



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง

ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

**Production of Isomalto-oligosaccharide**

**from Cassava Starch by Enzymatic Process**

ดร. อนันต์ บุญปาน

ผศ. ดร. สิริแข พงษ์สวัสดิ์

นายทรงพล จำดิษฐ์

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

กันยายน 2558

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ เป็นโครงการที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายจ่ายประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้องในการดำเนินงานวิจัยดังนี้

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ผู้สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย
2. อาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ในระหว่างดำเนินโครงการวิจัย

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจได้นำผลการวิจัยไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป

คณะผู้วิจัย  
กันยายน 2558

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (EC 3.2.1.1) จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* เพื่อผลิตน้ำเชื่อมสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง พบว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณ 5.0 หน่วย/กรัมของแป้ง พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสและใช้เวลาในการบ่ม 20 นาที จะได้น้ำเชื่อมที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสเท่ากับ 12.04 ซึ่งเหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส การใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส (EC 3.2.1.2) และมอลโตจินเนส (EC 3.2.1.133) ร่วมกันที่ปริมาณ 25 และ 50 หน่วย/กรัมของแป้ง ตามลำดับ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 60.50 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร พบว่า การใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (EC 3.2.1.20) จากเชื้อรา *Aspergillus niger* (1,000 หน่วย/มิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย พาโนส มอลโตไตรโอสและไอโซมอลโตไตรโอส ความเข้มข้น 19.59, 5.12, 17.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลังโดยการใช้อินไซม์จากจุลินทรีย์ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ฟรีไบโอติกที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ นอกจากนั้นข้อมูลจากงานวิจัยซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

**คำสำคัญ :** แป้งมันสำปะหลัง น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง กระบวนการทางเอนไซม์ ฟรีไบโอติก  
ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

## ABSTRACT

This research was aimed to study the optimum conditions for IMOs production from cassava starch by microbial enzymes. In this study, cassava starch was liquefied by  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) from *Bacillus licheniformis* to produce syrup to be used as substrate for high maltose syrup production. It was found that the optimum conditions for syrup production were as follows:  $\alpha$ -amylase of 5.0 U/g starch, pH 6.5 and incubated at 95 °C for 20 minutes. This resulted in the dextrose equivalent (DE) of 12.04 which was suitable for high maltose syrup production. When syrup was saccharified by mixed enzyme  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2) and maltogenase (EC 3.2.1.133) at the activities of 25 and 50 U/g starch, respectively, pH 5.0 and incubated at 60 °C for 36 hours, 60.50% of high maltose syrup was gained. When high maltose syrup was transglucosylated by transglucosidase (EC 3.2.1.20) in 10 litres bioreactor from *Aspergillus niger* (1,000 U/ml), pH 5.0 and incubated at 50 °C for 24 hours, IMOs containing panose, maltotriose and isomaltotriose of 19.59, 5.12, 17.12%, respectively, were obtained. IMOs production from cassava starch by microbial enzyme hydrolysis results in prebiotic substance that could be used in different food products which is good for human health. In addition, the results from this research are useful for further industrial development of IMOs production.

**Keywords :** cassava starch, high maltose syrup, enzymatic process, prebiotic, isomalto-oligosaccharide

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	3
2.2 ฟรีไบโอดีท	7
2.3 มันสำปะหลัง	17
2.4 องค์ประกอบของแป้ง	18
2.5 คุณสมบัติของแป้ง	22
2.6 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง	23
2.7 กระบวนการย่อยแป้งในอุตสาหกรรม	31
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	42
3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	42
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง	44
3.3 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	50
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	51
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	63
บรรณานุกรม	64

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมบัพเฟอร์	70
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	72

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปริมาณอินนูลิน และ โอลิโกฟรุคโตสในอาหารชนิดต่าง ๆ	10
ตารางที่ 2.2 กระบวนการผลิตฟรีไบโอติกทางการค้า	13
ตารางที่ 2.3 ฟรีไบโอติกที่ถูกสังเคราะห์จากเอนไซม์	14
ตารางที่ 2.4 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน	21
ตารางที่ 2.5 เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการย่อยแป้ง	38
ตารางที่ 3.1 สภาวะการทดลองโดยการออกแบบด้วยเทคนิค RSM	47
ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค RSM	49
ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและ เดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมชนิดต่าง ๆ	54
ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและ เดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่ค่าพีเอชต่าง ๆ	55
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและ เดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ	56
ตารางที่ 4.4 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่าง ๆ	60
ตารางที่ 4.5 ผลได้และอัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับปฏิบัติการ	61
ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	73
ตารางที่ ข-2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	75

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	3
ภาพที่ 2.2 กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้ง	6
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของ Sorbitol และ Maltitol	8
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของโมเลกุลอินนูลิน	9
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของโมเลกุลของฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	11
ภาพที่ 2.6 การผลิตฟรีไบโอติกโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์	16
ภาพที่ 2.7 ลักษณะทั่วไปของมันสำปะหลัง	17
ภาพที่ 2.8 การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง	19
ภาพที่ 2.9 โครงสร้างภายในเมล็ดแป้ง	20
ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน	21
ภาพที่ 2.11 การเปลี่ยนแปลงของเมล็ดแป้งในระหว่างการหุงต้ม	22
ภาพที่ 2.12 ระยะในการเกิดเจลลาคีโนเซชันของเมล็ดแป้ง	23
ภาพที่ 2.13 เครื่องมือวัดความหนาแน่นของหัวมัน	24
ภาพที่ 2.14 เครื่องร่อนดินทราย	24
ภาพที่ 2.15 เครื่องล้างหัวมัน	24
ภาพที่ 2.16 เครื่องสับหัวมัน	25
ภาพที่ 2.17 เครื่องโม่หัวมัน	25
ภาพที่ 2.18 ขั้นตอนการสกัดแป้ง	26
ภาพที่ 2.19 เครื่องสกัดแป้งหยาบ	27
ภาพที่ 2.20 เครื่องสกัดแป้งละเอียด	27
ภาพที่ 2.21 เครื่องอัดกากมัน	28
ภาพที่ 2.22 เครื่องแยกแป้ง	29
ภาพที่ 2.23 เครื่องสไลด์แห้ง	30
ภาพที่ 2.24 เครื่องร่อนแป้ง	30
ภาพที่ 2.25 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส	33
ภาพที่ 2.26 การทำงานของเอนไซม์เบตาอะไมเลส	33
ภาพที่ 2.27 การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟอรีเลส	34
ภาพที่ 2.28 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	34

## สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 2.29 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง	35
ภาพที่ 2.30 การทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยแป้ง	35
ภาพที่ 2.31 กระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ	36
ภาพที่ 2.32 การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ	37
ภาพที่ 4.1 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	52
ภาพที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน ด้วยเอนไซม์ผสม	57
ภาพที่ 4.3 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	62
ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคส	74
ภาพที่ ข-2 กราฟมาตรฐานโปรตีน	76
ภาพที่ ข-3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm	78
ภาพที่ ข-4 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm	78
ภาพที่ ข-5 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm	79
ภาพที่ ข-6 กราฟมาตรฐานฟรุกโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm	79
ภาพที่ ข-7 กราฟมาตรฐานมอลโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm	79
ภาพที่ ข-8 กราฟมาตรฐานพานอสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm	80
ภาพที่ ข-9 กราฟมาตรฐานมอลโตไตรโอสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm	80
ภาพที่ ข-10 กราฟมาตรฐานไอโซมอลโตไตรโอสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm	81
ภาพที่ ข-11 โครมาโทแกรมของน้ำตาลมอลโตไตรโอสมาตรฐานและสารละลาย น้ำตาลตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส	81

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) เป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล ซึ่งจัดเป็นสารเติมแต่งในอาหารที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้โอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ขนมอบ และขนมหวานชนิดต่าง ๆ โอลิโกแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติในการช่วยปรับปรุงคุณภาพของอาหารทั้งทางเคมีและกายภาพ ช่วยแก้ปัญหาด้านสุขภาพของผู้บริโภค โดยเป็นสารให้ความหวานที่ช่วยป้องกันฟันผุ ให้พลังงานต่ำ เนื่องจากไม่ถูกย่อยในร่างกายของมนุษย์ มีสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) คือ ช่วยเสริมสร้างสภาวะแวดล้อมที่ดีของระบบทางเดินอาหาร และช่วยเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์บีฟิโดแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในลำไส้ [1] ผลิตภัณฑ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galacto-oligosaccharide) แลคตูโลส (lactulose) แลคโตซูโครส (lactosucrose) มอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (malto-oligosaccharide) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) และไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides) เป็นต้น [1,2]

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides, IMOs) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,6 กลูโคซิดิก ( $\alpha$ -D-1,6 glucosidic linkages) ประกอบด้วยน้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose) พาโนส (panose) ไอโซมอลโตไตรออส (isomaltotriose) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านชนิดอื่นๆ เป็นต้น [3] ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบประเภทแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) พูลูลานเนส (pullulanase) เบตาอะไมเลส ( $\beta$ -amylase) และทรานสกลูโคซิเดส (transglucosidase) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เบตาอะไมเลส และ พูลูลานเนส จะย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส ส่วนเอนไซม์ทรานสกลูโคซิเดสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชัน (transglucosylation) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [1,4]

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ถูกย่อยสลายในร่างกายสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงเป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำและไม่มีผลต่ออินซูลินในเลือด จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับบุคคลที่ต้องการลดน้ำหนักและเป็นโรคเบาหวาน การบริโภคไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะไม่ทำให้เกิดฟันผุ เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นอาหารเพื่อสร้างกรด และสารประกอบพอลิกลูแคน นอกจากนี้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ยังจัดเป็นสารพรีไบโอติก โดยจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตบีฟิโดแบคทีเรีย และจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ชนิดอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ [1]

ปัจจุบันไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่กำลังได้รับความสนใจ และมีแนวโน้มจะถูกนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้หลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม เช่น มีความหนืดต่ำ ไม่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ และมีความคงตัวสูงในสถานะที่เป็นกรด เป็นต้น [3] นอกจากนี้การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถดำเนินการได้ง่ายในระดับอุตสาหกรรม และใช้แหล่งวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูก เช่น แป้งมันสำปะหลัง ดังนั้น การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ จึงมีความน่าสนใจและควรสนับสนุนให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ขึ้นในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นการลดการนำเข้าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากต่างประเทศ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลังให้เป็นผลิตภัณฑ์เชิงอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าสูงขึ้น เพื่อการส่งออกได้อีกทางหนึ่งด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากแป้งมันสำปะหลังด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

1.2.3 เพื่อทำการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory Scale)

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์เบตาอะไมเลส ( $\beta$ -amylase) พูลูลานเนส (pullulanase) มอลโตจินเนส (maltoginase)

1.3.3 ทำการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม

1.3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

1.3.5 ทำการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ (batch production)



การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายประเภท เช่น แป้ง น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำเชื่อมมอลโตส เป็นต้น [6, 7] กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์นิยมจะใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) พุลลูลานเนส (pullulanase) เบตาอะไมเลส ( $\beta$ -amylase) และ ทรานกลูโคซิเดส (transglucosidase) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เบตาอะไมเลส และพุลลูลานเนส จะย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส ส่วนเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชัน (transglucosylation) ทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [1,3] โดยแสดงกระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ดังภาพที่ 2.2

กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะเริ่มจากการย่อยแป้งให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสด้วยเอนไซม์ น้ำเชื่อมมอลโตสเป็นสารละลายที่มีกลูโคส 2 โมเลกุลเป็นองค์ประกอบเป็นของเหลวข้น รสหวาน ใส บางกรณีอาจมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลอ่อนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำเชื่อมว่าจะมีปริมาณมอลโตสในสัดส่วนใด กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสด้วยวิธีการทางเอนไซม์ โดยจะมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

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

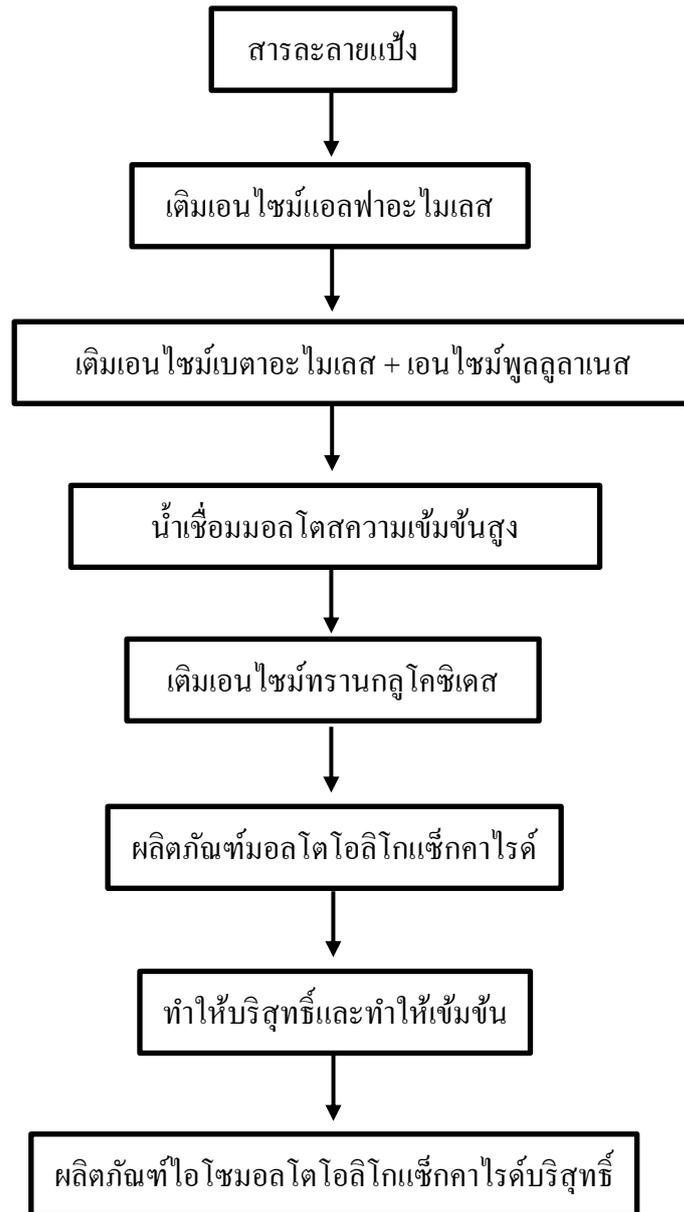
การย่อยแป้งครั้งแรก (liquefaction) ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งเริ่มต้นซึ่งการย่อยครั้งแรกเป็นการทำให้แป้งที่สุกมีความหนืดน้อยลงและแป้งบางส่วนถูกย่อยทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็กลงเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยภายในทำหน้าที่ตัดพันธะน้ำตาลกลูโคสที่จับกันเป็นแป้งจะได้แป้งที่มีโมเลกุลเล็กลงเป็นกลุ่ม ๆ ที่เท่า ๆ กันวัดค่าสมมูลเดกซ์โทรสได้ 5-20 ในทางปฏิบัติควรรักษาสมมูลเดกซ์โทรสไว้ที่ 10-15 เพื่อป้องกันการรวมตัวกันหรือจับกันใหม่ของแป้งโมเลกุลใหญ่และเกิดตะกอนแขวนลอยที่กรองยากลักษณะการเกิดตะกอนเช่นนี้เรียกว่า การเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) เมื่อเตรียมน้ำแป้งได้ความเข้มข้นพอดีปรับพีเอชให้ถูกต้องคำนวณปริมาณเอนไซม์และเติมถูกต้อง อุณหภูมิประมาณ 100-105 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในช่วงนี้สามารถทนอุณหภูมิสูงและสามารถย่อยสลายแป้งในขณะที่อุณหภูมิสูงได้น้ำแป้งที่ย่อยแล้วในช่วงนี้มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสอยู่ที่ 10-15 หรือต่ำกว่า 20 เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า มอลโตเดกซ์ตริน ถ้าต้องการผลิตมอลโตเดกซ์ตรินก็เพียงนำแป้งที่ย่อยระดับนี้แล้วไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์คือการกรองด้วยผงถ่านจนใสและนำไประเหยน้ำโดยเครื่องต้มระเหยให้ได้ความเข้มข้นจากเดิม 35-40 เปอร์เซ็นต์เป็นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์แล้วนำมาผ่านเครื่องพ่นผงจะได้ผลิตภัณฑ์มอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrins)

การย่อยแป้งขั้นสุดท้าย (saccharification) เมื่อได้มอลโตเดกซ์ทรินซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำค่อนข้างใส ไม่มีความหนืดแล้ว ทำการปรับพีเอชให้มีความเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นคำนวณปริมาณ เอนไซม์ตามปริมาณของมอลโตเดกซ์ทริน ซึ่งเอนไซม์มอลโตจินเนสและพุลลานเนสเป็น endoenzyme ที่มีความสามารถในการตัดพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคซิดิกภายในโครงสร้างของอะไมโลเพกตินและค่าสมมูล เดกซ์โทรสที่ได้หลังจากการย่อยอยู่ที่ 60 เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า น้ำเชื่อมมอลโตส [9]

การทำบริสุทธิ์ (refining) การทำให้บริสุทธิ์นั้นสะดวกสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากแป้งมันสำปะหลังเพราะมีสารประกอบ เช่น โปรตีน ไขมัน น้อยมาก สามารถกรองโดยใช้สารช่วยกรองและผงถ่านพร้อมกันได้ ปกติสามารถใช้เครื่องกรอง เช่น filter press หรือ vacuum drum filter ได้ หลังจากการกรองแล้ว ควรจะได้สารละลายใส ซึ่งขั้นต่อไปคือการจับประจุด้วยการผ่าน ion-exchange resin

การต้มระเหย กระบวนการต้มระเหยเป็นกระบวนการสุดท้ายที่ระเหยน้ำออกไป เพราะน้ำเชื่อมที่กรองและทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีความเข้มข้นของของแข็งประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ จึงจำเป็นต้องระเหยน้ำออกไปจนกระทั่งความเข้มข้นของของแข็งเป็น 80 เปอร์เซ็นต์จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ในการต้มระเหย ต้องทำให้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยการต้มระเหยภายใต้สุญญากาศ เพื่อป้องกันการแตกตัวของน้ำตาลมอลโตส เนื่องจากความร้อน [10]

หลังจากได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงแล้ว จะเติมเอนไซม์ทรานสกลูโคซิเลสเพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชัน (transglucosylation) ที่หมู่ 6-OH ของน้ำตาลกลูโคส ทำให้ได้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) ได้แก่ ไอโซมอลโตส พาโนส ไอโซมอลโตไทรโอส และเตตระแซคคาไรด์



ภาพที่ 2.2 กระบวนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้ง [3]

## 2.2 พรีไบโอติก (Prebiotics)

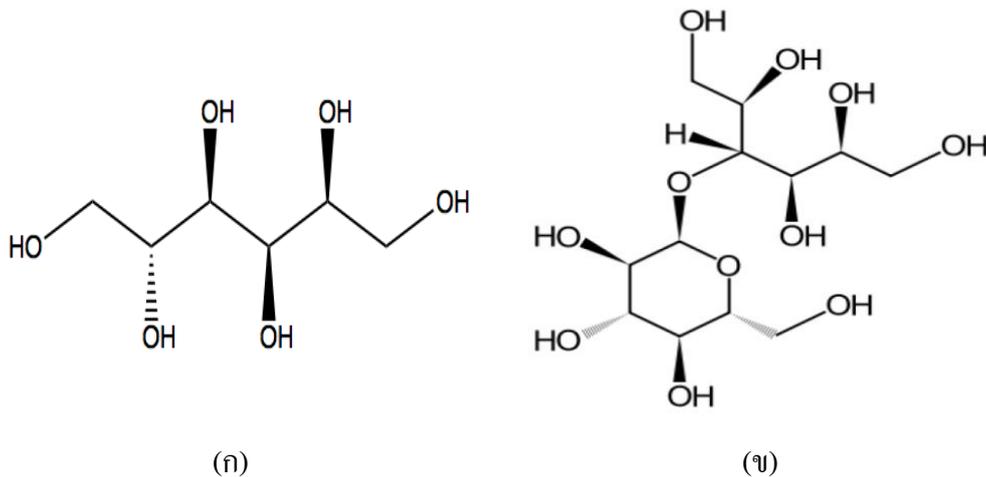
พรีไบโอติก เป็นสารประกอบพวกโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ซึ่งเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายและถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีผลช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ [11] จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะสร้างสารบางชนิดที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) และผลจากการย่อยยังทำให้ค่าพีเอชในลำไส้ลดลง ซึ่งผลดังกล่าวช่วยลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค [12] ซึ่งในลำไส้ใหญ่จะมีแบคทีเรียอยู่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกคือแบคทีเรียที่มีประโยชน์ (beneficial bacteria) เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* กลุ่มที่สอง คือ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) เช่น *Esherichia coli*, *Salmonella* และ *Clostridium* [13]

### 2.2.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

สารที่สามารถจัดเป็นพรีไบโอติกได้นั้นจะต้องมีคุณสมบัติคือ สารนั้นจะไม่ถูกย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร ไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนที่ไปถึงลำไส้ใหญ่ในสภาพที่สมบูรณ์ [14, 15, 16] สามารถที่จะเกิดการหมักในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น *Bifidobacteria* sp. และ *Lactobacillus* sp. อีกทั้งส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร และไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค [11] เพื่อใช้เป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถนำสารเหล่านี้มาใช้ในการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนอีกด้วย

### 2.2.2 ประเภทของพรีไบโอติก [13]

**2.2.2.1 น้ำตาลแอลกอฮอล์ (alcohol sugar)** จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโครงสร้างหรือดัชนีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) เพียง 1-2 ตัว สารที่อยู่ในกลุ่มนี้เช่น แมนนิทอล, ซอบิทอล, ไอโซมอลต์ และไซลิทอล เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.3 บางครั้งจะเรียกว่า Polyols สามารถเป็นสารให้ความหวานได้ โดยมีความหวานประมาณ 3 ใน 4 หรือครึ่งหนึ่งของน้ำตาลทั่วไป และยังคงจับได้ซ้ในลำไส้เล็กเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาล จึงทำให้น้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ



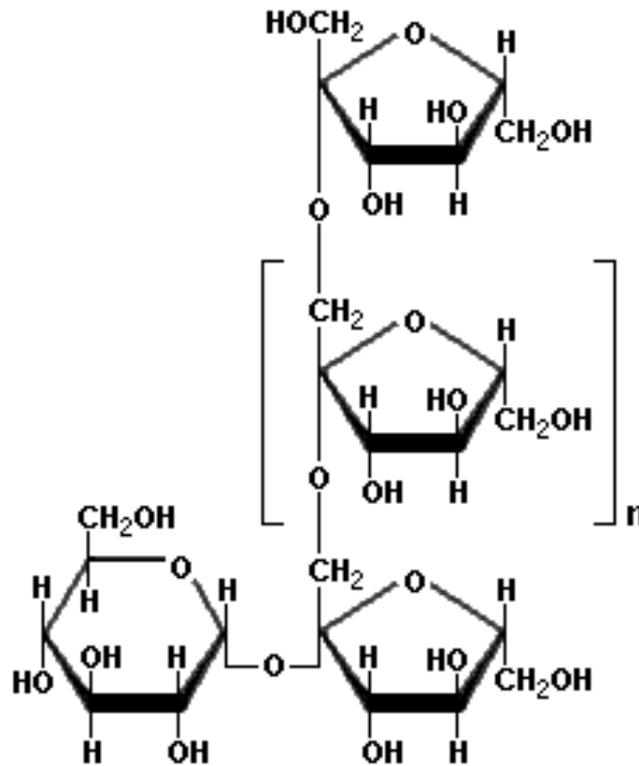
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของ (ก) Sorbitol (ข) Maltitol [17]

**2.2.2.2 Resistant starch** เป็นแป้งหรือผลิตภัณฑ์แป้งที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์และดูดซึมภายในลำไส้เล็กของมนุษย์ปกติได้ ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะและแหล่งที่มาได้ 3 ประเภท คือ ประเภทที่ 1 แป้งที่มีลักษณะทางกายภาพขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (physically inaccessible starch; RS1) โดยเม็ดแป้งอาจถูกห่อหุ้มภายในร่างแหของโปรตีนหรือถูกตรึงอยู่ในเซลล์เมล็ดพืช ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาในเม็ดแป้งได้ ประเภทที่ 2 เม็ดแป้งดิบที่ทนทานต่อการทำงานของเอนไซม์ (Raw starch granules; RS2) ได้แก่ เม็ดแป้งมันฝรั่งดิบ เม็ดแป้งกล้วยดิบ และเม็ดแป้งจากเมล็ดถั่ว โดยความคงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างตามธรรมชาติของเม็ดแป้งที่ไม่มีรูหรือช่องเปิดให้เอนไซม์เข้าไปในเม็ดแป้ง การเกิด เจลาตินไนซ์ของแป้งจะช่วยช่วยให้เอนไซม์สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเม็ดแป้งได้มากขึ้น และประเภทที่ 3 แป้งคืนตัว (retrograded starch; RS3) Resistant starch ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในประเภท Retrograded starch ได้แก่ อาหารที่ผ่านการให้ความร้อนจนแป้งเกิดเจลาตินไนซ์ แล้วถูกทำให้เย็นตัวลงทำให้ส่วนอะมิโลส (โพลีเมอร์เชิงเส้นของกลูโคส) เกิดการเรียงตัวใหม่ได้เป็นผลึกแป้งที่แข็งแรงและทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ ดังนั้นแป้งที่มีอัตราส่วนของอะมิโลสสูงกว่าจะสามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้มากกว่าแป้งที่มีอะมิโลเพกทิน (โพลีเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส) สูง แป้งที่มีปริมาณอะมิโลสสูงก็สามารถผลิต Resistant starch ได้ในระดับสูงเช่นเดียวกัน พืชส่วนใหญ่จะมีอะมิโลส อยู่ประมาณ 20-25%

**2.2.2.3 Non-starch polysaccharides** เป็นสารที่ได้จากพืชเช่น Pectin, Hemicellulose, Guar, Cellulose และ Xylan

**2.2.2.4 Inulin** เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้และมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตให้กับพืช พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น Chicory root เห็ดหัวหอม หัวกระเทียม กล้วย เป็นต้น โครงสร้างของอินนูลินประกอบด้วย ฟรุกโตส (Fructose) 80% และ

กลูโคส (Glucose) 20% เชื่อมกันด้วยพันธะเบตา 2-1 ( $\beta$  2-1) ที่มีความยาวตั้งแต่ 2-60 หน่วย ดังแสดงในภาพที่ 2.4 โดยทั่วไป อินนูลินมีขนาดโครงสร้างหรือค่าดัชนีการสังเคราะห์ พอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) ประมาณ 10 (ส่วนค่า DP ของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยทั่วไปเท่ากับ 4) และตามโครงสร้างจะมีโอลิโกฟรุกโตส ประกอบอยู่เป็นโครงสร้างกลุ่มย่อยโดยพืชต่างชนิดกันจะมีปริมาณอินนูลินและโอลิโกฟรุกโตส ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จากการทดลองนำอินนูลิน และโอลิโกฟรุกโตส ให้ผู้ใหญ่จำนวน 8 คน ในปริมาณ 15 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 15 วัน พบว่า 프리ไบโอติกทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มปริมาณ *bifidobacteria* ได้ [11]

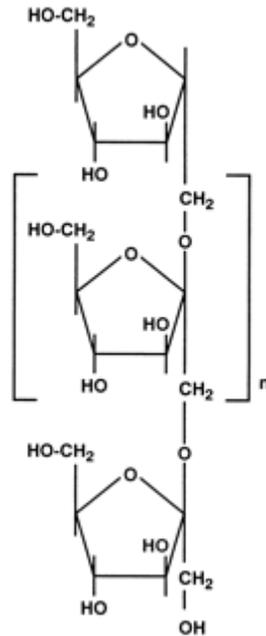


ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของโมเลกุลอินนูลิน (Inulin) [17]

ตารางที่ 2.1 ปริมาณอินนูลินและโอลิโกฟรุคโตสในอาหารชนิดต่าง ๆ [13]

พืช	ปริมาณอินนูลิน (%)	ปริมาณโอลิโกฟรุคโตส (%)
Onion (หัวหอม)	2-6	2-6
Jerusalem artichoke (แก่นตะวัน)	16-20	16-20
Chicory (ชิโครี)	15-20	5-10
Asparagus (แอสปารากัส)	1-30	1-20
Leek (ต้นกระเทียม)	3-10	2-5
Garlic (กระเทียม)	9-16	3-6
Artichoke (อาร์ติโชค)	3-10	<1
Banana (กล้วย)	0.3-0.7	0.3-0.7
Wheat (ข้าวสาลี)	1-4	1-4
Rye (ข้าวไรย์)	0.5-1	0.5-1
Barley (ข้าวบาเลย์)	0.5-1.5	0.5-1.5

**2.2.2.5 Sugar and Oligosaccharides** สำหรับพรีไบโอติกในกลุ่มนี้ จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้น (short-chain polysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-20 หน่วย ตัวอย่างเช่น Raffinose, Stachyose, Fructooligosaccharides (FOS) ดังแสดงในภาพที่ 2.5 นอกจากนี้ยังมี Lactose, Lactulose, Galacto-oligosaccharides (GOS), Soybean oligosaccharide, Lactosucrose, Isomalto-oligosaccharide, Gluco-oligosaccharide, Xylo-oligosaccharide และ Palatinose ที่สามารถจัดเป็นพรีไบโอติกได้ด้วย



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างโมเลกุลของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ [17]

**2.2.2.6 Mucin glycoproteins** ถูกสร้างโดย Goblet cells ที่อยู่ในเยื่อเมือกในลำไส้และเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในไส้

**2.2.2.7 Related mucopolysaccharides** เช่น Chondroitin sulphate, Heparin, Pancreatic และ Bacterial secretions ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้

**2.2.2.8 Protein and peptides** สารเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหาร สร้างโดยการหลั่งของตับอ่อนหรือสร้างโดยแบคทีเรีย แต่จะมีปริมาณน้อยกว่าพวกคาร์โบไฮเดรต

### 2.2.3 ประโยชน์ของพรีไบโอติก

ประโยชน์ต่อสุขภาพของพรีไบโอติกจะมีความเกี่ยวข้องกับประโยชน์ของโปรไบโอติก ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มนี้แล้วทั้งแบคทีเรียเองและสารที่เกิดจากกระบวนการในการใช้พรีไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอนก็มีบทบาทต่อผู้บริโภคร เช่น ช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบทางเดินอาหาร มีผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด และมีผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้

**2.2.3.1 ผลต่อระบบทางเดินอาหาร** พรีไบโอติกทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนของมนุษย์เมื่อมาถึงลำไส้ใหญ่ก็จะเป็นอาหารให้กับแบคทีเรียในลำไส้ เมื่อแบคทีเรียนำไปใช้ก็จะให้พลังงานและสารสำคัญบางชนิดกับร่างกาย ตัวอย่างเช่น Inulin-type fructans ให้กรดแลคติก (lactic acid) และกรดไขมันชนิดสั้น (short-chain fatty acid) ซึ่งเป็นผลิตผลจากกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งการหมักนี้จะทำให้มีการกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacteria* ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ชีวภาพ และในสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. และ

*Esherichia coli* ในลำไส้ จึงช่วยป้องกันท้องเสีย โดยเฉพาะจากการติดเชื้อได้ นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติคล้ายใยอาหารอื่นๆ ก็จะช่วยบรรเทาอาการท้องผูก เนื่องจากผลของการเพิ่มน้ำหนักของอุจจาระและผลต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ จึงช่วยให้ขับถ่ายง่ายขึ้น นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาถึงผลของพรีไบโอติกในการต้านมะเร็ง (anticarcinogenic effect) ซึ่งก็สามารถนำผลที่มีต่อทางเดินอาหารมาอธิบายได้เช่นกัน

**2.2.3.2 ผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด** ปกติพวกใยอาหารหรือพรีไบโอติกจะรบกวนการดูดซึมของเกลือแร่ด้วยการไปจับกับแร่ธาตุไว้ในโครงสร้างที่ซับซ้อน ทำให้ไม่สามารถถูกดูดซึมได้ที่ลำไส้เล็ก จะเดินทางมาถึงลำไส้ใหญ่จากนั้นจะปลดปล่อยแร่ธาตุออกมา เมื่อมีการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ได้กรดไขมันชนิดสายสั้น ความเป็นกรดก็จะช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิดได้แก่ แคลเซียมและแมกนีเซียม นอกจากนี้อาจเป็นกลไกที่ทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic effect) จะดึงน้ำเข้ามาช่วยในการละลายเกลือแร่ต่างๆ ได้ และมีพรีไบโอติกช่วยเรื่องการดูดซึมแคลเซียม อาจส่งผลกระทบต่อกระดูกพรุน แต่ยังคงต้องการการศึกษามาสนับสนุนมากกว่านี้

#### 2.2.4 แหล่งของพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติจะพบได้ในผักและผลไม้ เช่น กกล้วย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว กลุ่มธัญพืช และพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้ง [18] ซึ่งในปัจจุบันพรีไบโอติกที่นำมาใช้ทางการค้าและในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์

#### 2.2.5 การผลิตพรีไบโอติก [19]

การผลิตพรีไบโอติกทำได้หลายวิธี ทั้งการสกัดโดยตรงจากพืชที่มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์สูง เช่น กกล้วย ข้าวสาลี หัวกระเทียม หัวหอม หรือพืชต่างประเทศ เช่น ชิโครี (chicory) และแก่นตะวัน (jerusalem artichoke) เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันนิยมผลิตพรีไบโอติกโดยใช้ชีววิธี คือ การใช้เอนไซม์ และการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมี ตามตารางที่ 2.2 แสดงกระบวนการผลิตพรีไบโอติก

## ตารางที่ 2.2 กระบวนการผลิตฟรีไบโอติกทางการค้า [20]

วิธีการผลิต	ตัวอย่างฟรีไบโอติก
1. การสกัดโดยตรงจากพืช ผัก ผลไม้ที่มีส่วนประกอบของโพลีแซ็กคาไรด์	- ซอยบีน โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Soybean oligosaccharide) จากน้ำนมถั่วเหลือง - อินูลิน (Inulin) จากชิโครี
2. การใช้เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์แล้วใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์	- ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ - ซิโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylo-oligosaccharide) จากขังข้าวโพด
3. กระบวนการทรานสโกลโคซิเลชัน (Transglycosylation) คือ การใช้เอนไซม์เพื่อสังเคราะห์ โอลิโกแซ็กคาไรด์แล้วใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์	- กานเลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จากแลคโตส - ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จากซูโครส
4. กระบวนการทางเคมี	- แลคตูโลสจากปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชันของแลคโตส

### 2.2.6 การสกัดฟรีไบโอติก

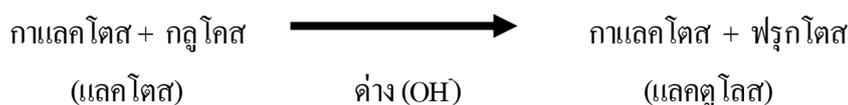
เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดสำหรับการผลิตฟรีไบโอติก คือสามารถสกัดโดยตรงจากพืชหรือผลไม้ที่มีสารพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น การสกัดอินูลินจากชิโครีเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ โดยการสกัดด้วยน้ำร้อน จากนั้นใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีเพื่อทำอินูลินที่ได้ให้มีความบริสุทธิ์และเข้มข้น จากนั้นนำไปทำให้เป็นผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer machine) เพื่อนำไปผสมเป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ โดยใช้วิธีการสกัดฟรีไบโอติกได้ 2 วิธี คือ ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction) และเทคโนโลยีเอนไซม์ (enzyme technology)

#### 2.2.6.1 ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction)

แลคตูโลสเป็นฟรีไบโอติกชนิดเดียวในปัจจุบันที่ผลิตโดยใช้กระบวนการทางเคมี [21] โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้ค่าเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชัน (isomerization) ของ

โมเลกุลกลูโคสซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำตาลแลคโตสให้กลายเป็นฟรุกโตสเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Lbry de Bruyn-Alberda van Ekenstein ปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชันนี้ทำงานภายใต้สภาวะที่เป็นด่างโดยนิยมใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) และบอเรต (borate) โดยเมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้วจะทำให้เกิดแลคตูโลสได้ดังสมการที่ 2-1

(2-1)



### 2.2.6.2 เทคโนโลยีเอนไซม์ (enzyme technology)

การผลิตฟรีไบโอติกโดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์มีวัตถุประสงค์ทั้งเพื่อย่อยสลายและสังเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์จากสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งแม้ว่าปฏิกิริยาทางเคมีจะสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ แต่การผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีจะต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรง เช่น สภาวะที่มีความดันและอุณหภูมิสูง และอาจเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการได้ ซึ่งจำเป็นต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนการกำจัดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงดังกล่าวด้วย ดังนั้นการผลิตฟรีไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้เทคโนโลยีเอนไซม์เนื่องจากควบคุมการผลิตได้ง่ายและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากความจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต

#### 1) การใช้เอนไซม์สังเคราะห์ (enzymatic synthesis)

ฟรีไบโอติกบางชนิด เช่น ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และทรานกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังตารางที่

2.3

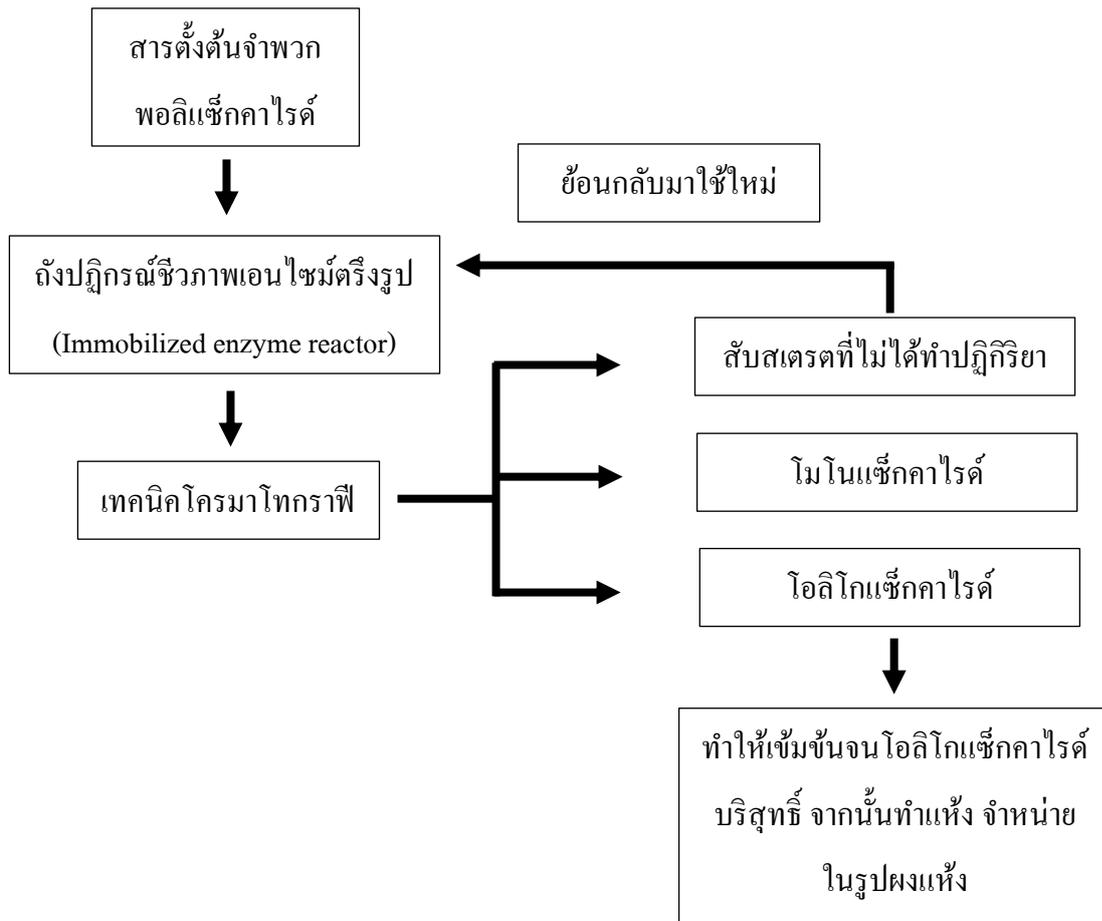
ตารางที่ 2.3 ฟรีไบโอติกที่ถูกสังเคราะห์จากเอนไซม์

ชนิดของฟรีไบโอติก	เอนไซม์	เอกสารอ้างอิง
ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	ฟรุกโตซิลทรานสเฟอร์เรส	[60]
ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	เบตา-กาแลคโตซิเดส	[61]
ทรานกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	เอนไซม์ผสมของอะไมเลส พูลูลานเนส และ แอลฟากลูโคซิเดส	[62]

ปัจจัยในการใช้เอนไซม์เพื่อสังเคราะห์ฟรีไบโอติกต้องคำนึงถึงแหล่งที่มาของเอนไซม์ กลไกการทำงานของเอนไซม์ สภาพที่ใช้ในการผลิตและชนิดของสับสเตรทที่ใช้ ปัจจัยต่างๆ จะส่งผลถึงคุณภาพและ องค์ประกอบของสารฟรีไบโอติกได้โดยตรง เช่น การผลิตทรานสกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะให้องค์ประกอบของทรานสกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน เช่น Tanaka *et al.* [22] ใช้เอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสจาก *Aspergillus oryzae* พบว่าได้ทรานสกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ ประกอบด้วยไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharides) เตตราแซ็กคาไรด์ (tetracaccharides) เพนตะแซ็กคาไรด์ (pentasaccharides) และ เฮกซะกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (hexagalacto-oligosaccharides) ในขณะที่ Ito *et al.* [23] ได้ทรานสกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยไดแซ็กคาไรด์ (disaccharides) โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharides) เตตราแซ็กคาไรด์ (tetracaccharides) เพนตะแซ็กคาไรด์ (pentasaccharides) และเฮกซะกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (hexagalacto-oligosaccharides) เมื่อใช้เอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสจาก *Aspergillus oryzae* ร่วมกับเบตา-กาแลคโตซิเดสจาก *Streptococcus thermophiles*

## 2) การใช้เอนไซม์ย่อยสลาย (enzymatic hydrolysis)

ฟรีไบโอติกส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการผลิตสารฟรีไบโอติก คือการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้ง และ เซลลูโลส เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลสายสั้น ๆ หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มักอยู่ในรูปของสารผสมของโอลิโกแซ็กคาไรด์หลายชนิด จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการคัดแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ เช่น เทคนิคโครมาโตกราฟี เป็นต้น รูปแบบการผลิตฟรีไบโอติกโดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายแสดงดังภาพที่ 2.6 ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 85-99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2.6 การผลิตพรีไบโอติกโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ [20]

## 2.3 มันสำปะหลัง (Cassava)

มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland topics) การปลูกมันสำปะหลังเริ่มในแถบประเทศบราซิล ชาวยุโรปเป็นผู้นำมันสำปะหลังมาปลูกในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ และในปัจจุบันกลายเป็นพืชปลูกสำคัญของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย และอินโดนีเซีย

### 2.3.1 การจัดลำดับทางด้านอนุกรมวิธานของมันสำปะหลัง

**Kingdom** Plantae

**Phylum** Magnoliophyta

**Class** Magnoliopsida

**Order** Malpighiales

**Family** Euphorbiaceae

**SubFamily** Crotonoideae

**Tribe** Manihoteae

**Genus** *Manihot*

**Species** *M. esculenta*

### 2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

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

ไม้พุ่ม มีรากสะสมอาหารเป็นหัวยาว ลำต้นเปราะ ใบเดี่ยว เรียงเวียน หยักเป็นแฉกลึก 3-7 แฉก แต่ละแฉกรูปหอกหรือรูปใบหอกแกมรูปแถบ ปลายใบเรียวแหลม ดอกออกที่ปลายกิ่งหรือซอกใบ โกลีปปลายกิ่ง ช่อดอกแบบช่อกระจุก หรือช่อแยกแขนง กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูปประมง หยักเป็นกลีบ 5 กลีบ เกสรเพศผู้ 10 ผลรูปทรงกลม เป็นสันหรือปีกสั้น ๆ 6 ปีก ดังภาพที่ 2.7



ก.



ข.

ภาพที่ 2.7 ลักษณะทั่วไปของมันสำปะหลัง

ก. ใบของมันสำปะหลัง [24] ข. รากของมันสำปะหลัง [24]

**2.3.2.2 ประโยชน์ของมันเป็น้าปะหลัง** มัน้าปะหลังสามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้หลายประเภท ดังภาพที่ 2.8 โดยประโยชน์ที่สำคัญของมัน้าปะหลังมีดังนี้

1) **ใช้เป็นอาหารของมนุษย์** โดยใช้เป็นอาหารหลัก และอาหารเสริม มัน้าปะหลังที่ผลิตได้ในโลกประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยเฉพาะในทวีปแอฟริกา และอเมริกาใต้ ใช้มัน้าปะหลังเป็นอาหาร การใช้เป็นอาหารของมนุษย์อาจจะใช้ต้ม ทอด หรือปิ้ง

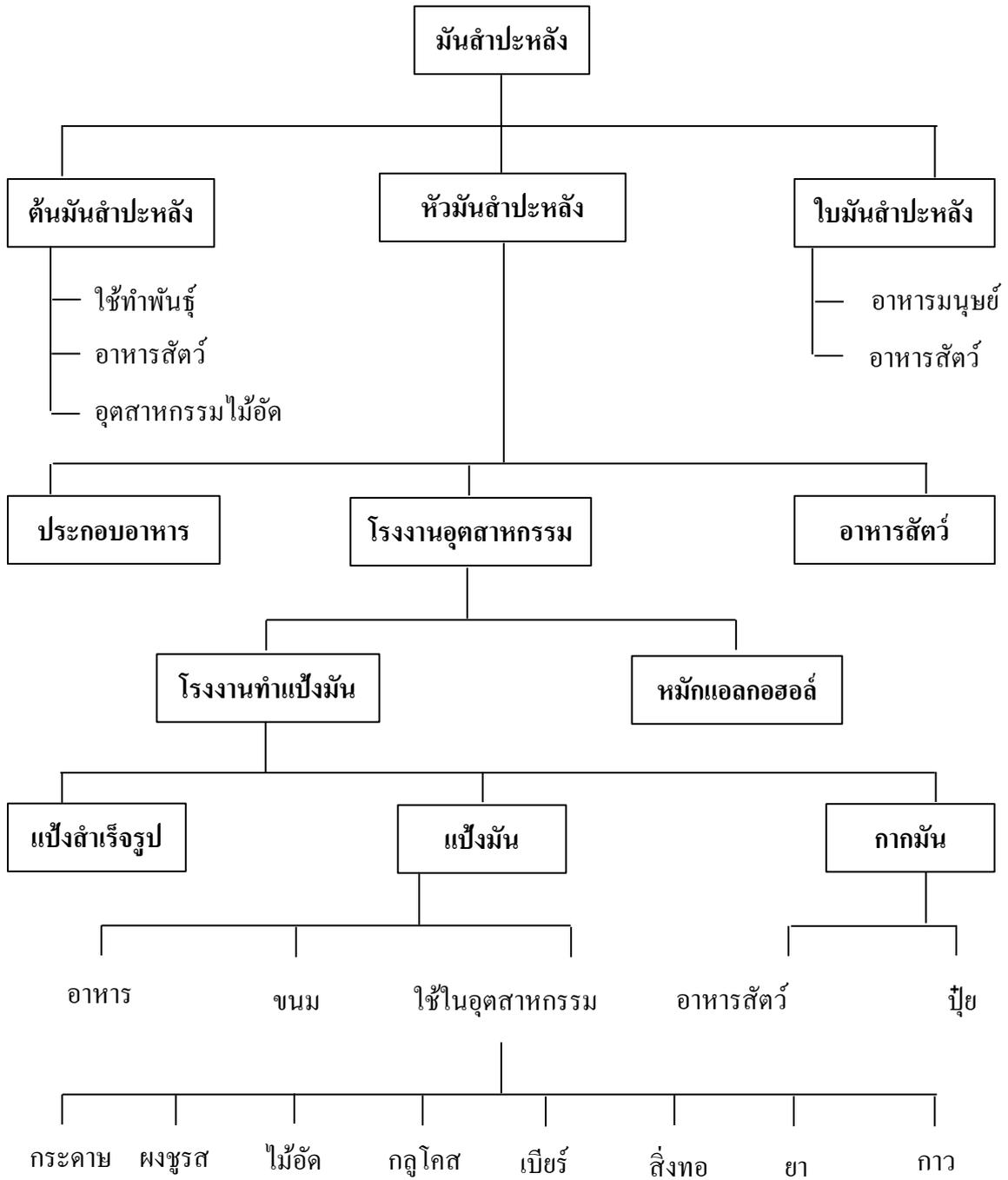
2) **ใช้ทำแป้ง** แป้งมัน้าปะหลังใช้เป็นอาหารของมนุษย์โดยตรง และเป็นสารสำคัญใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำแก้ว การทำกระดาษ การทอผ้า การผลิตน้ำตาลกลูโคส และเดกซ์โทรส เป็นต้น

3) **ใช้หมักทำแอลกอฮอล์ เบียร์ และขนมปัง** ในบางประเทศ อย่างเช่น ประเทศบราซิล กำลังใช้หัวมัน้าปะหลังหมักเป็นแอลกอฮอล์ เพื่อใช้แทนน้ำมันเบนซินสำหรับเครื่องยนต์

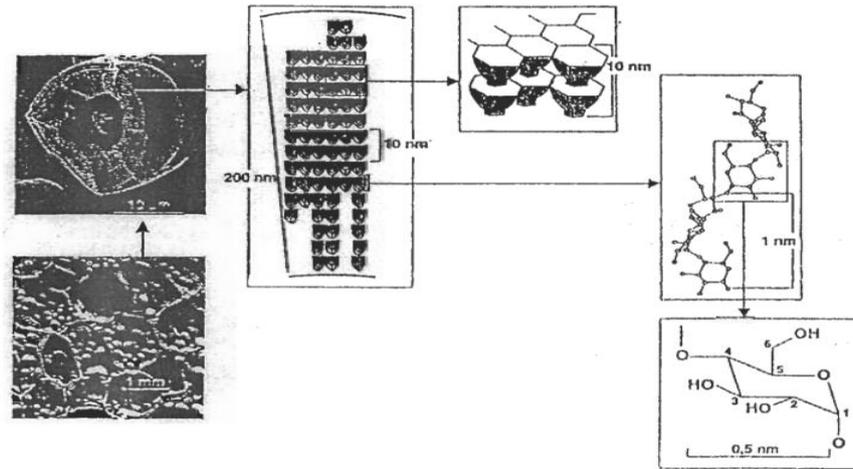
4) **ใช้เป็นอาหารสัตว์** โดยทำเป็นมันเส้น มัน้าปะหลังอัดเม็ด และกากมัน้าปะหลัง ซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานผสมในอาหารสัตว์

## 2.4 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) และพอลิเมอร์แบบกึ่ง (อะไมโลเพกทิน) ดังภาพที่ 2.9 แป้งจากแหล่งที่มาต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกทินแตกต่างกันจึงทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกันดังตารางที่ 2.4



ภาพที่ 2.8 การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง [25]



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างภายในเม็ดแป้ง ได้แก่

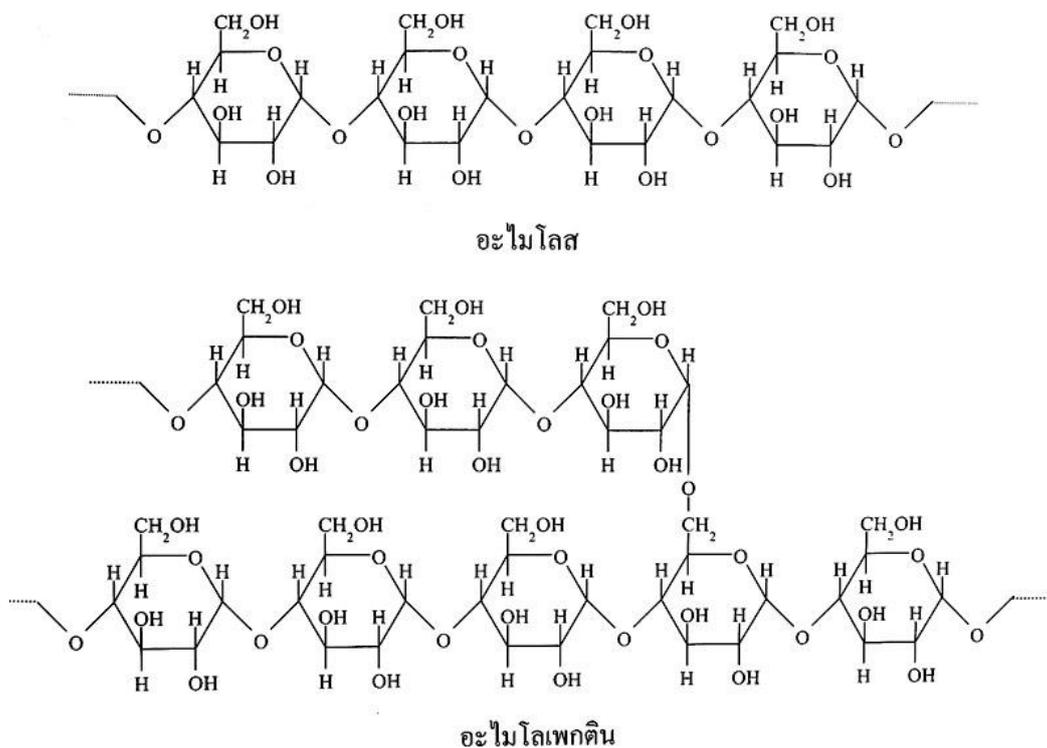
1. อะไมโลส (amylose) [8]
2. อะไมโลเพกทิน (amylopectin) [8]
3. สารตัวกลาง (intermediate material) [8]

#### 2.4.1 อะไมโลส (amylose)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิก ( $\alpha$ -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 ขณะที่ต้มน้ำจะมีลักษณะขุ่น ความหนืดต่ำ เมื่ออุณหภูมิลดลงเกิดการคืนตัวได้มาก

#### 2.4.2 อะไมโลเพกทิน (amylopectin)

อะไมโลเพกทินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์เชิงเส้นของกลูโคส 10-60 หน่วยที่เชื่อมกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 กลูโคซิดิก และพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส 15-45 หน่วยที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,6 กลูโคซิดิก ดังภาพที่ 2.10 คุณสมบัติของอะไมโลเพกทินขณะต้มจะใสและมีความหนืดสูง เมื่ออุณหภูมิลดลงจะเกิดการคืนตัวน้อย เพราะ โมเลกุลของอะไมโลเพกทินเรียงตัวไม่เป็นระเบียบจึงรวมตัวกันได้ยาก [10]



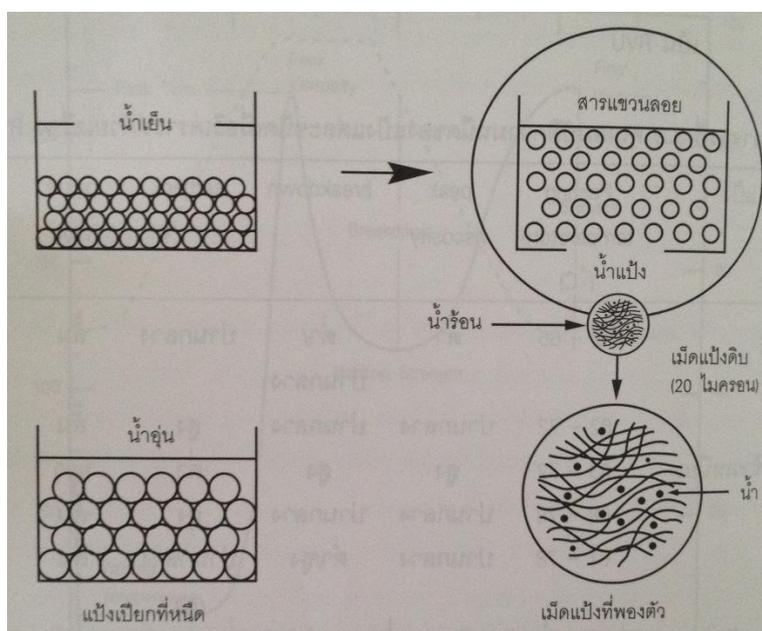
ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน [26]

ตารางที่ 2.4 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน [27]

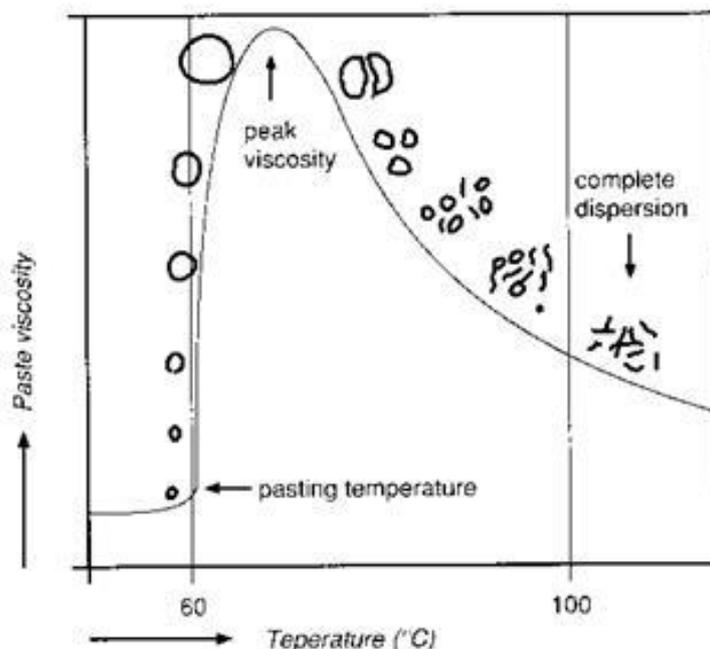
คุณสมบัติ	อะไมโลส	อะไมโลเพกทิน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	$\alpha$ - 1,4	$\alpha$ - 1,4 และ $\alpha$ - 1,6
ขนาด	200 -2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน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

## 2.5 คุณสมบัติของแป้ง

เมื่อแป้งผสมในน้ำแป้งจะแตกตัวเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ในน้ำ แต่จะไม่ละลายน้ำเนื่องจากอนุภาคของแป้งจะมีขนาดใหญ่เกินที่จะละลายน้ำได้แป้งจะมีความหนาแน่นค่อนข้างสูงประมาณ 1.45-1.64 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร (ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) ดังนั้นแป้งจึงพร้อมที่จะตกตะกอนหลังจากแขวนลอยอยู่ แต่เมื่ออุณหภูมิของสารแขวนลอยสูงขึ้นประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) น้ำจะเข้าไปใน amorphous region และพลังงานความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจน ดังภาพที่ 2.11 ใน crystalline region ทำให้สามารถเข้าไปในเม็ดแป้งมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เม็ดแป้งเกิดบวมอย่างรวดเร็ว ความหนาแน่นจะลดลงความหนืดจะสูงขึ้น นอกจากนั้นผิวของเม็ดแป้งจะเปิดมากขึ้น จนเม็ดแป้งเกิดการแตกต่างจับปล้น ทำให้อะไมโลสออกจากเม็ดแป้งเกิดเป็นเจลขึ้น ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า การเกิดเจลาตินในเซชัน (gelatinization) ดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.11 การเปลี่ยนแปลงของเม็ดแป้งในระหว่างการหุงต้ม [8]



ภาพที่ 2.12 ระยะในการเกิดเจลลาคีโนเซชันของเม็ดแป้ง [8]

## 2.6 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นกระบวนการผลิตที่โรงงานโดยทั่วไปใช้กันอยู่ในปัจจุบัน มีขั้นตอนการผลิตดังนี้

### 2.6.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ในขั้นแรกของการเตรียมรับมันสำปะหลัง ทางโรงงานจะสุ่มตัวอย่างนำมาตรวจวัดความหนาแน่น โดยใช้เครื่องวัดแบบ Reimann scale ดังภาพที่ 2.13 เพื่อประมาณของแข็ง (เชื้อแป้ง) ในหัวมัน เพื่อตกลงราคาซื้อขาย แล้วนำมาเทไว้บนลาน จากนั้นจะใช้รถตัดตัดหัวมัน (root hopper) แล้วผ่านระบบสายพานลำเลียงไปสู่เครื่องร่อนดินทราย (root siever) ดังภาพที่ 2.14 ซึ่งมีลักษณะเป็นถังตะแกรงกลมที่มีการหมุนตามแนวอน หมุนด้วยความเร็ว 10-15 รอบ/นาที หัวมันจะถูกหมุนและเคลื่อนตัวตามเกลียวเหล็กในตะแกรง ทำให้ดินทรายและเศษเปลือกหรือรากไม้ที่ปะปนมาให้ร่วงหล่นผ่านช่องตะแกรงลงไป

จากนั้นหัวมันจะถูกล้างให้สะอาดโดยผ่านเครื่องล้างหัวมัน (root washer) ดังภาพที่ 2.15 มีลักษณะเป็นทรงกระบอกผ่าครึ่งตามแนวอนขึ้นเป็นช่องๆ ภายในมีใบพัดหมุนกวานหัวมันและตัดหัวมันจากช่องหนึ่งไปยังช่องถัดไปเรื่อยๆ เพื่อล้างเอาเศษดินทรายที่ยังติดอยู่กับหัวมันออกไปกับน้ำ



ภาพที่ 2.13 เครื่องมือวัดความหนาแน่นของหัวมัน [28]



ภาพที่ 2.14 เครื่องร่อนดินทราย [29]



ภาพที่ 2.15 เครื่องด้างหัวมัน [29]

### 2.6.2 การโม่ห้วมันสำปะหลัง

หลังจากห้วมันสำปะหลังผ่านขั้นตอนการล้างทำความสะอาดจากเครื่องล้างห้วมันแล้ว จะถูกลำเลียงด้วยสายพานเพื่อเข้าสู่เครื่องสับห้วมัน (root chopper) ดังภาพที่ 2.16 ทำหน้าที่สับห้วมันให้มีขนาดเล็กกลง จากนั้นห้วมันขนาดเล็กจะผ่านท่อที่มีลักษณะเป็นรูปขากางเกง ลงสู่เครื่องโม่ (rasper) ดังภาพที่ 2.17



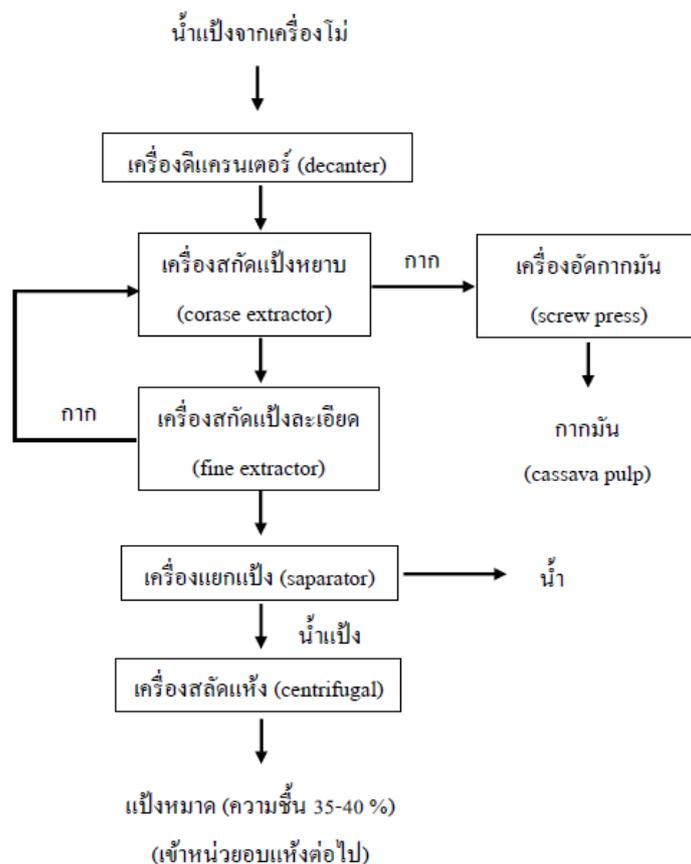
ภาพที่ 2.16 เครื่องสับห้วมัน [29]



ภาพที่ 2.17 เครื่องโม่ห้วมัน [29]

### 2.6.3 การสกัดแป้ง

ขั้นตอนการสกัดแป้ง ดังภาพที่ 2.18 มีรายละเอียดดังนี้ ของเหลวข้นจากเครื่องโม่จะถูกปั๊มเข้าสู่เครื่องดีแคนเตอร์ (decanter) ซึ่งเป็นเครื่องแยกน้ำทิ้งที่มีโปรตีนและไขมันออกจากเนื้อแป้ง โดยอาศัยหลักของแรงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force) แรงเหวี่ยงทำให้ส่วนที่เป็นของแข็ง (แป้งและกาก) ถูกแรงเหวี่ยงทำให้ติดรอบผนัง (bowl wall) ที่แกนกลางมีเกลียวติดอยู่โดยรอบ (conveyor screw หรือ scroll) เกลียวนี้มีไว้เพื่อส่งผ่านของแข็งที่ติด “bowl wall” ออกที่ปลายกรวย ดังนั้นส่วนของแข็งที่เป็นแป้งรวมทั้งเส้นใยและกากจะถูกเหวี่ยงแยกออกเป็นน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นสูง แล้วเข้าหน่วยสกัดแป้งต่อไป



ภาพที่ 2.18 ขั้นตอนการสกัดแป้ง [30]

น้ำแป้งจากเครื่องดีแคนเตอร์จะถูกปั๊มเข้าสู่เครื่องสกัดแป้ง (extractor) ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้แยกน้ำแป้งออกจากเส้นใยและกาก มีลักษณะเป็นตะกร้ากรองที่อาศัยแรงหนีศูนย์กลาง (continuous perforate-basket centrifugal) โดยการเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำๆ ประมาณ 600-800 รอบ/นาที น้ำแป้งจะถูกปั๊มเข้าสู่ด้านบนของเครื่อง และมีการฉีดน้ำอย่างสม่ำเสมอผ่านท่อ 2 ท่อ ทางด้านบนเหมือนกัน แรงเหวี่ยงทำให้แป้งซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กสามารถผ่านการกรองไหลลงถึงรวมน้ำแป้งด้านล่าง ประสิทธิภาพการทำงานประมาณ 0.75-1.50 ตัน (โดยน้ำหนักแห้ง)/ชั่วโมง เครื่องสกัดแป้งแบ่งตามหน้าที่ตามการกรองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดสกัดหยาบ (coarse extractor) และชุดสกัดละเอียด (fine extractor) ดังภาพที่ 2.19 และ 2.20

น้ำแป้งจะผ่านเข้าสู่ชุดสกัดหยาบและกากอ่อนที่ได้จะถูกเหวี่ยงออกทางด้านบนของตะกร้ากรองแล้วเข้าสู่เครื่องสกัดชุดสกัดกาก (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 น้ำกำมะถันช่วยกำจัดสารกำมะถันที่เกิดเมือกที่จะไปอุดตันแผ่นกรอง ป้องกันไม่ให้เกิดการสูญเสียแป้งจากจุลินทรีย์และช่วยฟอกสีแป้งให้ขาว



ภาพที่ 2.19 เครื่องสกัดแป้งหยาบ [29]



ภาพที่ 2.20 เครื่องสกัดแป้งละเอียด [29]

กากที่ได้จากเครื่องสกัดซูดสกัดกากแล้ว จะถูกลำเลียงด้วยเกลียวหมุน (screw conveyer) เข้าเครื่องอัดกากมัน (screw press) ดังภาพที่ 2.21 โดยเครื่องอัดกากมัน 1 เครื่องจะมี 2 หัวอัด (screw) และมีมอเตอร์ขนาด 3 แรงม้า หัวอัดมีลักษณะเป็นตะแกรงสแตนเลสรูปกรวยปลายเปิดเป็นท่อทรงกระบอก ภายในกรวยเป็นเกลียวหมุนทำหน้าที่อัดกากให้แห้งและดันกากออกที่ปลายเปิดจะได้กากมันเป็นท่อนทรงกระบอกที่แห้ง มีความชื้น 20-30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เป็นน้ำไหลผ่านตะแกรงออกมา



ภาพที่ 2.21 เครื่องอัดกากมัน [29]

น้ำแฉะจากเครื่องสกัดละเอียดจะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น โดยผ่านเครื่องแยกแฉะ (separator) ดังภาพที่ 2.22 ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้แยกแฉะซึ่งอยู่ในรูปสารละลายคอลลอยด์ออกจากน้ำแฉะ ทำให้แฉะที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น น้ำแฉะเข้มข้นที่ได้จะไหลรวมกันในถังเพื่อเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป ส่วนของน้ำและสิ่งเจือปนในน้ำแฉะ (clarified overflow หรือ light phase) จะถูกแยกออกมาเนื่องจากความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะ เมื่อเกิดแรงเหวี่ยงจะทำให้ น้ำไหลขึ้น ไปทางด้านบนของเครื่อง ในโรงงานส่วนมากใช้เครื่องแยกแฉะ 2 ชุด ชุดแรกเรียกว่า “ชุดแยกใส” ชุดที่สองเรียกว่า “ชุดแยกขุ่น” โดยทั่วไปมักติดตั้งเครื่องสกัดละเอียดหรือเครื่องแยกแฉะทั้งสองชุดติดกัน น้ำแฉะจากเครื่องแยกแฉะชุดสุดท้ายโดยทั่วไปจะควบคุมให้มีความเข้มข้นประมาณ 18-20 องศาเบ (°Bé) เพื่อเข้าระบบสกัดแห้งต่อไป



ภาพที่ 2.22 เครื่องแยกแป้ง [29]

ขั้นตอนการแยกแป้ง (separation) สามารถที่ใช้ไฮโดรไซโคลอน (hydrocyclone) แทนได้ หลักการทำงานอาศัยแรงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force) น้ำแป้งจะถูกป้อนเข้าส่วนบนด้านข้างแล้วจะหมุนรอบ ๆ ภายในกระบอก (cone section) เกิดแรงปั่นเหวี่ยงทำให้แป้งตกลงสู่ส่วนล่างออกมา (underflow) ส่วนที่เป็นน้ำจะแยกออกที่ส่วนบน (overflow) ซึ่งไม่ต้องใช้มอเตอร์ในการหมุนให้เกิดแรงปั่นเหวี่ยงเหมือนเครื่องแยกแป้ง ทำให้ประหยัดพลังงาน สามารถควบคุมการทำงานได้ง่ายเพียงแค่เปิดวาล์วด้านบน ปัจจุบันมีการนำไฮโดรไซโคลอน มาใช้ในกระบวนการผลิตอื่นๆ เช่น กระบวนการผลิตแป้งข้าวโพด และเริ่มมีการนำมาใช้ในโรงงานแป้งมันสำปะหลังบางแห่งแล้ว

ในขั้นตอนสกัดแป้งจะป้อนน้ำแป้งที่มีความบริสุทธิ์สูงจากถังพักมายังเครื่องสกัดแป้ง (centrifugal หรือ dewatering) ดังภาพที่ 2.23 ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกร้า โดยน้ำแป้งจะถูกป้อนเข้าสู่ส่วนกลางของเครื่อง ซึ่งจะหมุนด้วยมอเตอร์ขนาด 40 แรงม้า หมุนด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที มีประสิทธิภาพการทำงาน 1.5 ตันน้ำแป้ง/ชั่วโมง (ความชื้น 50-60 เปอร์เซ็นต์)/ชั่วโมง แรงเหวี่ยงจะผลัดน้ำในน้ำแป้งขึ้นให้ซึมผ่านผ้ากรอง น้ำที่ผสมอยู่ในน้ำแป้งจะซึมผ่านผ้ากรองที่บุไว้รอบตะกร้าออกไปด้านล่าง เรียกว่า “น้ำสกัดแห้ง” ส่วนเนื้อแป้งจะถูกกรองไว้เกาะอยู่บริเวณผิวผ้ากรองภายในตะกร้า เนื้อแป้งจะก่อตัวเป็นชั้นแป้งหนาขึ้น ใบบิดจะปาดเนื้อแป้งที่มีความหนาพอสมควรให้ตกลงไปข้างเครื่อง แป้งที่ได้ เรียกว่า “แป้งหมาด (starch cake)” มีความชื้นประมาณ 35-40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะส่งไปยังหน่วยอบแห้งต่อไป การลดปริมาณความชื้นในแป้งหมาดอาจทำได้โดยการเปลี่ยนชนิดของเครื่องสกัดแป้ง เช่น การใช้เครื่องกรองแรงดันสูง high pressure filter [31]



ภาพที่ 2.23 เครื่องสตั๊ดแห้ง [29]

#### 2.6.4 การอบแห้ง

ในการอบแห้งลมร้อนอุณหภูมิ 180-200 องศาเซลเซียส จากเตาเผา (air heater) จะเป่าแป้งหมาดขึ้นไปยังปล่องอบแห้ง (flash dryer) แล้วตกลงมาสู่ไซโคลนร้อน (drying cyclone) ระบายความชื้นออกไปบางส่วน ซึ่งจะมีการตรวจสอบความชื้นของแป้ง ถ้าชื้นมากอาจปรับอัตราเร็วของแป้งที่เข้าปล่องอบแห้ง โดยลดปริมาณแป้งเข้าหรือลดอัตราเร็วของลมร้อนที่เป่า เพื่อให้แป้งมีความชื้นน้อยลงตามที่ต้องการ หลังจากเข้าสู่ไซโคลนร้อนแล้ว แป้งจะถูกดูดเข้าสู่ไซโคลนเย็น (cooling cyclone) อีกชุดหนึ่ง แล้วผ่านเครื่องร่อนแป้ง และบรรจุแป้งละเอียดที่ได้ลงถุงต่อไป ดังภาพที่ 2.24



ภาพที่ 2.24 เครื่องร่อนแป้ง [29]

### 2.6.5 การบรรจุและเก็บรักษา

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

## 2.7 กระบวนการย่อยแป้งในอุตสาหกรรม

การย่อยแป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

### 2.7.1 การเกิดเจลาตินในเซชัน (gelatinization)

เจลาตินในเซชันเป็นกระบวนการเกิดการพองตัวเนื่องจากการดูดซึมน้ำของเม็ดแป้งในขณะที่ได้รับความร้อนทำให้เกิดการพองตัวของเม็ดแป้งช่วงอุณหภูมิที่แป้งมีการดูดซึมน้ำอย่างรวดเร็วและพองตัวขึ้น เรียกว่า อุณหภูมิการเกิดเจลาติน (gelatinization temperature) การเกิดเจลาตินเป็น กระบวนการผันกลับไม่ได้และทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น แป้งมันสำปะหลังมีอุณหภูมิการเกิดเจลาตินที่ 52-64 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าธัญพืชอื่นๆ ทำให้อัตราการเพิ่มความหนืดสูงเกิดการสลายตัวได้มาก และแป้งมันสำปะหลังยังเกิดการคืนตัวค่อนข้างน้อยและช้าเพราะมีองค์ประกอบส่วนมากเป็นอะไมโลเพกติน [10]

### 2.7.2 การเกิดลิเคอฟิเคชัน (liquefaction)

เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจลาตินโดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของโซ่กลูโคสทำให้แยกเป็นสายสั้น ๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีความหนืดน้อยลง กว่า 30 ปีที่ผ่านมาได้มีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) แทนการใช้กรดย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า [32]

### 2.7.3 การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (saccharification)

เป็นการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ภายหลังจากการย่อยจะทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าเล็กน้อย ผลผลิตที่ได้ คือกลูโคส มอลโตสหรือมอลโตไตรโอส [33]

### 2.7.4 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งนั้นมีหลายชนิด ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ เช่น น้ำเชื่อมกลูโคส น้ำเชื่อมฟรุกโตส โซโคลเดกซ์ทริน

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง โดยพิจารณาตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์แบ่งออกได้ 3 กลุ่ม [30] คือ

2.7.4.1 เอกโซอะไมเลส (exoamylase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะแอลฟา-1,4 และแอลฟา-1,6 กลูโคซิติก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เบตาอะไมเลส ( $\beta$ -amylase) และฟอสฟอริเลส (phosphorase) ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุล

กลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังภาพที่ 2.25, 2.26 และ 2.27

2.7.4.2 เอนโดอะไมเลส (endoamylase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลของแป้งที่ตัดพันธะแอลฟา-1,4 กลูโคซิดิกระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน เอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของแอลฟาอะไมเลส คือ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และแอลฟาลิมิตเดกซ์ตริน ( $\alpha$ -limit-dextrins) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แสดงดังภาพที่ 2.28

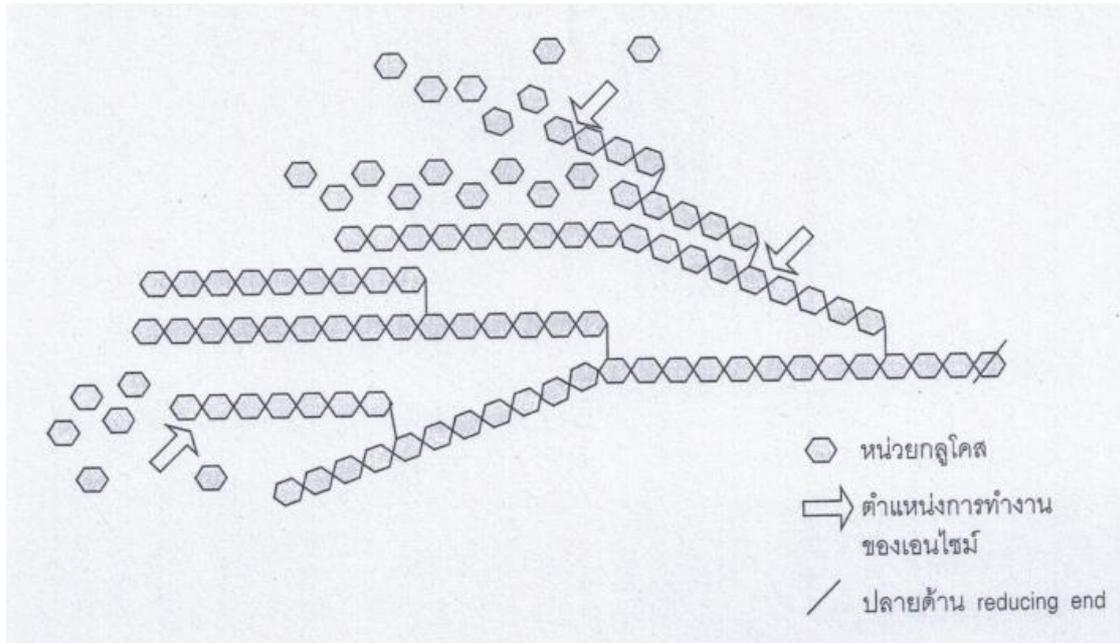
2.7.4.3 เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (debranching enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ตัดเฉพาะพันธะแอลฟา 1,6 กลูโคซิดิก ( $\alpha$ -1,6 glucosidic) เอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และ พูลูลานาส (pullulanase) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้แสดงดังภาพที่ 2.29

#### 2.7.5 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

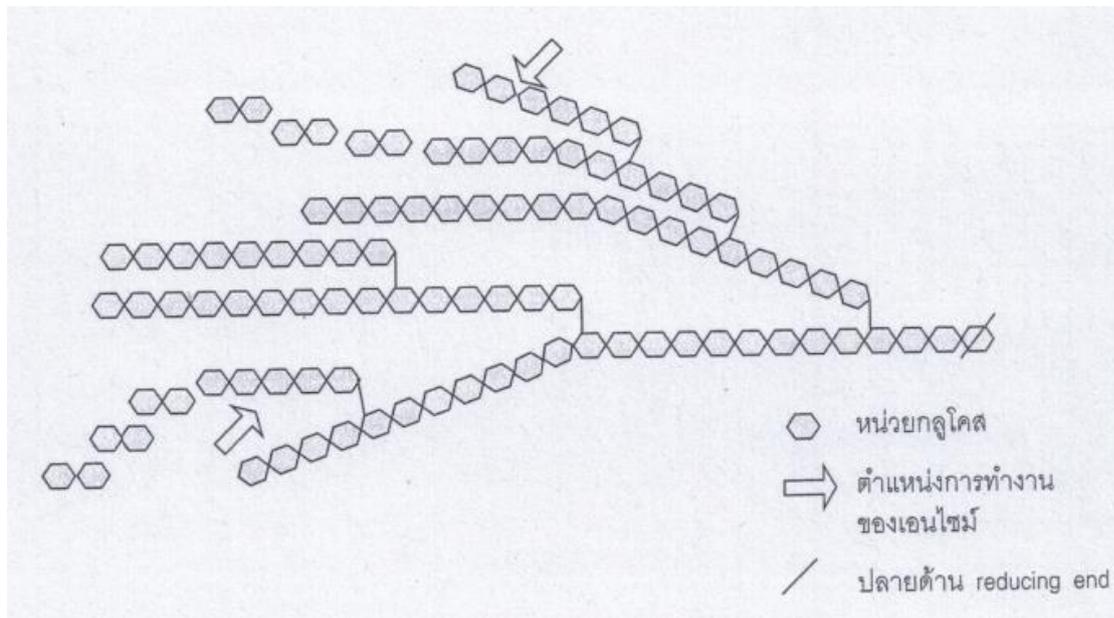
ข้อดีของการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ คือ สภาพที่ใช้ในการย่อยทั้งอุณหภูมิและพีเอชไม่รุนแรงจึงทำให้สามารถใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ไม่ทนต่อการกัดกร่อนได้ สามารถตกผลึกกลูโคสได้ดี ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เฟอร์ฟูรอลและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากการย่อยอย่างจำเพาะของเอนไซม์ สำหรับข้อเสียของการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ คือ เสียค่าใช้จ่ายสูง ปฏิกริยาการย่อยเกิดขึ้นช้า และเอนไซม์มีอายุการใช้งานจำกัดอาจเสื่อมสภาพหรือประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาลดลง [10]

#### 2.7.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

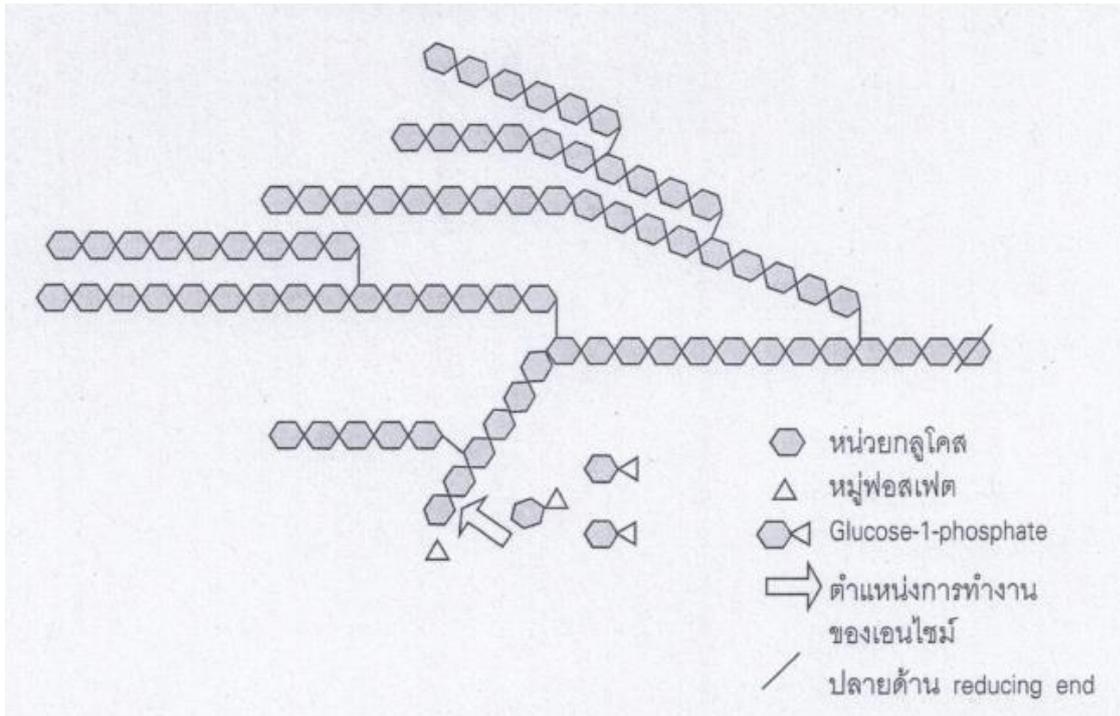
เอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้งมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจากการย่อยสลายแป้ง ได้แก่ น้ำเชื่อมกลูโคส น้ำเชื่อมฟรุกโตส ไฮโคเดกซ์ตริน เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.30, 2.31 และ 2.32 และตารางที่ 2.5 ซึ่งแสดงถึงการนำแป้งมาแปรรูปโดยใช้เอนไซม์ในการผลิตผลิตภัณฑ์การย่อยแป้ง เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีสถานะของการทำงานที่แตกต่างกัน



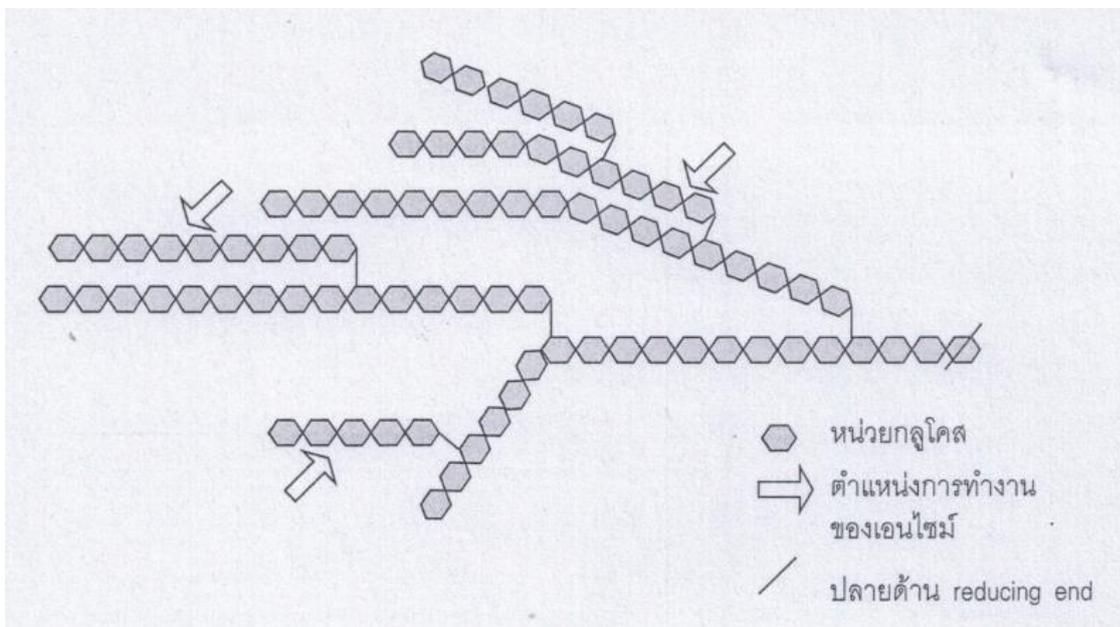
ภาพที่ 2.25 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส [34]



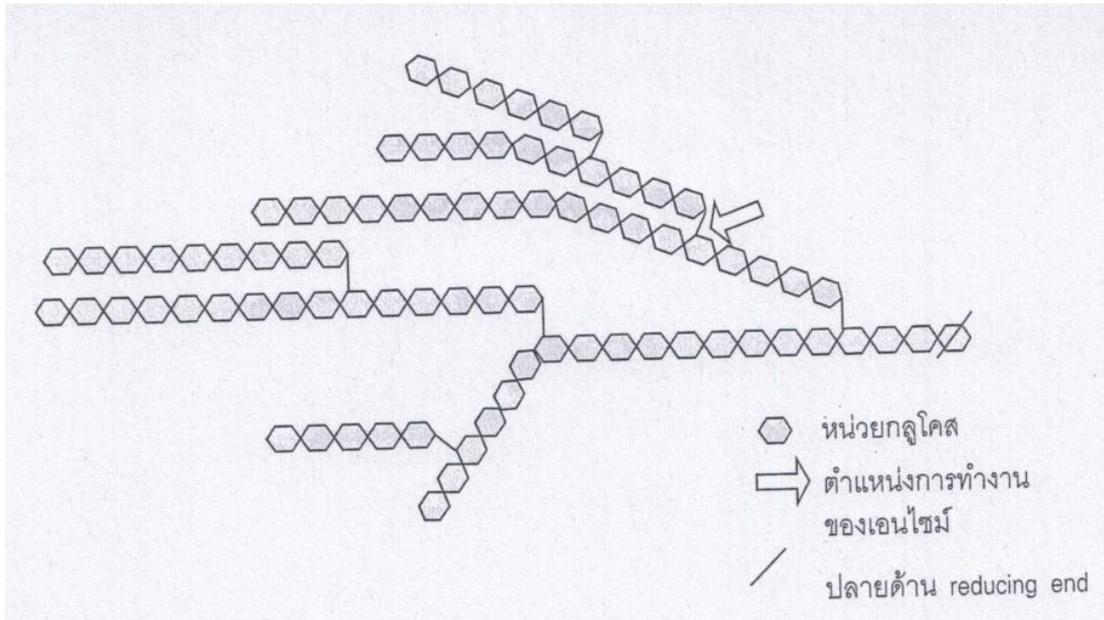
ภาพที่ 2.26 การทำงานของเอนไซม์เบตาอะไมเลส [34]



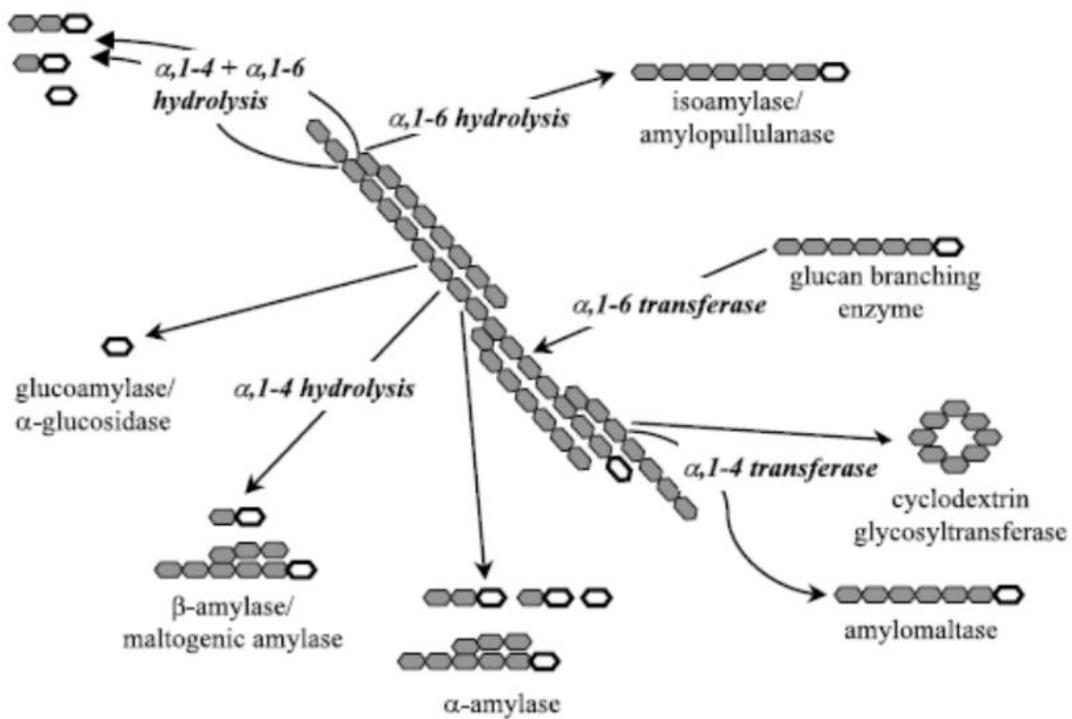
ภาพที่ 2.27 การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟอรีเลส [34]



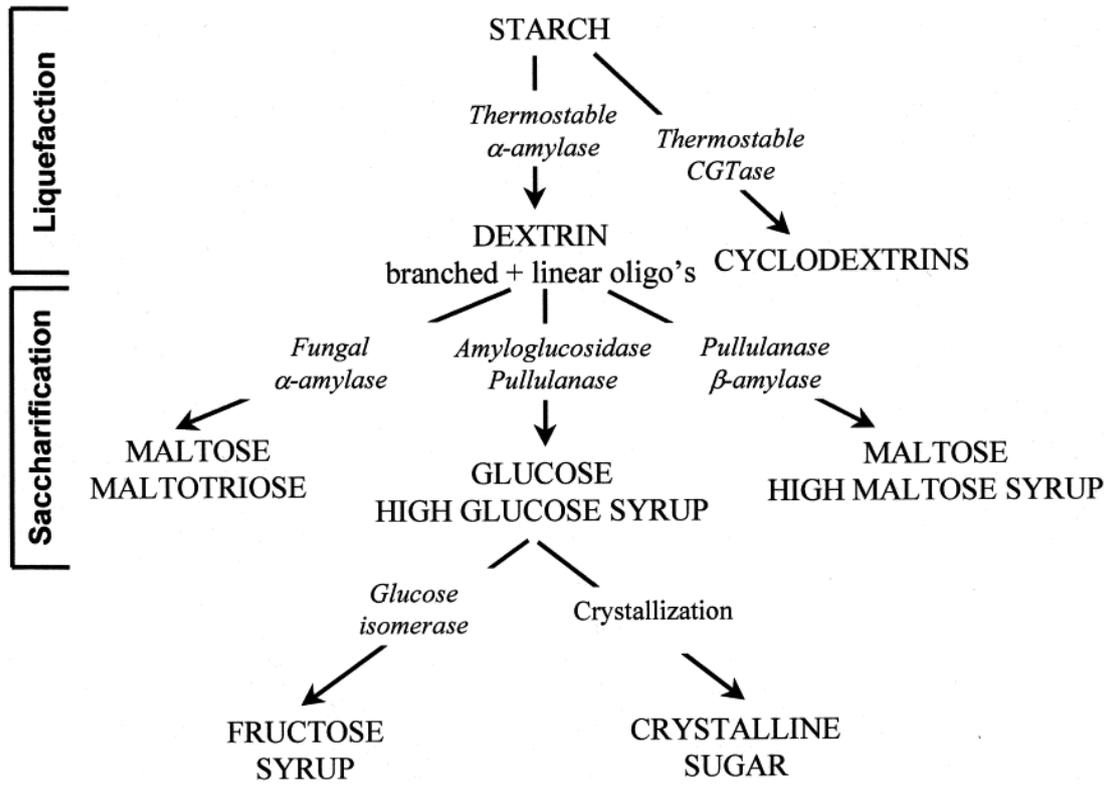
ภาพที่ 2.28 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส [34]



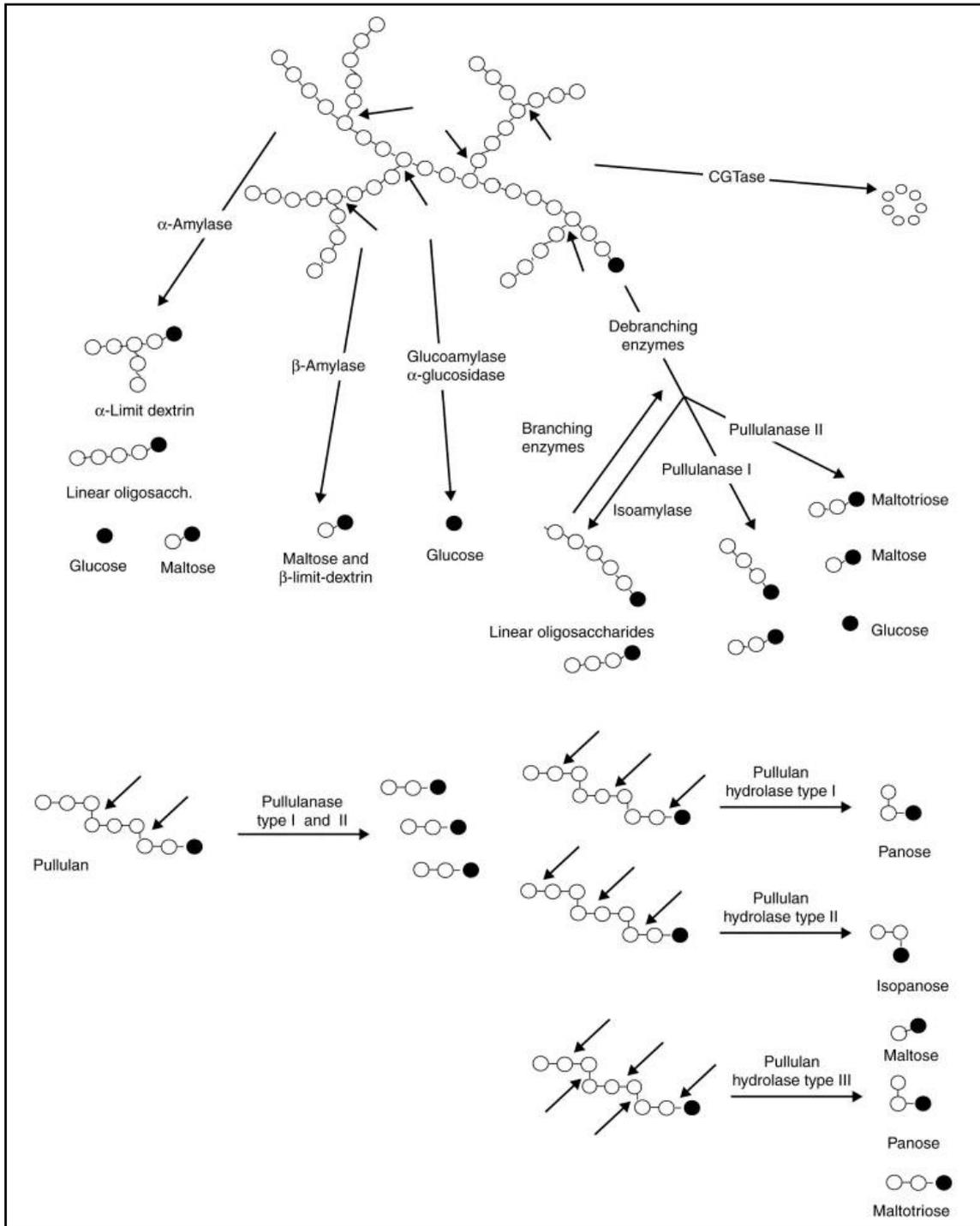
ภาพที่ 2.29 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง [34]



ภาพที่ 2.30 การทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยแป้งสัญลักษณ์วงแหวนเปิดแสดงถึง reducing end ของ polyglucose molecule [35]



ภาพที่ 2.31 กระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ [35]



ภาพที่ 2.32 การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ [36]

ตารางที่ 2.5 เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการย่อยแป้ง [37]

Enzyme	EC number	Source	Action
$\alpha$ -amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Only $\alpha$ -1,4-oligosaccharide links are claved to give $\alpha$ -dextrins and predominantly maltose ( $G_2$ ), $G_3$ , $G_6$ and $G_7$ oligosaccharides
		<i>B. licheniformis</i>	Only $\alpha$ -1,4-oligosaccharide links are claved to give $\alpha$ -dextrins and predominantly maltose $G_3$ , $G_4$ and $G_5$ oligosaccharides
		<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Only $\alpha$ -1,4-oligosaccharide links are claved to give $\alpha$ -dextrins and predominantly maltose $G_3$ oligosaccharides
Saccharifying $\alpha$ -amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus subtilis amylosacchariticus</i>	Only $\alpha$ -1,4-oligosaccharide links are claved to give $\alpha$ -dextrins with maltose $G_3$ , $G_4$ and up 50% (w/v) glucose
$\beta$ -amylase	3.2.1.2	Malted barley	Only $\alpha$ -1,4 links are claved from non-reducing ends, to give limit dextrins and $\beta$ -maltose
Glucoamylase	3.2.1.3	<i>A. niger</i>	$\alpha$ -1,4 and $\alpha$ -1,6 links are claved from non-reducing ends, to give $\beta$ -glucose
Pullulanase	3.2.1.41	<i>B. acidopullulyticus</i>	Only $\alpha$ -1,6 links are claved to give straight-chain maltodextrins

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

Purdue *et al.* (1994) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่ไม่ตกผลึก (non-crystallizing) โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ และใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ผสมเดกซ์โตรไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและพูลูลานเนสในการผลิต พบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คือ พีเอชประมาณ 5.5-5.7 อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 58.00 เปอร์เซ็นต์ [38]

Shaw and Nankang (1994) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากแป้งข้าวเจ้าโดยใช้กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์โดยใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลสและพูลูลานเนส พบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือ พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 83.19 เปอร์เซ็นต์ [39]

Gaouar *et al.* (1998) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด ultrafiltration membrane โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบและใช้เอนไซม์มอลโตจินเนสและพูลูลานเนสในการย่อยแป้งพบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือพีเอช 5.0 อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส โดยทำการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสได้สูงสุด 65.00 เปอร์เซ็นต์ [40]

Hilary *et al.* (1999) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ พบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คือ พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 79 เปอร์เซ็นต์ [41]

Noda *et al.* (2001) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงโดยใช้เอนไซม์ตรึงด้วยการหมักแบบกึ่งกะ (semi-continuous) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ในการย่อยแป้งจะใช้เอนไซม์ตรึงเบตาอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์ตรึงพูลูลานเนสพบว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือพีเอช 6.6 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสได้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสสูงสุด 70.9 เปอร์เซ็นต์ [42]

จิรวรรณ (2540) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการมันสำปะหลังโดยเปรียบเทียบการย่อย 2 วิธีคือการย่อยด้วยกรดและการย่อยด้วยเอนไซม์ ในการย่อยด้วยกรดใช้กรด 3 ชนิดคือกรดซัลฟิวริก กรดออกซาลิกและกรดซัลฟิวริก และสถานะที่ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตด้วยกรดที่ดีที่สุดเกิดจากการย่อย ภายใต้อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและน้ำเชื่อมกลูโคสที่เกิดขึ้นมีความเข้มข้น 158.55 กรัมต่อลิตร ส่วนการย่อยจากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 500 หน่วยเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำให้เกิดแซคคาริฟิเคชันต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 300 หน่วยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำเอาส่วนที่ละลายได้มาย่อยให้เกิดแซคคาริฟิเคชันต่อด้วยอัตราส่วนสารละลาย 50 มิลลิลิตรต่อเอนไซม์ อะไมโลกลูโคซิเดส 75 หน่วยเป็นเวลา 12 ชั่วโมงทำให้ได้น้ำเชื่อมกลูโคสที่มีความเข้มข้น 40.44 กรัมต่อ ลิตร จากการศึกษาพบว่า การย่อยจากมันสำปะหลังด้วยกรดมีประสิทธิภาพที่เหนือกว่าการใช้เอนไซม์ เนื่องจากน้ำเชื่อมกลูโคสที่ได้มีความเข้มข้นสูงกว่า [10]

พัศตร์ประไพ (2546) ได้ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากกมันสำปะหลัง ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในขั้นตอนการเกิดแซคคาริฟิเคชันที่ความเข้มข้นกมันสำปะหลัง 150 กรัม ต่อลิตร ปริมาณการย่อย 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 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงทำให้เกิดการเปลี่ยนกมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคส 69.80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับประสิทธิภาพการย่อย 72.71 เปอร์เซ็นต์ [9]

วารวิถัลยาและสุนันทา (2550) ได้ทำการศึกษาการตัดกิ่งโมเลกุลแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ พูลูลานเนส พบได้ว่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในช่วงปริมาณแป้ง 5-8 เปอร์เซ็นต์ ระดับการย่อยคงที่และสูงสุดที่ปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์และเอนไซม์พูลูลานเนส 15 ยูนิตต่อกรัม ของแป้ง เมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มจาก 30-24 ชั่วโมงทำให้ระดับของการตัดกิ่งเพิ่มขึ้นจาก 58.9 เป็น 89.3 เปอร์เซ็นต์ [43]

Sung, L.M. et al. (2008) พบว่า ผลกระทบของปฏิกิริยาเอนไซม์ dextranase จากเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* B-512F ซึ่งใช้หมอลโตสเป็นสารตั้งต้น โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของซูโครส และมอลโตสในอัตราที่ต่างกัน และความเข้มข้นของซูโครสและมอลโตส อัตราส่วนของซูโครสและ มอลโตสที่ระดับต่างๆ ดังนี้ 1:4, 1:2, 1:1 และ 2:1 ความเข้มข้นของซูโครสและมอลโตสตั้งแต่ 2% ถึง 20% ให้ผลการทดลองว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสในอัตราส่วน 2:1 ผลิตภัณฑ์ที่พบคือ ไอโซมอลโตซิล มอลโตส (DP4) หรือ ไอโซมอลโตไตรโอสิล มอลโตส (DP5) และน้ำตาลแซ็กคาไรด์สายยาวคือ DP8 หรือ DP9 แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างซูโครสและมอลโตส (1:1) จะให้ผลผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่าง 40 และ 70% และเมื่อ มอลโตสมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจะให้อัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นประมาณ 70-90% ตามที่สรุปผลผลิตของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สูงสุดเท่ากับ 91.5% เมื่อซูโครสและมอลโตสมีความเข้มข้นที่ 10% และ 5% ตามลำดับ [44]

Lin Q., *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาเรื่อง การผลิตน้ำเชื่อมไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งข้าวโดยใช้วิธีทางชีวภาพเพียงขั้นตอนเดียว พบว่าเมื่อเติมปริมาณเอนไซม์นีโอพูแลเนส และแซ็กคาริไฟด์แอลฟาอะไมเลส ลงในน้ำแป้ง ปรับพีเอชที่ 6.0 นำอาหารที่ผสมเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 และ 120 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรสและ HPLC ในชั่วโมงที่ 72 ผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 59.2 เปอร์เซ็นต์ [7]

Chockchaisawasdee and Naiyatat (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งกล้วย ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเบตาอะไมเลส พบว่า ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ *Fungamyl* ให้ความเข้มข้นสูงสุด คือ 76.67 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ผลิตจากเอนไซม์  $\beta$ -amylase ให้ความเข้มข้นเท่ากับ 70.74 กรัมต่อลิตร [35]

Saman and Artjariyasripong (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรีไบโอติกไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากข้าว พบว่า ในน้ำเชื่อมข้าวพบองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 44, 10 และ 7 กรัมต่อลิตรตามลำดับ [46]

Saman *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรีไบโอติกไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากวัตถุดิบทางการเกษตร พบว่า ในน้ำเชื่อมข้าวพบองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ คือ ไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 6.4, 4.5 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันน้ำเชื่อมมันสำปะหลังให้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 1 และ 0.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ [47]

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

##### 3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1.1 กรวยกรอง

3.1.1.2 กระดาษกรอง

3.1.1.3 กระบอกลวด

3.1.1.4 ขวดรูปชมพู่

3.1.1.5 ขวดปรับปริมาตร

3.1.1.6 ชุดอุปกรณ์ไตเตรต

3.1.1.7 แท่งแก้ว

3.1.1.8 ปีกเกอร์

3.1.1.9 หลอดทดลองพร้อมฝา

3.1.1.10 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid

Chromatography, HPLC)

3.1.1.11 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (Analytical balance 2 digital)

3.1.1.12 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digital)

3.1.1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)

3.1.1.14 เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

3.1.1.15 เครื่องวัดของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand Refractometr)

3.1.1.16 ตู้เขี่ยเชื้อ (Biohazard Safety Carbinet, BSC)

3.1.1.17 ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)

3.1.1.18 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3.1.1.19 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)

3.1.1.20 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.1.1.21 เตาไฟฟ้า (Hot plate)

3.1.1.22 อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ (Oil bath)

3.1.1.23 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.1.1.24 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร (10 L Bioreactor)

## 3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 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  $\alpha$ -Methyl-D-glucoside ( $\alpha$ -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 เอนไซม์

3.1.3.1 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase, Termamyl) (EC 3.2.1.1) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ของบริษัท Novozymes

3.1.3.2 เอนไซม์เบตาอะไมเลส ( $\beta$ -amylase) (EC 3.2.1.2) จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ของบริษัท Novozymes

3.1.3.3 เอนไซม์พูลูลานเนส (pullulanase, Promozyme D2) (EC 3.2.1.41) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus acidopullulyticus* ของบริษัท Novozymes

3.1.3.4 เอนไซม์มอลโตจินเนส (maltogenase, Maltogenase<sup>®</sup> L) (EC 3.2.1.133) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ของบริษัท Novozymes

3.1.3.5 เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (Transglucosidase, TG) (EC 3.2.1.20) จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ของบริษัท Megazyme

## 3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

### 3.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

#### 3.2.1.1 เตรียมสารละลายน้ำแป้ง

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

#### 3.2.1.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำสารละลายน้ำแป้งที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.5 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 3.0, 5.0, 7.0 และ 10 หน่วย/กรัมของแป้ง ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้เย็นและนำไปวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose equivalent, DE)

### 3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง

#### 3.2.2.1 การศึกษาชนิดของเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1 ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 เติมเอนไซม์ผสม ดังนี้

- เอนไซม์เบตาอะไมเลสและมอลโตจินเนสปริมาณ 25 และ 50 หน่วย/กรัมของแป้งตามลำดับ

- เอนไซม์เบตาอะไมเลสและพุลลูลานเนสปริมาณ 25 และ 0.5 หน่วย/กรัมของแป้งตามลำดับ

- เอนไซม์มอลโตจินเนสและพุลลูลานเนสปริมาณ 50 และ 0.5 หน่วย/กรัมของแป้งตามลำดับ

บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้เย็น นำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 3.2.2.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรออสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรออสและเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1 ปรับพีเอชที่ระดับต่าง ๆ ดังนี้ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.1 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้เย็น นำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 3.2.2.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรออสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรออสและเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1 ปรับพีเอชระดับที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.2.2 จากนั้นเติมเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.1 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้เย็น นำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 3.2.2.4 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรออสและเดกซ์ทริน

นำมอลโตไตรออสและเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สภาวะเหมาะสมจากข้อ 3.2.1 ปรับพีเอชระดับที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.2 จากนั้นเติมเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.1 บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2.3 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง และทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้เย็น นำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

## 3.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ตัวแปรที่สนใจคือปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ โดยออกแบบการทดลองและสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการ Response Surface Methodology (RSM) แบบ Box-behnken design (3 ระดับ) ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยนำค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปรแทนลงในสมการ 3-1 ซึ่งมีสภาวะการทดลองจำนวน 27 ชุด แสดงค่า Code variable ดังตาราง

ที่ 3.1 ชุดสภาวะการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้นวิเคราะห์ผลของตัวแปรตามแบบจำลองสมการกำลังสอง (full quadratic model) มีสมการทั่วไปตามสมการ 3-2

สมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำนวน 3 ตัวแปร

(3-1)

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

โดยที่  $X_1$  คือ ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส

$X_2$  คือ พีเอช

$X_3$  คือ อุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ )

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทดลองโดยการออกแบบด้วยเทคนิค RSM แบบ Box-behnken design เพื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ

ชุดการทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส	พีเอช	อุณหภูมิ (°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
27	1	1	1
Min-Max Value	0.1 – 0.3	5.0 – 7.0	50-70

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

โดยที่  $X$  คือ Code Variable  
 $x$  คือ ตัวแปรอิสระ  
 $x_{min}$  คือ ค่าต่ำสุดของตัวแปรอิสระ  
 $x_{max}$  คือ ค่าสูงสุดของตัวแปรอิสระ

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค RSM เพื่อศึกษาผลของตัวแปรในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ชุดการทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (%)	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)
1	0.1	5	50
2	0.1	5	60
3	0.1	5	70
4	0.1	6	50
5	0.1	6	60
6	0.1	6	70
7	0.1	7	50
8	0.1	7	60
9	0.1	7	70
10	0.2	5	50
11	0.2	5	60
12	0.2	5	70
13	0.2	6	50
14	0.2	6	60
15	0.2	6	70
16	0.2	7	50
17	0.2	7	60
18	0.2	7	70
19	0.3	5	50
20	0.3	5	60
21	0.3	5	70
22	0.3	6	50
23	0.3	6	60
24	0.3	6	70
25	0.3	7	50
26	0.3	7	60
27	0.3	7	70

### 3.2.4 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จ (batch production)

เตรียมน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงและเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสปริมาณที่เหมาะสม ทำการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร โดยมีการควบคุมสถานะในการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เก็บตัวอย่างเป็นช่วง ๆ ตลอดการทำปฏิกิริยา เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 3.3 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

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

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

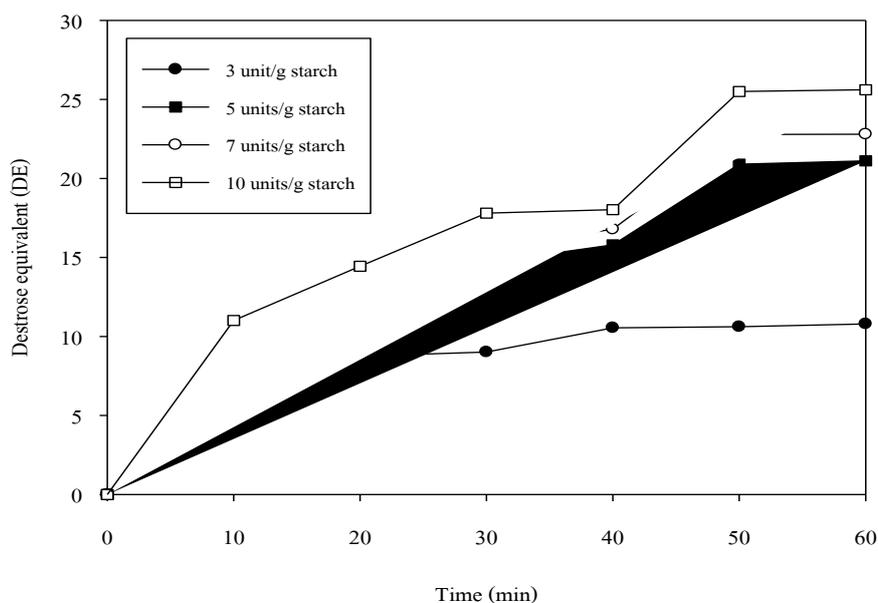
#### 4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยกระบวนการทางเอนไซม์นั้น ช่วงแรกจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัดโมเลกุลของแป้งที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสให้มีขนาดเล็กลง (liquefaction) โดยการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในขั้นตอนนี้จะต้องได้ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose Equivalent ; DE) ประมาณ 12 ซึ่งเป็นค่า DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งให้เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้นๆ เช่น มอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินในปริมาณสูง [48] ดังนั้นการศึกษาปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลังจะต้องได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ประมาณ 12

จากการเตรียมสารละลายน้ำแป้งเริ่มต้นโดยชั่งแป้งปริมาณ 600 กรัม ละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กวนจนสารละลายน้ำแป้งให้เข้ากัน ปรับพีเอช 6.5 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 3.0, 5.0, 7.0 และ 10 หน่วย/กรัมของแป้ง ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 10 นาที เพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้น ๆ ได้แก่ มอลโตไตรโอส และเดกซ์ทริน ติดตามการย่อยของแป้งมันสำปะหลัง โดยการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า DE ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1 จากการทดลองพบว่า ปริมาณของเอนไซม์มีผลต่อค่า DE โดยเมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังจะส่งผลให้ค่า DE สูงขึ้น เนื่องจากเมื่อปริมาณของเอนไซม์มากขึ้นจะสามารถย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังเป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินได้เร็วขึ้น นอกจากนั้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยนานขึ้นจะส่งผลให้ค่า DE สูงขึ้นด้วย โดยเมื่อทำการย่อยเป็นเวลา 20 นาที การใช้เอนไซม์ปริมาณ 5.0 และ 7.0 หน่วย/กรัมของแป้ง ให้ค่า DE เท่ากับ 12.04 และ 12.10 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p > 0.05$ ) เนื่องจากค่า DE ทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันจึงเลือกใช้ปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 5.0 หน่วย/กรัมของแป้ง เพราะเป็นการลดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตในระดับโรงงานอุตสาหกรรม โดยสารละลายน้ำแป้งมันสำปะหลังถูกย่อยเป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินแล้วมีค่า DE ใกล้เคียงกับ DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลังในขั้นแรก ( $DE = 12$ ) ดังนั้นในการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินปริมาณสูง จึงควรให้ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ปริมาณเท่ากับ 5.0 หน่วย/กรัมของแป้ง และทำการย่อยเป็นเวลา 20 นาที

ค่า DE ในน้ำเชื่อมเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคส โดยถ้าค่า DE สูงจะแสดงว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเชื่อมสูง [49] จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยสลาย จะทำให้ค่า DE ในน้ำเชื่อมมีปริมาณสูง แสดงว่าในสภาวะดังกล่าวจะส่งผล

ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส เนื่องจากในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจะมีการใช้เอนไซม์ เบตาอะไมเลสหรือมอลโตจินเนส หรือ พูลูลานเนสในการเปลี่ยนมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตส [48] ดังนั้นการใช้ปริมาณของเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ไม่เหมาะสมสำหรับนำไปผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส



ภาพที่ 4.1 ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *B. licheniformis* คือ การใช้เอนไซม์ปริมาณ 5.0 หน่วย/กรัมของแป้ง พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 20 นาที ซึ่งจะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ที่มีค่าใกล้เคียงกับ DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังให้ได้เป็นมอลโตไตรโอส สำหรับเป็นสับสเตรตตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส สภาวะดังกล่าวมีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Q. Lin *et al.* [7, 50] ซึ่งได้ทำการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจากแป้งข้าวเจ้า โดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ กระบวนการตัดโมเลกุลของแป้งที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสให้มีขนาดเล็กลง (liquefaction) จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้งข้าวเจ้า โดยสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งข้าวเจ้าให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตไตรโอส คือ การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสย่อยแป้งข้าวเจ้าที่พีเอช 6.9 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 22 นาที จะได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE 8-11 ซึ่งน้ำเชื่อมที่มีค่า DE สูงเกินไปจะทำให้ได้ผลได้ของน้ำตาลมอลโตสลดลง แต่ถ้าน้ำเชื่อมมีค่าต่ำเกินไป (DE ต่ำกว่า 8) จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมีความหนืดสูง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการแชคคาริฟิเคชัน

(saccharification) ทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการดังกล่าวทำงานได้ไม่ดี นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยของ Karmakar and Ray [51] ซึ่งได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตไทรโอสด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง (thermostable enzyme) จากเชื้อ *Bacillus* sp. KR11 โดยเอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

#### 4.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง

ในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยกระบวนการทางเอนไซม์นั้น จะนำน้ำเชื่อมที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมาเปลี่ยนเป็นน้ำเชื่อมมอลโตสโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์เบตาอะไมเลส พุลลูลานาส และมอลโตจินเนส สำหรับการศึกษาครั้งนี้ต้องการน้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 50-55 เปอร์เซ็นต์ [48] จึงได้มีการศึกษาชนิดของเอนไซม์ผสม พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง และเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในขั้นต่อไป

##### 4.2.1 การศึกษาชนิดของเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทริน

นำน้ำเชื่อมที่ประกอบด้วยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินจากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้ว นำมาปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 แล้วย่อยสลายด้วยเอนไซม์ผสมชนิดต่าง ๆ ดังนี้ เอนไซม์เบตาอะไมเลสกับมอลโตจินเนส เบนตาอะไมเลสกับพุลลูลานาส และมอลโตจินเนสกับพุลลูลานาส โดยใช้ปริมาณของเอนไซม์เบตาอะไมเลส 25 หน่วย/กรัมของแป้ง เอนไซม์พุลลูลานาส 0.5 หน่วย/กรัมของแป้ง และเอนไซม์มอลโตจินเนส 50 หน่วย/กรัมของแป้ง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อย่อยให้มอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินเป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากผลการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์เอนไซม์ผสมแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินที่จะทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p > 0.05$ ) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดมีการย่อยสลายพันธะกลูโคซิลิกในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์เบตาอะไมเลสจะไปตัดพันธะไกลโคซิลของแป้งที่แอลฟา-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านที่ไม่มีหมูรีดิวิซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของมอลโตสหรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคสและจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่แอลฟา-1,6 [52,53] เอนไซม์มอลโตจินเนสทำปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ 1,4 –แอลฟา-กลูโคซิลิก โดยตัดสายพอลิเมอร์จากปลายสายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวิซ์ [54] เอนไซม์พุลลูลานาส จะเข้าทำปฏิกิริยาตัดพันธะแอลฟา-1,6 [43] สำหรับการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสและมอลโตจินเนสจะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 58.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสสูงที่สุด ดังนั้นเอนไซม์เบตาอะไมเลสและมอลโตจินเนสจึงมีความเหมาะสมในการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินเพื่อผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง เนื่องจากเอนไซม์เบตาอะไมเลสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะ  $\alpha$ -1,4 และ  $\alpha$ -1,6 กลูโคซิลิกของโมเลกุลกลูโคสที่ปลายสาย [33] และ

เอนไซม์มอลโตจินเนสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะ  $\alpha$ -1,4 กลูโคซิดิกที่ปลายสายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ [54] ดังนั้นเอนไซม์ผสมเบตาอะไมเลสร่วมกับมอลโตจินเนสมีความจำเพาะกับมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินสูง จึงสามารถย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงได้

**ตารางที่ 4.1** ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมชนิดต่างๆ

ชนิดของเอนไซม์ผสม	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์) <sup>1</sup>
เบตาอะไมเลสและมอลโตจินเนส	58.92 <sup>a</sup>
เบตาอะไมเลสและพูลูลูรานเนส	51.01 <sup>b</sup>
มอลโตจินเนสและพูลูลูรานเนส	45.90 <sup>c</sup>

หมายเหตุ <sup>1</sup> อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P > 0.05$ )

จากการทดลองชนิดของเอนไซม์ที่ใช้สำหรับผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจะแตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ โดย Q. Lin *et al.* [50] ได้ทำการผลิตได้ทำการผลิตมอลโตสไซรัปจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดโดยมีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (E.C. 3.2.1.1) ในขั้นตอนลิเคอฟแฟกชัน (liquefaction) และใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส (E.C. 3.2.1.2) และเอนไซม์พูลูลูรานเนส (E.C. 3.2.1.41) ในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส คือ 104.6 และ 102.2 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/กรัม) ตามลำดับ Shaw and Sheu [55] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากข้าว โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *B. licheniformis* และศึกษาการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน ได้แก่ พูลูลูรานเนสจากเชื้อ *Aerobacter aerogenes* ไอโซอะไมเลสจากเชื้อ *Pseudomonas amyloclavata* และเบตาอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus cereus* จากการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกันทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เบตาอะไมเลส, ไอโซอะไมเลส และพูลูลูรานเนส พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงเท่ากับ 83.19 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลสร่วมกับพูลูลูรานเนส พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงเท่ากับ 80.14 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลสร่วมกับไอโซอะไมเลส พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จะได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง เท่ากับ 68.32 เปอร์เซ็นต์ Gaouar *et al.* [40] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสจากแป้งมันสำปะหลังในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอัลตราฟิวเดรชัน โดยใช้เอนไซม์ BAN 120L จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* (E.C. 3.2.1.1) ในกระบวนการลิเคอฟแฟกชัน และใช้เอนไซม์ Maltogenase 4000L จาก

เชื้อ *B. subtilis* และเอนไซม์ Promozyne 600L จากเชื้อ *B. acidopullulyticus* (E.C. 3.2.1.41) ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน พบว่าได้น้ำเชื่อมมอลโตสเท่ากับ 217 กรัมต่อลิตร Purdue *et al.* [38] ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่ไม่ตกผลึก (non-crystallizing) โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ และใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกับพุลูลูลานเนสและเดกซ์โตรไซม์ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน จะได้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของมอลโตสเท่ากับ 58.00 เปอร์เซ็นต์

#### 4.2.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน

ทำการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสกับมอลโตจินเนส ปริมาณ 25 และ 50 หน่วย/กรัมของแป้ง ที่พีเอช 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2 จากการทดลองพบว่า พีเอชจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสมีความแตกต่างกัน เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นจะส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสลดลง เนื่องจากเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเอนไซม์ผสม ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนั้น มีความแตกต่างกัน คือ เอนไซม์เบตาอะไมเลสมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 4.5-5.5 [48] และเอนไซม์มอลโตจินเนส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 5.0-6.0 [54] สำหรับค่าพีเอช 5.0 จะให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสสูงที่สุดซึ่งแตกต่างจากระดับพีเอชอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ผสมคือ พีเอช 5.0 ซึ่งจะได้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส เท่ากับ 59.05 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่พีเอชต่างๆ

พีเอช (pH)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์) <sup>1</sup>
5.0	59.05 <sup>a</sup>
5.5	57.81 <sup>b</sup>
6.0	51.14 <sup>c</sup>
6.5	51.20 <sup>c</sup>
7.0	48.98 <sup>d</sup>

หมายเหตุ <sup>1</sup>อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P > 0.05$ )

#### 4.2.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทริน

ทำการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสกับมอลโตจินเนส ปริมาณ 25 และ 50 หน่วย/กรัมของแป้ง ที่พีเอช 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสมีความแตกต่างกัน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เบตาอะไมเลสอยู่ในช่วง 55-62 องศาเซลเซียส [48] และเอนไซม์มอลโตจินเนสอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส [54] สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจะให้น้ำเชื่อมมอลโตสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากอุณหภูมิอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ผสมคือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส เท่ากับ 59.13 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมที่อุณหภูมิต่างๆ

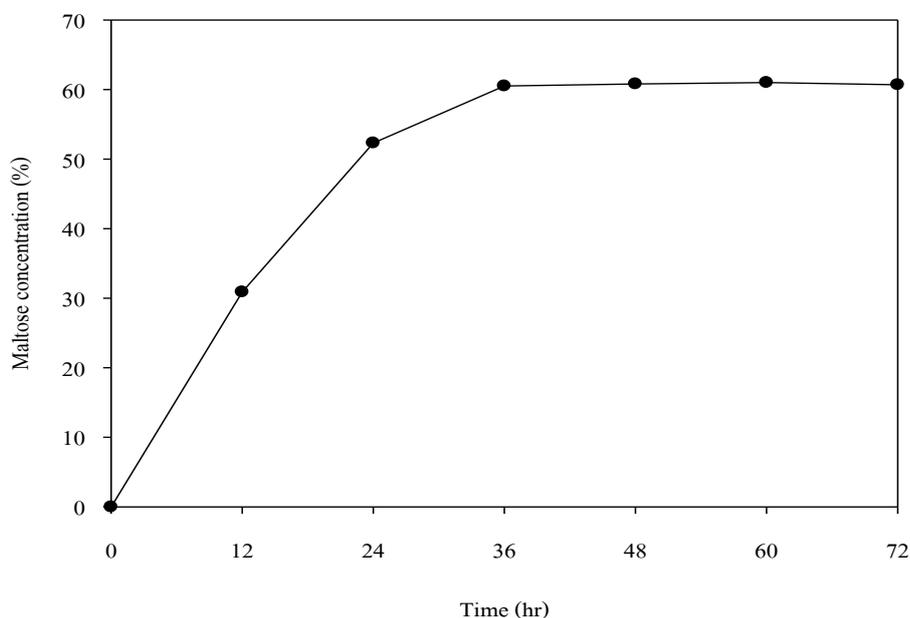
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาลมอลโตส (เปอร์เซ็นต์) <sup>1</sup>
50	55.04 <sup>b</sup>
55	55.20 <sup>b</sup>
60	59.13 <sup>a</sup>
65	50.16 <sup>c</sup>
70	48.77 <sup>d</sup>

หมายเหตุ <sup>1</sup> อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวดังแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P > 0.05$ )

#### 4.2.4 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทริน

ทำการย่อยมอลโตไทรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสกับมอลโตจินเนส ปริมาณ 25 และ 50 หน่วย/กรัมของแป้ง ที่พีเอช 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตส ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2 จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น โดยชั่วโมงที่ 36-72 ปริมาณน้ำตาลมอลโตสจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากแป้งมันสำปะหลังคือ

36 ชั่วโมง ซึ่งจะได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสเท่ากับ 60.50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากการย่อยมอลโตไตร โอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ผสมของเบตาอะไมเลสและมอลโตจินเนส พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

จากการทดลองพบว่าสถานะที่เหมาะสมในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชันแป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง โดยใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส 25 หน่วย/กรัมของแป้ง ร่วมกับเอนไซม์มอลโตจินเนส 50 หน่วย/กรัมของแป้ง พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ย่อยสลายเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสเท่ากับ 60.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นว่าสถานะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงจากงานวิจัยนี้จะแตกต่างจากงานวิจัยของ Gaouar *et al.*, [30] Noda *et al.*, [42] Hilary *et al.*, [41] และ Shaw and Nankang [39] เนื่องจากวัตถุดิบ ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการแซคคาริฟิเคชันจะมีความแตกต่างกันส่งผลให้สถานะต่างๆที่เหมาะสม สำหรับผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงมีความแตกต่างกันด้วย

### 4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* ที่ปริมาณ 5.0 หน่วย/กรัมของแป้ง พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีค่า DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังให้ได้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินสำหรับเป็นสับสเตรตตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส จากนั้นทำการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์เบตาอะไมเลสปริมาณ 25 หน่วย/กรัมของแป้ง ร่วมกับเอนไซม์มอลโตจินเนสปริมาณ 50 หน่วย/กรัมของแป้ง พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสเท่ากับ 60.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะถูกใช้เป็นสับสเตรตเริ่มต้นสำหรับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ที่ 0.1-0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5-7 และอุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส ในการทดลองนี้ได้ออกแบบการทดลองแบบ factorial design จะได้การทดลองทั้งหมด 27 ชุดการทดลอง จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พีเอช และอุณหภูมิ จะมีผลต่อปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ คือ พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส การใช้สภาวะที่พีเอช และอุณหภูมิไม่เหมาะสม จะส่งผลให้ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เกิดขึ้นน้อย เนื่องจากสภาวะอาจจะไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์คือ การใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะมีปริมาณองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p > 0.05$ ) กับการใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความเหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยจะได้พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 18.27, 3.16 และ 15.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และได้ผลได้ของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 0.36 อัตราการผลิต เท่ากับ 15.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จะแตกต่างจากงานวิจัยอื่น เนื่องจากวัตถุดิบ สภาวะที่ใช้ในการผลิต และกระบวนการผลิตมีความแตกต่างกันโดย Saman *et al.* [47] ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าว และมันสำปะหลัง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* TISTR3102 บนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยเชื้อราดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (52.5 U/g) และแอลฟาไกลโคซิเดส (2.4 U/g) หลังจากนั้นทำวัตถุดิบไปบดผสมกับน้ำ (mashing) ปล่อยให้หมักต่อที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส พีเอช 5.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ผลผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

จากข้าว ซึ่งประกอบด้วยไอโซมอลโตส พาโนส และ ไอโซมอลโตไตรออส สูงกว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากมันสำปะหลัง Pan and Lee [56] ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจากเศษข้าวเจ้า (rice crumb) โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นตอนลิเคียวแฟกชัน และใช้เอนไซม์โปรโมไซม์ และเอนไซม์เบตาอะไมเลส 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขั้นตอนกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน และใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ในขั้นตอนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จะได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 53.19 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่ประกอบด้วยไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรออส จากนั้นนำไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไปทำให้บริสุทธิ์สูง โดยการเติมยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ลงไปเพื่อให้ใช้น้ำตาลชนิดอื่นที่ปนอยู่ในไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จะทำให้ได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์ 66.5-99.4 เปอร์เซ็นต์ Sheu *et al.* [57] ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดสที่ตรึงบนกลูตารัลดีไฮด์-ไลโคซานบีดที่บรรจุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้สารละลายน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัตถุดิบ ทำการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ Arrojo *et al.* [58] ได้ศึกษาการเปลี่ยนมอลโตสเป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดสที่ได้จากยีสต์ *Xantophyllomyces dendrorhous* โดยใช้สารละลายมอลโตสความเข้มข้น 525 กรัมต่อลิตร เป็นวัตถุดิบ พีเอช 5.6 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าจะได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปไตรและเตตระแซ็กคาไรด์เท่ากับ 167.1 กรัมต่อลิตร Kuriki *et al.* [4] ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์นีโอพูลูลานเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 เป็นระยะเวลา 32 ชั่วโมง โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ จะได้ความเข้มข้นของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่าง ๆ ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาณ			ปริมาณไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (เปอร์เซ็นต์) <sup>1</sup>			
เอนไซม์ TG (เปอร์เซ็นต์)	ทีเอช	อุณหภูมิ (°C)	พานอส	มอลโตไตรออส	ไอโซ มอลโตไตรออส	ไอโซมอลโต โอลิโกแซ็กคาไรด์
0.1	5	50	18.27 <sup>a</sup>	3.16 <sup>a</sup>	15.22 <sup>a</sup>	36.65 <sup>a</sup>
0.1	5	60	17.23 <sup>b</sup>	2.68 <sup>b</sup>	14.67 <sup>b</sup>	34.58 <sup>b</sup>
0.1	5	70	16.33 <sup>c</sup>	1.80 <sup>c</sup>	13.17 <sup>c</sup>	31.30 <sup>c</sup>
0.1	6	50	17.10 <sup>b</sup>	2.58 <sup>b</sup>	14.33 <sup>b</sup>	34.01 <sup>b</sup>
0.1	6	60	15.50 <sup>d</sup>	1.68 <sup>d</sup>	12.10 <sup>d</sup>	29.28 <sup>d</sup>
0.1	6	70	15.33 <sup>d</sup>	1.52 <sup>d</sup>	12.40 <sup>d</sup>	29.25 <sup>d</sup>
0.1	7	50	13.50 <sup>c</sup>	0.82 <sup>c</sup>	10.67 <sup>c</sup>	24.99 <sup>c</sup>
0.1	7	60	13.37 <sup>c</sup>	0.79 <sup>c</sup>	10.53 <sup>c</sup>	24.69 <sup>c</sup>
0.1	7	70	10.31 <sup>f</sup>	0.31 <sup>f</sup>	9.50 <sup>f</sup>	20.12 <sup>f</sup>
0.2	5	50	18.50 <sup>a</sup>	3.02 <sup>a</sup>	15.01 <sup>a</sup>	36.53 <sup>a</sup>
0.2	5	60	17.17 <sup>b</sup>	2.78 <sup>b</sup>	14.83 <sup>b</sup>	34.78 <sup>b</sup>
0.2	5	70	16.67 <sup>c</sup>	1.92 <sup>c</sup>	13.33 <sup>c</sup>	31.92 <sup>c</sup>
0.2	6	50	17.40 <sup>b</sup>	2.65 <sup>b</sup>	14.70 <sup>b</sup>	34.75 <sup>b</sup>
0.2	6	60	14.83 <sup>d</sup>	1.62 <sup>d</sup>	12.09 <sup>d</sup>	28.54 <sup>d</sup>
0.2	6	70	14.67 <sup>d</sup>	1.60 <sup>d</sup>	12.50 <sup>d</sup>	28.77 <sup>d</sup>
0.2	7	50	13.17 <sup>c</sup>	0.85 <sup>c</sup>	10.83 <sup>c</sup>	24.85 <sup>c</sup>
0.2	7	60	13.51 <sup>c</sup>	0.72 <sup>c</sup>	10.77 <sup>c</sup>	25.00 <sup>c</sup>
0.2	7	70	13.31 <sup>c</sup>	0.85 <sup>c</sup>	10.50 <sup>c</sup>	24.66 <sup>c</sup>
0.3	5	50	18.41 <sup>a</sup>	3.17 <sup>a</sup>	15.30 <sup>a</sup>	36.88 <sup>a</sup>
0.3	5	60	17.20 <sup>b</sup>	2.80 <sup>b</sup>	14.77 <sup>b</sup>	34.77 <sup>b</sup>
0.3	5	70	16.72 <sup>c</sup>	1.93 <sup>c</sup>	13.09 <sup>c</sup>	31.74 <sup>c</sup>
0.3	6	50	17.29 <sup>b</sup>	2.83 <sup>b</sup>	14.73 <sup>b</sup>	34.85 <sup>b</sup>
0.3	6	60	14.89 <sup>d</sup>	1.72 <sup>d</sup>	12.17 <sup>d</sup>	28.78 <sup>d</sup>
0.3	6	70	14.69 <sup>d</sup>	1.77 <sup>d</sup>	12.49 <sup>d</sup>	28.95 <sup>d</sup>
0.3	7	50	13.20 <sup>c</sup>	0.90 <sup>c</sup>	10.33 <sup>c</sup>	24.43 <sup>c</sup>
0.3	7	60	13.53 <sup>c</sup>	0.84 <sup>c</sup>	10.27 <sup>c</sup>	24.64 <sup>c</sup>
0.3	7	70	13.31 <sup>c</sup>	0.88 <sup>c</sup>	10.51 <sup>c</sup>	24.70 <sup>c</sup>

หมายเหตุ <sup>1</sup>อักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

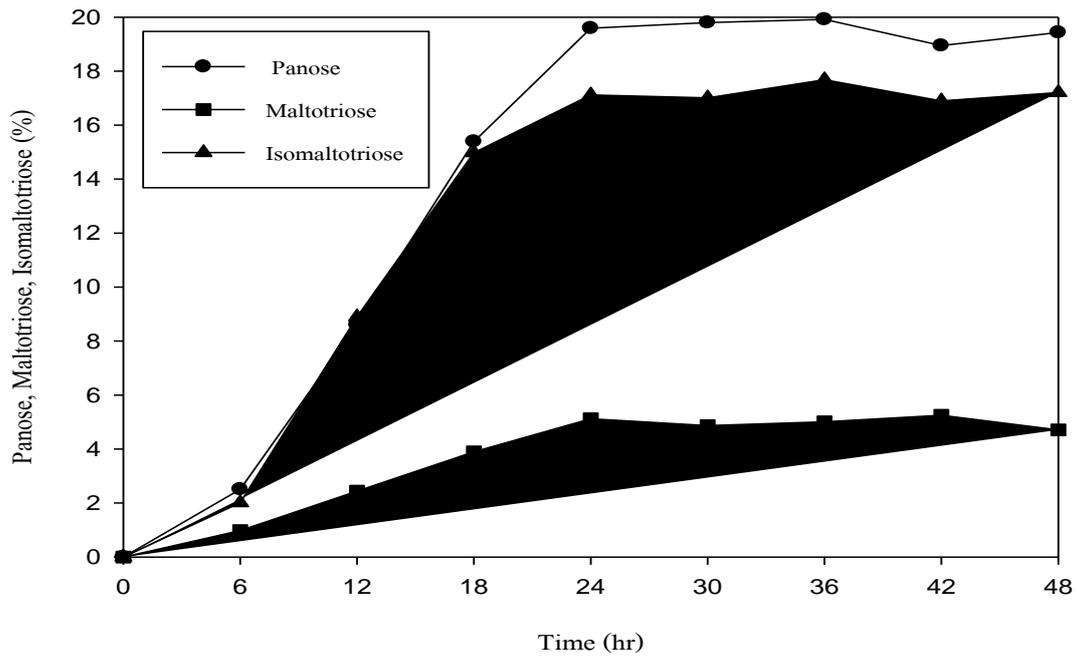
ตารางที่ 4.5 ผลได้และอัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับปฏิบัติการ

พารามิเตอร์	การผลิตระดับปฏิบัติการ
ผลได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Yield, $Y_{p/s}$ )	0.36
อัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	15.27

#### 4.4 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จ (batch production)

การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร จะเตรียม น้ำแป้งปริมาตร 8 ลิตร ทำการย่อยน้ำแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* ที่ ปริมาณ 5.0 หน่วย/กรัมของแป้ง พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ให้ได้น้ำเชื่อม ที่มีค่า DE ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังให้ได้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทริน สำหรับ ใช้เป็นสับสเตรตตั้งต้นในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส จากนั้นทำการย่อยมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินด้วย เอนไซม์เบตาอะไมเลสปริมาณ 25 หน่วย/กรัมของแป้ง ร่วมกับเอนไซม์มอลโตจินเนสปริมาณ 50 หน่วย/กรัม ของแป้ง พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จะทำให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตส ความเข้มข้นสูง ซึ่งจะถูกใช้เป็นสับสเตรตเริ่มต้นสำหรับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของพานอส มอลโตไตรโอส และ ไอโซมอลโตไตรโอส ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.3 จากการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของพานอส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยชั่วโมงที่ 24-48 ปริมาณพานอส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติที่ระดับ 0.05 ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ คือ 24 ชั่วโมง ซึ่งจะได้พานอส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 19.59, 5.12 และ 17.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.3 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (EC 3.2.1.1) จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ให้เป็นมอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส คือการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณ 5.0 หน่วย/กรัมของแป้ง พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสและใช้เวลาในการบ่ม 20 นาที จะได้น้ำเชื่อมที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสเท่ากับ 12.04 การผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูง พบว่า การใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส (EC 3.2.1.2) และมอลโตจินเนส (EC 3.2.1.133) ร่วมกันที่ปริมาณ 25 และ 50 หน่วย/กรัมของแป้ง ตามลำดับ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จะสามารถผลิตน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 60.50 เปอร์เซ็นต์

การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงแบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร พบว่า การใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (EC 3.2.1.20) จากเชื้อรา *Aspergillus niger* (1,000 หน่วย/มิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยพานอส มอลโตไตรโอสและไอโซมอลโตไตรโอส ความเข้มข้น 19.59, 5.12, 17.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรชนิดอื่นที่มีราคาถูกในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เปรียบเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลัง

5.2.3 ควรมีการศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนของเอนไซม์

## บรรณานุกรม

- [1] สาโรจน์ ศิริคັນสนียกุล, *เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแฉะดัดแปลง*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2547.
- [2] สาโรจน์ ศิริคັນสนียกุล 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 transglycosylation reaction of neopullulanase,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59(4), pp. 953-959. 1993.
- [5] A. Tanriseven and S. Dogan , “Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres,” *Process Biochem.*, vol. 37, pp. 1111-1115, 2002.
- [6] S. Moon and G. Cho, “Production of maltooligosaccharides from starch and separation of maltopentaose by adsorption of them on activated carbon (I),” *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 2, pp. 19-22, 1997.
- [7] 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,” *J. Food Technol.*, vol. 46(6), pp. 1194-1200, 2011.
- [8] 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.
- [9] พัศตร์ประไพ ประจำเมือง, “การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ,” *วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท*, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2546.
- [10] จีรวรรณ อภิรักษากร, “การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลัง,” *วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท*, สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540.
- [11] G.R Gibson and M.B. Roberfoid, “Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics,” *J. Nutr.*, vol. 125, pp. 1401-1412, 1995.
- [12] G.R Gibson, “Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin,” *J. Nutr.*, vol. 129(7), pp. 1438s-1441s, 1999.

- [13] เฉลิมขวัญ คำคำ และมัลลิกา ชมนาวัง, “คุณรู้จัก Prebiotics แล้วหรือยัง,” *วารสารอาหาร*, ปีที่ 35 ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน, หน้า 96-102, 2548.
- [14] G.R. Gibson, “Prebiotic,” *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 18, pp. 287-298, 2004.
- [15] S. Kolida, K. Tuohy and G.R. Gibson, “Prebiotic effects of inulin and oligosaccharide,” *Br. J. Nutr.*, vol. 87, pp. s193-s197, 2002.
- [16] 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,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 51, pp. 1-5, 1997.
- [17] สุพจน์ นวลละออง, “การสกัดสารพรีไบโอติกส์จากพืชเกษตร,” *วิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาโท*, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2552.
- [18] ธนารัตน์ ศุภศิริ, “Prebiotic แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ,” *วารสารวิทยาศาสตร์*, ปีที่ 35 ฉบับที่ 4-6 พฤศจิกายน-ธันวาคม, หน้า 357-360, 2542.
- [19] สุชาติพิทย์ จูฑะ โภคา, “พรีไบโอติก,” *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, ฉบับที่ 37(4), หน้า 366-375, 2552.
- [20] R.G. Crittenden and M.J. Playne, “Prebiotics,” in *Y.K. Lee and S. Salminen (Eds) Handbook of probiotics and prebiotics (2<sup>nd</sup> ed.) New Jersey : John Wiley & son Inc.*, pp. 535-581, 2009.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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,” *Microb. Ecol. Health Dis.* vol. 3, pp. 285-292, 1990.
- [24] จุฑาลักษณ์ วงศ์ชัยชนะ, *วิชาการ.คอม (Online)*, 2557, Available:  
<http://www.vcharkarn.com/varticle/60649>, (20 January 2013).
- [25] เน่งน้อย อัมรากร, *รายงานการศึกษาเรื่องอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมสำหรับประเทศไทย*, กรุงเทพฯ: สำนักปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม, 2531.

- [26] สุพรรณวดี ประสงค์, รุ่งทิวา ถิระโคตร, สุพรรณษา ช่วยบรรจง และศศิศาสน์ฤดี คงศรี, *คาร์โบไฮเดรต (Online)*, Available: [http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/28/P\\_Untitled-10.html](http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/28/P_Untitled-10.html), (17 March 2013).
- [27] G.M.A. van Beynum and J.A. Roles, “*Starch Conversion Technology*,” Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 326, 1985.
- [28] C.A. Brautlecht, “*Starch Its Sources, Production and Uses*,” Reinhold Publishing Corporation, New York, pp. 408, 1953.
- [29] เอกพจน์ ฤกษ์กลาง และธนา พินิจวชิรพงศ์, “การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแป้งมันสำปะหลังด้วยระบบการผลิตแบบลิ้นขิ้นตอนการสกัดหยาบ บริษัท แป้งตะวันออกเฉียงเหนือ (1987) จำกัด,” *ปริญญาณิพนธ์ ระดับปริญญาตรี, สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี*, 2553.
- [30] กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, “เทคโนโลยีการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง,” ใน *เทคโนโลยีของแป้ง*. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2550, หน้า 78-79.
- [31] K. Sriroth, K. Piyachomkwan, S. Chotineeranat, R. Chollakup, V. Santisopasri and C.G. Oates, “Impact of drought during early growth on cassava starch quality,” in *Fourth International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network*. November 2-6, 1999.
- [32] C.W. Douglas and C.Michinson, “Enzymes involed in the processing of starch to sugars,” *Trends in Biotechnol. J.*, vol. 15, pp. 349-352, 1997.
- [33] พักตร์ประไพ ประจำเมือง และวิชัย ลีลาวัชรมาศ, “เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง,” *วารสารศูนย์บริการวิชาการ*, ฉบับที่ 11(4), หน้า 28-31, 2546.
- [34] 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.
- [35] 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  $\alpha$ -amylase family.” *J. Biotechnol.*, vol. 94, pp. 137-155, 2002.
- [36] C. Bertoldo and G. Antranikian, “Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria,” *Curr. Opin. Chem. Biol. J.*, vol. 6(2), pp. 151-160, 2002.
- [37] M.F. Chaplin and C. Bucke, *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, Great Britain, pp. 160, 1990.

- [38] J.C. Purdue, D.K. Kevin, D.B. Michael and LT. Jerry, "Highly fermentable, high maltose, non-crystallizing starch conversion syrup," *Biotechnol. Adv.*, vol. 4(13), pp. 310-311, 1994.
- [39] 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).
- [40] O. Gaouar, N. Zakhia, C. Aymard and G.M. Rios, "Production of maltose syrup by bioconversion of cassava starch in an ultrafiltration reactor," *Ind. Crop Prod. J.*, vol. 7, pp. 159-167, 1998.
- [41] E.M.M. Hilary, T.K. Catherine and M.F. William, High maltose-producing amyolytic system of *Streptomyces* sp., *Biotechnol. Lett.*, vol. 21, pp. 23-26, 1999.
- [42] T. Noda, S. Furuta and I. Suda, "Sweet potato  $\beta$ -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose," *Carbohydr. Polym. J.*, vol. 44, pp. 189-195, 2001.
- [43] วรวิทย์ เกียรติพงษ์ลักษณ์ และสุนันทา ทองทา, "สมบัติทางโครงสร้างและทางกายภาพของแป้งมันสำปะหลังตัดกิ่ง," *วารสารเทคโนโลยีสุรนารี*, ฉบับที่ 14(2), หน้า 195-204, 2550.
- [44] 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 using dextranase of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol.18(6), pp. 1141-1145, 2008.
- [45] S. Chockchaisawasdee and N. Poosaran, "Production of isomaltooligosaccharides from banana flour," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, pp. 180-186, 2013.
- [46] P. Saman and S. Artjariyasripong, "Prebiotic: isomaltooligosaccharide production from Thai rice, in 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, October 4-6, Pattaya, Thailand, pp. 260-265, 2010.
- [47] P. Saman, A. Chaiongam, S. Moonmangmee and S. Artjariyasripong, "Prebiotic isomaltooligosaccharide production from economic crops of Thailand, *KKU Research J.* vol. 17(5), pp. 794-799, 2012.
- [48] Novozymes. "Production of maltose syrup," Denmark, 2005.
- [49] G.E. Inglett, "Symposium : Sweeteners," AVI, Westport, 240 pp., 1974.
- [50] 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 Technol.*, vol. 6, pp. 242-248, 2013.
- [51] M. Karmakar and R.R. Ray, "A Maltotriose producing thermostable amylase from *Bacillus* sp. KR11," *J. Microbiol. Biotechnol. Res.*, vol. 3, pp. 91-99, 2011.

- [52] พัชรวิระกะลีส, “เอนไซม์,” สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพฯ, 344 หน้า, 2541.
- [53] ปราณี อานเป็รื่อง, “เอนไซม์ทางอาหาร,” สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพฯ, 440 หน้า, 2543.
- [54] Novozymes, Maltogenase<sup>®</sup> L., Denmark, 2002.
- [55] J.F. Shaw and J.R. Sheu, “Production of high-maltose syrup and high-protein flour from rice by an enzymatic method,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 56(7), pp. 1071-1073, 1992.
- [56] 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,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 89(7), pp. 797-804, 2005.
- [57] D.C. Sheu, C.I. Huang and K.J. Duan, “Production of isomaltooligosaccharides by  $\alpha$ -glucosidase immobilized in chitosan beads and by polyethyleneimine-glutaraldehyde treated mycelia of *Aspergillus carbonarius*,” *Biotechnol. Tech.*, vol. 11(5), pp. 287-291, 1997.
- [58] 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  $\alpha$ -glucosidase from *Xantophyllomyces dendrorhous*,” *Process Biochem.*, vol. 42, pp. 1530-1536, 2007.

**ภาคผนวก**

ภาคผนวก ก

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 บรรจุใส่ขวดนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องตั้งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 ดูดสารละลายกรดอะซิติก ( $CH_3COOH$ ) 1.57 มิลลิลิตร และดูดสารละลายโซเดียมอะซิเตท (NaOAc) 1.76 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

**ภาคผนวก ข**

**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

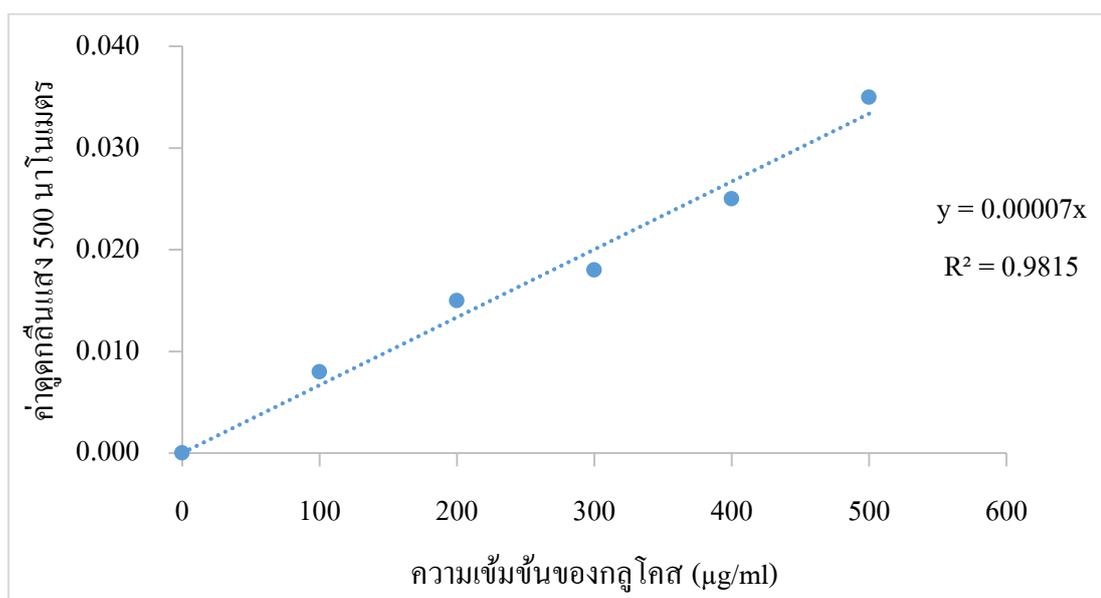
1.3 เจือจางสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.4 คูณสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ 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**

ความเข้มข้นของสารละลาย กลูโคสมาตรฐาน (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 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.5 กรัม และโซเดียมซิติเรท ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) 1 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลาย B : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) 4 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

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

2.1.4 สารละลาย D : ผสมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 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 เติมน้ำสารละลาย D ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที

2.2.3 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร หาค่าควบคุมให้ใช้น้ำกลั่น

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

2.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้น โปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.1 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการเตรียม standard protein curve

2.3.2 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ไปเทียบหาปริมาณ โปรตีนจากกราฟ standard protein curve

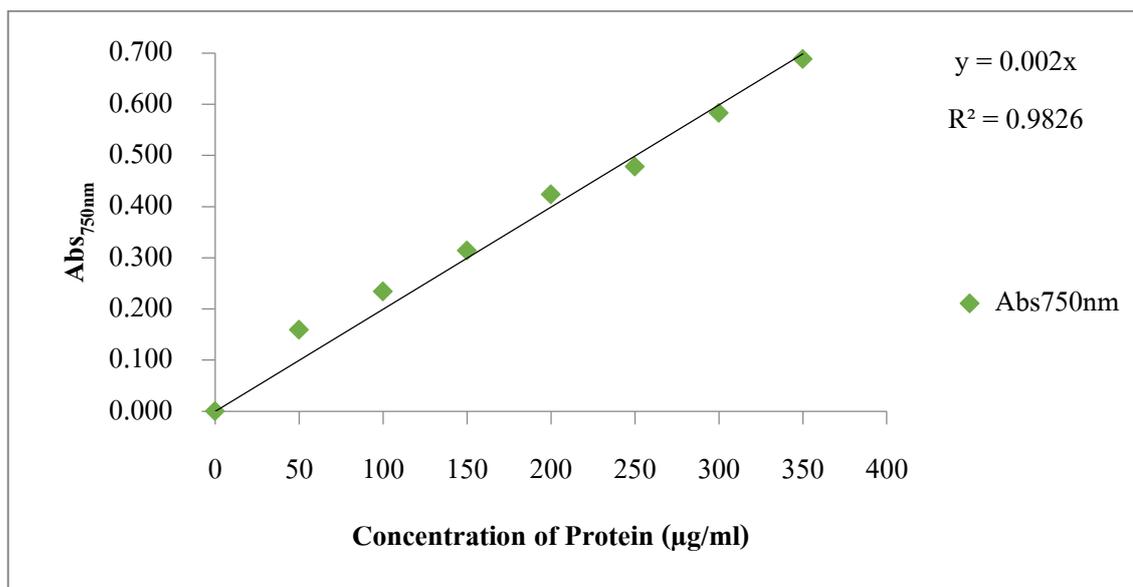
2.4 การคำนวณ

ความเข้มข้น โปรตีน (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 กราฟมาตรฐาน โปรตีน

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส พาโนส มอลโตไทรโอส และไอโซมอลโตไทรโอสด้วยวิธี HPLC

#### 3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องควบคุมระบบ (system controller) Shimadzu LC-3A
- 3.1.2 คอลัมน์ Lichrocart NH<sub>2</sub> (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 ฟรุคโตส มอลโตส พาโนส มอลโตไทรโอส และไอโซมอลโตไทรโอส เตรียมที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm ในน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรู 0.45 ไมครอน

3.2.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ เตรียมโดยสารละลายอะซิโตนไทรท์ (Acetonitrile) และน้ำกลั่น อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) กรองด้วยกระดาษกรองขนาดรู 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

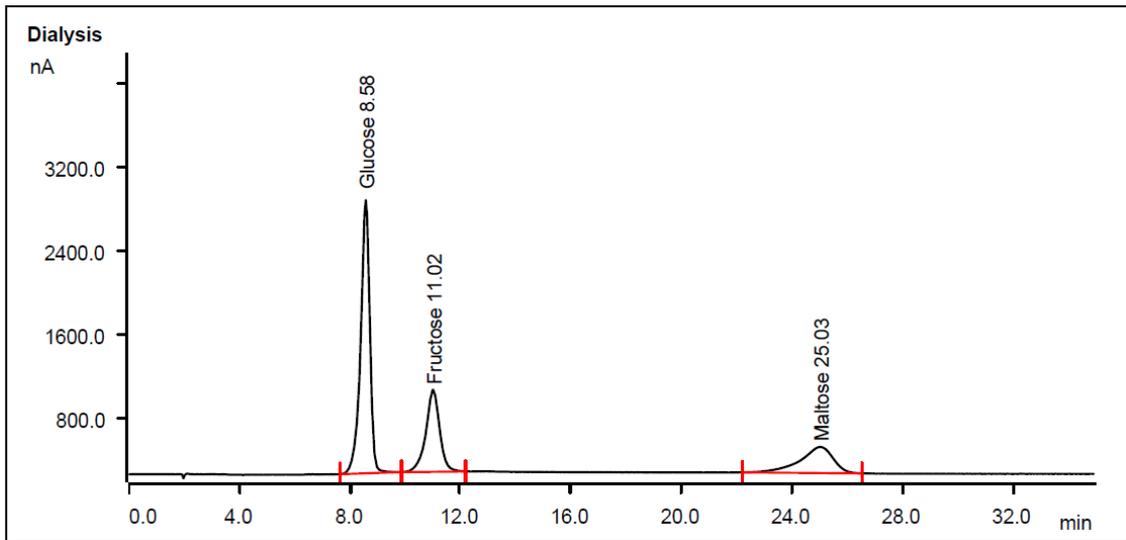
3.3.2 ตั้งค่าความยาวคลื่นของ LDC 4100 spectrophotometer monitor ให้เท่ากับ 254 นาโนเมตร

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

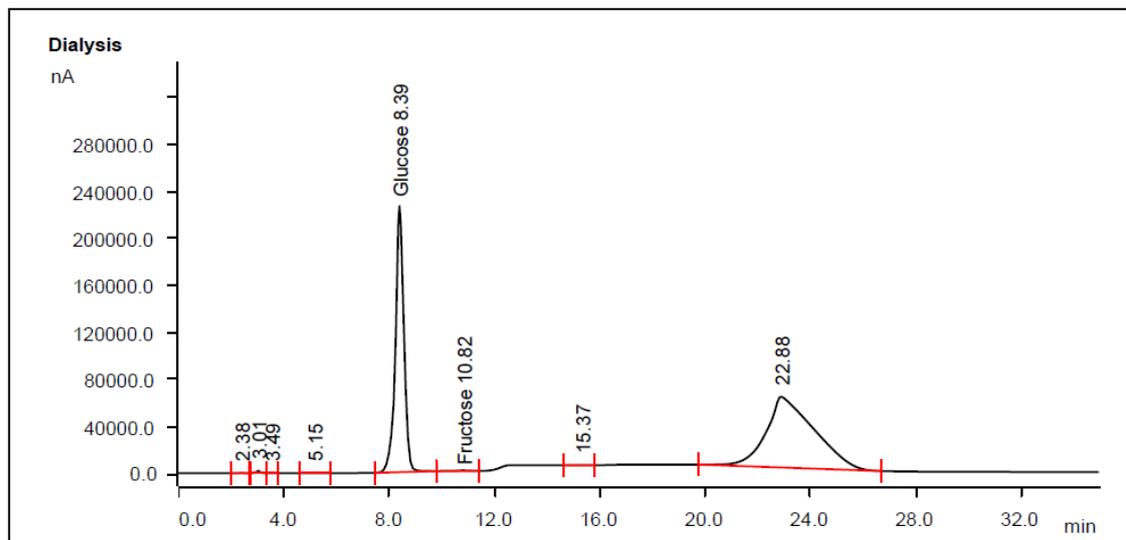
3.3.4 ฉีดสารตัวอย่างที่ได้เจือจางให้เหมาะสมที่ให้พื้นที่ใต้กราฟอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบระยะเวลาที่ถูกหน่วง (retention time) เพื่อหาชนิดของน้ำตาลกับเวลาที่ถูกหน่วงของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และนำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้มาทำการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลในตัวอย่าง

### 3.4 วิธีการคำนวณ

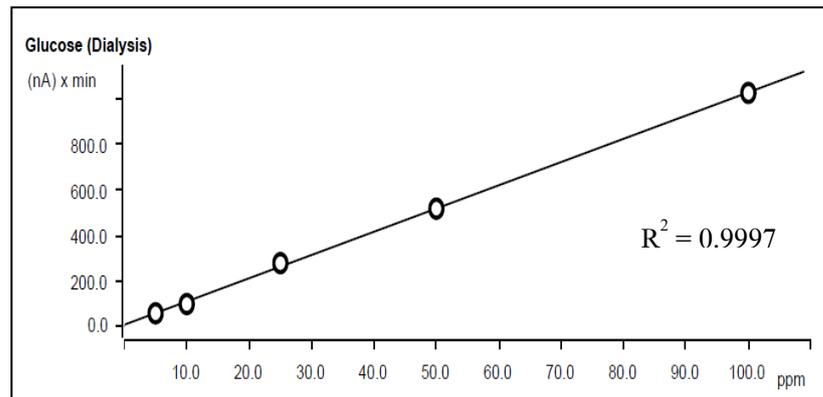
$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./มล.)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรม}) \times (\text{การเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



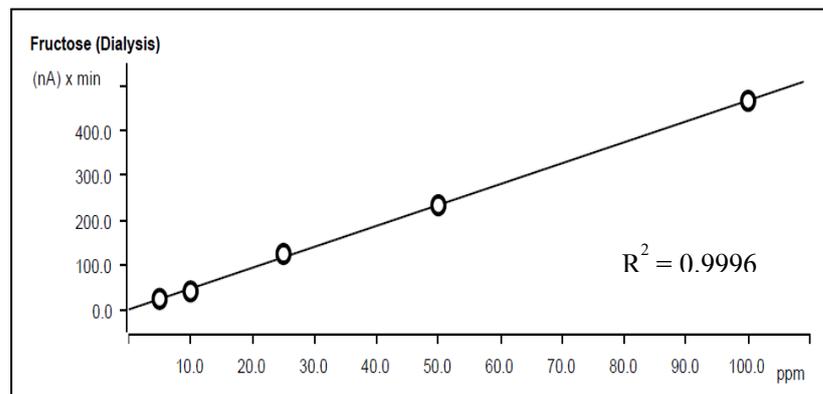
ภาพที่ ข-3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm



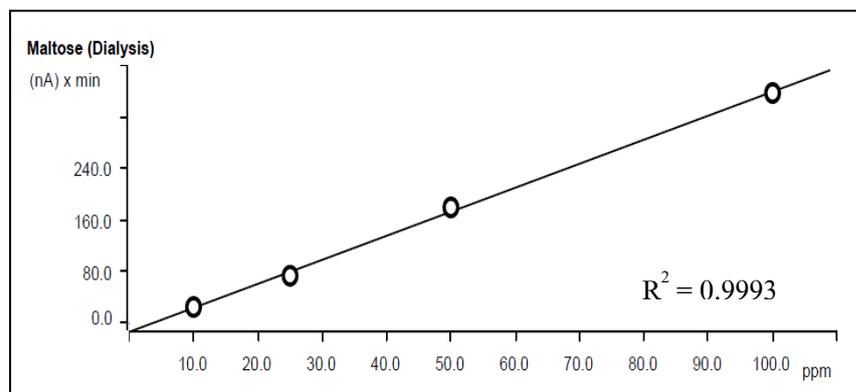
ภาพที่ ข-4 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm



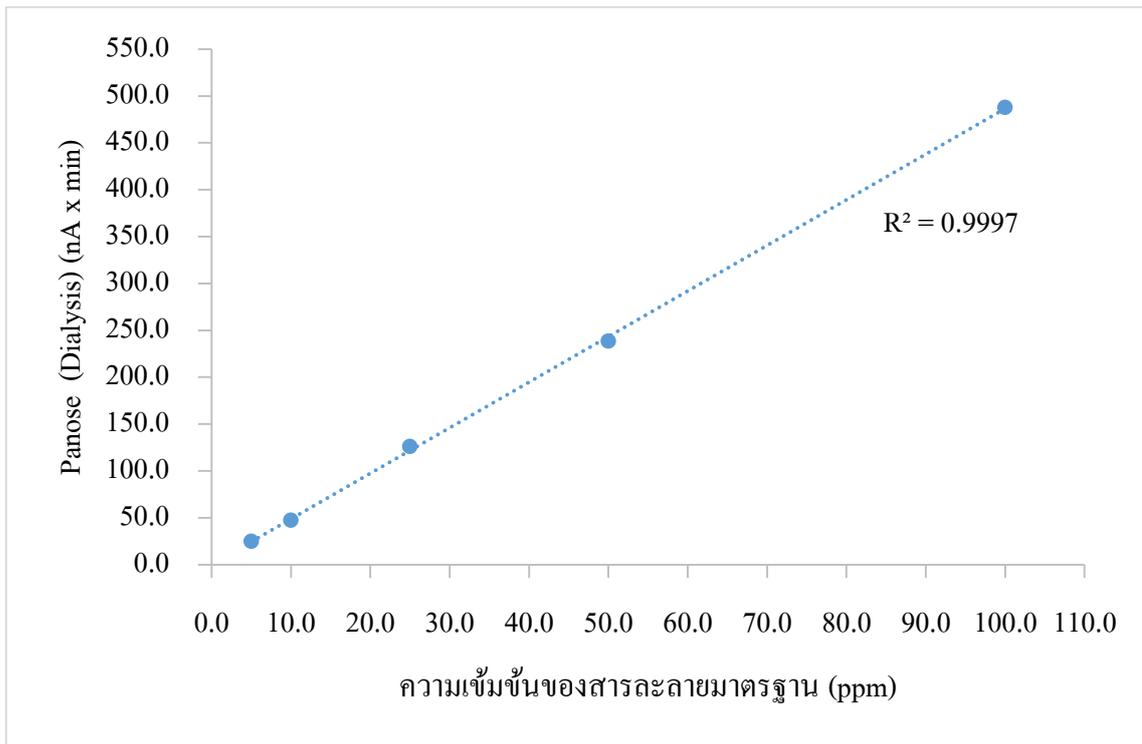
ภาพที่ ข-5 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



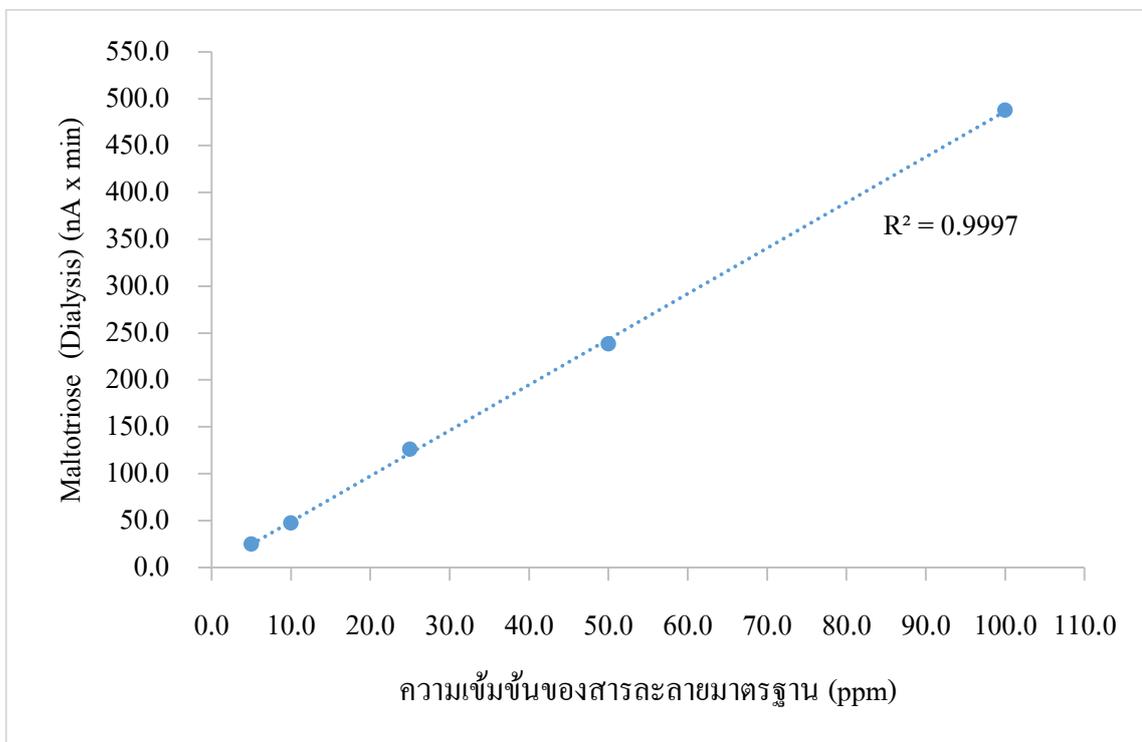
ภาพที่ ข-6 กราฟมาตรฐานฟรุคโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



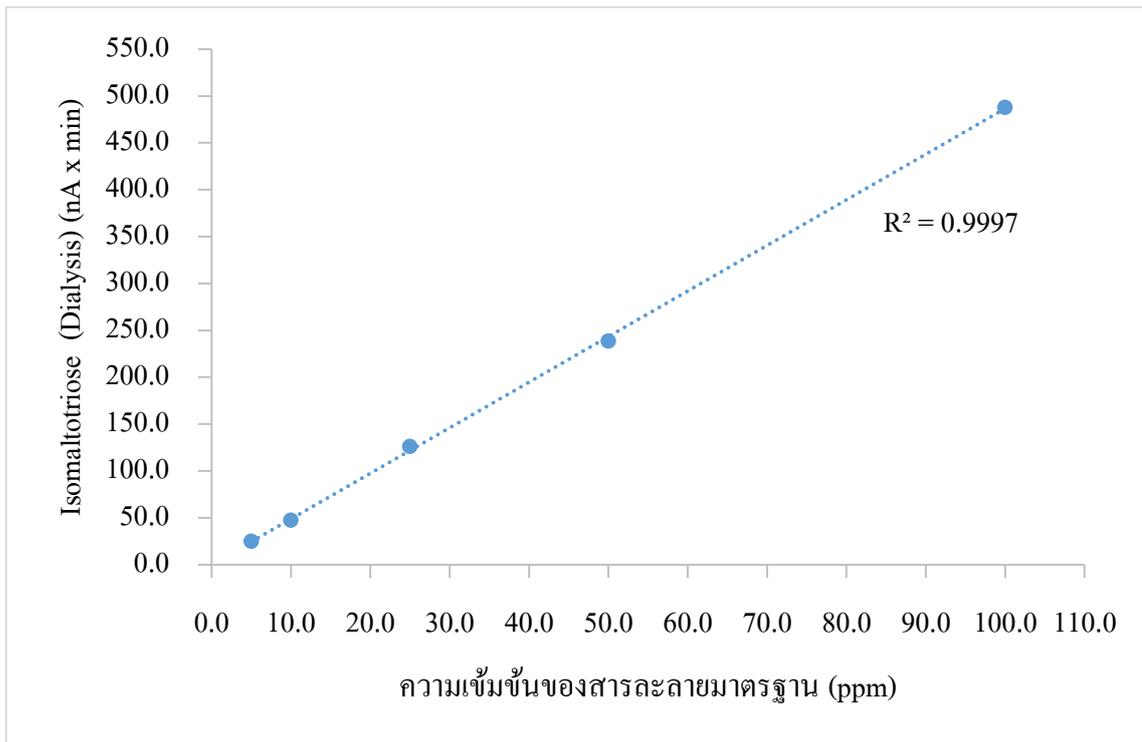
ภาพที่ ข-7 กราฟมาตรฐานมอลโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



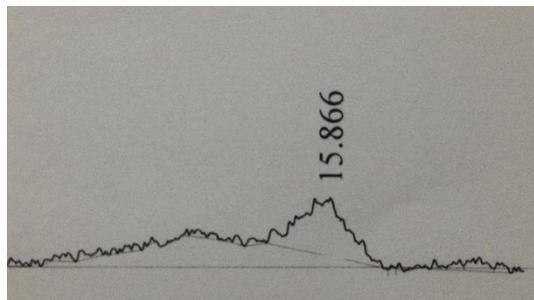
ภาพที่ ข-8 กราฟมาตรฐานพานอสที่มี ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



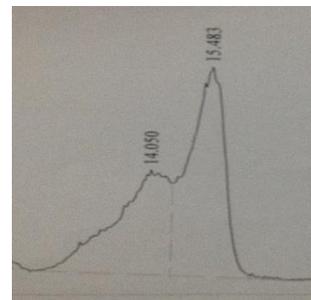
ภาพที่ ข-9 กราฟมาตรฐานมอลโตไตรโอสที่มี ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm



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



(A)



(B)

ภาพที่ ข-11 โครมาโทแกรมของน้ำตาลมอลโตไตรโอสมาตรฐาน (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 สารละลายเฟห์ลิง (Fehling's solution)

เตรียมสารละลายเฟห์ลิงเอ (Fehling's A solution) โดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate pentahydrate,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 69.28 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร และเตรียมสารละลายเฟห์ลิงบี (Fehling's B solution) ละลายโปแตสเซียมโซเดียมทาร์ทเรต (potassium sodium tartate tetrahydrate,  $\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 346 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide,  $\text{NaOH}$ ) 100 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำสารละลายเฟห์ลิงเอและบีผสมเข้าด้วยกันตั้งทิ้งไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง กรองก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์

##### 4.1.2 สารละลายมาตรฐานเดกซ์โทรส (standardization)

อบน้ำตาลเดกซ์โทรสบริสุทธิ์ (D-Glucose) จำนวนหนึ่งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดความชื้น (desiccator) จากนั้นชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไตเตรทกับสารละลายเฟห์ลิงตามวิธีการไตเตรทในข้อ 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

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

นำไปชั่งตามน้ำหนักที่คำนวณได้ละลายในน้ำกลั่น และถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน

#### 4.2.2 การไตเตรท

บรรจุสารละลายตัวอย่างลงในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดสารละลายเฟห์ลิง 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำสารละลายเฟห์ลิงตั้งบนเตาไฟฟ้าเมื่อสารละลายเฟห์ลิงเริ่มเดือด ใสสารละลายตัวอย่างประมาณ 20 มิลลิลิตร จากบิวเรตลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายเฟห์ลิงอยู่ 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. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) [22]

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำเชื่อมมอลโตสความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยนำสารละลายตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรอง Millipore ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์การแยกและหาปริมาณน้ำตาลมอลโตสซึ่งใช้ตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ CMP เป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และใช้น้ำกำจัดไอออนเป็นวัฏภาคไหล (mobile phase) ซึ่งต้องกรองด้วยกระดาษกรอง Millipore ขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อน ด้วยอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ Reflective index detector (RID) เป็นตัวตรวจวัด

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมอลโตสในสารละลายโดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยวิธีการและสภาวะเดียวกันกับตัวอย่าง