



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การกำจัดกากน้ำตาลของโรงงานเครื่องต้มให้เป็นสารโพรไบโอติกโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากอาหาร

Produce prebiotic in form of Levan by added value of molasses

ผศ. ดร. วิทวัส แจ่มเอียด

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080023

สัญญาเลขที่ 19/2561 (เพิ่มเติม)

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การกำจัดกากน้ำตาลของโรงงานเครื่องต้มให้เป็นสารโพรไบโอติกโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้  
จากอาหาร

Produce prebiotic in form of Levan by added value of molasses.

ผศ. ดร. วิทวัส แจ่มเอี่ยม

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล  
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงาน  
คณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 19/2561

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อสืบหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากถั่วเหลืองหมัก และทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารลิแวน โดยเอนไซม์ลิแวนซูเครสนั้นเป็นเอนไซม์เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ก่อนจะถูกขับออกนอกเซลล์เพื่อทำการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเกิดเป็นสารลิแวน เอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายซูโครสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและฟรุกโตสผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และเชื่อมต่อโมเลกุลของสายฟรุกโตสกับโมเลกุลของกลูโคสที่ปลายของสายโซ่หลักเกิดเป็นสารลิแวน (Levan) ผ่านกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน (Transfructosylation) และการวิจัยนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่ถูกคัดเลือกจากถั่วเน่า พบว่าความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตลิแวนเท่ากับ 20 %w/v ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมี Enzyme activity สูงสุด 1.00 IU/mL จากนั้นได้ทำการศึกษาการบำบัดของเสียอุตสาหกรรมอาหารที่มีองค์ประกอบของซูโครสโดยมีความเข้มข้น 20 %w/v ด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า Enzyme activity มีค่าสูงสุด 0.92 IU/mL ปริมาณซูโครสลดลงจาก 17.42 %w/v เหลือ 13.21 %w/v ภายใน 48 ชั่วโมง

**คำสำคัญ:** ลิแวน ลิแวนซูเครส ของเสียซูโครส ซูโครส

## Abstract

Levansucrase is formed in microbial cell and secrete to the extracellular environment to change sucrose into levan. Levansucrase is an enzyme which can degrade sucrose become glucose and fructose as products with hydrolysis reaction and occur linkage between the long chain of fructose and one glucose at terminal become levan by a transfructosylation reaction. In this study investigated the effect of sucrose concentration to produce levan with levansucrase from *Bacillus siamensis* was selected from soybeans fermented. The optimized sucrose concentration was 20%w/v at 37-degree Celsius, 48 hours. An enzyme activity rises to 1.00 IU/mL. Then, investigated a treatment of food industrial waste containing sucrose with 20%w/v waste reacted with levansucrase from *Bacillus siamensis* at 37-degree Celsius, 48 hours. The highest enzyme activity is 0.92 IU/mL and sucrose residue was decreased from 17.42%w/v to 13.21%w/v within 48 hours.

**Keywords:** levan, levansucrase, sucrose waste, sucrose

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์	3
3. ขอบเขตของการทำโครงการวิจัย	3
4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	22
6. วิธีการทดลอง	22
7. ผลการทดลองและอภิปรายผล	29
8. สรุปผลการทดลอง	40
9. ข้อเสนอแนะ	41
10. ผลผลิต (Output)	42
รายงานสรุปการเงิน	43
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	50
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	57

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 7.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย	30
ตารางที่ ข.1 การจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ตามสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง	51
สูตร 2 และการย้อมแกรม	
ตารางที่ ข.1 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง OD600	55

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 4.1 ถั่วหมัก	4
รูปที่ 4.2 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปอิมูลินต่อกันเป็นสายแบบ $\beta(2 \rightarrow 1)$	5
รูปที่ 4.3 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกันเป็นสายแบบ $\beta(2 \rightarrow 6)$	6
รูปที่ 4.4 A. โครงสร้างลิแวนแบบเส้นตรง B. โครงสร้างลิแวนแบบเส้นตรงและกิ่ง	7
รูปที่ 4.5 กระบวนการการผลิตเอนไซม์ลิแวนจากเซลล์จุลินทรีย์	9
รูปที่ 4.6 ปฏิกริยาของเอนไซม์เอนไซม์ลิแวนซูเครสเพื่อสังเคราะห์สารลิแวน	10
รูปที่ 4.7 โครงสร้าง 1-Kestose	11
รูปที่ 4.8 โมเดลการเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization บน active site	14
รูปที่ 4.9 กระบวนการ dialysis	16
รูปที่ 4.10 กระบวนการวิเคราะห์สารแบบ ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี	16
รูปที่ 4.11 ขั้นตอนการบำบัดน้ำเสีย	18
รูปที่ 7.1 การคัดแยกจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงสูตรที่ 1	29
รูปที่ 7.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการย่อยซูโครสกับชนิดของจุลินทรีย์	31
รูปที่ 7.3 กราฟแสดงพฤติกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสในแต่ละช่วงเวลาของจุลินทรีย์	32
รูปที่ 7.4 เลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งสูตร 1: (A) จุลินทรีย์กลุ่ม B-5, (B) จุลินทรีย์กลุ่ม B-6	32
รูปที่ 7.5 การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5	34
รูปที่ 7.6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ <i>Bacillus simensis</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว	35
รูปที่ 7.7 Enzyme activity of sucrose degradation with 10%w/v sucrose	36
รูปที่ 7.8 Enzyme activity of sucrose degradation with 20%w/v sucrose	36



รูปที่ 7.9 Enzyme activity of sucrose degradation with 30%w/v sucrose	37
รูปที่ 7.10 The absorbance of <i>Bacillus siamensis</i> in culture medium 2 containing 10, 20 and 30%w/v sucrose	37
รูปที่ 7.11 Enzyme activity of waste degradation with 20%w/v sucrose waste	38
รูปที่ 7.12 Concentration of sugar (Fructose, glucose and sucrose) after incubated 20%w/v waste	38

## 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พฤติกรรมรักสุขภาพของในคนปัจจุบันนั้นมีเพิ่มมากขึ้น หลากๆ คนต่างมองหาผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายส่งผลให้อุตสาหกรรมต่างๆ หันมาปรับปรุงคุณภาพสินค้าเพื่อตอบสนองของความต้องการของผู้บริโภค ทำให้อาหารและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพนั้นได้รับความสนใจมาในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา (A.L. Dominguez และคณะ,2014)(R.A. Rastall, 2010)

กลุ่มอุตสาหกรรมจำพวกนมและผลิตภัณฑ์จากนมนิยมใช้ สารประเภทเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS) ในด้านสารคงตัว การปรับปรุงเนื้อสัมผัส และสารลดแรงตึงผิวต่างๆ (Patel, A.และคณะ 2013)( Han, Y.W., 1990) โครงสร้างของ EPS เป็นโพลีเมอร์แบบเส้นหรือกิ่งซึ่งมีหน่วยเป็นน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาล ถูกสังเคราะห์จาก แล็กติแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria: LAB) เช่น Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus, as well as Bifidobacterium sp. and Weissella strains (De Vuyst and Degeest, 1999, Notararigo et al.,2012). EPS ถูกจำแนกออกเป็น 2 ลักษณะ คือ homopolysaccharides (HoPS) มีหน่วยย่อยเป็น  $\alpha$ -d-glucans,  $\beta$ -d-glucans,  $\beta$ -d-fructans ตามลักษณะของโครงสร้างและ heteropolysaccharides (HePS) ประกอบด้วย monosaccharides แตกต่างกัน (De Vuyst, L., Degeest, B., 1999) กลุ่ม EPS มีคุณสมบัติเป็นสาร prebiotic เป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่จะไปช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและกิจกรรมบางอย่างของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของเราแทน (Probiotics) เป็นส่วนสำคัญของ functional food หรืออาหารเพื่อสุขภาพ (M. Robermufroid, 1993) สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก อาจเป็นสารจำพวก exopolysaccharides อาทิเช่น Fructooligosaccharides (FOSs), galactooligosaccharides (GOSs) และ xylooligosaccharides (XOS) เป็นต้น

ลิแวนเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันเป็นสายหลัก (Cerning, J, 1990) หรือเรียกอีกอย่างได้ว่า ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide:FOS) (V. Bali และคณะ, 2015 และ P.T. Sangeetha และคณะ, 2005) ซึ่งถือเป็นสารพรีไบโอติกและถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนมและผลิตภัณฑ์จากนมเป็นจำนวนมาก (Bello, 2001) เพราะเป็นสารที่จำเป็นต่อร่างกายโดยปริมาณที่ร่างกายต้องการต่อวันนั้น อยู่ที่ 4 – 12 กรัม (Roberfroid และคณะ, 2010). ไม่เพียงเท่านั้น อุตสาหกรรมเครื่องดื่มยังใช้ลิแวน (Levan) เป็นสารให้ความหวานเนื่องจากเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลฟรุกโตสต่อกัน ซึ่งถือเป็นสารให้ความหวานที่มีพลังงานต่ำจึงนิยมนำมาเติมในการผลิต (P.T. Sangeetha, 2005)

นอกจากนี้ levan ยังถูกนำมาใช้ในการรักษาบาดแผล การรักษาโรคผิวหนัง หรือการอุดตัมฟันในทางทันตกรรมและทางการแพทย์ (Kang และคณะ, 2009) มีผลต่อการแข็งตัวของเลือดใน

ระหว่างการผลิตของผู้ป่วยโรคหัวใจ (Roberts และคณะ, 1998) levan นั้นได้ถูกนำมาใช้เป็นสารป้องกันมะเร็ง และเนื้ออกชนิดต่างๆ และยัง ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านการอักเสบของแผล ช่วยทำให้ผิวหนังดีขึ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้อีกด้วย

Levan ยังถูกใช้งานอย่างมากในเทคโนโลยีชีวภาพและสารเคมีอุตสาหกรรม หากนำ Levan ผสมเข้ากับดิน มอนต์มอริลโลไนต์ ถูกใช้ในการเตรียม nanocomposites ซึ่ง Levan มีความ ทนทานสูง โปร่งใส และมีความยืดหยุ่น ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง คุณสมบัติเชิงกลนี้เหมาะสมต่อหลายอุตสาหกรรมสาขาชีวการแพทย์( Chen, X.,2014)( Chung, B. H.,1997) ซึ่งในด้าน อุตสาหกรรม levan นั้นตอบสนองในเรื่องคุณสมบัติที่หลากหลายนี่มีต้นทุนในการผลิตไม่สูงมากนัก ทำให้ levan กลายมาเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีคุณค่าอันหลากหลายและเป็นที่ต้องการต่อตลาดโลก อย่างแน่นอน (Rapala Srikanth และคณะ, 2015)

ดังนั้นหากสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์โดยการเปลี่ยนน้ำตาล(sucrose) ให้อยู่ในรูปของ สารลิแวน(Levan) โดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อตอบสนองความต้องการของอุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้นและเพิ่มผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจให้กับประเทศได้ และนำมาศึกษา สภาพ(Condition) ที่เหมาะสมที่สามารถสังเคราะห์สารลิแวน เพื่อเป็นต้นแบบในการบวนการผลิตลิ แวนในขั้นอุตสาหกรรมต่อไป

บริษัทเอส.เอ็ม.ซี. (ประเทศไทย) จำกัด เป็นบริษัทที่ผลิตอาหารและเครื่องดื่ม รวมไปถึง เวชภัณฑ์และเครื่องสำอาง โดยในกระบวนการผลิตนั้นจะมีกากของเสียประเภทน้ำตาลอยู่เป็นจำนวนถึง 30-40 ตัน และมีองค์ประกอบของน้ำตาลถึง 80% และมีค่าความเค็มสูง หากเราสามารถคัดเลือก จุลินทรีย์ที่ทนต่อความเค็มและมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกากน้ำตาลมาเป็นสารลิแวนได้ จะเป็นการ เพิ่มมูลค่าให้กับกากของเสียประเภทน้ำตาลนั้น ถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการของเสียประเภท น้ำตาลให้กับทางบริษัท และตอบสนองความต้องการสารลิแวนในตลาดโลก ซึ่งจะส่งผลให้เศรษฐกิจของ ประเทศมีความมั่นคงมากยิ่งขึ้น

## 2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อลดปริมาณกากของเสียประเภทน้ำตาลของบริษัท เอส.เอ็ม.ซี. (ประเทศไทย) จำกัด เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเป็น prebiotic ในรูปของ levan
- 2.2 สืบหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เลเวนซูเครสจากอาการหมักดองที่มีความเค็มสูง
- 2.3 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกากของเสียประเภทน้ำตาลจากบริษัท เอส.เอ็ม.ซี. (ประเทศไทย) จำกัด ให้เป็นสาร levan
- 2.4 หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารเลเวนโดยใช้การหมักแบบแข็ง (Solid fermentation)

## 3. ขอบเขตของการทำโครงการวิจัย

คัดเลือกจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์จากการหมักดองแบบเค็ม นำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ทนความเค็มและสามารถผลิตสารเลเวนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนสภาพกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตเครื่องดื่มเพื่อสังเคราะห์เป็นสารเลเวน เป็นการเพิ่มมูลค่าของกากน้ำตาลให้สูงขึ้น

## 4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

### 4.1 ถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า : Thua nao)

เป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก (รูปที่ 4.1) เป็นอาหารพื้นบ้านล้านนาที่นิยมบริโภคในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งแปรรูปเพื่อการถนอมอาหาร (food preservation) ด้วยการหมัก (fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติจนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่น สี และรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นแหล่งของอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน สารอาหารที่มีประโยชน์จากถั่วเหลือง ถั่วเหลืองหมักนำมาใช้ประกอบอาหาร หรือใช้เป็นเครื่องปรุงรส เช่นเดียวกับกะปิ น้ำปลาของภาคกลาง น้ำบูดูของภาคใต้ หรือปลาร้าของภาคอีสาน

กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักคล้ายคลึงกับถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองที่พบในประเทศอื่น เช่น เตมเป้ ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซีย นัตโตะ (natto) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่น คีเนมา (kenema) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวเนปาลและอินเดีย และ chungkookjang ซึ่งใช้เป็นเครื่องปรุงรสของประเทศเกาหลี

การหมักถั่วเหลืองเกิดจากจุลินทรีย์แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่มาจากธรรมชาติ จากสิ่งแวดล้อมและวัตถุดิบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน ย่อยโปรตีนในถั่วเหลือง ให้มีโมเลกุลเล็กลง มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ และชีวเคมีของผลิตภัณฑ์ เช่น

เนื้อสัมผัสนุ่ม และรสชาติ สาร Pyrazine ซึ่ง เป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวของถั่วหมัก การหมักถั่วหมักต่างจากเต้าเจี้ยว มิโซะ ซีอิ๊ว (fermented soy sauce) ตรงที่การหมักถั่วหมัก ไม่เติมเกลือระหว่างหมัก (K. Dajanta, 2011)



รูปที่ 4.1 ถั่วเหลืองหมัก (K. Dajanta, 2011)

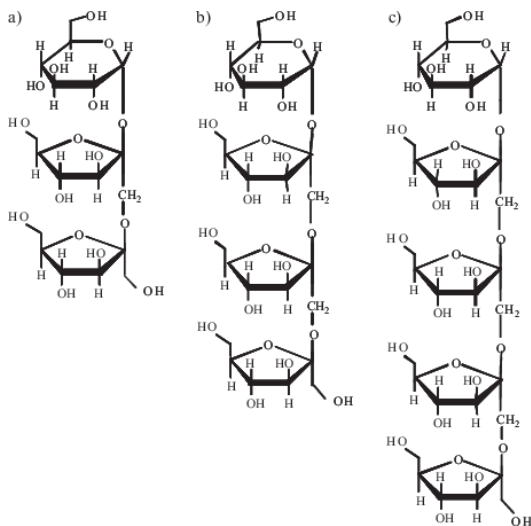
#### 4.2 ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs)

ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ บางครั้งก็เรียก โอลิโกฟรุคโทสหรือ โอลิโกฟรุคแทน เป็นชื่อเรียกของโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งโมเลกุลของฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เกิดจากเอนไซม์ fructosyl-transferas ทำหน้าที่เชื่อมพันธะไกลโคไซด์ระหว่างน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลต่อกับน้ำตาลฟรุคโทส น้อยกว่า 10 โมเลกุล โดยในรูปแบบของ อินูลินนีโออินูลิน, ลีแวน, นีโอลีแวน (M. Li, 2014) โครงสร้างของ อินูลินมีมอนอเมอร์เป็นฟรุคโตสต่อกันเป็นสายแบบ  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructosyl-fructose แต่จะมีขนาดของสายโมเลกุลที่เล็ก ซึ่ง FOSs ในรูปแบบของอินูลิน สามารถจำแนกออกได้เป็น 1-kestose (GF2), nystose (GF3) และ 1F-fructosyl nystose (GF4) (M. Li 2014, G. Chen 2016) ดังรูปที่ 1 โมเลกุลของฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปแบบอินูลินต่อกันเป็นสายแบบ  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructosyl-fructose : a) 1-kestose (GF2), b) nystose (GF3), c) 1-b-fructo-furanosyl nystose (GF4)

โดยที่กลุ่มอินูลินมีการต่อกันแบบ  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructosyl-fructose linkages อินูลินสามารถพบได้ในพืชมากกว่า 3,000 ชนิด อินูลินเป็นสารพรีไบโอติก ที่สามารถสังเคราะห์ได้จากซูโครส ใช้กันอย่างแพร่หลายในอาหารแปรรูปของไขมันโดยให้พลังงานเพียง 25% ถึง 30% เมื่อเทียบกับคาร์โบไฮเดรตหรือใช้ทดแทนน้ำตาลโดยให้ความหวาน 10% ของซูโครสและละลายในน้ำได้ดี ใช้ในอาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักเนื่องจากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่ถูกย่อยที่ลำไส้ใหญ่โดยเชื้อแบคทีเรีย (M. Shoib, 2016)

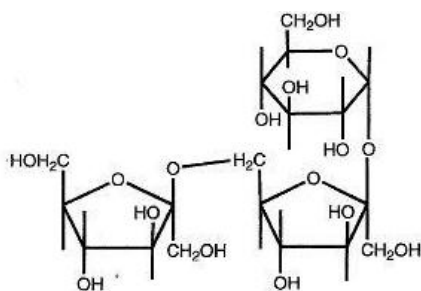
โดยที่ FOSs ในรูปแบบของสารลีแวนนั้นจะมีโครงสร้าง  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructosyl-fructose ซึ่งจะมีโครงสร้างไตรแซ็กคาไรด์หรือเรียกว่า 6-kestose นั้นเป็นโมเลกุลที่เล็กที่สุด หรืออาจจะมีการต่อกับโมเลกุลกลูโคสหรือซูโครสจะได้เป็นโครงสร้าง neo-nystose หรือ neo-kestose หรืออาจจะมีการต่อผสมระหว่างสายแบบ  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructosyl-fructose และ  $\beta(2 \rightarrow 6)$  fructosyl-fructose

โมเลกุลที่เล็กที่สุดเรียกว่า Bifurcose ดังรูปที่ 2 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกันเป็นสายแบบ  $\beta(2\rightarrow6)$  fructosyl-fructose

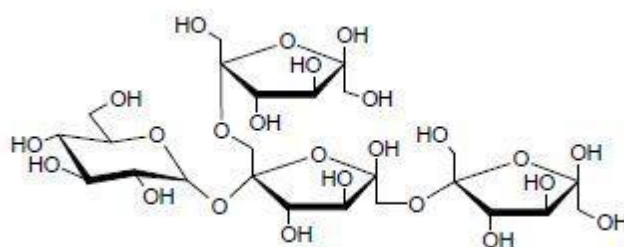


รูปที่ 4.2 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปอินูลินต่อกันเป็นสายแบบ  $\beta(2\rightarrow1)$  fructosyl-fructose : a) 1-kestose (GF2), b) nystose (GF3), c) 1-b-fructofuranosyl nystose (GF4) (R. Sarup, 2016)

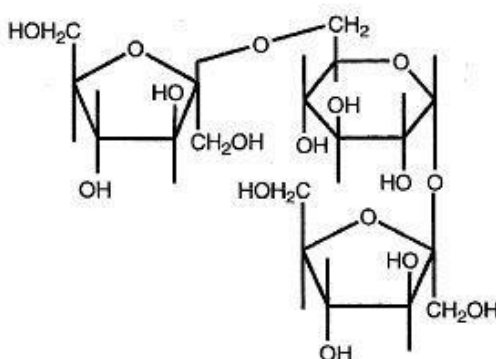
โดยสามารถพบในแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasserii*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter lev-anicum*, *Streptococcus salivarius* ฯลฯ (R. Srikanth, 2015) มีคุณสมบัติทางการแพทย์ที่สำคัญ เช่น สารต่อต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ป้องกันมะเร็ง และสารต่อต้านโรคเอดส์ (C. Sturzoiu, 2011) และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารเสริม และยา (Madigan, 2006)



6-kestose



Bifurcose



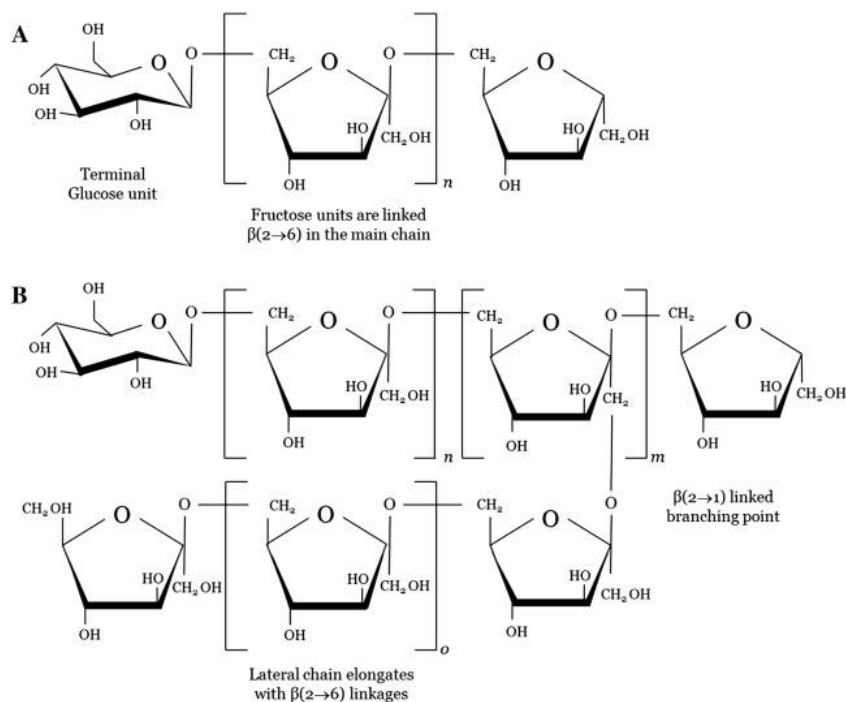
Neokestose

รูปที่ 4.3 โมเลกุลฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกันเป็นสายแบบ  $\beta(2 \rightarrow 6)$  fructosyl-fructose (M. Li, 2014)

### 4.3 ฟรุกแทน

#### 4.3.1 ลีแวน

ลีแวนลีแวน (Levan) เป็นชนิดของ fractans ที่มีโมเลกุลของน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิด มาเชื่อมต่อกันแบบ  $\beta(2 \rightarrow 6)$  linkages ซึ่งเป็นสายตรงของน้ำตาลฟรุกโทส (fructose) กับ  $\beta(2 \rightarrow 1)$  linkages โชกิง ตั้งแต่ 10 ถึง 60 โมเลกุล โดยมีน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นสายเริ่มต้น (N. Benkeblia 2013, J.R. Porras-domínguez 2014) ดังรูปที่ 3 A. โครงสร้างลีแวนแบบเส้นตรง B. โครงสร้างลีแวนแบบเส้นตรงและกึ่ง



รูปที่ 4.4 A. โครงสร้างลิแวนแบบเส้นตรง B. โครงสร้างลิแวนแบบมีกิ่ง (R. Srikanth, 2015)

#### 4.3.2 กระบวนการสร้างลิแวน

เอนไซม์ลิแวนซูเครสทำหน้าที่เป็นตัวขนย้ายสารออกมามากภายนอกเซลล์ และมีกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) น้ำตาลซูโครส (sucrose) เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำฟรักโทส โดยที่น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลจะต่อกับน้ำฟรักโทสจะรวมเป็นสายโพลิเมอร์แบบ  $\beta(2 \rightarrow 1)$  linkages (J.R. Porras-domínguez, 2015) ดังรูปที่ 4.4 กระบวนการการสร้างลิแวนของเอนไซม์ลิแวนซูเครสสามารถแบ่งขั้นตอนการสังเคราะห์ลิแวน จากซูโครส ได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : การสังเคราะห์เอนไซม์ลิแวนซูเครส เกิดขึ้นในเซลล์ของจุลินทรีย์

ขั้นตอนที่ 2 : เอนไซม์ลิแวนซูเครส สะสมภายในเซลล์ ส่งมายังช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เรียกว่า periplasmic space และส่งออกมายังนอกเซลล์

ขั้นตอนที่ 3 : เกิดกระบวนการของเอนไซม์ลิแวนซูเครส ที่เรียกว่า signal peptide จะมีสังเคราะห์โปรตีนออกมาพร้อมกระบวนการ

ขั้นตอนที่ 4 : เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยจุลินทรีย์ ทำให้น้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นโมเลกุลคู่เปลี่ยนเป็นกลูโคสและฟรักโทสที่มีโมเลกุลเดี่ยว เกิดการรวมกันระหว่างเอนไซม์ลิแวนซูเครส กลูโคส และฟรักโทส

ขั้นตอนที่ 5 : เกิดปฏิกิริยา transfructosylation เอนไซม์ลิแวนซูเครสจะจับตัวกับกลูโคส 1 โมเลกุลต่อกับฟรักโทสเป็นสายโพลิเมอร์ ที่เรียกว่า ลิแวน (R. Srikanth, 2015) ดังรูปที่ 4.4 กระบวนการการผลิตเอนไซม์ลิแวนจากเซลล์จุลินทรีย์

#### 4.3.3. เอนไซม์ฟรักโทซิลทรานส์เฟอรัส (Fructosyl transferase : FTase)

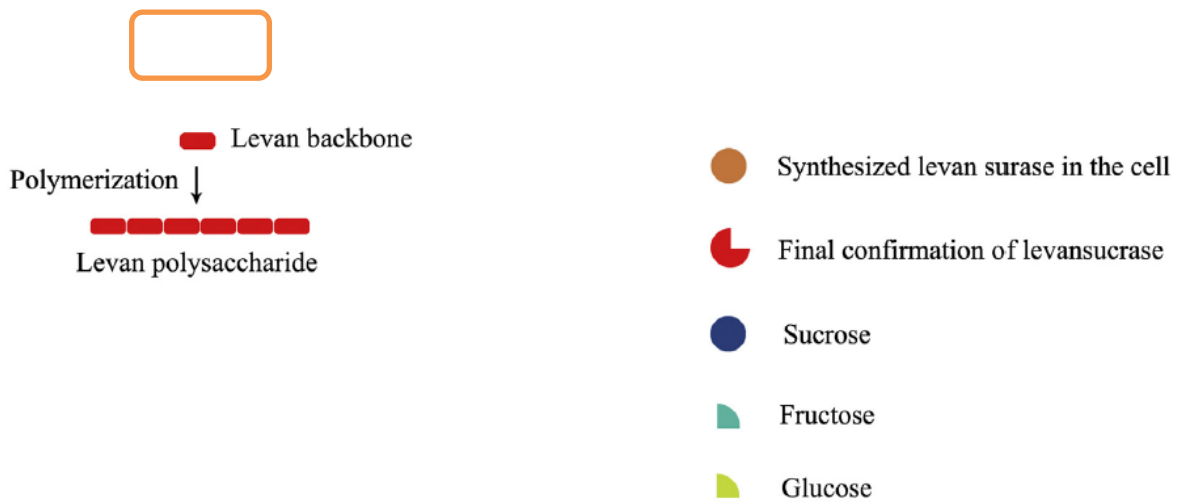
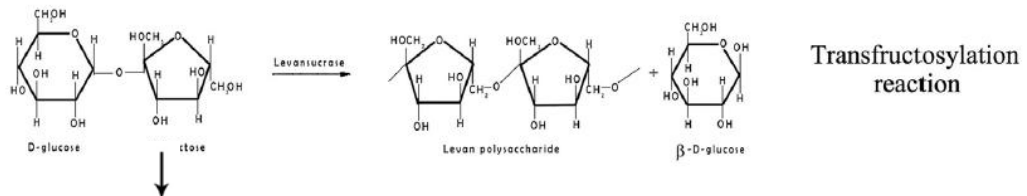
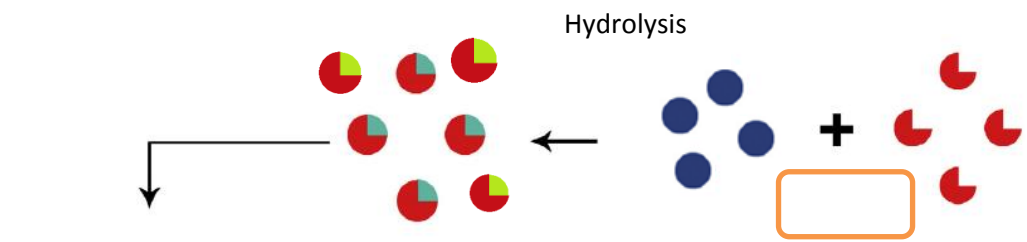
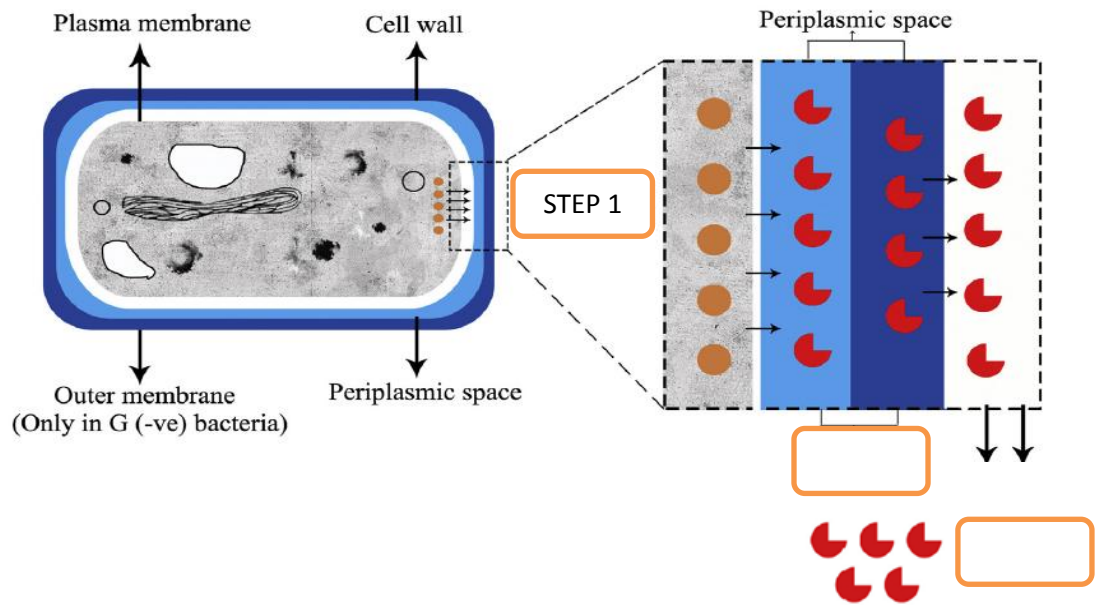


เอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟอรัเรสถูกจัดกลุ่มใน glycoside hydrolase 68 (GH68) (B.L. Cantarel, 2009)

สามารถสังเคราะห์ FOSs ได้ โดยมีกลไกเกิดปฏิกิริยา 2 ลักษณะ

1. ทำหน้าที่ในการย่อยซูโครสเปลี่ยนเป็นกลูโคสและฟรุคโตส (hydrolysis)
2. ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สาร FOSs (Transfructosylation)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย เอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) สังเคราะห์สารลิแวนและเอนไซม์อินูโลซูเครส สังเคราะห์สารอินูลิน (M.A. Anwar, 2012)

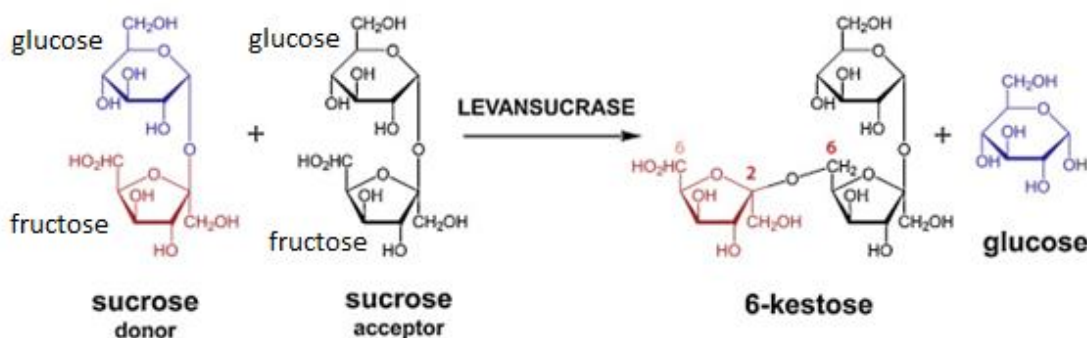


รูปที่ 4.5 กระบวนการการผลิตเอนไซม์ดีแวนจากเซลล์จุลินทรีย์ (R. Srikanth, 2015)

### 1) เอนไซม์ลิแวนซูเครส (levansucrase)

เอนไซม์ลิแวนซูเครสจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟออร์- เรสมีลักษณะการสังเคราะห์  $\beta(2\rightarrow6)$  โอลิโกฟรุกแทน โดยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจะทำหน้าที่ 2 ปฏิกริยานำโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวรับ สร้างพันธะกับโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวให้เรียกว่า ทรานฟรุกโทซิเลชั่นแยกโมเลกุลกลูโคสตัวให้ออกจากฟรุกโตสตัวให้เรียกว่า ไฮโดรไลซิส (E.T. Öner 2016, C. Olvera 2007)

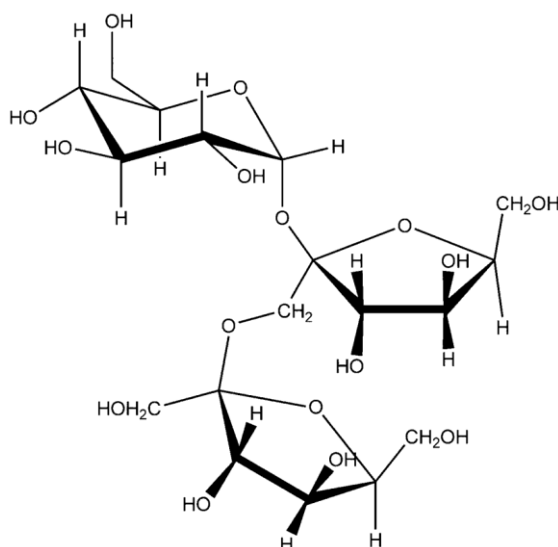
จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 6-kestose ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในปฏิกิริยา Polymerization เพื่อเพิ่มความยาวของสายพอลิเมอร์  $\beta(2\rightarrow6)$  โอลิโกฟรุกแทน ดังรูปที่ 5 ปฏิกริยาของเอนไซม์เอนไซม์ ลิแวนซูเครสเพื่อสังเคราะห์สารลิแวนสามารถพบได้ทั้งในพืช (Agropyron cristatum, Dactylis glomerata และPoa secunda) (R. Srikanth, 2015) แบคทีเรียและเชื้อรา (Acetobacter, Bacillus, Erwinia, Gluconobacter, Halomonas, Microbacterium, Pseudomonas, Streptococcus and Zymomonas) (E.T. Öner, 2016)



รูปที่ 4.6 ปฏิกริยาของเอนไซม์เอนไซม์ลิแวนซูเครสเพื่อสังเคราะห์สารลิแวน (W. Lammens, 2009)

### 2) เอนไซม์อินูโลซูเครส (inulosucrase)

เอนไซม์อินูโลซูเครสอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟออร์เรสแต่มีลักษณะการสังเคราะห์  $\beta(2\rightarrow1)$  โอลิโกฟรุกแทนที่เรียกว่า อินูลิน โดยเอนไซม์อินูโลซูเครส จะทำหน้าที่ 2 ปฏิกริยา เช่นเดียวกับเอนไซม์ลิแวนซูเครสนำโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวรับ สร้างพันธะกับโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวให้เรียกว่า ทรานฟรุกโทซิเลชั่น แยกโมเลกุลกลูโคสตัวให้ออกจากฟรุกโตสตัวให้เรียกว่า ไฮโดรไลซิส แต่โครงสร้างเริ่มต้นนั้น จะเป็น 1-Kestose ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในปฏิกิริยา Polymerization เพื่อเพิ่มความยาวของสายพอลิเมอร์  $\beta(2\rightarrow1)$  โอลิโกฟรุกแทน (M. Li 2014, A. Banguela 2017)



รูปที่ 4.7 โครงสร้าง 1-Kestose (M. Li 2014, A. Banguela 2017)

สามารถพบได้แบคทีเรียและเชื้อราบางกลุ่มและมีความจำเพาะกว่าเอนไซม์ลีแวนซูเครส (*Streptococcus mutans* JC2, *Streptococcus mutans* GS-5, *Leuconostoc citreum* CW2, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, *Lactobacillus gasseri* DSM 20604, *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106, *Bacillus* sp.217C-11, *Weissella confusa* MBFCNC-2 (1) และ *Lactobacillus reuteri* 12) (D. Ni, 2017)

#### 4.3.4. ปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชันและไฮโดรซิส

ความสัมพันธ์ของปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชันและไฮโดรซิสของ เอนไซม์ลีแวนซูเครสและ เอนไซม์อินูโลซูเครส จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่เอื้อต่อการเกิดปฏิกริยาหนึ่งและอีกยับยั้งการเกิดปฏิกริยาหนึ่ง เช่น ความเข้มข้นของซูโครส ค่า pH อุณหภูมิ และไอออนของโลหะ (M. Li 2014, A. Banguela 2017).

##### - ความเข้มข้นของซูโครส

ผลของความเข้มข้นของซูโครสกับเอนไซม์ลีแวนซูโครสที่มาจาก *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าความเข้มข้นซูโครสต่ำจะส่งผลต่อการเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิส มากกว่าปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชัน อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นกลับเอื้อต่อการเกิดปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชันมากกว่าเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิส ในทำนองเดียวกับเอนไซม์อินูโลซูเครสที่สร้างจาก *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 (D. Ni, 2017)

- ค่า pH

ความเป็นกรดต่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ลีสแวนซูเครสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าการเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันมากกว่าเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในช่วง pH 5.5 ในช่วง pH มากกว่า 5.5 และ pH น้อยกว่า 5.5 จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าทรานฟรุกโทซิเลชัน ส่วนเอนไซม์อินูโลซูเครสจะเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันมากที่สุด ในสภาวะที่เป็นกรด ในสภาวะที่เป็นกลางเบสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชัน (D. Ni, 2017)

- อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งในการเกิดปฏิกิริยาเคมี หากอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นแปรผันตรงแต่เอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน ดังนั้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะถูกยับยั้งได้ อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญมากอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ลีสแวนซูเครสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 55°C เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันน้อยกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่จะเกิดสูงกว่าในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 55°C และอุณหภูมิที่ 57°C อัตราส่วนเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมี้อัตราสูงที่สุด (A. Szwengiel, 2016) แต่มีงานวิจัยพบว่า *Zymomonas mobilis* สร้างเอนไซม์ลีสแวนซูเครส เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันมากกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 4°C แต่ที่อุณหภูมิ 40°C เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันน้อยกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ในทำนองเดียวกันเอนไซม์อินูโลซูเครสที่ถูกสร้างจาก *Lactobacillus gasserii* DSM 20604 เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันมากกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 10 °C ถึง 35°C และช่วงอุณหภูมิ 40 °C ถึง 70°C เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันน้อยกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

- ไอออนของโลหะ

ไอออนของโลหะทำหน้าที่ Co-factor ในการทำงานของเอนไซม์และไอออนบางชนิดอาจจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย ในกรณีเอนไซม์ลีสแวนซูเครสจาก *Bacillus subtilis* พบว่า  $Mn^{2+}$  2.5 mM การเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันเพิ่มขึ้น 100% และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 75% (Q. Liu, 2017) เอนไซม์อินูลินซูเครสที่สร้างจาก *Lactobacillus gasserii* DSM 20604 พบว่า  $Mn^{2+}$  เพิ่มเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันและปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น 157% (D. Ni, 2017)

#### 4.3.5. การเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization

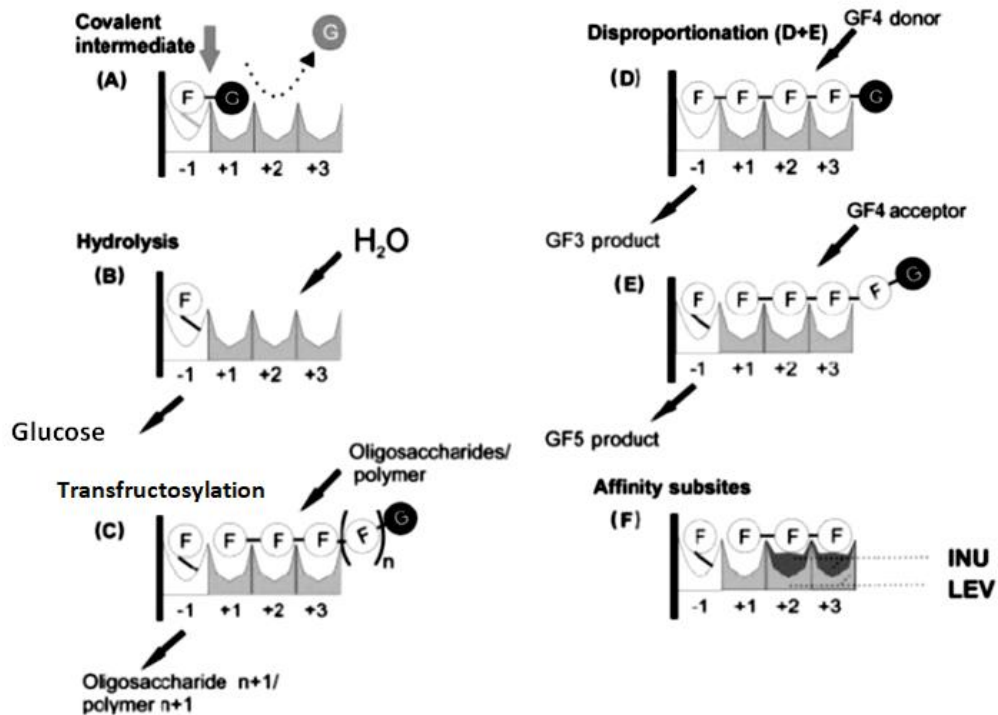
เอนไซม์ลีสแวนซูเครสสามารถสังเคราะห์ได้ทั้ง ลีสแวน และ FOSs แต่การเกิดปฏิกิริยาที่จะให้ผลิตภัณฑ์นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมากในอัตราส่วนพอลิเมอร์ (ลีสแวน) กับ FOSs ที่สังเคราะห์ ขึ้นอยู่กับเอนไซม์และสภาวะของปฏิกิริยา โดยเสนอแบบจำลอง "Processive กับ Non-processive" สำหรับการทำงานของลีสแวนซูเครส ในการสร้างพันธะของโมเลกุลน้ำตาลเพื่ออธิบายถึงการเกิดปฏิกิริยา

ต่อ Polymerization และ Oligomerization โดยจะเอนไซม์จะมี subsite ดังนี้ - 1 subsite จะสร้างพันธะกับโมเลกุลฟรุทโตส +1 subsite สามารถรองรับน้ำตาลกลูโคส (ทั้งน้ำตาลซูโครสและราฟฟิโนส) และฟรุทโตส (ซูโครสที่มีผลต่อการเป็นตัวรับ (acceptor))

ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุทโทซิเลชั่น เมื่อซูโครสมาที่ active site โมเลกุล ฟรุทโตสจะอยู่ที่ -1 subsite ส่วนโมเลกุลกลูโคส +1 subsite จะปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จากนั้นโมเลกุลของซูโครสตัวใหม่จะเข้าสู่ active site ที่ +1 subsite และ +2 subsite มีเกิดปฏิกิริยา ทรานฟรุทโทซิเลชั่น เป็นสาร FOSs ในลักษณะ GF2 หาก ถ้าซูโครสตัวใหม่ เข้าสู่ active site ที่ +2 subsite และ +3 subsite หรืออาจจะเพิ่มมากขึ้น จะทำให้เกิดสายพอลิเมอร์

แต่ในกรณีที่ active site มีประสิทธิภาพในการจับกับฟรุทโตสต่ำและสายพอลิเมอร์ที่เพิ่มขึ้นนั้น จะหลุดออกมาพร้อมกับโมเลกุลซูโครส เรียกกระบวนการนี้ว่า Non-processive หรือ Oligomerization

กรณีที่ active site มีประสิทธิภาพในการจับกับฟรุทโตสสูงจะทำให้สายพอลิเมอร์ที่เพิ่มขึ้นทำให้โพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เรียกกระบวนการนี้ว่า Processive หรือ Polymerization ไม่เพียงเท่านั้นความสำคัญของน้ำตาลตัวรับและน้ำตาลตัวให้ จะจำเพาะเจาะจงกับ active site ของ เอนไซม์ลีสแวนซูเครส ณ ตำแหน่งที่ -1 subsite จะจับกับโมเลกุลของฟรุทโตส จากซูโครสที่เป็นตัวให้และ +1 subsite จะจับทั้งตัวให้และตัวรับในกรณีที่ความเข้มข้นซูโครส ทำให้เอนไซม์ลีสแวน ซูเครสสามารถนำน้ำตาลฟรุทโตสต่างโมเลกุล มาผลิตเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ ดังรูปที่ 4.8 โมเดลการเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization บน active site ของเอนไซม์ลีสแวนซูเครส : G (กลูโคส), F (ฟรุทโตส) and LEV (ลีสแวนซูเครส)



รูปที่ 4.8 โมเดลการเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization บน active site ของ เอนไซม์ลิแวนซูเครส : G (กลูโครส), F (ฟรุคโตส) and LEV (ลิแวนซูเครส) (M. Li, 2014)

เอนไซม์ลิแวนซูเครสที่สังเคราะห์จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน จะทำให้การทำงานของเอนไซม์แตกต่างกันอีกด้วย ทั้งในเรื่องของในรูปแบบของโครงสร้างและขนาดของสายพอลิเมอร์ (Degree of polymerization) เช่น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* สังเคราะห์เอนไซม์ลิแวนซูเครส จะผลิตสารลิแวนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าการผลิต FOSs แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์จะเป็นแบบ processive แต่ในทางกลับกัน *Zymomonas mobilis* และ *Lactobacillus sanfranciscensis* จะสังเคราะห์เอนไซม์ลิแวนซูเครสที่ผลิตสาร FOSs มากกว่าสารลิแวน

#### 4.3.6. ประโยชน์ของสารลิแวน

##### 1) ด้านสุขภาพ

1. ทำเป็นแผ่นฟิล์ม ใช้ในการรักษาบาดแผลพุพอง (C. Sturzoiu, 2011)
2. ป้องกันการระคายเคือง ต่อต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ (A.D. Sedgwick, 1984)
3. การลดน้ำหนัก และช่วยลดคอเลสเตอรอล (Madigan, 2006)
4. ทดสอบการระคายเคืองของผิวและตา (Kim, 2003)

5. ผสมกับผลิตภัณฑ์เพิ่มความกระจ่างของผิว (Kim 2003, K.H. Kim 2006)

6. สารพรีไบโอติก (Prebiotics) ที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อย และไม่ถูกดูดซึมได้

ในระบบทางเดินอาหาร ทั้งกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่จะถูกย่อยด้วยแบคทีเรียบริเวณในลำไส้ใหญ่ โดยจะกระตุ้นการทำงานและส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติก (K.Adamberg, 2015)

## 2) ด้านเศรษฐกิจ

1. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ลีแวนสามารถสร้างภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำสามารถทนต่ออุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นได้ (S.K. Gupta 2008, S.K. Gupta 2010)
2. ทดแทนไขมันในกระบวนการทำโยเกิร์ต (R. Article, 2013)
3. เพิ่มการอายุการเก็บรักษาขนมปัง (F. Jakob, 2012)
4. นำมาเป็นฟิล์มบรรจุอาหาร (S.V.N. Vijayendra, 2014)

## 4.4 กระบวนการทำให้สารบริสุทธิ์ (Purification)

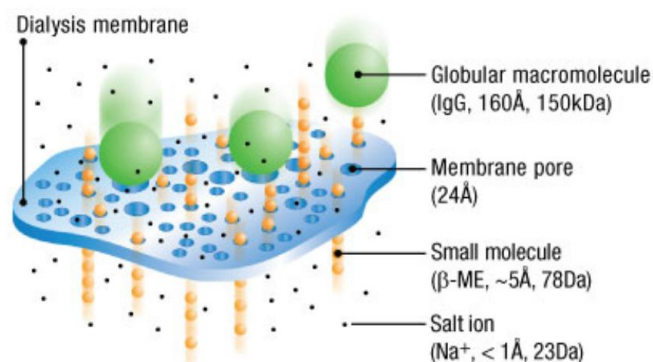
### 1) การตกตะกอน

การตกตะกอน ใช้แยกของผสมเนื้อผสมที่เป็นของแข็งแขวนลอยอยู่ในของเหลว โดยปล่อยของผสมนั้นวางทิ้งไว้ให้สารแขวนลอยค่อยๆ ตกตะกอนจะได้สาร 2 ส่วน ด้านบนจะเป็นส่วนใสและด้านล่างจะเป็นตะกอนเนื่องจากแรงโน้มถ่วงของโลก ในกรณีที่ตะกอนเบามากถ้าต้องการให้ตกตะกอนเร็วขึ้น อาจทำได้โดยใช้สารตัวกลางให้อนุภาคของตะกอนมาเกาะ เมื่อมีมวลมากขึ้นน้ำหนักจะมากขึ้นจะตกตะกอนได้เร็วขึ้น

### 2) Dialysis

กระบวนการ dialysis เป็นการอาศัยการแพร่กระจายของโมเลกุลผ่านแผ่น เมมเบรนแบบกึ่งโปร่งมีเพื่อแยกขนาดโมเลกุล ตัวอย่างโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนจะถูกเก็บไว้ด้านของเมมเบรน แต่โมเลกุลที่เล็กกว่าขนาดรูพรุนจะผ่านเมมเบรนและมีการแลกเปลี่ยนกับบัฟเฟอร์เพื่อลดความเข้มข้นของสารตัวอย่าง





รูปที่ 4.9 กระบวนการ dialysis (P. Haney, 2013)

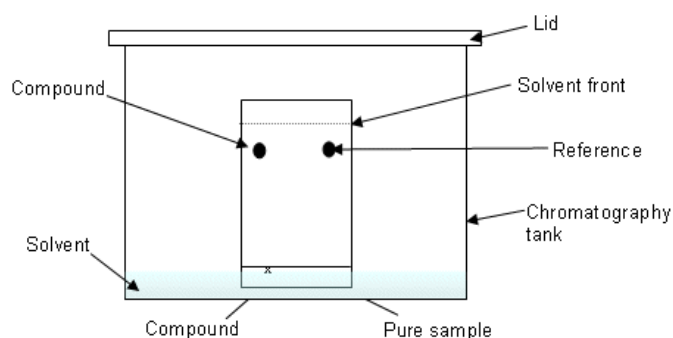
ขนาดรูพรุนของเมมเบรนสามารถบอกในหน่วย molecular-weight cutoffs (MWCO) โดยที่ MWCO หมายถึง มวลโมเลกุลเฉลี่ยที่น้อยที่สุดของโมเลกุลมาตรฐาน ที่จะไม่เกิดการแพร่กระจายของสาร

#### 4.5 การวิเคราะห์สาร

##### 1) ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง ใช้ตรวจวัดองค์ประกอบของสารผสม โดยสังเกตการณ์เคลื่อนที่ของสารจาก

ตัวดูดซับ (K.S. Belghith, 2012)



รูปที่ 4.10 กระบวนการวิเคราะห์สารแบบ ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) (P.E. Wall, 2005)

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารแบบทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) มีดังนี้

- วาดเส้นตัวดูดซับจากด้านล่างขึ้นมา 1 เซนติเมตร ด้านบน 0.5 เซนติเมตร
- วาดจุดบนเส้นล่างห่างออกมาทางด้านข้าง 0.5 เซนติเมตร ถัดไปจุดละ 1 เซนติเมตร
- โดยให้มีจุดอ้างอิงและจุดสารผสม

- ใส่สารละลายต่ำกว่าเส้นด้านล่าง และรอสารละลายเคลื่อนตัวขึ้นไปยังเส้นด้านบน
- เปรียบเทียบสารระหว่างจุดอ้างอิงกับสารผสม

#### 4.6 น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร

อุตสาหกรรมอาหารเป็นอุตสาหกรรมที่เติบโตขึ้นเพื่อสนองความต้องการของมนุษย์ เนื่องจากอาหารเป็นปัจจัยสำคัญต่อการดำรงชีวิตที่ขาดไม่ได้ อุตสาหกรรมประเภทนี้จึงเติบโตควบคู่ไปกับการเติบโตของจำนวนของประชากรโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่พัฒนาแล้วจะมีอัตราการเติบโตของอุตสาหกรรมอาหารค่อนข้างสูง (Noukeu et al., 2016) ในกระบวนการผลิตอาหารของอุตสาหกรรมนี้มีการใช้น้ำในปริมาณมาก เช่น มีการใช้น้ำในกระบวนการทำความสะอาด ใช้น้ำเพื่อการผลิตอาหาร ใช้ในการขนส่ง และในการทำความเย็น เป็นต้น จึงทำให้เกิดน้ำเสียขึ้นเป็นจำนวนมาก น้ำเสียที่เกิดขึ้นมีลักษณะและองค์ประกอบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของอาหารที่ผลิต ส่วนใหญ่มีค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solid, TSS) ค่อนข้างสูง และมีองค์ประกอบของไนโตรเจน ไขมัน โปรตีน น้ำมัน สารอินทรีย์ต่าง ๆ ฟอสฟอรัส คลอรีน และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการทำความสะอาด น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมีความคล้ายคลึงกับน้ำเสียชุมชน กล่าวคือมีสารอาหารต่าง ๆ ปนเปื้อนแต่มีในปริมาณที่สูงกว่า ไม่เป็นพิษ ย่อยสลายได้ และยังสามารถบำบัดได้ด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพทั่วไป สำหรับพารามิเตอร์พื้นฐานของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารจะมีค่า BOD และค่า Chemical Oxygen Demand (COD) มากกว่าน้ำเสียชุมชนตั้งแต่ 10 ถึง 100 เท่า (Ghimpusan, Nechifor, Nechifor, Dima, & Passeri, 2017)

#### 4.7 ระบบบำบัดน้ำเสีย

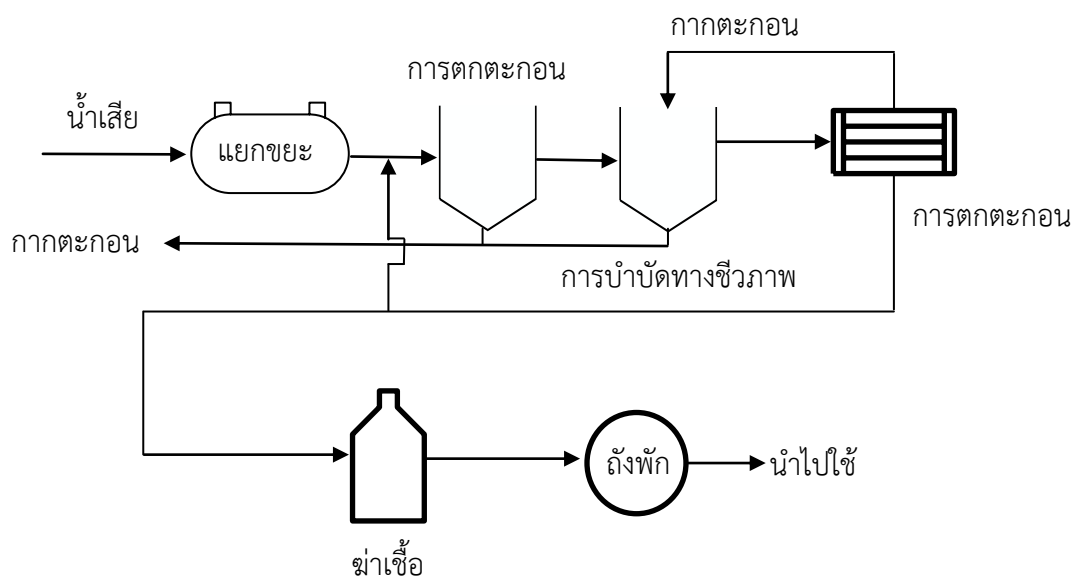
ในกรณีที่ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมีความสามารถในการละลายน้ำสูงและปนเปื้อนออกมากับน้ำเสียของกระบวนการผลิตจะนิยมบำบัดด้วยระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้งานโดยทั่วไป มีขั้นตอนการบำบัดน้ำเสียโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ การบำบัดน้ำเสียขั้นเตรียมการ (Preliminary wastewater treatment) การบำบัดน้ำเสียขั้นต้น (Primary wastewater treatment) การบำบัดน้ำเสียขั้นที่สอง (Conventional secondary wastewater treatment) และการบำบัดน้ำเสียขั้นสูง (Advanced wastewater treatment)

4.7.1 การบำบัดน้ำเสียขั้นเตรียมการ (Preliminary wastewater treatment) เป็นขั้นตอนแรกในการบำบัดน้ำเสียเพื่อกำจัดของเสีย เศษขยะต่าง ๆ น้ำมัน และไข เป็นต้น ที่อาจจะเข้าไปสร้างความเสียหายต่อเครื่องมือในระบบบำบัดน้ำเสียในขั้นต่อไป การบำบัดขั้นเตรียมการ ได้แก่ การกรอง การแยกและการบดเศษขยะ เป็นต้น

4.7.2 การบำบัดน้ำเสียขั้นต้น (Primary wastewater treatment) เป็นขั้นตอนการบำบัดของแข็งแขวนลอยและสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่ได้จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียขั้นเตรียมการ ขั้นตอนนี้ใช้การบำบัดทางกายภาพ เช่น การกรอง และการตกตะกอน เป็นต้น

4.7.3 การบำบัดน้ำเสียขั้นที่สอง (Conventional Secondary wastewater treatment) เป็นขั้นตอนการบำบัดเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ด้วยวิธีการบำบัดทางชีวภาพ เช่น กระบวนการแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ (Activated sludge process) ถังตกตะกอน (Sedimentation tank) เป็นต้น

4.7.4 การบำบัดน้ำเสียขั้นสูง (Advanced wastewater treatment) เป็นการบำบัดน้ำเสียที่ได้จากการบำบัดน้ำเสียขั้นที่สอง โดยขั้นตอนนี้จะทำการบำบัดเพื่อกำจัดสารอาหารและสารพิษต่าง ๆ โดยอาศัยกระบวนการสร้างและรวมตะกอนทางเคมี การตกตะกอน การกรอง การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (George Tchobanoglous, 1991)



รูปที่ 4.11 ขั้นตอนการบำบัดน้ำเสีย

#### 4.8 การบำบัดของเสียของแข็งจากอุตสาหกรรมอาหาร

ของเสียของแข็งจากอุตสาหกรรมอาหารมักประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยมีองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่ละลายน้ำได้ จึงเหมาะสมต่อการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ ในกระบวนการบำบัดจะเกิดสลัดจ์ (Sludge) ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นปุ๋ยสำหรับ

การเกษตรและการเลี้ยงสัตว์ได้ อย่างไรก็ตามกระบวนการนี้จะก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นรบกวน และเกิดน้ำชะที่สกปรกและปนเปื้อน (Leaching)

สำหรับของแข็งที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ หากสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้จะถูกนำไปบำบัดและประยุกต์กับการผลิตแก๊สธรรมชาติ (Biogas) หรือนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ หรือนำไปผลิตเป็นปุ๋ย หากของแข็งเหล่านั้นไม่สามารถนำไปประโยชน์ใด ๆ ได้อีกจะถูกกำจัดด้วยวิธีการฝังกลบ (Landfill) เป็นขั้นตอนสุดท้าย

อย่างไรก็ตามของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร บริษัท เอส. เอ็ม เคมีคัล ประเทศไทย (จำกัด) เป็นของเสียที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นหลักซึ่งสามารถละลายน้ำได้ การบำบัดที่เหมาะสมจึงเป็นการบำบัดด้วยวิธีการทางชีวภาพด้วยการเปลี่ยนของเสียซูโครสให้เป็นสารลิวโนที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้ (Doble & Kumar, 2005)

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ing Lung shih และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาเรื่องการผลิตอนุพันธ์ของสาร Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) จากจุลินทรีย์ Bacillus subtilis พบว่านอกเหนือจากการผลิตสาร สาร Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) แล้วนั้น จุลินทรีย์ Bacillus subtilis ยังสามารถผลิตสารลิวโน ได้อีกด้วย (Ing Lung shih, 2004)

และต่อมาในปี 2005 Ing Lung shih และคณะ จึงได้ทำการศึกษาศึกษาการผลิตสารลิวโน จาก จุลินทรีย์ Bacillus subtilis (Natto) Takahashi หลักจากที่ทิ้งให้จุลินทรีย์นี้ย่อยน้ำตาลกลูโคสเป็นเวลา 21 ชั่วโมงพบว่าสามารถผลิตสารลิวโน ได้ 40-50 มิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็น 50% yield และพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลิวโนด้วย Bacillus subtilis (Natto) Takahashi นั้นขึ้นกับชนิดของน้ำตาล ความเข้มข้น pH อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก และความเร็วในการหมุน และกล่าวอีกว่า Bacillus subtilis (Natto) Takahashi นั้นเป็นตัวที่ดีที่สุดในการผลิตสารลิวโนจากการทดลองและงานวิจัยก่อนหน้านี้ เพราะสามารถผลิตสารลิวโนได้ด้วย % yield ที่สูงที่สุดในเวลาที่น้อยที่สุด (21 ชั่วโมง) ภายใต้สภาวะปกติ

และในปี 2010 Ing Lung shih และคณะ ได้นำ Bacillus subtilis (Natto) มาทำการตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 2 % calcium เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารลิวโน พบว่าความแข็งแรงและคงตัวของเม็ดอัลจิเนตนั้นขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ค่า pH ไอออนของโลหะ และความเร็วในการเขย่า ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถผลิตสารลิวโนได้สูงที่สุดเมื่อผ่านไป 3 วันของการหมักและทำลายตัวของเม็ดอัลจิเนต ซึ่งการตรึงจุลินทรีย์ Bacillus subtilis (Natto) ไว้ในเม็ดอัลจิเนตนั้นสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 5 รอบ (72 ชั่วโมง/รอบ) (Ing Lung shih, 2005)

Lorenzoni และคณะ (2013) ได้ศึกษาการการสังเคราะห์ Fructooligosaccharides ด้วย เอนไซม์  $\beta$ -fructofuranosidase โดยใช้จุลินทรีย์ Viscozyme ตรึงบนเม็ดโคโตซาน พบว่าที่อุณหภูมิ 60°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม จากการทำซ้ำ 50 ครั้ง ทำให้ได้ค่า yield เฉลี่ย เท่ากับ 55% (A.S.G. Lorenzoni, 2014)

F. Wu และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักริมของ ลีแวนของ *Bacillus subtilis natto* ใน batch และ fed-batch culture ในถังหมัก การผลิตลีแวนใน batch และ fed-batch culture ของ *Bacillus subtilis (natto)* ในการหมัก เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีซูโครส (250 กรัม / ลิตร) ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37°C และความเร็วยรอบ 175 rpm จะทำให้มีประสิทธิภาพและผลผลิตลีแวนที่สูง (61 g/L at 24 h ; 3.4 g/L/h) น้ำตาลซูโครสช่วยเพิ่มการผลิตลีแวนเป็น 100 กรัม / ลิตร (เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า) นี่เป็นครั้งแรกที่ได้รับการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ในถังหมัก และมีลีแวนที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ได้รับรายงาน ผลผลิตและน้ำหนักริมของลีแวนขึ้นอยู่กับ การเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม ความเข้มข้นของซูโครสเป็นปัจจัยที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุม น้ำหนักริมของลีแวนที่สังเคราะห์ ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างลีแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันสำหรับการใช้งานที่ต่างกัน (F. Wu, 2013)

ในปี ค.ศ. 2017 นักวิจัยจากโปรตุเกสทำการศึกษาการผลิตสารพรีไบโอติกชนิดแลกตูโลส (Lactulose) และกาแลกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Galacto-oligosaccharide, GOS) ด้วยเอนไซม์  $\beta$  - galactosidases ที่ผลิตได้จากราสายพันธุ์ *Aspergillus lacticoffeatus* ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์  $\beta$ -galactosidases ด้วยอาหารทั้งหมดที่แตกต่างกัน 7 แบบ โดยใช้แหล่งคาร์บอนด้วย Cheese whey (CW) และ Corn steep liquor (CSL) ซึ่งประกอบด้วย

- อาหาร A (lactose, peptone, yeast extract, salt)
- อาหาร B (lactose, 0.8%(w/v) CSL, salt)
- อาหาร C (lactose, 2%(w/v) CSL, salt)
- อาหาร D (CW)
- อาหาร E (CW, salt)
- อาหาร F (peptone, CW, yeast extract)
- อาหาร G (peptone, yeast extract, salt)

จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า *A.lacticoffeatus* สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidases บนอาหารทุกชนิด ยกเว้นอาหารชนิด D เนื่องจากอาหารชนิดนี้ขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์ สำหรับอาหาร A ให้ค่า Activity ของเอนไซม์สูงที่สุดที่ 413 U/L และอาหารอื่น ๆ อยู่ในช่วงประมาณ 100 – 180 U/L นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ และ pH ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดิบ (Crude enzyme) โดยทดลองที่อุณหภูมิ 15-65 °C และ pH 3-7.5 ผลการทดลองยืนยันว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 50-60 °C โดยมี Relative activity มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และ pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 3.5-4.5 โดยมี Relative activity มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และยังทำการศึกษาผลของไอออนของสารประกอบเกลือ สารเติมแต่ง (Additive) และสารลดแรงตึงผิว โดยไอออนเกลือชนิด Li+, K+, Fe<sup>2+</sup> และ Ba<sup>2+</sup> มีผลกระทบต่อ Relative activity ลดลง สารเติมแต่งและสารลดแรงตึงผิวทุกชนิดได้แก่ Sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween-40, TrironX-100, Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) และ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ส่งผลให้ Relative activity เพิ่มขึ้นหรือคงที่ ยกเว้นวิตามินซี (Ascorbic acid) ที่ทำให้ Relative activity ลดลง เมื่อทำการเติมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ ฟรุกโตส กลูโคสและกาแลคโตส ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อศึกษาผลกระทบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว พบว่า มีเพียงกาแลคโตสเท่านั้นที่ส่งผลให้ Relative activity ลดลง (Cardoso, Silvério, Abrunhosa, Teixeira, & Rodrigues, 2017)

## 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 5.1 สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าให้กับกากของเสียประเภทน้ำตาลจากโรงงานได้
- 5.2 จุลินทรีย์ที่พบสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพของกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตเครื่องดื่มเป็นสารสีแว่นได้
- 5.3 ทราบถึงสถานะที่เหมาะสมในการทำงานของจุลินทรีย์ที่พบให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสารสีแว่นได้สูงสุด
- 5.4 สามารถหาวิธีการและเทคโนโลยีใหม่ ๆ ในการบำบัดของเสียที่เหลือทิ้งจากโรงงานที่มีปริมาณน้ำตาลสูงได้
- 5.5 มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถเพิ่มคุณค่าให้นำไปสู่การต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ในระดับสากลได้

## 6. วิธีการทดลอง

### 6.1 สารเคมีและอาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Sucrose
2. Yeast Extract
3. Tryptone
4. NaCl
5. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
6. Agar
7. น้ำกลั่น
8. แอลกอฮอล์ 95%
9. NaOH
10. Potassium tartrate
11. คลอโรฟอร์ม
12. กรดอะซิติก
13. กรดกำมะถัน
14. เอทานอล
15. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
16. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
17. MgSO<sub>4</sub>
18. NaNO<sub>3</sub>
19. อาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1
20. อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1

21. อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2

22. ขอสื่อจากบริษัท เอส. เอ็ม. เคมีคัล ประเทศไทย จำกัด

## 6.2 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. ปีกเกอร์ขนาด 250 mL	4 ใบ
10. ปีกเกอร์ขนาด 50 mL	4 ใบ
11. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL	2 ขวด
12. ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 mL	2 ขวด
13. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 mL	3 ขวด
14. ขวด suction (Suction flask) ขนาด 250 mL	1 ขวด
15. หลอดพลาสติกขนาด 15 mL	20 หลอด
16. Eppendorf tube ขนาด 1.5 mL	10 หลอด
17. แท่งแก้วคนสาร	3 อัน
18. งานอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบพลาสติก	3 อัน
19. เข็มเขี่ยจุลินทรีย์ (Loop)	3 อัน



20. ตะเกียงแอลกอฮอล์	2 อัน
21. กรวยกรอง	1 อัน
22. กระดาษกรอง ขนาด 70 mL	5 แผ่น
23. หลอดฉีดยา ขนาด 20 mL	5 อัน
24. Syringe Filters	5 อัน
25. TLC Sprayer	1 อัน
26. Thin Layer Chromatography (TLC) G-60	2 แผ่น

### 6.3 ขั้นตอนการทดลอง

6.3.1 การคัดแยกและเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารสีแวนไดในระดับเบื้องต้นบนอาหารแข็งนำถั่วเน่ามาบดในโถร่งบดสารด้วยการเติมน้ำเกลือเข้มข้น 0.9%wt แล้วทำการเจือจางแบบ serial dilutionจนถึงความเข้มข้นที่ 10-12 แล้วจึงปิเปตสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมาทำการ Spread plate บนอาหารแข็ง [Sucrose 200 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Trypton 10 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/L, Agar 15 g/L] แล้วนำไปบ่มในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการคัดเลือกโคโลนีที่สร้างเมือกมาทำการเลี้ยงลงในอาหารเหลว [Sucrose 50 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Trypton 10 g/L, NaCl 5 g/L] เขย่าทิ้งไว้ 1 คืน ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40°C จากนั้นก็นำเชื้อไปเลี้ยงต่อในอาหารแข็ง [Sucrose 50 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Trypton 10 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 15 g/L] ด้วยการ streak plate เพื่อใช้เป็น Stock เชื้อ

6.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสของเชื้อจุลินทรีย์นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการสร้าง เอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยการนำเชื้อเลี้ยงในอาหารเหลว [Sucrose 50 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Trypon 10 g/L, NaCl 5 g/L] เขย่าทิ้งไว้ 1 คืน ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40°C หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ 10,000 × g เป็นเวลา 15 นาที แยกของเหลวด้านบน ทดสอบด้วยกระบวนกร DNS และนำไปทดสอบการดูดกลืนแสงที่ OD570 เพื่อคำนวณหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น

6.3.3 การศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของซูโครสต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูโครส และเปลี่ยนซูโครสเป็นลิแวนด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 %w/v ตามลำดับ
  2. ทำการปลูกจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ด้วยอาหารแข็งสูตรที่ 1 (Enrich media) และทำการเลือกโคโลนีที่สร้างเมือก
  3. เลือกโคโลนีที่สร้างเมือก 1 ลูบ นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตรที่ 1 (Enrich media) ปริมาตร 100 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 6
  4. นำจุลินทรีย์จากข้อ 3 จำนวน 20 mL เติมลงไปในการอาหารเหลวสูตรที่ 2 (Differential media) ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 %w/v ตามลำดับ จำนวน 200 mL และเขย่าทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 6
  5. เก็บตัวอย่าง 3 mL ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปหมუნเหวียงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9100× g นาน 15 นาที
  6. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์
  7. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์
  8. ทำการวิเคราะห์ Activity ของเอนไซม์และองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC (High performance liquid chromatography)
  9. นำเซลล์ที่ถูกแยกออกกลางด้วยน้ำเกลือ 2 ครั้ง และนำไปวัดค่า OD 600 เพื่อตรวจสอบแนวโน้มการเติบโตของชีวมวล
- 6.3.4 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิของซูโครสต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีงานวิจัยรายงานว่า เอนไซม์แต่ละชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ต่างกันในอุณหภูมิต่างกัน (Cardoso et al., 2017) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่มีความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 6.3.1
2. ทำการปลูกจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ด้วยอาหารแข็งสูตรที่ 1 (Enrich media) และทำการเลือกโคโลนีที่สร้างเมือก
3. เลือกโคโลนีที่สร้างเมือก 1 ลูบ นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตรที่ 1 (Enrich media) ปริมาตร 100 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 6
4. นำจุลินทรีย์จากข้อ 3 จำนวน 20 mL เติมลงไป ในอาหารเหลวสูตรที่ 2 (Differential media) ที่มีความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3.3.1 จำนวน 200 mL และเขย่าทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 °C และ pH 6
5. เก็บตัวอย่าง 3 mL ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปหมუნเหวียงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9100× g นาน 15 นาที
6. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์
7. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์
8. ทำการวิเคราะห์ Activity ของเอนไซม์และองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC (High performance liquid chromatography)
9. นำเซลล์ที่ถูกแยกออกแล้วด้วยน้ำเกลือ 2 ครั้ง และนำไปวัดค่า OD 600 เพื่อตรวจสอบแนวโน้มการเติบโตของชีวมวล

### 6.3.5 การศึกษาการย่อยสลายของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารด้วยจุลินทรีย์

การศึกษานี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดของเสียด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.1-3.3.4 ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครส อุณหภูมิ เวลาป่ม และน้ำตาล โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารละลายของเสียเข้มข้น 20 %w/v นำสารละลายของเสียวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณซูโครสด้วย HPLC
2. ทำการปลูกจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ด้วยอาหารแข็งสูตรที่ 1 (Enrich media) และทำการเลือกโคโลนีที่สร้างเมือก
3. เลือกโคโลนีที่สร้างเมือก 1 ลูบ นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตรที่ 1 (Enrich media) ปริมาตร 100 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 6
4. นำจุลินทรีย์จากข้อ 3 จำนวน 20 mL เติมลงไปในการเลี้ยงอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่แทนที่ซูโครสด้วยของเสียโดยให้มีความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3.3.1 จำนวน 200 mL และเขย่าทิ้งไว้โดยใช้เวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.3 ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3.3.2
5. เก็บตัวอย่าง 3 mL ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปหมუნเหวียงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9100× g นาน 15 นาที
6. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์
7. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำตาลซูโครสในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 20%w/v (pH 6.0) 0.5 mL เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์
8. ทำการวิเคราะห์ Activity ของเอนไซม์และองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC (High performance liquid chromatography)

9. นำเซลล์ที่ถูกแยกออกกลางด้วยน้ำเกลือ 2 ครั้ง และนำไปวัดค่า OD 600 เพื่อตรวจสอบแนวโน้มการเติบโตของชีวมวล
10. เก็บตัวอย่างซ้ำ เช่นเดียวกับข้อที่ 5 โดยเพิ่มปริมาณเป็นตัวอย่าง 10 mL
11. นำตัวอย่างจากข้อ 10 ไปแยกลิแวนออกด้วยวิธีการ Dialysis (กรองผ่านเมมเบรน)
12. นำสารละลายที่แยกลิแวนออกแล้วไปวิเคราะห์ COD

## 7. ผลการทดลองและอภิปรายผล

7.1 ทำการเก็บตัวอย่างถั่วหมัก ที่อยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ โดยมุ่งเก็บตัวอย่างจาก อำเภอเวียงแหง จังหวัดเชียงใหม่

7.2 นำตัวอย่างถั่วหมักมาทำการคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารสีแวนไดในระดับเบื้องต้น ทำการเก็บตัวอย่างถั่วหมักนำมาชั่ง 5 กรัม บดในโถรงบดสารด้วยการเติมน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% โดยมวล 5 มิลลิลิตร เจือจางแบบ Serial dilution ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-1}$  จนถึงความเข้มข้นที่  $10^{-12}$  ปิเปตสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นทำการ Spread plate บนอาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1 แล้วนำไปบ่มในตู้อบ ที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่สร้างเมือกที่มีลักษณะเหนียวหนืดและไม่เกิดโคโลนีที่ทับซ้อนกับโคโลนีอื่น ซึ่งคาดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารสีแวนได ทำการเลี้ยงลงในอาหาร (เหลว) เลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2 เขย่าทิ้งไว้ 1 คืน ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  นำจุลินทรีย์ ไปเลี้ยงต่อในอาหาร(แข็ง) เลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2 ด้วยการเชี่ยจุลินทรีย์ (Streak plate) เพื่อใช้เป็น คลังเก็บจุลินทรีย์ ศึกษาสัณฐานวิทยาจุลินทรีย์บนอาหารแข็งสูตรที่ 2 และการย้อมสีแกรม เพื่อ จำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์

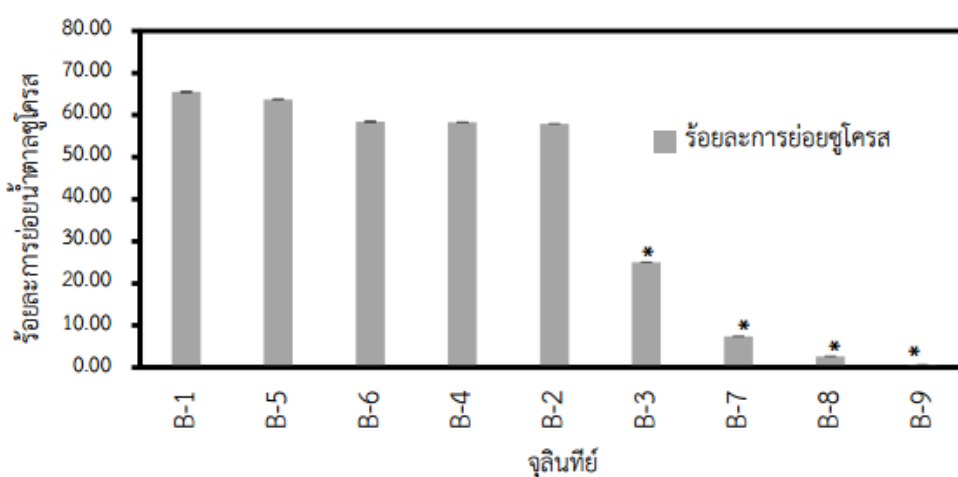


รูปที่ 7.1 การคัดแยกจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงสูตรที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  24 ชั่วโมง  
โคโลนีของจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและสร้างเมือกขึ้นได้

ตารางที่ 7.1 การจำแนกลักษณะโคโลนีของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตบนอาหารสูตรเลี้ยงจุลินทรีย์ สูตรที่ 1 (Medium screen) คัดเลือกไอโซเลตทั้งหมด 43 ไอโซเลต

รหัส ไอโซ เลต	ลักษณะโคโลนี	ย้อมแกรม	ลักษณะ ของเซลล์	จำนวน ไอโซเลต
B-1	ขนาดใหญ่รูปร่างไม่แน่นอน ทึบแสง ขอบเป็นคลื่น ผิวหน้าขรุขระ	บวก	bacilli	12
B-2	ขนาดใหญ่รูปร่างไม่แน่นอน ทึบแสง ขอบเป็นคลื่น ผิวหน้าเหี่ยวย่น	บวก	bacilli	8
B-3	ขนาดใหญ่รูปร่างไม่แน่นอน โปร่ง แสงขอบเป็นคลื่น ผิวหน้าขรุขระ	บวก	bacilli	6
B-4	ขนาดใหญ่กลมโปร่งแสง ขอบ เกือบ ไม่มีรอยเว้า ผิวหน้าเหี่ยวย่น	บวก	bacilli	5
B-5	ขนาดใหญ่กลมทึบแสง ขอบเกือบ ไม่มีรอยเว้า ผิวหน้าเหี่ยวย่น	บวก	bacilli	4
B-6	ขนาดใหญ่กลมโปร่งใสขอบเกือบ มีรอยเว้า ผิวหน้าเรียบ	บวก	bacilli	3
B-7	ขนาดใหญ่กลมโปร่งแสง ขอบ เกือบ ไม่มีรอยเว้าผิวหน้าเรียบ	บวก	bacilli	2
B-8	ขนาดใหญ่กลมโปร่งแสงขอบ เกือบไม่มีรอยเว้าผิวหน้าขรุขระ	บวก	bacilli	2
B-9	ขนาดเล็กกลมโปร่งแสง ขอบ เกือบ ผิวหน้าเรียบ	บวก	cucci	1

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อน้ำตาลซูโครสของจุลินทรีย์เบื้องต้น เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อน้ำตาลซูโครสได้เร็วที่สุด 5 ชนิด จากจุลินทรีย์ที่เราได้ทำการคัดแยกเบื้องต้นมาจากถั่วหมัก นำจุลินทรีย์จาก Primary screening เลี้ยงในอาหาร(เหลว)เลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2 ในหลอดทดลอง ขนาด 15 m มิลลิเมตร l ปริมาตร 3 มิลลิเมตร เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40°C นำจุลินทรีย์แต่ละหลอด หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ 9100 ×g เป็นเวลา 15 นาที แยกของเหลวด้านบน ทดสอบด้วยกระบวนการ DNS และนำไปทดสอบการดูดกลืนแสงที่ OD540 เพื่อคำนวณหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐาน

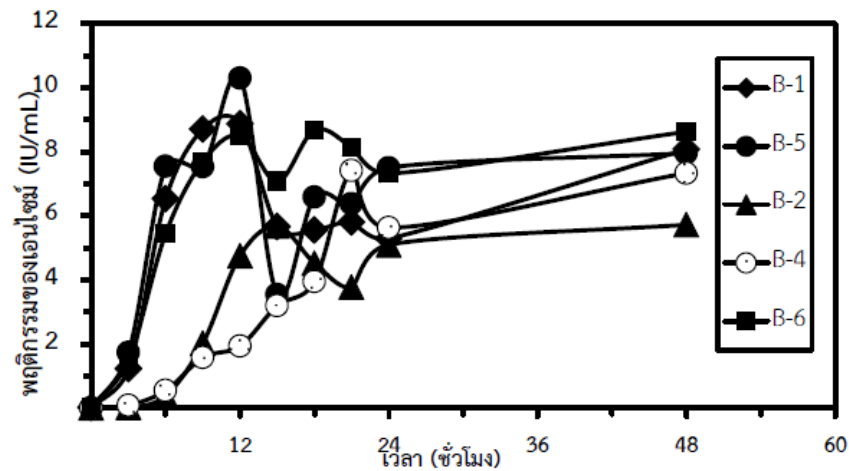


รูปที่ 7.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการย่อน้ำตาลซูโครสกับชนิดของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหาร(เหลว) สูตร 2 ที่ความเข้มข้นซูโครส 5%w ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 rpm 24 ชั่วโมง (\* ) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับ B-1

7.4 ศึกษาพฤติกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 2.3.3

เพื่อนำมาสร้างเป็นกราฟของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นกับเวลาซึ่งจะใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตสารลิแวนของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ตัว จากข้อ 2.3.3 ทำการศึกษาเอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยจะนำจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ปริมาณ 3 มิลลิตร มาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เหลวสูตรที่ 2 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร ปริมาณอาหาร 30 มิลลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิตร มาทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ 9100× g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสของเหลวด้านบน นำไปหาค่าความเข้มข้นของกลูโคสด้วยกระบวนการ DNS และนำไปทดสอบการดูดกลืนแสงที่ OD540 ดังข้อ 2.3.3

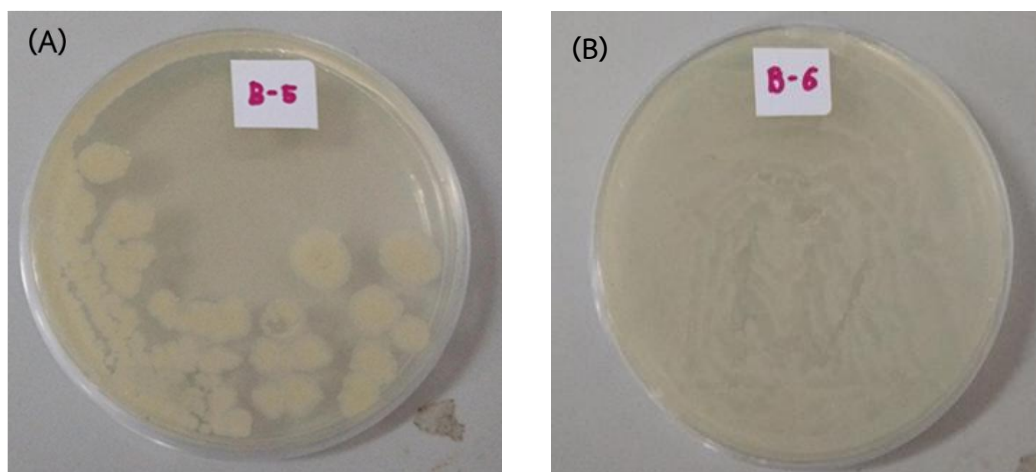




รูปที่ 7.3 กราฟแสดงพฤติกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูโครสในแต่ละช่วงเวลาของจุลินทรีย์

#### 7.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยน้ำตาลซูโครสของจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยใช้ โดยการแยกลิแวนชนิดฟรุคโทโอลิโกแซ็คคาไรด์ ( Isolation of Levan-type FOSs ) และการทำให้สารบริสุทธิ์ (Purification)

ได้มีการคัดเลือกจุลินทรีย์จากถั่วเหลืองหมักที่สามารถผลิตลิแวนได้ จึงได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิแวนได้สูงสุดจากการทดสอบการย่อยน้ำตาลซูโครส แบบใช้กระบวนการ DNS และการบวนการทดสอบ TLC คือ จุลินทรีย์กลุ่ม B-5 และจุลินทรีย์กลุ่ม B-6 จึงได้มีการศึกษาคือ จุลินทรีย์กลุ่ม B-5 และจุลินทรีย์กลุ่ม B-6 โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 แล้วนำไปบ่มในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้จุลินทรีย์กลุ่ม B-5 เป็นโคโคไนต์เดี่ยว โปร่งใสขอบเกลี้ยงไม่มีรอยว่า ผิวหน้าเรียบ แกรมบวก เซลล์เป็นท่อน (bacilli) และจุลินทรีย์กลุ่ม B-6 ที่มีลักษณะที่เป็นเมือกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1 และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 2 มีความเข้มข้นของซูโครสความเข้มข้น 20 %w/v เพื่อศึกษาการย่อยของน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่ม ณ เวลาที่ 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 7.41 เลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งสูตร 1: (A) จุลินทรีย์กลุ่ม B-5, (B) จุลินทรีย์กลุ่ม B-6

เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผสมน้ำตาลซูโครส ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ได้ไปทดสอบลงแผ่น TLC ซึ่งเป็นแผ่นซิลิกาเจล G-60 เป็นตัวดูดซับสาร และเมื่อนำไปวางบนสารละลาย (คลอโรฟอร์ม / กรดอะซิติก / น้ำ (6: 7: 1 v/v)) สารละลายจะทำหน้าเคลื่อนที่สารขึ้นไปยังตำแหน่งต่างๆ ฉีดพ่นส่วนผสมของกรดกำมะถันและเอทานอล (10:90) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 115 °C 15 นาที จะได้จุดบนแผ่นซิลิกาเจล G-60 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีส่วนประกอบของไตรแซ็กคาไรด์ ได้แก่ ซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลในอาหารที่จุลินทรีย์ย่อยไม่หมด และยังมีส่วนประกอบมोनอแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กลูโคส และฟรุคโทส ที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์จุลินทรีย์ ที่เรียกว่า กระบวนการไฮโดรไลซิส และยังมีส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ เกิดการต่อกันของพรุคโตสหลายๆ โมเลกุลมาต่อกับกลูโคส 1 โมเลกุล ที่เรียกว่า กระบวนการทรานพรุคโทซิเลชัน จะได้ผลิตภัณฑ์คือ ลีแวน ดังรูปที่ 16 การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5: 1= การแยกเซลล์

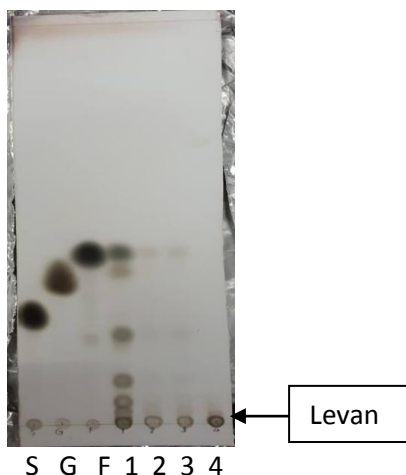
สารที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ดังกล่าวต้องลีแวนเป็นผลิตภัณฑ์เท่านั้น จึงได้มีการทำกระบวนการแยกลีแวนพรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์และการบวนการทำให้สารบริสุทธิ์ต่อไป โดยการนำจุลินทรีย์กลุ่ม B-5 และ B-6 หมักในอาหารหมักที่สภาวะการหมักเพื่อสังเคราะห์สารลีแวน นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ และนำส่วนใสไปต้ม (Heat treatment) เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ในระหว่างการแยกสารที่ไม่ต้องการออกไปจะมีการทดสอบ TLC เพื่อดูความบริสุทธิ์ของสาร ที่ได้ โดยเทียบค่ามาตรฐาน คือความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20%w/v, น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20%w/v และน้ำตาลพรุคโตสความเข้มข้น 20%w/v ดังรูปที่ 16 การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5: S = Sucrose, G = Glucose, F= Fructos

นำไปตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อตกตะกอน Exopolysaccharides และโปรตีน เนื่องจากเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำจะเกิดสภาวะที่ pH=pi (pi : Isoelectric point) ทำให้ Exopolysaccharides และโปรตีนที่ละลายในเอทานอลมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ และเกิดการรวมตัวกันเป็นตะกอน ลีแวนเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงได้นำเอาตะกอนไปปั่นเหวี่ยง และละลายน้ำ DI เมื่อนำไปทดสอบลงแผ่น TLC ดังรูปที่ 16 การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5: 2 = การตกตะกอนด้วยเอทานอล พบว่ายังเหลือ Exopolysaccharides และโปรตีน บางส่วนจึงได้นำไปแยกโปรตีนด้วย sevag reagent

การแยกโปรตีนด้วย sevag reagent เพื่อกำจัดโปรตีนที่เหลืออยู่จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอล โปรตีนที่ได้มีลักษณะเจลสีขาว อยู่ระหว่างเฟสน้ำและโคลิฟอร์ม นำไปทำการ ปั่นเหวี่ยง และทดสอบลงแผ่น TLC ดังรูปที่ 16 การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5: 3 = การตกตะกอนโปรตีน พบว่า Exopolysaccharides และโปรตีน ได้จางหายไป แต่เหลือน้ำตาลพรุคโตส จึงได้ทำ dialysis เพื่อกำจัดน้ำตาลดังกล่าว

การทำ dialysis เป็นกระบวนการที่กำจัดสารที่ไม่ต้องการที่มีขนาดเล็กออกไป พบว่าโมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็กกว่า 12,000 Da ซึ่งเป็นรูพรุนของ dialysis bag จะมีการเคลื่อนที่ของสารจากที่มี

ความเข้มข้นมากไปยังน้ำ DI ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า เมื่อนำไปทดสอบลงในแผ่น TLC ดังรูปที่ 16 การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5: 4 = dialysis พบว่าเหลือเพียงจุดเริ่มต้นเท่านั้น ซึ่งก็คือ ลีแวน หลังจากนั้นทำกระบวนการ freeze drying ที่อุณหภูมิ 0°C เพื่อกำจัดน้ำออกจากสารผลิตภัณฑ์ และนำสารไปวิเคราะห์โครงสร้างต่อไป



รูปที่ 7.5 การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5 : การทดสอบ TLC ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5;

S = Sucrose, G = Glucose, F= Fructos, 1= การแยกเซลล์, 2 = การตกตะกอนด้วยเอทานอล, 3 = การตกตะกอนโปรตีน, 4 = dialysis

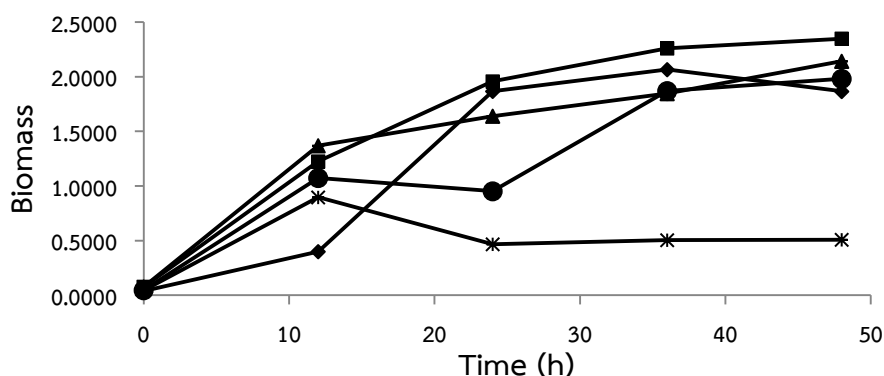
#### 7.6 เพื่อศึกษาสถานะในการหมักของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตลีแวนได้สูงสุด

โดยการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสารลีแวนผลจากการจำแนกจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการจำแนกสายพันธุ์ (Species) โดยการใช้ 16SrRNA เพื่อหาลำดับเบสของจุลินทรีย์พบว่าจุลินทรีย์ชนิด B-6 พบว่ามีความเหมือนจุลินทรีย์ *Bacillus simensis* 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นลีแวนที่พบได้ในอาหารประเภทหมัก

จึงได้นำจุลินทรีย์ชนิด B-6 นำมาศึกษาสถานะในการหมักของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตลีแวนได้สูงสุด โดยการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสารลีแวน โดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5%w/v, 10%w/v, 20%w/v, 30%wt และ 40%w/v ในอาหารเหลวสูตร 2 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และนำวัดค่าการดูดกลืนแสง OD<sub>600</sub> เพื่อหาปริมาณ ชีวมวล

พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ชนิด B-6 สามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุด คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10%w/v ชั่วโมงที่ 48 วัดค่าได้ 2.0657 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 20%w/v ที่ 48 ชั่วโมง วัดค่าได้ 2.1424 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5%w/v ที่ 36 ชั่วโมง วัดค่าได้ 2.0657 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 30%w/v ที่ 42 ชั่วโมง วัดค่าได้ 1.9813, ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 40%w/v ที่ 12 ชั่วโมง วัดค่าได้ 0.8962 จากการศึกษากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์พบว่าจุลินทรีย์เกิดการขยายเซลล์

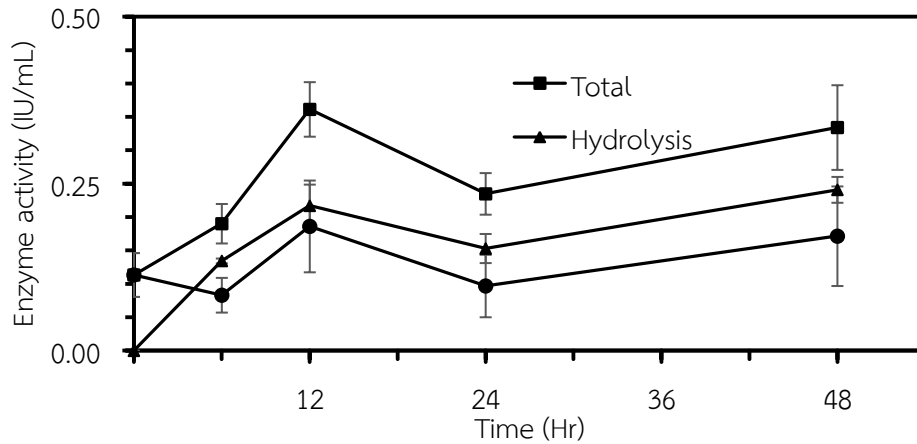
และทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอนไซม์ลิแวนซูโครส และมีการสังเคราะห์โปรตีนออกมาพร้อมกัน เมื่อจุลินทรีย์เกิดการขยายตัวถึง stationary phase จะมีการลดลงของจุลินทรีย์ เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่เข้มข้นมากๆ จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้มากกว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่น้อยๆ แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยเกินไปจะทำอาหารที่ใช้จุลินทรีย์ไม่พอจุลินทรีย์จึงค่อยๆ ลดลง ในกรณีที่จุลินทรีย์เพิ่มขึ้นหลังจากการลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์มีการนำโปรตีนที่ได้สังเคราะห์มาข้างต้นนำมาใช้ในการเจริญเติบโตแทนน้ำตาลซูโครส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่พบว่าที่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5%w/v จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10%w/v หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 20%w/v, 30%w/v และ 40%w/v จะค่อยๆ ลดลงตามลำดับ โดยเอนไซม์ลิแวนซูโครสจะทำหน้าที่ไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุคโทซิลเลชั่น เกิดเป็นลิแวน และยังพบว่าค่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมบวก มีการขยายตัวของชีวะมวลเท่ากับปริมาณลิแวน ซึ่งการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10%w/v สามารถผลิตชีวะมวลมากที่สุด แสดงว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 10%w/v สามารถสังเคราะห์ลิแวนได้ปริมาณสูงสุดเช่นกัน



รูปที่ 7.6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus simensis* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 2 ณ เวลาต่างๆ: ◆ ความเข้มข้นซูโครส 5%w/v, ■ ความเข้มข้นซูโครส 10%w/v, ▲ ความเข้มข้นซูโครส 20%w/v, ● ความเข้มข้นซูโครส 30%w/v, \* ความเข้มข้นซูโครส 40%w/v

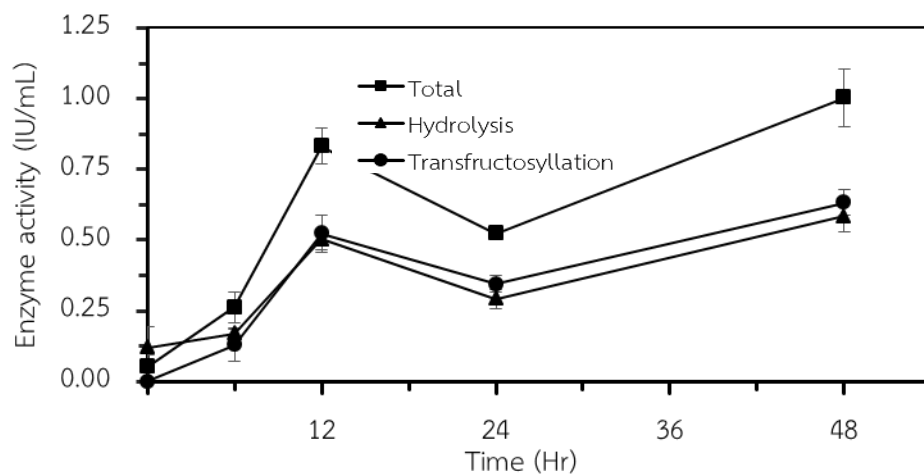
#### 7.7 ผลกระทบของความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

จากการทดลองพบว่า การย่อยสลายของซูโครสในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้น 10%w/v เกิด Enzyme activity สูงสุด 0.36 IU/mL ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยมี Enzyme activity ของการไฮโดรไลซิสโมเลกุลของซูโครส และทรานส์ฟรุคโตซิลเลชั่น 0.22 และ 0.19 IU/mL ตามรูปที่ 7.7



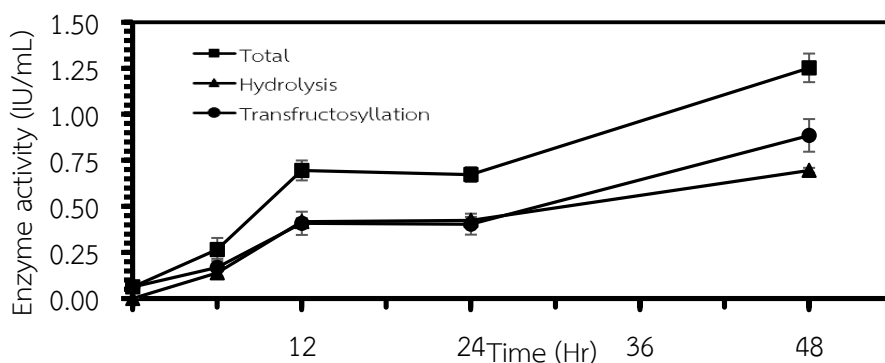
รูปที่ 7.7 Enzyme activity of sucrose degradation with 10%w/v sucrose, 37-degree Celsius, 200 rpm, 48 Hr

การย่อยสลายของซูโครสในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้น 20%w/v เกิด Enzyme activity สูงสุด 1.00 IU/mL ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมี Enzyme activity ของการไฮโดรไลซิสโมเลกุลของซูโครส และทรานส์ฟรุคโตซิลเลชัน 0.58 และ 0.63 IU/mL ตามลำดับ รูปที่ 7.8



รูปที่ 7.8 Enzyme activity of sucrose degradation with 20%w/v sucrose, 37-degree Celsius, 200 rpm, 48 Hr

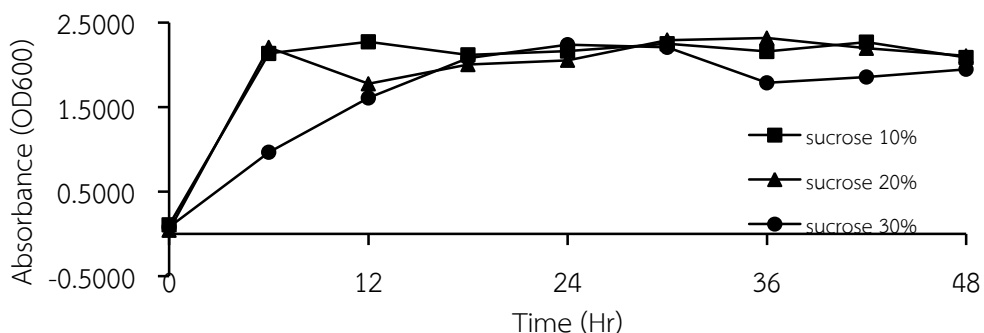
การย่อยสลายของซูโครสในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้น 30%w/v เกิด Enzyme activity สูงสุด 1.25 IU/mL ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมี Enzyme activity ของการไฮโดรไลซิสโมเลกุลของซูโครส และทรานส์ฟรุคโตซิลเลชัน 0.70 และ 0.88 IU/mL ตามลำดับ รูปที่ 7.9



รูปที่ 7.9 Enzyme activity of sucrose degradation with 30%w/v sucrose, 37-degree Celsius, 200 rpm, 48 Hr

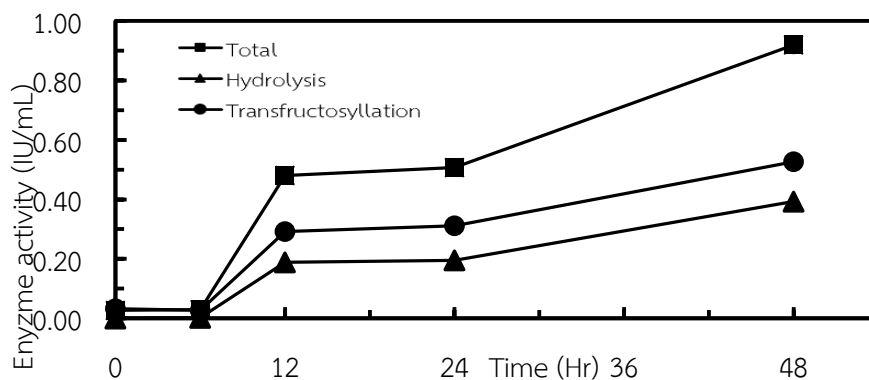
#### 7.8 การย่อยสลายของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารด้วยจุลินทรีย์

จากขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ พบว่าความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสูงสุดได้แก่ ซูโครสเข้มข้น 30 20 และ 10%w/v ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ในซูโครสแต่ละความเข้มข้นพบว่าที่ซูโครสเข้มข้น 20%w/v มีอัตราการเจริญของจุลินทรีย์เร็วกว่าที่ซูโครสเข้มข้น 30%w/v รูปที่ 7.10 จึงทำการศึกษาการย่อยสลายของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารด้วยจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของของเสีย 20%w/v

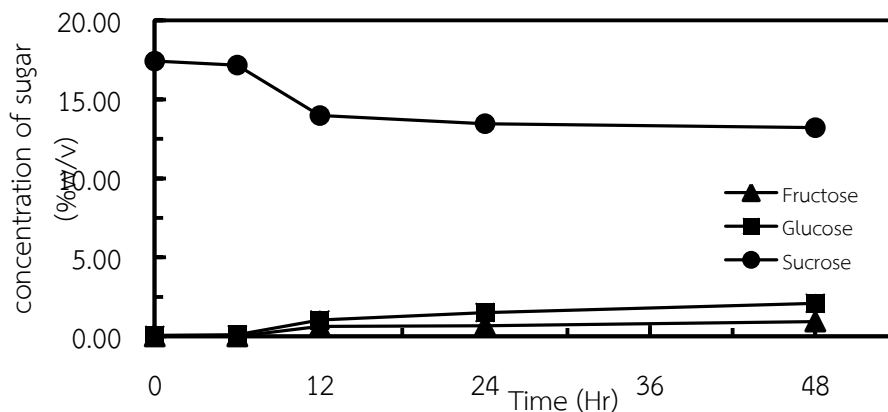


รูปที่ 7.10 The absorbance of *Bacillus siamensis* in culture medium 2 containing 10, 20 and 30%w/v sucrose, 37-degree Celsius, 200 rpm, 48 Hr

การย่อยสลายของเสียที่มีความเข้มข้น 20%w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เกิด Enzyme activity สูงสุด 0.92 IU/mL ที่เวลา 48 ชั่วโมง เกิดการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน 0.39 และ 0.53 IU/mL ตามลำดับ (Figure 5) ในขณะที่เดียวกันพบว่าของเสียเข้มข้น 20%w/v ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 17.42%w/v และสามารถลดลงเหลือเพียง 13.21 %w/v เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง มีกลูโคสและฟรุกโตสเกิดขึ้นสูงสุด 2.09 และ 0.94%w/v ตามลำดับ รูปที่ 7.11



รูปที่ 7.11 Enzyme activity of waste degradation with 20%w/v sucrose waste, 37-degree Celsius, 200 rpm, 48Hr



รูปที่ 7.12 Concentration of sugar (Fructose, glucose and sucrose) after incubated 20%w/v waste, 37-degree Celsius, 200 rpm, 48 Hr

จากขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์พบว่า หลังจากการบ่มอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 10, 20 และ 30 %w/v ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เกิดกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่ากระบวนการไฮโดรไลซิส ของซูโครสเข้มข้น 20 และ 30%w/v แต่สำหรับซูโครส

เข้มข้น 10 %w/v เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสมากกว่ากระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Shih *et al.* (2005) โดยรายงานว่าความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมเป็นตัวแปรที่ทำให้เกิดการสร้างลิแวนในปริมาณที่ต่างกัน โดยลิแวนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน

จากการย่อยสลายของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารด้วยจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ในอาหารเหลวสูตรที่ 1 และ 2 แต่แทนที่ซูโครสด้วยของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารโดยมีความเข้มข้น 20%w/v ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณซูโครสลดลงตามระยะเวลาบ่มและเกิดเป็นกลูโคสและฟรุกโตส โดยฟรุกโตสมีปริมาณมากกว่าปริมาณซูโครส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ozimek *et al.* (2006) โดยอ้างอิงถึงการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจะเข้าจับกับซูโครส เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและฟรุกโตส จากนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจะจับกับโมเลกุลของกลูโคส 1 โมเลกุลและเชื่อมต่อกับโมเลกุลของฟรุกโตสอิสระเป็นสายยาวผ่านกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันเกิดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์หรือลิแวน

เมื่อเปรียบเทียบ Enzyme activity ระหว่างการบ่มจุลินทรีย์ด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครส 20%w/v และของเสียเข้มข้น 20%w/v พบว่าเกิด Enzyme activity 1.00 และ 0.92 IU/mL ตามลำดับซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน เป็นผลลัพธ์ที่ยืนยันได้ว่า เอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* สามารถกำจัดของเสียที่มีองค์ประกอบของซูโครสได้ โดยสามารถลดปริมาณซูโครสได้สูงสุดจาก 17.42 %w/v เหลือ 13.21 %w/v โดยใช้เวลาบ่ม 48 ชั่วโมง

อย่างไรก็ตามอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ใช้บ่มจุลินทรีย์เป็นอุณหภูมิที่อ้างอิงจากรายงานวิจัยของ Sumpavapol *et al.* (2009) โดยเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่ถูกคัดเลือกจากปูดองแต่ไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพิ่มเติมรวมไปถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ระยะเวลาในการบ่ม pH สารเติมแต่งและสารลดแรงตึงผิวต่างๆ เป็นต้น



## 8. สรุปผลการทดลอง

1. จากการนำถั่วเหลืองหมักมาคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลิแวนเบื้องต้นเลี้ยงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 ได้โคโลนีที่เป็นเมือกและแต่ละโคโลนีไม่อยู่ติดกันจำนวนทั้งหมด 43 โคโลนี และจากการศึกษาสัณฐานวิทยาจุลินทรีย์ และการย้อมสีแกรมสามารถแบ่งกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ได้ทั้งหมดออกได้เป็น 9 กลุ่ม คือกลุ่ม B-1 ถึง B-9

เมื่อนำจุลินทรีย์จากแต่ละกลุ่มที่แบ่งได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นมาทำการทดสอบหาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำตาลซูโครสของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40°C 24 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม B-1 มีปริมาณร้อยละการย่อยน้ำตาลซูโครสสูงที่สุดคือร้อยละ 65.49 รองลงมาคือกลุ่ม B-5, B-6, B-4, B-2, B-3, B-7, B-8 และ B-9 ตามลำดับ โดยปริมาณร้อยละการย่อยน้ำตาลซูโครสคือร้อยละ 63.72, 58.41, 58.25, 57.92, 24.99, 7.39, 2.65 และ 0.59 ตามลำดับ ซึ่งจะได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 5 ตัวที่สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้มากกว่าร้อยละ 50 คือจุลินทรีย์กลุ่ม B-1, B-5, B-6, B-4 และ B-2

2. จากการนำถั่วเหลืองหมักมาคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลิแวนเบื้องต้นโดยทำการคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม B-5 และ B-6 เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับหมัก เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์กลุ่ม B-5 และ B-6 มาตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% เพื่อตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์และแยกโปรตีนด้วย sevag reagent นำไปทำ dialysis และทำ freeze drying จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วย TLC จะได้สารบริสุทธิ์ที่เรียกว่า ลิแวน

3. จุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสได้ดีที่ความเข้มข้นของซูโครส 20%w/v โดยมี Enzyme activity สูงสุด 1.00 IU/mL ที่เวลาบ่ม 48 ชั่วโมง และจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถกำจัดของเสียซูโครส โดยลดปริมาณของซูโครสจาก 17.42 %w/v เหลือ 13.21 %w/v โดยใช้เวลาบ่ม 48 ชั่วโมง โดยมี Enzyme activity สูงสุด 0.92 IU/mL ที่เวลา 48 ชั่วโมง

## 9. ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงสังเคราะห์โดยนำจุลินทรีย์ที่ได้ทำการตรึงเซลล์บนเม็ดอัลจินตหรืออาจตรึงเอนไซม์ลีแวนซูเครสบนเม็ดอัลจินต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารลีแวน
2. ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารลีแวน (Degree of polymerization ,DP) โดยการวิเคราะห์ขั้นสูงด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น GPC, HPSEC, GC-MS, MALDI-TOF หรือ ESI-MS และศึกษาคุณสมบัติต่างๆของสารลีแวน เช่น สภาวะของอุณหภูมิและคุณสมบัติการทนความร้อน เป็นต้น
3. ปรับปรุงและพัฒนาสารลีแวนโดยการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมยา เช่น Anti-cancer, Anti-bacterial, Anti-viral เป็นต้น และการสร้างแบบจำลองกระบวนการปลดปล่อยยา (Modeling of drug release from delivery systems)

## 10. ผลผลิต (Output)

- รายงานฉบับสมบูรณ์
- อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ลงวารสารวิชาการระดับชาติ

## รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 256101A1080023 สัญญาเลขที่ 19/2561 (เพิ่มเติม)

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การกำจัดกากน้ำตาลของโรงงานเครื่องตีให้เป็นสารโพรบิโอติกโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ. ดร. วิทวัส แจ่มเอี่ยม

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 01/10/2560 ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 30/09/2561

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี - เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 01/10/2560

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) ..... บาท เมื่อ วันที่ เดือน ปี .....

งวดที่ 2 (40%) ..... บาท เมื่อ วันที่ เดือน ปี .....

งวดที่ 3 (10%) ..... บาท เมื่อ วันที่ เดือน ปี .....

รวม.....

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน			
2. ค่าจ้าง			
3. ค่าวัสดุ			
4. ค่าใช้สอย			
5. ค่าครุภัณฑ์			
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย)			
รวม			

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

### บรรณานุกรม

- K. Dajanta, A. Apichartsrangkoon, E. Chukeatirote, and R. A. Frazier, “Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean,” *Food Chem.*, vol. 125, no. 2, pp. 342–347, 2011.
- I.-L. Shih, P.-J. Wu, and C.-J. Shieh, “Microbial production of a poly( $\gamma$ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*,” *Process Biochem.*, vol. 40, no. 8, pp. 2827–2832, 2005.
- R. Srikanth, C.H.S.S.S. Reddy, G. Siddartha, M.J. Ramaiah, K.B. Uppuluri, Review on production , characterization and applications of microbial levan, *Carbohydr. Polym.* 120 (2015) 102–114.
- M. Li, Levansucrase catalyzed tranfructosylation reaction: Novel biocatalytic approach for the production of fructooligosaccharides, oligolevans and levans using maple syrups as reaction media, (2014)
- G. Chen, C. Li, K. Chen, Fructooligosaccharides: A Review on Their Mechanisms of Action and Effects, 48 (2016).
- M. Shoaib, A. Shehzad, M. Omar, A. Rakha, H. Raza, H. Rizwan, A. Shakeel, A. Ansari, S. Niazi, Inulin: Properties , health benefits and food applications, *Carbohydr. Polym.* 147 (2016) 444–454.
- R. Sarup, R. Pal, J.F. Kennedy, International Journal of Biological Macromolecules Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 85 (2016) 565–572.
- C. Sturzoiu, M. Petrescu, B. Galateanu, M. Anton, C. Nica, G.I. Simionca, A. Dinischiotu, G. Stoian, *Zymomonas mobilis* Levan is Involved in Metalloproteinases Activation in Healing of Wounded and Burned Tissues, *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 44 (2011) 453–458.
- Madigan, M.T. and J.W. Martinco, Brock Biology of Microorganism. 11nd ed.

New Jersey: Association of Office Analytical Chemist; 2006.

- N. Benkeblia, Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops, *J. Chromatogr. A.* 1313 (2013) 54–61.
- J.R. Porras-domínguez, Á. Ávila-fernández, M.E. Rodríguez-alegría, A. Miranda-molina, A. Escalante, R. González-cervantes, C. Olvera, A. López, Levantype FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase, *Process Biochem.* 49 (2014) 783–790.
- J.R. Porras-domínguez, Á. Ávila-fernández, A. Miranda-molina, M.E. Rodríguez-alegría, A. López, *Bacillus subtilis* 168 levansucrase ( SacB ) activity affects average levan molecular weight, *Carbohydr. Polym.* 132 (2015) 338–344.
- B.L. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, The Carbohydrate-Active EnZymes database ( CAZy ): an expert resource for Glycogenomics, 37 (2009) 233–238.
- M.A. Anwar, H. Leemhuis, T. Pijning, S. Kralj, B.W. Dijkstra, The role of conserved inulosucrase residues in the reaction and product specificity of *Lactobacillus reuteri* inulosucrase, 279 (2012) 3612–3621.
- E.T. Öner, L. Hernández, J. Combie, Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 827–844.
- C. Olvera, Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293, (2007) 11–20.
- W. Lammens, K. Le Roy, L. Schroeven, A. Van Laere, A. Rabijns, W. Van Den Ende, Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 727–740.
- A. Banguela, L. Hernandez, Fructans : From natural sources to transgenic plants, (2017).

- D. Ni, Y. Zhu, W. Xu, Y. Bai, T. Zhang, W. Mu, Biosynthesis of inulin from sucrose using inulosucrase from, *Int. J. Biol. Macromol.* 2 (2017) 1–10.
- P. Santos-moriano, L. Fernandez-arrojo, A. Poveda, J. Jimenez-barbero, A.O. Ballesteros, F.J. Plou, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis* : Effect of reaction conditions, "*Journal Mol. Catal. B, Enzym.* 119 (2015) 18–25.
- F. Tian, S. Karboune, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* : specificity, kinetics , and product characterization, "*Journal Mol. Catal. B, Enzym.* 82 (2012) 71–79.
- M. Campus, Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides and levan through transfructosylation reaction catalyzed by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* and by its combined use with endo-inulinase enzymatic synthesis of fructooligosacchrides and levan, (2013)
- A. Szwengiel, K. Goderska, M. Gumienna, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* Synthesis of  $\beta$ - ( 2-6 ) -linked fructan with a partially purified levansucrase from *Bacillus subtilis*, "*Journal Mol. Catal. B, Enzym.* 131 (2016) 1–9.
- Q. Liu, S. Yu, T. Zhang, B. Jiang, W. Mu, Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 1732–1740.
- A.D. Sedgwick, A. Rutman, Y.M. Sin, A.R. Mackay, D.A. Willoughby, The effects of levan on the acute inflammatory response, 65 (1984) 215–222.
- R. Srikanth, G. Siddartha, C.H.S.S. Sundhar Reddy, B.S. Harish, M. Janaki Ramaiah, K.B. Uppuluri, Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization, *Carbohydr. Polym.* 123 (2015) 8–16.

- The Anti-Obesity Effects of the Dietary Combination of Fermented Red Ginseng with Levan in High Fat Diet Mouse Model, 28 (2014) 2014.
- Kim, C.H., Kim, G.H., Ko, G.I., Lee, J.S., Lee, S.G., Park, G.S., Cosmetic composition containing levan having cell-proliferation, skin-moisturizing and irritation-alleviating effects, (2003)
- K.H. Kim, C.B. Chung, Y.H. Kim, K.S. Kim, C.S. Han, C.H. Kim, Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*., *Int. J. Cosmet. Sci.* 28 (2006) 231.
- K. Adamberg, K. Tomson, T. Talve, K. Pudova, M. Puurand, T. Visnapuu, T. Alamäe, S. Adamberg, Levan enhances associated growth of *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in fecal microbiota, *PLoS One*. 10 (2015) 144042.
- S.K. Gupta, A.K. Pal, N.P. Sahu, R. Dalvi, V. Kumar, S.C. Mukherjee, Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: Effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*, *J. Fish Dis.* 31 (2008) 649–657.
- S.K. Gupta, A.K. Pal, N.P. Sahu, R.S. Dalvi, M.S. Akhtar, A.K. Jha, K. Baruah, Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress, *Aquaculture*. 306 (2010) 398–402.
- Preparation method of levan-contained yogurt , Chinese patent CN103190478B, (2014) 2014.
- F. Jakob, D. Meißner, R.F. Vogel, Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter* species, *Acetic Acid Bact.* 1 (2012) e2.
- S.V.N. Vijayendra, T.R. Shamala, Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 34 (2014) 338–357.



- P. Haney, D. Ph, K. Herting, S. Smith, Molecular weight cut-off ( MWCO ) specifications and rates of buffer exchange with Slide-A-Lyzer Dialysis Devices and Snakeskin Dialysis Tubing, *Thermo Fischer Sci.* 04 (2013) 100.
- K.S. Belghith, I. Dahech, H. Belghith, H. Mejdoub, Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 451–458.
- P.E. Wall, *Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach*, (2005) 300.
- M.S. Bostan, E.C. Mutlu, H. Kazak, S. Sinan Keskin, E.T. Oner, M.S. Eroglu, Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 993–1000.
- Y.W. Han, Microbial Levan, *Adv. Appl. Microbiol.* 35 (1990) 171–194.
- Noukeu, N. A., Gouado, I., Priso, R. J., Ndongu, D., Taffouo, V. D., Dibong, S. D., & Ekodeck, G. E. (2016). Characterization of effluent from food processing industries and stillage treatment trial with *Eichhornia crassipes* (Mart.) and *Panicum maximum* (Jacq.). *Water Resources and Industry*, 16, 1-18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.wri.2016.07.001>
- 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. doi: doi:10.1099/mic.0.28484-0
- Shih, I.-L., & Yu, Y.-T. (2005). Simultaneous and selective production of levan and poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* (Vol. 27).
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102-114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003>

Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N.,  
Luxananil, P., & Visessanguan, W. (2009). *Bacillus siamensis* sp. nov., from  
salted crab (poo-khem) in Thailand (Vol. 60).

ณัฐพงศ์ ทาคำ และ นภาพรณ ปิยะวรรณรัตน์. 2560. การคัดเลือกและศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิต  
สารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากถั่วเหลืองหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี.  
มหาวิทยาลัยบูรพา. 72 น.

## ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก ผลการทดลอง

#### อาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1

- Sucrose 200 g/L
- Yeast extract 5 g/L
- Trypon 10 g/L
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/L
- Agar 15 g/L

#### อาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2

- Sucrose 50 g/L
- Yeast extract 5 g/L
- Trypon 10 g/L
- NaCl 5 g/L
- Agar 15 g/L

#### อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1

- Sucrose 50 g/L
- Yeast extract 5 g/L
- Trypon 10 g/L
- NaCl 5 g/L

#### อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.5 g/L
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 g/L
- MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L
- NaNO<sub>3</sub> 3.5 g/L
- Yeast extract 5 g/L

## ภาคผนวก ข

## กราฟและตารางผลการทดลอง

ตารางที่ ข.1 การจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ตามสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งสูตรที่ 2 และการย้อมแกรม

ไอโซเลต	ขนาด	รูปร่าง โคโลนี	ลักษณะ เกี่ยวกับแสง	ขอบโคโลนี	ผิว โคโลนี	ย้อม แกรม	รูปร่าง ของเซลล์
1	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
2	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
3	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
4	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
5	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
6	ขนาดใหญ่	กลม	ทึบแสง	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
7	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
8	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
9	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
10	ขนาดใหญ่	กลม	ทึบแสง	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
11	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
12	ขนาดเล็ก	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เรียบ	+	cucci
13	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli

ตารางที่ ข.1การจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ตามสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งสูตรที่ 2 และการย้อมแกรม

ไอโซเลต	ขนาด	รูปร่าง โคโคไนด์	ลักษณะ เกี่ยวกับแสง	ขอบโคโคไนด์	ผิว โคโคไนด์	ย้อม แกรม	รูปร่าง ของเซลล์
14	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
15	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งใส	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เรียบ	-	bacilli
16	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
17	ขนาดใหญ่	กลม	ทึบแสง	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
18	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
19	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
20	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
21	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
22	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
23	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
24	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
25	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งใส	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เรียบ	+	bacilli
26	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
27	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli

ตารางที่ ข.1การจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ตามสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งสูตรที่ 2 และการย้อมแกรม

ไอโซเลต	ขนาด	รูปร่าง โคโคไล	ลักษณะ เกี่ยวกับแสง	ขอบโคโคไล	ผิว โคโคไล	ย้อม แกรม	รูปร่าง ของเซลล์
28	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
29	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
30	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
31	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	-	bacilli
32	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	-	bacilli
33	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งใส	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เรียบ	+	bacilli
34	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	-	bacilli
35	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เรียบ	+	bacilli
36	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เรียบ	+	bacilli
37	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	ขรุขระ	+	bacilli
38	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	ขรุขระ	+	bacilli
39	ขนาดใหญ่	กลม	โปร่งแสง เล็กน้อย	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	ขรุขระ	+	bacilli
40	ขนาดใหญ่	กลม	ทึบแสง	ขอบเกลี้ยงไม่มี รอยเว้า	เหี่ยว ย่น	-	bacilli
41	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	+	bacilli

ตารางที่ ข.1การจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ตามสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งสูตรที่ 2 และการย้อมแกรม

ไอโซเลต	ขนาด	รูปร่าง โคโลนี	ลักษณะ เกี่ยวกับแสง	ขอบโคโลนี	ผิว โคโลนี	ย้อม แกรม	รูปร่าง ของเซลล์
42	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	+	bacilli
43	ขนาดใหญ่	รูปร่างไม่ แน่นอน	ทึบแสง	ขอบเป็นคลื่นที่ โค้งหรือเว้าเพียง	เหี่ยว ย่น	+	bacilli

ตารางที่ ข.2 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง OD<sub>600</sub>

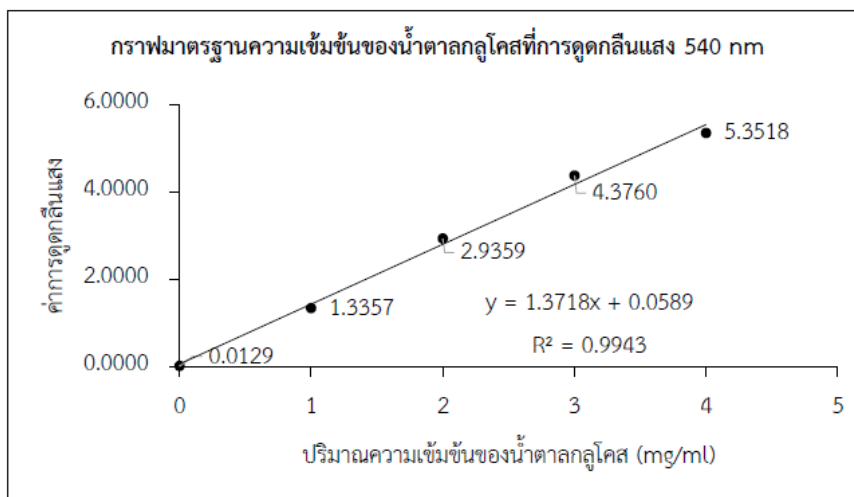
ชั่วโมง	ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (%w/v)				
	5	10	20	30	40
0	0.0387	0.0779	0.0764	0.0462	0.0456
	0.0388	0.078	0.0763	0.0463	0.0455
	0.0387	0.0779	0.0766	0.0461	0.0455
AVERAGE	0.0387	0.0779	0.0764	0.0462	0.0455
S.D.	5.8E-05	5.8E-05	1.5E-04	1.0E-04	5.8E-05
6	1.5607	1.2638	1.5256	1.2903	0.5101
	1.5604	1.2633	1.5246	1.2898	0.51
	1.5606	1.2633	1.5227	1.2893	0.5099
AVERAGE	1.5606	1.2635	1.5243	1.2898	0.5100
S.D.	0.0002	0.0003	0.0015	0.0005	0.0001
18	1.3152	1.8073	1.3698	1.2398	0.9483
	1.3151	1.8074	1.3696	1.2397	0.948
	1.3146	1.8072	1.3697	1.2397	0.9481
AVERAGE	1.31497	1.80730	1.36970	1.23973	0.94813
S.D.	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002
36	2.0655	2.2604	1.8459	1.8696	0.5048
	2.0658	2.2606	1.8466	1.87	0.5046
	2.0659	2.2607	1.8468	1.8704	0.5045
AVERAGE	2.0657	2.2606	1.8464	1.8700	0.5046
S.D.	0.0002	0.0002	0.0005	0.0004	0.0002
48	1.8661	2.3494	2.1423	1.9814	0.5082
	1.8662	2.3499	2.1426	1.9814	0.5086
	1.8661	2.3494	2.1424	1.9811	0.5086
AVERAGE	1.8661	2.3496	2.1424	1.9813	0.5085
S.D.	5.8E-05	2.9E-04	1.5E-04	1.7E-04	2.3E-04



## ภาคผนวก ค

## การคำนวณ

การคำนวณปริมาณกลูโคสและค่า IU/ml



รูปที่ ข กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่การดูดกลืนแสง 540 nm จากกราฟได้สมการจากเส้นแนวโน้มคือ  $y = 1.3718x + 0.0589$

เมื่อ  $y$  คือ ค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง

$x$  คือ ค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น หน่วยเป็น mg/ml

การคำนวณ จากการทดลองครั้งที่ 1  $y = 0.0596$

แทนค่า  $y$  ลงในสมการจะได้  $0.0596 = 1.3718x + 0.0589$

$x = 0.0005103 \text{ mg/ml} \times 100$

$x = 0.05103 \text{ mg/ml}$

ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น =  $0.05103 \text{ mg/ml}$

เปลี่ยนหน่วยให้เป็น IU/ml จะได้เท่ากับ  $0.00472 \mu\text{mole/ml} \cdot \text{min}$

ดังนั้นค่า IU =  $0.00472 \text{ IU/ml}$

## ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

1. ผู้รับผิดชอบ ประกอบด้วย
  - 1.1 หัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) นายวิทวัส แจ็งเยี่ยม  
(ภาษาอังกฤษ) Mr.Witawat Jangiam  
หน่วยงานหลัก ภาควิชาวิศวกรรมเคมี  
คณะวิศวกรรมศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา  
โทรศัพท์ : 038-102222 (ต่อ 3350)  
แฟกซ์ : 038-102222 (ต่อ 3351)
  - 1.2 ผู้ร่วมวิจัย (ภาษาไทย) คุณสุนิกร  
หน่วยงานหลัก บริษัท เอส.เอ็ม.ซี. (ประเทศไทย) จำกัด  
โทรศัพท์ : -  
แฟกซ์ : -