บทที่ 1.

บทนำ

คำนำ

ปัจจุบันนี้อุตสาหกรรมการหมักมักจะใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ แล้วเปลี่ยนแป้งให้เป็นกลูโคส เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีของจุลินทรีย์ ซึ่งการเปลี่ยนแป้งให้เป็นกลูโคสนั้นอาจทำได้โดยใช้กรด หรือเอนไซม์ หรือทั้งกรดและเอนไซม์ร่วมกัน การใช้เอนไซม์จะช่วยลดต้นทุนการผลิตและสามารถควบคุมวิธีการผลิตให้มีประสิทธิภาพดี คือได้ผลผลิตสูงขึ้นและมีคุณภาพดี (Petersen, 1975 และ Radley 1976) เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเปลี่ยนแป้งให้เป็นกลูโคสนั้นได้จากแหล่งต่าง ๆ กันคือพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การผลิตเอนไซม์จากพืชและสัตว์นั้นมีปัญหาหลายอย่างโดยเฉพาะปริมาณวัตถุดิบและต้นทุนการผลิต จึงหันมาผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งเอนไซม์ที่มีปริมาณไม่จำกัด

กลูโคอมิเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นกลูโคส ซึ่งสามารถย่อยพันธะแอลฟา-ดี-1,3 1,4 และ 1,6 (α -D-1,3 1,4 and 1,6 linkages) โดยย่อยจากปลายต้นที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซ์ (non reducing end) เข้ามาทีละหนึ่งโมเลกุลของกลูโคส (Pazur and Ando, 1959) กลูโคอมิเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น Rhizopus sp. Aspergillus sp. Endomycopsis sp. โดยมีวิธีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม 2 วิธีคือ โดยวิธีเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งและเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกลูโคอมิเลสจาก Rhizopus sp. นั้นผลิตโดยเลี้ยงราบนอาหารแข็งเพราะถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวเส้นใยของเชื้อราจะจับกันเป็นก้อนใหญ่ (Radley, 1976) และการผลิตกลูโคอมิเลสจากเชื้อราซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งได้เปรียบกว่าการเลี้ยงราในอาหารเหลวหลายประการ เช่น ความคงตัวต่ออุณหภูมิ (temparature stability) และต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH stability) ของเอนไซม์ (Alazard and Raimbault, 1981)

สำหรับการผลิตลูราในประเทศไทยนิยมใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบ (เฉลิม, 2493) โดยเปลี่ยนแป้งให้เป็นกลูโคส ซึ่งใช้แป้งเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงรา Rhizopus sp. บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้า ข้าวเหนียว และรำหยาบ แล้วจึงนำกลูโคสที่ได้ไปหมักเป็นแอลกอฮอล์ด้วย

ยีสต์ ในขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นกลูโคสนี้ทางโรงงานสุรายังมิได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสปอร์เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น การควบคุมการทำแป้งเชื้อและการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส (saccharification) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงสภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ การหาสภาพที่เหมาะสมและปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตกลูโคอมิเลสจาก Rhizopus oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง การสกัดเอนไซม์ให้กึ่งบริสุทธิ์ คุณสมบัติบางประการของกลูโคอมิเลสและหาสภาพที่เหมาะสมต่อการแซคคาริฟิเคชั่นโดยใช้แป้งเชื้อที่ผลิตขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของรา R. oryzae
2. เพื่อศึกษาหาสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของรา R. oryzae จากวัตถุดิบในประเทศ
3. หาวิธีสกัดและทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์
4. ศึกษาการแซคคาริฟิเคชั่นข้าวเหนียวโดยใช้แป้งเชื้อที่ผลิตขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสภาพการทำแป้งเชื้อจากวิธีดั้งเดิมตามประสพการณ์ที่ได้รับจากโรงงาน
2. หากรรมวิธีการผลิตกลูโคอมิเลสให้เพิ่มขึ้น โดยศึกษาสภาพที่เหมาะสมดังนี้คือ ส่วนประกอบของอาหาร ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น (inoculum) ความชื้นของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารและระยะเวลาที่สร้างกลูโคอมิเลสสูงสุด
3. ขยายสเกลการผลิตแป้งเชื้อให้ใหญ่ขึ้น
4. หาวิธีสกัดและการทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์
5. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของกลูโคอมิเลสบริสุทธิ์
6. ศึกษาการย่อยแป้งข้าวเหนียวให้เป็นกลูโคสโดยใช้แป้งเชื้อ

การสำรวจการวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

วัตถุดิบ

ในประเทศไทยนิยมใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบในการผลิตสุรา เนื่องจากข้าวเหนียวให้กลิ่นรสที่ดีกว่าข้าวเจ้า (เฉลิม, 2493 มนตรี, 2521) ข้าวเหนียวและข้าวเจ้าประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ซึ่งมีสูตรทั่ว ๆ ไปคือ $(C_6H_{12}O_6)_n$ และ n มีค่าไม่น้อยกว่า 1,000 โมเลกุลของแป้ง

ประกอบด้วย แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนส (∝ -D-glucopyranose) ซึ่งต่อด้วยพันธะ 1,4-กลูโคสิดิก (1,4-glucosidic linkages) โดยสร้างสะพานออกซิเจน (oxygen bridge) ขึ้นระหว่างคาร์บอนตัวที่หนึ่งกับคาร์บอนตัวที่สี่ของกลูโคสโมเลกุลตัวถัดไป แป้งส่วนใหญ่ประกอบด้วย อมิโลส (amylose) และอมิโลเปคติน (amylopectin) อมิโลสเป็นโมเลกุลของแป้งที่เกิดจากกลูโคสประมาณ 1,100-4,400 โมเลกุลต่อกันเป็นสายโดยไม่มีการแตกแขนง ส่วนอมิโลเปคตินต่างจากอมิโลสตรงที่มีการแตกแขนงที่พันธะ 1, 3 หรือ 1, 6 และโมเลกุลของอมิโลเปคตินใหญ่กว่าอมิโลสมาก (Adams, 1953 Mayer, et al, 1951 and Reed, 1966)

ข้าวเจ้ามีอมิโลสประมาณ 16-17 % ข้าวเหนียวมีอมิโลเปคตินเป็นส่วนใหญ่และมีอมิโลสน้อยกว่าข้าวเจ้าคือมีอมิโลสเพียง 0-7 % (Juliani, et al 1964) ข้าวที่ใช้ผลิตสุราในประเทศไทยเป็นข้าวสาร จึงขอยกตัวอย่างองค์ประกอบของข้าวสารเจ้าและข้าวสารเหนียวดังได้แสดงไว้ในตารางข้างล่างนี้ (กรมพลศึกษา, 2510)

องค์ประกอบของข้าวสารในประเทศไทย (100 กรัม)

องค์ประกอบ	ข้าวสารเหนียว	ข้าวสารเจ้า
ความชื้น (กรัม)	11.9	11.0
แคลอรี่ (หน่วย)	366.0	367.0
ไขมัน (กรัม)	1.0	0.6
คาร์โบไฮเดรท (กรัม)	79.7	80.4
เส้นใย (กรัม)	0.2	0.3
โปรตีน (กรัม)	6.9	7.3
แคลเซียม (กรัม)	16.0	8.0
ฟอสฟอรัส (มก.)	95.0	104.0
เหล็ก (มก.)	1.1	1.0
ไวตามิน (มก.)	0.17	0.18
ไนอาซีน (มก.)	2.6	2.5

ลักษณะทางเคมีและการทำงานของกลูโคอมิเลส

Underkofler และ Hickey (1954) รายงานว่ากลูโคอมิเลสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการย่อยแป้ง (amylolytic enzymes) ให้เป็นกลูโคส โดยจัดกลูโคอมิเลสอยู่ในพวกไฮโดรเลส (hydrolase) เร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เอนไซม์ที่ย่อยแป้งมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิดคือ แอลฟา-อมิเลส (α -amylase) เบตา-อมิเลส (β-amylase) กลูโค-อมิเลส (glucoamylase) (Windish and Mhatre, 1965) และไอโซอมิเลส (isoamylase)

แอลฟา-อมิเลส เป็นเอนไซม์ที่พบในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถย่อยแป้งที่พันธะ แอลฟา-ดี-1,4 แบบสุ่ม (random) ทำให้ได้ลิมิต เดกตริน (limit dextrin) มอลโตสและกลูโคส (Windish and Mhatre, 1965)

เบตา-อมิเลส เป็นเอนไซม์ที่พบมากในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวมอลต์ และถั่วเหลือง สามารถย่อยแป้งที่พันธะ แอลฟา-ดี-1,4 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซ์ทีละสองโมเลกุลของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยพันธะ แอลฟา-ดี-1,6 ทำให้ได้น้ำตาลมอลโตสเป็นส่วนใหญ่ และลิมิต เดกตรันโมเลกุลใหญ่ ๆ (Windish and Mhatre, 1965)

กลูโคอมิเลสเป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อสัตว์และจุลินทรีย์ สามารถย่อยสลายแป้งได้อย่างสมบูรณ์ โดยย่อยได้ทั้งพันธะ แอลฟา-ดี-1,3 1,4 และ 1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซ์เข้าไปทีละหนึ่งโมเลกุลของกลูโคส ผลที่ได้คือกลูโคส (Hopkin, 1946 Corman Hopkin, 1946 Corman and Lauglke, 1948 Pazur and Ando, 1959 Adams, 1953 Pazur, 1965 Windish and Mhatre, 1965),

ไอโซอมิเลสเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์ สามารถย่อยแป้งที่พันธะ แอลฟา-ดี-1,6 ซึ่งจะตัดโมเลกุลของแป้งให้เป็นสายตรง ๆ (Boyer, 1971)

Pazur (1971) และ Lineback และ Aira (1972) ได้แยกกลูโคอมิเลสให้บริสุทธิ์จาก Aspergillus niger โดยผ่านลง ดี.อี.เอ.อี.เซลลูโลส (DEAE cellulose) ได้กลูโคอมิเลสที่เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) 2 ชนิดที่มีขนาดของโมเลกุลต่างกันคือ 112,000 และ 99,000 โดยที่คาร์โบไฮเดรตซึ่งต่ออยู่กับโปรตีนในโมเลกุลของกลูโคอมิเลสชนิดที่ 2 ลดลงครึ่งหนึ่งของกลูโคอมิเลสชนิดที่ได้มาในปี 1975 Hayashida ได้ทดลองเลี้ยง A. awamori var kawachi ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบแตกต่างกันสามารถคัดเลือกให้ราชนิด

ไม่ว้างกลูโคอมิเลสชนิดใดชนิดหนึ่งได้ และสามารถ สว้างกลูโคอมิเลสได้ 3 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 90,000, 83,000 และ 57,000 ตามลำดับ และมีความสามารถในการย่อยแป้งแตกต่างกัน กลูโคอมิเลสชนิดที่หนึ่งถูกย่อยสลายด้วยโปรตีเอส (Protease) โดยจะย่อยไกลโคเปปไตด์ (glycopeptide) ออกจากโมเลกุลของกลูโคอมิเลสชนิดที่หนึ่งออกไปบางส่วน เกิดเป็นกลูโคอมิเลสชนิดที่สองและสาม ตามลำดับ โดยจะทำให้กลูโคอมิเลสชนิดที่สองและสามมีความสามารถในการจับกับแป้งลดลง นอกจากนี้ความคงตัวต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดเป็นด่างลดลงด้วย (Hayashida, et al. 1976 Yoshino and Hayashida, 1978 Hayashida and Yoshino, 1978)

Takahashi และคณะ (1978) ได้แยกกลูโคอมิเลสจาก Rhizopus sp. ให้บริสุทธิ์โดยผ่านลงใน ดี.อี.เอ.อี เซฟาเดกซ์ เอ-50 (DEAE Sephadex A-50) ซี.เอม. เซฟาเดกซ์ ซี-50 (C.M. Sephadex C-50) และไบโอเจล พี-150 (Bio. Gel P-150) พบว่ามีกลูโคอมิเลส 3 ชนิด เมื่อศึกษาคุณสมบัติของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดมีความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกริยาที่ 4.5-5.0 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่ 50°c และต่อความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.0-8.0

กลูโคอมิเลสและอมิเลสมีแหล่งที่ผลิตได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ดังแสดงไว้ในตารางข้างล่างนี้ (Windish and Mhatre, 1965)

แหล่ง	ชนิดของเอนไซม์	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
พืช		
ข้าวมอลต์	α , β	M
มันเทศ	β	M
ถั่วเหลือง	β	M
สัตว์		
น้ำลาย	α	D , M
ตับอ่อน	α	D , M
จุลินทรีย์		
Bacillus subtilis	α	M , D
B. stearothermophillus	α	M , D

แหล่ง	ชนิดของเอนไซม์	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
Clostridium sp.	G.A.	G. (100 %)
Rhizopus sp.	G.A., ∝	G. (100 %)
Aspergillus niger	G.A.,∝,trans	G. (80 %)
Aspergillus oryzae	∝,G.A.,Trans	G. (70 %)
Endomycopsis sp.	∝,G.A.	G. (90 %)
Oospora sp.	∝	D.

หมายเหตุ

G.A. = กลูโคอมิเลส

∝ = แอลฟา-อมิเลส

β = เบตา-อมิเลส

trans = ทรานกลูโคซิเดส

M. = มอลโตส

D. = เดกซ์ตริน

G. = กลูโคส

จุลินทรีย์ที่ผลิตกลูโคอมิเลส

กลูโคอมิเลสสามารถผลิตได้จากรา และยีสต์ (Gutcho, 1974 Sukumavasi, et al 1975 ปาริชาติ, 2519) ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีและวัตถุดิบที่ใช้ผลิต ในปี ค.ศ.1894 Calmette ได้แยกจุลินทรีย์จากลูกแป้งจีน (chinese yeast) พบว่า Rhizopus sp. สามารถย่อยแป้งได้ จึงมีการผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งจาก Rhizopus sp. หลายสายพันธุ์ เช่น R. nivlus R. delemar R. oryzae และ R. javanicus (Hochenhull, 1976)

Sukumavasi และคณะ (1975) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกลูโคอมิเลสจากลูกแป้ง 10 แหล่งได้จุลินทรีย์ 23 ชนิดคือ ยีสต์ 7 ชนิด รา 15 ชนิด และแบคทีเรีย 1 ชนิด ปรากฏว่า

A. niger และ Endomycopsis fibuligera สามารถสร้างกลูโคอมิเลสได้สูงสุด

จากรายงานของ Kato และคณะ (1976) พบว่า E. fibuligera ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งของอินโดนีเซีย (Ragi) สามารถสร้างกลูโคอมิเลสได้เช่นเดียวกับ E. fibuligera สายพันธุ์อื่น ๆ ชัยวัฒน์ (2520) ได้แยกจุลินทรีย์จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งสุรา พบว่ามีเชื้อรา 5 สกุลคือ Rhizopus sp. Mucor sp. Amylomyces sp. Penicillium sp. และ Aspergillus sp. ซึ่ง Amylomyces sp. สามารถสร้างอมิเลสได้สูงสุด Krzichowska และ Urbanek (1975) กล่าวว่าเชื้อราที่สามารถผลิตกลูโคอมิเลสได้คือ A. oryzae A. niger A. awamori A. phoenicus R. delemar R. javanicus E. capsularis และ Coniophora cerebella และมีการศึกษากลูโคอมิเลสจาก A. niger มากที่สุด

Feniksova (1957) อธิบายสภาพการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ว่าขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ คือ ปริมาณและส่วนประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะทางเคมีฟิสิกส์ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ระยะเวลาในการเลี้ยงจุลินทรีย์ และคุณสมบัติของจุลินทรีย์แต่ละชนิด สำหรับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตอมิเลสนั้น Hockenhull (1967) กล่าวว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตอมิเลสนั้นต้องประกอบด้วย ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ความสมดุลย์ของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ และต้องมีสารที่เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์

จากการทดลองของ Pichyangkura และคณะ (1981) โดยเลี้ยงรา A. oryzae บนข้าวไทยชนิดต่าง ๆ 5 ชนิดที่ความชื้น 37-40 % เพื่อผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้ง (แอลฟา-อมิเลส และกลูโคอมิเลส) พบว่าข้าวหอมมะลิให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงสุด และข้าวเหนียวให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดต่ำสุด Borton และคณะ (1972) รายงานว่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอมิเลสนั้นประมาณ 3.0-5.0 ขึ้นอยู่กับแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้เลี้ยงเชื้อ สำหรับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับแหล่งของไนโตรเจน โดยถ้าเลี้ยง A. niger ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ พบว่าเกลือแร่ที่ต้องการจำนวนน้อย ๆ (trace element) จะทำให้การผลิตกลูโคอมิเลสเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ (Lineback et al, 1966)

การเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งนั้นความชื้นของอาหารมีความสำคัญมาก (Nishio et al., 1979 Raimbault และ Alazard, 1980) ซึ่งพบว่าความชื้น 40-55 % เป็นความชื้นที่เหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา อรุณ (2498) ได้ใช้แป้งเชื้อในการผลิตสุราโดยเลี้ยงราบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเหนียวและแกลบ ใช้แอมโมเนียมทาร์เทรต (ammonium tartrate) 0.1 % เป็นแหล่งของไนโตรเจน และใส่น้ำ 45 % พบว่า Rhizopus sp. ซึ่งแยกได้จากแป้งเชื้อ (koji) จากประเทศญี่ปุ่นสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ดีแล้วนำไปหมักต่อเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์

การทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์

Razzaque และ Ueda (1978) ได้แยกกลูโคอมิเลสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก A. oryzae โดยใช้แป้งเชื้อ (mold bran) แช่ในน้ำนาน 16 ชม. แล้วกรองเอาสารละลายมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 % และเอธานอลที่ความเข้มข้น 70 % นำเอนไซม์ที่ได้ผ่านลงใน ดี.อี.เอ.อี.เซฟาเดกซ์ 10-25 โครมาโตกราฟี โดยชะ (elute) ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0-0.2 โมลาร์ ได้กลูโคอมิเลส 3 ชนิด แล้วนำกลูโคอมิเลสแต่ละชนิดผ่านลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 โครมาโตกราฟี (Sephadex G-200) พบว่าแอคติวิตีเฉพาะ (specific activity) เพิ่มขึ้น 40 เท่าจากเอนไซม์ที่เริ่มสกัด (crude enzyme) เมื่อทำโพลีอคริลาไมด์-เจล อิเลกโตรโฟรีซีส แล้วกลูโคอมิเลสแต่ละชนิดมีแถบเดียวในแท่งเจล

Takahashi และคณะ (1978) ได้ทำกลูโคอมิเลสให้บริสุทธิ์โดยใช้กลูโคอมิเลสซึ่งผลิตขายจาก Rhizopus sp. ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50-70 % แล้วผ่านเอนไซม์ลงในเซฟาเดกซ์ จี-75 โครมาโตกราฟี ดี.อี.เอ.อี เซฟาเดกซ์ เอ-50 เซฟาเดกซ์ จี-75 ซี.เอม.เซฟาเดกซ์ ซี-50 (C.M. Sephadex C-50) และไบโอเจล พี-150 (Bio Gel P-150) ได้กลูโคอมิเลส 3 ชนิด เมื่อนำโพลีอคริลาไมด์เจล อิเลกโตรโฟรีซีส แล้วได้แถบโปรตีนแถบเดียวในแท่งเจล

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาสภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นหาสภาพของอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอมิเลส การทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณ-สมบัติบางประการของกลูโคอมิเลสและศึกษาการแซคคาริฟิเคชั่นข้าวเหนียวโดยใช้แป้งเชื้อที่ผลิตขึ้น