

การผลิ้อัลฟาอะไมเลสจากรา

Aspergillus oryzae



นางสาว ปิยนุช คชภักดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมีเทคนิค

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2525

007320

I16561410

THE  $\alpha$ -AMYLASE PRODUCTION FROM  
ASPERGILLUS ORYZAE

MISS PEYANOOT KOTCHAPAKDI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science  
Department of Chemical Technology  
Graduate School  
Chulalongkorn University

1982

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การผลิต อัลฟา อะไมเลส จากรา Aspergillus oryzae  
 โดย                              นางสาว ปิยนุช คชภักดิ์  
 ภาควิชา                              เคมีเทคนิค  
 อาจารย์ที่ปรึกษา              รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ัญญพิทยากุล  
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม        อาจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
 ของ การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

*[Signature]* ..... อนุมัติบัณฑิตวิทยาลัย  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.สุประคิษฐ์ บุญนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

*[Signature]* ..... ประธานกรรมการ  
 (ผุช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคส์ตฤศาสน์)

*[Signature]* ..... กรรมการ  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ัญญพิทยากุล)

*[Signature]* ..... กรรมการ  
 (อาจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

*[Signature]* ..... กรรมการ  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.วิชา วนคุงศ์วรรณ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตอัลฟา อะไมเลส จากรา Aspergillus oryzae

ชื่อนิสิต

นางสาว ปิยนุช กชภักดิ์

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ คุ้มพิทยากุล

อาจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์

ภาควิชา

เคมีเทคนิค

ปีการศึกษา

2524



บทคัดย่อ

ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ อัลฟา อะไมเลส จากรา Aspergillus oryzae ศึกษาถึงอาหาร เสริมและปริมาณที่ใช้ อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งได้แก่ความเร็วของ เครื่องกวน อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ ตลอดจนศึกษาการนำเอนไซม์ที่ได้มาทำเป็นผง หรือเป็นเอนไซม์เข้มข้น และศึกษาเสถียรภาพของ เอนไซม์ ในระหว่างการเก็บ

ผลการศึกษาพบว่า อาหารเสริมและปริมาณที่เหมาะสม ได้แก่  $K_2HPO_4$  0.1%,  $KH_2PO_4$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05% และ  $FeSO_4$  0.001% โดยมีสูตรอาหารที่สมบูรณ์คือ แป้งมัน 20% ยีสต์แดง 4%  $K_2HPO_4$  0.1%,  $KH_2PO_4$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05% และ  $FeSO_4$  0.001% มีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้คือ ความเร็วของ เครื่องกวน 700 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรของอากาศ/ปริมาตรของน้ำหมัก/นาที ปริมาณหัวเชื้อ 5% และ pH 5.0 ในการทำให้เอนไซม์เข้มข้นพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์เข้มข้นที่ได้มีค่า specific activity  $9.6 \times 10^3$  หน่วย/กรัม soluble protein และเสถียรภาพในการเก็บของ เอนไซม์เข้มข้นที่เตรียม (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 เดือน ดีมาก คือค่า activity เปลี่ยนแปลงน้อย ส่วนเอนไซม์ผงที่เตรียมได้มีค่า specific activity  $7.2 \times 10^3$  หน่วย/กรัม soluble protein และเมื่อเก็บไว้ในถุงอะลูมิเนียมเป็นเวลา 2 เดือนที่อุณหภูมิห้องพบว่า ค่า specific activity เปลี่ยนแปลงน้อยมาก และลักษณะผง สี กลิ่น ยังคงเดิม

Thesis Title        The  $\alpha$ -amylase production from Aspergillus oryzae  
Name                Miss Peyanoot Kotchapakdi.  
Thesis Advisor     Associate Professor Chaiyute Thunpitayakul, Ph.D.  
                      Mr. Suttisak Suknaisilp, M.Sc.  
Department        Chemical Technology  
Academic Year     1981

#### ABSTRACT

This research project involved the production of  $\alpha$ -amylase from Aspergillus oryzae with special emphasis on micro-nutrients, ratio of carbon and nitrogen source and optimum environment conditions viz. speed of agitator, temperature, aeration and volume of inoculum. The study of enzyme preparations in the form of powder and concentrate as well as their storage stability was also carried out.

It was found that the optimum media consisted of 20% tapioca starch, 4% dry yeast, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  and 0.001%  $FeSO_4$ . The favourable conditions for enzyme production were: speed of agitator 700 rpm, aeration 1.0 VVM, temperature 35°C, volume of inoculum 5% and pH 5.0. The appropriate temperature for concentration of enzyme was 60°C and the prepared enzyme concentrate has a specific activity of  $9.6 \times 10^3$  unit/gm soluble protein. The stability of enzyme concentrate stored at refrigerated temperature (4°C) was found to be very good; with only a small change in  $\alpha$ -amylase activity after three months' storage in a sterile bottle. In the case of enzyme powder, the prepared powder showed a specific activity of  $7.2 \times 10^3$  unit/gm soluble protein. Storage test conducted on aluminium foil-packed

samples showed that there was only a small variation in enzyme activity after two months' storage at room temperature. The general appearance of the powder with respect to color and odor was almost the same.



### กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ัญญิทธิชากุล ที่ได้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ เป็นอย่างดี กราบขอบพระคุณ อาจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวงศ์สัตตฤๅสน์ ที่ได้ให้คำแนะนำเพิ่มเติม ขอขอบพระคุณภาค วิชาเคมีเทคนิค บริษัท เบียร์ไทยอมฤๅต จำกัด สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อ เครื่องมือและวัตถุดิบในการทดลอง

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเคมีเทคนิค ที่ให้การสนับสนุนทั้ง กำลัง ภายและกำลังใจ จนทำให้งานผ่านไปด้วยความเรียบร้อย

สารบัญ



หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ข
รายการตารางประกอบ .....	ฉ
รายการรูปประกอบ .....	ณ

บทที่

1	บทนำ .....	1
2	วารสารปริทัศน์ .....	4
2.1	ชนิดของอะไมเลส และการทำงาน .....	4
2.1.1	ชนิดของอะไมเลส .....	4
2.1.2	ธรรมชาติและสารประกอบที่ถูกละลาย .....	5
2.1.3	วิธีทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของ เอนไซม์ .....	5
2.1.4	อัลฟาอะไมเลส .....	7
2.2	อุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ .....	9
2.2.1	Semi-solid culture .....	9
2.2.2	Submerged culture .....	12
2.3	ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการผลิตอัลฟาอะไมเลส .....	12
2.3.1	ชนิดของจุลินทรีย์และ ระบบของ เมตา โบลิซึม .....	14
2.3.2	ลักษณะการ เจริญของ เชื้อ จุลินทรีย์และการผลิต เอนไซม์ อัลฟา อะไมเลส .....	14

X  
X



บทที่ (ต่อ)

หน้า

2.3.3	อาหารเลี้ยงเชื้อ, อัตราส่วนระหว่างแหล่งของคาร์บอน กับไนโตรเจน .....	14
2.3.4	สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ..	19
2.4	การแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ .....	20
2.4.1	การกรอง .....	20
2.4.2	การทำให้เข้มข้น .....	23
2.5	การทำอัลฟา อะไมเลส ให้อยู่ในรูปที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม ..	25
2.5.1	คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ .....	25
2.5.2	รูปแบบของผลิตภัณฑ์ .....	25
2.6	การนำอัลฟา อะไมเลส ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร .....	27
3	การทดลอง .....	32
3.1	เครื่องมือ .....	32
3.2	กรรมวิธี การผลิตเอนไซม์ .....	37
3.2.1	การเตรียมวัตถุดิบ .....	37
3.2.2	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	38
3.2.3	การปลูกเชื้อ .....	38
3.3	การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ ในการผลิตเอนไซม์ .....	38
3.3.1	อิทธิพลของอาหาร เสริมและปริมาณที่ใช้ .....	38
3.3.2	เปรียบเทียบแหล่งของไนโตรเจนระหว่างยีสต์สกัดกับยีสต์แห้ง .....	40
3.3.3	อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน .....	41
3.4	การศึกษาอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในการผลิตเอนไซม์ .....	42
3.4.1	ระยะเวลาของการหมักที่ทำให้ $\alpha$ -amylase activity ที่สูงสุด .....	42
3.4.2	อิทธิพลของการกวน .....	43

## บทที่ (ต่อ)

หน้า

3.4.3	อิทธิพลของอุณหภูมิ .....	43
3.4.4	อิทธิพลของการให้อากาศ .....	44
3.4.5	อิทธิพลของปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ .....	45
3.5	การศึกษาการ เติบโตของ เอนไซม์ที่ผลิตได้ .....	45
3.5.1	เอนไซม์เข้มข้น .....	45
3.5.1.1	อิทธิพลของอุณหภูมิในการระเหย .....	46
3.5.1.2	เสถียรภาพของ เอนไซม์เข้มข้นที่ อุณหภูมิศูนย์ .....	46
3.5.2	เอนไซม์ผง .....	47
3.6	วิธีการวิเคราะห์ .....	47
4	ผลการทดลอง .....	49
4.1	การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ ในการผลิตเอนไซม์ .....	49
4.1.1	อิทธิพลของอาหาร เสริมและปริมาณที่ใช้ .....	50
4.1.2	เปรียบเทียบแหล่ง ไนโตร เจนระหว่างยีสต์สกัด กับยีสต์แห้ง .....	52
4.1.3	อัตราส่วนของแหล่ง คาร์บอนและไนโตร เจน .....	54
4.2	การศึกษาอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในการ ผลิตเอนไซม์ .....	55
4.2.1	ระบบเวลาการหมักที่ให้ $\alpha$ -amylase activity ที่ที่สุด .....	56
4.2.2	อิทธิพลของการกวน .....	57
4.2.3	อิทธิพลของอุณหภูมิ .....	58
4.2.4	อิทธิพลของการให้อากาศ .....	59
4.2.5	อิทธิพลของปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ .....	60

บทที่ (ต่อ)

4.3	การศึกษาการเตรียมเอนไซม์ที่ผลิตได้ .....	61
4.3.1	เอนไซม์เข้มข้น .....	62
4.3.2	เอนไซม์ผง .....	64
5	วิจารณ์ผลการทดลอง .....	66
5.1	การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ ในการผลิตเอนไซม์ ...	66
5.1.1	อิทธิพลของอาหารเสริมและปริมาณที่ใช้ .....	66
5.1.2	เปรียบเทียบแหล่งของไนโตรเจนระหว่าง ยีสต์สกัดกับยีสต์แห้ง .....	66
5.1.3	อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ....	67
5.2	การศึกษาอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในการผลิตเอนไซม์ ...	67
5.2.1	ระยะเวลาการหมักที่ให้ $\alpha$ -amylase activity ที่ที่สุด .....	67
5.2.2	อิทธิพลของการกวน .....	68
5.2.3	อิทธิพลของอุณหภูมิ .....	68
5.2.4	อิทธิพลของการให้อากาศ .....	68
5.2.5	อิทธิพลของปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ .....	69
5.3	การศึกษาการเตรียมเอนไซม์ที่ผลิตได้ .....	69
5.3.1	เอนไซม์เข้มข้น .....	69
5.3.2	เอนไซม์ผง .....	70
6	สรุปผล .....	72
	เอกสารอ้างอิง .....	74
	ภาคผนวก .....	80
	ประวัติ .....	89

รายการประกอบ



รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของอะไมโลเพคติน และการทำงานของ เอนไซม์อะไมเลส ทั้ง 3 แบบ	6
2	การทำงานของอัลฟา อะไมเลส และสูตร โครงสร้างของมัน	8
3	แสดงระยการ เจริญเติบโตของ เชื้อจุลินทรีย์	15
4	แผนผังแสดง การแยกผลิตภัณฑ์ออกจากน้ำหมัก	21
5	แผนผังแสดง การผลิตมอลโตสไซรัป (Maltose syrup)	29
6	แผนผังแสดง การผลิต High conversion syrup	30
7	เครื่องหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของ NBS มองทาง ด้านหน้า	34
8	เครื่องหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของ NBS มองทาง ด้านข้าง	35
9	เครื่องหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของ NBS มองทาง ด้านหลัง	36
10	แผนผังแสดง การ เตรียมยีสต์แห้ง	39
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\alpha$ -amylase activity กับระยะเวลา การหมักเอนไซม์ เมื่อความเร็วของ เครื่องกวนเป็น 700 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM ปริมาตร หัวเชื้อเป็น 5%, pH 5.0	56
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\alpha$ -amylase activity กับระยะเวลา ในการหมัก เมื่อความเร็วของ เครื่องกวนต่างกัน ที่อุณหภูมิ 35 องศา เซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM, pH 5.0 ปริมาตรหัวเชื้อ เป็น 5%	57
13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\alpha$ -amylase activity กับระยะเวลา ของการหมักเมื่ออุณหภูมิต่างกัน ที่ความเร็วของ เครื่องกวน 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM, pH 5.0, ปริมาตรหัวเชื้อเป็น 5%	58

รูปที่ (ต่อ)

๒

หน้า

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 14 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\alpha$ -amylase activity กับระยะเวลาในการหมัก เมื่ออัตราการให้อากาศต่างกัน ที่ความเร็วของเครื่องกวนเป็น 700 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH 5.0 ปริมาตรหัวเชื้อเป็น 5% | 59 |
| 15 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\alpha$ -amylase activity ที่ระยะเวลาการหมัก เมื่อปริมาตรหัวเชื้อต่างกัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วของเครื่องกวน 700 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM pH 5.0      | 60 |
| 16 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Optical density ของมอลโตส กับ ความเข้มข้นของมอลโตส ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนมิเตอร์   | 80 |

รายการตารางประกอบ



ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของอัลฟา อะไมเลส จากแหล่งกำเนิดต่าง ๆ	10
2	เปรียบเทียบคุณสมบัติของ อัลฟา อะไมเลส จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ	11
3	เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยวิธี Semi-solid และ Submerged process	13
4	ส่วนประกอบของยีสต์ชนิดต่าง ๆ	17
5	กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในยีสต์ชนิดต่าง ๆ	18
6	ขนาดของจุลินทรีย์และชนิดของ เครื่อง เหยียงที่ใช้	22
7	สารที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์ใส	24
8	NOVO Food Grade Specification	26
9	ความสัมพันธ์ระหว่างอาหารเสริมที่ใช้กับ $\alpha$ -amylase activity	50
10	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารเสริมที่ใช้กับ $\alpha$ -amylase activity	51
11	ความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งของไนโตรเจนที่ต่างกันกับ $\alpha$ -amylase activity	52
12	เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนระหว่างยีสต์แห้ง กับยีสต์สกัด	53
13	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่าง ๆ กับ $\alpha$ -amylase activity	54
14	ผลของอุณหภูมิในการระเหยน้ำที่มีต่อ $\alpha$ -amylase activity ของเอนไซม์เข้มข้น	62
15	ระยะเวลาของการเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) มีต่อเอนไซม์เข้มข้น	63
16	ข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับเอนไซม์ผง	64
17	เปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่าง เอนไซม์เข้มข้น เอนไซม์ผงกับเอนไซม์ของ NOVO และจากการวิจัยต่าง ๆ	65