

การผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อราที่ทำลายหัวมันสำปะหลัง โดยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง¹

Production of Glucoamylases by A Rotting Cassava Tuber Fungus on Solid Culture

อรพิน ภูมิภมร²
Orapin Bhumibhamon

ABSTRACT

Aspergillus niger H-9 is a fungal strain isolated from rotting cassava tuber in Thailand. In the present study, the strain was found to produce better glucoamylase on solid culture for 3-4 days. (ricebran and soybean meal in the ratio of 9:1). The moisture content for cultivation was found to be 3:1 of solid-liquid ratio. The suitable initial pH and temperature were 5–6 and 30°C. The highest enzyme yield was found to be 1,080 units. Optimum pH of the enzyme for starch hydrolysis was at pH 5.5. Such enzyme shows pH stability between 4–8, temperature activity at 60–70°C and temperature stability between 30–70°C.

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* H-9 ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

ชนิดของอะไมเลสที่พบส่วนใหญ่ คือ กลูโคอะไมเลส โดยมีแอลฟา-อะไมเลสปะปนน้อยมาก เอนไซม์ที่ผลิตได้สูงสุด คือ 1,080 หน่วย ซึ่งได้จากการเลี้ยงโดยใช้สูตรอาหารการ้าข้าวและกากถั่วเหลืองในอัตราส่วน 9 : 1 เป็นเวลา 3–4 วัน มีปริมาณความชื้นที่ใช้เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวเท่ากับ 3 : 1 ความเป็นกรด-ด่างในสูตรอาหารผสมเริ่มต้น

อยู่ที่ pH 5–6 และอุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ดังกล่าวคือ 30°C คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น มีคุณสมบัติย่อยแป้งได้ดี คือ pH 5.5 ความคงทนต่อ pH อยู่ในช่วง 4–8 ส่วนอุณหภูมิพอเหมาะต่อการทำงาน คือ 60–70°C และความคงทนต่ออุณหภูมิ 30–70°C

คำนำ

เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มอะไมเลสที่มีบทบาทต่อการแปรเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ได้แก่ α -amylase, β -amylase และ glucoamylase เป็นต้น เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่สำคัญต่อการแปรเปลี่ยน

1 งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสภากิจแห่งชาติ ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง การปรับปรุงประสิทธิภาพของการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์

2 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart Univ.

แบ่งให้เป็นน้ำตาล ได้แก่ α -amylase และ gluco-amylase

การศึกษาเพื่อผลิตเอนไซม์กลุ่ม amylase ครั้งนี้มีจุดมุ่งที่หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* H-9 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกจากแป้งมันสำปะหลังในเมืองไทย ในขณะที่เดียวกันก็จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกับสายพันธุ์จุลินทรีย์กลุ่มเดียวกันที่ได้จากแหล่งอื่น

ส่วนวัสดุที่ใช้ในการศึกษาผลิตเอนไซม์ดังกล่าว ได้มุ่งใช้วัสดุการเกษตรเหลือใช้จากโรงงานสกัดน้ำมันพืช โดยเฉพาะกากรำข้าวเจ้า ถึงแม้ว่าการผลิตเอนไซม์ที่มีรายงานมักจะใช้กากรำข้าวสาลีก็ตาม แต่ประเทศไทยผลิตข้าวเจ้าเป็นหลัก วัสดุการเกษตรจึงมีอยู่ทั่วไปดังนั้นจึงได้มุ่งนำวัสดุเกษตรเหลือใช้มาใช้ให้เป็นประโยชน์ และกรรมวิธีในการทดลองครั้งนี้ก็จะใช้วิธีเลี้ยงในอาหารแข็งเป็นหลัก เพราะเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและต้องการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์น้อยกว่า

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

1. วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ประกอบด้วย รำข้าวที่ไม่ได้สกัดน้ำมันออก กากรำข้าวและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออก จากโรงงานสกัดน้ำมันพืช

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ คือ เชื้อรา *Aspergillus niger* H-9 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารผลิตเอนไซม์

สารละลายแร่ธาตุ ประกอบด้วย KH_2PO_4 2 กรัม, CaCl_2 0.3 กรัม และ trace element 1.0 ลบ.ซม. สารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 ลบ.ซม.

สำหรับ trace element เตรียมโดยละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 มก. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 160 มก. และ CoCl_2 200 มก. ในน้ำกลั่น 100 ลบ.ซม.

อาหารในการผลิตเอนไซม์ ประกอบด้วย กากรำและกากถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่าง ๆ กันเป็นจำนวน 50 กรัม ซึ่งใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 ลบ.ซม. เติมน้ำละลายแร่ธาตุลงไป 25 ลบ.ซม. (อัตราส่วนของแข็ง : ของเหลว 2:1) pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในระดับ pH 5 ถึง 6

อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (inoculum medium)

อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ ประกอบด้วย malt extract (Difco) 15 กรัม peptone (Difco) 2.0 กรัม น้ำกลั่น 1000 ลบ.ซม. pH 6.0 ใส่อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ 50 ลบ.ซม. ลงในฟลาสก์ 250 ลบ.ซม. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์

การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ใส่สปอร์เชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงไว้ในหลอดอาหารแข็ง (Czapek agar) ขนาด 5 ลบ.ซม. คัดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ลบ.ซม. ใส่ลงในหลอดสปอร์ของเชื้อราแล้วเขี่ยสปอร์ให้แขวนลอยในขวด จากนั้นจึงเทสปอร์ทั้งหมดลงในอาหารสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ 50 ลบ.ซม. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) โดยใช้ 180 รอบ/นาที ที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในการผลิตเอนไซม์จะคัดหัวเชื้อที่เลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง จำนวน 10 ลบ.ซม. ใส่ลงในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ 50 กรัม จากนั้นเลี้ยงไว้ที่ 30°C เป็นเวลา 1-6 วัน แต่ละวันนำตัวอย่างออกมาทดสอบหาความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ pH และความชื้นในอาหารที่ผลิตเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์เพื่อหาความสามารถในการย่อย

ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว 5 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 50 ลบ.ซม. แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกสารละลายเอนไซม์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทดสอบหาความสามารถในการย่อยของเอนไซม์

การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้ในแต่ละวัน มาทำให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่พอเหมาะ แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ทั้ง α -amylase และกลูโคอะไมเลส ด้วยวิธีได้อธิบายโดย Bhumibhamon (1983) โดยให้เอนไซม์ย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที และกำหนดให้

1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 1 กรัม และใช้ในการย่อยแป้ง 1% ได้น้ำตาลกลูโคสออกมา 1 มิลลิกรัม ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

ผลและวิจารณ์

อิทธิพลของ pH ต่อการสกัดเอนไซม์

เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นบนอาหารแข็ง จำเป็นจะต้องสกัดออกให้มากที่สุด ดังนั้น จึงได้ใช้ citrate-phosphate buffer 0.5 M ที่ pH ต่าง ๆ กันในการสกัด ซึ่งผลปรากฏว่า pH 7.0 จะมีประสิทธิภาพในการสกัดเอนไซม์ออกมาได้มากที่สุด ซึ่งคงจะเป็น pH ที่ห่างจาก isoelection point ของโปรตีน ดังแสดงในรูป 1 ทั้งนี้โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่สกัดได้เปรียบเทียบกับ pH 7.0 (pH เดียวกับน้ำกลั่น) ส่วน pH 8 นั้น เอนไซม์ที่สกัดได้มีสีเข้มเกินไป ดังนั้น

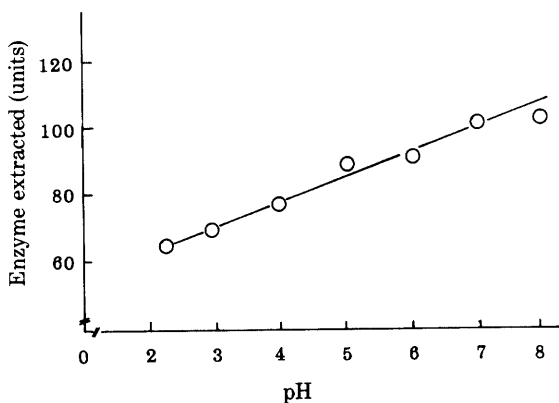


Figure 1. Effect of pH on enzyme extraction

ในการสกัดเอนไซม์ของการทดลองต่อ ๆ ไป จึงได้ใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายสกัดแทน buffer

ส่วนผสมของรำข้าวและกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอนไซม์

ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* H-9 โดยวิธีเลี้ยงในอาหารแข็ง ได้นำกากรำข้าวและกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว มาทำการผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน คือ ใช้กากรำข้าวต่อกากถั่วเหลืองในอัตราส่วน 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, 90 : 10 โดยใช้น้ำหนักของส่วนผสม 50 กรัม ต่อสารละลายแร่ธาตุ 25 ลบ.ซม. เมื่อเลี้ยงเชื้อราได้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-6 วัน ปรากฏว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นได้สูงส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงวันที่ 3-5 ดังแสดงในรูปที่ 2 เอนไซม์ลดลงจะเริ่มหลังจากวันที่ 5 ส่วนผสมของกากรำข้าวและกากถั่วเหลือง

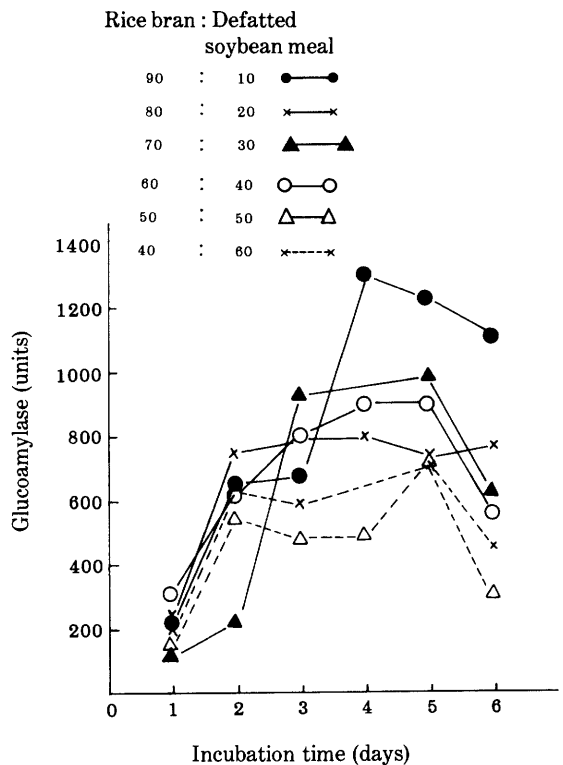


Figure 2. Substrate mixture on enzyme production

ที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด คือ ใช้กากรำข้าว 90 กากถั่วเหลือง 10 ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้ 1300 หน่วย ส่วนการทดลองครั้งที่สองได้ที่ใช้กากรำข้าวอย่างเดียว ได้เอนไซม์ 1103 หน่วย จะเห็นได้ว่า สูตรอาหารกากรำข้าวอย่างเดียวให้ผลการผลิตเอนไซม์ต่ำกว่าสูตรอาหารผสมของกากรำและกากถั่วเหลืองเพียงเล็กน้อย

การเปลี่ยนแปลงของความชื้นและ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยง และระดับความชื้นที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดประมาณ 50% ในขณะที่ pH ของอาหารอยู่ในช่วง pH 5.6

สูตรอาหารดังกล่าวเมื่อใช้รำสด (รำข้าวที่ไม่ได้สกัดน้ำมัน) แทนกากรำ ผลปรากฏว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้สูงสุดในวันที่ 5 คือ 1020 หน่วย โดยใช้อัตราส่วนของรำสด และกากถั่วเหลือง 80 : 20 คือ แสดงให้เห็นว่าการใช้รำสดแทนกากรำ จะให้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำกว่าการรำที่สกัดน้ำมันออก

ส่วนความชื้นและ pH ในสูตรอาหารที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดของอาหารทั้งสองนั้นไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีความชื้นจะอยู่ประมาณ 50% และ pH 5.5

การผลิตเอนไซม์ แหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนมีความสำคัญมาก การผลิตเอนไซม์อะไมเลส สารอาหารคาร์บอนจะสำคัญกว่าสารอาหารไนโตรเจน ในขณะที่สูตรอาหารผลิตเอนไซม์โปรติเอส แหล่งอาหารไนโตรเจนจะมีความสำคัญมากกว่า สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจจะเป็นเพราะว่า เชื้อจุลินทรีย์จะสังเคราะห์เอนไซม์ออกมาเรื่อยๆ ดังนั้น แหล่งคาร์บอน เช่น รำข้าวที่ใช้ จึงอาจจะช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์อะไมเลส และเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตอะไมเลสจาก *A. niger* (Mahmoud, 1978) ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเชื้อและแหล่งที่มาของเชื้อ (Ramchendran, 1979)

ปริมาณความชื้นและอัตราส่วนของแร่ธาตุในสูตรอาหารต่อการผลิตเอนไซม์

ความชื้นและอัตราส่วนแร่ธาตุที่เหมาะสม

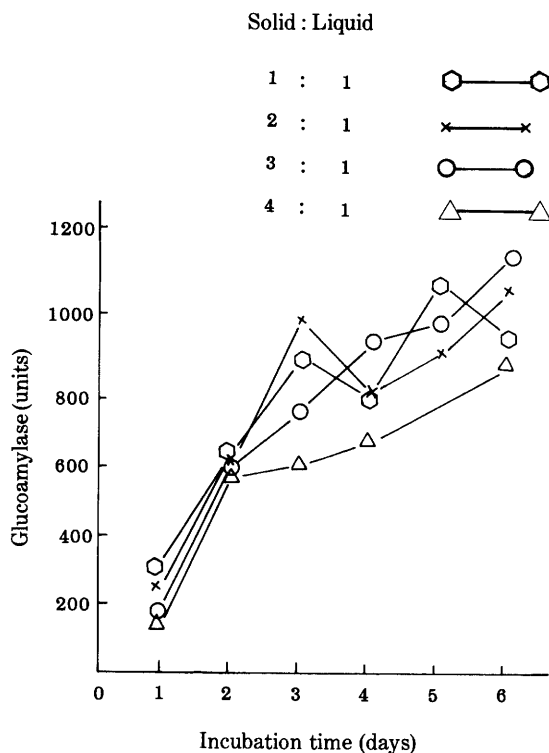


Figure 3. Effect of moisture on enzyme production

เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองปริมาณน้ำที่ใส่ลงในสูตรอาหารแข็งโดยใช้อัตราส่วนของแข็ง (ซึ่งเป็นส่วนผสมของกากรำข้าว 90% กากถั่วเหลือง 10% ในปริมาณ 50 กรัม) และสารละลายแร่ธาตุ 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1 ผลปรากฏว่า อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวที่ให้ผลผลิตเอนไซม์ได้ดีทั้งสามอัตราส่วนที่ไม่แตกต่างกัน คือ 3 : 1 โดยได้ปริมาณเอนไซม์ 1220 หน่วย อัตราส่วน 1 : 1 ให้เอนไซม์ 1150 หน่วย และอัตรา 1 : 2 ให้เอนไซม์ 1020 หน่วย ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยมีปริมาณความชื้นในอาหารที่ทำให้ผลิตเอนไซม์ได้ดี คือ ขณะที่อาหารนั้นมีความชื้น 47-55% และ pH อยู่ในช่วง 4.4-6.6

อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์

ในการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อผลิตเอนไซม์ได้ใช้สูตรอาหารกากรำข้าว 90% และ

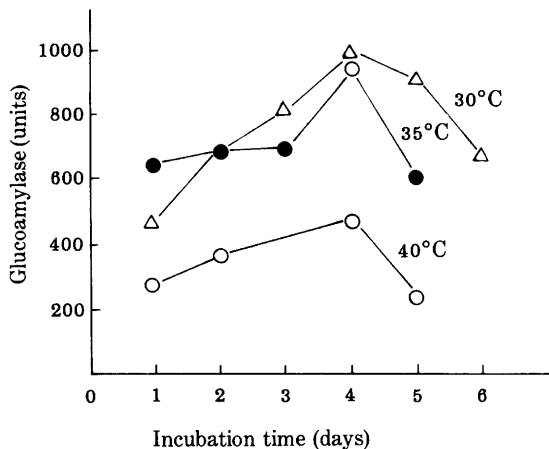


Figure 4. Effect of temperature on enzyme production

กากถั่วเหลือง 10% ในอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 3 : 1 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30°, 35° และ 40°ซ ผลปรากฏว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ คือ 30° และ 35°ซ โดยได้ปริมาณเอนไซม์ประมาณ 900–1000 หน่วย เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 4 วัน ส่วนอุณหภูมิ 40°ซ ปริมาณการผลิตเอนไซม์ต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 4 โดย pH สุดท้ายอยู่ในช่วง 4.4–5.2

pH ในสารละลายแร่ธาตุต่อการผลิตเอนไซม์

เนื่องจากการผลิตเอนไซม์โดยใช้วิธีเลี้ยงในอาหารแข็งนั้น การควบคุม pH ในอาหารผสมค่อนข้างจะยุ่งยาก ดังนั้น จึงได้ใช้สารละลายแร่ธาตุใน pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 3.0–7.5 ผสมลงในสูตรอาหารแข็งกากรำข้าว 90% และกากถั่วเหลือง 10% ที่ต้องการศึกษาระดับ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์นั้น เนื่องจาก pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อรา และ pH ที่พอเหมาะกับการผลิตเอนไซม์ไม่จำเป็นจะต้องเป็น pH เดียวกัน จากการทดลองปรากฏว่า เมื่อใช้สารละลายแร่ธาตุที่ pH 5.5 ผสมลงในอาหารแข็ง จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดภายใน 3–4 วัน ได้เอนไซม์ประมาณ 1150 หน่วย ส่วน pH ต่ำกว่า 4.5 และสูงกว่า 6.0 มีผลให้ปริมาณเอนไซม์ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 5

จะเห็นได้ว่า ค่าของเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้

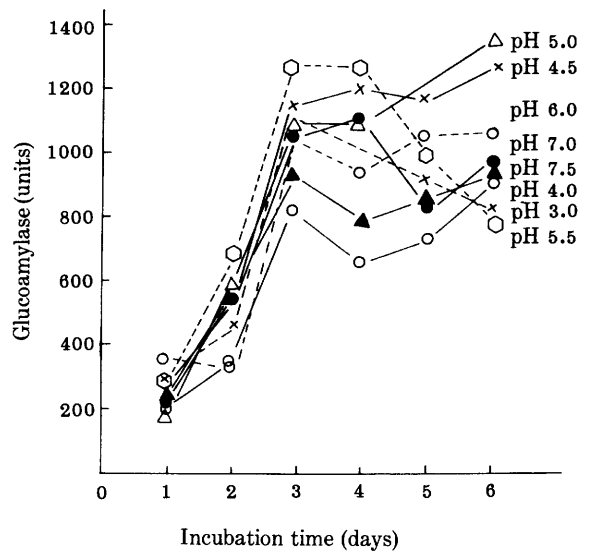


Figure 5. Effect of pH on enzyme production

ในแต่ละการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกันจะมีความผันแปรอยู่บ้าง ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองยังอยู่ในระดับปฏิบัติการขนาดเล็ก และไม่อาจจะควบคุมเกี่ยวกับ humidity ได้ อีกทั้งค่าที่ได้เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณของน้ำหนักแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ทำให้ค่าผันแปรได้ อย่างไรก็ตาม ในแต่ละการทดลองนี้ก็ได้นำแสดงถึงความแตกต่างของปัจจัยที่ศึกษา ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงเพื่อผลิตในระดับโรงงานต้นแบบ ซึ่งมีโอกาสที่จะควบคุมได้ดีกว่าที่ทำในฟลasks

อย่างไรก็ตาม มีความต้องการอยากทราบประสิทธิภาพของเชื้อ *Aspergillus niger* H-9 จึงได้ใช้เชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม *Aspergillus niger* อีก 5 เชื้อที่ได้จากต่างประเทศ ผลปรากฏว่าเชื้อทั้ง 5 ให้ผลผลิตเอนไซม์อยู่ในช่วง 1000–1800 หน่วยภายในเวลา 2 วัน จากข้อมูลนี้แสดงว่า เชื้อ *Aspergillus niger* H-9 มีประสิทธิภาพในการผลิตยังต่ำกว่าเชื้อที่มีอยู่

คุณลักษณะบางประการของกลูโคอะไมเลส

ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* H-9 ยังต่ำอยู่ก็ตาม คุณ-

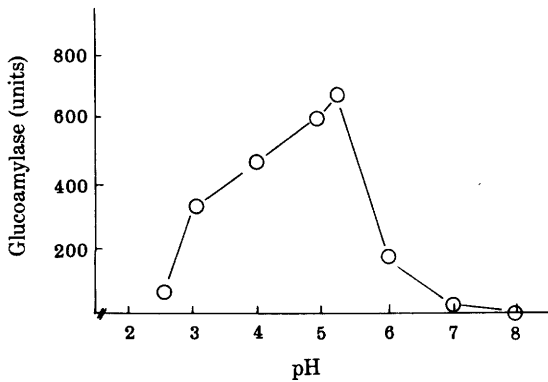


Figure 6. Optimum pH on enzyme activity

สมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความจำเป็นที่จะต้องทราบ จากผลการทดลอง pH ที่พอเหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 5.5 ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่านี้ เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมไป ส่วนความคงทนของเอนไซม์ต่อ pH นั้น ค่อนข้างกว้าง คืออยู่ระหว่าง pH 4-8 และอุณหภูมิที่พอเหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์นั้นสูง คือ ตั้งแต่ 60-70°C โดยมีความคงทนต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30-70°C (รูปที่ 6-9) จะเห็นได้ว่า เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผลิตได้ดังกล่าว สามารถทำงานในสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า

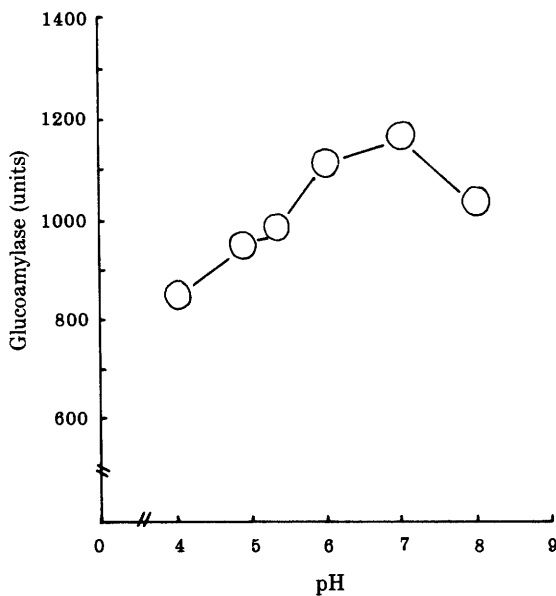


Figure 7. Effect of pH on enzyme stability

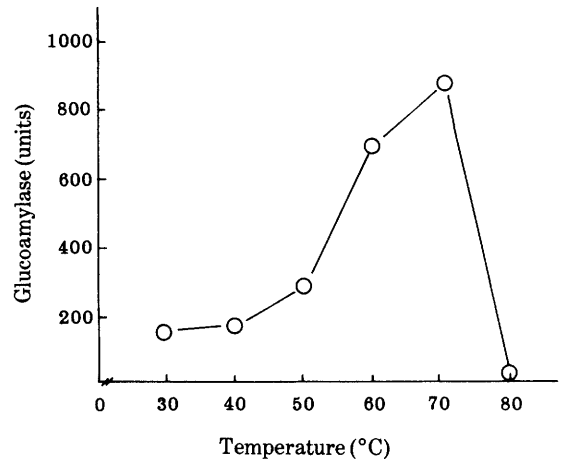


Figure 8. Optimum temperature on enzyme activity

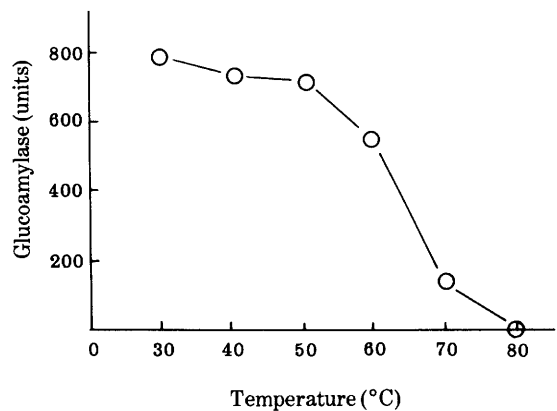


Figure 9. Effect of temperature on enzyme stability

กลูโคอะไมเลสที่ได้เคยมีรายงานไว้ทั่ว ๆ ไป คือ ที่อุณหภูมิ 55-65°C (Godfrey, 1983) ส่วนคุณสมบัติอื่น ๆ รวมทั้งการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ที่ผลิตขึ้นนี้ได้แสดงอยู่ในรายงานฉบับอื่น (Bhumibhamon, 1986).

เอกสารอ้างอิง

- Bhumibhamon, O. 1983. Production of amyloglucosidase by submerged culture. Thai J. Agric. Sci. 16: 173-184.
- Bhumibhamon, O. 1987 Glucoamylase of a fungus isolated from a rotting casava tuber. Mircen. Journal 2,000-000

- Godfrey, T. 1983. Comparison of key characteristics of industrial enzymes by type and source, pp. 473–475. *In* T. Godfrey and J. Reichelt (ed.). Industrial Enzymology: The Application of Enzyme in Industry. The Nature Press, New York.
- Mahmond, S.A.Z., A.M. Abdel Hafez, W.A. Mash hoor and A.A.A. Rejaet. 1978. Utilization of industrial and agricultural by-products for fungal amylase production. Microbiological Abst. 14A – 37.
- Ramchendran, N., K.R. Sreekantiah and V.S. Murthy. 1979. Influence of media composition of the production of α -amylase and amyloglucosidase by strain of *A. niger* Starke, 31(4), 134 – 138.