

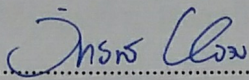
การผลิตสารละลายด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสเพื่อการประยุกต์ใช้กับกากของเสียอุตสาหกรรม
ด้วยเอนไซม์แบบตรึง

ธนวัฒน์ ราชภิรมย์

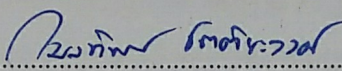
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ธันวาคม 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

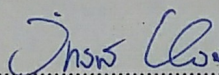
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ธนวัฒน์ ราชภิมย์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

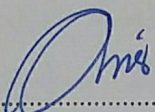
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

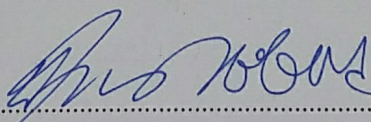
 อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทวัส แจ็งเอี่ยม)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

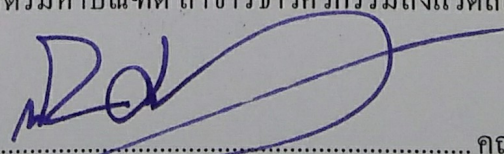
 ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กมลทิพย์ ชัตติยะวงศ์)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทวัส แจ็งเอี่ยม)

 กรรมการ
(ดร. สันติ โพธิ์ศรี)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชงชัย ศรีวิริยรัตน์)

คณะวิศวกรรมศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

 คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นยศ คุรุกิจโกศล)

วันที่ 12 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2562

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ธนวัฒน์ ราชภิรมย์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิทวัส แจ่มเอี่ยม)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กมลทิพย์ ขัตติยะวงศ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิทวัส แจ่มเอี่ยม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย ศรีวิริยรัตน์)

..... กรรมการ
(ดร. สันติ โพธิ์ศรี)

คณะวิศวกรรมศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณยศ กุรุกิจ โกศล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. วิทวัส
แจ่มเยี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ แนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไข
ข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง
จึงขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กมลทิพย์ ขัตติยะวงศ์ ดร. สันติ โพธิ์ศรี
รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย ศรีวิริยรัตน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง
รวมถึงเอื้อเฟื้อสารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ ตลอดจนวิธีการวิเคราะห์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง
จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ เกษักรหญิง ดร. ณัฐฉิณี ชีรกุลกิตติพงษ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ
วิเคราะห์ HPLC ภาควิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ระหว่างดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ ห้องปฏิบัติการ ระหว่างดำเนิน
งานวิจัย และขอขอบคุณ บริษัท เอส เอ็ม ซีพี (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ของเสียที่
ใช้ศึกษาในงานวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุน
การวิจัยภายใต้แผนงานบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 และ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้การสนับสนุนค่าใช้จ่าย
รายเดือนนักศึกษาระดับปริญญาโท/เอก เพื่อทำงานวิจัยตอบโจทย์ภาคอุตสาหกรรม: STEM
Workforce ประจำปี 2561

ธนวัฒน์ ราชภิรมย์

60910066: สาขาวิชา: วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม; วศ.ม. (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ *Bacillus siamensis*/ ลิแวนซูเครส/ ของเสียอุตสาหกรรม/ ลิแวน

ธนวัฒน์ ราชภิรมย์: การผลิตสารลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสเพื่อการประยุกต์ใช้กับกากของเสียอุตสาหกรรมด้วยเอนไซม์แบบตรึง (PRODUCTION OF LEVAN BY LEVANSUCRASE FOR APPLICATION WITH INDUSTRIAL WASTE BY IMMOBILIZED ENZYME.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิทวัส แจ่มเยี่ยม, Ph.D., 69 หน้า, ปี พ.ศ. 2562.

Bacillus siamensis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายซูโครสผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อโมเลกุลผ่านกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน (Transfructosylation) เกิดเป็นสารลิแวน (Levan) ซึ่งเป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) งานวิจัยนี้จึงศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส ที่ความเข้มข้นของซูโครส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของฟอสเฟสบัฟเฟอร์และอะซิเตทบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิ พบว่า มีโปรตีนทั้งหมด 5 ชนิด หลังจากทำเอนไซม์บริสุทธิ์ และสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของลิแวนซูเครสได้ 11.47 และสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 78.75 ซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 15.95 IU/mg ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิแวนเท่ากับ ความเข้มข้นซูโครส 20% (w/v) pH 6 ของฟอสเฟสบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิแวน โดยที่สภาวะของฟอสเฟสบัฟเฟอร์และอะซิเตทบัฟเฟอร์ไม่มีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.4 IU/mL และสามารถผลิตลิแวนได้สูงสุด 14.59% (w/v) จากนั้นทำการศึกษาการบำบัดของเสียอุตสาหกรรมอาหาร พบว่า กิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุด 0.066 IU/mL และศึกษาการบำบัดของเสียอุตสาหกรรมอาหารด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรึง พบว่า กิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุด 0.023 IU/mL จากการศึกษาสรุปได้ว่าเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์สามารถเปลี่ยนรูปของเสียให้เป็นสารลิแวน ซึ่งเป็นสารที่มีมูลค่า เพื่อส่งเสริมให้มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ

60910066: MAJOR: ENVIRONMENTAL ENGINEERING; M.Eng. (ENVIRONMENTAL ENGINEERING)

KEYWORDS: LEVAN/ LEVANSUCRASE/ INDUSTRIAL WASTE/ *BACILLUS SIAMENSIS*
TANAWAT RACHPHIROM: PRODUCTION OF LEVAN BY LEVANSUCRASE
FOR APPLICATION WITH INDUSTRIAL WASTE BY IMMOBILIZED ENZYME.

ADVISORY COMMITTEE: WITAWAT JANGIAM, Ph.D., 69 P. 2019.

Levansucrase enzyme is excreted out of from *Bacillus siamensis* which can degrade sucrose become as products with hydrolysis and transfructosylation reaction formed as a polysaccharide or levan. In this study, we performed by using the purified levansucrase enzyme to find the optimum condition of sucrose concentration, pH and temperature effect to the production of levan. In which all 5 proteins were found after purification of the enzyme. The enzyme was finally purified about 11.47 folds purer than crude enzyme, with a recovery of 78.75%. The specific activity of enzyme was 15.95 IU/mL. The optimization of sucrose concentration was 20% (w/v), pH 6 of phosphate buffer and acetate buffer at 37 °C for 48 hours. The condition of phosphate buffer and acetate buffer were not significantly different. The maximal enzyme activity of levansucrase was 0.4 IU/mL which produce levan to 14.59% (w/v). Moreover, we used purified levansucrase enzyme to produce levan from the food industry waste. The results showed that maximal enzyme activity was 0.066 IU/mL. On the other hand, by using immobilized levansucrase enzyme, it was found the maximal enzyme activity was 0.023 IU/mL. From the study, it can be concluded that the levansucrase enzyme can transform the food waste into levan, which is a substance that is worth to encourage the development of health products.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของโครงการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
สมมุติฐานงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุม.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โครงสร้างของลีแวน.....	6
การสังเคราะห์ลีแวน.....	6
กลไกของการทำงานของเอนไซม์ลีแวนซูเครส.....	8
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	9
การตรึงเอนไซม์.....	12
ของเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม.....	14
ระบบการบำบัดน้ำเสีย.....	14
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	23
สารเคมีและอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์.....	23
อุปกรณ์และเครื่องแก้ว.....	24
วิธีการทดลอง.....	25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	34
5 สรุปผล.....	57
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก.....	63
ภาคผนวก ก.....	64
ภาคผนวก ข.....	66
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	69

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุม.....	4
2-1	ตารางเปรียบเทียบการส่งสัญญาณของ ^{13}C chemical shift ระหว่างโครงสร้าง $\beta(2\rightarrow 6)$ glycosidic linkage levan กับแบคทีเรียอื่น ๆ.....	21
4-1	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ <i>Bacillus siamensis</i>	35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	โครงสร้างของ levan ที่มีสายหลักเป็นฟรุกโทสต่อกันที่พันธะ β -(2,6) และแบบกิ่งเชื่อมด้วยพันธะ β -(2,1).....	6
2-2	แผนผังแสดงการสังเคราะห์ลิแวนจากน้ำตาลซูโครส.....	7
2-3	กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส.....	8
2-4	วิธีการตรึงเอนไซม์รูปแบบต่าง ๆ.....	12
2-5	แผนภาพแสดงกระบวนการการบำบัดน้ำเสีย.....	15
2-6	กราฟแสดงพฤติกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสในแต่ละช่วงเวลาของจุลินทรีย์..	17
2-7	กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-5 ด้วยเทคนิค FTIR.....	18
2-8	กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-6 ด้วยเทคนิค FTIR.....	18
2-9	กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-5 ด้วยเทคนิค $^1\text{H NMR}$	19
2-10	กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-6 ด้วยเทคนิค $^1\text{H NMR}$	20
3-1	แผนภาพโดยรวมของการทดลอง.....	25
3-2	การเตรียมเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ <i>Bacillus siamensis</i>	26
3-3	การแยกเอนไซม์ลิแวนซูเครสให้บริสุทธิ์จากเชื้อจุลินทรีย์ <i>B. siamensis</i>	27
3-4	การทดสอบของเอนไซม์ลิแวนซูเครส.....	28
3-5	การตรึงลิแวนซูเครสด้วยวิธีโควาลেন্টบนเม็ดไคโตซาน.....	29
3-6	การหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส.....	30
3-7	การผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสในของเสียอุตสาหกรรม.....	31
3-8	การผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์แบบตรึงในของเสียอุตสาหกรรม.....	32
4-1	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลิแวนซูเครส.....	34
4-2	ขนาดของเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่ได้จากกระบวนการทำบริสุทธิ์.....	35
4-3	กิจกรรมเอนไซม์ที่ซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะ pH 6 บ่ม 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	36
4-4	กิจกรรมเอนไซม์ที่ซูโครสเข้มข้น 20% ในสภาวะ Phosphate buffer pH ต่าง ๆ บ่ม 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4-5	กิจกรรมเอนไซม์ที่ชูโครสความเข้มข้น 20% ในสภาวะ Acetate buffer pH ต่าง ๆ บ่ม 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	40
4-6	กิจกรรมเอนไซม์ที่ชูโครสเข้มข้น 20% ในสภาวะบัฟเฟอร์ต่าง ๆ pH 6 บ่ม อุณหภูมิต่าง ๆ เขย่า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	42
4-7	การผลิตลิแวนที่ความเข้มข้นของชูโครส 5 10 และ 20% (w/v) ในฟอตเฟดบัฟเฟอร์ และอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง.....	44
4-8	การผลิตลิแวนที่ความเข้มข้นของชูโครส 20% (w/v) ในฟอตเฟดบัฟเฟอร์ pH 6 7 8 และอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4 5 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง.....	45
4-9	การผลิตลิแวนที่ความเข้มข้นของชูโครส 20% (w/v) ในฟอตเฟดบัฟเฟอร์ และอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง.....	46
4-10	อัตราการเกิดลิแวนที่ชูโครสเข้มข้น 20% (w/v) ในฟอตเฟดบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	47
4-11	อัตราการเกิดลิแวนที่ชูโครสเข้มข้น 20% (w/v) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	48
4-12	กิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตสารลิแวนที่ชูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสีย ในฟอตเฟดบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	49
4-13	อัตราการเกิดลิแวนที่ชูโครสเข้มข้น 20% (w/v) จากของเสียในฟอตเฟดบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	49
4-14	กิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตลิแวนที่ชูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสีย ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-15 อัตราการเกิดลิแวนที่ซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) จากของเสียในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	51
4-16 กิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรีงในการผลิตสารลิแวนที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสียอุตสาหกรรมในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	52
4-17 อัตราการเกิดลิแวนด้วยลิแวนซูเครสแบบตรีงจากของเสียอุตสาหกรรมในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง..	52
4-18 กิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรีงในการผลิตสารลิแวนที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสียอุตสาหกรรมใน อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง.....	53
4-19 อัตราการเกิดลิแวนด้วยลิแวนซูเครสแบบตรีงจากของเสียอุตสาหกรรมในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง...	54
4-20 กราฟปริมาณความเข้มข้นของซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส.....	55
4-21 กราฟปริมาณความเข้มข้นของลิแวน.....	55

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของโครงการวิจัย

ปัจจุบันปัญหาทางด้านมลพิษที่เกิดจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อชุมชน และบ้านเรือนที่อยู่บริเวณใกล้เคียง ซึ่งปัญหาที่เกิดขึ้นตามมามีหลายด้าน เช่น สุขภาพทางร่างกายและจิตใจของประชาชน ทรัพยากรทางธรรมชาติ ความหลากหลายทางชีวภาพในแหล่งน้ำเสื่อมโทรมมีจำนวนลดลง เป็นต้น นอกจากนี้ในปัจจุบันประเทศไทยมีกลไกการขับเคลื่อน Thailand 4.0 เป็นการพาไปสู่ ประเทศในโลกที่หนึ่ง โดยเน้น ระบบเศรษฐกิจที่เน้นการสร้างมูลค่า (Value-Based Economy) ที่ขับเคลื่อนด้วยนวัตกรรม เทคโนโลยี และความคิดสร้างสรรค์ โดยหนึ่งในกลุ่มเทคโนโลยีหรืออุตสาหกรรมเป้าหมายที่ต้องการพัฒนาในประเทศไทย นั่นคือ กลุ่มเทคโนโลยีทางการแพทย์และอาหาร โดยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งแนวคิดของ Thailand 4.0 เพื่อผลักดันให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์และอาหารระดับชั้นนำ และเป็นผู้ส่งออกเทคโนโลยีด้านการเกษตร เมล็ดพันธุ์ วัคซีน ที่สร้างฐาน เศรษฐกิจที่มั่นคงจากความหลากหลายดังกล่าว โดยมีเป้าหมายในการสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงสุดในระยะ 20 ปี ที่มีมูลค่าสูงถึง 1,000,000 ล้านบาท ด้วยกลไกขับเคลื่อนต่าง ๆ ซึ่งคาดว่าจะในอีกไม่กี่ปีข้างหน้าจะมีโรงงานอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เกิดขึ้นอีกจำนวนมาก และอาจส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติมากขึ้น อุตสาหกรรมอาหารเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความต้องการของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหนึ่งในข้อจำกัดที่มีผลต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหารคือ ค่าใช้จ่ายในการบำบัดและกำจัดของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิต สำหรับการพัฒนาอย่างยั่งยืนสำหรับอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Küçükaşık, et al., 2011) การพัฒนาไบโอรีไฟนารี (Biorefineries) ได้รับความสนใจอย่างยิ่งจากนักวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม ซึ่งแนวคิดนี้เกี่ยวข้องกับการผลิตสารประกอบต่าง ๆ เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ สารเคมี และพลังงานที่ดีจากแหล่งพลังงานทดแทน อย่างเช่น พลังงานจากชีวมวล (Alam, et al., 2009) ซึ่งเป็นกระบวนการแปรรูปชีวมวลให้เป็นวัสดุชีวภาพที่มีประโยชน์ และสามารถเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจจากของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต และลดปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นได้

ในสังคมปัจจุบันอาหารไม่ได้มีความสำคัญเพียงเพื่อให้พลังงานแก่ร่างกายเท่านั้น แต่ยังเน้นไปทางด้านการส่งเสริมสุขภาพ ความสนใจทางด้านสุขภาพที่เพิ่มขึ้นของผู้คนในการเลือกรับประทานอาหาร (Dominguez, et al., 2014) ในช่วงที่ผ่านมาผู้คนให้ความสำคัญกับพฤติกรรมการบริโภคอาหารมากขึ้น โดยอาหารที่ให้ประโยชน์จะถูกให้ความสำคัญจากผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น ซึ่งพรีไบโอติก (Prebiotics) ถือเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตสายสั้น Fructooligosaccharides (FOSs) และเป็นหนึ่งในกลุ่มหลักของพรีไบโอติกที่มีคุณสมบัติเป็น bifidogenic โดย FOSs สามารถสกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ หรือการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีอยู่ในซูโครสที่เกิดจากปฏิกิริยา fructosyltransferase (Singh, et al., 2016) ในบรรดาพรีไบโอติกเหล่านี้ FOSs เป็นที่สนใจเนื่องจากมีคุณค่าและมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง (Yun, 1996; Flores-Gallegos et al., 2015) FOSs ทั้งยังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus sp.* ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ โดยกลุ่มแบคทีเรียชนิดดังกล่าวนี้จะทำให้เกิดกรดไขมัน เช่น acetate (C2), propionate (C3) และ butyrate (C4) ซึ่งช่วยลดความเป็นกรดของลำไส้ใหญ่ ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ (Ca²⁺ และ Mg²⁺) และสารอาหารในร่างกาย (Scholz-Ahrens et al., 2007; Tazoe, et al., 2008) เป็นต้น ลิเวิน (Levan) จัดเป็นไฮโมโพลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันเป็นสายหลัก (Cerning, 1990) ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด (Smeekens, et al., 1999) จากการศึกษาเกี่ยวกับการรวบรวมการสังเคราะห์และการผลิตลิเวิน เริ่มขึ้นระหว่างปี พ.ศ. 2413 ถึง พ.ศ. 2483 ในเยอรมนี ฝรั่งเศส และอังกฤษ (Hendry, et al., 1993) นอกจากคุณสมบัติทั่วไปลิเวินยังมีคุณสมบัติทางชีวการแพทย์ที่สำคัญ เช่น สารต่อต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ป้องกันมะเร็ง สารต่อต้านเอดส์ ฯลฯ (Dahech, et al., 2011) และยังใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางในการจัดทำครีมผิวมอยเจอไรเซอร์ ฯลฯ (Yang, 2011) การใช้ประโยชน์จากลิเวินในภาคอุตสาหกรรมมีจำนวนมาก ลิเวินจึงกลายเป็นโพลิเมอร์ที่สำคัญและเป็นสารที่มีความต้องการในตลาด โดยที่ลิเวินเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าสูง

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้เป็นการเพิ่มกำลังการผลิตสารลิเวิน (Levan) ซึ่งเป็นสารพรีไบโอติกมูลค่าสูง โดยผลิตจากของเหลือทิ้งจากโรงงานที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครส โดยในปีที่แล้วได้ดำเนินการวิจัยในเฟสแรกแล้วเสร็จ ทีมนักวิจัยสามารถผลิตสารลิเวิน ซึ่งเป็นสารพรีไบโอติก จากของเหลือทิ้งของโรงงานได้ ทั้งนี้ได้ดำเนินการวิเคราะห์โครงสร้างและองค์ประกอบเสร็จสิ้น โดยในปีนี้นักวิจัยและทางโรงงานได้วางแผนที่จะเพิ่มกำลังการผลิตสารลิเวินให้มีกำลังการผลิตที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นการสร้างรายได้และใช้ประโยชน์จากของเสียให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับโรงงาน (พงษ์ธร เฟื่องน้อย, 2561) และเพื่อตอบสนองความต้องการของ

อุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจให้กับประเทศได้ และตรงกับนโยบาย Thailand 4.0 โดยจะทำให้อัตราการขยายตัวทางเศรษฐกิจจากระดับร้อยละ 3-4 เป็นร้อยละ 5-6 การเพิ่มระดับการวิจัยและพัฒนา จากร้อยละ 0.25 GDP ในปี พ.ศ. 2553 เป็นร้อยละ 4.0 (เทียบเท่าประเทศเกาหลีใต้)

และโรงงานที่มีของเสียประเภทน้ำตาลชูโครส เช่น โรงงานน้ำตาล โรงงานน้ำอัดลม โรงงานน้ำผลไม้ เป็นต้น สามารถนำความรู้จากงานวิจัยไปเป็นต้นแบบในการผลิตชีวได้น้ำตาล ซึ่งจะเป็นการสร้างประโยชน์ต่อโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพสูง และสามารถแข่งขันกับตลาดโลกได้ ซึ่งจะส่งผลให้เศรษฐกิจของประเทศได้รับการขยายตัว

วัตถุประสงค์

ศึกษาการทำเอนไซม์ลิวานซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ในการผลิตสารลิวานศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตลิวานด้วยเอนไซม์ลิวานซูเครส และศึกษาความสามารถในการผลิตสารลิวานมูลค่าสูง ด้วยเอนไซม์ลิวานซูเครสแบบตรึง โดยใช้ชูโครสในของเสียอุตสาหกรรม

สมมุติฐานงานวิจัย

เอนไซม์ลิวานซูเครสสามารถผลิตสารลิวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้น้ำตาลชูโครสที่ได้จากของเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และการตรึงเอนไซม์ลิวานซูเครส ด้วยวิธีโควาลนต์บนเม็ดโกลโคซาน สามารถผลิตสารลิวานได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นองค์ความรู้ที่ง่ายต่อการศึกษาต่อในระดับอุตสาหกรรม โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนชูโครสให้เป็นสารลิวานได้ปริมาณและประสิทธิภาพสูงสุด

ขอบเขตของงานวิจัย

เอนไซม์ลิวานซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* สามารถผลิตลิวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ชูโครสที่ได้จากของเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ช่วยให้อัตราการผลิตลิวานสูงขึ้น ซึ่งการตรึงเอนไซม์ลิวานซูเครสด้วยวิธีโควาลนต์กับเม็ดโกลโคซาน โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนน้ำตาลชูโครสให้เป็นสารลิวานได้ปริมาณและประสิทธิภาพสูง

ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุม

ตารางที่ 1-1 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุม

การทดลอง	ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ลิแวนซูเครสด้วยวิธี แลกเปลี่ยนไอออน	- ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์	- ปริมาณเอนไซม์ ลิแวนซูเครส	- เวลา - อุณหภูมิ - pH
การศึกษาความเข้มข้น ซูโครสที่เหมาะสม ต่อการทำงานของ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครส	- ค.เข้มข้นซูโครส ฟอสเฟตบัฟเฟอร์/ อะซิเตตบัฟเฟอร์	- กิจกรรมเอนไซม์ - ลิแวน	- เวลา - อุณหภูมิ - pH
การศึกษาผลกระทบอุณหภูมิ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครส	- อุณหภูมิ - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์/ อะซิเตตบัฟเฟอร์	- กิจกรรมเอนไซม์ - ลิแวน	- ค.เข้มข้นซูโครส - เวลา - pH
การศึกษาผลกระทบ ความเป็นกรด-ด่าง ของเอนไซม์ลิแวนซูเครส	- pH - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์/ อะซิเตตบัฟเฟอร์	- กิจกรรมเอนไซม์ - ลิแวน	- ค.เข้มข้นซูโครส - อุณหภูมิ - เวลา
การศึกษาการตรึง ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์บนเม็ด ไคโตซาน	- ปริมาณเอนไซม์ - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์/ อะซิเตตบัฟเฟอร์	- กิจกรรมเอนไซม์ - ลิแวน	- ค.เข้มข้นซูโครส - อุณหภูมิ - เวลา - pH

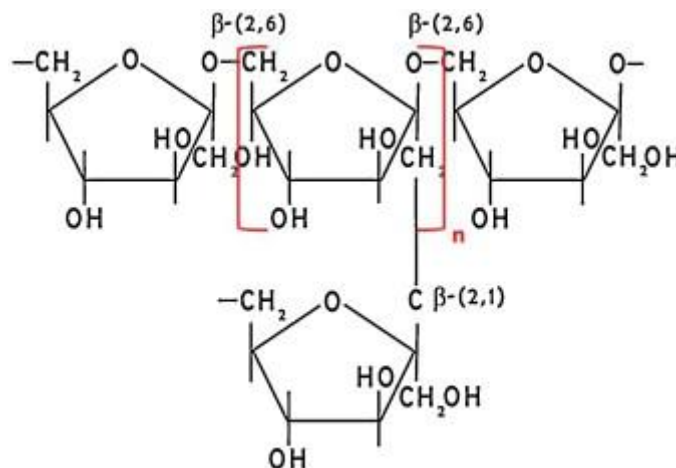
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถลดปริมาณของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และสามารถผลิตสีแวนที่มีมูลค่าสูงได้ สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปขยายผลในระดับอุตสาหกรรม และสามารถผลิตสารสีแวนมูลค่าสูงได้จากของเสียอุตสาหกรรมด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรึงบนเม็ดโคโนซาน

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างของลีแวน

สารลีแวนเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโฮโมโพลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลฟรุกโทสเป็นสายหลัก (Cerning, 1990) ได้สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดซึ่งเป็น exopolysaccharides (EPS) (Smeekens et al., 1999) สามารถย่อยสลายทางชีวภาพและสามารถละลายน้ำได้ เช่นเดียวกับ polysaccharides, levan ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่ โดยมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลฟรุกโทสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -(2,6) linkages กับ β -(2,1) linkages ในสายหลักและโซ่กิ่งตามลำดับแล้วต่อกับ d-glucosyl ที่ปลายด้านหนึ่งของสายโครงสร้างด้วยพันธะ β -(2,1) Linkages (Venugopal, 2016) ดังภาพที่ 2-1

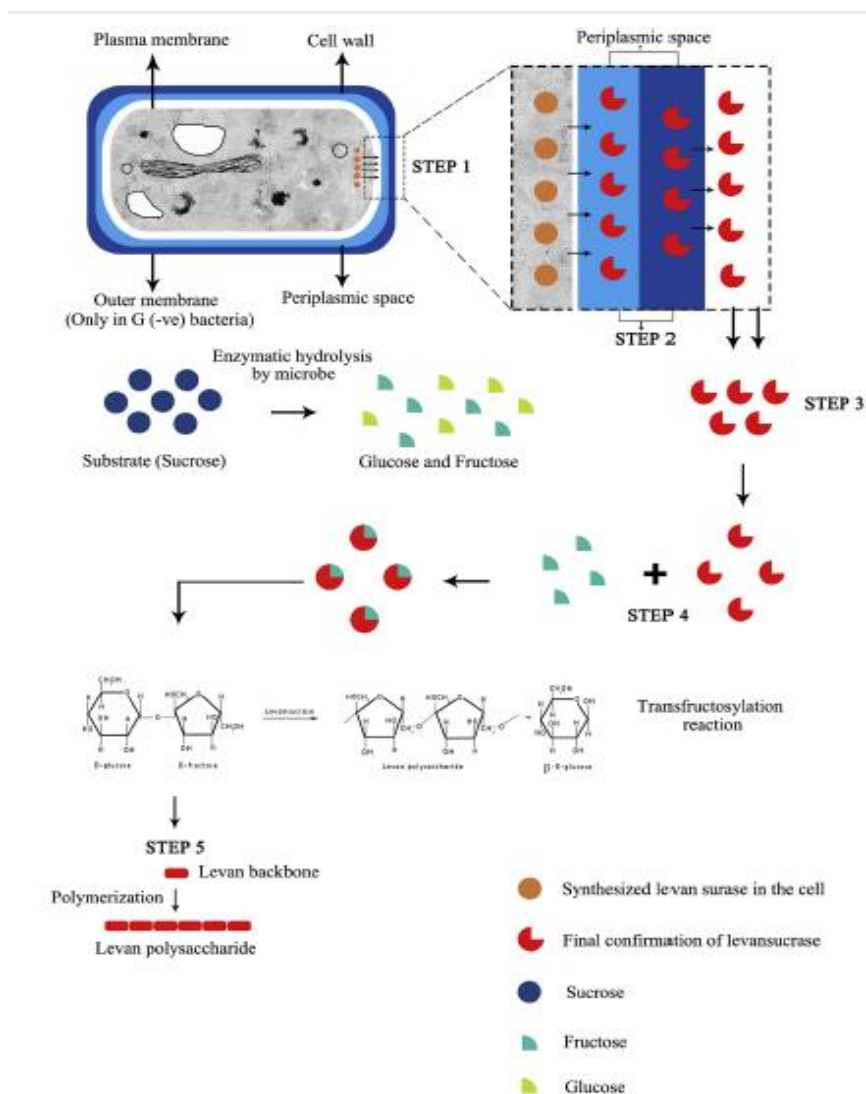


ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของ levan ที่มีสายหลักเป็นฟรุกโทสต่อกันที่พันธะ β -(2,6) และแบบกิ่งเชื่อมด้วยพันธะ β -(2,1) (Srikanth, et al., 2015)

การสังเคราะห์ลีแวน

Levan มีอยู่กระจายทั่วไปทั้งในพืช ยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย (Jang, et al., 2003) โดยการสังเคราะห์ levan นั้นเกิดจากการใช้เอนไซม์ที่ชื่อว่า levansucrase ที่รู้จักกันในรูปของ sucrose 6-fructosyltransferase (Hernández, et al., 1999) โดยมีจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง

เอนไซม์ที่ทำงานได้ อาทิเช่น *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasserii*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum* และ *S. salivarius* เป็นต้น (Han, 1990)



ภาพที่ 2-2 แผนผังแสดงการสังเคราะห์หีสึเวนจากน้ำตาลซูโครสโครส

ขั้นตอนที่ 1: การสังเคราะห์ Levansucrase เกิดขึ้นภายในเซลล์

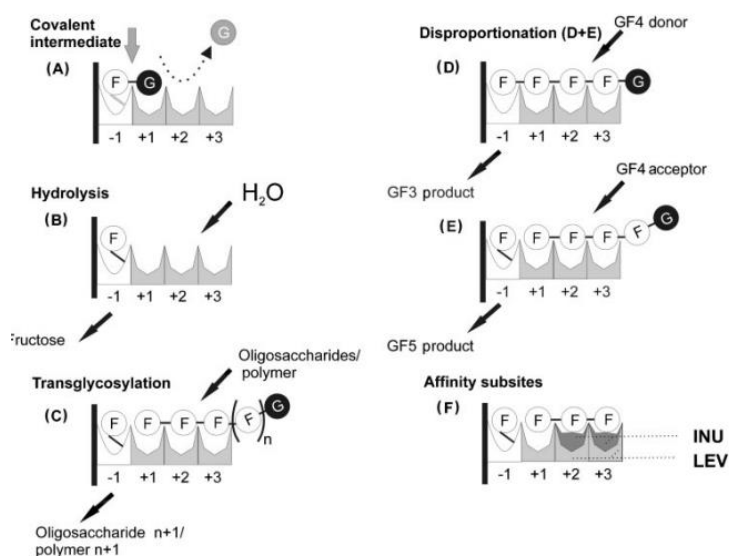
ขั้นตอนที่ 2: Levansucrase จะถูกสะสมอยู่ในชั้นของ periplasmic space ก่อนถูกนำส่งออกเซลล์

ขั้นตอนที่ 3: Levansucrase ถูกขับออกมานอกเซลล์สู่สิ่งแวดล้อมทั้งที่แยกออกมาจาก signal peptide ที่หลั่งออกมาพร้อมกับ โปริติน และที่ถูกขับออกมาด้วยกลไกจาก signal peptide ของตัวมันเอง

ขั้นตอนที่ 4: Levansucrase จะทำตัวเป็นสารตั้งต้น และสังเคราะห์ levan เมื่อเริ่มเกิดปฏิกิริยา transfructosylation

ขั้นตอนที่ 5: จะไปจับกับน้ำตาลฟรุกโทสที่แยกได้จากน้ำตาลซูโครส แล้วนำน้ำตาลฟรุกโทสนั้นมาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยปฏิกิริยา transfructosylation ได้มาเป็น levan backbone แล้วเชื่อมต่อกันด้วย ปฏิกิริยา polymerization ได้เป็น levan สายยาว (Srikanth, et al., 2015)
 ดังภาพที่ 2-2

กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Ozimek, et al., 2006)



ภาพที่ 2-3 กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

Active site ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสตำแหน่ง -1 และ +1 มีความจำเพาะกับโมเลกุลของฟรุกโทสและกลูโคสตามลำดับ เมื่อโมเลกุลของซูโครส (ประกอบด้วยฟรุกโทส, F และกลูโคส, G) จับเข้ากับ Active site ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสในตำแหน่งที่ถูกต้อง พันธะระหว่างฟรุกโทสและกลูโคสจะถูกทำลายและกลูโคสจะถูกปล่อยออกจาก Active site ดังภาพที่ 2-3 (A) โดยโมเลกุลของน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์บริเวณ Active site เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้โมเลกุล

ของฟรุกโตสและกลูโคสหลุดออกจากกัน ดังภาพที่ 2-3 (B) หรือในอีกกรณีหนึ่ง เมื่อโมเลกุลของ ซูโครสทำปฏิกิริยากับ Active site และยึดติดกับ Subsite ที่ตำแหน่ง +1 และ +2 จะทำให้เกิดเป็น โมเลกุลของโอลิโกแซ็กคาไรด์หรือพอลิแซ็กคาไรด์ ดังภาพที่ 2-3 (C) ซึ่งเรียกว่า ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิลเลชัน (Transglycosylation reactions) ปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถเกิด ได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบของการตัดสายพอลิเมอร์ให้สั้นลงด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และต่อให้สายพอลิเมอร์ยาวขึ้นด้วยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิลเลชัน ดังภาพที่ 2-3 (D และ E) เมื่อพอลิเมอร์ของโอลิโกแซ็กคาไรด์ (G, F4) มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิสทำให้โมเลกุลของฟรุกโตสหลุดออก 1 โมเลกุล ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่เป็น โอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 1 โมเลกุล และฟรุกโตส 3 โมเลกุล (G, F3) ซึ่ง โมเลกุล GF4 ที่ถูกไฮโดรไลซิสจะเรียกว่าตัวให้ (GF4 donor) ดังภาพที่ 2-3 (D) ในส่วนของการต่อ สายพอลิเมอร์นั้น เมื่อโมเลกุลโอลิโกแซ็กคาไรด์ GF4 ทำปฏิกิริยากับ Active site ที่ตำแหน่ง +1 จะ สามารถเชื่อมต่อพันธะระหว่างโมเลกุลของฟรุกโตสที่ตำแหน่ง -1 บน Active site ทำให้เกิด แซ็กคาไรด์ที่สายยาวขึ้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแซ็กคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 1 โมเลกุล และฟรุกโตส 5 โมเลกุล (G, F5) ดังภาพที่ 2-3 (E) GF4 ที่ถูกต่อสายพอลิเมอร์ให้ยาวขึ้นจะเรียกว่า ตัวรับ (GF4 acceptor)

เอนไซม์ลิแวนซูเครสมีความสามารถในการผลิตได้ทั้งโอลิโกแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับโมเลกุลของแซ็กคาไรด์ที่ เป็นตัวรับบน Active site ที่ตำแหน่ง +1 ในกรณีที่เอนไซม์มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของ แซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ เรียกกระบวนการนี้ตามแบบจำลองว่า Non-processive ในทางกลับกันหากเอนไซม์มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของแซ็กคาไรด์ ตัวรับที่มีโมเลกุลยาว ๆ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นพอลิแซ็กคาไรด์หรือที่เรียกว่า ลิแวน (Ozimek, et al., 2006)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Scanlon, et al., 2018)

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารเริ่มต้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จะต้องมี การรวมตัวกันของ เอนไซม์-สารเริ่มต้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของ โมเลกุลทั้งสอง ถ้ามีสารเริ่มต้นพอเพียง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นสองเท่าจะทำให้ อัตราเร็วเพิ่มขึ้นไปเป็น 2 เท่าด้วย แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อไปเรื่อย ๆ อัตราการเกิด ปฏิกิริยาเป็นแนวระนาบเพราะสารเริ่มต้นเริ่มหมดไป ทำให้เป็นตัวจำกัดการเกิดปฏิกิริยาได้ อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของ โมเลกุล ซึ่งจะชนกันมากขึ้นเมื่อปริมาณ

เอนไซม์หรือสารเริ่มต้นมากขึ้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นนั้น ถ้าให้เอนไซม์เป็นตัว
คงที่และเพิ่มปริมาณสารเริ่มต้นขึ้นเรื่อย ๆ นั้น ปฏิกิริยาได้เป็น 3 ระยะ คือ

- ระยะที่ 1 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารเริ่มต้น
- ระยะที่ 2 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มลดลงเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์เริ่มเป็นตัวจำกัด
- ระยะที่ 3 อัตราเร็วถึงจุดอิ่มตัว

2. ความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน
หลายด้านตามปกติเอนไซม์แต่ละชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์
จะลดลงเมื่อ pH สูงหรือต่ำกว่า pH ที่เหมาะสม pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง
6-8 การที่ pH สูงมากหรือต่ำมาก จะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ เนื่องจากเอนไซม์ ประกอบด้วย
กลุ่ม (อะมิโน) และ (คาร์บอกซิล) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงประจุของไฮโดรเจนไอออนในสารละลาย
ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

- pH ลดลง - NH₂ กลายเป็น - NH₃⁺
- pH เพิ่มขึ้น - COOH กลายเป็น - COO⁻
- pH อยู่ที่ isoelectric point
- NH₂ ยังคงเป็น - NH₂
- COOH ยังคงเป็น - COOH

นอกจาก pH จะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์แล้ว pH ยังมีผลต่ออัตราการเกิด
ปฏิกิริยาอีก 2 ทาง คือ

2.1 กิจกรรมของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับการปรากฏของกลุ่มอะมิโน
และกลุ่มคาร์บอกซิล ซึ่งทั้ง 2 กลุ่ม อาจจะมีประจุหรือไม่มีประจุก็ได้ แต่เอนไซม์จะทำงานได้ดี
เพียงเมื่อกลุ่มทั้ง 2 มีประจุหรือไม่มีประจุแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ ถ้าเอนไซม์ทำงานได้ดี
เมื่อกลุ่มอะมิโนไม่มีประจุ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มักจะสูง ในขณะที่
ถ้าเอนไซม์ทำงานได้ดี เมื่อคาร์บอกซิลเป็นกลาง pH ที่เหมาะสมจะต่ำ

2.2 pH ควบคุมการแตกตัวของสารเริ่มต้น ซึ่งมีหลายปฏิกิริยาต้องเกิดการแตกตัวของ
สารเริ่มต้นก่อน ปฏิกิริยาจึงจะดำเนินต่อไปได้

3. อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้พลังงานจลน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ปฏิกิริยา
เพิ่มขึ้นด้วย อัตราการเพิ่มความเร็วของปฏิกิริยาคำนวณได้จากค่า Q₁₀ หรือ Temperature quotient
ค่า Q₁₀ ของเอนไซม์มักจะมีค่ามากกว่า 1 ขึ้นไป

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

4. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Reaction product) อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถวัดได้จากอัตราการหายไปของสารเริ่มต้นหรืออาจจะวัดจากการปรากฏขึ้นของผลิตภัณฑ์ หรือทำทั้ง 2 วิธีพร้อมกัน แต่ไม่ว่าจะวัดโดยวิธีใด จะพบว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ช้าลงนี้ เป็นเพราะเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังเกิดเพราะมีการลดลงของสารเริ่มต้น และผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้น จนถึงความเข้มข้นหนึ่ง อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ (Reversibility) โมเลกุลของผลิตภัณฑ์จะรวมกับเอนไซม์แทนสารเริ่มต้นทำให้ปฏิกิริยาถูกจำกัดได้

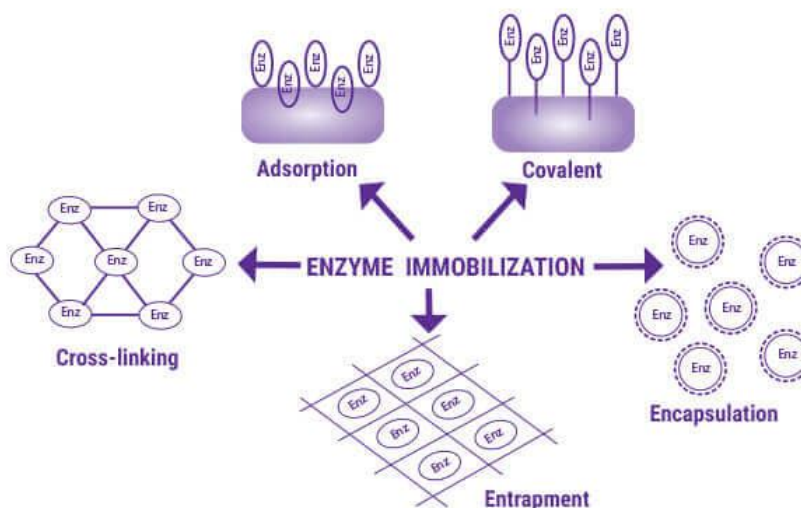
5. สารระงับการทำงานของเอนไซม์ (Inhibitors) มีสารหลายชนิดที่สามารถระงับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ สารเหล่านี้ อาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น โลหะหนักต่าง ๆ หรืออาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) หรือ โปรตีน แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ ดังนี้

5.1 Competitive inhibitor เป็นสารระงับการทำงานของเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารเริ่มต้นมาก และเข้าแย่งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ Active site ของเอนไซม์ เมื่อเกิดการรวมกันเป็นเอนไซม์-สารระงับ (Enzyme-Inhibitor) จะทำให้ปริมาณของเอนไซม์ลดลง ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง สารระงับเหล่านี้ อาจจะไปเปลี่ยนหรือไม่เปลี่ยนไปก็ได้ การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นให้มากขึ้นจะลดผลของ Competitive inhibitor ได้ ตัวอย่างของ Competitive inhibitor คือ การที่มาโลเนต (malonate) แย่งทำปฏิกิริยากับ succinate dehydrogenase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ปกติจะทำปฏิกิริยากับ succinate ได้ fumarate ซึ่งปรากฏในการหายใจ ซึ่งเมื่อ malonate รวมกับเอนไซม์แล้วทำให้การหายใจเกิดไม่ได้

5.2 Noncompetitive inhibitor สารระงับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะเข้ารวมกับเอนไซม์แต่จะไม่รวมที่ Active site สารพวกนี้มีลักษณะต่างจากสารเริ่มต้น การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นจะไม่สามารถลบล้างผลของสารเหล่านี้ได้ โลหะที่เป็นพิษทั้งหลาย และสารที่รวมหรือทำลาย กลุ่มซัลไฟไฮไดรล มักจะเป็นสารในกลุ่มนี้ เช่น การที่มีออกซิเจนมาก จะทำให้ -SH ถูกออกซิไดซ์ เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ขึ้นมา ซึ่งทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้ Active site รวมกับสารเริ่มต้นไม่ได้ ส่วนโลหะ เช่น Hg^{+2} และ Ag^{+} จะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของกลุ่มซัลไฟไฮไดรล เกิดเป็นเมอร์แคปไทด์ (Mercaptides) ซึ่งไม่ละลายน้ำ

5.3 Uncompetitive inhibitor สารระงับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ไม่รวมกับเอนไซม์อิสระ และไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ และสารเริ่มต้น แต่จะเข้ารวมกับเอนไซม์-สารเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ การระงับการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีสารเริ่มต้นมากขึ้น สารระงับชนิดนี้มักจะพบในปฏิกิริยาซึ่งมีสารเริ่มต้นสองชนิด

การตรึงเอนไซม์ (Hettiarachchy et al., 2018; Liu et al., 2018)



ภาพที่ 2-4 วิธีการตรึงเอนไซม์รูปแบบต่าง ๆ

1. การตรึงรูปด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง (carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำ วิธีนี้มีเทคนิคการทำอยู่หลายรูปแบบ โดยอาจทำการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพุง ด้วยพันธะเคมีที่เรียกว่า พันธะไอออนิก หรือเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ปฏิกิริยาการเกิดพันธะ จะมีผลต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์ หรือจะเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพุง ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพก็ได้ ซึ่งจะไม่ทำให้โครงสร้าง และแอกติวิตีของเอนไซม์เสียไป แต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้จะต้องพิจารณาเลือกตัวพุงให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ และวัสดุคิปที่ใช้เป็นซับสเตรท ซึ่งมีทั้งสารธรรมชาติ และสารสังเคราะห์

2. การตรึงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (Cross linking method) การตรึงรูปวิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุงแต่จะอาศัยสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีแบบโคเวเลนต์ ทำให้โมเลกุลเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไป ต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ละลายน้ำได้น้อย การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้มีผลต่อโครงสร้าง และแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ เนื่องจากการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเชื่อมขวางจะเกิดปฏิกิริยารุนแรง

3. การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ (Entrapping method) การตรึงเอนไซม์วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะเอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใด ๆ กับสารห่อหุ้ม และเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวพุงหรือจับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด

ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

3.1 เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ ภายในช่องตาข่าย ของสารโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำอย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วิธีนี้อาจเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติ หรือสังเคราะห์ก็ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องเลือกชนิดของสารโพลีเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นโพลีเมอร์จะมีปฏิกิริยารุนแรงจนทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายไปได้

3.2 เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลเล็กที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้า-ออกได้ แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดสารโพลีเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นจะมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้

การนำเอนไซม์มาใช้ในวงการอุตสาหกรรมทั่ว ๆ ไปจะอยู่ในรูปของเอนไซม์อิสระ และยังสามารถนำมาใช้ได้ไปอีกลักษณะหนึ่ง คือ ใช้ในแบบของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว ให้กลายเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายได้น้อยมาก โดยการนำเอาเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดหรือจัดไว้ หรือนำมาจับยึดไว้กับตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ หรือทำให้โมเลกุลเอนไซม์จับเชื่อมกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น

เอนไซม์ตรึงรูปนี้เมื่อใช้งานแล้ว สามารถแยกนำกลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้งจนกว่าแอกติวิตี (activity) หรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก ทำให้ประหยัดกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ และสามารถใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระดั้งเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับทางเลือกชนิดของตัวกลางที่ใช้จับยึด กับวิธีการตรึงรูป ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางมากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ ซึ่งจะต้องใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่จุดหนึ่งที่เหมาะสมเท่านั้น

เอนไซม์ตรึงรูปค่อนข้างจะมีเสถียรภาพที่ดีกว่าเอนไซม์ในรูปอิสระ สามารถใช้งานในระบบที่มีเอนไซม์หลาย ๆ ตัวได้ และใช้ได้ทั้งในลักษณะแบบต่อเนื่องหรือเป็นครั้งคราว เอนไซม์ที่จะนำมาตรึงรูปไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์มากนัก ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ สำหรับเครื่องปฏิกรณ์ที่จะใช้กับเอนไซม์ตรึงรูปก็ไม่มีปัญหาอะไร เพราะสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมได้ขึ้นอยู่กับรูปแบบของการตรึงรูป และสารที่เป็นตัวสเตรทจะเห็นว่าการใช้เอนไซม์ตรึงรูปจะมีข้อดีอยู่หลายประการ ดังนั้นนอกจากจะใช้ในงานอุตสาหกรรมแล้ว ยังใช้เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งใช้ในทางการแพทย์ด้วย วิธีใช้ก็ไม่ยุ่งยากจะยุ่งบ้างก็ตอนที่เลือกวิธีการตรึงรูป และสารตัวกลางที่จะใช้จับยึดให้เหมาะสมตรงกับจุดประสงค์ที่ต้องการเท่านั้น

คังภาพที่ 2-4

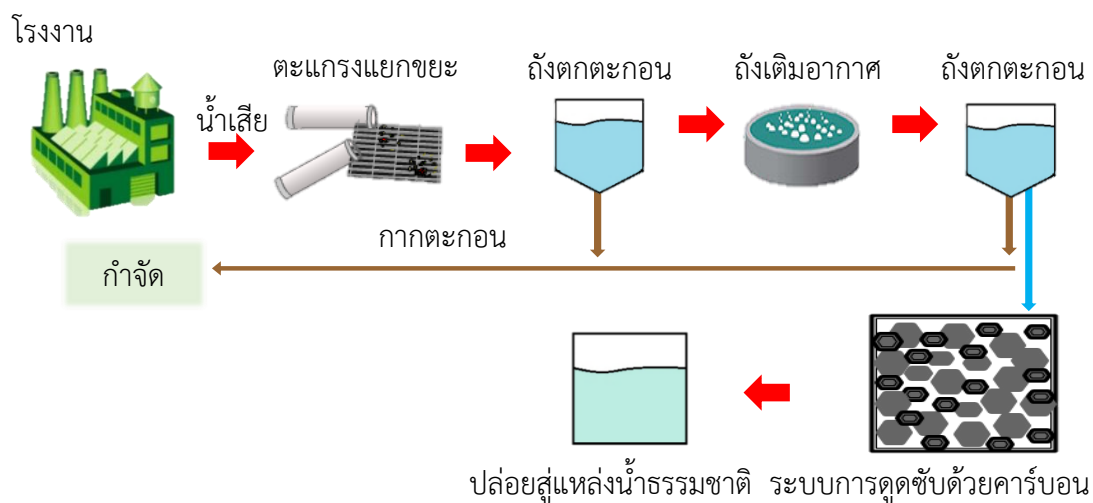
ของเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ของเสียจากอุตสาหกรรมเครื่องดื่มเป็นสารย่อยสลายทางชีวภาพได้สูงและเป็นสารผสมต่าง ๆ ของสารเคมี ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแลคโตส สารให้ความหวานเทียม น้ำผลไม้เข้มข้น สารปรุงรส สารละลายคาร์บอน ไดออกไซด์ คาร์บอนเนต ไบคาร์บอนเนต สารสี สารกันบูด (กรดฟอสฟอริกและกรด tartaric) และเกลือแร่ที่ใช้ในระหว่างการผลิต ความต้องการออกซิเจนทางชีวภาพ (BOD) และความต้องการของสารเคมีออกซิเจน (COD) (BOD : COD) ของน้ำเสียจากเครื่องระหว่างการผลิตเครื่องดื่ม โดยทั่วไป 0.05 : 1 (Ait Hsine et al., 2005) น้ำตาลที่เป็นของเสียเป็นปัจจัยหลักที่มีค่า COD สูง 25-145,000 มก./ล. ปริมาณไอโอดีน 130-350 มก./ ลิตร สารแขวนลอยทั้งหมด 26-38,000 มก./ ลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TDS) 1200 มก./ ลิตร รวมไนโตรเจน (TN) 20-1180 มก./ ลิตร และฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) 130-250 mg/ L pH อาจเป็นกรดหรือด่างตั้งแต่ 3.4 ถึง 11 (Ait Hsine et al., 2005; Matošić et al., 2009) การปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจึงจำเป็นต้องมีการบำบัดของเสียก่อนปล่อยออกนอกโรงงาน เพราะไม่อย่างนั้นจะทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม (Manyele et al., 2008; Matošić et al., 2009) ผลกระทบของสภาวะต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์

ระบบการบำบัดน้ำเสีย (Fersi et al., 2005)

ขั้นตอนการบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังภาพที่ 2-5

1. การบำบัดขั้นเตรียมการ (Preliminary treatment) เป็นขั้นตอนการแยกสิ่งสกปรกที่มีขนาดใหญ่ไม่ละลายน้ำออกจากน้ำ โดยการใส่ตะแกรง (Screens)
2. การบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) น้ำเสียที่ผ่านขั้นตอนจากข้อที่ 1 แล้ว จะถูกนำมาตกตะกอนในถังตกตะกอน ซึ่ง เรียกว่า Primary sludge การบำบัดในขั้นนี้จะลดค่า BOD ได้ประมาณ 25-40% แล้วแต่คุณลักษณะของน้ำทิ้งและประสิทธิภาพของถังตกตะกอน
3. การบำบัดขั้นที่สอง (Secondary treatment) น้ำเสียจากข้อ 2 จะถูกนำไปสู่ถังเติมอากาศซึ่งจะมีการเติมอากาศให้แก่แบคทีเรียโดยใช้เครื่องเติมอากาศ แบคทีเรียช่วยย่อยสลายและกำจัดสารอินทรีย์หรือ BOD ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายหรืออนุภาคคอลลอยด์ออกไปกลายเป็นตะกอนตกลงไปที่ก้นถังตกตะกอนในส่วนนี้จะถูกนำไปกำจัดต่อไปหรืออาจมีการเติมโพลิเมอร์
4. การบำบัดขั้นที่สาม (Tertiary treatment) นำมาผ่านระบบการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ โดยขั้นตอนนี้จะทำการบำบัดเพื่อเป็นการดูดซับสีและกลิ่นก่อนปล่อยน้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ



ภาพที่ 2-5 แผนภาพแสดงกระบวนการบำบัดน้ำเสีย

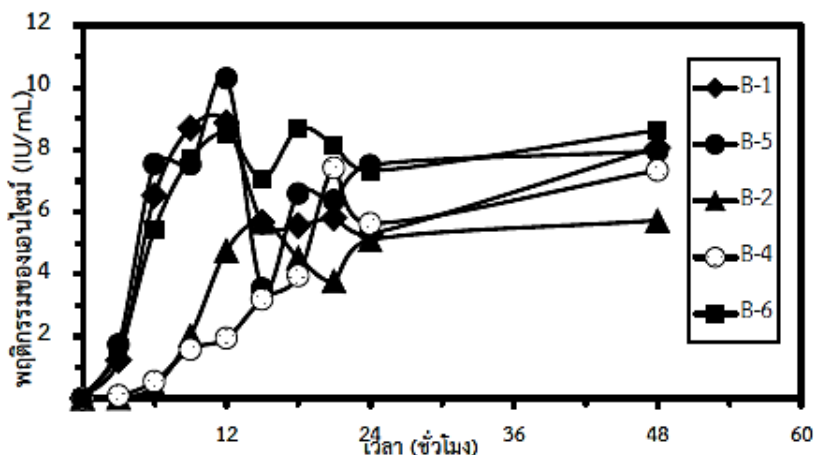
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Esawy et al. (2008) ศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์ Levansucrase จากจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ด้วยวิธีการตรึงรูปแบบต่าง ๆ เช่น การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) พันธะโควาเลนต์ (Covalent binding) พันธะไอออนิก (Ionic binding) และ Entrapment จากการศึกษาค้นคว้าทดลอง พบว่า การตรึงเอนไซม์ที่เตรียมด้วยวิธีโควาเลนต์ โดยใช้ Gluteraldehyde 3% เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการกระตุ้นการสับสนุน (โคโคซาน) เพื่อให้ได้เอนไซม์ตรึงรูปที่ให้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งมีประสิทธิภาพการตรึงที่ดี (81.51%) ดังนั้นจึงใช้เป็นตัวอย่างทั่วไปสำหรับการตรึง Levansucrase จากจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* NRC33a แต่จากการทดสอบพบว่า เวลาของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของสารตั้งต้นของเอนไซม์ตรึงมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ โดยที่ Levansucrase ที่ตรึงไว้จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเอนไซม์ฟรีที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส พลังงานกระตุ้น คือ 6.62 และ 9.27 kcal mol⁻¹ สำหรับเอนไซม์อิสระและตรึงตามลำดับ แม้ว่าความคงตัวของความร้อนของ Levansucrase ที่ตรึงไว้จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับรูปแบบอิสระ ผลของค่า pH ที่แตกต่างกันพบว่า pH ที่มีความเป็นกรดสูงการทำงานของ Levansucrase ที่ตรึงอยู่มีเอนติวิตีสูงกว่าของเอนไซม์อิสระ และการศึกษาความคงตัวของค่า pH ของ Levansucrase ที่เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงสามารถปกป้องเอนไซม์จากค่าความเป็นกรดและเป็นด่างรุนแรง และการตรึงเอนไซม์มีค่าเอนติวิตีสูงถึง 51.13% หลังจากที่มีการใช้ซ้ำ 14 ครั้ง

โดยในแต่ละปีที่ผ่านมาทาง นิติระดับปริญญาตรีและระดับปริญญาโท สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ทำการศึกษาวิจัยโครงการการผลิต สารสีแวนด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยการหมักได้ดำเนินการวิเคราะห์โครงสร้างและ องค์ประกอบเสร็จสิ้นแล้ว จึงนำผลการศึกษาต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยโครงการนี้ โดยที่ ข้อมูลจากทีมวิจัยที่ได้ศึกษา มีดังต่อไปนี้

ณัฐพงศ์ ทาคำ (2559) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกและศึกษา จุลินทรีย์ที่ผลิต สารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากถั่วเหลืองหมัก ด้วยวิธีการดังนี้

1. ทำการเจือจางสารแบบ serial dilution ถั่วเหลืองหมัก
2. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จากถั่วเหลืองหมัก ในอาหารแข็งที่ใช้สำหรับสกรีนจุลินทรีย์ ที่มี น้ำตาลซูโครสสูงโดยพิจารณาจากการสร้างเมือกของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิแวนจากน้ำตาล ซูโครสได้ และนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 2 ที่มีปริมาณซูโครสน้อยสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ เป็นโคโลนีได้ 9 ชนิด
3. หาประสิทธิภาพการย่อยน้ำตาลซูโครสของจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ 5 ชนิด ในอาหารเหลวสูตร 1 ด้วยวิธี DNS เพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากกระบวนการ ไฮโดรไลซิส
4. ศึกษาพฤติกรรมของการย่อยน้ำตาลกลูโคส พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 12 จุลินทรีย์ชนิด B-5 มี ประสิทธิภาพในการย่อยสูงสุด และ B-1, B-6, B-2, B-4 ตามลำดับ ดังภาพที่ 2-6
5. ศึกษาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ด้วยวิธีการ Thin layer chromatography (TLC) พบว่า ที่ 0 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ยังไม่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมงเชื้อจุลินทรีย์ เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และทรานฟรุกโทซิเลซัน ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารโพลีแซ็กคาไรด์



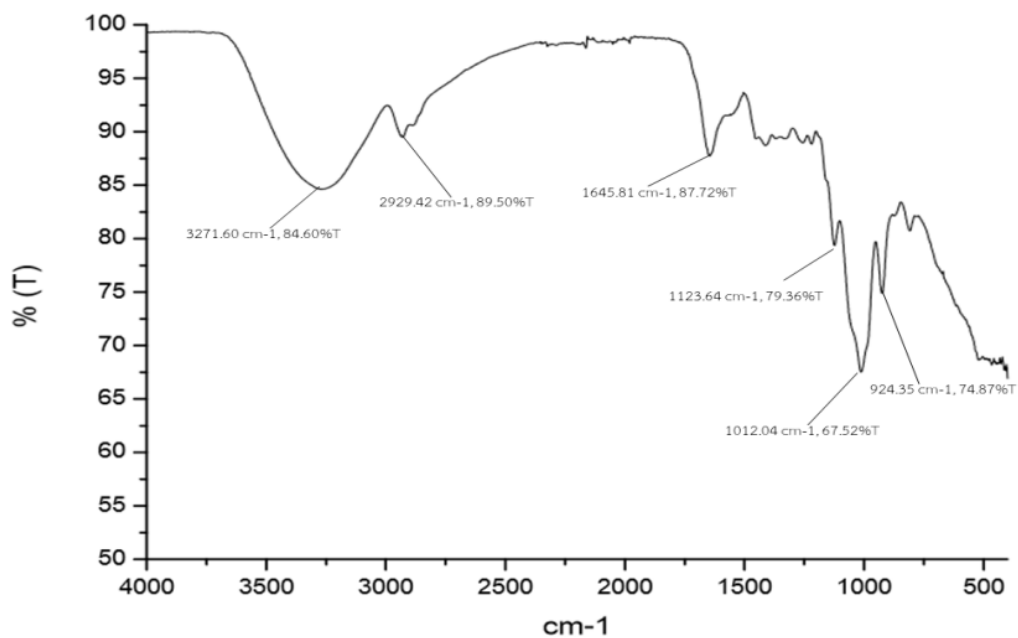
ภาพที่ 2-6 กราฟแสดงพฤติกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสในแต่ละช่วงเวลาของจุลินทรีย์

จากการศึกษาพบว่า การนำถั่วเหลืองหมักมาคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลิแวน เบื้องต้นเลี้ยงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับสกรีนจุลินทรีย์ ได้โคโลนีที่เป็นเมือกและแต่ละโคโลนีไม่อยู่ติดกันจำนวนทั้งหมด 43 โคโลนี และจากการศึกษาสัณฐานวิทยาจุลินทรีย์ และการย้อมสีแกรมสามารถแบ่งกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ได้ทั้งหมดออกได้เป็น 9 กลุ่ม คือ กลุ่ม B-1 ถึง B-9 เมื่อนำเอนไซม์ลิแวนซูเครสของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มมาการศึกษาพฤติกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส พบว่า ที่เวลา 12 ชั่วโมง จุลินทรีย์ B-5, B-1 และ B-6 สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดซึ่งผลิตได้ 10.30 IU/ml, 8.88 IU/ml และ 8.51 IU/ml ตามลำดับ

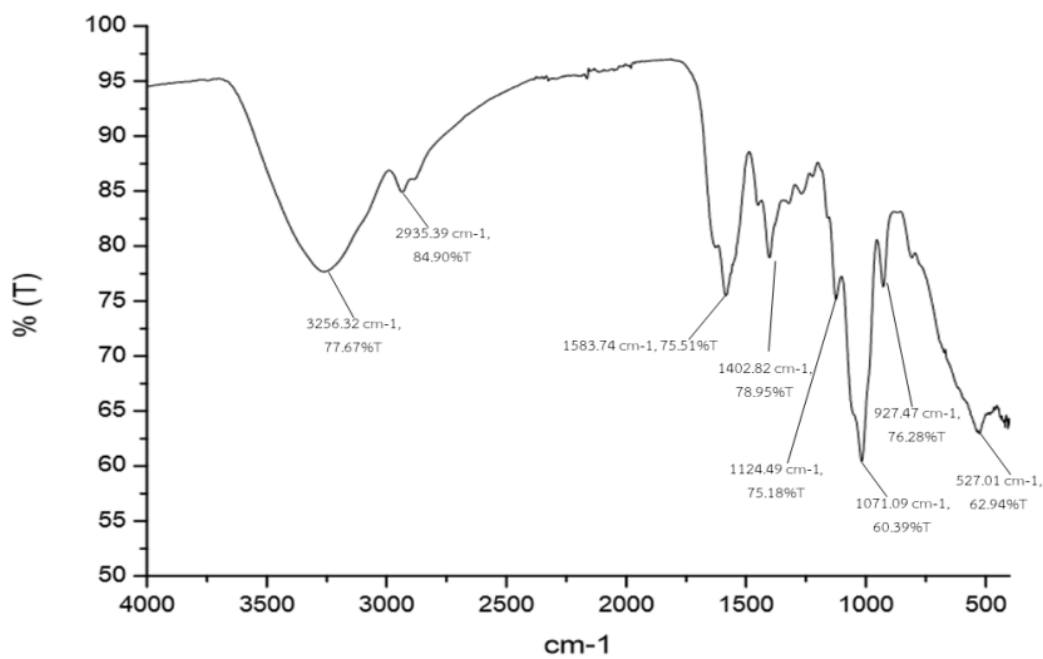
ณัฐวุฒิ ไตรโอสถ (2560) ได้การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารฟรีไบโอดีทในรูปของลิแวนจากถั่วเหลืองหมัก ด้วยวิธีการดังนี้

1. นำจุลินทรีย์ B-5 และ B-6 ที่ได้จากการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Enrich media เพื่อเพาะจุลินทรีย์ที่คัดเลือกให้เจริญเติบโตได้ดีขึ้น
2. เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสูตร Selective media เพื่อตรวจสอบว่าเกิดการผลิตสารลิแวน
3. การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification) โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล และการทำ Dialysis
4. ศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ด้วยวิธี FTIR และ NMR
5. ศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากถั่วหมัก ด้วยวิธีการจำแนกสายพันธุ์ (Species) โดยการใช้ 16S rRNA เพื่อหาลำดับเบสของจุลินทรีย์
6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิแวน โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากถั่วหมัก

7. ศึกษาความเข้มข้นของคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสารลิแวน



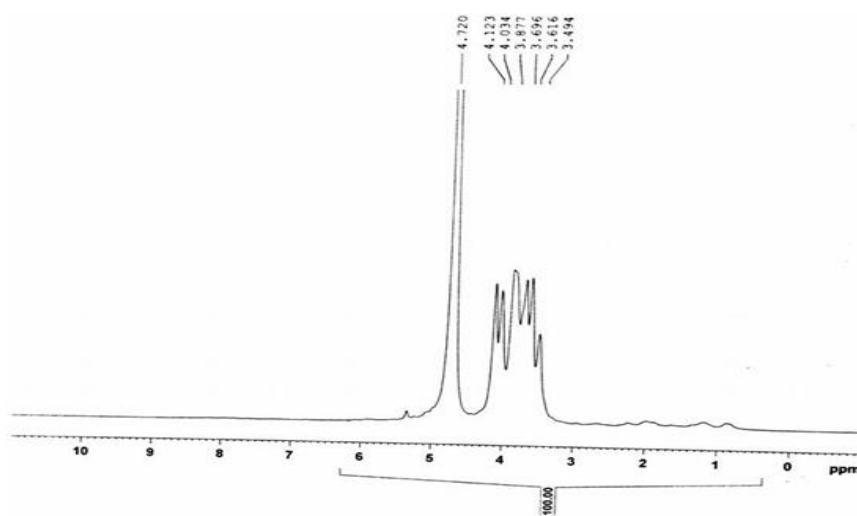
ภาพที่ 2-7 กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-5 ด้วยเทคนิค FTIR



ภาพที่ 2-8 กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-6 ด้วยเทคนิค FTIR

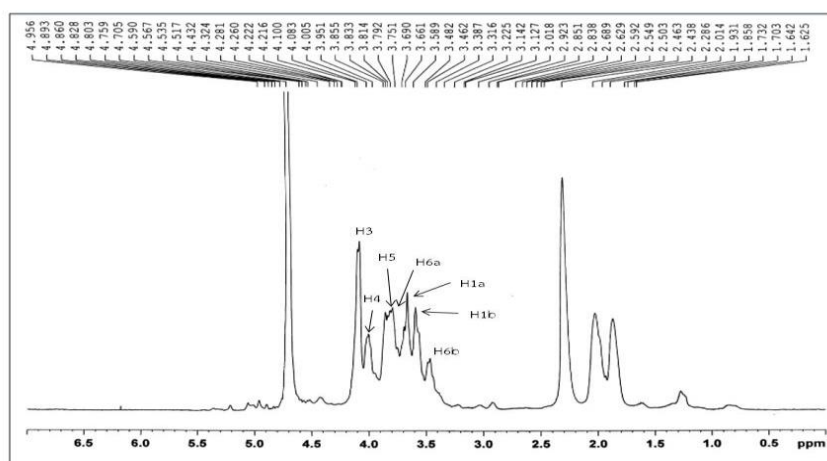
จากการทดสอบ FTIR ดังภาพที่ 2-7 และภาพที่ 2-8 พบว่า สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบสารแก่ช่วงเลขคลื่น 4000-1000 cm^{-1} เท่านั้น เนื่องจากช่วงเลขคลื่นที่น้อย 1000 cm^{-1} มีความเฉพาะเจาะจงของสาร ซึ่งยากต่อการวิเคราะห์ข้างต้น จึงมีการนำสารไปวิเคราะห์ร่วมกับเครื่องมือวิเคราะห์ Nuclear magnetic resonance

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR ของจุลินทรีย์กลุ่ม B-5 และจุลินทรีย์กลุ่ม B-6 โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^1H NMR และ ^{13}C NMR โดยการส่งตรวจคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยใช้เครื่องมือ Bruker, Avance Ultrashield ความถี่ 400 MHz บันทึกในรูปแบบความสูงของพีค และค่า Chemical shifts (ppm) โดยใช้สารละลาย D_2O (Deuterium oxide) จากการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR spectroscopy ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์กลุ่ม B-5 จากภาพที่ 2-8 กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-5 ด้วยเทคนิค ^1H NMR แสดงให้เห็นว่า สเปกตรัมของ ^1H NMR เป็นสัญญาณของการเปลี่ยนแปลงของโปรตอน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ลักษณะการเกิดพิกของสารผลิตภัณฑ์จะอยู่ในช่วง 4.9-5.3 ppm เป็นการบ่งชี้ให้เห็นลักษณะของการเกิดพันธะ α -(1 \rightarrow 6) glucosyl residues (H-1), α -(1 \rightarrow 2) glucosyl residues (H-1) และ α -(1 \rightarrow 3) glucosyl residues (H-1) มีลักษณะคล้ายโครงสร้างของเดกซ์แทรน แต่เนื่องจากที่พิก 4.720 ppm คือ สารละลาย D_2O (Deuterium oxide) ซึ่งซ้อนทับกับลักษณะพิกของการเกิดพันธะของสารผลิตภัณฑ์จึงทำให้ต้องทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย ^{13}C NMR spectroscopy, HSQC spectrum และ HMBC spectrum เพื่อยืนยันลักษณะโครงสร้างของเดกซ์แทรน (dextran)



ภาพที่ 2-9 กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-5 ด้วยเทคนิค ^1H NMR

จากการวิเคราะห์ด้วย ^1H และ ^{13}C NMR spectroscopy ดังภาพที่ 2-9 ให้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับโครงสร้างของสารลิแวนของจุลินทรีย์กลุ่ม B-6 สเปกตรัมของ ^1H NMR ซึ่งให้เห็นสัญญาณของโปรตอนว่ามีโมเลกุลของฟรุกโตส ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ของสารลิแวน ซึ่งสัญญาณเหล่านี้แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ 4.08 ppm (H-3), 3.95 ppm (H-4), 3.83 ppm (H-5), 3.81 ppm (H-6a), 3.69 ppm (H-1a), 3.66 ppm (H-1b) และ 3.48 ppm (H-6b) ซึ่งสอดคล้องกับผลิตภัณฑ์ของสารลิแวนที่ผลิตมาจาก *Bacillus megaterium* GJT321 *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002 และ *Bacillus licheniformis* BK AG21 จากตารางที่ 2-1 ตารางเปรียบเทียบการส่งสัญญาณของ ^{13}C chemical shift ระหว่างโครงสร้าง $\beta(2\rightarrow6)$ glycosidic linkage levan กับแบคทีเรียอื่น ๆ และจากการวิเคราะห์ด้วยสเปกตรัมของ ^{13}C NMR พบว่า มีการเกิดสัญญาณโซแนนซ์ขึ้นทั้ง 6 ตำแหน่ง ดังนี้ 104.42 ppm (C-2), 80.47 ppm (C-5), 76.26 ppm (C-3), 75.02 ppm (C-4), 63.56 ppm (C-6) และ 60.41 ppm (C-1) ซึ่งยืนยันได้ว่า hexoses เป็นรูปร่างของ monosaccharides ของ Exopolysaccharides และเกี่ยวข้องกับสารลิแวน เนื่องจาก โครงสร้างพันธะทางเคมีแสดงให้เห็นถึงตำแหน่งของคาร์บอนของสารลิแวน ที่ได้รับรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้จาก (Porras-domínguez, 2014) และความสัมพันธ์ทั้งหมดของ HMBC ได้แสดงให้เห็นถึงการเชื่อมโยง β -2,6-glycosidic ระหว่างฟรุกโตส ซึ่งได้จากความสัมพันธ์ของ tree-bond บ่งชี้ให้เห็นถึงความไม่เสถียรของโปรตอนทั้ง 2 (CH₂-O) ดังนี้ H-6a ที่ 3.43 และ H-6b ที่ 3.37 กับคาร์บอน (C-2) ที่ 101.66 ใน HMBC สเปกตรัม ดังภาพที่ 2-10 กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-6 ด้วยเทคนิค ^1H NMR กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-6 ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR



ภาพที่ 2-10 กราฟแสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลิแวน B-6 ด้วยเทคนิค ^1H NMR

ตารางที่ 2-1 เปรียบเทียบการส่งสัญญาณของ ^{13}C chemical shift ระหว่างโครงสร้าง $\beta(2\rightarrow 6)$ glycosidic linkage levan กับแบคทีเรียอื่น ๆ

Carbon atom	The chemical shift (ppm) of the levans formed from			
	<i>B. siamensis</i> ^a	<i>B. megaterium</i> GJT321	<i>B. licheniformis</i> BK AG21	<i>B. methy-</i> <i>lotrophicus</i>
C-1	60.41	59.86	59.81	61.20
C-2	104.2	104.14	104.22	104.66
C-3	76.26	76.25	76.24	77.51
C-4	75.02	75.31	75.18	76.10
C-5	80.47	80.23	80.31	80.77

จากการศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากถั่วหมัก โดยการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA พบว่า จุลินทรีย์ในกลุ่ม B-5 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus tequilensis* และ *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* ถึง 99.92% และพบว่า จุลินทรีย์ในกลุ่ม B-6 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus siamensis* ถึง 100%

จากการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA จึงได้คัดเลือกที่จุลินทรีย์ชนิด B-6 หรือจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* นำมาการศึกษาความเข้มข้นของคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสารลิแวนเพื่อให้ได้ปริมาณลิแวนสูงสุด โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 10%w/v จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตมากที่สุด รองมาคือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 20%w/v, 5%w/v, 30%w/v และ 40%w/v โดยค่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เท่ากับ 2.34957, 2.1424, 2.0657, 1.9813 และ 0.8962 ตามลำดับ

พงษ์ธร เฟื่องน้อย (2561) การบำบัดของเสียซูโครสจากอุตสาหกรรมอาหารทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส ด้วยวิธีการดังนี้

การวิจัยนี้ศึกษาการบำบัดของเสียที่มีองค์ประกอบของซูโครสโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของลิแวนด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่ถูกคัดเลือกจากถั่วเน่า โดยศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมในการกำจัดซูโครสและผลิตลิแวนในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ หลังจากนั้นจึงเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวประยุกต์ใช้ในการกำจัดของเสียซูโครสจากอุตสาหกรรมอาหาร

จากขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์พบว่า หลังจากการบ่มอาหารเหลวสูตรที่ 2 ที่ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 10 20 และ 30 %w/v ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เกิดกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่ากระบวนการไฮโดรไลซิสของซูโครสเข้มข้น 20 และ 30%w/v แต่สำหรับซูโครสเข้มข้น 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 ชั่วโมงพบว่า ปริมาณซูโครสลดลงตามระยะเวลาบ่มและเกิดเป็นกลูโคสและฟรุกโตส โดยฟรุกโตสมีปริมาณมากกว่าปริมาณซูโครส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ozimek et al. (2006) โดยอ้างอิงถึงการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจะเข้าจับกับซูโครส เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและฟรุกโตส จากนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจะจับกับโมเลกุลของกลูโคส 1 โมเลกุลและเชื่อมต่อกับโมเลกุลของฟรุกโตสอิสระเป็นสายยาวผ่านกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันเกิดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์หรือลิแวนเมื่อเปรียบเทียบกับ 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 3.21 %w/v โดยใช้เวลาบ่ม 48 ชั่วโมง

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

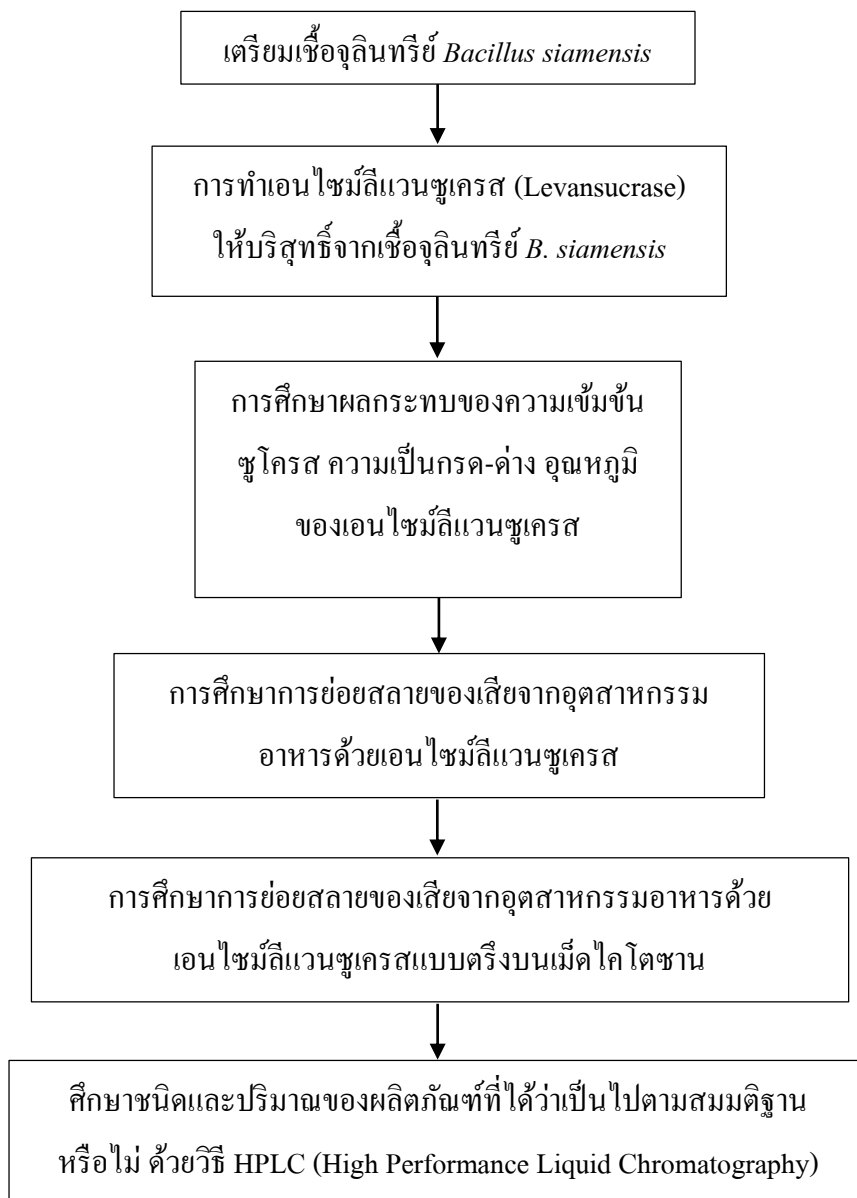
สารเคมีและอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
2. น้ำตาลกลูโคส (Glucose)
3. น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose)
4. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
5. กลูต้าแอลดีไฮด์ (Glutaldehyde)
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Tryptom)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient agar)
9. DEAE-TOYOPERL
10. แอลกอฮอล์ 95%
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
12. โพแทสเซียม คาร์เตรท ($K_2C_4H_4O_6$)
13. กรดอะซิติก
14. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
15. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)
16. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
17. ของเสียดอุตสาหกรรม
18. อาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1
19. อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1
20. อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2

อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

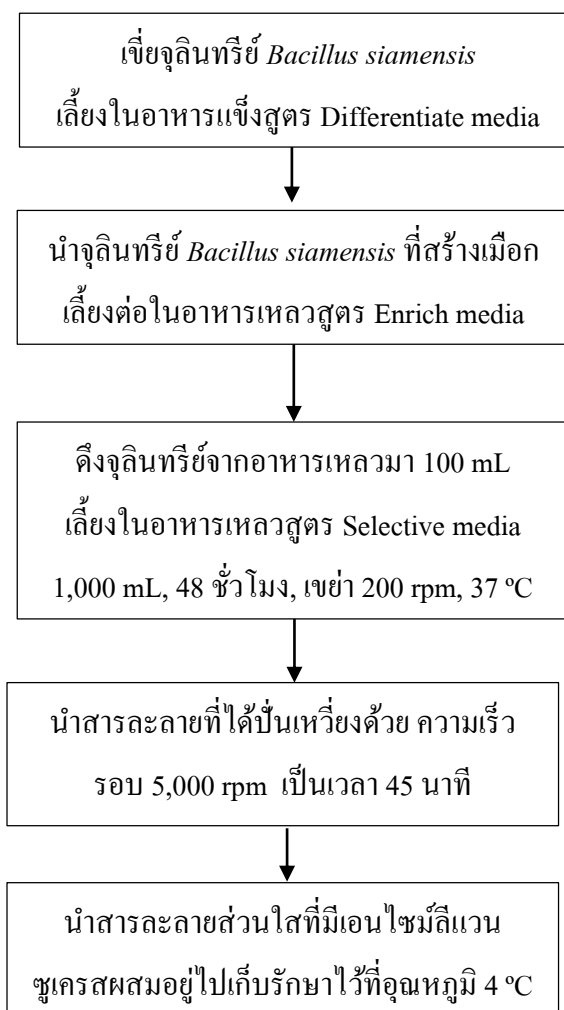
1. เครื่อง Spectrophotometer 1 เครื่อง
2. เครื่อง pH meter 1 เครื่อง
3. เครื่อง HPLC 1 เครื่อง
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง 1 เครื่อง
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) 1 เครื่อง
6. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร 4 ใบ
7. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร 4 ใบ
8. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร 2 ขวด
9. ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ขวด
10. แท่งแก้วคนสาร 1 อัน
11. ที่กรองสารละลาย 50 อัน
12. จานอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบพลาสติก 1 อัน
13. หลอดพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร 50 หลอด
14. แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader) 2 อัน
15. เข็มเย็บจุลินทรีย์ (Loop) 2 อัน
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์ 2 อัน
17. หลอดฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร 5 อัน

วิธีการทดลอง



ภาพที่ 3-1 แผนภาพโดยรวมของการทดลอง

1. การเตรียมเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) จากเชื้อจุลินทรีย์ *B. siamensis*



ภาพที่ 3-2 การเตรียมเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis*

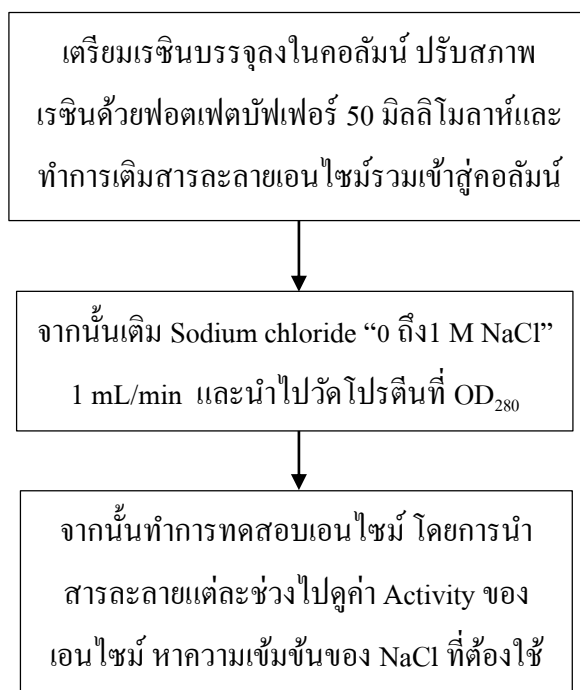
1.1 เชื้อจุลินทรีย์ *B. siamensis* ที่ได้จากการ Stock จุลินทรีย์เก็บไว้ทำการแยก จุลินทรีย์เบื้องต้นบนอาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตร Differentiate media ทำการคัดเลือก โคโลนีที่ สร้างเมือก

1.2 ทำการเลี้ยงลงในอาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตร Enrich media เพื่อเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ให้มีการเจริญเติบโต โดยดึงจุลินทรีย์ออกมาจำนวน 1 หลอด และใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ 1 คืน ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3 นำจุลินทรีย์ที่ได้จากอาหารเหลวสูตร Enrich media จำนวน 100 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ Fermentation media ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้เอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยเขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.4 นำสารละลายที่ได้มาใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที เพื่อกำจัดเซลล์จุลินทรีย์ออก หลังจากนั้นจะได้สารละลายส่วนใสที่มีเอนไซม์ลิแวนซูเครสผสมอยู่ เพื่อนำสารละลายไปใช้แยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. การแยกเอนไซม์ลิแวนซูเครสให้บริสุทธิ์จากเชื้อจุลินทรีย์ *B. siamensis*



ภาพที่ 3-3 การแยกเอนไซม์ลิแวนซูเครสให้บริสุทธิ์จากเชื้อจุลินทรีย์ *B. siamensis*

2.1 ตรวจสอบปริมาณโปรตีนของเอนไซม์รวม (Crude Enzyme) เพื่อหาปริมาณความจุที่เรซินรับได้ (30 ± 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

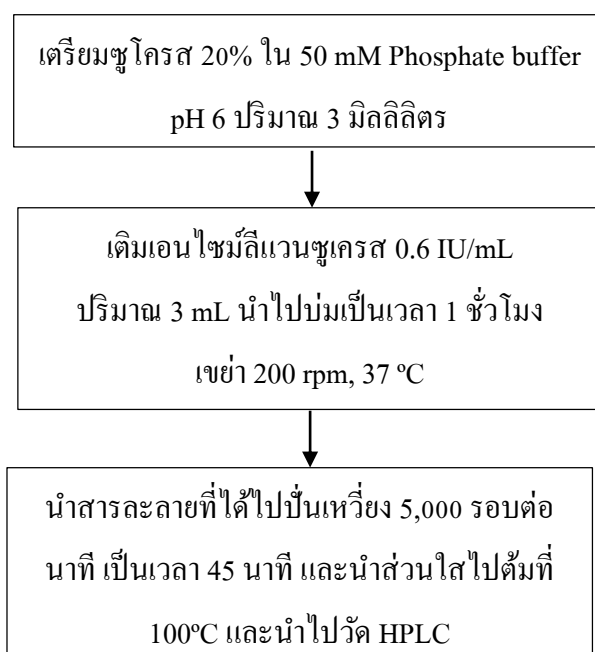
2.2 เตรียมเรซินบรรจุลงในคอลัมน์โดยนำเทียบกับค่าความจุที่เรซินรับได้ต่อเอนไซม์รวม 1 L ปรับสภาพเรซินด้วย Phosphate buffer pH 6 จากนั้นป้อนเอนไซม์รวมเข้าสู่คอลัมน์

2.3 จากนั้นชะโปรตีนด้วย Sodium chloride ตั้งแต่ 0 ถึง 1 M NaCl ด้วยอัตราการไหล 1 mL/min และเก็บสารละลายที่ออกมาหลอดละ 5 mL แล้วนำไปวัด OD280 เพื่อหาปริมาณโปรตีนของแต่ละช่วงความเข้มข้น

2.4 จากนั้นทำการทดสอบเอนไซม์ โดยการนำสารละลายแต่ละหลอดไปคู่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ หาความเข้มข้นของ NaCl ที่ต้องใช้เพื่อดึงเอนไซม์ออกจากผิวของเรซิน

2.5 นำจุลินทรีย์จากข้อ 2.3 จำนวน 20 mL (10% inoculum) เติมลงไปในการอาหารเหลว สูตรที่ 2 สำหรับเร่งการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส ที่มีความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 1 ปริมาตรสุดท้ายจำนวน 200 mL และเขย่าทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 50 °C และ pH 6

3. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase)



ภาพที่ 3-4 การทดสอบของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

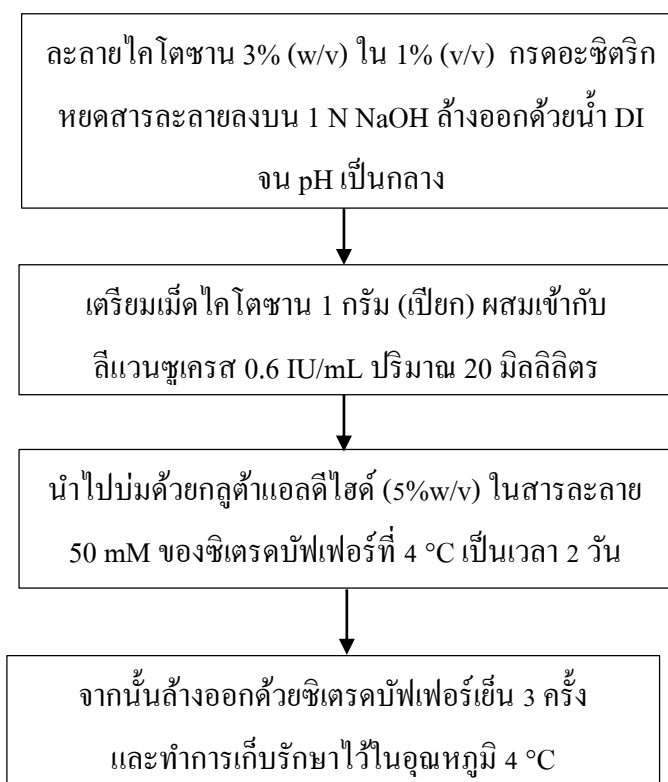
3.1 เตรียมซูโครส 20% ใน 50 mM Phosphate buffer pH 6 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

3.2 เติมเอนไซม์ลิแวนซูเครส 0.6 IU/mL ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนของไบพัดที่ 200 รอบต่อนาที แล้วเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3 นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกของแข็ง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที จะได้ส่วนใสที่เป็นของเหลวด้านบน

3.4 หลังจากนั้นนำส่วนใสไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์

4. การตรึงลิแกนด์ด้วยวิธีโควาเลนต์กับเม็ดโคโนซาน



ภาพที่ 3-5 การตรึงลิแกนด์ด้วยวิธีโควาเลนต์บนเม็ดโคโนซาน

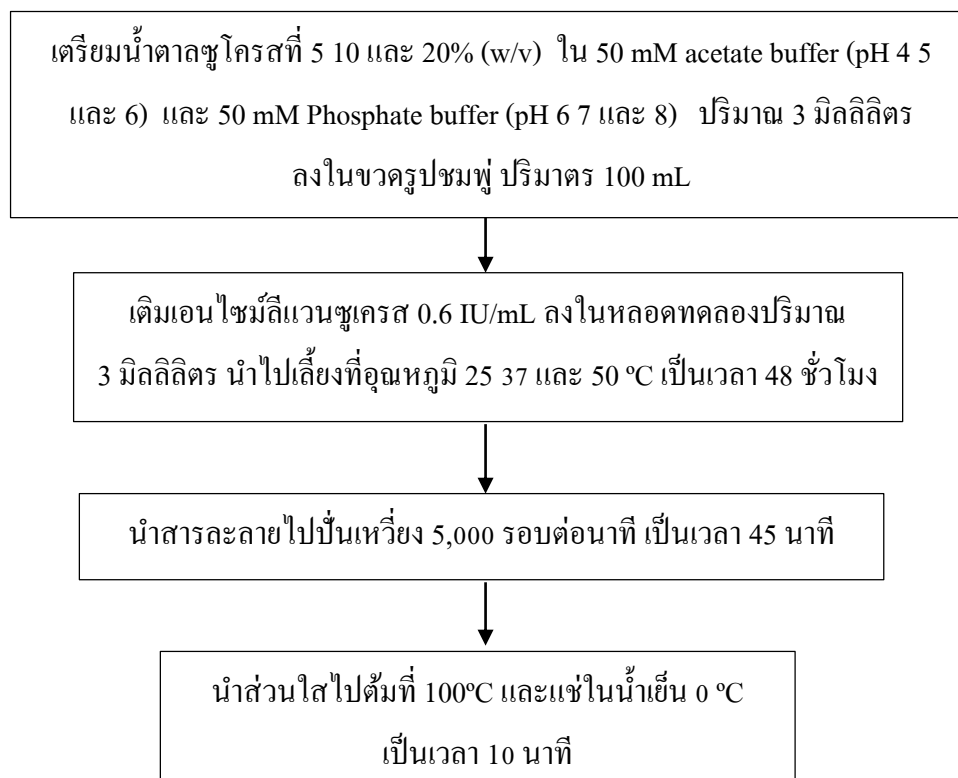
4.1 เตรียมเม็ดโคโนซาน โดยการละลายโคโนซาน 3% (w/v) ใน 1% (v/v) กรดอะซิติก หยดสารละลายลงบน 1 N NaOH ล้างออกด้วยน้ำ DI จน pH เป็นกลาง

4.2 การตรึงลิแกนด์ลงบนเม็ดโคโนซาน โดยเตรียมเม็ดโคโนซาน 1 กรัม (เปียก) ในลิแกนด์ 0.6 IU/mL ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

4.3 นำไปบ่มด้วยกลูต้าแอลดีไฮด์ (5%w/v) ในสารละลาย 50 mM ของซิเตรดบัฟเฟอร์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

4.4 หลังจากนั้นล้างออกด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์เย็น 3 ครั้ง และทำการเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase)



ภาพที่ 3-6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

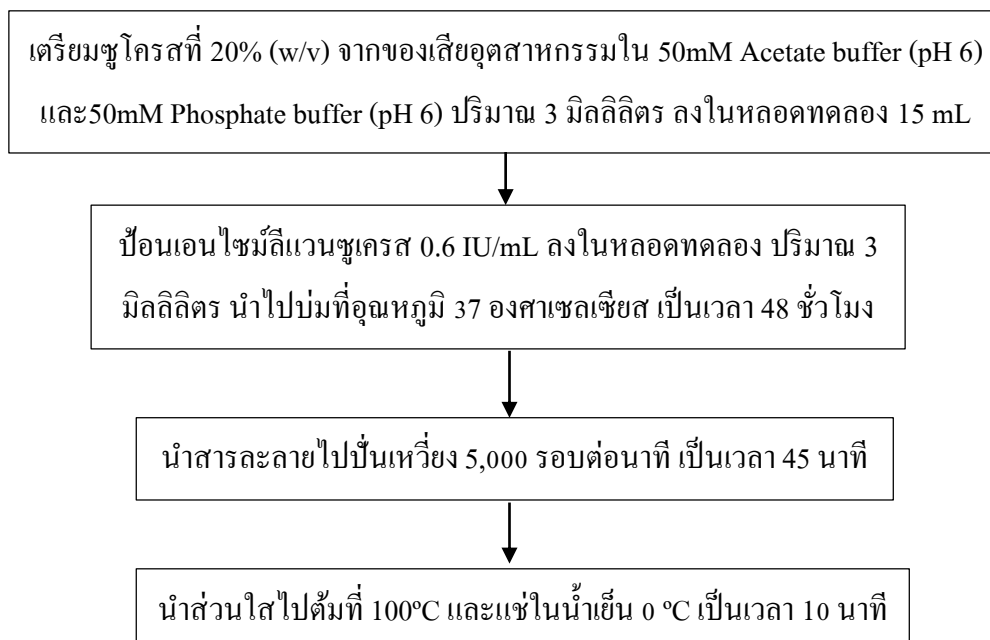
5.1 เตรียมน้ำตาลซูโครสที่ 5 10 และ 20% (w/v) ใน 50 mM acetate buffer (pH 4 5 และ 6) และ 50 mM Phosphate buffer (pH 6 7 และ 8) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

5.2 ป้อนเอนไซม์ลิแวนซูเครส 0.6 IU/mL ลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 200 รอบต่อนาที

5.3 นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกของแข็ง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที จะมีส่วนใสที่เป็นของเหลวด้านบน

5.4 หลังจากนั้นนำส่วนใสไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์

6. ศึกษาการผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์ในของเสียอุตสาหกรรม



ภาพที่ 3-7 การผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสในของเสียอุตสาหกรรม

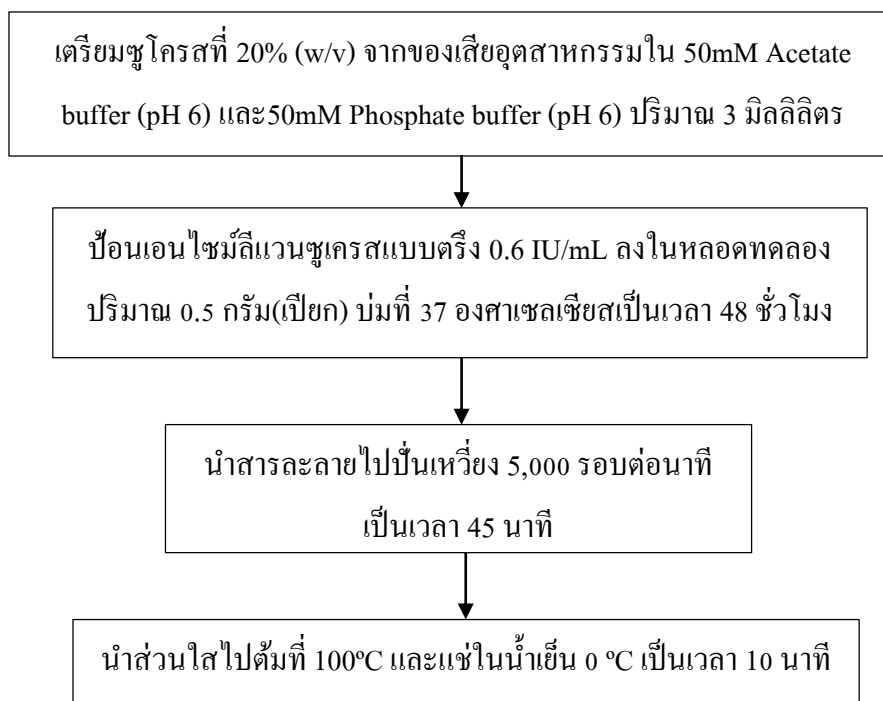
6.1 เตรียมซูโครสที่ 20% (w/v) จากของเสียอุตสาหกรรม (ของเสียอุตสาหกรรมมีองค์ประกอบของซูโครส 17%) ใน 50mM Acetate buffer (pH 6) และ 50mM Phosphate buffer (pH 6) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

6.2 ป้อนเอนไซม์ลิแวนซูเครส 0.6 IU/mL ลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 200 รอบต่อนาที

6.3 นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกของแข็ง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที จะได้ส่วนใสที่เป็นของเหลวด้านบน

6.4 หลังจากนั้นนำส่วนใสไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์

7. ศึกษาการผลิตเอนไซม์ด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์ในของเสียอุตสาหกรรม



ภาพที่ 3-8 การผลิตเอนไซม์ด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์แบบตรงในของเสียอุตสาหกรรม

7.1 เตรียมซูโครสที่ 20% (w/v) จากของเสียอุตสาหกรรม (ของเสียอุตสาหกรรมมีองค์ประกอบของซูโครส 17%) ใน 50mM Acetate buffer (pH 6) และ 50mM Phosphate buffer (pH 6) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

7.2 ป้อนเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรง 0.6 IU/mL ลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 0.5 กรัม(เปียก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 200 รอบต่อนาที

7.3 นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกของแข็ง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที จะได้ส่วนใสที่เป็นของเหลวด้านบน

7.4 หลังจากนั้นนำส่วนใสไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์

8. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

8.1 วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่เกิดขึ้น

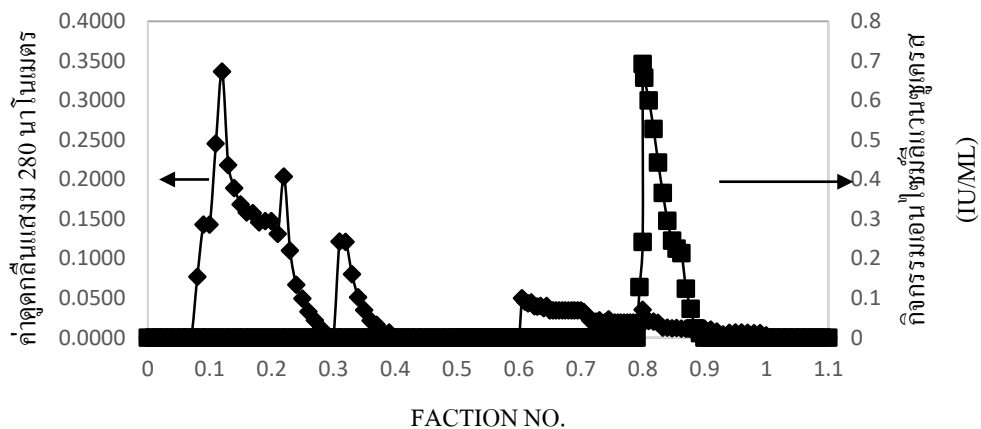
8.2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford เพื่อหาปริมาณโปรตีนในสารละลาย

8.3 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) เพื่อ
ตรวจสอบปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase)

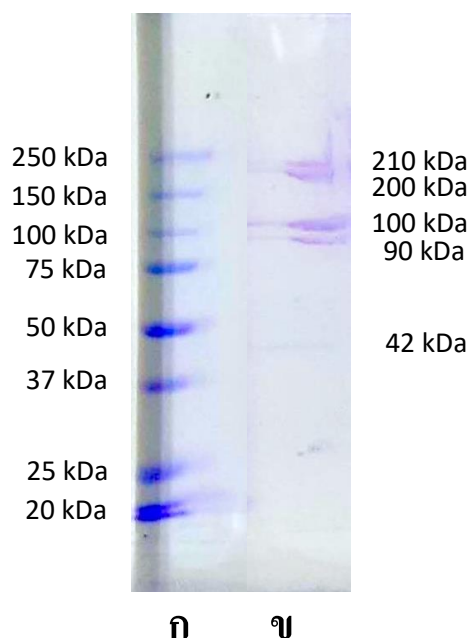


ภาพที่ 4-1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลิแวนซูเครส ค่าดูดกลืนแสง (◆) และกิจกรรมเอนไซม์ (■) โดยกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนด้วยเรซิน (TOYOPERL DEAE-650M)

การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ Levansucrase จากเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยวิธีแลกเปลี่ยนไอออนผ่านคอลัมน์เรซินชนิด TOYOPERL DEAE-650M โดยทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนสำหรับการทำเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่า มีโปรตีนออกมาทั้งหมด 2 ช่วง ได้แก่ 0.1 ถึง 0.4 M NaCl และ 0.6 ถึง 0.9 M NaCl และพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่ 0.8 M NaCl ซึ่งเกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.69 IU /mL (ภาพที่ 4-1) งานวิจัยก่อนหน้าทำการบริสุทธิ์เอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* ด้วยวิธี DEAE-cellulose chromatography (Sangmanee, 2013) และจากจุลินทรีย์ *Klebsiella sp.* strain L1 ด้วยวิธี DEAE-cellulose column chromatography (Desai & Patel, 2019) จากตารางที่ 4-1 พบว่าสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของลิแวนซูเครสได้ 11.47 ด้วย 78.75% recovery ซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์รวม 1.39 IU/ mg เป็น 15.95 IU/ mg การทำให้เอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์ *Klebsiella sp.* พบว่า สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ 5.45 ด้วย 22.72% recovery และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 48.19 IU/ mg (Desai & Patel, 2019)

ตารางที่ 4-1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis*

ขั้นตอนการทำ เอนไซม์บริสุทธิ์	กิจกรรม เอนไซม์ (IU)	โปรตีน ทั้งหมด (mg)	กิจกรรมจำเพาะ ของเอนไซม์ (IU/mg)	Recovery (%)	การเพิ่ม ความบริสุทธิ์
เอนไซม์รวม (Crude enzyme)	320	230	1.39	100	1
TOYOPERL DEAE-650M	252	15.8	15.95	78.75	11.47



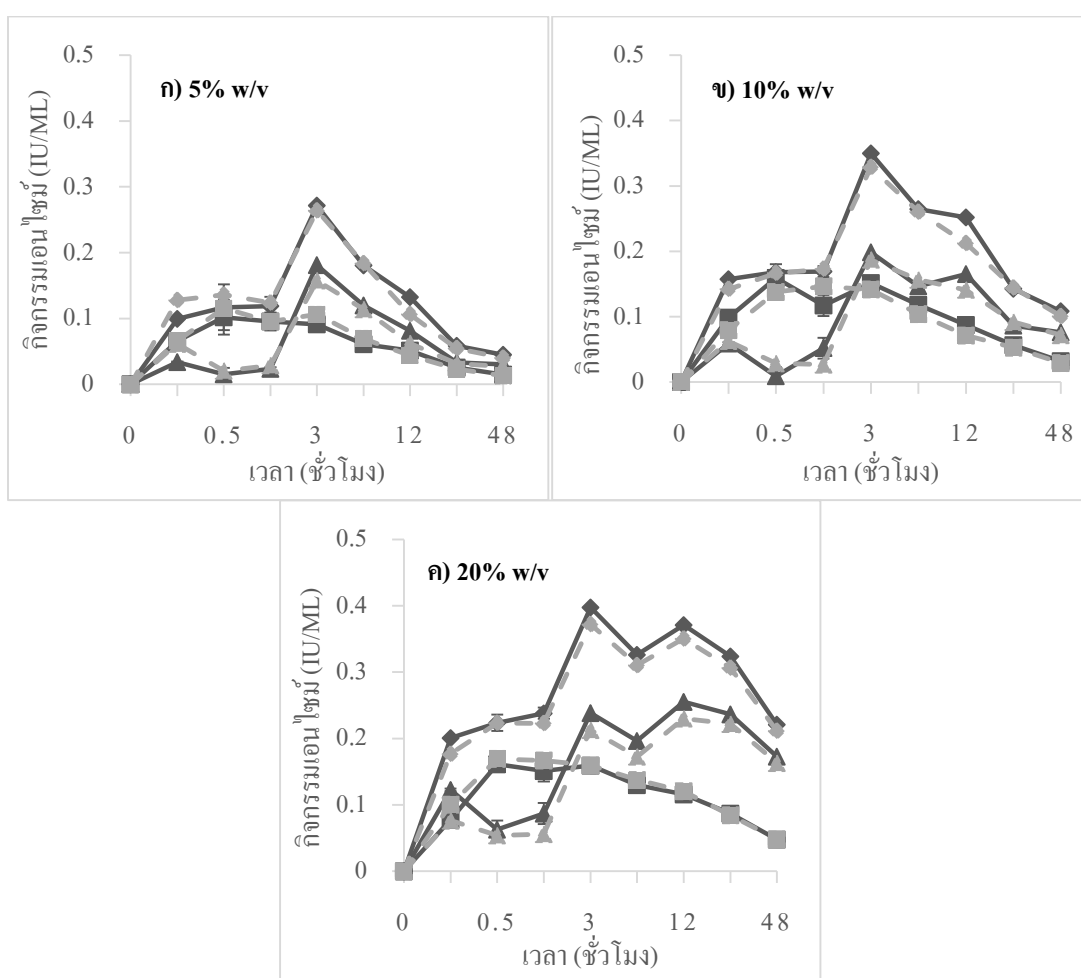
ภาพที่ 4-2 ขนาดของเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่ได้จากกระบวนการทำบริสุทธิ์ วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE (ก คือ Partial/Marker และ ข คือ Partial/Purified LS)

การทดสอบขนาดของโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนอยู่ทั้งหมด 5 ขนาด โดยมีขนาดตั้งแต่ 210-42 kDa และพบว่า ในเอนไซม์ลิแวนซูเครสยังมีโปรตีนบางตัวปนเปื้อนปรากฏอยู่บน SDS-PAGE ดังภาพที่ 4-2 โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ การทำลิแวนซูเครสบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas syringae* พบที่ 45 kDa (Hettwer et al., 1995) จากจุลินทรีย์ *Bacillus sp.* TH4-2 พบที่ 56 kDa (Ammar et al., 2002) และจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* B-512 พบที่

103 kDa บน SDS-PAGE (Kang et al., 2005) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Levansucrase มีขนาดโมเลกุลได้หลายขนาดขึ้นกับแหล่งที่มา (Annamalai, et al., 2009)

2. ผลของความเข้มข้นซูโครสต่อการผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส

จากการทดลองความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 5 10 และ 20% (w/v) pH 6 ของฟอตเฟตบัฟเฟอร์และอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 0.25 0.5 1 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ดังภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 กิจกรรมเอนไซม์ที่ซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะ pH 6 บ่ม 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง กิจกรรมทั้งหมด (◆) ไฮโคโรไลซิส (■) ทรานฟรุคโตซิเลชั่น (▲)

จากภาพที่ 4-3 (เส้นทึบ, -----) แสดงกิจกรรมเอนไซม์ในสภาวะฟอสเฟตบัพเฟอร์ ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 15 นาที พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ ทั้งหมดของซูโครสเข้มข้น 5 และ 10% (w/v) โดยมีค่า 0.1 และ 0.16 IU/mL ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) อย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่า 0.2 IU/mL เนื่องจากอยู่ในช่วงที่ 20% เป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 3 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าสูงสุดที่ 0.27 0.35 และ 0.40 IU/ mL ตามลำดับ และเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงกว่าไฮโดรไลซิส เนื่องจากฟรุกโตสมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงค่าหนึ่ง เอนไซม์ลิแวนซูเครสจะเริ่มจับฟรุกโตสมาต่อเป็นโมเลกุลสายยาวหรือเรียกว่า เกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน และเมื่อทำการบ่มต่อไป พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลง จนถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า มีค่าเหลือเท่ากับ 0.04 0.11 และ 0.22 IU/ mL ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดังรูปที่ 21 ทำให้เห็นว่าที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลิแวนมากที่สุด เพราะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.40 IU/ mL และปริมาณซูโครสสุดท้ายเหลืออยู่เท่ากับ 3.41%(w/v)

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีซูโครสเข้มข้น 5% (w/v) มีค่าสูงสุด 0.09 และ 0.18 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีซูโครสเข้มข้น 10% (w/v) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.15 และ 0.20 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.16 และ 0.24 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

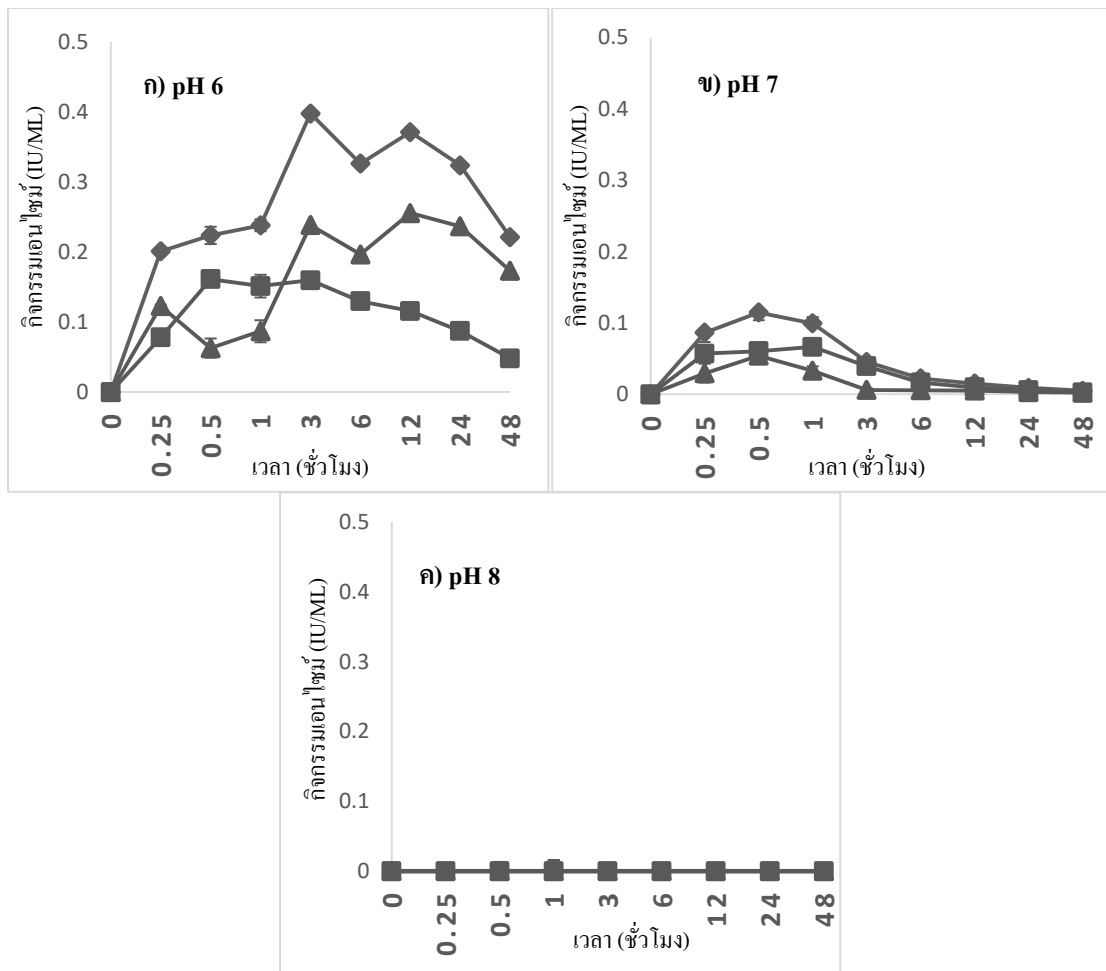
จากภาพที่ 4-3 (เส้นประ, - - - -) แสดงกิจกรรมเอนไซม์ในสภาวะอะซิเตตบัพเฟอร์ ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 15 นาที พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ ทั้งหมดของซูโครสเข้มข้น 5 และ 10% (w/v) โดยมีค่า 0.13 และ 0.14 IU/mL ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) อย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่า 0.18 IU/mL เนื่องจากอยู่ในช่วงที่ 20% เป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 3 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าสูงสุดที่ 0.26 0.33 และ 0.37 IU/mL ตามลำดับ และเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงกว่าไฮโดรไลซิส เมื่อทำการบ่มต่อไป พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลง จนถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า มีค่าเหลือเท่ากับ 0.04 0.10 และ 0.21 IU/mL ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดังภาพที่ 4-3 ทำให้เห็นว่าที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลิแวนมากที่สุด เพราะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.40 IU/mL และปริมาณซูโครสสุดท้ายเหลืออยู่เท่ากับ 2.55%(w/v)

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีซูโครสเข้มข้น 5% (w/v) มีค่าสูงสุด 0.1 และ 0.16 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีซูโครสเข้มข้น 10% (w/v) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.14 และ 0.19 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.16 และ 0.21 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ช่วงของความเข้มข้นซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตลิแวน คือ 20-40% (w/v) ที่สภาวะ 50 mM citrate buffer pH 6.40 องศาเซลเซียส ด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* ซึ่งช่วงของความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (สุรวุฒิ แสงมณี, 2556)

3. ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส จากการทดลองความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 6.7 และ 8 อะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ 4.5 และ 6 ที่มี ความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) pH ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 0.25 0.5 1 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ดังภาพที่ 4-4 และภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-4 กิจกรรมเอนไซม์ที่ซูโครสเข้มข้น 20% ในสภาวะ Phosphate buffer pH ต่าง ๆ

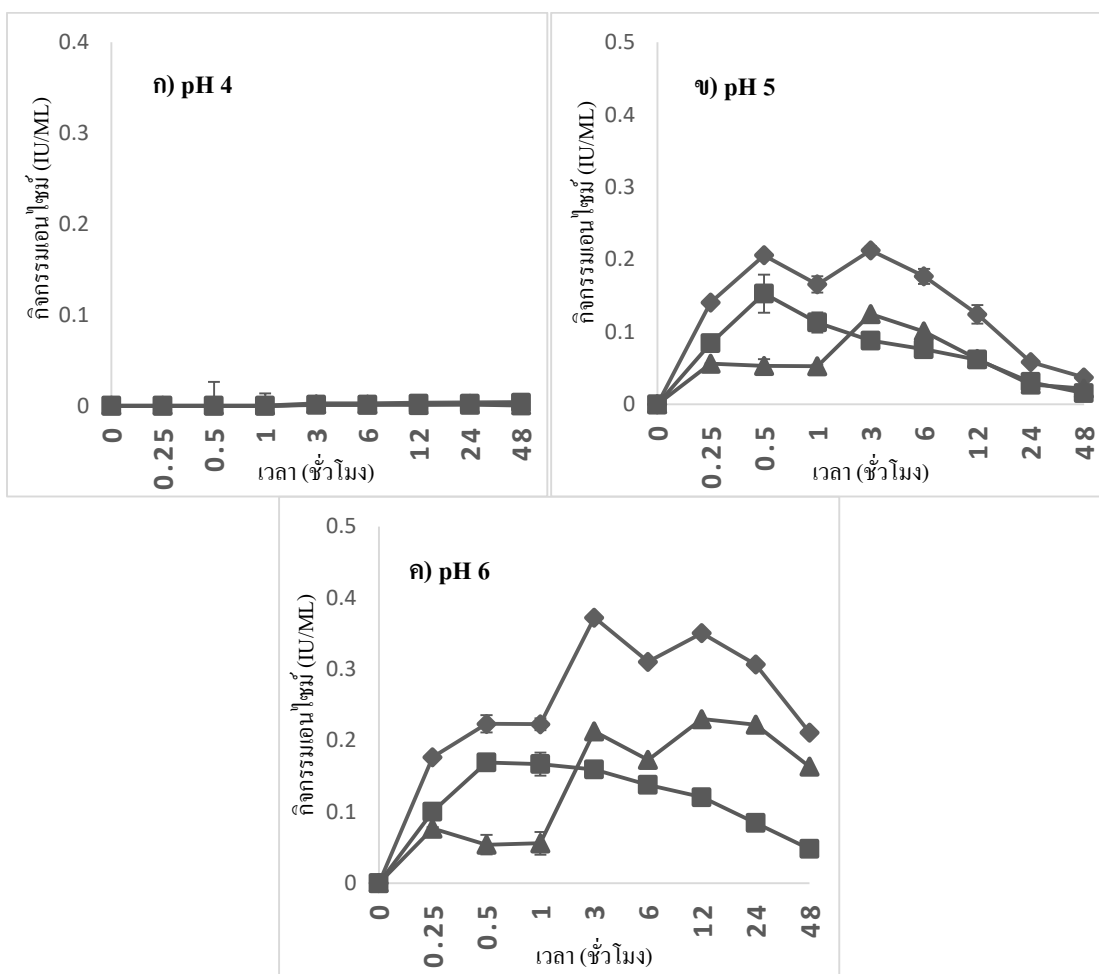
บ่ม 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง กิจกรรมทั้งหมด (◆)

ไฮโดรไลซิส (■) ทรานฟรุกโตซิลเลชั่น (▲)

จากภาพที่ 4-4 ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 15 นาที พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของค่า pH 6 7 และ 8 โดยมีค่า 0.2 0.09 และ 0 IU/ mL ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่สภาวะของ pH มากกว่า 6 จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ pH 8 พบว่า ไม่เกิดกิจกรรมเอนไซม์เลยหลังจากผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุด คือ pH เท่ากับ 6 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อบ่มถึง 3 ชั่วโมงที่ pH 6 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าสูงสุดที่ 0.40 IU/ mL แต่เห็นได้ว่าที่ pH 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.11 IU/ mL ที่เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเรื่อย ๆ และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดที่ pH 6 7 และ 8 มีค่าลดลงเท่ากับ 0.22 0.005 และ 0 IU/ mL ตามลำดับ จากค่า

กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดังภาพที่ 4-3 ทำให้เห็นว่าที่ pH 6 นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลิแวนมากที่สุด และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของ pH 6 มีค่าสูงสุด 0.16 และ 0.24 IU/ mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ pH 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.06 และ 0.05 IU/ mL ที่ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ และ pH 8 ไม่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันเกิดขึ้น



ภาพที่ 4-5 กิจกรรมเอนไซม์ที่ซูโครสความเข้มข้น 20% ในสภาวะ Acetate buffer pH ต่าง ๆ

บ่ม 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง กิจกรรมทั้งหมด (◆)

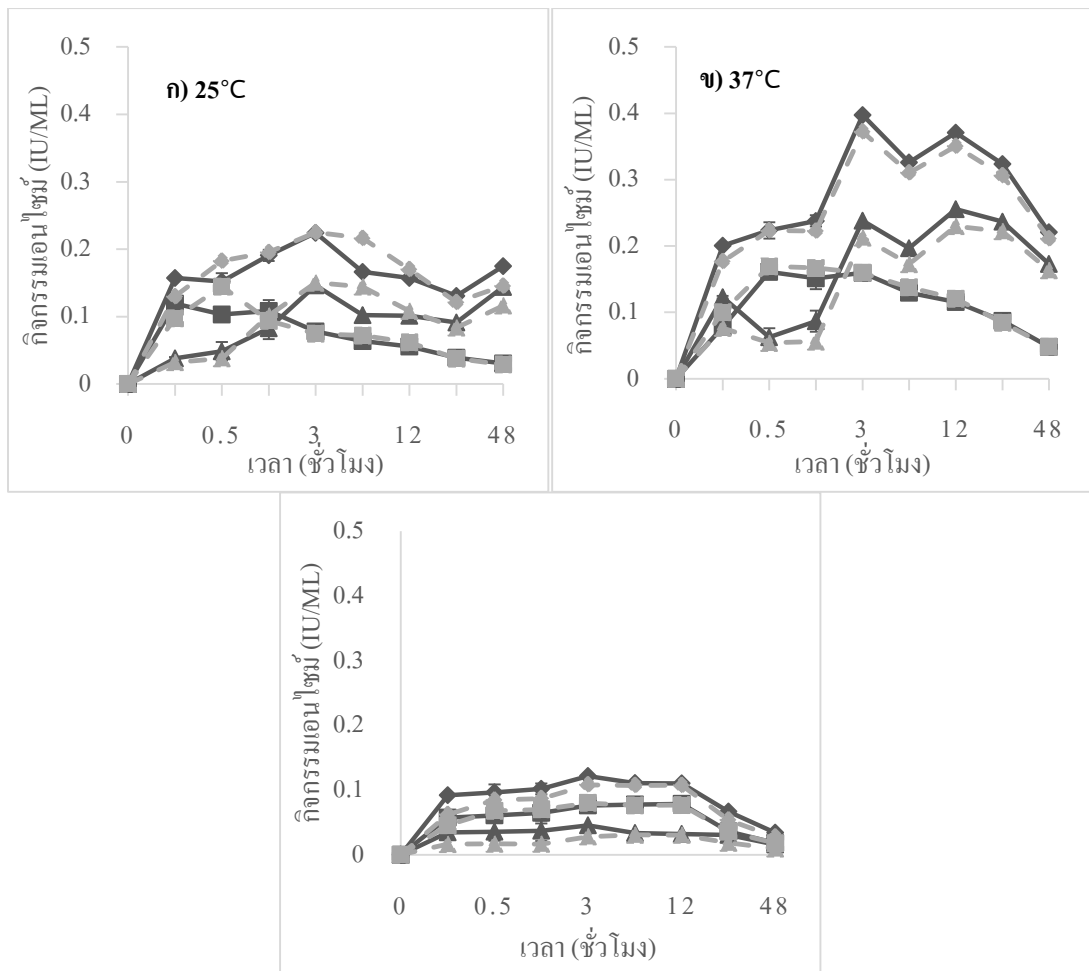
ไฮโดรไลซิส (■) ทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน (▲)

จากภาพที่ 4-5 ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 30 นาที พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของค่า pH 4 5 และ 6 โดยมีค่า 0.205 และ 0.22 IU/ mL ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่สภาวะของ pH น้อยกว่า 6 จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลง โดยเฉพาะที่ pH 4 พบว่าแทบไม่เกิดกิจกรรมเอนไซม์เลยหลังผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุด คือ pH เท่ากับ 6 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อบ่มถึง 3 ชั่วโมงที่ pH 6 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าสูงสุดที่ 0.37 IU/ mL แต่เห็นได้ว่าที่ pH 5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.21 IU/ mL ที่เวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเรื่อย ๆ และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดที่ pH 4 5 และ 6 มีค่าลดลงเท่ากับ 0.0039 0.0371 และ 0.2112 IU/ mL ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ ดังภาพที่ 4-5 ทำให้เห็นว่าที่ pH 6 นั้นเหมาะแก่การผลิตสารสีแวนมากที่สุด และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของ pH 6 มีค่าสูงสุด 0.16 และ 0.21 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ pH 5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.09 และ 0.12 IU/ mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และ pH 4 ไม่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันเกิดขึ้น

งานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ มีทดสอบพบว่ามีค่ากิจกรรมสูงสุดอยู่ในช่วงในช่วง pH 5.0 และ 6.5 โดยใช้จุลินทรีย์ *Aspergillus niger* (L'Hocine et al., 2000; Sangeetha et al., 2002; Belghith et al., 2012)

4. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสีแวนด้วยเอนไซม์สีแวนซูเครส จากการทดลองอุณหภูมิที่มีความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์และอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 0.25 0.5 1 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ดังภาพที่ 4-6



ภาพที่ 4-6 กิจกรรมเอนไซม์ที่ซูโครสเข้มข้น 20% ในสภาวะบัฟเฟอร์ต่าง ๆ pH 6 บ่มอุณหภูมิต่าง ๆ เหย้า 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง กิจกรรมทั้งหมด (◆) ไฮโดรไลซิส (■) ทรานฟรุคโตซิเลชั่น (▲)

จากภาพที่ 4-6 (เส้นทึบ, -----) แสดงกิจกรรมเอนไซม์ในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 15 นาทีแรก พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส โดยมีค่า 0.157 0.20 และ 0.102 IU/ mL ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าต่ำอย่างเห็นได้ชัด และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงสามารถทำงานได้อยู่แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 3 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าสูงสุดที่ 0.225 0.40 และ 0.122 IU/ mL ตามลำดับ เห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส ยังคงมี กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอาหารที่อุณหภูมิ 30 37 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่าลดต่ำลง เท่ากับ 0.175 0.22 และ 0.034 IU/ mL ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดังรูปที่ 25 ทำให้เห็นว่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลิแวนมากที่สุด เนื่องจากใช้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

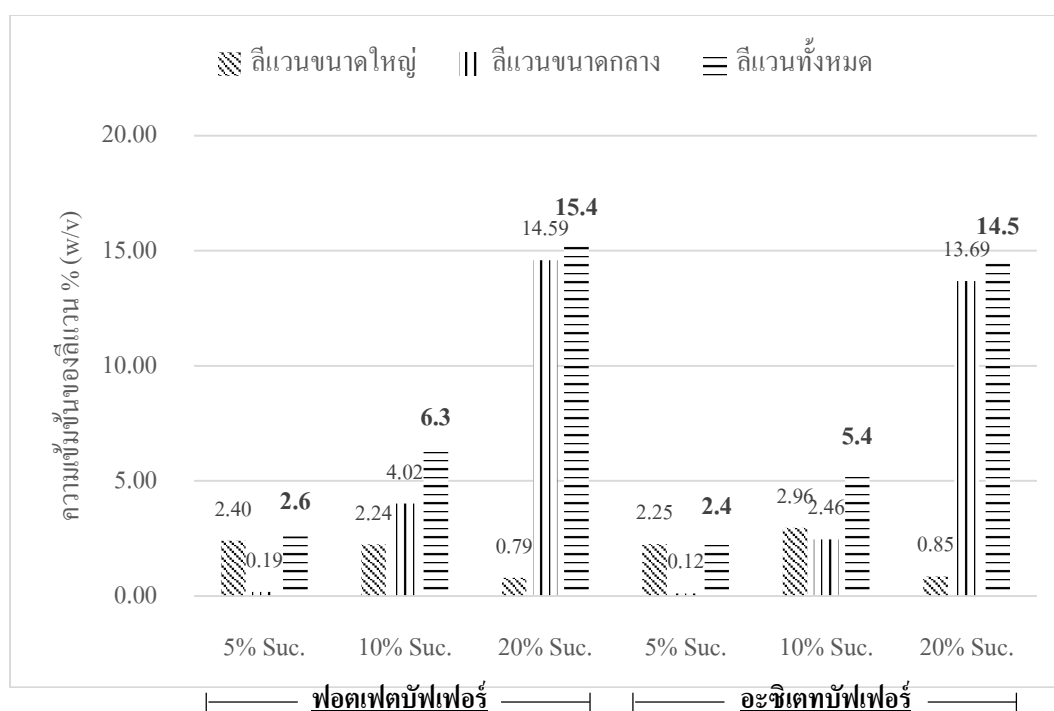
กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุด 0.078 และ 0.15 IU/ mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.16 และ 0.24 IU/ mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.076 และ 0.046 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากภาพที่ 4-6 (เส้นทึบ, -----) แสดงกิจกรรมเอนไซม์ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 15 นาทีแรก พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส โดยมีค่า 0.13 0.18 และ 0.062 IU/mL ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าต่ำอย่างเห็นได้ชัด และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงสามารถทำงานได้อยู่แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 3 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าสูงสุดที่ 0.225 0.40 และ 0.122 IU/ mL ตามลำดับ เห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยังคงมี กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอาหารที่อุณหภูมิ 30 37 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่าลดต่ำลง เท่ากับ 0.175 0.22 และ 0.034 IU/ mL ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดังรูปที่ 26 ทำให้เห็นว่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลิแวนมากที่สุด

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุด 0.075 และ 0.15 IU/ mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.16 และ 0.21 IU/ mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.079 และ 0.028 IU/mL ที่ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ งานวิจัยก่อนหน้านี้ การใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์ จากจุลินทรีย์ *Klebsiella sp.* ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 16.21 IU ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Desai & Patel, 2019)

จากจุลินทรีย์ *Rhodotorula sp.* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (Barbosa, 2007) และจากจุลินทรีย์ *Bacillus macerans* EG-6 รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส (Park et al., 2001)

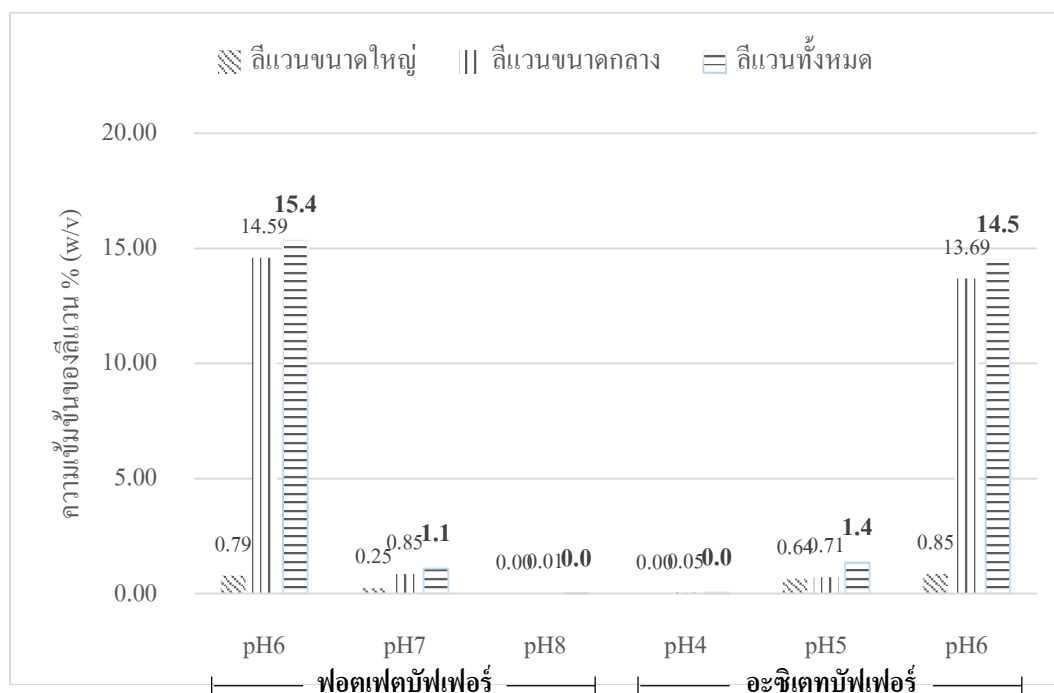
5. การผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) จากการทดลองอุณหภูมิที่มีความเข้มข้นของซูโครส 5 10 และ 20% (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 7 8 และอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4 5 6 ที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 0.25 0.5 1 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ดังภาพที่ 4-7 ภาพที่ 4-8 ภาพที่ 4-9 4-10 และภาพที่ 4-11



ภาพที่ 4-7 การผลิตลิแวนที่ความเข้มข้นของซูโครส 5 10 และ 20% (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง

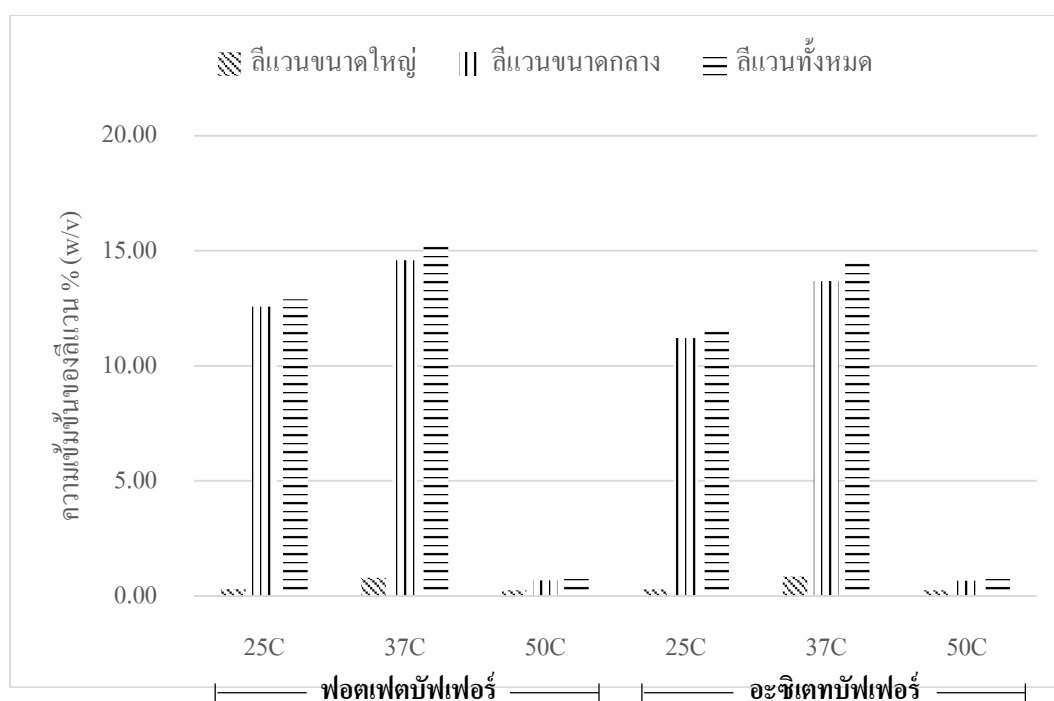
จากภาพที่ 4-7 ความเข้มข้นของซูโครส 20%(w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 และอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณลิแวนเกิดขึ้นสูงสุด พบว่า มีลิแวนเกิดขึ้นทั้งหมด 15.4% (w/v) และ 14.5% (w/v) ตามลำดับ โดยแบ่งออกเป็นลิแวนขนาดกลาง

(ประมาณ 50 kDa) 14.59% (w/v) และ 13.69% (w/v) ตามลำดับ ลิแวนขนาดใหญ่ (ประมาณ 10^6 kDa) 0.79% (w/v) และ 0.86% (w/v) ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการสร้างลิแวนขนาดกลางได้มากกว่าขนาดใหญ่ถึง 95% และ 94% ตามลำดับ แต่ในทางกลับกันเมื่อทำการลดความเข้มข้นของซูโครสลงเหลือ 5%(w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 และอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณลิแวนเกิดขึ้นต่ำสุด พบว่ามีลิแวนเกิดขึ้นทั้งหมด 2.6% (w/v) และ 2.4% (w/v) ตามลำดับ โดยแบ่งออกเป็นลิแวนขนาดกลาง (ประมาณ 50 kDa) 0.19% (w/v) และ 0.12% (w/v) ตามลำดับ ลิแวนขนาดใหญ่ (ประมาณ 10^6 kDa) 2.40% (w/v) และ 2.25% (w/v) ตามลำดับ ซึ่งพบว่า มีความสามารถในการสร้างลิแวนขนาดใหญ่ได้มากกว่าขนาดกลางถึง 92% และ 94% ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของซูโครสมีผลต่อขนาดลิแวนที่เกิดขึ้น เมื่อความเข้มข้นซูโครสลดลง โดยที่งานวิจัยก่อนหน้าศึกษาซูโครสเข้มข้น 20% w/v เกิดลิแวน 7.73 kDa และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นซูโครสถึง 60% w/v เกิดลิแวน 4.98% w/v โดยทำการบ่มด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus Subtilis* (Porras-Domínguez et al., 2015)



ภาพที่ 4-8 การผลิตลิแวนที่ความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 7 8 และอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4 5 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง

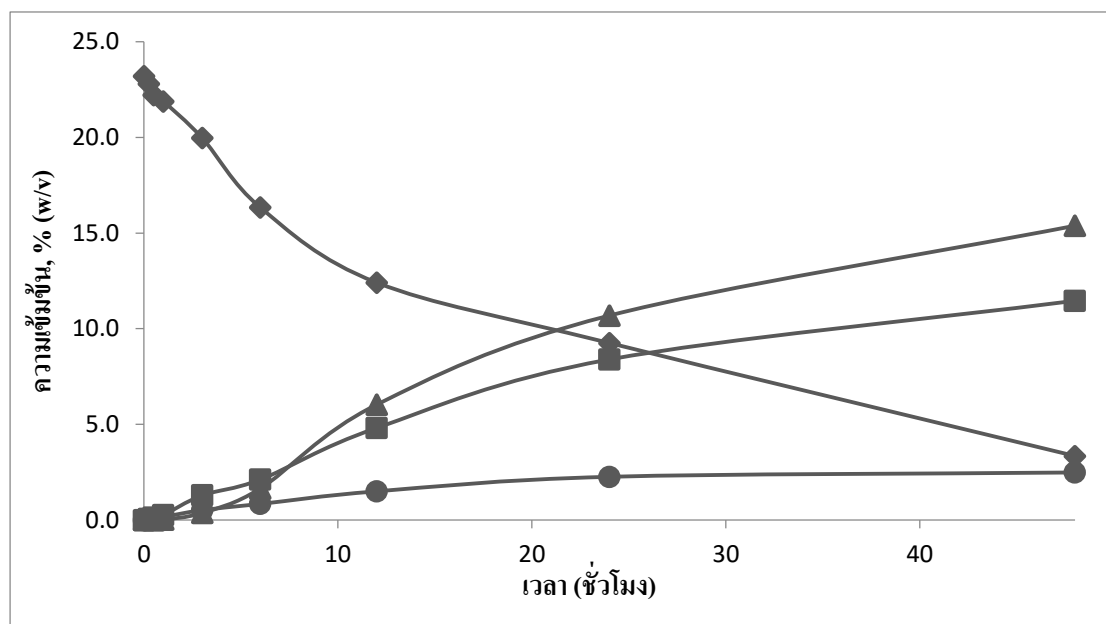
จากภาพที่ 4-8 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) ในฟอตเฟสบัฟเฟอร์ที่ pH 6 7 และ 8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ pH 6 สามารถผลิตลิแวนได้ดีที่สุด ด้วยจุลินทรีย์ *Klebsiella* Strain ในทางกลับกันเมื่อเพิ่มความเป็นเบสสูงขึ้นที่ pH 7 และ 8 ทำให้ความสามารถในการผลิตลิแวนต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากอยู่ในสภาวะความเป็นเบส (Desai & Patel, 2019) นอกจากนี้ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4 5 และ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ pH 6 สามารถสร้างลิแวนได้ดีที่สุด ด้วยจุลินทรีย์ *Klebsiella* Strain ซึ่งเมื่อเพิ่มความเป็นกรดสูงขึ้นที่ pH 4 และ 5 ทำให้ความสามารถในการผลิตลิแวนต่ำลง เนื่องจากอยู่ในสภาวะความเป็นกรด (Desai & Patel, 2019)



ภาพที่ 4-9 การผลิตลิแวนที่ความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) ในฟอตเฟสบัฟเฟอร์และอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่ออนาทินาน 48 ชั่วโมง

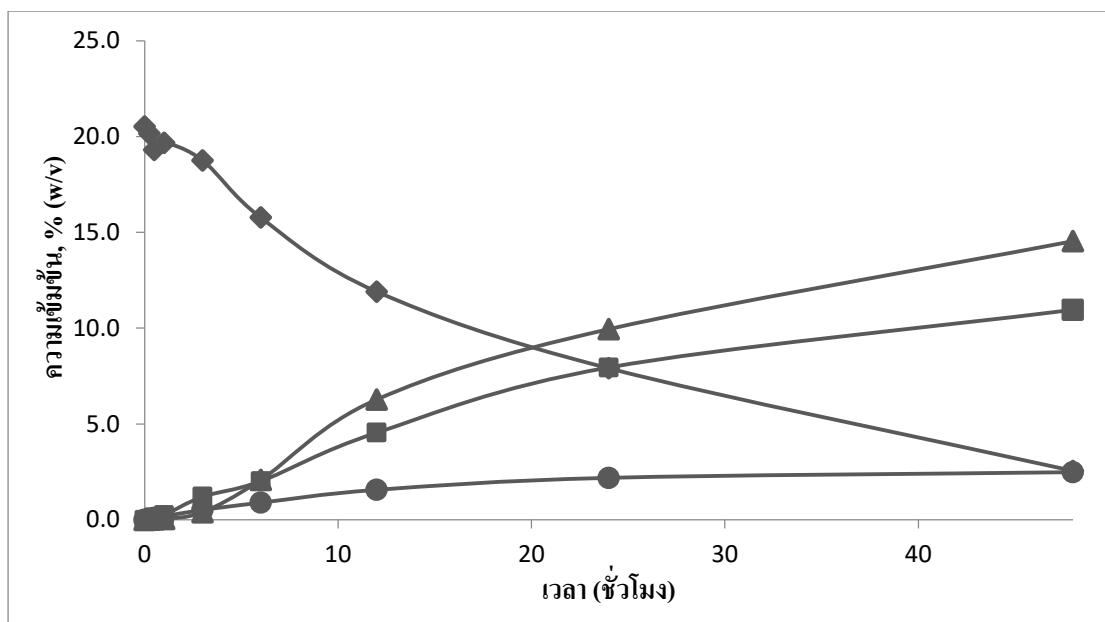
จากภาพที่ 4-9 ที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) ในฟอตเฟสบัฟเฟอร์ pH 6 และอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 มีผลต่อการผลิตลิแวนอย่างเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า เกิดลิแวนเพียงแค่ 0.9% (w/v) และ 0.9% (w/v)

ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สร้างลิแวนได้สูงถึง 12.9% (w/v) และ 11.5% (w/v) ตามลำดับ



ภาพที่ 4-10 อัตราการเกิดลิแวน ลิแวน (▲) ซูโครส (◆) กลูโคส (■) และฟรุกโตส (●)
 ที่ซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

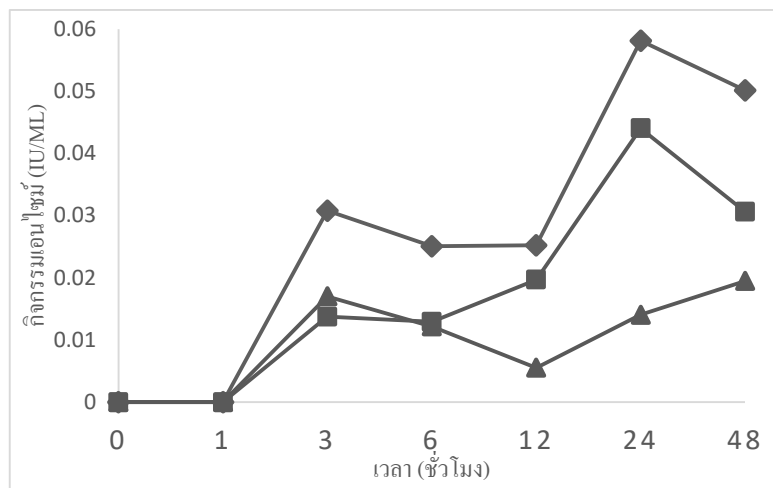
จากภาพที่ 4-10 อัตราการเกิดลิแวนที่ 0 ชั่วโมงพบซูโครส 23% (w/v) เมื่อเวลาผ่านไป ซูโครสจะลดลงตามเวลาจนถึง 48 ชั่วโมง เหลือเพียง 3.3% (w/v) ในทางกลับกันกลูโคส และฟรุกโตสจะเพิ่มขึ้นตามเวลาจนถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า กลูโคสและฟรุกโตส 11.46% (w/v) และ 2.49% (w/v) ตามลำดับ โดยลิแวนที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาก่อน 3 ชั่วโมงจะสร้างลิแวนได้น้อย เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงกว่าทรานฟรุกโตซิลเลชั่น และเมื่อเวลาผ่านไปหลังจาก 3 ชั่วโมง พบว่า ลิแวนถูกสร้างขึ้นอย่างทวีคูณ ที่ 12 ชั่วโมง พบว่ามีลิแวนเกิดขึ้นถึง 6% (w/v) ที่ 24 ชั่วโมง พบว่า มีลิแวนเกิดขึ้นถึง 10.7% (w/v) จนกระทั่งถึง 48 ชั่วโมง พบว่า เกิดสารลิแวนสูงสุดที่ 15.4% (w/v) ซึ่งเมื่อเทียบเป็นอัตราการเกิดทรานฟรุกโตซิลเลชั่น (% transfructosylations) เท่ากับ 87.5%



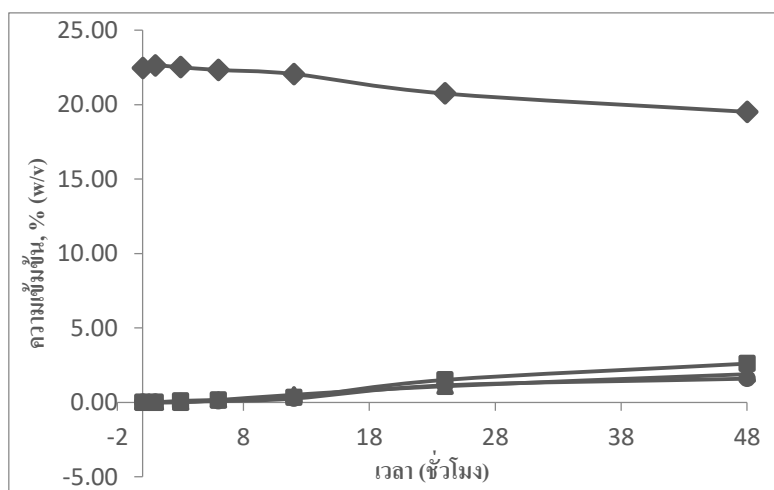
ภาพที่ 4-11 อัตราการเกิดลิแวน ลิแวน (▲) ซูโครส (◆) กลูโคส (■) และฟรุคโตส (●)
 ที่ซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-11 อัตราการเกิดลิแวนที่ 0 ชั่วโมงพบซูโครส 21% (w/v) เมื่อเวลาผ่านไป ซูโครสจะลดลงตามเวลาจนถึง 48 ชั่วโมง เหลือเพียง 2.55% (w/v) ในทางกลับกันกลูโคส และฟรุคโตสจะเพิ่มขึ้นตามเวลาจนถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งพบกลูโคสและฟรุคโตส 10.96% (w/v) และ 2.49% (w/v) ตามลำดับ โดยลิแวนที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาก่อน 3 ชั่วโมงจะสร้างลิแวนได้น้อย เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงกว่าทรานฟรุคโตซิเลชั่น และเมื่อเวลาผ่านไปหลังจาก 3 ชั่วโมง พบว่า ลิแวนถูกสร้างขึ้นอย่างทวีคูณ ที่ 12 ชั่วโมง พบว่า มีลิแวนเกิดขึ้นถึง 6.3% (w/v) ที่ 24 ชั่วโมง พบว่า มีลิแวนเกิดขึ้นถึง 9.9% (w/v) จนกระทั่งถึง 48 ชั่วโมง พบว่า เกิดสารลิแวน สูงสุดที่ 14.5% (w/v) ซึ่งเมื่อเทียบเป็นอัตราการเกิดทรานฟรุคโตซิเลชั่น (% transfructosylations) เท่ากับ 86.1%

6. การผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสในของเสียอุตสาหกรรมอาหาร

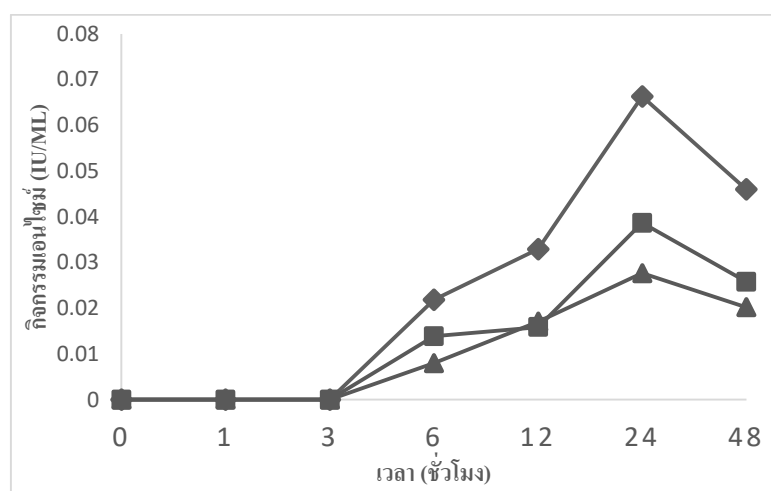


ภาพที่ 4-12 กิจกรรมของเอนไซม์ กิจกรรมทั้งหมด (◆) ไฮโดไลซิส (■) ทรานฟรุกโตซิเลชั่น (▲) ในการผลิตสารลิแวนที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสียในพอดเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

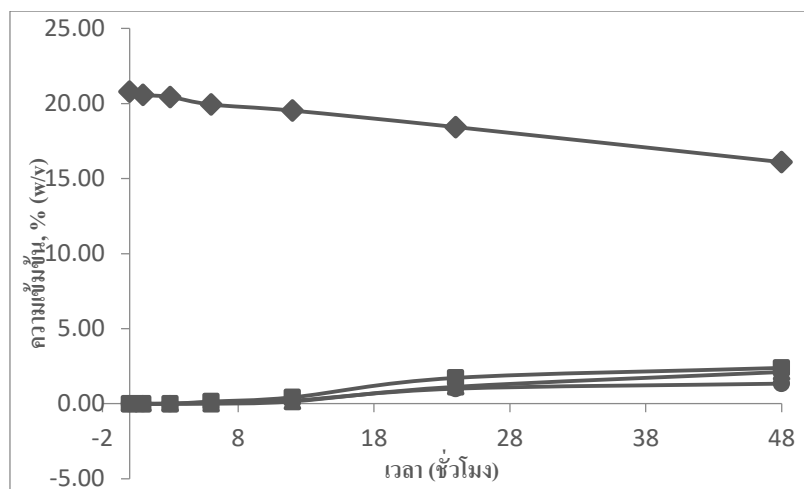


ภาพที่ 4-13 อัตราการเกิดลิแวน ลิแวน (▲) ซูโครส (◆) กลูโคส (■) และฟรุกโตส (●) ที่ซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) จากของเสียในพอดเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-12 พบว่า 1 ชั่วโมงแรกไม่เกิดปฏิกิริยาจนกระทั่ง 3 ชั่วโมง เริ่มเกิดปฏิกิริยาที่ 0.0307 IU/ mL และเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป จนกระทั่ง 24 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.058 IU/ mL เกิดสารลิแวน 1.08% (w/v) (ภาพที่ 4-13) จากนั้นลดลงที่ 48 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์เหลือ 0.0501 IU/mL เกิดลิแวน 1.89% (w/v) โดยที่ซูโครสในของเสียอุตสาหกรรมเริ่มต้นเท่ากับ 22.4% (w/v) สุกท้ายเหลือ 19.51% (w/v) (ภาพที่ 4-13) และทำการเทียบเป็นอัตรา การเกิดทรานฟรุคโตซิเลชัน (% transfructosylations) เท่ากับ 45.9%



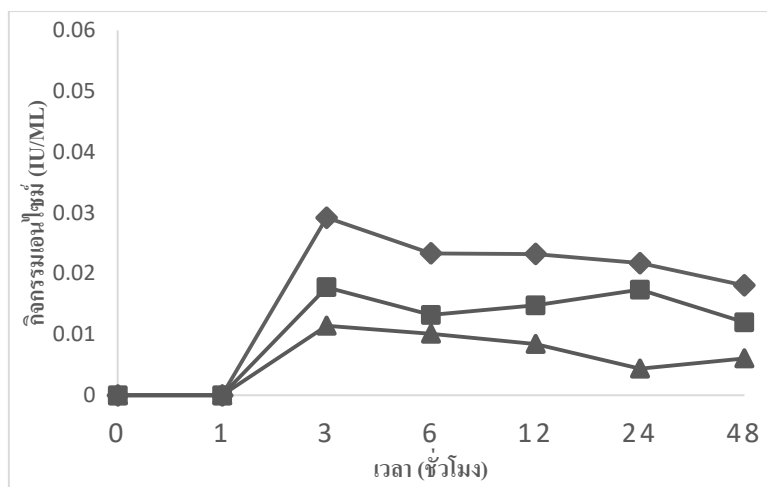
ภาพที่ 4-14 กิจกรรมของเอนไซม์ กิจกรรมทั้งหมด (◆) ไฮโดไลซิส (■) ทรานฟรุคโตซิเลชัน (▲) ในการผลิตสารลิแวนที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสียในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง



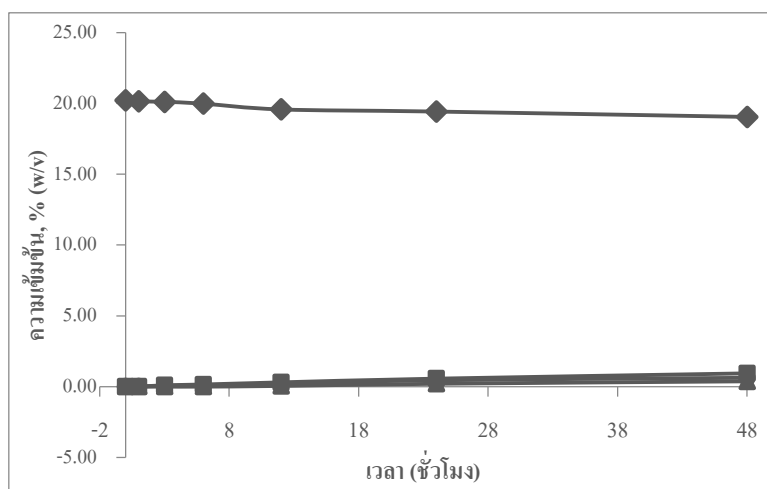
ภาพที่ 4-15 อัตราการเกิดลิแวน ลิแวน (▲) ซูโครส (◆) กลูโคส (■) และฟรุคโตส (●) ที่ซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) จากของเสียในฟอตเฟตบัพเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-14 พบว่า 3 ชั่วโมงแรก ไม่เกิดปฏิกิริยาจนกระทั่ง 6 ชั่วโมง เริ่มเกิดปฏิกิริยาที่ 0.022 IU/mL และเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปถึง 24 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.066 IU/mL เกิดสารลิแวน 1.13% (w/v) (ภาพที่ 4-15) จากนั้นลดลงที่ 48 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์เหลือ 0.046 IU/mL เกิดลิแวน 2.11% (w/v) โดยที่ซูโครสในของเสียอุตสาหกรรมเริ่มต้นเท่ากับ 20.79% (w/v) สุดท้ายเหลือ 16.09% (w/v) (ภาพที่ 4-15) ซึ่งเมื่อเทียบเป็นอัตราการเกิดทรานฟรุคโตซิเลชัน (% transfructosylations) เท่ากับ 50%

7. การผลิตลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรึงบนเม็ดโพลีโพรพิลีนของเสียอุตสาหกรรม

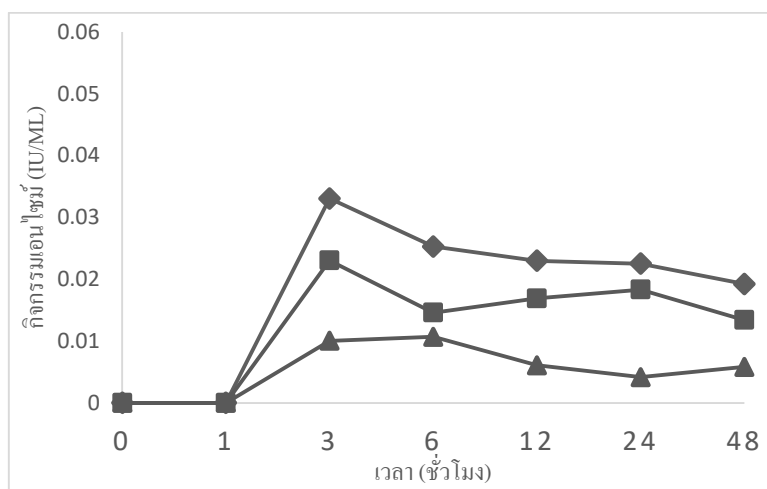


ภาพที่ 4-16 กิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรง กิจกรรมทั้งหมด (◆) ไฮโดไลซิส (■) ทรานฟรุกโตซิเลส (▲) ในการผลิตสารลิแวนที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสียอุตสาหกรรมในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

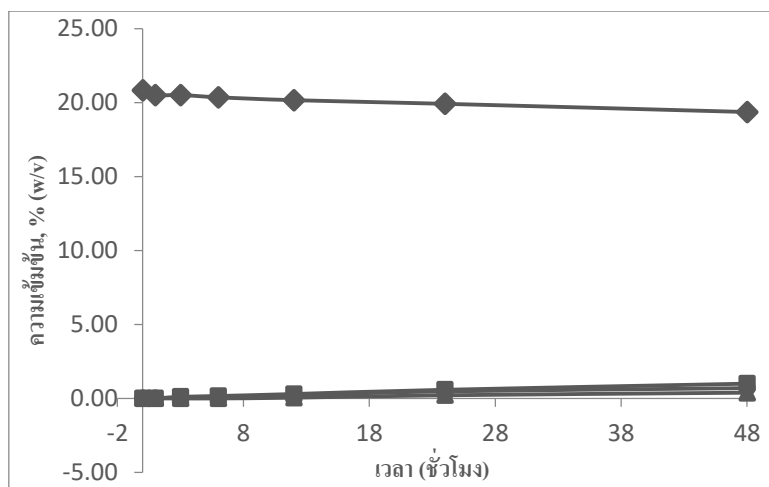


ภาพที่ 4-17 อัตราการเกิดลิแวนด้วยลิแวนซูเครสแบบตรง ลิแวน (▲) ซูโครส (◆) กลูโคส (■) และฟรุกโตส (●) ที่ความเข้มข้นซูโครส 20% (w/v) จากของเสียอุตสาหกรรมในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-16 พบว่า 1 ชั่วโมงแรกไม่เกิดปฏิกิริยาจนกระทั่ง 3 ชั่วโมง เริ่มเกิดปฏิกิริยาที่ 0.0292 IU/mL และลดลงเมื่อเวลาผ่านไปถึง 24 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.0217 IU/mL เกิดสารลิแวน 0.2% (w/v) (ภาพที่ 4-17) จากนั้นลดลงอีกที่ 48 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์เหลือ 0.0181 IU/mL เกิดลิแวน 0.38% (w/v) โดยที่ซูโครสในของเสียอุตสาหกรรมเริ่มต้นเท่ากับ 20.22% (w/v) สุดท้ายเหลือ 19.05% (w/v) (ภาพที่ 4-17) ซึ่งเมื่อเทียบเป็นอัตราการผลิตทรานฟรุคโตซิเลชั่น (% transfructosylations) เท่ากับ 45.8%



ภาพที่ 4-18 กิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสแบบตรง กิจกรรมทั้งหมด (◆) ไฮโดรไลซิส (■) ทรานฟรุคโตซิเลชั่น (▲) ในการผลิตสารลิแวนที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) จากของเสียอุตสาหกรรมในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

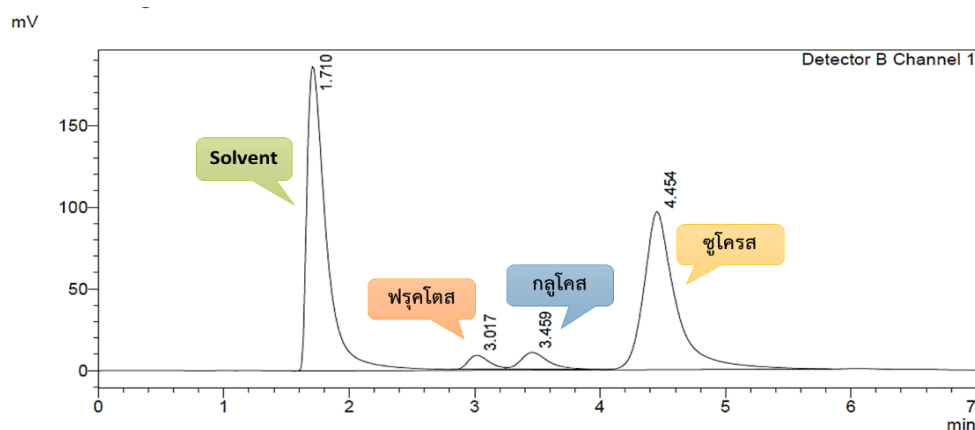


ภาพที่ 4-19 อัตราการเกิดลิแวนด้วยลิแวนซูโครสแบบตรง ลิแวน (▲) ซูโครส (◆) กลูโคส (■) และฟรุกโตส (●) ที่ความเข้มข้นซูโครส 20% (w/v) จากของเสียอุตสาหกรรมในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-18 พบว่า 1 ชั่วโมงแรก ไม่เกิดปฏิกิริยาจนกระทั่ง 3 ชั่วโมงเริ่ม เกิดปฏิกิริยาที่ 0.0331 IU/mL และลดลงเมื่อเวลาผ่านไปถึง 24 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.0225 IU/mL เกิดสารลิแวน 0.22% (w/v) (ภาพที่ 4-19) จากนั้นลดลงอีกที่ 48 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์เหลือ 0.0192 IU/mL เกิดลิแวน 0.39% (w/v) โดยที่ซูโครสในของเสียอุตสาหกรรมเริ่มต้นเท่ากับ 20.84% (w/v) สุดท้ายเหลือ 19.36 % (w/v) (ภาพที่ 4-19) ซึ่งเมื่อเทียบเป็นอัตราการเกิดทรานฟรุกโตซิเลชัน (% transfructosylations) เท่ากับ 53%

8. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลิแวนซูเครสและลิแวน

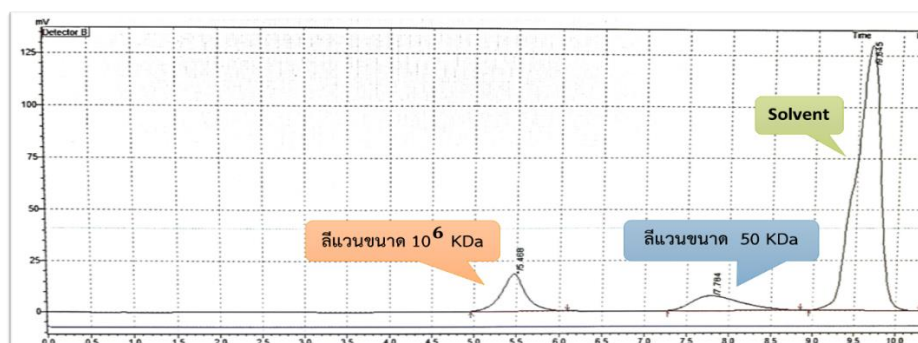
8.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลิแวนซูเครส



ภาพที่ 4-20 กราฟปริมาณความเข้มข้นของซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส

ทำการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu UFLC และคอลัมน์วิเคราะห์ รุ่น Luna 5 μm NH2 100 \AA ขนาด 250 x 4.6 mm ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นอะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) และน้ำ DI ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ที่อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส และใช้ Acetonitrile 100% ในการเก็บคอลัมน์

8.2 การวิเคราะห์ลิแวน



ภาพที่ 4-21 กราฟปริมาณความเข้มข้นของลิแวน

ทำการวัดปริมาณลิแวนที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu UFLC ด้วยเครื่อง Detector แบบ RI และคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์แบบ Size exclusion โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นเกลือแกง (NaCl) 0.1 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และใช้ 20% เอทานอลในการเก็บคอลัมน์

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการทดลอง การทำเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่สามารถผลิตสารลิแวนได้ ด้วยวิธีแลกเปลี่ยนไอออนบนเรซิน (TOYOPERL DEAE-650M) ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับการดึงเอนไซม์ลิแวนซูเครสออกจากเรซิน คือ 0.8 โมลาร์ วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ลิแวนซูเครสมีขนาด 100 kDa และยังมีโปรตีนบางส่วนปนเปื้อนอยู่

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสต่อการผลิตลิแวน พบว่าเอนไซม์ลิแวนซูเครส สามารถผลิตลิแวนได้สูงสุดที่ความเข้มข้นซูโครส 20% (w/v) pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยพบว่า มีกิจกรรมสูงสุดในฟอตเฟตบัฟเฟอร์และอะซิเตตบัฟเฟอร์อยู่ที่ 0.398 และ 0.372 IU/mL ตามลำดับ และสามารถผลิตลิแวนได้ 15.4% (w/v) และ 14.5% (w/v) ตามลำดับ โดยลิแวนที่ผลิตได้จะแบ่งออกเป็น 2 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (10⁶ kDa) และ ขนาดกลาง (50 kDa) ซึ่งลักษณะของการผลิตลิแวน พบว่าที่ความเข้มข้นซูโครส 5% จะสามารถผลิตลิแวนขนาดใหญ่ได้ถึง 95% ของทั้งหมด และที่ความเข้มข้นของซูโครส 20% สามารถผลิตลิแวนขนาดกลางได้ถึง 95% ของทั้งหมด

จากการศึกษาการผลิตลิแวนโดยการเปลี่ยนของเสียอุตสาหกรรมที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบ สามารถผลิตลิแวนได้สูงสุด 1.89% (w/v) ในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ และ 2.11% (w/v) ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ โดยความสามารถในการผลิตลิแวนลดลง เนื่องจากสารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในของเสียอุตสาหกรรมอาจทำให้เอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์สูญเสียเสถียรภาพ หรือทำให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ช้าลง

การดึงเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์เพื่อผลิตลิแวน พบว่าเกิดกิจกรรมเอนไซม์ลดลงจากเอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์ เนื่องจากยังมีโปรตีนบางส่วนปนเปื้อนอยู่อาจทำให้พันธะโควาเลนต์บนผิวโคโคซานมีแรงยึดเหนี่ยวลดลง ซึ่งทำการทดสอบโดยการเปลี่ยนของเสียอุตสาหกรรม สามารถผลิตลิแวนได้สูงสุด 0.39% (w/v) ในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.38% (w/v) ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ และอาจเกิดจากสารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในของเสียอุตสาหกรรมอาจทำให้เอนไซม์ลิแวนซูเครสบริสุทธิ์สูญเสียเสถียรภาพ และเกิดกิจกรรมเอนไซม์ช้าลง

จากการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะด้วยฟอตเฟตบัฟเฟอร์และอะซิเตตบัฟเฟอร์ พบว่าสามารถผลิตลิแวนได้ใกล้เคียงกัน โดยที่ฟอตเฟตบัฟเฟอร์เหมาะสมสำหรับการใช้ที่ pH ระหว่าง

6-7 และในทางตรงข้ามที่อะซิเตทบัฟเฟอร์เหมาะสำหรับการใช้งานในสภาวะความเป็นกรดอ่อนที่ pH ระหว่าง 5-6

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ลิวโนซูเครสบนเม็ดโคโคซาน เช่น ความเข้มข้นของกลูต้าเอลดีไฮด์ ระยะเวลาในการบ่ม เป็นต้น

2.2 ตรวจสอบสารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในของเสี้ยวอุตสาหกรรม เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตลิวโน

2.3 ศึกษาปริมาณความสามารถในการนำเอนไซม์ลิวโนซูเครสแบบตรึงกลับมาใช้ใหม่

บรรณานุกรม

- ณัฐพงศ์ ทาค่า. (2559). การคัดเลือกและศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนจาก
ถั่วเหลืองหมัก. (ปริญาตรี), มหาวิทยาลัยบูรพา,
- ณัฐวุฒิ ไตร โอสถ (2560). การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารพรี
ไบโอติกในรูปของลิแวนจากถั่วเหลืองหมัก. (ปริญาตรี), มหาวิทยาลัยบูรพา,
- พงษ์ธร เพ็งน้อย (2561). การบำบัดของเสียชีวโครสทางชีวภาพจากอุตสาหกรรมอาหารด้วยกลุ่ม
เอนไซม์จากแบคทีเรีย *Bacillus siamensis*. (ปริญาโท), มหาวิทยาลัยบูรพา,
- สุรวุฒิ แสงมณี (2556). การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดลิแวนโดยลิแวนซูเครสแบบตรึง.
(ปริญาเอก), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,
- Ait Hsine, E., Benhammou, A., & Pons, M. (2005). Water resources management in soft drink
industry-water use and wastewater generation. *Environmental technology*, 26(12), 1309-
1316.
- Alam, A., Hossain, K., Hossain, B., Ahmed, A., & Hoque, M. (2009). A study on industrial waste
effluents and their management at selected food and beverage industries of Bangladesh.
- Ammar, Y. B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Minamiura,
N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2
capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of
Biotechnology*, 99(2), 111-119.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Balasubramanian, T. (2009). Thermostable and
alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated form marine
environment.
- Barbosa, G. N. d. O. (2007). Produção de frutossiltransferase por *Rhodotorula sp.*
- Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2012). Microbial production of
levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International Journal of
Biological Macromolecules*, 50(2), 451-458.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS
Microbiology Reviews*, 7(1-2), 113-130.

- Dahech, I., Belghith, K. S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2011). Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 942-947.
- Desai, M., & Patel, K. (2019). Isolation, optimization, and purification of extracellular levansucrase from nonpathogenic *Klebsiella* strain L1 isolated from waste sugarcane bagasse. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 19, 101107.
- Dominguez, A. L., Rodrigues, L. R., Lima, N. M., & Teixeira, J. A. (2014). An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food and bioprocess technology*, 7(2), 324-337.
- Esawy, M., Mahmoud, D., & Fattah, A. (2008). Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 237-246.
- Fersi, C., Gzara, L., & Dhahbi, M. (2005). Treatment of textile effluents by membrane technologies. *Desalination*, 185(1-3), 399-409.
- Flores-Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J. C., Morlett-Chávez, J. A., Aguilar, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2015). Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(4), 421-426.
- Han, Y. W. (1990). Microbial levan. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 35, pp. 171-194): Elsevier.
- Hendry, G. A., & Wallace, R. K. (1993). The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. *Science and technology of fructans*, 119-139.
- Hernández, L., Arrieta, J., Betancourt, L., Falcón, V., Madrazo, J., Coego, A., & Menéndez, C. (1999). Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Current microbiology*, 39(3), 146-152.
- Hettiarachchy, N., Feliz, D., Edwards, J., & Horax, R. (2018). The use of immobilized enzymes to improve functionality. In *Proteins in Food Processing* (pp. 569-597): Elsevier.
- Hettwer, U., Gross, M., & Rudolph, K. (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of bacteriology*, 177(10), 2834-2839.

- Jang, K.-H., Kang, S.-A., Cho, Y.-H., Kim, Y.-Y., Lee, Y.-J., Hong, K.-H., . . . Rhee, S.-K. (2003). Prebiotic properties of levan in rats. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(3), 348-353.
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., . . . Robyt, J. F. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1727(1), 5-15.
- Küçükaşık, F., Kazak, H., Güney, D., Finore, I., Poli, A., Yenigün, O., . . . Öner, E. T. (2011). Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(6), 1729-1740.
- L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., & Xu, S. (2000). Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology*, 81(1), 73-84.
- Liu, D.-M., Chen, J., & Shi, Y.-P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342.
- Manyele, S. V., Peay, M., & Halfani, M. R. (2008). Treatment of beverage-processing wastewater in a three-phase fluidised bed biological reactor. *International journal of food science & technology*, 43(6), 1058-1065.
- Matošić, M., Prstec, I., Jakopović, H. K., & Mijatović, I. (2009). Treatment of beverage production wastewater by membrane bioreactor. *Desalination*, 246(1-3), 285-293.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., Van der Maarel, M. J., & Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152(4), 1187-1196.
- Park, J.-P., Oh, T.-K., & Yun, J.-W. (2001). Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Process Biochemistry*, 37(5), 471-476.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M. E., & Munguía, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate polymers*, 132, 338-344.

- Sangeetha, P., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2002). Influence of media components and reaction parameters on the production of fructosyl transferase and fructooligosaccharides. *Sciences des Aliments (France)*.
- Scanlon, M., Henrich, A., & Whitaker, J. (2018). Factors affecting enzyme activity in food processing. In *Proteins in Food Processing* (pp. 337-365): Elsevier.
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., AÇil, Y., . . . Schrezenmeir, J. r. (2007). Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 838S-846S.
- Singh, R. S., Singh, R. P., & Kennedy, J. F. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 565-572.
- Smeeckens, J. C. M., Ebskamp, M. J. M., & Weisbeek, P. J. (1999). Method for obtaining transgenic plants showing a modified fructan pattern. In: Google Patents.
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate polymers*, 120, 102-114.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S., & Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*, 59(Suppl 2), 251-262.
- Venugopal, V. (2016). *Marine polysaccharides: Food applications*: CRC Press.
- Yang, S.-T. (2011). *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*: Elsevier.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 107-117.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

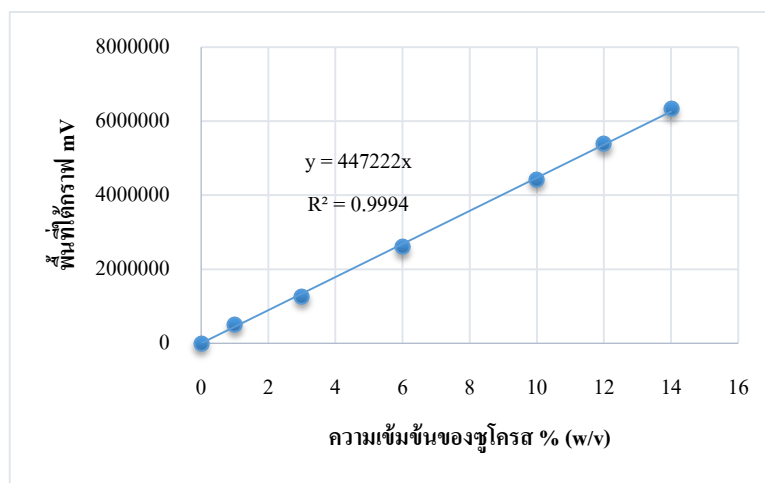
1. อาหารแข็งสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ ประกอบด้วย ชูโครต 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด (Yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร ทริปโทน (Tryptone) 10 กรัมต่อลิตร กลีโกล 5 กรัมต่อลิตร และผลุ้น (Agar) 15 กรัมต่อลิตร
2. อาหารเหลวสูตรที่ 1 สำหรับเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ประกอบด้วยชูโครต 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด (Yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร ทริปโทน (Tryptone) 10 กรัมต่อลิตร และกลีโกล 5 กรัมต่อลิตร
3. อาหารเหลวสูตรที่ 2 สำหรับเร่งการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส ประกอบด้วยชูโครต 100 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 3.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 0.8 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) 0.2 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) 3.5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด (Yeast extract) 5.0 กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ข

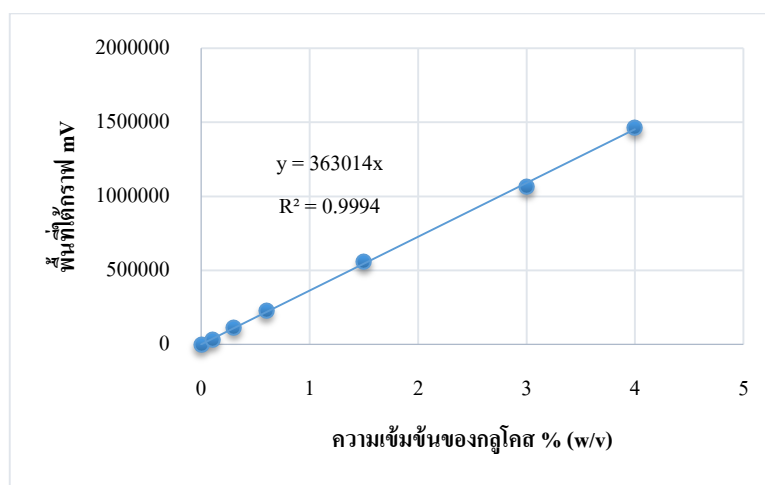
ภาพกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารละลาย
และอัตราการเกิดทรานฟรุคโตซิเลชั่น

กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายและพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วย

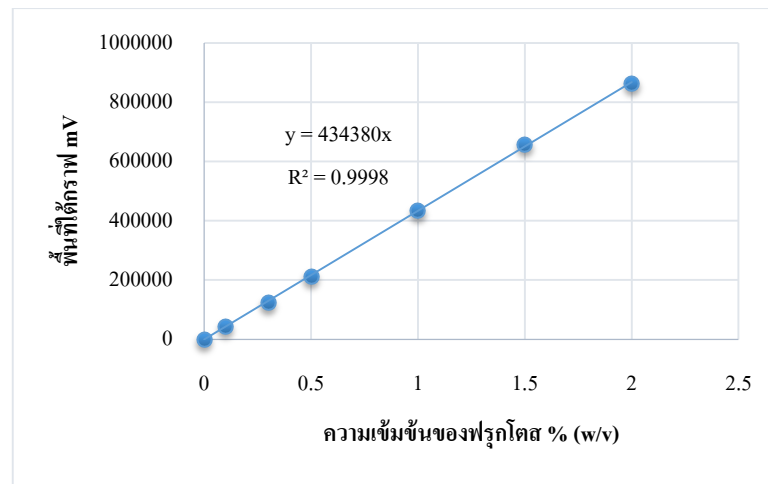
HPLC



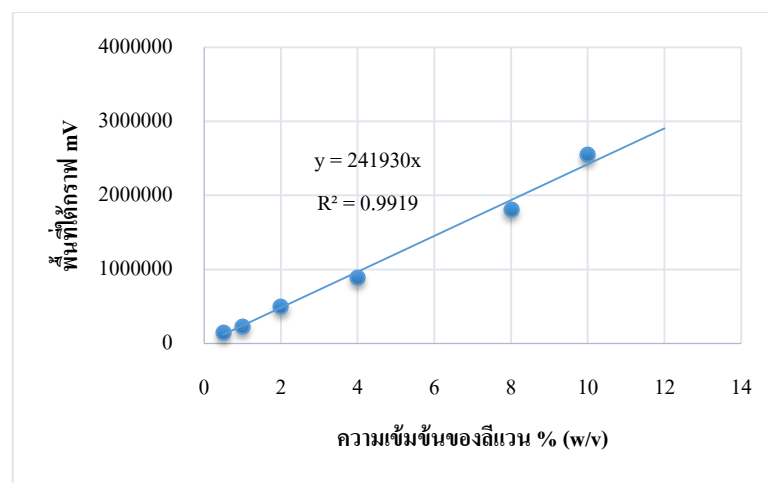
ภาพภาคผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นซูโครส



ภาพภาคผนวก ข-2 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นกลูโคส



ภาพภาคผนวก ข-3 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นฟรุกโตส



ภาพภาคผนวก ข-4 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นลิแวน

การหาอัตราการเกิดทรานฟรุกโตซิเลชัน (% transfructosylations) (Porras-Domínguez et al. 2015) ซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 23.2% (w/v) เมื่อถูกบ่มด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส นาน 48 ชั่วโมง พบว่า มีความเข้มข้นซูโครสเหลือ 3.35% (w/v) และฟรุกโตสเหลือ 2.49 % (w/v)

$$\text{อัตราการเกิดทรานฟรุกโตซิเลชัน} = \frac{(\text{ซูโครสเริ่มต้น} - \text{ซูโครสสุดท้าย} - \text{ฟรุกโตสสุดท้าย})}{\text{ซูโครสเริ่มต้น} - \text{ซูโครสสุดท้าย}} \times 100\%$$

$$\text{อัตราการเกิดทรานฟรุกโตซิเลชัน} = \frac{(23.2 - 3.35 - 2.49)}{23.2 - 3.35} \times 100\%$$

$$\text{อัตราการเกิดทรานฟรุกโตซิเลชัน} = 87.45\%$$