การเลี้ยงรา Rhizopus oryzae บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอมิเลส

นายไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2526

ISBN 974-561-977-9

011298

Solid State Cultivation of *Rhizopus oryzae* for Glucoamylase Production

Mr.Krairork Tawatpun

A Thesis Subsmitted in Partial Fulfillments of

the Reqiurements for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

1983

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเลี้ยงรา Rhizopus oryzae บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอมิเลส
โดย	นายไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนท์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเลี้ยงรา Rhizopus oryzae บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอมิเลส
ชื่อนิสิต	นายไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2525

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาหาสภาพอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae สายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงงานสุราโดยใช้ปลายข้าวเจ้า รำข้าวสาลี กากถั่วเหลือง และรำข้าวเจ้าหยาบ เป็นสารตั้งต้น พบว่า R. oryzae สร้างสปอร์สูงสุดในปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบอัตราส่วน 9:1 ใส่น้ำ 23 % สร้างสปอร์ได้จำนวน 9.5×10^{12} สปอร์/มล. ส่วนในปลายข้าวเจ้า ปลายข้าวเจ้าผสมรำข้าวสาลีอัตราส่วน 4:1 และปลายข้าวเจ้าผสมกากถั่วเหลืองอัตราส่วน 4:1 ได้จำนวนสปอร์ 1.3×10^{12}, 7.5×10^{12} และ 6.0×10^{12} สปอร์/มล. ตามลำดับ

การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ R. oryzae บนอาหารวุ้น พบว่าโพลีเปปโตนส่งเสริมให้มีการเจริญได้สูงกว่าแอมโมเนียมทาร์เทรต ส่วนสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสพบว่า โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร ส่งเสริมการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสเพิ่มขึ้น แต่เฟอร์ริก-ซัลเฟตเป็นตัวยับยั้งการสร้างกลูโคอมิเลส ส่วนคอปเปอร์ซัลเฟตมีผลต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสน้อยมาก

การเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งเพื่อสร้างกลูโคอมิเลสพบว่า ปริมาณน้ำที่ใส่ลงในอาหารแข็ง 40 % เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลส สำหรับสารอาหารตั้งต้นพบว่าข้าวเจ้าเหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสมากกว่าข้าวเหนียว และเมื่อหาปริมาณรำหยาบที่ใส่ลงในข้าวเจ้าพบว่าอัตราส่วนของข้าวเจ้าต่อรำหยาบอัตราส่วน 5:1 เหมาะสมที่สุด เมื่อศึกษาหาเกลือแร่และสภาพของอาหารต่อการสร้างกลูโคอมิเลสพบว่าแอมโมเนียมทาร์เทรตส่งเสริมให้มีการสร้างกลูโคอมิเลสได้มากกว่าโพลีเปปโตน โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมทาร์เทรต 0.3 %

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 % และมีความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.0 ใส่เชื้อเริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°ซ นาน 36 ชม. สามารถผลิตกลูโคอมิเลสได้ 415 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อขยายสเกลการผลิตกลูโคอมิเลสในตู้บ่มเชื้อที่ออกแบบขึ้นโดยมีการเป่าอากาศที่อิ่มตัวด้วยความชื้นตลอดเวลา สามารถผลิตกลูโคอมิเลส 376.8 หน่วย/กรัมสารตั้งต้น แล้วนำแป้งเชื้อที่ผลิตได้ไปอบที่อุณหภูมิ 45°ซ นาน 12 ชม. โดยที่กลูโคอมิเลสแอคติวิตีคงที่ และสามารถเก็บแป้งเชื้อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

การทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์โดยใช้แป้งเชื้อที่อบแห้งและบดให้ละเอียด แช่ในอซิเตตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ที่อุณหภูมิ 10°ซ นาน 12 ชม. กรองเอาสารละลายไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 % นำตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์แล้วผ่านลงในคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-25 เอาส่วนที่มีกลูโคอมิเลสแอคติวิตีมาผ่านลงใน ซี.เอม.เซฟาเดกซ์ ซี-50 (4x50 ซม.) กลูโคอมิเลสจะถูกชะออกมา 2 พวกที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2 และ 0.3 โมลาร์ เมื่อนำกลูโคอมิเลสทั้ง 2 พวกผ่านลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 สามารถแยกกลูโคอมิเลสได้ 3 ชนิดคือ กลูโคอมิเลส I II และ III ซึ่งมีแอคติวิตีเฉพาะเพิ่มขึ้นจากเอนไซม์ที่เริ่มสกัด 254 204 และ 205 เท่าตามลำดับ กลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดจะให้แถบโปรตีนแถบเดียวในโพลีอคริลาไมด์ เจล อิเลกโตรโฟรีซีส

กลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันคือ กลูโคอมิเลส I และ II มีความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกริยาที่ 5.5 ส่วนกลูโคอมิเลส III มีความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกริยาที่ 4.5 กลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 50°ซ ความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างของกลูโคอมิเลส I ที่ 3.5-6.0 กลูโคอมิเลส II ที่ 4.0-6.0 และกลูโคอมิเลส III ที่ 4.0-4.5 กลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดมีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่ 50°ซ กลูโคอมิเลสแต่ละชนิดมีค่าคงที่ของ Michealis (Km) แตกต่างกันคือ 0.37 3.33 และ 1.43 ตามลำดับ และกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดสามารถย่อยสลายแป้งได้อย่างสมบูรณ์โดยย่อยแป้ง 1.0 % หมดในเวลา 2 5 และ 4 ชม. ตามลำดับ

การแซคคาริฟีเคชั่นข้าวเหนียวโดยใช้แป้งเชื้อที่ผลิตขึ้น มีกลูโคอมิเลสแอคติวิตี 734 หน่วย/กรัมแป้งเชื้อแห้ง พบว่าปริมาณน้ำที่ใส่ลงในข้าวเหนียวนึ่งมากกว่า 50 % ของน้ำหนักข้าวเหนียวก่อนนึ่ง จะมีการย่อยสลายข้าวเหนียวได้ดี โดยใส่แป้งเชื้อ 3.0 % ได้กลูโคส 16 กรัมจากข้าวเหนียว 20 กรัมในเวลา 60 ชม. การใช้ปริมาณแป้งเชื้อในการย่อยสลายข้าวเหนียวถ้าใช้แป้งเชื้อมากขึ้นจะทำให้การย่อยสลายข้าวเหนียวเร็วขึ้น จากการทดลองถ้าใช้แป้งเชื้อน้อย

กว่า 3 % การย่อยสลายข้าวเหนียวจะได้กลูโคสต่ำมากถ้าใช้แป้งเชื้อ 3 % จะได้กลูโคส 16 กรัม ในเวลา 60 ชม. แต่ถ้าใช้แป้งเชื้อ 5 % จะได้กลูโคส 16 กรัมในเวลา 48 ชม. ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซนต์การย่อยสลายแป้งแล้วได้ 80 % จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการแซคคาริฟิเคชั่น แล้วพบว่าอุณหภูมิ 30-50°ซ จะได้กลูโคสไม่แตกต่างกันคือ 16.40 กรัม แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 55°ซ จะได้กลูโคสลดลง

การขยายสเกลการแซคคาริฟิเคชั่น โดยใช้ข้าวเหนียว 500 กรัม แช่น้ำนาน 6 ชม. ใส่แป้งเชื้อ 5 % โดยน้ำหนักของข้าวเหนียว (734 หน่วย/กรัมแป้งเชื้อแห้ง) และเติมน้ำ 50 % โดยปริมาตร/น้ำหนักข้าวเหนียว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชม. แล้วได้กลูโคส 80 % ของข้าวเหนียว ซึ่งไม่แตกต่างกับการแซคคาริฟิเคชั่นในสเกลเล็ก

Thesis title Solid State Cultivation of Rhizopus oryzae for Glucoamylase Production

Name Mr. Krairork Tawatpun

Thesis Advisor Associate Professor Sumalee Pichayangkura. Ph.D.

Thesis Co-Advisor Assistant Professor Pairoh Pinphanichakarn Ph.D.

Department Microbiology

Academic Year 1982.

Abstract

The optimal conditions for spore production by Rhizopus oryzae, a gift from a whiskey factory in Thailand, were studied. Various kinds of starchy materials were used as carbon, nitrogen and vitamins sources. The ratio of scrab rice to coarse rice bran with 23 % of added water that yielded the highest amount of spore production (9.5×10^{12} spores/ml) was found to be 9:1.

The spore production by the organism cultured on only rice bran or scrab rice : wheat bran (4:1) or scrab rice : soy bean waste (4:1) were 1.3×10^{12}, 7.5×10^{12}, and 6.0×10^{12} spores/ml, respectively.

The culturing conditions of R. oryzae on agar medium using ammonium tartrate or polypeptone as a nitrogen source were studied. Polypeptone was found to be better in promoting the cell growth whereas ammonium tartrate was better in enhancing the glucoamylase production. The highest level of glucoamylase production was obtained when the medium containing 2grams/liter of KH_2PO_4 and 1 gram/liter of $MgSO_4.7H_2O$ was used. Ferric sulfate inhibited the production of glucoamylase whereas copper sulfate had no effect.

The composition of solid substrate for glucoamylase production by R. oryzae consisted of ground rice mixing with coarse rice bran in a ratio of 5:1, 0.3 % ammonium tartrate, 0.1 % $K H_2PO_4$, 0.1 % $MgSO_4.7H_2O$, and 40 % of water, pH 4.0. The inoculum size was 5 ml of $5x10^6$ spores/ml per 100 grams of the substrate. The optimal incubation time was 36 hrs. at 35°C. Under these conditions, upto 415 units of glucoamylase were obtained from 1 gram of the mold bran. In the expansive production scale of glucoamylase (1.2 kilograms of the medium), 376.8 units of the enzyme were obtained from 1 gram of the mold bran. The mold bran obtained was dried at 45°C for 12 hrs. for further study.

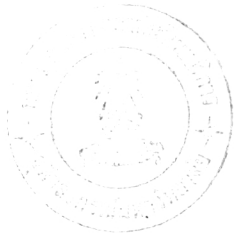
The glucoamylase was extracted from the dry mold bran by soaking with 0.05 M acetate buffer, pH 4.5 at 10°C for 12 hrs. It was precipitated with 40-80 % saturation of ammonium sulfate then fallowed by chromatography on Sephadex G-25 and CM-Sephadex C-50, respectively. Two peaks of glucoamylase activity were detected from CM-Sephadex C-50 chromatography at 0.2 M.,and 0.3 M. of NaCl, respectively. Both peaks were further subjected to Sephadex G-200 chromatography. A single peak of glucoamylase activity, designated as glucoamylase I, was obtained from the first peak of the activity from the CM-Sephadex C-50 chromatography (the 0.2 M fraction) whereas the second peak (the 0.3 M fraction) gave two separated peaks of the enzyme activity. They were designated as glucoamylase II,and III, respectively.

Approximately 254, 204, and 205 folds of purification of glucoamylases I, II,and III were obtained , respectively. Each type of the enzymes showed a single band on polyacrylamide disc-gel electrophoresis.

Some properties of glucoamylases I, II, and III were determined. The optimal pHs for their activities were at 5.5, 5.5,and 4.5, respectively.

These enzymes had the same optimal temperature at 50°C. They were also heat stable upto 50°C. Their pH stabilities were found to be in the pH ranges of 3.5-6.0, 4.0-6.0, and 4.0-4.5, respectively. The Km values of glucoamylases I, II and III for starch were 0.37, 3.33,and 1.43 mg/ml, respectively. Twenty-eight units/ml of each type of the enzymes completely hydrolyzed 1 % of starch solution in 2, 5,and 4 hrs, respectively.

Finally, saccharification of glutinous rice was studied by using 5 % of dry mold bran (734 units of gluamylase activity/gram of dry mold bran) with respect to the substrate and 50 % of water added to the glutinous rice. About 80 % (by weight of glutinous rice) of saccharification was obtained.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และให้แนวคิดอย่างดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์นี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ Dr. S. Kinoshita แห่งแห่งมหาวิทยาลัยโอซากา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณผู้จัดการโรงงานสุราบางยี่ขันทั้งสองแห่งที่ได้อำนวยความสะดวกและแนะนำวิธีทำแป้งเชื้อและส่าขาวของโรงงาน ขอขอบพระคุณ คุณประสิทธิ์ เธียรศิริ และคุณสุพรรณ ชาติบุรุษ ที่ได้กรุณา ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ตลอดจนพนักงานโรงงานสุราบางยี่ขันทั้งสองแห่งที่มีส่วนช่วยทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ ท่านคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนิสิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา พี่และน้องที่ให้ความช่วยเหลือทั้งด้านกำลังใจและกำลังเงินในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ช

กิตติกรรมประกาศ ..... ญ

สารบัญ ..... ฎ

รายการตารางประกอบ ..... ฐ

รายการรูปประกอบ ..... ฑ

รายการกราฟ ..... ฒ

คำย่อ ..... ด

บทที่

1 บทนำ 1

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 2

การสำรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง 2

2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 9

2.1 ชนิดและวิธีแยกจุลินทรีย์จากแป้งเชื้อ 9

2.2 ศึกษาหาสภาพอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ

R. oryzae 9

2.3 การตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคอมิเลส 10

หน้า

2.4 การหาสารอาหารและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารวุ้น 10
2.5 การหาสภาพของอาหาร ปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง ... 11
2.6 การขยายสเกล (scale up) การผลิตกลูโคอมิเลส 14
2.7 การทำแป้งเชื้อให้แห้งโดยใช้ความร้อน 14
2.8 การหาปริมาณโปรตีน 14
2.9 การทำดิสซ์ เจล อิเล็กโตรโฟริซีส 14
2.10 การแยกคาริฟิเคชั่นข้าวเหนียว 15
2.11 การขยายสเกลการแยกคาริฟิเคชั่นข้าวเหนียว 15

3 ผลการทดลอง

3.1 การหาสภาพอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae 16
3.2 การหาสารอาหารและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารวุ้น 16
3.3 การหาสภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอมิเลสบนอาหารแข็ง 25
3.4 การขยายสเกลการผลิตกลูโคอมิเลสบนอาหารแข็ง 35
3.5 การทำแป้งเชื้อให้แห้งโดยใช้ความร้อน 35
3.6 การสกัดและการทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์ 35
3.7 การทดสอบความบริสุทธิ์ของกลูโคอมิเลส 41
3.8 คุณสมบัติบางประการของกลูโคอมิเลส 47
3.9 การแยกคาริฟิเคชั่น 53
3.10 การขยายสเกลการแยกคาริฟิเคชั่น 58

4 การอภิปรายผลการทดลอง 60

บรรณานุกรม 66

ภาคผนวก 72

ประวัติผู้เขียน 80

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่

1 การสร้างสปอร์ของ R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีความชื้นแตกต่างกัน 17

2 สรุปลำดับการทำให้กลูโคอมิเลสบริสุทธิ์ 42

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ตู้บ่มเชื้อที่ใช้ในการผลิตกลูโคอมิเลสในสเกลใหญ่	32
2	การเจริญของ R. oryzae บนอาหารแข็งในสเกลใหญ่	38
3	การทำอีเลกโตรโฟริซีสของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดบนโพลีอคริลาไมด์เจล	46

รายการกราฟประกอบ

กราฟที่		หน้า
1	อัตราส่วนของปลาข้าวเจ้าต่อรำหยาบที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae	18
2	ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น	19
3	ผลของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น	21
4	ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น	22
5	ผลของเฟอร์ริกซัลเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น	23
6	ผลของคอปเปอร์ซัลเฟตต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น	24
7	ผลของความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	26
8	ปริมาณรำหยาบที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	27
9	อัตราส่วนของข้าวเจ้าต่อข้าวเหนียวที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น	28
10	อิทธิพลของความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	29
11	ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	31

รายการกราฟประกอบ (ต่อ)

กราฟที่		หน้า
12	ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	32
13	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	33
14	ผลของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	34
15	ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง	36
16	การเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอมิเลสในสเกลใหญ่ ..	39
17	การทำแป้งเชื้อให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน	40
18	การแยกกลูโคอมิเลสโดยใช้ ซี.เอม.เซฟาเดกซ์ ซี-50 โครมาโตกราฟี ...	43
19	การทำกลูโคอมิเลสพีก ก. ให้บริสุทธิ์โดยผ่านลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 โครมาโตกราฟี	44
20	การทำกลูโคอมิเลสพีก ข. ให้บริสุทธิ์โดยผ่านลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 โครมาโตกราฟี	45
21	ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด	48
22	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด	49
23	ความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด	50
24	ความคงตัวต่ออุณหภูมิต่อกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด	51
25	ไลน์เวเวอร์-เบิร์ค พลอท ของกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิด	52
26	ความสามารถในการย่อยสลายแป้งของกลูโคอมิเลสแต่ละชนิด	54

รายการกราฟประกอบ (ต่อ)

หน้า

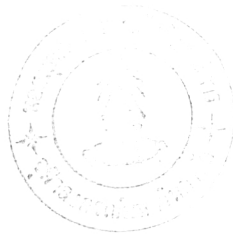
กราฟที่

27 ผลของปริมาณน้ำที่ใส่ลงในข้าว เหนียวนึ่งต่อการแซคคาริฟิเคชั่น 55

28 ผลของปริมาณแป้งเชื้อที่ใส่ลงในข้าว เหนียวนึ่งต่อการแซคคาริฟิเคชั่น ... 56

29 ผลของอุณหภูมิต่อการแซคคาริฟิเคชั่น 57

30 การแซคคาริฟิเคชั่นในสเกลใหญ่ 59



คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

มก. = มิลลิกรัม

ซม. = เซนติเมตร

ชม. = ชั่วโมง

°ซ = องศาเซลเซียส