สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง

THE OPTIMUM CONDITIONS OF ISOMALTO-OLIGOSACCHARIDES PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH

ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง

ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง The Optimum Conditions of Isomalto-oligosaccharides Production from Cassava Starch
ชื่อ-นามสกุล	นายยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อนันต์ บุญปาน, ปร.ด.
ปีการศึกษา	2557

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ดลนภา แก้วภา, ปร.ด.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อนันต์ บุญปาน, ปร.ด.)

..... กรรมการ
(อาจารย์จันทิมา ตีฆะ, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์, วท.ด.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สิริแข พงษ์สวัสดิ์, วท.ด.)
วันที่ 14 เดือน กันยายน พ.ศ. 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง
ชื่อ-นามสกุล	นายยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อนันต์ บุญปาน, ปร.ด.
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides, IMOs) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส 2-5 หน่วยต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-กลูโคซิดิก (α-1,6-glucosidic linkages) ประกอบด้วยน้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose) พาโนส (panose) ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose) และ โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านชนิดอื่นๆ ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จัดเป็นสารที่น่าสนใจในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ และยังจัดให้เป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* เพื่อผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ พบว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสและใช้เวลาในการบ่ม 10 นาที จะได้น้ำเชื่อมที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส (DE=12) การใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส และมอลโตจิเนสร่วมกันที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.13 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) ตามลำดับ พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 58.08 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไอโซมอลโตโอลิกแซ็กคาไรด์จากน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง พบว่า การใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จะสามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย พาโนส มอลโตไตรโอสและไอโซมอลโตไตรโอส ความเข้มข้น 16.95, 12.13, 24.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง โดยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ นอกจากนี้ข้อมูลจากงานวิจัยจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : แป้งมันสำปะหลัง น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง ทรานกลูโคซิเดส ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ พรีไบโอติก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

Thesis Title	The Optimum Conditions of Isomalto-oligosaccharides Production from Cassava Starch
Name-Surname	Mr.Yutthachai Phetcharatphaisan
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Mr.Anan Boonpan, Ph.D.
Academic Year	2014

ABSTRACT

Isomalto-oligosaccharide (IMOs) is oligosaccharide containing 2 – 5 glucose units with α-1, 6-glucosidic linkages. IMOs are mainly composed of isomaltose, panose, isomaltotriose, and various types of oligosaccharide branching. IMOs are gaining interest in the food industry as they are sweeteners with low caloric value properties, and are known as prebiotic substances that promote the growth of microorganism which is good for human health.

This research was aimed to study the optimum conditions for IMOs production from cassava starch by microbial enzymes. In this study, cassava starch was hydrolyzed by α-amylase from *Bacillus licheniformis* to produce high maltose syrup to be used as substrate for IMOs production. It was found that the optimum conditions for maltose syrup production were as follows: 0.04%α-amylase (v/w), pH 6.5, and incubated at 90 ºC for 10 minutes. This resulted in the dextrose equivalent (DE) of 12 which was suitable for high maltose syrup production. When maltose syrup was tranglucosylated by mixed enzyme β-amylase and maltogenase at the concentration of 0.04 % (v/w) and 0.13% (v/w), respectively, pH 5.5, and incubated at 55 ºC for 6 hours, 58.08% of high maltose syrup was gained. When high maltose syrup was tranglucosylated by transglucosidase (TG) from *Aspergillus niger* of 0.06% (v/v), pH 5.0, and incubated at 60 ºC for 6 hours, IMOs containing panose, maltotriose and isomaltotriose of 16.95, 12.13, 24.72 g/l respectively, were the outcome.

IMOs production from cassava starch by microbial enzyme results in prebiotic substance that could be used in different food products. In addition, the results from this research are useful for further industrial development of IMOs production.

Keywords : cassava starch, high maltose syrup, transglucosidase, isomalto-oligosaccharide, prebiotic

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความอนุเคราะห์ของ ดร.อนันต์ บุญปาน อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้ความรู้ คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในการแก้ไข ปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้ทำการศึกษาวิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ดลนภา แก้วภา ประธานกรรมการสอบ ดร.จันทิมา ฑีฆะ และ ดร.ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์ กรรมการสอบ ที่ได้ให้ความกรุณาเสียสละเวลาให้คำแนะนำในการแก้ไขตรวจสอบวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร.อภินันท์ วัลภา ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ ที่ช่วยเหลือในการแนะนำการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange Chromatography, IC) รวมทั้งขอขอบพระคุณ บริษัท ดับเบิ้ลยูจีซี จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการนำตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายเอกสิทธิ์ อุ่นเรือน นายณัฐพล ชาวสวน รวมทั้งนักศึกษาปริญญาตรีที่คอยสละเวลาให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ พร้อมทั้งมอบความดีทั้งหมดให้แก่ คุณพ่อบุญเลิศ และคุณแม่อำไพ เพชรรัตน์ไพศาล ผู้คอยอบรมสั่งสอนในสิ่งที่ดีงาม คอยช่วยเหลือ สนับสนุน ห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีอย่างยิ่งตลอดเวลา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจและสามารถนำความรู้ดังกล่าวไปต่อยอดประยุกต์ใช้ เพื่อเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในอนาคตต่อไป และถ้าหากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… (3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…….. (5)
กิตติกรรมประกาศ…… (7)
สารบัญ..... (8)
สารบัญตาราง..... (10)
สารบัญภาพ..... (14)
บทที่ 1 บทนำ…… 17
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 17
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย……. 18
1.3 ขอบเขตของการวิจัย…….. 18
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย..... 19
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 21
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 22
2.1 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์..... 22
2.2 กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์..... 23
2.3 พรีไบโอติก……..... 25
2.4 มันสำปะหลัง..... 35
2.5 องค์ประกอบของแป้ง……... 36
2.6 คุณสมบัติของแป้ง..... 40
2.7 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง……..…… 42
2.8 กระบวนการย่อยแป้งในอุตสาหกรรม……...……. 50
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..…… 59

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 62

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 62

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง..... 66

3.3 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล..... 72

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 73

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส..... 73

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง..... 78

4.3 การผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากอาหารเหลว..... 87

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์..... 88

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 94

5.1 สรุปผลการวิจัย..... 94

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 94

บรรณานุกรม..... 95

ภาคผนวก..... 103

ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา และการเตรียมอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส..... 104

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมบัฟเฟอร์..... 108

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์..... 110

ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ..... 112

ภาคผนวก จ ผลการทดลอง..... 117

ประวัติผู้เขียน..... 123

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ปริมาณอินนูลินและโอลิโกฟรุกโตสในอาหารชนิดต่างๆ..... 28

ตารางที่ 2.2 กระบวนการผลิตพรีไบโอติกทางการค้า..... 31

ตารางที่ 2.3 พรีไบโอติกที่ถูกสังเคราะห์จากเอนไซม์..... 33

ตารางที่ 2.4 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน..... 39

ตารางที่ 2.5 เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการย่อยแป้ง..... 58

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทดลองโดยการออกแบบด้วยเทคนิค RSM แบบ Box-behnken design เพื่อศึกษาผลของ ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ..... 70

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค RSM เพื่อศึกษาผลของตัวแปร (ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ) ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์..... 71

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมชนิดต่างๆ..... 80

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่ค่าพีเอชต่างๆ..... 82

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่อุณหภูมิต่างๆ..... 84

ตารางที่ 4.4 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในสภาวะต่างๆทำการบ่มเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง..... 91

ตารางที่ 4.5 ผลได้และอัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับปฏิบัติการ..... 92

ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 111

ตารางที่ ข-2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 113

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ง-1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อย
เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test
ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 113
ตารางที่ ง-2 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของ
การย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่างๆ
เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT)
ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 113
ตารางที่ ง-3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของ
การย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส
0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test
(DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 114
ตารางที่ ง-4 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของ
การย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส
0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)
และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 114
ตารางที่ ง-5 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของ
การย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่พีเอชต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of
Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับ
ความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 114
ตารางที่ ง-6 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของ
การย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่พีเอชต่างๆ โดยใช้วิธี Duncan's multiple
rang test (DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 115

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ง-7 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95…….……. 116
ตารางที่ ง-8 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95…….……... 116
ตารางที่ จ-1 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่างๆในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ในระยะเวลา 10 นาที……...…….. 118
ตารางที่ จ-2 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เป็นระยะเวลา 30 นาที…… 118
ตารางที่ จ-3 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับพีเอชต่างๆ ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เป็นระยะเวลา 10 นาที……...… 118
ตารางที่ จ-4 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เป็นระยะเวลา 10 นาที…… 119
ตารางที่ จ-5 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมเอนไซม์ผสมต่างๆ ในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง…… 119
ตารางที่ จ-6 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์เบตาอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์มอลโตจิเนสที่พีเอชต่างๆ ในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง……... 119
ตารางที่ จ-7 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์เบตาอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์มอลโตจิเนสที่พีเอชเท่ากับ 5.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง…… 120
ตารางที่ จ-8 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง……... 120

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ จ-9 ปริมาณน้ำตาลไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการเติมเอนไซม์
ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง..... 121

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์..... 20
ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้ง..... 23
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของ (ก) ซอบิทอล (Sorbitol) (ข) แมนนิทอล
(Mannitol)..... 26
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของโมเลกุลอินนูลิน (Inulin)..... 28
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของโมเลกุลของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์..... 29
ภาพที่ 2.5 การผลิตพรีไบโอติกโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์..... 34
ภาพที่ 2.6 ลักษณะทั่วไปของมันสำปะหลัง..... 36
ภาพที่ 2.7 การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง..... 38
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างภายในเม็ดแป้ง..... 39
ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน..... 40
ภาพที่ 2.10 การเปลี่ยนแปลงของเม็ดแป้งในระหว่างการหุงต้ม..... 41
ภาพที่ 2.11 ระยะในการเกิดเจลาทิไนเซชันของเม็ดแป้ง..... 41
ภาพที่ 2.12 เครื่องมือวัดความหนาแน่นของหัวมัน..... 42
ภาพที่ 2.13 เครื่องร่อนดินทราย..... 43
ภาพที่ 2.14 เครื่องล้างหัวมัน..... 43
ภาพที่ 2.15 เครื่องสับหัวมัน..... 44
ภาพที่ 2.16 เครื่องโม่หัวมัน..... 44
ภาพที่ 2.17 ขั้นตอนการสกัดแป้ง..... 45
ภาพที่ 2.18 เครื่องสกัดแป้งหยาบ..... 46
ภาพที่ 2.19 เครื่องสกัดแป้งละเอียด..... 47
ภาพที่ 2.20 เครื่องอัดกากมัน..... 47
ภาพที่ 2.21 เครื่องแยกแป้ง..... 48
ภาพที่ 2.22 เครื่องสลัดแห้ง..... 49
ภาพที่ 2.23 เครื่องร่อนแป้ง..... 50
ภาพที่ 2.24 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส..... 53

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 2.25 การทำงานของเอนไซม์เบตาอะไมเลส…….. 53
ภาพที่ 2.26 การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟอรีเลส……..... 54
ภาพที่ 2.27 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส……..….. 54
ภาพที่ 2.28 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง……..……. 55
ภาพที่ 2.29 การทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยแป้งสัญลักษณ์วงแหวนเปิดแสดงถึง reducing end ของ polyglucose molecule……. 55
ภาพที่ 2.30 กระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ…….. 56
ภาพที่ 2.31 การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ…… 57
ภาพที่ 4.1 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที……..……...…….... 74
ภาพที่ 4.2 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที…...……..…….. 75
ภาพที่ 4.3 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที……..... 76
ภาพที่ 4.4 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้น0.04 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ …...……..…. 77
ภาพที่ 4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน ด้วยเอนไซม์ผสมของเบตาอะไมเลสและมอลโตจิเนส พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 24 ชั่วโมง……..…….. 86
ภาพที่ 4.6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นระยะเวลา 5 วัน…….…… 88
ภาพที่ 4.7 ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วยปริมาณเอนไซม์ ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง…… 93
ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่……..…….. 112

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานโปรตีน……..…… 114
ภาพที่ ค-3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm…..... 115
ภาพที่ ค-4 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm……. 115
ภาพที่ ค-5 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm…….. 116
ภาพที่ ค-6 กราฟมาตรฐานฟรุกโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50และ 100 ppm……... 116
ภาพที่ ค-7 กราฟมาตรฐานมอลโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm…….. 116
ภาพที่ ค-8 กราฟมาตรฐานพาโนสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm……..… 117
ภาพที่ ค-9 กราฟมาตรฐานมอลโตไตรโอสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm…… 117
ภาพที่ ค-10 กราฟมาตรฐานไอโซมอลโตไตรโอสที่มีความเข้มข้น
5, 10, 25, 50 และ 100 ppm……..…… 118
ภาพที่ ค-11 โครมาโทแกรมของน้ำตาลมอลโตไตรโอสมาตรฐาน (A) และสารละลาย
น้ำตาลตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (B)
(โดย Retention time 15.866 (A) และ 15.483 (B) คือ น้ำตาลมอลโตไตรโอส)…….. 118

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) เป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล ซึ่งจัดเป็นสารเติมแต่งในอาหารที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้โอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ขนมอบ และขนมหวานชนิดต่างๆ โอลิโกแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติในการช่วยปรับปรุงคุณภาพของอาหารทั้งทางเคมีและกายภาพ ช่วยเกื้อกูลต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยเป็นสารให้ความหวานที่ช่วยป้องกันฟันผุ ให้พลังงานต่ำ เนื่องจากไม่ถูกย่อยในร่างกายของมนุษย์ มีสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) คือ ช่วยเสริมสร้างสภาวะแวดล้อมที่ดีของระบบทางเดินอาหาร และช่วยเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์บิฟีโดแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีประโยชน์ในลำไส้ [1] ผลิตภัณฑ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galacto-oligosaccharide) แลคทูโลส (lactulose) แลคโตซูโครส (lactosucrose) มอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (malto-oligosaccharide) ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) และไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides) เป็นต้น [1,2]

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides, IMOs) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,6 กลูโคซิดิก (α-D-1,6 glucosidic linkages) ประกอบด้วยน้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose) พาโนส (panose) ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านชนิดอื่นๆ เป็นต้น [3] ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบประเภทแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) พูลลูลาเนส (pullulanase) เบตาอะไมเลส (β-amylase) และ ทรานกลูโคซิเดส (transglucosidase) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เบตาอะไมเลส และ พูลลูลาเนส จะย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส ส่วนเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชั่น (tranglucosylation) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [1,4]

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ถูกย่อยสลายในร่างกายสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงเป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำและไม่มีผลต่ออินซูลินในเลือด จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับบุคคลที่ต้องการลดน้ำหนักและเป็นโรคเบาหวาน การบริโภคไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะไม่ทำให้เกิดฟันผุ เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นอาหารเพื่อสร้างกรด และสารประกอบพอลิกลูแคน นอกจากนี้ไอโซมอลโต

โอลิโกแซ็กคาไรด์ยังจัดเป็นสารพรีไบโอติก โดยจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตบิฟิโดแบคทีเรีย และจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ชนิดอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ [1]

ปัจจุบันไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่กำลังได้รับความสนใจ และมีแนวโน้มจะถูกนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้หลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม เช่น มีความหนืดต่ำ ไม่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ และมีความคงตัวสูงในสภาวะที่เป็นกรด เป็นต้น [3] นอกจากนั้นการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถดำเนินการได้ง่ายในระดับอุตสาหกรรม และใช้แหล่งวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูก เช่น แป้งมันสำปะหลัง ดังนั้นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ จึงมีความน่าสนใจและควรสนับสนุนให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ขึ้นในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นการลดการนำเข้าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากต่างประเทศ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลังให้เป็นผลิตภัณฑ์เชิงอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าสูงขึ้น เพื่อการส่งออกได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ขอบเขตของสถานที่ทำการวิจัย

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

1.3.2 ขอบเขตเนื้อหางานวิจัย

1.3.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

1.3.2.2 ศึกษาสภาวะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์เบตาอะไมเลส (β-amylase) พูลลูลาเนส (pullulanase) มอสโตจีเนส (maltoginase)

1.3.2.3 การผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากอาหารเหลว

1.3.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

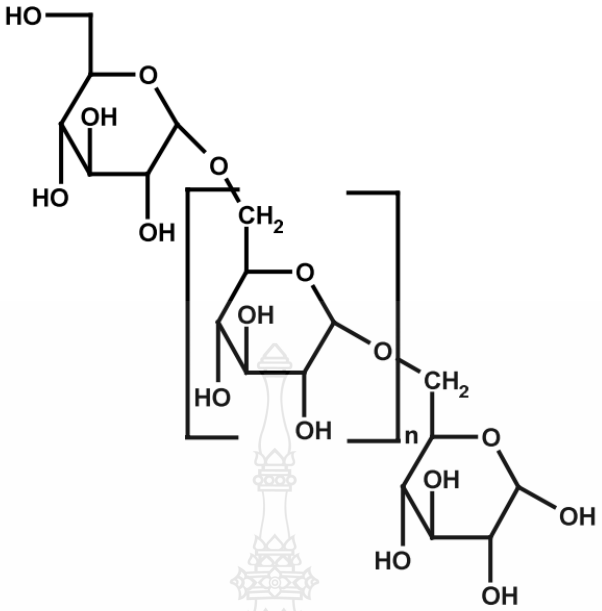
1.3.3 ขอบเขตของเวลาที่ทำการวิจัย

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2558 เป็นระยะเวลา 2 ปี 8 เดือน

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย

โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharides) เป็นสารประกอบซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลตั้งแต่สามถึงสิบโมเลกุล โดยโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถละลายได้ในน้ำ และให้รสชาติที่หวานที่มีความหวานประมาณ 0.3-0.6 เท่าของน้ำตาลซูโครส สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่างๆ ได้ เช่น นมผงทารก เครื่องดื่ม ขนมหวาน และผลิตภัณฑ์ขนมอบ เป็นต้น ข้อดีของโอลิโกแซ็กคาไรด์ คือ ป้องกันการเกิดฟันผุ ให้พลังงานต่ำโดยไม่มีผลต่ออินซูลินในเลือด เหมาะสำหรับบุคคลที่จะลดน้ำหนักหรือผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน [1] โอลิโกแซ็กคาไรด์จัดเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของบิฟีโดแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ตลอดจนช่วยให้เกิดความสมดุลในระบบทางเดินอาหาร [2] ผลิตภัณฑ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galacto-oligosaccharide) แลคทูโลส (lactulose) แลคโตซูโครส (lactosucrose) มอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (malto-oligosaccharide) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) และไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomalto-oligosaccharide) เป็นต้น [2,1]

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-ดี 1,6 กลูโคซิดิก (α-D- 1,6 glucosidic linkages) ประกอบด้วยน้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose) พาโนส (panose) ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านชนิดอื่นๆ เป็นต้น [1, 5]โครงสร้างของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แสดงดังภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [6]

การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายประเภท เช่น แป้ง น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำเชื่อมมอลโตส เป็นต้น [7, 8] กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์นิยมจะใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) พูลลูลาเนส (pullulanase) เบตาอะไมเลส (β-amylase) และทรานกลูโคซิเดส (tranglucosidase) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เบตาอะไมเลส และพูลลูลาเนสจะย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส ส่วนเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส จะช่วยเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชั่น (tranglucosylation) ทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [1,3]

เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ คือ เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส(tranglucosidase) หรือ ดี-กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (D-glucosyltransferase) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายและการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของแอลฟา-ดี-กลูโค-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (α-D-gluco-oligosaccharides) เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ทรานกลูโคซิเลชั่น(tranglucosylation) ผลจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไกลโคซิล (glycosyl residues) ที่เชื่อมต่อด้วยแอลฟา-ดี 1,6 กลูโคซิดิก [3,9]

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ การบริโภคจะไม่ทำให้เกิดฟันผุ ช่วยส่งเสริมการเจริญของบิฟิโดแบคทีเรียและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ของมนุษย์

ปัจจุบันมีการนำ ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์นม ขนมหวาน เต้าหู้ บิสกิต เค้ก โยเกิร์ต ไอศกรีม แยม และชอคโกแล็ต เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆที่ไม่ใช่อาหารอีกด้วย เช่น อุตสาหกรรมเภสัชภัณฑ์ และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น [1,3] นอกจากนั้นการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถใช้แหล่งวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูก โดยใช้กระบวนการผลิตด้วยวิธีทางเอนไซม์ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ง่าย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมากให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์เชิงอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าสูงขึ้น อีกทั้งจะเป็นการลดการนำเข้าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากต่างประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ ซึ่งจะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรม

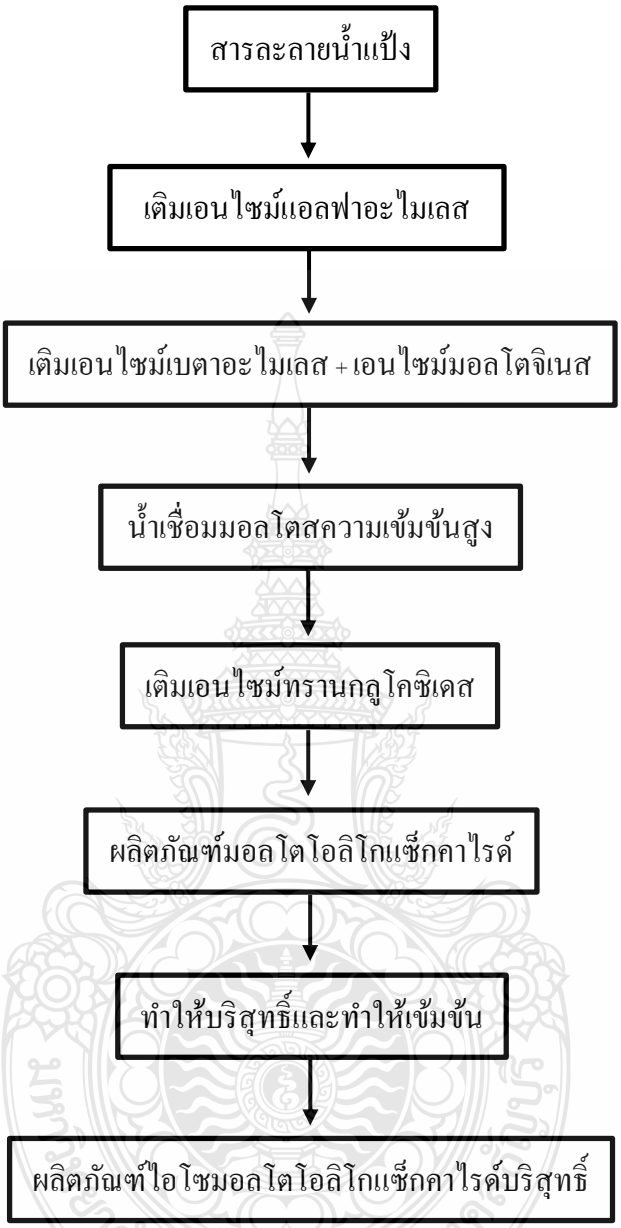
1.5.2 สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับแป้งมันสำปะหลังโดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เชิงอุตสาหกรรมที่มูลค่าสูง

บทที่ 2
วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharides, IMOs)

เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-ดี- 1,6 กลูโคซิดิก (α-D-1,6 glucosidic linkages) ประกอบด้วยน้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose) พาโนส (panose) ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านชนิดอื่นๆ เป็นต้น [3] ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบประเภทแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) พูลลูลาเนส (pullulanase) เบตาอะไมเลส (β-amylase) และ ทรานกลูโคซิเดส (transglucosidase) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เบตาอะไมเลส และพูลลูลาเนส จะย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส ส่วนเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชั่น (tranglucosylation) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [1,4]

การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายประเภท เช่น แป้ง น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำเชื่อมมอลโตส เป็นต้น [7, 8] กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์นิยมจะใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) พูลลูลาเนส (pullulanase) เบตาอะไมเลส (β-amylase) และทรานกลูโคซิเดส (tranglucosidase) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เบตาอะไมเลส และพูลลูลาเนส จะย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส ส่วนเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส จะช่วยเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชั่น (tranglucosylation) ทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [1,3] โดยแสดงกระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้ง [3]

2.2 กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะเริ่มจากการย่อยแป้งให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสด้วยเอนไซม์ น้ำเชื่อมมอลโตสเป็นสารละลายที่มีกลูโคส 2 โมเลกุลเป็นองค์ประกอบหลัก ลักษณะทั่วไปของน้ำเชื่อมมอลโตสเป็นของเหลวข้น รสหวาน ใส บางกรณีอาจมีสีเหลืองหรือ

สีน้ำตาลอ่อนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำเชื่อมว่าจะมีปริมาณมอลโตสในสัดส่วนใด กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสด้วยวิธีการทางเอนไซม์ โดยจะมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 การเตรียมแป้ง

การเตรียมน้ำแป้งจะเป็นตัวกำหนดผลิตภัณฑ์ที่ได้และกำลังในการผลิตผลิตภัณฑ์นั้นๆ ถ้าเตรียมน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นของแป้งมากจะได้ผลผลิตสูงใช้พลังงานในการต้มระเหยน้ำน้อย การผสมแป้งกับน้ำมีข้อกำหนด เนื่องจากความยืดหยุ่นของแป้งเมื่อถูกความร้อนถึงอุณหภูมิของการสุก (gelatinization) ฉะนั้นถ้าต้องการให้มีเนื้อแป้งในน้ำแป้งมากๆ ต้องทำการย่อยแป้งขณะที่แป้งกำลังจะสุกเพื่อให้ได้น้ำแป้งที่มีความหนืดต่ำ โดยทั่วไปจะเตรียมน้ำแป้งประมาณ 35-40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแล้วปรับพีเอชให้เหมาะสมต่อการย่อยขั้นต่อไป

2.2.2 การย่อยแป้งครั้งแรก (liquefaction)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งเริ่มต้นซึ่งการย่อยครั้งแรกเป็นการทำให้แป้งที่สุกมีความหนืดน้อยลงและแป้งบางส่วนถูกย่อยทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็กลง เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยภายในทำหน้าที่ตัดพันธะน้ำตาลกลูโคสที่จับกันเป็นแป้งจะได้แป้งที่มีโมเลกุลเล็กลงเป็นกลุ่มๆ ที่เท่าๆ กันวัดค่าสมมูลเดกซ์โทรสได้ 5-20 ในทางปฏิบัติควรรักษาสมมูลเดกซ์โทรสไว้ที่ 10-15 เพื่อป้องกันการรวมตัวกันหรือจับกันใหม่ของแป้งโมเลกุลใหญ่และเกิดตะกอนแขวนลอยที่กรองยากลักษณะการเกิดตะกอนเช่นนี้เรียกว่า การเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) เมื่อเตรียมน้ำแป้งได้ความเข้มข้นพอดีปรับพีเอชให้ถูกต้องคำนวณปริมาณเอนไซม์และเติมถูกต้อง อุณหภูมิประมาณ 100-105 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในช่วงนี้สามารถทนอุณหภูมิสูงและสามารถย่อยสลายแป้งในขณะที่อุณหภูมิสูงได้น้ำแป้งที่ย่อยแล้วในช่วงนี้มีค่าสมมูลเดกโทรสอยู่ที่ 10-15 หรือต่ำกว่า 20 เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า มอลโตเดกซ์ตริน ถ้าต้องการผลิตมอลโตเดกซ์ตรินก็เพียงนำแป้งที่ย่อยระดับนี้แล้วไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ คือ การกรองด้วยผงถ่านจนใสและนำไประเหยน้ำโดยเครื่องต้มระเหยให้ได้ความเข้มข้นจากเดิม 35-40 เปอร์เซ็นต์เป็นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์แล้วนำมาผ่านเครื่องพ่นผงจะได้ผลิตภัณฑ์มอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrins)

2.2.3 การย่อยแป้งขั้นสุดท้าย (saccharification)

เมื่อได้มอลโตเดกซ์ตรินซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำค่อนข้างใสไม่มีความหนืดแล้ว ทำการปรับพีเอชให้มีความเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นคำนวณปริมาณเอนไซม์ตามปริมาตรของมอลโตเดกซ์ตริน ซึ่งเอนไซม์มอลโตจิเนสและพูลูลาเนสเป็น endoenzyme ที่มีความสามารถในการตัดพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิกภายในโครงสร้างของอะไมโลเพกทินและค่า

สมมูลเดกซ์โทรสที่ได้หลังจากการย่อยอยู่ที่ 60 เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า มอลโตสไซรัป (maltose syrup) [27]

2.2.4 การทำบริสุทธิ์ (refining)

การทำให้บริสุทธิ์นั้นสะดวกสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากแป้งมันสำปะหลังเพราะมีสารประกอบ เช่น โปรตีน ไขมัน น้อยมาก สามารถกรองโดยใช้สารช่วยกรองและผงถ่านพร้อมกันได้ ปกติสามารถใช้เครื่องกรอง เช่น filter press หรือ vacuum drum filter ได้ หลังจากการกรองแล้วควรจะได้สารละลายใส ซึ่งขั้นตอนต่อไปคือการจับประจุด้วยการผ่าน ion-exchange resin

2.2.5 การต้มระเหย

กระบวนการต้มระเหยเป็นกระบวนการสุดท้ายที่ระเหยน้ำออกไป เพราะน้ำเชื่อมที่กรองและทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีความเข้มข้นของของแข็งประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ จึงจำเป็นต้องระเหยน้ำออกไปจนกระทั่งความเข้มข้นของของแข็งเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ในการต้มระเหยต้องทำให้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยการต้มระเหยภายใต้สุญญากาศ เพื่อป้องกันการแตกตัวของน้ำตาลมอลโตสเนื่องจากความร้อน [15]

หลังจากได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงแล้ว เติมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสเพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชั่น (tranglucosylation) ที่หมู่ 6-OH ของน้ำตาลกลูโคส ทำให้ได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมด้วยพันพันธะแอลฟา-ดี-(1,6) (α-D-(1,6)) ได้แก่ ไอโซมอลโตส พาโนส ไอโซมอลโตไตรโอส และเตตระแซ็กคาไรด์

2.3 พรีไบโอติก (Prebiotics)

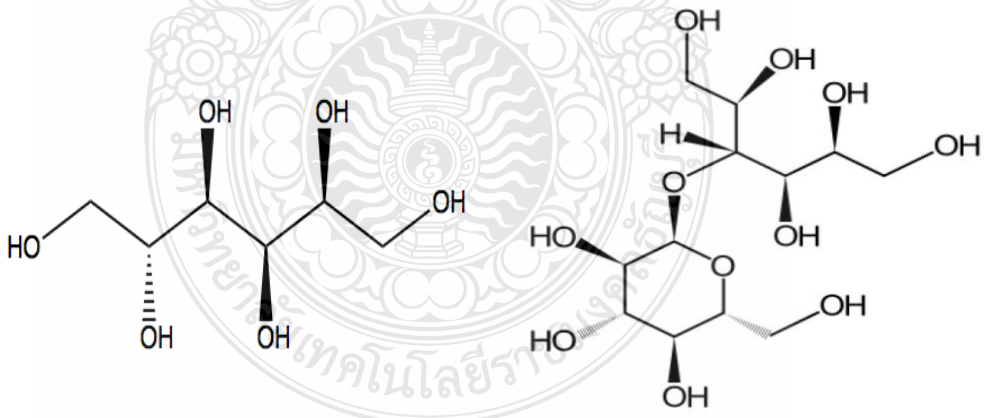
พรีไบโอติก เป็นสารประกอบพวกโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ซึ่งเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายและถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีผลช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ [49] จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะสร้างสารบางชนิดที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) และผลจากการย่อยยังทำให้ค่าพีเอชในลำไส้ลดลง ซึ่งผลดังกล่าวช่วยลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค [50] ซึ่งในลำไส้ใหญ่จะมีแบคทีเรียอยู่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกคือแบคทีเรียที่มีประโยชน์ (beneficial bacteria) เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* กลุ่มที่สอง คือ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) เช่น *Esherichia coli*, *Salmonella* และ *Clostridium* [51]

2.3.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

สารที่สามารถจัดเป็นพรีไบโอติกได้นั้นจะต้องมีคุณสมบัติคือ สารนั้นจะไม่ถูกย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร ไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนที่ไปถึงลำไส้ใหญ่ในสภาพที่สมบูรณ์ [52, 53, 54] สามารถที่จะเกิดการหมักในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น *Bifidobacteria* sp. และ *Lactobacillus* sp. อีกทั้งส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร และไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค [49] เพื่อใช้เป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถนำสารเหล่านี้มาใช้ในการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนอีกด้วย

2.3.2 ประเภทของพรีไบโอติก [51]

2.3.2.1 น้ำตาลแอลกอฮอล์ (alcohol sugar) จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโครงสร้างหรือดัชนีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) เพียง 1-2 ตัว สารที่อยู่ในกลุ่มนี้เช่น แมนนิทอล, ซอบิทอล, ไอโซมอลต์ และ ไซลิทอล เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.2 บางครั้งจะเรียกว่า พอลิออล (Polyols) สามารถเป็นสารให้ความหวานได้ โดยมีความหวานประมาณ 3 ใน 4 หรือครึ่งหนึ่งของน้ำตาลทั่วไป และยังดูดซับได้ช้าในลำไส้เล็กเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาล จึงทำให้น้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ



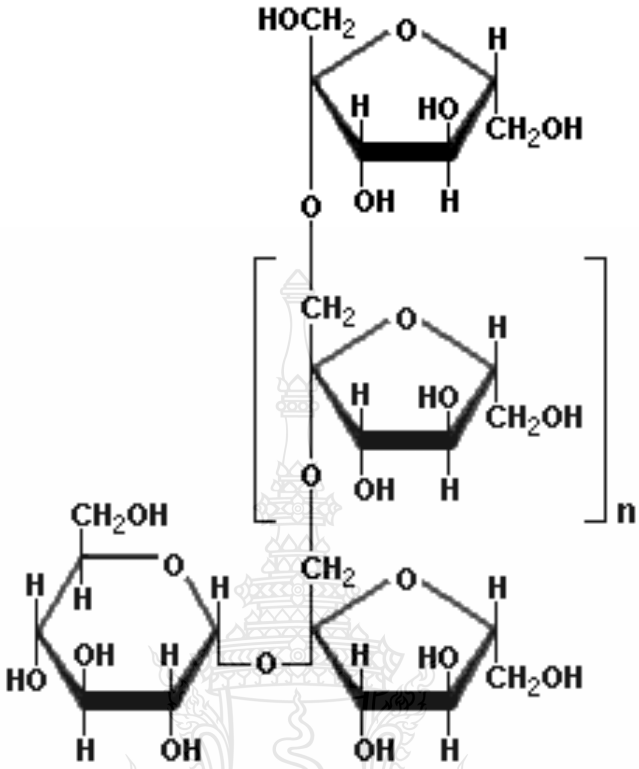
(ก) (ข)

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของ (ก) ซอบิทอล (sorbitol) (ข) แมนนิทอล (mannitol) [55]

2.3.2.2 Resistant starch เป็นแป้งหรือผลิตภัณฑ์แป้งที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์และดูดซึมภายในลำไส้เล็กของมนุษย์ปกติได้ ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะและแหล่งที่มาได้ 3 ประเภท คือ ประเภทที่ 1 แป้งที่มีลักษณะทางกายภาพขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (physically inaccessible starch; RS1) โดยเม็ดแป้งอาจถูกห่อหุ้มภายในร่างแหของโปรตีนหรือถูกตรึงอยู่ภายในเซลล์เมล็ดพืช ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาในเม็ดแป้งได้ ประเภทที่ 2 เม็ดแป้งดิบที่ทนทานต่อการทำงานของเอนไซม์ (raw starch granules; RS2) ได้แก่ เม็ดแป้งมันฝรั่งดิบ เม็ดแป้งกล้วยดิบ และเม็ดแป้งจากเมล็ดถั่ว โดยความคงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างตามธรรมชาติของเม็ดแป้งที่ไม่มีรูหรือช่องเปิดให้เอนไซม์เข้าไปในเม็ดแป้ง การเกิดเจลาติไนซ์ของแป้งจะช่วยจะช่วยให้เอนไซม์สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเม็ดแป้งได้มากขึ้น และประเภทที่ 3 แป้งคืนตัว (retrograded starch; RS3) Resistant starch ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในประเภท Retrograded starch ได้แก่ อาหารที่ผ่านการให้ความร้อนจนแป้งเกิดเจลาติไนซ์ แล้วถูกทำให้เย็นตัวลง ทำให้ส่วนอะไมโลส (พอลิเมอร์เชิงเส้นของกลูโคส) เกิดการเรียงตัวใหม่ได้เป็นผลึกแป้งที่แข็งแรงและทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ ดังนั้นแป้งที่มีอัตราส่วนของอะไมโลสสูงกว่าจะสามารถเกิดรีโทรเกรเดชั่นได้มากกว่าแป้งที่มีอะไมโลเพกทิน (พอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส) สูง แป้งที่มีปริมาณอะไมโลสสูงก็สามารถผลิต Resistant starch ได้ในระดับสูงเช่นเดียวกัน พืชส่วนใหญ่จะมีอะไมโลสอยู่ประมาณ 20-25 เปอร์เซ็นต์

2.3.2.3 Non-starch polysaccharides เป็นสารที่ได้จากพืช เช่น Pectin, Hemicellulose, Guar, Cellulose และ Xylan

2.3.2.4 Inulin เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้และมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตให้กับพืช พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น ชิโครี่ เห็ด หัวหอม หัวกระเทียม กล้วย เป็นต้น โครงสร้างของอินนูลินประกอบด้วย ฟรุกโตส (fructose) 80 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส (glucose) 20 เปอร์เซ็นต์ เชื่อมกันด้วยพันธะเบตา 2-1 (β 2-1) ที่มีความยาวตั้งแต่ 2-60 หน่วย ดังแสดงในภาพที่ 2.3 โดยทั่วไป อินนูลินมีขนาดโครงสร้างหรือค่าดัชนีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) ประมาณ 10 (ส่วนค่า DP ของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยทั่วไปเท่ากับ 4) และตามโครงสร้างจะมีโอลิโกฟรุกโตส ประกอบอยู่เป็นโครงสร้างกลุ่มย่อยโดยพืชต่างชนิดกันจะมีปริมาณอินนูลิน และโอลิโกฟรุกโตส ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จากการทดลองนำอินนูลิน และโอลิโกฟรุกโตสให้ผู้ใหญ่จำนวน 8 คน ในปริมาณ 15 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 15 วัน พบว่า พรีไบโอติกทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มปริมาณ *Bifidobacteria* ได้ [49]



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของโมเลกุลอินนูลิน (inulin) [55]

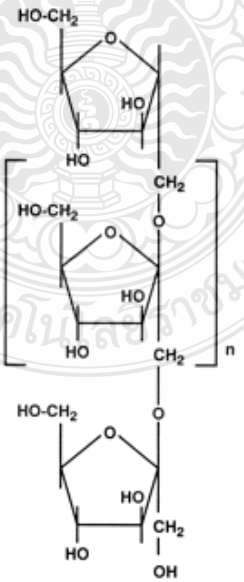
ตารางที่ 2.1 ปริมาณอินนูลินและโอลิโกฟรุกโตสในอาหารชนิดต่างๆ [51]

พืช	ปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโอลิโกฟรุกโตส (เปอร์เซ็นต์)
หัวหอม (onion)	2-6	2-6
แก่นตะวัน (jerusalem artichoke)	16-20	16-20
ชิโครี่ (chicory)	15-20	5-10
แอสปารากัส (asparagus)	1-30	1-20
ต้นกระเทียม (leek)	3-10	2-5
กระเทียม (garlic)	9-16	3-6

ตารางที่ 2.1 ปริมาณอินนูลินและโอลิโกฟรุกโตสในอาหารชนิดต่างๆ [51] (ต่อ)

พืช	ปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโอลิโกฟรุกโตส (เปอร์เซ็นต์)
อาร์ติโชค (artichoke)	3-10	<1
กล้วย (banana)	0.3-0.7	0.3-0.7
ข้าวสาลี (wheat)	1-4	1-4
ข้าวไรย์ (rye)	0.5-1	0.5-1
ข้าวบาเลย์ (barley)	0.5-1.5	0.5-1.5

2.3.2.5 Sugar and Oligosaccharides สำหรับพรีไบโอติกในกลุ่มนี้ จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้น (short-chain polysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-20 หน่วย ตัวอย่างเช่น raffinose, stachyose, fructooligosaccharides (FOS) ดังแสดงในภาพที่ 2.4 นอกจากนี้ยังมี lactose, lactulose, galacto-oligosaccharides (GOS), soybean oligosaccharide, lactosucrose, isomalto-oligosaccharide, gluco-oligosaccharide, xylo-oligosaccharide และ palatinose ที่สามารถจัดเป็นพรีไบโอติกได้ด้วย



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างโมเลกุลของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [55]

2.3.2.6 Mucin glycoproteins ถูกสร้างโดย globelt cells ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้และเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในไส้

2.3.2.7 Related mucopolysaccharides เช่น chondroitin sulphate, heparin, pancreatic และ bacterial secretions ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้

2.3.2.8 Protein and peptides สารเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหาร สร้างโดยการหลั่งของตับอ่อนหรือสร้างโดยแบคทีเรีย แต่จะมีปริมาณน้อยกว่าพวกคาร์โบไฮเดรต

2.3.3 ประโยชน์ของพรีไบโอติก

ประโยชน์ต่อสุขภาพของพรีไบโอติกจะมีความเกี่ยวข้องกันกับประโยชน์ของโปรไบโอติก ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มนี้แล้วทั้งแบคทีเรียเองและสารที่เกิดจากกระบวนการในการใช้พรีไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอนก็มีบทบาทต่อผู้บริโภค เช่น ช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบทางเดินอาหาร มีผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด และมีผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้

2.3.3.1 ผลต่อระบบทางเดินอาหาร พรีไบโอติกทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนของมนุษย์เมื่อมาถึงลำไส้ใหญ่ก็จะเป็นอาหารให้กับแบคทีเรียในลำไส้ เมื่อแบคทีเรียนำไปใช้ก็จะให้พลังงานและสาระสำคัญบางชนิดกับร่างกาย ตัวอย่างเช่น inulin-type fructans ให้กรดแลคติก (lactic acid) และกรดไขมันชนิดสั้น (short-chain fatty acid) ซึ่งเป็นผลิตผลจากกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งการหมักนี้จะทำให้มีการกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacteria* ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ชีวภาพ และในสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* ในลำไส้ จึงช่วยป้องกันท้องเสีย โดยเฉพาะจากการติดเชื้อได้ นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติคล้ายใยอาหารอื่นๆ ก็จะช่วยบรรเทาอาการท้องผูก เนื่องจากผลของการเพิ่มน้ำหนักของอุจจาระและผลต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ จึงช่วยให้ขับถ่ายง่ายขึ้น นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาถึงผลของพรีไบโอติกในการต้านมะเร็ง (anticarcinogenic effect) ซึ่งก็สามารถนำผลที่มีต่อทางเดินอาหารมาอธิบายได้เช่นกัน

2.3.3.2 ผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด ปกติพวกใยอาหารหรือพรีไบโอติกจะรบกวนการดูดซึมของเกลือแร่ด้วยการไปจับกับแร่ธาตุไว้ในโครงสร้างที่ซับซ้อน ทำให้ไม่สามารถถูกดูดซึมได้ที่ลำไส้เล็ก จะเดินทางมาถึงลำไส้ใหญ่จากนั้นจะปลดปล่อยแร่ธาตุออกมา เมื่อมีการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ได้กรดไขมันชนิดสายสั้น ความเป็นกรดก็จะช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด ได้แก่ แคลเซียมและแมกนีเซียม นอกจากนี้อาจจะเป็นกลไกที่ทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic

effect) จะดึงน้ำเข้ามาช่วยในการละลายเกลือแร่ต่างๆ ได้ และมีพรีไบโอติกช่วยเรื่องการดูดซึมแคลเซียม และอาจส่งผลลดความเสี่ยงต่อกระดูกพรุนอีกด้วย

2.3.4 แหล่งของพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติจะพบได้ในผักและผลไม้ เช่น กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว กลุ่มธัญพืช และพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้ง [56] ซึ่งในปัจจุบันพรีไบโอติกที่นำมาใช้ทางการค้าและในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์

2.3.5 การผลิตพรีไบโอติก [57]

การผลิตพรีไบโอติกทำได้หลายวิธี ทั้งการสกัดโดยตรงจากพืชที่มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์สูง เช่น กล้วย ข้าวสาลี หัวกระเทียม หัวหอม หรือพืชต่างประเทศ เช่น ชิโคริ่ (chicory) และแก่นตะวัน (jerusalem artichoke) เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันนิยมผลิต พรีไบโอติกโดยใช้ชีววิธี คือ การใช้เอนไซม์ และการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี ตามตารางที่ 2.2 แสดงกระบวนการผลิตพรีไบโอติก

ตารางที่ 2.2 กระบวนการผลิตพรีไบโอติกทางการค้า [58]

วิธีการผลิต	ตัวอย่างพรีไบโอติก
1. การสกัดโดยตรงจากพืชผักผลไม้ที่มีส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์	-ซอยบีนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (soybean oligosaccharide) จากน้ำนมถั่วเหลือง -อินูลิน (inulin) จากชิโคริ่
2. การใช้เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์แล้วใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟฟีทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์	-ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ -ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylo-oligosaccharide) จากซังข้าวโพด
3. กระบวนการทรานไกลโคซิเลชั่น (transglycosylation) คือ การใช้เอนไซม์เพื่อสังเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์แล้วใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟฟีทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์	-กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จากแลคโตส -ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จากซูโครส
4. กระบวนการทางเคมี	-แลคตูโลสจากปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชั่นของแลคโตส

2.3.6 การสกัดพรีไบโอติก

เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดสำหรับการผลิตพรีไบโอติก คือสามารถสกัดโดยตรงจากพืชหรือผลไม้ที่มีสารพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น การสกัดอินูลินจากชิโครี่เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ โดยการสกัดด้วยน้ำร้อน จากนั้นใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟฟีเพื่อทำอินูลินที่ได้ให้มีความบริสุทธิ์และเข้มข้น จากนั้นนำไปทำให้เป็นผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer machine) เพื่อนำไปผสมเป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ โดยใช้วิธีการสกัดพรีไบโอติกได้ 2 วิธี คือ ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction) และเทคโนโลยีเอนไซม์ (enzyme technology)

2.3.6.1 ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction)

แลคตูโลสเป็นพรีไบโอติกชนิดเดียวในปัจจุบันที่ผลิตโดยใช้กระบวนการทางเคมี [59] โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้ด่างเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชั่น (isomerization) ของโมเลกุลกลูโคสซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำตาลแลคโตสให้กลายเป็นฟรุกโตส เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Lbry de Bruyn-Alberda van Ekenstein ปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชั่นนี้ทำงานภายใต้สภาวะที่เป็นด่างโดยนิยมใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) และบอเรต (borate) โดยเมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้วจะทำให้เกิดแลคตูโลสได้ดังสมการที่ 2-1

(2-1)

2.3.6.2 เทคโนโลยีเอนไซม์ (enzyme technology)

การผลิตพรีไบโอติกโดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์มีวัตถุประสงค์ทั้งเพื่อย่อยสลายและสังเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์จากสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งแม้ว่าปฏิกิริยาทางเคมีจะสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ แต่การผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีจะต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรง เช่น สภาวะที่มีความด่างและอุณหภูมิสูง และอาจเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการได้ ซึ่งจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการกำจัดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงดังกล่าวด้วย ดังนั้นการผลิตพรีไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้เทคโนโลยีเอนไซม์เนื่องจากควบคุมการผลิตได้ง่ายและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากความจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต

1) การใช้เอนไซม์สังเคราะห์ (enzymatic synthesis)

พรีไบโอติกบางชนิด เช่น ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และทรานกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 พรีไบโอติกที่ถูกสังเคราะห์จากเอนไซม์

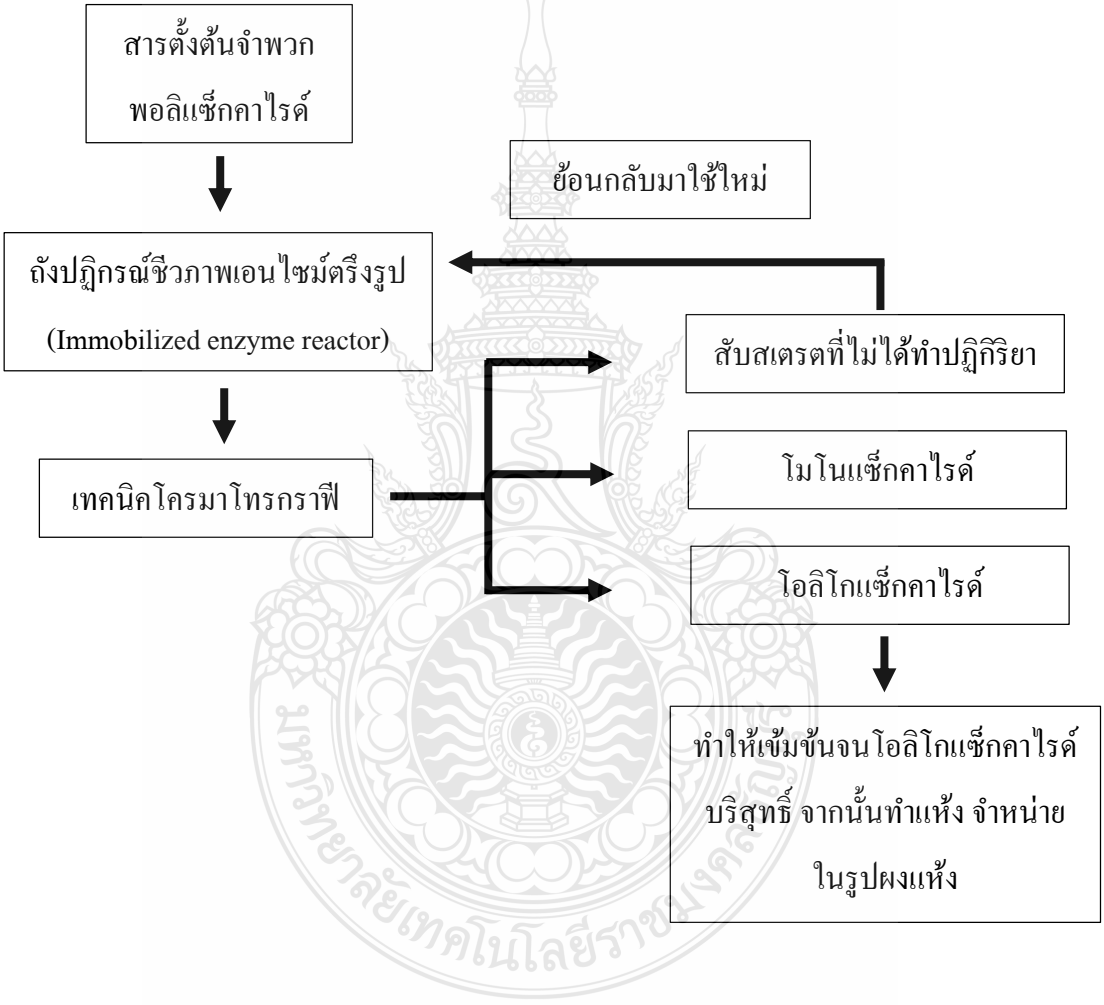
ชนิดของพรีไบโอติก	เอนไซม์	เอกสารอ้างอิง
ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	ฟรุกโตซิลทรานสเฟอร์เรส	[60]
ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	เบตา-กาแลคโตซิเดส	[61]
ทรานกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	เอนไซม์ผสมของอะไมเลส พูลูลาเนส และแอลฟากลูโคซิเดส	[62]

ปัจจัยในการใช้เอนไซม์เพื่อสังเคราะห์พรีไบโอติกต้องคำนึงถึงแหล่งที่มาของเอนไซม์ กลไกการทำงานของเอนไซม์ สภาวะที่ใช้ในการผลิตและชนิดของสับสเตรทที่ใช้ปัจจัยต่างๆ จะส่งผลถึงคุณภาพและองค์ประกอบของสารพรีไบโอติกได้โดยตรง เช่น การผลิตทรานสกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะให้องค์ประกอบของทรานกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน เช่น Tanaka *et al.* [63] ใช้เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสจาก *Aspergillus oryzae* พบว่าได้ทรานสกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharides) เตตราแซ็กคาไรด์ (tetracaccharides) เพนตะแซ็กคาไรด์ (pentasaccharides) และเฮกซะกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (hexagalacto-oligosaccharides) ในขณะที่ Ito *et al.* [64] ได้ทรานสกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยไดแซ็กคาไรด์ (disaccharides) โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharides) เตตราแซ็กคาไรด์ (tetrasaccharides) เพนตะแซ็กคาไรด์ (pentasaccharides) และเฮกซะกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (hexagalacto-oligosaccharides) เมื่อใช้เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสจาก *A. oryzae* ร่วมกับเบตากาแลคโตซิเดสจาก *Streptococcus thermophiles*

2) การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย (enzymatic hydrolysis)

พรีไบโอติกส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการผลิตสารพรีไบโอติก คือการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์

เช่น แป้ง และเซลลูโลส เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มักอยู่ในรูปของสารผสมของโอลิโกแซ็กคาไรด์หลายชนิด จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการคัดแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ เช่น เทคนิคโครมาโทรกราฟฟี เป็นต้น รูปแบบการผลิตพรีไบโอติกโดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายแสดงดังภาพที่ 2.5 ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 85-99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2.5 การผลิตพรีไบโอติกโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ [58]

2.4 มันสำปะหลัง (Cassava)

มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (lowland topics) [12] การปลูกมันสำปะหลังเริ่มในแถบประเทศบราซิล ชาวยุโรปเป็นผู้นำมันสำปะหลังมาปลูกในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ และในปัจจุบันกลายเป็นพืชปลูกสำคัญของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย และอินโดนีเซีย

2.4.1 การจัดลำดับทางด้านอนุกรมวิธานของมันสำปะหลัง

Kingdom Plantae

Phylum Magnoliophyta

Class Magnoliopsida

Order Malpighiales

Family Euphorbiaceae

SubFamily Crotonoideae

Tribe Manihoteae

Genus *Manihot*

Species *M. esculenta*

2.4.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

2.4.2.1 ลักษณะทั่วไป หัวมันสำปะหลัง คือ รากสะสมอาหาร การแปรรูปหัวมันสำปะหลัง อาจนำมาต้ม ย่าง ปิ้ง เชื่อม หากนำไปตากแห้งและบดละเอียดจะได้แป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้ทำอาหาร นอกจากนี้ยังใช้ทำกาว และเป็นวัตถุดิบในการผลิตผงชูรส

ไม้พุ่ม มีรากสะสมอาหารเป็นหัวยาว ลำต้นเปราะ ใบเดี่ยว เรียงเวียน หยักเป็นแฉกลึก 3-7 แฉก แต่ละแฉกรูปช้อนหรือรูปใบหอกแกมรูปแถบ ปลายใบเรียวแหลม ดอกออกที่ปลายกิ่งหรือซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ช่อดอกแบบช่อกระจะ หรือช่อแยกแขนง กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูประฆัง หยักเป็นกลีบ 5 กลีบ เกสรเพศผู้ 10 ผลรูปทรงกลม เป็นสันหรือปีกสั้นๆ 6 ปีก ดังภาพที่ 2.6

ก.

ข.

ภาพที่ 2.6 ลักษณะทั่วไปของมันสำปะหลัง

ก. ใบของมันสำปะหลัง [13]

ข. รากของมันสำปะหลัง [13]

2.4.2.2 ประโยชน์ของมันสำปะหลัง มันสำปะหลังสามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้หลายประเภท ดังภาพที่ 2.7 โดยประโยชน์ที่สำคัญของมันสำปะหลังมีดังนี้

1) ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยใช้เป็นอาหารหลัก และอาหารเสริม มันสำปะหลังที่ผลิตได้ในโลกประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยเฉพาะในทวีปแอฟริกา และอเมริกาใต้ ใช้มันสำปะหลังเป็นอาหาร การใช้เป็นอาหารของมนุษย์อาจจะใช้ต้ม ทอด หรือปิ้ง

2) ใช้ทำแป้ง แป้งมันสำปะหลังใช้เป็นอาหารของมนุษย์โดยตรง และเป็นสารสำคัญใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำกาว การทำกระดาษ การทอผ้า การผลิตน้ำตาลกลูโคส และเดกซ์โทรส เป็นต้น

3) ใช้หมักทำแอลกอฮอล์ เบียร์ และขนมปัง ในบางประเทศ อย่างเช่น ประเทศบราซิลกำลังใช้หัวมันสำปะหลังหมักเป็นแอลกอฮอล์ เพื่อใช้แทนน้ำมันเบนซินสำหรับเครื่องยนต์

4) ใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยทำเป็นมันเส้น มันสำปะหลังอัดเม็ด และกากมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานผสมในอาหารสัตว์

2.5 องค์ประกอบของแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 : 10 : 5 มีสูตรทางเคมีทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1

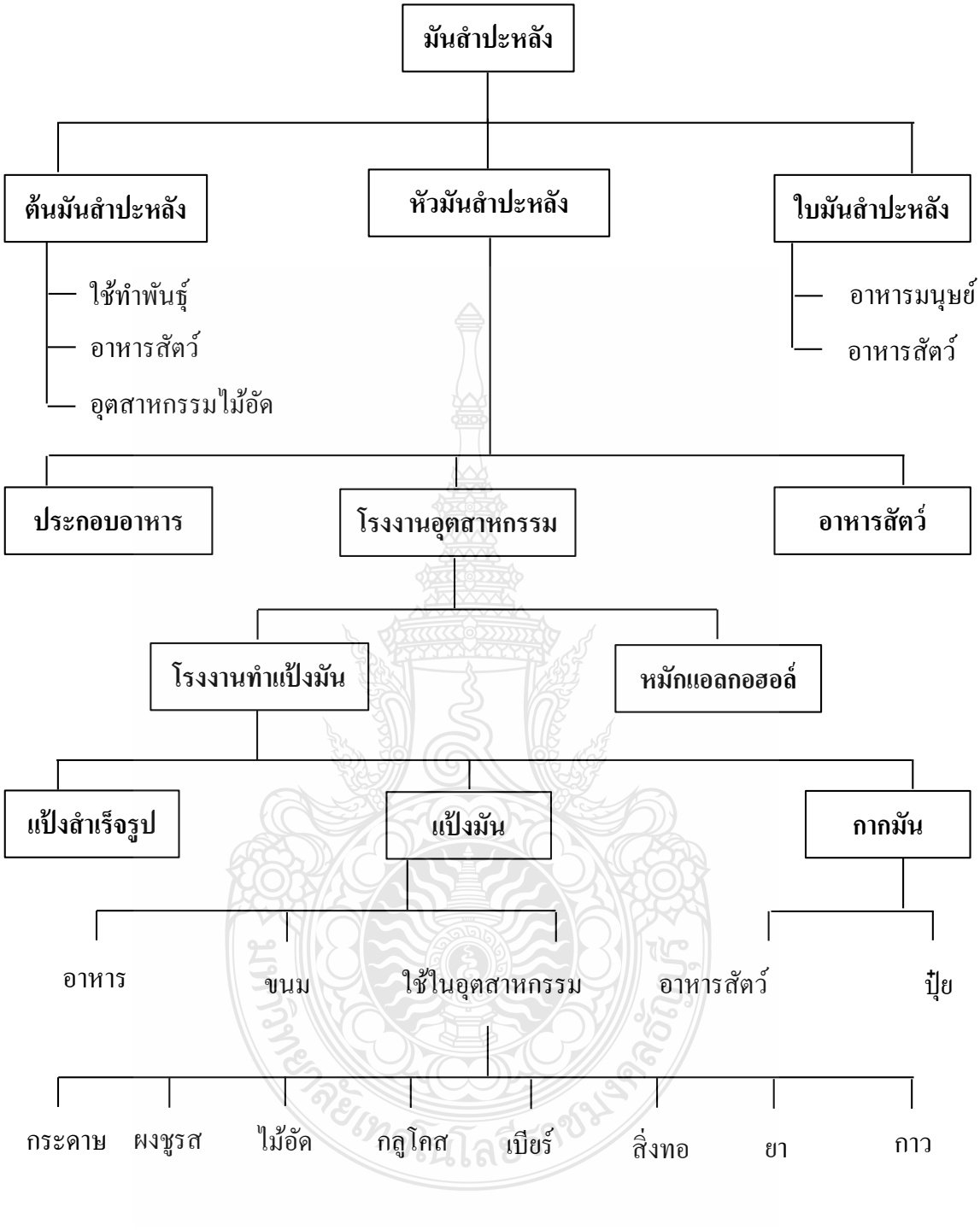
บริเวณปลายสายของพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซิง (reducing end group) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์แบบกิ่ง (อะไมโลเพกทิน) ดังภาพที่ 2.8 แป้งจากแหล่งที่มาต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกทินแตกต่างกัน จึงทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกันดังตารางที่ 2.4

2.5.1 อะไมโลส (amylose)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก (α-1,4 glucosidic linkages) ดังภาพที่ 2.8 จำนวนหน่วยของกลูโคสจะเรียกว่า DP (degree of polymerization) ซึ่ง DP จะแปรผันตามแหล่งของอะไมโลส เช่น แป้งมันฝรั่งหรือแป้งมันสำปะหลังจะมี DP 1,000-6,000 ในขณะที่แป้งข้าวโพดหรือแป้งสาลีจะมี DP 200-1,200 คุณสมบัติของอะไมโลสมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี ขณะที่ต้มน้ำจะมีลักษณะข่นความหนืดต่ำ เมื่ออุณหภูมิลดลงเกิดการคืนตัวได้มาก

2.5.2 อะไมโลเพกติน (amylopectin)

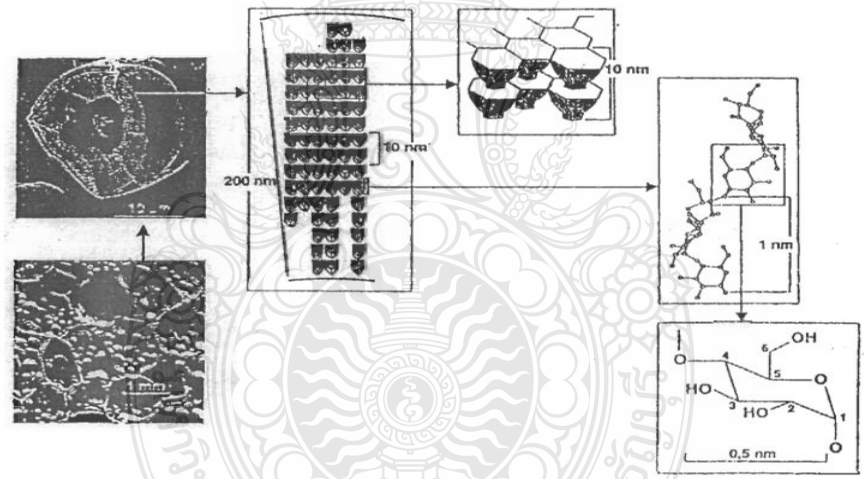
อะไมโลเพกตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์เชิงเส้นของกลูโคส 10-60 หน่วยที่เชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก และพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส 15-45 หน่วยที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก ดังภาพที่ 2.9 คุณสมบัติของอะไมโลเพกตินขณะต้มน้ำจะใสและมีความหนืดสูง เมื่ออุณหภูมิลดลงจะเกิดการคืนตัวน้อย เพราะโมเลกุลของอะไมโลเพกตินเรียงตัวไม่เป็นระเบียบจึงรวมตัวกันได้ยาก [15]



ภาพที่ 2.7 การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง [11]

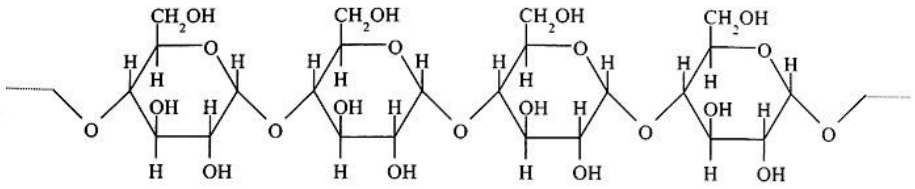
ตารางที่ 2.4 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน [16]

คุณสมบัติ	อะไมโลส	อะไมโลเพกทิน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	α- 1,4	α- 1,4 และ α- 1,6
ขนาด	200 -2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อน ทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

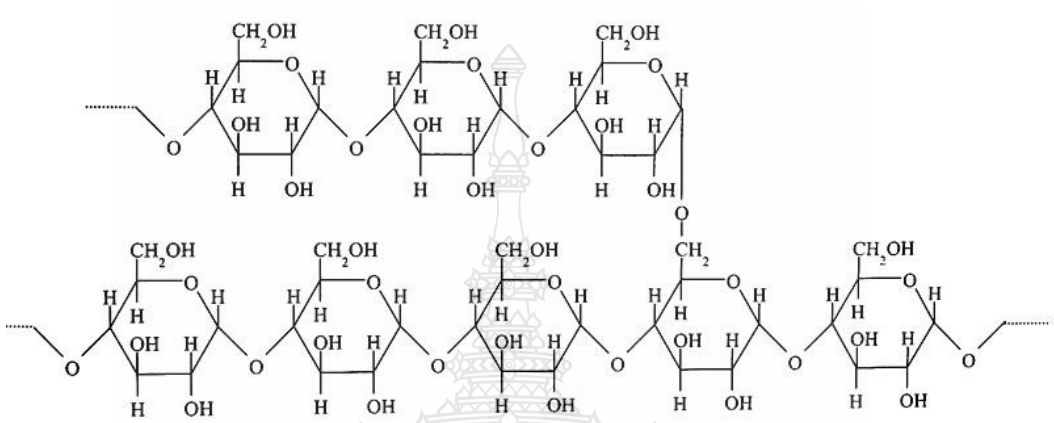


ภาพที่ 2.8 โครงสร้างภายในเม็ดแป้ง ได้แก่

1. อะไมโลส (amylose) [10]
2. อะไมโลเพกทิน (amylopectin) [10]
3. สารตัวกลาง (intermediate material) [10]



อะไมโลส

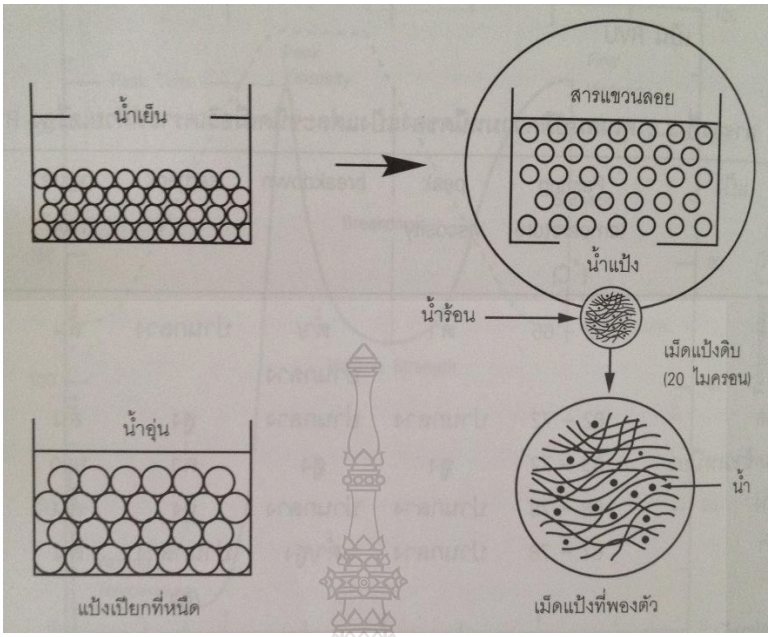


อะไมโลเพกติน

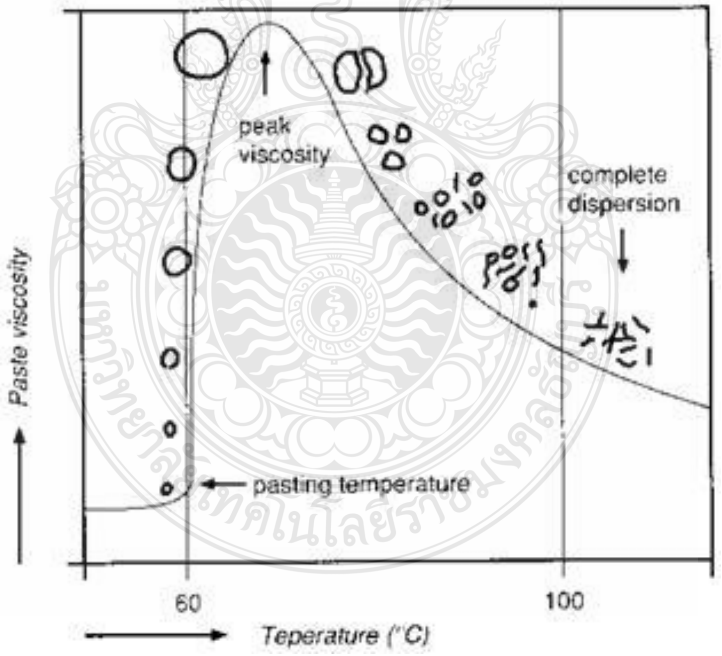
ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน [14]

2.6 คุณสมบัติของแป้ง

เมื่อแป้งผสมในน้ำแป้งจะแตกตัวเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ในน้ำ แต่จะไม่ละลายน้ำเนื่องจากอนุภาคของแป้งจะมีขนาดใหญ่เกินที่จะละลายน้ำได้แป้งจะมีความหนาแน่นค่อนข้างสูงประมาณ 1.45-1.64 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร (ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) ดังนั้นแป้งจึงพร้อมที่จะตกตะกอน หลังจากแขวนลอยอยู่แต่เมื่ออุณหภูมิของสารแขวนลอยสูงขึ้นประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) น้ำจะเข้าไปใน amorphous region และพลังงานความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจน ดังภาพที่ 2.10 ใน crystalline region ทำให้สามารถเข้าไปในเม็ดแป้งมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เม็ดแป้งเกิดบวมอย่างรวดเร็ว ความหนาแน่นจะลดลงความหนืดจะสูงขึ้น นอกจากนั้นผิวของเม็ดแป้งจะเปิดมากขึ้น จนเม็ดแป้งเกิดการแตกต่างฉับพลัน ทำให้อะไมโลสออกจากเม็ดแป้งเกิดเป็นเจลขึ้น ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า การเกิดเจลาทิไนเซชัน (gelatinization) ดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.10 การเปลี่ยนแปลงของเม็ดแป้งในระหว่างการหุงต้ม [10]



ภาพที่ 2.11 ระยะในการเกิดเจลาทิไนเซชันของเม็ดแป้ง [10]

2.7 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นกระบวนการผลิตที่โรงงานโดยทั่วไปใช้กันอยู่ในปัจจุบัน มีขั้นตอนการผลิตดังนี้

2.7.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ในขั้นแรกของการเตรียมรับมันสำปะหลัง ทางโรงงานจะสุ่มตัวอย่างนำมาตรวจวัดความหนาแน่น โดยใช้เครื่องวัดแบบ Reimann scale ดังภาพที่ 2.12 เพื่อประมาณของแข็ง (เชื้อแป้ง) ในหัวมันเพื่อตกลงราคาซื้อขาย แล้วนำมาเทไว้บนลาน จากนั้นจะใช้รถตักตักหัวมัน (root hopper) แล้วผ่านระบบสายพานลำเลียงไปสู่เครื่องร่อนดินทราย (root siever) ดังภาพที่ 2.13 ซึ่งมีลักษณะเป็นถังตะแกรงกลมที่มีการหมุนตามแนวนอน หมุนด้วยความเร็ว 10-15 รอบ/นาที หัวมันจะถูกหมุนและเคลื่อนตัวตามเกลียวเหล็กในตะแกรง ทำให้ดินทรายและเศษเปลือกหรือรากไม้ที่ปะปนมาให้ล่วงหล่นผ่านช่องตะแกรงลงไป

จากนั้นหัวมันจะถูกล้างให้สะอาดโดยผ่านเครื่องล้างหัวมัน (root washer) ดังภาพที่ 2.14 มีลักษณะเป็นทรงกระบอกผ่าครึ่งตามแนวนอนขั้นเป็นช่องๆ ภายในมีใบพัดหมุนกวนหัวมันและตักหัวมันจากช่องหนึ่งไปยังช่องถัดไปเรื่อยๆ เพื่อล้างเอาเศษดินทรายที่ยังติดอยู่กับหัวมันออกไปกับน้ำ

ภาพที่ 2.12 เครื่องมือวัดความหนาแน่นของหัวมัน [17]

ภาพที่ 2.13 เครื่องร่อนดินทราย [18]

ภาพที่ 2.14 เครื่องล้างหัวมัน [18]

2.7.2 การโม่หัวมันสำปะหลัง

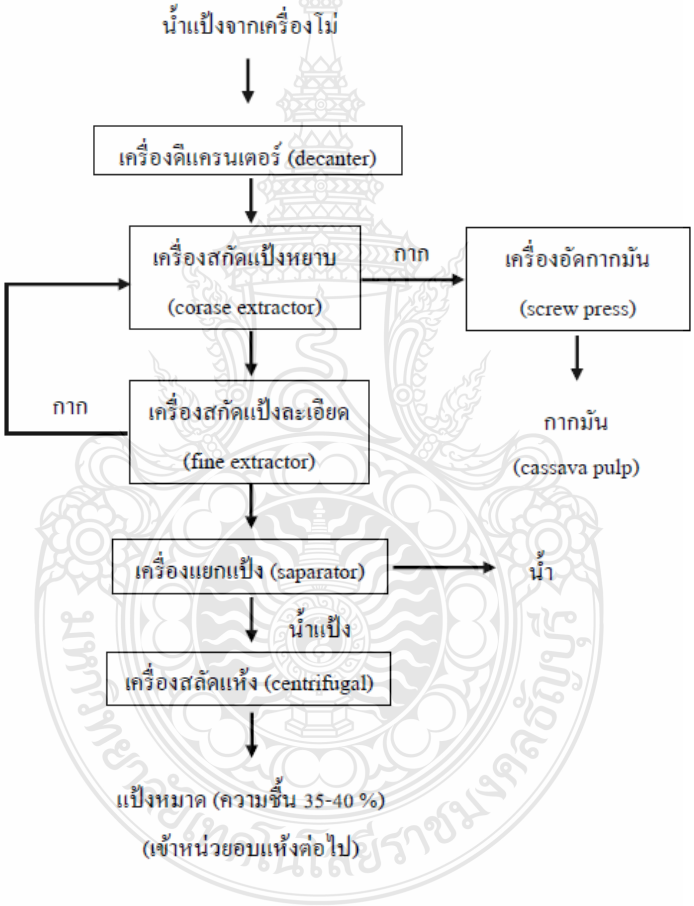
หลังจากหัวมันสำปะหลังผ่านขั้นตอนการล้างทำความสะอาดจากเครื่องล้างหัวมันแล้ว จะถูกลำเลียงด้วยสายพานเพื่อเข้าสู่เครื่องสับหัวมัน (root chopper) ดังภาพที่ 2.15 ทำหน้าที่สับหัวมันให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นหัวมันขนาดเล็กจะผ่านท่อที่มีลักษณะเป็นรูปขากางเกง ลงสู่เครื่องโม่ (rasper) ดังภาพที่ 2.16

ภาพที่ 2.15 เครื่องสับหัวมัน [18]

ภาพที่ 2.16 เครื่องโม่หัวมัน [18]

2.7.3 การสกัดแป้ง

ขั้นตอนการสกัดแป้ง ดังภาพที่ 2.17 มีรายละเอียดดังนี้ ของเหลวข้นจากเครื่องโม่จะถูกปั๊มเข้าสู่เครื่องดีแคนเตอร์ (decanter) ซึ่งเป็นเครื่องแยกน้ำทิ้งที่มีโปรตีนและไขมันออกจากเนื้อแป้ง โดยอาศัยหลักของแรงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force) แรงเหวี่ยงทำให้ส่วนที่เป็นของแข็ง (แป้งและกาก) ถูกแรงเหวี่ยงทำให้ติดรอบผนัง (bowl wall) ที่แกนกลางมีเกลียวติดอยู่โดยรอบ (conveyor screw หรือ scroll) เกลียวนี้มีไว้เพื่อส่งผ่านของแข็งที่ติด “bowl wall” ออกที่ปลายกรวย ดังนั้นส่วนของแข็งที่เป็นแป้งรวมทั้งเส้นใยและกากจะถูกเหวี่ยงแยกออกเป็นน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นสูง แล้วเข้าหน่วยสกัดแป้งต่อไป



ภาพที่ 2.17 ขั้นตอนการสกัดแป้ง [19]

น้ำแป้งจากเครื่องดีแคนเตอร์จะถูกปั๊มเข้าสู่เครื่องสกัดแป้ง (extractor) ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้แยกน้ำแป้งออกจากเส้นใยและกาก มีลักษณะเป็นตะกร้ากรองที่อาศัยแรงหนีศูนย์กลาง (continuous perforate-basket centrifugal) โดยการเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำๆ ประมาณ 600-800

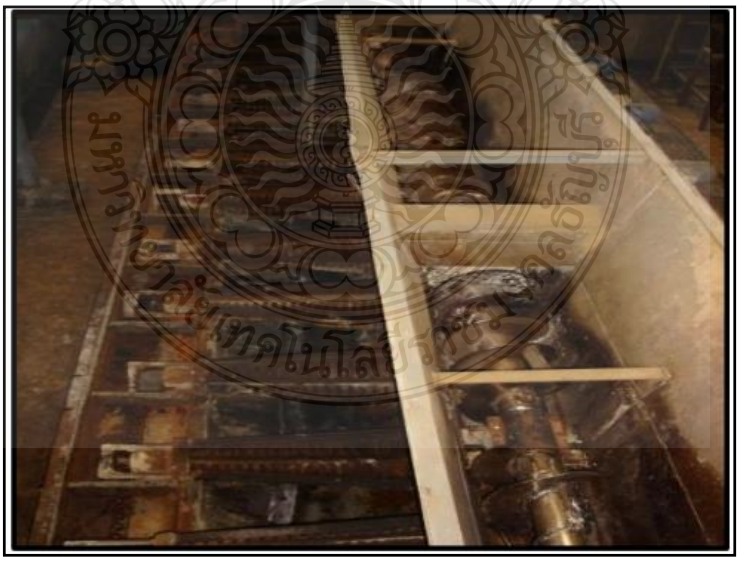
รอบ/นาที น้ำแป้งจะถูกปั๊มเข้าสู่ด้านบนของเครื่อง และมีการฉีดน้ำอย่างสม่ำเสมอผ่านท่อ 2 ท่อ ทางด้านบนเหมือนกัน แรงเหวี่ยงทำให้แป้งซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กสามารถผ่านการกรองไหลลงถังรวมน้ำแป้งด้านล่าง ประสิทธิภาพการทำงานประมาณ 0.75-1.50 ตัน (โดยน้ำหนักแห้ง)/ชั่วโมง

เครื่องสกัดแป้งแบ่งตามหน้าที่ตามการกรองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดสกัดหยาบ (coarse extractor) และชุดสกัดละเอียด (fine extractor) ดังภาพที่ 2.18 และ 2.19 น้ำแป้งจะผ่านเข้าชุดสกัดหยาบและกากอ่อนที่ได้จะถูกเหวี่ยงออกทางด้านบนของตะกร้ากรองแล้วเข้าสู่เครื่องสกัดชุดสกัดกาก (pulp extractor) และเครื่องอัดกากต่อไป โดยที่เครื่องสกัดหยาบมีตะกร้ากรองเป็นสแตนเลส (stainless screen) ขนาดรูกรอง 35-40 เมช (mesh) ใช้มอเตอร์ขนาด 7.5 แรงม้า ใช้น้ำหมุนเวียนหรือน้ำดีเพื่อช่วยในการสกัดแป้งออกจากกากหยาบ ส่วนเครื่องสกัดละเอียดตะกร้ากรองเป็นสแตนเลสมีรูกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร และใช้ผ้ากรองไนลอนทรงกรวยเหมือนตะกร้ากรองวางด้านบนแล้วยึดด้วยสายรัดโลหะ ผ้ากรองที่ใช้มีขนาดรูกรองสองแบบ คือ 100-120 เมช (mesh) และ 140-200 เมช (mesh) ใช้มอเตอร์ขนาด 5.5 แรงม้า มีการใช้น้ำกำมะถันและน้ำดีช่วยในการสกัดแป้งจากกากอ่อน น้ำกำมะถันช่วยกำจัดการเกิดเมือกที่จะไปอุดตันแผ่นกรอง ป้องกันไม่ให้เกิดการสูญเสียแป้งจากจุลินทรีย์และช่วยฟอกสีแป้งให้ขาว

ภาพที่ 2.18 เครื่องสกัดแป้งหยาบ [18]

ภาพที่ 2.19 เครื่องสกัดแป้งละเอียด [18]

กากที่ได้จากเครื่องสกัดชุดสกัดกากแล้ว จะถูกลำเลียงด้วยเกลียวหมู (screw conveyer) เข้าเครื่องอัดกากมัน (screw press) ดังภาพที่ 2.20 โดยเครื่องอัดกากมัน 1 เครื่องจะมี 2 หัวอัด (screw) และมีมอเตอร์ขนาด 3 แรงม้า หนึ่งตัว หัวอัดมีลักษณะเป็นตะแกรงสแตนเลสรูปกรวยปลายเปิดเป็นท่อทรงกระบอก ภายในกรวยเป็นเกลียวหมูทำหน้าที่อัดกากให้แห้งและดันกากออกที่ปลายเปิดจะได้กากมันเป็นท่อนทรงกระบอกที่แห้งมีความชื้น 20-30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เป็นน้ำไหลผ่านตะแกรงออกมา



ภาพที่ 2.20 เครื่องอัดกากมัน [18]

น้ำแป้งจากเครื่องสกัดละเอียดจะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้นโดยผ่านเครื่องแยกแป้ง (separator) ดังภาพที่ 2.21 ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้แยกแป้งซึ่งอยู่ในรูปสารละลายคอลลอยด์ออกจากน้ำแป้ง ทำให้แป้งที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น น้ำแป้งเข้มข้นที่ได้จะไหลรวมกันในถังเพื่อเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป ส่วนของน้ำและสิ่งเจือปนในน้ำแป้ง (clarified overflow หรือ light phase) จะถูกแยกออกมาเนื่องจากความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะ เมื่อเกิดแรงเหวี่ยงจะทำให้น้ำไหลขึ้นไปทางด้านบนของเครื่อง ในโรงงานส่วนมากใช้เครื่องแยกแป้ง 2 ชุด ชุดแรกเรียกว่า “ชุดแยกใส” ชุดที่สองเรียกว่า “ชุดแยกข้น” โดยทั่วไปมักติดตั้งเครื่องสกัดละเอียดหรือเครื่องแยกแป้งทั้งสองชุดติดกัน น้ำแป้งจากเครื่องแยกแป้งชุดสุดท้ายโดยทั่วไปจะควบคุมให้มีความเข้มข้นประมาณ 18-20 องศาบูเม่ (ºBé) เพื่อเข้าระบบสลัดแห้งต่อไป

ภาพที่ 2.21 เครื่องแยกแป้ง [18]

ขั้นตอนการแยกแป้ง (separation) สามารถที่ใช้ไฮโดรไซโคลน (hydrocyclone) แทนได้ หลักการทำงานอาศัยแรงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force) น้ำแป้งจะถูกป้อนเข้าส่วนบนด้านข้างแล้วจะหมุนรอบๆ ภายในกระบอก (cone section) เกิดแรงปั่นเหวี่ยงทำให้แป้งตกลงสู่ส่วนล่างออกมา (underflow) ส่วนที่เป็นน้ำจะแยกออกที่ส่วนบน (overflow) ซึ่งไม่ต้องใช้มอเตอร์ในการหมุนให้เกิดแรงปั่นเหวี่ยงเหมือนเครื่องแยกแป้ง ทำให้ประหยัดพลังงาน สามารถควบคุมการทำงานได้ง่ายเพียงแต่เปิดวาล์วด้านบน ปัจจุบันมีการนำไฮโดรไซโคลน มาใช้ในกระบวนการผลิตอื่นๆ เช่น กระบวนการผลิตแป้งข้าวโพด และเริ่มมีการนำมาใช้ในโรงงานแป้งมันสำปะหลังบางแห่งแล้ว

ในขั้นตอนสลัดแห้งจะปั๊มน้ำแป้งที่มีความบริสุทธิ์สูงจากถังพักมายังเครื่องสลัดแห้ง (centrifugal หรือ dewatering) ดังภาพที่ 2.22 ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกร้า โดยน้ำแป้งจะถูกป้อนเข้าสู่ส่วนกลางของเครื่อง ซึ่งจะหมุนด้วยมอเตอร์ขนาด 40 แรงม้า หมุนด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที มีประสิทธิภาพการทำงาน 1.5 ตันน้ำแป้งข้น (ความชื้น 50-60 เปอร์เซ็นต์)/ชั่วโมง แรงเหวี่ยงจะผลักน้ำในน้ำแป้งข้นให้ซึมผ่านผ้ากรอง น้ำที่ผสมอยู่ในน้ำแป้งจะซึมผ่านผ้ากรองที่บุไว้รอบตะกร้าออกไปด้านล่าง เรียกว่า “น้ำสลัดแห้ง” ส่วนเนื้อแป้งจะถูกกรองไว้เกาะอยู่บริเวณผิวผ้ากรองภายในตะกร้า เนื้อแป้งจะก่อตัวเป็นชั้นแป้งหนาขึ้น ใบมีดจะปาดเนื้อแป้งที่มีความหนาพอสมควรให้ตกลงไปข้างเครื่อง แป้งที่ได้ เรียกว่า “แป้งหมาด (starch cake)” มีความชื้นประมาณ 35-40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะส่งไปยังหน่วยอบแห้งต่อไป การลดปริมาณความชื้นในแป้งหมาดอาจทำได้โดยการเปลี่ยนชนิดของเครื่องสลัดแห้ง เช่น การใช้เครื่องกรองแรงดันสูง (high pressure filter) [20]

ภาพที่ 2.22 เครื่องสลัดแห้ง [18]

2.7.4 การอบแห้ง

ในการอบแห้งลมร้อนอุณหภูมิ 180-200 องศาเซลเซียส จากเตาเผา (air heater) จะเป่าแป้งหมาดขึ้นไปยังปล่องอบแห้ง (flash dryer) แล้วตกลงมาสู่ไซโคลนร้อน (drying cyclone) ระเหยความชื้นออกไปบางส่วน ซึ่งจะมีการตรวจสอบความชื้นของแป้ง ถ้าชื้นมากอาจปรับอัตราเร็วของแป้งที่เข้าปล่องอบแห้ง โดยลดปริมาณแป้งเข้าหรือลดอัตราเร็วของลมร้อนที่เป่า เพื่อให้แป้งมีความชื้นน้อยลงตามที่ต้องการ หลังจากเข้าสู่ไซโคลนร้อนแล้ว แป้งจะถูกดูดเข้าสู่ไซโคลนเย็น

(cooling cyclone) อีกชุดหนึ่ง แล้วผ่านเครื่องร่อนแป้ง และบรรจุแป้งละเอียดที่ได้ลงถุงต่อไป ดังภาพที่ 2.23

ภาพที่ 2.23 เครื่องร่อนแป้ง [18]

2.7.5 การบรรจุและเก็บรักษา

แป้งที่ผลิตได้จากการอบแห้งจะมีความชื้นต่ำ (9-11 เปอร์เซ็นต์) ความหนาแน่นต่ำ ทำให้เกิดการฟุ้งกระจายระหว่างการบรรจุ ถ้าสามารถมีที่เก็บก่อนการบรรจุ จะทำให้แป้งมีความชื้นเข้าใกล้สมดุลกับบรรยากาศมากขึ้น การเก็บรักษาหลังจากการบรรจุแล้วทำได้โดยการวางเรียงซ้อนกันเป็นชั้น พยายามหลีกเลี่ยงการทับซ้อนกันถึง 4 หรือ 5 เมตร ใช้หลักการเคลื่อนย้ายถุงแป้งแบบมาก่อนใช้ก่อน

2.8 กระบวนการย่อยแป้งในอุตสาหกรรม

การย่อยแป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.8.1 การเกิดเจลลาติไนเซชัน (gelatinization)

เจลลาติไนเซชันเป็นกระบวนการเกิดการพองตัวเนื่องจากการดูดซึมน้ำของเม็ดแป้ง ในขณะที่ได้รับความร้อนทำให้เกิดการพองตัวของเม็ดแป้งช่วงอุณหภูมิที่แป้งมีการดูดซึมน้ำอย่างรวดเร็วและพองตัวขึ้น เรียกว่า อุณหภูมิการเกิดเจล (gelatinization temperature) การเกิดเจลเป็นกระบวนการผันกลับไม่ได้และทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น แป้งมันสำปะหลังมีอุณหภูมิการเกิดเจลที่

52-64 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าธัญพืชอื่นๆ ทำให้อัตราการเพิ่มความหนืดสูงเกิดการสลายตัวได้มาก และแป้งมันสำปะหลังยังเกิดการคืนตัวค่อนข้างน้อยและช้าเพราะมีองค์ประกอบส่วนมากเป็นอะไมโลเพกทิน [15]

2.8.2 การเกิดลิเคอเฟคชัน (liquefaction)

เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจลโดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของโซ่กลูโคส ทำให้แยกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีความหนืดน้อยลง กว่า 30 ปีที่ผ่านมาได้มีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) แทนการใช้กรดย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า [21]

2.8.3 การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (saccharification)

เป็นการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ภายหลังการย่อยจะทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าเล็กน้อย ผลผลิตที่ได้ คือกลูโคส มอลโตสหรือมอลโตไตรโอส [22]

2.8.4 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง

แป้งย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแป้งดัดแปร (modified starch) ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ จากสารละลายน้ำแป้งกับเอนไซม์ นำไปทำให้เป็นเจลาทิไนซ์ (gelatinization) โดยผ่านความร้อน เมื่อย่อยถึงระดับที่ต้องการ หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยลดอุณหภูมิและปรับลดพีเอชลง เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งนั้นมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งดัดแปร ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ เช่น น้ำเชื่อมกลูโคส น้ำเชื่อมฟรุกโตส ไซโคลเดกซ์ทริน

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง โดยพิจารณาตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์ แบ่งออกได้ 3 กลุ่ม [19] คือ

2.8.4.1 เอกโซอะไมเลส (exoamylase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะแอลฟา-1,4 และแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เบตาอะไมเลส (β-amylase) และฟอสฟอรีเลส (phosphorerase) ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุลกลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังภาพที่ 2.24, 2.25 และ 2.26

2.8.4.2 เอนโดอะไมเลส (endoamylase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลของแป้งที่ตัดพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิกระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน เอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของ

แอลฟาอะไมเลส คือ โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) และแอลฟาลิมิตเดกซ์ตริน (α-limit-dextrins) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แสดงดังภาพที่ 2.27

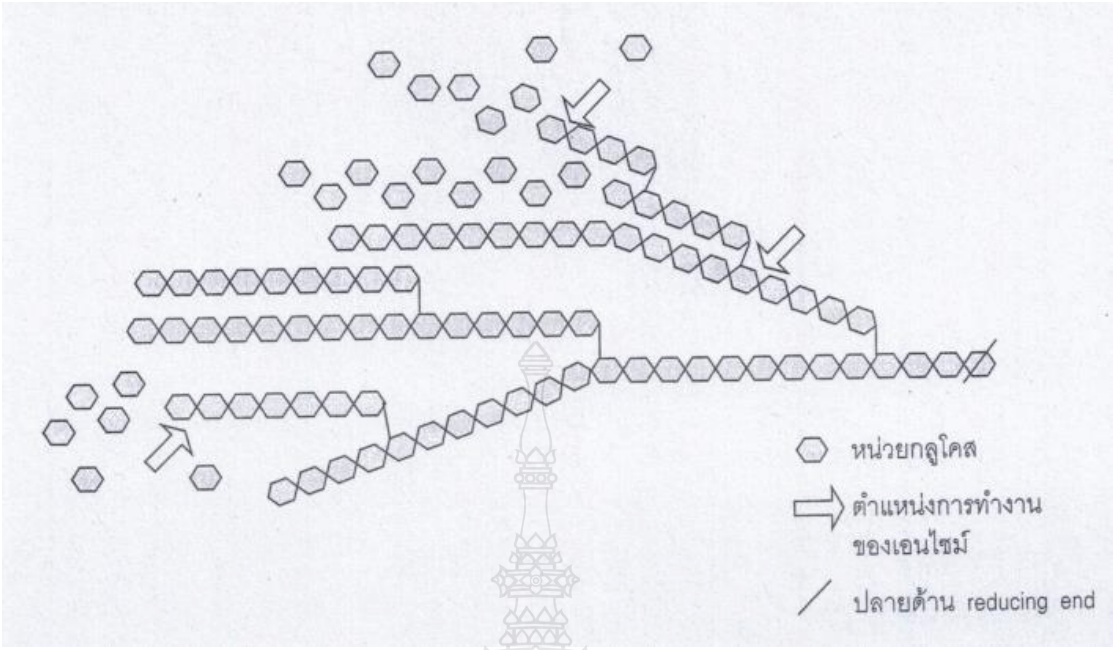
2.8.4.3 เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (debranching enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ตัดเฉพาะพันธะแอลฟา 1,6 กลูโคซิดิก (α-1,6 glucosidic) เอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และพูลลูลาเนส (pullulanase) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้แสดงดังภาพที่ 2.28

2.8.5 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

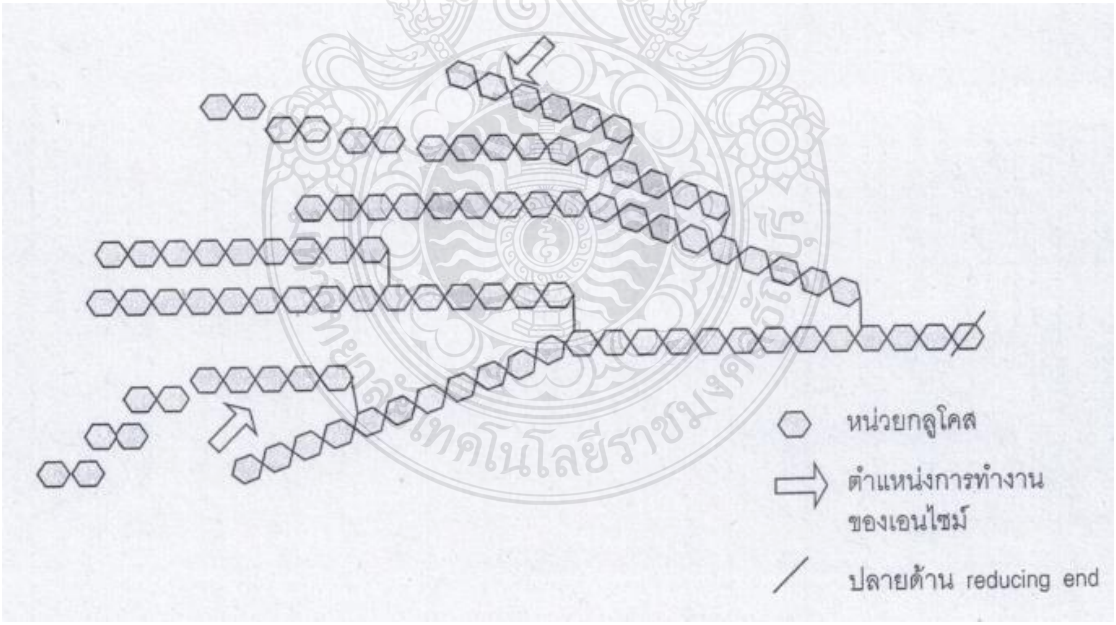
ข้อดีของการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ คือ สภาวะที่ใช้ในการย่อยทั้งอุณหภูมิและพีเอชไม่รุนแรงจึงทำให้สามารถใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ไม่ทนต่อการกัดกร่อนได้ สามารถตกผลึกกลูโคสได้ดี ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เฟอร์ฟูรอลและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงเนื่องจากการย่อยอย่างจำเพาะของเอนไซม์ สำหรับข้อเสียของการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ คือ เสียค่าใช้จ่ายสูง ปฏิกิริยาการย่อยเกิดได้ขึ้นช้า และเอนไซม์มีอายุการใช้งานจำกัดอาจเสื่อมสภาพหรือประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาลดลง [15]

2.8.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

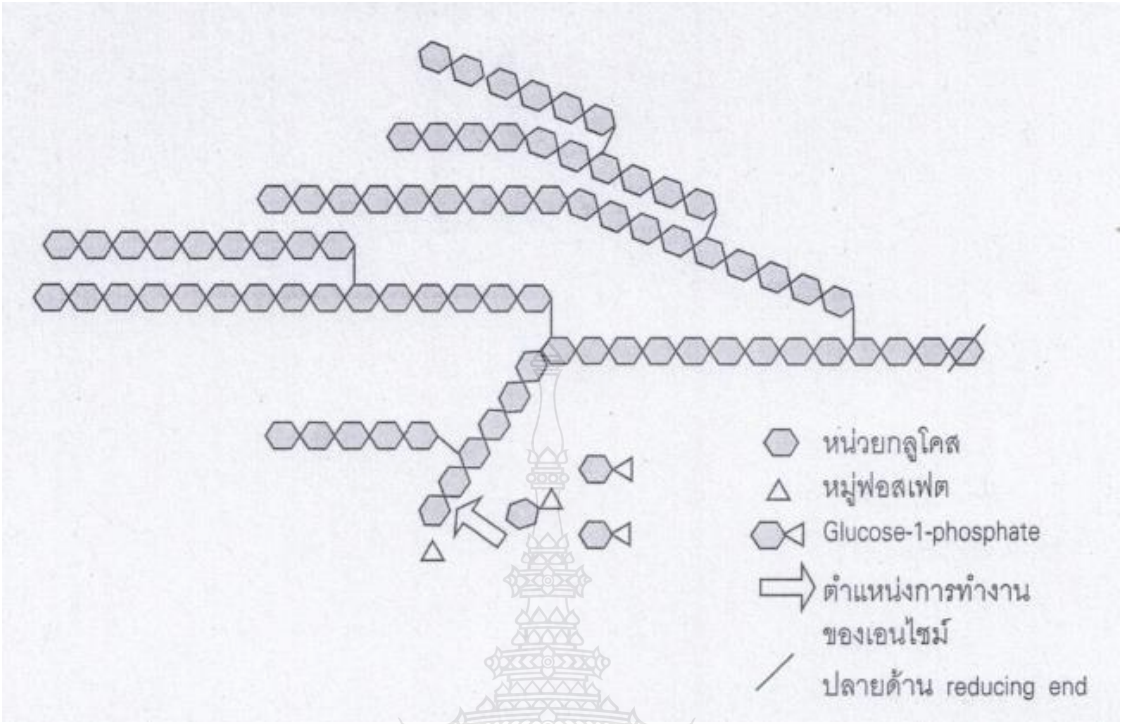
เอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้งมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจากการย่อยสลายแป้ง ได้แก่ น้ำเชื่อมกลูโคส น้ำเชื่อมฟรุกโตส ไซโคเดกซ์ตริน เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.29, 2.30 และ 2.31 และตารางที่ 2.5 ซึ่งแสดงถึงการนำแป้งมาแปรรูปโดยการใช้เอนไซม์ในการผลิตผลิตภัณฑ์การย่อยแป้งเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีสภาวะของการทำงานที่แตกต่างกัน



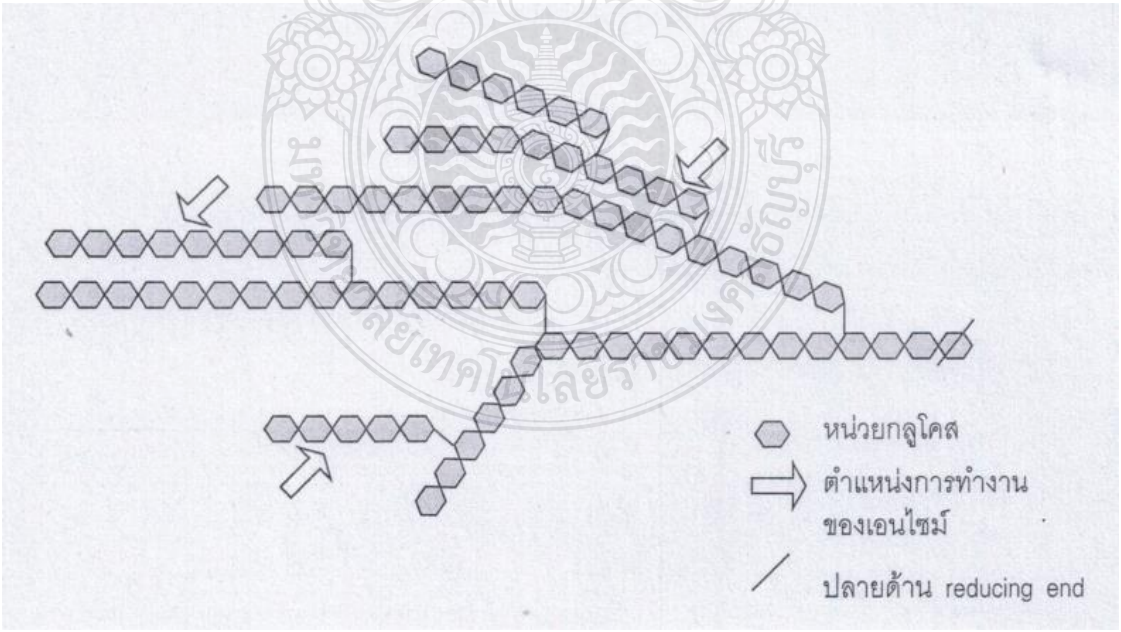
ภาพที่ 2.24 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส [23]



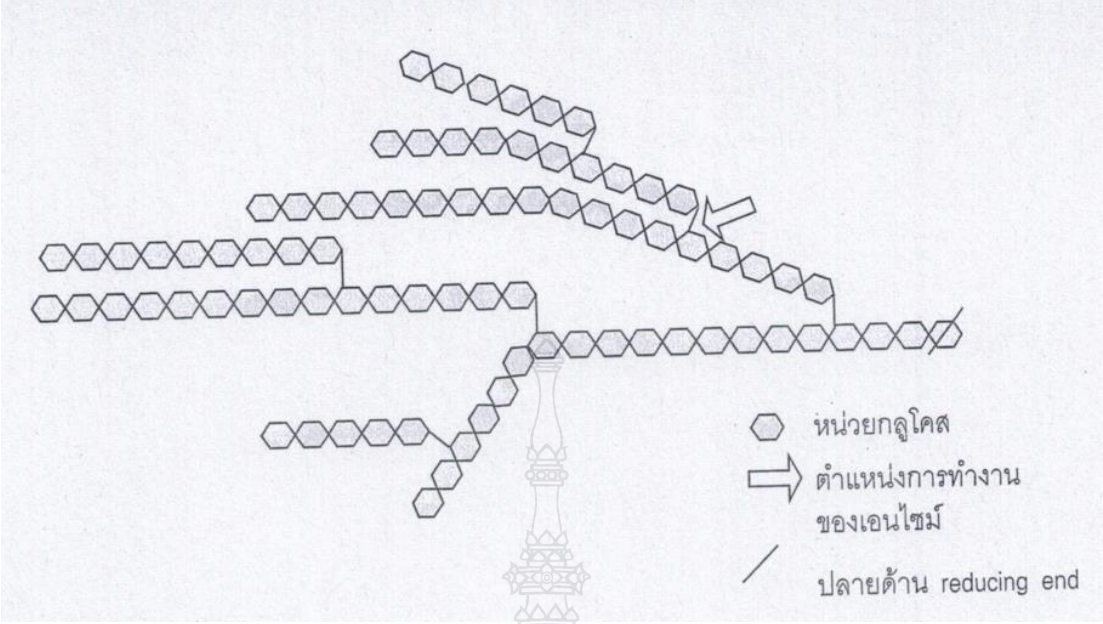
ภาพที่ 2.25 การทำงานของเอนไซม์เบตาอะไมเลส [23]



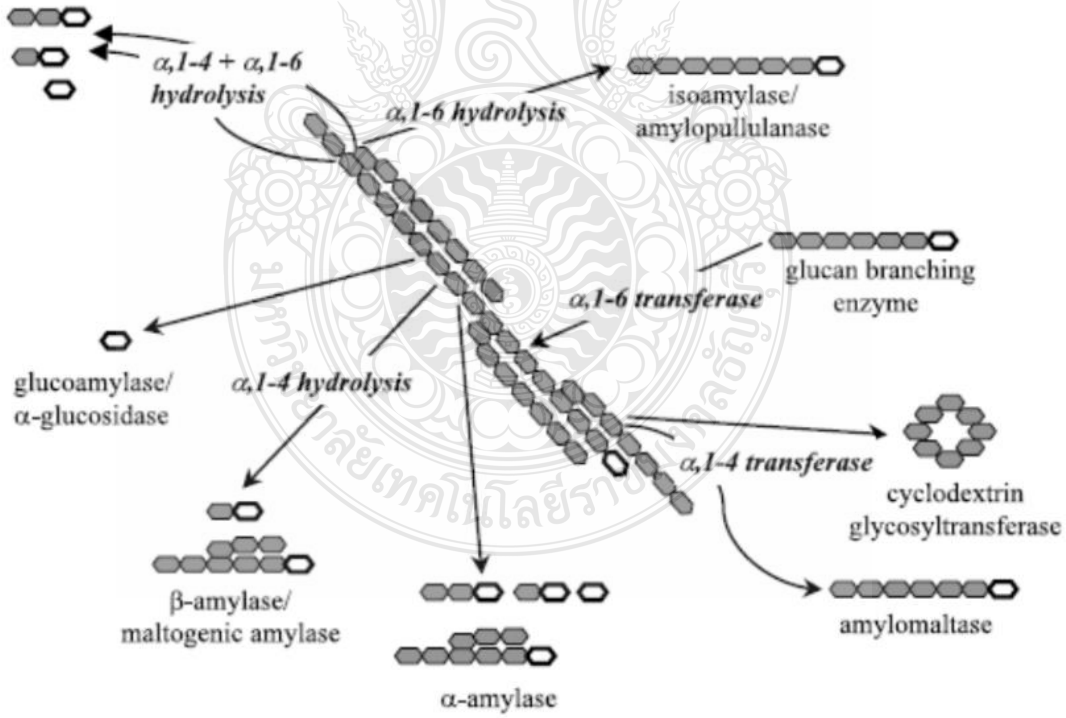
ภาพที่ 2.26 การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟอรีเลส [23]



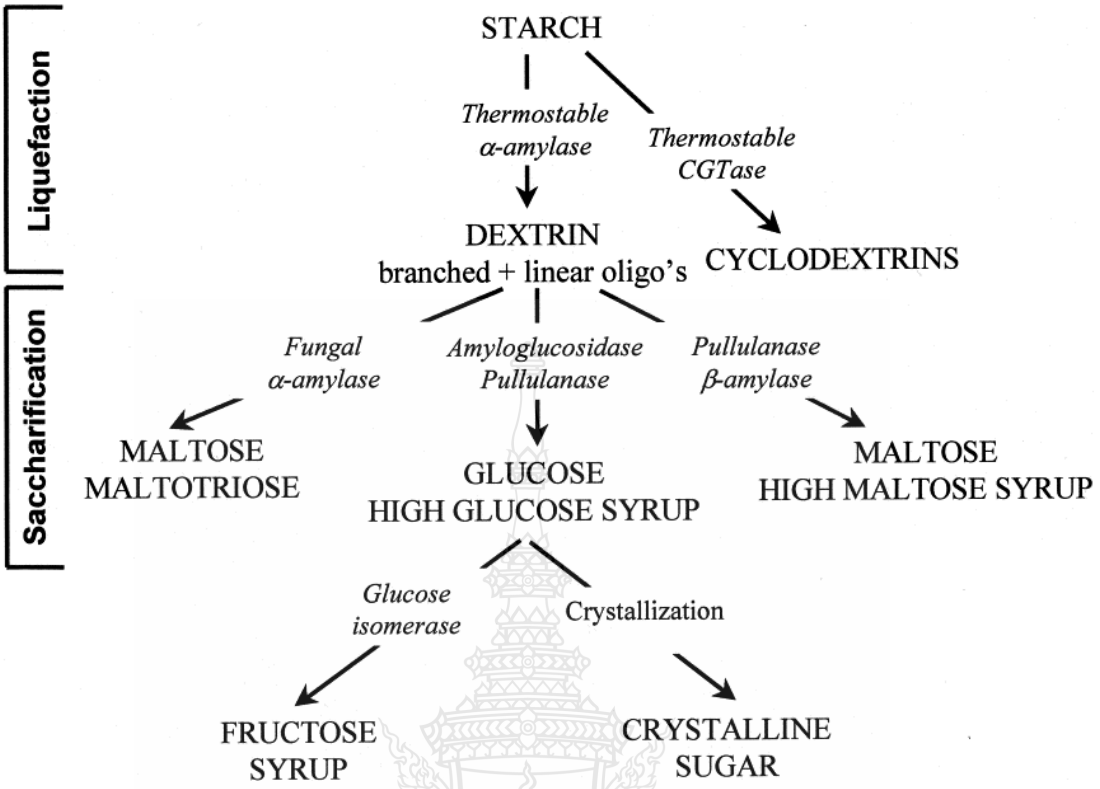
ภาพที่ 2.27 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส [23]



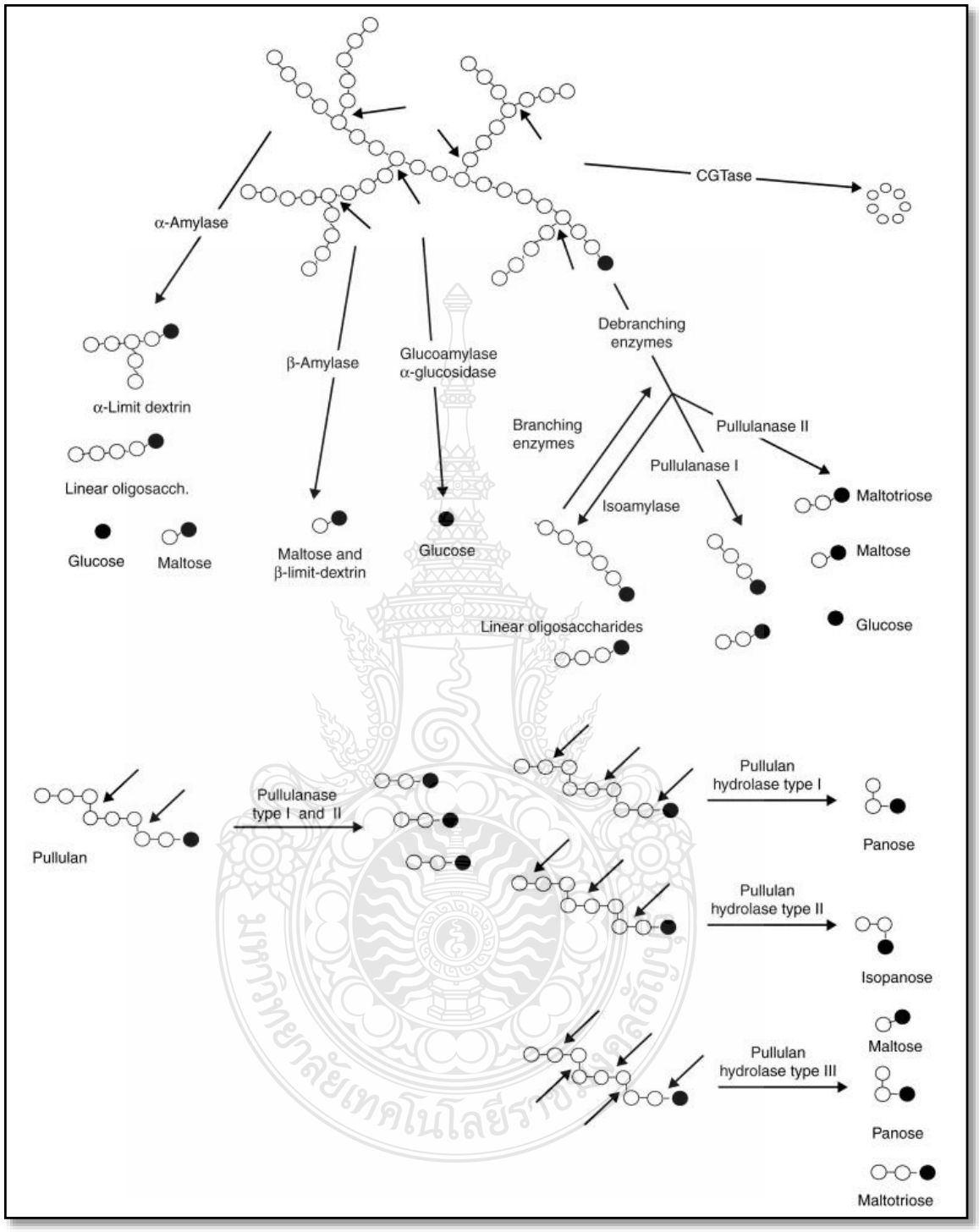
ภาพที่ 2.28 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง [23]



ภาพที่ 2.29 การทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยแป้งสัญลักษณ์วงแหวนเปิดแสดงถึง reducing end ของ polyglucose molecule [24]



ภาพที่ 2.30 กระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ [24]



ภาพที่ 2.31 การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ [25]

ตารางที่ 2.5 เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการย่อยแป้ง [26]

Enzyme	EC number	Source	Action
α-amylase	3.2.1.1	*Bacillus amyloliquefaciens*	Only α-1,4-oligosaccharide links are claved to give α –dextrins and predominantly maltose (G_2), G_3, G_6 and G_7 oligosaccharides
		B. licheniformis	Only α-1,4-oligosaccharide links are claved to give α –dextrins and predominantly maltose G_3, G_4 and G_5 oligosaccharides
		Aspergillus oryzae, A. niger	Only α-1,4-oligosaccharide links are claved to give α –dextrins and predominantly maltose G_3 oligosaccharides
Saccharifiyling α-amylase	3.2.1.1	*Bacillus subtilis amylosaccharitiicus*	Only α-1,4-oligosaccharide links are claved to give α –dextrins with maltose G_3, G_4 and up 50% (w/v) glucose
β-amylase	3.2.1.2	Malted barley	Only α-1,4 links are clavedfrom non-reducing ends, to give limit dextrins and β –maltose
Glucoamylase	3.2.1.3	*A. niger*	α-1,4 and α-1,6 links are clavedfrom non-reducing ends, to give β –glucose
Pullulanase	3.2.1.41	*B. acidopullulyticus*	Only α-1,6 links are claved to give straight-chain maltodextrins

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kuriki *et al.* (1993) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (malto-oligosaccharide) โดยใช้เอนไซม์นีโอพูลูลาเนส (neopullulanase) ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ความเข้มข้นของมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าต้องการจะลดต้นทุนการผลิตโดยใช้เอนไซม์นีโอพูลูลาเนสตรึงก็จะได้ปริมาณมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์นีโอพูลูลาเนสอิสระ [4]

Purdue *et al.* (1994) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่ไม่ตกผลึก (non-crystallizing) โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ และใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเอนไซม์พูลูลาเนสร่วมกับเอนไซม์ผสมเดกซ์โตรไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและพูลูลาเนสในการผลิต พบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คือ พีเอชประมาณ 5.5-5.7 อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 58.00 เปอร์เซ็นต์ [28]

Shaw and Nankang (1994) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากแป้งข้าวเจ้าโดยใช้กระบวนย่อยด้วยเอนไซม์โดยใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลสและพูลูลาเนส พบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือ พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 83.19 เปอร์เซ็นต์ [29]

Gaouar *et al.* (1998) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด ultrafiltration membrane โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบและใช้เอนไซม์มอลโตจิเนสและพูลูลาเนสในการย่อยแป้งพบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือพีเอช 5.0 อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส โดยทำการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสได้สูงสุด 65.00 เปอร์เซ็นต์ [30]

Hilary *et al.* (1999) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ พบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คือ พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 79.00 เปอร์เซ็นต์ [31]

Noda *et al.* (2001) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงโดยใช้เอนไซม์ตรึงด้วยการหมักแบบกึ่งกะ (semi-continuous) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ในการย่อยแป้งจะใช้เอนไซม์ตรึงเบตาอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์ตรึงพูลูลาเนสพบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

คือพีเอช 6.6 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสได้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสสูงสุด 70.90 เปอร์เซ็นต์ [32]

จิรวรรณ (2540) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการมันสำปะหลังโดยเปรียบเทียบการย่อย 2 วิธีคือการย่อยด้วยกรดและการย่อยด้วยเอนไซม์ ในการย่อยด้วยกรดใช้กรด 3 ชนิดคือ กรดซัลฟิวรัส กรดออกซาลิกและกรดซัลฟิวริก และสภาวะที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตด้วยกรดที่ดีที่สุดเกิดจากการย่อยภายใต้อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและน้ำเชื่อมกลูโคสที่เกิดขึ้นมีความเข้มข้น 158.55 กรัม/ลิตร ส่วนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 500 หน่วยเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำให้เกิดแซคคาริฟิเคชันต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 300 หน่วยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาส่วนที่ละลายได้มาย่อยให้เกิดแซคคาริฟิเคชันต่อด้วยอัตราส่วนสารละลาย 50 มิลลิลิตรต่อเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 75 หน่วยเป็นเวลา 12 ชั่วโมงทำให้ได้น้ำเชื่อมกลูโคสที่มีความเข้มข้น 40.44 กรัม/ลิตร จากการศึกษาพบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมีประสิทธิภาพที่เหนือกว่าการใช้เอนไซม์เนื่องจากน้ำเชื่อมกลูโคสที่ได้มีความเข้มข้นสูงกว่า [15]

พักตร์ประไพ (2546) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในขั้นตอนการเกิดแซคคาริฟิเคชันที่ความเข้มข้นกากมันสำปะหลัง 150 กรัม/ลิตรปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1,000 หน่วย พีเอช 6.5-7.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 600 หน่วย พีเอช 4.3-4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมงทำให้เกิดการเปลี่ยนกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคส 69.80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับประสิทธิภาพการย่อย 72.71 เปอร์เซ็นต์ [27]

วรวิกัลยาและสุนันทา (2550) ได้ทำการศึกษาการตัดกิ่งโมเลกุลแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์พูลลูลาเนส พบได้ว่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในช่วงปริมาณแป้ง 5-8 เปอร์เซ็นต์ ระดับการย่อยคงที่และสูงสุดที่ปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์และเอนไซม์พูลลูลาเนส 15 หน่วย/กรัมของแป้ง เมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มจาก 30-24 ชั่วโมงทำให้ระดับของการตัดกิ่งเพิ่มขึ้นจาก 58.9 เป็น 89.3 เปอร์เซ็นต์ [33]

Sung, L.M. *et al.* (2008) พบว่า ผลกระทบของปฏิกิริยาเอนไซม์เดกซ์แทนซูเครส (dextransucrase) จากเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteriodes* B-512F ซึ่งใช้มอลโตสเป็นสารตั้งต้นโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของซูโครสและมอลโตสในอัตราที่ต่างกัน และความเข้มข้นของซูโครสและมอลโตส อัตราส่วนของซูโครสและมอลโตสที่ระดับต่างๆ ดังนี้ 1:4, 1:2, 1:1 และ 2:1 ความเข้มข้นของซูโครสและมอลโตสตั้งแต่ 2 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดลองว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

ของซูโครสในอัตราส่วน 2:1 ผลิตภัณฑ์ที่พบคือ ไอโซมอลโตซิล มอลโตส (DP4) หรือ ไอโซมอลโตไตรโอซิล มอลโตส (DP5) และน้ำตาลแซ็กคาไรด์สายยาวคือ DP8 หรือ DP9 แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างซูโครสและมอลโตส (1:1) จะให้ผลผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่าง 40 และ 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อมอลโตสมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจะให้อัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ ตามที่สรุปผลผลผลิตของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 91.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อซูโครสและมอลโตสมีความเข้มข้นที่ 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [34]

Lin Q. *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาเรื่อง การผลิตน้ำเชื่อมไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งข้าวโดยใช้วิธีทางชีวภาพเพียงขั้นตอนเดียว พบว่าเมื่อเติมปริมาณเอนไซม์นีโอพูลลาเนส และแซ็กคาริไฟด์แอลฟาอะไมเลส ลงในน้ำแป้ง ปรับพีเอชที่ 6.0 นำอาหารที่ผสมเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 และ 120 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรสและ HPLC ในชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 59.20 เปอร์เซ็นต์ [8]

Chockchaisawasdee and Naiyatat (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งกล้วย ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเบตาอะไมเลส พบว่า ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ Fungamyl ให้ความเข้มข้นสูงสุด คือ 76.67 กรัม/ลิตร ส่วนที่ผลิตจากเอนไซม์ β-amylase ให้ความเข้มข้นเท่ากับ 70.74 กรัม/ลิตร [35]

Premsuda and Suparp (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตพรีไบโอติกไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากข้าว พบว่า ในน้ำเชื่อมข้าวพบองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ ไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 44, 10 และ 7 กรัม/ลิตร ตามลำดับ [36]

Premsuda *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาการผลิตพรีไบโอติกไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากวัตถุดิบทางการเกษตร พบว่า ในน้ำเชื่อมข้าวพบองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ คือ ไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 6.4, 4.5 และ 1.8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะเดียวกันน้ำเชื่อมมันสำปะหลังให้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 1 และ 0.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ [37]

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1.1.1 กรวยกรอง

3.1.1.2 กระจกปิดสไลด์

3.1.1.3 กระจกสไลด์

3.1.1.4 กระดาษกรอง Whatman No.1

3.1.1.5 กระบอกตวง

3.1.1.6 ขวดรูปชมพู่

3.1.1.7 ขวดปรับปริมาตร

3.1.1.8 ขวดเก็บตัวอย่าง

3.1.1.9 ขวดสีชา

3.1.1.10 ขวด Duran

3.1.1.11 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.1.1.12 จานเพาะเชื้อ

3.1.1.13 ชุดบิวเร็ตพร้อมฐาน

3.1.1.14 แท่งแก้ว

3.1.1.15 บีกเกอร์แก้ว

3.1.1.16 บีกเกอร์สแตนเลส

3.1.1.17 เทอร์โมมิเตอร์

3.1.1.18 ไม้พาย

3.1.1.19 หลอดทดลองพร้อมฝา

3.1.1.20 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 4-Aminoantipyrine ($C_{11}H_{13}N_3O$)

3.1.2.2 Bovine serum albumin (BSA)

3.1.2.3 Copper sulphate pentahydrate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.1.2.4 Corn steep liquor (CSL)

3.1.2.5 Citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)

3.1.2.6 Dextrose (D-Glucose)

3.1.2.7 Di-Ammonium hydrogen citrate ($2NH_3C_6H_8O_7$)

3.1.2.8 Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)

3.1.2.9 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

3.1.2.10 D-Panose

3.1.2.11 Ethanol (CH_3CH_2OH)

3.1.2.12 Folin-Ciocalteus

3.1.2.13 Fructose

3.1.2.14 Glucose

3.1.2.15 Hydrochloric acid (HCl)

3.1.2.16 Iodine solution

3.1.2.17 Isomaltooligosaccharide

3.1.2.18 Isomaltotriose DP3

3.1.2.19 Maltose

3.1.2.20 Maltotriose hydrate

3.1.2.21 Methanol (CH_4O)

3.1.2.22 α-Methyl-D-glucoside (α-MG)

3.1.2.23 Methylene blue

3.1.2.24 Potassium sodium tartrate tetrahydrate ($KNaC_4O_6 \cdot 4H_2O$)

3.1.2.25 Sodium carbonate (Na_2CO_3)

3.1.2.26 Sodium citrate ($C_6H_5O_7Na_3$)

3.1.2.27 Sodium hydroxide pellet (NaOH)

3.1.2.28 Sodium hydroxide solution 50% (50% NaOH solution)

3.1.2.29 Soluble starch

3.1.2.30 Tween 80

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.1.3.1 Czapek dox agar (CZA)

3.1.3.2 Nutrient agar (NA)

3.1.3.3 Potato dextrose agar (PDA)

3.1.4 เอนไซม์

3.1.4.1 เอนไซม์เบตาอะไมเลส (β-amylase, Liquozyme) จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ของบริษัท Novozymes

3.1.4.2 เอนไซม์พูลลูลาเนส (pullulanase, Promozyme D2) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus acidopullulyticus* ของบริษัท Novozymes

3.1.4.3 เอนไซม์มอลโตจิเนส (maltogenase, Maltogenase® L) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* ของบริษัท Novozymes

3.1.4.4 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase, Termamyl) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ของบริษัท Novozymes

3.1.4.5 เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (Transglucosidase, TG) จากเชื้อรา *Aspergillus niger*

3.1.5 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

3.1.5.1 เครื่องโครมาโทรกราฟีสมรรถนะสูงแบบของเหลว (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.1.5.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (Analytical balance 2 digital)

3.1.5.3 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digital)

3.1.5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge with temperature)

3.1.5.5 เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

3.1.5.6 เครื่องวัดปริมาณความหวาน (Hand Refractometr)

3.1.5.7 ตู้เขี่ยเชื้อ (Biohazard Safety Carbinet, BSC)

3.1.5.8 ตู้ดูดความชื้น (Desicator)

3.1.5.9 ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3.1.5.10 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)

3.1.5.11 ตู้บ่มเชื้อแบบไม่เขย่า (Incubator)

3.1.5.12 เตาไฟฟ้า (Hot plate)

3.1.5.13 อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ (Oil bath)

3.1.5.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

3.2.1.1 เตรียมสารละลายน้ำแป้ง

ชั่งแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 600 กรัม ละลายกับน้ำประปาปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์แสตนเลสขนาด 2,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จะได้สารละลายน้ำแป้งไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำสารละลายน้ำแป้งที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ปรับพีเอชให้ได้ เท่ากับ 6.5 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหล่อเย็นและนำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (dextrose equivalent, DE)

3.2.1.3 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำสารละลายน้ำแป้งที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ปรับพีเอชที่ระดับต่างๆ คือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างและทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหล่อเย็นและนำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (dextrose equivalent, DE)

3.2.1.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำสารละลายน้ำแป้งที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ปรับพีเอชที่ระดับเหมาะสมจากข้อ 3.2.1.3 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1.2 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 75, 80, 85, 90 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างและทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหล่อเย็นและนำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (dextrose equivalent, DE)

3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง

3.2.2.1 การศึกษาชนิดของเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1 ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 เติมเอนไซม์ผสม ดังนี้

- เอนไซม์เบตาอะไมเลสและมอลโตจิเนส ที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- เอนไซม์เบตาอะไมเลสและพูลูลาเนส ที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- เอนไซม์มอลโตจิเนสและพูลูลาเนส ที่ความเข้มข้น 0.13 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหล่อเย็น นำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose equivalent, DE) และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีสมรรถนะสูงแบบของเหลว (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.2.2.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1.2 ปรับพีเอชที่ระดับต่างๆ ดังนี้ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.1 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหล่อเย็น นำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.2.2.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1.2 ปรับพีเอชระดับที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.2.2 จากนั้นเติมเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.1 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหล่อเย็น นำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีสมรรถนะสูงแบบของเหลว

3.2.2.4 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1.2 ปรับพีเอชระดับที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.2 จากนั้นเติมเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.1 บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.3 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง และทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปหล่อเย็น นำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีสมรรถนะสูงแบบของเหลว

3.2.3 การผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากอาหารเหลว

3.2.3.1 เตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเอียง Czapex dox agar ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3.2 ผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส

นำเชื้อราที่เจริญอยู่บนอาหารเอียง เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นขูดให้สปอร์ของเชื้อรา *A. niger* หลุดออก เทสปอร์ลงบนอาหารเหลว ประมาณ 2 มิลลิลิตร (ส่วนประกอบของอาหารเหลว : 15 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ Corn steep Liquor ปรับพีเอชเท่ากับ 5.9 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 นำอาหารเหลวที่เติมสปอร์ของเชื้อรา เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ เตรียมอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส ปริมาณ 900 มิลลิลิตร เติมสปอร์ลงในอาหารปริมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมา กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (ภาคผนวก ค)

3.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ตัวแปรที่สนใจ ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ โดยออกแบบการทดลองและสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการ Response Surface Methodology (RSM) แบบ Box-behnken design (3 ระดับ) ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยนำค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปรแทนลงในสมการ 3-1 ซึ่งมีสภาวะการทดลองจำนวน 27 ชุด แสดงค่า Code variable ดังตารางที่ 3.1 ชุดสภาวะการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้นวิเคราะห์ผลของตัวแปรตามแบบจำลองสมการกำลังสอง (full quadratic model) มีสมการทั่วไปตามสมการ 3-2

สมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำนวน 3 ตัวแปร

$$y = \sum A_0 + \sum_{i=1}^{3} A_i X_i + \sum_{i=1}^{3} A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} A_{ij} X_i X_j \qquad (3\text{-}1)$$

โดยที่ X_1 คือ ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (เปอร์เซ็นต์)

X_2 คือ พีเอช

X_3 คือ อุณหภูมิ (°C)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทดลองโดยการออกแบบด้วยเทคนิค RSM แบบ Box-behnken design เพื่อศึกษาผลของ ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ

ชุดการทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (เปอร์เซ็นต์)	พีเอช	อุณหภูมิ (^{o}C)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	0
3	-1	-1	1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6	-1	0	1
7	-1	1	-1
8	-1	1	0
9	-1	1	1
10	0	-1	-1
11	0	-1	0
12	0	-1	0
13	0	0	-1
14	0	0	0
15	0	0	1
16	0	1	-1
17	0	1	0
18	0	1	1
19	1	-1	-1
20	1	-1	0
21	1	-1	1
22	1	0	-1
23	1	0	0
24	1	0	1
25	1	1	-1
26	1	1	0

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทดลองโดยการออกแบบด้วยเทคนิค RSM แบบ Box-behnken design เพื่อศึกษาผลของ ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (เปอร์เซ็นต์)	พีเอช	อุณหภูมิ (^{o}C)
27	1	1	1
Min-Max Value	0.04 – 0.08	5 - 7	50-70

$$X = \left(\frac{X - \frac{X_{max} + X_{min}}{2}}{\frac{X_{max} - X_{min}}{2}} \right) \quad (3\text{-}2)$$

โดยที่ X คือ Code Variable

x คือ ตัวแปรอิสระ

x_{min} คือ ค่าต่ำสุดของตัวแปรอิสระ

x_{max} คือ ค่าสูงสุดของตัวแปรอิสระ

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค RSM เพื่อศึกษาผลของตัวแปร (ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ) ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ชุดการทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (เปอร์เซ็นต์))	พีเอช	อุณหภูมิ (^{o}C)
1	0.04	5	50
2	0.04	5	60
3	0.04	5	70
4	0.04	6	50
5	0.04	6	60
6	0.04	6	70
7	0.04	7	50
8	0.04	7	60
9	0.04	7	70
10	0.06	5	50

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค RSM เพื่อศึกษาผลของตัวแปร (ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ) ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (เปอร์เซ็นต์)	พีเอช	อุณหภูมิ (^{o}C)
11	0.06	5	60
12	0.06	5	70
13	0.06	6	50
14	0.06	6	60
15	0.06	6	70
16	0.06	7	50
17	0.06	7	60
18	0.06	7	70
19	0.08	5	50
20	0.08	5	60
21	0.08	5	70
22	0.08	6	50
23	0.08	6	60
24	0.08	6	70
25	0.08	7	50
26	0.08	7	60
27	0.08	7	70

3.3 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่เติมปริมาณเอนไซม์ พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่ม โดยนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์และหาค่าทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance ; One-Way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ $p>0.05$

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

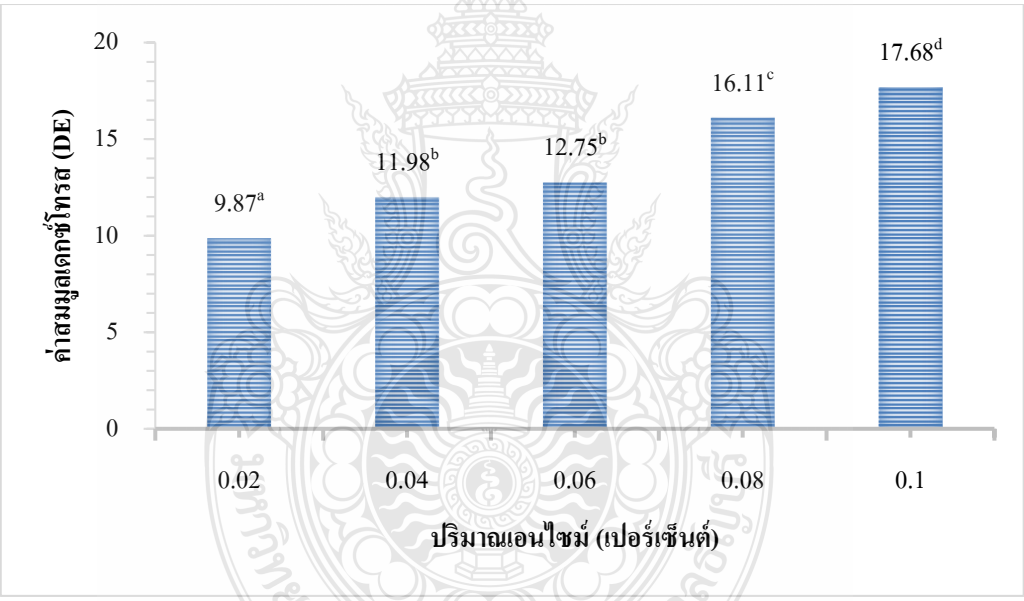
การผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยกระบวนการทางเอนไซม์นั้น ช่วงแรกจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัดโมเลกุลของแป้งที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสให้มีขนาดเล็กลง (liquefaction) โดยการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในขั้นตอนนี้จะต้องได้ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (dextrose equivalent ; DE) ประมาณ 12 ซึ่งเป็นค่า DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งให้เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้นๆ เช่น มอลโตไตรโอสและเดกซ์ตรินในปริมาณสูง [39] ดังนั้นการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังจะต้องได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ประมาณ 12

4.1.1 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาไมเลสในสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

จากการเตรียมสารละลายน้ำแป้งเริ่มต้นโดยชั่งแป้งปริมาณ 600 กรัม ละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กวนจนสารละลายน้ำแป้งให้เข้ากัน ปรับพีเอช 6.5 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้นๆ ได้แก่ มอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน ติดตามการย่อยของแป้งมันสำปะหลัง โดยการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า DE ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1 จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อค่า DE โดยเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังจะส่งผลให้ค่า DE สูงขึ้น เนื่องจากเมื่อปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้นจะสามารถย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังเป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินได้เร็วขึ้น การเติมปริมาณเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) ให้ค่า DE เท่ากับ 11.98 และ 12.75 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p>0.05$) เนื่องจากค่า DE ทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในปริมาณที่ 0.04 เปอร์เซ็นต์ เพราะเป็นการลดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตในระดับโรงงานอุตสาหกรรม เมื่อสารละลายน้ำแป้งมันสำปะหลังถูกย่อยเป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินแล้ว มีค่า DE ใกล้เคียงกับ DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลังในขั้นแรก

(DE = 12) ดังนั้นในการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินปริมาณสูง จึงควรให้ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก)

ค่า DE ในน้ำเชื่อมเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคส โดยถ้าค่า DE สูงจะแสดงว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเชื่อมสูง [40] จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยสลาย จะทำให้ค่า DE ในน้ำเชื่อมมีปริมาณสูง แสดงว่าในสภาวะดังกล่าวจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส เนื่องจากในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจะมีการใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลสหรือมอลโตจิเนส หรือพูลูลาเนสในการเปลี่ยนมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตส [39] ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ไม่เหมาะสำหรับนำไปผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส

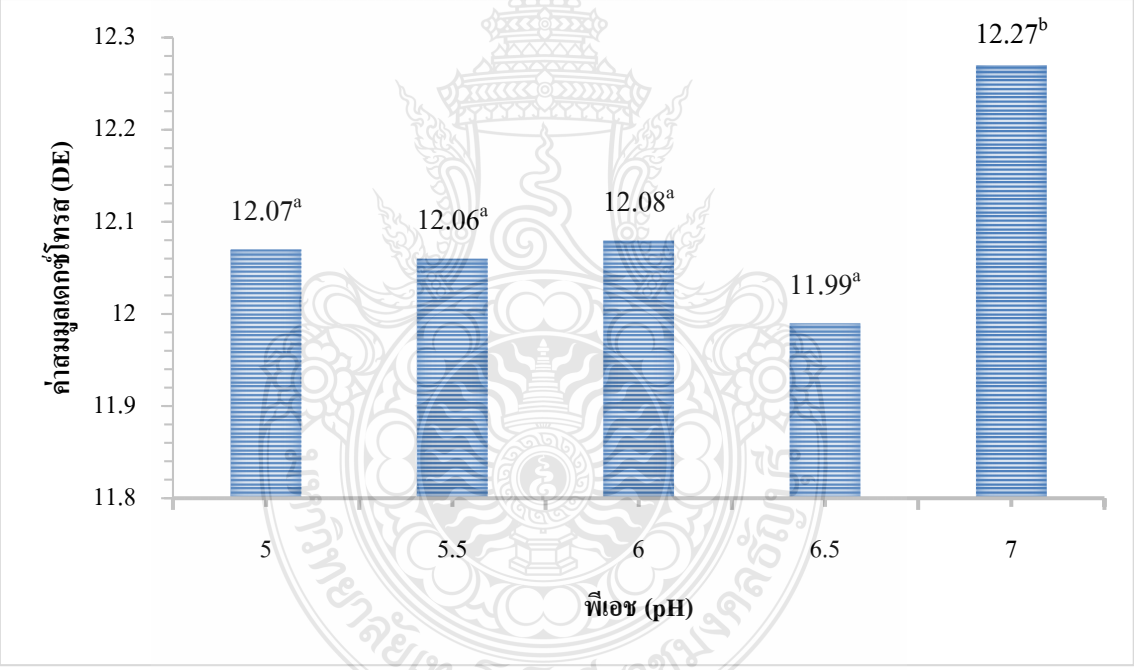


ภาพที่ 4.1 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที

4.1.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อทำการย่อยสารละลายน้ำแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันความเข้มข้นของพีเอชเป็น 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *B. licheniformis* ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถทำงานได้ดี [39] ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์

(ปริมาตร/น้ำหนัก) บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นๆ ได้แก่ มอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน ดังแสดงในภาพที่ 4.2 จากการทดลองพบว่า การยย่อยแป้งมันสำปะหลังที่พีเอช 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ได้ค่า DE ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p>0.05$) โดยจะได้ค่า DE เท่ากับ 12.07, 12.06, 12.08 และ 11.99 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ DE=12 ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอช 6.5 เนื่องจากพีเอชของสารละลายน้ำแป้งมีค่าเท่ากับ 6.5 และมีค่าพีเอชในสภาวะเป็นกลาง จึงไม่ต้องปรับพีเอชมากเกินไป โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะย่อยสลายสารละลายน้ำแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำเชื่อมที่มีค่า DE เท่ากับ 11.99 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลังในขั้นแรก ดังนั้นในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสให้เป็นมอลโตไตรโอส และเดกซ์ทรินปริมาณสูง จึงควรใช้พีเอชเท่ากับ 6.5

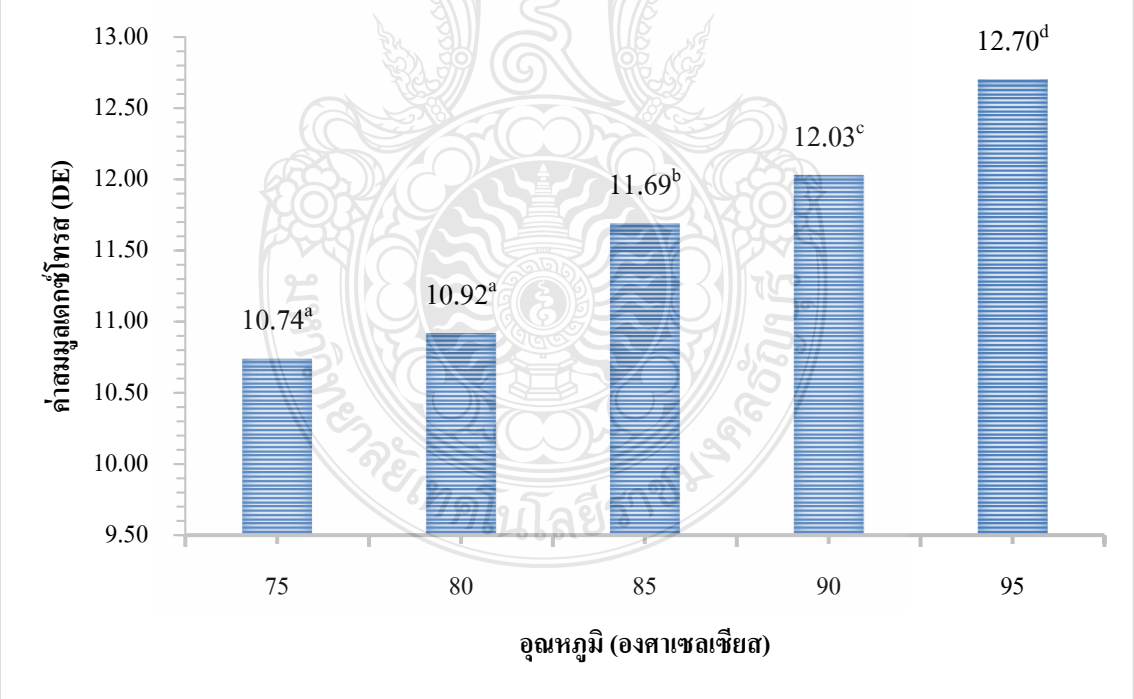


ภาพที่ 4.2 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที

4.1.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่แปรผันอุณหภูมิเป็น 75, 80, 85, 90 และ 95 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. licenifrrmis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่สภาวะ

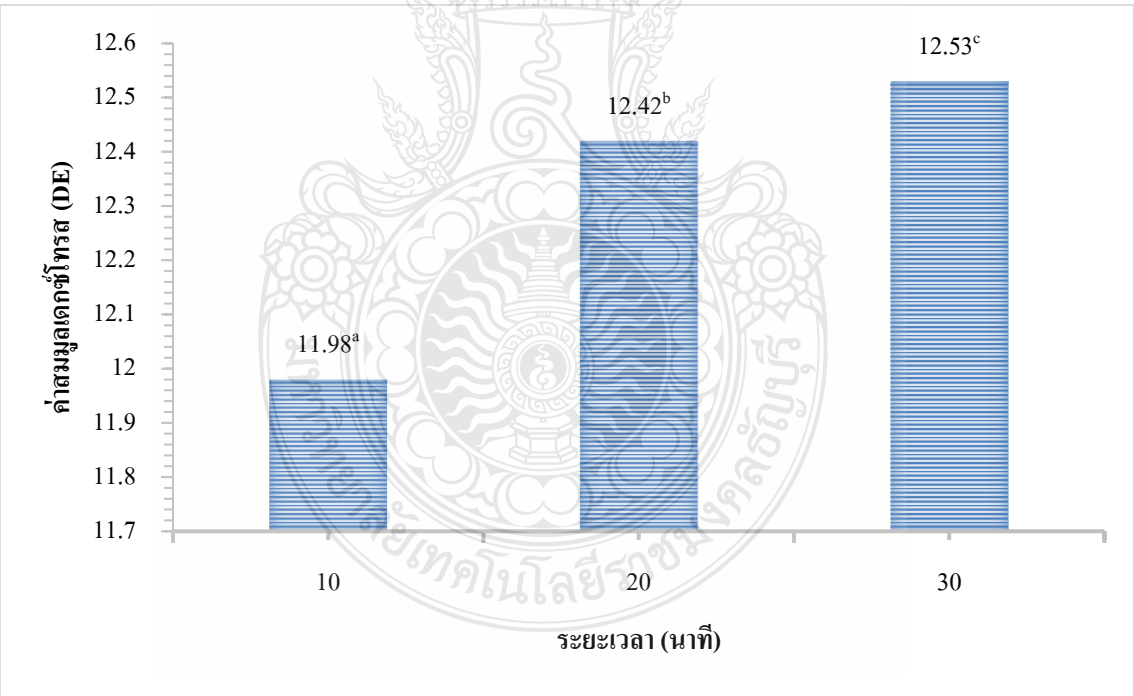
อุณหภูมิสูงได้ดี ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง (thermostable enzyme) [41] ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) พีเอช 6.5 ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นๆ ได้แก่ มอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.3 จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิมีผลต่อค่า DE เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังจะส่งผลให้ค่า DE สูงขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 75, 80, 85, 90 และ 95 องศาเซลเซียส ให้ค่า DE เท่ากับ 10.74, 10.92, 11.69, 12.03 และ 12.70 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p>0.05$) สำหรับที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสจะให้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE เท่ากับ 12.03 ซึ่งมีค่า DE ใกล้เคียงกับค่า DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (DE=12) ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสสำหรับย่อยแป้งมันสำหลังให้เป็นมอลโตไตรโอสเพื่อใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส ซึ่งเป็นการลดการใช้พลังงานความร้อนเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นในการย่อยแป้งมันสำหลังให้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินปริมาณสูง จึงควรใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.3 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที

4.1.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่แปรผันระยะเวลาเป็น 10, 20 และ 30 นาที โดยเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นๆ ได้แก่ มอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.4 จากการทดลองพบว่า เมื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระยะเวลาเพิ่มขึ้น จะทำให้ค่า DE สูงขึ้น ให้ค่า DE ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที เท่ากับ 11.98, 12.42 และ 12.53 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p>0.05$) สำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นระยะเวลา 10 นาทีจะให้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE เท่ากับ 11.98 ซึ่งมีค่า DE ใกล้เคียงกับค่า DE ที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อนำไปใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส ดังนั้นจึงเลือกใช้การบ่มที่ระยะเวลา 10 นาที สำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นมอลโตไตรโอสเพื่อใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส



ภาพที่ 4.4 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *B. licheniformis* คือ การใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 10 นาที ซึ่งจะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ที่มีค่าใกล้เคียงกับ DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังให้ได้เป็นมอลโตไตรโอส สำหรับเป็นสับสเตรตตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส สภาวะดังกล่าวมีความแตกต่างจากการงานวิจัยของ Lin Q. *et al.* [8,46] ซึ่งได้ทำการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจากแป้งข้าวเจ้าโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ กระบวนการตัดโมเลกุลของแป้งที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสให้มีขนาดเล็กลง (liquefaction) จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งข้าวเจ้าให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตไตรโอส คือ การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 5 หน่วยต่อกรัมของแป้งข้าวเจ้า พีเอช 6.9 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 22 นาที จะได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE 8-11 ซึ่งน้ำเชื่อมที่มีค่า DE สูงเกินไปจะทำให้ได้ผลได้ของน้ำตาลมอลโตสลดลง แต่ถ้าน้ำเชื่อมมีค่าต่ำเกินไป (DE ต่ำกว่า 8) จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมีความหนืดสูง ซึ่งจะส่งผลเสียต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการดังกล่าวทำงานได้ไม่ดี นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยของ Karmakar and Ray [47] ซึ่งได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตไตรโอสด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง (thermostable enzyme) จากเชื้อ *Bacillus* sp. KR11 โดยเอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง

ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยกระบวนการทางเอนไซม์นั้น จะนำน้ำเชื่อมที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมาเปลี่ยนเป็นน้ำเชื่อมมอลโตสโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์เบตาอะไมเลส พูลูลาเนส และมอลโตจิเนส สำหรับการศึกษาครั้งนี้ต้องการน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 50-55 เปอร์เซ็นต์ [39] จึงได้มีการศึกษาชนิดของเอนไซม์ผสม พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงและเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomaltooligosaccharides, IMOs) ในขั้นตอนต่อไป

4.2.1 การศึกษาชนิดของเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

นำน้ำเชื่อมที่ประกอบด้วยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินจากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้ว นำมาปรับพีเอชเท่ากับ 5.5 แล้วย่อยสลายด้วยเอนไซม์ผสมชนิดต่างๆ ดังนี้

เอนไซม์เบตาอะไมเลสกับมอลโตจิเนส เบตาอะไมเลสกับพูลูลาเนส และมอลโตจิเนสกับพูลูลาเนส โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เบตาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) เอนไซม์พูลลูลาเนส 0.15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) และเอนไซม์มอลโตจิเนส 0.13 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อย่อยให้มอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินเป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากผลการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์เอนไซม์ผสมแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินที่จะทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p>0.05$) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดมีการย่อยสลายพันธะกลูโคซิดิกในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์เบตาอะไมเลสจะไปตัดพันธะไกลโคซิลของแป้งที่แอลฟา-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของมอลโตสหรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคสและจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่แอลฟา -1,6 [48,65] เอนไซม์มอลโตจิเนสทำปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ 1,4 –แอลฟา-กลูโคซิดิก โดยตัดสายพอลิเมอร์จากปลายสายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ [42] เอนไซม์พูลูลาเนส จะเข้าทำปฏิกิริยาตัดพันธะแอลฟา-1,6 [33] สำหรับการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสและมอลโตจิเนสจะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 55.80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสสูงที่สุด ดังนั้นเอนไซม์เบตาอะไมเลสและมอลโตจิเนสจึงมีความเหมาะสมในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินเพื่อผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง เนื่องจากเอนไซม์เบตาอะไมเลสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิกของโมเลกุลกลูโคสที่ปลายสาย [22] และเอนไซม์มอลโตจิเนสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิกที่ปลายสายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ [42] ดังนั้นเอนไซม์ผสมเบตาอะไมเลสร่วมกับมอลโตจิเนสมีความจำเพาะกับมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินสูง จึงสามารถย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงได้

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมชนิดต่างๆ

ชนิดของเอนไซม์ผสม	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์)
β+MG	55.80[a]
β +P	52.19[b]
MG+P	47.87[c]

หมายเหตุ [1]อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

β หมายถึง เอนไซม์เบตาอะไมเลส

MG หมายถึง เอนไซม์มอลโตจิเนส

P หมายถึง เอนไซม์พูลูลาเนส

จากการทดลองชนิดของเอนไซม์ที่ใช้สำหรับผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจะแตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ โดย Lin Q. *et al.* [46]ได้ทำการผลิตได้ทำการผลิตมอลโตสไซรัปจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดโดยมีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (E.C. 3.2.1.1) ในขั้นตอนลิเคอแฟคชัน (liquefraction) และใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส (E.C. 3.2.1.2) และเอนไซม์พูลูลาเนส (E.C. 3.2.1.41) ในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดที่มีค่า DE และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส คือ 96.6, 104.6 และ 95.2, 102.2 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/กรัม) ตามลำดับ งานวิจัยของ Shaw and Sheu [66] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากข้าว โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *B. licheniformis* และศึกษาการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน ได้แก่ พูลูลาเนสจากเชื้อ *Aerobacter aerogens* ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *Pseudomonas amyloderamosa* และเบตาอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus cereus* จากการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกันทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เบตาอะไมเลส, ไอโซอะไมเลส และพูลูลาเนส พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 83.19 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นการใช้เอนไซม์ เบตาอะไมเลสร่วมกับพูลูลาเนส พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 80.14 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลสร่วมกับไอโซอะไมเลส พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็น

ระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 68.32 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ Gaouar *et al.* [30] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจากแป้งมันสำปะหลังในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอัลตร้าฟิวเตรชัน โดยใช้เอนไซม์ BAN 120L จากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.2.1.1) ในกระบวนการลิเคอแฟคชัน และใช้เอนไซม์ Maltogenase 4000L จากเชื้อ *Bacillus subtilis* และเอนไซม์ Promozyme 600L จากเชื้อ *Baillus acidopullulyticus* (E.C. 3.2.1.41) ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน พบว่าได้น้ำเชื่อมมอลโตส เท่ากับ 217 กรัม/ลิตร งานวิจัยของ Purdue *et al.* [28] ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่ไม่ตกผลึก (non-crystallizing) โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ และใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกับพูลูลาเนสและเดกซ์โตรไซม์ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน จะได้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของมอลโตสเท่ากับ 58.00 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

โดยแปรผันพีเอช 5 ระดับคือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลสความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมอลโตจิเนสความเข้มข้น 0.13 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จากการทดลองพบว่า พีเอชจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสมีความแตกต่างกัน เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นจะส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสลดลง เนื่องจากเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเอนไซม์ผสม ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนั้น มีความแตกต่างกัน คือ เอนไซม์เบตาอะไมเลสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 4.5-5.5 [39] และเอนไซม์มอลโตจิเนส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 5.0-6.0 [42] สำหรับค่าพีเอช 5.0 และ 5.5 จะให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p>0.05$) ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ผสมคือ พีเอช 5.5 ซึ่งจะได้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส เท่ากับ 54.88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งที่ระดับพีเอชดังกล่าวจะง่ายต่อการผลิตซึ่งไม่ต้องมีการปรับพีเอชมากเกินไป และน้ำเชื่อมมอลโตสที่ได้จะมีสีค่อนข้างใส สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย

จากการทดลองพบว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้พีเอชมีผลต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เพื่อให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจะแตกต่างจากงานวิจัยอื่น เนื่องจากชนิดของเอนไซม์ที่ใช้มีความแตกต่างกัน โดยงานวิจัยของ Lin Q. *et al.* [46] ได้ทำการผลิตได้ทำการผลิตมอลโตสไซรัปจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพด โดยใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส (E.C. 3.2.1.2) และเอนไซม์พูลูลาเนส (E.C. 3.2.1.41) ในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) พีเอช 4.8 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะได้น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดที่มีค่า DE และความเข้มข้นของ

น้ำตาลมอลโตส คือ 96.6, 104.6 และ 95.2, 102.2 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/กรัม) ตามลำดับ งานวิจัยของ Shaw and Sheu [66] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากข้าวใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน ได้แก่ พูลูลาเนสจากเชื้อ *A. aerogens* ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *P. amyloderamosa* และเบตาอะไมเลสจากเชื้อ *B. cereus* จากการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกันทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เบตาอะไมเลส, ไอโซอะไมเลส และพูลูลาเนส พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 83.19 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ Gaouar *et al.* [30] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจากแป้งมันสำปะหลังในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอัลตร้าฟิวเตรชัน โดยใช้เอนไซม์ BAN 120L จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* (E.C. 3.2.1.1) ในกระบวนการลิเคอแฟคชัน และใช้เอนไซม์ Maltogenase 4000L จากเชื้อ *B. subtilis* และเอนไซม์ Promozyme 600L จากเชื้อ *B. acidopullulyticus* (E.C. 3.2.1.41) ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน พีเอช 5.0-5.5 พบว่าได้น้ำเชื่อมมอลโตส เท่ากับ 217 กรัม/ลิตร งานวิจัยของ Noda *et al.* [32] ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงแบบกึ่งกะ (semi-continuous) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ค่าพีเอช 6.6 เนื่องมาจากเอนไซม์ผสมที่ใช้เป็นเอนไซม์เบตาอะไมเลสและพูลูลาเนสที่อยู่ในรูปของการตรึงเอนไซม์ (immobilized enzyme) จะมีความคงตัวมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่พีเอชสูงกว่าพีเอชที่เหมาะสมเมื่อเอนไซม์อยู่ในรูปอิสระ (free enzyme) [43]

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่พีเอชต่างๆ

พีเอช (pH)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์)
5.0	54.84[a]
5.5	54.88[a]
6.0	50.24[b]
6.5	50.22[b]
7.0	46.88[c]

หมายเหตุ [1]อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

4.2.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

โดยแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับคือ 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมอลโตจิเนสความเข้มข้น 0.13 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสมีความแตกต่างกัน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพและทำงานได้ไม่ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เบตาอะไมเลสอยู่ในช่วง 55-62 องศาเซลเซียส [39] และเอนไซม์มอลโตจิเนสอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส [42] สำหรับอุณหภูมิที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียสจะให้น้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p>0.05$) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ผสมคือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส เท่ากับ 56.24 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นการประหยัดพลังงานในการให้ความร้อนซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่ง

จากการทดลองพบว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้อุณหภูมิมีผลต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เพื่อให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจะแตกต่างจากงานวิจัยอื่น เนื่องจากชนิดของเอนไซม์ที่ใช้มีความแตกต่างกัน โดยงานวิจัยของ Lin Q. *et al.* [46] ได้ทำการผลิตได้ทำการผลิตมอลโตสไซรัปจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพด โดยใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส (E.C. 3.2.1.2) และเอนไซม์พูลูลาเนส (E.C. 3.2.1.41) ในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 จะได้น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดที่มีค่า DE และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส คือ 96.6, 104.6 และ 95.2, 102.2 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/กรัม) ตามลำดับ งานวิจัยของ Shaw and Sheu [66] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากข้าวใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน ได้แก่ พูลูลาเนสจากเชื้อ *A. aerogens* ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *P. amyloderamosa* และเบตาอะไมเลสจากเชื้อ *B. cereus* จากการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกันทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เบตาอะไมเลส, ไอโซอะไมเลส และพูลูลาเนส อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 83.19 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ Gaouar *et al.* [30] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจากแป้งมันสำปะหลังในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอัลตร้าฟิวเตรชัน โดยใช้เอนไซม์ BAN 120L จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens*

(E.C. 3.2.1.1) ในกระบวนการลิเคอแฟคชัน และใช้เอนไซม์ Maltogenase 4000L จากเชื้อ *B. subtilis* และเอนไซม์ Promozyme 600L จากเชื้อ *B. acidopullulyticus* (E.C. 3.2.1.41) ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน พีเอช 5.0-5.5 พบว่าได้น้ำเชื่อมมอลโตส เท่ากับ 217 กรัม/ลิตร งานวิจัยของ Noda *et al.* [32] ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงแบบกึ่งกะ (semi-continuous) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ค่าพีเอช 6.6 เนื่องมาจากเอนไซม์ผสมที่ใช้เป็นเอนไซม์เบตาอะไมเลสและพูลูลาเนสที่อยู่ในรูปของการตรึงเอนไซม์ (immobilized enzyme) จะมีความคงตัวมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่พีเอชสูงกว่าพีเอชที่เหมาะสมเมื่อเอนไซม์อยู่ในรูปอิสระ (free enzyme) [43]

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์)
50	50.74[a]
55	56.24[b]
60	56.21[b]
65	48.46[c]
70	47.17[d]

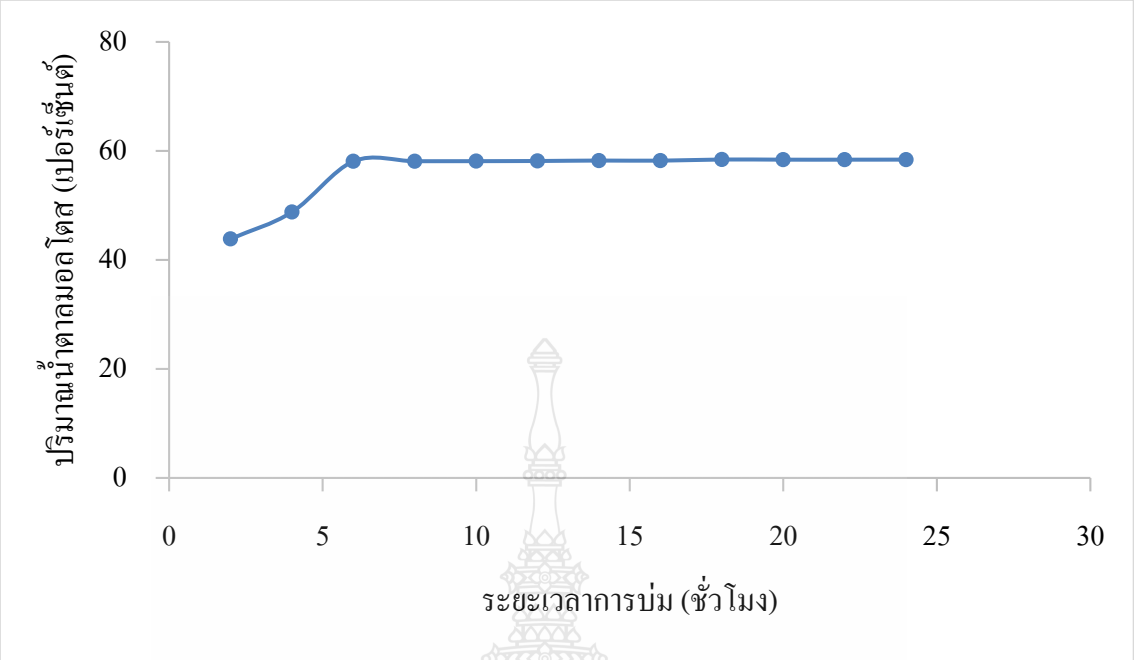
หมายเหตุ [1]อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

4.2.4 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

โดยเติมเอนไซม์ผสม เบตาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) และเอนไซม์มอลโตจิเนสที่ความเข้มข้น 0.13 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมอลโตส ดังแสดงผลในภาพที่ 4.5 พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น โดยชั่วโมงที่ 6-24 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p>0.05) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากแป้งมันสำปะหลัง ในชั่วโมงที่ 6 ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความ

เข้มข้นสูงที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสเท่ากับ 58.08 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในชั่วโมงที่ 6 จึงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้น และเมื่อนำไปผลิตในระดับโรงงานอุตสาหกรรมจะเป็นการประหยัด และลดต้นทุนในการผลิตอีกประการหนึ่ง

จากการทดลองพบว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้ระยะเวลามีผลต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เพื่อให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจะแตกต่างจากงานวิจัยอื่น เนื่องจากชนิดของเอนไซม์ที่ใช้มีความแตกต่างกัน โดยงานวิจัยของ Lin Q. *et al.* [46] ได้ทำการผลิตได้ทำการผลิตมอลโตสไซรัปจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพด โดยใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส (E.C. 3.2.1.2) และเอนไซม์พูลูลาเนส (E.C. 3.2.1.41) ในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 จะได้น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดที่มีค่า DE และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส คือ 96.6, 104.6 และ 95.2, 102.2 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/กรัม) ตามลำดับ งานวิจัยของ Shaw and Sheu [66] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากข้าวใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน ได้แก่ พูลูลาเนสจากเชื้อ *A. aerogens* ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *P. amyloderamosa* และเบตาอะไมเลสจากเชื้อ *B. cereus* จากการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกันทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เบตาอะไมเลส, ไอโซอะไมเลส และพูลูลาเนส อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นสูงเท่ากับ 83.19 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ Gaouar *et al.* [30] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจากแป้งมันสำปะหลังในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอัลตร้าฟิวเตรชัน โดยใช้เอนไซม์ BAN 120L จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* (E.C. 3.2.1.1) ในกระบวนการลิเคอแฟคชัน และใช้เอนไซม์ Maltogenase 4000L จากเชื้อ *B. subtilis* และเอนไซม์ Promozyme 600L จากเชื้อ *B. acidopullulyticus* (E.C. 3.2.1.41) ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน พีเอช 5.0-5.5 พบว่าได้น้ำเชื่อมมอลโตส เท่ากับ 217 กรัม/ลิตร งานวิจัยของ Noda *et al.* [32] ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงแบบกึ่งกะ (semi-continuous) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ค่าพีเอช 6.6 เนื่องมาจากเอนไซม์ผสมที่ใช้เป็นเอนไซม์เบตาอะไมเลสและพูลูลาเนสที่อยู่ในรูปของการตรึงเอนไซม์ (immobilized enzyme) จะมีความคงตัวมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่พีเอชสูงกว่าพีเอชที่เหมาะสมเมื่อเอนไซม์อยู่ในรูปอิสระ (free enzyme) [43]



ภาพที่ 4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมของเบตาอะไมเลสและมอลโตจิเนส พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

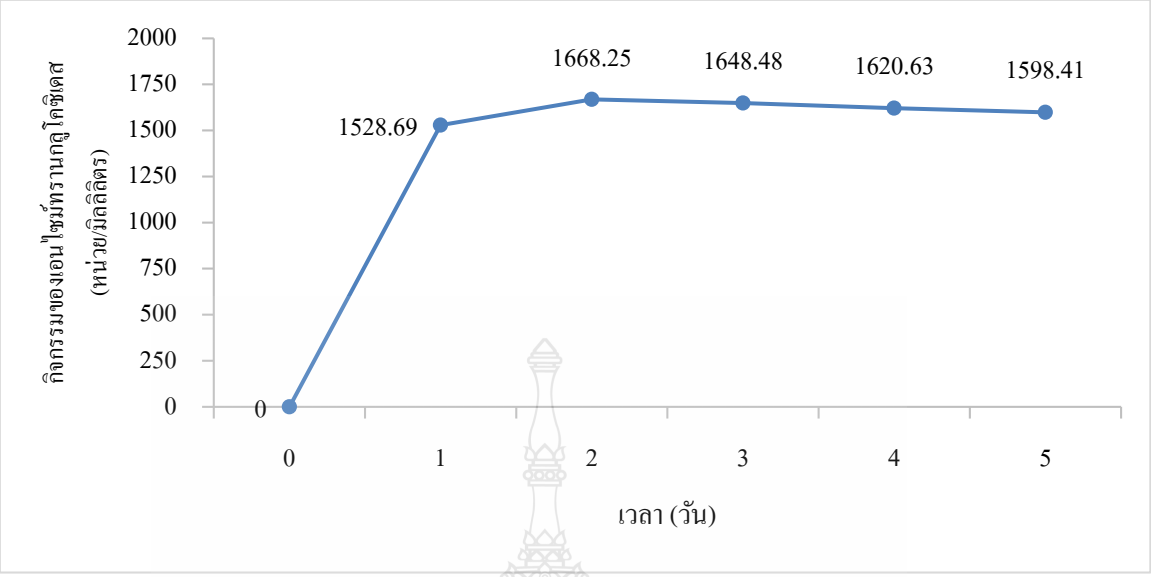
จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชันแป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง โดยใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลสความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มอลโตจิเนสความเข้มข้น 0.13 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ย่อยสลายเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 58.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากงานวิจัยนี้จะแตกต่างจากงานวิจัยของ Gaouar *et al.*, [30] Noda *et al.*, [32] Hilary *et al.*, [31] และ Shaw and Nankang [29] เนื่องมาจากวัตถุดิบ ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชันจะมีความแตกต่างกันส่งผลให้สภาวะต่างๆที่เหมาะสม สำหรับผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงมีความแตกต่างกันด้วย

4.3 การผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากอาหารเหลว

เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชั่น (transglucosylation) ทั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายและการเคลื่อนย้ายแอลฟา-ดี-กลูโค-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (α-D-gluco-oligosaccharides) ทำให้เกิดโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิลที่ตำแหน่งแอลฟา 1,6 (α-(1,6) linked-oligomers of glucose) เช่น ไอโซมอลโตส พาโนส ไอโซมอลโตไตรโอส [67,68]

ในการทดลองนี้จะทำการผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสได้ดี เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Czapek Dox Agar, CZA เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และเติมสปอร์ที่ได้ลงในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Benson *et al.* [45] ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 5.5 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน จากการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่า เชื้อรา *A. niger* จะสามารถผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสได้ตั้งแต่วันที่ 1 และจึงสามารถผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสได้สูงสุดในวันที่ 2 หลังจากจากนั้นการผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจะลดลงเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อรา *A. niger* ได้ใช้สารอาหารจนหมด จึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้สูงขึ้น ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* เพื่อผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 2 วัน ซึ่งจะได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,668.25 หน่วย/มิลลิลิตร

เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ใช้สำหรับผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ *A. niger* GXM-2 [68], *A. niger* [69,70], *A. carbonarious* CCRC 30414 [71], *A. oryzae* TISTR3102 [37] ซึ่งจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วง 1,000 - 1,500 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. niger* จากการทดลองในครั้งนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์



ภาพที่ 4.6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ผลิตจากเชื้อรา *A. niger* เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* ที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังให้ได้เป็นมอลโตไตรโอส สำหรับเป็นสับสเตรตตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้ได้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินโดยเติมเอนไซม์เบตาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มอลโตจิเนสที่ความเข้มข้น 0.13 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 58.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสับสเตรตเริ่มต้นสำหรับใช้ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ได้จากการผลิตจากเชื้อรา *A. niger* โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.06 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พีเอช 5, 6 และ 7 และอุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในการทดลองนี้ได้ออกแบบการทดลองแบบ factorial design จะได้การทดลองทั้งหมด 27 ชุดการทดลอง จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ จะมีผลต่อปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ คือ พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส การใช้สภาวะพีเอช และอุณหภูมิไม่เหมาะสมจะส่งผลให้ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เกิดขึ้นน้อย เนื่องจากสภาวะไม่เหมาะสมต่อการ

ทำงานของเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์คือ การใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง มีปริมาณองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ดังนี้ พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 16.95, 12.13 และ 24.72 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.7 และได้ผลได้ของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 0.69 อัตราการผลิต เท่ากับ 8.97 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จะแตกต่างจากงานวิจัยอื่น เนื่องจากวัตถุดิบ สภาวะที่ใช้ในการผลิต และกระบวนการผลิตมีความแตกต่างกัน โดย Premsuda *et al.* [37] ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าว และมันสำปะหลัง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* TISTR3102 บนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยเชื้อราดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (52.5 หน่วย/กรัม) และแอลฟากลูโคซิเดส (2.4 หน่วย/กรัม) หลังจากนั้นทำวัตถุดิบไปบดผสมกับน้ำ (mashing) ปล่อยให้หมักต่อที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส พีเอช 5.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ผลผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากข้าว ซึ่งประกอบด้วย ไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรโอส สูงกว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากมันสำปะหลัง งานวิจัยของ Pan and Lee [44] ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจากเศษข้าวเจ้า (rice crumb) โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นตอนลิควอแฟคชัน เอนไซม์โปรโมไซม์ และเอนไซม์เบตาอะไมเลส 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขั้นตอนกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน และใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นตอนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จะได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 53.19 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ประกอบด้วยไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรโอส จากนั้นนำไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไปทำให้บริสุทธิ์สูง โดยการเติมยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ลงไปเพื่อให้ใช้น้ำตาลชนิดอื่นที่ปนอยู่ในไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จะทำให้ได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์ 66.5-99.4 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ Sheu *et al.* [72] ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ตรึงบนกลูตารัลดีไฮด์-ไคโตซานบีดที่บรรจุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้สารละลายน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัตถุดิบ ทำการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ Arrojo *et al.* [38] ได้ศึกษาการเปลี่ยนมอลโตสเป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย

ใช้เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ได้จากยีสต์ *Xantophyllomyces dendrorhous* โดยใช้สารละลายมอลโตสความเข้มข้น 525 กรัม/ลิตร เป็นวัตถุดิบ พีเอช 5.6 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าจะได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปไตร และเตตระแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 167.1 กรัม/ลิตร งานวิจัยของ Kuriki *et al.* [4] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์นีโอพูลูลาเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 เป็นระยะเวลา 32 ชั่วโมง โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ จะได้ความเข้มข้นของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่างๆ ทำการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ปริมาณเอนไซม์ TG (เปอร์เซ็นต์)	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (กรัม/ลิตร)			
			น้ำตาลพาโนส	น้ำตาลมอลโตไตรโอส	น้ำตาลไอโซมอลโตไตรโอส	ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
0.04	5	50	11.67^{f}	9.38^{d}	20.55^{e}	41.60^{j}
0.04	5	60	13.05^{d}	9.47^{d}	21.12^{d}	43.64^{h}
0.04	5	70	12.22^{e}	9.33^{d}	20.28^{e}	41.83^{j}
0.04	6	50	11.67^{f}	9.30^{d}	20.55^{e}	41.52^{j}
0.04	6	60	12.50^{e}	9.47^{d}	20.83^{e}	42.80^{i}
0.04	6	70	12.22^{e}	9.20^{d}	20.00^{e}	41.42^{j}
0.04	7	50	12.50^{e}	6.87^{e}	19.45^{f}	38.82^{k}
0.04	7	60	11.95^{f}	6.92^{e}	19.72^{f}	38.29^{k}
0.04	7	70	11.95^{f}	6.70^{e}	19.17^{f}	37.82^{l}
0.06	5	50	15.83^{b}	11.70^{b}	24.17^{a}	51.70^{b}
0.06	5	60	16.95^{a}	12.13^{a}	24.72^{a}	53.80^{a}
0.06	5	70	16.12^{a}	11.83^{b}	23.88^{b}	51.83^{b}
0.06	6	50	15.83^{b}	11.87^{b}	24.17^{a}	51.87^{b}
0.06	6	60	16.38^{a}	11.70^{b}	23.33^{b}	51.41^{b}
0.06	6	70	16.12^{a}	11.70^{b}	22.50^{c}	50.32^{c}
0.06	7	50	15.28^{b}	11.67^{b}	21.38^{d}	48.33^{e}
0.06	7	60	15.83^{b}	11.70^{b}	21.95^{d}	49.48^{d}
0.06	7	70	14.72^{c}	11.58^{b}	20.55^{e}	46.85^{g}
0.08	5	50	15.55^{b}	11.70^{b}	22.50^{c}	49.75^{d}
0.08	5	60	16.12^{a}	11.67^{b}	23.62^{b}	51.41^{b}
0.08	5	70	15.55^{b}	11.55^{b}	23.33^{b}	50.43^{c}
0.08	6	50	15.83^{b}	11.72^{b}	23.05^{b}	50.60^{c}
0.08	6	60	16.38^{a}	11.70^{b}	23.62^{b}	51.70^{b}
0.08	6	70	16.12^{a}	11.62^{b}	22.50^{c}	50.24^{c}

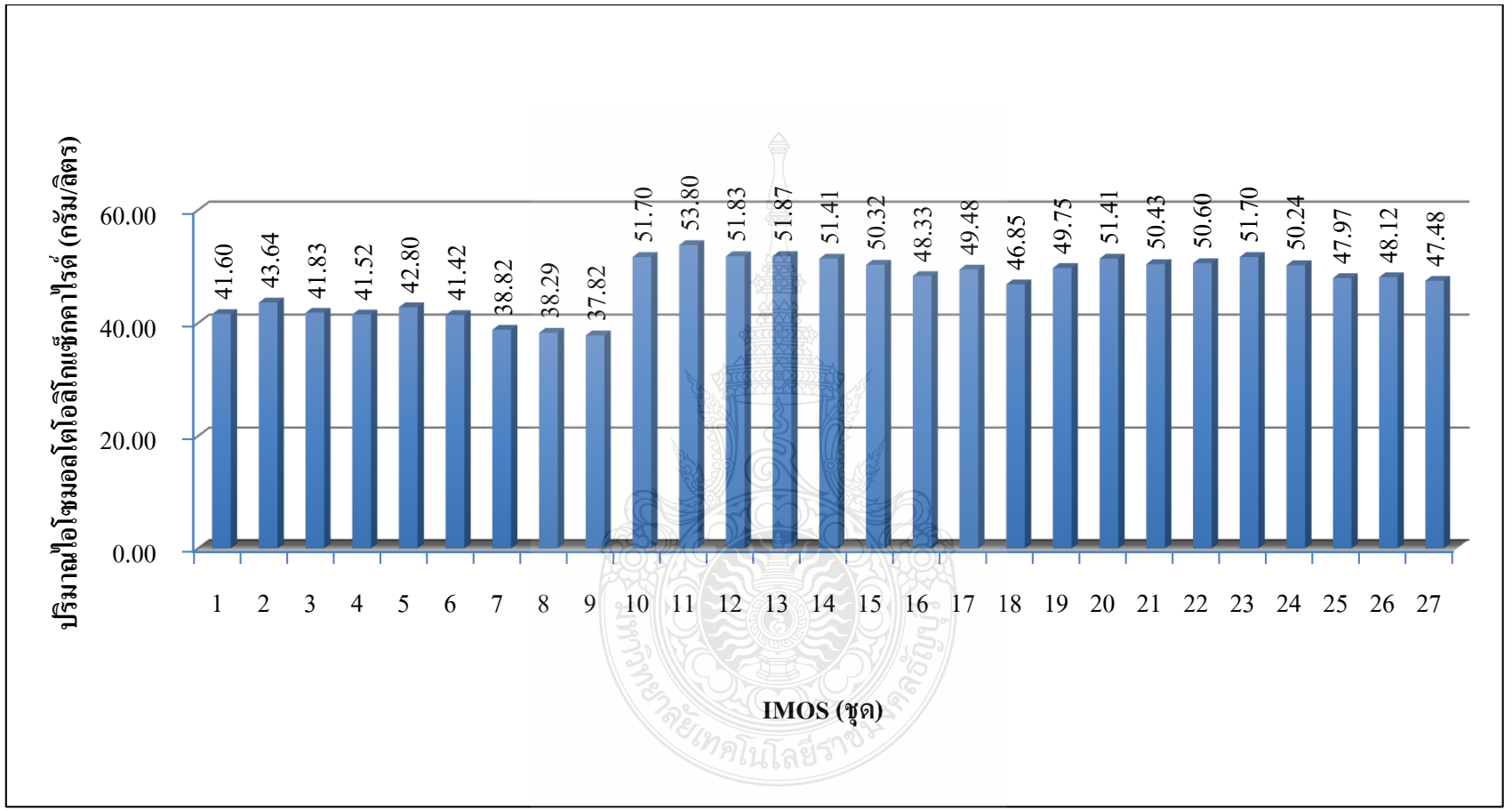
ตารางที่ 4.4 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่างๆ ทำการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ต่อ)

ปริมาณเอนไซม์ TG (เปอร์เซ็นต์)	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)			
			น้ำตาลพาโนส	น้ำตาลมอลโตไตรโอส	น้ำตาลไอโซมอลโตไตรโอส	ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
0.08	7	50	15.00[b]	10.75[c]	22.22[c]	47.97[f]
0.08	7	60	14.72[c]	10.62[c]	22.78[c]	48.12[e]
0.08	7	70	15.00[b]	10.53[c]	21.95[d]	47.48[f]

หมายเหตุ [1]อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

ตารางที่ 4.5 ผลได้และอัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับปฏิบัติการ

พารามิเตอร์	การผลิตระดับปฏิบัติการ
ผลได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Yield, $Y_{p/s}$)	0.61
อัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	8.97



ภาพที่ 4.7 ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากย่อยด้วยปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสให้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 10 นาที จะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสประมาณ 12 เมื่อได้น้ำเชื่อมที่ค่าสมมูลเดกซ์โทรสประมาณ 12 แล้ว จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงนั้น คือ เอนไซม์เบตาอะไมเลสและเอนไซม์มอลโตจิเนส ที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.13 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) ตามลำดับ พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส เท่ากับ 58.08 เปอร์เซ็นต์

การผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากอาหารเหลว พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 1,668.25 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ทำการย่อยเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จะสามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เช่น พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอสเท่ากับ 16.95, 12.13 และ 24.72 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการแยก การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ได้จากการผลิตในอาหารเหลว

5.2.2 ควรมีการศึกษาการใช้วัตถุดิบจากแป้งชนิดต่างๆที่มีราคาถูกในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

5.2.3 ควรมีการขยายการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

บรรณานุกรม

[1] สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, *เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2547.

[2] สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์ และสิทธิวัฒน์ เลิศศิริ, "การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์," *รายงานวิจัย*, สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ, 2544.

[3] J.K. Shetty and O.J. Lantero, "Transglucosylation of malto-oligosaccharides : process for producing isomalto-oligosaccharides, new class of oligosaccharides," Genencor international, 1999.

[4] T. Kuriki, M. Yanase, H. Takata, Y. Takesada, T. Imanaka and S. Okada, "A new way of producing isomalto-oligosaccharide syrup by using the transglycosylationreaction of neopullulanase," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59(4), pp. 953-959. 1993.

[5] S. Kumar, and Khare, S.K., "Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming α-amylase from moderately halophilic Marinobacter sp. EMB8," *Bioresource.Technology*, vol. 116, pp. 247-251, 2012.

[6] A. Tanriseven and S. Dogan , "Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres." *Process Biochemistry*, vol. 37, pp. 1111-1115, 2002.

[7] S. Moon and G. Cho, "Production of maltooligosaccharides from starch and separation of maltopentaose by adsorption of them on activated carbon (I)," *Biotechnology Bioprocess Engineering*, vol. 2, pp. 19-22, 1997.

[8] Q. Lin, H. Xiao, J. Zhao, L. Li, F. Yu, X. Liu and X. Cheng, "Production of isomalto-oligosaccharide syrup from rice starch using an one-step conversion method," *Journal Food Technology*, vol. 46(6), pp. 1194-1200, 2011.

[9] C. Moulis, M.G. Vaca, S. Suwannarangsee, P. Monsan, M. Remaud-Simeon and G. Potocki-Veronese, "One-step synthesis of isomalto-oligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextransucrase," *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 26, pp. 141-151, 2008.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[10] J.P.M. Sander, “Starch manufacturing in the world,” in Advanced Post Academic Course on Tapioca Starch Technology, Jan 22-26 Jan & Feb 19-23, 1996.

[11] แน่งน้อย อัมราภร, *รายงานการศึกษาเรื่องอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง*, กรุงเทพฯ: สำนักปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม, 2531.

[12] ไกวัล กล้าแข็ง, “มันสำปะหลัง”, ใน *มันสำปะหลัง: คู่มือนักวิชาการส่งเสริมการเกษตร*. กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551, หน้า 6-7.

[13] จุฑาลักษณ์ วงค์ชัยชนะ, *วิชาการ.คอม (Online)*, 2557, Available: http://www.vcharkarn.com/varticle/60649, (20 January 2013).

[14] สุพรรณวดี ประสงค์, รุ่งทิวา ถิระโคตร, สุพรรณยา ช่วยบรรจง และศศิศานต์ฤดี คงศรี, *คาร์โบไฮเดรต (Online)*, Available: http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/28/P_Untitled-10.html, (17 March 2013).

[15] จิรวรรณ อภิรักษากร, “การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลัง,” วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท, สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540.

[16] G.M.A. van Beynum and J.A. Roles, “Starch Conversion Technology,” Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 326, 1985.

[17] C.A. Brautlecht, “Starch Its Sources, Production and Uses,” Reinhold Publishing Corporation, New York, pp. 408, 1953.

[18] เอกพจน์ ฤกษ์กลาง และธนา พินิจวชิรพงศ์, “การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแป้งมันสำปะหลังด้วยระบบการผลิตแบบลีนขั้นตอนการสกัดหยาบ บริษัท แป้งตะวันออกเฉียงเหนือ (1987) จำกัด,” ปริญญานิพนธ์ ระดับปริญญาตรี, สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน, 2553.

[19] กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, “เทคโนโลยีการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง,” ใน *เทคโนโลยีของแป้ง*. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2550, หน้า 78-79.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[20] K. Sriroth, K. Piyachomkwan, S. Chotineeranat, R. Chollakup, V. Santisopasri and C.G. Oates, "Impact of dought during early growth on cassava starch quality," in *Fourth International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network*. November 2-6, 1999.

[21] C.W. Douglas and C.Michinson, "Enzymes involed in the processing of starch to sugars," *Trends in Biotechnology Journal*, vol. 15, pp. 349-352, 1997.

[22] พักตร์ประไพ ประจำเมือง และวิชัย ลีลาวัชรมาศ, "เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง," *วารสารศูนย์บริการวิชาการ*, ฉบับที่ 11(4), หน้า 28-31, 2546.

[23] P. Bruinenberg, "Bioconversion of starch by enzymes," in *Advanced Post-Academic Course on Tapioca Starch Technology (I)*, January 22-26 & February 19-23, 1996, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand.

[24] J.E.C. van der Maarel, B. van der Veen, J.M.C. Vitdehaang, H. Leemhuis and L. Dijikuizen, "Properties and applications of starch –converting enzymes of the α-amylase family." *Journal of Biotechnology*, vol. 94, pp. 137-155, 2002.

[25] C. Bertoldo and G. Antranikian, "Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria," *Current Opinion in Chemical Biology Journal*, vol. 6(2), pp. 151-160, 2002.

[26] M.F. Chaplin and C. Bucke, Enzyme Technology, Cambridege University Press, Grat Britain, pp. 160, 1990.

[27] พักตร์ประไพ ประจำเมือง, "การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ," วิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาโท, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2546.

[28] J.C. Purdue, D.K. Kevin, D.B. Michael and LT. Jerry, "Highly fermentable, high maltose, non-crystallizing starch conversion syrup," *Biotechnology Advance*, vol. 4(13), pp. 310-311, 1994.

[29] J.F. Shaw and Nankang, *Production of high-maltose syrup and high-protein by product from materials that contain starch and protein by enzymatic process (online)*, 1994, Available: http://www.freepatentsonline.com/53212739.html, (15 July 2013).

บรรณานุกรม (ต่อ)

[30] O. Gaouar, N. Zakhia, C. Aymard and G.M. Rios, "Production of maltose syrup by bioconversion of cassava starch in an ultrafiltration reactor," *Industrial Crops and Products Journal*, vol. 7, pp. 159-167, 1998.

[31] E.M.M. Hilary, T.K. Catherine and M.F. William, High maltose-producing amylolytic system of *Streptomyced* sp., *Biotechnology Letter*, vol. 21, pp. 23-26, 1999.

[32] T. Noda, S. Furuta and I. Suda, "Sweet potato β-amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose," *Carbohydrate Polymers Journal*, vol. 44, pp. 189-195, 2001.

[33] วรวิกัลยา เกียรติ์พงษ์ลาภ และสุนันทา ทองทา, "สมบัติทางโครงสร้างและทางกายภาพของแป้งมันสำปะหลังตัดกิ่ง," *วารสารเทคโนโลยีสุรนารี*, ฉบับที่ 14(2), หน้า 195-204, 2550.

[34] L.M. Sung, S.K. Cho, H.J. Eom, S.Y. Kim, T.J. Kim and N.S. Han, "Optimized substrate concentrations for production of long-chain isomaltooligosaccharides usingdextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F," *Journal Microbiology Biotechnology*, vol.18(6), pp. 1141-1145, 2008.

[35] S. Chockchaisawasdee and N. Poosaran, "Production of isomaltooligosaccharides from banana flour," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, pp. 180-186, 2013.

[36] P. Samam and S. Artjariyasripong, "Prebioticisomaltooligosaccharide production from Thai rice, in *8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology*, October 4-6, Pattaya, Thailand, pp. 260-265, 2010.

[37] P. Samam, A. Chaiongkam, S. Moonmangmee and S. Artjariyasripong, "Prebiotic isomaltooligosaccharide production from economic crops of Thailand, *Journal Research KKU*, vol. 17(5), pp. 794-799, 2012.

[38] L.F-Arrojo, D. Marín, A.G. D. Segura, D. Linde, M. Alcalde, P.G-Alonso, I. Ghazi, F.J. Plou, M.F-Lobato and A. Ballesteros, "Transformation of maltose into prebiotic isomaltooligosaccharides by a novel α-glucosidase from *Xantophyllomyces dendrorhous*," *Process Biochemistry*, vol. 42, pp. 1530-1536, 2007.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[39] Novozymes. “Production of maltose syrup,” Denmark, 2005.

[40] G.E. Inglett, “Symposium : Sweeteners,” AVI, Westport, 240 pp., 1974.

[41] Genencor international, CLARASE® L., Finland, 2001.

[42] Novozymes, Maltogenase® L., Denmark, 2002.

[43] วราภรณ์ บูรณานนท์, “Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis,” *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม*, ฉบับที่ 16(2), หน้า 14-17, 2552.

[44] Y.C. Pan and W.C. Lee, “Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells,” *Biotechnology Bioengineering*, vol. 89(7), pp. 797-804, 2005.

[45] C.P. Benson, C.T. Kelly and W.M. Fogarty, “Production and quantification of transglucosidase from *Aspergillus niger*,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 32(7-12), pp. 790-798, 1982.

[46] Q. Lin, H. Xiao, G-Q. Lin, Z. Lin, L. Li and F. Yu, “Production of Maltose Syrup by Enzymatic Conversion of Rice Starch,” *Food Bioprocess Technology*, vol. 6, pp. 242-248, 2013.

[47] M. Karmakar and R.R. Ray, “A Maltotriose producing thermostable amylase from *Bacillus* sp. KR11,” *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, vol. 3, pp. 91-99, 2011.

[48] พัชรา วีระกะลัส, “*เอนไซม์*,” สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพฯ, 344 หน้า, 2541.

[49] G.R Gibson and M.B. Roberfoid, “Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics,” *Journal of Nutrition*, vol. 125, pp. 1401-1412, 1995.

[50] G.R Gibson, “Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin,” *Journal of Nutrition*, vol. 129(7), pp. 1438s-1441s, 1999.

[51] เฉลิมขวัญ ดำคำ และมัลลิกา ชมนาวัง, “คุณรู้จัก Prebiotics แล้วหรือยัง,” *วารสารอาหาร*, ปีที่ 35 ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน, หน้า 96-102, 2548.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[52] G.R. Gibson, "Prebiotic," *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 18, pp. 287-298, 2004.

[53] S. Kolida, K. Tuohy and G.R. Gibson, "Prebiotic effects of inulin and oligosaccharide," *British Journal of Nutrition*, vol. 87, pp. s193-s197, 2002.

[54] L. Ellegard, H. Andersson and I. Bosaeus, "Inulin and oligoeructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects," *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 51, pp. 1-5, 1997.

[55] สุพจน์ นวลละออง, "การสกัดสารพรีไบโอติกส์จากพืชเกษตร," วิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาโท, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2552.

[56] ธนารัตน์ ศุภศิริ, "Prebiotic แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ," *วารสารวิทยาศาสตร์*, ปีที่ 35 ฉบับที่ 4-6 พฤศจิกายน-ธันวาคม, หน้า 357-360, 2542.

[57] สุดาทิพย์ ฐิตะโภคา, "พรีไบโอติก," *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, ฉบับที่ 37(4), หน้า 366-375, 2552.

[58] R.G. Crittenden and M.J. Playne, "Prebiotics," in *Y.K. Lee and S. Salminen (Eds) Handbook of probiotics and prebiotics (2nd ed.) New Jersey : John Wiley & son Inc.*, pp. 535-581, 2009.

[59] E. Timmermans, "Lactose; its manufacture and physiochemical properties," in *H.V. Bekkum, H. Roper and A.G. Voragewn, Journal (Eds.) Carbohydrates as organic raw materials III,* VCH, Weinheim, pp.67-92, 1996.

[60] S. Perrin, M. Warchol, J.P. Grill and F. Schneider, "Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC15697 on batch culture in semi-synthetic medium," *Journal Applied Microbiology*, vol. 90, pp. 859-865, 2001.

[61] R.G. Crittenden, "Prebiotics," in *G. Tannock (Ed.) Probiotics : Acritical Review, London : Academic Press*, pp. 141-156, 1999.

[62] T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku, Y. Machida, M. Arai and T. Mitsuoka, "Effect of isomalto-oligosaccharides on human fecal flora," *Bifidobacteria Microflora*, vol. 7, pp. 61069, 1998.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[63] R. Tanaka, H. Takayama, M. Morotomi, T. Kuroshima, S. Ueyama, K. Matsumoto, A. Kuroda and M. Mutai, "Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve*4006 on the human fecal flora," *Bifidobacteria Microflora*, vol. 2, pp. 17-24, 1983.

[64] M. Ito, Y. Deguchi, A. Miyamori, K. Matsumoto, H. Kikuchi, Y. Kobayashi, T. Yajima and T. Kan, "Effects of administration of galactooligosaccharides on the human fecal microflora stool weight and abdominal sensation," *Microbiology Ecology in Health and Disease*, vol. 3, pp. 285-292, 1990.

[65] ปราณี อ่านเปรื่อง, "*เอนไซม์ทางอาหาร*," สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพฯ, 440 หน้า, 2543.

[66] J-F. Shaw and J-R. Sheu, "Production of High-maltose Syrup and High-protein Flour from Rice by an Enzymatic Method," *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, vol. 56(7), pp. 1071-1073, 1992.

[67] M. Mendis, B.R. Mendoza and S. Simsek, "Covalent Immobilization of Transglucosidase onto Polymer Beads for Production of Isomaltooligosaccharides," *Catalysis Letters*, vol. 142, pp. 1107-1113, 2012.

[68] G-G. Chen, W. Li, Y-K. Zhang, Y-L. Qin, K-Y. Wu and Z-Q. Liang, " A high-throughput method for screening of *Aspergillus niger* mutants with high transglycosylation activity by detecting non-fermentable reducing sugar," *World Journal Microbiology Biotechnology*, vol. 27, pp. 1519-1523, 2011.

[69] J.H. Pazur, Y. Tominaga, C.W. DeBrosse and L.M. Jackman, *Carbohydrate Research*, vol. 61, pp. 279-290, 1978.

[70] S. Chiba and T. Shimomura, *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, vol. 26, pp. 59-67, 1979.

[71] D-C. Sheu, K.J. Duan and C.T. Lin, *Biotechnology Techniques*, vol. 8, pp. 515-520, 1994.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[72] D-C. Sheu, C.I. Huang and K.J. Duan, "Production of isomaltooligosaccharides by α-glucosidase immobilized in chitosan beads and by polyethyleneimine-glutaraldehyde treated mycelia of *Aspergillus carbonarious*," *Biotechnology Techniques*, vol. 11(5), pp. 287-291, 1997.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา
และการเตรียมอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

สูตรอาหาร

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	3	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 ชั่งอาหารแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนด

1.2 ค่อยๆเติมน้ำและคนให้อาหารแต่ละชนิดและมีการให้ความร้อนจนอาหารแต่ละชนิดเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

สูตรอาหาร

Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร
Potatoes infusion from	200	กรัมต่อลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ชั่งอาหารแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนด

2.2 ค่อยๆเติมน้ำและคนให้อาหารแต่ละชนิดและมีการให้ความร้อนจนอาหารแต่ละชนิดเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

2.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox Agar (CZA)

สูตรอาหาร

Sucrose	30	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร
Sodium nitrate	2	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	1	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.5	กรัมต่อลิตร
Potassium chloride	0.5	กรัมต่อลิตร
Ferrous sulphate	0.01	กรัมต่อลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.3-7.5

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 ชั่งอาหารแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนด

3.2 ค่อยๆเติมน้ำและคนให้อาหารแต่ละชนิดและมีการให้ความร้อนจนอาหารแต่ละชนิดเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

3.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียมอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (Transglucosidase, TG)

สูตรอาหาร

D-Glucose	150	กรัมต่อลิตร
Corn steep liquor	25	กรัมต่อลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.9

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 ชั่งอาหารแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนด

4.2 กวนอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปิดจุกสำลี

4.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ปรับ pH เท่ากับ 5.5

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมบัฟเฟอร์

1. การเตรียม 0.1 M McIlvaine buffer pH 4.0

วิธีการเตรียม

1.1 สารละลาย A 0.1 M citric acid

ชั่งสาร Citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย B 0.2 M Disodium hydrogen phosphate

ชั่งสาร Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 35.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.3 ค่อยๆผสมสารละลาย A และ B วัดพีเอชให้เท่ากับ 4.0 จะได้ 0.1 M McIlvaine buffer pH 4.0

2. การเตรียม 0.02 M Acetic acid – sodium acetate buffer

วิธีการเตรียม

2.1 สารละลาย 3 M Acetic acid

ดูดสารละลายอะซิติกเข้มข้น (Acetic acid Conc.) ปริมาตร 180.15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

2.2 สารละลาย 3 M Sodium acetate (NaOAc) pH 5.2

ชั่งสาร Sodium acetate (NaOAc) 408.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 5.2 ด้วย Glacial acetic acid (CH_3COOH) และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร บรรจุใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องตู้นึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 ดูดสารละลายกรดอะซิตริก (CH_3COOH) 1.57 มิลลิลิตร และดูดสารละลายโซเดียมอะซิเตรท (NaOAc) 1.76 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีของ National standard method of China (QB2525-2001)

1.1 ชั่งสารละลายกลูโคส (D-Glucose) ปริมาณ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 ชั่งสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-aminoantipyrine) ปริมาณ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร

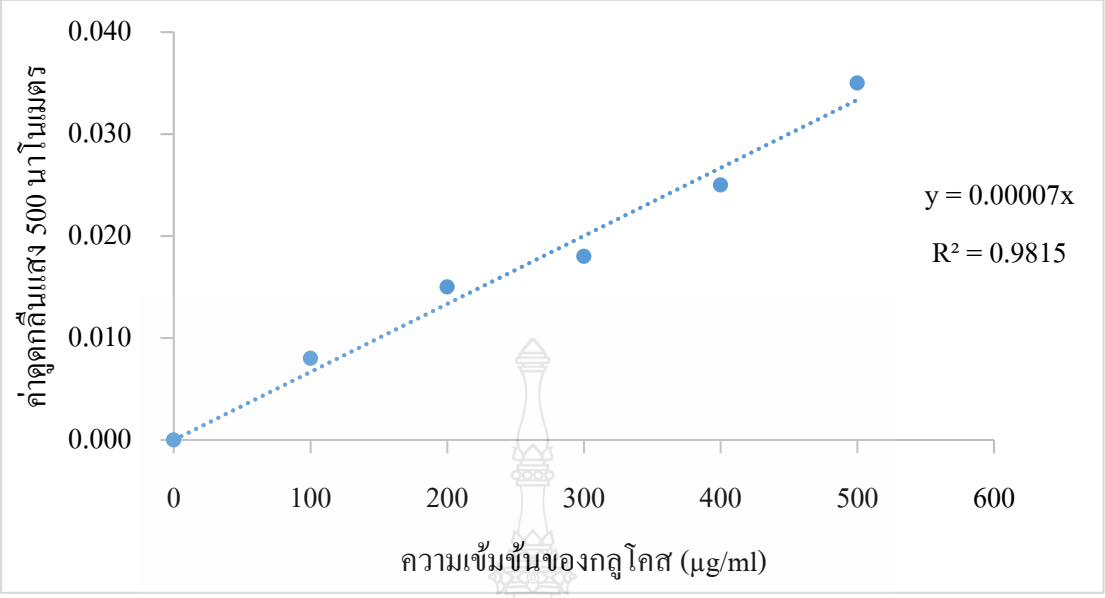
1.3 เจือจางสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.4 ดูดสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลอดทดลอง 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.5 นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	5,000
100	1,000	4,000
200	2,000	3,000
300	3,000	2,000
400	4,000	1,000
500	5,000	0



ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

2. การวิเคราะห์โปรตีน

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1.1 สารละลาย A : ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 0.5 กรัมและโซเดียมซิเตรท ($C_6H_5O_7Na_3$) 1 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลาย B : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.1.3 สารละลาย C : ผสมสารละลายB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันที)

2.1.4 สารละลาย D : ผสมสารละลาย Folin-Ciocalteau ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันที)

2.1.5 สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียม standard protein curve

2.2.1 นำสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย C ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

2.2.2 เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที

2.2.3 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ชุดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่น

2.2.4 เขียนกราฟ standard protein curve ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin

2.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.1 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการเตรียม standard protein curve

2.3.2 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟ standard protein curve

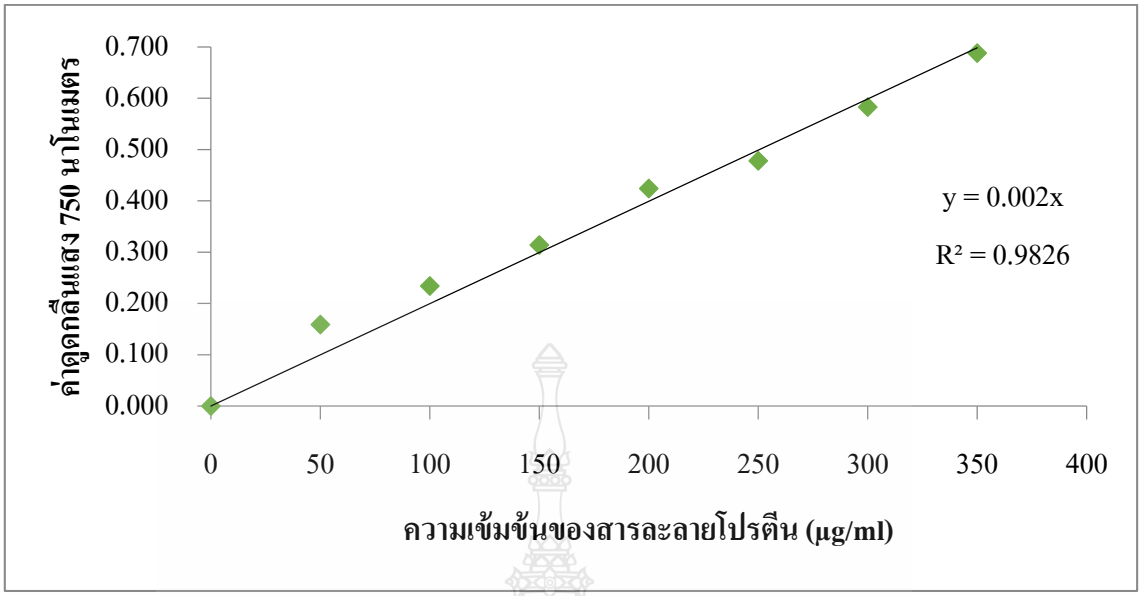
2.4 การคำนวณ

ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/ลิตร)

$$= \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร)} \times \text{(อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน)}}$$

ตารางที่ ข-2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารละลายโปรตีน (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	5,000
50	834	4,166
100	1,667	3,333
150	2,500	2,500
200	3,333	1,667
250	4,166	834
300	5,000	0



ภาพที่ ข-2 กราฟมาตรฐานโปรตีน

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอสด้วยวิธี HPLC

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องควบคุมระบบ (system controller) Shimadzu LC-3A

3.1.2 คอลัมน์ Lichrocart NH_2 (E.Merck) ขนาด 250x4 มิลลิเมตร

3.1.3 LDC 4100 spectrophotometer monitor

3.1.4 Shimadzu LC-3A High Performance Liquid Chromatography

3.1.5 Shimadzu GR 1A integrator

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.1 สารละลายมาตรฐานกลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส เตรียมที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm ในน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

3.2.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ เตรียมโดยสารละลายอะซีโตไนไตรท์ (Acetonitrile) และน้ำกลั่น อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) กรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที

3.3 วิธีวิเคราะห์

3.3.1 ตั้งค่าตัวแปรต่างๆของเครื่องควบคุมระบบ (system controller) Shimadzu LC3A อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ oven 30 องศาเซลเซียส

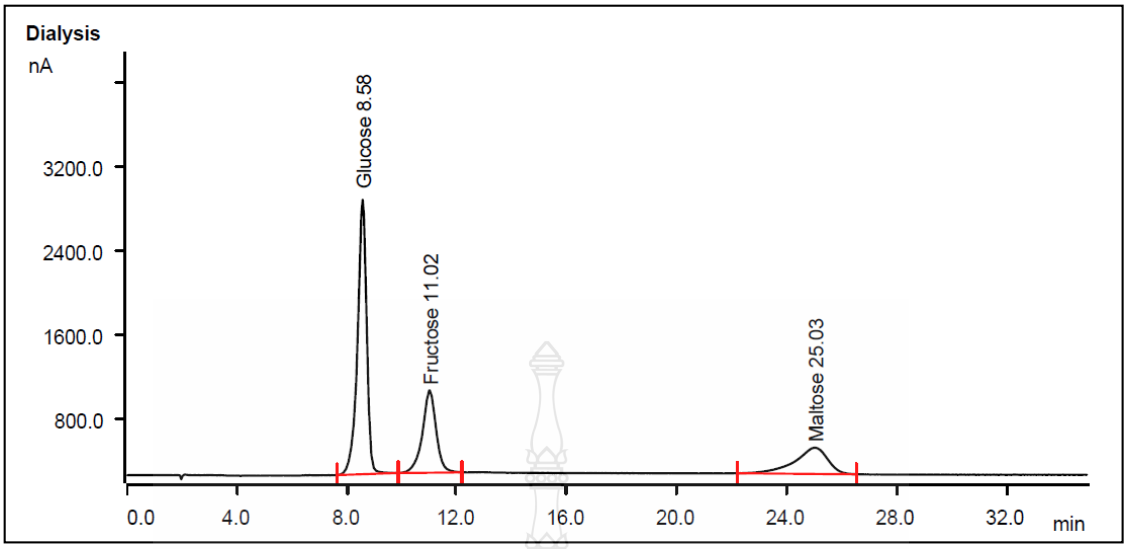
3.3.2 ตั้งค่าความยาวคลื่นของ LDC 4100 spectrophotometer monitor ให้เท่ากับ 254 นาโนเมตร

3.3.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยแรงดันสูงจากปั๊ม เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์จะเกิดการดูดกลืนแสงของสารที่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์และส่งสัญญาณไปที่เครื่องรวบรวมสัญญาณ (integrator) แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ซึ่งแสดงเวลาที่ตัวอย่างสารละลายน้ำตาลถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ (retention time) และพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลโดยเวลาที่ถูกหน่วงในคอลัมน์ของสารชนิดเดียวกันจะเท่ากัน ดังนั้นจึงใช้เวลาที่ถูกหน่วงในคอลัมน์เป็นตัวบ่งบอกสารละลายน้ำตาล ในตัวอย่างเปรียบเทียบกับเวลาของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน นำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ทำการฉีดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลในตัวอย่าง

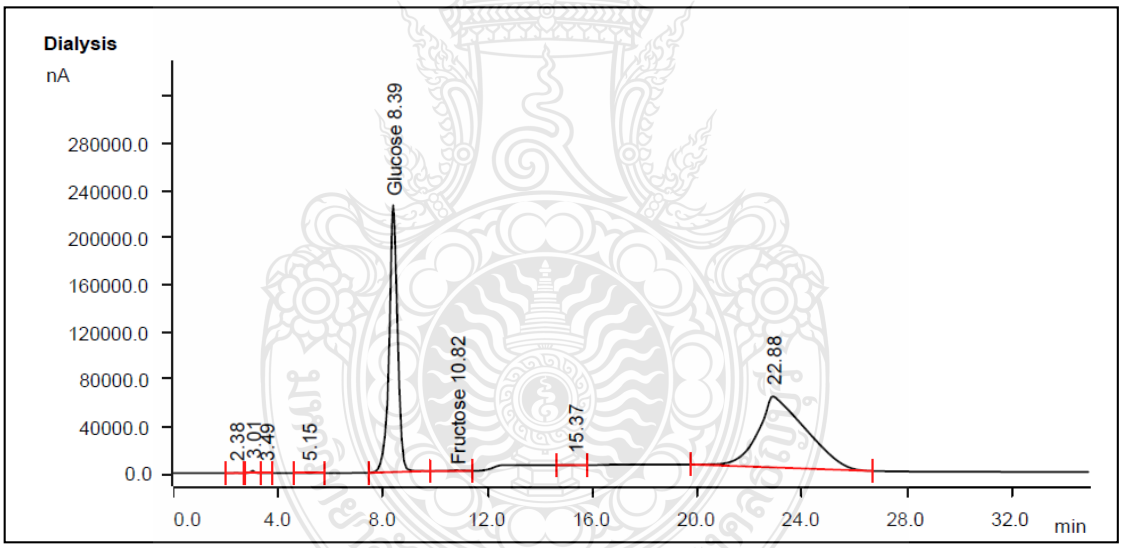
3.3.4 ฉีดสารตัวอย่างที่ได้เจือจางให้เหมาะสมที่ให้พื้นที่ใต้กราฟอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบระยะเวลาที่ถูกหน่วง (retention time) เพื่อหาชนิดของน้ำตาลกับเวลาที่ถูกหน่วงของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และนำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้มาทำการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลในตัวอย่าง

3.4 วิธีการคำนวณ

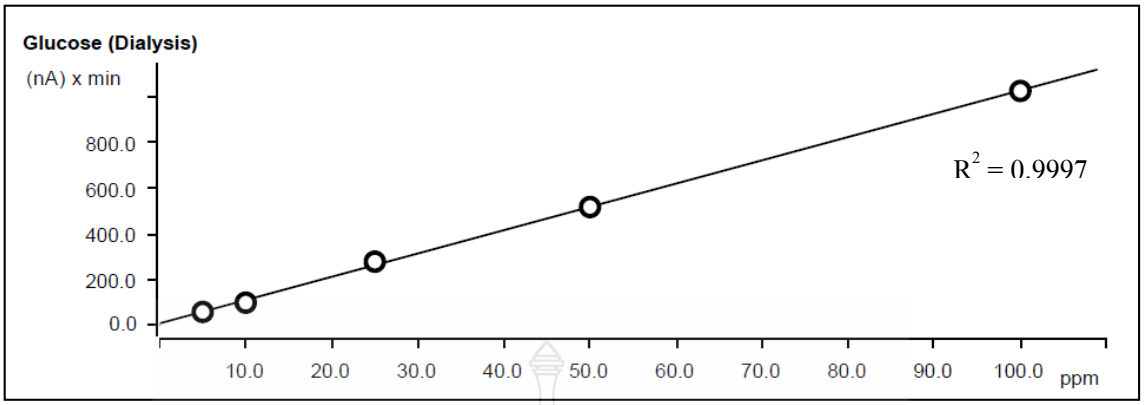
$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./มล.)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรม}) \times (\text{การเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



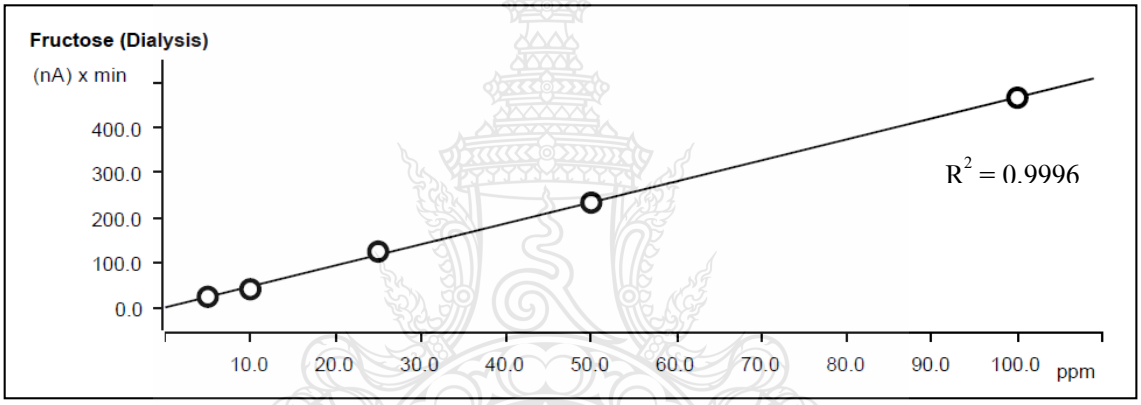
ภาพที่ ค-3 โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm



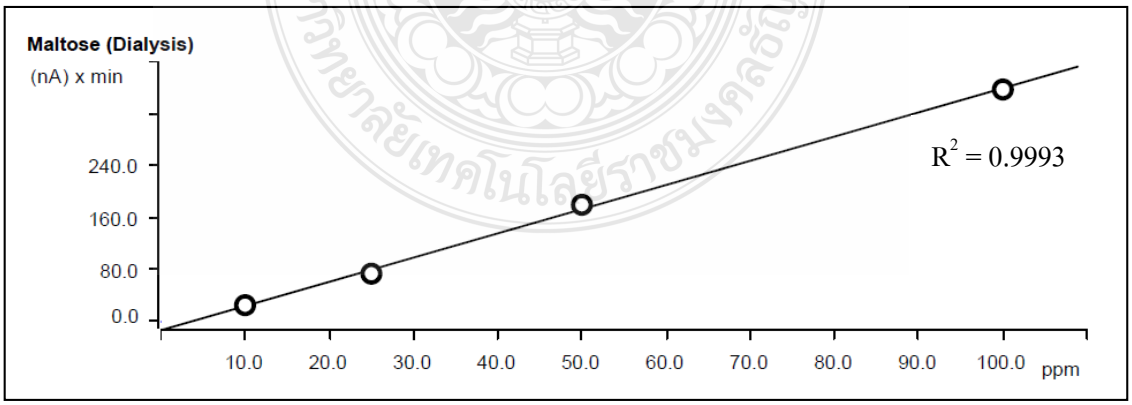
ภาพที่ ค-4 โครมาโทรแกรมของสารตัวอย่างของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm



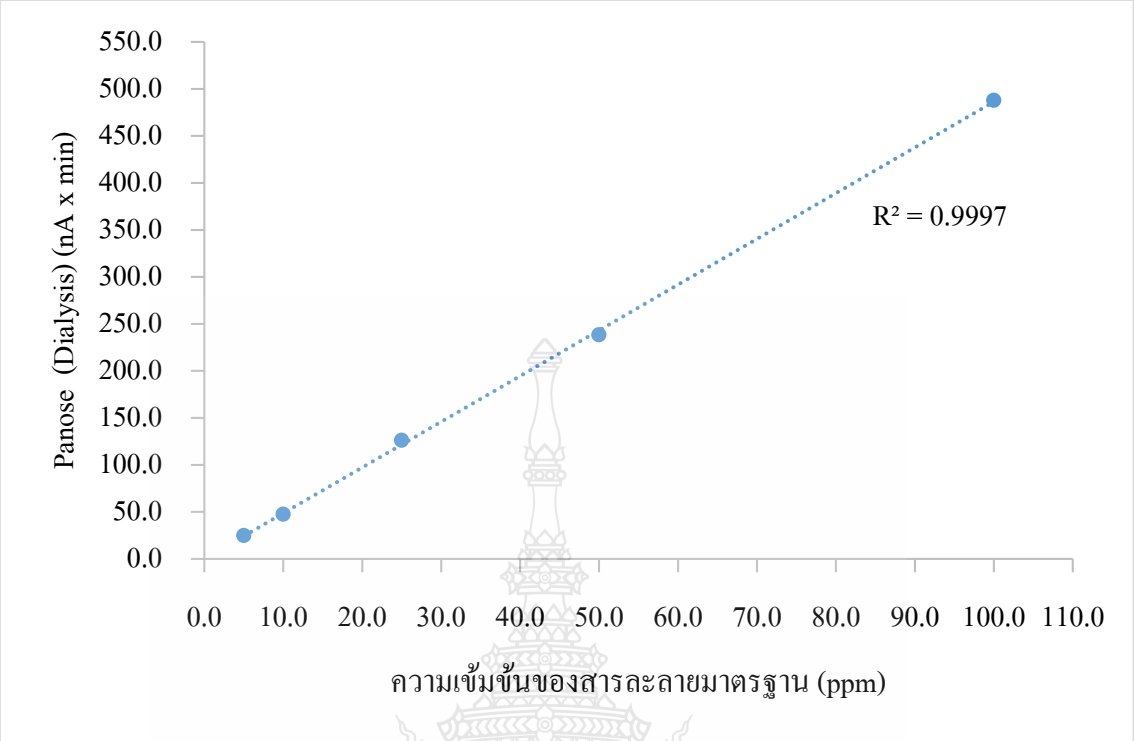
ภาพที่ ค-5 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



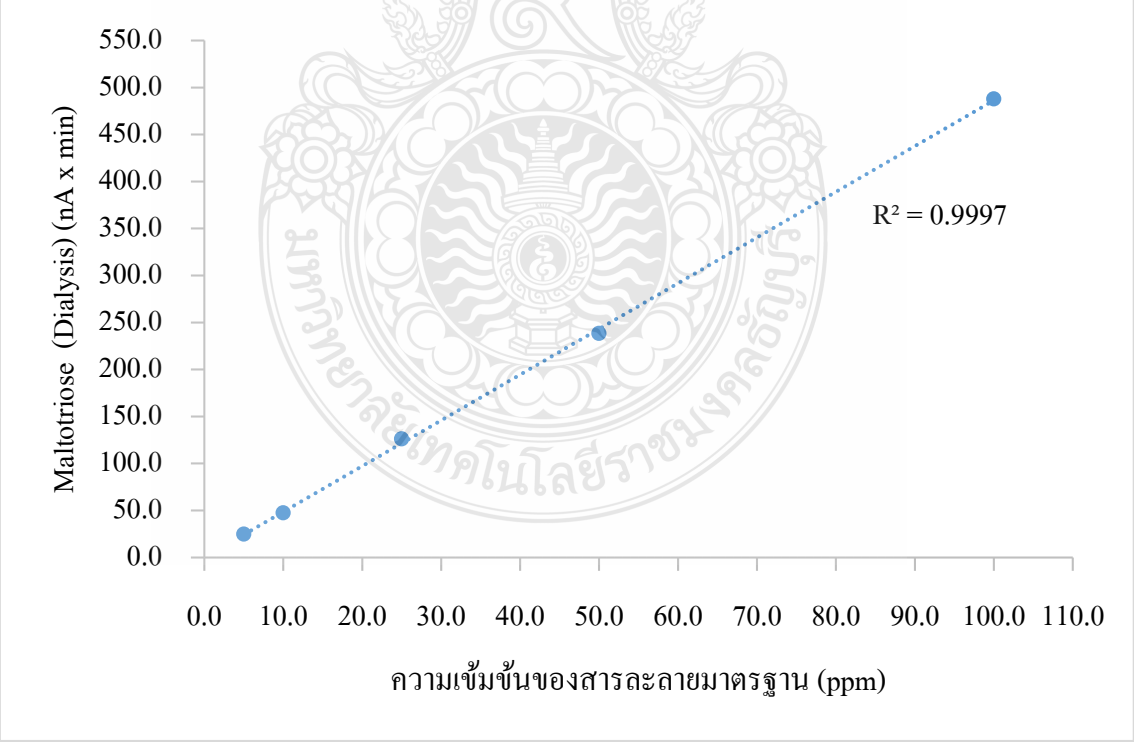
ภาพที่ ค-6 กราฟมาตรฐานฟรุกโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



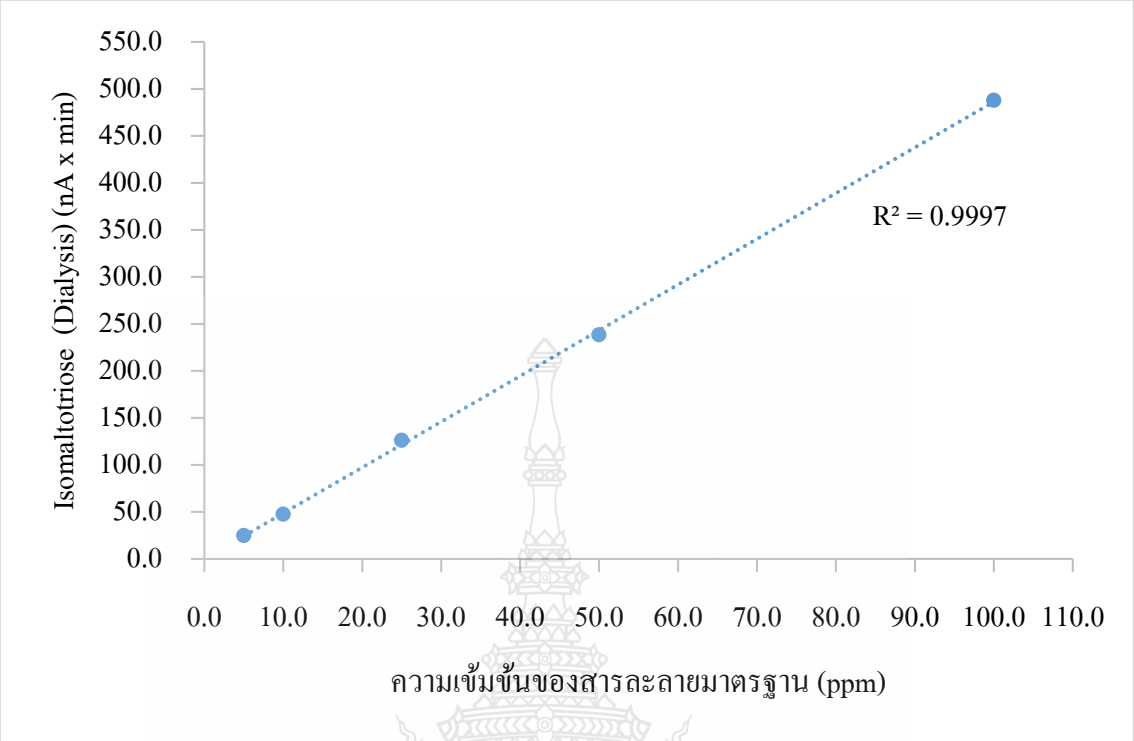
ภาพที่ ค-7 กราฟมาตรฐานมอลโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



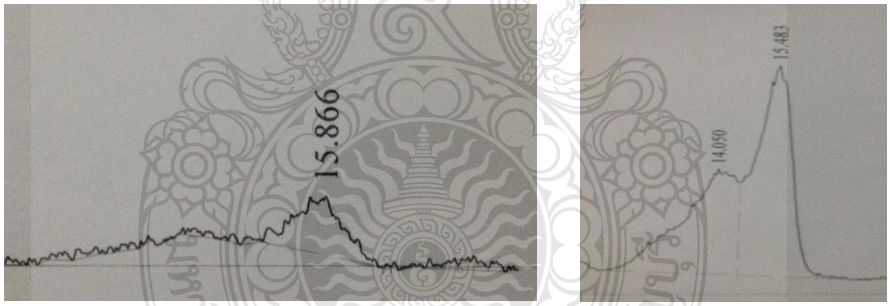
ภาพที่ ค-8 กราฟมาตรฐานพาโนสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



ภาพที่ ค-9 กราฟมาตรฐานมอลโตไตรโอสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



ภาพที่ ค-10 กราฟมาตรฐานไอโซมอลโตไตรโอสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



(A) (B)

ภาพที่ ค-11 โครมาโทรแกรมของน้ำตาลมอลโตไตรโอสมาตรฐาน (A) และสารละลายน้ำตาลตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (B) (โดย Retention time 15.866 (A) และ 15.483 (B) คือ น้ำตาลมอลโตไตรโอส

4. การวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose equivalent, DE)

4.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.1.1 สารละลายเฟห์ลิ่ง (fehling's solution)

เตรียมสารละลายเฟห์ลิ่งเอ (fehling's A solution) โดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟส (copper sulphate pentahydrate , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 69.28 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร และเตรียมสารละลายเฟห์ลิ่งบี (fehling's B solution) ละลายโปแตสเซียมโซเดียมทราเทรต (potassium sodium tartate tetrahydrate, $KNaC_4O_6 \cdot 4H_2O$) 346 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) 100 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำสารละลายเฟห์ลิ่งเอและบีผสมเข้าด้วยกันตั้งทิ้งไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง กรองก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์

4.1.2 สารละลายมาตรฐานเดกซ์โทรส (standartdization)

อบน้ำตาลเดกซ์โทรสบริสุทธิ์ (D-Glucose) จำนวนหนึ่งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดความชื้น (desicator) จากนั้นชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไตเตรทกับสารละลายเฟห์ลิ่งตามวิธีการไตเตรทในข้อ 4.2.2 จดปริมาตรสารละลายเดกซ์โทรสที่ใช้ไป (A)

4.1.3 1% เมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ (1% methylene blue indicator)

ละลายเมทิลีนบลู 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.2 วิธีการวิเคราะห์

4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำเชื่อมปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้ทิ้งไว้ให้เย็น วัดความเข้มข้น (% Brix) ของน้ำเชื่อมนำมาคำนวณหาน้ำหนักตัวอย่างจากสูตร

$$\text{น้ำหนักตัวอย่าง (m)} = \frac{1.25}{0.Brix \times 0.DE}$$

นำไปชั่งตามน้ำหนักที่คำนวณได้ละลายในน้ำกลั่น และถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เท่ากัน

4.2.2 การไตเตรท

บรรจุสารละลายตัวอย่างลงในบิวเร็ตขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดสารละลายเฟห์ลิ่ง 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำสารละลายเฟห์ลิ่งตั้งบนเตาไฟฟ้าเมื่อสารละลายเฟห์ลิ่งเริ่มเดือด ไขสารละลายตัวอย่างประมาณ 20 มิลลิลิตร จากบิเร็ตลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายเฟห์ลิ่งอยู่ เขย่าให้เข้ากัน หลังจากสารละลายเดือด 2 นาที ให้เติมสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1-2 หยด จากนั้นไตเตรทโดยเติมสารละลายตัวอย่างครั้งละ 2-3 หยด จนกระทั่งเกิดสีม่วง การไตเตรทต้องเสร็จภายใน 1 นาที นับจากหยดสารละลายเมทิลีนบลู หรือไม่เกิน 3 นาที นับจากที่สารละลายเดือด ระหว่างการไตเตรทจะต้องให้สารละลายในขวดรูปชมพู่เดือด เขย่าให้เข้ากันตลอดเวลา จดปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (V) นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสมมูลเดกซ์โทรสจากสูตร

$$\text{ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE)} = \frac{A \times 12500}{mV \times \%Brix}$$

A คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเดกซ์โทรสที่ใช้ในการไทเทรต

m คือ น้ำหนักตัวอย่าง

V คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไทเทรต

% Brix คือ ความเข้มข้นของน้ำเชื่อม

5. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (Activity of transglucosidase)

5.1 ดูดสารละลายเมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพแรนโนไซด์ (methyl-α-D-glucopyranoside, α-MG) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ ดูดสารละลาย 0.02 M acetic acid – sodium acetate buffer ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.2 ดูดเอนไซม์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

5.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในน้ำร้อนเป็นเวลา 5 นาที

5.4 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5.5 นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

$$\text{Transglucosidase activity (unit/ml)} = \frac{Absorbance \times Dilution}{slope}$$

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณต่างๆ เป็นระยะเวลา 10 นาทีโดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	120.418	4	30.105	134.308	.000
Within Groups	2.241	10	.224		
Total	122.660	14			

ตารางที่ ง-2 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่างๆ เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Enzyme (เปอร์เซ็นต์)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0.02	3	9.8733			
0.04	3		11.9767		
0.06	3		12.7533		
0.08	3			16.1067	
0.10	3				17.6800
Sig.		1.000	.072	1.000	1.000

ตารางที่ ง-3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.517	2	.259	11.033	.010
Within Groups	.141	6	.023		
Total	.658	8			

ตารางที่ ง-4 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Time (min.)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
10	3	11.9767	
20	3		12.4167
30	3		12.5333
Sig.		1.000	.387

ตารางที่ ง-5 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่พีเอชต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.134	4	.034	.572	.689
Within Groups	.587	10	.059		
Total	.722	14			

ตารางที่ ง-6 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่พีเอชต่างๆ โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

pH	N	Subset for alpha = 0.05
		1
6.50	3	11.9867
5.50	3	12.0567
5.00	3	12.0667
6.00	3	12.0800
7.00	3	12.2700
Sig.		.216

ตารางที่ ง-7 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.816	4	1.954	370.073	.000
Within Groups	.053	10	.005		
Total	7.869	14			

ตารางที่ ง-8 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าสมมูลเดกซ์โทรสของการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Temperature (^{O}C)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
75.00	3	10.7433				
80.00	3		10.9167			
85.00	3			11.6900		
90.00	3				12.0333	
95.00	3					12.7000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ภาคผนวก จ

ผลการทดลอง

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง

ตารางผลการทดลองที่ จ-1 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่างๆในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ในระยะเวลา 10 นาที

ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (เปอร์เซ็นต์)	ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE)
0.02	9.87[a]
0.04	11.98[b]
0.06	12.75[b]
0.08	16.11[c]
0.10	17.68[d]

ตารางผลการทดลองที่ จ-2 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เป็นระยะเวลา 30 นาที

ระยะเวลา (นาที)	ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE)
10	11.98[a]
20	12.42[b]
30	12.53[b]

ตารางผลการทดลองที่ จ-3 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับพีเอชต่างๆ ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เป็นระยะเวลา 10 นาที

พีเอช	ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE)
5.0	12.07[a]
5.5	12.06[a]
6.0	12.08[a]
6.5	11.99[a]
7.0	12.27[a]

ตารางผลการทดลองที่ จ-4 ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.04 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เป็นระยะเวลา 10 นาที

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE)
75	10.74[a]
80	10.92[b]
85	11.69[c]
90	12.03[d]
95	12.70[e]

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสม

ตารางผลการทดลองที่ จ-5 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมเอนไซม์ผสมต่างๆ ในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง

เอนไซม์ผสม (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์)
B 0.04 + Pu 0.15	55.80[a]
B 0.04 + MG 0.13	52.19[b]
MG 0.13 + Pu 0.15	47.87[c]

หมายเหตุ ; B ย่อมาจาก β-amylase, MG ย่อมาจาก Maltogenase และ Pu ย่อมาจาก Pullulanase

ตารางผลการทดลองที่ จ-6 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมเอนไซม์ผสมระหว่างเบตาอะไมเลสร่วมกับมอลโตจิเนส ที่พีเอชต่างๆ ในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง

พีเอช (pH)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์)
5.0	54.84[a]
5.5	54.88[a]
6.0	50.24[b]
6.5	50.22[b]
7.0	46.88[c]

ตารางผลการทดลองที่ จ-7 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมเอนไซม์ผสมระหว่างเบตาอะไมเลส ร่วมกับมอลโตจิเนส ที่พีเอชเท่ากับ 5.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์)
50	50.74[a]
55	56.24[b]
60	56.21[b]
65	48.46[c]
70	47.17[d]

ตารางผลการทดลองที่ จ-8 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการเติมสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์)
2	43.84[a]
4	48.77[b]
6	58.08[c]
8	58.10[c]
10	58.11[c]
12	58.14[c]
14	58.22[c]
16	58.20[c]
18	58.41[c]
20	58.38[c]
22	58.38[c]
24	58.39[c]

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ตารางผลการทดลองที่ จ-9 ปริมาณน้ำตาลไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการเติมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

ปริมาณเอนไซม์ TG (เปอร์เซ็นต์)	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (กรัม/ลิตร)			
			น้ำตาลพาโนส	น้ำตาลมอลโตไตรโอส	น้ำตาลไอโซมอลโตไตรโอส	ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
0.04	5	50	11.67^{f}	9.38^{d}	20.55^{e}	41.60^{j}
0.04	5	60	13.05^{d}	9.47^{d}	21.12^{d}	43.64^{h}
0.04	5	70	12.22^{e}	9.33^{d}	20.28^{e}	41.83^{j}
0.04	6	50	11.67^{f}	9.30^{d}	20.55^{e}	41.52^{j}
0.04	6	60	12.50^{e}	9.47^{d}	20.83^{e}	42.80^{i}
0.04	6	70	12.22^{e}	9.20^{d}	20.00^{e}	41.42^{j}
0.04	7	50	12.50^{e}	6.87^{e}	19.45^{f}	38.82^{k}
0.04	7	60	11.95^{f}	6.92^{e}	19.72^{f}	38.29^{k}
0.04	7	70	11.95^{f}	6.70^{e}	19.17^{f}	37.82^{l}
0.06	5	50	15.83^{b}	11.70^{b}	24.17^{a}	51.70^{b}
0.06	5	60	16.95^{a}	12.13^{a}	24.72^{a}	53.80^{a}
0.06	5	70	16.12^{a}	11.83^{b}	23.88^{b}	51.83^{b}
0.06	6	50	15.83^{b}	11.87^{b}	24.17^{a}	51.87^{b}
0.06	6	60	16.38^{a}	11.70^{b}	23.33^{b}	51.41^{b}
0.06	6	70	16.12^{a}	11.70^{b}	22.50^{c}	50.32^{c}
0.06	7	50	15.28^{b}	11.67^{b}	21.38^{d}	48.33^{e}
0.06	7	60	15.83^{b}	11.70^{b}	21.95^{d}	49.48^{d}
0.06	7	70	14.72^{c}	11.58^{b}	20.55^{e}	46.85^{g}
0.08	5	50	15.55^{b}	11.70^{b}	22.50^{c}	49.75^{d}
0.08	5	60	16.12^{a}	11.67^{b}	23.62^{b}	51.41^{b}
0.08	5	70	15.55^{b}	11.55^{b}	23.33^{b}	50.43^{c}
0.08	6	50	15.83^{b}	11.72^{b}	23.05^{b}	50.60^{c}

ตารางผลการทดลองที่ จ-9 ปริมาณน้ำตาลไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการเติมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง (ต่อ)

ปริมาณเอนไซม์ TG (เปอร์เซ็นต์)	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)			
			น้ำตาลพาโนส	น้ำตาลมอลโตไตรโอส	น้ำตาลไอโซมอลโตไตรโอส	ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
0.08	6	60	16.38[a]	11.70[b]	23.62[b]	51.70[b]
0.08	6	70	16.12[a]	11.62[b]	22.50[c]	50.24[c]
0.08	7	50	15.00[b]	10.75[c]	22.22[c]	47.97[f]
0.08	7	60	14.72[c]	10.62[c]	22.78[c]	48.12[e]
0.08	7	70	15.00[b]	10.53[c]	21.95[d]	47.48[f]

หมายเหตุ [1]อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล
วัน เดือน ปี	11 มิถุนายน 2531
ที่อยู่	132/6 ถนน มนตรีสุริยวงศ์ ตำบล หน้าเมือง อำเภอ เมืองราชบุรี จังหวัด ราชบุรี
การศึกษา	ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ประสบการณ์ทำงาน	เจ้าหน้าที่ฝ่ายจัดซื้อ บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด 18 กรกฎาคม พ.ศ. 2554 – 31 มกราคม พ.ศ. 2555 ผู้ช่วยนักวิจัย สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 1 มกราคม พ.ศ. 2557 – 31 ตุลาคม พ.ศ. 2557
เบอร์โทรศัพท์	088-491-1107
อีเมล์	h_biotechnology@hotmail.com