้น จึงเลือกเชื้อสายพันธุ์นี้ไว้ศึกษาต่อไป

2. <u>สภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ</u>

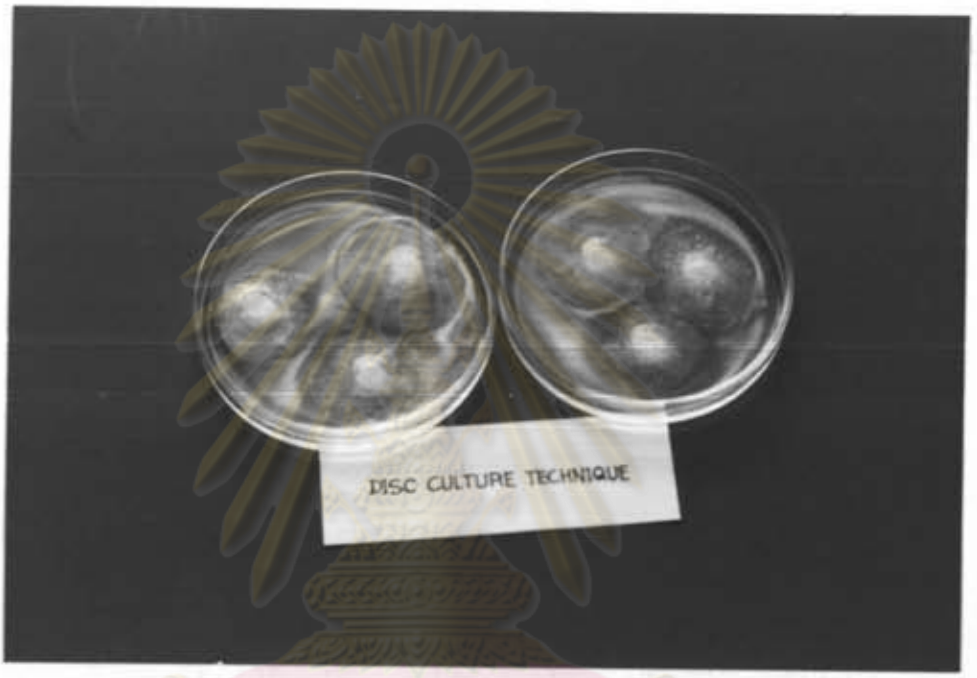
2.1 <u>ขนาดของรำข้าว</u> จากการเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งซึ่งได้ทดลองตามที่กล่าวไว้แล้วในบทที่ 2 หัวข้อ 7.1 เพื่อเปรียบเทียบขนาดของรำข้าว พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ในการย่อยแป้งดิบเมื่อเลี้ยงเชื้อบนรำทั้งสองชนิด เป็นดังนี้

แอคติวิตีกับแป้งดิบเมื่อเลี้ยงเชื้อบนรำหยาบ = 38 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แอคติวิตีกับแป้งดิบเมื่อเลี้ยงเชื้อบนรำละเอียด = 7 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แอคติวิตีของเอนไซม์ต่อแป้งดิบขณะเมื่อเลี้ยงเชื้อบนรำหยาบนั้นสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงการคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสโดยวิธีดิสค์คัลเจอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีส เมื่อคัดเลือกในขั้นต้นด้วยวิธีการดิสค์คัลเจอร์

เชื้ออะไมโลไมซีส หมายเลข	แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ (หน่วย/มล.)	ชนิดของ-ลูกแป้ง	แหล่งที่เก็บ-ตัวอย่าง
1	7.86	สุรา	ตาก
2	2.73	ข้าวหมาก	กรุงเทพฯ (1)
3	2.26	ข้าวหมาก	กรุงเทพฯ (2)
4	2.11	ข้าวหมาก	นนทบุรี
5	11.03	สุรา	สุพรรณบุรี
6	2.61	ข้าวหมาก	ปทุมธานี
7	2.94	ข้าวหมาก	นครสวรรค์
8	3.09	ข้าวหมาก	ราชบุรี
9	5.39	สุรา	สุรินทร์
10	4.51	ข้าวหมาก	สุรินทร์
11	2.65	ข้าวหมาก	ขอนแก่น
12	4.57	ข้าวหมาก	ร้อยเอ็ด
13	3.76	สุรา	อุบลราชธานี
14	9.43	ข้าวหมาก	อุบลราชธานี (1)
15	3.13	ข้าวหมาก	อุบลราชธานี (2)
16	15.59	สุรา	ชัยภูมิ
17	11.13	ข้าวหมาก	นครพนม
18	6.55	ข้าวหมาก	ยะลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้อบนอาหารแข็ง

เชื้ออะไมโลไมซีส หมายเลข	แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ (หน่วย/กรัม)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
1	25.9	78.2
5	31.5	95.2
14	32.1	96.9
16	33.1	100.0
17	30.8	93.1
18	29.7	89.7

บนรำละเอียดอยู่ประมาณ 6 เท่า ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้รำหยาบเป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารแข็ง

2.2 อัตราส่วนของรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการศึกษาหาปริมาณแป้งที่ใช้ผสมในอาหารแข็งรำหยาบ ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 7.2 พบว่า เมื่อผันแปรอัตราส่วนของรำหยาบและแป้งโดยมีอัตราส่วนของแกลบคงที่นั้น เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของแป้ง และจะสูงสุดที่อัตราส่วนของรำหยาบ แป้ง และแกลบเป็น 30 20 1 หลังจากนั้นจะลดลงตามอัตราส่วนของแป้งที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 5)

2.3 ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนรำหยาบตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 7.3 พบว่า การผลิตเอนไซม์จะสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความชื้น 50 % เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 30, 40 และ 50 % มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามเวลาและจะลดลงภายหลังการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 48 ชั่วโมง ในขณะที่การผลิตเอนไซม์ของเชื้อบนอาหารที่มีความชื้น 60 % จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 ของการเลี้ยงเชื้อ และจะเริ่มลดลงหลังจากนี้ ดังแสดงในรูปที่ 6

2.4 <u>อัตราส่วนของแกลบในอาหารเลี้ยงเชื้อ</u> จากการทดลองหาอัตราส่วนของแกลบที่ผันแปรไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อกำหนดให้อัตราส่วนของรำหยาบและแป้งคงที่เป็น 30:20 ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 7.4 นั้น ปรากฏว่า อาหารแข็งที่ไม่มีส่วนผสมของแกลบจะผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีย่อยแป้งดิบได้ดีที่สุด และพบว่าแอคติวิตีจะลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของแกลบในอาหารแข็งตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงไว้ในรูปที่ 7

2.5 <u>พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u> จากการเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งที่ปรับความชื้นให้มีพีเอชระหว่าง 2.5-7.0 ด้วยวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 7.5 ผลการทดลองตามรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 3.5 นั้น มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่สุด พีเอชที่สูงหรือต่ำกว่านี้จะมีผลให้การผลิตเอนไซม์ลดลง

2.6 <u>ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม</u> ในการศึกษาปริมาณสปอร์ที่ปลูกบนอาหารแข็ง ตามวิธีการในบทที่ 2 หัวข้อ 7.6 นั้น พบว่า การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่คลุกสปอร์เริ่มต้นขนาด 5×10^6 สปอร์/10 กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ นั้นจะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุด และถ้าปลูกเชื้อในปริมาณที่สูงกว่านี้จะผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีต่ำ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 9

2.7 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อ</u> จากการเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งที่ได้บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 °ซ ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 7.7 นั้น เชื้ออะไมโลไมซีสผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงสุด เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เอนไซม์แอคติวิตีจะลดลงเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °ซ และ จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °ซ การบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ จะยืดระยะเวลาการสร้างเอนไซม์ออกไปโดยเริ่มพบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบในชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 10

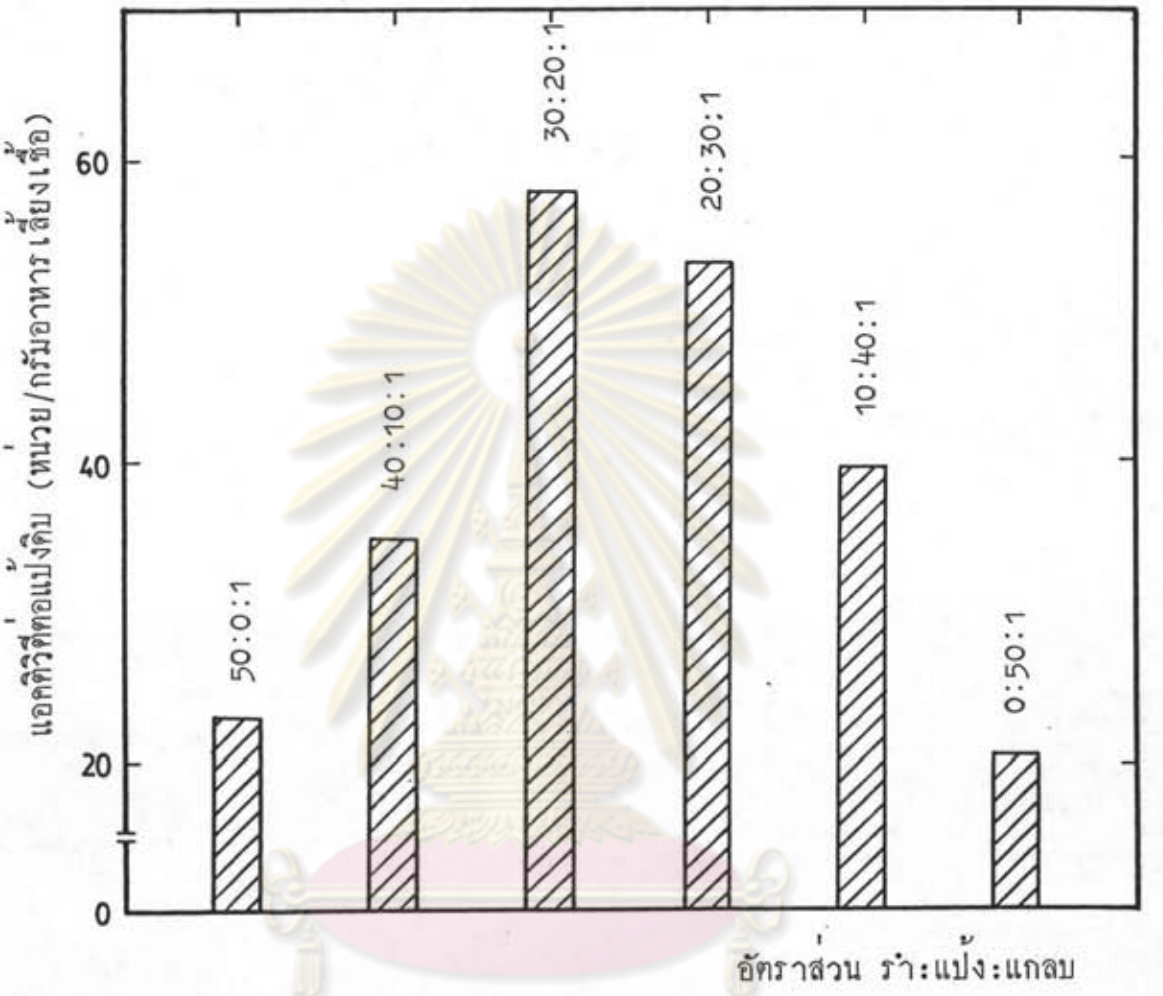
2.8 <u>การเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารแข็ง</u> จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งตามวิธีการในบทที่ 2 หัวข้อ 7.8 ได้เติมแหล่งไนโตรเจนจากแหล่งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ได้แก่ ผงสกัดจากยีสต์ เปปโตน กากถั่วเหลือง แอมโมเนียมตาร์เตรท และ แอมโมเนียมซิเตรท โดยผันแปรปริมาณของสารแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ ปรากฏผลดังตารางที่ 4 ว่า การเติมกากถั่วเหลือง 7 % จะส่งเสริมให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงกว่าการเติมผงสกัดจากยีสต์และเปปโตน ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ที่มีราคาแพง การ

เติมแอมโมเนียมคาร์เตรท และ แอมโมเนียมซิเตรท ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ จะผลิตเอนไซม์ให้มีแอคติวิตีได้สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ พบว่าการเติมแอมโมเนียมซิเตรท 9.0 % จะส่งเสริมให้เอนไซม์มีแอคติวิตีได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นกากถั่วเหลืองร่วมกับแอมโมเนียมซิเตรทแล้ว เชื้ออะไมโลไมซีสจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว และยังลดปริมาณการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปอีกด้วย ซึ่งแสดงผลไว้ในตารางที่ 5 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติแล้วพบว่า การเติมกากถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซิเตรท 5% และ 0.5% หรือ 5% และ 1.5% หรือ 6% และ 1.0% หรือ 6% และ 1.5% ตามลำดับนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.25 จึงได้เลือกการเติมกากถั่วเหลือง 5% และ แอมโมเนียมซิเตรท 0.5%

2.9 <u>การเติมแหล่งเกลือแร่</u> เมื่อได้ศึกษาการเติมแหล่งเกลือแร่ในอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีส ตามวิธีการในบทที่ 2 หัวข้อ 7.9 โดยผันแปรปริมาณการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตแล้วนั้น พบว่า การเติมแมกนีเซียมซัลเฟตขนาด 0.1 % ลงในอาหารแข็ง จะผลิตเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีได้สูงที่สุด และ เมื่อเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตขนาด 0.15 % ร่วมกับ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 % แล้ว จะส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด ผลการเติมแหล่งเกลือแร่นี้ปรากฏอยู่ในรูปที่ 11

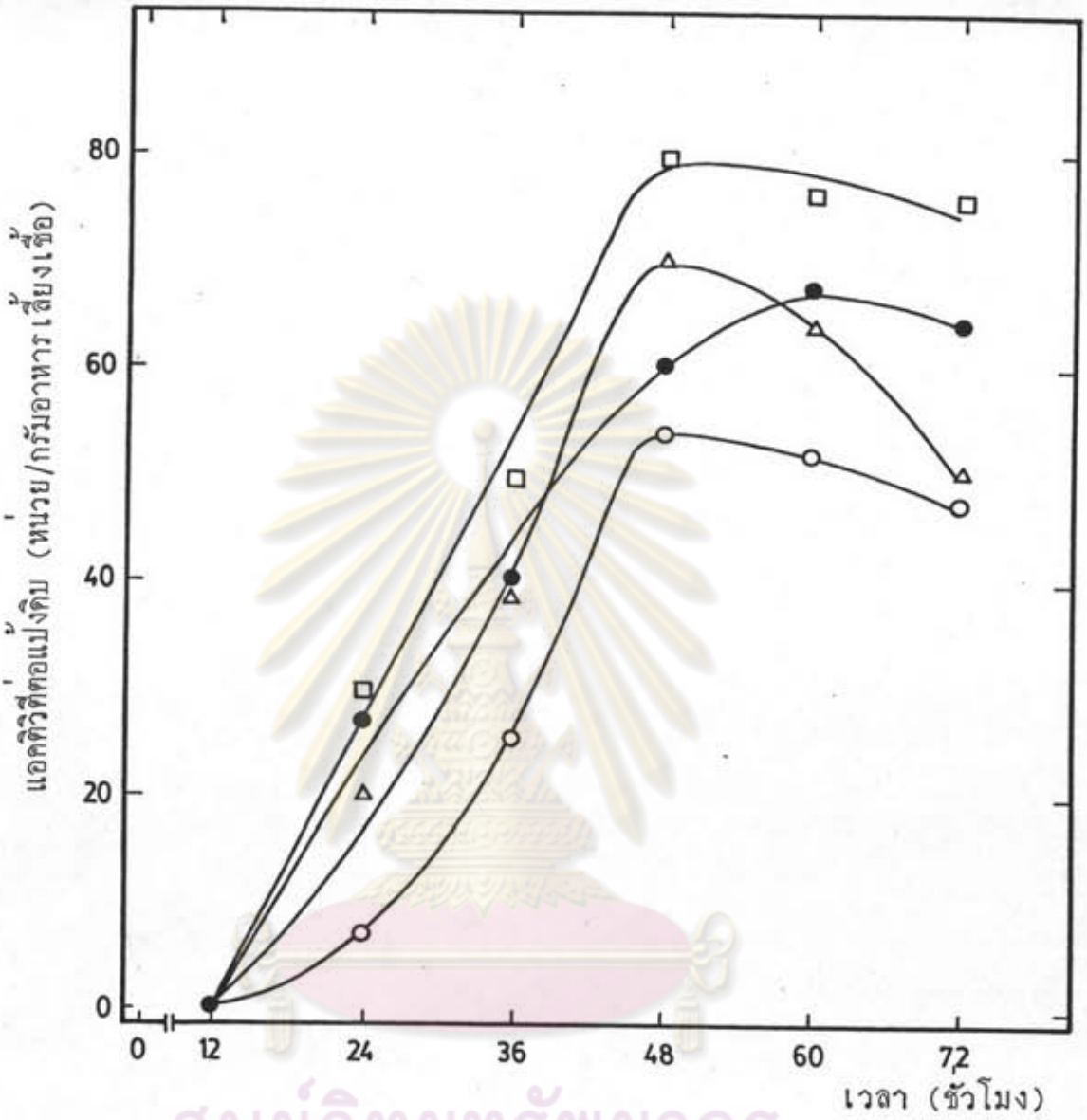
สภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ คือ การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย รำหยาบ และ แป้งข้าวเจ้าดิบ ในอัตราส่วน 3:2 หนัก 10 กรัม ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. โดยเติมกากถั่วเหลือง 5% แอมโมเนียมซิเตรท 0.5% เกลือโพแทส,เซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15% และ เกลือแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10% ปลูกเชื้อเริ่มต้น 5×10^6 สปอร์ และ ปรับความชื้นเริ่มต้นให้ได้ 50% ที่พีเอชเริ่มต้น 3.5 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้ออะไมโลไมซีส เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าในอัตราส่วนต่างๆ กัน โดยมีส่วนผสมของแกลบคงที่ บ่มเชื้อในขณะที่อาหารแข็งมีความชื้น 40 % ที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 48 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 อิทธิพลของความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีส เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย รำหยาบ แป้ง และแกลบ (30:20:1) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในเวลาต่างๆ กัน

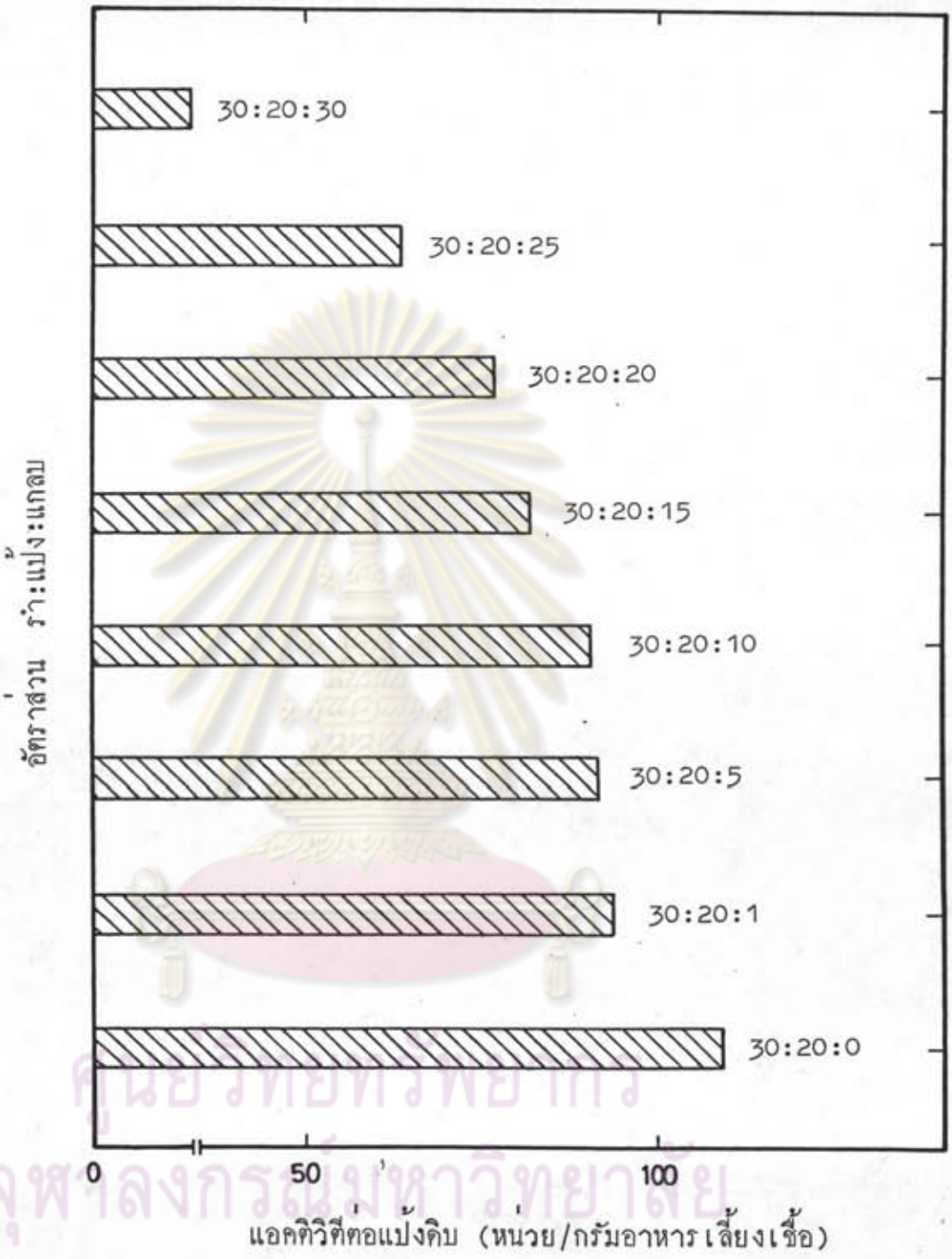
○——○ ความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 % (ปริมาตร/น้ำหนักแห้ง)

△——△ " " " 40 % "

□——□ " " " 50 % "

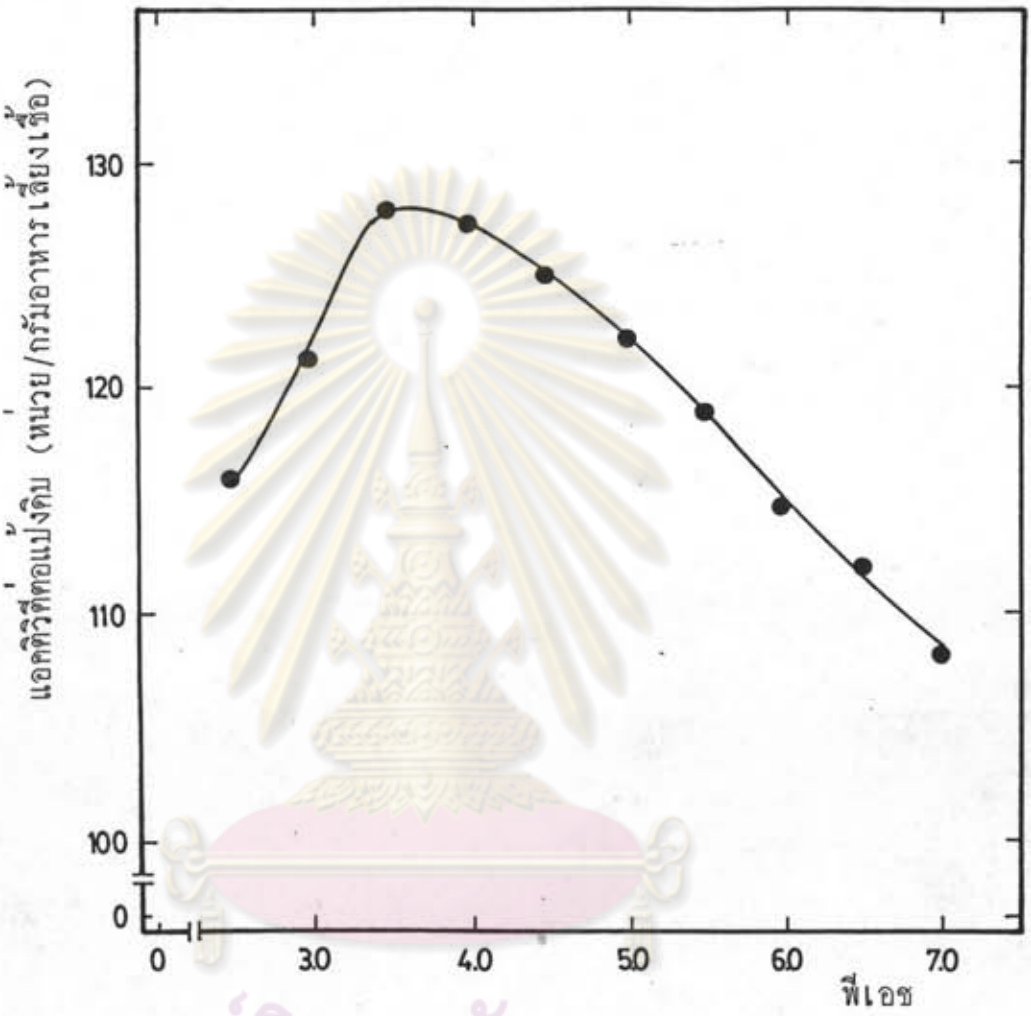
●——● " " " 60 % "

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



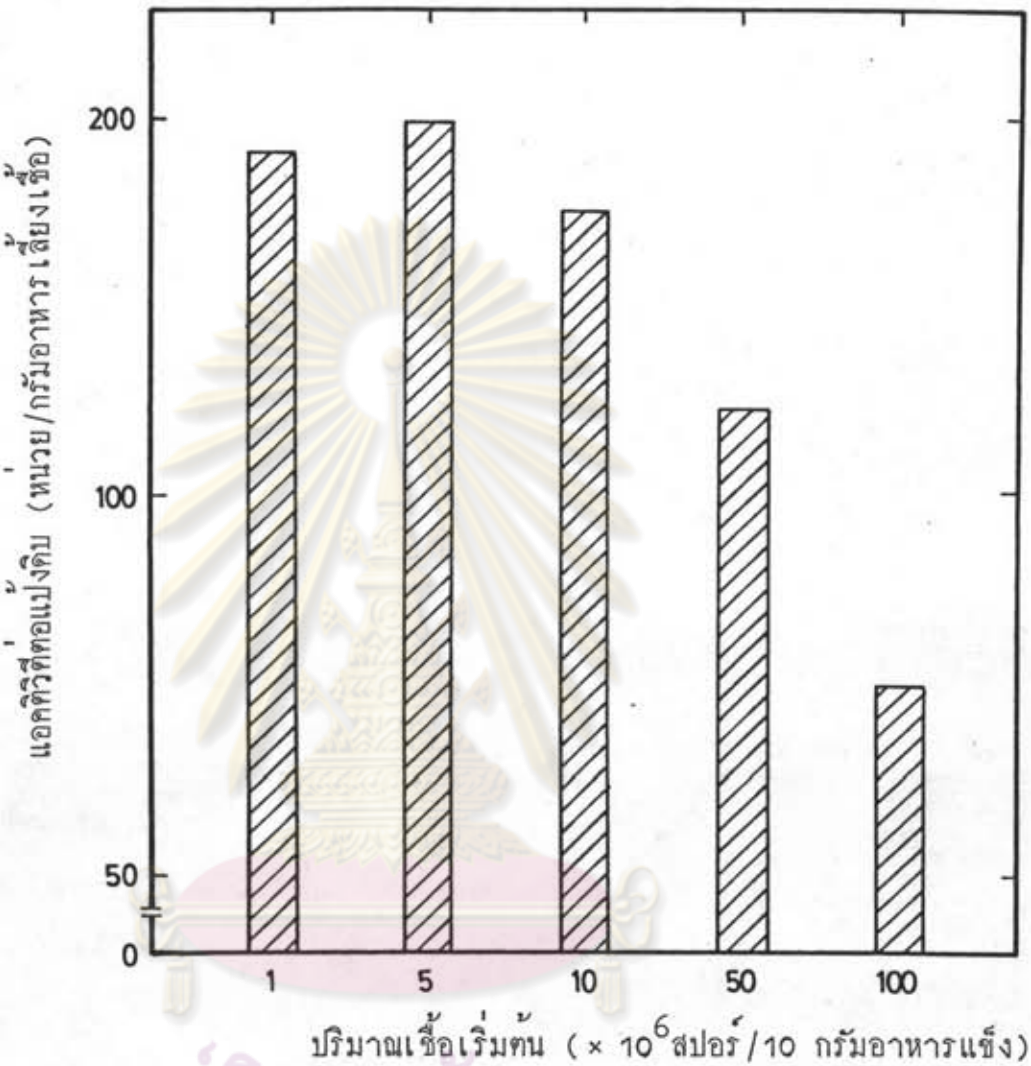
รูปที่ 7 เปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้ออะไมโลไมซีส เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าในอัตราส่วน 30:20 คงที่ และผันแปรอัตราส่วนองค์ประกอบที่เป็นแกลบ บ่มเชื้อในขณะที่อาหารแข็งมีความชื้น 50% ที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 48 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



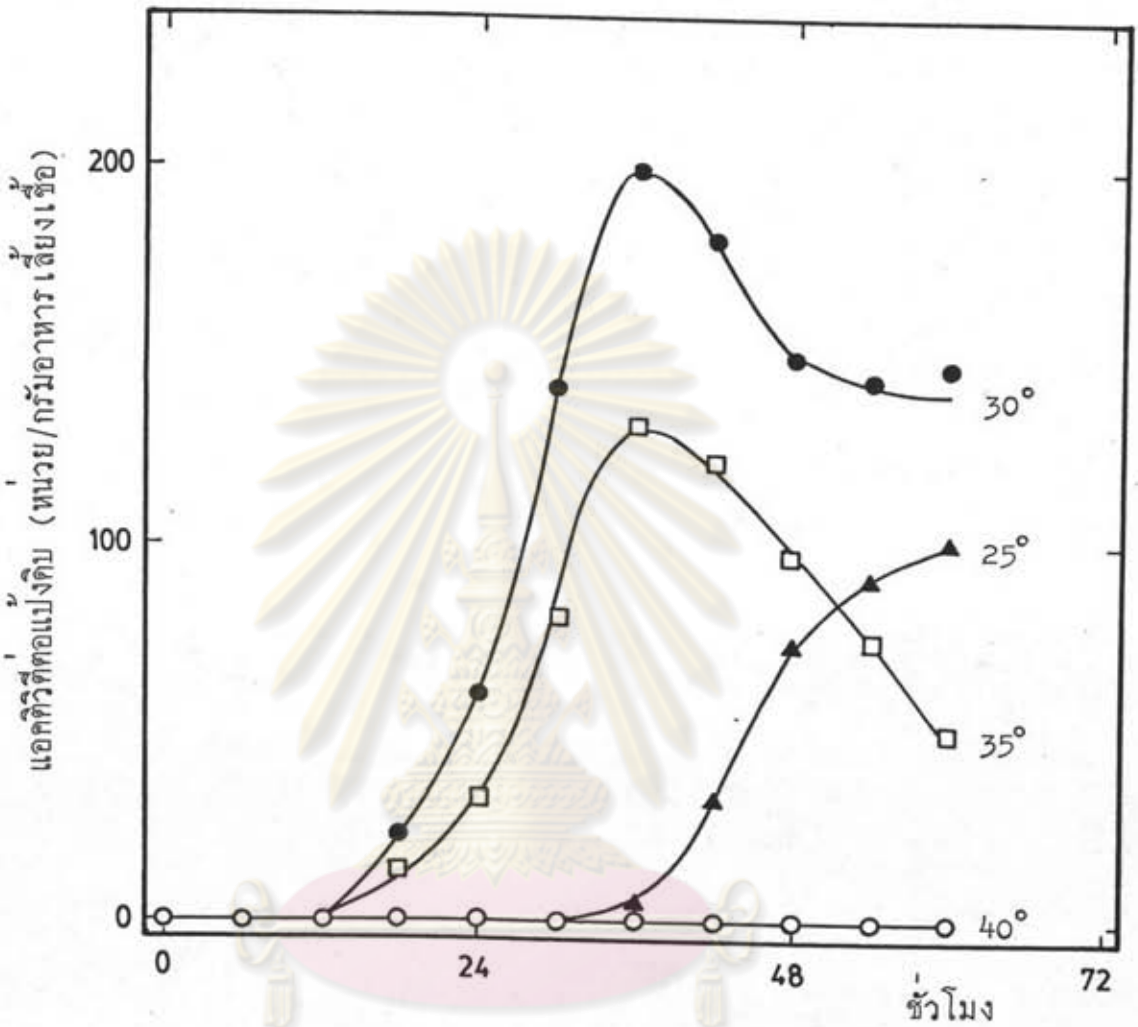
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 อิทธิพลของพีเอชในน้ำที่ใช้ปรับความชื้นอาหารเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ เมื่อบ่มเชื้อในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าอัตราส่วน 3:2 ในสภาพอาหารที่มีความชื้น 50% ที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 36 ชั่วโมง



รูปที่ 9 ปริมาณเชื้ออะไมโลไมซีสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าอัตราส่วน 3:2 ปรับความชื้นให้เป็น 50% ด้วยน้ำที่พีเอช 3.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 แสดงผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้ออะไมโลไมซีสต่อ การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบบนอาหารแข็งรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าอัตราส่วน 3:2 ที่ปรับความชื้นเป็น 50 % ด้วยน้ำที่พีเอช 3.5 ปลูกเชื้อเริ่มต้นขนาด 5×10^5 สปอร์/กรัมอาหารแข็ง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 °ซ (▲——▲), 30 °ซ (●——●), 35 °ซ (□——□), 40 °ซ (○——○).

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีส เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วย รำหยาบ: แป้ง ในอัตราส่วน 3:2 ปรับความชื้นด้วยน้ำที่พีเอช 3.5 ให้ได้ 50% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ (หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ) ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เติม (% น้ำหนักแห้ง)						
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	3.0
ผงยีสต์สกัด	200	200	212	217	226	230	284
เปปโตน	200	200	210	215	238	232	217

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ (หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ) ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เติม (% น้ำหนักแห้ง)						
	0	1.0	3.0	5.0	7.0	10.0	15.0
กากถั่วเหลือง	200	277	302	321	351	330	271

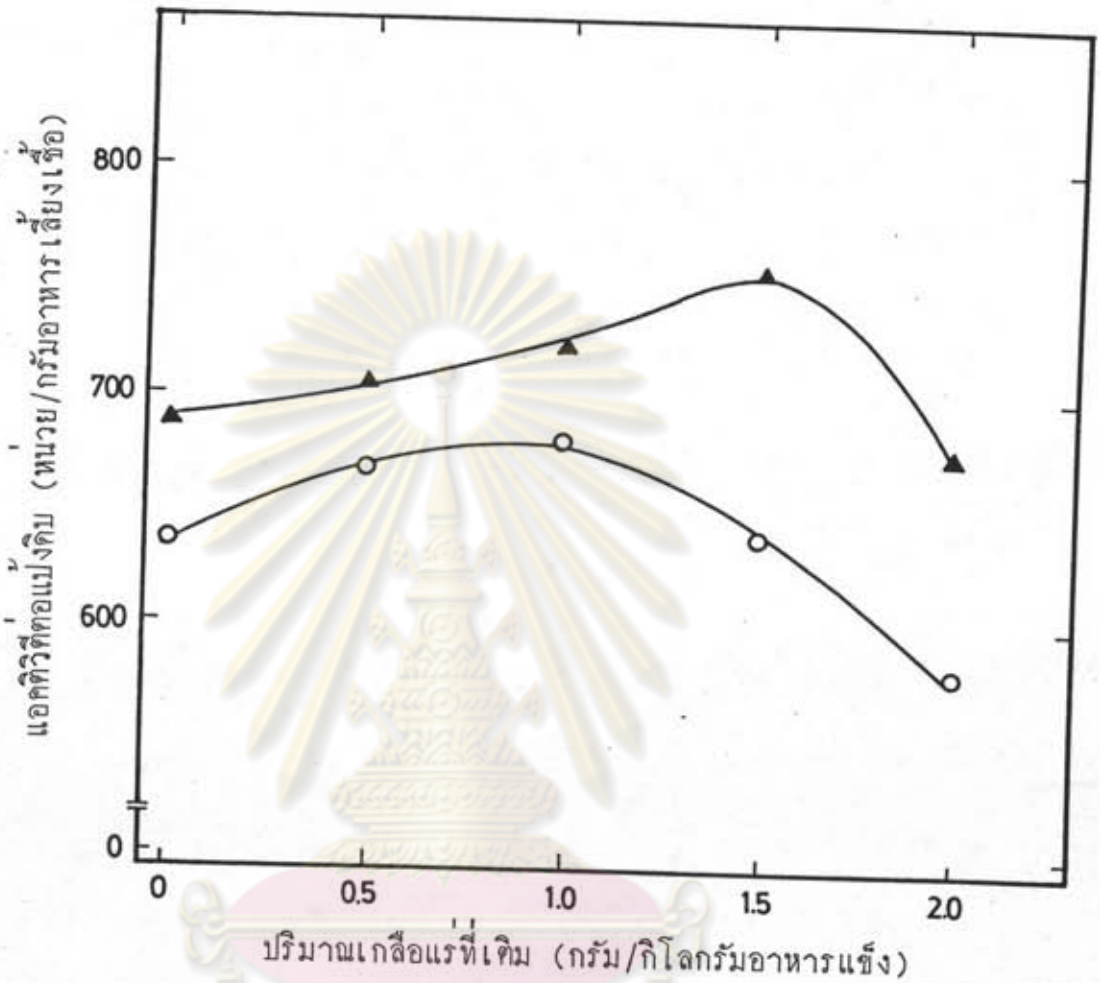
แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ (หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ) ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เติม (% น้ำหนักแห้ง)					
	0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
แอมโมเนียมซิเตรท	200	347	396	396	427	378
แอมโมเนียมตาร์เตรท	200	359	395	416	391	359

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ เมื่อผสมกากถั่วเหลือง (4.0-6.0%) และแอมโมเนียมซิเตรท (0.5-1.5%) ในปริมาณต่างๆ ลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วย รำหยาบ:แป้ง ในอัตราส่วน 3:2 ปรับความชื้นด้วยน้ำที่พีเอช 3.5 ให้เป็น 50% บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ปริมาณกากถั่วเหลืองที่เติม (% น้ำหนักแห้ง)	แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ (หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ)		
	ปริมาณแอมโมเนียมซิเตรทที่เติม (% น้ำหนักแห้ง)		
	0.5	1.0	1.5
4.0	470	400	492
5.0	545	491	500
6.0	448	526	525

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงผลของเกลือแร่ต่อ การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าอัตราส่วน 3:2 เติมกากถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซิเตรท 5 % และ 0.5 % (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ปรับความชื้นเป็น 50% ด้วยน้ำ พีเอช 3.5 ปลูกเชื้อขนาด 5×10^5 สปอร์/กรัมอาหารแข็ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 36 ชั่วโมง

o——o แมกนีเซียมซัลเฟต

▲——▲ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1% และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

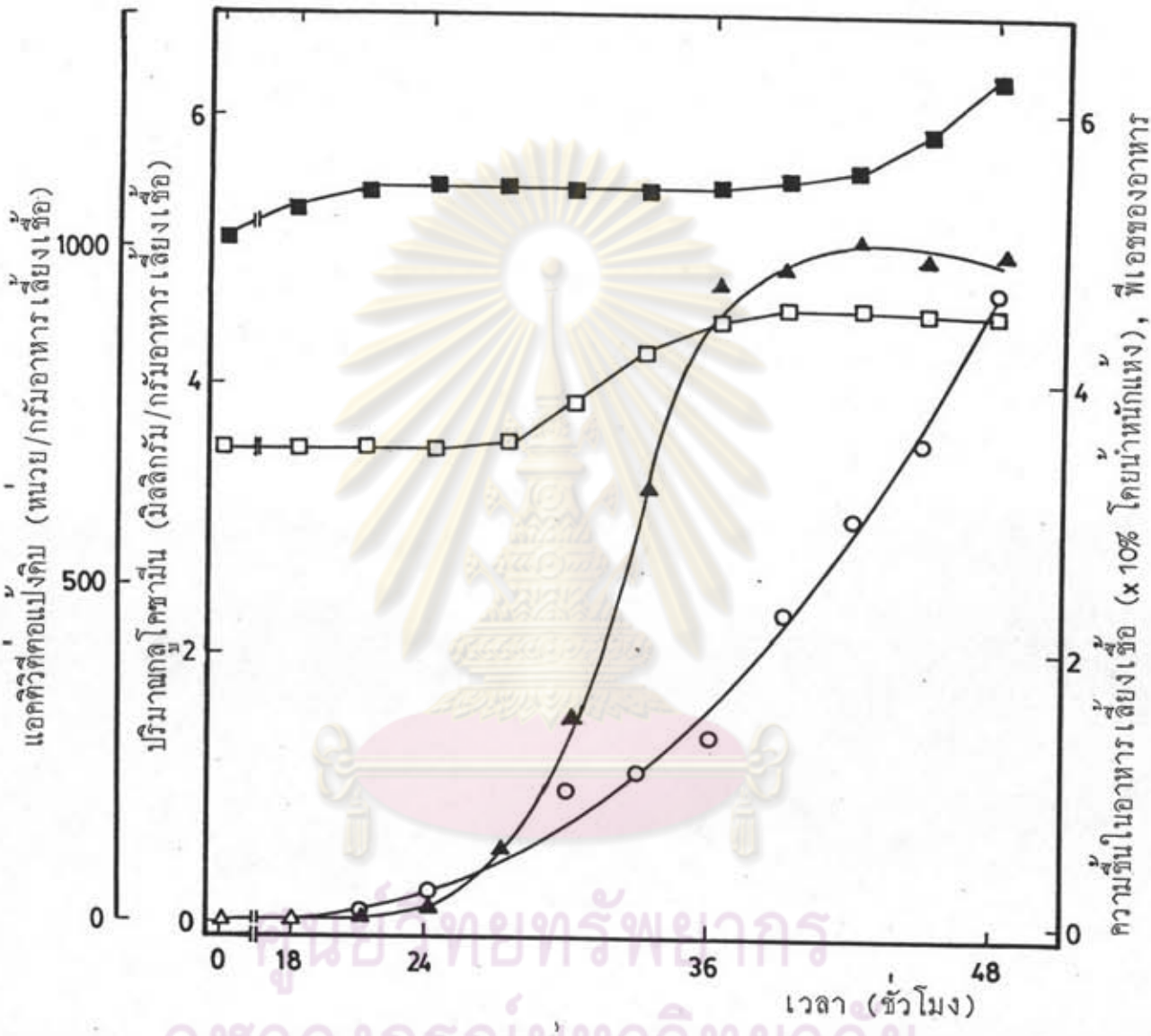
3. ความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบกับการเจริญของเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็ง

จากการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสในสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทุกๆ 6 ชั่วโมง มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 8 ผลการทดลองปรากฏอยู่ในรูปที่ 12 ซึ่งสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป และแอคติวิตีของเอนไซม์จะขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 คงไว้จนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นเวลาสุดท้ายที่เก็บตัวอย่าง ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นจาก 50 % เป็น 55 % ไปจนถึงชั่วโมงที่ 42 และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 62 % เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าพีเอชของเอนไซม์ที่สกัดได้จะเปลี่ยนแปลงในขณะที่มีการสร้างเอนไซม์ จากพีเอช 3.5 ไปเป็น 4.5 และคงไว้เช่นนี้จนสิ้นสุดการทดลอง

4. การทำเอนไซม์ย่อยแป้งดิบให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.1 การสกัดแยกเอนไซม์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดเอนไซม์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 300 กรัม ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.5 จำนวน 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 10 °ซ เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอนไซม์ที่สกัดได้ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และ นำเอนไซม์ไปตรวจสอบ พบว่า มีแอคติวิตีสุทธิในการย่อยแป้งดิบ 34,000 หน่วย และ โปรตีนสุทธิ 6,375 มิลลิกรัม คิดเป็นแอคติวิตีจำเพาะ 5.33 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน

4.2 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำสารละลายเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 40% ปั่นทิ้งตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ 10,000xg นำส่วนใสมาตกตะกอนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 80% แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยง ปั่นเก็บตะกอนมาละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 ผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ได้จำนวน 70 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์ จี-25 (4.0x40 ซม.) เพื่อขจัดเกลือ แล้วนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกรองแบบอัลตรา ใช้แผ่นกรองชนิดยูเอ็ม-10 ภายใต้ความดันไนโตรเจน 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว ผลจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 40-80 % นี้ สามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออก



รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและ การผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็ง

▲——▲ แอคติวิตีต่อแป้งดิบ, ○——○ กลูโคซามีน,

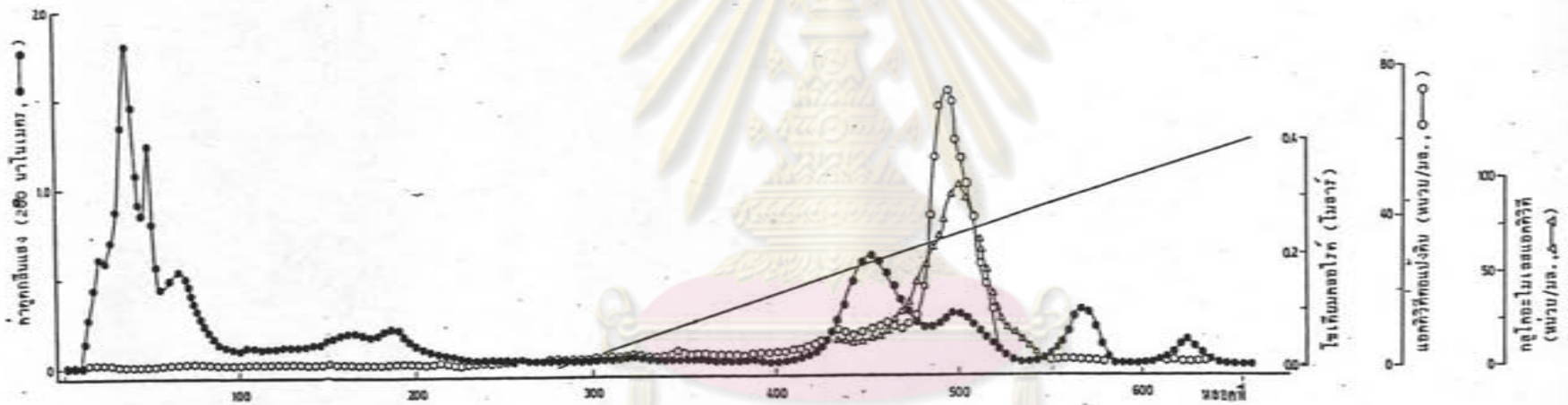
■——■ ความชื้นในอาหาร; □——□ พีเอชของอาหาร.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไป เหลือเอนไซม์อยู่ 67.5 % ของแอคติวิตีเริ่มต้น และ ทำให้แอคติวิตีจำเพาะในการย่อยแป้งดิบเพิ่มขึ้น 7.1 เท่า ของเอนไซม์ที่สกัด ดังแสดงในตารางที่ 6

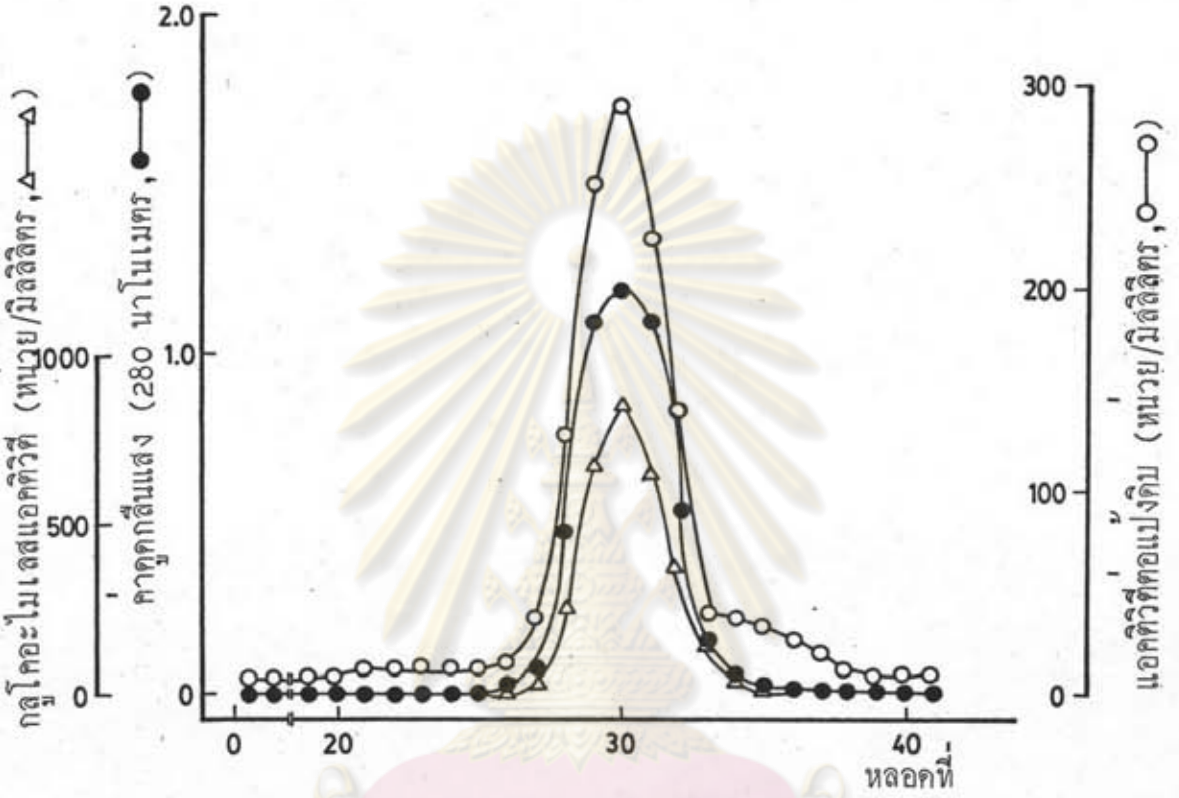
4.3 <u>การทำโครมาโตกราฟบน ซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ ซี-50</u> บรรจุซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี-50 ที่พองตัวเต็มที่ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 3.6 x 60.0 ซม. ผ่านบัฟเฟอร์ดังกล่าวหลายๆครั้ง จนเม็ดเจลอยู่ในสภาพสมดุล ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชั่วโมง ผ่านสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 จำนวน 51 มิลลิลิตร และ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่มีการแลกเปลี่ยนประจุบนเม็ดเจลออกด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ส่วนของโปรตีนซึ่งจับติดอยู่กับเจลนั้น ชะออกด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แบบเกรเดียนท์เส้นตรง ตั้งแต่ 0 ถึง 0.4 โมลาร์ เก็บสารละลายโปรตีนด้วยเครื่องเก็บลำดับ-ส่วน หลอดละ 5 มิลลิลิตร ตรวจวัดโปรตีนด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และตรวจสอบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ จากรูปที่ 13 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ถูกชะออกมาด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.22 โมลาร์ ซึ่งปรากฏในหลอดที่ 470-520 รวมสารละลายโปรตีนในหลอดที่ 485-505 เข้าด้วยกัน แล้วนำไปผ่านลงคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์ จี-25 เพื่อขจัดเกลือออกก่อนที่จะทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกรองแบบอัลตรา ภายหลังการทำโครมาโตกราฟบนซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ ซี-50 แล้ว ทำให้แอค-ติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 19.2 เท่า ของเอนไซม์ที่สกัดได้ คิดเป็นปริมาณเอนไซม์ 8.5 % ของแอคติวิตีเริ่มต้น

4.4 <u>การทำโครมาโตกราฟบน ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50</u> บรรจุดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 ที่พองตัวเต็มที่ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 3.6 x 60.0 ซม. ผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ดังกล่าวหลายๆครั้ง จนเม็ดเจลในคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลที่อัตราการไหล 20 มล./ชั่วโมง ผ่านสารละลายเอนไซม์ 17 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 4.3 ลงในคอลัมน์และชะเอนไซม์ออกด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ เหลือโปรตีนอื่นค้างแลกประจุกับเจล เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านออกมาหลอดละ 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บลำดับส่วน แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบจะปรากฏในหลอดที่ 28-33 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 14 เมื่อรวมสารละลายเอนไซม์ในหลอดที่ 28-32 เข้าด้วยกัน และ ทำให้เข้มข้นแล้วพบว่า มีปริมาณเอนไซม์อยู่ 2.2 % มีแอคติวิตีจำเพาะเป็น 23.7 เท่า ของเอนไซม์ที่สกัดได้



รูปที่ 13 แสดงโครมาโตกราฟีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีสบนซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ ซี-50 โดยผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ขนาด 3.6×60.0 เซ็นติเมตร ชะเอนไซม์ออกด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แบบเกรเดียนท์เส้นตรง (0-0.4 โมลาร์) เก็บสารละลายเอนไซม์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 แสดงโครมาโตกราฟีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีสบน ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 โดยผ่านเอนไซม์ลงไปในคอลัมน์ขนาด 3.6x60.0 เซ็นติเมตร ชะเอนไซม์ออกด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 เก็บเอนไซม์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ลำดับขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีสให้บริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอคติวิตีสุทธิ (หน่วย)	โปรตีนสุทธิ (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	ปริมาณเอนไซม์ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
เอนไซม์ที่เริ่มสกัด	1,000	34,000	6,375	5.33	100	1
ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต อิ่มตัว 40 - 80 %	51	22,948	602	38.12	67.5	7.1
ซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ ซี-50	17	2,876	27	106.52	8.5	19.2
ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50	14	758	6	126.33	2.2	23.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าแอคติวิตีจำเพาะ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ และ ปริมาณเอนไซม์ที่เหลืออยู่ภายหลังจากการผ่านขั้นตอนต่างๆ ในการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ ได้รวบรวมสรุปไว้ในตารางที่ 6

5. การทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ

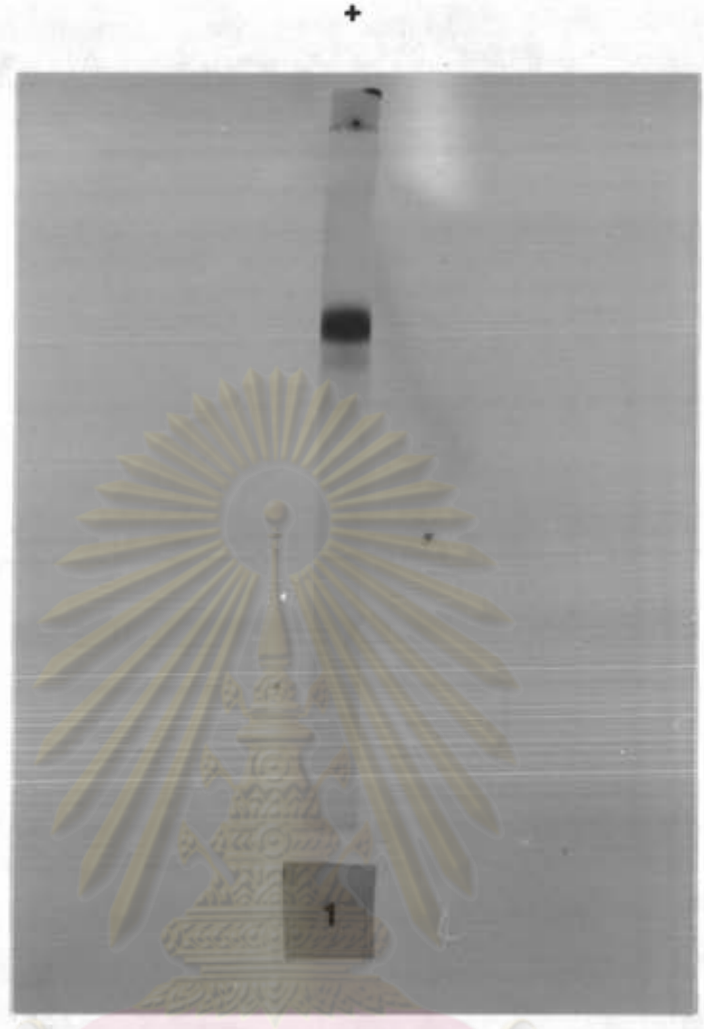
ได้ทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการทำ โพลีอะคริลาไมด์ ดิสค์เจล อิเล็ก-โทรโฟรีซิส บนเจลที่ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 7.5 % ผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่หลอดละ 4 มิลลิแอมแปร์ ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย เบตา-อะลานีน และ กรดอะซีติก ที่พีเอช 4.3 ย้อมโปรตีนด้วยสีย้อมโคแมสซีบูล ซึ่งมีรายละเอียดของการทดลองอยู่ในบทที่ 2 หัวข้อ 12 ผลจากการทดสอบความบริสุทธิ์พบ โปรตีน 2 แถบ บนแท่งเจล ดังแสดงไว้ในรูปที่ 15 และวัดค่าอาร์เอฟ (R_f) ได้ 0.261 และ 0.304 ซึ่งตรวจพบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบในแถบโปรตีนที่มีค่าอาร์เอฟ 0.261 เท่านั้น ดังรูปที่ 16

6. คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว

6.1 น้ำหนักโมเลกุล จากการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยการกรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์ จี-150 มาเปรียบเทียบกับค่า K_{av} ของเอนไซม์กับโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 11 ลำดับของเอนไซม์และโปรตีน-มาตรฐานที่กรองผ่านคอลัมน์ ปรากฏอยู่ในรูปที่ 17 และ จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับ ค่า K_{av} ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 18 นี้ สามารถจะประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ได้เป็น 44,000 ดาลตัน

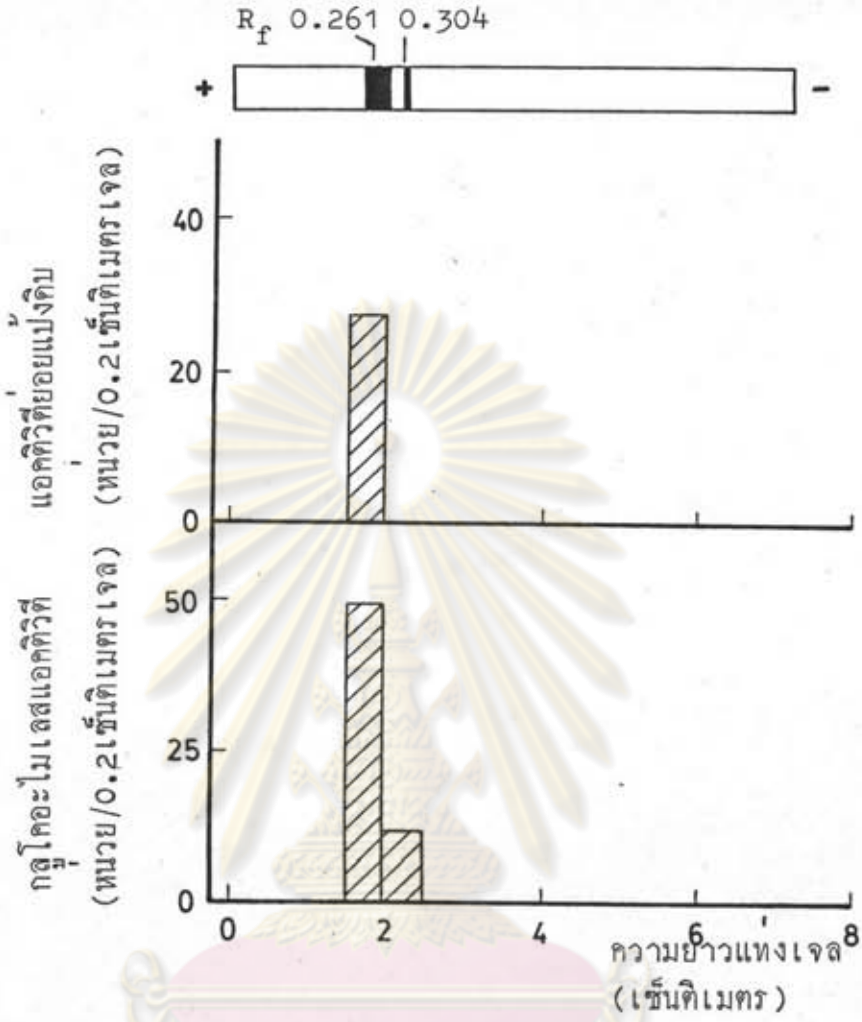
6.2 อิทธิพลของพีเอชที่มีต่อการย่อยแป้ง การหาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยแป้งดิบ กระทำโดยการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้ม-ข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.0-5.5 และ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.5-7.0 เอนไซม์จะย่อยแป้งดิบได้ดีในพีเอช 4.5 - 5.5 พีเอชที่ต่ำ-กว่า 4.0 และ สูงกว่า 6.0 จะมีผลให้ความสามารถในการย่อยแป้งดิบลดลงอย่างรวดเร็ว สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อกลูโคอะไมเลสแอคติวิตีซึ่งได้กระทำในบัฟเฟอร์ข้างต้นจะอยู่ที่พีเอช 4.5 - 5.5 เช่นเดียวกัน ผลการทดลองนี้ปรากฏอยู่ในรูปที่ 19

6.3 อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการย่อยแป้ง เมื่อย่อยแป้งในอะซิเตทบัฟเฟอร์



รูปที่ 15 แสดงผลการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไม่ซีส เมื่อกระทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล 7.5% ที่พีเอช 4.3 ใน β-อะลานีนและกรดอะซิติกบัฟเฟอร์ ใส่โปรตีน 187 ไมโครกรัม และผ่านกระแสไฟคงที่หลอดละ 4 แอมแปร์ ย้อมโปรตีนด้วยสีโคแมสซีบลู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 แสดงผลการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีสกับแอคติวิตีบนแท่งเจล เมื่อกระทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล 7.5% ที่พีเอช 4.3 ใน β-อะลานีนและกรดอะซิติกบัฟเฟอร์ ใส่โปรตีน 187 ไมโครกรัม และผ่านกระแสไฟคงที่หลอดละ 4 แอมแปร์ ตัดแท่งเจลเป็นท่อนๆละ 0.2 เซ็นติเมตร แช่ใน 1 มิลลิลิตรของอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 10 °ซ แล้วนำมาตรวจวัดแอคติวิตี

ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30-60 °ซ ผลการทดลองในรูปที่ 20 แสดงให้เห็นว่า แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ และ จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55 °ซ ในขณะที่กลูโคอะไมเลสจะแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 °ซ

6.4 <u>ความเสถียรต่อพีเอช</u> เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบของสารละลายเอนไซม์ (6.5 หน่วย/มิลลิลิตร) ซึ่งได้เก็บไว้ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 3.0-5.5) และ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 5.5-8.0) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์จะมีความเสถียรต่อพีเอชในช่วง 5.0 - 7.0 และ เมื่อตรวจสอบกลูโคอะไมเลสแอคติวิตีของสารละลายเอนไซม์ที่เก็บโดยวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่า กลูโคอะไมเลสจะมีความเสถียรในช่วงพีเอช 5.0 - 7.0 เช่นเดียวกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 21

6.5 <u>ความเสถียรต่ออุณหภูมิ</u> เมื่อเก็บสารละลายเอนไซม์ (6.5 หน่วย/มิลลิลิตร) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 20 - 60 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบที่เหลือ พบว่า เอนไซม์จะมีความเสถียรตั้งแต่อุณหภูมิต่ำ จนถึง 30 °ซ แอคติวิตีจะลดลงตามลำดับเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และ จะสูญเสียความสามารถโดยสิ้นเชิงเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 60 °ซ และเมื่อตรวจสอบความเสถียรของกลูโคอะไมเลสภายหลังการเก็บเอนไซม์ข้างต้นนี้ จะปรากฏผลในทำนองเดียวกันกับแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ ซึ่งได้แสดงผลการทดลองไว้ในรูปที่ 22

6.6 <u>อิทธิพลของความเข้มข้นของแป้งดิบที่มีต่อแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ</u>

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (5.6 หน่วย/มิลลิลิตร) มาย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบที่มีความเข้มข้น 5-25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการตรวจสอบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบแล้ว พบว่า เอนไซม์จะแสดงแอคติวิตีสูงสุดเมื่อบ่มในแป้งดิบที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งปรากฏอยู่ในรูปที่ 23(ก) และ เมื่อเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์-เบอร์ก (Lineweaver-Burk plot) สามารถหาค่า K_m สำหรับแป้งดิบได้เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 23(ข)

6.7 <u>ความสัมพันธ์ระหว่าง พีเอช การดูดซับ และ การย่อยแป้งดิบ</u> จากการทดสอบการดูดซับและการย่อยแป้งดิบต่างๆ ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และ แป้งมันสำปะหลัง ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 3.0-5.0) และ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช - 6.0-8.0) โดยผันแปรค่าพีเอชต่างๆ และตรวจสอบการดูดซับตามวิธีในบทที่ 2 หัวข้อ 12 ผลปรากฏว่า อัตราการดูดซับแป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลังที่พีเอช 3.0 จะครบ 100 % และ จะลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น จะไม่พบการดูดซับแป้งข้าวเหนียวและแป้งสาลีในช่วงพีเอช 3.0 - 8.0 ดังแสดงในรูปที่ 24 ส่วนการย่อยแป้งดิบนั้นพบว่า เอนไซม์สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า แป้งสาลี และ แป้งข้าวเหนียว ได้ดีที่พีเอช 5.0 ส่วนการย่อยแป้งข้าวโพดจะลดลงตามพีเอชที่เพิ่มขึ้น ซึ่งปรากฏผลการทดลองในรูปที่ 25 ความสัมพันธ์ของการดูดซับและการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ นั้นจะแตกต่างกัน กล่าวคือ การดูดซับแป้งข้าวโพดและแป้งข้าวเจ้าจะมีแบบแผนเดียวกันกับการย่อยแป้งดิบ แต่การดูดซับแป้งมันสำปะหลังจะมีแบบแผนที่แตกต่างออกไปในช่วงพีเอชต่ำๆ (3.0-4.0) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์จะย่อยแป้งข้าวเหนียวและแป้งสาลีได้โดยไม่มีการดูดซับแป้งเลย

6.8 <u>การย่อยสลายแป้ง</u>

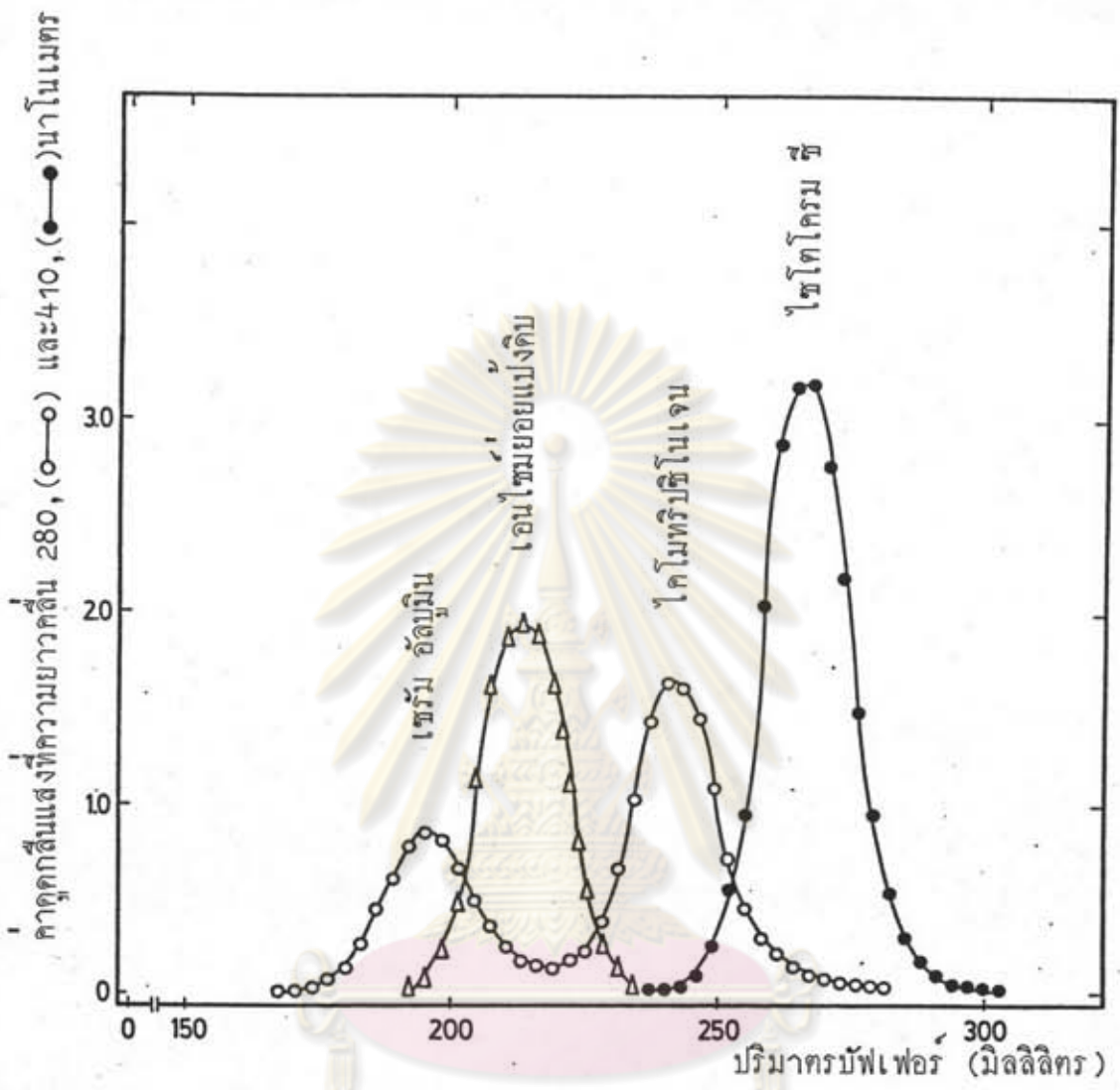
6.8.1 <u>การย่อยแป้งดิบ</u> เมื่อศึกษาการย่อยแป้งข้าวเหนียว แป้งสาลี แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และ แป้งมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์ (65 หน่วย) มาทำปฏิกิริยากับแป้งดิบ 0.3 กรัม ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 30 °ซ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์กลูโคส และ คำนวณหาแป้งที่ถูกย่อยสลายไป พบว่า เอนไซม์จะย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีที่สุด คิดเป็น 82 % ในเวลา 72 ชั่วโมง และ สามารถย่อยแป้งสาลี แป้งข้าวเจ้า และ แป้งข้าวโพด ในเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น 44, 30 และ 21 % ตามลำดับ เอนไซม์ที่เตรียมได้นี้จะย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ต่ำที่สุด เพียง 16 % เท่านั้น อัตราการย่อยแป้งมันสำปะหลังจะเพิ่มขึ้นช้ามาก ตั้งแต่ 24 ชั่วโมง เป็นต้นไป ซึ่งผลการทดลองนี้ปรากฏอยู่ในรูปที่ 26

6.8.2 <u>การย่อยแป้งละลายน้ำสุกและไกลโคเจน</u> ผลจากการศึกษาการย่อยแป้งละลายน้ำสุกและไกลโคเจน โดยใช้เอนไซม์ 13.8 หน่วย ทำปฏิกิริยากับแป้งละลายน้ำ หรือ ไกลโคเจน 100 มิลลิกรัม ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่

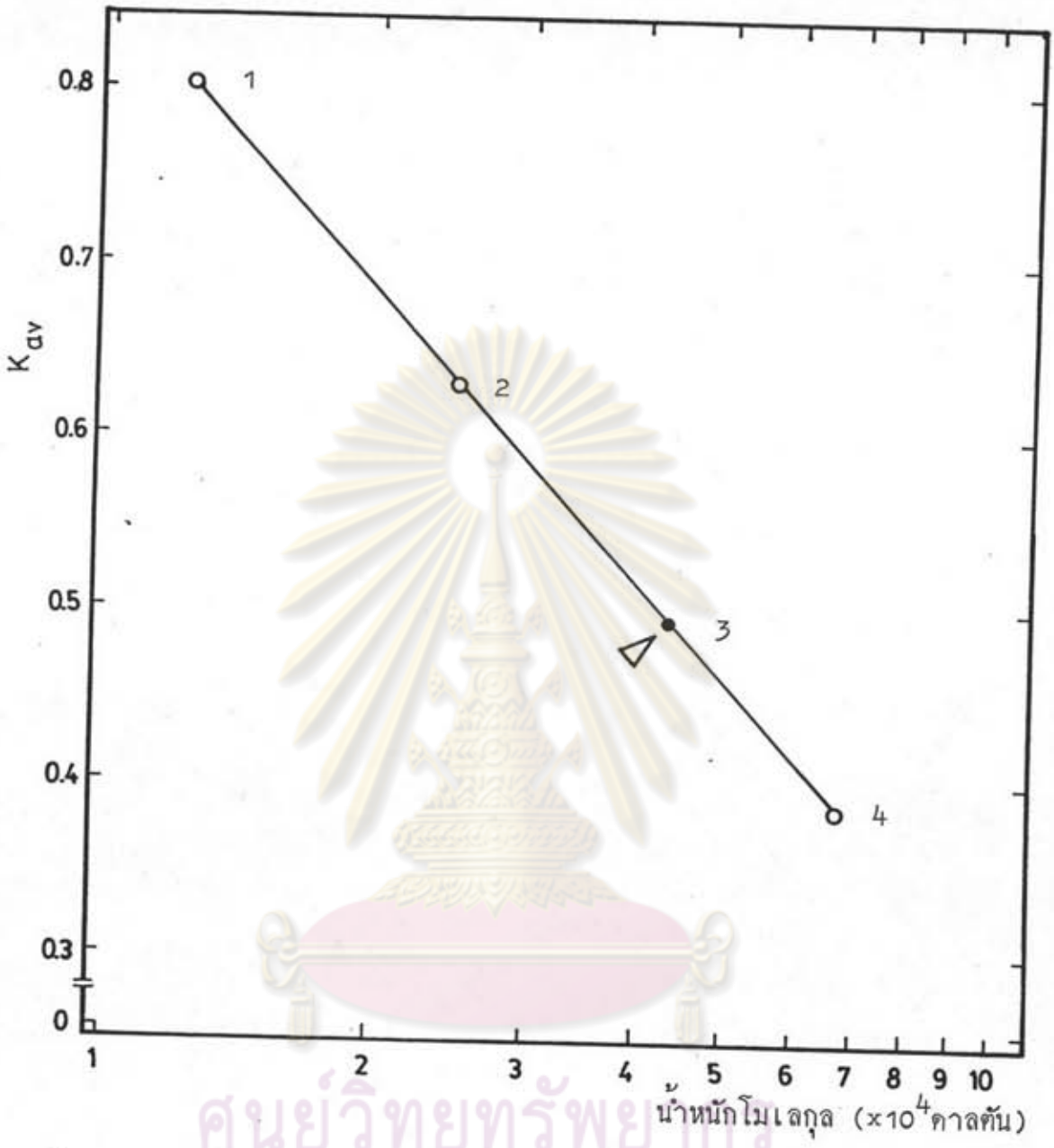
พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 30 °ซ ตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคสที่ได้ และ คำนวณหาแป้งที่ถูกย่อยสลายไปในช่วง 1-6 ชั่วโมง ปรากฏว่า เอนไซม์สามารถย่อยสลายแป้งละลายน้ำสุก และ ไกลโคเจน ได้ 81 % และ 93 % ในเวลา 6 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลไว้ในรูปที่ 27

6.8.3 <u>การวิเคราะห์น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง</u> ได้นำส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มาทำโครมาโตกราฟบนกระดาษชะด้วยตัวทำละลายผสมของบิวทานอล ไพริดีน และน้ำ (6:4:3 โดยปริมาตร) และ ตรวจสอบน้ำตาลบนกระดาษด้วยการแช่ลงในสารละลายเกลือเงินไนเตรทในด่าง ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 15 ผลจากการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวที่ได้จากการย่อยแป้งดิบ รวมทั้งแป้งละลายน้ำสุก และ ไกลโคเจน ดังแสดงในรูปที่ 28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

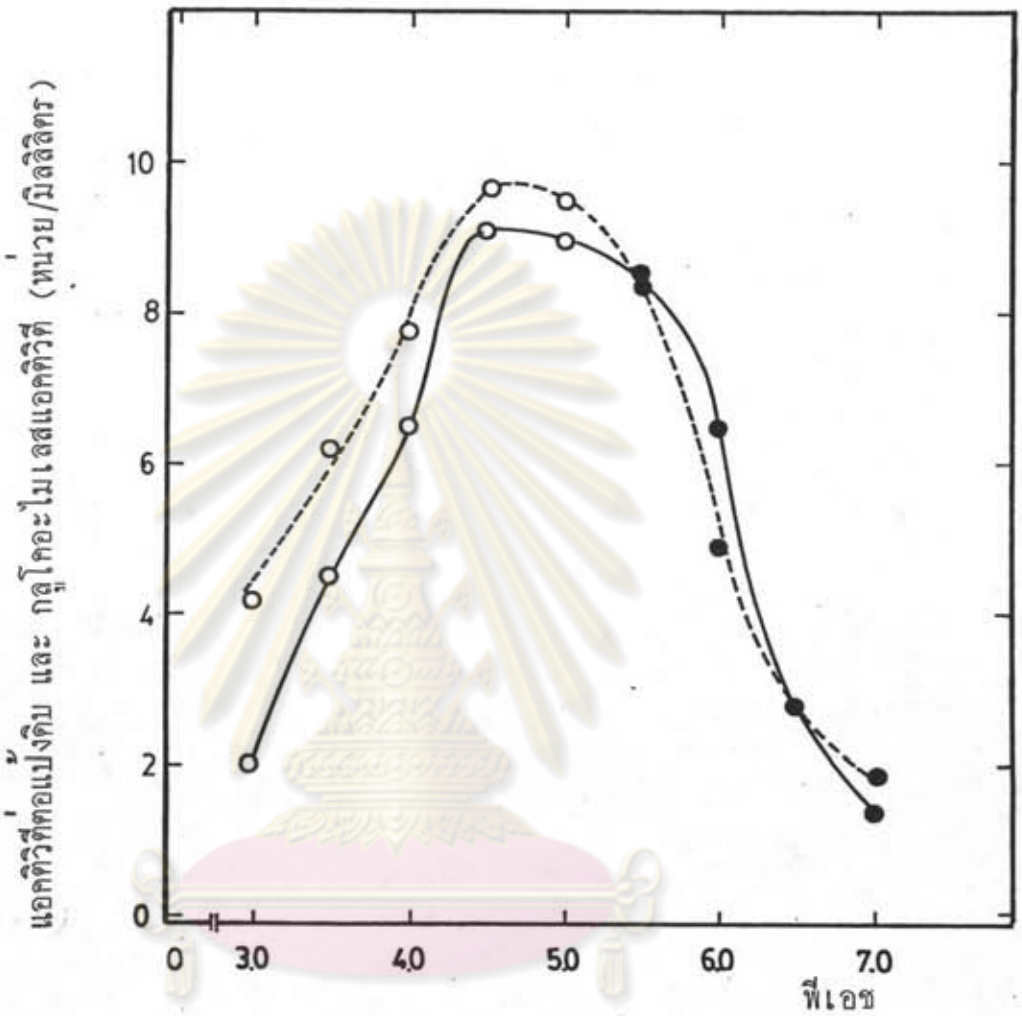


รูปที่ 17 แสดงลำดับของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีสและโปรตีนมาตรฐานเมื่อกรองผ่านคอลัมน์ (2.4×60.0 เซ็นติเมตร) ที่บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์ จี-150 ในอัตราการไหล 10 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ภายใต้ความดันน้ำ 25 เซ็นติเมตร



รูปที่ 18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและค่า K_{av} เพื่อประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีส โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 1, ไซโตโครม ซี (12,270 ดาลตัน) 2, ไคโมทริปซิโนเจน (25,000 ดาลตัน) 3, เอนไซม์ย่อยแป้งดิบ และ 4, เซรัม อัลบูมิน (67,000 ดาลตัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

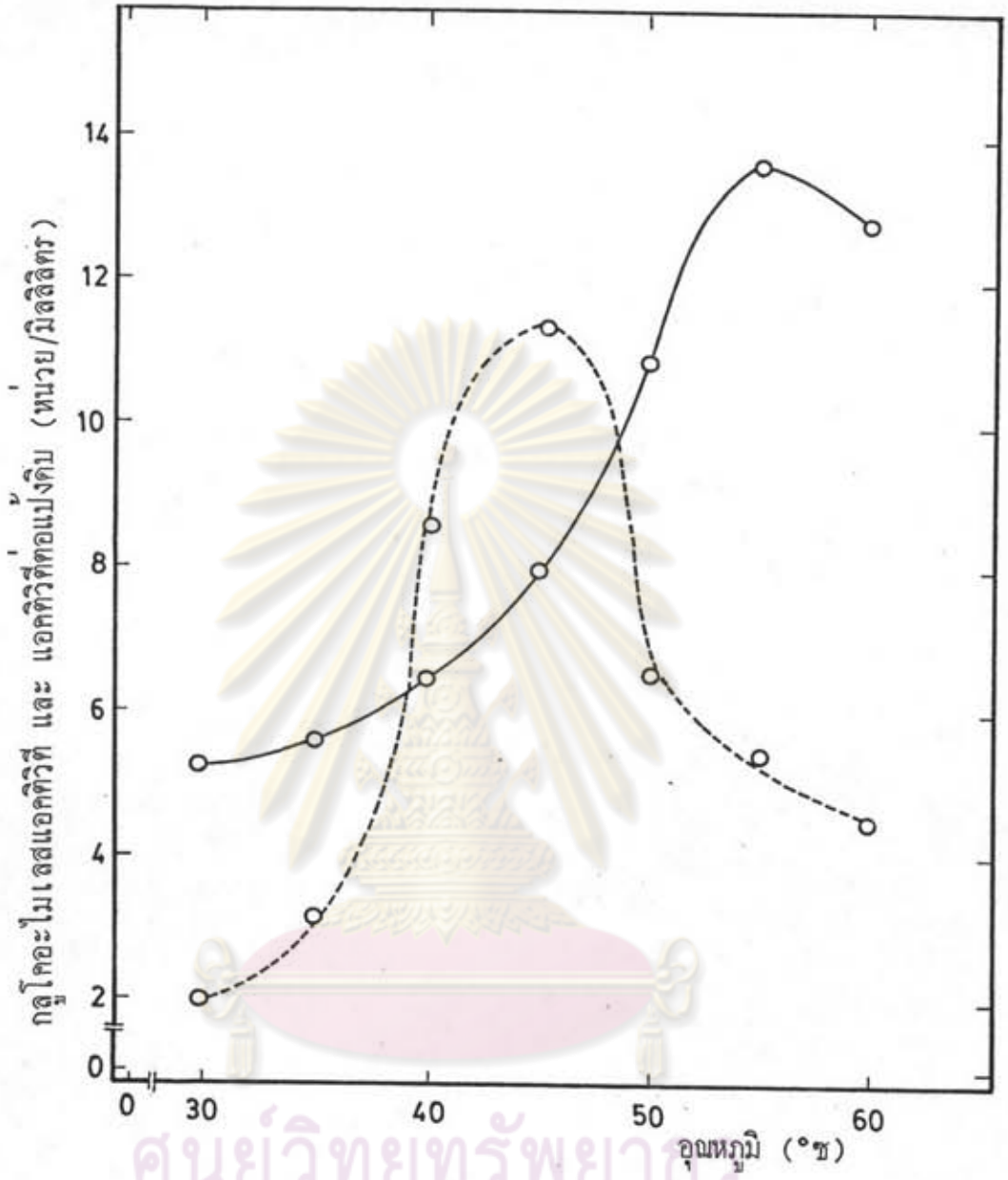


รูปที่ 19 อิทธิพลของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยการตรวจสอบแอคติวิตีย่อยแป้งดิบและกลูโคอะไมเลสแอคติวิตีในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.0-5.5 (o) และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.5-7.0 (●) ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 นาที

o——o แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ (6.5 หน่วย)

o------o กลูโคอะไมเลสแอคติวิตี (3.3 หน่วย)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

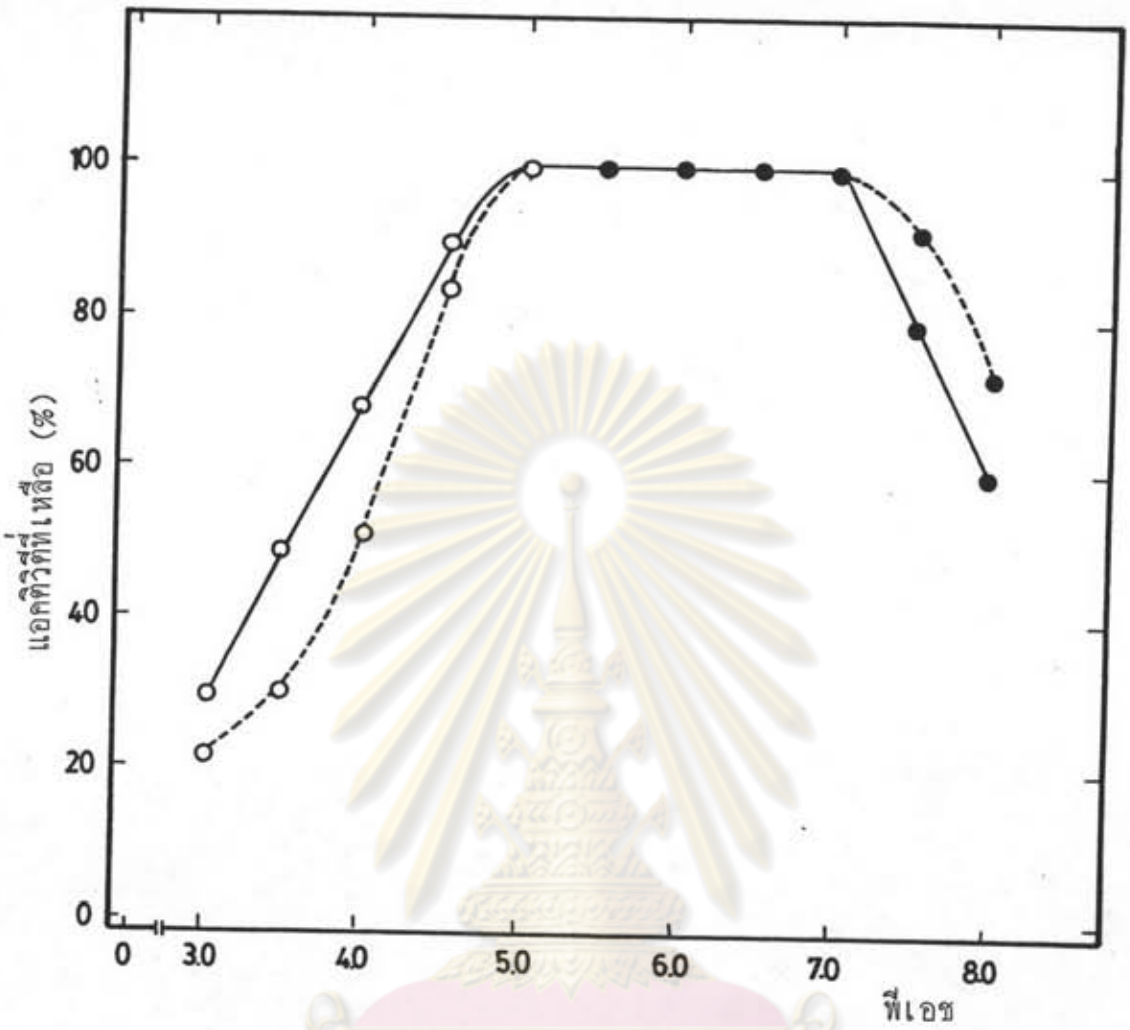


รูปที่ 20 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวีตีของเอนไซม์ เมื่อศึกษาแอคติวีตีในการย่อยแป้งดิบและกลูโคอะไมเลสแอคติวีตีในอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

o——o แอคติวีตีในการย่อยแป้งดิบ (6.5 หน่วย)

o------o กลูโคอะไมเลสแอคติวีตี (3.3 หน่วย)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

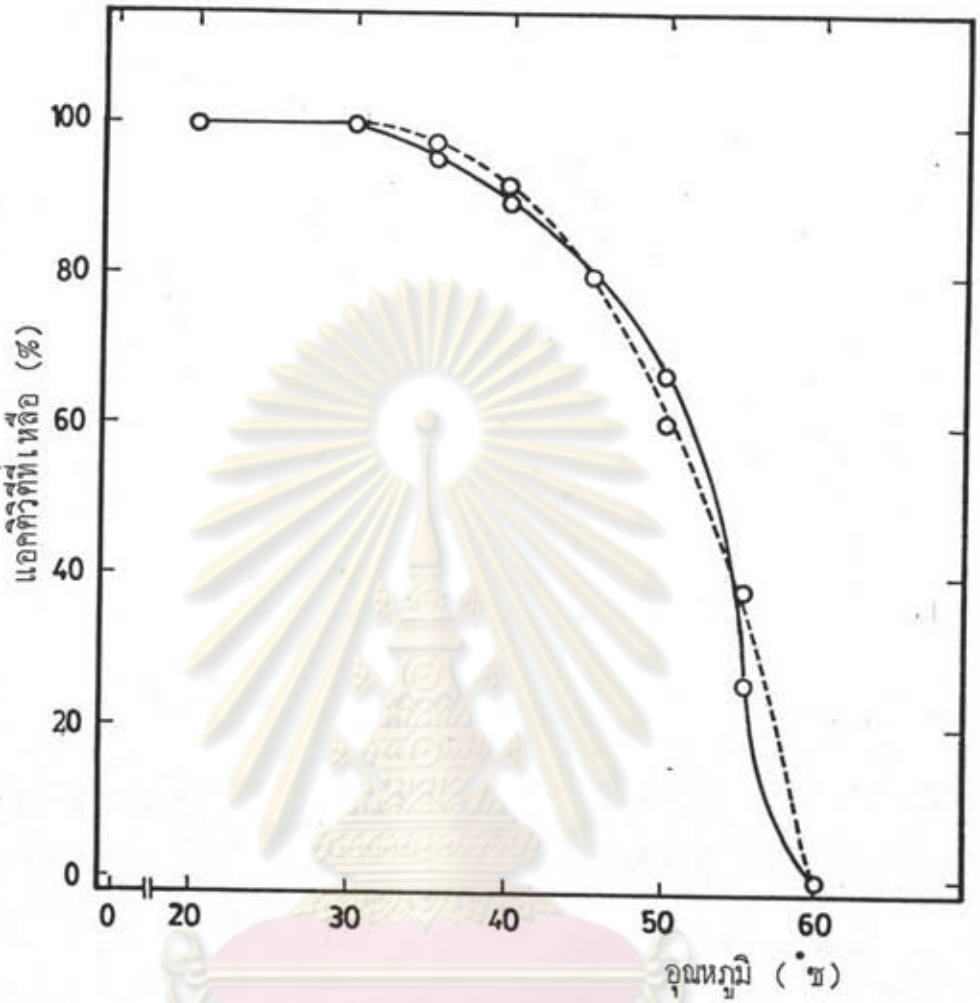


รูปที่ 21 เสถียรภาพของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ เมื่อเก็บเอนไซม์ (6.5 หน่วย/มิลลิลิตร) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.0-5.5 และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้ม-ข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.5-8.0 เป็นเวลา 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 °ซ แล้วตรวจวัดแอคติวิตีที่เหลือ

o——o แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ

o-----o กลูโคอะไมเลสแอคติวิตี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

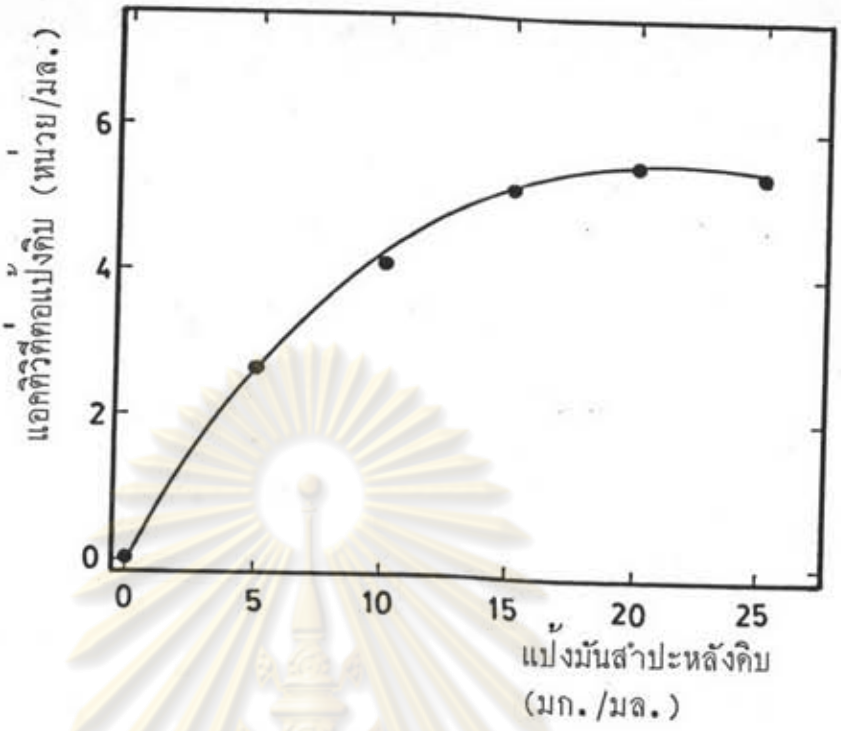


รูปที่ 22 เสถียรภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อเก็บเอนไซม์ 6.5 หน่วย/มิลลิลิตร ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 20-60 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลือ

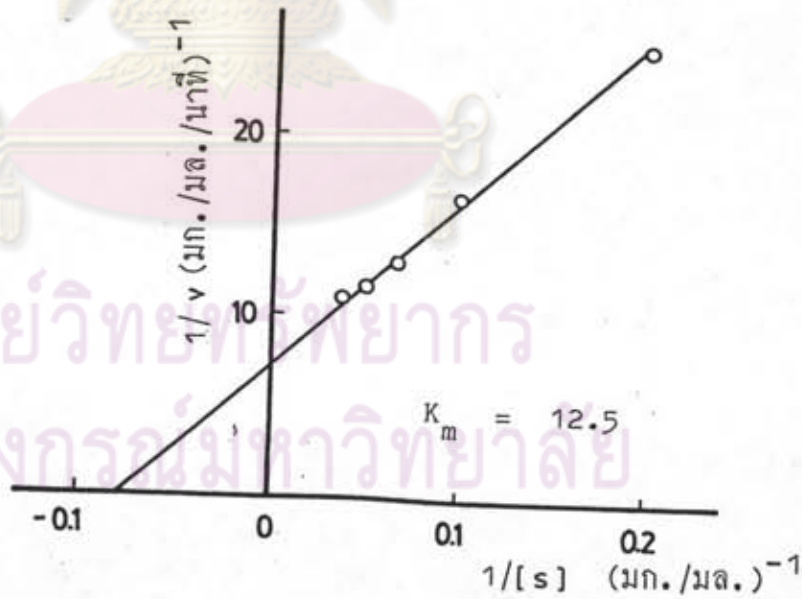
——o—— แอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบ

o------o กลูโคอะไมเลสแอคติวิตี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

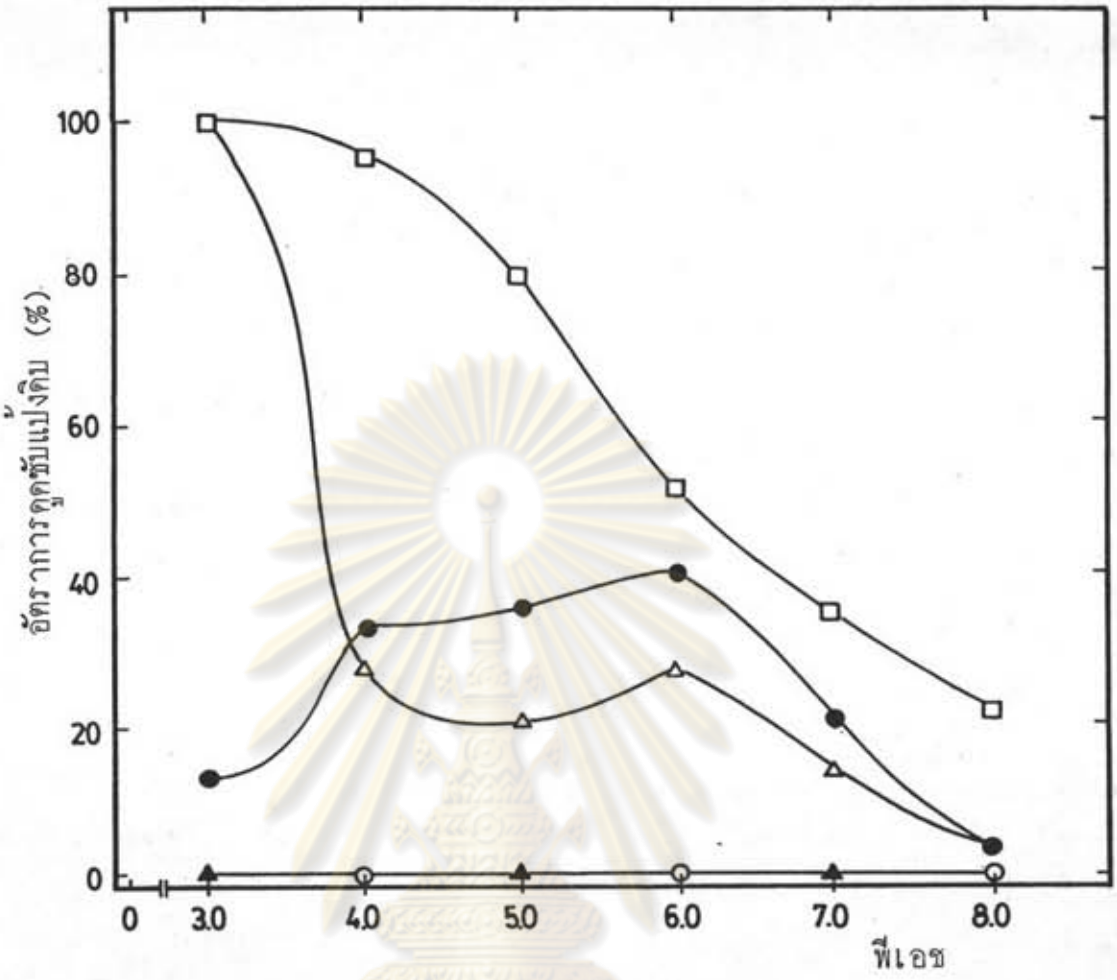


รูปที่ 23(ก) ผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังดิบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีส



รูปที่ 23(ข) แสดงการหาค่า K_m ของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากกราฟของไลน์วีเวอร์-เบอร์ก เมื่อนำเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ (5.6 หน่วย/มล.) มาย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบที่มีความเข้มข้น 5-25 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 40°ซ ที่พีเอช 4.5

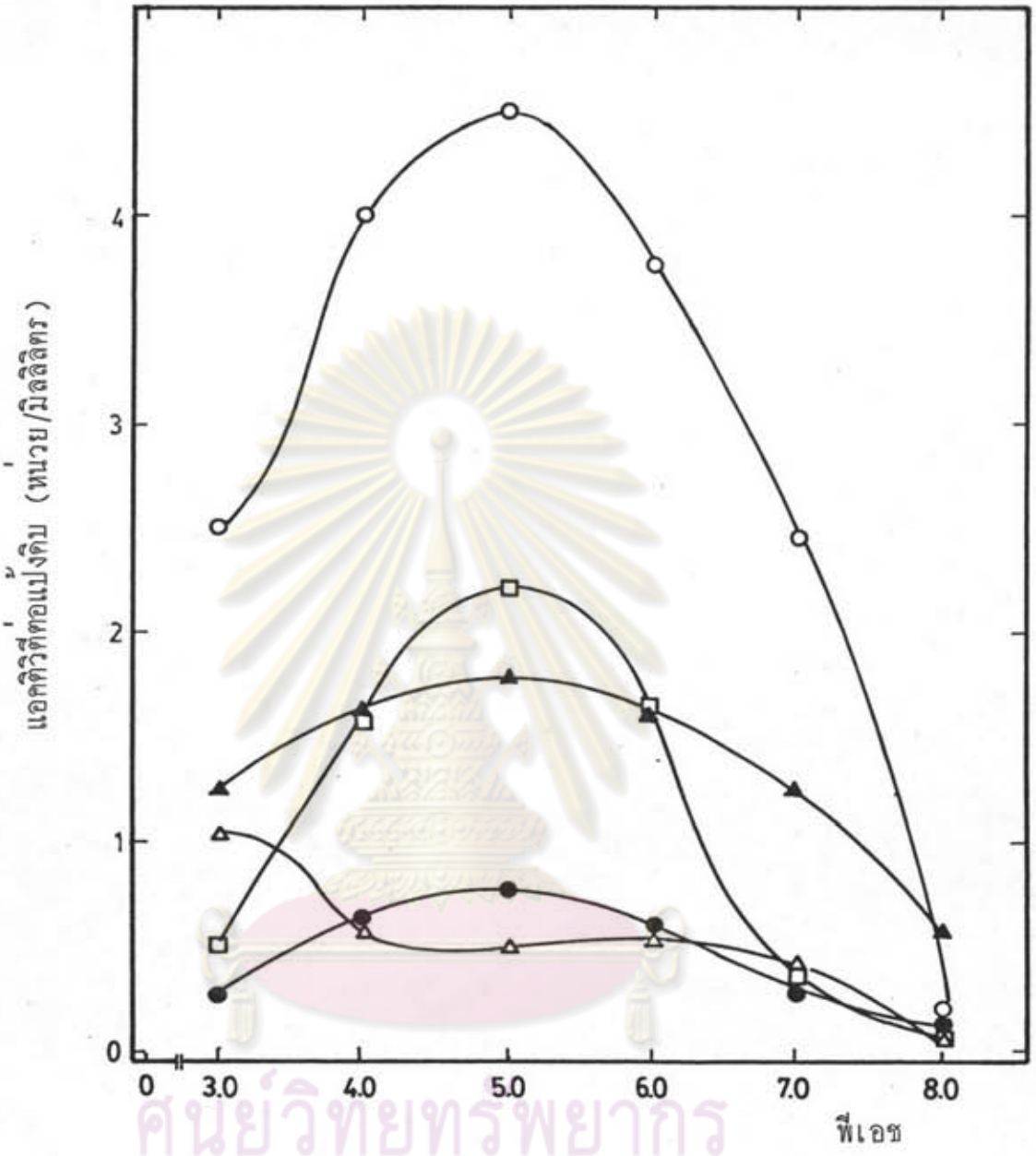
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 แสดงอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบกับแป้งดิบชนิดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายเอนไซม์ (6.5 หน่วย/มิลลิลิตร) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.0-5.0 และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0-8.0 ดูดซับกับแป้งดิบ 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ก่อนและหลังการทดสอบ แล้วคำนวณอัตราการดูดซับตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 10

●——● แป้งข้าวเจ้า
○——○ แป้งข้าวเหนียว
▲——▲ แป้งข้าวสาลี
△——△ แป้งข้าวโพด
□——□ แป้งมันสำปะหลัง

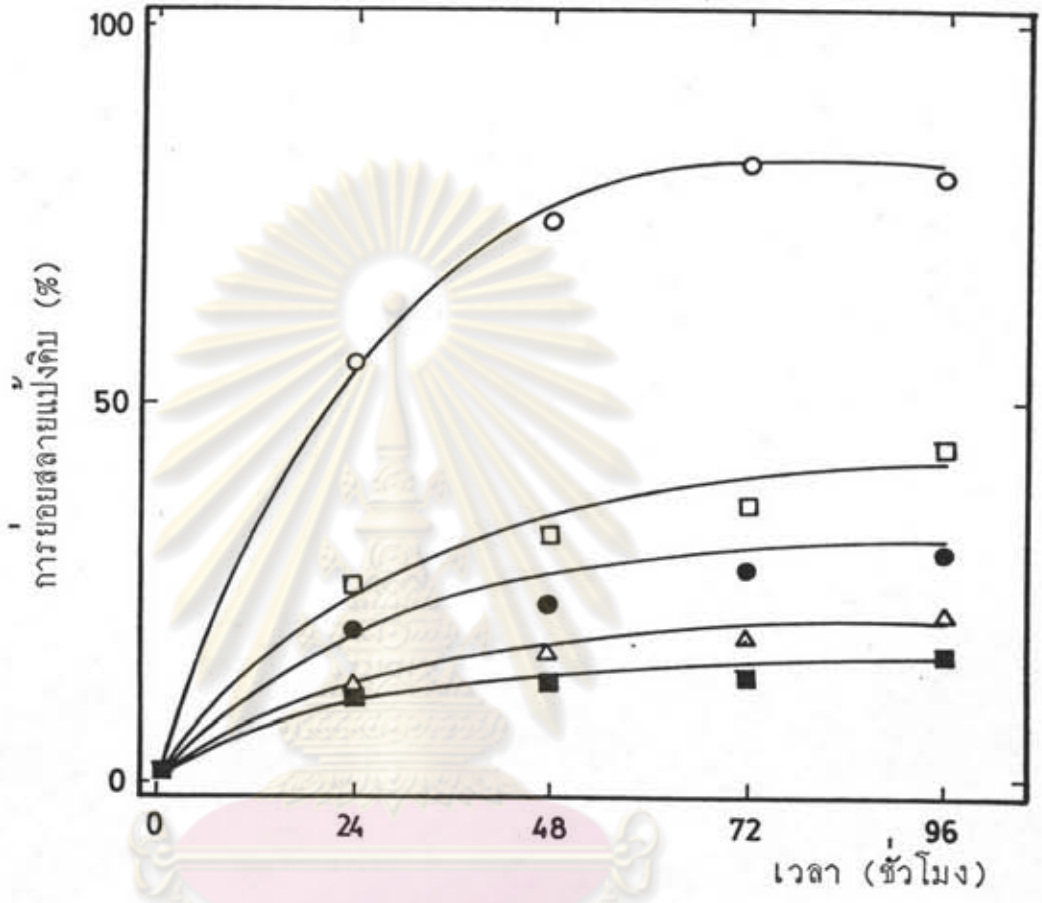
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 แสดงอิทธิพลของพีเอชต่อเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีส ในการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีในการย่อยแป้งดิบในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 3.0-5.0) และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 5.0-8.0) ที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที

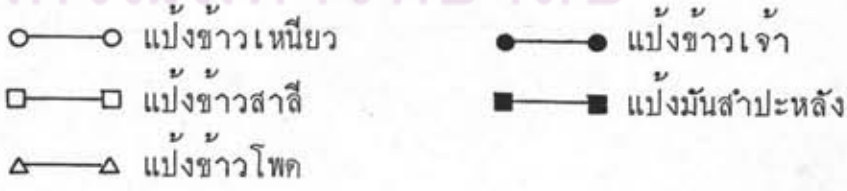
●——● แป้งข้าวเจ้า
○——○ แป้งข้าวเหนียว
▲——▲ แป้งข้าวสาลี
△——△ แป้งข้าวโพด
□——□ แป้งมันสำปะหลัง

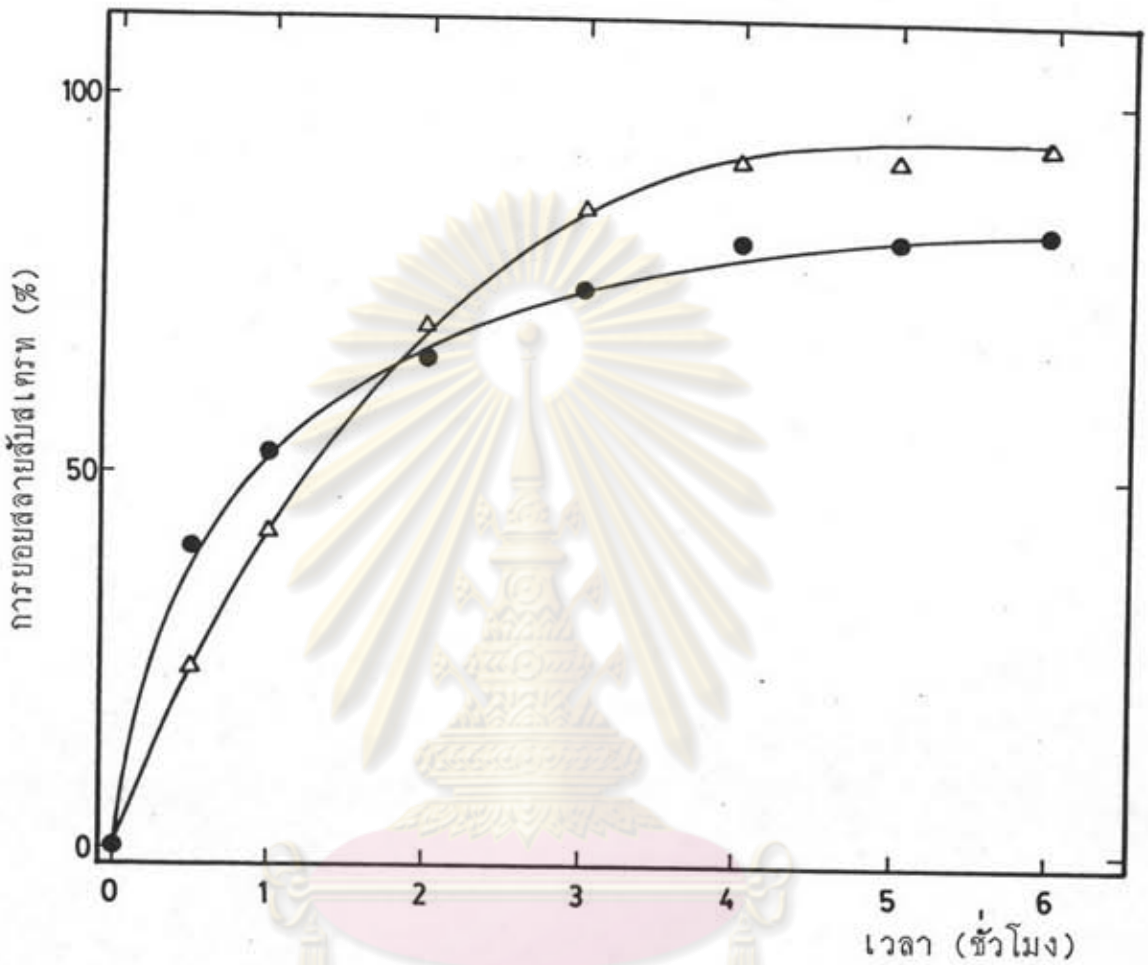
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 ผลการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ เมื่อผสมสารละลายเอนไซม์ 65 หน่วยในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 ปริมาตร 48 มิลลิลิตร กับแป้งดิบ 0.3 กรัม และเติมทอลูอีน 1 มิลลิลิตร ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



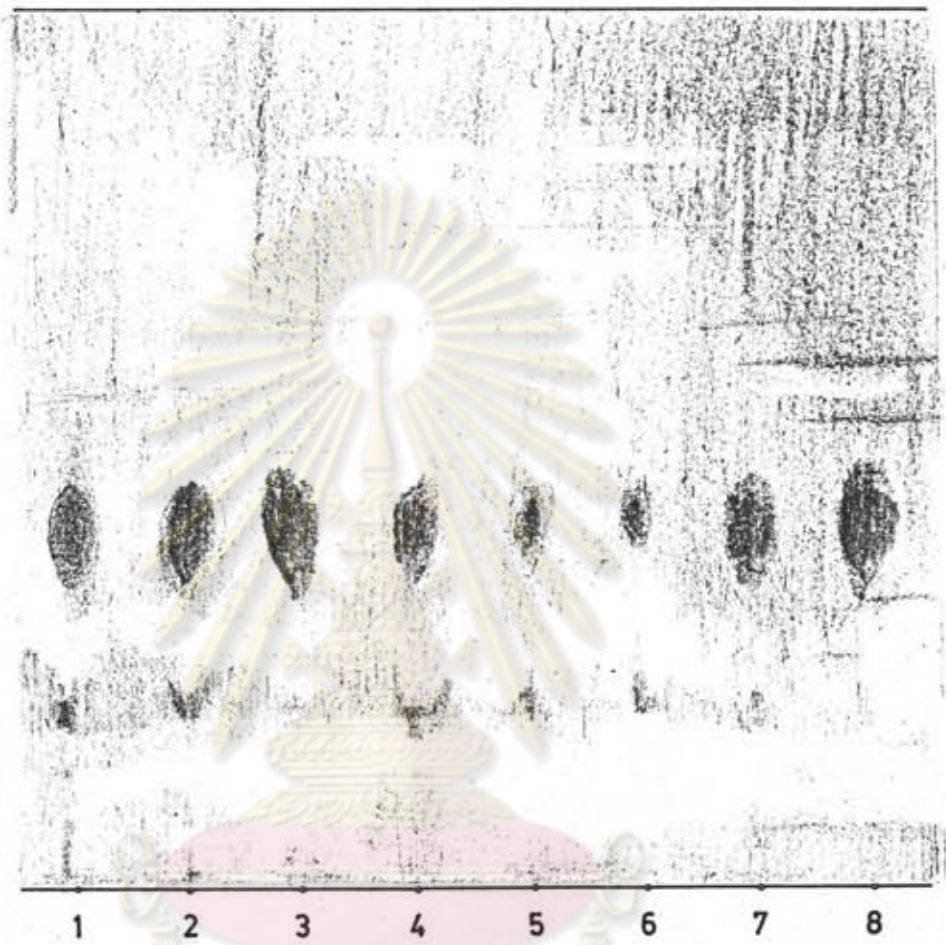


รูปที่ 27 การย่อยสลายแป้งละลายน้ำสุกและไกลโคเจน บ่มสารละลายเอนไซม์ (13.8 หน่วย) 1 มิลลิลิตร กับสารละลายแป้งละลายน้ำหรือไกลโคเจน 100 มิลลิกรัม ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

●——● แป้งละลายน้ำ

△——△ ไกลโคเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 แสดงโครมาโตกราฟีบนกระดาษของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยแป้งของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบจากเชื้ออะไมโลไมซีส กระทำโครมาโตกราฟในตัวทำละลายบิวทานอล ไพริดีน และน้ำ (6:4:3) และตรวจสอบน้ำตาลบนกระดาษด้วยการแช่ในสารละลายเกลือเงินในด่าง

1,กลูโคสมาตรฐาน 2,แป้งข้าวเหนียวดิบ 3,แป้งข้าวสาลีดิบ
4,แป้งข้าวเจ้าดิบ 5,แป้งข้าวโพดดิบ 6,แป้งมันสำปะหลัง
7,แป้งละลายน้ำสุก 8,ไกลโคเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย