บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแป้งมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้ แถบประเทศบราซิลและเม็กซิโก มีการเรียกชื่อต่าง ๆ กันตามรากศัพท์ภาษาอังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน โปรตุเกส เช่น Cassava, Mandioca, Yucca Tapioca และ Manioc ในทางพฤกษศาสตร์มันสำปะหลังเป็นพืชในวงศ์ (Class) ใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledoneae) ตระกูล (Family) Euphobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta Crantz* (แต่เดิมมีการใช้ชื่อว่า *Manihot utilissima* Pohl.)

แป้งมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาว ลักษณะเด่นของแป้งมันสำปะหลัง คือ มีความบริสุทธิ์สูง มีสิ่งปนเปื้อนต่ำ โดยมีแป้งอยู่มากกว่าร้อยละ 95 มีปริมาณโปรตีนและไขมันค่อนข้างต่ำ (<1%) และมีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 0.04%

1.1 แป้ง

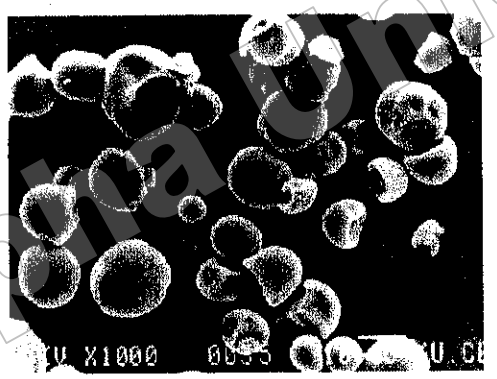
แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโฮโมโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่พบมากในพืช ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายโพลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde Group) เรียกว่าปลายรีดิวซิง (Reducing End Group) ประกอบด้วยโพลิเมอร์เชิงเส้นหรืออะไมโลส (Amylose) และโพลิเมอร์เชิงกิ่งหรืออะไมโลเพคติน (Amylopectin) วางตัวในแนวรัศมี โดยแป้งจากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินแตกต่างกันทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

พืชเก็บสะสมแป้งไว้ตามส่วนต่าง ๆ เช่น หัว ราก เมล็ด ลำต้น และผล โดยรวมตัวกันอยู่เป็นเม็ดแป้ง (Starch Granule) ที่อาจมีหรือไม่มีเมมเบรนหุ้ม เรียกว่า อะไมโลพลาสท์ (Amyloplast) แป้งส่วนใหญ่ได้มาจากเมล็ดของธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และบางส่วนได้มาจากหัวและรากของพืช เช่น มันเทศ มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง โดยแป้งที่ได้จากพืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะ คือ มีโครงสร้างทางเคมีในโมเลกุลแตกต่างกัน และเม็ดแป้งจะมีขนาด รูปร่างและสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน โดยเฉพาะรูปร่างของเม็ดแป้งที่มาจาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

พืชแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของแป้งได้ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) โดยภาพที่ 1 แสดงลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง และภาพที่ 2 แสดงขนาดและรูปร่างของเม็ดแป้งมันสำปะหลังเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ภาพที่ 1 ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้งที่ได้จากมันสำปะหลัง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539)



ภาพที่ 2 ขนาดและรูปร่างของเม็ดแป้งมันสำปะหลังเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

แป้งประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 44.4 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.2 และออกซิเจนร้อยละ 49.4 โดยอยู่ในรูปดี-กลูโคส (D-Glucose) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นจะมีโปรตีน ไขมัน ฟอสฟอรัส และเถ้า โดยทั่วไปเป็นของแข็งสีขาว ไม่ละลายในน้ำเย็น แต่ละลายในสารละลายอินทรีย์ มีขนาดตั้งแต่ 2-100 ไมครอน มีความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.50-1.53 ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง (ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ, วรนุช ศรีเจษฎารักษ์ และเทพฤทธิ์ ปิติฤทธิ์, 2542)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 โครงสร้างของเม็ดแป้ง

ภายในเม็ดแป้งประกอบด้วยโพลีเมอร์กลูแคน 2 ชนิดผสมกัน คือ อะไมโลส เป็นโพลีเมอร์สายยาวของแอลฟา-1,4 กลูแคน และอะไมโลเพคติน เป็นสายแขนงที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูงต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 เป็นสายตรงและมีพันธะแอลฟา-1,6 เป็นสายแขนง อะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่เป็นองค์ประกอบในแป้งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล ระดับการเกิดโพลิเมอร์ (Degree of Polymerization) ของแต่ละสาย ตำแหน่งที่อยู่ในแป้งและสัดส่วนของอะไมโลสต่ออะไมโลเพคติน สมบัติของแป้งที่ได้จากพืชแต่ละชนิดจึงแตกต่างกัน

แป้งแต่ละชนิดที่มีสมบัติแตกต่างกัน จึงมีความสามารถในการทำหน้าที่ได้แตกต่างกัน เนื่องมาจากสัดส่วนขององค์ประกอบและ/ หรือโครงสร้างขององค์ประกอบดังกล่าว โดยแป้งส่วนใหญ่จะมีอะไมโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ในเม็ดแป้งประมาณ 25-35 % และมีอะไมโลเพคตินประมาณ 75-85% เม็ดแป้งไม่ละลายในน้ำเย็น เมื่ออยู่ในน้ำอุ่นสามารถดูดน้ำและพองตัวออกได้เล็กน้อย และการพองตัวสามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ เพราะเม็ดแป้งสามารถหดตัวลงได้เมื่อนำไปอบไล่น้ำออกหรือทำให้แห้ง แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิของน้ำให้สูงขึ้นเรื่อย ๆ เม็ดแป้งจะพองตัวมากขึ้น จนกระทั่งแตกได้เป็นสารละลายข้นหนืด (Starch Paste) เรียกกระบวนการนี้ว่า เจลาติไนเซชัน (Gelatinization) ซึ่งสารละลายข้นหนืดที่ได้จะมีส่วนผสมของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน เมื่อนำแป้งมาทำการไฮโดรไลซิสเพียงบางส่วน จะได้ส่วนผสมของเด็กซ์ตรินมอลโตส และกลูโคส ถ้าทำการไฮโดรไลซิสอย่างสมบูรณ์จะได้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น และถ้านำสารละลายแป้งที่อยู่ในรูปคอลลอยด์มาทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์อะไมเลส จะได้เป็นน้ำตาลมอลโตสและกลูโคส (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539)

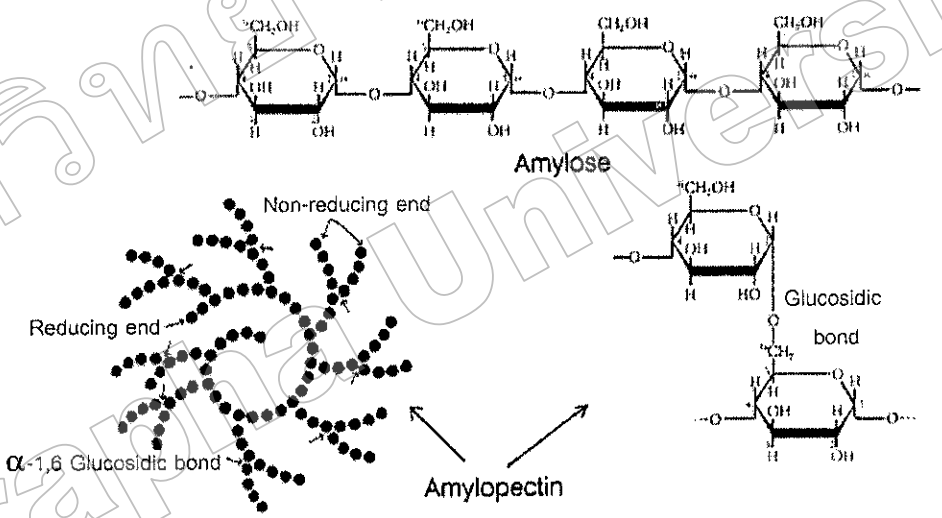
1.2.1 อะไมโลส

อะไมโลสเป็นโพลีเมอร์สายยาวของน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสประมาณ 250 –2,000 หน่วย เรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา-ดี-(1,4) จึงเป็นหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันของน้ำตาลมอลโตสด้วย จึงจัดว่าโมเลกุลของอะไมโลสเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสสายยาวที่มีขนาดใหญ่มาก อะไมโลสไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อเติมน้ำลงไปอะไมโลสจะเกาะตัวเป็นตะกอนที่ไม่ละลาย และเนื่องจากโมเลกุลของอะไมโลสเป็นสายยาวจึงมีโอกาสที่จะจับคู่กับอะไมโลสอีกโมเลกุลหนึ่ง เป็นสายยาวคู่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจนกลายเป็นตาข่ายมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำลดลงและตกตะกอนได้ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า รีโทรกราเดชัน (Retrogradation) อะไมโลสสามารถจับกับไอโอดีน โดยจะพันเป็นเกลียวรอบ ๆ ไอโอดีน ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของอะไมโลสและไอโอดีน (Amylose-Iodine Complex)

ที่มีสีน้ำเงิน โดยสีที่เกิดขึ้นจะผันแปรตามความยาวของสายอะไมโลสและจำนวนเกลียวของสายอะไมโลส

1.2.2 อะไมโลเพคติน

อะไมโลเพคตินเป็นโฮโมโพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีสายแขนงแยกออกมา ซึ่งแต่ละแขนงจะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 20-35 หน่วย ดังนั้น ในโมเลกุลของอะไมโลเพคตินจึงมีทั้งพันธะแอลฟา-1,4 และแอลฟา-1,6 อะไมโลเพคตินมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าอะไมโลสมากและทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) โดยโครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินแสดงดังภาพที่ 3 และสมบัติของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินสรุปดังตารางที่ 1



ภาพที่ 3 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน (Bielefeld University, 1969)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 สมบัติของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539)

สมบัติ	อะไมโลส	อะไมโลเพคติน
โครงสร้างโมเลกุล	สายยาว	สายแขนง
การเกิดสีกับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดง
การดูดกลืนแสงของ Iodine Complex	650 nm	540 nm
Iodine Affinity	19-20%	<1%
จำนวนน้ำตาลกลูโคสในสาย	100-10,000	20-30
Degree of Polymerization (จำนวนน้ำตาลกลูโคสในโมเลกุล)	100-10,000	10,000-100,000
ความสามารถในการละลายน้ำ	ไม่ละลายน้ำ	ละลายน้ำ
ความคงตัวในสารละลาย	เกิด Retrogradation	คงตัว
การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลมอลโตสโดย β-Amylase	70%	55%

2. รายละเอียดเกี่ยวกับอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับแป้งมันสำปะหลัง

แป้งสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์จากการย่อยแป้งได้หลายทาง ดังตารางที่ 2 เนื่องจากความต้องการน้ำเชื่อมหรือน้ำตาลจากแป้ง (Starch Syrup หรือ Starch Sugars) มีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าความสามารถในการผลิต และการพัฒนากรรมวิธีการผลิตเป็นไปอย่างยากลำบากเพราะการย่อยด้วยกรดมีปัญหาเกี่ยวกับปฏิกิริยาต่อเนื่องและการเกิดปรากฏการณ์ข้างเคียงทำให้การผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งหรือน้ำเชื่อมกลูโคสหรือน้ำเชื่อมข้าวโพดที่มีความหวานสูงสุดทำได้ยาก จึงได้มีความสนใจในการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งมากขึ้น (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 การนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้งไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

ผลผลิตของการย่อยสลายแป้ง	การนำไปใช้ประโยชน์
มอลโตเดกซ์ตริน น้ำเชื่อมผสม (42-63 สมมูลเดกซ์โทรส) น้ำเชื่อมมอลโตสสูง น้ำเชื่อมกลูโคส น้ำเชื่อมไอโซกลูโคส (ฟรุกโตสสูง)	สารเพิ่มความข้น สารเพิ่มความคงตัว เครื่องดื่ม ลูกกวาด น้ำซอส แยม ไอศกรีม ลูกกวาดชนิดแข็ง เครื่องดื่ม ไวน์ เบียร์ น้ำผลไม้ น้ำซอส โยเกิร์ต

เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปแป้งเป็นไซรัปด้วยเอนไซม์แบ่งได้ 3-4 กลุ่ม ได้แก่ Endoamylases, Exoamylases, Debranching Amylases และ Isomerases ดังรายละเอียดดังนี้

1. การเจลาติไนเซชัน (Gelatinization)

เริ่มด้วยการทำให้สารละลายแป้งร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่าขึ้นกับชนิดแป้งเพื่อให้เม็ดแป้งแตกออกมาละลายกับโมเลกุลของน้ำเกิดเป็นเจล เรียกว่า เจลาติไนเซชัน ซึ่งจะมีความหนืดสูงขึ้น ในขั้นตอนถัดไปจึงต้องลดความหนืดลงด้วยการเติมสารช่วยเจือจาง (Thinning Reagent) เช่น กรดและเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

2. การทำให้ใส (Liquefaction)

เป็นกระบวนการลดความหนืดของแป้งสุกคือ ทินนิง (Thinning) และเด็กซ์ตริไนเซชัน (Dextrinization) ของแป้งที่ผ่านการทำให้สุก โดยลดพีเอชไป 1.5-2.0 และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 140-155 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์พร้อมกับมีการย่อยสลายบางส่วน ถ้าขั้นตอนนี้ใช้เอนไซม์แทนการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ เอนไซม์ที่ใช้คือ แอลฟาอะไมเลส โดยให้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นมอลโตเด็กซ์ตริน (Maltodextrin) เนื่องจากแอลฟาอะไมเลสไม่สามารถตัดพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิกได้ ยังคงรูปเป็นลิมิตเด็กตรินซ์ที่มีกลูโคส 2-6 หน่วย จึงใช้เป็นสารเติมเนื้อ (Filler) และสารเพิ่มความคงตัว (Stabilizer) ในอาหารได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การทำให้หวาน (Saccharification)

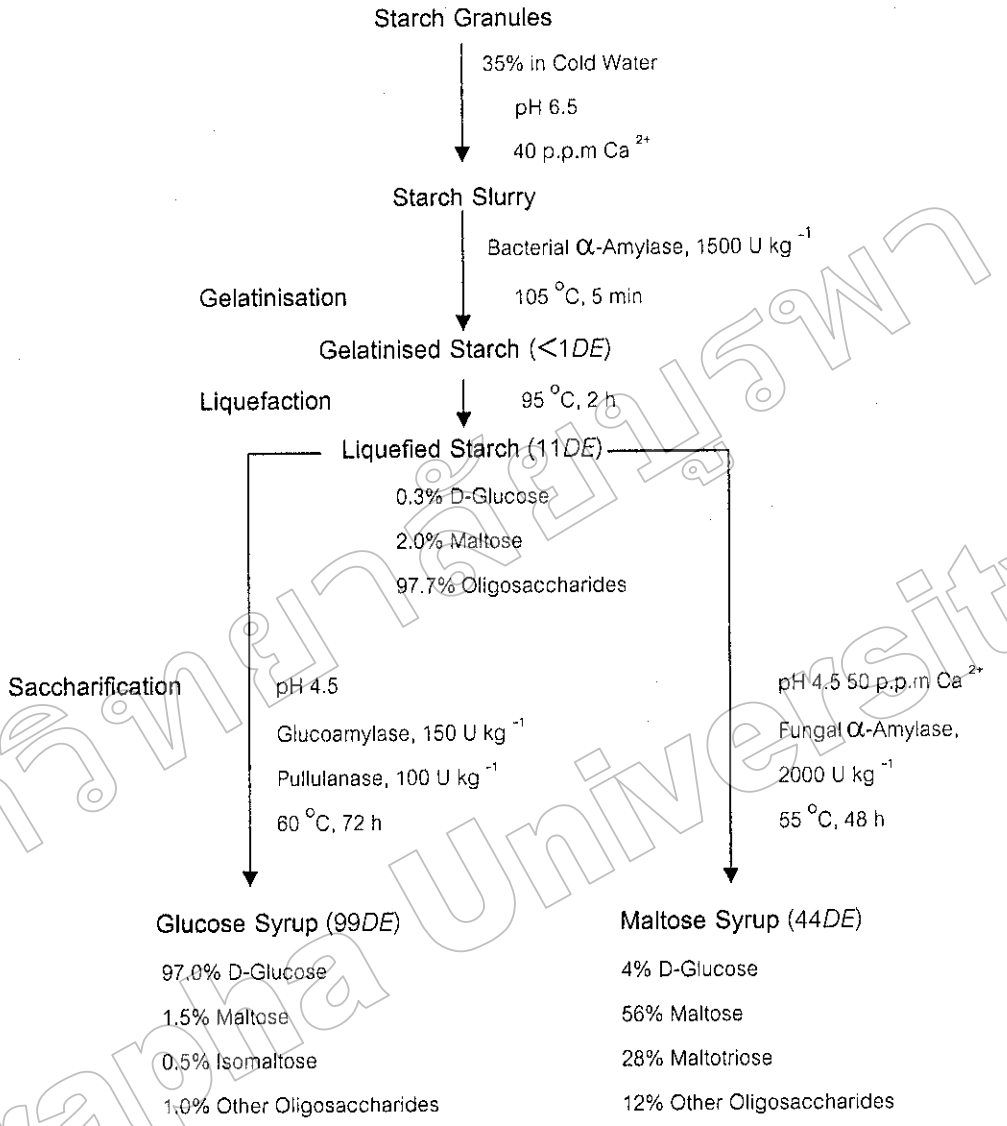
กระบวนการนี้ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เบตาและแกมมาอะไมเลส (Glucoamylase) เพื่อไฮโดรไลซ์ผลผลิตจากการทำให้ใสให้เกิดผลผลิตของน้ำตาลมอลโตสและกลูโคส ขั้นตอนนี้อาจจะต้องเสริมด้วยเอนไซม์ย่อยสาขาของแป้ง (Debranching Enzyme) เพื่อย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 และแอลฟา-1,3 กลูโคซิดิก

4. การเปลี่ยนไอโซเมอร์ (Isomerization)

ใช้เอนไซม์ไอโซเมอเรส (Isomerase) เพื่อเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโตส ได้เป็นฟรักโตสไซรัปหรือไอโซกลูโคส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

ในกระบวนการการทำให้ใสจะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสชนิดทนร้อนที่ผลิตจากแบคทีเรีย เนื่องจาก มีความเสถียรต่อปฏิกิริยาที่เกิดที่อุณหภูมิสูงและสามารถเกิดปฏิกิริยาเจลาติไนเซชันได้อย่างสมบูรณ์และรวดเร็ว โดยเอนไซม์ที่ใช้ผลิตจากแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus stearothermophilus*, *B. licheniformis* และ *B. subtilis* โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. stearothermophilus* และ *B. licheniformis* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทนร้อนได้มากถึง 100 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* จะสามารถทนร้อนได้น้อยกว่า คือ ไม่เกิน 90 องศาเซลเซียส (Ronald, 1993) โดยในกระบวนการการทำให้ใสมักใช้เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* (Dominic, 1995) โดยขั้นตอนหลักของกระบวนการแปรรูปแป้งแสดงดังภาพที่ 4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



หมายเหตุ: DE = Dextrose Equivalent

ภาพที่ 4 ขั้นตอนหลักของกระบวนการแปรรูปแป้ง (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ประเภทที่ผลิตแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular Enzyme) ที่สามารถย่อยแป้งได้ พบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเอนไซม์ประเภทนี้แบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

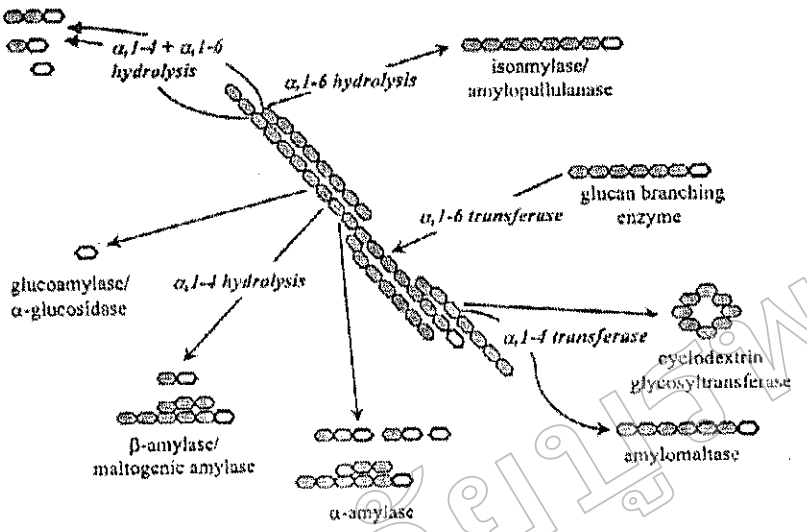
1. Endoamylase

เอนไซม์ประเภทนี้ทำการย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ถ้าย่อยแบบไม่สมบรูณ์จะได้กลูโคส มอลโตส และเด็กซ์ตริน ถ้าย่อยแบบสมบรูณ์จะได้มอลโตสและกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส

2. Exoamylase

เอนไซม์ประเภทนี้ทำการย่อยแป้งจากปลายนอนรีดิวซ์ (Non-Reducing End) เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบตาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยเบตาอะไมเลสจะย่อยแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะแบบแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิกได้ ผลผลิตที่ได้จากการย่อยจึงเป็นน้ำตาลมอลโตสและลิมิตเด็กซ์ตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย เอนไซม์นี้พบมากในพืช ธัญพืช มันเทศ และจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ เช่น *B. cereus*, *B. megaterium* ส่วนกลูโคอะไมเลสสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากปลายนอนรีดิวซ์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ คือ แอลฟา-1,4 และแอลฟา -1,6 กลูโคซิดิกเข้าไปทีละ 1 หน่วย จึงได้กลูโคสเพียงอย่างเดียวในการย่อย เอนไซม์นี้พบครั้งแรกในจุลินทรีย์ ต่อมาจึงพบในเนื้อเยื่อสัตว์ด้วย จุลินทรีย์ที่สร้าง ได้แก่ ยีสต์และรา เช่น *Endomycopsis fibuligera*, *A. Oryzae* และ *A. niger* เป็นต้น (ดวงพร คันธโชติ, 2530) โดยตำแหน่งและผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสชนิดต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



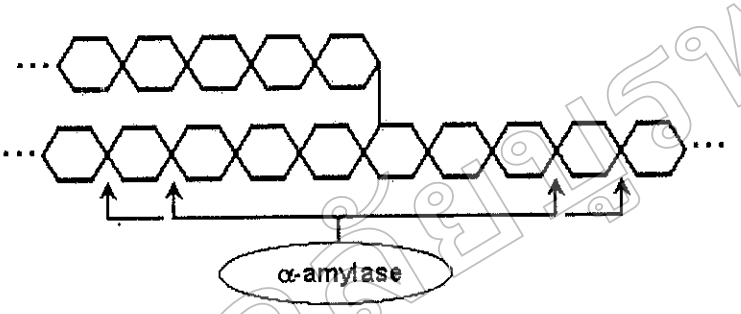
ภาพที่ 5 ตำแหน่งและผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสชนิดต่าง ๆ (Van der Maarel, Van der Veen, Uitdehaag, Leemhuis, & Dijkhuizen, 2002)

3.1 แอลฟาอะไมเลส (α-Amylase)

เอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นอะไมเลสชนิด Endo-α-1,4-Glucanase (Atkinson, & Manituna, 1991) มีชื่อทางการค้าเป็นที่รู้จักกันว่า Termamyl® มีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทอเรส (Diasterase) และมีชื่อตามระบบว่า α-1,4 Glucan 4-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 พบทั่วไปทั้งในอาณาจักรพืช สัตว์ และจุลินทรีย์บางชนิด ในคนจะพบในน้ำลายและตับอ่อน มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิโก- และได-แซคคาไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกาย เป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 ต้องการ Ca^{2+} เป็นตัวร่วมกิจกรรมของเอนไซม์ มักถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนอิออน เช่น Cl^-, Br^-, F^- มีค่า pK ของหมู่ที่แตกอิออนได้ในบริเวณเร่งอยู่ที่ 6.5-8.0 ซึ่งหมู่ที่ว่านี้อาจเป็นหมู่อิมิดาโซลหรือหมู่อะมิโน แต่เมื่อพิจารณาค่า ΔH_{ion} เป็น 4 kcal/mole ดังนั้น น่าจะเป็นหมู่อิมิดาโซล (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533) และมีตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ Alcohols, Ascorbic Acid, Lactose, Maltose, Oxalate, Phosphates และ Sucrose (Atkinson, & Marituna, 1991)

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายก็คือ เจาะจงต่อการย่อยสลายแป้งที่พันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิกในลักษณะตัดภายในสายโพลิเมอร์ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน และลิมิตเด็กซ์ตรินที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงรูปเดิม คือ โครงรูปแอลฟา (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533) โดยการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแสดงดังภาพที่ 6

และการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลสชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3 โดยพบว่า เมื่อแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ได้แก่ มีความเป็นรีดิวซ์สูงขึ้น การให้สีกับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป มีความหนืดลดลง และมีความสามารถในการเบี่ยงเบนแสงลดลง (ดวงพร คันธโชติ, 2530)



ภาพที่ 6 การย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Wageningen University, 2000)

ตารางที่ 3 การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลสชนิดต่าง ๆ (Vector Research-Global Technologies, 2001)

ปฏิกิริยา	แอลฟาอะไมเลส	เบตาอะไมเลส	แกมมาอะไมเลส
บริเวณที่ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง (Site Specificity)	พันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก	พันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก	พันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก
การทำปฏิกิริยา	เป็น Endoamylase ย่อยสลายพันธะ α-1,6 กลูโคซิดิกไม่ได้	เป็น Exoamylase ย่อยสลายพันธะ α-1,6 กลูโคซิดิกไม่ได้	เป็น Exoamylase ย่อยสลายพันธะ α-1,6 กลูโคซิดิกได้
การลดความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
การลดสีม่วงของไอโอดีน	เร็ว	ช้า	ช้า
หมู่รีดิวซ์ที่เกิด	ช้า	เร็ว	เร็ว
การเกิดกลูโคส	ช้า	ไม่มี	เร็ว
การเกิดมอลโตส	ช้า	เร็ว	ไม่มี
การเกิดเด็กตรินซ์	เร็ว	ช้า	ช้า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2 แหล่งจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแหล่งต่าง ๆ ทั้งจากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ โดยแหล่งของเอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่มีการนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์มากที่สุด เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสนั้นมีข้อดี คือ สามารถควบคุมการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์ได้ง่าย อีกทั้งจุลินทรีย์ยังสามารถผลิตเอนไซม์ให้มีคุณลักษณะตามที่ต้องการได้ โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถผลิตได้จุลินทรีย์ที่หลากหลาย ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีตีส โดยในอุตสาหกรรมเอนไซม์ที่มีการนำไปใช้มักเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียและรา (Gupta et al., 2003)

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีทั้งแบคทีเรีย ราและยีสต์ ดังนี้

1. แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ผลิตแอลฟาอะไมเลส ได้แก่ สกุล *Bacillus* เช่น *B. licheniformis*, *B.subtilis*, *B. amyloliquefqciens*, *B. stearothermophilus*, *B.acidocoldarius*, *B. brevis*, *B.circulans*, *B. coagulans*, *B. flavothermus*, *B. globisporus* และ *B. megaterium* *Clostridium* เช่น *C. butricum*, *C. thermosulfurogenes* เป็นต้น สำหรับแบคทีเรียอื่น ๆ ที่มีรายงาน ได้แก่ *Aeromonas caviae*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alteromonas haloplanetis*, *Pyrococcus woesei*, *Eubacterium* sp., *Filobasidium capsuligenum*, *Halobacterium halobium*, *Lactobacillus brevis*, *Micrococcus luteus* (Pandey, Nigam, Soccol, Soccol, Singh, & Mohan, 2000) , *Pseudomonas saccharophila* และ *Pseudomonsa stutzeri* (ดวงพร คันธโชติ, 2530) เป็นต้น โดยตารางที่ 4 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*, *B.amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis* ที่ใช้ในอุตสาหกรรม

2. รา

ราที่ผลิตแอลฟาอะไมเลส ได้แก่ สกุล *Aspergillus* เช่น *A. awamori*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. kawachi*, *A. niger*, *A. oryzae* และ *A. usanii* (Pandey et al., 2000) และราในวงศ์ Mucoraceae ได้แก่ *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *M. rouxii* (ดวงพร คันธโชติ, 2530) เป็นต้น

3. แอคติโนมัยซีตีส

แอคติโนมัยซีตีสที่ผลิตแอลฟาอะไมเลส ได้แก่ *Streptomyces aureofaciens*, *Thermoactinomyces vulgaris* (ดวงพร คันธโชติ, 2530), *Micromonospora vulgaris*,

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Thermonospora curvata (Nigam, & Singh, 1995) *Nocardia asteroides*, *Thermoactinomyces* sp., *Thermonospora viridis*, *Thermomyces lanuginosus* และ *Thermotoga maritima* (Pandey et al., 2000) เป็นต้น

4. ยีสต์

ยีสต์ที่ผลิตแอลฟาอะไมเลส ได้แก่ *Endomycopsis fibuligera*, *Trichosporon variable*, *Candida* sp., *Pichia* sp. และ *Saccharomyces diastaticus* (ดวงพร คันธโชติ, 2530) เป็นต้น

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *B. subtilis* var. *amylosachariticus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis* (Atkinson & Marituna, 1991)

	B. subtilis var. *amylosachariticus*	*B. amyloliquefaciens*	*B. licheniformis*
พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน	6.8	5.9	7.7-9.0
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	-	70	90
ความเสถียร (50% Inactivation, ^{o}C)	68	80	-
การย่อยสลาย Soluble Starch (%)	43	16	-
น้ำหนักโมเลกุล	41000	49000	62000

3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแหล่งจุลินทรีย์ต่างๆมีดังนี้

3.3.1 ความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรท (Substrate Specificity)

ความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรทของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีลักษณะแตกต่างกันตามแหล่งจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีความเฉพาะเจาะจงต่อซับสเตรทสูงต่อโมเลกุลของแป้ง ได้แก่ อะไมโลส อะไมโลเพคติน ไซโคลเด็กตรินซ์ ไกลโคเจน และมอลโตไตรโอส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 2-12 โดยแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียและราจะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงพีเอชที่มีความเป็นกรดไปจนถึงช่วงพีเอชที่มีความเป็นกลาง และเอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้างระหว่าง 4-11 โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแหล่งต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 5

3.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ และความเสถียรของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับการมีแคลเซียม ซับสเตรทที่เป็นตัวชักนำและสารเพิ่มความเสถียรต่าง ๆ

3.3.4 มวลโมเลกุลของเอนไซม์ (Molecular Weight)

มวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ 10-210 กิโลดาลตัน โดยขนาดมวลโมเลกุลโดยทั่วไปของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่พบ คือ 50-60 กิโลดาลตัน

3.3.5 ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Inhibitors)

ได้แก่ โลหะหนักต่าง ๆ สารละลายที่มีหมู่ซัลไฟดริล BSA (Bovine Serum Albumin) EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) EGTA (Ethylene Glycol Bis (2-Aminoethyl Ether)-N,N,N'N'-Tetraacetic Acid) Iodoacetate *N*-Bromosuccinimide และ *p*-Hydroxyl Mercuribenzoic Acid เป็นต้น

3.3.6 แคลเซียม (Ca^{2+})

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็น Melloenzyme ที่ต้องการแคลเซียมไอออนอย่างน้อย 1 ตัว เพื่อเป็นตัวร่วมปฏิกิริยา (Cofactor of Enzyme) โดยแคลเซียมสามารถจับกับแอลฟาอะไมเลสได้ดีกว่าไอออนชนิดอื่น ซึ่งจำนวนของแคลเซียมที่มาจับอาจมีได้ตั้งแต่หนึ่งไปจนถึงสิบตัว โดยสามารถกำจัดแคลเซียมออกได้โดยการไดอะไลซิสด้วย EDTA หรือการทำ Electrodialysis อีกทั้งเอนไซม์ยังสามารถกลับมาทำงานได้อีกครั้งโดยการเติมแคลเซียมลงไป (Gupta et al., 2003)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 5 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแหล่งต่าง ๆ (Atkinson & Marituna, 1991)

แหล่งของจุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส
Aspergillus niger	5.0
Aspergillus oryzae	5.5-5.9
Bacillus sp.	5.7-6.0
Clostridium acetobutylicum	4.8
Endomycopsis fibuliger	4.8-5.0
Malt	5.7-6.3
Streptococcus bovis	6.5

โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียมักจะทนอุณหภูมิได้สูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากรา และเอนไซม์ที่ผลิตจากราสามารถทนความเป็นกรดได้สูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่มักทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2534) โดยการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแหล่งจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มักมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม แสดงดังตารางที่ 6 และแหล่งของจุลินทรีย์และคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสชนิดที่ทนความร้อน แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแหล่งจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มักมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม (Haki & Rakshit, 2003)

เอนไซม์	แหล่งจุลินทรีย์	ช่วงอุณหภูมิที่ทำงานได้	ช่วงพีเอชที่ทำงานได้
Bacterial Mesophilic			
α-Amylase	*Bacillus subtilis*	80-85	6.0 -7.0
Bacterial Thermophilic			
α-Amylase	*Bacillus licheniformis*	95-105	6.0 -7.0
Fungal			
α-Amylase	*Aspergillus oryzae*	55-70	4.0 -5.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 7 แหล่งของจุลินทรีย์และคุณสมบัติของเอนไซม์ชนิดที่ทนความร้อนแอล์ฟาอะไมเลส (Haki & Rakshit, 2003)

แหล่งจุลินทรีย์	คุณสมบัติของเอนไซม์	
	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน (^{o}C)	พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน
Bacillus amyloliquefaciens	70	7.0
Bacillus licheniformis	100	6.0-6.5
Bacillus stearothermophilus	70-80	5.0-6.0
Bacillus subtilis	70	7.0
Lactobacillus manthotivorans	55	5.5
Myceliophthora thermophila	100	5.6
Pyrococcus woesei	100	6.5-7.5
Pyrococcus furiosus	100	5.5
Staphylothermus marinus	65	5.0
Sulfolobus solfataricus	-	-
Thermococcus aggreganes	100	5.5
Thermococcus celer	90	5.5
Thermococcus fumicolans	95	4.0-6.3
Thermococcus hydrothermalis	85	4.8-7.8
Thermococcus lanuginosus	60	5.6
Thermococcus profoundus	80	4.0-5.0

3.4 การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยจุลินทรีย์

3.4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จะทำการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดอื่น คือ อาศัยเทคนิควิธีการแยกจุลินทรีย์ที่จำเพาะเจาะจง และการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์จากแหล่งจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4.1.1 เทคนิควิธีการแยกจุลินทรีย์ที่เฉพาะเจาะจง

3.4.1.1.1 การเสริมอาหาร (Enrichment) และการเลือกอาหารที่จำเพาะเจาะจงต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการ

จุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาตินั้นสามารถใช้วัตถุจำพวกสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติได้โดยอาศัยการย่อยสลายซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่ขับออกมาจากจุลินทรีย์เหล่านั้น ในการคัดเลือกชนิดจุลินทรีย์ที่จะผลิตเอนไซม์จึงอาจจะอาศัยแหล่งสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ดังนั้น ซับสเตรทที่เฉพาะสำหรับเอนไซม์จึงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ ดังรายงานของศุภชัย สมัปปิโต (2541) ที่ได้ศึกษาการคัดเลือกราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากธรรมชาติและสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าราไอโซเลท D1 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณไร่อ้อย ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดและเมื่อได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาจัดได้ว่าเป็นราในสกุล *Aspergillus*

3.4.1.1.2 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้องการสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว

วิธีการหนึ่งที่นิยมทำกันมากคือ Agar diffusion method ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบแบบหยาบ โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบและตรวจสอบการผลิตเอนไซม์โดยการเทสารละลายไอโอดีนลงไปในจานทดลองคัดเลือกเชื้อถ้าเกิดบริเวณใส (Clear zone) แสดงว่าจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดบริเวณใสนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้และการวัดกิจกรรมเอนไซม์ในอาหารเหลว เป็นต้น

3.4.1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดที่ต้องการต้องคำนึงถึงแหล่งจุลินทรีย์ที่ดีเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ต้องการที่ให้ผลผลิตสูง มีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าพันธุ์พ่อแม่และมีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ โดยมีหลักการในการคัดเลือกจุลินทรีย์ ดังต่อไปนี้

3.4.1.2 .1 มีอัตราการเจริญเร็วในถังหมักขนาดใหญ่และสามารถใช้อาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงสุด

3.4.1.2 .2 ไม่จำเป็นจะต้องเติมสารกระตุ้นในการผลิตเอนไซม์

3.4.1.2 .3 จุลินทรีย์ที่ใช้มีลักษณะทางสรีระที่คงตัว

3.4.1.2 .4 ผลิตเอนไซม์ได้จำนวนมาก โดยผลิตสารอื่นปนมาน้อยที่สุด

3.4.1.2 .5 ไม่สร้างสารพิษลงในน้ำหมัก

3.4.1.2 .6 ปราศจากปฏิกิริยาทางอ้อมที่เป็นอันตรายในเอนไซม์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4.1.2 .7 สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่าย (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529)

3.4.2 วิธีการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยจุลินทรีย์

วิธีการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมมีสองวิธี ได้แก่

3.4.2.1 การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง (Surface Culture; Koji-Type Solid Culture)

ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์พวกรามากกว่าแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยอาหารแข็งและน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (อัตราส่วนที่ใช้ขึ้นกับชนิดสายพันธุ์ของรา) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใช้มักเป็นรำข้าวสาลีหรือรำข้าวเจ้า และบางครั้งอาจมีการเสริมอาหารพวกโปรตีนและเกลือที่จำเป็น วิธีการผลิตทำโดยนำรำข้าวที่ผ่านการเติมน้ำ เกลือแร่ อาหารเสริมที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาผสมกับสปอร์ของรา จากนั้นเกลี่ยใส่ถาด ส่วนมากมักให้มีความหนาประมาณ 5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางไว้เป็นชั้น ๆ ในห้องบ่มเชื้อที่มีการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการเจริญของราและป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น หลังจากบ่มประมาณ 3 วันจะเห็นเส้นใยของราเจริญแทรกเข้าไปอยู่ในอาหารแข็งพร้อมกับผลิตเอนไซม์ออกมาสูงสุดจนผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณที่มากพอ อาจนำไปทำให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิที่ไม่สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เพราะอาจสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้ หลังจากทำให้แห้งแล้วจึงทำการบดก็สามารถนำไปใช้ได้เลยในรูปแห้งหรืออาจนำไปสกัดเอนไซม์ออกจากอาหารแข็งและทำให้เอนไซม์เข้มข้นต่อไป (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) วิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด แต่มีข้อเสีย คือ ต้องใช้แรงงานมากกว่าและมีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นง่ายกว่าการเลี้ยงแบบการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

3.4.2.2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว (Submerged Culture; Liquid Culture)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวได้นำมาประยุกต์ใช้ผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ ซึ่งแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนจะเป็นสารประกอบอินทรีย์หรือ อนินทรีย์ก็ได้ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) นิยมใช้ในการผลิตอะไมเลสจากแบคทีเรียและกลูโคอะไมเลส จากรา โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนขึ้นอุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 3-5% มีการควบคุมการให้อากาศและการกวน วิธีนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิตและการควบคุมสภาพต่าง ๆ ทำได้ง่าย แต่มีข้อเสีย คือ มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ง่ายและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จะลดลง จึงจำเป็นต้องคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง ๆ อยู่เสมอ (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

3.5 วิธีการวัดกิจกรรมของแอลฟาอะไมเลส

ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมักมีการใช้ Soluble Starch หรือแป้งดัดแปรเป็นซับสเตรท โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิกในแป้ง ให้ผลผลิตได้แก่ กลูโคส เด็กซ์ตรินและลิมิตเด็กซ์ตริน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หรือเกิดการลดลงของความเข้มข้นสีของไอโอดีนที่อยู่ร่วมกับซับสเตรท (Starch-Iodine Complex) โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะอาศัยพื้นฐานของการลดลงของความเข้มข้นสีของไอโอดีนที่อยู่ร่วมกับซับสเตรทที่ใช้ในการทดสอบ การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การย่อยสลายของซับสเตรทที่มีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสีและการลดลงของความหนืดของสารละลายแป้ง โดยวิธีการในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแบ่งได้หลายวิธี ดังนี้

3.5.1 วัดจากการลดลงของความเข้มข้นสีของไอโอดีนที่อยู่ร่วมกับซับสเตรท

แป้งเมื่อจับกับสีของไอโอดีนจะเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงิน การย่อยสลายแป้งที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาลแดง โดยวิธีการต่าง ๆ ในการศึกษาด้านปริมาณของเอนไซม์อะไมเลสจะอาศัยคุณสมบัตินี้ในการทดสอบ เนื่องจากสามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในรูปของการลดลงของสีของไอโอดีนเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้

3.5.1.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยซับสเตรทได้ผลผลิตเด็กซ์ตริน (Dextrinising Activity)

การวิเคราะห์จะใช้ Soluble Starch เป็นซับสเตรท ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง จากนั้นจึงเติมสารละลายไอโอดีนลงไปและวัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ใช้ซับสเตรทเป็นชุดควบคุม โดย 1% ของค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง คือ เอนไซม์ปริมาณ 1 หน่วย ข้อจำกัดของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ คือ การเกิดผลรบกวนจากส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Luria Broth ทริปโตน เพปโตน น้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น และสารประกอบเชิงซ้อนของพวกไทออลกับสารประกอบสีของไอโอดีนที่อยู่ร่วมกับซับสเตรท สามารถใช้คอปเปอร์ซัลเฟตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ป้องกันการรบกวนจากส่วนประกอบต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และยังสามารถใช้ซิลค์ซัลเฟตขจัดการรบกวนจากโลหะหนักต่าง ๆ ได้ นอกจากนั้นยังสามารถใช้วิธีการวิเคราะห์ร่วมกับ Flow Injection Analysis (FIA) โดยระบบจะประกอบด้วย Injection Valve, Peristatic Pump, Photometer ที่มี Flow Cells และ 570 nm Filter

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และ Pen Recorder ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจะเข้าทำปฏิกิริยากับแป้งที่อยู่ในขดลวดก่อนที่จะเติมสารละลายไอโอดีนลงไป จากนั้นจึงอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร วิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถผ่านตัวอย่างเข้าไปได้ในอัตราเร็วสูง ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ไวต่อการตรวจสอบและทำได้ง่าย แบ่งได้ 2 วิธีดังนี้

3.5.1.1.1 Sandstedt Kneen and Blish (SKB) Method

วิธีนี้มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมขนมอบ โดยแสดงในรูปของหน่วย SKB ซึ่งจะแสดง Diastatic strength ของข้าวมอลต์แต่ไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้เพียงชนิดเดียว

3.5.1.1.2 Indian Pharmacopoeia Method

วิธีนี้วัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในรูปของจำนวนกรัมของแป้งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่ทำการเจือจางเป็นค่าต่าง ๆ ในบัฟเฟอร์ที่มีแป้งเป็นซับสเตรทที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เติมสารละลายไอโอดีนลงไป ผลที่ได้สีของสารละลายไอโอดีนจะมีการจางลงจนไม่มีสี จากนั้นจึงคำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ในรูปของจำนวนกรัมของแป้งที่ถูกย่อยสลาย โดยวิธีการนี้มักใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากธัญพืช

3.5.2 วัดจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หรือ DNS Method

วิธีการนี้ใช้วัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส มีข้อจำกัดคือ สีที่เกิดขึ้นจะมีการจางลงอย่างช้า ๆ และกลูโคสที่ได้อาจโดนทำลายจากสารละลาย Dinitrosalicylic Acid (DNS) หลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าวโดยมีการดัดแปลงวิธีการโดยใช้ Rochelle Salts และมีการเติมโซเดียมซัลเฟตลงไปเพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสาร

3.5.3 วัดจากการย่อยสลายของซับสเตรทที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสี

วิธีการนี้จะเป็นการใช้ซับสเตรทแป้งจับกับสีย้อมสีน้ำเงินเกิดเป็นเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น Remazol Brilliant Blue R หรือ Cibacron Blue F3 G-A โดยมีหลักการที่สำคัญ คือ ทำการย้อมสี Soluble Starch ให้มีสีเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่เป็นด่างเพื่อสร้างพันธะโควาเลนซ์ระหว่างแป้งและโมเลกุลของสีย้อม โดยแป้งที่มีสีเกิดขึ้นนี้จะเกิดการเชื่อมกันจากการเติม 1,4-Butanediol Diglycide Ether ทำให้เกิดเป็นเครือข่ายที่พอง ไม่ละลายน้ำ การย่อยอนุพันธ์ของแป้งที่ไม่ละลายน้ำนี้ด้วยเอนไซม์จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเกิดขึ้น วิธีการนี้มีข้อดี คือ สามารถทำได้ง่าย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

น่าเชื่อถือ ไวต่อการตรวจสอบ มีความแม่นยำในการวิเคราะห์และสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณต่ำ (0-50 นาโนกรัม) ได้ แต่มีข้อเสีย คือ มีราคาแพงเพราะต้องมีการสังเคราะห์ซับสเตรทขึ้นมาและต้องใช้เอนไซม์ที่มีความจำพาะเจาะจง มีความจำเพาะเจาะจงต่อบางการทดสอบและอาจมีการปนเปื้อนของซับสเตรทที่เป็นเด็กซ์ตรินที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ เปรียบเทียบกับรายงานของ Ten, Im, Kim, Kang, and Lee, (2004) ที่ศึกษาความสามารถในการละลายของสารอนุภาคขนาดเล็กที่ใช้เป็นซับสเตรทและการสร้างบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นซับสเตรทของจุลินทรีย์ ที่มีส่วนผสมของสีย้อมชนิดต่าง ๆ ได้แก่ 1,4 Butanediol Diglycidyl Ether , Brillint Red 3B-A, Cibacron Blue 3GA และ Reactive Orange 14 โดยทำการผสมในซับสเตรท ได้แก่ อะไมโลส, ไซแลน และ HE-Cellulose พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสหรือไซแลนเนสหรือเซลลูเลสหรือเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกันจากดินและแหล่งอื่น ๆ ได้ โดยวิธีการดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจง น่าเชื่อถือและให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว

3.5.4. วัดจากการลดลงของความหนืดของสารละลายแป้ง

วิธีการนี้มักใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบเพื่อวัดคุณภาพของแป้ง แต่ไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้เนื่องจากความหนืดของแป้งโด (Dough) โดยการทดสอบแบ่งได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

3.5.4.1 Falling Number (FN) Method

วิธีการนี้ได้รับการยอมรับว่ามีความมาตรฐานในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่พบในส่วนผสมของแป้งกับเอนไซม์ที่ผลิตจากทั้งธัญพืชและราที่ถูกใช้ในการปรับปรุงการหมักแป้งที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แต่เนื่องจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากรามีความเสถียรต่ำที่อุณหภูมิสูง จึงทำให้ไม่สามารถตรวจหา Standard FN Method ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้ วิธีการนี้จึงถูกดัดแปลงและทำให้มีมาตรฐานเพื่อสามารถทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ทั้งในเอนไซม์ที่ผลิตจากธัญพืชและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากราที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงในขั้นตอนก่อนการเกิดเจลาติไนเซชันได้โดย Falling Number ประมาณ 400 เป็นค่าปกติที่มักพบในแป้งข้าวมอลต์

3.5.4.2 Amylograph/Farinograph Test

วิธีการนี้มักใช้ในวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบในแป้งในอุตสาหกรรมการผลิตแป้งและอุตสาหกรรมขนมอบ โดยใช้หลักการเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของ Starch Slurry และระดับกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าสูงสุดเมื่อแป้งมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความหนืดเมื่อให้ความร้อน ค่าที่ได้จาก Amylograph จะมีค่า 400-600 Brabender Units ของ Farinograph ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการหมักแป้งที่จะใช้ในการทำขนมปัง (ค่าที่สูงแสดงถึงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำ)

นอกจากนี้การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ยังได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปต่าง ๆ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ให้มีความสะดวก รวดเร็ว ดังรายงานของยุวดี (2543) ที่ได้ศึกษาวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Mono-Test [a] α-Amylase ของ Boehringer Mannheim (Germany)

3.6 การนำเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

3.6.1 อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับแป้ง

ในอุตสาหกรรมการผลิตที่เกี่ยวข้องกับแป้ง มักมีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการผลิตกลูโคสและฟรักโตส โดยแป้งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำเชื่อมที่มีปริมาณฟรักโตสสูง (HFCS) เพื่อนำไปใช้เป็นส่วนผสมเพื่อให้ความหวานในเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ โดยในกระบวนการผลิตต้องการเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงของกระบวนการทำให้ใส (Gupta et al., 2003) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับแป้งเพื่อย่อยแป้งในกระบวนการการทำให้ใสนั้นสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ ดังต่อไปนี้

3.6.1.1 *B. amyloliquefaciens* หรืออีกชื่อหนึ่งว่า *B. subtilis* (*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*)

เอนไซม์กลุ่มนี้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้ประมาณ 70 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส และต้องการแคลเซียมเป็นตัวร่วมกิจกรรม มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 6.0-6.5 ในการกระบวนการผลิตจะการใช้เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานมากกว่า 1 ชั่วโมง (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์) เมื่อกิจกรรมการย่อยสลายเสร็จสิ้น ความสามารถของเอนไซม์จะหมดลงพร้อม ๆ กัน ไม่ต้องใช้ความร้อนเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์

3.6.1.2 *B. licheniformis*

เอนไซม์กลุ่มนี้มีความเสถียรต่อความร้อนได้ดี เหมาะสมกับการทำงานที่อุณหภูมิสูงและต้องการแคลเซียมเป็นตัวร่วมกิจกรรม การทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้น้ำแป้งที่ย่อยแล้วเปลี่ยนสีไปบ้าง สามารถหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้โดยใช้ความร้อนสูง 120-140 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.6.1.3 *B. stearothermophilus*

เอนไซม์กลุ่มนี้มีความเสถียรต่อความร้อนได้ดีที่สุด โดยน้ำแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว (ในอุณหภูมิสูง) จะมีสีคล้ำ และต้องหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใช้ความร้อนสูงก่อนเริ่มกระบวนการผลิตอื่น ๆ ต่อไป (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

อุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับการนำแป้งมาใช้ประโยชน์อื่น ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ การผลิตเอธานอลด้วยกระบวนการหมักโดยยีสต์ เนื่องจากแป้งเป็นแหล่งที่ให้ผลผลิตเอธานอลสูง การผลิตอะซิโตนและบิวทานอล การผลิตกรดแลคติค การเป็น Malt Adjunct ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และการผลิตซีวมวล เป็นต้น (Gupta et al., 2003)

3.6.2 อุตสาหกรรมการผลิตขนมปังและขนมอบต่าง ๆ

มีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการผลิตขนมปังและขนมอบพวกโรลเพื่อช่วยเปลี่ยนแปลงอัตราการหมักและลดความหนืดของแป้งโด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเนื้อผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลขึ้นในแป้งโด ช่วยเปลี่ยนแปลงรูปลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ให้มีสีสัน เนื้อสัมผัสที่อ่อนนุ่มน่ารับประทาน ปรับปรุงรสชาติและสีของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น

3.6.3 อุตสาหกรรมทอผ้า

ในการทอผ้ามีการนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ซึ่งทำให้ด้ายดิบขาดง่าย ดังนั้น จึงต้องนำด้ายดิบไปชุบน้ำแป้งก่อนที่จะนำมาทอ เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนจึงต้องมีการเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ โดยวิธีการที่กล่าวมามักใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะและแพรเทียม (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

นอกจากนั้นยังใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นตัว Saccharifying Agent ในอุตสาหกรรมแอลกอฮอล์จากธัญพืช อุตสาหกรรมการผลิตกาว อุตสาหกรรมการทำกระดาษ (Starch Coating) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2534) อุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก และใช้ในการวิเคราะห์ทางการแพทย์ (Gupta et al., 2003) เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Planchot and Colonna (1995) ได้รายงานถึง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจาก *A. fumugatus* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 5.5 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 40 องศาเซลเซียส

Uguru, Akinyanju and Sani (1997) ได้ศึกษาถึง การผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดย *A. niger* ที่คัดแยกได้จากหัวมันเทศ พบว่า เอนไซม์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ มากกว่า 50% ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Ali, Mezghani and Bejar (1999) รายงานถึง *Bacillus* sp. US100 ที่คัดแยกได้จากดิน ที่ตูนีเซีย สามารถเจริญและผลิตแอลฟาอะไมเลสชนิดที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยเอนไซม์ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 110 องศาเซลเซียส โดยใช้ซับสเตรทปริมาณ 20%(w/v)

Stamford et al. (2001) ได้ศึกษาเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสชนิดที่ทำงานได้ดี ที่อุณหภูมิสูงที่ผลิตจาก *Nocardiopsis* sp. ที่คัดแยกได้จากหัวมันเทศ พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรม ของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 100% และมีความเสถียรต่อ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 50%

Konsula and Liakopoulou-Kyriakides (2004) รายงานถึง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงที่ผลิตจาก *B. subtilis* ที่คัดแยกได้จากน้ำนมแกะ พบว่า เอนไซม์สามารถ ทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงสุด คือ 135 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.5 และความเสถียรต่ออุณหภูมิของ เอนไซม์ต้องการแคลเซียมหรือแป้งเป็นตัวร่วมกิจกรรม โดยเอนไซม์สามารถย่อยแป้งให้อัตราการ ย่อยสลายซับสเตรทสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยการย่อยสลายแป้งมันฝรั่งให้ผลผลิต ของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ รองลงมา ได้แก่ Soluble starch แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพดและแป้งข้าวโอ๊ต ตามลำดับ

Burhan, Nisa, Omer, Ashabil and Osman (2003) ได้ศึกษาถึงเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงและสภาวะที่เป็นด่างที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ANT-6 ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่า เอนไซม์จะแสดงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ พีเอช 10.5 และ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถทำงานได้ ที่สภาวะเป็นด่าง (พีเอช 9.5-13) และสามารถทำงานได้อย่างสมบูรณ์ที่ 100 องศาเซลเซียส พีเอช 10.5 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 85.5%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ten, Im, Kim, Kang and Lee (2004) รายงานถึงเทคนิคการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ซับสเตรทที่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสีย้อมต่าง ๆ พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสหรือไซแลนเนสหรือเซลลูเลสหรือเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกันจากดินและแหล่งอื่น ๆ ได้ โดยเทคนิคนี้มีความน่าเชื่อถือ และให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วต่อการย่อยสลายซับสเตรทของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้โพลีแซคคาไรด์ต่าง ๆ ที่พบตามธรรมชาติได้ เนื่องจาก ความสามารถในการละลายของอนุภาคของสารขนาดเล็กที่ใช้เป็นซับสเตรทและการสร้างบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีย้อมต่าง ๆ เป็นส่วนประกอบในซับสเตรท (อะไมโลส ไซแลน และ HE-Cellulose) ได้แก่ 1,4 Butanediol Diglycidyl Ether Brillint Red 3B-A Cibacron Blue 3GA และ Reactive Orange 14

Wanderley, Torres, Moraes and Ulhoa (2004) สามารถคัดแยก *Cryptococcus flavus* จากผลไม้ของบราซิล พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ปริมาณสูง โดยมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียสและพีเอช 5.5 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เท่ากับ 80% เมื่อทำการบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้โดย Cu^{2+}, Fe^{2+} และ Hg^{2+}

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University