สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัย

เรื่อง

"การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส และกลูโคอะไมเลสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในถังหมักสำหรับการสลายแป้งมันสำปะหลัง

The Production of α-amylase and Glucoamylase from the Selected Microbial Strains in Fermenters for Cassava Starch Hydrolysis

คณะผู้วิจัย

เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์
ศิริโฉม ทุ่งเก้า
เยาภา ไหวพริบ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

BK 010839b
23 มิถุนายน 2552
249112
เริ่มบริการ
23 มิ.ย. 2552

ทุนวิจัยสำนักงานสภาวิจัยแห่งชาติ (วช)
ประจำปีงบประมาณ 2548-2549

คำนำ

โครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2548 ถึง 2549 ในการดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่อง "การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส และกลูโคอะไมเลส จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในถังหมักสำหรับการสลายแป้งมันสำปะหลัง" (The Production of α-amylase and Glucoamylase from the Selected Microbial Strains in Fermenters for Cassava Starch Hydrolysis) ขณะนี้งานวิจัยได้เสร็จสิ้นแล้วโดยรายงานวิจัยแบ่งออกเป็นสองส่วนนึ่งอยู่ในเล่มเดียวกันคือ ส่วนที่ 1 เป็นเรื่องเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส หน้าที่ 1-83 และส่วนที่ 2 เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ตั้งแต่หน้าที่ 94 เป็นต้นไป ผลการวิจัยโดยรวมทั้งสองเรื่องได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

รายงานวิจัย I

เรื่อง

"การปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมและการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสสำหรับย่อยแป้งมันสำปะหลัง

Optimum Conditions and Production of Alfa-amylase for Cassava Starch Hydrolysis

คณะผู้วิจัย

เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์

ศิริโฉม ทุ่งเก้า

เยาภา ไหวพริบ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการลิควิแฟคชันของแป้ง จากการวิจัยพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแบบ Submerge โดย *B. licheniformis* กล่าวคือ ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงและมีราคาถูก ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ น้ำแป้งถั่วเหลือง ความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ พีเอชเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะดังกล่าวทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 28.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 34.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีการตัดยีสต์สกัดออกจากสูตรอาหารและมีการแทนที่ทริปโทนด้วยน้ำแป้งถั่วเหลืองเพื่อลดต้นทุนการผลิต และจากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Batch ที่สภาวะที่ทำการทดลอง พบว่า การผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ของ *B. licheniformis* มีลักษณะเป็น Growth-associated ที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.39 ต่อชั่วโมง ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 30.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาของระยะ Lag (t-lag) เท่ากับ 1.46 ชั่วโมง Doubling time (t-d) เท่ากับ 1.76 ชั่วโมง ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ต่อมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 20060.70 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อสับสเตรท ($Y_{p/s}$)เท่ากับ 2221.45 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุด (Maximum enzyme production rate) เท่ากับ 1253.8 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง และ ค่า Maximum specific activity เท่ากับ 16082.84 หน่วยต่อกรัมโปรตีน

สารบัญ

หน้า

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

สมมติฐานของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

คุณสมบัติและโครงสร้างของแป้ง 5

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava Starch) 11

กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาล 13

คุณสมบัติและความสำคัญของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์ 20

กระบวนการหมัก (Fermentation) 25

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 38

3 วิธีดำเนินการวิจัย 43

จุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 43

วิธีดำเนินการวิจัย 45

4 ผลการวิจัย 52

5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย 62

บรรณานุกรม 68

ภาคผนวก 74

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 74

ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี 77

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน 81

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,(1-4) กูลโคซิดิก ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด ได้แก่ อะไมโลสและอะไมโลเพคติน อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์สายยาวที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิก จำนวนโมเลกุลของกลูโคสที่มาต่อกันอาจมีจำนวนมากถึง 6,000 โมเลกุล ส่วนอะไมโลเพคตินประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 10-60 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิก และมีแขนงข้างที่มีความยาวประมาณ 15-45 หน่วยกลูโคส เชื่อมต่อกับพอลิเมอร์สายหลักด้วยพันธะ α,(1-6) กลูโคซิดิก (Van der Maarel, Van der Veen, Uitdehaag, Leemhuis, and Dijkhuizen, 2002) แป้งเป็น Storage product หลักในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวเจ้า ข้าวโพด มันสำปะหลังและมันฝรั่ง (Hagihara et al., 2001) โดยแป้งจากพืชเหล่านี้จะอยู่ในรูปเม็ดแป้ง เม็ดแป้งไม่ละลายในน้ำเย็น เมื่อให้ความร้อนเม็ดแป้งจะพองตัวจนถึงจุดที่ไม่สามารถกลับมาเป็นเหมือนเดิมได้อีก โดยอะไมโลสจะหลุดออกมาจากเม็ดแป้งส่งผลให้ความหนืดของสารละลายสูงขึ้น กระบวนการนี้เรียกว่า เจลาติไนเซชัน (Gelatinization) (Van der Maarel et al., 2002)

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังรายใหญ่ของโลก โดยประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้จะถูกส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ที่เหลือก็จะถูกนำมาใช้ภายในประเทศ (ผู้ส่งออก, 2545) แป้งมันสำปะหลังสามารถนำไป ใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น การผลิตสารให้ความหวาน การผลิตผงชูรสและเอนไซม์ต่าง ๆ การหมักเอทานอล เป็นต้น ซึ่งต้องมีการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลเสียก่อน การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้กรดมีข้อเสีย คือ ควบคุมปฏิกิริยาได้ยาก ใช้สภาวะรุนแรงและอาจมีปฏิกิริยาข้างเคียง ทำให้การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากการย่อยด้วยเอนไซม์มีข้อดีหลายประการ เช่น ความจำเพาะสูงกว่า ปฏิกิริยาไม่รุนแรง และใช้สารเคมีที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าทำให้เหมาะสมต่อการบริโภคมากกว่า (Sodhi, Sharma, Gupta, and Soni, 2005) นอกจากนี้ กระบวนการผลิตโดยใช้เอนไซม์ยังสิ้นเปลืองพลังงานน้อยกว่าและไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการ Neutralization ของผลิตภัณฑ์ (Sivaramakrishnan, Gangadharan, Nampoothiri, Soccol, and Pandey, 2006) กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลมีหลายขั้นตอน ได้แก่ เจลาติไนเซชัน ลิควิแฟคชัน แซคคาริฟิเคชัน และไอโซเมอไรเซชัน ขั้นตอนการ

ทำเจลาติไนเซชันเป็นการทำให้แป้งละลายน้ำที่อุณหภูมิสูงประมาณ 100 องศาเซลเซียส เกิดสภาพเจล ความหนืดของแป้งจะสูงขึ้นทำให้เกิดปัญหาด้านการปั๊มและการกวนผสม ทำให้ต้องมีการลดความหนืดลงโดยการทำลิควิเฟคชันควบคู่ไปด้วย (Sodhi et al., 2005) กระบวนการลิควิเฟคชันอาจทำได้โดยการใช้กรดทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง หรืออาจทำโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิกแบบสุ่มภายในสายอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโครงรูปเป็นแบบแอลฟาขนาดต่างๆ กัน และเดกซ์ตริน ซึ่งจะช่วยลดความหนืดของสารละลายแป้งลง (Van der Maarel et al., 2002) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการแซคคาริฟิเคชันเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสและไอโซเมอไรเซชันเพื่อเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุกโตส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

กระบวนการลิควิเฟคชันโดยเอนไซม์จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงจากแบคทีเรียเนื่องจากสามารถทนอุณหภูมิสูงและเกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์และรวดเร็ว ตัวอย่างเอนไซม์ที่นำมาใช้ ได้แก่ *Bacillus stearothermophilus* *B. licheniformis* และ *B. subtilis* (*B. amyloliquefaciens*) โดยเฉพาะเอนไซม์จาก *B. stearothermophilus* และ *B. licheniformis* ซึ่งทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์จาก *B. subtilis* ทนได้น้อยกว่าคือไม่เกิน 90 องศาเซลเซียส (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) ซึ่งประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าเอนไซม์เหล่านี้จากต่างประเทศ เนื่องจากยังไม่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในปริมาณมากและต้นทุนต่ำเพียงพอ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับอุตสาหกรรมขึ้นใช้เองภายในประเทศโดยใช้ผลิตผลทางการเกษตรที่มีปริมาณมากและราคาถูกเป็นวัตถุดิบ เพื่อลดการนำเข้าและเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีของไทยขึ้นใช้เอง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มโรงงานที่นำผลผลิตจากการสลายแป้งมันสำปะหลังไปใช้เป็นวัตถุดิบ ได้แก่ โรงงานผลิตสารชีวภาพต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน ผงชูรส เอทานอล ตลอดจนอุตสาหกรรมอื่น ๆ

การผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียทำได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ Solid state fermentation (SSF) และ Submerge fermentation (SmF) การหมักแบบ Solid-state เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารที่เป็นของแข็ง เช่น เมล็ดข้าว เมล็ดถั่ว รำข้าว รำข้าวสาลี ฯลฯ ที่มีความชื้น ในประเทศญี่ปุ่น การหมักแบบ Solid-state เป็นเทคโนโลยีหลักของการผลิตเอนไซม์ที่รู้จักกันในนามของโคจิ (Koji) แต่ เนื่องจากการควบคุมกระบวนการทำได้ยากจึงทำให้การหมักแบบ Submerge ได้รับความนิยมมากกว่า ส่วนการหมักแบบ Submerge เป็นการหมักในอาหารเหลวโดยอาจทำในระดับ Shake flask หรือในถังหมัก (Fermenter) อย่างไรก็ตาม การหมักแบบ Submerge มีข้อได้เปรียบกว่าแบบ Solid-state หลายประการ เช่น การควบคุมพารามิเตอร์ต่างๆ ทำได้ง่ายและ

แน่นอน การวัดค่าต่างๆ ทำได้ง่ายและถูกต้องเนื่องจากลักษณะเป็นเนื้อเดียวกับของสับสเตรท การขยายส่วน (scale-up) และการสร้างแบบจำลองทำได้ง่าย นอกจากนี้ยังประหยัดเนื้อที่มากกว่า และมีความคงที่ของผลผลิตในแต่ละรอบการผลิตมากกว่าการหมักแบบ Solid-state (Jin, Li, Zhang, and Yu, 2001)

จากการที่กระบวนการลิควิแฟคชันระหว่างการสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลจำเป็นต้องใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูง และเนื่องจากการที่ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยง ตลอดจนกระบวนการที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นสำคัญ (Nigam and Singh, 1995) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อหาองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม กล่าวคือ ให้ปริมาณเอนไซม์สูงและมีราคาถูก รวมทั้งเพื่อหาสภาวะและกระบวนการผลิตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *B.licheniformis* โดยการหมักแบบ Submerge ในระดับ Shake flask และในถังหมักขนาด 5 ลิตร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักนั้นสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมได้ดี ส่งผลให้ผลการทดลองที่ได้นั้นมี reproducibility สูง ทำให้ค่าต่าง ๆ ที่ได้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นค่าอ้างอิงที่เชื่อถือได้สำหรับการปรับขนาดการผลิต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงและมีราคาถูก
2. เพื่อหาสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *B.licheniformis* โดยการหมักแบบ Submerge ในระดับ Shake flask
3. เพื่อหากระบวนการผลิตที่เหมาะสมต่อการการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* โดยการหมักแบบ Submerge ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

สมมติฐานของการวิจัย

สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* ได้ในปริมาณสูงและต้นทุนต่ำที่สภาวะและกระบวนการการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* ได้ในปริมาณสูงและต้นทุนต่ำ

2. สามารถนำสภาวะและกระบวนการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการทดลองไปใช้ในการขยายขนาดการผลิตเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะช่วยลดการนำเข้าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากต่างประเทศลง

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 หัวข้อหลัก คือ

1. การทดสอบหาองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. licheniformis* ในระดับ Shake flask โดยองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการศึกษา ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ส่วนสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่ศึกษา ได้แก่ พีเอชและอุณหภูมิ

2. การทดสอบหากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ Batch และFed-batch

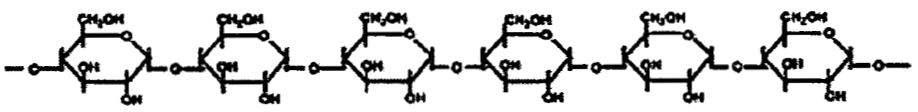
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. คุณสมบัติและโครงสร้างของแป้ง

แป้ง (Starch) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไนโตรเจนและออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 ต่อ 10 ต่อ 5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิก (Van der Maarel et al., 2002) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหมู่แอลดีไฮด์ เรียกว่า ปลายรีดิวซ์ (Reducing end) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น ได้แก่ อะไมโลส และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง ได้แก่ อะไมโลเพคติน วางตัวในแนวรัศมี แป้งที่ได้จากแหล่งต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินต่างกัน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

1.1 อะไมโลส

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์สายยาวที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิก ดังภาพที่ 2-1 จำนวนโมเลกุลของกลูโคสที่มาต่อกันอาจมีจำนวนมากถึง 6,000 โมเลกุล โดยจำนวนโมเลกุลของกลูโคสที่มาต่อกันจะแสดงด้วยค่า Degree of polymerization (DP) (Van der Maarel et al., 2002) อะไมโลสไม่ละลายน้ำและมีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่ (Double helix) ที่มีกลูโคส 6 โมเลกุลในแต่ละรอบ (Nigam and Singh, 1995) อะไมโลสสามารถจับกับไอโอดีน (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) และสารประกอบอินทรีย์บางชนิด เช่น บิวทานอล กรดไขมัน สารลดแรงตึงผิว ฟีนอลและไฮโดรคาร์บอน ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ โดยอะไมโลสจะพันเป็นเกลียวรอบสารดังกล่าว (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546) ในกรณีของไอโอดีนจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Amylose-Iodine Complex ที่มีสีน้ำเงิน ความเข้มสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามความยาวและจำนวนเกลียวของสายอะไมโลส (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539)



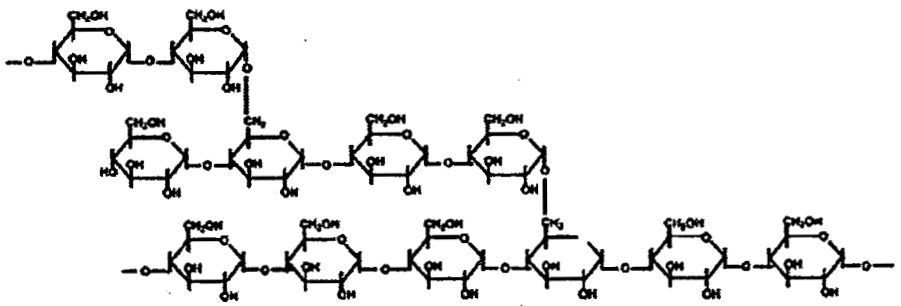
ภาพที่ 2-1 สูตรโครงสร้างของโมเลกุลอะไมโลส
ที่มา : De Geeter, 1999

แป้งจากธัญพืช เช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งข้าวฟ่าง มีปริมาณอะไมโลส ประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์ แป้งจากรากและหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง แป้งสาคู มีปริมาณอะไมโลสประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ แป้งข้าวเหนียว (Waxy starch) ไม่มีอะไมโลสเลย ส่วนแป้งข้าวโพดอะไมโลเมซ (Amylomaize) มีอะไมโลสสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลสจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแป้ง แต่โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 10^5-10^8 ดาลตัน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

โครงสร้างของอะไมโลสเมื่ออยู่ในสารละลายมีได้หลายรูปแบบ ได้แก่ เป็นเกลียวม้วน (Helix) เกลียวที่คลายตัว (Interupted helix) หรือม้วนแบบไม่เจาะจง (Random coil) ในสารละลายที่อุณหภูมิห้องอะไมโลสจะอยู่ในรูปเกลียวม้วนหรือเกลียวที่คลายตัว แต่ในตัวทำละลายบางชนิด อะไมโลสจะอยู่ในลักษณะม้วนแบบไม่เจาะจง นอกจากนี้ โครงสร้างของอะไมโลสยังขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลด้วย โดยอะไมโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 6,500-160,000 จะอยู่ในรูปเกลียวคู่ที่แข็ง (Double helix) ส่วนอะไมโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 6,500 หรือมากกว่า 160,000 จะมีลักษณะม้วนแบบไม่เจาะจงและอาจมีบางส่วนละลายได้ (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

1.2 อะไมโลเพคติน

โมเลกุลของอะไมโลเพคตินประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 10-60 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิก และมีแขนงข้างที่มีความยาวประมาณ 15-45 หน่วยกลูโคส เชื่อมต่อกับพอลิเมอร์สายหลักด้วยพันธะ α,(1-6) กลูโคซิดิก (Van der Maarel et al., 2002) ดังภาพที่ 2-2 โดยมีจำนวนของพันธะ α,(1-6) กลูโคซิดิก ประมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ต่อโมเลกุลของอะไมโลเพคติน (Nigam and Singh, 1995)



ภาพที่ 2-2 สูตรโครงสร้างของโมเลกุลอะไมโลเพคติน

ที่มา : De Geeter, 1999

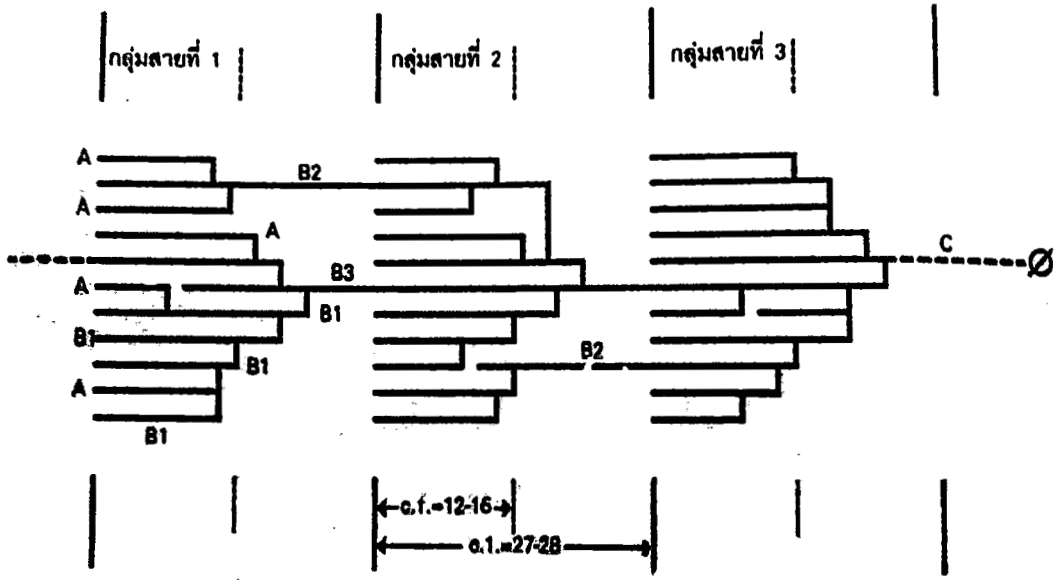
ตามปกติอะไมโลเพคตินมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าอะไมโลส มาก คือประมาณ 1,000 เท่าของอะไมโลส (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) และอาจมีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 10^8 ดาลตัน (Nigam and Singh, 1995) อะไมโลเพคตินสามารถทำปฏิกิริยากับไอโอดีนได้สารประกอบเชิงซ้อนสีแดง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2539) อะไมโลเพคตินมีอัตราการคืนตัวต่ำ เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นแบบกิ่ง (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) โดยลักษณะโครงสร้างแบบกิ่งของ อะไมโลเพคตินประกอบด้วยสายโซ่ (Chain) 3 ชนิด คือ

1.2.1 สาย A (A-chain) เชื่อมต่อกับสายอื่นที่ตำแหน่งเดียว ไม่มีแขนงข้าง (Unbranched)

1.2.2 สาย B (B-chain) มีแขนงข้างเชื่อมต่อกับสายอื่นๆ 2 สายหรือมากกว่า ในโมเลกุลอะไมโลเพคตินประกอบด้วยสาย A และ B ในอัตราส่วน 0.8-0.9 ต่อ 1

1.2.3 สาย C (C-chain) เป็นสายแกน ประกอบด้วยหมู่รีดิวซ์ 1 หมู่ ใน 1 โมเลกุลของอะไมโลเพคติน ประกอบด้วยสาย C 1 สายเท่านั้น (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

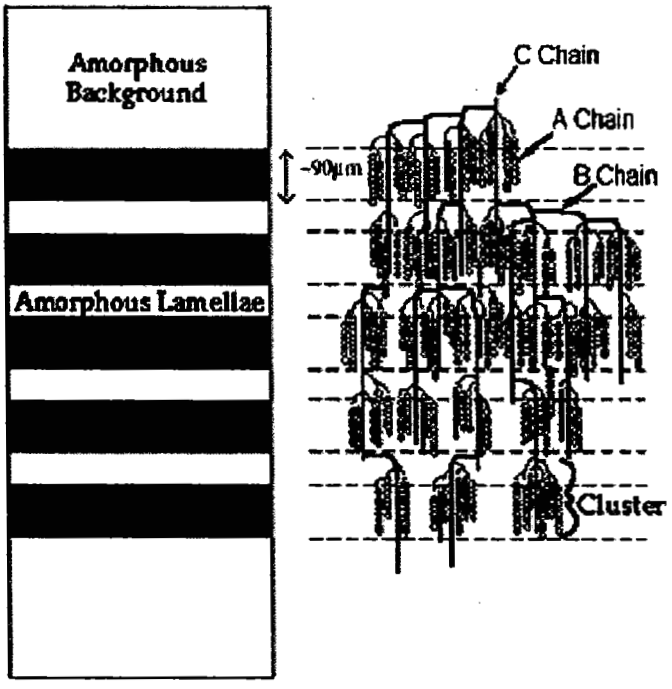
ลักษณะโครงสร้างของอะไมโลเพคตินที่ประกอบด้วยสาย A B และ C แสดงดังภาพที่ 2-3



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของอะไมโลเพคตินที่ประกอบด้วยสาย A B และ C

ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546

โมเลกุลของอะไมโลเพคตินจะอยู่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม (Cluster) จากการศึกษาโครงสร้างของอะไมโลเพคตินอย่างละเอียดโดยใช้เอนไซม์ที่ย่อยพันธะกิ่ง (Debranching enzyme) และเบต้าอะไมเลส (β-Amylase) ย่อยอะไมโลเพคตินจากมันฝรั่ง พบว่า โครงสร้างของอะไมโลเพคตินแสดงดังภาพที่ 2-4 ส่วนหนึ่งแสดงถึงส่วนผลึก (Crystalline region) ส่วนที่สองเป็นส่วนที่มีโครงสร้างเป็นกิ่งเชื่อม แสดงถึงส่วนอสัณฐาน (Amorphous region) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

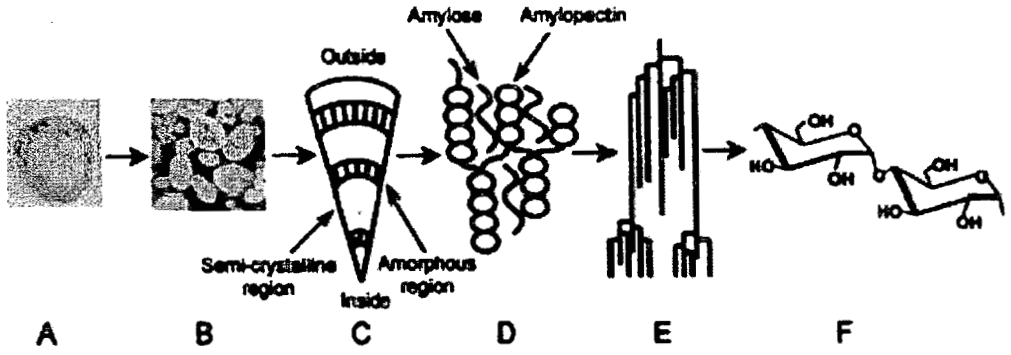


ภาพที่ 2-4 ลักษณะโครงสร้างของอะไมโลเพคตินในเม็ดแป้งที่ซึ่งประกอบด้วยส่วนผลึกและส่วนอสัณฐาน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Nowjee, 2004

สำหรับอะไมโลเพคตินของแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่ง สายส่วนใหญ่ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มเดี่ยว ๆ และสายที่เหลืออีก 10-20 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนเชื่อมต่อของแต่ละกลุ่ม ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายประมาณ 22-25 สาย ทำให้เกิดเป็นส่วนผลึกของเม็ดแป้ง ในการจับกันเป็นกลุ่มของอะไมโลเพคตินทำให้เกิดเป็นส่วนผลึกของเม็ดแป้ง มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ ช่วยให้เม็ดแป้งมีความคงทนต่อการทำปฏิกิริยาโดยกรดและเอนไซม์ (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

แป้งเป็น Storage product หลักในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว สาลี ข้าวเจ้า ข้าวโพด มันสำปะหลังและมันฝรั่ง (Hagihara et al., 2001) โดยแป้งจากพืชเหล่านี้จะอยู่ในรูปเม็ดแป้ง (Starch granule) ภายในเม็ดแป้งจะประกอบด้วยส่วนอสัณฐานและส่วนผลึก กรณีของแป้งที่ได้จากส่วนหัวหรือรากพืช บริเวณส่วนผลึกของเม็ดแป้งจะประกอบด้วยอะไมโลเพคตินเพียงอย่างเดียว ส่วนอะไมโลสจะพบเฉพาะบริเวณส่วนอสัณฐานเท่านั้น (Van der Maarel et al., 2002) ในขณะที่เม็ดแป้งที่ได้จากธัญพืชจะพบว่าประกอบด้วยอะไมโลเพคติน 70 เปอร์เซ็นต์ และอีก 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นอะไมโลส (Nigam and Singh, 1995) โดยจะพบอะไมโลเพคตินเป็นส่วนประกอบหลักของบริเวณส่วนผลึก ส่วนอะไมโลสจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับลิปิดซึ่งฟอร์มโครงสร้างผลึกอย่างอ่อนและช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เม็ดแป้ง (Van der Maarel et al., 2002) โครงสร้างของเม็ดแป้งในพืชหัว แสดงดังภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 โครงสร้างของเม็ดแป้งภายในหัวมันฝรั่ง โดย

A หมายถึง หัวมันฝรั่ง

B หมายถึง ลักษณะของเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

C หมายถึง ภาพตัดขวางของเม็ดแป้ง แสดงส่วนอสัณฐาน และส่วนกึ่งผลึก

D หมายถึง รายละเอียดของส่วนกึ่งผลึก

E หมายถึง โครงสร้างของอะไมโลเพคติน

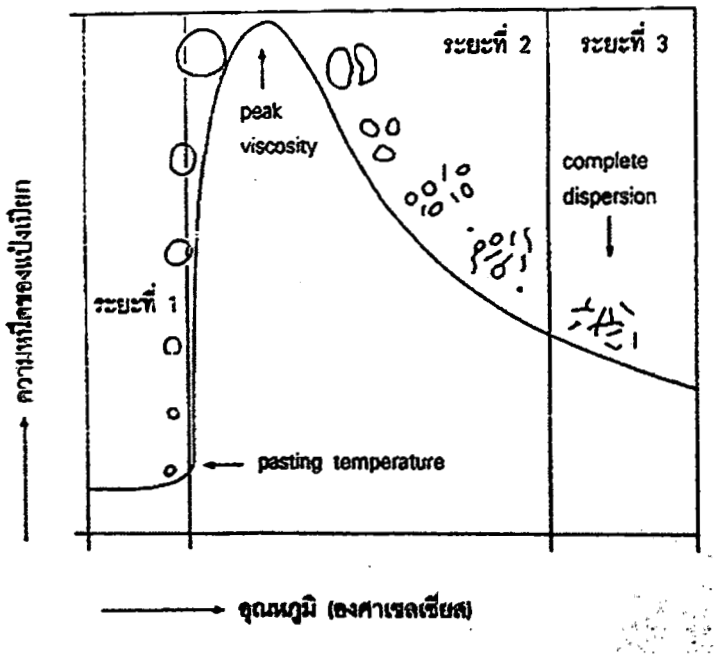
F หมายถึง กลูโคส 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิก

ที่มา : Van der Maarel et al., 2002

เม็ดแป้งไม่ละลายในน้ำเย็น (Van der Maarel et al., 2002) แม้ว่าโมเลกุลของแป้งจะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก ยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) แต่เนื่องจากเม็ดแป้งอยู่ในรูปของร่างแห (Micelles) การจัดเรียงตัวเช่นนี้ทำให้

เม็ดแป้งละลายในน้ำเย็นได้ยาก ขณะที่แป้งอยู่ในน้ำเย็นเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำและพองตัวได้เล็กน้อย เมื่อให้ความร้อนกับน้ำแป้ง พันธะไฮโดรเจนจะคลายตัวลง เม็ดแป้งจะดูดน้ำแล้วพองตัว (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546) โดยปริมาตรของเม็ดแป้งจะเพิ่มขึ้น 25-30 เท่า (Atkinson and Mavituna, 1991) การที่โมเลกุลของน้ำอิสระที่อยู่รอบ ๆ เม็ดแป้งเหลือน้อยลงทำให้เม็ดแป้งเคลื่อนที่ได้ยากขึ้นและเกิดความหนืด น้ำแป้งจะมีความหนืดมากขึ้นและใสขึ้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า การเกิดเจลาติไนเซชัน (Gelatinization) อุณหภูมิที่สารละลายเริ่มเกิดความหนืดเรียกว่า อุณหภูมิเริ่มเจลาติไนซ์ กรณีที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวัดความหนืดมักเรียกจุดนี้ว่า Pasting temperature หรือ Pasting time ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแป้งแต่ละชนิด แป้งจากพืชหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง จะมีอุณหภูมิเริ่มเจลาติไนซ์ต่ำกว่าแป้งจากธัญพืช (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

การเกิดเจลาติไนเซชันของเม็ดแป้งแบ่งได้ 3 ระยะ คือ ระยะแรก เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำเย็นได้อย่างจำกัดและเกิดการพองตัวแบบผันกลับได้ เนื่องจากร่างแหระหว่างไมเซลล์ยืดหยุ่นได้จำกัด ความหนืดของสารแขวนลอยจะไม่เพิ่มขึ้นจนเห็นได้ชัด เม็ดแป้งยังคงรักษารูปร่างและโครงสร้างแบบที่เกิดการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ (Birefringence) เมื่อใส่สารเคมีหรือให้ความร้อนเพิ่มขึ้นแล้วแต่ชนิดของแป้ง จะเริ่มเข้าสู่ระยะที่ 2 เม็ดแป้งจะพองตัวอย่างรวดเร็ว ร่างแหระหว่างไมเซลล์ภายในเม็ดแป้งจะอ่อนแอลงเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำเข้าไปมากและเกิดการพองตัวแบบผันกลับไม่ได้ (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546) โดยอะไมโลสจะหลุดออกมาจากเม็ดแป้งส่งผลให้ความหนืดของสารละลายสูงขึ้น (Van der Maarel et al., 2002) เม็ดแป้งมีการเปลี่ยนรูปร่างและโครงสร้างของการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนเข้าสู่ระยะที่ 3 รูปร่างของเม็ดแป้งจะไม่แน่นอน การละลายของแป้งเพิ่มขึ้น (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546) ในที่สุดเม็ดแป้งจะแตกออกเกิดการแตกตัวเป็นคอลลอยด์อย่างสมบูรณ์ (Van der Maarel et al., 2002) เมื่อน้ำแป้งเย็นลงจะเกิดเจล การเกิดเจลาติไนเซชันจะทำให้หมู่ไฮดรอกซิลสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ได้ดีขึ้นและถูกย่อยด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ได้ดีกว่า ระยะต่าง ๆ ของการเกิดเจลาติไนเซชันแสดงดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 ระยะต่าง ๆ ของการเกิดเจลาติไนเซชันของเม็ดแป้ง

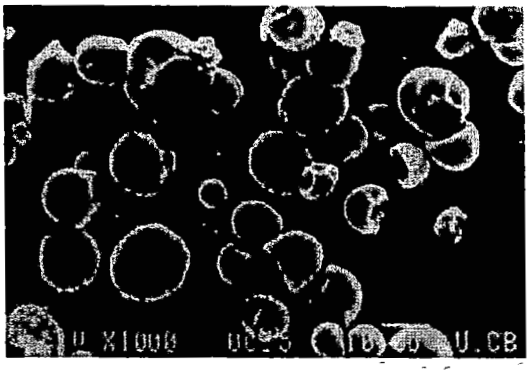
ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546

2. แป้งมันสำปะหลัง (Cassava Starch)

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava Starch) ผลิตขึ้นจากส่วนหัวของมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ (Class) ใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledoneae) ตระกูล (Family) Euphobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz. (แต่เดิมใช้ชื่อว่า *Manihot utilissima* pohl.) มีการเรียกชื่อสามัญต่าง ๆ กันตามรากศัพท์ภาษาอังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน โปรตุเกส เช่น Cassava Mandioca Tapioca และ Manioc มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ แถบบราซิล/เม็กซิโก สำหรับประเทศไทยมีพันธุ์ที่ควรกล่าวถึง 9 พันธุ์ด้วยกัน ได้แก่ ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 60 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 ศรีราชา 1 และพันธุ์ห้านาที (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546) มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากปลูกง่าย ไม่ต้องการการดูแลรักษามาก ให้ผลผลิตเร็ว มีความทนทานต่อโรคและความแห้งแล้งสูง เพาะปลูกได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถปลูกได้ในพื้นที่ที่ปลูกพืชชนิดอื่นไม่ได้ผลดี (กรมบัญชีกลาง, 2549)

แป้งมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว มีลักษณะเด่นคือ มีความบริสุทธิ์สูง สิ่งปนเปื้อนต่ำ โดยมีสตาร์ชอยู่มากกว่าร้อยละ 95 มีปริมาณโปรตีนและไขมันค่อนข้างต่ำ

(ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์) มีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 0.04 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างเป็นเม็ดกลมหรือรูปไข่และอาจมีรอยปุ่มที่ปลายด้านหนึ่งของเม็ด เม็ดแป้งมันสำปะหลังส่วนใหญ่จะมีขนาดปานกลางคือ 3-40 ไมครอน และมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 12-15 ไมครอน เล็กกว่าเม็ดแป้งมันฝรั่งที่มีขนาด 5-100 ไมครอน แต่ใหญ่กว่าเม็ดแป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณอะไมโลสค่อนข้างต่ำ คือ 18-23 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดต่าง ๆ กัน โดยมีค่า Degree of polymerization (DP) ตั้งแต่ 1,100-3,200 ขึ้นกับวิธีการที่ใช้ในการวัดขนาด (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) ลักษณะของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง แสดงดังภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-7 เม็ดแป้งมันสำปะหลังภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546

คุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยากับน้ำเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการนำแป้งไปใช้ประโยชน์ เมื่อเม็ดแป้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำได้รับความร้อนแล้ว พลังงานความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างของเม็ดแป้ง ทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถเข้าไปจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระของเม็ดแป้งได้ จากนั้นเม็ดแป้งจะเริ่มพองขึ้น โดยกำลังการพองตัวของเม็ดแป้งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของแป้ง ปริมาณและโครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน สารอื่นๆ ที่มีอยู่ในแป้ง เช่น ไขมัน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น แป้งที่มีปริมาณอะไมโลสสูงจะมีการพองตัวต่ำกว่าแป้งที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลอะไมโลสที่เป็นเส้นตรงจะทำให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลได้ดี นอกจากนี้ อะไมโลสอาจจับตัวกับไขมันขัดขวางการพองตัวของเม็ดแป้งได้ การที่แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณอะไมโลสต่ำทำให้มีกำลังการพองตัวที่ดีและมีค่าความสามารถในการละลายซึ่งสัมพันธ์กับกำลังการพองตัวสูง ค่ากำลังการพองตัววัดได้จากน้ำหนักของเม็ดแป้งที่พองตัวอย่างอิสระในน้ำต่อน้ำหนักแห้งของแป้ง

สำหรับแป้งมันสำปะหลังมีค่าการพองตัวประมาณ 50 และมีความสามารถในการละลายประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าแป้งข้าวโพดแต่ต่ำกว่าแป้งมันฝรั่ง เนื่องจากแป้งมันฝรั่งมีหมู่ฟอสเฟตที่สามารถแตกตัวและจับกับน้ำได้ดี ช่วยให้แป้งมันฝรั่งมีค่ากำลังการพองตัวสูงมาก (มากกว่า 1,000) แป้งมันสำปะหลังมีอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชันอยู่ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส และพลังงานที่ใช้ในกระบวนการเจลาติไนเซชันจะมีค่าประมาณ 14-17 จูลต่อกรัม (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

3. กระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาล

แป้งสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น การผลิตไซรัป การหมักเอทานอล การผลิตผงชูรสและเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งต้องมีการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลเสียก่อน รายละเอียดของกระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาลเป็นดังนี้

3.1 วิวัฒนาการของกระบวนการแปรรูปแป้งเป็นน้ำตาล

ในระยะแรก การผลิตน้ำหวานจากแป้งทำโดยการย่อยแป้งด้วยกรดไฮโดรคลอริก ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า น้ำตาลหรือน้ำเชื่อมจากแป้ง (Starch sugar หรือ Starch syrup) สามารถควบคุมการย่อยสลายได้ดีพอควร ต่อมาสามารถตกผลึกน้ำตาลกลูโคสได้ เรียกว่า Solid starch sugar น้ำที่สลัดออกเรียกว่า ไฮโดรล (Hydrol) ในช่วง ค.ศ. 1940 ความต้องการน้ำเชื่อมหรือน้ำตาลจากแป้งหรือ Chip sugar ซึ่งต่อมาเรียกว่า เดกซ์โทรสโมโนไฮเดรต เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าความสามารถในการผลิตถึง 10 เท่าตัว (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546) แต่การพัฒนาวิธีการผลิตทำได้ลำบาก เพราะการย่อยด้วยกรดใช้สภาวะรุนแรง (Sodhi et al., 2005) และมักมีปัญหาเกี่ยวกับปฏิกิริยาต่อเนื่องและการเกิดปรากฏการณ์ข้างเคียง เช่น การรวมตัวกันใหม่ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเกิดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ (Condensation หรือ Polymerization) และการเกิดสารสีพวก 5-hydroxymethylfurfural (HMF) ส่งผลให้การผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งที่มีค่าความหวานสูงสุดทำได้ยาก (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) ทำให้การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากการย่อยด้วยเอนไซม์มีข้อดีหลายประการ เช่น มีความจำเพาะสูงกว่า ปฏิกิริยาไม่รุนแรง และใช้สารเคมีที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าทำให้เหมาะสมต่อการบริโภคมากกว่า (Sodhi et al., 2005)

การใช้เอนไซม์ย่อยแป้งเป็นที่รู้จักกันดีในแถบเอเชีย เช่น ข้าวหมาก สาเก ซึ่งถูกหมักในกระบวนการผลิตแบบพื้นบ้าน มีการย่อยสลายแป้งเป็นกลูโคสโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อราซึ่งมีการศึกษากันมากในช่วงปี 1950 จนในปี 1957 มีการสร้างโรงงานผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสเป็น

แห่งแรกโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ในปีนี้ยังมีการค้นพบเอนไซม์ไอโซเมอเรสที่สามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุกโทส จาก *Pseudomonas hydrophila* โดย R.O. Marshall และ E.R. Kooi และจดลิขสิทธิ์ครั้งแรกในปี 1960 มีความพยายามที่จะผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสที่มีฟรุกโทสผสมอยู่ ในปี 1965 บริษัท Clinton Corn Processing ร่วมมือกับหน่วยงานทางวิทยาศาสตร์ของประเทศญี่ปุ่นผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสที่มีฟรุกโทสผสมอยู่ด้วย ในปี 1967 น้ำเชื่อมกลูโคสที่มีฟรุกโทสผสมอยู่ (มีฟรุกโทสประมาณ 14-16 เปอร์เซ็นต์) ถูกส่งออกจากญี่ปุ่นไปจำหน่ายยังสหรัฐอเมริกา ในช่วงแรกเรียกน้ำเชื่อมนี้ว่า ไอโซกลูโคสไซรัป หรือไอโซไซรัป หมายถึงน้ำเชื่อมที่มีไอโซเมอร์ของกลูโคสผสมอยู่ โดยในการผลิตใช้ทั้งเอนไซม์อะไมเลสและไอโซเมอเรสร่วมกัน จนกระทั่งปี 1968 สามารถผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสที่มีฟรุกโทสผสมอยู่สูงสุดในเชิงการค้า กล่าวคือที่สภาวะสมดุลมีฟรุกโทสอยู่ถึง 42 เปอร์เซ็นต์ ของของแข็งทั้งหมด ในขณะที่มีกลูโคส 51 เปอร์เซ็นต์ และเป็นที่มาของการเรียกน้ำเชื่อมชนิดนี้ว่า High fructose syrup ต่อมา มีการค้นพบเอนไซม์จากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis* ทำให้ช่วงปี 1970 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสถือได้ว่าเป็นการผลิตโดยใช้เอนไซม์ทั้งหมด และถือว่าช่วงนี้เป็นช่วงปีของการเจริญเติบโตของเทคโนโลยีการย่อยแป้งอย่างแท้จริง การใช้เอนไซม์ในการผลิตทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น การผลิตกลูโคสผง (Dextrose monohydrate หรือ Dextrose anhydrous) ทำได้ง่ายขึ้น เพราะน้ำเชื่อมกลูโคสมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นกว่าการผลิตระบบเดิม ในช่วงปลายปี 1978 เริ่มมีการใช้เทคโนโลยีการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟี ทำให้สามารถแยกน้ำตาลฟรุกโทสส่วนใหญ่ออกจากน้ำเชื่อมได้และผลิตน้ำเชื่อม High fructose corn syrup (HFCS) ที่มีน้ำตาลฟรุกโทสอยู่ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ ได้สำเร็จ เรียกว่า Enriched fructose syrup ซึ่งมีความหวานสูงกว่าน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 10 เปอร์เซ็นต์ ในปี 1980 บริษัทโคคาโคลา ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้ HFCS ชนิด 55 เปอร์เซ็นต์ฟรุกโทส แทนการใช้น้ำตาลทรายถึงครึ่งหนึ่ง ในปี 1983 บริษัทเปปซี่หันมาทำตามบริษัทโคคาโคลา และต่อมาทั้งสองบริษัทได้ใช้ HFCS ชนิด 55 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโทส แทนการใช้น้ำตาลทรายทั้งหมดในปี 1984 การพัฒนาเทคโนโลยีการแยกสารด้วยโครมาโท กราฟีทำให้การผลิตน้ำตาลฟรุกโทสบริสุทธิ์หรือในรูปผงทำได้ง่ายขึ้น ดังนั้น การพัฒนาน้ำเชื่อมจากแป้งถือได้ว่ามาถึงจุดสูงสุดของวิวัฒนาการ (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

สำหรับในประเทศไทยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมีมานานแล้ว เช่น ข้าวหมาก หรือเหล้าโรง ซึ่งใช้เอนไซม์จากเชื้อราในลูกแป้งย่อยแป้งในข้าวเหนียว ในระดับพื้นบ้านมีการผลิตแบะแซโดยใช้เอนไซม์จากต้นกล้าข้าวสาลี ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยปลายข้าวเหนียว ในระดับอุตสาหกรรม น้ำเชื่อมกลูโคสถือว่ากำเนิดขึ้นในปี 2492 โดยบริษัท

ประเสริฐชัย จำกัด การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสที่ใช้แป้งมากที่สุดในประเทศไทยใช้สำหรับการหมักต่อเนื่อง เช่น การผลิตผงชูรสและ แอล-ไลซีน ของบริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

3.2 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นของผลิตภัณฑ์หลายชนิดจากแป้ง มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การเตรียมน้ำแป้ง (Gelatinization)

การเตรียมน้ำแป้งเป็นตัวกำหนดผลิตภัณฑ์ที่ได้และกำลังการผลิต ถ้าสามารถเตรียมน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นของแป้งสูงจะทำให้ได้ผลผลิตสูง ใช้พลังงานในการต้มระเหยน้ำน้อย แต่การผสมแป้งกับน้ำมีข้อจำกัดเนื่องจากความหนืดของแป้งเมื่อถูกความร้อนจนถึงอุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนเซชัน ดังนั้น ถ้าต้องการน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นสูงจะต้องทำการย่อยแป้งในระหว่างกระบวนการเจลาติไนเซชันเพื่อให้ได้น้ำแป้งที่มีความหนืดต่ำ โดยทั่วไปจะเตรียมน้ำแป้งให้มีความเข้มข้นประมาณ 35-40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เทียบเท่ากับประมาณ 17-19 องศาโบม (Degree Buame, Be') (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

การปรับพีเอชของน้ำแป้งให้ได้ช่วงที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ควรใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในกรณีที่ต้องใช้เอนไซม์ ต้องให้น้ำแป้งมีแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เพื่อทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในน้ำแป้งจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้นประมาณ 100-300 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งในบางครั้งพบว่าน้ำที่ใช้ในโรงงานมีปริมาณแคลเซียมไอออนเพียงพออยู่แล้ว (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

3.2.2 การย่อยแป้งครั้งแรก (Liquefaction)

การย่อยแป้งครั้งแรกทำเพื่อลดความหนืดของน้ำแป้งเริ่มต้น ทำให้น้ำแป้งที่สุกแล้วมีความหนืดลดลง และแป้งบางส่วนถูกย่อยทำให้มีโมเลกุลเล็กลง ในกรณีที่ใช้เอนไซม์ในการย่อย เอนไซม์ที่ใช้ต้องเป็นพวกเอนโดอะไมเลส เพื่อตัดพันธะระหว่างน้ำตาลกลูโคสภายในสายพอลิเมอร์ของกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่า DE (Dextrose equivalent) ประมาณ 5-20 แต่ในทางปฏิบัติควรรักษาไว้ที่ 10-15 เพื่อป้องกันการเกิดการรวมตัวกันหรือการจับตัวกันใหม่ของผลิตภัณฑ์เกิดเป็นตะกอนแขวนลอยที่กรองยาก การเกิดตะกอนลักษณะนี้เรียกว่า รีโทรเกรเดชัน

(Retrogradation) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) การย่อยแป้งครั้งแรกทำได้ 2 วิธี คือ

3.2.2.1 การย่อยแป้งครั้งแรกด้วยกรด

ปัจจุบันหลังจากวิวัฒนาการของเอนไซม์เข้าสู่กระบวนการผลิตมากขึ้น การใช้กรดก็ลดลงไป เนื่องจากการทำงานกับกรดต้องใช้ความระมัดระวังและใช้วัสดุอุปกรณ์เป็นพิเศษ อย่างไรก็ตาม ยังมีบางโรงงานที่ผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสโดยใช้กรดเป็นตัวย่อยล้วน ๆ (Acid process) หรือใช้กรดย่อยครั้งแรกแล้วจึงใช้เอนไซม์ย่อยครั้งสุดท้าย (Acid-enzyme process) กรดที่ใช้ย่อยนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกมากกว่ากรดซัลฟูริก ทั้งนี้เนื่องจากในกรณีที่น้ำมีแคลเซียมไอออนอยู่ กรดซัลฟูริกจะทำให้เกิดเกลือยิปซัม ($CaSO_4$) จะตกตะกอนปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ค่าพีเอชที่ใช้ประมาณ 1.8 จากนั้นให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 130-140 องศาเซลเซียส จากการให้ไอน้ำโดยตรงหรือทางอ้อม ความดันประมาณ 5 บาร์ โดยปกติจะทำปฏิกิริยาในท่อ (Pipe-injection หรือ Jet cooker) ใช้เวลาประมาณ 10 นาที ได้ค่า DE ประมาณ 15-20 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา น้ำแป้งที่ย่อยแล้วจะถูกปล่อยออกที่ถังความดันบรรยากาศ (Flash tank) แล้วจึงปรับพีเอชเป็น 4.5-5.0 ด้วยโซเดียมคาร์บอเนต เกลือโซเดียมคาร์บอเนตทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นบางส่วน และบางส่วนจะตกตะกอนลงมาพร้อมโปรตีนและไขมัน การย่อยแป้งครั้งแรกด้วยกรดควรปรับเวลาให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่า DE ไม่น้อยกว่า 18 ป้องกันการคืนตัว (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

3.2.2.2 การย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์

การย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์ มีหลักการคือ เมื่อเตรียมน้ำแป้งให้ได้ความเข้มข้นเหมาะสม คำนวณปริมาณเอนไซม์และเติมถูกต้อง เติมแคลเซียมไอออนในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และปรับพีเอชให้ถูกต้องแล้ว การให้ความร้อนส่วนใหญ่ใช้ในรูปของไอน้ำอัดเข้าไปในท่อส่งน้ำแป้งโดยตรง อุณหภูมิประมาณ 100-105 องศาเซลเซียส ช่วงนี้ถือว่าสำคัญมากเพราะเป็นการทำลายหรือลดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำแป้ง เอนไซม์ที่ใช้ในช่วงนี้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงและย่อยสลายแป้งขณะที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นได้ หลังจากลดความดันลงให้เท่ากับแรงดันบรรยากาศ (Flash) น้ำแป้งจะถูกส่งไปยังถังย่อยซึ่งอาจเป็นถังเดี่ยว (Batch) หรือต่อเนื่อง การให้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมเอนไซม์หลังการย่อยครั้งแรกขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากในบางกรณีความสามารถของเอนไซม์จะหมดลงหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เช่น เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* จึงไม่จำเป็นต้องหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนอีก

น้ำแป้งที่ย่อยแล้วควรมีค่า DE อยู่ที่ 10-15 หรือต่ำกว่า 20 เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า มอลโทเดกซ์ทริน (Maltodextrin) ซึ่งถ้าต้องการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ก็นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำ

ให้บริสุทธิ์โดยกรองด้วยผงถ่านจนใสแล้วนำไประเหยน้ำด้วยเครื่องต้มระเหยให้ได้ความเข้มข้นจากเดิม 35-40 เปอร์เซ็นต์ เป็นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้เป็นผงด้วยเครื่อง Sprey dryer ได้ผลิตภัณฑ์มอลโทเด็กซ์ทรินผง (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งครั้งแรกควรเป็นพวกเอนโดอะไมเลส คือ ตัดภายในโมเลกุลแป้ง เพื่อให้แป้งถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลขนาดย่อม ๆ หรือเล็ก ๆ เท่ากันในเวลาสั้น เพื่อให้ได้ของเหลวที่มีความหนืดต่ำ มีค่า DE ต่ำกว่า 20 โอกาสที่แป้งจะจับตัวมีต่ำ เอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ แอลฟาอะไมเลส ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

3.2.2.2.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

อีกชื่อหนึ่งคือ *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* เอนไซม์กลุ่มนี้มีความคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส ความสามารถหรือกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส ต้องการแคลเซียมไอออนเป็นตัวร่วมกิจกรรม พีเอชที่เหมาะสม คือ 6.0-6.5 โดยปกติในการผลิตจะให้ทำงานที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 1 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ ความสามารถของเอนไซม์หมดลงเมื่อการย่อยสลายสิ้นสุด ทำให้ไม่ต้องใช้ความร้อนในการหยุดปฏิกิริยา

3.2.2.2.2 *Bacillus licheniformis*

เอนไซม์กลุ่มนี้ทนความร้อนได้ดี เหมาะสมกับการทำงานที่อุณหภูมิสูงและต้องการแคลเซียมไอออนเป็นตัวร่วมกิจกรรม ในขณะทำงานที่อุณหภูมิ 107 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำแป้ง 30 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6 และความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 230 ส่วนในล้านส่วน พบว่าเอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 21 นาที จากการทำงานที่อุณหภูมิสูงอาจทำให้น้ำแป้งที่ย่อยแล้วเปลี่ยนสีไปบ้าง การหยุดปฏิกิริยาทำโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120-140 องศาเซลเซียส

3.2.2.2.3 *Bacillus stearothermophilus*

เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 107 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำแป้ง 30 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6 และความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 230 ส่วนในล้านส่วน พบว่าเอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 53 นาที น้ำแป้งที่ย่อยแล้วในอุณหภูมิสูงจะมีสีคล้ำและต้องหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนสูงก่อนเข้ากระบวนการผลิตขั้นต่อไป เอนไซม์กลุ่มนี้มีจำหน่ายโดยทั่วไป (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ใช้ในการย่อยแป้งครั้งแรกที่มีจำหน่ายในทางการค้าแสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 รายชื่อเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีการจำหน่ายในทางการค้าและบริษัทผู้ผลิต

เชื้อที่ผลิต	ชื่อการค้า	บริษัทผู้ผลิต
Bacillus amyloliquefaciens	BACTERIAL AMYLASE	Amano International enzyme
(*Bacillus subtilis* liquefying)	CANALPHA	Biocon/Quest
	HITEMPASE	Biocon/Quest
	KLEISTASE	Daiwa Kasei
	DEX-LO	IBIS (Gist-Brocades)
	SPEEDASE HS	Nagase
	BAN	Novo Nordisk
	NERVANASE	Novo Nordisk
	ROHALASE AF	Rohm
	TENASE	Solvay (Miles)
	OPTIAMYL-L	Solvay (MKC)
	ALPHAMYLASE	Ueda
Bacillus licheniformis	SPEZYME AA 20	Genencor (Finnsugar)
	MAXAMYL	IBIS (Gist-Brocades)
	TERMAMYL	Novo Nordisk
	NERVANASE T	Rhone-Poulenc (ABM)
	ROHALASE AT	Rohm
	TAKA-THERM	Solvay (Miles)
	OPTIAMYL-L	Solvay (MKC)
Bacillus stearothermophilus	G-ZYME G995	Enzyme Biosystem Ltd.
	THERMOLASE	Enzyme Development
	NERVANASE BT	Rhone-Poulenc (ABM)
Blend:*B. licheniformis*	TERMAMYL LS	Novo Nordisk
B. stearothermophilus		

ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546

3.2.3 การย่อยน้ำแป้งครั้งสุดท้าย (Saccharification)

น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยครั้งแรกแล้วจะมีลักษณะเป็นน้ำค่อนข้างใส สีคล้ำมากน้อยขึ้นอยู่กับความร้อนและเอนไซม์ที่ใช้ ไม่มีความหนืดคล้ายกับน้ำ การย่อยครั้งสุดท้ายต้องใช้

ความระมัดระวังสูงเพราะเป็นการย่อยเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและใช้เวลานานมากคือตั้งแต่ 8-72 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ กล่าวคือ

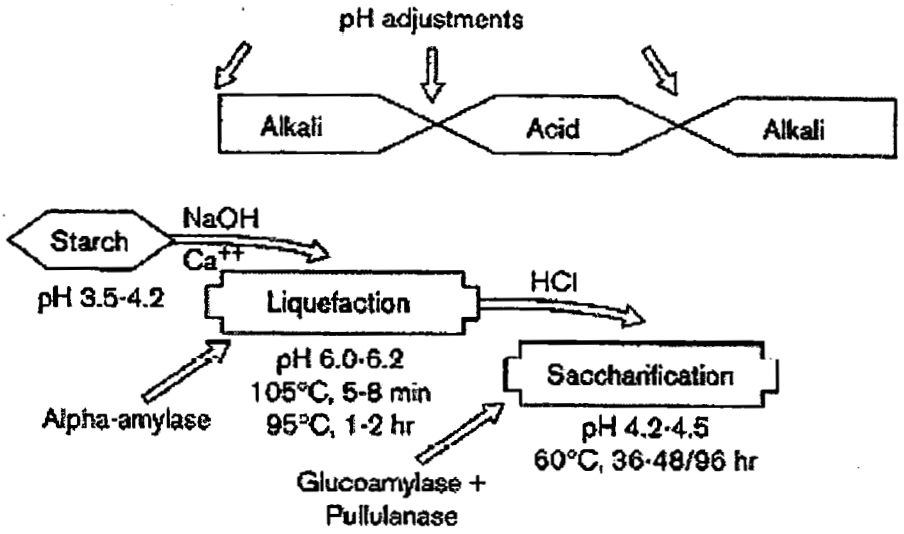
3.2.3.1 การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสชนิด 38-42 DE

น้ำเชื่อมกลูโคสชนิด 38-42 DE หรือต่ำกว่า 42 DE เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ขนมหวาน ลูกกวาด และยา ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องเหนียว ใสและมีความหวานเล็กน้อย ไม่มีการคืนตัว เอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่คือเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรามากกว่าการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถใช้ได้แต่ต้องมีการควบคุมที่ดีเพื่อป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีค่า DE สูงมาก เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรามีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 55-60 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5-5.0 บางครั้งอาจใช้เอนไซม์เบต้าอะไมเลสร่วมด้วย

3.2.3.2 การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสชนิดค่า DE สูง

การผลิตกลูโคสที่มีค่า DE สูงกว่า 95 เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลฟรุกโทส ซอร์บิทอลหรือเดกซ์โทรส ต้องใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่านั้น เอนไซม์นี้ทำงานช้าคือใช้เวลาในการย่อยอย่างสมบูรณ์ระหว่าง 60-72 ชั่วโมง ที่ 60 องศาเซลเซียส ต้องควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อระหว่างการย่อย เมื่อย่อยเสร็จแล้วบางครั้งไม่ต้องใช้ความร้อนทำลายเอนไซม์ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์หมดลงพอดี อย่างไรก็ตาม การใช้ความร้อนหยุดกิจกรรมเอนไซม์มีข้อดีคือ ทำให้แน่ใจได้ว่ากิจกรรมเอนไซม์หยุดลงแล้วและเป็นการฆ่าเชื้อครั้งที่สอง (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปียะจอมขวัญ, 2546)

ตัวอย่างของกระบวนการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากแป้งโดยใช้เอนไซม์ย่อยแป้งแสดงในภาพที่ 2-8



ภาพที่ 2-8 กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากแป้งโดยใช้เอนไซม์ย่อยแป้ง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Crabb and Shetty, 1999

4. คุณสมบัติและความสำคัญของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์

แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) มีชื่อระบบว่า 1,4- α -D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.1) (Van der Maarel et al., 2002) จัดเป็นพวกไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (Glycoside hydrolase) ในตระกูล (Family) แอลฟาอะไมเลส ในกลุ่มเอนโดอะไมเลส (Sivaramakrishnan et al., 2006) เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ α,(1-4) กลูโคซิดิกแบบสุ่มภายในสายอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโครงรูปเป็นแบบแอลฟาขนาดต่าง ๆ กัน และ α - limit dextrin ซึ่งจะช่วยลดความหนืดของสารละลายแป้งลง (Van der Maarel et al., 2002) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสส่วนใหญ่เป็นเมทัลโลเอนไซม์ (Metalloenzyme) ที่ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในการทำกิจกรรม การคงรูปของโครงสร้าง และความคงตัว (Stability) ของเอนไซม์ (Sivaramakrishnan et al., 2006)

4.1 แหล่งของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์และรา มีบทบาทสำคัญในเมทาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต เอนไซม์อะไมเลสจากพืชและจุลินทรีย์ได้ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งในอาหารมานานนับศตวรรษ เช่น อะไมเลสจากข้าวบาร์เลย์ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ อะไมเลสจากเชื้อราใช้ในการเตรียมอาหารตะวันออก

เป็นต้น (Sivaramakrishnan et al., 2006) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มักผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ โดยเฉพาะใน 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ ได้ผลผลิตปริมาณมากในต้นทุนต่ำ การควบคุมและดัดแปรจุลินทรีย์เพื่อให้ได้คุณสมบัติที่ต้องการทำได้ง่าย (Gupta, Gigras, Mohapatra, Goswami, and Chauhan, 2003) ใช้ระยะเวลาและพื้นที่น้อย ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสม่ำเสมอ และการปรับปรุงสภาวะการผลิตให้เหมาะสมทำได้ง่าย (Sivaramakrishnan et al., 2006)

แบคทีเรียที่นิยมใช้ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงที่ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ *Bacillus* spp. โดยเฉพาะ *B. subtilis* *B. stearothermophilus* *B.licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* ซึ่งนิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ส่วนเชื้อราที่เป็นเส้นสายก็นิยมนำมาใช้ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเช่นกัน โดยเฉพาะในกระบวนการหมักแบบ Solid state (SSF) ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากไม่ต้องใช้เทคโนโลยีมากนัก (Sivaramakrishnan et al., 2006)

4.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

4.2.1 ความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity)

ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะแตกต่างกันไปในแต่ละแหล่งเช่นเดียวกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ แต่โดยทั่วไปเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะมีความจำเพาะต่อแป้งมากที่สุด รองลงมาคือ อะไมโลส อะไมโลเพคติน ไซโคลเดกซ์ทริน ไกลโคเจนและมอลโทไทรโอส (Gupta et al., 2003)

4.2.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์

พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์แต่ละแหล่งจะมีค่าต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 2-12 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่และเชื้อราจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงเป็นกรดถึงเป็นกลาง ส่วนเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (Alkaline α-amylase) จะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงกว่า 8 (Gupta et al., 2003) เช่น แอลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus* sp. KSM-K38 มีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8.0-9.5 (Hagihara et al., 2001) แอลฟาอะไมเลสจาก *B. clausii* BT-21 มีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ที่ 9.5 (Duedahl-Olesen, Kargh, and Zimmermann, 2000) เป็นต้น และอาจพบค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากบางแหล่งสูงถึง 11-12 เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus* sp. GM8901 (Gupta et al., 2003)

โดยทั่วไปเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมักมีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอชกว้าง คือ ตั้งแต่ 4-11 อย่างไรก็ตาม เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอชแคบ ๆ ก็สามารถพบได้เช่นกัน (Gupta et al., 2003)

4.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนั้นเกี่ยวเนื่องกับอุณหภูมิการเจริญของจุลินทรีย์ อุณหภูมิต่ำสุดที่มีรายงานอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *Fusarium oxysporum* และสูงสุดที่ 130 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *Pyrococcus woesei* ซึ่งเป็นอาร์คีแบคทีเรีย นอกจากนี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์บางชนิดยังขึ้นอยู่กับสารเคมีบางอย่าง เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) หรือโซเดียมคลอไรด์ (Gupta et al., 2003)

สำหรับความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน สับสเตรทและ Stabilizer อื่นๆ แต่โดยทั่วไป ปัจจัยที่พบได้บ่อยว่ามีบทบาทสำคัญต่อความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้แก่ แคลเซียมไอออน (Gupta et al., 2003)

4.2.4 น้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีตั้งแต่ 10-210 กิโลดาลตัน โดยน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด 10 กิโลดาลตัน เป็นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus caldolyticus* และน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด 210 กิโลดาลตัน เป็นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Chloroflexus aurantiacus* (Gupta et al., 2003)

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-60 กิโลดาลตัน ในกรณีของยูคาริโอตมักมีส่วนของไกลโคโปรตีนเพิ่มขึ้นมาในโมเลกุลของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม สามารถพบไกลโคโปรตีนในเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากแบคทีเรีย *Bacillus* บางสายพันธุ์ ได้เช่นกัน (Gupta et al., 2003)

4.2.5 ตัวยับยั้งเอนไซม์

แคทไอออนของโลหะหลายชนิด โดยเฉพาะโลหะหนัก สารเคมีที่มีหมู่ซัลไฟดริล N-bromosuccinimide Iodoacetate p-hydroxyl mercuribenzoic acid BSA EDTA และ EGTA เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Gupta et al., 2003)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

4.2.6 บทบาทของแคลเซียมไอออนต่อความคงตัวของเอนไซม์

แอลฟาอะไมเลสเป็นเมทัลโลเอนไซม์ที่ประกอบด้วยแคลเซียมไอออนอย่างน้อย 1 โมเลกุล โดยสัมพรรคภาพของแคลเซียมไอออนต่อเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนั้นสูงกว่าไอออนชนิดอื่นๆ มาก จำนวนของแคลเซียมไอออนที่เกาะอยู่กับเอนไซม์มีได้ตั้งแต่ 1-10 โมเลกุล เช่น ใน Crystalline Taka amylase A (TAA) มีแคลเซียมไอออน 10 โมเลกุล แต่มีเพียง 1 โมเลกุลที่เกาะกับเอนไซม์อย่างแน่นหนา สำหรับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทั่วไปพบว่าแคลเซียมไอออนเพียง 1 โมเลกุล ก็เพียงพอที่จะทำให้เอนไซม์มีความคงตัว การกำจัดแคลเซียมไอออนออกจากโมเลกุลเอนไซม์ทำได้โดยการไดอะไลซิสร่วมกับ EDTA หรือโดยอิเล็กโทรไดอะไลซิส เอนไซม์ที่ถูกดึงแคลเซียมไอออนออกไปแล้วสามารถจับกับแคลเซียมไอออนได้อีก เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์บางชนิด (Gupta et al., 2003)

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

4.3.1 แหล่งคาร์บอนและการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์

แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ (Inducible enzyme) และมักถูกเหนี่ยวนำให้สร้างในสภาวะที่มีแป้งหรือผลิตภัณฑ์จากการย่อย เช่น มอลโทส นอกจากนี้ แหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เช่น แลกโทส ทรีฮาโลส และ α-methyl-D-glycoside ก็พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้เช่นกัน การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถเกิด Catabolite repression โดยกลูโคสและน้ำตาลอื่น เช่นเดียวกับ Inducible enzyme ทั่วไป อย่างไรก็ตาม บทบาทของกลูโคสในการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสยังคงเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ เนื่องจากมีผู้พบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์บางชนิดไม่ถูกยับยั้งโดยกลูโคส เช่น *A. oryzae* DSM63303 ส่วนไซโลสและฟรุกโทสถือเป็น Repressor ที่แรงสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Gupta et al., 2003)

แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้แก่ แป้ง กลูโคส และมอลโทส นอกจากนี้ยังอาจใช้สับสเตรทอื่น ๆ เช่น แลกโทส คาซิโทน ฟรุกโทส กากเมล็ดพืชน้ำมัน และน้ำเสียจากการแปรรูปแป้ง เป็นต้น (Gupta et al., 2003)

ว.ย.ย.
ส.863 ก
ค.3
249112

4.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนิยมใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น ยีสต์สกัด ซึ่งนอกจากจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเดี่ยว ๆ แล้ว ยังนิยมนำมาใช้ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ เช่น แบคโทเปปโทน แอมโมเนียมซัลเฟต เคซีน แป้งถั่วเหลือง มอลท์สกัด เนื้อสกัด เปปโทน Corn steep liquor แอมโมเนียมไนเตรท และ Vogel salt นอกจากนี้ ยังมีการใช้กรดอะมิโนเติมลงในอาหารร่วมกับวิตามิน เช่น Glycine β-alanine DL-nor valine D-methionine Asparagine และ Argenine เป็นต้น โดยคาดว่ากรดอะมิโนไม่ได้เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแต่จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์และการหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Gupta et al., 2003)

4.3.3 พีเอช

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีบทบาทสำคัญคือ เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของจุลินทรีย์และมีผลต่อการหลั่งเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์อาจส่งผลต่อความคงตัวของสารผลิตภัณฑ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ส่วนใหญ่ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับอุตสาหกรรมโดยกระบวนการหมักแบบ Submerge มักมีค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.0-7.0 นอกจากนี้ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อยังเป็นตัวบ่งชี้การเริ่มต้นและสิ้นสุดของกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ (Gupta et al., 2003) จากรายงานของ Yabuki, Ono, Hoshino และ Fukui (1977) พบว่าสามารถใช้การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในการควบคุมการปลดปล่อยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* 557 โดยเมื่อเจริญในอาหารที่ขาดฟอสเฟตหรือซัลเฟต *A. oryzae* 557 จะสะสมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสไว้ภายในเส้นใยและจะหลั่งเอนไซม์ออกมาเมื่อถ่ายเส้นใยออกสู่อาหารที่มีพีเอชสูงกว่า 7.2 (Yabuki et al., 1977)

4.3.4 อุณหภูมิ

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ ในเชื้อรามักต้องการอุณหภูมิในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส แต่ในเชื้อราบางชนิด เช่น *Thermomonospora fusca* และ *T. Lanuginosus* ต้องการอุณหภูมิค่อนข้างสูง คือ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนในกรณีของแบคทีเรียจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสค่อนข้างกว้างขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของแบคทีเรีย (Gupta et al., 2003) เช่น *Bacillus thermooleoverans* ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศนิวซีแลนด์ มีอุณหภูมิที่

เหมาะสมอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส (Narang, and Satyanarayana, 2001) *B. subtilis* ที่แยกได้จากน้ำนมแกะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส (Konsula, and Liakopoulou-Kyriakides, 2004) เป็นต้น

5. กระบวนการหมัก (Fermentation)

การหมัก (Fermentation) มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินว่า Fervere แปลว่า เดือด ซึ่งในครั้งแรกใช้เพื่ออธิบายลักษณะการเกิดฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผุดขึ้นมาเหมือนน้ำเดือดที่เกิดจากการกิจกรรมของยีสต์ในน้ำสกัดจากผลไม้หรือเมล็ดข้าวมอลท์เนื่องจากการย่อยสลายน้ำตาลในสภาวะแอนแอโรบิกของยีสต์ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันนักชีวเคมีและนักจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมได้นำคำว่าการหมักมาใช้ในความหมายที่แตกต่างกันไปบ้าง ในทางชีวเคมี การหมักหมายถึง การสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์เนื่องจากเอนไซม์ โดยมีสารเคมีเป็นตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ส่วนการหมักในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม หมายถึงกระบวนการผลิตผลผลิตใดๆ ก็ตามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (Mass culture) ซึ่งจะครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน ในขณะที่การหมักทางชีวเคมีจะหมายถึงเฉพาะกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น (สมใจ ศิริโภค, 2544)

สามารถแบ่งการหมักตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่

5.1 กระบวนการหมักแบบ Batch

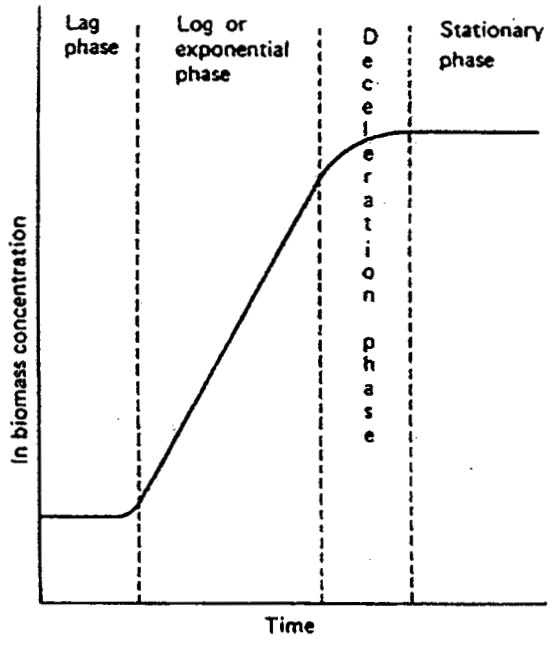
5.2 กระบวนการหมักแบบ Fed-batch

5.3 กระบวนการหมักแบบ Continuous

กระบวนการหมักแต่ละชนิดจะมีรายละเอียดต่าง ๆ กันไป ดังนี้

5.1 กระบวนการหมักแบบ Batch (Batch fermentation)

กระบวนการหมักแบบ Batch เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่องซึ่งทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นในปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในระบบแล้ว จะไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เพิ่มลงไปอีก (สมใจ ศิริโภค, 2544) รูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบ Batch แสดงดังภาพที่ 2-9



ภาพที่ 2-9 กราฟแสดงการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในระบบ Batch

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1995

เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหาร ระยะแรกเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า Lag phase ระยะเวลาในช่วง Lag phase นี้ ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น (Inoculum หรือ Starter) ที่เหมาะสม หลังจากนั้น จุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนเข้าสู่ Exponential หรือ Log phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ Log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$dx/dt = \mu x \qquad (1)$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (Biomass)

t = เวลา มีหน่วยเป็น ชั่วโมง

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) มีหน่วยเป็น ชั่วโมง$^{-1}$

อินทิเกรทสมการ (1) จะได้

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \qquad (2)$$

เมื่อ x_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

x_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ Natural logarithm

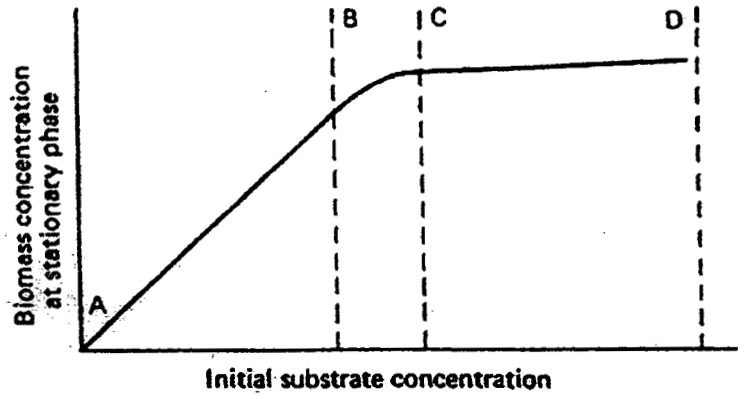
ใส่ Natural logarithm กับสมการ (2) จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \qquad (3)$$

ดังนั้น เมื่อเขียนกราฟระหว่าง Natural logarithm ของความเข้มข้นมวลเซลล์ ($\ln x$) กับเวลา (t) จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความลาดเอียง (Slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากสมการ (2) แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด แต่ในความเป็นจริง การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดด้วยสารอาหารและสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ดังนั้น หลังจากที่จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็วไปได้ระยะหนึ่งแล้ว อัตราการเจริญจะค่อย ๆ ลดลง จนกระทั่งหยุดการเจริญเพิ่มจำนวน

การศึกษาการเจริญที่มีขอบเขตจำกัดของจุลินทรีย์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ Batch ในอาหารที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรทต่างกัน พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์สูงสุดที่ระยะ Stationary phase กับความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรท แบ่งได้เป็น 3 บริเวณ คือ A-B B-C และ C-D ดังภาพที่ 2-10



ภาพที่ 2-10 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรทต่อปริมาณเซลล์สูงสุด

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1995

ในบริเวณ A-B ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ Stationary phase จะเพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสับสเตรทที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$x = Y(S_R - s) \qquad (4)$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่ผลิตได้

Y = Yield cofactor (ไม่มีหน่วย)

S_R = ความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรท

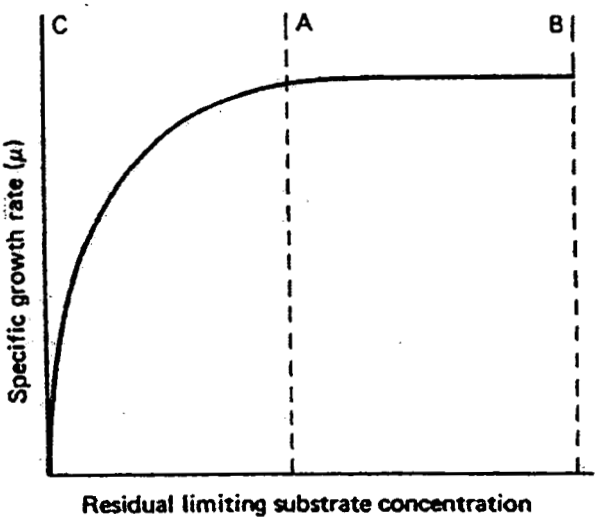
s = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ

ในบริเวณ A-B การเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์จะหยุดลงเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ (s) มีค่าเท่ากับศูนย์ ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการ (4) ในการประเมินค่าปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นจากสารอาหารที่ใช้เป็นสับสเตรทได้

ในบริเวณ C-D แม้ว่าความเข้มข้นของสับสเตรทจะเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณเซลล์ที่ Stationary phase จะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงตามลำดับ เนื่องจากการสะสมสารพิษที่เกิดจากการเจริญของเซลล์เอง การสะสมสารพิษนี้เมื่อเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งแล้ว จะทำให้เซลล์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอีกก็ตาม นอกจากนี้ การที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดการเจริญเนื่องจากอาหารหมดยังสามารถอธิบายได้ในรูปของความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือโดยใช้สมการของ Monod และภาพที่ 2-11 ดังนี้

$$\mu = \mu_{max} s / (K_s + s) \qquad (5)$$

เมื่อ K_s = ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท (Substrate utilization constant) ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อ μ เท่ากับ ½ μ_{max} และเป็นค่าที่แสดงสัมพรรคภาพ (Affinity) ของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรทด้วย



ภาพที่ 2-11 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือต่ออัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของแบคทีเรีย

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1995

จากภาพที่ 2-11 บริเวณ A-B จะอยู่ในช่วง Log phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินพอและจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุด ส่วนบริเวณ C-A อยู่ในช่วง Deceleration phase ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลงเนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรทลดลง จึงมีอาหารเหลือไม่เพียงพอที่จะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ในอัตราสูงสุด ในกรณีที่จุลินทรีย์มีสัมพรรคภาพต่อสับสเตรทสูง (มีค่า K_s ต่ำ) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงก็ต่อเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทลดลงถึงระดับที่ต่ำมาก ทำให้มี Deceleration phase สั้น แต่ในกรณีที่จุลินทรีย์มีสัมพรรคภาพต่อสับสเตรทต่ำ (มีค่า K_s สูง) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทค่อนข้างสูง ทำให้มี Deceleration phase ยาว อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปค่า K_s ของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรทมักมีค่าน้อยมาก

สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ Stationary phase นั้น เป็นระยะที่อัตราการเจริญของจุลินทรีย์เป็นศูนย์ ในระยะนี้จุลินทรีย์ยังคงมีเมทาบอลิสมและจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิซึ่งไม่มีการผลิตในระยะ Log phase ได้

การหมักแบบ Batch นี้ สามารถใช้ได้ทั้งการผลิตชีวมวล สารเมทาบอไลท์ปฐมภูมิ และสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ โดยในการผลิตชีวมวลควรใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด การผลิตสารเมทาบอไลท์ปฐมภูมิควรทำให้การเจริญในระยะ Log phase ยาวที่สุด และการผลิตสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิควรใช้สภาวะที่ทำให้มีระยะ Log phase สั้น แต่ให้มี Stationary phase ยาว ๆ หรือใช้สภาวะที่ทำให้อัตราการเจริญในช่วง Log phase ลดลง ทำให้มีการสร้างสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิได้เร็วขึ้น (สมใจ ศิริโภค, 2544)

5.2 กระบวนการหมักแบบ Fed-batch (Fed-batch fermentation)

กระบวนการหมักแบบ Fed-batch เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้เต็มที่โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก ดังนั้น ปริมาตรของอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งอาจส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือทำให้จุลินทรีย์ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอเมื่อใช้ความเข้มข้นสูง (สมใจ ศิริโภค, 2544)

ถ้าพิจารณาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ Batch การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของสับสเตรท ดังนั้น ความเข้มข้นของมวลเซลล์ใด ๆ จะหาได้จากสมการ

$$x_t = x_0 + Y(S_R - s) \qquad (6)$$

เมื่อ x_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

x_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ (s) มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ ความเข้มข้นของมวลเซลล์จะมีค่ามากที่สุด (x_{max}) และทำให้ x_0 มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับ x_{max} ดังนั้น จากสมการ (6) จะได้

$$x_{max} \approx YS_R \qquad (7)$$

ถ้าเริ่มเติมอาหารเพิ่มในเวลาที่ x มีค่าเท่ากับ x_{max} โดยให้อัตราการเจือจาง (D) มีค่าต่ำกว่า μ_{max} จะทำให้สับสเตรทที่เข้าสู่ภาชนะเพาะเลี้ยงถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น

$$FS_R \approx \mu (X/Y) \qquad (8)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของอาหาร

X = ปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมดในระบบ

= xV เมื่อ V คือปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในระบบที่เวลา t

จากสมการ (7) อาจสรุปได้ว่า สับสเตรทที่เติมเข้าไปจะมีค่าเท่ากับสับสเตรทที่จุลินทรีย์ใช้ไป ดังนั้น $ds/dt \approx 0$ และแม้ว่าปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมดในระบบจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา แต่ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (x) จะมีค่าคงที่ นั่นคือ $dx/dt \approx 0$ และ $\mu \approx D$ สภาวะเช่นนี้เรียกว่า Quasi steady state อย่างไรก็ตาม อัตราการเจือจางจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะเพิ่มขึ้น การหาค่า D สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$D = F/(V_0 + Ft) \qquad (8)$$

เมื่อ V_0 = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาเริ่มต้น

ระบบ Fed-batch ได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักหลายชนิด เช่น การผลิตเซลล์ยีสต์ เพนนิซิลลินและเอนไซม์ เป็นต้น ระบบนี้มีข้อดี คือ สามารถควบคุมปริมาณสับสเตรทที่เหลือให้มีความเข้มข้นต่ำมากได้ ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญและใช้ออกซิเจนปริมาณไม่มากเกินความสามารถในการให้อากาศของถังหมัก ช่วยลด Repressive effect ของแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ได้อย่างรวดเร็ว และลดความเป็นพิษของส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตเอนไซม์ การสังเคราะห์เอนไซม์หลายชนิดจะถูกยับยั้งเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว การแก้ปัญหานี้อาจทำได้โดยใช้ระบบ Fed-batch ค่อย ๆ เติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารให้มีปริมาณน้อยกว่าที่จะทำให้เกิด Catabolite repression ตัวอย่างเช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวควบคุมอัตราการเติมสับสเตรทในระบบ Fed-batch เป็นต้น (สมใจ ศิริโภค, 2544)

5.3 กระบวนการหมักแบบ Continuous (Continuous fermentation)

กระบวนการหมักแบบ Continuous เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง โดยมีการเติมอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้เรื่อย ๆ โดยไม่มีข้อจำกัดเรื่องอาหาร (สมใจ ศิริโภค, 2544)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ Batch ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบบางอย่างที่จำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ แต่การเจริญไม่ถูกจำกัดด้วยสารพิษแล้ว จะสามารถยืดระยะเวลาของการเจริญในระยะ Log phase ให้นานขึ้นได้โดยเติมอาหารใหม่ลงไปจนกว่าจะเต็มภาชนะ แต่ถ้ามีการถ่ายอาหารเก่าออกจากภาชนะจำนวนหนึ่งและเติมอาหารใหม่เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่าเดิม จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง และถ้ามีการถ่ายอาหารเก่าออกและเติมอาหารใหม่เข้าสู่ภาชนะอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสมจะทำให้เกิดสภาวะคงที่ (Steady state) กล่าวคือ ปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะเท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ปล่อยออกจากภาชนะ ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ภาชนะกับปริมาตรของภาชนะ เรียกว่า อัตราการเจือจาง (Dilution rate, D) สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$D = F/V \qquad (9)$$

เมื่อ F = อัตราการไหล (Flow rate)

V = ปริมาตร

D = อัตราการเจือจาง มีหน่วยเป็น ชั่วโมง$^{-1}$

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ในระยะเวลาหนึ่ง อาจเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$dx/dt = \text{Growth} - \text{Output}$$

หรือ $$dx/dt = \mu x - Dx \qquad (10)$$

แต่ที่สภาวะคงที่ความเข้มข้นของเซลล์จะคงที่ ดังนั้น dx/dt มีค่าเท่ากับศูนย์ และ

$$\mu x = Dx$$

จะได้ $$\mu = D \qquad (11)$$

ดังนั้น ที่สภาวะคงที่ อัตราการเจริญจำเพาะจะมีค่าเท่ากับอัตราการเจือจาง

เมื่อแทนค่า $\mu = \mu_{max} s/(K_s + s)$ ลงในสมการ (10) จะได้

$$dx/dt = x[\mu_{max} s/(K_s + s) - D] \qquad (12)$$

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสับสเตรทที่เป็นตัวจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ อาจเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$ds/dt = \text{Input of substrate} - \text{Output of substrate} - \text{Consumption by cells}$$

หรือ $$ds/dt = DS_R - D_S - \mu_{max}\{x/Y[s/(K_s + s)]\} \qquad (13)$$

ที่สภาวะคงที่ ds/dt และ dx/dt จะมีค่าเท่ากับศูนย์ ดังนั้น เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการ (12) และ (13) จึงสามารถเขียนใหม่ได้ดังนี้

$$\bar{x} = Y(S_R - \bar{s}) \quad (14)$$

$$\bar{s} = K_s D/(\mu_{max} - D) \quad (15)$$

เมื่อ $\bar{x}$ = ความเข้มข้นของเซลล์ที่สภาวะคงที่

$\bar{s}$ = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่

สมการ (15) อธิบายกลไกของอัตราการการเจือจาง (D) ในการควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญจะทำให้ปริมาณสารอาหารลดลง จนกระทั่งความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ได้ในอัตราที่เท่ากับ D ซึ่งจะทำให้เกิดสภาวะคงที่ แต่ถ้าความเข้มข้นของสับสเตรทลดลงมากเกินไปจะทำให้เซลล์ถูกชะล้าง (Wash out) ออกมาในอัตราที่สูงกว่าการเจริญ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงและความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย และในที่สุดระบบจะเข้าสู่สมดุลอีกครั้ง จะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องนี้เป็นระบบที่สามารถปรับตัวให้อยู่ในสมดุลได้เอง (Self-balancing system)

ระบบการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องซึ่งได้อธิบายไปแล้วนี้เป็นแบบ Chemostat เนื่องจากอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ถูกควบคุมด้วยสภาพแวดล้อมทางเคมี ซึ่งในที่นี้ได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ ยังมีระบบควบคุมการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องอีกแบบหนึ่ง คือ Turbidostat ซึ่งใช้วิธีควบคุมอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นคงที่ สำหรับวิธีการที่ใช้ในการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงให้คงที่นั้น อาจทำได้โดยการวัดความขุ่นของเซลล์โดยใช้ Photoelectric cell ต่อเข้ากับเครื่องส่งสัญญาณไปยังเครื่องสูบอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะส่งเข้าสู่ระบบ หรืออาจใช้วิธีวัดความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์แทนก็ได้ ในกรณีหลังนี้ การเรียกชื่อระบบควรใช้คำว่า Biostat จะถูกต้องกว่า

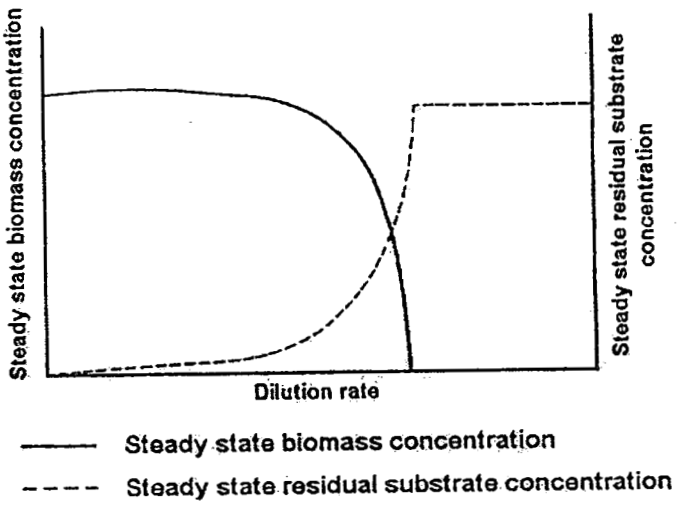
โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องนิยมใช้ระบบ Chemostat มากกว่าระบบ Turbidostat เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ระบบควบคุมที่ซับซ้อนในการรักษาสภาวะคงที่ อย่างไรก็ตาม ระบบ Turbidostat ก็มีข้อดีคือ ไม่มีปัญหาการชะล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมดซึ่งพบบ่อยในระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะทางจลนศาสตร์ของจุลินทรีย์ในระบบ Chemostat สามารถอธิบายได้โดยดูจากค่าคงที่ Y μ_{max} และ K_s ค่า Y จะมีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์ที่สภาวะคงที่ ค่า μ_{max} จะมีผลต่ออัตราการเจือจางสูงสุดที่จะใช้ได้ และค่า K_s จะมีผลต่อความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ

ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้ และมีผลต่ออัตราการเจือจางสูงสุดที่จะใช้ได้ด้วย ในทางทฤษฎี จุลินทรีย์ที่มีค่า K_s ต่ำ เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจางต่างกัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ s และ x ดังแสดงในภาพที่ 2-12 เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น s จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และ x จะลดลงเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งอัตราการเจือจางมีค่าเข้าใกล้ μ_{max} จึงจะทำให้ s เพิ่มขึ้น และ x ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับอัตราการเจือจางที่ทำให้ x มีค่าเท่ากับศูนย์ (เซลล์ถูกชะล้างออกจากระบบจนหมด) เรียกว่า Critical dilution rate (D_{crit}) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$D_{crit} = \mu_{max} . S_R / (K_s + S_R) \qquad (16)$$

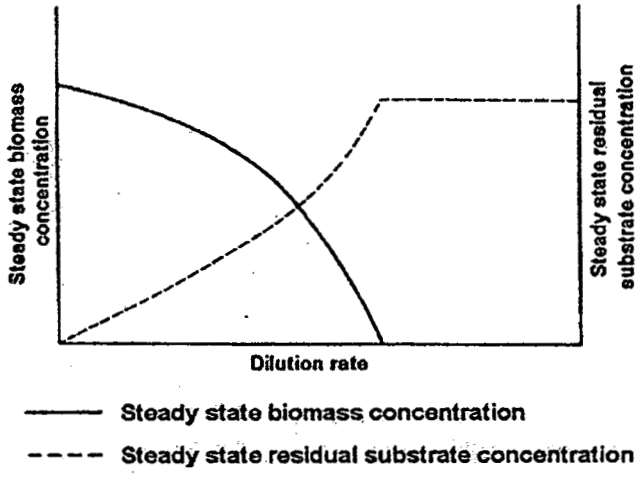
จากสมการ (16) จะเห็นได้ว่า D_{crit} จะขึ้นอยู่กับค่า μ_{max} S_R และ K_s ถ้า S_R ยิ่งมีค่ามาก D_{crit} จะมีค่าเข้าใกล้ μ_{max} มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบ Simple chemostat ตามปกติ ความเข้มข้นของสับสเตรทจะเป็นตัวจำกัดการเจริญ ทำให้จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญต่ำกว่า μ_{max}



ภาพที่ 2-12 ผลของอัตราการเจือจางต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์และสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s ต่ำ ในระบบ Chemostat

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1995

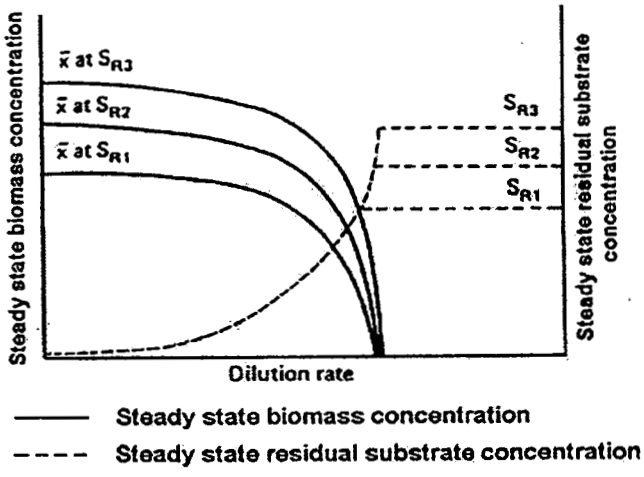
สำหรับจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s สูง เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น s จะเพิ่มขึ้น และ x ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทันที ดังแสดงในภาพที่ 2-13



ภาพที่ 2-13 ผลของอัตราการเจือจางต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์และสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีค่า K_s สูง ในระบบ Chemostat

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1995

ในกรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น (S_R) ต่างกัน เมื่อ S_R เพิ่มขึ้น $\bar{x}$ จะเพิ่มขึ้นตาม แต่ไม่มีผลให้ s เปลี่ยนแปลงต่างกัน และ D_{crit} จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อ S_R เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2-14



ภาพที่ 2-14 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์ และสับสเตรทที่เหลือ ที่สภาวะคงที่ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบ Chemostat

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1995

อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องโดยใช้ระบบ Chemostat จะได้ผลแตกต่างไปจากทฤษฎีที่กล่าวมาแล้วบ้าง เนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ เช่น การกวนผสมไม่ดี ทำให้จุลินทรีย์ติดอยู่ตามผนังภาชนะ หรือจากสาเหตุทางด้านสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ เช่น การใช้สับสเตรทบางส่วนในการรักษาสภาพเซลล์ และความเป็นพิษของสับสเตรทเมื่อใช้อัตราการเจือจางสูง ๆ เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องมีข้อดีกว่าการใช้ระบบ Batch คือ ให้ผลผลิตต่อหน่วยเวลา (Productivity) สูงกว่า มีความสม่ำเสมอในการดำเนินงานและควบคุมโดยใช้ระบบอัตโนมัติได้ง่าย แต่ก็มีข้อเสียคือ มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าระบบ Batch รายละเอียดของแต่ละข้อดีและข้อเสียเป็นดังนี้

5.3.1 Productivity

Productivity หมายถึง ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยเวลาของการหมัก ในการหมักแบบ Batch จะหา Productivity ของมวลเซลล์ได้จากสูตร

$$R_{batch} = (x_{max} - x_0) / (t_i + t_{ii}) \qquad (17)$$

เมื่อ R_{batch} = ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง

x_{max} = ความเข้มข้นสูงสุดของเซลล์ที่ Stationary phase

x_0 = ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

t_i = ระยะเวลาที่จุลินทรีย์เจริญด้วยอัตราเร็ว μ_{max}

t_{ii} = ระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในกระบวนการหมัก ยกเว้นระยะเวลาที่จุลินทรีย์เจริญด้วยอัตราเร็ว μ_{max} ระยะเวลาในช่วงนี้จะรวมทั้งเวลาในระยะ Lag phase Deceleration phase การทำให้ปราศจากเชื้อ และการเก็บเกี่ยวผลผลิต

สำหรับ Productivity ของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง จะหาได้จากสูตร

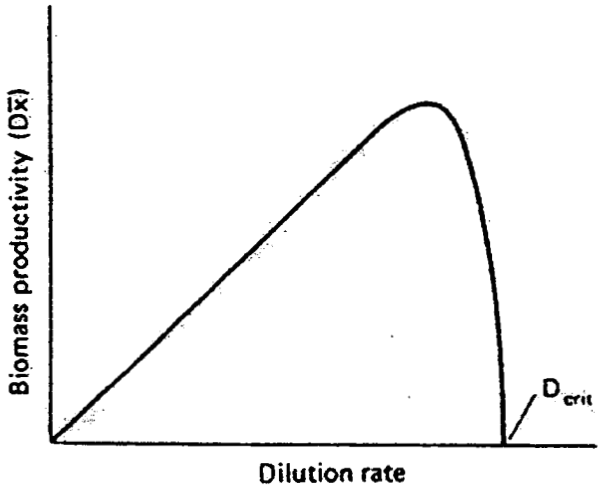
$$R_{cont} = \bar{Dx}\,[\,1 - (t_{iii} / T)\,] \qquad (18)$$

เมื่อ R_{cont} = ความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง

t_{iii} = ระยะเวลาตั้งแต่การเตรียมถังหมัก การทำให้ปราศจากเชื้อ และการเพาะเลี้ยงแบบ Batch ก่อนที่จะเข้าสู่ระบบต่อเนื่องจนกระทั่งเข้าสู่สภาวะคงที่

T = ระยะเวลาที่สภาวะคงที่

ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น จะทำให้ค่า $D\bar{x}$ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งจุดหนึ่งซึ่งทำให้ $D\bar{x}$ มีค่าสูงสุด หลังจากนั้น ถ้าเพิ่มอัตราการเจือจางต่อไป จะทำให้ค่า $D\bar{x}$ ลดลง ดังแสดงในภาพที่ 2-15



ภาพที่ 2-15 ผลของอัตราการเจือจางต่อ Biomass productivity เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1995

Productivity ที่ได้จากการหมักแบบ Batch ตามสมการ (17) เป็นค่าเฉลี่ยตลอดระยะเวลาของการหมัก ผลผลิตของเซลล์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในระยะหลังของการหมัก ดังนั้น การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ Batch จะได้ผลผลิตสูงสุดก็ต่อเมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดลง แต่การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจางที่เหมาะสมนั้น ภายใต้สภาวะคงที่ผลผลิตจะมีค่าสูงสุดและคงที่ตลอดเวลา ทำให้ได้ Productivity สูงกว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ Batch มาก นอกจากนี้ ระบบต่อเนื่องสามารถหมักได้เป็นเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน ทำให้ค่า t_{iii} (Non-productive period) มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ทำให้เกิดผลผลิต ในขณะที่ระบบ Batch หมักได้ในระยะเวลาจำกัด ทำให้ t_{ii} มีค่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่จุลินทรีย์เจริญด้วยอัตราเร็วสูงสุด (μ_{max})

5.3.2 ความสม่ำเสมอในการดำเนินงานและการและควบคุมโดยใช้ระบบอัตโนมัติ

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องเป็นระบบที่ควบคุมตัวเองได้ โดยอัตราการเจริญของเซลล์จะปรับตัวตามอัตราการเจือจางจนกระทั่งเกิดสภาวะคงที่ซึ่งมีความเข้มข้น

ของเซลล์ สับสเตรท ผลผลิตและสารพิษคงที่ และมีความต้องการปัจจัยต่าง ๆ เช่น ปริมาณออกซิเจน น้ำหล่อเย็นและพีเอช คงที่ตลอดเวลา ดังนั้น จึงทำให้กระบวนการควบคุมการหมักคงที่ด้วย แต่ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ Batch กระบวนการควบคุมการหมักจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ต้องการในระยะแรกจะต่ำกว่าระยะหลัง เนื่องจากเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นและอาหารมีความหนืดสูงขึ้น ปริมาณน้ำหล่อเย็นจะต้องการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักที่เพิ่มขึ้น และการเติมสารละลายกรดหรือด่างเพื่อควบคุมพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ Batch ยังต้องการแรงงานมากในช่วงเวลาการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเก็บเกี่ยวผลผลิต แต่ใช้แรงงานน้อยระหว่างการหมัก ในขณะที่การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องมีการใช้แรงงานค่อนข้างสม่ำเสมอ เนื่องจากมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การทำให้ปราศจากเชื้อและการสกัดผลผลิตอย่างต่อเนื่อง ทำให้ใช้ระบบอัตโนมัติในการควบคุมได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ Batch

5.3.3 การปนเปื้อน

เนื่องจากโดยทั่วไปจะใช้เวลาในการหมักนานกว่าการหมักแบบ Batch มาก จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้มากกว่า อย่างไรก็ตาม ระบบต่อเนื่องเป็นระบบที่มีความสามารถสูงในการคัดเลือกจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ปนเปื้อนต้องเจริญในถังหมักได้ดีเท่าหรือดีกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในระบบจึงจะคงอยู่ในระบบได้ ถ้าจุลินทรีย์ปนเปื้อนเจริญได้ในอัตราเท่ากับอัตราการเจือจาง จะทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่รวมกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต แต่ถ้าจุลินทรีย์ปนเปื้อนเจริญได้ในอัตราที่สูงกว่าอัตราการเจือจาง จะทำให้จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตถูกแทนที่โดยจุลินทรีย์ปนเปื้อน การแก้ปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นนี้สามารถทำได้โดยการออกแบบก่อสร้างถังหมักให้เหมาะสม และการจัดการดำเนินงานที่ดีในระหว่างการหมัก

นอกจากปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอกแล้ว ระบบการหมักแบบต่อเนื่องยังอาจมีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายในด้วย ซึ่งปัญหานี้ไม่สามารถแก้ไขได้โดยการออกแบบถังหมักและการดำเนินการที่ดี ตามปกติการหมักโดยใช้ระบบต่อเนื่องจะใช้เวลานาน ทำให้จุลินทรีย์ในระบบมีโอกาสกลายพันธุ์ได้มากกว่าการหมักแบบ Batch และถ้ามิวแตนท์ที่เกิดขึ้นสามารถปรับตัวเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์เดิมที่ใช้ในการผลิต จะทำให้จุลินทรีย์เดิมถูกแทนที่โดยมิวแตนท์ได้ ปรากฏการณ์นี้อาจเป็นประโยชน์ในการผลิตมวลเซลล์ เพราะมิวแตนท์ที่เจริญขึ้นมาแทนที่นั้นจะมีประสิทธิภาพในการเจริญดีกว่าจุลินทรีย์เดิม แต่ในกรณีที่

ต้องการผลิตสารเมทาบอไลท์จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือการตัดต่อยีน การคัดเลือกเชื้อตามธรรมชาติอาจทำให้เกิดผลเสีย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ถูกดัดแปลงให้สร้างสารเมทาบอไลท์ได้สูงกว่าที่จุลินทรีย์ต้องการตามปกติ จุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีความสามารถในการเจริญค่อนข้างต่ำ ถ้ามีมิวแตนท์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (Back mutation) หรือสูญเสียยีนที่ทำให้สร้างผลผลิตปริมาณสูง จะทำให้ความสามารถในการผลิตสารเมทาบอไลท์ต่ำลงแต่ประสิทธิภาพในการเจริญดีขึ้น จึงสามารถแทนที่จุลินทรีย์เดิมที่ใช้ในกระบวนการหมัก ส่งผลให้ได้ผลผลิตต่ำลง

แม้ว่าระบบต่อเนื่องจะมีข้อดีกว่าระบบ Batch หลายประการดังที่ได้กล่าวไปแล้ว แต่การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องไปใช้ในอุตสาหกรรมยังไม่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากขาดความรู้ที่สำคัญในการควบคุมสภาวะการหมักแบบต่อเนื่อง ในขณะที่ความรู้ความเข้าใจในระบบ Batch มีมากกว่า ตัวอย่างอุตสาหกรรมที่มีการใช้ระบบต่อเนื่องในการผลิต ได้แก่ การผลิตเบียร์และการผลิตมวลเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องไปใช้ประโยชน์ในการแยกและคัดเลือกเชื้อ และใช้ในการหาข้อมูลพื้นฐานของจุลินทรีย์เพื่อการปรับปรุงกระบวนการหมักแบบ Batch และ Fed-batch ได้อีกด้วย (สมใจ ศิริโภค, 2544)

6. เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเพื่อหาองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะและกระบวนการผลิตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบ Submerge มีเป็นจำนวนมากและปัจจุบันก็ยังมีรายงานอย่างต่อเนื่อง ดังตัวอย่างงานวิจัยต่อไปนี้

Davis, Cohen, and Whitaker (1980) ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. stearothermophilus* โดยการเพาะเลี้ยงแบบ Batch และ Chemostat ในอาหาร ทริปโทน-มอลโทส ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากการเพาะเลี้ยงแบบ Batch พบว่า การสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจำกัดอยู่ในระยะ Log phase ของการเจริญเท่านั้น และผลผลิตเอนไซม์จะลดลง 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.2 ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบ Chemostat เมื่อใช้อัตราการเจือจางคงที่ การผลิตเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของ *B. stearothermophilus*

Pazlarova, Baig, and Votruba (1984) ได้ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. subtilis* โดยใช้เคซิเนทเป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch จะทำให้ได้ผลผลิตเอนไซม์มากกว่าแบบ Batch 2 เท่า

Yoo, Cadman, Hong, and Hatch (1988) รายงานถึงผลการศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* แบบ Fed-batch เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยป้อนมอลโทสเป็นสับสเตรท พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ Batch 60 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้แป้งแทนมอลโทสก็พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกัน

Lee, and Parulekar (1993) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN106[pAT5] ซึ่งเป็นเซลล์รีคอมบิแนนท์เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยใช้ Defined medium ที่มีกลูโคสและ/หรือแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch โดยให้อัตราการป้อนสับสเตรท (แป้ง) คงที่ พบว่า ได้ผลผลิตเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทที่ป้อนต่ำลง และจากการเพาะเลี้ยงแบบ Batch และ Fed-batch พบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้แปรผกผันกับการเจริญของเซลล์

Wind, Buitelaar, Eggink, Huizing, and Dijkhuizen (1994) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. stearothermophilus* เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Batch ในถังหมักขนาด 3 ลิตร (Working volume 2 ลิตร) กับระดับ Shake flask พบว่าได้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 26 เท่า และปัจจัยวิกฤติสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้แก่ ค่า Dissolved O_2

Milner, Martin, and Smith (1995) รายงานว่า จากการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *B. amyloliquefaciens* ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดใน 48 ชั่วโมง เมื่อให้อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.7 vvm โดยไม่มีการควบคุมค่า Dissolved oxygen และเมื่อควบคุมค่า Dissolved oxygen ให้เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้กิจกรรมเอนไซม์เพียงครึ่งหนึ่งของสภาวะข้างต้น และเมื่อเพิ่มค่า Dissolved oxygen เป็น 60 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้นไม่มากนัก แสดงว่า การควบคุมค่า Dissolved oxygen ไม่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการทดลองดังกล่าว

Morcel, Emborg, Madsen, and Biedermann, (1995) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* แบบต่อเนื่องใน Membrane recycle bioreactor พบว่า ได้มวลเซลล์และ Volumetric productivity สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ Batch หรือ Chemostat แต่เมื่อพิจารณากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ Batch แต่สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยง

แบบ Chemostat อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งการเพาะเลี้ยงโดยใช้ Membrane recycle bioreactor อาจถูกรบกวนเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูง

Milner, et al. (1997) ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* ระหว่างการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงเพียงขั้นตอนเดียวกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเพาะเลี้ยงสองขั้นตอน พบว่า เมื่อใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเพาะเลี้ยงสองขั้นตอน โดยขั้นที่ 1 ใช้เวลา 28 ชั่วโมงแล้วจึงถ่ายเชื้อไปเพาะเลี้ยงขั้นตอนที่สองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าเมื่อใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงเพียงขั้นตอนเดียวเป็นเวลา 16 ชั่วโมง 21 เปอร์เซ็นต์

Ferreyra, Lorda, and Balatti (1998) รายงานถึงความเป็นไปได้ในการนำหางนมที่เหลือจากการทำเนยแข็งมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. subtilis* NRRL 3411 เนื่องจากได้ผลผลิตที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกับเมื่อใช้แลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ ยังได้รายงานถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ ควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 7.5 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ซึ่งจะทำให้มีค่าอัตราการนำออกซิเจนเข้าเซลล์ (Oxygen adsorption rate) เท่ากับ 431.06 $mLO_2.L^{-1}h^{-1}$

Sarikaya (2000) ได้ศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตลอดจนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับ Shake flask จาก *B. subtilis* *B. amyloliquefaciens* I และ *B. amyloliquefaciens* II พบว่าที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ โซเดียมซิเตรท แป้ง และซูโครส ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ ยีสต์สกัด สำหรับ *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* II และแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับ *B. amyloliquefaciens* I แบคทีเรียแต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมอยู่ที่ 7.0 สำหรับ *B. subtilis* และ 5.9 สำหรับ *B. amyloliquefaciens* ทั้งสองสายพันธุ์

Zheng, Zhao, and Xiaolong (2000) ศึกษาถึงผลของอัตราการไหลของแก๊ส (Gas flow rate) และปริมาตรของของเหลวต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *B. subtilis* โดยใช้ External-loop airlift bioreactor ที่มีอัตราส่วนของความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.9 สำหรับส่วน Riser และอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วน Riser ต่อ Downcomer เท่ากับ 6.6 พบว่า หลังจากการหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยให้ปริมาตรของของเหลวเท่ากับ 8.5 ลิตร และอัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 1.2 vvm ใน 12 ชั่วโมงแรก 1.4 vvm ในชั่วโมงที่ 12-27 และ 1.2 vvm ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 27 จนสิ้นสุดการทดลอง ได้กิจกรรมเอนไซม์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 432.3 หน่วย

ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าที่ได้จากการผลิตในระดับ Shake flask และใกล้เคียงกับที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้ Stirred tank bioreactor

Dey, Mitra, Banerjee, and Maiti (2001) รายงานว่า จากการใช้วิธี Response surface methodology ในการหาความเข้มข้นขององค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสำหรับ *B. circulans* GRS 313 พบว่า องค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ได้แก่ กากถั่วเหลือง 48.4 กรัมต่อลิตร รำข้าวสาลี 28.4 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 15.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะช่วยเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ 1.25 เท่า

Jin et al. (2001) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. JF ได้แก่ แป้งสาลี และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ ทริปโทน นอกจากนี้ ยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ 10-20 เท่า

Narang, and Satyanarayana (2001) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้แก่ แป้งและทริปโทนตามลำดับ จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 22 ลิตร (Working volume 10 ลิตร) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ ปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และมีการควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 7

Huang, Ridgeway, Gu, and Moo-Young (2004) ศึกษาถึงการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *B. subtilis* สายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ ซึ่งเป็นออกโซโทรฟที่ต้องการฟีนิลอะลานีน ไทโรซีนและทริปโตเฟน แต่เนื่องจากไทโรซีนและทริปโตเฟนละลายน้ำได้น้อย ในการทดลองนี้จึงแยกไทโรซีนและทริปโตเฟนออกมาละลายในสารละลายแอมโมเนียต่างหาก แล้วจึงป้อนเข้าสู่ระบบแยกกับสายป้อนสับสเตรทหลัก ด้วยอัตราการป้อนแบบ Exponential ที่แตกต่างกัน วิธีการป้อนดังกล่าวทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 17.6 กรัมต่อลิตร กิจกรรมเอนไซม์ 41.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร และค่า Overall biomass yield เท่ากับ 0.39 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส

Haq, Ashraf, Iqbal, and Qadeer (2003) ได้ศึกษาหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกเพื่อใช้ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *B. licheniformis* จากการทดลองทำให้ได้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 1.25 เปอร์เซ็นต์ Nutrient broth 0.5 เปอร์เซ็นต์ Pearl millet starch 1.0 เปอร์เซ็นต์ แลกโทส 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร

Konsula and Liakopoulou-Kyriakides (2004) ได้ศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *B. subtilis* ในระดับ Shake flask พบว่าได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 ในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

Santos and Martins (2003) ศึกษาผลขององค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *Bacillus* sp. และพบว่าแหล่งคาร์บอน ได้แก่ มอลโทส Soluble starch และซิเตรท ช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ ในขณะที่กลูโคสส่งผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ อีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ ได้แก่ ความเข้มข้นของยีสต์สกัด โดยกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 2-5 กรัมต่อลิตร และกิจกรรมเอนไซม์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดไม่อยู่ในช่วงดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของเปปโทนที่เหมาะสม คือ ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร

Aiyer (2004) รายงานว่า ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. licheniformis* SPT27 จะสูงขึ้นเมื่อมีแป้งเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแป้งที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือแป้งจาก *Amarantus peniculatus* และจากการเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ พบว่าฟรุกโทสให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ เปปโทนและแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุด เท่ากับ 1

Tanyildizi, Ozer, and Elibol (2005) รายงานว่า จากการใช้วิธี Response surface methodology ในการหาความเข้มข้นขององค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสำหรับ *Bacillus* sp. พบว่า องค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ได้แก่ แป้ง 17.58 กรัมต่อลิตร กลีเซอริน 12.37 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเปปโทน 8.77 กรัมต่อลิตร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

จุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. จุลินทรีย์

Bacillus licheniformis ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณลานตากมันของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังสามชัยพืชผล อ. เสิงสาง จ. นครราชสีมา (ลลิต, 2548)

2. อุปกรณ์

2.1 ถังหมักขนาด 5 ลิตร (Bioflo IV)

2.2 ไมโครเซนตริฟิวจ์ (Z233MK, Hermle)

2.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Gallenkamp)

2.4 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (HeλIOS-γ)

2.5 เครื่องวัดพีเอช (Denver basic)

2.6 Water bath (Memmert)

2.7 เครื่อง Deep freezer (Ultralow, Sanyo)

2.8 เครื่อง Hot air oven (Memmert)

2.9 ตู้บ่มเชื้อ (IM1000, Clayson)

2.10 Auto pipette (Pipetman, Gilson)

2.11 เครื่อง Vortex mixer (Vortex-Genie2)

2.12 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius)

2.13 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius C244S)

2.14 Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.15 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

2.16 Desiccator

2.17 กล่องน้ำแข็ง

3. สารเคมี

3.1 สารละลายไอโอดีน

3.2 Soluble starch

3.3 อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3.4 แคลเซียมคลอไรด์

3.5 สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

3.6 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์

3.7 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์

3.8 แป้งมันสำปะหลัง

3.9 แป้งข้าวเจ้า

3.10 แป้งข้าวเหนียว

3.11 แป้งถั่วเหลือง

3.12 แอมโมเนียมซัลเฟต

3.13 ทริปโทน

3.14 เปปโทน

3.15 Tween 80

3.16 กลีเซอรอล

3.17 กรดซัลฟุริกเข้มข้น

3.18 Alkaline copper solution

3.19 Folin ciocaltue reagent

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียมดังแสดงในภาคผนวก ก)

4.1 Nutrient agar ที่มี Soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ (Hamilton, Kelly and Fogarty, 1999)

4.2 Nutrient broth ที่มี Soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ (Hamilton et al., 1999)

4.3 Inoculum medium (ดัดแปลงจาก Hamilton et al., 1999)

4.4 Production medium (ดัดแปลงจาก Jin et al., 2001)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบหาองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับ Shake flask

1.1 การทดสอบหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

1.1.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

1.1.1.1 ถ่ายเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ลงใน Inoculum medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.1.1.2 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

1.1.2.1 เตรียมอาหาร Production medium 3 ชนิด โดยแทนที่ Soluble starch ในสูตรอาหารด้วย แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ใส่ใน Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรฟลาสก์ละ 45 มิลลิลิตร

1.1.2.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

1.1.2.3 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.1.2.4 แยกเอนไซม์ออกจาก Fermentation broth แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังวิธีการในข้อ 1.1.4

1.1.3 การแยกเอนไซม์ออกจาก Fermentation broth

1.1.3.1 นำ Fermentation broth มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.3.2 เก็บส่วน Supernatant ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์

1.1.3.3 เก็บรักษาเอนไซม์โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ดัดแปลงจาก Jin et al., 2001)

1.1.4.1 เตรียมสับสเตรท ได้แก่ 1 เปอร์เซ็นต์ Soluble starch ในอะซิเตท บัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

1.1.4.2 ถ่ายสับสเตรท 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

1.1.4.3 ถ่ายเอนไซม์ใส่หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร

1.1.4.4 บ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (นอกจากกำหนดเป็นค่าอื่น) เป็นเวลา 20 นาที

1.1.4.5 ถ่าย Reaction mixture 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายไอโอดีน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer

1.1.4.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

1.1.4.7 เทียบหาความเข้มข้นของแป้งกับกราฟมาตรฐาน

<u>หมายเหตุ</u>

1. ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่เติมสารละลายไอโอดีนลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยาโดยไม่มีการบ่ม

2. แช่ Reaction mixture ในน้ำแข็งเสมอ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทนอกเหนือจากช่วงเวลาที่บ่มในอุณหภูมิที่กำหนด

3. กราฟมาตรฐานของแป้งใช้ Soluble starch ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1 หน่วยเอนไซม์ (U) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแล้วทำให้ปริมาณแป้งลดลง 1 มิลลิกรัม ภายใน 20 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำปฏิกิริยา โดยคำนวณจากสูตร

1 U = (ความเข้มข้นของแป้งในชุดควบคุม – ความเข้มข้นของแป้งที่เหลือในตัวอย่าง) x 5

1.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

1.2.1 เตรียมอาหาร Production medium โดยแทนที่ Soluble starch ในสูตรอาหารด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ใส่ใน Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรฟลาสก์ละ 45 มิลลิลิตร

1.2.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมดังข้อ 1.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

1.2.3 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2.4 แยกเอนไซม์ออกจาก Fermentation broth ดังวิธีการในข้อ 1.1.3 แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังวิธีการในข้อ 1.1.4

1.3 การทดสอบหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

1.3.1 เตรียมอาหาร Production medium 4 ชนิด โดยแทนที่ Soluble starch ในสูตรอาหารด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม และแทนที่ทริปโทนในสูตรอาหารด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เปปโทน และแป้งถั่วเหลืองที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และไม่ผ่านการกรอง ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนเดิม ซึ่งได้แก่ ทริปโทน ใส่ใน Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรฟลาสก์ละ 45 มิลลิลิตร

1.3.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมดังข้อ 1.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

1.3.3 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3.4 แยกเอนไซม์ออกจากดังวิธีการในข้อ 1.1.3 Fermentation broth แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังวิธีการในข้อ 1.1.4

1.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

1.4.1 เตรียมอาหาร Production medium โดยแทนที่ Soluble starch ในสูตรอาหารด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม และแทนที่ทริปโทนในสูตรอาหารด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 3 5 7 และ 9 กรัมต่อลิตร ใส่ใน Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรฟลาสก์ละ 45 มิลลิลิตร

1.4.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมดังข้อ 1.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

1.4.3 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.4.4 แยกเอนไซม์ออกจาก Fermentation broth ดังวิธีการในข้อ 1.1.3 แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังวิธีการในข้อ 1.1.4

1.5 การทดสอบหาพีเอชที่เหมาะสม

1.5.1 เตรียมอาหาร Production medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม ให้มีพีเอชต่าง ๆ กัน 6 ค่า คือ เท่ากับ 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 ใส่ใน Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรฟลาสก์ละ 45 มิลลิลิตร

1.5.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมดังข้อ 1.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

1.5.3 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.5.4 แยกเอนไซม์ออกจาก Fermentation broth ดังวิธีการในข้อ 1.1.3 แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังวิธีการในข้อ 1.1.4

1.6 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

1.6.1 เตรียมอาหาร Production medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม ให้มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสม ใส่ใน Baffled flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรฟลาสก์ละ 45 มิลลิลิตร

1.6.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมดังข้อ 1.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

1.6.3 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.6.4 แยกเอนไซม์ออกจาก Fermentation broth ดังวิธีการในข้อ 1.1.3 แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังวิธีการในข้อ 1.1.4

2. กระบวนการหมักสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.1 การเพาะเลี้ยงแบบ Batch

2.1.1 เตรียมอาหาร Production medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม ให้มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสม ปริมาตร 2850 มิลลิลิตร ใส่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.1.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

2.1.3 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยควบคุมค่า Dissolved oxygen ให้มากกว่า 0 เปอร์เซ็นต์ และควบคุมพีเอชให้เท่ากับพีเอชที่เหมาะสม โดยปรับพีเอชอัตโนมัติด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ เป็นเวลา 55 ชั่วโมง

2.1.4 เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และเก็บทุก ๆ 4 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 จนสิ้นสุดการทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ดังวิธีการในข้อ 1.4) ปริมาณแป้งโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟุริก ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์และการเจริญของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งเทียบจากปริมาณโปรตีนในเซลล์ (ดังวิธีการที่แสดงในภาคผนวก ข) นำไปสร้างกราฟการเจริญ การใช้สับสเตรทและการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แล้วนำมาคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

2.1.4.1 ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) มีหน่วยเป็นหน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คำนวณจากสมการ

$$Y_{p/x} = \Delta P/\Delta X$$

ΔP คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด - ค่ากิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น มีหน่วยเป็นหน่วยต่อลิตร (U/l)

ΔX คือ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด - น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (g/l)

2.1.4.2 ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อสับสเตรท ($Y_{p/s}$) มีหน่วยเป็นหน่วยต่อกรัมสับสเตรท คำนวณจากสมการ

$$Y_{p/s} = \Delta P_x/S_{used}$$

S_{used} คือ ปริมาณแป้งที่ถูกใช้ไป มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (g/l)

2.1.4.3 อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุด (Maximum enzyme production rate; Rp_{max}) มีหน่วยเป็น หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง (U/l/h) คำนวณจากสมการ

Rp_{max} = ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด/t

t คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด มีหน่วยเป็นชั่วโมง (h)

2.1.4.4 Maximum specific activity (SA_{max}) มีหน่วยเป็น หน่วยต่อกรัมโปรตีน (U/g protein) คำนวณจากสมการ

SA_{max} = ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด/Prot.

Prot. คือ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (g/l)

2.1.4.5 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ ได้แก่ น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น (NO) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (N_{max}) อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ระยะเวลาของระยะ Lag (t-lag) และ Doubling time (t-d) ตลอดจนการพลอตกราฟการเจริญ ทำโดยใช้โปรแกรม IFR Microfit 1.0

2.1.5 นำข้อมูลที่ได้ไปใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch

2.2 การเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch

2.2.1 เตรียมอาหาร Production medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม ให้มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่เหมาะสม ในปริมาตรเริ่มต้นที่กำหนดไว้ใส่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.2.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ให้มีปริมาตรเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร Production medium เริ่มต้น ลงในอาหาร Production medium ที่เตรียมได้

2.2.3 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยควบคุมค่า Dissolved oxygen ให้ไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และควบคุมพีเอชให้เท่ากับค่าพีเอชที่เหมาะสม โดยปรับพีเอชอัตโนมัติด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์

2.2.4 ป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบแบบ Exponential โดยอาศัยข้อมูลจากกราฟการเจริญ การใช้สับสเตรทและการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ Batch ในข้อ 2.1 มาคำนวณหาอัตราการเติมอาหาร (Feed rate, F) จากสมการ

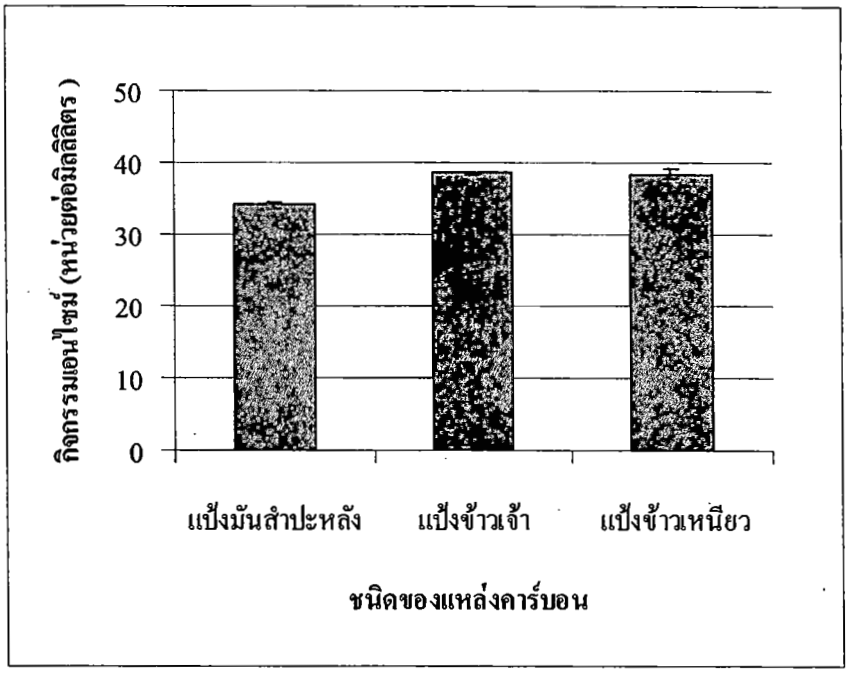
$$F = F_0 e^{\mu t}$$

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. องค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับ Shake flask

1.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการทดสอบหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ *B. licheniformis* ผลิตได้ในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 10 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-1

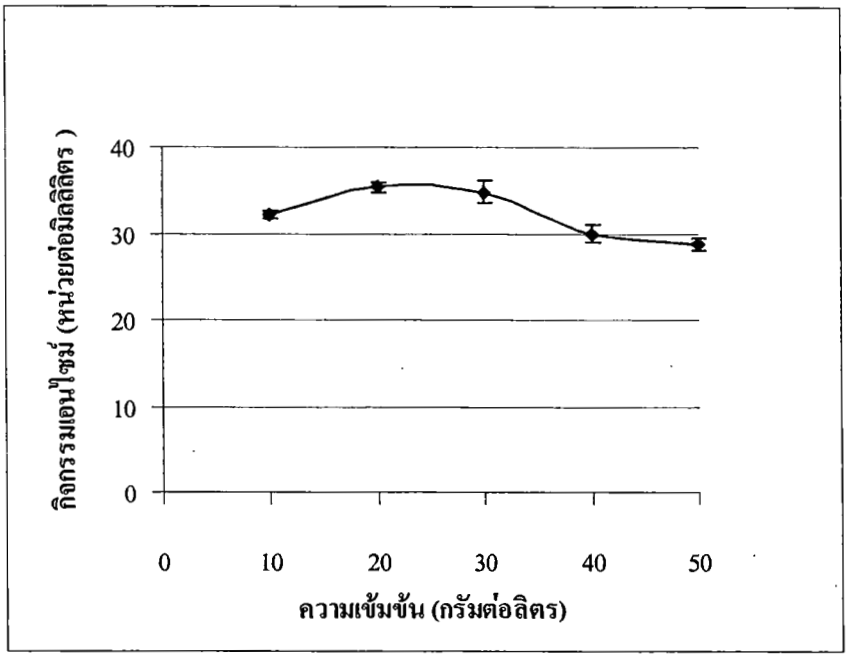


ภาพที่ 4-1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่ง คาร์บอนที่แตกต่างกัน

จากภาพที่ 4-1 แป้งข้าวเจ้าให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือเท่ากับ 38.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร ใกล้เคียงกับแป้งข้าวเหนียวซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์ 38.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนแป้งมัน

สำปะหลังให้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดคือเท่ากับ 34.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม แม้ว่าแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวจะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าแป้งมันสำปะหลัง แต่เนื่องจากแป้งทั้งสองชนิดมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน ไม่เป็นเนื้อเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสมบูรณ์ แม้จะผ่านขั้นตอนเจลาติไนเซชันแล้ว ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาด้านการผสมผสานเมื่อนำไปใช้ในการผลิตจริง ดังนั้น แป้งมันสำปะหลังจึงมีความเหมาะสมมากกว่า

ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-2 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นดังกล่าวให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 35.31 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเป็น 30 กรัมต่อลิตร กิจกรรมเอนไซม์จะเริ่มลดลง

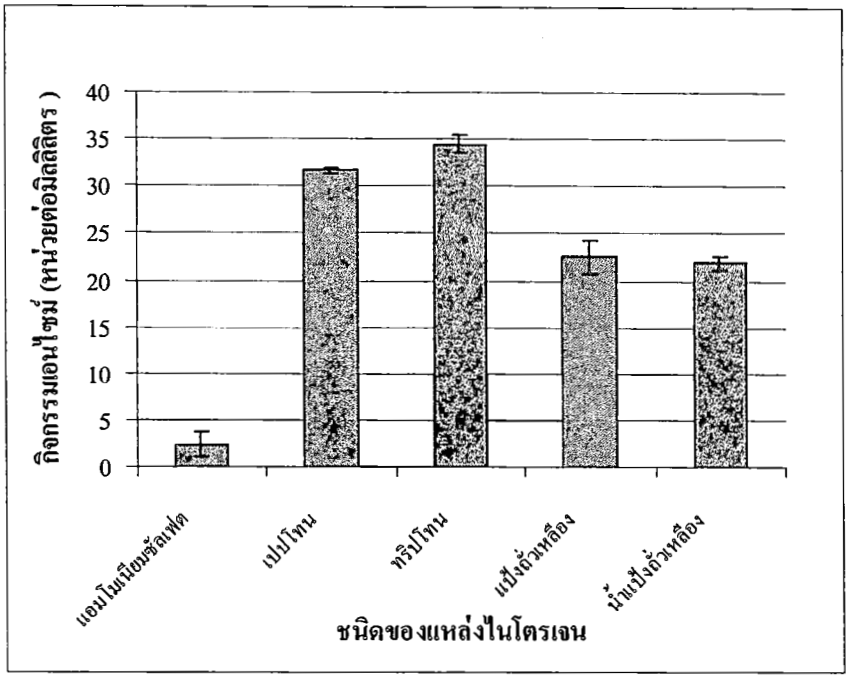


ภาพที่ 4-2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่แตกต่างกัน

1.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการทดสอบหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ *B. licheniformis* ผลิตได้ในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่ง

ไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโทน ทริปโทน แป้งถั่วเหลือง และน้ำแป้งถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 3 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-3

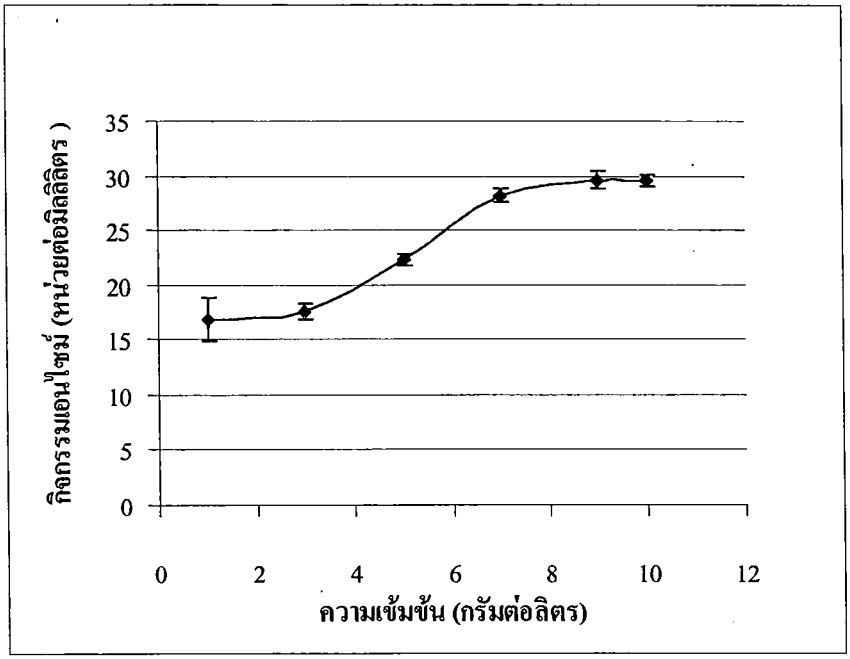


ภาพที่ 4-3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ได้ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 4-3 แหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ ทริปโทน รองลงมาคือ เปปโทน แป้งถั่วเหลือง น้ำแป้งถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 34.47 31.64 22.50 21.87 และ 2.32 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาความคุ้มทุนของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด พบว่าทั้งเปปโทนและ ทริปโทนมีราคาค่อนข้างสูง (หลายพันบาทต่อกิโลกรัม) ในขณะที่แป้งถั่วเหลืองมีราคาต่ำกว่ามากคือประมาณ 45 บาท ต่อ 400 กรัม (นมถั่วเหลืองแท้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตราดอยคำ) รวมทั้งเมื่อพิจารณาราคาของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาไม่สูงมากนัก ดังนั้นแป้งถั่วเหลืองและน้ำแป้งถั่วเหลืองจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้มากกว่า และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ระหว่างแป้งถั่วเหลืองกับน้ำแป้งถั่วเหลืองพบว่า ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ไม่มีการแสดงข้อมูล) ดังนั้น น้ำแป้งถั่วเหลืองจึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตในขั้นทดลอง เนื่องจากผ่านการกรองเอากากออกแล้ว ทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็น

เนื้อเดียวกัน ในขณะที่แป้งถั่วเหลืองจะมีกากและอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำซึ่งจะเป็นปัญหาต่อการวิเคราะห์การเจริญของ *B. licheniformis*

ความเข้มข้นของน้ำแป้งถั่วเหลืองที่เหมาะสมคือ เท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือเท่ากับ 29.63 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแป้งถั่วเหลืองจะทำให้ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นจนได้ค่าสูงสุดที่ 9 กรัมต่อลิตร แล้วจึงมีแนวโน้มคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 10 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำแป้งถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน

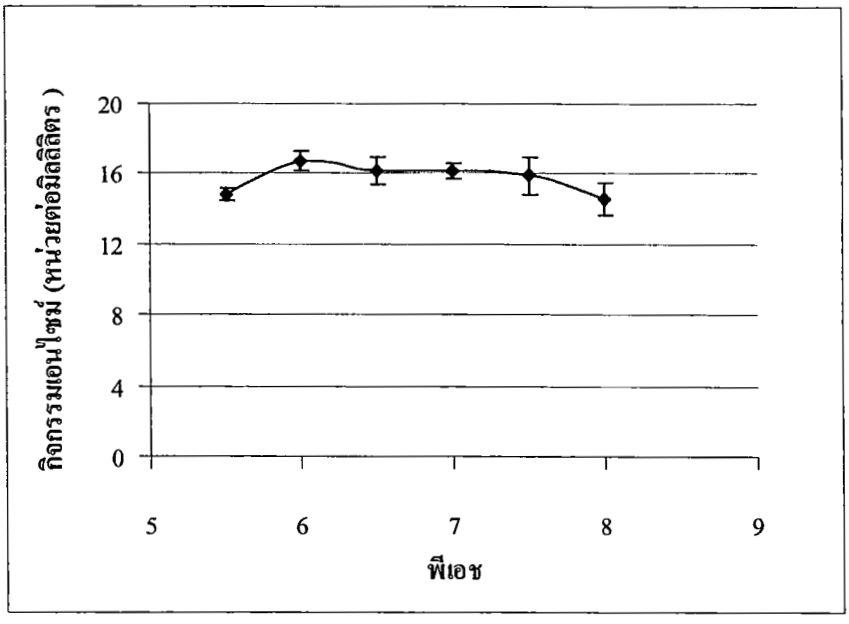
เนื่องจากยีสต์สกัดที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีราคาสูง (หลายพันบาทต่อกิโลกรัม) ซึ่งจะทำให้ไม่คุ้มทุนเมื่อทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้น การทดลองต่อ ๆ ไปจะไม่มีการเติมยีสต์สกัดเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ แม้ว่าการตัดยีสต์สกัดออกจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงถึง 1.9 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้เมื่อมีการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ก็ตาม (ไม่มีการแสดงข้อมูล)

จากผลการทดลองข้างต้น สรุปได้ว่าองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. licheniformis* เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนการผลิตและความเหมาะสมในการนำไปใช้ผลิตจริงร่วมด้วย คือ ใช้แป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้น้ำแป้งถั่วเหลือง ความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่มีการเติมยีสต์สกัดเป็นสารอาหารเสริม

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับ Shake flask

2.1 พีเอช

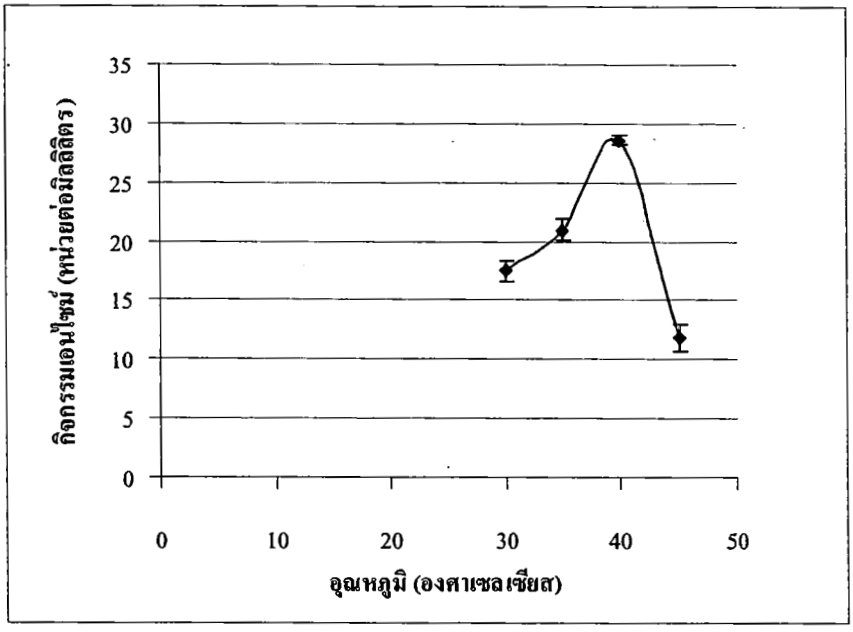
จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน คือเท่ากับ 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลสเท่ากับ 6.0 ทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 16.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-5 ซึ่งลดลงจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากผลการทดลองตอนที่ 1 อย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากมีการตัดยีสต์สกัดออกจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ดังเหตุผลที่กล่าวไปแล้วในหัวข้อ 1.2



ภาพที่ 4-5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

2.1 อุณหภูมิ

เมื่อเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่มีพีเอชเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือเท่ากับ 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. licheniformis* เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 28.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-6



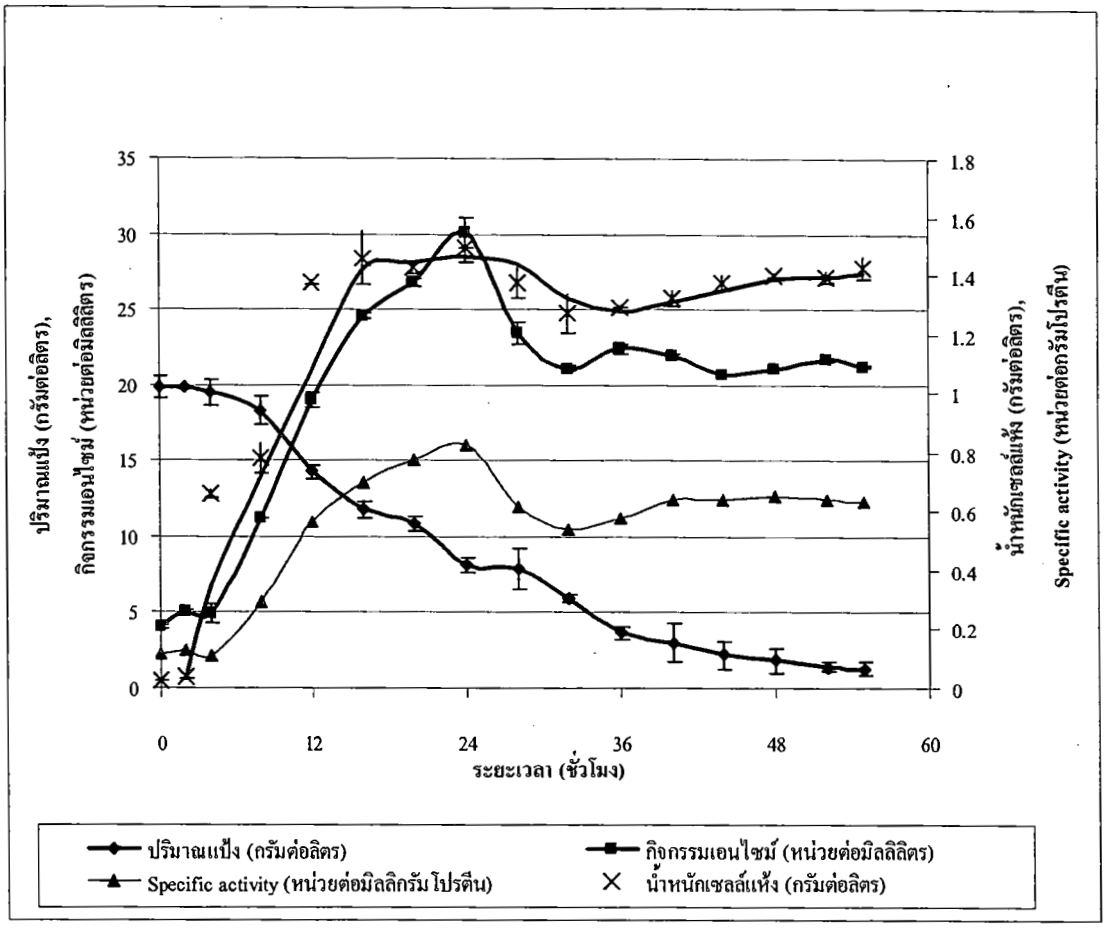
ภาพที่ 4-6 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ

3. กระบวนการหมักสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.1 การเพาะเลี้ยงแบบ Batch

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรในการผลิตทั้งหมด (Working volume) เท่ากับ 3 ลิตร และใช้หัวเชื้อ

แบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาตรคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรในการผลิตทั้งหมด โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และควบคุมค่า Dissolved oxygen ให้มากกว่า 0 เปอร์เซ็นต์ แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส การเจริญของจุลินทรีย์และปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-7



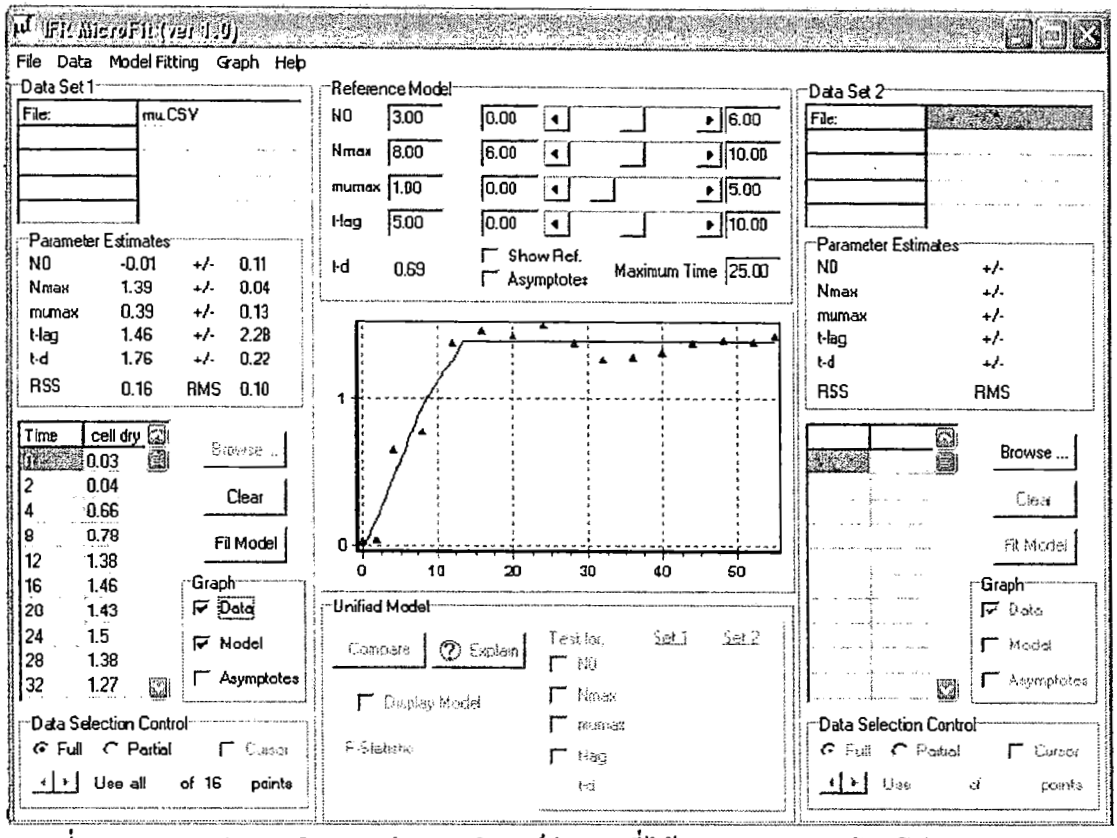
ภาพที่ 4-7 การเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่าง ๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

จากภาพที่ 4-7 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญ พบว่า *B. licheniformis* เข้าสู่ระยะ Exponential หลังจาก 2 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และสิ้นสุดระยะ Exponential ที่ชั่วโมงที่ 16 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตร (คำนวณโดยโปรแกรม IFR Microfit 1.0) จากนั้นจะเริ่มมีแนวโน้มคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 55 เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสพบว่า การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. licheniformis* มีลักษณะเป็น Growth-

associated กล่าวคือมีการผลิตไปพร้อม ๆ กับการเจริญ โดย *B. licheniformis* เริ่มมีการผลิตเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 4 ของการเจริญ คือหลังจากการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ Exponential เล็กน้อย และได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 30.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์จึงเริ่มลดลง ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการลดลงของอัตราการเจริญของ *B. licheniformis* ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ลดลงตามไปด้วย เนื่องจากการผลิตเอนไซม์นี้เป็นแบบ Growth associated นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการเสียสภาพของเอนไซม์ เนื่องจากที่สภาวะการเพาะเลี้ยงซึ่งมีอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6.0 และมีสับสเตรทของเอนไซม์ คือ แป้งมันสำปะหลัง จะทำให้เอนไซม์มีการทำงานซึ่งเป็นสาเหตุให้เอนไซม์เสียสภาพไปบางส่วนซึ่งยืนยันได้จากการลดลงอย่างต่อเนื่องของปริมาณแป้งหลังจากชั่วโมงที่ 24 ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้เริ่มลดลง หรืออาจเนื่องจากมีการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย เช่น กลูโคส ซึ่งจะส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดย *B. licheniformis* สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองมีการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแบบ Inducible คือ ให้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำมากเมื่อไม่มีแป้งเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ไม่มีการแสดงข้อมูล) นอกจากนี้ ยังอาจมีสาเหตุมาจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสซึ่งมักมีการสังเคราะห์ขึ้นเสมอเมื่อมีการใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความซับซ้อน และเมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์ควบคู่ไปกับค่า Specific activity พบว่ากราฟทั้งสองมีลักษณะขนานกันไปตลอดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นโปรตีนหลักที่มีการหลั่งออกนอกเซลล์ที่สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท พบว่า ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทดลองปริมาณแป้งลดลงเล็กน้อยและเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อกิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นและเชื้ออยู่ในระยะ Exponential แสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* มีการนำสับสเตรทไปใช้โดยมีการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสออกมาย่อยแป้งเพื่อนำไปใช้ในการเจริญ อย่างไรก็ตาม แม้ว่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 24 แต่ปริมาณแป้งก็ยังคงลดลงต่อไปจนสิ้นสุดการทดลอง ทั้งนี้ น่าจะเนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์ที่ยังคงมีอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งจะทำให้ยังคงมีการย่อยแป้งต่อไปและผลิตภัณฑ์จากการย่อยส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการเจริญของ *B. licheniformis* ในระยะ Stationary ซึ่งยังคงมีการเจริญอยู่และอีกส่วนหนึ่งน่าจะมีการสะสมอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

จากการใช้โปรแกรม IFR Microfit 1.0 พลอตกราฟการเจริญและคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้ดังนี้ น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น (NO) เท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (N_{max}) เท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.39 ต่อชั่วโมง ระยะเวลาของระยะ Lag (t-lag) เท่ากับ 1.46 ชั่วโมง และ Doubling time (t-d) เท่ากับ 1.76 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-8



ภาพที่ 4-8 กราฟการเจริญและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการคำนวณโดยโปรแกรม IFR Microfit 1.0

เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองไปคำนวณค่าผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อสับสเตรท ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุด (Maximum enzyme production rate) และ ค่า Maximum specific activity ได้ผลดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Batch เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

	Culture method
	Batch culture
$Y_{p/x}$ (U/g dry cell weight)	20060.70
$Y_{p/s}$ (U/g substrate)	2221.45
Maximum enzyme production rate (U/l/h)	1253.8
Maximum specific activity (U/g protein)	16082.84

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

1. องค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับ Shake flask

ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยแบคทีเรีย นอกจากนี้ การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมยังเป็นหนึ่งในขั้นตอนสำคัญในการพัฒนากระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำ จากการศึกษาเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีราคาถูกและมีขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบไม่ยุ่งยาก พบว่า ผลผลิตเอนไซม์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเมื่อพิจารณาความสามารถในการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งทั้ง 3 ชนิด พบว่า แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน ไม่เป็นเนื้อเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาด้านการผสมผสานเมื่อนำไปใช้ในการผลิตจริง ในขณะที่แป้งมันสำปะหลังไม่จับตัวเป็นก้อนและเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้จริงมากกว่า

ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. licheniformis* เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 35.31 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อความเข้มข้นของแป้งเพิ่มขึ้นเป็น 30 กรัมต่อลิตร กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จะเริ่มลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Wind et al. (1994) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งสูงกว่า 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้ผลผลิตเอนไซม์ที่ได้ลดลง กล่าวคือลดลงจาก 44.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น 34.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของแป้งเพิ่มขึ้นเป็น 2.0 กรัมต่อลิตร และลดลงเรื่อย ๆ เมื่อความเข้มข้นของแป้งที่ใช้เพิ่มสูงขึ้น

การที่ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสลดลงเมื่อความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นสูงกว่า 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดน่าจะเนื่องมาจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การเกิด Catabolite repression โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง เช่น กลูโคส หรืออาจมีสาเหตุจากการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงเนื่องจากความหนืดที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้ง หรืออาจเกิดจากทั้ง 2 สาเหตุประกอบกัน โดยทั่วไปเป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่า การสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะเกิด Catabolite repression

โดยกลูโคสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง เช่น มอลโทส แลกโทส (Konsula, and Liakopoulou-Kyriakides, 2003) และฟรุกโทส (Gupta et al., 2003) นอกจากนี้ นักวิจัยจำนวนมากได้รายงานว่า เอนไซม์ย่อยแป้งโดยเฉพาะแอลฟาอะไมเลสมักถูกเหนี่ยวนำเฉพาะในสภาวะที่มีแป้งเท่านั้น (Pandey et al., 2000)

จากการเปรียบเทียบผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ ทริปโทน รองลงมาคือ เปปโทน แป้งถั่วเหลือง น้ำแป้งถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Jin et al. (2001) Narang, and Satyanarayana (2001) และ Konsoula, and Liakopoulou (2007) ที่พบว่าทริปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ที่ทำการทดสอบ โดย Jin et al. (2001) ได้เปรียบเทียบผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. JF ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 6 ชนิด พบว่า ทริปโทนให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือ เปปโทน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด ยูเรีย และ $(NH_3)_2SO_4$ ตามลำดับ Narang, and Satyanarayana (2001) รายงานว่าทริปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ ผลผลิตเอนไซม์จาก *B. thermooleoverans* สูงที่สุดที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 3 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ มอลท์สกัด เปปโทน แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต เคซีน เนื้อสกัด แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตและโซเดียมไนเตรท ตามลำดับ ส่วนงานวิจัยของ Konsoula, and Liakopoulou (2007) รายงานว่า เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด พบว่า ทริปโทนให้ Specific enzyme activity สูงที่สุด รองลงมาคือ ไกลซีน เคซีน เปปโทน ยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความคุ้มทุนของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด พบว่าทั้งเปปโทนและทริปโทนมีราคาค่อนข้างสูง (หลายพันบาทต่อกิโลกรัม) ในขณะที่แป้งถั่วเหลืองมีราคาต่ำกว่ามากคือประมาณ45 บาท ต่อ 400 กรัม (นมถั่วเหลืองแท้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตราดอยคำ) รวมทั้งเมื่อพิจารณาราคาของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาไม่สูงมากนัก ดังนั้นแป้งถั่วเหลืองและน้ำแป้งถั่วเหลืองจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดแทนทริปโทนและเปปโทน เนื่องจากแป้งถั่วเหลืองประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิด โดยในแป้งถั่วเหลือง 100 กรัม ประกอบด้วยโปรตีน 34.2 กรัม ไขมันอิ่มตัว 3.4 กรัม น้ำตาล 5.5 กรัม โซเดียม 19.5 มิลลิกรัม วิตามินบีหนึ่ง (B1) 0.01 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง (B2) 0.02 มิลลิกรัม แคลเซียม 272 มิลลิกรัม และเหล็ก 5.86 มิลลิกรัม เป็นต้น นอกจากนี้ Jin et al. (2001) ได้รายงานถึงการนำแป้งถั่วเหลืองมาใช้ในการ

ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Bacillus* sp. JF โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งถั่วเหลือง 6 กรัมต่อลิตร ผงข้าวสาลี 6 กรัมต่อลิตร และทริปโทน 2 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 2000 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในเวลา 76 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ระหว่างแป้งถั่วเหลืองกับน้ำแป้งถั่วเหลืองพบว่า ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้นน้ำแป้งถั่วเหลืองจึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตในขั้นทดลอง เนื่องจากผ่านการกรองเอากากออกแล้ว ทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะที่แป้งถั่วเหลืองจะมีกากและอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำซึ่งจะเป็นปัญหาต่อการวิเคราะห์การเจริญของ *B. licheniformis*

เมื่อพิจารณาผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ พบว่าได้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับรายงานของ Gupta et al. (2003) ที่กล่าวว่า แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เอื้อต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมากกว่า รวมถึงงานวิจัยของ Jin et al. (2001) ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้ผลผลิตแอลฟาอะไมเลสสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ 13-20 เท่า เมื่อใช้ *Bacillus* sp. JF ในการผลิต ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากการที่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ไม่ได้มีเพียงไนโตรเจนเท่านั้น แต่ประกอบด้วยโปรตีน กรดอะมิโน วิตามินและสารอาหารอื่น ๆ ทำให้มีความอุดมสมบูรณ์และเอื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียมากกว่า

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับ Shake flask

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเป็นตัวกำหนดการเจริญและรูปร่างของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความไวต่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sivaramakrishnan et al., 2006) นอกจากนี้ พีเอชยังมีผลต่อการสังเคราะห์และการหลั่งเอนไซม์ ตลอดจนความคงตัวของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Asgher, Asad, Rahman, and Legge, 2007) จากผลการทดลองพบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. licheniformis* เท่ากับ 6.0 ซึ่งใกล้เคียงกับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปรับพีเอชซึ่งมีค่าประมาณ 5.8 สอดคล้องกับรายงานของ Gupta et al. (2003) ที่กล่าวว่า แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในทางการค้าโดยกระบวนการ Submerge fermentation ส่วนใหญ่จะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.0-7.0 Teodoro, and Martins (2000) ที่พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *Bacillus* sp. เท่ากับ 6.0 Asgher et al. (2007) พบว่าได้

ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยง *B. subtilis* JS-2004 ที่พีเอช 7.0 ซึ่งเท่ากับพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. thermooleoverans* ที่ศึกษาโดย Narang, and Satyanarayana (2001)

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ว่าเป็น Psychrophile Mesophile หรือ Thermophile ตามปกติแบคทีเรียมักมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสค่อนข้างกว้าง โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เช่น *B. amyloliquefaciens* *B. licheniformis* *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ในช่วงอุณหภูมิ 37-60 องศาเซลเซียส (Sivaramakrishnan et al., 2006) จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. stearothermophilus* MFF4 ที่ศึกษาโดย Wind et al. (1994) และ *B. subtilis* ที่แยกได้จากน้ำนมแกะ ที่ศึกษาโดย Konsula and Liakopoulou-Kyriakides (2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานของ Asgher et al. (2007) ที่พบว่า *B. subtilis* JS-2004 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3. กระบวนการหมักสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.1 การเพาะเลี้ยงแบบ Batch

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรในการผลิตทั้งหมด (Working volume) เท่ากับ 3 ลิตร และใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาตรคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรในการผลิตทั้งหมด โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และควบคุมค่า Dissolved oxygen ให้มากกว่า 0 เปอร์เซ็นต์ แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส การเจริญของจุลินทรีย์และปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท พบว่า การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. licheniformis* มีลักษณะเป็น Growth-associated และมีแบบแผนการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในทำนองเดียวกับผลการวิจัยของ Pazlarova et al. (1984) ที่ได้ศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* แบบ Batch ในถังหมักที่มี Working volume 1.6 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความถี่การหมุน

ของใบกวน (Stirrer frequency) เท่ากับ 10 เฮิร์ทซ์ อัตราการให้อากาศ 1 vvm และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งความเข้มข้น 14 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเคซิเนทความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่มีการควบคุมพีเอช กล่าวคือ มีการผลิตเอนไซม์หลังจากเชื้อเข้าสู่ระยะ Exponential เล็กน้อย และยังคงมีการผลิตเอนไซม์อยู่หลังจากเชื้อเข้าสู่ระยะ Stationary แล้วจึงค่อยลดลง และพบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อนี้มีลักษณะเป็น Growth-associated ส่วนการศึกษาของ Wind et al. (1994) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *B. stearothermophilus* MFF4 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์ในช่วงต้นของระยะ Exponential และได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 5.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร ระหว่างการเจริญในระยะ Exponential ที่ชั่วโมงที่ 6 และพบว่าการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อนี้มีลักษณะเป็น Growth-associated เช่นเดียวกัน โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.44 ต่อชั่วโมง ค่ามวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตร

Davis et al. (1980) ได้รายงานว่า ใน *B. licheniformis* จะมีการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณน้อยระหว่างระยะ Lag และ Exponential แต่จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดในช่วงต้นระยะ Stationary สอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า *B. licheniformis* เริ่มมีการผลิตเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 4 ของการเจริญ คือหลังจากการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ Exponential เล็กน้อย และได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 30.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์จึงเริ่มลดลง

สรุปผลการวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการกระบวนการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแบบ Submerge โดย *B. licheniformis* และมีราคาถูก ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ น้ำแป้งถั่วเหลือง ความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ พีเอชเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะดังกล่าวทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 28.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 34.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีการตัดยีสต์สกัดออกจากสูตรอาหารและมีการแทนที่ทริปโทนด้วยน้ำแป้งถั่วเหลืองเพื่อลดต้นทุนการผลิต

2. เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ Batch ที่สภาวะที่ทำการทดลอง พบว่า การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ของ *B. licheniformis* มีลักษณะเป็น Growth-associated ที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.39 ต่อชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตร ระยะเวลา

ของระยะ Lag (t-lag) เท่ากับ 1.46 ชั่วโมง Doubling time (t-d) เท่ากับ 1.76 ชั่วโมง ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ต่อมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 20060.70 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อสับสเตรท ($Y_{p/s}$)เท่ากับ 2221.45 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุด (Maximum enzyme production rate) เท่ากับ 1253.8 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง และ ค่า Maximum specific activity เท่ากับ 16082.84 หน่วยต่อกรัมโปรตีน

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาถึงองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมควรมีการวัดปริมาณเซลล์แบคทีเรียและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร่วมกับการวัดกิจกรรมเอนไซม์ เพื่อให้สามารถอธิบายผลการวิจัยได้อย่างแม่นยำมากขึ้น

2. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Batch ควรมีการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาช่วยอธิบายการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์อื่น ๆ

บรรณานุกรม

กรมบัญชีกลาง. (2549). *กลุ่มภาคเหนือตอนบนล้านนา (กลุ่ม 1.1)*. วันที่สืบค้นข้อมูล 29 กันยายน 2549, เข้าถึงได้จาก http://www.cgd.go.th/cfo/cfo_data/sutirat/Industry%20Analysis.doc

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2546). *เทคโนโลยีของแป้ง* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2539). *เคมีอาหาร*. เชียงใหม่: ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). *เอนไซม์ทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ลลิต ขำวงษ์รัตนโยธิน. (2548). *การคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งในประเทศไทยที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลัง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สมใจ ศิริโภค. (2544). *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

Aiyer, P. V. D. (2004). Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African Journal of Biotechnology, 3*(10), 519-522.

Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman, S. U., & Legge, R. L. (2007). A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering. 79*, 950-955.

Atkinson, B., & Mavituna, F. (1991). *Biochemical engineering and biotechnology handbook* (2nd ed.). New York: Stockton.

Baig, M. A., Pazlarova, J., & Votruba, J. (1984). Kinetics of alpha-amylase production in a batch and a fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiologia, 29*(5), 359-364.

Choi, D. B., & Park, E. Y. (2006). Enhanced production of mouse α-amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, *41*, 390-397.

Copeland, R. A. (1994). *Methods for protein analysis: A practical guide to laboratory protocols*. New York: Chapman & Hall.

Crabb, W. D., & Shetty, J. K. (1999). Commodity scale production of sugars from starches. *Current Opinion in Microbiology*, *2*, 252-256.

Davis, P. E., Cohen, D. L., & Whitaker, A. (1980). A Production of alpha-amylase in batch and chemostat culture by *Bacillus stearothermophilus*. *Antonie Van Leeuwenhoek, 46*(4), 391-398.

De Geeter, H. (1999, October). Zetmeel in al haar vermen. *Nutrinews*, 15-17. Retrieved September 23, 2006, from http://www.nice-info.be/html/PROF_setNN.htm?http://www.nice-info.be/hTmL/prof/NUTRINEWSONLINE/NNzetmeelIN.htm

Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., & Maiti, B. R. (2001). Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal, 7*, 227-231.

Ferreyra, R., Lorda, G., & Balatti A. (1998). Production of α-amylase in acid cheese whey culture media with automatic pH control. *Revista de Microbiologia, 29*(4), 259-264.

Groom, C. A., Daugulis, A. J., & White, B. N. (1988). Continuous alpha-amylase production using *Bacillus amyloliquefaciens* adsorbed on an ion exchange resin. *Applied Microbiology and Biotechnology, 28*(1), 8-13.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α-amylase: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry, 38*, 1599-1616.

Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Kitayama, K., Ozaki, K., Kawai, S., & Ito, S. (2001). Novel α -amylase that is highly resistant to chelating agents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(4), 1744-1750.

Hamilton, L. M., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M. (1999). Production and properties of the raw starch-digesting α-amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry, 35*, 27-31.

Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J., & Qadeer, M. A. (2003). Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technology, 87*, 57-61.

Haq, I., Rani, S., Ashraf, H., & Qadeer, M. A. (2002). Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Sciences, 2*(2), 73-75.

Huang, H., Ridgeway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. (2003). A segregated model for heterologous amylase production by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology, 32*, 407-413.

_____. (2004). Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy. *Bioprocess and Biosystem Engineering, 27*, 63-69.

Jin, F., Li, Y., Zhang, C., & Yu, H. (2001). Thermostable α-amylase and α-galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp.JF strain. *Process Biochemistry, 36*, 559-564.

Jones, R. C., & Anthony, R. M. (1977). The relationship between nutrient feed rate and specific growth rate in fed batch culture. *Europian Journal of Applied Microbiology. 4*, 87-92.

Kandra, L. (2003). α-Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Theochem), 666–667*, 487–498.

Kim, T. U., Gu, B. G., Jeong, J. Y., Byun, S.M., & Shin, Y. C. (1995). Purification and Characterization of a maltotetraose-forming alkaline (alpha)-amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM8901. *Applied and Environmental Microbiology, 61*(8), 3105-3112.

Konsoula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). Co-production of α-amylase and β-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrate. *Bioresource Technology. 98*, 150-157.

Konsula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α-amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry, 39*, 1745-1749.

Lee, J., & Parulekar, S. J. (1993). Enhanced production of α-amylase in fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* TN106[pAT5]. *Biotechnology and Bioengineering, 42*(10), 1142-1150.

Milner, J. A., Martin, D. J., & Smith, A. (1996). Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology, 18*, 507-512.

_____. (1997). Two-stage inocula for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology, 21*, 382-386.

Mishra, S., Noronha, S. B., & Suraishkumar, G. K. (2005). Increase in enzyme productivity by induced oxidative stress in *Bacillus subtilis* cultures and analysis of its mechanism using microarray data. *Process Biochemistry, 40*(5), 1863-1870.

Morcel, C., Emborg, C., Madsen, S., & Biedermann, K. (1995). α-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* in a membrane recycle bioreactor. *Biotechnology Letters, 17*(6), 643-648.

Narang, S., & Satyanarayana, T. (2001). Thermostable α-amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans. Letters in Applied Microbiology, 32*, 31-35.

Nigam, P., & Singh, D. (1995). Enzyme and microbial system involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology, 17*, 770-778.

Nowjee, N. C., (2004). *Melt processing and foaming of starch.* Retrieved September 23, 2006, from University of Cambridge, Department of Chemical Engineering Web site: http://www.cheng.cam.ac.uk/.../nitin/ProjectPage.html

Park, Y. S., Dohjima, T., & Okabe, M. (1996). Enhanced α-amylase production in recombinant *Bacillus brevis* by fed-batch culture with amino acid control. *Biotechnology and Bioengineering, 49*(1), 36-44.

Pazlarova, J., Baig, M. A., & Votruba, J. (1984). Kinetics of α-amylase production in a batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis* with caseinate as nitrogen source and starch as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology, 20*(5), 311-334.

Saito, N., & Yamamoto, K. (1975). Regulatory factors affecting α-amylase production in *Bacillus licheniformis. Journal of Bacteriology, 121*(3), 848-856.

Santos, E. O., & Martins, M. L. L. (2003). Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 46*(1), 129-134.

Sarikaya, E. (2000). Increase of the α-amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turkish Journal of Biology, 24*, 299-308.

Shiina, S., Ohshima, T., & Sato, M. (in press). Extracellular production of α-amylase during fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using pulsed electric field. *Journal of Electrostatics.*

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). α-Amylases from microbial sources– An overview on Recent Developments. *Food Technology and Biotechnology, 44*(2), 173-184.

Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., & Soni, S. K. (2005). Production of a thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry, 40*, 525-534.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (1995). *Principles of fermentation technology* (2nd ed.). Oxford: Pergamon .

Syu, M. J., & Chen, Y. H. (1997). A study on the α-amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens. Chemical Engineering Journal, 65*, 237-247.

Tanyildizi, M. S., Ozer, D., & Elibol M. (2005). Optimization of α-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry, 40,* 2291-2296.

Teodoro, C. E. S., & Martins, M. L. L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology. 31*, 298-302.

Van der Maarel, M. J. E. C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of Biotechnology, 94*, 137-155.

Warren, R. A. J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Reviews of Microbiology, 50*, 183-212.

Waterborg, J. H. & Matthews, H. R. (1994). The Lowry method for protein quantitation. In J. M. Walker (Ed), *Methods in molecular biology volume 32 : Basic protein and peptide protocols.* New Jersey: Humana.

Wind, R. D., Buitelaar, R. M., Eggink, G., Huizing, H. J., & Dijkhuizen, L. (1994). Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolste : A highly thermostable α-amylase producing strain. *Applied Microbiology and Biotechnology, 41*, 155-162.

Yabuki, M., Ono, N., Hoshino, K., & Fukui, S. (1977). Rapid induction of alpha-amylase by nongrowing mycelia of *Aspergillus oryzae. Applied and Environmental Microbiology, 34*(1), 1-6.

Yoo, Y. J., Cadman, T. W., Hong, J., & Hatch, R. T. (1988). Fed-batch fermentation for the production of α-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering, 31*(5), 426-432.

Yuguo, Z., Zhao, W., & Xiaolong, C. (2000). α-Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal, 5*, 115-121.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar ที่มี Soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ (Hamilton et al., 1999)

Soluble starch	10	กรัมต่อลิตร
เนื้อสกัด	3	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient broth ที่มี Soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ (Hamilton et al., 1999)

Soluble starch	10	กรัมต่อลิตร
เนื้อสกัด	3	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Inoculum medium (ดัดแปลงจาก Hamilton et al., 1999)

Soluble starch	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	2	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	10	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.05	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	0.0015	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Production medium (ดัดแปลงจาก Jin et al., 2001)

แป้งมันสำปะหลัง	10	กรัมต่อลิตร
ทริปโทน	4	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	0.002	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
Tween80	10	เปอร์เซ็นต์

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. **Nutrient broth**

เนื้อสกัด	3	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

สารเคมี

1. สารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 5.5

1.1 เตรียมสารละลายดังนี้

1.1.1 สารละลาย A คือ กรดอะซิติก (CH_3COOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยละลายกรดอะซิติก 30.025 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลาย B คือ โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) เตรียมโดยละลายโซเดียมอะซิเตทแอนไฮดรัส 24.73 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

1.2 ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกันจนได้พีเอชเท่ากับ 5.5 โดยวัดพีเอชระหว่างผสมด้วยเครื่องวัดพีเอช

2. สารละลายไอโอดีน

2.1 ละลายไอโอดีน 0.0317 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.1 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.2 ปรับปริมาตรเป็น1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

ละลายฟีนอล 5.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. Alkaline copper solution

5.1 เตรียมสารละลายดังนี้

5.1.1 สารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

5.1.2 สารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

5.1.3 สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

5.2 เติมสารละลายข้อ 5.1.2 และ 5.1.3 อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายข้อ 5.1.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (สารละลายนี้เตรียมเมื่อใช้)

รายงานวิจัย II

เรื่อง

“การปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสำหรับย่อยแป้งมันสำปะหลัง
Optimum Conditions and Production of Glucoamylase for Cassava Starch Hydrolysis

คณะผู้วิจัย

เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์

ศิริโฉม ทุ่งเก้า

เยาภา ไหวพริบ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยสภาวะที่เหมาะสมและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ครั้งนี้ ได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากแหล่งต่าง ๆ จากโครงการวิจัยการคัดเลือกจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 โดยได้ให้ความสำคัญกับการศึกษาเพื่อปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงให้เหมาะสมสำหรับหารผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 แบบกะ คือ การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ในส่วนของสารอาหารสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ soluble starch ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ของ Uguru et al., (1997) ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์สูงสุดคือแป้งถั่วเหลืองร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่หาจากส่วนของ crude enzyme โดยรวมเท่ากับ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร และจากการทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในถังหมักพบว่าให้ผลดี

สารบัญ

หน้า

บทที่

1. บทนำ..... 84

2. การตรวจเอกสาร..... 86

3. วิธีดำเนินการวิจัย..... 90

4. ผลและอภิปรายผลการวิจัย..... 95

5. สรุปผลการวิจัย..... 105

ภาคผนวก..... 106

เอการอ้างอิง 108

บทที่ 1
บทนำ

มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก หาซื้อง่าย และทำการปลูกในประเทศไทยทางภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่เจริญได้ง่ายแม้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ในสภาวะแห้งแล้ง มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีการส่งออกเป็นอันดับสองรองจากข้าว และประเทศไทยเป็นประเทศที่ทำการส่งออกแป้งมันสำปะหลังเป็นอันดับหนึ่งของโลกแต่ปัจจุบันปริมาณการส่งออกเริ่มไม่แน่นอน เนื่องจากแป้งแต่ละชนิดสามารถนำมาใช้ทดแทนกันได้เพราะมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าจึงนิยมใช้แป้งที่ผลิตในประเทศเป็นหลัก เป็นผลให้ผลผลิตแป้งมันสำปะหลังล้นตลาดสร้างปัญหาให้กับเกษตรกรอย่างมาก จึงมีการศึกษาที่จะนำเอาแป้งมันสำปะหลัง มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ เช่น การผลิตแอลกอฮอล์ เพื่อใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีราคาสูงในปัจจุบัน อีกรูปแบบหนึ่งของการนำเอาแป้งมันสำปะหลังมาเพิ่มมูลค่า คือการนำเอาไปใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปแป้ง

ปัจจุบันมีโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศหลายโรงงานที่แปรรูปแป้งเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น กลูโคส ฟลุคโตส และซอร์บิทอล โดยใช้กระบวนการทางเคมี อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตทางชีวภาพ โดยการใช้เอนไซม์กำลังได้รับความนิยมมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมในอุตสาหกรรมแปรรูปแป้ง ได้แก่ อะไมเลส กลูโคอะไมเลส พูลลูลาเนส เนื่องจากมีข้อได้เปรียบมากกว่ากระบวนการทางเคมี โดยเฉพาะการให้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข่างบริสุทธิ์ ความจำเพาะของปฏิกิริยา และการเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิและความดันปกติ อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ อาจพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และผลิตภัณฑ์มีคุณภาพมากขึ้นได้อีก นอกจากการคัดเลือกแหล่งเอนไซม์เพื่อใช้ในกระวานการผลิตแล้ว การปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ ก็เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาอุตสาหกรรมแปรรูปแป้ง

การปรับปรุงสภาวะเหมาะสมของการเลี้ยงจุลินทรีย์บนเครื่องเขย่า และในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นสิ่งสำคัญเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นในการเพิ่มศักยภาพ ในการเพิ่มผลผลิตและการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งมีความสามารถในการย่อยแป้งที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ก่อนที่จะนำไปสู่การผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อใช้ย่อยสลายแป้งมัน โดยการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า
2. เพื่อศึกษาจลศาสตร์ของการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในสภาวะที่เหมาะสม

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

เอนไซม์ในกลุ่ม Extra cellular enzyme ที่สามารถย่อยสลายโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลง สามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งในแบคทีเรีย รา และยีสต์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตเบียร์ การซักฟอก ยา สิ่งทอ การผลิตกระดาษ ตลอดจนเภสัชกรรม ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งนี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. Endo-amylase เป็นเอนไซม์ชนิด Endo-activity enzyme ซึ่งย่อยโมเลกุลของแป้ง โดยตัดที่พันธะ α-1,4- glucosidic linkage ภายในโมเลกุลของสายอะไมโลสและอะไมโลเพ็คตินที่จับกันอยู่ เป็นการทำงานแบบสุ่ม ในกรณีที่มีการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้ น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลกลูโคส แต่ถ้าปฏิกิริยาการย่อยไม่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลออกมาหลายชนิดเช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส และเด็กสติน เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) (α-1,4-glucan-glucanohydrolase) (EC 3.2.1.1) กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้เช่น *Aspergillus niger* , *Aspergillus oryzae* , *Bacillus subtillis* , *Bacillus stearothemophillus* , *Endomycopsi fiburtonii* เป็นต้น

2. Exo-amylase เป็นเอนไซม์ชนิด Exo-acting enzyme ซึ่งย่อยสลายแป้งจากด้านปลายของ non-reducing end ของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินเข้ามา เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ เบต้าอะไมเลส (β-amylase) โดยจะย่อยแป้งเฉพาะพันธะ α-1,4 ได้ผลิตภัณฑ์คือ เบต้ามอลโตส (β-moltose) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เบต้าอะไมเลสได้แก่ *Bacillus cereus* , *Bacillus polymyxa* ซึ่งมีความแตกต่างจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) (amyloglucosidase) (EC 3.2.1.3) ที่สามารถย่อยโมเลกุลของแป้งได้ทั้งที่พันธะ α-1,4 และ α-1,6-glucosidic linkage กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น *Aspergillus* , *Penicillium, Rhizopus* , *Saccharomyces* , *Flavobacterium* sp. , *Amylomyces rouxii* และ *Bacillus stearothemophillus*

3. Debranching enzyme เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย α-1,6 glucosidic linkage ของอะไมโลเพคติน เด็กสตินที่มีกิ่งก้าน ไกลโคเจน รวมทั้งสารโอลิโกแซคคาไรด์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และพูนลูลาเนส (pullulanase) เอนไซม์ไอโซอะไมเลสจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีสายโซ่ที่สั้นซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2-3 หน่วย และโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง กลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ *Bacillus amyleliquefaciens* ATCC 23350 , *Saccharomyces cerevisiae* , *Flavobacterium* sp. , *Pseudomonas amyloderamosa* SB-15 เป็นต้น ส่วนเอนไซม์พูนลูลาเนสสามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์ที่มีกิ่งก้านได้ ซึ่งรวมทั้งพูลลูแลนซึ่ง

เอนไซม์ไอโซอะไมเลสไม่สามารถย่อยได้ กลุ่มจุลินทรีย์ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ได้เช่น *Aurebasidium pullulans* , *Bacillus acidopullulyticus* , *Bacillus sterothermophilus* เป็นต้น

การผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยแป้งนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้วปัจจัยภายนอกยังมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เช่นกัน ซึ่งได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร ซึ่งหมายถึง แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิตามิน และเกลือแร่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านกายภาพ เช่น อุณหภูมิในการหมัก ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ และการกวน เป็นต้น

การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปแป้งและสับสเตรทที่เกี่ยวข้องจะเป็นตัวชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ได้แก่ เกลือแอมโมเนีย เปปโตน ยีสต์สกัด เป็นต้น

ในการศึกษาการปรับปรุงสถาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเอนไซม์ในการสลายแป้งมันสำปะหลัง โดยกรองจันทร์ (2548) รายงานไว้ดังนี้ John et al., (1962) ได้ศึกษษคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus niger* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97,000 ส่วน *Aspergillus oryzae* M-13 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 52,000 มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่ 5.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส ส่วนการเลี้ยงยีสต์ *Schwanniomyces alluvis* เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในสูตรอาหารที่มีน้ำแป้ง 0.2 เปอร์เซ็นต์ และมีวิตามินแร่ธาตุต่างๆ ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการให้อากาศ 3 : 1 (air : medium, v/v) ต่อชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการกวนตลอดการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อมีการเติมอากาศตลอดการทดลอง พบว่ามีการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 14 ซึ่งเป็นระยะการเจริญแบบ exponential phase ค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงจาก 6 เป็น 4 (Simoes et al., 1984)

Li et al., (1998) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยแป้ง (soluble starch) อะไมโลส อะไมโลเพคติน เดกซตริน ไกลโคเจน และมอลโตสได้ พบว่าแป้งเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเท่ากับ 5.0

Feng et al., (2002) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Thermoanaerobacterium themosaccharolyticum* ATCC 7956 เมื่อใช้แป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 กับกลูโคสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อใช้แป้งเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าสูงสุด ในขณะที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่น

กลูโคส ไซโลส ฟรุกโตส จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพราะให้พลังงานมากพอแก่การเจริญโดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อยแป้ง

Sadhukhan et al., (1990) ทำการ ศึกษาการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มอะไมโลไลติกจากเชื้อรา *Myeeliophthora thermophila* D14 (ATCC 48 104) ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยได้ทดลองใช้โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรา พบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทกับโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้การเจริญของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์มีลักษณะคล้ายกันคือให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างสูง ในส่วนของกรดอะมิโนพบว่าฟีนิลอะลานีนและฮีสติดีนจะกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลสแต่จะให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ยังเลี้ยงเชื้อราในสภาวะอุณหภูมิในช่วง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อราสังเคราะห์เอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และสังเคราะห์ได้ต่ำเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสและสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส

Pandey et al., (1994) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A.* niger ที่เจริญบนอาหารแข็งที่มีลำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมฟอสเฟต ปริมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) กับเปปโตน (peptone) ปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ผลการทดลองพบว่าน้ำแช่ข้าวโพด เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟตส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าสูงขึ้น

Morita and Fujio (2000) ซึ่งศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการย่อยแป้งดิบโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ MKU 40 ในอาหารเหลวที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ นีโอเปปโตน (neopeptone) เคซีนจากนม (milk casein) และเนื้อสกัด (meat extract) ผลการทดลองพบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นสูงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ MKU 40 มีค่าลดลง

Sukara and Doelle (1989) ได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากหัวมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* สายพันธุ์ UQM 186F พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมได้แก่อุณหภูมิในช่วง 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอยู่ในช่วง 4.5 ถึง 5.0

Jin et al., (1999) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* สายพันธุ์ DAR 2710 จากน้ำทิ้งจากการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง (starch processing wastewater) พบว่าที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส มีผล

ทำให้เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูง และพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 ส่งผลให้มีการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในปริมาณสูง

Okolo et al., (1995) รายงานว่า *Aspergillus niger* ที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่เน่าเสียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบในมันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้างฟ่าง และ soluble starch ได้ โดยเอนไซม์ที่ได้ประกอบด้วยอะไมเลสอย่างน้อย 2 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส จากการทำลองพบว่า สับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา คือ แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้างฟ่าง ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแหล่งของแป้งมีอิทธิพลต่อการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบเท่ากับ 6.0

Goto et al., (1998) ได้ศึกษาการผลิตชีวมวลและกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจาก *Aspergillus fumigatus* ที่ใช้ α-methyl-D-glucoside ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับมอลโตสเป็นสับสเตรท จากการทดลองพบเอนไซม์อะไมเลสทั้งชนิดแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ต่างกันคือ แป้ง มอลโตส และ α-methyl-D-glucoside พบว่า แป้ง และมอลโตสให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน

Selvakumar et al., (1998) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus niger* โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่มีของเสียจากการผลิตชาผงเป็นสับสเตรท พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด 198.4 หน่วยต่อกรัมของสับสเตรท เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่มีความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้หัวเชื้อ 4 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงเชื้อนาน 96 ชั่วโมง

Ellaiah et al., (2002) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยการหมักบนอาหารแข็งด้วย *Aspergillus* sp. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พบว่า สับสเตรทที่เหมาะสมที่สุดคือ แป้งข้าวสาลี ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นน้ำตาลฟรุคโตส และแหล่งในโตรเจนที่เหมาะสมคือ ยูเรีย

Harpreet and Sanjeev (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส เพื่อใช้ย่อยแป้งสุก ด้วย *Aspergillus oryzae* HS-3 ในการหมักบนอาหารแข็งพบว่าสับสเตรทที่เหมาะสมคือ แป้งสาลี แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือน้ำตาลแลคโตสและน้ำนมถั่วเหลือง ตามลำดับ โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟุริก (ดัดแปลงจาก Dubois, 1956)

1.1 วิธีการวิเคราะห์

1.1.1 ปีเปตต์ตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

1.1.2 เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดตัวอย่างในข้อ 1.1 ผสมให้เข้ากัน

1.1.3 เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.1.4 นำไปแช่น้ำเย็นเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 488 นาโนเมตร

1.1.5 เทียบหาความเข้มข้นของแป้งกับกราฟมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง

1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง

1.2.1 เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งแป้งมันสำปะหลัง 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2.2 เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2.3 ปีเปตต์สารละลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่าง ๆ 1.0 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยาตามข้อ 2.1

1.2.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 488 นาโนเมตร ที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 488 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (ดัดแปลงจาก Waterborg and Matthews, 1994)

2.1 วิธีการวิเคราะห์

2.1.1 ปีเปตต์ตัวอย่าง ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาด

2.1.2 เติม Alkaline copper solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.1.3 เติม Folin ciocaltue reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดย Blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

2.1.5 เทียบหาความเข้มข้นของโปรตีนกับกราฟมาตรฐาน BSA

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

2.2.1 เตรียมสารละลาย BSA 3000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 0.3 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยปิเปตต์สารละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ 1.0 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยาตามข้อ 2.1

2.2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของ BSA

3. การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งโดยเทียบจากปริมาณโปรตีนในเซลล์ (ดัดแปลงจาก Waterborg and Matthews, 1994)

3.1 การเตรียมเซลล์อบแห้ง

3.1.1 ปิเปตต์น้ำเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 16 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.2 เก็บส่วน Supernatant ใส่ในหลอดใหม่ เป็นส่วนของเอนไซม์ที่แยกได้

3.1.3 ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น

3.1.4 นำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.1.3 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

3.1.5 ใช้แท่งแก้วบดตะกอนเซลล์แห้งที่ได้ให้เป็นอนุภาคขนาดเล็ก

3.2 การสกัดโปรตีน

3.2.1 ปิเปตต์สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในตะกอนเซลล์แห้งที่เตรียมได้ ผสมให้เข้ากัน

3.2.2 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3.2.4 เก็บส่วน Supernatant ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ดังวิธีการในข้อ 2

3.2.5 คำนวณกลับให้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าที่ได้ไปเทียบหาน้ำหนักเซลล์แห้งจากกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาณโปรตีนในเซลล์

3.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาณโปรตีนในเซลล์

3.3.1 เตรียมเซลล์โดยเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเตรียมเซลล์อบแห้ง ดังวิธีการในข้อ 3.1 แต่ไม่ต้องเก็บส่วน Supernatant โดยพยายามให้ได้ตะกอนเซลล์มากที่สุด

3.3.3 ชั่งเซลล์อบแห้งที่ได้ใส่หลอดไมโครทิวบ์ที่แห้งและสะอาด ให้มีน้ำหนักเท่ากับ 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัม

3.3.4 นำไปสกัดโปรตีนดังวิธีการในข้อ 3.2 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.3.5 วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ดังวิธีการในข้อ 2

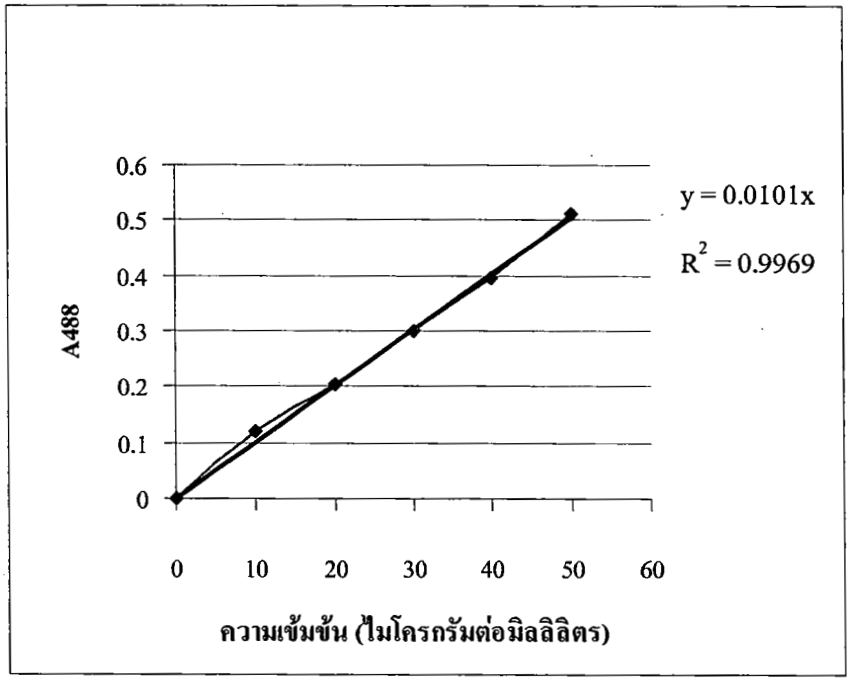
3.3.6 นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาณโปรตีนในเซลล์

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง

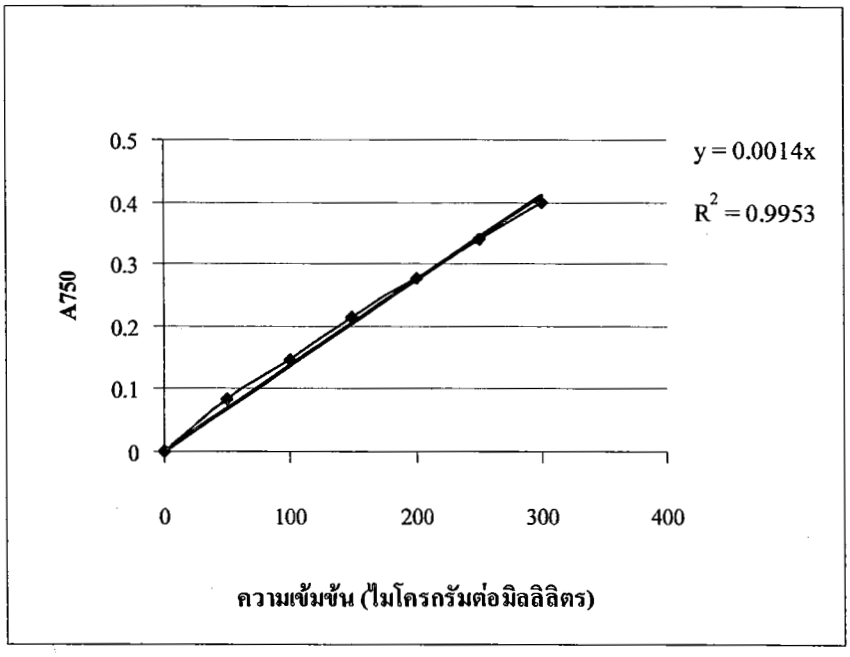
เตรียมโดยวิธี ฟีนอล-ซัลฟุริก แสดงดังภาพที่ ค-1



ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานแป้งมันสำปะหลังที่เตรียมโดยวิธี ฟีนอล-ซัลฟุริก

2. กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

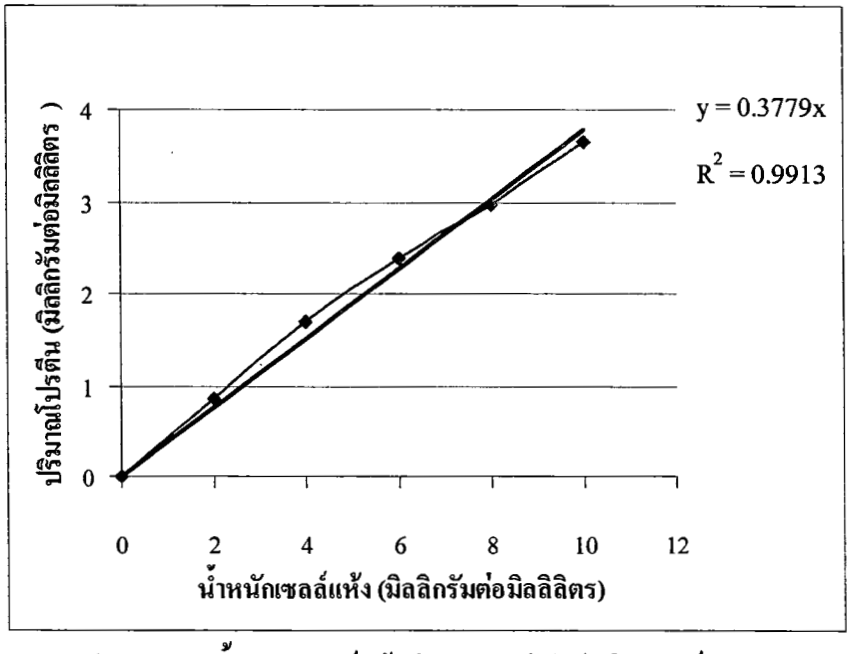
เตรียมโดยวิธี Lowry แสดงดังภาพที่ ค-2



ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐาน BSA ที่เตรียมโดยวิธี Lowry

3. กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาณโปรตีนในเซลล์

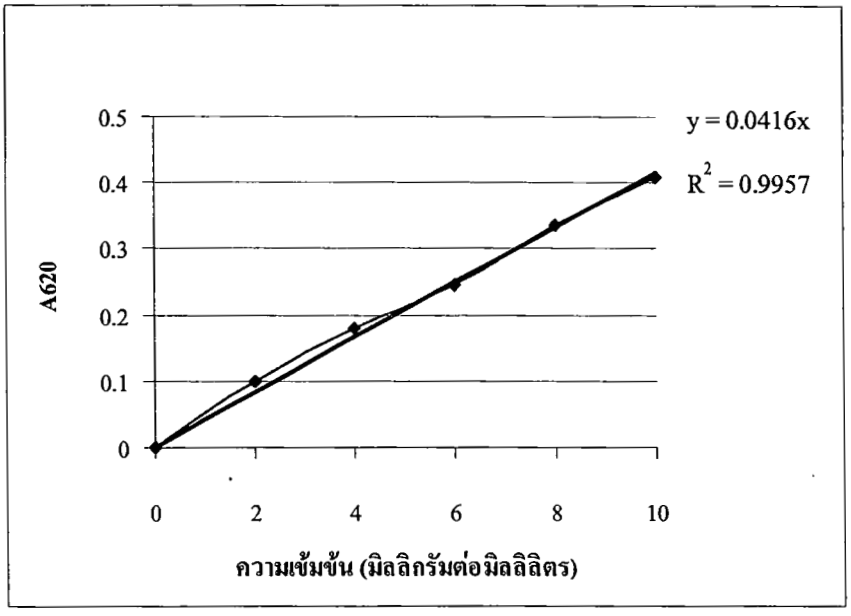
เตรียมดังวิธีที่แสดงในภาคผนวก ข ได้ผลดังภาพที่ ค-3



ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาณโปรตีนในเซลล์

4. กราฟมาตรฐานแป้ง

เตรียมโดยวิธี Iodometric แสดงดังภาพที่ ค-4



ภาพที่ ค-4 กราฟมาตรฐานแป้งที่เตรียมโดยวิธี Iodometric

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์จาก นางสาวลลิต ขำวงษ์รัตนโยธิน นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งได้แก่ *Aspergillus* sp. LK 90 (คัดแยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง "สามชัยพืชผล" อ. เสิงสาง จ. นครราชสีมา)

โดยจุลินทรีย์นี้เป็นเชื้อที่คัดเลือกได้จากการดำเนินงานการวิจัยตามโครงการ "การคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย สำหรับผลิตเอนไซม์สลายแป้งมันสำปะหลัง" ในปีงบประมาณ 2547 และสมควรดำเนินการศึกษาต่อเนื่องเพื่อประเมินความเหมาะสมและ/หรือกำหนดแนวทางการพัฒนาเพื่อนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ต่อไป

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 เครื่องมือ

2.1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Visible Spectrophotometer)

2.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

2.1.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ

2.1.4 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

2.1.5 เครื่องเขย่า

2.1.6 เครื่องวัดพีเอช

2.1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.1.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.1.9 เครื่องปั่นผสมสาร

2.2 วัสดุอุปกรณ์

2.2.1 ปิเปตสำหรับดูดสารน้อย

2.2.2 หลอดทอลอง

2.3 สารเคมี

2.3.1 3,5-dinitrosalisylic acid

2.3.2 Sodium Hydroxide

2.3.3 Hydrochloric acid

2.2.4 1 M acetate buffer

2.2.5 Dinitrosalisylic acid (DNS)

2.3.6 Yeast extract

2.3.7 Soya bean powder

2.3.8 Ammonium Nitrate NH_2CONH_2

2.3.9 Ammonium Chloride NH_4Cl

2.3.10 Ammonium Sulphate $(NH_4)_2SO_4$

2.3.11 Sodium Nitrate $NaNO_3$

2.3.12 soluble starch

2.3.13 Cassava starch

2.3.14 Potassium Dihydrogen Orthophosphate KH_2PO_4

2.3.15 Magnesium Sulphate $MgSO_4.7H_2O$

2.3.16 Iron (II) Sulphate $FeSO_4.7H_2O$

2.3.17 Potassium Chloride KCl

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose agar
2. Medium for Production

3. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อจุลินทรีย์

สำหรับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 ได้ดำเนินการโดยการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเอียง (PDA+1 % soluble starch w/w) บ่มที่อุณหภูมิห้องจนมีการเพิ่มปริมาณของสปอร์ได้มากเพียงพอ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน จากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ (Ufuru et al., 1997) โดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 170 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาส่วนใสนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยวิธี DNS method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Miller (1959)

2. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรเลี้ยงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ เทียบกับการเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปร เพื่อหาแหล่งคาร์บอนทดแทน soluble starch ที่ใช้อยู่ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์

โดยศึกษาเปรียบเทียบความเป็นไปได้ของการใช้แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังเส้น และกากมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอนแทน soluble starch โดยใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสามชนิดในช่วง 1 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนสารอาหารอื่นนอกจาก soluble starch ยังคงใช้เหมือนกับสูตรอาหารปกติ ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในสภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากการย่อยแป้งโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยวิธี DNS method

3. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ในสูตรอาหารประยุกต์ที่ใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ soluble starch ที่คัดเลือกได้จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ สำหรับการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมได้ดำเนินการโดยการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการใช้แหล่งอาหารไนโตรเจน 6 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ แป้งถั่วเหลือง แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรท ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณต่างกัน โดยใช้แหล่งอาหารไนโตรเจนทั้งหมดนี้ในช่วง 1 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ โดยนำหนักต่อปริมาตร ส่วนอาหารอื่นใช้ในปริมาณเท่ากับสูตรอาหารชุดควบคุม ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งโดยใช้วิธี DNS method นำผลการทำลองที่ได้ไปใช้ในการทดลองข้อถัดไป

4. การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ดำเนินการโดยการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ในสูตรอาหารดัดแปร โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากการศึกษาที่กล่าวถึงแล้วข้างต้น โดยการกำหนดให้สารอาหารอื่นคงที่ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 5 ถึง 7 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อไปนี้ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งโดยใช้วิธี DNS method นำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ในการทดลองข้อถัดไป

5. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่คัดเลือกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ทำการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดทดลองอาหารวุ้นเอียงบ่มที่อุณหภูมิห้องจนมีปริมาณของสปอร์ได้มากเพียงพอซึ่งใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน จากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาข้างต้น โดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ

ไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราการกวนของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ อัตราการเจริญสูงสุด ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งได้แบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งไปใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยใช้วิธี DNS method

วิธีการวิเคราะห์

1. วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalisylic acid (DNS method) (ดัดแปลงจาก Fujio and Morita, 1997)

1.1 ชุดทดลอง [RS = reducing sugar (sample)] เพื่อหากิจกรรมการย่อยแป้ง ทำโดย ปิเปต 1 % soluble starch ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง

1.2 เจือจางตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ (Crude enzyme คือ ส่วนน้ำหมัก หรือ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์) ด้วย 1 M acetate buffer (ภาคผนวก) โดยมีปริมาตรรวมเท่ากับ 500 ไมโครลิตร (ซึ่งอาจจะต้องทำการเจือจางโดยบัฟเฟอร์ 20 40 60 80 100 เท่าก็ได้ หรืออาจมากกว่า)

1.3 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.4 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที นำไปแช่ในน้ำเย็นต่ออีก 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

1.6 ชุดควบคุม RS (control) ทำเช่นเดียวกับชุดทดลอง ไม่เติมสารละลาย 1% soluble starch แต่ใช้ acetate buffer แทน และใช้ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์เท่ากับข้อ 1.2 โดยมีปริมาตรรวมเท่ากับ 500 ไมโครลิตร

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์

นำค่าที่อ่านได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ดังนี้

ชุดทดลอง RS sample

ชุดทดลอง RS control

การคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)} = \frac{(RSsample - RScontrol)xDilution}{\text{Slope of Standard curve}}$$

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

1 หน่วย (Unit) ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปของกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่กำหนด

2. การวัดการเจริญของเชื้อ

วัดโดยการหาน้ำหนักแห้ง

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการวิจัยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากการดำเนินงานการวิจัยตามโครงการการคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยสำหรับผลิตเอนไซม์สลายแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วย

1. การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 ให้เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

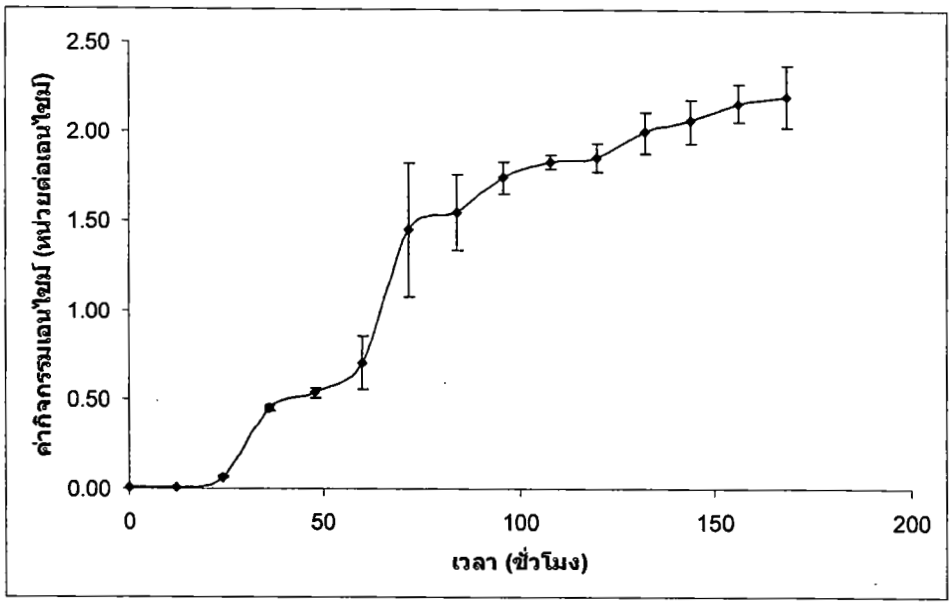
2. ลักษณะจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงให้เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเปรียบเทียบกับจลนพลศาสตร์การเจริญในสภาวะการเลี้ยงเริ่มต้น

4.1 การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 ให้เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

4.1.1 จลนศาสตร์การเจริญของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะ

การศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญแบบกะของ *Aspergillus* sp. LK 90 เป็นการศึกษษเบื้อต้นเพื่อนำเอาข้อมูลรูปแบบการเจริญของเชื้อมาใช้ในการกำหนดแนวทางการศึกษาเพื่อปรับปรุงสภาพการเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ต่อไป ทั้งนี้ได้นำเชื้อต้นแบบบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น PDA (+1% soluble starch) เพื่อเพาะสปอร์ของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน จากนั้นย้ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Uguru et al., 1997) โดยใช้สปอร์เริ่มต้น เท่ากับ 5×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญของเชื้อโดยเก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์จลนพลศาสตร์การเจริญด้วยวิธี DNS method

ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของ *Aspergillus* sp. LK 90 แสดงในภาพที่ 4-1 พบว่า *Aspergillus* sp. LK 90 สามารถเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงได้ดี โดยเข้าสู่ระยะการเจริญก้าวหน้าหลังชั่วโมงที่ 60 ของการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า มีอัตราการเจริญก้าวหน้าสูงสุดอยู่ในช่วง ชั่วโมงที่ 60 ถึง 72 และเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่หลัง 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-1 ลักษณะการเจริญของ *Aspergillus* sp. LK 90

เตรียมหัวเชื้อราโดยการนำเชื้อต้นแบบบริสุทธิ์มาเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น PDA (+1% soluble starch) เพื่อเพาะสปอร์ของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน จากนั้นย้ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Uguru et al., 1997) โดยใช้สปอร์เริ่มต้น เท่ากับ 5 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญของเชื้อโดยเก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์จลนพลศาสตร์การเจริญด้วยวิธี DNS method

4.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะ

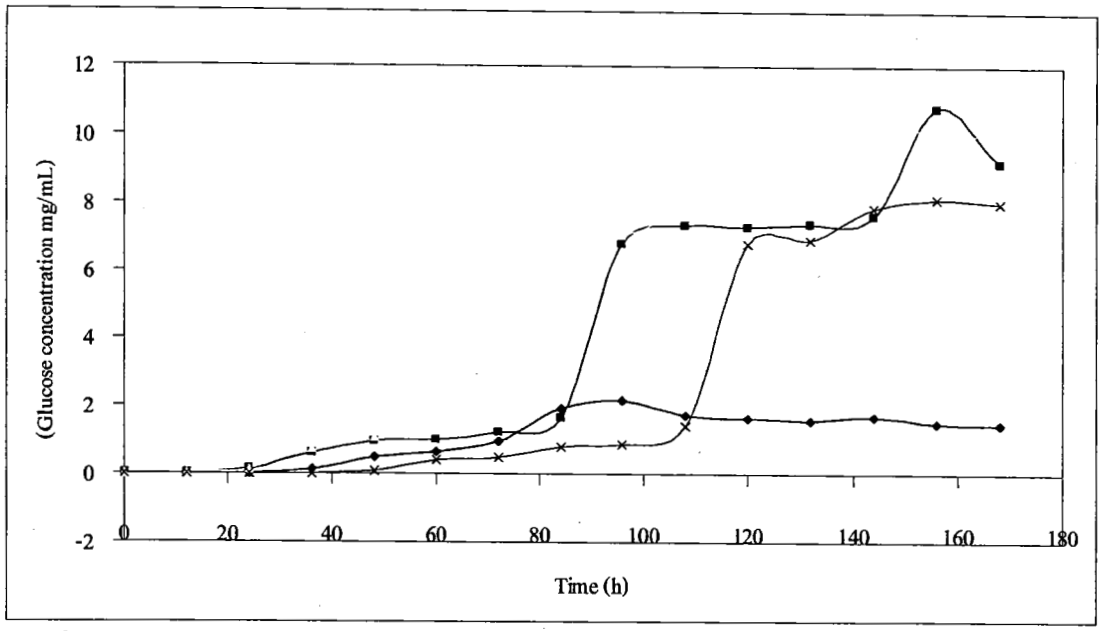
การศึกษาเพื่อคัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม สำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังเส้น และกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน soluble starch ที่ใช้อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น PDA (+1 % soluble starch) เพื่อเพาะสปอร์ของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน จากนั้นย้ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Uguru et al. (1997) โดยใช้สปอร์เริ่มต้น เท่ากับ 5 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปร ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังเส้นและกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนแทน soluble starch ในปริมาณร้อยละ 1 ถึง 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์

ตารางที่ 4-1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งเฉลี่ยสูงสุดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปรแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

แหล่งคาร์บอน	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ)
Soluble starch	1.93 ± 0.24	100
แป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 1	7.33 ± 3.37	379.79
แป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2	7.76 ± 1.55	402.07
แป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2	6.79 ± 2.47	402.07
มันสำปะหลังเส้น ร้อยละ 1	7.33 ± 3.37	221.24
มันสำปะหลังเส้น ร้อยละ 2	1.77 ± 0.08	91.70
มันสำปะหลังเส้น ร้อยละ 2	4.47 ± 1.20	231.60
กากมันสำปะหลัง ร้อยละ 1	5.69 ± 2.84	231.60
กากมันสำปะหลัง ร้อยละ 2	9.20 ± 3.37	231.60
กากมันสำปะหลัง ร้อยละ 1	5.00 ± 1.00	259.06

หมายเหตุ 1) ในชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มี Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน (Uguru et al., 1997) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปรใช้แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังเส้น และกากมันสำปะหลังในประมาณร้อยละ 1 ถึง 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที



ภาพที่ 4-3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปรที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณร้อยละ 1(■) ร้อยละ 2 (▲) ร้อยละ 3 (X) โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารควบคุมที่ใช้ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน (◆) โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

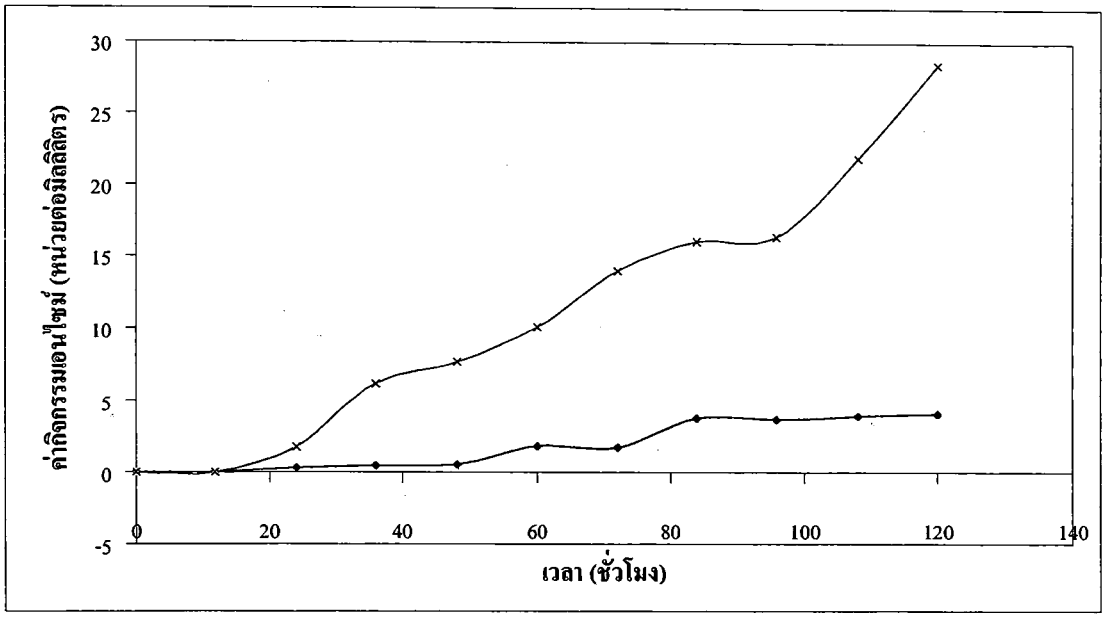
สำหรับผลการศึกษาที่ได้จากการเลี้ยง *Aspergillus* sp. LK 90 ในอาหารดัดแปรที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจาก soluble starch เป็นแป้งมันสำปะหลังในปริมาณร้อยละ 1 ถึง ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แสดงไว้ในภาพที่ 4-3 พบว่า ในอาหารดัดแปรที่ใช้แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เฉลี่ยสูงสุด คือ 7.76 $\pm$ 1.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 400 ของชุดควบคุม รองลงมาคือการใช้แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 1 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 7.33 $\pm$ 3.37 ซึ่งการใช้แป้งมันสำปะหลังจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุมในทุกความเข้มข้น

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *Aspergillus* sp. LK 90 ในการปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

4.1.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

การศึกษาเพื่อคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะ ได้ดำเนินการโดยนำ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่อยู่ในระยะของสปอร์มาเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปรซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แหล่งไนโตรเจน

เมื่อศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ด้วยอาหารดัดแปรซึ่งใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังแสดงในภาพที่ 4-4 พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารดัดแปรที่มีแป้งถั่วเหลืองร้อยละ 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด



ภาพที่ 4-4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปรที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ แป้งถั่วเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณร้อยละ 2 (▲) และ ร้อยละ 3 (X) โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (◆) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้แป้งถั่วเหลืองร้อยละ 3 เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับ *Aspergillus* sp. LK 90 ในการปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

4.1.4 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะ

การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ดำเนินการโดยการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ในสูตรอาหารดัดแปร โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2 แหล่งคาร์บอน และใช้แป้งถั่วเหลือง ร้อยละ 3 เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยการกำหนดให้สารอาหารอื่นคงที่ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 5.0 ถึง 7.0 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อไปนี้ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เก็บตัวอย่าง

ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ดำเนินการโดยการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ในสูตรอาหารดัดแปร โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 2 แหล่งคาร์บอน และใช้แป้งถั่วเหลือง ร้อยละ 3 เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด (12.73 $\pm$ 1.17) คิดเป็นร้อยละ 565.77 ของชุดควบคุม ถัดมาเป็นช่วงอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 และ 7 ตามลำดับ (12.58 $\pm$ 0.75 และ 12.41 $\pm$ 1.00) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่ากิจกรรมเอนไซม์แล้วค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 5-7 ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus* sp. LK 90

ตารางที่ 4-3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ในอาหารดัดแปรแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นและอุณหภูมิต่างกันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

แหล่งไนโตรเจน	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ)
ชุดควบคุม	2.25 $\pm$ 0.41	100
25 °C : pH 5.0	10.42 $\pm$ 0.52	463.11
25 °C: pH 6.0	11.99 $\pm$ 0.91	532.88
25 °C: pH 6.0	10.95 $\pm$ 1.42	486.66
25 °C: pH 6.0	12.73 $\pm$ 1.17	565.77
30°C: pH 6.0	12.58 $\pm$ 0.75	559.11
30 °C: pH 7.0	12.41 $\pm$ 1.00	551.55
25 °C: pH 6.0	11.45 $\pm$ 1.14	532.88
25 °C: pH 6.0	11.56 $\pm$ 0.77	565.77
30 °C: pH 7.0	10.41 $\pm$ 1.33	486.66

หมายเหตุ 1) ในชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มี Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน (Uguru et al., 1997) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปรใช้แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แป้งถั่วเหลือง ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 6 และ 7 ตามลำดับ

2) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

4.2 ลักษณะจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *Aspergillus* sp. LK 90 ภายหลังการปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงให้เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของ *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เลี้ยงในอาหารดัดแปรที่ได้จากการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้ดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง จากรายงานของ Uguru et al., (1997) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ soluble starch และใช้แป้งถั่วเหลืองร้อนละ 3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนสารอาหารอื่นๆ มีค่าคงที่ตามสูตรอาหารดั้งเดิมโดยไม่ต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราการกวนของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ อัตราการเจริญสูงสุด ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งได้แบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งไปใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยใช้วิธี DNS method

ตารางที่ 4-4 การสร้างชีวมวล ความสามารถในการรีดิวซ์น้ำตาล และค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 ที่เลี้ยงในอาหารดัดแปร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	41.16 ± 1.21	2.86 ± 0.19
12	45.91 ± 5.40	2.86 ± 0.19
24	46.08 ± 4.40	10.36 ± 0.43
24	61.12 ± 3.88	10.06 ± 0.50
48	61.75 ± 0.91	9.55 ± 0.95
48	62.62 ± 0.63	10.12 ± 1.03

ผลการศึกษาวิเคราะห์จลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ ได้แสดงใน ตารางที่ 4-4 พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารดัดแปรให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จาก *Aspergillus* sp. LK 90 มีค่าสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง (10.36 ± 0.43 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ทั้งนี้หลังจาก 24 ชั่วโมงการสร้างผลิตภัณฑ์จะมีค่าคงที่

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังครั้งนี้ ได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากโครงการวิจัยการคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยสำหรับผลิตเอนไซม์สลายแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 โดยได้ให้ความสำคัญกับการศึกษาเพื่อปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงให้เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเฉพาะการศึกษาความเป็นไปได้และความเหมาะสมในการนำแหล่งคาร์บอนราคาต่ำ เช่น แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังเส้น และกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจะเป็นการสนับสนุนการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรและผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องได้อีกทางหนึ่ง โดยสามารถสรุปผลของการศึกษาได้ดังนี้

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. LK 90 แบบกะ คือ การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ในส่วนของสารอาหารสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ soluble starch ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ของ Uguru et al., (1997) ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์สูงสุดคือแป้งถั่วเหลืองร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่หาจากส่วนของ crude enzyme โดยรวมเท่ากับ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์โดยรา (ดัดแปลงจาก Uguru et al., 1997)

ประกอบด้วย

Soluble starch	20	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$NaNO_3$	2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.001	กรัม
KCl	0.5	กรัม
Distilled water	1000	กรัม

pH 7.0

2. สารเคมีและวิธีการเตียมสารเคมี

2.1 สารละลาย 0.1 M Acetate buffer pH 4.5-5.5

เตรียมได้จากการเตรียมสารละลาย 0.1 M Acetate buffer โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B จนได้พีเอชตามที่ต้องการ

2.1.1 เตรียมสารละลายตั้งต้น (Stock solution) ดังนี้

2.1.1.1 สารละลาย A คือ 0.1 M CH_3COOH โดยละลาย 6.005 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2.1.1.2 สารละลาย B คือ 0.1 M $CH_3COOH.3\ H_2O$ โดยละลาย 8.203 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2.1.2 ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วนดังนี้

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
46.3	3.7	3.6	20.0	30.0	4.8
44.0	6.0	3.8	14.6	35.4	5.0
41.0	9.0	4.0	10.5	39.5	5.2
36.8	13.2	4.2	8.8	41.2	5.4
30.5	19.5	4.5	6.8	43.2	5.5
25.5	24.5	4.6	4.8	45.2	5.6

2.2 สารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1 % w/v

เตรียมโดยละลาย soluble starch 1.0 กรัม ในสารละลาย 0.1 M Acetate buffer pH 5.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส จากนั้นปรับให้มีอุณหภูมิลดลงเหลือ 35 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียม 3,5-dinitrosalycylic acid (DNS)

เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม Potassium sodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายมาตรฐานกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	1.0	0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

ทำการดูดสารละลายมาตรฐานกลูโคส (ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามตารางข้างต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่น้ำเย็นอีก 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารอ้างอิง

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. 2548. การปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เพื่อผลิตเอนไซม์ในการสลายแป้งมันสำปะหลัง.รายงานการวิจัย.คณะวิทยาศาสตร์.มหาวิทยาลัยบูรพา.ชลบุรี

Bo Jin, Hans J. van Leeuwen, B. Patel, H. W. Doelle and Q. Yu. (1999). Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. *Process Biochemistry*. 34: 59-65

Cristina E. Goto, Elisângela P. Barbosa, Laís C. L. Kistner, Fabiana G. Moreira, Veridiana Lenartovicz and Rosane M. Peralta. (1998). Production of amylase by Aspergillus fumigatus utilizing α-methyl-D -glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. *FEMS Microbiology Letters*. 267: 139-143.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., and Srinivasulu, B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*. 38: 615-620.

Harpreet Singh and Sanjeev K. soni. (2002). Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* Hs-3 in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 37: 453-459.

Okolo, B. N., Ezeogu, L. I., and Mba, C. N. (1995). Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. *Journal Science Food Agriculture*. 69: 109-115.

Selvakumar, P., Ashkumary, L., and Pandey, A. (1998). Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. *Bioresource Technology*. 65: 83-85.

Uguru, G.C., Akinyanju, J.A. and Sani, A. (1997) The use of yam peel for growth of locally isolated *A. niger* and amylase production. *Enzyme ans Microbial Technology*. 21: 48-51.