บรรณานุกรม

เฉลิม บูรณะนนท์ "การปฏิบัติเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูงสุดจากวิธีการหมักส่า" วิทยาศาสตร์ 4(2493) : 3-17.

ชัยวัฒน์ จาติเสถียร "การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับการหมักข้าวหมาก" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2520.

ปาริชาติ วัฒนา ประภา เพื่องฟูพงศ์ และมาลัย เมืองน้อย "การผลิต starch syrup จากแป้งมันสำปะหลังโดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด เอนไซม์ และกรดกับเอนไซม์ร่วมกัน" รายงานผลการวิจัยทุนอุดหนุนประเภทอาจารย์และศาสตราจารย์ ประจำปี 2519 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 2519.

พลศึกษา, กรม "ตารางคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม" โรงพิมพ์คุรุสภา กรุงเทพฯ 2510.

มนตรี เยาวสังเกตุ "การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และเชื้อราเพื่อผลิตไวน์ข้าว" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2521.

สุกัญญา จันทะชุม "การผลิตและใช้ประโยชน์กลูโคอมิเลสจากเชื้อรา" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2522.

อรุณ ศตะเมฆ "การคัดเลือกเชื้อราและการเตรียม mold bran เพื่อปรับปรุงการผลิตแอลกอฮอล์จากข้าว" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2494.

Adams, M. "Amylase : Their Kinds and Properties and Factors which Influence their Activity" Food technology. 7(1953) : 35-38.

Alazard, D. and Raimbault, M. "Comparative Study of Amylolytic Enzymes Production by Aspergillus niger in Liquid and Solid-State

Cultivation" Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12(1981): 113-117.

Borton, L.L., Georgi, E.C. and Lineback, D.R. "Effect of Moltose on Glucoamylase Formation by Aspergillus niger" J. Bact. 111(1972) : 771-777.

Borton, L.L., Lineback, D.R. and Georgi, C.E. "The Influence of Nitrogen and Carbon Sources on the Production of Glucoamylase by Aspergillus" J. Gen. Appl. Microbiol. 15(1969) : 327-344.

Boyer, P.D. in The Enzymes Vol. 6, 3th ed., pp. 192-233. Academic Press, New York, 1972.

Corman, J. and Lauglyke, A.F. "Action of Mold Enzymes in Starch Saccharification" Cereal Chem. 25(1948) : 190-201.

Feniksova, R.V. "Physiology and Nutrition of Aspergillus oryzae in Relation to the Fermentation of Action Amylase by this Fungal" Proc. Int. Synp. Enzymes Chem. Vol. 2. pp. 482-485., 1957

Gandjar, I. Some Notes on the Identification of Rhizopus Molds in Identification Techniques of Microorganisms in Culture Collection. pp. 37-41, Bangkok MIRCEN, Bangkok, 1981.

Gutcho, S.T. in Microbial Enzymes Production. pp. 116-135, Noyes Data Corporation, New Jersey, 1974.

Hayashida, S. "Selective Submerged Productions of Three Types of Glucoamylase by a Black-koji Mold" Agr. Biol. Chem. 39(1975): 2093-2099.

Hayashida, S. Nomura, T; Yoshino, E. and Hongo; M. "The Formation and Properties of Substilisin-modified Glucoamylase" Agr. Biol.

Chem. 40(1976) : 141-146.

Hayashida, S. and Yoshino, E. "Formation of Active Derivatives of Glucoamylase I During the Digestion with Fungal Acid Protease and ∝-Mannosidase" Agr. Biol. Chem. 42(1978) : 927-933.

Hockenhull, D.J.D. Recent Development in the Production and Industrial Application of Amylolytic Enzymes Derived from Filamentous Fungi in Progress in Industrial Microbiology Vol. 6. pp. 97-136, Interscience Publishers, Inc., New York, 1967.

Hopkins, R.H. The Action of Amylases. in Advances in Enzymology Vol. 6 pp. 389-412, Interscience Publishers, Inc New, York, 1946.

Juliano, B.O.; Cagampang, G.B., Cruz, L.J. and Szntiago, E.G. "Some Physicochemical Properties of Rice in Southeast Asia" Cereal Chem. 41(1964) : 275-285.

Kato, K.; Kuswanto, K; Banko, T and Harada, T "Identification of Endomycopsis fibuligera Isolated from Ragi in Indonesia and Properties of its Crystalline Glucoamylase" J. Ferment. Technol. 54 (1976) : 831-837.

Krzichowska, M. and Urbaned, H. "Isolation and Some Properties of Glucoamylase from Candida charticola Lindau" Appl. Microbiol. 30(1975) : 160-166.

Lineback, D.R. and Aira, L.A. "Structure Characterization of the Two Forms of Glucoamylase from Aspergillus niger" Cereal Chem. 49(1972) : 283-297.

Lineback, D.R.; Georgi, C.E. and Doty, R.I. "Glucoamylase Production by Aspergillus niger as Influenced by Medium Composition" J. Gen. Appl. Microbiol. 12(1966) : 27-38.

Lowry, O.H.; Rosebrough., N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. "Protein Meesurement with Folin Phenol Reagent" J. Biol. Chem. 193 (1951) : 265-275.

Mayer, H.K. and Gibbons, G.C. The Present Status of Starch Chemistry in Advances in Enzymology Vol. 12 pp. 342-374 Interscience Publishers, Inc., New York, 1951.

Narahara, H.; Koyama, Y; Yoshida, T; Pichyangkura, S; Ueda, R. and Taguchi, H. "Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of Aspergillus oryzae" J. Ferment. Technol. 60 (1982) : 311-319.

Nishio, N.; Tai, K. and Nagai, S. "Hydrolase Production by Aspergillus niger in Solid State Cultivation" Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8(1979) : 263-270.

Pazur, J.H. Enzymes in Synthesis and Hydrolysis of Starch in Starch Chemistry and Technology (Whistler, R.L. and Dasshall, E.P. eds.) Vol.I.pp. 153-175, Academic Press, New York, 1965.

Pazur, J.H. "Glucoamylase : Structure and Properties of the Two Forms of Glucoamylase from Aspergillus niger". Corbohyd. Res. 20 (1971) : 83-96.

Pazur, J.H. and Ando, T. "The Action of an Amyloglucosidase of Aspergillus niger on Starch and Malto-oligosaccharides" J. Biol. Chem. 234(1959) : 1966-1970.

Pazur, J.H. and Okada, S. "Properties of the Glucoamylase from Rhizopus delemar" Carbohyd. Res. 4(1967) : 371-379.

Peterson, N.B. in Edible Starches and Starch-Derived Syrups. pp.201-281, Nayes Data Corporation, London, 1975.

Pichyangkura, S; Suratanakavikul, V.; Nagai, S. and Taguchi, H. "Production of Liquifying and Soccharifying Amylase by Solid State Cultivation on Thai Rice" in Microbial Utilization of Renewable Resources Vol 2. J.S.P.S.-N.R.C.T. Seminor on Agro-Industry Including Microbial Technology. pp. 415-418 Songkhla, Thailand, January 5-8, 1981.

Radley, J.A. in Starch Production Technology pp. 302. Applied Science Publishers Ltd., London, 1976.

Raimbault, M. and Alazard, D. "Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation" Fur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9(1980) : 199-209.

Razzaque, A. and Ueda, S. "Glucoamylase of Aspergillus oryzae" J. Ferment. Technol. 56(1978) : 296-302.

Reed, G. Food Science and Technology in Enzymes in Food Processing (Auson, M.L., Chichester, C.O.; Mark, E.M. and Stewart, G.F. eds.) pp. 221-240. Academic Press, New York, 1966.

Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E. "Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels" Nature 195(1962) : 281-283.

Sigma Chemical Company "The Enzymatic Colorimetric Determination of Glucose in Whole Blood, Plasma or Serum at. 425-475 nm" Sigma Technical Bulletin. No. 510 p. 8,Saint Lauis, 1980.

Sukumavasi, J; Kato, K. and Harada, T. "Glucoamylase of Strain of Endomycopsis fibuligera Isolated from Mold Bran (Look Pang) of Thailand" J. Ferment. Technol. 53(1975) : 559-565.

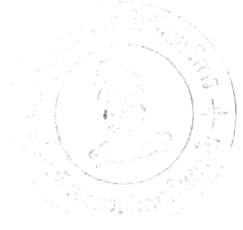
Takahashi, T; Tsuchida, Y. and Irie, M. "Purification and Some Properties of Three Forms of Glucoamylase froms a Rhizopus sp." J. Biochem. 84(1978) : 1183-1194.

Underkofler, L.A. and Hickey, R.J. in Industrial Fermentation Vol. 2 pp. 97-149. Chemical Publishing Co., Inc, New York, 1954.

Whilaker, J.R. in Principle of Enzymology for Food Science pp. 338-349 Marcel Dekkar, New York, 1972.

Windish, W.W. and Mhatre, N.S. in Advance in Applied Microbiology Vol. 7. pp. 273-297 Academic Press, New York, 1965.

Yoshino, E. and Hayashida, S. "Enzymatic Modification of Glucoamylase of Aspergillus awamori Var. kawachi" J. Ferment. Technol. 56(1978) : 289-295.



ภาคผนวก

ภาคผนวก

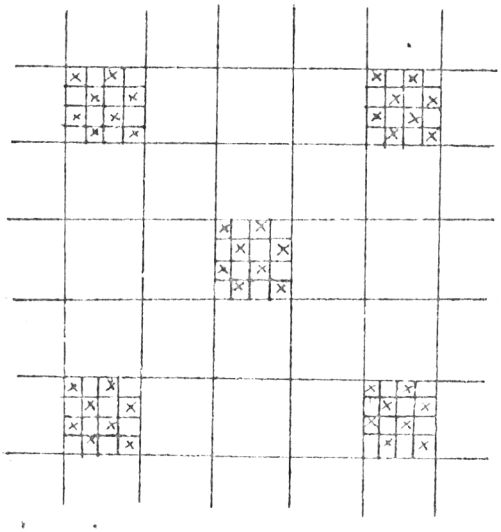
1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราสูตรที่ 1 (อรุณ, 2498)

กลูโคส	15.0 กรัม
โพลีเปปโตน	5.0 "
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2 "
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5 "
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5 "
แอมโมเนียมทาร์เทรต	1.0 "
วุ้น	15.0 "
น้ำกลั่น	1000 มล.

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

การนับจำนวนสปอร์โดยนับสปอร์ในช่องใหญ่ 5 ช่องและในแต่ละช่องใหญ่นั้นนับอีก 8 ช่อง โดยนับช่องเว้นช่องดังแสดงในรูปข้างล่างนี้



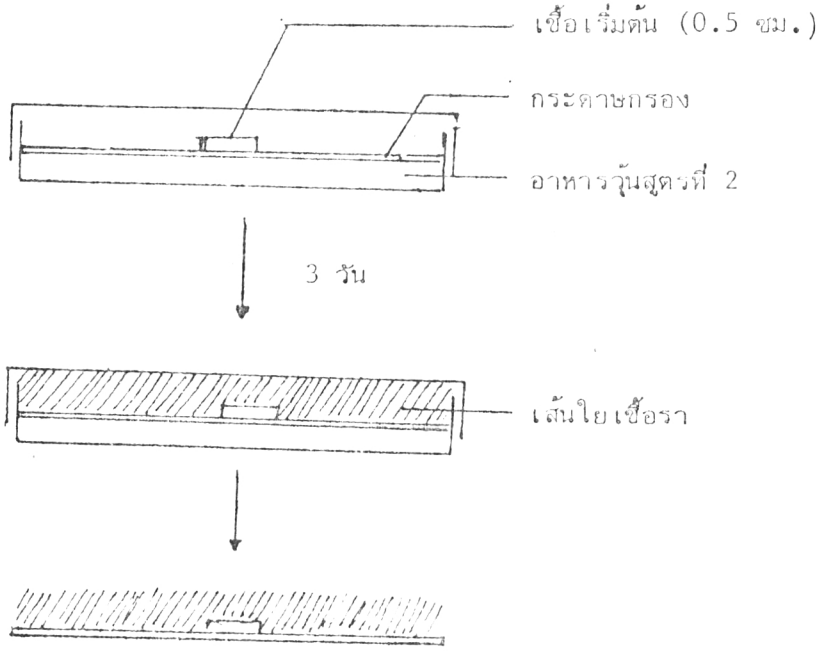
จำนวนสปอร์ = จำนวนสปอร์เฉลี่ยในช่องเล็กx16x10^8 สปอร์/มล.

3. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราสูตรที่ 2

แป้ง (soluble starch)	15.0	กรัม
โพลีเปปโตน	5.0	"
แอมโมเนียมทาร์เทรต	1.0	"
แมกนีเซียมซัลเฟต	1.0	"
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	"
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.1	"
เฟอร์ริกซัลเฟต $Fe_2(SO_4)_3$	0.1	"
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	1.0	"
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4\ 7H_2O$)	10.0	ไมโครกรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การหาการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสโดยเลี้ยงราบนอาหารวุ้นโดยใช้กระดาษกรองวางไว้บนอาหารวุ้น ดังแสดงในรูปข้างล่างนี้



4. การหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี พี.จี.โอ. เอนไซม์ (Sigma, 1980. Huggett and Nixon, 1957)

ก. การเตรียมสารละลาย พี.จี.โอ.เอนไซม์ โดยละลาย พี.จี.โอ.เอนไซม์ 1 แคปซูล (capsule) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วยและบัฟเฟอร์ในน้ำกลั่น 60 มล. เติมสารละลายของโอ-ไดอนซิดีน (o-dianisidine) 1 % ใน 95 % เอธานอล (ethanol) ปริมาตร 0.5 มล. ทำให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บไว้ในตู้เย็น

ข. การหาปริมาณกลูโคส

1. ใช้ตัวอย่าง 0.25 มล. (กลูโคส 10-200 ไมโครกรัม/มล.) ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายพี.จี.โอ.เอนไซม์ 2.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน

3. แช่ไว้ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที

4. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตร-โฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) นำค่าที่อ่านได้มาหาปริมาณกลูโคสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของกลูโคส (กราฟที่ 31) แล้วคำนวณหาปริมาณกลูโคสตามสูตรข้างล่างนี้

$$\text{ปริมาณกลูโคส} = \frac{40 \times \text{ค่าเจือจาง (dilution)} \times \text{ปริมาณกลูโคสที่เทียบกับกราฟมาตรฐาน}}{1000}$$

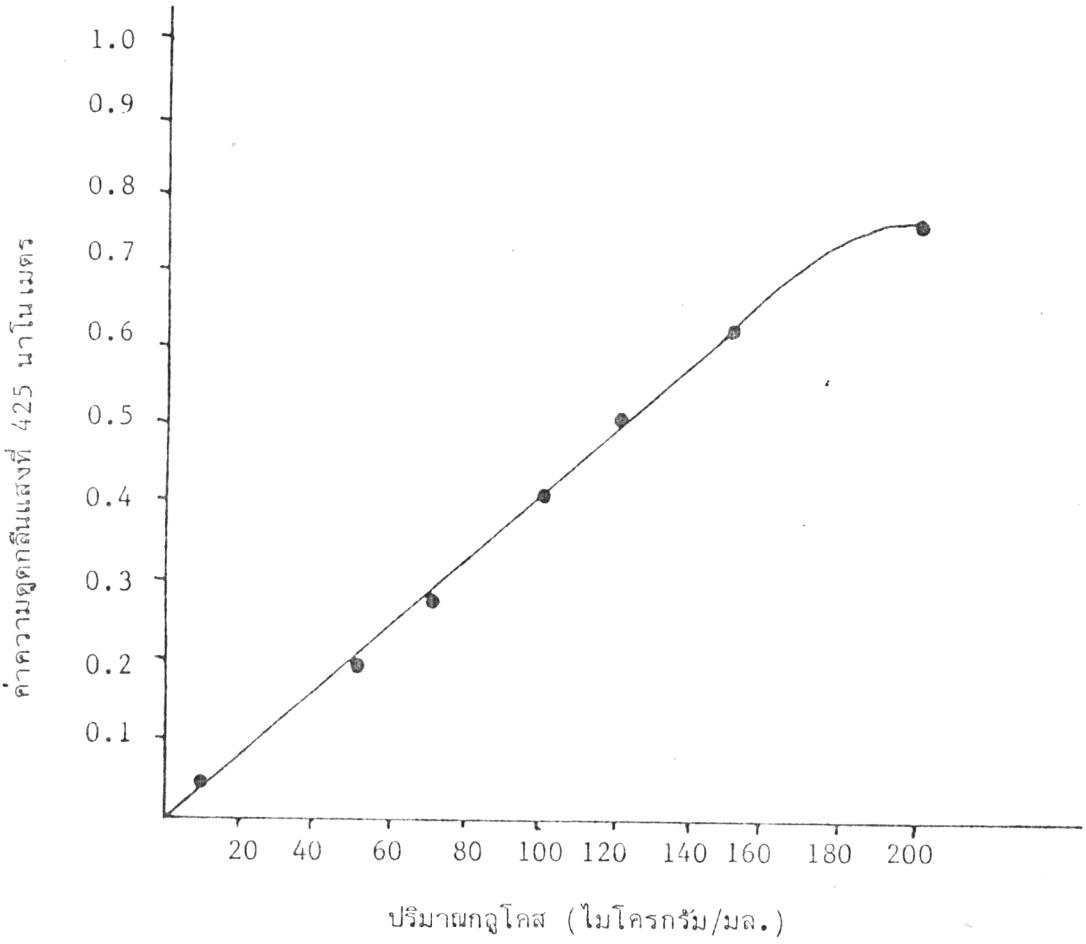
มก./มล.

5. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอว์รี (Lowry, O.H., et.al. 1951)

5.1 การเตรียมสารละลาย

5.1.1 ลอว์รี เอ (Lowry A.)

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3000	มล.



กราฟที่ 31 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี พี.จี.โอ. เอนไซม์

5.1.2 ลอว์รี บี. (Lowry B.)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$ $5H_2O$)	50	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

5.1.3 ลอว์รี ซี. (Lowry C.)

ลอว์รี เอ.	50	ส่วน
ลอว์รี บี.	1	ส่วน

5.1.4 ซีรัม อัลบูมิน มาตรฐาน (standard surrum albumin) 500 ไมโครกรัม/มล.

5.1.5 ฟีนิล (phenyl)

โฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ (folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

5.2 วิธีการหาปริมาณโปรตีน

1. ใส่สารละลายซีรัม อัลบูมินมาตรฐานหรือตัวอย่าง 1 มล. (โปรตีน 10-200 ไมโครกรัม/มล.) ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายลอว์รี ซี. 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

3. เติมสารละลายฟีนิล 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน

4. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาทีโดยเขย่าให้เข้ากันเป็นครั้งคราว

5. วัดการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร โดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

6. นำค่าดูดกลืนแสงนี้เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณโปรตีน

6. โพลีอคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซีส (Rusfeld, et al. 1962)

6.1 การเตรียมสารละลาย

6.1.1

โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0 นอร์มอล (N.)	48	มล.
กรดอซิติก (glacial acetic acid)	17.2	มล.
เตตระเมธิลเอธิลินไดอมีน	0.46	มล.
ใส่น้ำกลั่นให้ครบ	100	มล.

6.1.2

โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0 นอร์มอล	48 มล.
กรดอซิติก	2.87 มล.
เตตระเมธิลเอธิลีนไดอมีน	0.46 มล.
ใส่น้ำกลั่นให้ครบ	100 มล.

6.1.3

อคริลาไมด์ (acrylamide)	30 กรัม
เมธิลีน บิสอคริลาไมด์ (methylene bis acrylamide)	0.8 กรัม
ใส่น้ำกลั่นให้ครบ	100 มล.

6.1.4

อคริลาไมด์	10 กรัม
เมธิลีน บิสอคริลาไมด์	2.5 กรัม
ใส่น้ำกลั่นให้ครบ	100 มล.

6.1.5

ไรโบเฟลวิน (riboflavin)	4.0 มล.
ใส่น้ำกลั่นให้ครบ	100 มล.

6.1.6

บัฟเฟอร์

เบตา-อลานีน (B-alanine)	31.2 กรัม
กรดอซิติก	8.0 มล.
ใส่น้ำกลั่นให้ครบ	1000 มล.
pH	4.5

6.2 การเตรียมเซฟาเรติง เจล (separating gel)

สารละลาย 6.1.1	1 ส่วน
สารละลาย 6.1.3	2 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

6.3 การเตรียมสแตกกิง เจล (stacking gel)

สารละลาย 6.1.2	1 ส่วน
สารละลาย 6.1.4	2 ส่วน
สารละลาย 6.1.5	1 ส่วน
น้ำกลั่น	4 ส่วน

6.4 วิธีการทำโพลี อครีลาไมด์ เจล อิเลกโตรโฟลิซีส

1. ปิดปลายหลอดแก้วด้านล่าง (0.5x7.0 ซม.) ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) แล้วเรียงไว้ในที่ใส่หลอดแก้ว

2. ใส่เซพาเรติง เจล ลงในหลอดแก้ว $\frac{1}{3}$ ของหลอดแก้ว

3. ใส่น้ำกลั่นลงไปบนเจลประมาณ $\frac{1}{4}$ นิ้ว ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว แล้วจึงซับน้ำออก

4. ใส่สเตกกิงเจลลงในหลอดแก้วเหล่านี้อีก $\frac{1}{2}$ นิ้ว

5. ใส่น้ำกลั่นลงในหลอดแก้วอีก $\frac{1}{4}$ นิ้ว

6. ใช้หลอดไฟฟ้าส่องเพื่อช่วยให้เจลแข็งตัว

7. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงซับน้ำออก

8. เอาแผ่นพาราฟิล์มออกแล้วใส่ลงในอุปกรณ์ ทำอิเลกโตรโฟลิซีสที่มีบัฟเฟอร์อยู่

9. ใส่สารละลายโปรตีน 200 ไมโครกรัมซึ่งผสมกับกลีเซอร์รอล 50 มก. (กลีเซอร์รอน 1 กรัมผสมสารละลาย 6.1.2 ปริมาตร/มล.)

10. ใส่เมธิลกรีน (methyl green, 0.005 %) ลงไป 2-3 หยด

11. ต่อกระแสไฟฟ้าหลอดละ 5 มิลลิแอมแปร์นานประมาณ 2 ชม.

12. เอาแท่งเจลออกจากหลอดแก้ว แล้วย้อมสีโปรตีนด้วยอมิโด เบลค (amido black) 1.0 % ในกรดอซิติก 7 % นาน 1 ชม.

13. ล้างสีออกจากแท่งเจลโดยใส่แท่งเจลเข้าหลอดแก้วขนาด 0.6x7.0 ซม. แล้วทำอิเลกโตรโฟลิซีสอีกครั้งโดยใช้กรดอซิติก 7.0 % เป็นตัวพาสีออก จนสีออกหมดแท่งเจล

14. เอาแท่งเจลออกจากหลอดแก้วเก็บไว้ในกรดอซิติก 7.0 %

15. นำแท่งเจลมาวัดค่า อาร์.เอฟ. (Rf)

ประวัติผู้เขียน

นายไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์ เกิดวันที่ 2 ธันวาคม พ.ศ.2500 ในจังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนวัฒนาราม พิทยากร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน เมื่อปีการศึกษา 2522