บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การหาสารตั้งต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae

1.1 การหาสารตั้งต้นและปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์

ผลการเลี้ยง R. oryzae ในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวเจ้าผสมรำข้าวสาลี ปลายข้าวเจ้าผสมกากถั่วเหลือง และปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบ อัตราส่วน 4:1 ใส่น้ำ 15 17 20 23 26 29 และ 32 % ตามลำดับ พบว่าราสร้างสปอร์มากที่สุดในปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบ โดยเฉพาะที่ใส่น้ำ 29 % ได้สปอร์ $8.5x10^{12}$ สปอร์/มล. ส่วนในปลายข้าวเจ้าผสมรำข้าวสาลี ถ้าใส่น้ำน้อยกว่า 17 % เชื้อราจะไม่เจริญ และถ้าใส่น้ำลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 23-26 % จะได้สปอร์ $7x10^{12}$ สปอร์/มล. และในปลายข้าวเจ้าผสมกากถั่วเหลือง ถ้าใส่น้ำน้อยกว่า 20 % เชื้อราจะไม่มีการเจริญ และถ้าใส่น้ำ 23-26 % ได้สปอร์ $5x10^{12}$ สปอร์/มล. สำหรับในปลายข้าวเจ้าถ้าใส่น้ำ 17 % ได้สปอร์ $1x10^{12}$ สปอร์/มล. และถ้าใส่น้ำมากกว่า 23 % จะทำให้เชื้อราเจริญดีมาก แต่ไม่มีการสร้างสปอร์ ดังแสดงในตารางที่ 1

1.2 อัตราส่วนอย่างละเอียดของปลายข้าวเจ้าต่อรำหยาบที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์

จากการเลี้ยง R. oryzae ในอาหารที่ประกอบด้วยปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบในอัตราส่วนอย่างละเอียดเพิ่มขึ้น พบว่าปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบในอัตราส่วน 9:1 ให้สปอร์สูงสุดคือ $9.5x10^{12}$ สปอร์/มล. และเมื่อเพิ่มปริมาณรำหยาบทำให้การสร้างสปอร์ลดลงดังแสดงในกราฟที่ 1

2. สารอาหารและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

2.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ R. oryzae

2.1.1 ผลของแอมโมเนียมทาร์เทรตต่อการเจริญของ R. oryzae

จากการหาการเจริญของ R. oryzae โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของเชื้อราพบว่าแอมโมเนียมทาร์เทรตส่งเสริมการเจริญเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 กรัม/ลิตรขึ้นไป ดังแสดงในกราฟที่ 2

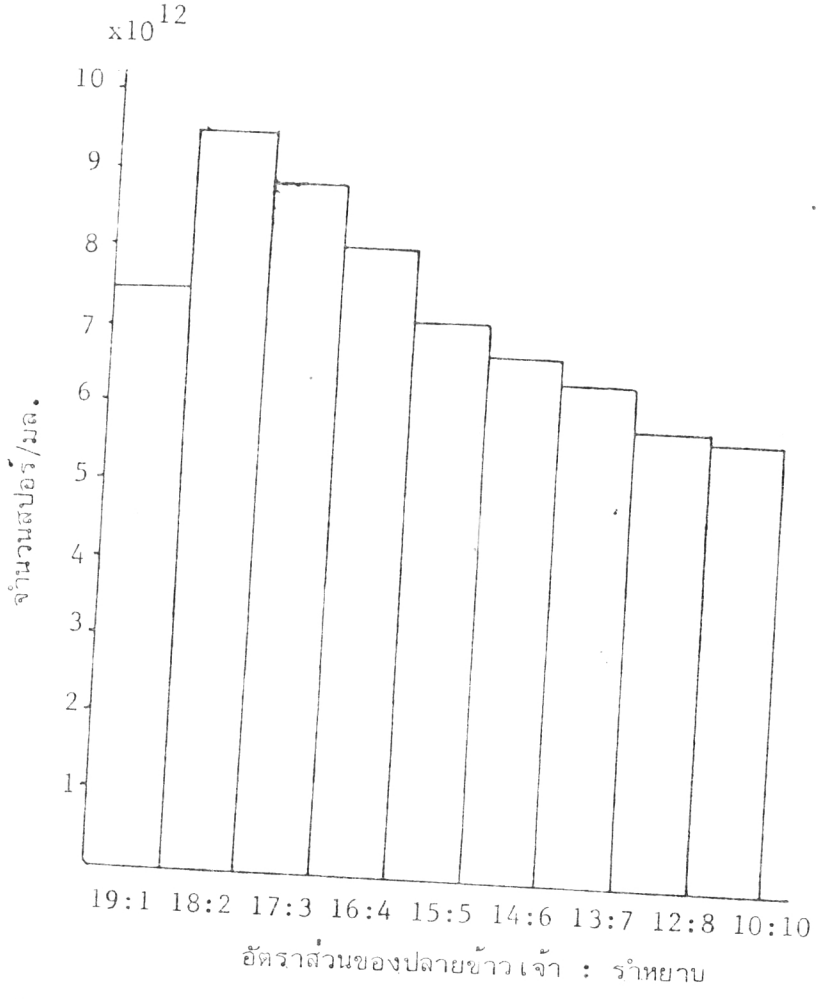
2.1.2 ผลของโพลีเปปโตนต่อการเจริญของ R. oryzae

จากการหาการเจริญของ R. oryzae โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของเชื้อรา พบว่าโพลีเปปโตนส่งเสริมให้มีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-10 กรัม/ลิตร แต่

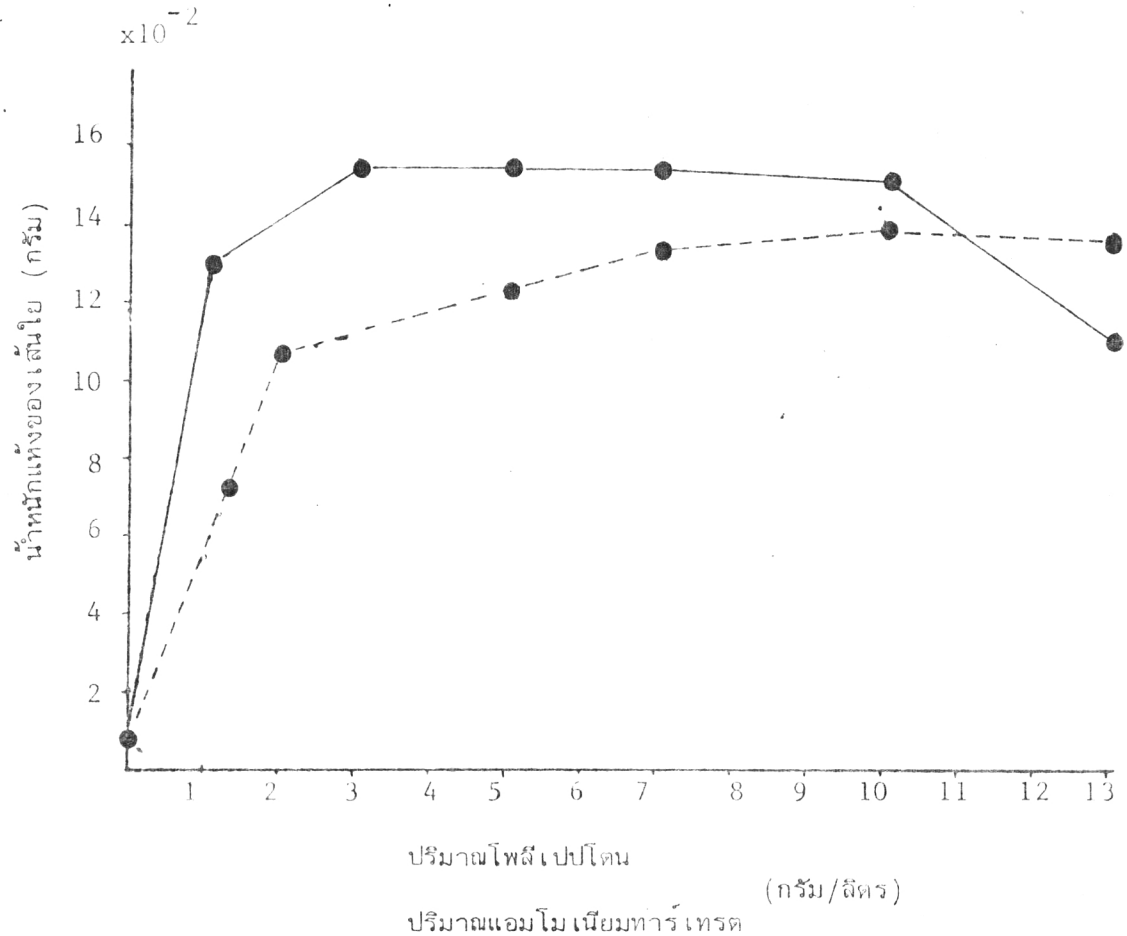
ตารางที่ 1 จำนวนสปอร์ของ R. oryzae ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบ รำข้าวสาลี กากถั่วเหลือง และแปรผันปริมาณน้ำโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน

จำนวนสปอร์/มล. / อาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำ (%)						
	15	17	20	23	26	29	32
ปลายข้าวเจ้า	5.1×10^{8}	1.3×10^{12}	8.3×10^{11}	0	0	0	0
ปลายข้าวเจ้า : รำข้าวสาลี อัตราส่วน 4:1	0	0	1.0×10^{12}	7.5×10^{12}	7.0×10^{12}	4.1×10^{12}	-
ปลายข้าวเจ้า : กากถั่วเหลือง อัตราส่วน 4:1	0	0	0	5.1×10^{12}	6.0×10^{12}	2.1×10^{12}	-
ปลายข้าวเจ้า : รำหยาบ อัตราส่วน 4:1	3.6×10^{12}	4.0×10^{12}	4.1×10^{12}	4.5×10^{12}	6.9×10^{12}	8.5×10^{12}	7.5×10^{12}

หมายเหตุ - หมายถึงไม่มีการทดลอง



กราฟที่ 1 แสดงจำนวนสปอร์ของ R. oryzae ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนของปลายข้าวเจ้าต่อรำหยาบแตกต่างกัน ใส่น้ำ 29 % บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°c เป็นเวลา 3 วัน



กราฟที่ 2 ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรที่ 2

_____ โพลีเปปโตน

-------- แอมโมเนียมทาร์เทรต

เลี้ยง R. oryzae ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน หาน้ำหนักแห้งของเส้นใยตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.1

ถ้าใส่โพสีเปปโตนมากกว่า 10 กรัม/ลิตร จะทำให้การเจริญลดลง ดังแสดงในกราฟที่ 2

2.2 เกลือแร่ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

2.2.1 ผลของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

จากการหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีและชั่งน้ำหนักแห้งของเชื้อราซึ่งเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วยโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0 1 3 และ5 กรัม/ลิตร พบว่าโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตส่งเสริมการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 2 กรัม/ลิตร จะมีการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดและการสร้างกลูโคอมิเลสจะลดลงที่ความเข้มข้นสูงกว่า 2 กรัม/ลิตร ดังแสดงในกราฟที่ 3

2.2.2 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

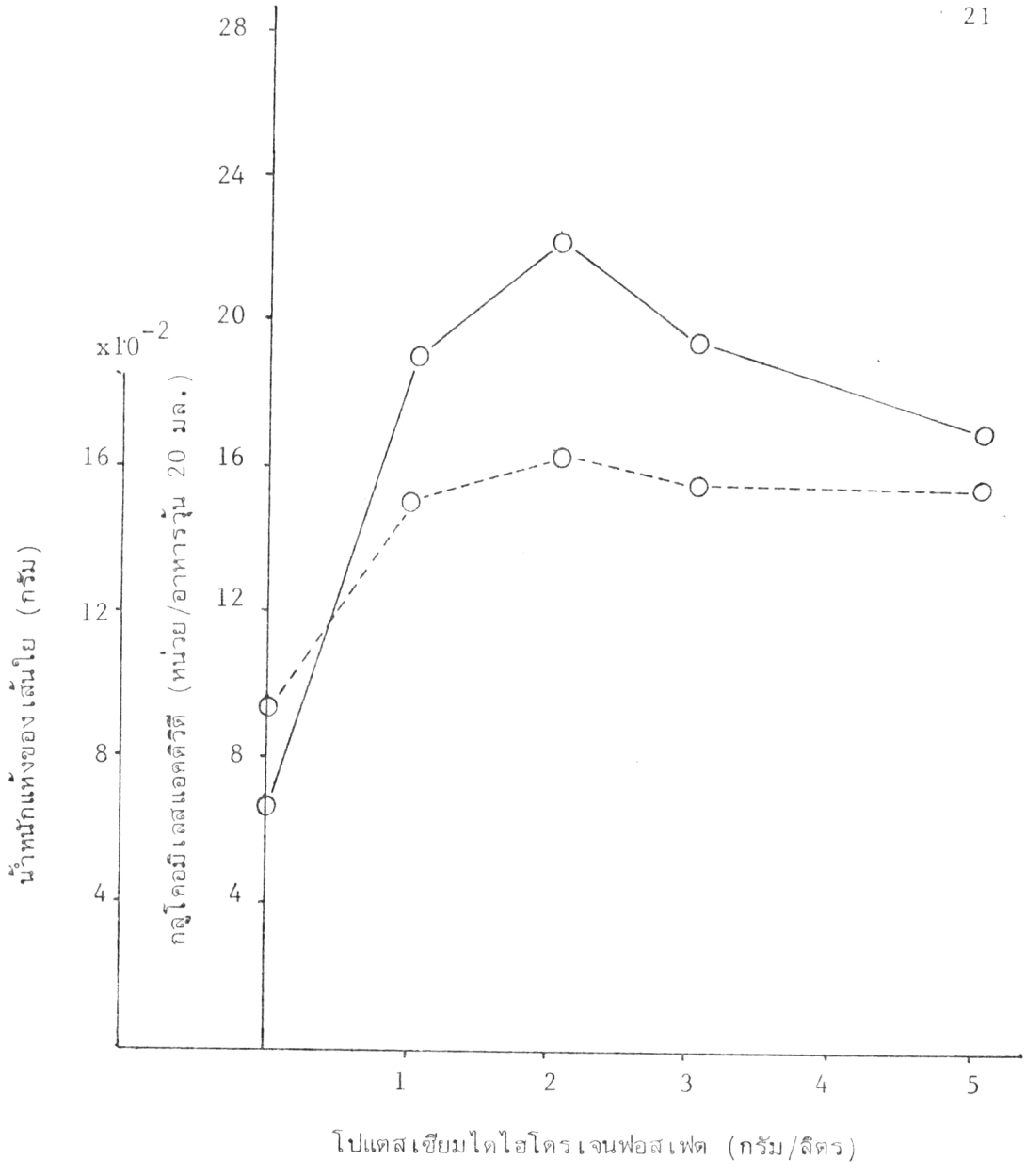
จากการหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีและชั่งน้ำหนักแห้งของเชื้อรา ซึ่งบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตรตามลำดับ พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตส่งเสริมการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0-1.5 กรัม/ลิตร ทำให้มีการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุด การสร้างกลูโคอมิเลสจะลดลงถ้ามีแมกนีเซียมซัลเฟตมากกว่า 1.5 กรัม/ลิตร ดังแสดงในกราฟที่ 4

2.2.3 ผลของเฟอร์ริกซัลเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

จากการหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีและชั่งน้ำหนักแห้งของเชื้อราซึ่งเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วยเฟอร์ริกซัลเฟต 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.5 กรัม/ลิตรตามลำดับ พบว่าเฟอร์ริกซัลเฟตไม่มีผลต่อการเจริญ แต่ทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลงที่ทุก ๆ ความเข้มข้น ดังแสดงในกราฟที่ 5

2.2.4 ผลของคอปเปอร์ซัลเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

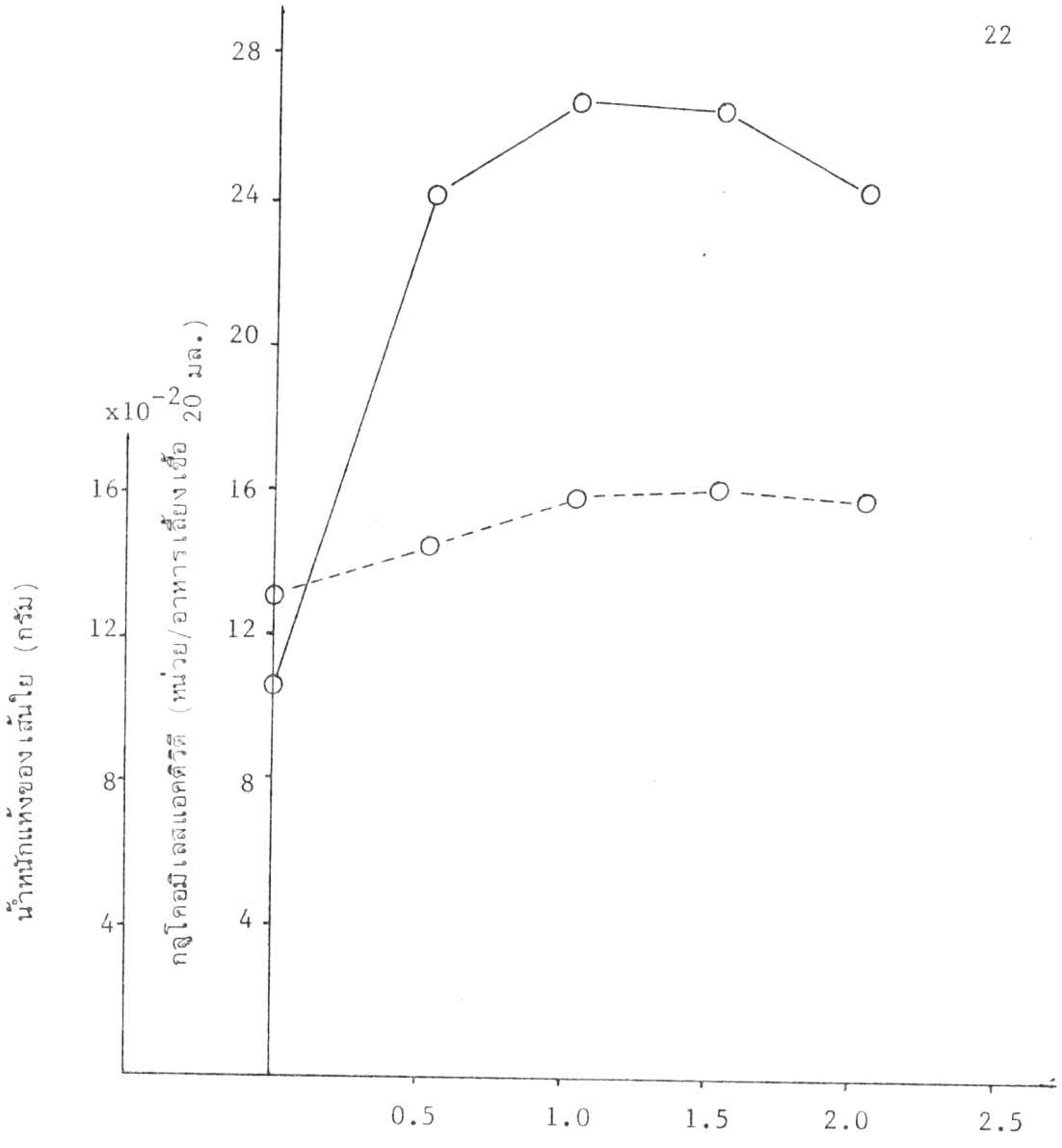
จากการหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีและชั่งน้ำหนักแห้งของเชื้อราซึ่งเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต 0 5 10 15 และ 25 ไมโครกรัม/ลิตร พบว่าคอปเปอร์ซัลเฟต



กราฟที่ 3 ผลของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารวุ้นสูตรที่ 2

_____ กลูโคอมิเลสแอคติวิตี --- น้ำหนักของเส้นใยแห้ง

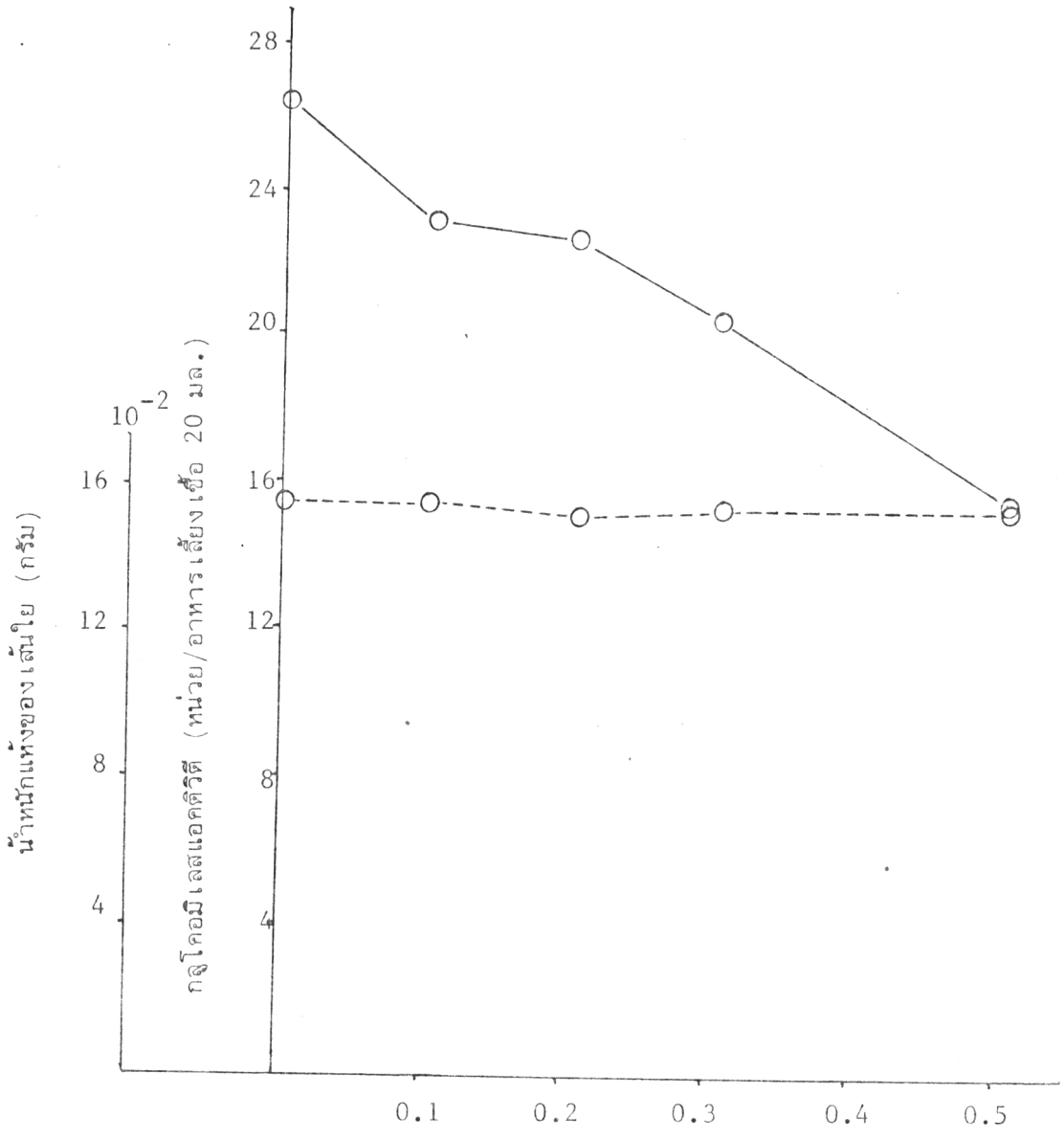
เลี้ยง R. oryzae ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน หาน้ำหนักแห้งของเส้นใยดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และกลูโคอมิเลสแอคติวิตีดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3



กราฟที่ 4 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารวุ้นสูตรที่ 2

——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี --- น้ำหนักของเส้นใยแห้ง

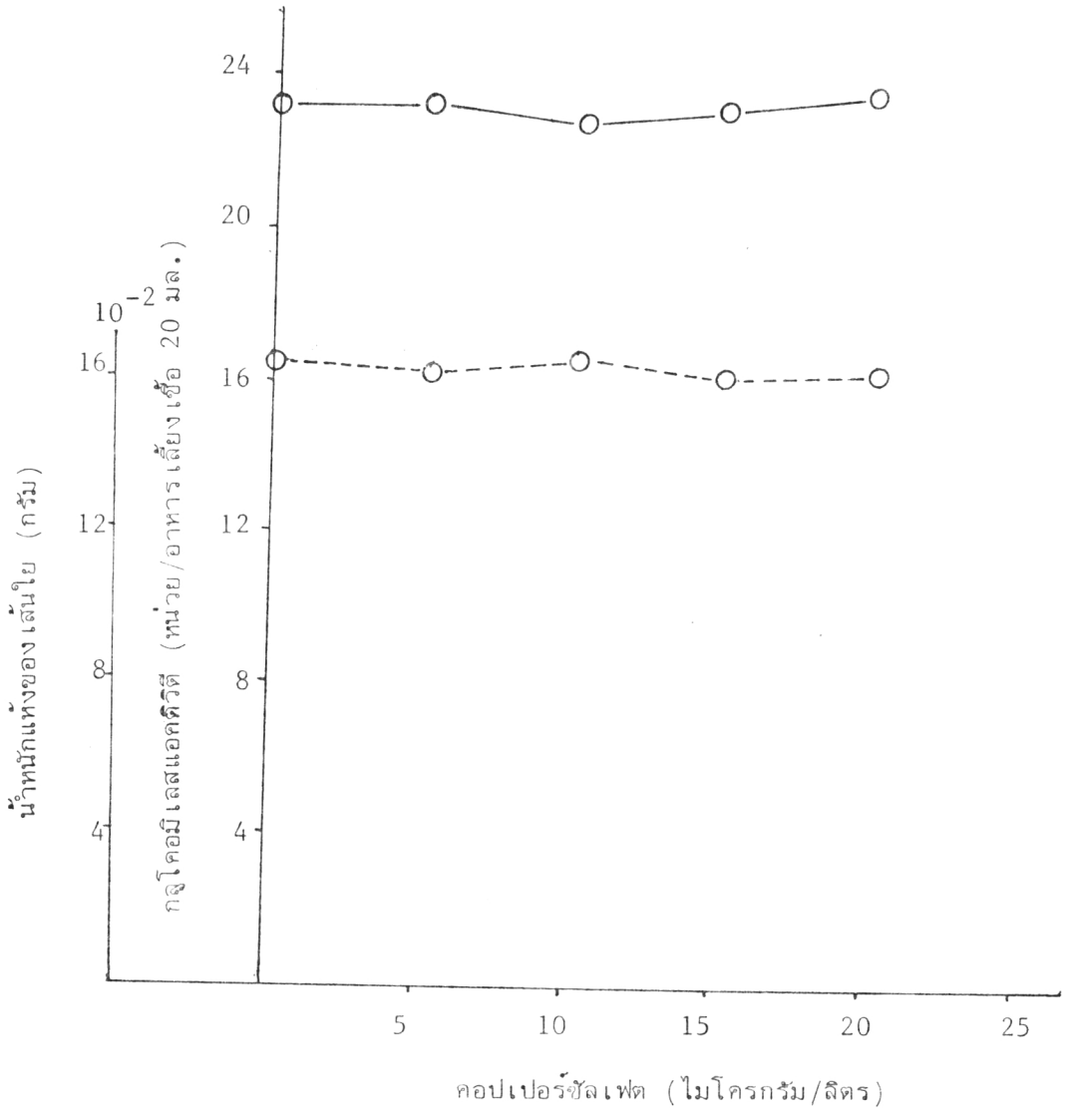
เลี้ยง R. oryzae ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน หาน้ำหนักแห้งของเส้นใยดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และกลูโคอมิเลสแอคติวิตีดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3



กราฟที่ 5 ผลของเฟอร์ริกซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรที่ 2

——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี --- น้ำหนักแห้งของเส้นใย

เลี้ยง R. oryzae ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน หาน้ำหนักแห้งของเส้นใยดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3



กราฟที่ 6 ผลของเฟอร์ริกซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรที่ 2

——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี ---- น้ำหนักแห้งของเส้นใย

เลี้ยง R. oryzae ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน หาน้ำหนักแห้งของเส้นใยดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 4.1 และหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3

ในปริมาณที่ใช้ในการทดลองนี้ คือตั้งแต่ 0-25 ไมโครกรัม/ลิตรไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ดังแสดงในกราฟที่ 6

3. การหาสภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสบนอาหารแข็ง

3.1 ความชื้นของอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยง R. oryzae เพื่อผลิตกลูโคอมิเลส

ผลการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยส่วนผสมของปลายข้าวเจ้าบด ปลายข้าวเหนียวบด และรำหยาบ อัตราส่วน 5:5:2 แล้วใส่น้ำกลั่น 30 40 50 และ 60 % โดยปริมาตร/น้ำหนักตามลำดับ พบว่าการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดในอาหารแข็งที่ใส่น้ำ 40 % โดยใช้เวลา 48 ชม. คือให้กลูโคอมิเลสแอคติวิตี 107.5 หน่วย/กรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับในอาหารแข็งที่ใส่น้ำ 50 % การสร้างกลูโคอมิเลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามเวลา ส่วนในอาหารแข็งที่ใส่น้ำ 30 และ 60 % นั้น การสร้างกลูโคอมิเลสค่อนข้างต่ำคือ 36.9 และ 28.8 หน่วย/กรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ ดังแสดงในกราฟที่ 7

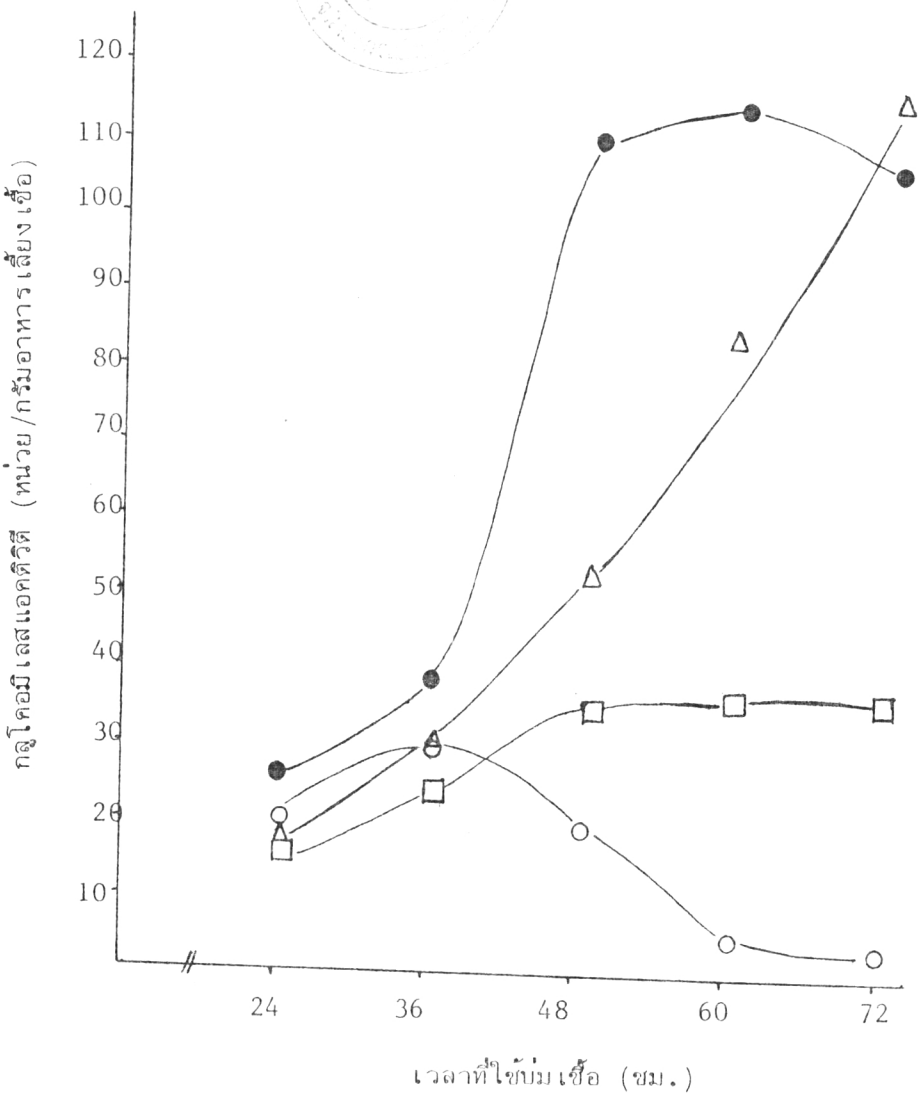
3.2 การหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

3.2.1 การแปรผันปริมาณรำหยาบในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวเจ้าบด 5 ส่วนและปลายข้าวเจ้าบด 5 ส่วน พบว่าเมื่อเลี้ยง R. oryzae ในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวเจ้าบด ปลายข้าวเหนียวบด และรำหยาบอัตราส่วน 5:5:2 ทำให้มีการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดโดยมีกลูโคอมิเลสแอคติวิตี 106.25 หน่วย/กรัม อาหารเลี้ยงเชื้อและเมื่อเพิ่มปริมาณรำหยาบจะทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลงดังแสดงในกราฟที่ 8

3.2.2 การหาอัตราส่วนของปลายข้าวเจ้าบดต่อปลายข้าวเหนียวบดที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำหยาบ 2 ส่วน โดยแปรผันอัตราส่วนของปลายข้าวเจ้าบดต่อปลายข้าวเหนียวบด พบว่าปลายข้าวเจ้าบดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสและถ้าเพิ่มอัตราส่วนของข้าวเหนียวจะทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลงตามลำดับ ดังแสดงในกราฟที่ 9

3.3 ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยง R. oryzae เพื่อผลิตกลูโคอมิเลส

ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสอยู่ระหว่าง 4.0-5.5 โดยที่ความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.0 ทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุด แต่ถ้าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นต่ำกว่า 4.0 และสูงกว่า 5.5 จะทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลง ดังแสดงในกราฟที่ 10



กราฟที่ 7 ผลของความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างกลูโคอมิเลส R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง

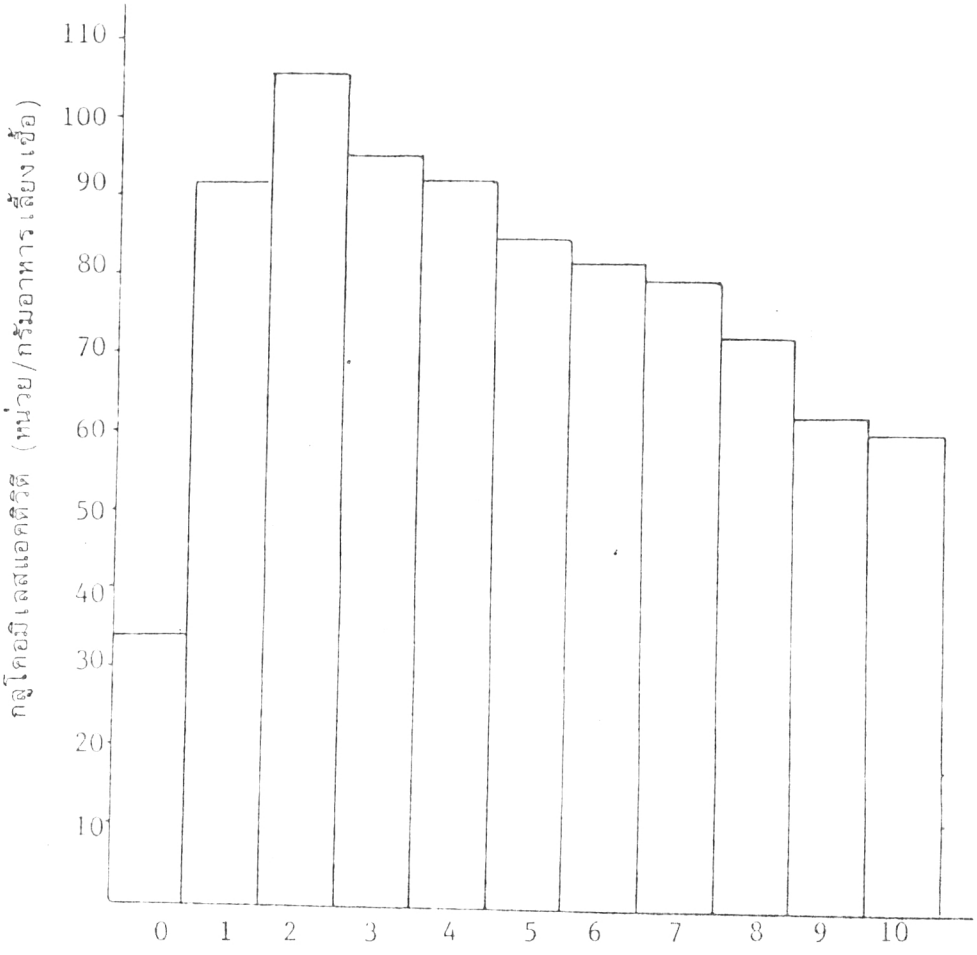
○ เติมน้ำลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 %

● เติมน้ำลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 %

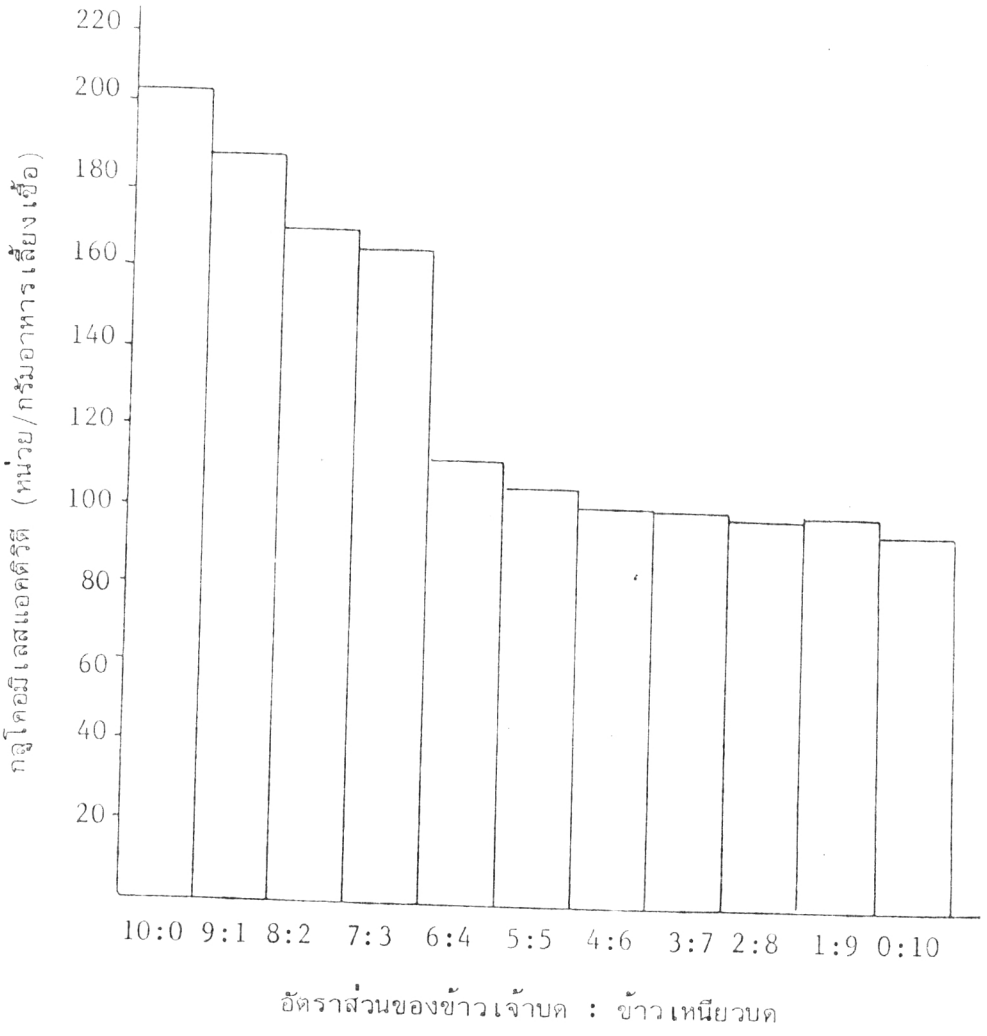
△ เติมน้ำลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 %

□ เติมน้ำลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 60 %

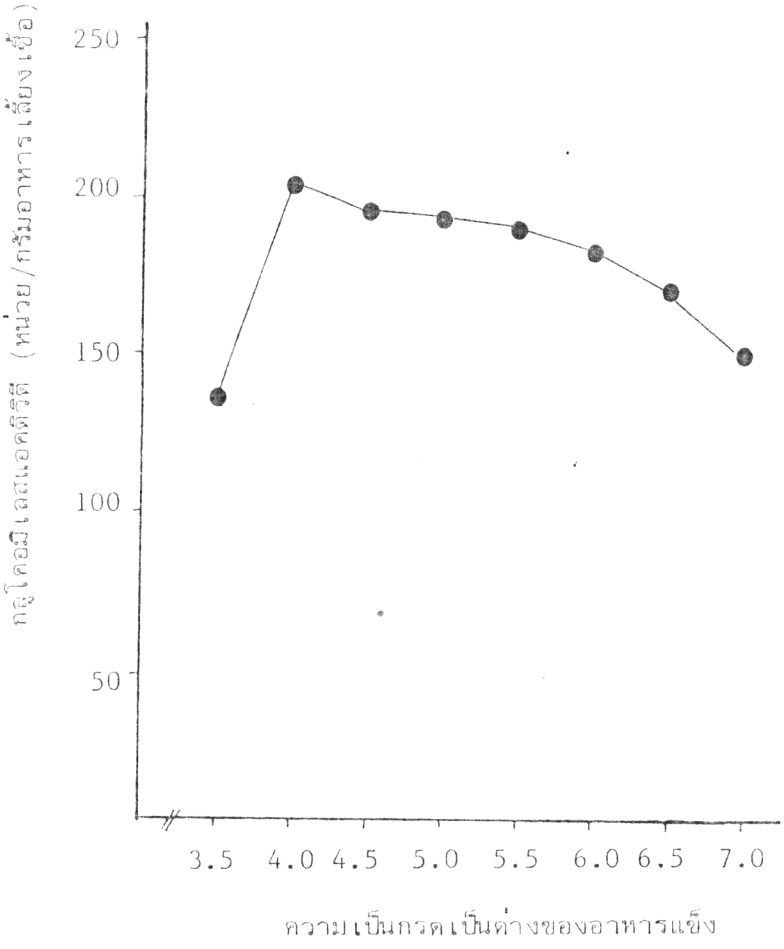
เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยส่วนผสมของข้าวเจ้าบด ข้าวเหนียวบดและรำหยาบอัตราส่วน 5:5:1 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°c



กราฟที่ 8 ปริมาณรำหยาบที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยส่วนผสมของข้าวเจ้าบด และข้าวเหนียวบด อัตราส่วน 5:5 เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนักบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชม.



กราฟที่ 9 อัตราส่วนของข้าวเจ้าบดต่อข้าวเหนียวบดที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใส่รำหยาบ 2 ส่วนคงที่ เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชม.



กราฟที่ 10 อิทธิพลของความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบดและรำหยาบ อัตราส่วน 5:1 เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

3.4 จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลส

จากการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ใส่สปอร์เริ่มต้นจำนวน $1x10^6$ $5x10^6$ $1x10^7$ $5x10^7$ $1x10^8$ และ $5x10^8$ สปอร์/มล. พบว่าจำนวนสปอร์เริ่มต้น $1x10^6$-$5x10^6$ สปอร์/มล. จะให้กลูโคอมิเลสสูงสุดโดยได้กลูโคอมิเลสแอคติวิตี 229.4 และ 235.0 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นมากกว่า $5x10^6$ สปอร์/มล. การสร้างกลูโคอมิเลสจะลดลง ดังแสดงในกราฟที่ 11

3.5 การหาอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อเพื่อผลิตกลูโคอมิเลส

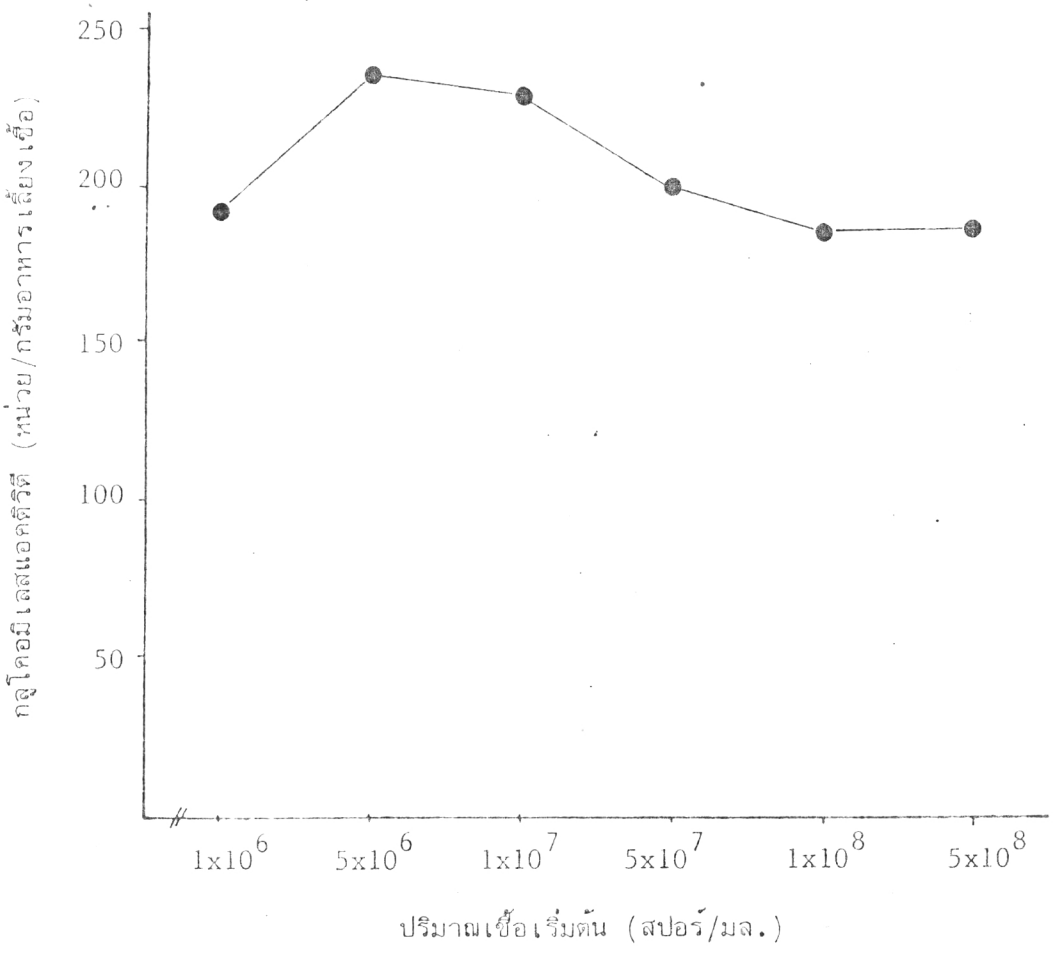
จากการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งซึ่งบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 35 37 และ 40°ซ พบว่าการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดเมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม. โดยมีเอนไซม์แอคติวิตี 283.7 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ การสร้างกลูโคอมิเลสค่อนข้างสูงคือมีแอคติวิตี 247.3 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ต้องใช้เวลานานถึง 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°ซ จะมีการสร้างกลูโคอมิเลสค่อนข้างต่ำ และไม่มีการสร้างกลูโคอมิเลสเลยที่อุณหภูมิ 40°ซ ดังแสดงในกราฟที่ 12

3.6 การหาแหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง

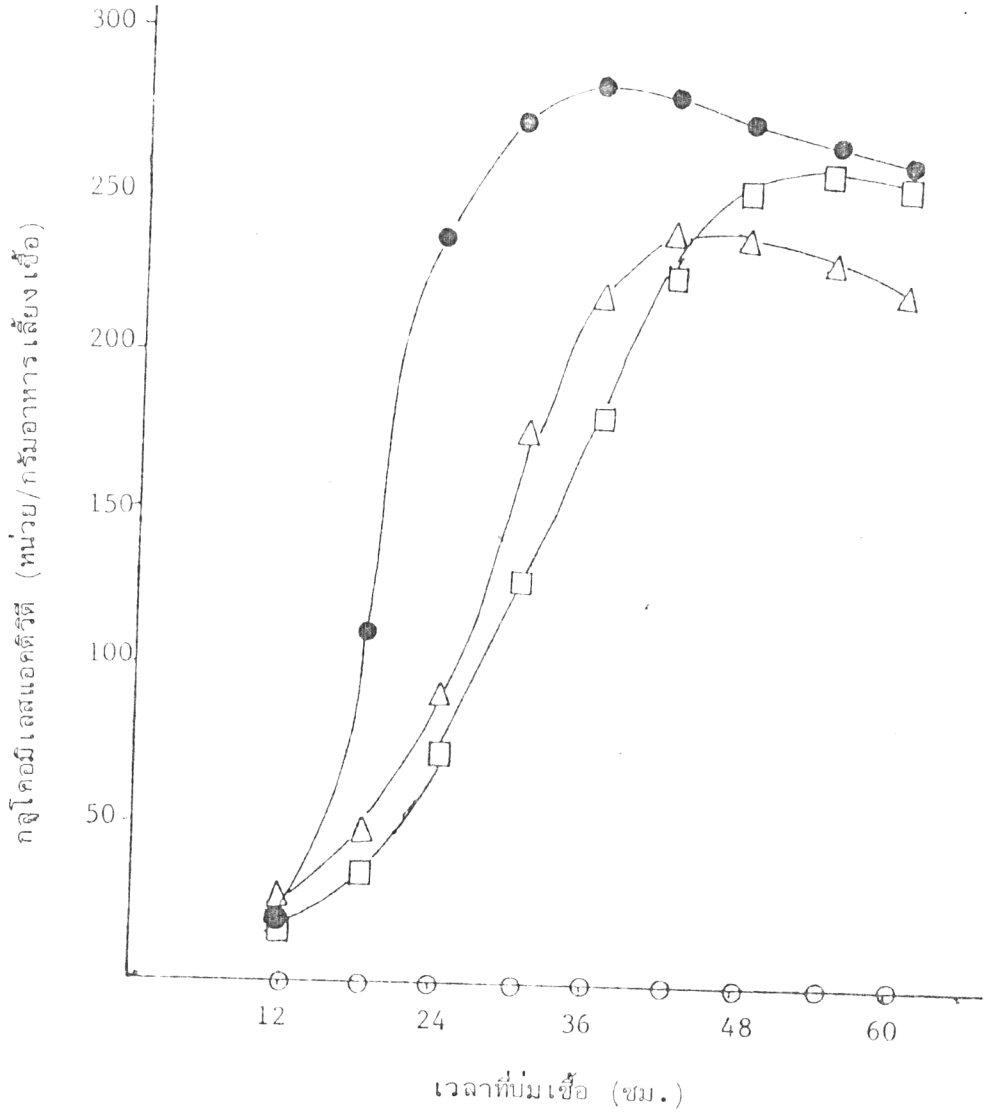
3.6.1 ผลของแอมโมเนียมทาร์เทรตและโพลีเปปโตนต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีแอมโมเนียมทาร์เทรต 0 0.1 0.3 0.5 1.0 และ 3.0 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักตามลำดับ หรือโพลีเปปโตน 0 0.2 0.5 0.7 และ 1.0 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักตามลำดับ พบว่าแอมโมเนียมทาร์เทรตความเข้มข้น 0.3 %จะให้การสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดคือ 337.2 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสูงกว่าในอาหารแข็งที่มีโพลีเปปโตนทุก ๆ ความเข้มข้นดังแสดงในกราฟที่ 13

3.6.2 ผลของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการสร้างกลูโคอมิเลส

จากการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0 1 2 3 และ 5 กรัม/กก.อาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุด 394.5 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม/กก.อาหารเลี้ยงเชื้อ และถ้าใส่มากกว่า 1 กรัม/กก.อาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างกลูโคอมิเลสลดลงดังแสดงในกราฟที่ 14



กราฟที่ 11 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลส R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบดและรำหยาบ อัตราส่วน 5 : 1 ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชม.



กราฟที่ 12 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง

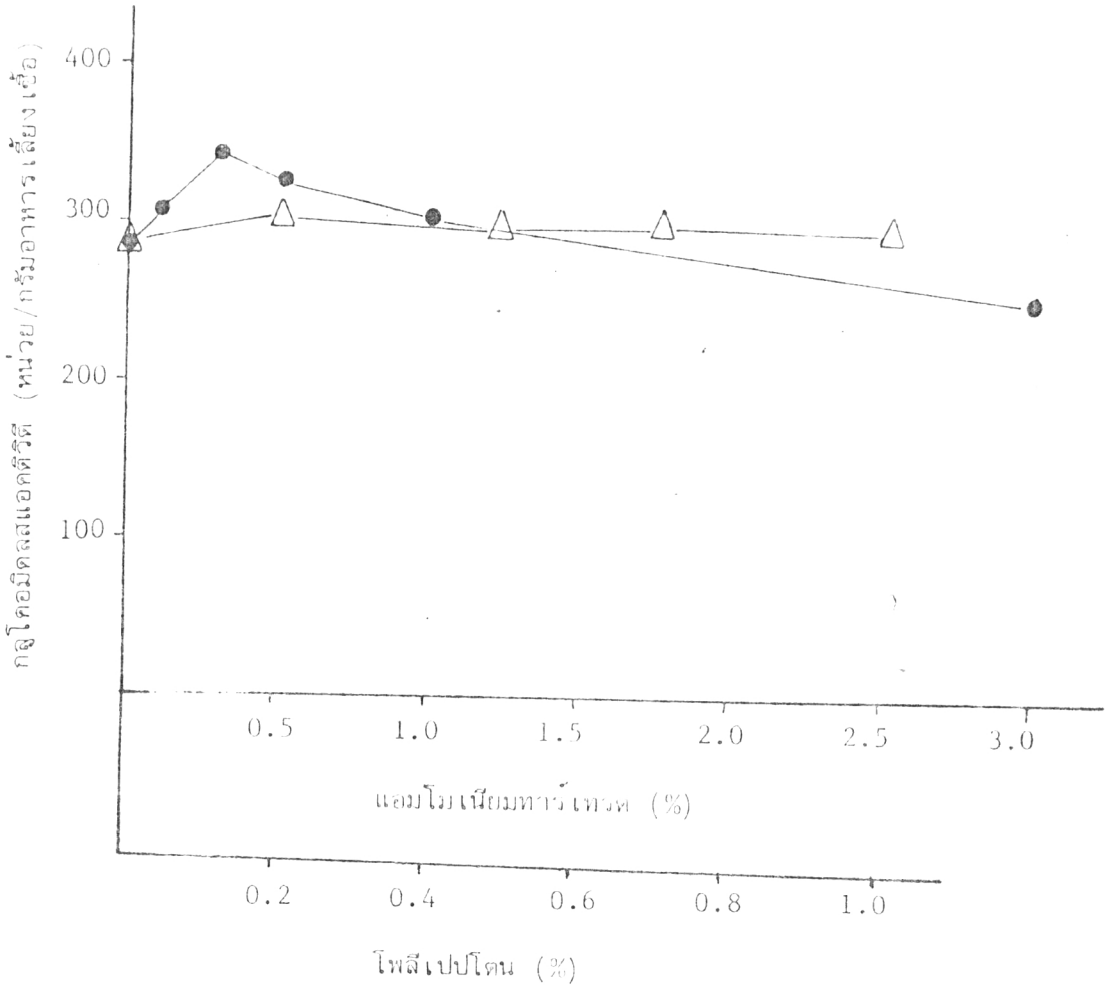
□ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ

● บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ

△ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ

○ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40°ซ

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบดและรำหยาบ อัตราส่วน 5:1 ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก ใส่เชื้อเริ่มต้น 5×10^6 สปอร์/มล.

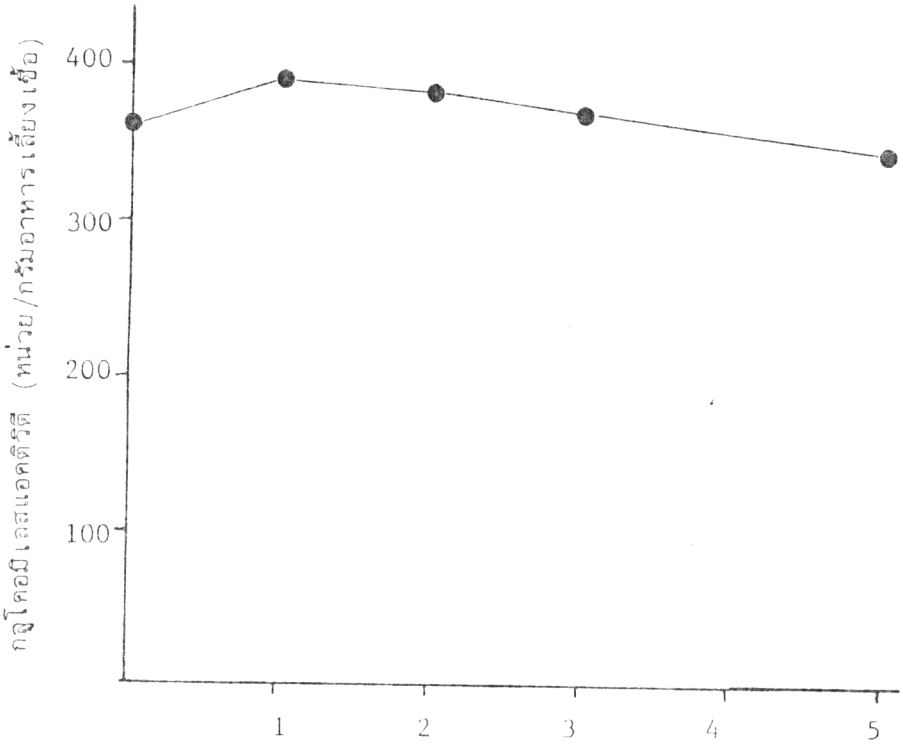


กราฟที่ 13 ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง

● แอมโมเนียมทาร์เทรต

△ โพลีเปปโตน

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบดและรำหยาบ อัตราส่วน 5:1 ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก ใส่เชื้อเริ่มต้น 5×10^{6} สปอร์/มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.



กราฟที่ 14 ผลของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบดและรำหยาบอัตราส่วน 5:1 มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 ใส่แอมโมเนียมทาร์เทรต 0.3 % โดยน้ำหนัก เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก ใส่เชื้อเริ่มต้น 5×10^{6} สปอร์/มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

3.6.3 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการสร้างกลูโคอมิเลส

จากการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/กก.อาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 1.0-1.5 กรัม/กก.อาหารเลี้ยงเชื้อส่งเสริมให้มีการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดคือ 415.6 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสร้างกลูโคอมิเลสจะลดลงถ้ามีแมกนีเซียมซัลเฟตมากกว่า 1.5 กรัม/กก.อาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในกราฟที่ 15

4. การผลิตกลูโคอมิเลสในสภาพที่เหมาะสมและขยายขนาดการผลิต (scale up)

ผลจากการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวเจ้าบด 1000 กรัม ผสมกับรำหยาบ 200 กรัมที่มีแอมโมเนียมทาร์เทรต 0.3 % โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 % โดยละลายสารเคมีเหล่านี้ในน้ำกลั่น 480 มล. แล้วใส่ลงในอาหารแข็ง นึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วผสมกับสปอร์ของ R. oryzae จำนวน $5x10^6$ สปอร์/มล.ปริมาตร 100 มล. บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องแล้วเป่าอากาศที่อิ่มตัวด้วยความชื้นตลอดเวลา พบว่าอากาศในตู้บ่มเชื้อมีความชื้นสัมพัทธ์ 100 % ในเวลา 3 ชม. และการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดเมื่อบ่มเชื้อไว้นาน 36 ชม. โดยจะได้กลูโคอมิเลสแอคทิวิตี 386.7 หน่วย/กรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับอุณหภูมิในตู้บ่มเชื้อจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดที่อุณหภูมิ 36°ซ. เมื่อบ่มเชื้อไว้นาน 24 ชม. และอุณหภูมิในแป้งเชื้อสูงสุดที่ 45°ซ เมื่อบ่มเชื้อนาน 27 ชม. (รูปที่ 1,2 และกราฟที่ 16)

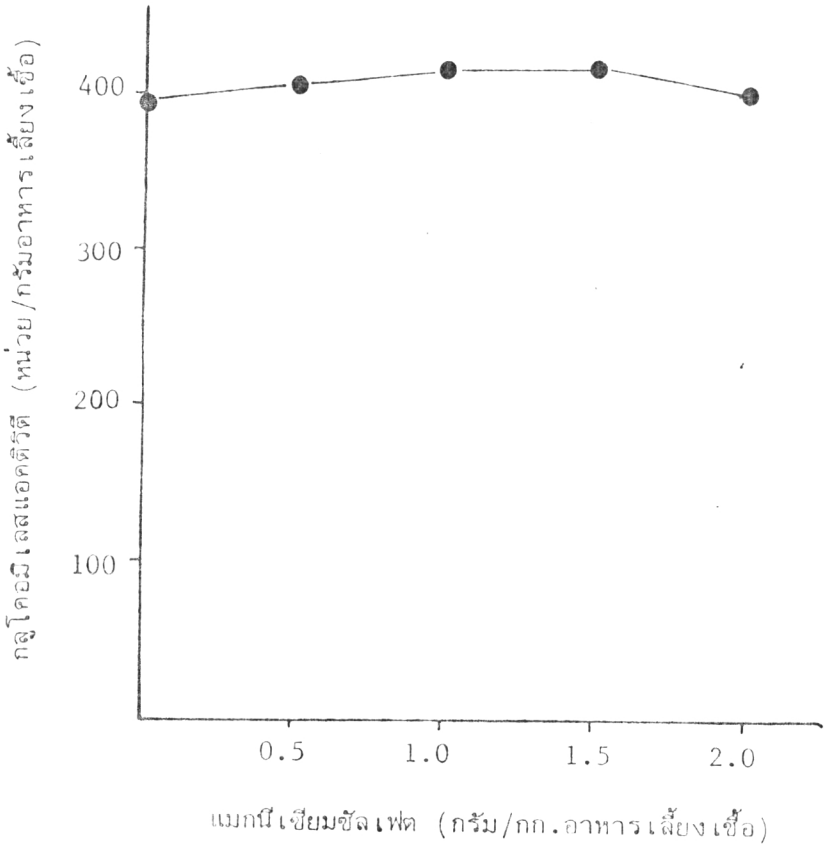
5. การทำแป้งเชื้อให้แห้งโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

นำแป้งเชื้อที่ได้จากการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งจากข้อ 4. มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 45 50 และ 55°ซ นาน 12 ชม. พบว่าอบที่อุณหภูมิ 40-50°ซ นาน 12 ชม. สามารถทำให้แป้งเชื้อแห้งได้โดยที่เอนไซม์ไม่เสียสภาพ (denature) แต่ถ้าอบไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°ซ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ดังแสดงในกราฟที่ 17

6. การสกัดและการทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์

6.1 การสกัดกลูโคอมิเลสออกจากแป้งเชื้อ

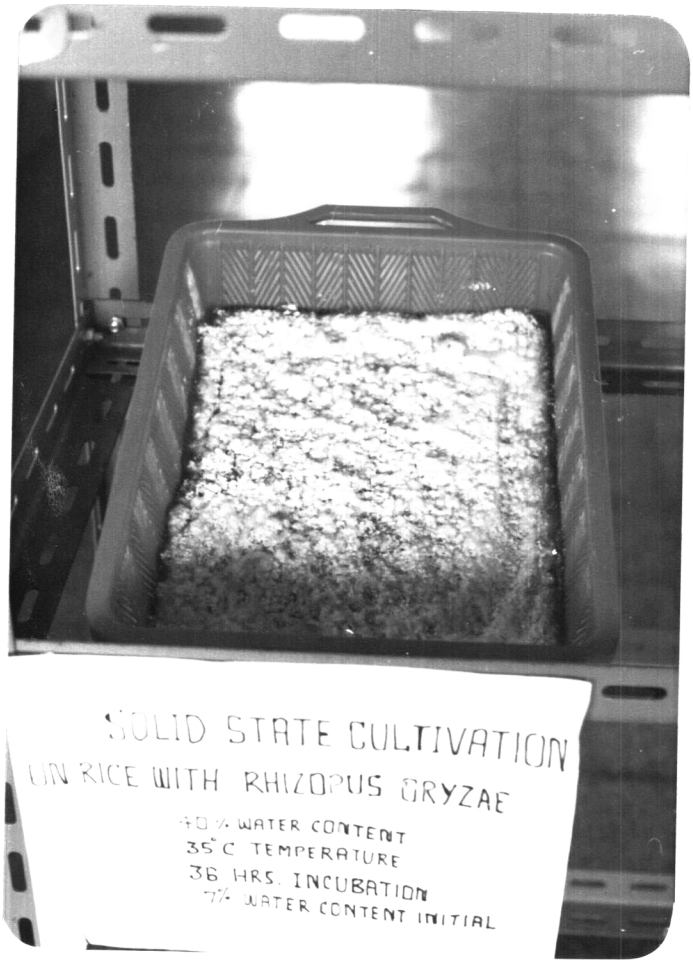
แช่แป้งเชื้อ 400 กรัมในอซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ปริมาตร 2000 มล.ที่อุณหภูมิ 20°ซ นาน 12 ชม. ตรวจหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีทั้ง



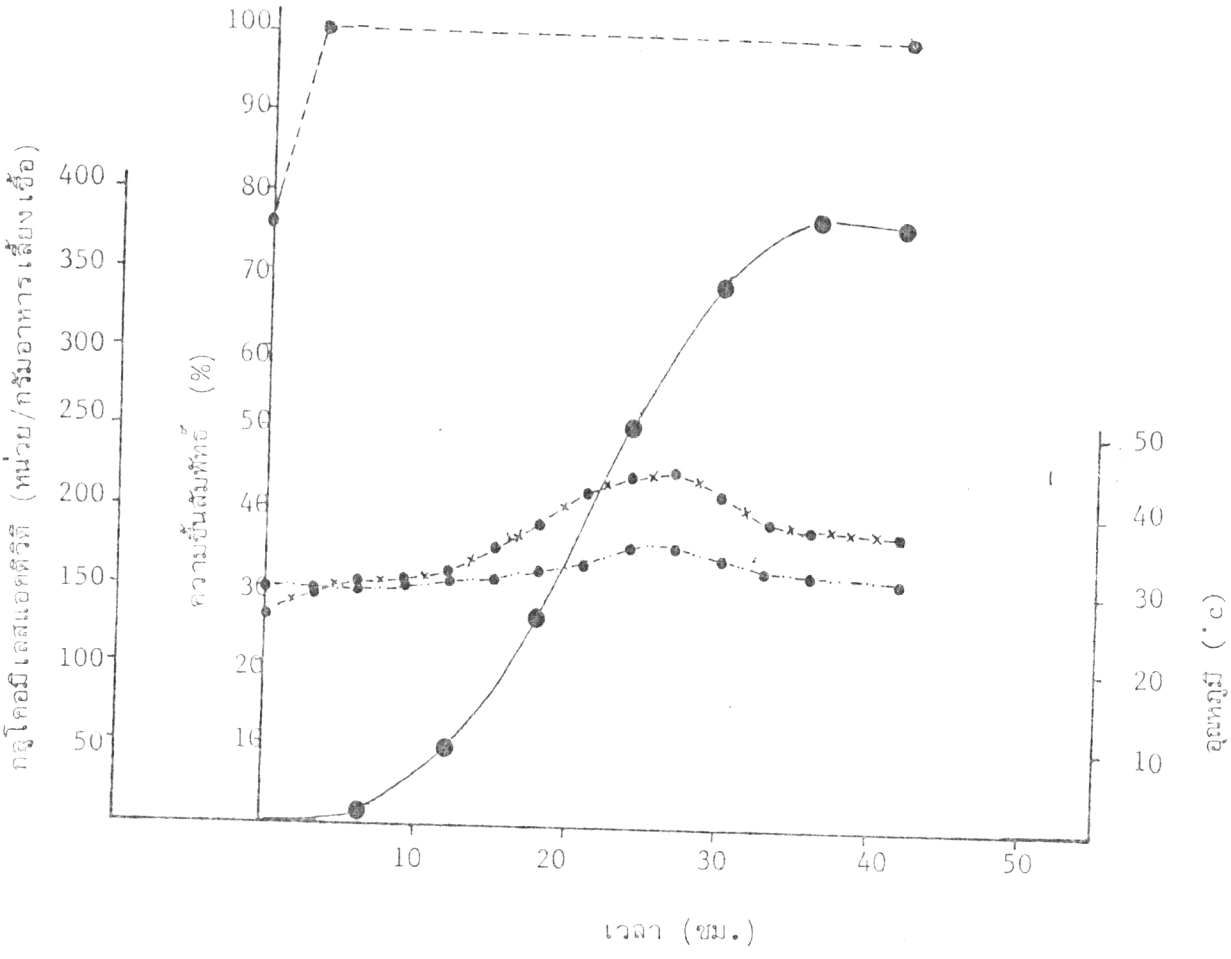
กราฟที่ 15 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบดและรำหยาบ อัตราส่วน 5:1 ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 ใส่แอมโมเนียมทาร์เทรต 0.3 % โดยน้ำหนัก โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % โดยน้ำหนัก เติมน้ำ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก ใส่เชื้อเริ่มต้น 5×10^6 สปอร์/มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

รูปที่ 1 แสดงตู้บ่มเชื้อที่ใช้ในการผลิตกลูโคอมิเลสในสเกลใหญ่ มีเครื่องเป่าอากาศที่อิ่มตัวด้วยความชื้น เทอร์โมมิเตอร์แบบกระเปาะแห้ง กระเปาะเปียก และเทอร์โมมิเตอร์



รูปที่ 2 การเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบด ผสมรำหยาบอัตราส่วน 5:1 เติมน้ำ 40 % บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (รูปที่ 1) อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชม.



กราฟที่ 16 การเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอมิเลสในสเกลใหญ่ในตู้บ่มเชื้อที่ออกแบบขึ้น (รูปที่ 1)

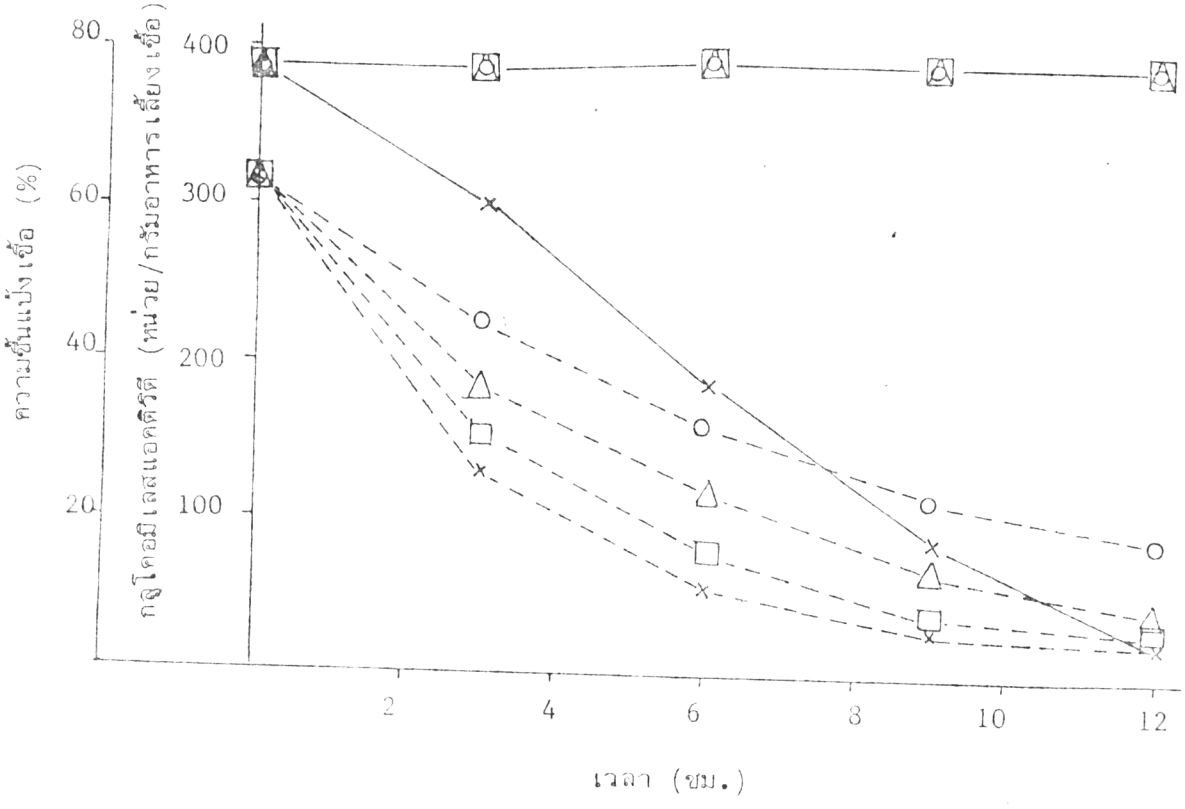
——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี

–·–·– อุณหภูมิในตู้บ่มเชื้อ

–×–×–×– อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อ

- - - - - ความชื้นสัมพัทธ์ในตู้บ่มเชื้อ

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าบดและรำหยาบอัตราส่วน 5:1 ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 ใส่แอมโมเนียมฟาร์เทรต 0.3 % โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 % เติมน้ำ 40 % ใส่เชื้อเริ่มต้น 5×10^6 สปอร์/มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 42 ชม.



กราฟที่ 17 การทำแป้งเชื้อให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

○ อบที่อุณหภูมิ 40°ซ

△ อบที่อุณหภูมิ 45°ซ

□ อบที่อุณหภูมิ 50°ซ

X อบที่อุณหภูมิ 55°ซ

——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี

----- ความชื้นของแป้งเชื้อ

หมด 147712.00 หน่วย โปรตีนทั้งหมด 21840.00 มก. และแอคติวิตีเฉพาะ 6.76 หน่วย/มก. โปรตีน (ตารางที่ 2)

6.2 การทำกลูโคอมิเลสให้บริสุทธิ์

6.2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80 % ที่อุณหภูมิ 25°ซ สามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลูโคอมิเลสออกไปเหลือแอคติวิตี 71.67 % และแอคติวิตีเฉพาะเพิ่มขึ้น 7.45 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัด (ตารางที่ 2)

6.2.2 การแยกกลูโคอมิเลสออกจากโปรตีนอื่น ๆ โดยใช้ ซี.เอ็ม.เซฟาเดกซ์ ซี-50

ผ่านสารละลายโปรตีนจากการตกตะกอนโปรตีนและเอาเกลือออกแล้วลงใน ซี.เอ็ม. เซฟาเดกซ์ ซี-50 คอลัมน์ (4x50 ซม.) แล้วชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0 ถึง 1.0 โมลาร์เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาส่วนละ 13 มล. จากการตรวจหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีพบว่ามีกลูโคอมิเลส 2 พีก (peak) เรียกว่า พีก ก. และ ข. ซึ่งออกมาส่วนที่ 40-54 และ 55-61 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2 และ 0.3 โมลาร์ตามลำดับ (กราฟที่ 18) กลูโคอมิเลสแอคติวิตีลดลงเหลือ 22.95 และ 19.28 % แอคติวิตีเฉพาะเพิ่มขึ้นเป็น 82.63 และ 49.24 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

6.2.3 การแยกกลูโคอมิเลสออกจากโปรตีนอื่น ๆ โดยใช้เซฟาเดกซ์ จี-200

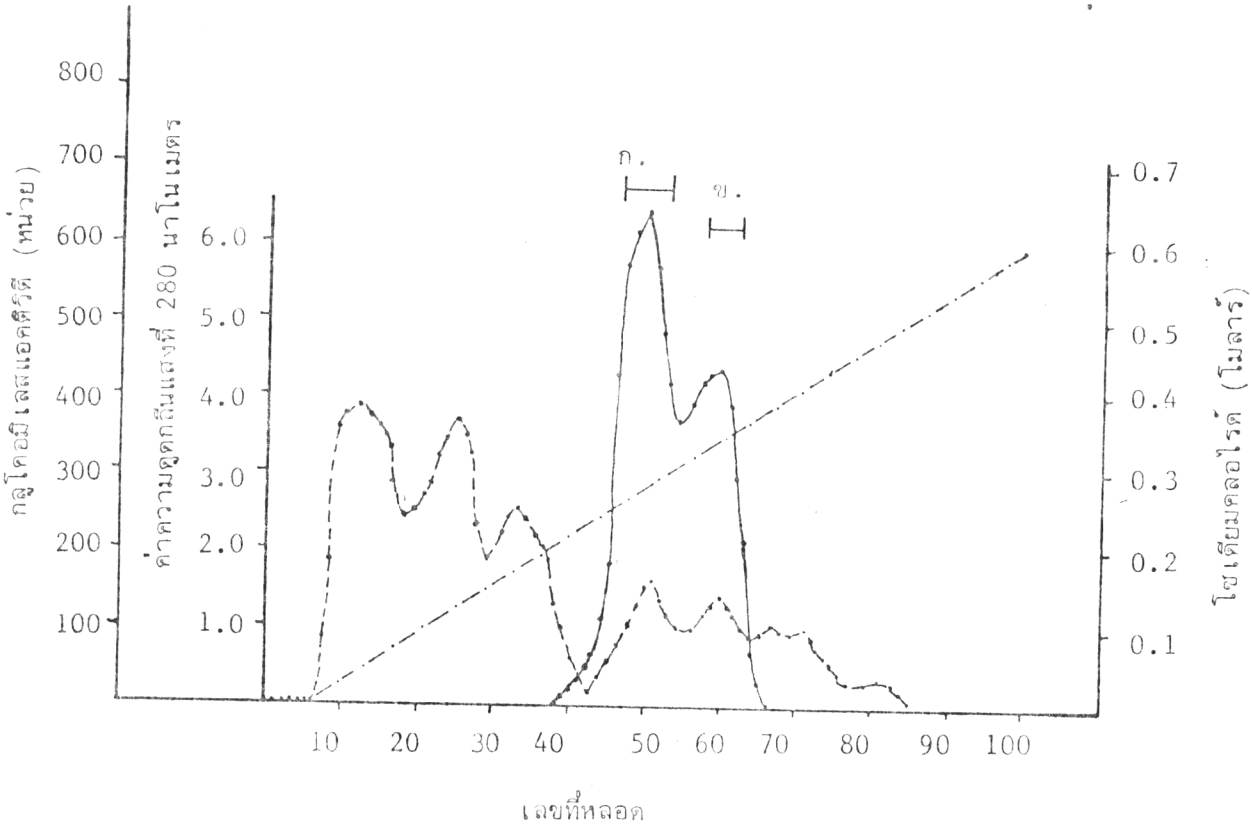
ผ่านสารละลายกลูโคอมิเลสพีก ก. และ ข. จากซี.เอ็ม.เซฟาเดกซ์ ซี-50 ลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 แล้วกลูโคอมิเลสพีก ก. ได้กลูโคอมิเลส I มีแอคติวิตีลดลงเหลือ 10.34 % และแอคติวิตีเฉพาะเพิ่มขึ้น 254.98 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัด (ตารางที่ 2 และกราฟที่ 19) ส่วนกลูโคอมิเลสพีก ข. นั้นได้กลูโคอมิเลส 2 ชนิดคือ กลูโคอมิเลส II และ III ซึ่งมีแอคติวิตีลดลงเหลือ 5.94 และ 7.04 % แอคติวิตีเฉพาะเพิ่มขึ้น 204.14 และ 205.06 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และกราฟที่ 20

7. การทดสอบความบริสุทธิ์ของกลูโคอมิเลสทั้งสามชนิด

การทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยใช้โพลีอคริลาไมด์เจล อิเลกโตรโฟริซีส พบว่ากลูโคอมิเลสแต่ละชนิดมีโปรตีนชนิดเดียวโดยให้แถบโปรตีนแถบเดียวในแท่งเจลแต่ละแท่ง (รูปที่ 3)

ตารางที่ 2. สรุปลำดับการทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์

ลำดับการทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีเฉพาะ (หน่วย/มก.)	เปอร์เซนต์ของเอนไซม์	ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์(เท่า)
เอนไซม์สกัดเริ่มต้น	1500	21,840.00	147,712.00	6.76	100.00	1.00
ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต อิ่มตัว 40-80 %	30	2,103.20	105,873.60	50.34	71.67	7.45
ซี.เอม.เซฟาเดกซ์ ซี-50						
ก.	65	60.70	33,906.60	558.60	22.95	82.63
ข.	78	85.56	28,481.00	332.88	19.28	49.24
เซฟาเดกซ์ จี-200						
ก. :-กลูโคอมิเลส I	20	8.86	15,271.56	1,723.65	10.34	254.98
ข. :-กลูโคอมิเลส II	20	6.36	8,776.64	1,379.97	5.94	204.14
กลูโคอมิเลส III	20	7.50	10,396.72	1,386.23	7.04	205.06

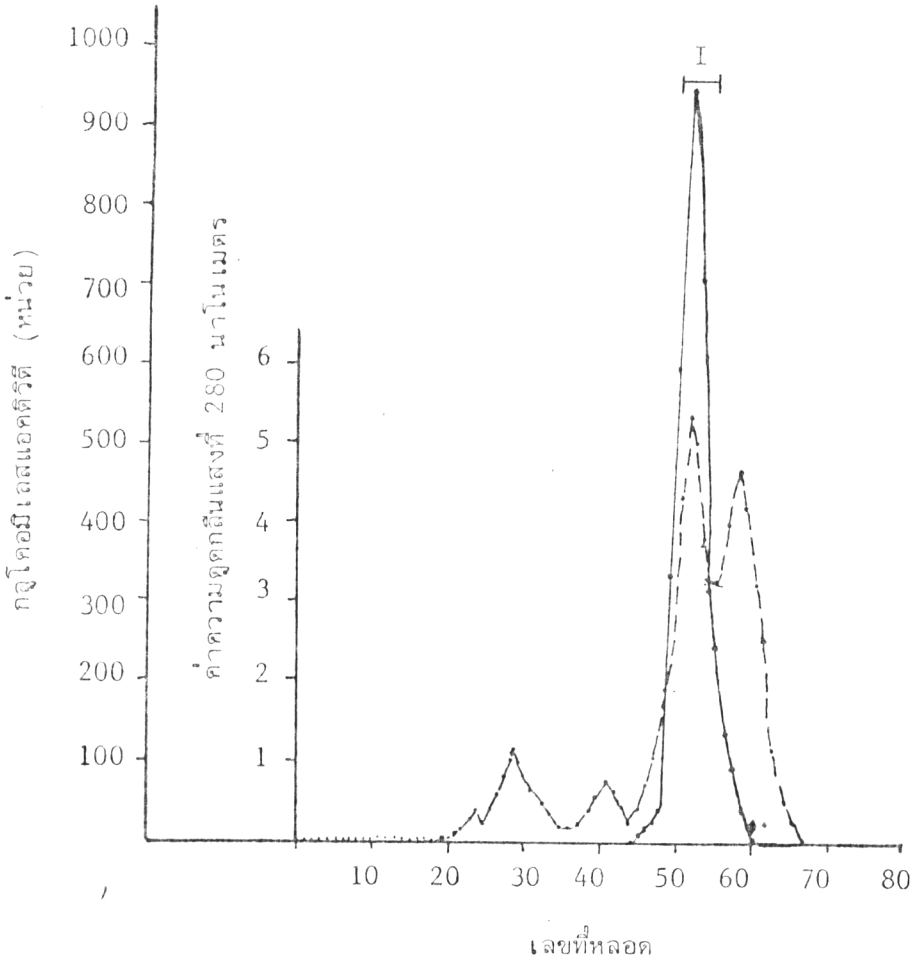


กราฟที่ 18 การแยกกลูโคอมิเลสโดยใช้ ซี.เอม.เซฟาเดกซ์ ซี-50 โครมาโตกราฟี ผ่านเอนไซม์ที่แยกเอาเกลืออกแล้วลงในคอลัมน์ (4x50 ซม.) แล้วชะด้วยอซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ด้วยอัตราเร็ว 30 มล./ชม. แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านออกมาไว้หลอดละ 13 มล. นำแต่ละหลอดมาหากลูโคอมิเลสแอคติวิตี วัดค่าความดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

—·—·— ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี

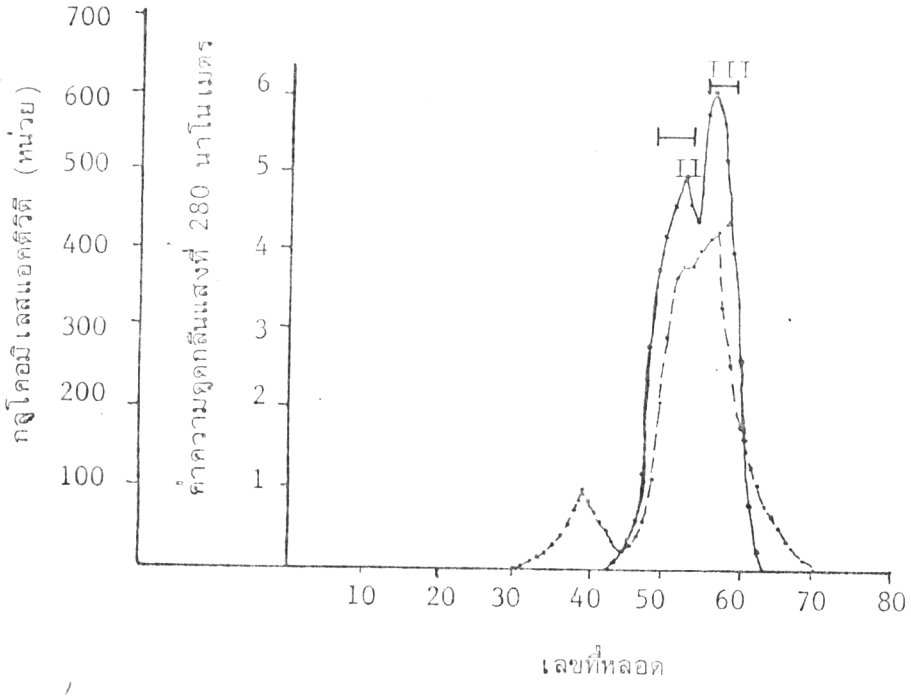
----- ค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



กราฟที่ 19 การทำให้กลูโคอมิเลสพีก ก. บริสุทธิ์โดยผ่านลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 โครมาโตกราฟี ผ่านกลูโคอมิเลสพีก ก. ที่ได้จาก ซี. เอม. เซฟาเดกซ์ ซี-50 ลงคอลัมน์ (3x50 ซม.) แล้วชะด้วยอซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ด้วยอัตราเร็ว 10 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาหลอดละ 4 มล.

——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี

---- ค่าความดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

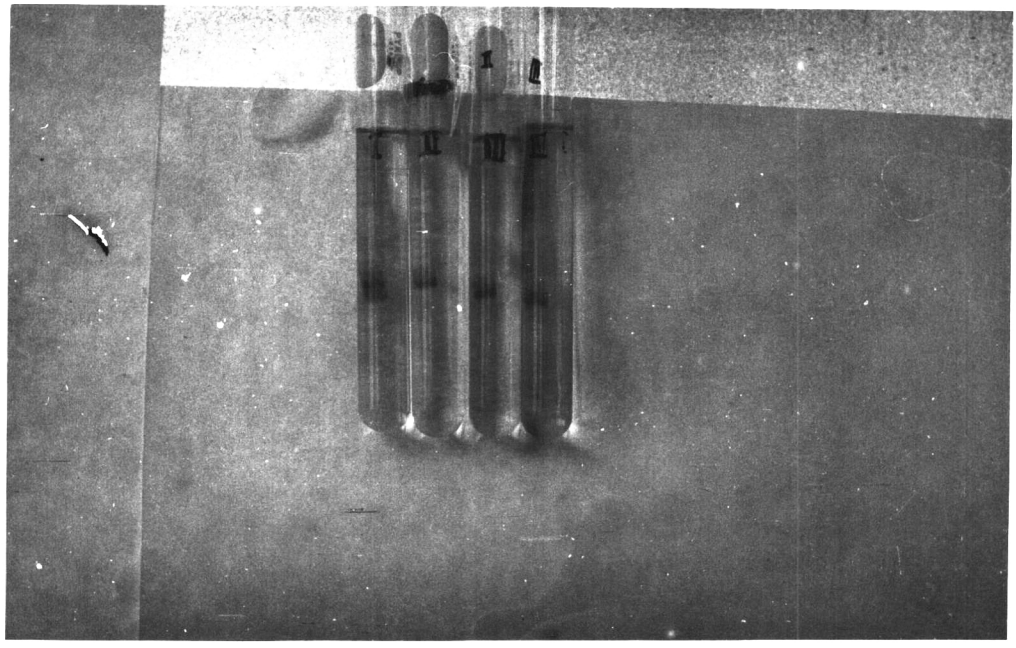


กราฟที่ 20 การทำกลูโคอมิเลสฟีก ข. ให้บริสุทธิ์ โดยผ่านลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 โครมรโตกราฟี

ผ่านกลูโคอมิเลสฟีก ข. ที่ได้จาก ซี.เอม.เซฟาเดกซ์ ซี-50 ลงคอลัมน์ (3x50 ซม.) แล้วชะด้วยอซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ด้วยอัตราเร็ว 10 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาหลอดละ 4 มล.

——— กลูโคอมิเลสแอคติวิตี

- - - - ค่าความดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



รูปที่ 3 การทำอิเลกโตรโฟรีซีสของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดบนโพลีอคริลาไมด์ เจล โดยใช้โพลีอคริลาไมด์ 7.5 % ในเบตา-อลานีน อซีติกแอซิด บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ใส่โปรตีน 200 ไมโครกรัมลงในแต่ละหลอด ผ่านกระแสไฟฟ้า 5 มิลลิแอมแปร์/หลอดเป็นเวลา 2 ชม.

1. กลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดผสมกัน 2. กลูโคอมิเลส I

3. กลูโคอมิเลส II และ 4 กลูโคอมิเลส III เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา

เมื่อวัดค่า อาร์.เอฟ. ได้ 0.378 0.388 และ 0.417 ตามลำดับ

8. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด

8.1 ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิด

ใช้ซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ พบว่าที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 เหมาะสมต่อแอคติวิตีของทั้งกลูโคอมิเลส I และ II ส่วนแอคติวิตีของกลูโคอมิเลส III ต้องการความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่ 4.5 ดังแสดงในกราฟที่ 21

8.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิด

ให้กลูโคอมิเลสแต่ละชนิดทำปฏิกริยากับสารละลายแป้งที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 70 และ 80°ซ นาน 30 นาที พบว่ากลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดมีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 50°ซ. ดังแสดงในกราฟที่ 22

8.3 ความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิด

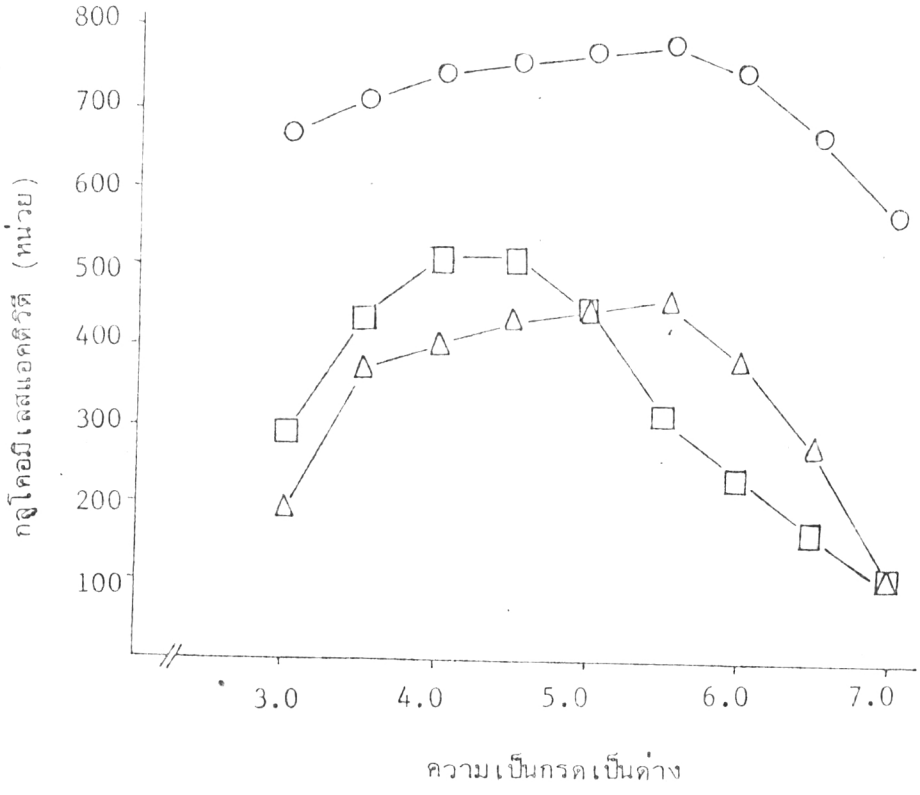
เตรียมกลูโคอมิเลสแต่ละชนิดให้มีแอคติวิตี 5 หน่วย/มล. โดยเจือจางด้วยซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 ชม. แล้วนำมาหาแอคติวิตีที่เหลือ พบว่ากลูโคอมิเลส I II และ III มีความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างที่ 3.5-6.0 4.0-6.0 และ 4.0-4.5 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟที่ 23

8.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิด

เตรียมกลูโคอมิเลสแต่ละชนิดให้มีแอคติวิตี 5 หน่วย/มล. แช่ไว้ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 30 40 50 60 และ 70°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีที่เหลือ พบว่ากลูโคอมิเลสทั้งสามชนิดสามารถคงตัวต่ออุณหภูมิได้ถึง 50°ซ. โดยไม่เสียแอคติวิตีแต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 50°ซ แอคติวิตีจะลดลง ดังแสดงในกราฟที่ 24

8.5 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของแป้งต่อแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิด

ใช้กลูโคอมิเลสที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. ทำปฏิกริยากับสารละลายแป้ง (soluble starch) 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 % นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 50°ซ. แล้วนำข้อ

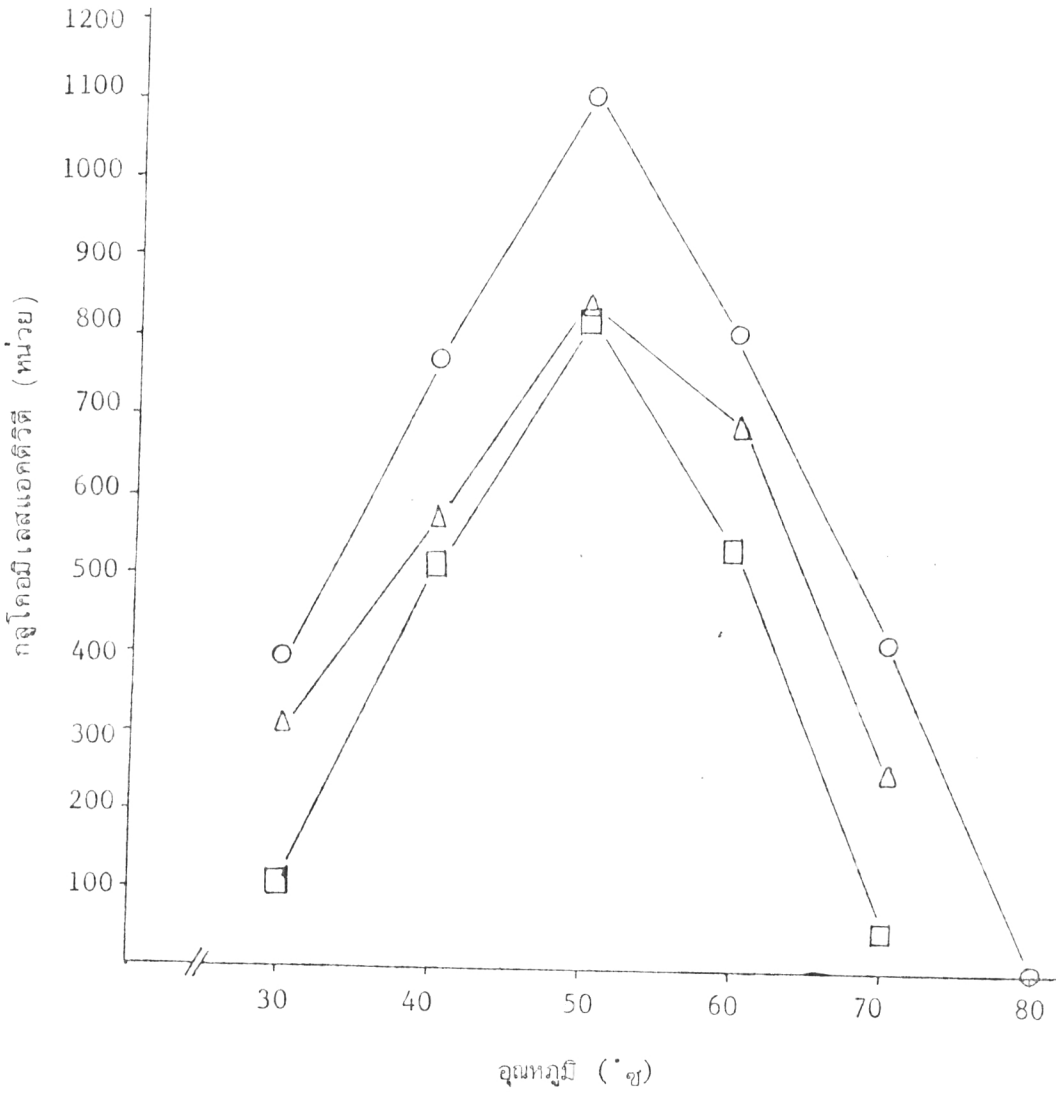


กราฟที่ 21 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด

○ กลูโคอมิเลส I

△ กลูโคอมิเลส II

□ กลูโคอมิเลส III

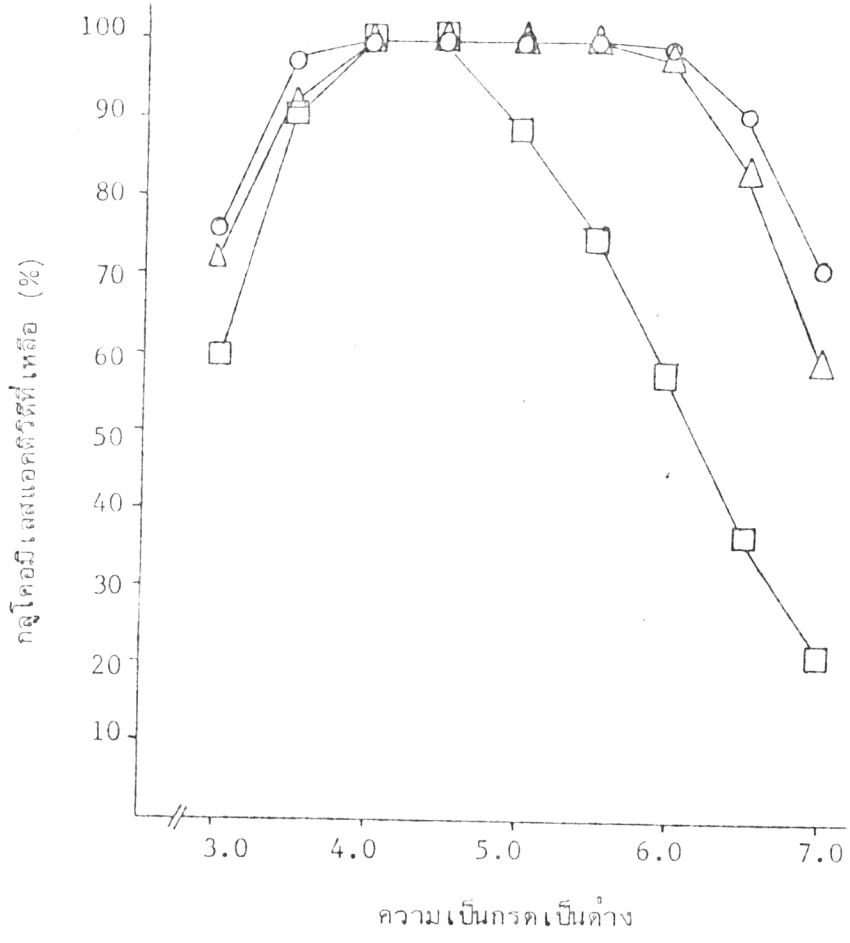


กราฟที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด

○ กลูโคอมิเลส I

△ กลูโคอมิเลส II

□ กลูโคอมิเลส III

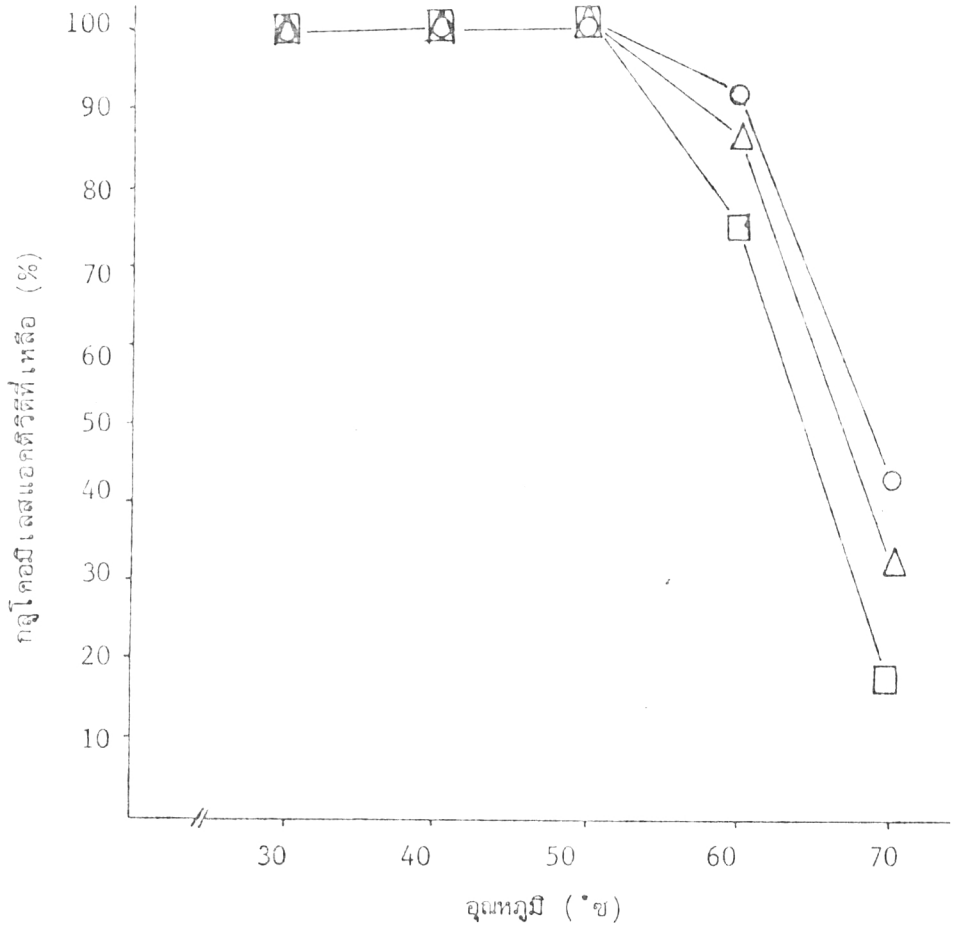


กราฟที่ 23 ความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด ใช้ซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 3.0-7.0 เจือจางกลูโคอมิเลสให้มีแอคติวิตี 5 หน่วย/มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชม. แล้วนำมาหาแอคติวิตีคือ

○ กลูโคอมิเลส I

△ กลูโคอมิเลส II

□ กลูโคอมิเลส III



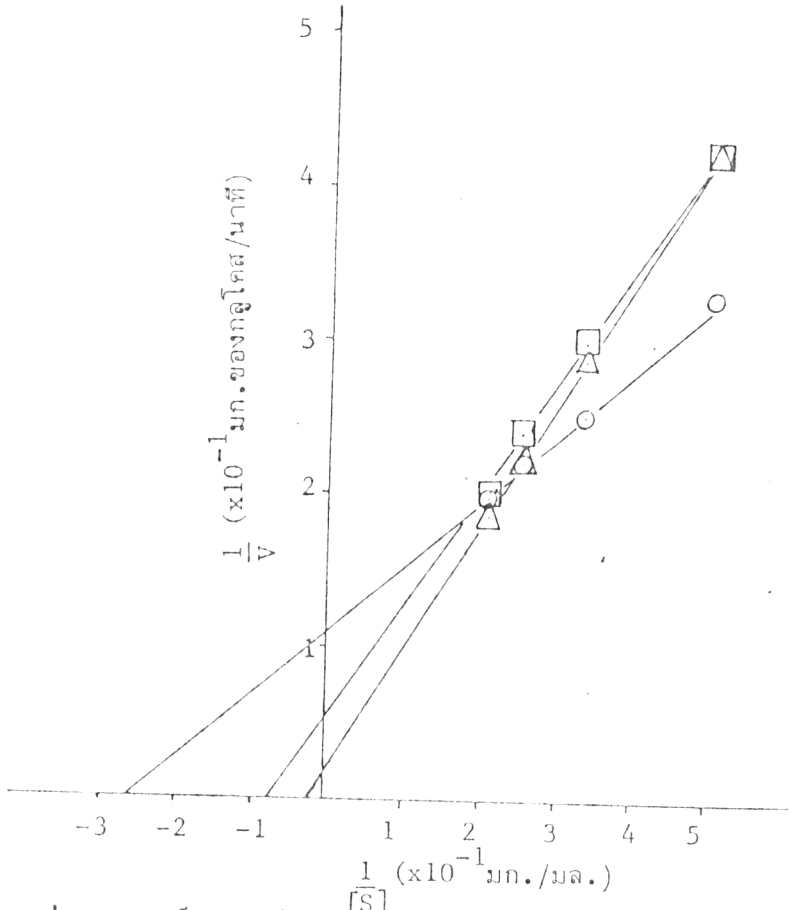
กราฟที่ 24 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด

เจือจางกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดด้วยซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ให้มีแอคติวิตี 5 หน่วย/มล. แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 70°ซ นาน 30 นาที นำมาหาแอคติวิตีที่เหลือ

○ กลูโคอมิเลส I

△ กลูโคอมิเลส II

□ กลูโคอมิเลส III



กราฟที่ 25 ไลน์เวเวอร์-เบิร์ค พลอท ของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด ใช้กลูโคอมิเลสมีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. 0.5 มล. ทำปฏิกริยากับสารละลายแป้ง (soluble starch) 4.5 มล. ที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 10 นาที

○ กลูโคอมิเลส I

△ กลูโคอมิเลส II

□ กลูโคอมิเลส III

มูลมาเขียนกราฟของไลน์เวเวอร์-เบิร์ค พบว่ามีค่าคงที่ 0.37 3.33 และ 1.43 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟที่ 25

8.6 ความสามารถในการย่อยสลายแป้งของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิด

ใช้กลูโคอมิเลสแอคติวิตี 28 หน่วย/มล. ทำปฏิกริยากับสารละลายแป้ง 1.0 % พบว่ากลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ แต่ใช้เวลาแตกต่างกันคือ 2 5 และ 4 ชม. ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟที่ 26

9. การแซคคาริฟิเคชั่นข้าวเหนียวโดยใช้แป้งเชื้อที่ผลิตขึ้น

9.1 การหาปริมาณน้ำที่ใส่ลงในข้าวเหนียวนึ่งที่เหมาะสมต่อการแซคคาริฟิเคชั่น

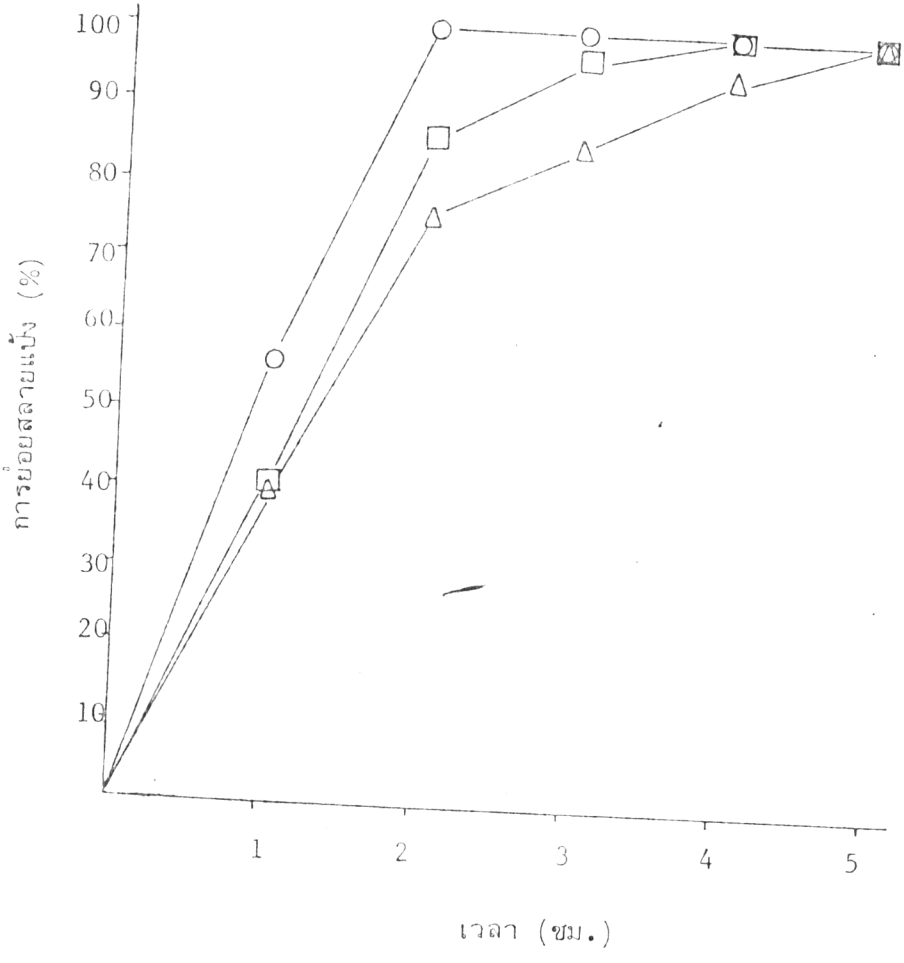
ใช้ข้าวเหนียว 20 กรัมแช่น้ำแล้วนึ่งด้วยไอน้ำ เติมน้ำ 10 30 50 70 และ 100 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก ใส่แป้งเชื้อ 3 % โดยน้ำหนัก (734 หน่วย/กรัมแป้งเชื้อ) พบว่าถ้าใส่น้ำ 10 % จะได้กลูโคส 2.48 กรัมในเวลา 72 ชม. ใส่น้ำ 30 % จะได้กลูโคส 12.35 กรัมในเวลา 72 ชม. และเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำจะได้กลูโคสเพิ่มขึ้น จากกราฟที่ 27 จะเห็นว่าเมื่อใส่น้ำ 50 70 และ 100 % ปริมาณกลูโคสที่ได้ในเวลาเดียวกันจะไม่แตกต่างกัน และปริมาณกลูโคสจะสูงสุดที่เวลา 60 ชม.

9.2 การหาปริมาณแป้งเชื้อที่ใช้ในการแซคคาริฟิเคชั่นข้าวเหนียว

ใช้แป้งเชื้อ 0.5 1.0 2.0 3.0 และ 5.0 % โดยน้ำหนัก พบว่าถ้าใส่แป้งเชื้อ 0.5 % ได้กลูโคส 5.82 กรัมในเวลา 60 ชม. ใส่แป้งเชื้อ 1.0 % ได้กลูโคส 10.38กรัมในเวลา 60 ชม. ใส่แป้งเชื้อ 2.0 %ได้กลูโคส 14.68 กรัม ถ้าใส่แป้งเชื้อ 3.0 และ 5.0 % จะได้กลูโคสสูงสุดไม่แตกต่างกันคือ 16.17 และ 16.23 กรัม แต่ถ้าใส่แป้งเชื้อ 5.0 % จะใช้เวลาการแซคคาริฟิเคชั่นสั้นกว่าคือใช้เวลา 48 ชม. แต่ถ้าใส่แป้งเชื้อ 3.0 % ต้องใช้เวลา 60 ชม.

9.3 ผลของอุณหภูมิต่อการแซคคาริฟิเคชั่น

ใช้ข้าวเหนียว 20 กรัมแช่น้ำและนึ่งด้วยไอน้ำ ใส่แป้งเชื้อ 5.0 % และใส่น้ำ 50 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 และ 70°ซ เป็นเวลา 48 ชม. พบว่าบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 40 และ 50°ซ ได้กลูโคส 16.30 16.17 และ 16.75 กรัมตามลำดับ แต่ถ้าบ่มไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°ซ จะได้กลูโคสลดลง และไม่มีการย่อยสลายแป้งเลยถ้าบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70°ซ

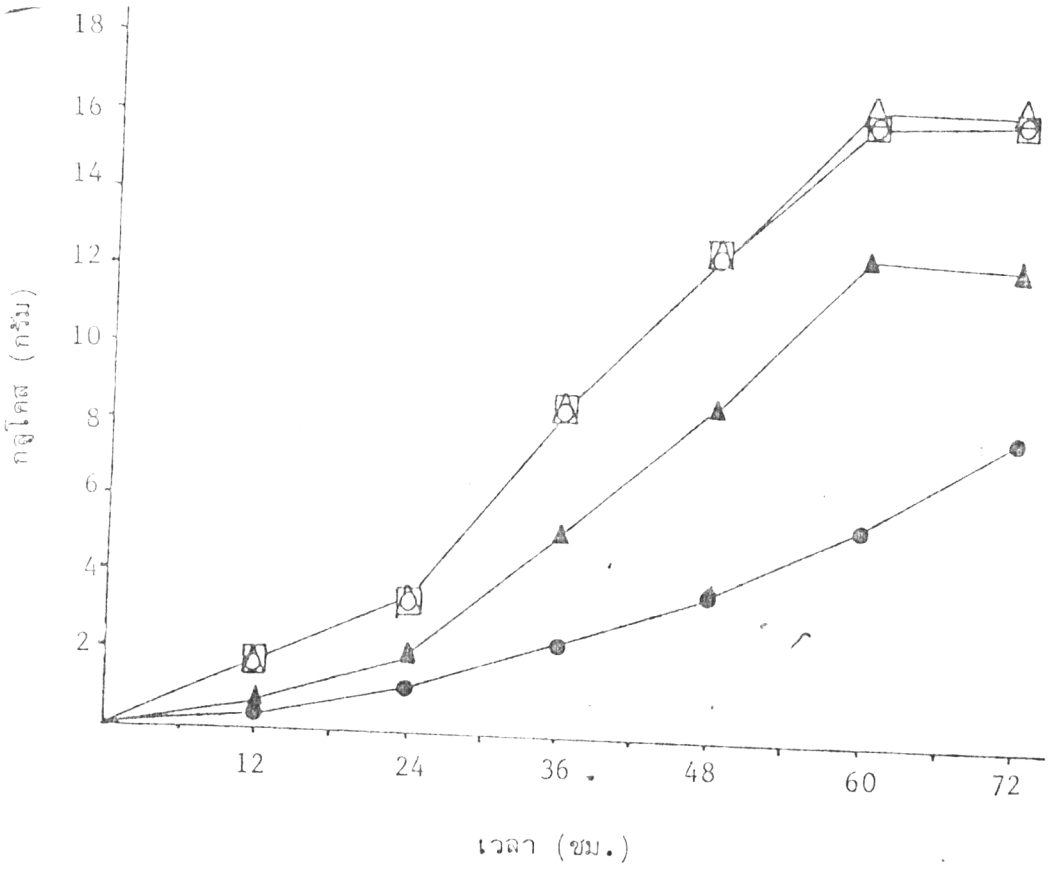


กราฟที่ 26 ความสามารถของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิดในการย่อยสลายแป้ง (soluble starch) โดยใช้เอนไซม์ 1 มล. ทำปฏิกริยากับสารละลายแป้ง 1% ปริมาตร 4 มล. ที่อุณหภูมิ 50°ซ

○ กลูโคอมิเลส I

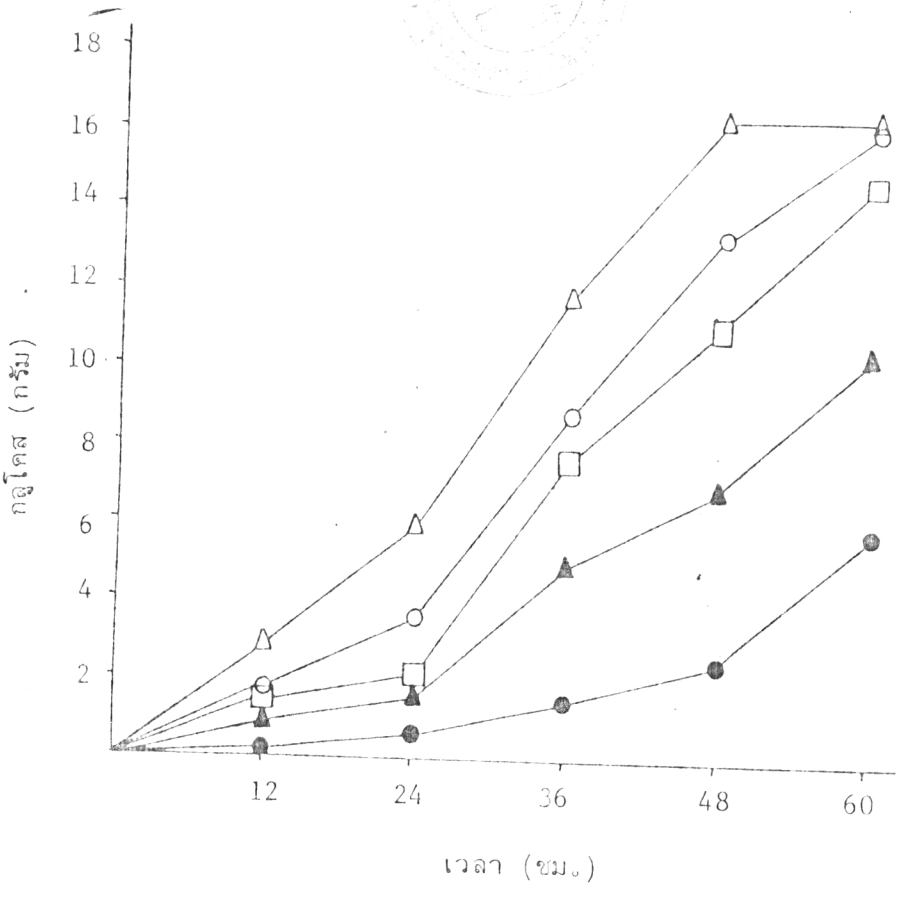
△ กลูโคอมิเลส II

□ กลูโคอมิเลส III



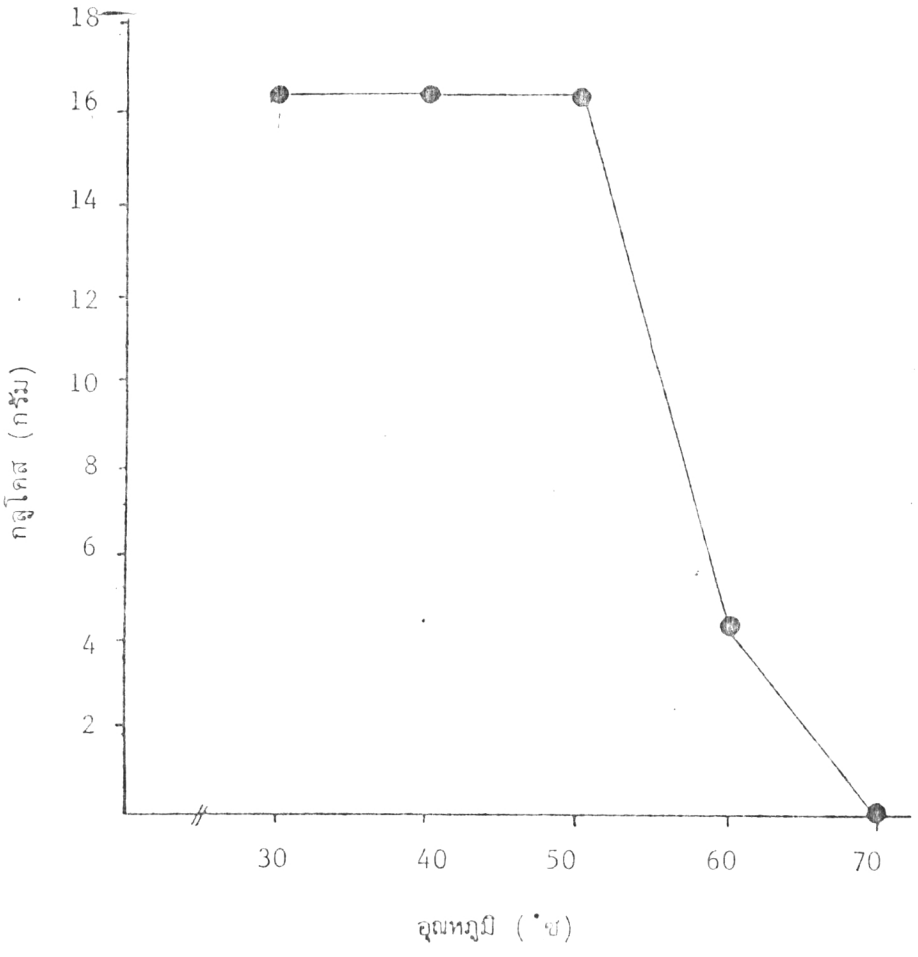
กราฟที่ 27 ผลของปริมาณน้ำที่ใส่ลงในข้าวเหนียวนึ่งต่อการแซคคาริฟิเคชั่น ใช้ข้าวเหนียว 20 กรัมแช่น้ำแล้วนึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที ใส่แป้งเชื้อ 3 % บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ

- ● เติมน้ำลงในข้าวเหนียวนึ่ง 10 % ของน้ำหนักข้าวเหนียว
- ▲ เติมน้ำลงในข้าวเหนียวนึ่ง 30 % ของน้ำหนักข้าวเหนียว
- ○ เติมน้ำลงในข้าวเหนียวนึ่ง 50 % ของน้ำหนักข้าวเหนียว
- □ เติมน้ำลงในข้าวเหนียวนึ่ง 70 % ของน้ำหนักข้าวเหนียว
- △ เติมน้ำลงในข้าวเหนียวนึ่ง 100% ของน้ำหนักข้าวเหนียว



กราฟที่ 28 ผลของปริมาณแป้งเชื้อที่ใส่ลงในข้าวเหนียวนึ่งต่อการแซคคาริฟิเคชั่น ใช้ข้าวเหนียว 20 กรัมแช่น้ำแล้วนึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที ใส่น้ำ 50 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ

- ● ปริมาณแป้งเชื้อ 0.5 %
- ▲ ปริมาณแป้งเชื้อ 1.0 %
- □ ปริมาณแป้งเชื้อ 2.0 %
- ○ ปริมาณแป้งเชื้อ 3.0 %
- △ ปริมาณแป้งเชื้อ 5.0 %

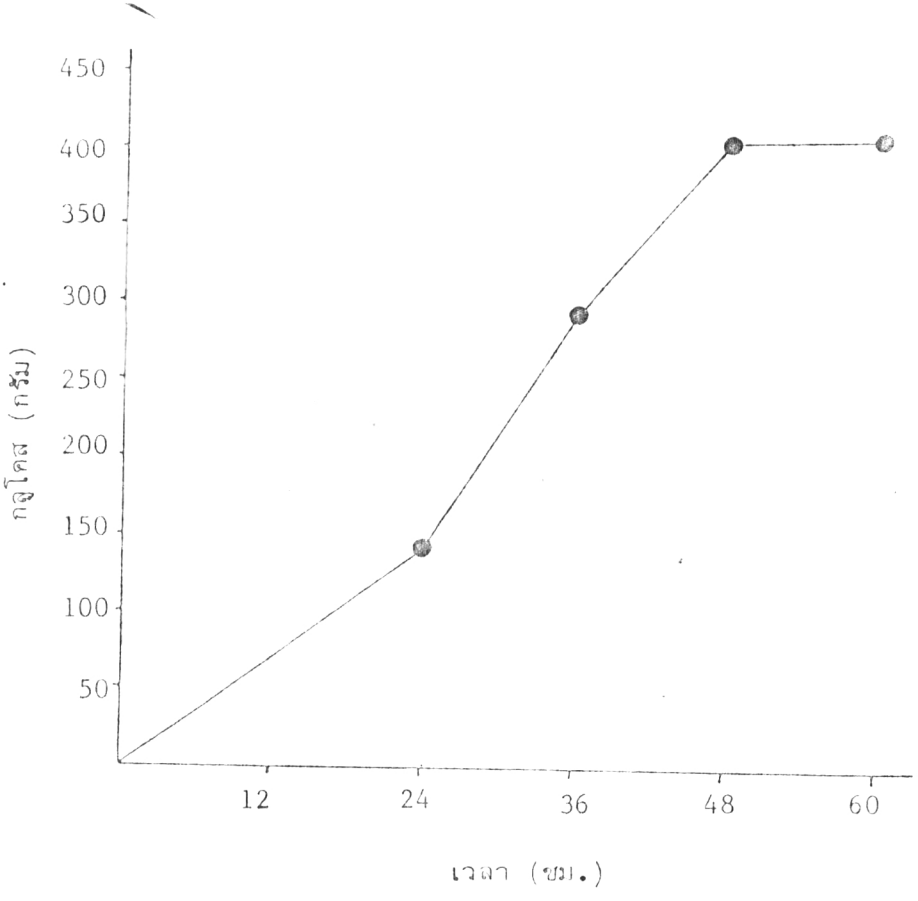


กราฟที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อการแซคคาริฟิเคชั่น
ใช้ข้าวเหนียว 20 กรัมแช่น้ำแล้วนึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที
ใส่แป้งเชื้อ 5.0 % เติมน้ำ 50 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา
48 ชม.

ดังแสดงในกราฟที่ 29

10. การขยายสเกลการแซคคาริฟิเคชั่น

ใช้ข้าวเหนียว 50.0 กรัมแช่น้ำแล้วนึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที เอาใส่ขวดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม. ใส่แป้งเชื้อ 5.0 % ใส่น้ำ 50 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 ซม. กลูโคสจะเพิ่มขึ้นเรื่อย และได้กลูโคสสูงสุด 404.53 กรัมในเวลา 48 ซม. ดังแสดงในกราฟที่ 30



กราฟที่ 30 การแซคคาริฟิเคชั่นในสเกลใหญ่

ใช้ข้าวเหนียว 500 กรัมแช่น้ำแล้วนึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที เอาใส่ขวดแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม. ใส่แป้งเชื้อ 5.0 % ใส่น้ำ 50 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง