รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารพรีไบโอติกมูลค่าสูงด้วยการแปรรูปของเสียจากโรงงานน้ำตาลโดยใช้จุลินทรีย์จากถั่วหมักที่เลี้ยงโดยใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ

High-value of prebiotic production from waste of sugar industry by microbial fermented peas with difference immobilization technology

รศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 59812

สัญญาเลขที่ 23/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารพรีไบโอติกมูลค่าสูงด้วยการแปรรูปของเสียจากโรงงานน้ำตาลโดยใช้จุลินทรีย์จากถั่วหมักที่เลี้ยงโดยใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ

High-value of prebiotic production from waste of sugar industry by microbial fermented peas with difference immobilization technology

รศ. ดร. วิทวัส แจ้งเอี่ยม

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับงบประมาณ ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 23/2562

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ และแบบท่อไหล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารลีเวน โดยใช้วิธีการตรึงจุลินทรีย์ที่ตรึงบนเม็ดอัลจิเนต และศึกษาการผลิตสารลีเวนจากขอเสียโรงงานอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพและปริมาณมากที่สุด

จากการวิจัยพบว่าการผลิตสารลีแวนโดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลซูโครสด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบกะมีอัตราการลดลงของซูโครสจาก 20%w/v เหลือ 2.04%W/V ที่เวลา 24 ชั่วโมง และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 °C ในส่วนของการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ พบว่า อุณหภูมิที่มากกว่าหรือน้อยกว่า 37 °C ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง จุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* สามารถผลิตสารลีแวนจากของเสียโรงงานอุตสาหกรรมได้ดีกว่าจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่ถูกตรึงด้วยเม็ดอัลจิเนต

Abstract

In this research aims to: 1) investigate the design of batch and plug flow reactors to increase the levan production efficiency by microbial immobilization method and 2) study the levan production from industrial waste.

The results revealed that the levan production occurred by the substrate as sucrose with batch the reactor, the sucrose concentration was decreased from 20%w/v to 2.04%w/v within 24 hours at 37 degree Celsius. In the part of enzyme application, the results showed the temperatures increased to higher or decreased to lower than 37 degree Celsius that affected to increase the enzyme activities. The free *Bacillus siamensis* can produced levan from industrial waste better than the *B. siamensis* was immobilized by alginate.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 สมมติฐานการวิจัย	4
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 โครงสร้างของลีเวน	6
2.2 การสังเคราะห์ levan	7
2.3 กลไกของการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส	8
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์	9
2.5 การตรึงเอนไซม์	13
2.6 ของเสียโรงงานอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม	15
2.7 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย	20
3.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว	21
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
3.4 วิธีการทดลอง	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	26
4.1 ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์	26
4.2 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายซูโครสด้วยจุลินทรีย์	31
4.3 ศึกษาการผลิตสารลีแวนจากของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยแอลจิเนตแบบในรูปแบบเม็ด	35

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ของประกอบด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร	36
4.5 ศึกษาการผลิตสารลีแวนจากของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยแอลจิเนตแบบในรูปแบบเม็ดด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหล	37
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	38
5.1 สรุปผล	38
5.2 ข้อเสนอแนะ	38
5.3 การประยุกต์ในการใช้งานจริง	39
ผลผลิต (Output)	40
รายงานสรุปการเงิน	41
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	47
ประวัตินักวิจัย	48

สารบัญรูปภาพ

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของ levan ที่มีสายหลักเป็นฟรุกโทสต่อกันที่พันธะ β-(2,6) และแบบกิ่งเชื่อมด้วยพันธะ β-(2,1)	6
รูปที่ 2 ขั้นตอนการผลิตสารลีแวน	7
รูปที่ 3 กลไกการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส	8
รูปที่ 4 วิธีการตรึงเอนไซม์รูปแบบต่างๆ	15
รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	27
รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 30%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	27
รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	29
รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 30%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	30
รูปที่ 9 ค่า OD600 ที่ได้จากการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของเซลล์จุลินทรีย์ Bacillus siamensis ที่บ่มด้วยอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20 และ 30%w/v อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	31
รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	32
รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	32
รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 45 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6	33

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

เรื่อง หน้า

รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 50 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 34

รูปที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 50 C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 35

รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 36

รูปที่ 15 จกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร 20%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 37

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานวิจัย

ปัจจุบันปัญหาทางด้านมลพิษที่เกิดจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อชุมชน หรือครัวเรือนที่อยู่ใกล้เคียงโรงงาน ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมามีหลายด้าน เช่น ด้านสุขภาพทางร่างกายและจิตใจ ทรัพยากรทางธรรมชาติและความหลากหลายทางชีวภาพในแหล่งน้ำเสื่อมโทรมและมีจำนวนลดลง อีกทั้งในปัจจุบันประเทศไทยมีกลไกการขับเคลื่อน Thailand 4.0 เป็นการพาไปสู่ “ประเทศในโลกที่หนึ่ง” โดยเน้น “ระบบเศรษฐกิจที่เน้นการสร้างมูลค่า” (Value - Based Economy) ที่ขับเคลื่อนด้วย นวัตกรรม เทคโนโลยี และความคิดสร้างสรรค์ โดยมี 5 กลุ่มเทคโนโลยี/อุตสาหกรรมเป้าหมายที่ต้องการพัฒนาขึ้นในประเทศ หนึ่งในนั้นคือ ด้านการเกษตรและอาหารใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งแนวคิดของ Thailand 4.0 จะผลักดันให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของผลิตผลการเกษตรและอาหารระดับพรีเมียม เป็นผู้ส่งออกเทคโนโลยีด้านการเกษตร เมล็ดพันธุ์ วัคซีน สร้างฐานเศรษฐกิจที่มั่นคงจากความหลากหลายทาง โดยมีเป้าหมายการสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงสุดที่ 20 ปี มีมูลค่าสูงถึง 1,000,000 ล้านบาท ด้วยกลไกขับเคลื่อนต่างๆ ซึ่งหมายความว่าในอีกไม่กี่ปีข้างหน้านี้จะมีโรงงานอุตสาหกรรมเกิดขึ้นอีกนับไม่ถ้วน และอาจส่งผลกระทบทางด้านปัญหาของน้ำเสียที่ปล่อยออกจากโรงงานสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติมากขึ้นอุตสาหกรรมอาหารเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความต้องการของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหนึ่งในข้อจำกัดที่มีผลต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหารคือค่าใช้จ่ายในการบำบัดและกำจัดของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิต สำหรับการพัฒนาอย่างยั่งยืนสำหรับอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม การพัฒนาไบโอรีไฟนารี่ (biorefineries) ได้รับความสนใจอย่างยิ่งจากนักวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม ซึ่งแนวคิดนี้เกี่ยวข้องกับการผลิตสารประกอบต่างๆ เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ สารเคมี และพลังงานที่ดีจาก

แหล่งพลังงานทดแทน อย่างเช่น พลังงานจากชีวมวล ซึ่งเป็นกระบวนการแปรรูปชีวมวลให้เป็นวัสดุชีวภาพที่มีประโยชน์ และสามารถเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจจากของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต และลดปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นได้ [1] ดังนั้นการพัฒนาไบโอรีไฟนารี่ (biorefineries) แบบยั่งยืนที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม แนวคิดนี้เกี่ยวข้องกับการผลิตสารประกอบต่างๆ เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ, สารเคมี หรือพลังงานที่ดีจากแหล่งพลังงานทดแทนเช่นชีวมวล [2] กระบวนการแปรรูปชีวมวลเป็นวัสดุชีวภาพที่เป็นประโยชน์สามารถเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของวัตถุดิบที่ทิ้งในปัจจุบันและลดปริมาณน้ำเสียที่ผลิตได้จากอุตสาหกรรมต่างๆ

ในสังคมปัจจุบันอาหารไม่ได้มีไว้เพื่อความต้องการด้านพลังงานของร่างกายเพียงเท่านั้น แต่ยังเน้นไปทางด้านการส่งเสริมสุขภาพ ความสนใจทางด้านสุขภาพที่เพิ่มขึ้นของผู้คนในการเลือกรับประทานอาหาร [3] ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาผู้คนให้ความสำคัญกับพฤติกรรมการบริโภคอาหารมากขึ้น และอาหารที่ให้ประโยชน์จะถูกให้ความสนใจทางด้านการรักษาสุขภาพของมนุษย์ พรีไบโอติก (Prebiotics) ถือเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตสายสั้น Fructooligosaccharides (FOSs) ถือว่าเป็นหนึ่งในกลุ่มหลักของพรีไบโอติกที่มีคุณสมบัติเป็น bifidogenic โดยที่ FOSs ได้จากการสกัดพืชชนิดต่างๆ หรือการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถหาได้จากซูโครสโดยเกิดจากปฏิกิริยา fructosyltransferase [4] ในบรรดาพรีไบโอติคเหล่านี้ FOSs เป็นที่สนใจเนื่องจากมีคุณค่าและมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง [5,6] FOSs ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ Bifidobacteria และ Lactobacillus sp. ในลำไส้ใหญ่ โดยกลุ่มแบคทีเรียชนิดเหล่านี้จะทำให้เกิดกรดไขมันเช่น acetate (C2), propionate (C3) และ butyrate (C4) ซึ่งจะช่วยลดความเป็นกรดของลำไส้ใหญ่และช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ (Ca2 + และ Mg2 +) และสารอาหารในร่างกาย [7,8] ลีเวน (Levan) เป็นโฮโมโพลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันเป็นสายหลัก [9] ถูกผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลาย

ชนิด [10] การศึกษาเกี่ยวกับการรวบรวมการสังเคราะห์และการผลิตลีเวน เริ่มขึ้นระหว่างปีพ.ศ. 2413 ถึง 2483 ในเยอรมนี ฝรั่งเศส และอังกฤษ [11] นอกจากคุณสมบัติทั่วไปลีเวนยังมีคุณสมบัติทางชีวการแพทย์ที่สำคัญ เช่น สารต่อต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการอักเสบ, ป้องกันมะเร็ง, สารต่อต้านเอดส์ ฯลฯ [12] และยังใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางในการจัดทำครีมผิวมอยเจอไรเซอร์ ฯลฯ [13] การใช้ประโยชน์จากลีเวนในภาคอุตสาหกรรมมีจำนวนมาก ลีเวนจึงกลายเป็นโพลิเมอร์ที่สำคัญและเป็นสารที่มีความต้องการในตลาด โดยที่ลีเวนเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าสูง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครส (sucrose) ที่อยู่ในน้ำเสียของโรงงานให้อยู่ในรูปของสารลีเวนซึ่งเป็นสารที่มีมูลค่าสูง โดยใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงบนเม็ดอัลจิเนต ด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบกะจากสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลีเวนที่มีประสิทธิภาพสูงสุด และผลิตลีเวนในปริมาณมากที่สุด ซึ่งจะเป็นการสร้างรายได้และใช้ประโยชน์จากของเสียให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับโรงงาน และเพื่อตอบสนองความต้องการของอุตสหกรรมที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจให้กับประเทศได้ และตรงกับนโยบาย Thailand 4.0 โดยจะทำให้อัตราการขยายตัวทางเศรษฐกิจจากระดับร้อยละ 3-4 เป็นร้อยละ 5-6 การเพิ่มระดับการวิจัยและพัฒนา จากร้อยละ 0.25 GDP ในปี พ.ศ. 2553 เป็นร้อยละ 4.0 (เทียบเท่าประเทศเกาหลีใต้) และโรงงานที่มีของเสียประเภทน้ำตาลซูโครส เช่น โรงงานน้ำตาล, โรงงานน้ำอัดลม, โรงงานน้ำผลไม้ เป็นต้น สามารถนำความรู้จากงานวิจัยไปเป็นต้นแบบในการผลิตลีเวนได้ ซึ่งจะเป็นการสร้างประโยชน์ต่อโรงงานอุตสาหกรรมและเศรษฐกิจของประเทศได้

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ (Batch reactor) และแบบท่อไหล (Plug flow reactor) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารลีเวน โดยใช้วิธีการตรึงจุลินทรีย์ที่ตรึงบนเม็ดอัลจิเนต และศึกษาการผลิตสารลีเวนจากการหมักด้วยน้ำตาลซูโครสที่ได้จากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพและปริมาณมากที่สุด

1.3 สมมติฐานการวิจัย

จุลินทรีย์สามารถผลิตสารลีแวนได้ในปริมาณสูง โดยใช้น้ำตาลซูโครสที่สกัดจากน้ำเสียโรงงานด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบถังหมักจากการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นสารลีเวนได้ในปริมาณและประสิทธิภาพสูง

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสูงสุดในเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ และการผลิตลีเวนด้วยจุลินทรีย์ที่ตรึงบนเม็ดอัลจิเนต จากผลิตภัณฑ์ถั่วหมักในเครื่องปฏิกรณ์แบบกะและแบบท่อไหล โดยที่กระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ลีแวนซูเครสเกิดขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ เพื่อทำการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสจากน้ำเสียโรงงานเป็นสารลีเวน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเพิ่มมูลค่าจากน้ำเสียของโรงงานให้เป็นสารลีเวนที่ปริมาณและประสิทธิภาพสูง ซเป็นสารที่มีมูลค่าสูงกว่าน้ำตาลทรายทั่วไปถึง 50 เท่า และมีความต้องการสูงในตลาดโลก โดยที่ความรู้จากการวิจัยจะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถเพิ่มคุณค่าให้นำไปสู่การต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ในระดับสากลได้ และโรงงานที่มีของเสียประเภทน้ำตาลซูโครส เช่น โรงงานน้ำตาล, โรงงานน้ำอัดลม,

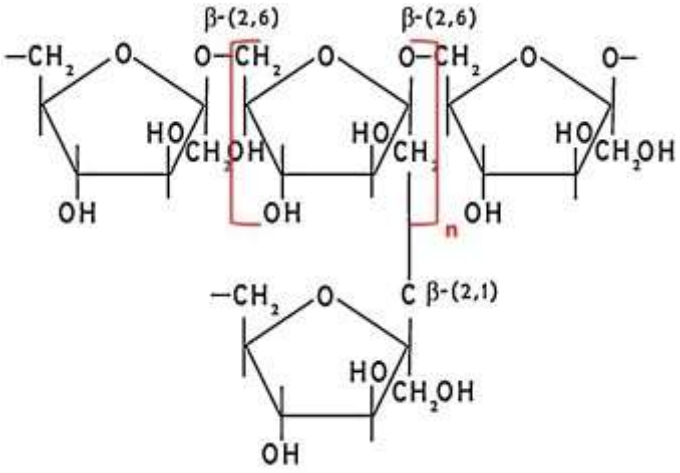
โรงงานน้ำผลไม้ เป็นต้น สามารถนำความรู้จากงานวิจัยไปเป็นต้นแบบในการผลิตลีเวนได้ ซึ่งจะเป็นการสร้างประโยชน์ต่อโรงงานอุตสาหกรรมและเศรษฐกิจของประเทศได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของลีเวน

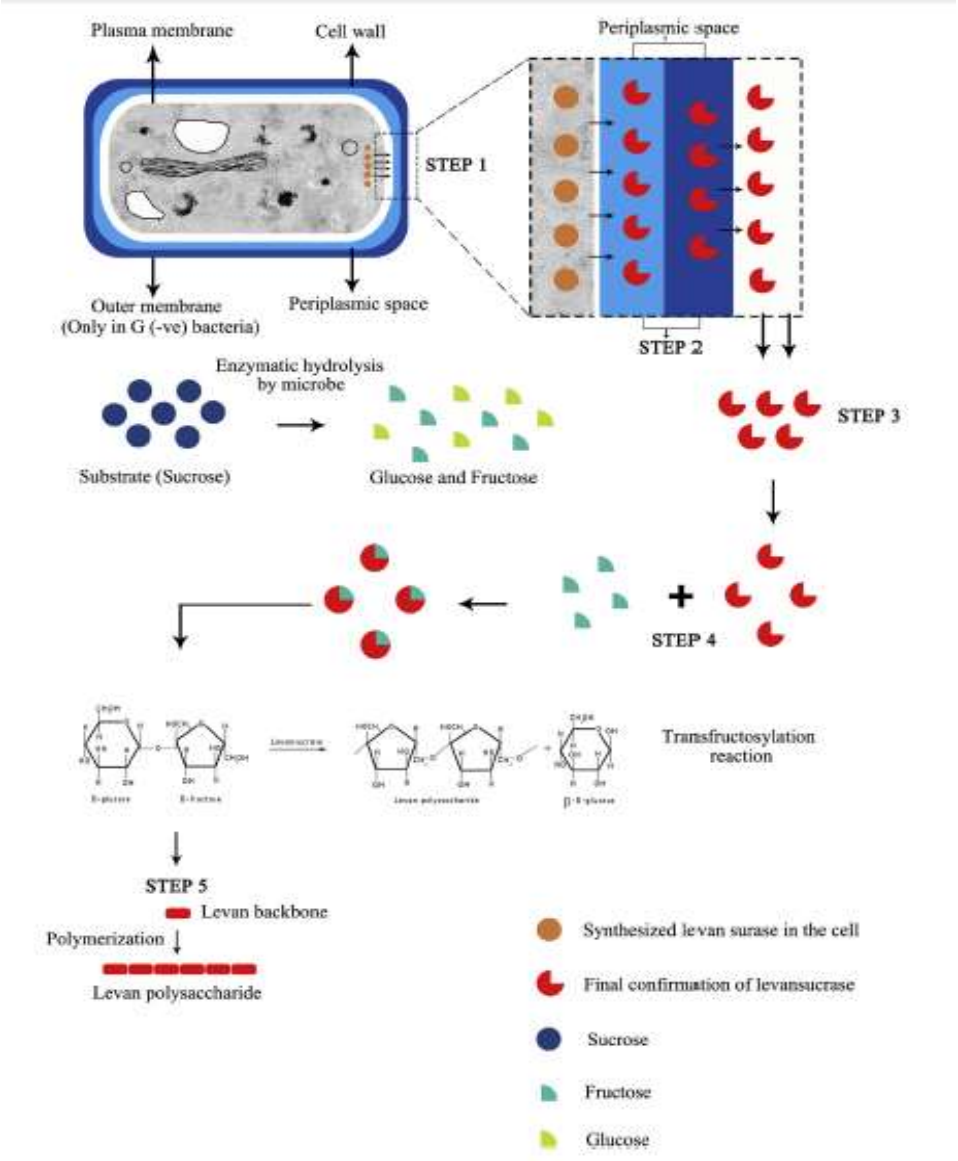
สารลีเวนเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโฮโมโพลิแซ็กคาร์ไรด์ที่มีน้ำตาลฟรุกโทสเป็นสายหลัก [9] ได้สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดซึ่งเป็น exopolysaccharides (EPS) [10] สามารถย่อยสลายทางชีวภาพและสามารถละลายน้ำได้ เช่นเดียวกับ polysaccharides, levan ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่ โดยมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลฟรุกโทสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(2,6) linkages กับ β-(2,1) linkages ในสายหลักและโซ่กิ่งตามลำดับแล้วต่อกับ d-glucosyl ที่ปลายด้านหนึ่งของสาย โครงสร้างด้วยพันธะ β-(2,1) Linkages [14]



รูปที่ 1 โครงสร้างของ levan ที่มีสายหลักเป็นฟรุกโทสต่อกันที่พันธะ β-(2,6) และแบบกิ่งเชื่อมด้วยพันธะ β-(2,1) [15]

2.2 การสังเคราะห์ levan

Levan มีอยู่กระจายทั่วไปทั้งในพืช ยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย [16] โดยการสังเคราะห์ levan นั้นเกิดจากการใช้เอนไซม์ที่ชื่อว่า levansucrase ที่รู้จักกันในรูปของ sucrose 6-fructosyltransferase [17] โดยมีจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ว่านี้ได้ อาทิเช่น *Lactobacillu, sjohnsonii* and *Lactobacillus gasserii*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *S. salivarius* เป็นต้น [18]



รูปที่ 2 ขั้นตอนการผลิตสารลีแวน

ขั้นตอนที่ 1: การสังเคราะห์ levansucrase เกิดขึ้นภายในเซลล์

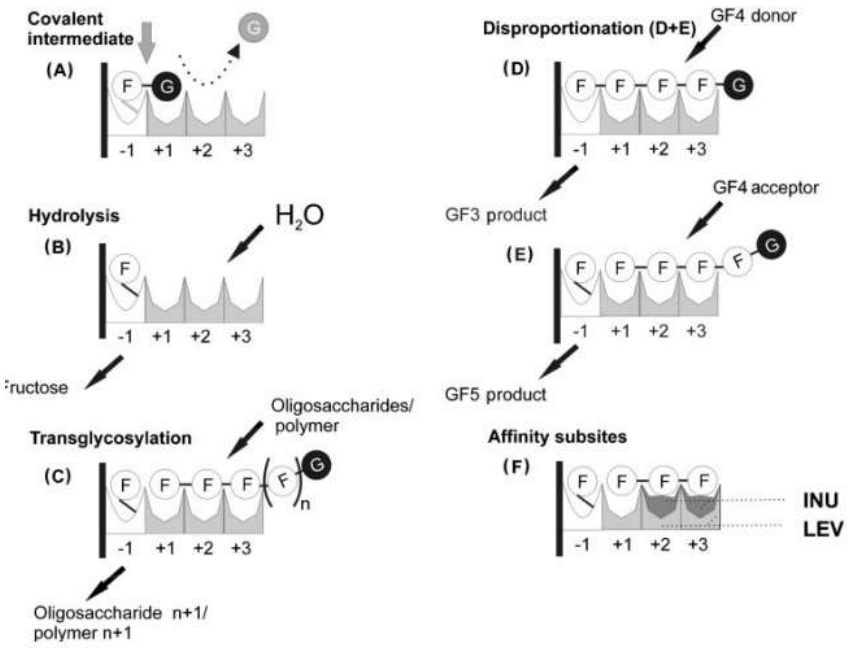
ขั้นตอนที่ 2: levansucrase จะถูกสะสมอยู่ในชั้นของ periplasmic space ก่อนถูกนำส่งออกเซลล์

ขั้นตอนที่ 3: levansucrase ถูกขับออกมานอกเซลล์สู่สิ่งแวดล้อมทั้งที่แยกออกมาจาก signal peptide ที่หลั่งออกมาพร้อมกับโปรตีน และที่ถูกขับออกมาด้วยกลไกจาก signal peptide ของตัวมันเอง

ขั้นตอนที่ 4: levansucrase จะทำตัวเป็นสารตั้งต้น และสังเคราะห์ levan เมื่อเริ่มเกิดปฏิกิริยา transfrucosylation

ขั้นตอนที่ 5: จะไปจับกับน้ำตาลฟรุกโทสที่แยกได้จากน้ำตาลซูโครส แล้วนำน้ำตาลฟรุกโทสนั้นมาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยปฏิกิริยา transfructosylation ได้มาเป็น levan backbone แล้วเชื่อมต่อกันด้วยปฏิกิริยา polymerization ได้เป็น levan สายยาว [19] ดังแสดงในรูปที่ 2

2.3 กลไกของการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส [24]



รูปที่ 3 กลไกการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส

Active site ของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตำแหน่ง -1 และ +1 มีความจำเพาะกับโมเลกุลของฟรุกโตสและกลูโคสตามลำดับ เมื่อโมเลกุลของซูโครส (ประกอบด้วยฟรุกโตส, F และกลูโคส, G) จับเข้ากับ Active site

ของเอนไซม์ลีแวนซูเครสในตำแหน่งที่ถูกต้อง พันธะระหว่างฟรุกโตสและกลูโคสจะถูกทำลายและกลูโคสจะถูกปล่อยออกจาก Active site ดังรูปที่ 5 (A) โดยโมเลกลุของน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์บริเวณ Active site เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้โมเลกุลของฟรุกโตสและกลูโคสหลุดออกจากกันดังรูปที่ 5 (B) หรือในอีกกรณีหนึ่ง เมื่อโมเลกุลของซูโครสทำปฏิกิริยากับ Active site และยึดติดกับ Subsite ที่ตำแหน่ง +1 และ +2 จะทำให้เกิดเป็นโมเลกุลของโอลิโกแซ็กคาไรด์หรือพอลิแซ็กคาไรด์ ดังรูปที่ 5 (C) ซึ่งเรียกว่าปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิลเลชัน (Transglycosylation reactions) ปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถเกิดได้ 2 รูปแบบ ได้แก่รูปแบบของการตัดสายพอลิเมอร์ให้สั้นลงด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และต่อให้สายพอลิเมอร์ยาวขึ้นด้วยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิลเลชัน ดังรูปที่ 5 (D และ E) เมื่อพอลิเมอร์ของโอลิโกแซ็กคาไรด์ (G, F4) มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้โมเลกุลของฟรุกโตสหลุดออก 1 โมเลกุล ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 1 โมเลกุล และฟรุกโตส 3 โมเลกุล (G, F3) ซึ่งโมเลกุล GF4 ที่ถูกไฮโดรไลซิสจะเรียกว่าตัวให้ (GF4 donor) ดังรูปที่ 5 (D) ในส่วนของการต่อสายพอลิเมอร์นั้น เมื่อโมเลกุลโอลิโกแซ็กคาไรด์ GF4 ทำปฏิกิริยากับ Active site ที่ตำแหน่ง +1 จะสามารถเชื่อมต่อพันธะระหว่างโมเลกุลของฟรุกโตสที่ตำแหน่ง -1 บน Active site ทำให้เกิดแซ็กคาไรด์ที่สายยาวขึ้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแซ็กคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 1 โมเลกุล และฟรุกโตส 5 โมเลกุล (G, F5) ดังรูปที่ 5 (E) GF4 ที่ถูกต่อสายพอลิเมอร์ให้ยาวขึ้นจะเรียกว่าตัวรับ (GF4 acceptor)

เอนไซม์ลีแวนซูเครสมีความสามารถในการผลิตได้ทั้งโอลิโกแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับโมเลกุลของแซ็กคาไรด์ที่เป็นตัวรับบน Active site ที่ตำแหน่ง +1 ในกรณีที่เอนไซม์มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ เรียกกระบวนการนี้ตามแบบจำลองว่า Non-processive ในทางกลับกันหากเอนไซม์มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของแซ็กคาไรด์ตัวรับที่มีโมเลกุลยาว ๆ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นพอลิแซ็กคาไรด์หรือที่เรียกว่าลีแวน (Ozimek et al., 2006)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

2.4.1. ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารเริ่มต้น

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จะต้องมีการรวมตัวกันของ เอนไซม์-สารเริ่มต้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุลทั้งสอง ถ้ามีสารเริ่มต้นพอเพียง เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

ของเอนไซม์เป็นสองเท่าจะทำให้อัตราเร็วเพิ่มขึ้นไปเป็น 2 เท่าด้วย แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อไปเรื่อย ๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นแนวระนาบเพราะสารเริ่มต้นเริ่มหมดไป ทำให้เป็นตัวจำกัดการเกิดปฏิกิริยาได้ อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับการชนกันของโมเลกุล ซึ่งจะชนกันมากขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์หรือสารเริ่มต้นมากขึ้น

อัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นนั้น ถ้าให้เอนไซม์เป็นตัวคงที่และเพิ่มปริมาณสารเริ่มต้นขึ้นเรื่อยๆ นั้น ปฏิกิริยาได้เป็น 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารเริ่มต้น

ระยะที่ 2 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มลดลงเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์เริ่มเป็นตัวจำกัด

ระยะที่ 3 อัตราเร็วถึงจุดอิ่มตัว

2.4.2. ความเป็นกรดด่าง (pH)

pH ของสารละลายจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในหลายด้านตามปกติเอนไซม์แต่ละชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อ pH สูงหรือต่ำกว่า pH ที่เหมาะสม pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 6-8 การที่ pH สูงมากหรือต่ำมาก จะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ

เนื่องจากเอนไซม์ประกอบด้วยกลุ่ม (อะมิโน) และ (คาร์บอกซิล) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงประจุของไฮโดรเจนไอออนในสารละลาย ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

pH ลดลง - NH_2 กลายเป็น - NH_3^+

pH เพิ่มขึ้น - COOH กลายเป็น - COO^-

pH อยู่ที่ isoelectric point

- NH_2 ยังคงเป็น - NH_2

- COOH ยังคงเป็น - COOH

นอกจาก pH จะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์แล้ว pH ยังมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาอีก 2 ทาง คือ

1. กิจกรรมของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับการปรากฏของกลุ่มอะมิโน และกลุ่ม คาร์บอกซิล ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มอาจจะมีประจุหรือไม่มีประจุก็ได้ แต่เอนไซม์จะทำงานได้ดีเพียงเมื่อกลุ่มทั้ง 2 มีประจุหรือไม่มีประจุแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ ถ้าเอนไซม์ทำงานได้ดีเมื่อกลุ่มอะมิโนไม่มีประจุ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มักจะสูง ในขณะที่ถ้าเอนไซม์ทำงานได้ดี เมื่อคาร์บอกซิลเป็นกลาง pH ที่เหมาะสมจะต่ำ

2. pH ควบคุมการแตกตัวของสารเริ่มต้น ซึ่งมีหลายปฏิกิริยาต้องเกิดการแตกตัวของสารเริ่มต้นก่อน ปฏิกิริยาจึงจะดำเนินต่อไปได้

2.4.3. อุณหภูมิ

การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้พลังงานจลน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วย อัตราการเพิ่มความเร็วของปฏิกิริยาคำนวณได้จากค่า Q_{10} หรือ Temperature Quotient ค่า Q_{10} ของเอนไซม์มักจะมีค่ามากกว่า 1 ขึ้นไป

$$Q_{10} = \frac{\text{อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ } X^\circ + 10^\circ C}{\text{อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ } X^\circ C}$$

2.4.4. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Reaction product)

อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถวัดได้จากอัตราการหายไปของสารเริ่มต้นหรืออาจจะวัดจากการปรากฏขึ้นของผลิตภัณฑ์ หรือทำทั้ง 2 วิธีพร้อมกัน แต่ไม่ว่าจะวัดโดยวิธีใด จะพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดช้าลงนี้ เป็นเพราะเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังเกิดเพราะมีการลดลงของสารเริ่มต้น และผลิตภัณฑ์เพิ่ม

มากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้น จนถึงความเข้มข้นหนึ่ง อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ (Reversibility) โมเลกุลของผลิตภัณฑ์จะรวมกับเอนไซม์แทนสารเริ่มต้นทำให้ปฏิกิริยาถูกจำกัดได้

2.4.5. สารระงับการทำงานของเอนไซม์ (Inhibitors)

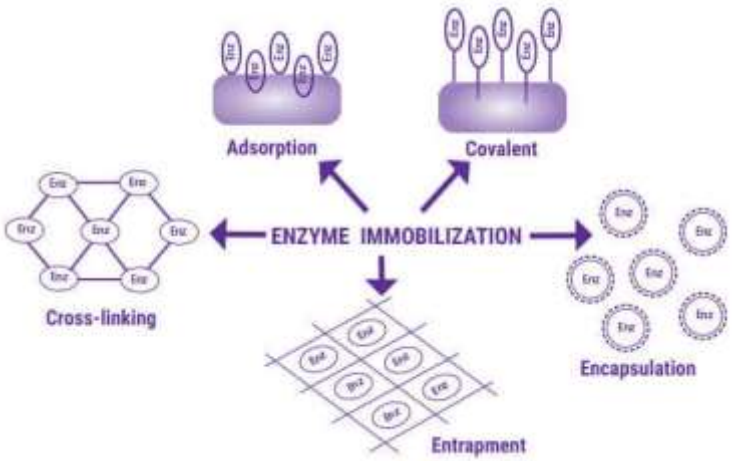
มีสารหลายชนิดที่สามารถระงับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ สารเหล่านี้อาจจะเป็นสารอนินทรีย์ เช่น โลหะหนักต่าง ๆ หรืออาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีโนลิค (Phenolic) หรือโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

1. Competitive Inhibitor เป็นสารชะงักการทำงานของเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารเริ่มต้นมาก และเข้าแย่งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ที่ Active Site ของเอนไซม์ เมื่อเกิดการรวมกันเป็นเอนไซม์-สารชะงัก (Emzyme-Inhibitor) จะทำให้ปริมาณของเอนไซม์ลดลง ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง สารชะงักเหล่านี้อาจจะเปลี่ยนหรือไม่เปลี่ยนไปก็ได้ การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นให้มากขึ้นจะลดผลของ Competitive Inhibitor ได้ ตัวอย่างของ Competitive Inhibitor คือ การที่มาโลเนท (malonate) แย่งทำปฏิกิริยากับ succinate dehydrogenase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ปกติจะทำปฏิกิริยากับ succinate ได้ fumarate ซึ่งปรากฏในการหายใจ ซึ่งเมื่อ malonate รวมกับเอนไซม์แล้วทำให้การหายใจเกิดไม่ได้

2. Non competitive Inhibitor สารชะงักการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะเข้ารวมกับเอนไซม์แต่จะไม่รวมที่ Active Site สารพวกนี้มีลักษณะต่างจากสารเริ่มต้น การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นจะไม่สามารถลบล้างผลของสารเหล่านี้ได้ โลหะที่เป็นพิษทั้งหลาย และสารที่รวมหรือทำลาย กลุ่มซัลฟ์ไฮดริลมักจะเป็นสารในกลุ่มนี้ เช่น การที่มีออกซิเจนมาก จะทำให้ -SH ถูกออกซิไดซ์ เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ขึ้นมา ซึ่งทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้ Active Site รวมกับสารเริ่มต้นไม่ได้ ส่วนโลหะ เช่น Hg+2 และ Ag+ จะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของกลุ่มซัลฟ์ไฮดริล เกิดเป็น เมอแคบไทด์ (Mercaptides) ซึ่งไม่ละลายน้ำ

3. Uncompetitive Inhibitor สารชะงักการทำงานของเอนไซม์ ชนิดนี้ไม่รวมกับเอนไซม์อิสระ และไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ และสารเริ่มต้น แต่จะเข้ารวมกับ เอนไซม์-สารเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ การชะงักการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีสารเริ่มต้นมากขึ้น สารชะงักชนิดนี้มักจะพบในปฏิกิริยาซึ่งมีสารเริ่มต้นสองชนิด

2.5 การตรึงเอนไซม์



รูปที่ 4 วิธีการตรึงเอนไซม์รูปแบบต่างๆ

2.5.1.การตรึงรูปด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง (carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำ

วิธีนี้มีเทคนิคการทำอยู่หลายรูปแบบ โดยอาจทำการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพยุง ด้วยพันธะ เคมีที่เรียกว่า พันธะไอออนิก หรือเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ปฏิกริยาการเกิดพันธะจะมีผลต่อโครงสร้างและ แอคติวิตีของเอนไซม์ หรือจะเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพยุงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพก็ได้ ซึ่งจะไม่ทำให้ โครงสร้าง และแอคติวิตีของเอนไซม์เสียไป แต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้จะต้องพิจารณาเลือกตัวพยุงให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ และวัตถุดิบที่ใช้เป็นซับสเตรท ซึ่งมีทั้งสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์

2.5.2. การตรึงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (cross linking method)

การตรึงรูปวิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุงแต่จะอาศัย สารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีแบบ โคเวเลนต์ ทำให้โมเลกุลเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไป ต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้จะมีผลต่อโครงสร้าง และแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ เนื่องจากการเชื่อม ระหว่าง โมเลกุล ของเอนไซม์กับสารเชื่อมขวาง จะเกิดปฏิกริยารุนแรง

2.5.3. การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ (entrapping method)

การตรึงเอนไซม์วิธีนี้ เป็น ที่นิยม ใช้กัน อย่างกว้างขวาง เพราะเอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้ม และเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวพยุง หรือ จับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

1. เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ ภายในช่องตาข่าย ของสารโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ อย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วิธีนี้อาจเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติ หรือ สังเคราะห์ก็ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องเลือกชนิดของสารโพลีเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นโพลีเมอร์ จะมีปฏิกริยารุนแรงจนทำให้ เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายไปได้

2. เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลเล็กที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่าน เข้า ออกได้ แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกริยา ขณะเกิดสาร โพลีเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้

การนำเอนไซม์มาใช้ในวงการอุตสาหกรรมทั่วๆ ไปจะอยู่ในรูปของเอนไซม์อิสระ และยังสามารถนำมาใช้ได้ในอีกลักษณะหนึ่ง คือ ใช้ในแบบของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกริยาที่เป็นของเหลว ให้กลายมาเป็นสารเร่งปฏิกริยาที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายได้น้อยมาก โดยการนำเอาเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดหรือจัดไว้ หรือนำมาจับยึดไว้กับตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ หรือทำให้โมเลกุลเอนไซม์จับเชื่อมกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น

เอนไซม์ตรึงรูปนี้เมื่อใช้งานแล้ว สามารถแยกนำกลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้งจนกว่า แอคติวิตี (activity) หรือความสามารถในการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก ทำให้ประหยัดกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ และสามารถใช้สภาวะในการทำปฏิกริยาที่แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระดั้งเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของตัวกลางที่ใช้จับยึด กับวิธีการตรึงรูป ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางมากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ ซึ่งจะต้องใช้สภาวะการทำปฏิกริยาที่จุดหนึ่งที่เหมาะสมเท่านั้น เอนไซม์ตรึงรูปค่อนข้างจะมีเสถียรภาพที่ดีกว่าเอนไซม์ในรูปอิสระ สามารถใช้งานในระบบที่มีเอนไซม์หลายๆ ตัวได้ และใช้ได้ทั้งในลักษณะแบบต่อเนื่องหรือเป็นครั้งคราว เอนไซม์ที่จะนำมาตรึงรูปไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์มากนัก ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ สำหรบเครื่องปฏิกรณ์ที่จะใช้กับเอนไซม์ตรึงรูปก็ไม่มีปัญหาอะไร เพราะสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมได้ขึ้นอยู่กับรูปแบบของการตรึงรูปและสารที่เป็นซับสเตรทจะเห็นว่าการใช้เอนไซม์ตรึงรูปจะมีข้อดีอยู่หลายประการ ดังนั้นนอกจากจะใช้ในงานอุตสาหกรรมแล้ว ยังใช้เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งใช้ในทางการแพทย์ด้วย วิธีใช้ก็ไม่ยุ่งยากจะยุ่งบ้างก็ตอนที่เลือกวิธีการตรึงรูป และสารตัวกลางที่จะใช้จับยึดให้เหมาะสมตรงกับจุดประสงค์ที่ต้องการเท่านั้น ดังรูปที่ 2.4

2.6 ของเสียโรงงานอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมเครื่องดื่มเป็นสารย่อยสลายทางชีวภาพได้สูงและเป็นสารผสมต่างๆของสารเคมี ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลแลคโตส, สารให้ความหวานเทียม, น้ำผลไม้เข้มข้น, สารปรุงรส, สารละลายคาร์บอนไดออกไซด์, คาร์บอเนต, ไบคาร์บอเนต, สารสี, สารกันบูด (กรดฟอสฟอริกและกรด tartaric) และเกลือแร่ที่ใช้ในระหว่างการผลิต ความต้องการออกซิเจนทางชีวภาพ (BOD) และความต้องการของสารเคมีออกซิเจน (COD) (BOD: COD) ของน้ำเสียจากเครื่องระหว่างการผลิตเครื่องดื่มโดยทั่วไป 0.05: 1 (E. Ait Hsine, 2005) น้ำตาลที่เป็นของเสียเป็นปัจจัยหลักที่มีค่า COD สูง

25-145,000 มก. / ล. ปริมาณไอโอดีน 130-350 มก. / ลิตรสารแขวนลอยทั้งหมด 26-38,000 มก. / ลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TDS) 1200 mg / L รวมไนโตรเจน (TN) 20-1180 mg / L และฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) 130-250 mg / L pH อาจเป็นกรดหรือด่างตั้งแต่ 3.4 ถึง 11 (E. Ait Hsine 2005, M. Matošić 2009) การปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจึงจำเป็นที่จะต้องมีการบำบัดของเสียก่อนปล่อยออกนอกโรงงาน เพราะไม่อย่างนั่นจะทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม [25,26]

2.7 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Fang-ChenWu และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตลีเวนจากจุลินทรีย์ Bacillus Subtilis (natto) ในเครื่องปฏิกรณ์แบบกะและเครื่องปฏิกรณ์ถังหมักแบบกะ โดยทำการทดลองการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบกะขนาด 10 ลิตร ใช้การควบคุมระบบจากคอมพิวเตอร์ พร้อมกับใช้หัววัดความเป็นกรด-ด่าง และหัววัดความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในสารละลาย เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 5 ลิตร (sucrose (250 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g/L), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (3 g/L), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (3 g/L)) แล้วเลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนของใบพัดที่ 300 รอบต่อนาที มีการเติมอากาศเข้าสู่ระบบที่ 3 ลูกบาศก์เมตรต่อนาที และควบคุมค่า pH ด้วยตัวควบคุมแบบ PID โดยการเติม NaOH 2 N และHCl 2 N ภายในถังปฏิกรณ์ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นศึกษาผลกระทบจากความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 20, 160, 200, 250 และ 400 กรัมต่อลิตร ที่ pH เท่ากับ 3.0, 6.0, 7.0 และ 9.0 ที่อุณหภูมิ 20, 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส และที่ความเร็วรอบในการหมุนของใบพัดที่ 50, 100, 175 และ 250 รอบต่อนาที จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 กรัมต่อลิตร ที่ pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ความเร็วในการกวน 175 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลผลิตของลีเวนสูงสุดที่ 61 กรัมต่อลิตร และการหมักด้วยเครื่องปฏิกรณ์ถังหมักแบบกะ จะเริ่มต้นเมื่อ 85% ของ

ซูโครสถูกย่อยสลาย โดยการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นซูโครสที่ 500 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ถังปฏิกรณ์ ด้วยอัตราการไหลที่ 30 มิลลิลิตรต่อนาที จนกระทั่งความเข้มข้นของซูโครสสูงถึง 170 กรัมต่อลิตร โดยการศึกษาเครื่องปฏิกรณ์ถังหมักแบบกะพบว่าจะช่วยเพิ่มการผลิตลีเวนได้สูงถึง 100 กรัมต่อลิตร (เพิ่มขึ้น 1.7 เท่าเมื่อเทียบกับเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ) [20]

Selim Silbir และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาเรื่องการผลิตลีเวนด้วยจุลินทรีย์ Zymomonas mobilis ในเครื่องปฏิกรณ์ถังหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง ด้วยจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงไว้บนเม็ดอัลจิเนต โดยนำเชื้อปริมาณ 25 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับสารละลาย Na-alginate 4%(v/v) ที่อัตราส่วน 1:1, v/v จนเป็นสารละลายเนื้อเดียวและทำการหยดสารละลายลงบน $CaCl_2$ 2%(w/v) ปริมาณ 500 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสหนึ่งคืน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาใช้งานต่อไป จากนั้นทำทดลองด้วยขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร หมักด้วยอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และไม่มีการเติมอากาศเข้าสู่ระบบ โดยศึกษาผลกระทบการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 150, 250, 300 และ 350 กรัมต่อลิตร (sucrose, 150–300; yeast extract, 2.5; K2HPO4, 1.0; (NH4)2SO4, 1.0; MgSO4·7H2O, 0.5 (pH 5.0 ± 0.2) ที่ pH เท่ากับ 4.5, 5.0 และ 5.5 เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 299.1 กรัมต่อลิตร ที่ pH เท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 28 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 42.3 ชั่วโมง มีการผลิตลีเวนสูงสุดที่ 40.2 กรัมต่อลิตร และศึกษาผลกระทบจากเครื่องปฏิกรณ์ถังหมักแบบต่อเนื่อง ด้วยจุลินทรีย์ที่ตรึงบนเม็ดอัลจิเนต โดยใช้คอลัมน์ Pyrex มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2.0-2.4 มิลลิเมตร สูง 49 เซนติเมตร ปริมาตรเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 95 มิลลิลิตร และบรรจุจุลินทรีย์ที่ตรึงบนเม็ดอัลจิเนตปริมาณ 67 กรัม โดยอัตราการไหลขาเข้าจะไหลจากด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์ขึ้นสู่ด้านบนด้วยปั๊มความเร็วต่ำ และบริเวณขาเข้า/ขาออกเครื่องปฏิกรณ์จะมีตะแกรงกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ตรึงบน

เม็ดอัลจิเนตไหลออกจากระบบ โดยใช้อุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส และศึกษาผลกระทบของการลดความเข้มข้นที่ 0.14, 0.22, 0.29 และ 0.4 ต่อชั่วโมง จากการทดลองพบว่ามีการผลิตลีเวนสูงสุดที่ 31.8±0.21 กรัมต่อลิตร ในอัตราการเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง การเพิ่มอัตราการเจือจางทำให้การผลิตลีเวนลดลงและเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลที่ออกจากระบบสูงขึ้น [21]

Ing-Lung Shih และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเสถียรภาพของการตรึงจุลินทรีย์ Bacillus subtilis ลงบนเม็ดอัลจิเนต โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 3 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นผสมเข้ากับโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 3%(w/v) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร หลังจากสารละลายผสมกันจนเป็นเนื้อเดียว ทำการหยดสารละลายลงในแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2% จะได้เม็ดอัลจิเนตที่มีจุลินทรีย์ถูกตรึงอยู่ภายใน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.33 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปใช้สำหรับการผลิตลีเวนจากกระบวนการหมัก โดยศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเป็นกรด-ด่าง และความเร็วรอบในการหมุน เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (ที่ pH 5.6-5.8, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ความเร็วรอบในการหมุน 150 รอบต่อนาที) จะได้ผลผลิตลีเวนสูงสุดที่ 70.6 กรัมต่อลิตร จากการหมัก 3 วัน และจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนเม็ดอัลจิเนตสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 5 ครั้ง (ครั้งละ 72 ชั่วโมง) และมากถึงรอบที่ 9 โดยที่มีประสิทธิเหลืออยู่ 72% [22]

Eduardo Leal IslaSantos และคณะ (2018) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงไว้ในฟิล์มแคลเซียมอัลจิเนท การตรึงฟิล์มแคลเซียมอัลจิเนตเริ่มจากเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ (*Saccharomyces cerevisiae)* ที่เจริญเติบโตเต็มที่ผสมลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต จากนั้นนำสารละลายที่ได้ผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ บรรจุลงในแผ่นอะคริลิคที่มีช่องลึก 1

มิลลิเมตร และนำไปแช่แข็งประมาณ 30 นาที เพื่อสร้างเป็นฟิล์มอัลจิเนตแคลเซียม โดยที่ขั้นตอนทั้งหมดทำในที่ปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ส่วนแผ่นอะครีลิคจะถูกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอล 70%(w/w) เป็นเวลา 15 นาที และนำไปฆ่าเชื้อด้วยแสงยูวี การศึกษาการผลิตเอทานอลเริ่มจากใส่ฟิล์มที่ผ่านการตรึงเซลล์ลงไปในถังหมักที่มีปริมาณสารละลายผสม 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย (120 g/l of glucose, 2 g/l of potassium phosphate, 1 g/l of ammonium sulphate, and 1 g/l of magnesium sulfate) โดยใช้ความเร็วในการหมุนใบพัด 150 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างหลังจาก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง เพื่อหาเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมัก จากผลการทดลองพบว่า ยีสต์ที่ตรึงบนฟิล์มอัลจิเนตทำให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าเซลล์ยีสต์ฟรีภายใต้เงื่อนไขการหมักเดียวกัน [23]

บทที่ 3

เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Sucrose
2. Yeast Extract
3. Trypon
4. NaCl
5. K2HPO4
6. Agar
7. น้ำกลั่น
8. แอลกอฮอลล์ 95%
9. 3,5-Dinitrosalisytic acid (DNS)
10. NaOH
11. Potassium tartate
12. คลอโรฟอร์ม
13. กรดอะซิติก
14. กรดกามะถัน
15. เอทานอล
16. Na2HPO4
17. NaH2PO4
18. MgSO4 0.2
19. NaNO3
20. อาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์

3.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. เครื่อง pH meter	1 เครื่อง
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	1 เครื่อง

3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) 1 เครื่อง

4. ตู้อบไฟฟ้า 1 เครื่อง

5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) 1 เครื่อง

6. เครื่องเขย่า (Incubator shaker) 1 เครื่อง

7. Hot plate 1 เครื่อง

8. ไมโครปิเปต (Micropipette) 2 อัน

9. บีกเกอร์ขนาด 250 mL 4 ใบ

10. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL 2 ขวด

11. ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 mL 2 ขวด

12. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 mL 3 ขวด

13. หลอดพลาสติกขนาด 15 mL 20 หลอด

14. Eppendorf tube ขนาด 1.5 mL 10 หลอด

15. เข็มเขี่ยจุลินทรีย์ (Loop) 3 อัน

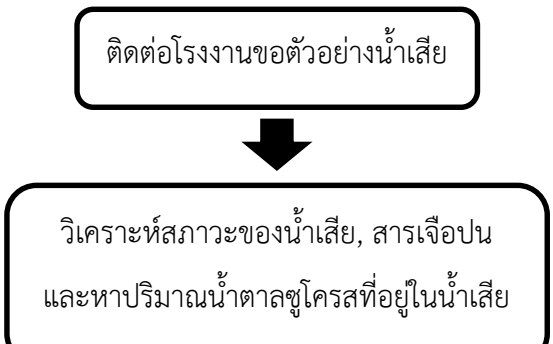
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์ 2 อัน

17. กระดาษกรอง ขนาด 70 mL 5 แผ่น

18. หลอดฉีดยา ขนาด 20 mL 5 อัน

19. Syringe Filters 5 อัน

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย



3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของซูโครสต่อการผลิตเอนไซม์ลีแวนซูเครส และเปลี่ยนซูโครสเป็นลีแวนด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 20 และ 30 %w/v ตามลำดับ

2. ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ Bacillus siamensis ด้วยอาหารแข็ง (Enrich media) และทำการเลือกโคโลนีที่สร้างเมือก

3. เลือกโคโลนีที่สร้างเมือก 1 ลูป นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตรที่ 1 (Enrich media) ปริมาตร 100 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ºC และ pH 6

4. นำจุลินทรีย์จากข้อ 3 จำนวน 20 mL เติมลงไปในอาหารเหลวสูตรที่ 2 (Differential media) ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 20 และ 30 %w/v ตามลำดับ ปริมตรสุดท้ายจำนวน 200 mL และเขย่าทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ºC และ pH 6

5. เก็บตัวอย่าง 3 mL ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9100× g นาน 15 นาที

6. นำส่วนใสปริมาตร 1 mL 0.5 mL ต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ (ใช้สำหรับวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์)

7. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ (ใช้สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์)

8. ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC (High performance liquid chromatography)

3.4.2 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิของซูโครสต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีงานวิจัยรายงานว่า เอนไซม์แต่ละชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ต่างกันที่อุณหภูมิต่างกัน โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่มีความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3.4.1

2. ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ Bacillus siamensis ด้วยอาหารแข็งสูตรที่ 1 (Enrich media) และทำการเลือกโคโลนีที่สร้างเมือก

3. เลือกโคโลนีที่สร้างเมือก 1 ลูป นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตรที่ 1 (Enrich media) ปริมาตร 100 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ºC และ pH 6

4. นำจุลินทรีย์จากข้อ 3 จำนวน 20 mL เติมลงไปในอาหารเหลวสูตรที่ 2 (Differential media) ที่มีความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมที่สุดจาการทดลองที่ 3.3.1 ปริมาตรสุดท้ายจำนวน 200 mL และเขย่าทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 50 ºC และ pH 6

5. เก็บตัวอย่าง 3 mL ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9100× g นาน 15 นาที

6. นำส่วนใสปริมาตร 1 mL ไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ (ใช้สำหรับวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์)

7. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ (ใช้สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์)

8. ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC (High performance liquid chromatography)

3.4.2 การตรึงจุลินทรีย์

3.4.2.1 การตรึงจุลินทรีย์บนเม็ดอัลจิเนต

1. เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2%w/v และเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 4%w/v

2. หยดสารละลายโซเดียมอัลจิเนตลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อสร้างเม็ดอัลจิเนตบริสุทธิ์

3. เตรียมจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ปริมาตรเท่ากัน (1:1, v/v)

4. หยดสารละลายผสมจุลินทรีย์ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2%w/v เพื่อตรึงจุลินทรีย์ไว้บนเม็ดอัลจิเนต

3.3.3 ศึกษาพฤติกรรมการผลิตสารลีแวนด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหล

ทำการทดลองด้วยการเตรียมของเสียและตรึงจีลินทรีย์เช่นเดิมดังการทดลองที่ผ่านมา แต่เปลี่ยนจากทำการทดลองด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ เป็นเรื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหล โดยใช้อัตราการไหล 1 mL/min

3.4.4 การสกัดลีเวนออกจากสารละลาย และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ 9100× g เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนใสที่เป็นของเหลวด้านบน

2. หลังจากนั้นนำส่วนใส ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 6.0) และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์

3. ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เพื่อตรวจสอบปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

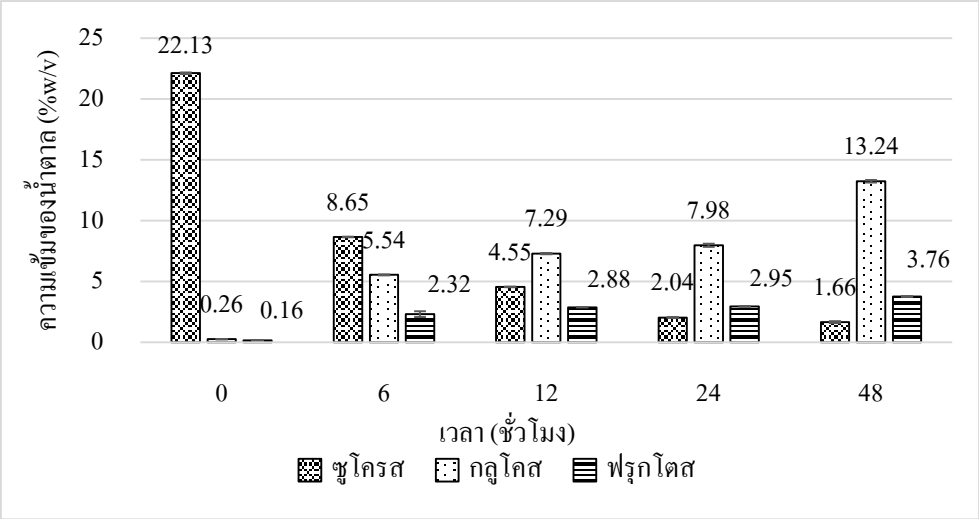
4.1 ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

เมื่อทำการบ่มจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ลงในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 20 และ 30%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 มีการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์และกิจกรรมของเอนไซม์ดิบดังนี้

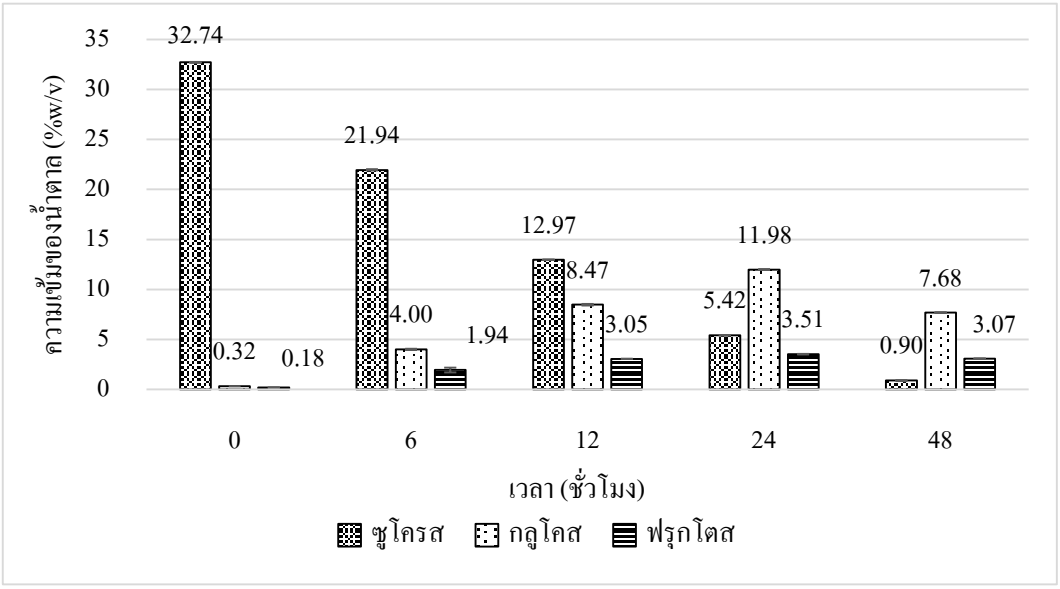
1. การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่ม

หลังการบ่มด้วยอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 20%w/v พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ซูโครสถูกไฮโดรไลซิสจาก 22.13%w/v เหลือ 8.65%w/v คิดเป็นร้อยละการลดลงของซูโครสร้อยละ 60.91 และลดลงเหลือ 1.66%w/v คิดเป็นร้อยละ 92.50 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง (รูปที่ 5) สำหรับอาหารเหลวสูตร 2 ที่มีซูโครสเข้มข้น 30%w/v หลังการบ่มถึง 6 ชั่วโมงพบว่า ลดลงจาก 32.74%w/v เหลือ 21.94%w/v คิดเป็นร้อยละ 32.99 และลดลงเหลือเพียง 0.90%w/v เมื่อทำการบ่มถึง 48 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 97.25 (รูปที่ 6)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง พบว่า อาหารที่มีซูโครส 20%w/v มีการลดลงของซูโครสเหลือ 2.04%w/v คิดเป็นร้อยละ 90.78 เมื่อบ่มต่อไปอีก 24 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมงมีร้อยละการลดลงของซูโครสเป็นร้อยละ 92.50 แต่สำหรับอาหารที่มีซูโครส 30%w/v มีการลดลงของซูโครสเหลือ 5.42%w/v คิดเป็นร้อยละ 83.45 เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการลดลงของซูโครสเป็น 97.25 เมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาบ่มระหว่าง 24 กับ 48 ชั่วโมงพบว่าการลดลงของซูโครสของอาหารที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v มีอัตราการลดลงคงที่กว่าอาหารเหลวที่ประกอบด้วยซูโครส 30%w/v จึงเลือกความเข้มข้นของซูโครส 20%w/v เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดซูโครสและการหาสภาวะต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6



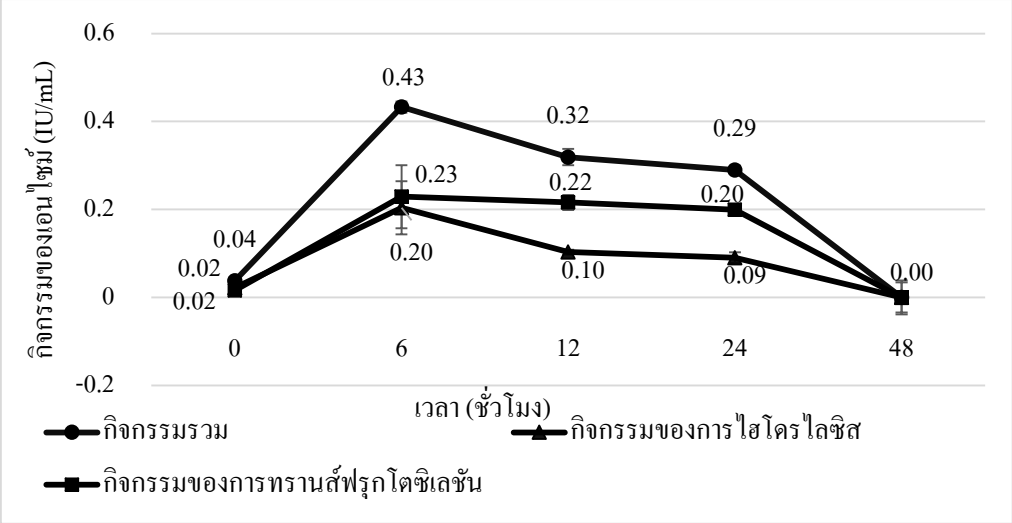
รูปที่ 62 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 30%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

จากรูปที่ 5 และ 6 พบว่าทุก ๆ ช่วงเวลาที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นมีความเข้มข้นสูงกว่าปริมาณฟรุกโตสที่เกิดขึ้นทุกช่วงเวลา อาจเป็นได้ว่าเอนไซม์ลีแวนซูเครสนำโมเลกุลของฟรุกโตสไปต่อกับกลูโคส 1 โมเลกุลให้เป็นสายยาวผ่านกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิเลชันเกิดเป็นสารลีแวน

1.2 กิจกรรมของเอนไซม์ของการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20 และ 30%w/v

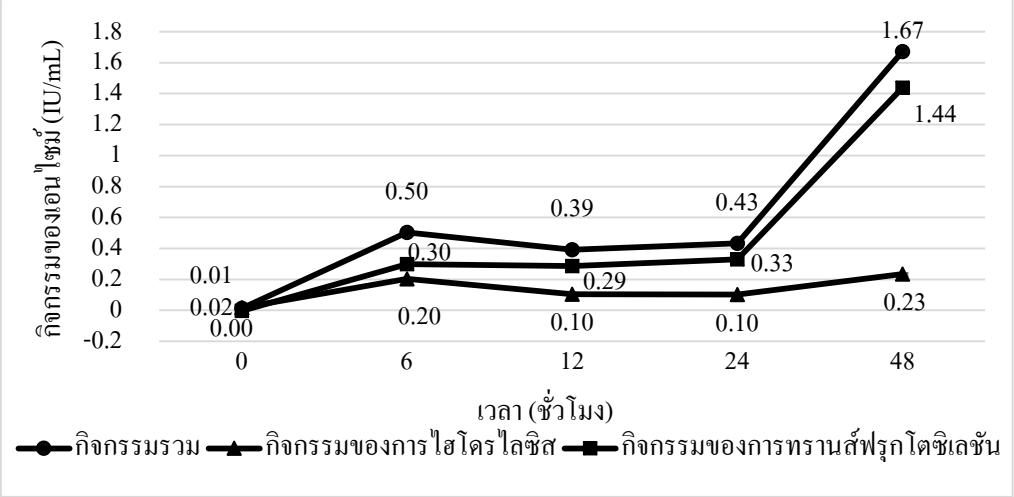
กิจกรรมของเอนไซม์ดิบที่ได้จากการบ่มจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ในอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20 และ 30%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 แสดงดังรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

การบ่มด้วยอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v ที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังการบ่มมีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีกิจกรรมรวม 0.43 IU/mL เมื่อผ่านไปถึง 12 ชั่วโมง กิจกรรมรวมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 0.32 IU/mL และค่อนข้างคงที่เมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมรวม 0.29 IU/mL และลดลงเหลือ 0 IU/mL เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการลดลงของซูโครสในอาหารเหลวดังรูปที่ 16 เมื่อพิจารณากิจกรรมของการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสโมเลกุลของซูโครสให้ได้กลูโคสและฟรุกโตส และเป็นปฏิกิริยาการต่อโมเลกุลของกลูโคสและฟรุกโตสเป็นสายยาวเพื่อผลิตลีแวน พบว่า ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกกิจกรรมของการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชันมีค่า 0.20 และ 0.23 IU/mL ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นการผลิตสารลีแวนจึงเกิดได้ไม่สูงมาก เนื่องจากเหลือฟรุกโตสอิสระในระบบมาก (ผลต่างของปริมาณระหว่างกลูโคสและฟรุกโตสน้อย) ซึ่งเกิดจากการไฮโดรไลซิสโมเลกุลของซูโครสที่สูง และเมื่อเวลาในการบ่มผ่านไปครบ 12 ชั่วโมง กิจกรรมของการไฮโดรไลซิสมีค่าลดลงเหลือ 0.10 IU/mL และกิจกรรมของทรานส์ฟรุกโตซิเลชันค่อนข้างคงที่โดยมีค่า 0.22 IU/mL ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการนำฟรุกโตสที่ได้จากการไฮโดรไลซิสซูโครสไปใช้ผลิตสารลีแวนมากขึ้น เนื่องจากปริมาณฟรุกโตสอิสระมีน้อยกว่าปริมาณกลูโคสอิสระ เมื่อเวลาผ่านไปครบ 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ โดยกิจกรรมไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชันมีค่า 0.09 และ 0.20 IU/mL ตามลำดับ เนื่องจากอาจเกิดการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (Protease) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางส่วนได้ โดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus sp.* บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ และเมื่อเวลาผ่านไปครบ 48 ชั่วโมง กิจกรรมทั้งหมดลดลงเหลือ 0 IU/mL เนื่องจากปริมาณของซูโครสลดลงเหลือเพียง 1.66%w/v ซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการเหนี่ยวนำในการสร้างเอนไซม์ลีแวนซูเครสประกอบกับมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระบบ



รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

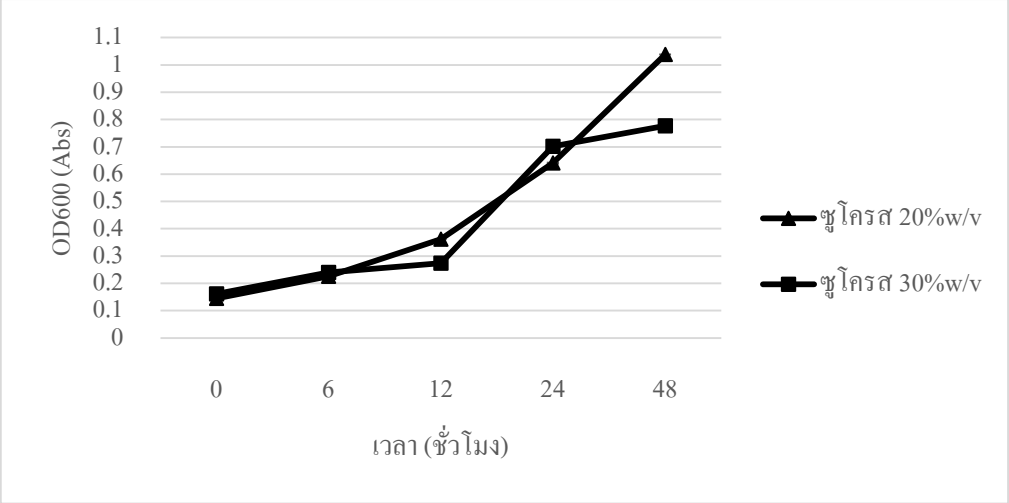
กิจกรรมของเอนไซม์ดิบสำหรับการบ่มด้วยอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 30%w/v นั้น เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง มีการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้น โดยมีกิจกรรมรวม กิจกรรมของการไฮโดรไลซิส และกิจกรรมของการทรานส์ฟรุกโตซิเลชันเป็น 0.43, 0.20 และ 0.20 IU/mL ตามลำดับ โดยกิจกรรมของการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชันมีแนวโน้มเช่นเดียวกันที่อาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง เช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์รวม กิจกรรมของการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชันเป็น 0.39, 0.10 และ 0.29 IU/mL เมื่อบ่มจุลินทรีย์จนครบ 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของการทรานส์ฟรุกโตซิลชั่นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 0.33 IU/mL ในขณะที่กิจกรรมของการไฮโดรไลซิสคงที่ที่ 0.10 IU/mL ส่งผลให้กิจกรรมรวมเพิ่มขึ้นเป็น 0.43 IU/mL และเมื่อบ่มจนครบ 48 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้น โดยกิจกรรมรวมมีค่า 1.67 IU/mL กิจกรรมของการไฮโดรไลซิสเป็น 0.23 IU/mL และกิจกรรมของการทรานส์ฟรุกโตซิเลชันเป็น 1.44 IU/mL จากกิจกรรมของเอนไซม์ดังรูปที่ 17 และ 18 สามารถอธิบายผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตเอนไซม์ลีแวนซูเครสได้ โดยที่ซูโครสเข้มข้น 30%w/v มีการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ลีแวนซูเครสมากกว่าที่ซูโครส 20%w/v อย่างไรก็ตามความหนืดของอาหารที่ประกอบด้วยซูโครส 30%w/v มีค่าสูงกว่าที่ซูโครส 20%w/v ซึ่งอาจเป็นปัจจัยในการลดประสิทธิภาพของการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครสได้



รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 30%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

1.3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เมื่อทำการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของเซลล์จุลินทรีย์ที่บ่มด้วยอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 20 และ 30%w/v ด้วยเครื่อง UV-visible light spectrophotometer ความยาวคลื่น 600 nm มีอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังรูปที่ 5 ในช่วง 6 ชั่วโมงแรก จุลินทรีย์ในอาหารเหลวทั้ง 2 ชุด มีอัตราการเจริญเติบโตเล็กน้อยและใกล้เคียงกัน ซึ่งอยู่ในระยะการปรับตัวของจุลินทรีย์ และเพิ่มขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยค่า OD600 ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 20%w/v มีค่าสูงกว่าที่ซูโครส 30%w/v มีค่า 0.36 และ 0.27 ตามลำดับ จากนั้นค่า OD600 สูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปครบ 24 ชั่วโมง โดยมีค่า 0.64 และ 0.70 ที่ซูโครส 20 และ 30%w/v ตามลำดับ สำหรับเวลาบ่มที่ 48 ชั่วโมง OD600 ของอาหารที่มีซูโครส 30%w/v ค่อนข้างคงที่โดยมีค่าเป็น 0.78 ในขณะที่ซูโครส 20%w/v ค่า OD600 ยังเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.04 ทั้งนี้ความเข้มข้นของซูโครสที่สูงขึ้นส่งผลให้อาหารเหลวมีความหนืดสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นปัจจัยทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดยลักษณะการเจริญเติบโตสัมพันธ์กับอัตราการหายไปของซูโครสในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด



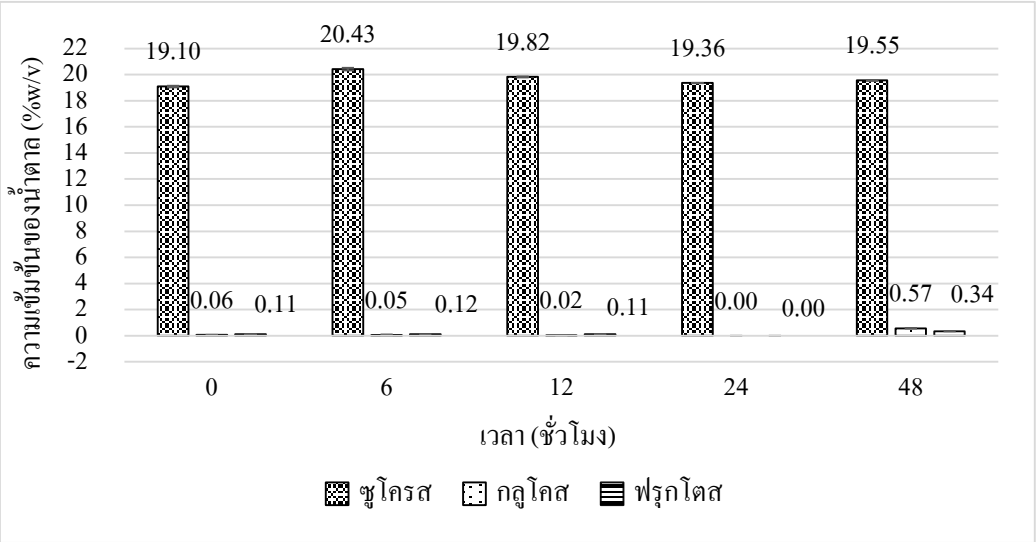
รูปที่ 93 ค่า OD600 ที่ได้จากการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของเซลล์จุลินทรีย์ Bacillus siamensis ที่บ่มด้วยอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20 และ 30%w/v อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

4.2 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายซูโครสด้วยจุลินทรีย์

เมื่อทำการบ่มจุลินทรีย์ Bacillus siamensis ลงในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 20 และ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 50°C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 มีการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์และกิจกรรมของเอนไซม์ดิบดังนี้

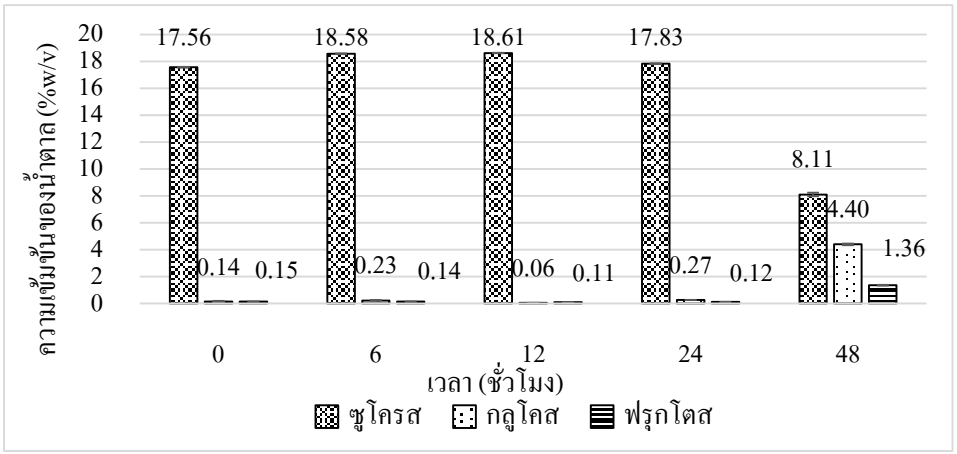
1. ผลิตภัณฑ์จากการบ่มด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

หลังการบ่มจุลินทรีย์ภายใต้อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของซูโครสมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก รวมถึงการเกิดกลูโคสและฟรุกโตสในระบบซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

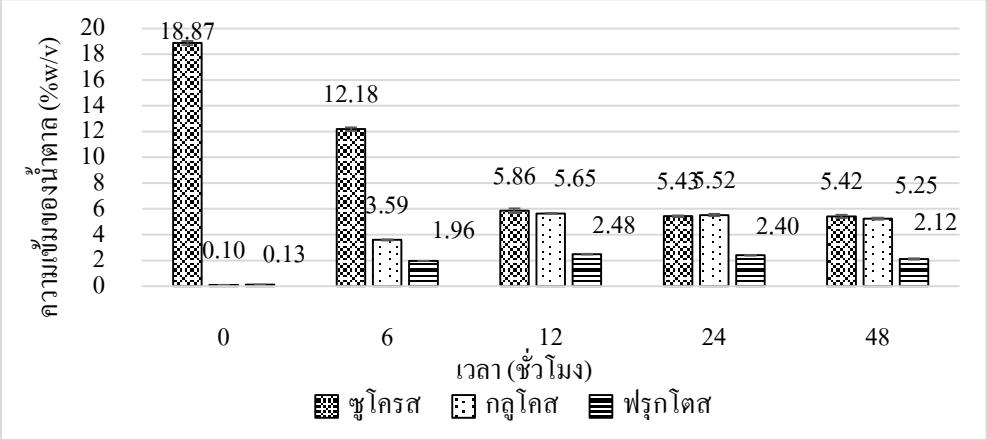
เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 0 ถึง 24 ชั่วโมงมีการเปลี่ยนแปลงของซูโครสน้อยมาก ซึ่งค่อนข้างคงที่ โดยมีซูโครสเหลืออยู่ประมาณ 18.15%w/v โดยเฉลี่ย คาดว่าอยู่ในช่วงปรับตัวของจุลินทรีย์ เมื่อทำการบ่มถึง 48 ชั่วโมง พบว่าซูโครสลดลงเหลือ 8.11%w/v มีกลูโคสและฟรุกโตสเกิดขึ้น 4.40 และ 1.36 %w/v ตามลำดับดังรูปที่ 11 โดยเอนไซม์ลีแวนซูเครสยังสามารถผลิตสารลีแวนได้ที่เวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

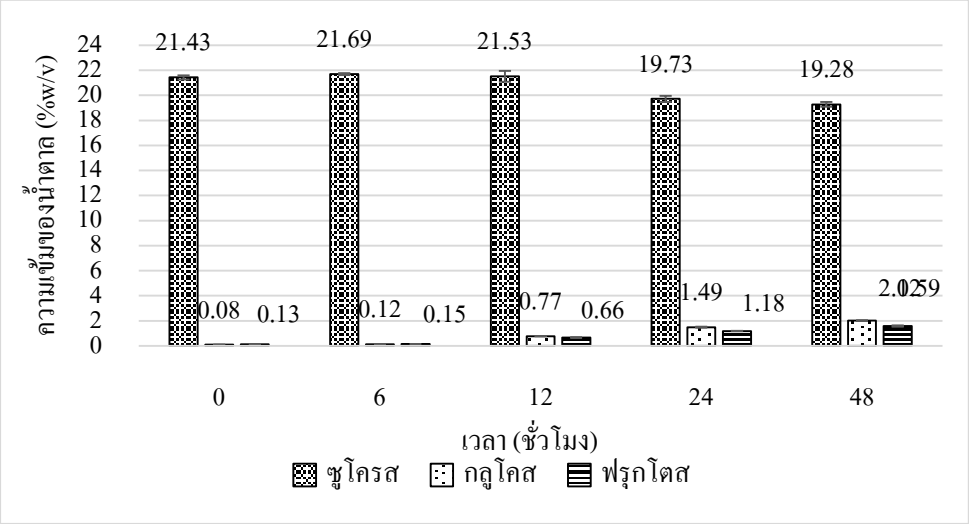
สำหรับการบ่มด้วยอุณหภูมิ 37 °C เป็นอุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ทำให้เกิดการลดลงของซูโครสอย่างรวดเร็ว โดยมีการเปลี่ยนแปลงของซูโครสตั้งแต่ช่วง 6 ถึง 48 ชั่วโมง ดังรูปที่ 5 ปริมาณของซูโครส ณ เวลาบ่ม 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงเป็น 22.13, 8.65, 4.55, 2.04 และ 1.66%w/v ตามลำดับ โดยในช่วงเวลาดังกล่าวมีแนวโน้มการผลิตลีแวนได้

ที่อุณหภูมิบ่ม 45 °C การลดลงของซูโครสและการเกิดผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและฟรุกโตสมีแนวโน้มเช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 37 °C ณ เวลาบ่ม 6 ชั่วโมง ดังรูปที่ 12 แต่มีอัตราการลดลงของซูโครสน้อยกว่า โดยซูโครสลดลงเหลือ 12.18%w/v เกิดกลูโคสและฟรุกโตส 3.59 และ 1.96%w/v ตามลำดับ เมื่อทำการบ่มถึง 12 ชั่วโมงพบว่าปริมาณซูโครสลดลงเหลือ 5.86%w/v กลูโคสและฟรุกโตสเกิดขึ้น 5.65 และ 2.48%w/v ตามลำดับ เมื่อบ่มต่อเนื่องถึง 48 ชั่วโมงปริมาณซูโครส กลูโคส และฟรุกโตสค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจเกิดจากอุณหภูมิที่ร้อนขึ้นทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส



รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 45 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

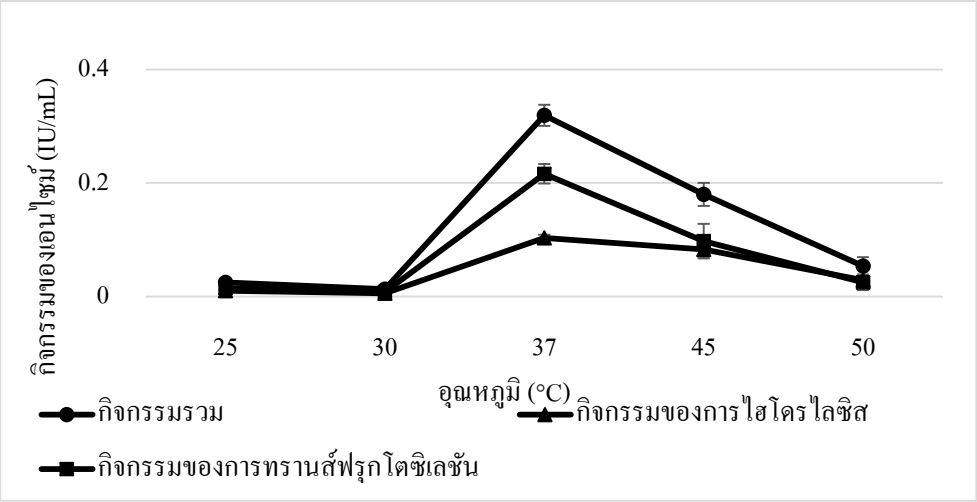
การบ่มจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 50 °C มีการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์น้อยมากดังรูปที่ 13 โดยปริมาณซูโครสลดลงจาก 21.43%w/v เหลือ 19.28%w/v เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง โดยปริมาณกลูโคสและฟรุกโตสแต่ละช่วงเวลาเกิดขึ้นน้อยมากและมีปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติมโตของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครสอีก



รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 50 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ของการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20 ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 50 °C

กิจกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มจุลินทรีย์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีพฤติกรรมที่ขึ้นกับอุณหภูมิบ่มดังรูปที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ดิบมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีกิจกรรมเอนไซม์รวม 0.32 IU/mL กิจกรรมการไฮโดรไลซิส 0.10 IU/mL และกิจกรรมการทรานส์ฟรุกโตซิเลชัน 0.22 IU/mL ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวเอนไซม์ลีแวนซูเครสสามารถผลิตสารลีแวนได้อีกด้วย เมื่ออุณหภูมิลดลงกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลด โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C เอนไซม์ดิบมีกิจกรรมน้อยมาก โดยมีค่ากิจกรรมรวมน้อยกว่า 0.01 IU/mL สำหรับการเพิ่มอุณหภูมิบ่มส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน โดยที่ 45 °C กิจกรรมของเอนไซม์รวมมีค่า 0.18 IU/mL โดยมีกิจกรรมของการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชันเป็น 0.10 และ 0.08 ตามลำดับ และกิจกรรมรวมลดลงเหลือ 0.05 IU/mL เมื่อเพิ่มอุณหภูมิบ่มเป็น 50 °C โดยมีกิจกรรมของการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชันเป็น 0.03 และ 0.02 IU/mL ตามลำดับ

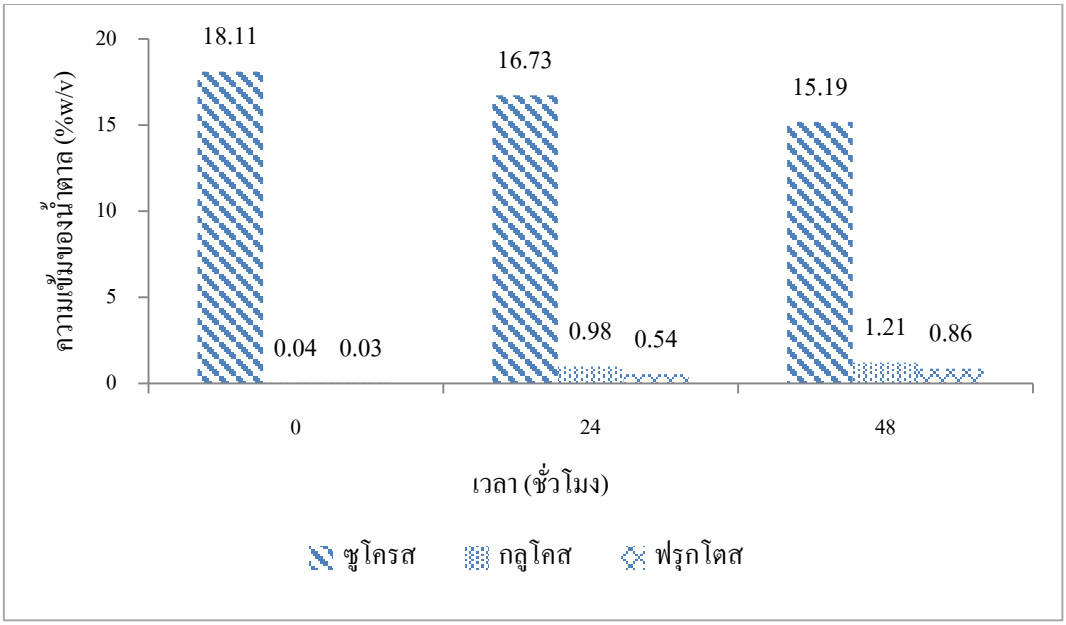


รูปที่ 134 กิจกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยซูโครส 20%w/v เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 50 C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

4.3 ศึกษาการผลิตสารลีแวนจากของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยแอลจิเนตแบบในรูปแบบเม็ด

หลังจากทำการบ่มจุลินทรีย์ในของเสียจากอุตสาหกรรมที่มีซูโครสความเข้มข้น 20%w/v บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6 สามารถอภิปรายผลได้ดังนี้

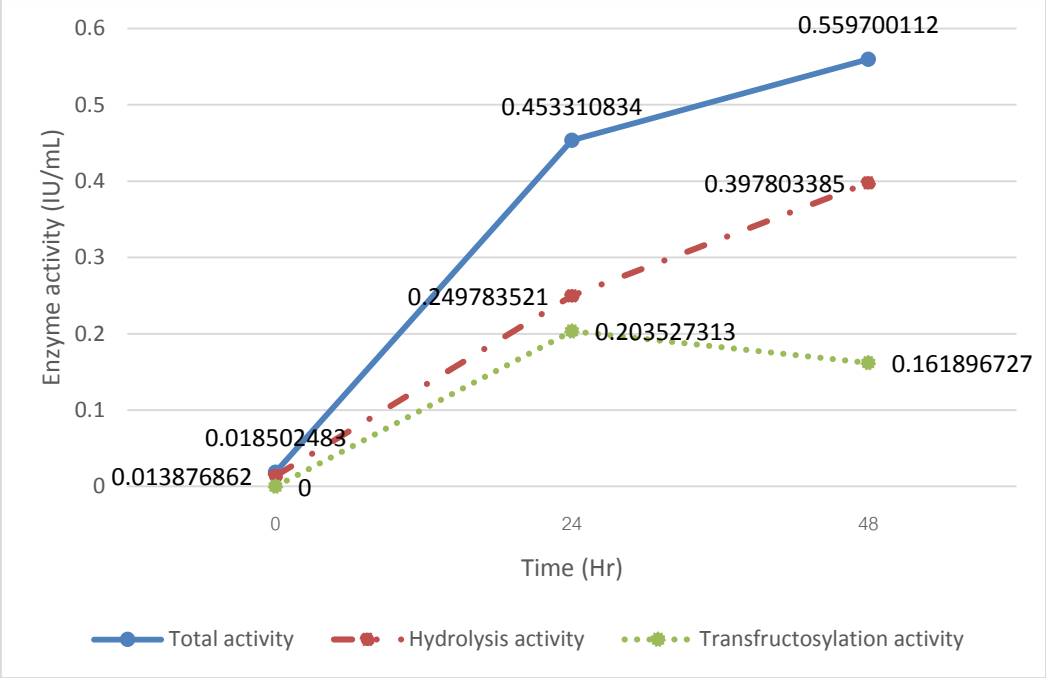
เมื่อทำการบ่มจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมที่มีซูโครสความเข้มข้น 20%w/v มีการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ดังรูปที่ 14 ในช่วงเวลาบ่ม 0 ถึง 48 ชั่วโมง มีปริมาณซูโครสลดลงค่อนข้างน้อยเมื่อทำการเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ อาจเกิดจากการถูกตรึงทำให้เอนไซม์ออกมาปริมาณด้านนอกได้น้อยลง หรืออาจจะต้องใช้เวลาในการบ่มที่นานขึ้น โดยที่เมื่อเวลาผ่านไปครบ 48 ชั่วโมงพบว่าซูโครสลดลงเหลือ 15.19%w/v เกิดกลูโคสและฟรุกโตส 1.21 และ 0.86%w/v ตามลำดับ ซึ่งในอีกทางหนึ่งอาจเกิดจากการที่มีสารเจือปนที่อยู่ในของเสียส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส



รูปที่ *14* การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร 20%w/v หลังการบ่มด้วยจุลินทรีย์ Bacillus siamensis เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ของประกอบด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร

กิจกรรมของเอนไซม์ดิบหลังการบ่มจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ในของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร 20%w/v มีพฤติกรรมของเอนไซม์ดังรูปที่ 12 ในช่วง 0 ถึง 48 ชั่วโมงของการบ่ม กิจกรรมรวมของเอนไซม์มีค่าน้อยมาก โดยมีค่า 0.3 IU/mL เมื่อเวลาผ่านไปถึง 12 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์รวมมีค่าสูงขึ้นเป็น 0.56 IU/mL เกิดการไฮโดรไลซิสมากกว่าการทรานส์ฟรุกโตซิเลชัน โดยมีกิจกรรมการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิเลชันเป็น 0.40 และ 0.16 IU/mL ตามลำดับ เนื่องจากอาจเกิดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส



รูปที่ *15* จกรรมของเอนไซม์ดิบจากการบ่มอาหารเหลวสูตร 2 ที่ประกอบด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร 20%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ pH 6

4.5 ศึกษาการผลิตสารลีแวนจากของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงด้วยแอลจิเนตแบบในรูปแบบเม็ดด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหล

การศึกษาการผลิตสารลีแวนด้วยเทคโนโลยีการตรึงจุลินทรีย์และประยุกต์ใช้กับเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหลนั้น มีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ แอลกอฮอล์ในของเสียอุตสาหกรรมมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และส่งผลต่อความแข็งแรงของเม็ดตรึงจุลินทรีย์ ทำให้ไม่สามารถใช้เม็ดตรึงจุลินทรีย์ในการทดลองดังกล่าวได้ ประกอบการเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหล มีแรงกระทำของของไหลต่อเม็ดตรึงจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน ทำให้เม็ดตรึงจุลินทรีย์สูญเสียเสถียรภาพและแตกในที่สุด

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้น อุณหภูมิ การตรึงจุลินทรีย์ด้วยแอลจิเนตในรูปแบบเม็ด และการศึกษาการย่อยสลายของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการกำจัดซูโครสด้วยจุลินทรีย์ คือ ซูโครสเข้มข้น 20%w/v โดยสามารถลดซูโครสเหลือ 2.04%w/v โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง และเหลือเพียง 1.66%w/v โดยใช้เวลา 48 ชั่วโมง
2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดซูโครสด้วยจุลินทรีย์คือที่อุณหภูมิ 37 °C โดยลดเหลือ 1.66%w/v เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง
3. อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่า 37 °C กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลง
4. จุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* สามารถกำจัดของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารจากความเข้มข้น 18.11%w/v เหลือ 15.19%w/v ภายในเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง และมีความเป็นไปได้ในการผลิตสารลีแวน เนื่องจากปริมาณกลูโคสมีค่าสูงกว่าฟรุกโตส
5. การตรึงจุลินทรีย์มีผลทำให้อัตราการผลิตของสารลีแวนลดน้อยลง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการกำจัดสารเจือปนในของเสียอุตสาหกรรมที่อาจยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์เบื้องต้นก่อนนำมาผ่านกระบวนการต่าง ๆ
2. ควรออกแบบระบบที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การตรึงจุลินทรีย์ด้วยสารที่ให้ประสิทธิภาพสูงกว่า หรือเปลี่ยนลักษณะการตรึง เช่น ทำการตรึงแบบฟิล์ม ใช้สารตั้งต้นในการทำเม็ดตรึงที่มีความแข็งแรงมากขึ้น เป็นต้น
3. เลือกใช้ระบบเครื่องปฏิกรณ์ที่เหมาะสม เช่น ในกรณีที่ไม่ทำการตรึงจุลินทรีย์ ควรใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหล หรือแบบถังกวนผสม

5.3 การประยุกต์ในการใช้งานจริง

การศึกษาวิจัยของโครงการนี้ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ที่จะสามารถใช้องค์ความรู้ดังกล่าวพัฒนาระบบการผลิตสารพรีไบโอติกลีแวนมูลค่าสูงด้วยสารตั้งต้นชนิดน้ำตาล หรือของเสียที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครสได้

ผลผลิต (Output)

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

ได้รับการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิจัยรามคำแหง (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) ปีที่ 22 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2562 ในหัวข้อเรื่อง “การผลิตสารลีแวนด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครสเพื่อการเพิ่มมูลค่ากากของเสียอุตสาหกรรม” (หน้า 35-42) โดยมีผู้แต่งบทความวิจัยได้แก่ ธนวัฒน์ ราชภิรมย์ ณัฏฐิณี ธีรกุลกิตติพงศ์ และวิทวัส แจ้งเอี่ยม

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS) 59812 สัญญาเลขที่ 23/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การผลิตพรีไบโอติกมูลค่าสูงด้วยการแปรรูปของเสียจากโรงงานน้ำตาล โดยใช้จุลินทรีย์จากถั่วหมักที่เลี้ยงโดยใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.วิทวัส แจ้งเอี่ยม

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึงวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2563

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2561

รายรับ

จำนวนเงินที่รับ

งวดที่ 1 (50%)	**505,650 หัก 10% เหลือ 455,085**	**บาท**	**เมื่อวันที่**	**12/12/2561**
งวดที่ 2 (40%)	**405,520 หัก 10% เหลือ 36,4968**	**บาท**	**เมื่อวันที่**	**25/04/2562**
งวดที่ 3 (10%)	**100,130 หัก 10% เหลือ 90,117**	**บาท**	**เมื่อวันที่**	**(ยังไม่ได้เบิกจ่าย)**
รวม	**1,011,300**	**บาท**		

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน **1.1 ค่าตอบแทนผู้วิจัย (10%)**	**101,130**	**0**	**101,130**
2. ค่าจ้าง **2.1 ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย (12 เดือน)**	**480,000**	**480,000**	**0**
3. ค่าวัสดุ			

3.1 วัสดุสำนักงานต่างๆ	0	0	0
3.2 วัสดุเพื่อใช้ในการทดลองต่างๆ - ค่าวัสดุฟุ่มเฟือยใช้แล้วทิ้ง เช่น plastic wares จำพวก 6-well plates, หลอดเก็บตัวอย่างดินขนาด 15 และ 50 ml, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ, tip, หัวกรองยาขนาด 0.22 ไมโครเมตร - เครื่องแก้วต่างๆ - ค่ายาปฏิชีวนะสำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรีย - ค่ายาปฏิชีวนะสำหรับยับยั้งเชื้อรา - ค่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น PDA, YPD - ค่าสารเคมีอื่นๆ เช่น ethanol, NaCl, cholrox - อื่นๆ	166288.30	166288.30	0
4. ค่าใช้สอย 4.1 ค่าจ้างนิสิตช่วยงาน	162751.70	162751.70	0

4.2 ค่าเชื้อเพลิงรถยนต์สำหรับเดินทาง	0	0	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ 6.1 ค่าสาธารณูปโภค (10%)	101,130	0	101,130
รวม	1,011,300	809,040	202,260

.....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

1. F. KüçükaŞik, H. Kazak, D. Güney, *et a.l,* Molasses as fermentation substrate for Levan production by *Halomonas* sp, Applied Microbiology and Biotechnology, 89 (6) (2011), p. 1729-1740
2. A.S. Alam, K.M. Hossain, et al., A study on industrial waste effluents and their management at selected food and beverage industries of Bangladesh, J. Appl. Sci. Environ. Manage., 11 (2007), p. 5-9
3. A.L. Dominguez, L.R. Rodridues, et al., An overview of the recent developments on fructooligosaccharides production and applications, Food Bioprocess Technol., 7(2014), p. 324-337.
4. Ram Sarup Singh, Rupinder Pal Singh, et al., Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin, International Journal of Biological Macromolecules, 85(2016), p. 565-572.
5. A.C. Flores-Gallegos, J.C. Contreras-Esquivel, et al., Comparative study of fungal strains for thermo stable inulinase production, J. Biosci. Bioeng., 119(2015), p.421-426
6. J.W. Yun, Fructooligosaccharides-occurrence preparation, and application, Enzyme Microb. Technol., 19(1996), p. 107-117
7. K.E. Scholz-Ahrens, P. Ade, et al., Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content and bone structure, J. Nutr., 137(2007), p. 838s-8346s
8. H. Tazoe, Y. Otomo, et al., Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions, J. Physiol. Pharmacol., 59(2008), p. 251-262
9. J. Cerning, Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, FEMS Microbiology Letters, 87 (1–2) (1990), p. 113-130
10. Ebskamp, M. J. M., Smeekens, J. C. M., & Weisbeek, P. J. (1999). Method for obtaining transgenic plants showing a modified fructan pattern. Google Patents.
11. G.A. Hendry, R.K. Wallace, The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans, Science and Technology of Fructans, Florida, USA (1993), p. 119-139

12. I. Dahech, K.S. Belghith, et al., Administration of Levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats, International Journal of Biological Macromolecules, 49 (5) (2011), p. 942-947
13. S.T. Yang, Bioprocessing for Value-added Products from Renewable Resources, (first ed.), Elsevier, Ohio, USA (2007)
14. V. Venugopal, Marine polysaccharides: Food applications, CRC Press, Florida, USA (2011)
15. Rapala Srikanth, Chinta H.S.S Sundhar Reddy, et al., Review on production, characterization and applications of microbial levan, Carbohydrate Polymers, 120(2015), p. 102-114
16. Jang, K.-H., Soon, A. K., et al., 2003. Prebiotic properties of Levan in rats. Journal of Microbiology and Biotechnology, 13(3), p.348–353.
17. Hernández, L., Arrieta, J., et al., 1999. Levansucrase from Acetobacter diazotrophicus SRT4 is secreted via periplasmby a signal-peptide-dependent pathway. Current Microbiology, 39(3), p.146–152.
18. Han, Y. W., 1990. Microbial Levan. Advances in Applied Microbiology, 35, 171–194.
19. Rapala Srikanth, Chinta H S S, et al., 2015. Review on production, characterization and applications of microbial.levan, Carbohydrate Polymers 120, 102–114.
20. Fang-ChenWu[a], Shou-ZuChou, et al., Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 6(2013), p. 846-853
21. Selim Silbir, Seval Dagbagli, et al., Levan production by Zymomonas mobilis in batch and continuous fermentation systems, Carbohydrate Polymers, 99(2014), p. 454-461
22. Ing-Lung Shih, Li-Dar Chen, et al., Levan production using Bacillus subtilis natto cells immobilized on alginate, Carbohydrate Polymers, 82(2010), p. 111-117
23. Eduardo Leal IslaSantosMagdalenaRostro-Alanís, et al., A novel method for bioethanol production using immobilized yeast cells in calcium-alginate films and hybrid composite pervaporation membrane, Bioresource Technology, 247(2018), p. 165-173

24. Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of Lactobacillus reuteri 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. Microbiology, 152(4), 1187-1196.
25. H. Miyaki, S. Adachi, et al., Water recycling by floating media filtration and nanofiltration at a soft drink factory, Desalination, 131 (2000), p. 47-53
26. M. MatošiĆ, I. Prstec, et al., Treatment of beverage production wastewater by membrane bioreactor, Desalination, 246 (2009), p. 285-293