



# วิทยานิพนธ์

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินโดยวิธีทากูชิ

**OPTIMIZATION OF CYCLODEXTRIN PRODUCTION BY  
TAGUCHI METHOD**

นางสาวอรอุมา หล้าแหล่ง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



# ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(เทคโนโลยีชีวภาพ)

## ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินโดยวิธีทาคุชิ

Optimization of Cyclodextrin Production by Taguchi Method

นามผู้วิจัย นางสาวอรอุมา หล้าแหล่ง

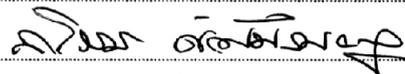
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ



( รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนานา, Ph.D. )

กรรมการ



( รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, Dr.rer.nat )

กรรมการ



( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, Ph.D. )

กรรมการ



( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจาอนันตกุล, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา



( รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว



( รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 23 เดือน เมษายน พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน โดยวิธีทากูชิ

Optimization of Cyclodextrin Production by Taguchi Method

โดย

นางสาวอรอุมา หล้าแหล่ง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2551

อรอุมา หล้าแหล่ง 2551: การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินโดยวิธีทากูชิ  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา  
เทคโนโลยีชีวภาพ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.  
140 หน้า

ไซโคลเด็กซ์ทรินมีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมเกษตร ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งเน้นที่จะพัฒนากรรมวิธีการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน โดยนำวิธีทากูชิมาใช้ในการออกแบบการทดลอง เริ่มจากการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase) โดยมีการแปรผัน 8 ปัจจัย แบบ  $L_{18}(2^1 \times 3^7)$  Orthogonal Array เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเปปโติน 15 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 300 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.5 และเวลาในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ 10 ชั่วโมง พบว่ามีอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินเท่ากับ 0.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ชั่วโมง และเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่า dextrinizing activity เท่ากับ 9.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อค่า dextrinizing activity และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน โดยการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ซึ่งมีการแปรผัน 4 ปัจจัย แบบ  $L_9$  Orthogonal Array เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์ 50 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต เวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 9 ชั่วโมง และอัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที พบว่าจากการทดลอง มีค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน 15.627 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ของไซโคลเด็กซ์ทริน 0.537 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน 1.736 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ซึ่งพบว่าถ้าใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่เวลา 3 ชั่วโมง จะทำให้ค่าอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน มีค่าสูงขึ้นเป็น 3.395 กรัมต่อชั่วโมง และพบว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นและอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อรอุมา หล้าแหล่ง  
1  
ลายมือชื่อนิติ

วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน  
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

10 / 4 / 2551

Onuma Lalaeng 2008: Optimization of Cyclodextrin Production by Taguchi Method. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Wirat Vanichsriratana, Ph.D. 140 pages.

Cyclodextrin is an important ingredient in many industries including food and beverage, cosmetic, pharmaceutical and agro-industry. This study employed Taguchi Method as an experimental design technique to improve cyclodextrin production. A design of 8 factor variables in the pattern of  $L_{18} (2^1 \times 3^7)$  Orthogonal Array was used to determine the optimal conditions and media compositions for producing of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase). The optimal condition were obtained as: 10%(v/v) inoculum size, 20 g/l cassava starch concentration, 15 g/l peptone, 10 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 3 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , shaking 300 rpm, initial pH 9.5 and operating time at 10 hour. At this condition, the cyclodextrin glycosyltransferase productivity and dextrinizing activity of 0.97 U/ml h and 9.75 U/ml. were obtained, respectively. All these factors except pH were found to have effect on productivity and dextrinizing activity significantly.

Optimal condition for cyclodextrin production were determined using Taguchi method in 4 factor variables and in the pattern of  $L_9 (3^4)$  Orthogonal Array. The optimal conditions were obtained as: 40 g/l cassava starch concentration, 50 U/g substrate CGTase, reaction time 9 h and agitation at 300 rpm. The obtained result of cyclodextrin concentration, yield and productivity were 15.627 g/l, 0.537 g/g and 1.736 g/l h., respectively. The shortening of reaction time 3 hour also increased cyclodextrin productivity to 3.395 g/l h. From the analysis of data, all these factors were found to have effect on cyclodextrin concentration, yield and productivity significantly.

Onuma lalaeng.

Student's signature

W. Vanichsriratana

Thesis Advisor's signature

10 / 4 / 2551

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนา ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้กรุณาเสียสละเวลาให้โอกาสและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยและการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ดร.สาโรจน์ สิริสันตนิยกุล และ ดร.ประมุข ภระกุกสุขสถิตย์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอกและผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.ธนะบุญย์ สัจจาอนันตกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาเพิ่มเติมในการวิจัย และ ดร.นันทวัน เทิดไทย ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และขอขอบคุณน้องสาว และหลานชายที่ได้ให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและคณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับความช่วยเหลือคำปรึกษากำลังใจ และมิตรภาพที่ดีในการศึกษาระดับปริญญาโท รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการ ที่อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2549 จากบัณฑิตวิทยาลัย ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอน และให้ความรู้ มาจนถึงปัจจุบัน

อรอุมา หล้าแหล่ง

มีนาคม 2551

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	33
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
สรุป	69
ข้อเสนอแนะ	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก ข้อมูลการทดลอง	78
ภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์	85
ภาคผนวก ค สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	92
ภาคผนวก ง จนพลาศาสตร์ของเอนไซม์ดิบ	92
ภาคผนวก จ โครมาโตแกรม HPLC	108
ภาคผนวก ฉ การนำเสนอผลงาน The 19 <sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology	132
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	140

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของไซโคลเด็กซ์ทริน	5
2	เปรียบเทียบคุณสมบัติของ CGTase จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	10
3	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองการผลิตเอนไซม์ CGTase	25
4	$L_{18} (2^1 \times 3^7)$ Orthogonal array	26
5	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	30
6	$L_9 (3^4)$ Orthogonal array	30
7	ค่าจลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อ <i>B.circulans</i> TISTR 907 ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ CGTase ของกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ	35
8	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ Dextrinizing activity ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase)	37
9	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการผลิตเชิงปริมาตรในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase)	38
10	การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อ Dextrinizing activity ของเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase)	40
11	การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)	41
12	ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase	43
13	ค่าประมาณและผลการยืนยันการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase (Starch Dextrinizing activity, DE) และค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase (Starch Dextrinizing Productivity, $Q_{DE/S}$ ) เมื่อแปรผันปัจจัยการทดลองในระดับที่เหมาะสม	44
14	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของ Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase	46

### สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ( $Q_{DE/S}$ )	47
16	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ในช่วง pH ต่าง ๆ	50
17	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ	51
18	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	54
19	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของผลได้ของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	54
20	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการผลิตเชิงปริมาตรของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	55
21	ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	58
22	การวิเคราะห์ห้อทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ ) และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	59
23	การประมาณค่าและการยืนยันผลการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน โดยพิจารณา 3 สภาวะ คือ ค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) ค่าอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) เมื่อแปรผันปัจจัยการทดลองในระดับที่เหมาะสม	61
24	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ )	62
25	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	63

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
26	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของอัตราการผลิตเชิงปริมาตร ( $Q_p$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	64
27	ค่าอัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตจากการยีสันผลการทดลอง	67
<b>ตารางผนวกที่</b>		
ก1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ <i>B. circulans</i> TISTR 907 กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase และปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรตที่ถูกใช้ไป	79
ก2	จลนพลศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ CGTase แบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ <i>B. circulans</i> TISTR 97 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_{18}$ )	80
ก3	ระดับของปัจจัยควบคุมในการผลิตเอนไซม์ CGTase แบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์ <i>B. circulans</i> TISTR 97 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_{18}$ )	81
ก4	จลนพลศาสตร์ของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์ CGTase จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_9$ )	82
ก5	การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์ CGTase จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_9$ ) ชุดที่ 1	83
ก6	การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์ CGTase จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_9$ ) ชุดที่ 2	84
ก7	การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์ CGTase จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_9$ ) ชุดที่ 3	84
ข1	สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานเฟอเรส (CGTase) แบบเบ็ดเสร็จ	86
ค1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง	96
ค2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโคลเด็กซ์ทริน	99

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
จ1	ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินที่เกิดขึ้นและความเข้มข้นของสับสเตรตที่ลดลงที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 0-15 ชั่วโมง	103
จ2	สับสเตรตที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาและอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา	104
จ3	การเปลี่ยนสับสเตรตเปลี่ยนเป็นไซโคลเด็กซ์ทรินที่ช่วงเวลาต่าง ๆ	106

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของ $\alpha$ -, $\beta$ -, และ $\gamma$ -ไซโคลเด็กซ์ทริน	4
2	แผนผังกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase แบบ transglycosylation	12
3	การเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในระบบเบ็ดเสร็จ	15
4	รูปแบบการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน	31
5	การเจริญเติบโตของเซลล์ <i>B.circulans</i> (TISTR 907) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโฮริโกชิ (1% starch) ที่ 37 องศาเซลเซียส	34
6	ค่า Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase และค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ ทรีตเมนต์ที่ทำการทดลอง ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)	39
7	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อ dextrinizing activity ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)	42
8	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตเชิงปริมาณในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)	42
9	ผลของกิจกรรมเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมในช่วง pH ต่าง ๆ	51
10	ผลของกิจกรรมสัมพัทธ์เอนไซม์ CGTase ที่มีความคงตัวในช่วง pH ต่าง ๆ	52
11	ผลของกิจกรรมเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ	52
12	ผลของกิจกรรมสัมพัทธ์เอนไซม์ CGTase ที่มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ	53
13	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นไซโคลเด็กซ์ทริน	56
14	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อผลได้ของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ )	56
15	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ )	57
16	อัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตจากการยืนยันผลการทดลองของพารามิเตอร์ ทั้ง 3 สภาวะ คือ ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ )	67

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า	
ค1	กราฟสารละลายมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง	98
ค2	กราฟสารละลายมาตรฐานของ แอลฟา-ไซโคลเด็คซ์ทริน	100
ค3	กราฟสารละลายมาตรฐานของ บีตา-ไซโคลเด็คซ์ทริน	100
ค4	กราฟสารละลายมาตรฐานของ แกมมา-ไซโคลเด็คซ์ทริน	101
จ1	ความเข้มข้นของไซโคลเด็คซ์ทรินที่เกิดขึ้นและความเข้มข้นของสับสเตรดที่ลดลง ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 0-15 ชั่วโมง	104
จ2	สับสเตรดที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาและอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา	105
จ3	%การเปลี่ยนสับสเตรดไปเป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ	106

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

### สัญลักษณ์

$C_p$	ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน (กรัมต่อลิตร)
$Y_{P/S}$	ผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน (กรัมต่อกรัม)
$Q_p$	อัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินเชิงปริมาตร (กรัมต่อชั่วโมง)
DE	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิตร)
$Q_{DE}$	อัตราการผลิต dextrinizing activity (หน่วยต่อมิลลิตร ชั่วโมง)
$q_s$	อัตราจำเพาะของการใช้แป้ง (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)
$Y_{X/S}$	ผลได้ของการเกิดเซลล์ (กรัมต่อกรัม)
$Y_{DE/S}$	ผลได้ของการเกิด dextrinizing activity (หน่วยต่อมิลลิตร กรัม)
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
S/N Ratio	อัตราส่วนที่ได้จากการเปลี่ยนรูปค่าตอบสนองของผลการทดลอง
dB	เป็นหน่วยของ S/N Ratio (เดซิเบล)
d.f.	องศาความอิสระ
ANOVA	การวิเคราะห์ความแปรปรวน(Analysis of variance)
DOE	การออกแบบการทดลอง (design of experiment)
OA	ตารางแผนการทดลองของทากูชิ
Taguchi Methods	วิธีการของทากูชิ คือมีแนวคิดที่จะรวมคุณภาพให้อยู่ในผลิตภัณฑ์
Larger the better type problem	ค่าความต้องการของค่าตอบสนองของผลิตภัณฑ์หรือกระบวนการที่ดีที่สุดจะต้องมีค่าให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้
Smaller the better type problem	ค่าความต้องการของค่าตอบสนองของผลิตภัณฑ์หรือกระบวนการที่ดีที่สุดจะต้องมีค่าให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้
Nominal is best	ค่าความต้องการของค่าตอบสนองของผลิตภัณฑ์หรือกระบวนการที่ดีที่สุดจะต้องมีค่าใกล้เคียงค่าที่กำหนดมากที่สุด

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

### ตัวอักษรกรีก

$\mu$	อัตราจำเพาะการเติบโต ( $h^{-1}$ )
$\alpha$ -CD	แอลฟา-ไซโคลเด็คซ์ทริน (g/l)
$\beta$ -CD	บีตา-ไซโคลเด็คซ์ทริน (g/l)
$\gamma$ -CD	แกมมา-ไซโคลเด็คซ์ทริน (g/l)

# การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินโดยวิธีทาคุชิ

## Optimization of Cyclodextrin Production by Taguchi Method

### คำนำ

ไซโคลเด็กซ์ทริน คือ วงแหวนโอลิโกแซคคาไรด์ โครงสร้างของโมเลกุลมีรูปร่างเป็นทรงกลมกลวง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนนอกและส่วนใน ส่วนนอกนั้นเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำ และส่วนในเป็นโพรงบริเวณตรงกลางเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โครงสร้างของโมเลกุลมีลักษณะเฉพาะเหมาะสำหรับการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลอื่น นอกจากนั้นไซโคลเด็กซ์ทรินยังมีคุณสมบัติในการ encapsulation ได้อีกด้วย โมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ทรินมีความเสถียร และสามารถละลายในสารละลายต่าง ๆ ได้

ไซโคลเด็กซ์ทรินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, EC 2.4.1.19) ซึ่ง CGTase เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะ สามารถสร้างได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด (Gawand and Patkar, 2001) เช่น *Klebsiella pneumoniae* AS-22, *Thermococcus* sp., *Paenibacillus* sp. F8 และ *Bacillus* sp. เอนไซม์นี้สามารถผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้จากแป้งหลายประเภท เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และแป้งชนิดอื่น ๆ แต่จากงานวิจัย พบว่าแป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งที่สามารถผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้มากกว่าแป้งชนิดอื่น ๆ (Ibrahim, 2004.)

แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบประเภทแป้งซึ่งได้จากพืชหัว ปัจจุบันประเทศไทยส่งมันสำปะหลังออกขายต่างประเทศได้เป็นจำนวนมาก แต่มักผลิตในรูปวัตถุดิบของแป้ง เช่น มันเส้น มันเม็ด และอาหารสัตว์ ซึ่งมีราคาต่ำและไม่มีคุณค่าเท่าที่ควร อีกประการหนึ่งแป้งมันสำปะหลังยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในอุตสาหกรรมได้ น่าจะเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมอุตสาหกรรมของประเทศ โดยนำวัตถุดิบที่มีในประเทศอยู่เป็นจำนวนมากเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูง ซึ่งการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน จากแป้งมันสำปะหลัง เกิดโดยอาศัยปฏิกิริยาจากเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) ซึ่งเอนไซม์ CGTase ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* TISTR 907 ซึ่งวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส

เฟอร์ส จากเชื้อ *B. circulans* โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนที่สองเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง โดยทั้งสองส่วนใช้การออกแบบการทดลองวิธีทากูชิเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

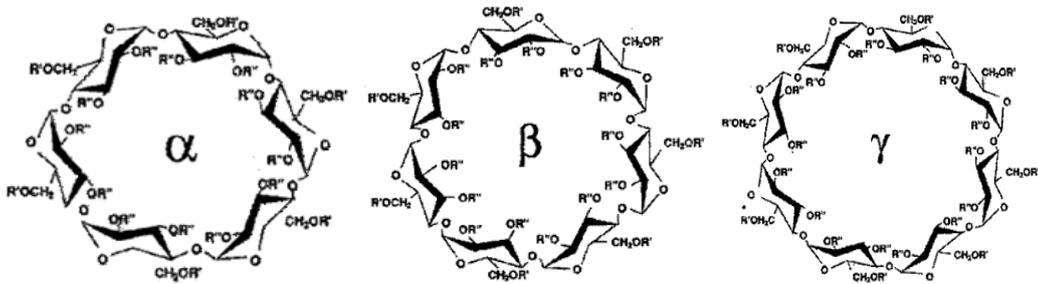
## วัตถุประสงค์

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) จากเชื้อ *B.circulans* TISTR 907 โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ
2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็คซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ

## การตรวจเอกสาร

### 1. ไซโคลเด็กซ์ทริน

ไซโคลเด็กซ์ทริน คือ วงแหวนโอลิโกแซ็กคาไรด์เชื่อมกันด้วยพันธะ แอลฟา 1-4 ไกลโคซิดิก (glycosidic bonds) ไซโคลเด็กซ์ทรินมีความแตกต่างกัน 3 ประเภท คือ แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทริน แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน ซึ่งแต่ละประเภทประกอบด้วย 6, 7 และ 8 โมเลกุลของกลูโคส ตามลำดับ ดังภาพที่ 1 เรารู้จักกันในชื่อ Cycloamylose, Cyclomaltoses และ Schardinger dextrin เป็นต้น



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ  $\alpha$ -,  $\beta$ -, และ  $\gamma$ -ไซโคลเด็กซ์ทริน

สำหรับรูปร่างของไซโคลเด็กซ์ทริน มีโครงสร้างซึ่งอยู่รอบนอกของวงแหวนเป็นส่วนที่ชอบน้ำ(hydroxyl groups) ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้ ส่วนโครงสร้างภายในวงแหวนเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ(CH groups) ซึ่งเป็นโครงสร้างวงแหวนแบบปิดเหมาะสำหรับการรวมตัวเป็น inclusion complex กับโมเลกุลของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์อื่น ๆ ผลที่ได้คือไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพสำหรับการ encapsulated สารอื่นที่ต้องการได้ (Loftsson, 2006) ซึ่งเมื่อ encapsulate สารอินทรีย์ที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำอื่น ๆ จะช่วยให้ละลายในน้ำได้ดียิ่งขึ้น จากคุณสมบัตินี้ทำให้เราสามารถนำไซโคลเด็กซ์ทรินมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและของใช้ส่วนตัว และสามารถประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรได้ ไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถสังเคราะห์ได้โดยเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของไซโคลเด็กซ์ทริน

Property	$\alpha$ - cyclodextrins	$\beta$ - cyclodextrins	$\gamma$ - cyclodextrins
Number of glucopyranose units	6	7	8
Molecular weight (g/mol)	972	1135	1297
Solubility in water at 25 °C (%w/v)	14.5	18.5	23.2
Outer diameter (A)(Å)	14.6	15.4	17.5
Inner diameter (B)(Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Height of torus (A <sup>0</sup> )	7.9	7.9	7.9
Approx. cavity volume (ml/mol)	174	262	427

ที่มา: Martin Del Valle (2004)

### 1.1 การประยุกต์ใช้ไซโคลเด็กซ์ทรินในอุตสาหกรรมอาหาร

ไซโคลเด็กซ์ทรินช่วยให้องค์ประกอบของรสชาติอาหารมีความคงตัวและควบคุมการปลดปล่อยกลิ่นรส โดยทั่วไปในส่วนของรสชาติและเครื่องเทศบริเวณผิวหนังอาหารจะไม่คงตัว ซึ่งสามารถนำคุณสมบัตินี้มาประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันได้ ไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถช่วยป้องกันการระเหยของวัตถุดิบต่าง ๆ และช่วยควบคุมการปลดปล่อยรสชาติ ในสารละลายที่เป็นของเหลวจะเกิดสมดุลไดนามิก ระหว่างโมเลกุลอิสระและสภาวะที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโมเลกุลภายนอกกับไซโคลเด็กซ์ทริน โมเลกุลภายนอกสามารถเข้าและออกจากโพรงของโมเลกุลไซโคลเด็กซ์ทรินได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนั้นก็ยังสามารถนำมาใช้ได้ ซึ่งในขั้นตอนแรกของการปลดปล่อยจะเกิดการละลายของสารประกอบเชิงซ้อนในบางส่วน ถ้าองค์ประกอบของโมเลกุลภายนอกโดนใช้หมดไปหรือโดนกำจัดออก สภาวะการเกิดสมดุลของสารประกอบเชิงซ้อนจะเปลี่ยนไป จึงทำให้ไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อน นำไปสู่การส่งเสริมให้เกิดการปลดปล่อยโมเลกุลภายนอกทั้งหมด ในการประยุกต์ใช้เกี่ยวกับรสชาติ มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการปลดปล่อยรสชาติของสารประกอบเชิงซ้อน ดังตัวอย่าง น้ำในน้ำลายจะเป็นตัวเจือจางสารประกอบเชิงซ้อนทำให้สารประกอบเชิงซ้อนเกิดการละลายและปลดปล่อยโมเลกุลภายนอก ส่วนประกอบของอาหารบางประเภทอาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ทรินหรือ

เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยรสชาติ ดังนั้นโมเลกุลภายนอกจะเกิดการแยกตัวออกและไม่สามารถกลับมาเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ทรินได้อีก

ช่วยในการปกปิดกลิ่นและรสชาติ ไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถช่วยปกปิดรสชาติขมหรือรสชาติไม่พึงประสงค์ของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำส้มและน้ำองุ่น การเกิดไฮโดรไลซิสของโปรตีนจากสัตว์และพืช สารสกัดจากต้นโสม เนื้อสัตว์ที่ยังไม่แห้ง สารสกัดจากเห็ดสำหรับพัฒนาารรสชาติ และกลิ่น มีการสันนิษฐานว่ารสชาติของสารอิสระเท่านั้นที่มีรสขมภายในและรสชาติไม่พึงประสงค์ แต่เมื่อสารเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ทรินจะทำให้สารมีรสชาติที่ดีขึ้น ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน เป็นไปได้ว่าส่วนที่ชอบน้ำจะห่อหุ้มส่วนที่ไม่ชอบน้ำซึ่งจะไปขัดขวางการผ่านทะลุของรสชาติไปยังต่อมรับรสบนลิ้น และส่วนที่ชอบน้ำจะช่วยนำสารนั้นออกจากตัวรับรสบริเวณเมมเบรนได้ง่ายยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ไซโคลเด็กซ์ทรินยังสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน โดยทั่วไป ไขมันและสารประกอบพวกน้ำมันสามารถเกิดอิมัลชันได้ แต่จะไม่คงตัว เนื่องจากไขมันและสารประกอบพวกน้ำมันจะไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน และเกิดการแยกชั้นจากโมเลกุลของน้ำและไขมัน ซึ่งไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถช่วยให้เกิดความคงตัวของสารประเภทอิมัลชันได้ โดยโมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับหยดของสารที่ต้องการ ทำให้สามารถเกิดการกลับไปรวมตัวกันได้อีกครั้ง โดยในกรณีนี้อิมัลชันของไขมันและสารประกอบพวกน้ำมันจะมีความคงตัวมากขึ้น ซึ่งคุณสมบัตินี้เหมาะสำหรับนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น น้ำสลัด มาของเนส วิปปิงครีม สารที่มีไขมันและน้ำมันเป็นส่วนประกอบ

การเกิดการคงตัวต่อแสงหรือออกซิเจนและมีความไวต่อสารต่าง ๆ องค์ประกอบของรสชาติหลาย ๆ ตัวจะมีความไวต่อแสง ความร้อน หรืออากาศ (ออกซิเจน) เมื่อเกิดการรวมตัวกับไซโคลเด็กซ์ทรินเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจะช่วยให้เกิดความคงตัวและช่วยเพิ่มอายุในการเก็บรักษาโดยจะช่วยลดกิจกรรมบริเวณผิวหน้าของสาร

## 1.2 การประยุกต์ใช้ไซโคลเด็กซ์ทรินในอุตสาหกรรมยา

ความสามารถในการละลายของยา โดยทั่วไปยาที่มีความบริสุทธิ์จะมีความสามารถในการละลายต่ำเป็นสาเหตุให้ยากต่อการนำไปใช้ ดังนั้น ไซโคลเด็กซ์ทรินจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของยา นอกจากนั้น พบว่าอนุพันธ์ของไซโคลเด็กซ์ทรินที่มีความเข้มข้นต่ำจะมีความสามารถในการละลายได้เหมือนกับอนุพันธ์ของไซโคลเด็กซ์ทรินที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับปริมาณประจุของไซโคลเด็กซ์ทริน

ความคงตัวของยา ไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นตัวช่วยให้ยาที่มีความคงตัว ซึ่งมีจุดเด่นแสดงให้เห็นหลายอย่าง ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น ไฮโดรลิซิส ออกซิเดชัน steric rearrangement racemization polymerization enzymatic และการสลายตัวของยา ซึ่งไซโคลเด็กซ์ทรินจะช่วยให้ตัวยามีความคงตัวและต้านทานต่อการสลายตัว นอกจากนั้นจะไม่มีผลต่อกิจกรรมของยา และคุณสมบัติของยาไม่เปลี่ยนแปลง

การป้องกันตัวยา โดยส่วนใหญ่ยาจะมีรสขมและมีกลิ่นระคายเคือง ซึ่งไซโคลเด็กซ์ทรินจะช่วยลดคุณสมบัติเหล่านี้ได้ โดยไซโคลเด็กซ์ทรินจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับยา ทำให้ลดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้ และช่วยลดรสขมในยา เช่น ควินิน ไฮโดรคลอไรด์ ลิเบอซิน (libexin) และสารสกัดจากจินเซ่น (ginseng extracts) เป็นต้น

## 1.3 การประยุกต์ใช้ไซโคลเด็กซ์ทรินในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

โดยทั่วไป เครื่องสำอางจะมีส่วนผสมของวัตถุดิบที่เป็นมัน ลีน (น้ำมัน จี๊ตติ้ง ไฮโดรคาร์บอน ไขมัน (long chain fatty acids) แอลกอฮอล์ (long chain alcohol) และเอสเทอร์ โพลีเมอร์ สารช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต แอนติออกซิเดนต์ วัตถุที่มีสี (รงควัตถุและสี) และวัตถุดิบที่มีกลิ่นหอม เป็นต้น เครื่องสำอางเหล่านี้สามารถซึมซาบเข้าไปในผิว ซึ่งมีส่วนช่วยฟื้นฟูเซลล์ผิว เช่น วิตามิน สอร์บอน และกรดอะมิโน ซึ่งจากรายงานพบว่า การซึมซาบของเครื่องสำอางจะช่วยรักษาและบำรุงผิวหน้า แต่กลิ่นหอมของวัตถุดิบเป็นสาเหตุให้เกิดอาการคันบริเวณผิวหนัง นอกจากนั้น เครื่องสำอางส่วนใหญ่จะละลายน้ำได้น้อย จึงต้องการสารลดแรงตึงผิว (surfactants) ที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลาย อย่างไรก็ตาม การใช้สารลดแรงตึงผิว มีข้อเสียหลายข้อ เช่น ทำให้เกิดอาการคันบริเวณผิวหนัง อาจมีสารอื่นเจือปน และเกิดโฟม ดังนั้นไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวได้ และช่วยทำให้เครื่องสำอางละลายได้ดีขึ้นและไม่มีอาการคันบริเวณ

ผิวหนัง และสามารถประยุกต์ใช้เครื่องสำอางได้ใน การควบคุมการปลดปล่อยกลิ่นหอม ป้องกัน กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ เพิ่มความคงตัวของเครื่องสำอาง ยับยั้งการเกิดโฟม และช่วยในการผลิตแป้ง จากวัตถุดิบพวกน้ำมัน

#### 1.4 การประยุกต์ใช้ไซโคลเด็กซ์ทรินในอุตสาหกรรมเกษตร

ในทางเกษตรกรรม จะประยุกต์ใช้กับสารเคมีที่มีความเข้มข้นน้อย ซึ่งไม่เป็นอันตราย ต่อสิ่งแวดล้อม แต่มีประสิทธิภาพสูง โมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ทรินใช้เป็นองค์ประกอบของสารที่ ใช้ในยาฆ่าแมลง มีความสามารถในการละลายตัวได้โดยธรรมชาติสูง และในทางเทคโนโลยีชีวภาพ ผลิตมาจากแป้ง การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไซโคลเด็กซ์ทรินและยาฆ่าแมลง ผลที่ได้มีดังนี้

1. การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไซโคลเด็กซ์ทริน ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของยาฆ่าแมลง ช่วยให้ยาฆ่าแมลงละลายได้อย่างรวดเร็วกว่า ยาฆ่าแมลงที่ไม่เกิด สารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ทริน จึงนำไปสู่การพัฒนาทางชีวภาพ

2. สารที่ระเหยหรือสารที่ตกผลึกบริสุทธิ์แล้ว สามารถเคลื่อนย้ายเข้ามาอยู่ในสภาวะ ของผงของแข็งและจะทำให้ความสามารถในการระเหยลดลง เมื่อนำมาเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ ไซโคลเด็กซ์ทริน

3. การละลายตัวของสาร ความไวต่อแสง ความร้อน ออกซิเจน และไออนสามารถคง ตัวอยู่ด้วยกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ทริน

#### 1.5 การประยุกต์ใช้ไซโคลเด็กซ์ทรินในอุตสาหกรรมสิ่งทอ

ในการพัฒนาที่สำคัญในอุตสาหกรรมสิ่งทอคือ การออกแบบเส้นใยและผืนผ้าที่มี นวัตกรรมใหม่ ๆ ทั้งทางด้านโครงสร้างและประโยชน์ใช้สอย กลิ่นบำบัด ซึ่งนิยมการทำ microencapsulation เป็นวิธีที่จะทำให้กลิ่นหอมสามารถเกาะติดอยู่บนผ้าได้คงทนมากกว่าวิธีอื่น จาก คุณสมบัติของไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถรวมตัวกับสารอินทรีย์ได้หลายชนิด ซึ่งมีโมเลกุลพอดีกับ ช่องว่างของไซโคลเด็กซ์ทริน ทำให้สารที่มีกลิ่นหอมหลายตัวสามารถรวมกับไซโคลเด็กซ์ทริน และ ทำให้สารนั้นคงความหอมได้นานขึ้น นอกจากนี้สารนี้ยังไม่ก่อให้เกิดโรคหรือความเป็นพิษ นอกจากนั้นการนำไซโคลเด็กซ์ทรินไปเกาะติดไว้บนสายโซ่พอลิเมอร์ของเซลลูโลสจะไม่มีผลต่อ

สมบัติการดูดซึมน้ำของเส้นใย และไซโคลเด็กซ์ทรินยังคงสามารถที่จะรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสารอื่น ๆ ได้อีกด้วย (นฤมล, 2004)

## 2. เอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)

เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน มีชื่ออย่างเป็นทางการว่า Cyclodextrin glycosyltransferase (1,4- $\alpha$ -D-glucopyranosyl transferase EC 2.4.1.19, CGTase) เป็นสมาชิกของกลุ่มเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ซึ่งเอนไซม์ CGTase จะคล้ายคลึงกับเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์ CGTase นี้ สามารถเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน 4 ปฏิกิริยาอย่างชัดเจน คือ ปฏิกิริยา Transglycosylation 3 แบบ คือ Disproportionation Cyclization และ Coupling และ ปฏิกิริยา Hydrolysis อีก 1 แบบ ซึ่งลักษณะของ Transglycosylation ทั้ง 3 แบบ แสดงให้เห็นถึงกลไกทางจลนพลศาสตร์ที่แตกต่างกัน (Kobayashi, 1996)

### 2.1 แหล่งผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)

มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถผลิต CGTase ได้ ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน จากคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่า CGTase เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะ และสามารถสร้างได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Klebsiella pneumoniae* AS-22, *Thermococcus* sp., *Paenibacillus* sp.F8, *Bacillus sterothermophilus* HR1 (Rahman, 2004), *B. circulans* (Charoenlap, 2004), *B. agaradhaerens* strain LS-3C (Martins, 2001), *B. macerans* (Tonkova, 1998.), *B. sterothermophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Brevibacterium* sp. และ *B. autolyticus* ซึ่ง *Bacillus* sp. จัดเป็นจีสหลักในการผลิตเอนไซม์ CGTase แต่ความหลากหลายของแบคทีเรีย ก็เป็นตัวกำหนดการผลิต CGTase ซึ่งจากงานวิจัยโดยส่วนใหญ่ พบว่า *B. circulans* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงที่สุด (โชติรส, 2530) เอนไซม์นี้สามารถผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้ โดยใช้แป้งหลายประเภท เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และแป้งชนิดอื่น ๆ

## 2.2. โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ CGTase

CGTase ประกอบด้วยกรดอะมิโน 686 ตัว ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ส่วนได้อย่างชัดเจน คือ A, B, C, D และ E โดยส่วน B จะแทรกอยู่ระหว่างส่วน A ทำให้แบ่งส่วน A ออกได้เป็น ส่วนย่อย A<sub>1</sub> และ A<sub>2</sub> (Keadsin, 2003) ส่วน A ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 300-400 ตัว ซึ่งส่วน A นี้ จะเป็นตำแหน่ง active site ส่วนนี้จะพบเช่นเดียวกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญ คือเป็นบริเวณที่จับกับสับสเตรต ส่วน B ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 44-133 ตัว จะเป็นส่วนที่ช่วยในการเข้าจับกับสับสเตรตเช่นเดียวกัน และส่วน C ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 100 ตัว และเป็นส่วนที่ค่อนข้างยาว เพราะเป็นส่วนที่จับกับมอลโตสหรือแป้งดิบ ส่วน D ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 90 ตัว ส่วนหน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด และส่วน E ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 110 ตัว ส่วน E เป็นส่วนที่ตอบสนองต่อการดูดซับเม็ดแป้งและช่วยในการนำทางให้สับสเตรตมาจับบริเวณ active site อย่างถูกต้อง (Charoenlap, *et al.*, 2004) CGTase จากธรรมชาติ โดยทั่วไปจะผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินทั้ง 3 ชนิด ในสัดส่วนที่ไม่เท่ากันและเอนไซม์ CGTase สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ alpha-CGTase beta-CGTase และ gamma-CGTase ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละประเภทสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้แตกต่างกัน และเอนไซม์แต่ละประเภทก็ส่งผลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินที่แตกต่างกันด้วย พบว่า beta-CGTase สามารถผลิตเบตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Keadsin, 2003)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ CGTase จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

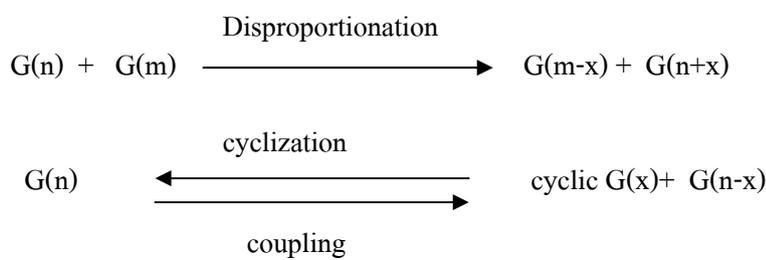
Origin	Optimum pH	Optimum temperature	pH stability	Major product
<i>Bacillus agaradhaerens</i>	9	55	5.0-11.4	$\beta$
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	5.5	50-55	6.0-9.0	$\beta$
<i>Bacillus firmus</i>	5.5-5.8	65	7.0-11.0	$\beta$
<i>Bacillus</i> sp.AL-6	7.0-10.0	60	5.0-8.0	$\gamma$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.5-9.0	35-50	6.0-9.0	$\alpha$
<i>Brevibacterium</i> sp.FERM BP-4537	8.0-9.0	45	6.0-8.0	$\gamma$

ที่มา: Charoenlap, *et al.* (2004 )

## 2.3 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase

CGTase สามารถเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบอย่างชัดเจน ปฏิกิริยา Intramolecular transglycosylation ประกอบด้วย 3 รูปแบบ คือ 1. ปฏิกิริยา Disproportionation, 2. ปฏิกิริยา Cyclization 3. ปฏิกิริยา Coupling และ 4. ปฏิกิริยา Hydrolysis ซึ่งลักษณะของปฏิกิริยาแบบ Intramolecular transglycosylation ของ CGTase จะมีลักษณะทางจลนพลศาสตร์ที่แตกต่างกัน (Kobayashi, 1996)

ปฏิกิริยา transglycosylation สามารถอธิบายได้ดังนี้



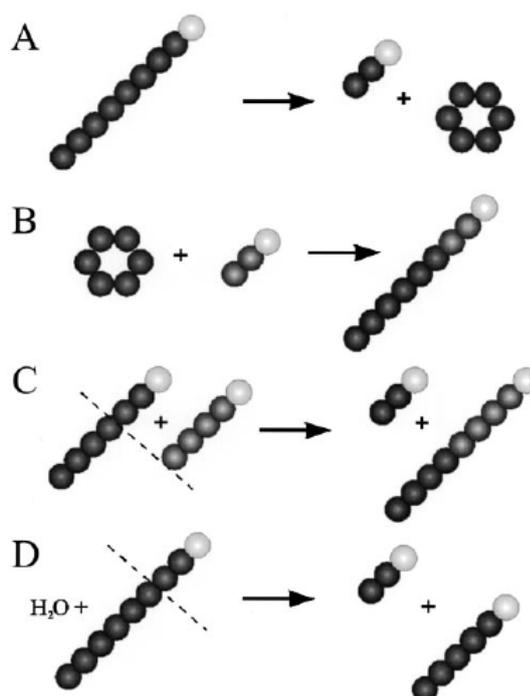
ซึ่ง  $G(n)$  คือ โอลิโกแซคคาไรด์ของตัวให้ (donor) และ  $G(m)$  คือ โอลิโกแซคคาไรด์ตัวรับ (accepter) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคส  $n$  และ  $m$  ตามลำดับ

ปฏิกิริยา Cyclization เป็นปฏิกิริยาการตัดสายของโอลิโกแซคคาไรด์ แล้วนำส่วนที่ตัดได้ไปปิดเป็นวงไซโคลเด็คซทริน โดยการนำส่วนที่เป็นปลาย Reducing end ย้ายไปยังส่วนที่เป็น Non-reducing end ภายในสายเดียวกัน และใช้สับสเตรตตั้งต้นเพียง 1 ตัว ในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้เป็นไปตามจลนพลศาสตร์ของ Michaelis-Menten (เมื่อใช้สับสเตรตที่มีสายสั้น ๆ)

ปฏิกิริยา Disproportionation เป็นปฏิกิริยาที่ตัดสายพันธะ  $\alpha$ -(1,4) glycosidic ของโอลิโกแซคคาไรด์อีกโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งโอลิโกแซคคาไรด์จะแยกออกจากกันและบริเวณปลาย reducing end ของน้ำตาล จะย้ายไปจับกับตัวรับ (acceptor) ของสับสเตรต ทำให้ได้สายของน้ำตาลที่เหมาะสมในการเกิด cyclization มากขึ้น ซึ่งปฏิกิริยา Disproportionation นี้ใช้สับสเตรตตั้งต้น 2 ตัว ในการเกิดปฏิกิริยา และเกิดผลิตภัณฑ์ 2 ตัว ผลที่ได้เป็นไปตามกลไกของ Substituted-Enzyme

ส่วนปฏิกิริยา Coupling เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยา Cyclization ซึ่งเป็นการแตกโมเลกุลของไซโคลเด็คซ์ทรินและนำไปต่อกับโอลิโกแซคคาไรด์ทำให้เกิดโอลิโกแซคคาไรด์สายใหม่ที่มีความยาวเพิ่มขึ้น และเป็นปฏิกิริยาที่ใช้สับสเตรตตั้งต้น 2 ตัว เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 1 ตัว ซึ่งกระบวนการเป็นไปตามกลไกของ Random Ternary Complex (Van der Veen, *et al.*, 2000)

ส่วนปฏิกิริยา Hydrolysis จะเกิดกิจกรรม (activity) เพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 2 แผนผังกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase แบบ transglycosylation

(A) Cyclization; (B) Coupling; (C) Disproportionation; และ (D) Hydrolysis. ในภาพวงกลมสีดำแทน โมเลกุลของกลูโคส และวงกลมสีขาวแทนปลายรีดิวซิงส์ของกลูโคส

ที่มา: Van der Veen, *et al.* (2000)

## 2.4 แป้งมันสำปะหลัง

แป้ง (Starch) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สำคัญที่สุดในธรรมชาติ เกิดจากโมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharide) หลาย ๆ หน่วย มาต่อกัน สูตรทั่วไปคือ  $(CH_2O)_n$  โดยปกติแป้งจะมีอยู่ในเมล็ดธัญพืช และลำต้นของพืช ลักษณะของแป้งจะเป็นเม็ดเล็ก พบได้จากแหล่งต่าง ๆ จากธรรมชาติ เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด จากพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง จากเมล็ดถั่วชนิดต่าง ๆ และจากผักและผลไม้ แป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรกคือ อะไมโลส ประกอบไปด้วยหน่วยของ กลูโคส D(+) ประมาณ 500-2,000 มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ Alpha,1-4 glycosidic linkage มีลักษณะเป็นเส้นตรง (Linear) น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2,000-500,000 โดยทั่วไปอะไมโลสจะไม่ละลายน้ำ แต่สามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำเป็นไมเซลล์ และเมื่อรวมกับ ไอโอดีนจะให้สีน้ำเงิน มีอยู่ประมาณ 20-25% ของแป้งทั้งหมด ส่วนที่สองคือ อะไมโลเพกติน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4-  $\alpha$ -D-glucose และ กิ่งของพันธะ 1,6- $\alpha$ -linked branches. โมเลกุลของอะไมโลเพกติน (Amylopectin) ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา ซึ่งเป็นสายสั้น ๆ มีโครงสร้างแตกแขนง โดยแต่ละแขนงจะประกอบไปด้วยหน่วยกลูโคสประมาณ 12 หน่วย แขนงของอะไมโลเพกติน จะยึดกันด้วยพันธะ Alpha, 1,4-glycosidic linkage แต่ละจุดที่มีการแตกแขนงจะยึดกันด้วยพันธะ  $\alpha$  1,6 glycosidic linkage โดยทั่วไปปกติอะไมโลเพกตินจะเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย  $\geq 1,000,000$  เมื่อรวมตัวกับไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง มีอยู่ประมาณ 75-80% ของแป้งทั้งหมด (Boonaeksap, *et al.*, 1999)

แป้งของมันสำปะหลังสกัดมาจากมันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทย ซึ่งมันสำปะหลังมีชื่อสามัญเป็นภาษาอังกฤษว่า Cassava แถบลาตินอเมริกาที่พูดภาษาสเปนเรียก yucca ภาษาโปรตุเกสในบราซิลเรียก manidca ส่วนชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและใช้อยู่ในปัจจุบันคือ *Manihot esculenta Crantz* (วรารุติ, 2528) เป็นพืชหัวที่มีราคาสูงและมีปริมาณโปรตีนต่ำ โดยเฉลี่ยแล้วมันสำปะหลังสดประกอบด้วยน้ำ 60-65 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแร่ธาตุกับวิตามินค่อนข้างต่ำ ซึ่งแป้งมันสำปะหลังสามารถใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้ เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังมีราคาถูกและเป็นวัตถุดิบที่หาง่ายในประเทศไทย และจากงานวิจัยอื่น ๆ พบว่าแป้งมันสำปะหลังเมื่อนำมาผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน แล้วได้ผลผลิตที่สูง แป้งมันสำปะหลังจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้ และเป็นตัวเหนียวทำให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการผลิตเอนไซม์ CGTase ด้วยเช่นกัน นอกจากนั้นการเพิ่มผลผลิตยังขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนสับสเตรตและขึ้นอยู่กับปัจจัยของสิ่งแวดล้อม เช่น ความเข้มข้นของแร่ธาตุในอาหารสามารถนำไปสู่การเพิ่มการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ และการ

ออกแบบสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะสามารถลดระยะเวลาในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้

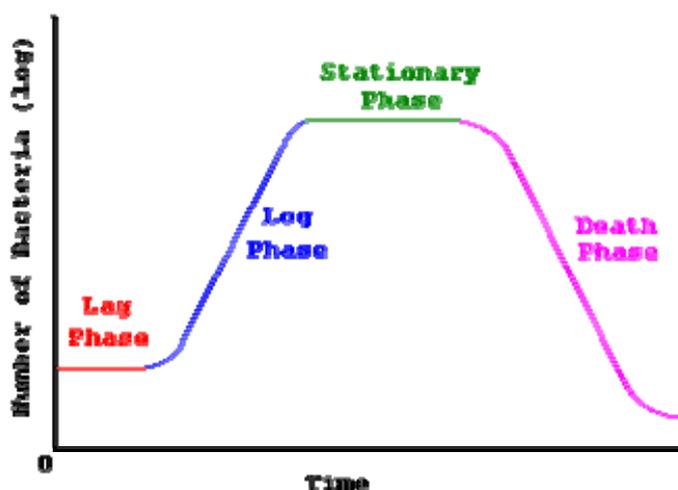
## 2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase

การผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ แหล่งอาหารคาร์บอน แหล่งอาหารไนโตรเจน อิทธิพลของความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอิทธิพลของอุณหภูมิในขณะเลี้ยงเชื้อ (สัตถาวร, 2524)

### 2.5.1 จลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก (Fermentation kinetics) เป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เราทราบธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น การเจริญของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของสับสเตรต การเกิดผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ รวมทั้งปริมาณของออกซิเจนที่ถูกดูดซึมไปใช้ โดยบ่งบอกปริมาณการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเลขอย่างแน่ชัด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก รวมทั้งระบบการหมักให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ที่มีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัดทำให้จุลินทรีย์มีรูปแบบการเจริญดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในระบบเบ็ดเสร็จ

เอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และจะมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิเหมาะสมอุณหภูมิหนึ่ง และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่านี้กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิ จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่ม แต่การเพิ่มของอุณหภูมิเพื่อทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มนั้นมีขีดจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างสามมิติที่สลับซับซ้อน และการที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้จะต้องมีโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสมในการทำงาน โดยมีการจัดเรียงตัวของหมู่อัลคิลของกรดอะมิโนต่าง ๆ โดยเฉพาะที่บริเวณ active site อย่างเหมาะสมที่จะให้สับสเตรตเข้าจับแล้วเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ขึ้นได้

### 2.5.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน  $[H^+]$  เอนไซม์ส่วนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ที่ pH ในช่วง 4-10 ถ้า pH ต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวรเพราะเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป เนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลายไป สำหรับเอนไซม์ทั่วไปจะทำงานได้ดีที่ pH ช่วงหนึ่ง การเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วงนี้จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเปลี่ยนไปอย่างทวนกลับได้ การเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วงนี้จะมีผลต่อการแตกตัวของหมู่อัลคิลของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ active site ของเอนไซม์ (ปราณี, 2547)

## 2.6 การหมักในอาหารเหลวแบบพลาสติกเขย่า (Shake flask fermentation)

การหมักในอาหารเหลวแบบพลาสติกเขย่าเป็นกระบวนการหมักที่มีความสำคัญและสะดวกต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลว เทคนิคพลาสติกเขย่าเป็นการหมักแบบมีออกซิเจนในระดับห้องปฏิบัติการ ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ก่อนที่จะนำมาขยายปริมาณการผลิตในถังหมักอีกครั้ง

การเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบตั้งแต่ 100-300 รอบต่อนาที (rpm) โดยความเร็วรอบอาจเปลี่ยนแปลงได้ การเขย่าอาหารเหลวจะเป็นแบบวนเป็นวงกลม โดยให้เชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่สัมผัสไปรอบ ๆ ด้านข้างของภาชนะบรรจุ จะไม่ใช้การเขย่าในลักษณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อถูกเหวี่ยงกลับไปกลับมา เพราะจะทำให้เชื้อกระฉอกได้ ภาชนะที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบนี้จะเป็น พลาสติกรูปชมพู่ (Erlenmeyer) เป็นส่วนใหญ่ ในกรณีที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์หรือกระบวนการอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกัน หรือเพื่อเร่งการเจริญของเซลล์ การเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีนี้มีผลดีคือช่วยให้เชื้อเจริญได้เร็วและสม่ำเสมอ

การผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเป็นกระบวนการหมักแบบครั้งคราว ใช้เวลาในการหมักตั้งแต่ 30-150 ชั่วโมง และในระหว่างกระบวนการผลิตจะต้องควบคุมให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อตลอดเวลา

การเตรียมกล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักจะต้องป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อน โดยถ่ายเชื้อจากหลอด lyophilized โดยตรงลงในพลาสติกอาหารเหลวก่อนที่จะถ่ายลงในพลาสติกกล้าเชื้อ อาหารที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อจะเหมือนกับอาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ และในการผลิตเอนไซม์จะใช้กล้าเชื้อ 10% ของปริมาณอาหารเหลวในพลาสติก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ที่เตรียมใน พลาสติกจะต้องประกอบด้วยแหล่งพลังงาน สารอาหาร และสารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน หรือสารอื่นที่ช่วยกระตุ้นการเจริญให้เร็วขึ้นเพื่อลดระยะของ lag phase ให้น้อยลงและเพิ่มอัตราการผลิตให้มากขึ้น

## 2.7 การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment, DOE)

การออกแบบการทดลองเป็นกลวิธีทางสถิติด้านหนึ่งที่ได้ว่ามีประสิทธิภาพมาก ๆ ในแง่ของการปรับปรุงคุณภาพและการเพิ่มผลผลิต ผลลัพธ์ของการออกแบบการทดลอง จะช่วยให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อผลลัพธ์ของกระบวนการว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ และถ้ามีความสัมพันธ์กัน มีความสัมพันธ์กันมากน้อยเพียงใด การออกแบบการทดลองเริ่มใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1920 (Roy, 2001) หลังจากนั้นก็มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการออกแบบการทดลองต่าง ๆ ซึ่งจัดได้ว่าการออกแบบการทดลอง เป็นเทคนิคในการหาค่าผลลัพธ์ที่ดีที่สุด และนำมาผสมผสานกับการใช้เทคนิคทางคณิตศาสตร์เพื่อหาค่าที่ดีที่สุดตามทฤษฎี (optimization theory) ให้ได้ค่าตัวแปรตอบสนองที่ดีที่สุด

## 2.8 การออกแบบการทดลองแบบทาคุชิ (Taguchi Experimental Design), 2001)

การออกแบบการทดลองแบบทาคุชิมีแนวความคิดมาจาก Dr. Genechi Taguchi ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ที่ได้อุทิศเวลาส่วนใหญ่ให้กับงานวิจัยทางการพัฒนาคุณภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ การออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิเริ่มนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1940 ซึ่งแรกเริ่มการออกแบบการทดลองโดยวิธีนี้นำมาใช้กับการออกแบบการทดลองผลิตอุปกรณ์การติดต่อสื่อสารทางอิเล็กทรอนิกส์ ได้แก่ โทรศัพท์ โทรสาร ซึ่งต่อมามีผู้นำแนวคิดนี้มาปรับใช้ในหลาย ๆ บริษัทในประเทศญี่ปุ่น ส่วนมากใช้ในงานทางด้านวิศวกรรม เนื่องจากวิธีนี้สามารถลดจำนวนสิ่งทดลอง ส่งผลให้ราคาการลงทุนต่ำ แต่ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการออกแบบการทดลองแบบทาคุชิมาประยุกต์ใช้ในหลาย ๆ ด้าน (Roy, 2001)

เทคนิคในการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้วิธีทาคุชิ มีวัตถุประสงค์เพื่อการลดจำนวนทริตเมนต์ดังกล่าวโดยการใช้รูปแบบการวางทริตเมนต์แบบ Orthogonal Array สำหรับ Outer Array และ Inner Array และนำข้อมูลของตัวแปรที่ต้องการทดลอง (Design variable) และตัวแปรรบกวน (Noise Variable) มาจัดวางลงในการทดลอง เพื่อคำนวณหาค่าการตอบสนองที่เหมาะสม ซึ่งวิธีการออกแบบการทดลองของทาคุชิสามารถวิเคราะห์ผลการทดลองโดย แปลงรูปแบบค่าการตอบสนอง (Response) อัตราส่วนหรือค่าที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของค่าตอบสนอง (Signal to Noise Ratio) จากนั้นจึงทำการเลือกตัวแปรออกแบบให้ตรงกับเป้าหมายมากที่สุด

ในการวิเคราะห์ผลโดยวิธีทากูชิ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งในการออกแบบการทดลอง(DOE) เป็นการกล่าวถึงการนำผลการทดลองมาวิเคราะห์เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้อง และหลังจากผลการทดลองเสร็จสิ้นจะได้ค่าที่ต้องการจากสถานะของสิ่งที่ทดลอง (Treatment) ที่กำหนดได้ (Roy, 2001)

ส่วนที่ 1 เป็นการวิเคราะห์อย่างง่าย ในส่วนนี้จะเป็นการวิเคราะห์ค่าที่ได้จากการคำนวณค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง และค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละปัจจัย การคำนวณในส่วนนี้จะรวมถึงการคำนวณค่าทางคณิตศาสตร์อย่างง่าย เพื่อช่วยสรุปผลได้ตรงตามวัตถุประสงค์ ในการคำนวณส่วนแรกของวิธีทากูชิสามารถอธิบาย ปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- อิทธิพลของปัจจัยหลัก
- สถานะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการทดลอง
- การคาดหมายถึงสถานะที่เหมาะสมในการทดลอง

ในการคำนวณและการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีทากูชิทั้งหมด สามารถคำนวณได้โดยใช้โปรแกรม Microsoft excell หรือใช้โปรแกรม Qualitek-4 Software (QT4) ในการวิเคราะห์ได้ เมื่อทำการวิเคราะห์โดยคอมพิวเตอร์ ในขั้นตอนการวิเคราะห์ในส่วนแรกนี้ ต้องทำการกำหนด QC (Quality Characteristic) ขึ้นมาก่อน ซึ่งค่านี้ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์กระบวนการ หรือระบบ ซึ่งการวัดค่านี้จะมาจากค่าตอบสนอง ผลการทดลอง output ของระบบ ซึ่ง QC แบ่งออกเป็น 3 แบบดังต่อไปนี้

QC = B Bigger is better คือค่าตอบสนองที่เราต้องการมีค่ามากที่สุด

QC = S Smaller is better คือค่าตอบสนองที่เราต้องการมีค่าน้อยกว่าค่าอื่น ๆ หรือตามทฤษฎีจะเท่ากับศูนย์ เช่น จำนวนของ cake คลื่นแสงที่รบกวนคลื่นโทรศัพท์ ปริมาณความเสียหายต่าง ๆ

QC = N Nominal is best ในการวัดประเภทนี้มักจะกำหนดค่าที่เราต้องการ หรือ กำหนด ระดับที่ต้องการทำให้สำเร็จ เราเรียกว่าเป้าหมาย (Target) หรือ nominal value สำหรับการเปรียบเทียบ คือ ผลการทดลองที่เบี่ยงเบนไปจากค่าเป้าหมายน้อยที่สุดจะดีที่สุด ซึ่งอาจจะเบี่ยงเบนไปทางบวกหรือลบนั้น จะขึ้นอยู่กับพิจารณาความสำคัญเป็นหลัก เช่น การวัดความต่างศักย์ของแบตเตอรี่ขนาด 9 โวลต์หรือ การวัดน้ำหนักของลูกเทนนิสหรือลูกฟุตบอล เป็นต้น

เมื่อเรากำหนด QC แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่า MSD ซึ่ง MSD คือ Mean Squared Deviation มี 2 ประเภท คือ

1. จะเป็นการเปรียบเทียบตัวอย่างเฉพาะของการทดลอง เปรียบเทียบจากการทดลองที่วัดได้โดยตรง

2. เป็นการเปรียบเทียบ MSD ของกลุ่มว่า target มีความผันแปรในระดับใด (ANOVA) ซึ่งการหาค่า MSD ประเภทแรกจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ (QC ของแต่ละประเภท)

$$QC = N ; MSD = [(y_1 - m)^2 + (y_2 - m)^2 + \dots + (y_n - m)^2] / n$$

$$QC = S ; MSD = [(y_1^2 + y_2^2 + \dots + y_n^2) / n]$$

$$QC = B ; MSD = [(1/y_1)^2 + (1/y_2)^2 + \dots + (1/y_n)^2] / n$$

ค่า MSD ที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการคำนวณหาค่า signal to noise ratio แสดงออกมาในรูปของการใส่  $\log_{10}$  ในค่า MSD ดังรูป

$$S/N = -10 \log_{10} MSD$$

ค่า S/N ratio ใช้สูตรการคำนวณเหมือนกันในแต่ละ QC สามารถคำนวณจากโปรแกรมสำเร็จรูป QT4 หรือสามารถคำนวณโดยใช้สูตรได้ เมื่อได้ค่า S/N ratio ของแต่ละ treatment นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟ เพื่อเปรียบเทียบค่า S/N ratio หาปัจจัยที่กำหนดจาก QC เช่น ค่าที่มากที่สุด คือค่าที่ดีที่สุด เราจึงเลือกอันดับที่สูงที่สุดของแต่ละปัจจัย เป็นสถานะที่เหมาะสม และนำระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยมาทำการทดลองใหม่อีกครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลองจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทากูชิ และวิเคราะห์ค่าที่ได้จากการทำนายผลของ Taguchi โดยใช้สูตร

$$Y_{\text{expected}} = (MSD)^{1/2}$$

ซึ่งจากการยืนยันผลการทดลอง จะต้องมามีค่าใกล้เคียงกับค่า  $Y_{\text{expected}}$  ที่คำนวณได้

ส่วนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาความแปรปรวนของผลการทดลอง การคำนวณในส่วนนี้ส่วนใหญ่สามารถทำการวิเคราะห์โดยคำนวณจากสูตรได้สะดวก รวมทั้งรูปแบบสี่เหลี่ยมจัตุรัส (Squaring) และการถอดรากที่สอง การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) จะเป็นการคำนวณเพื่อใช้ในการสนับสนุนผลการทดลอง ตรวจสอบความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย และสังเกตค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

1. ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของปัจจัยและปฏิสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนของผลการทดลอง
2. การทดสอบนัยสำคัญของปัจจัยและปฏิสัมพันธ์ระหว่างคอลัมน์ที่กำหนด
3. การหาช่วงความเชื่อมั่นของสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลอง
4. การหาช่วงความเชื่อมั่นภายในของปัจจัยหลักแต่ละปัจจัย
5. อธิบายปัจจัยที่ผิดพลาด ซึ่งประกอบด้วยอิทธิพลของปัจจัยทั้งหมด และปัจจัยที่ไม่รวมอยู่ในผลการทดลอง และผลของการทดลองที่ผิดพลาด

#### วิธีการคำนวณความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA)

วัตถุประสงค์หลักของการวิเคราะห์โดยใช้ตาราง ANOVA คือ ต้องการกำจัดผลจากความแปรปรวนของแต่ละปัจจัยออกไป ซึ่งมาจากผลของความแปรปรวนที่เรารับมาจากการทดลอง และสามารถอธิบายความแปรปรวนของแต่ละปัจจัย (หรือปฏิสัมพันธ์ระหว่างคอลัมน์) เพื่อให้ทราบว่าปัจจัยใด มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตมากกว่ากัน เป็นสาเหตุสำคัญของความแปรปรวนทั้งหมดที่สังเกตได้จากผลการทดลอง ซึ่งรูปแบบของความแปรปรวนบ่งบอกได้โดยการอธิบายในรูปแบบทางคณิตศาสตร์ ซึ่งสามารถนำค่าที่ได้ไปใช้ได้ หรืออาจพิจารณาได้จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

### 3. งานวิจัยอื่น ๆ

Vassileva *et al.* (2003) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *B.circulans* ATCC 21783 ในอาหารที่มีส่วนประกอบเหมือนกันและความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งต่างกัน (0.4, 0.8, 1.0, 2.0 และ 10 กรัมต่อลิตร) เพื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์ CGTase พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์คือ ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น 1.0-2.0 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 3.3 vvm ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 120-150 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ  $0.55-0.60 \text{ h}^{-1}$  เอนไซม์ CGTase จะสร้างในช่วงแรกของระยะ exponential phase (ชั่วโมงที่ 9) ค่าผลได้ของเอนไซม์ CGTase มีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณแป้งเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์

Rahman (2004) ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารสำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glucanotransferase จากเชื้อ *Bacillus sterothermophilus* HR 1 โดยใช้ Response surface methodology ออกแบบการทดลองรวมทั้งสิ้น 32 การทดลอง ซึ่งรวม 10 จุด และ 6 จุดที่จุดศูนย์กลาง ในการออกแบบการทดลองเลือกแป้งสาकु เปปโตนจากเคซีน  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $\text{CaCl}_2$  และ ค่า pH เริ่มต้น รวมตัวแปรอิสระในการศึกษาครั้งนี้ 5 ตัวแปร และมีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแหล่งเกลือแร่ที่ 50 องศาเซลเซียส ในพลาสติกเป็นเวลาานาน 24 ชั่วโมง และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการคำนวณหาค่าที่เหมาะสมของตัวแปร เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ CGTase ให้ได้มากที่สุด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งสาकु 16.02 กรัมต่อลิตร เปปโตนจากเคซีน 20 กรัมต่อลิตร  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.4 กรัมต่อลิตร  $\text{CaCl}_2$  0.2 กรัมต่อลิตร และค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.54 ซึ่งทำนายค่า กิจกรรมของ CGTase ได้เท่ากับ 14.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทำนายในห้องปฏิบัติการและค่ากิจกรรมของ CGTase ที่ได้มีค่าเท่ากับ 14.80 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Higuti *et al.* (2004) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase และผลของกิจกรรมของ CGTase อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย 2% ของสารละลายแป้ง(แป้งข้าวโพด) เปปโตน 0.5% สารสกัดจากยีสต์ 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1% และเอนไซม์ CGTase สามารถผลิตบีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินและแกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน ในระหว่างที่แบคทีเรียเจริญเติบโตด้วย

Prasad *et al.* (2005) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ Submerge Culture ของการผลิต Laccase โดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองของทากูชิ ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีสำหรับการศึกษา ปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรจำนวนมาก กับจำนวนการทดลองที่น้อย เพื่อนำไปสู่การประหยัดเวลา รวมทั้งต้นทุนสำหรับกระบวนการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการทดลองศึกษา 8 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (ยูเรีย) 2,5-ไซลิคีน(ตัวเหนี่ยวนำ) ราข้าวสาลี inoculum size pH ของ น้ำหมัก สารสกัดจากยีสต์ และแหล่งฟอสเฟต( $K_2HPO_4$ ) ซึ่งแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และใช้การ ออกแบบโดย Orthogonal Array L-18 ( $2^1 \times 3^7$ ) ในการทดลอง ผลได้ของ laccase จากการทดลองทั้ง 18 การทดลอง สภาวะที่เหมาะสมจะช่วยให้การผลิต laccase 32.9% (จาก 538.8-803.3 U) การวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีนี้ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิต Laccase และเข้าใจถึง ปัจจัยของตัวแปรแต่ละตัวได้ดียิ่งขึ้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Centrifuge); (Sigma 93176)
2. ตู้เป็ยเชื้อ (Microflow biological safety cabinet); (NUAIRE)
3. ตู้บ่มเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (Low temperature incubator); (Binder BD 115 E2)
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer); (Thermospectronic)
5. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (FR)
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง : (Satorius BL1500S)
7. ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (Hot air oven)
8. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (High Pressure Steam Sterilizer TOMY ES -315)
9. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave); (Panasonic: Japan)
10. โถดูดความชื้น (Desicator)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Group Digital Heat 15L)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
13. เครื่องเขย่า (Vortex); (Shaker : New Brunswick G25)
14. เครื่องเขย่าเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (Thermoshaker)
15. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo)
16. เครื่องวัดพีเอช (pH meter);(Schott CG842)
17. ตู้ดูดควัน (Hood);(Neo-Flow)
18. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็น (ตั้งระบุในแต่ละการทดลอง)
19. สารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็น (ตั้งระบุในแต่ละการทดลอง)

## วิธีการ

### จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus circulans* ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR) สายพันธุ์ 907 โดยเชื้อจะถูกเก็บอยู่ในอาหาร triptic soy agar

### การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อในพลาสติกโดยเชื้อ *B.circulans* (TISTR 907) จากหลอดเก็บลงในอาหารสูตรโฮริโกชิ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย สารละลายแป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร  $K_2HPO_4$  1 กรัมต่อลิตร  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัมต่อลิตร และ  $Na_2CO_3$  10 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 10.0 (ทำการละลายแป้งมันสำปะหลังด้วยเครื่องไมโครเวฟก่อน) หลังจากนั้นทำการฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD = 0.5$ ) (Illias *et al.*, 2002)

### การศึกษาการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase จากเชื้อ *B. circulans* TISTR 907

หลังจากการเตรียมกล้าเชื้อแล้ว ทำการย้ายกล้าเชื้อ (Inoculum) ลงในพลาสติก 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารสูตรโฮริโกชิ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่าความขุ่น น้ำหนักเซลล์แห้ง starch dextrinizing activity และปริมาณแป้งที่ถูกใช้ไป เพื่อหาค่าปัจจัยการเจริญเติบโตของเซลล์ทางจลนพลศาสตร์

## ศึกษาภาวะและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) ด้วยวิธีทากูชิ

### การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ

ในการศึกษาครั้งนี้พิจารณาปัจจัยและระดับของปัจจัยที่มีผลต่อค่า dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase และอัตราการผลิตเชิงปริมาตรของเอนไซม์ CGTase จำนวน 8 ปัจจัย ประกอบด้วย ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของ เปปโตน ความเข้มข้นของ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้นของ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ความเร็วรอบในการเขย่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร และ เวลาในการเก็บตัวอย่างเอนไซม์ โดยแต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งวิธีทากูชิจะแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนการทดลอง ปัจจัย และระดับของปัจจัย ในรูปของ Orthogonal Array (OA) โดยจะเห็นได้ว่าการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัยที่มี 2 ระดับ 1 ปัจจัย และปัจจัยที่มี 3 ระดับ 7 ปัจจัย สามารถใช้ OA แบบ  $L_{18}(2^1 \times 3^7)$  แสดงดังตารางที่ 4 ในการทดลองทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตรที่ใช้ในการทดลอง คือ 100 มิลลิลิตรในพลาสติกรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยบ่มบนเครื่องเขย่า หลังจากทำการทดลองทั้งหมดแล้ววิเคราะห์ข้อมูลและได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วทำการทดลองซ้ำภายใต้สภาวะดังกล่าว เพื่อยืนยันผลการทดลอง

ตารางที่ 3 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองการผลิตเอนไซม์ CGTase

ปัจจัย	ระดับ		
	1	2	3
1. (A) ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (% , v/v)	8	10	-
2. (B) ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (g/l)	10	15	20
3. (C) ความเข้มข้นของเปปโตน (g/l)	5	10	15
4. (D) ความเข้มข้น $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (g/l)	10	12.5	15
5. (E) ความเข้มข้น $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (g/l)	1	2	3
6. (F) อัตราการให้อากาศ (rpm)	200	250	300
7. (G) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	9	9.5	10
8. (H) เวลาในการผลิตเอนไซม์ (h)	10	12	14

ตารางที่ 4  $L_{18}(2^1 \times 3^7)$  Orthogonal Array

ชุดการทดลอง	ปัจจัย							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

ที่มา : Roy, *et al.* (2001)

## การเตรียมเอนไซม์ CGTase

ทำการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในขั้นต้น นำส่วนของอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อมา ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที (4,000×g) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใส (Supernatant) ไว้เป็น crude enzyme หลังจากนั้น นำ crude enzyme ที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาศึกษาลักษณะของเอนไซม์

### ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase

ทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase โดยได้ศึกษา 4 แบบ คือ พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum pH) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum temperature) ความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ (pH stability) และความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (temperature stability) โดยทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้คือ

### การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ในการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีระดับพีเอช ที่กำหนดดังต่อไปนี้ คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.067 โมลาร์ พีเอช 5.5, 6.0, 7.0 และ 8.0 และบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0, 9.0, 9.5, และ 10.0 และไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0 นำสารละลายของแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ผสมกับ crude enzyme CGTase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15×125 มิลลิตร เขย่าให้ผสมกันดี และบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที และหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยกรด HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิตร จากนั้นทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในภาคผนวก ก

### การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ นำสารละลายของแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ในบอเรตบัฟเฟอร์ (pH ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองข้างต้น) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมกับเอนไซม์ดิบ CGTase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15×125 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันดี และบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ ที่กำหนดดังต่อไปนี้ คือ 30, 40, 50, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลานาน 10 นาที และหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยกรด HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในภาคผนวก ก

### การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase (ซึ่งได้จากการทดลองข้างต้น) พบว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป และจะใช้อุณหภูมินี้ตลอดระยะเวลาการทดลอง ในการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ นำ crude enzyme CGTase มาใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีระดับพีเอชที่กำหนดดังต่อไปนี้ คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.067 โมลาร์ พีเอช 5.5, 6.0, 7.0 และ 8.0 และบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0, 9.0, 9.5, และ 10.0 และ ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำเอนไซม์มาปรับ pH ให้เท่ากับ pH เริ่มต้นอีกครั้ง นำเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase โดยใช้สารละลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH optimum) ผสมกับเอนไซม์ดิบ CGTase ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15×125 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันดี และบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลานาน 10 นาที และหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยกรด HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในภาคผนวก ก

### การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ในการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ นำ crude enzyme CGTase มาบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่กำหนดดังต่อไปนี้ คือ 30, 40, 50, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลานาน 30 นาที นำเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase โดยใช้สารละลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ผสมกับเอนไซม์ดิบ CGTase ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15×125 มิลลิเมตร เขย่าให้ผสมกันดี และบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลานาน 10 นาที และหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยกรด HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ HCl ปริมาตร 0.5 มิลลิตร จากนั้นทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในภาคผนวก ค

### ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินด้วยวิธีทากูชิ

#### การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ

ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีทากูชิแบบ Three Level Orthogonal Arrays (L-9) ออกแบบเพื่อศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของตัวแปร 4 ปัจจัย ซึ่งแต่ละปัจจัยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ โดยแบ่งออกเป็นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อกรัมสับสเตรต เวลาในการเกิดปฏิกิริยา และอัตราการเขย่า โดยในการทดลองทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตรที่ใช้ในการทดลอง คือ 600 มิลลิตร ในพลาสติกรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิตร โดยบ่มบนเครื่องเขย่า หลังจากทำการทดลองวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีทากูชิเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วทำการทดลองซ้ำภายใต้สภาวะดังกล่าว เพื่อยืนยันผลการทดลอง และประมาณค่าพารามิเตอร์ของผลได้ของการเกิดผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p,s}$ ) อัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) และความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตได้ ( $C_p$ ) เพื่อศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อค่าพารามิเตอร์ดังกล่าว

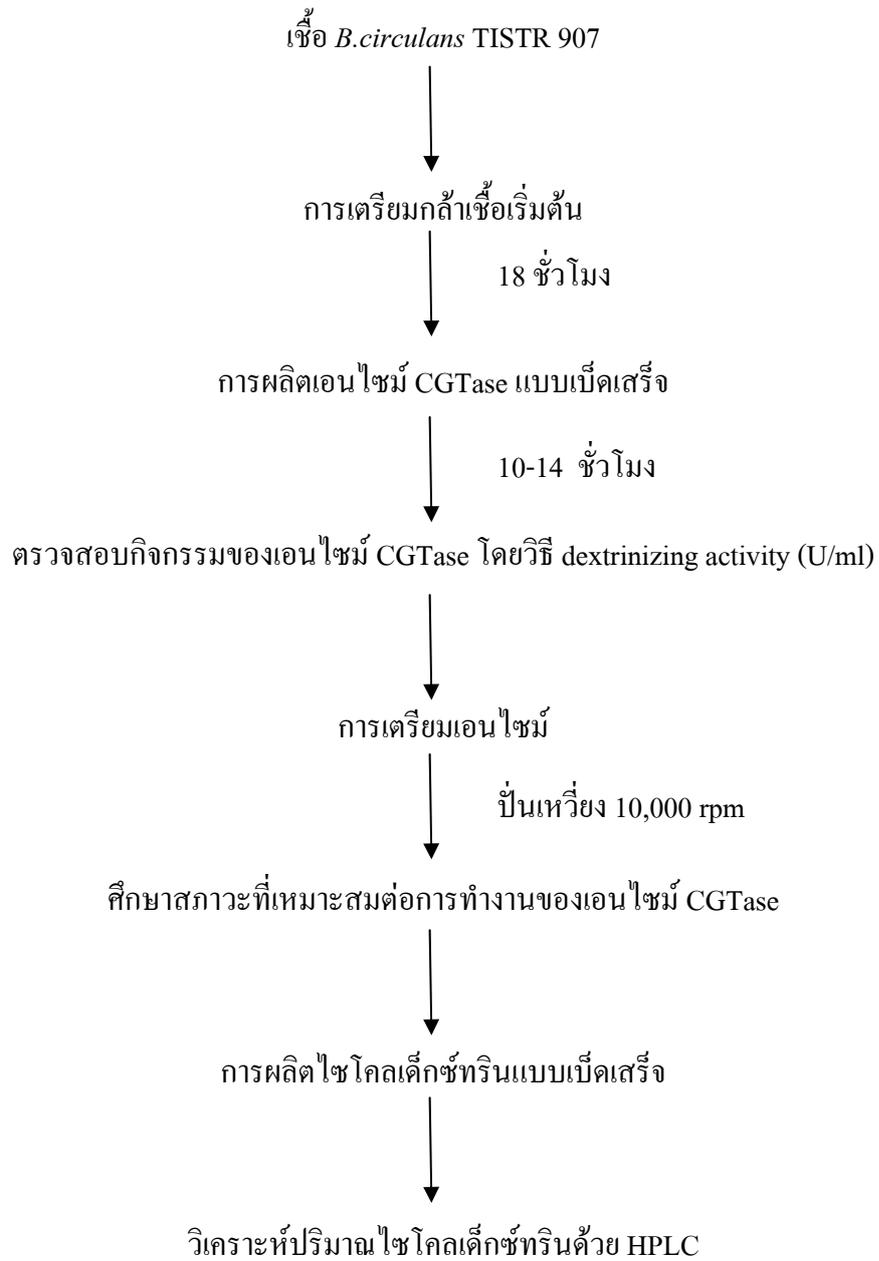
ตารางที่ 5 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

ปัจจัย	ระดับ		
	1	2	3
1. ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (g/l)	20	30	40
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase (U/g <sub>substrate</sub> )	10	30	50
3. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (h.)	3	6	9
4. อัตราการเขย่า (rpm)	100	200	300

ตารางที่ 6  $L_9(3^4)$  Orthogonal Array

การทดลอง	ปัจจัย			
	1	2	3	4
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

ที่มา: Roy, *et al.* (2001)



ภาพที่ 4 รูปแบบการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

## การวิเคราะห์ไซโคลเด็กซ์ทรินโดยวิธีทางโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง(HPLC) (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

### การเตรียมตัวอย่าง

นำสารละลายผสมที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ CGTase และแป้งมันสำปะหลัง มากำจัดอนุภาคปนเปื้อนออกโดยการกรองด้วยกระดาษกรองตัวอย่าง ขนาด 0.2 ไมครอนก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

### สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

เครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu LC- 3A คอลัมน์ที่ใช้คือ Lichrospher-NH<sub>2</sub> ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร ขนาดอนุภาค (Particle size) 5 ไมครอน สารละลายเฟสที่เคลื่อนที่ได้คือ สารละลายผสมระหว่าง Acetonitrile และ น้ำ ในอัตราส่วน 75 ต่อ 25 โดยปริมาตร อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2 มิลลิลิตร/นาที ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วย Refractive Index Detector เครื่องจะทำการแปลข้อมูลโดยระบบ OLC Analysis ออกมาเป็นพื้นที่ใต้กราฟ สำหรับการคำนวณค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน สารละลายมาตรฐานของไซโคลเด็กซ์ทริน แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทริน และแกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน ดังภาคผนวก ก

### สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

#### สถานที่การทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

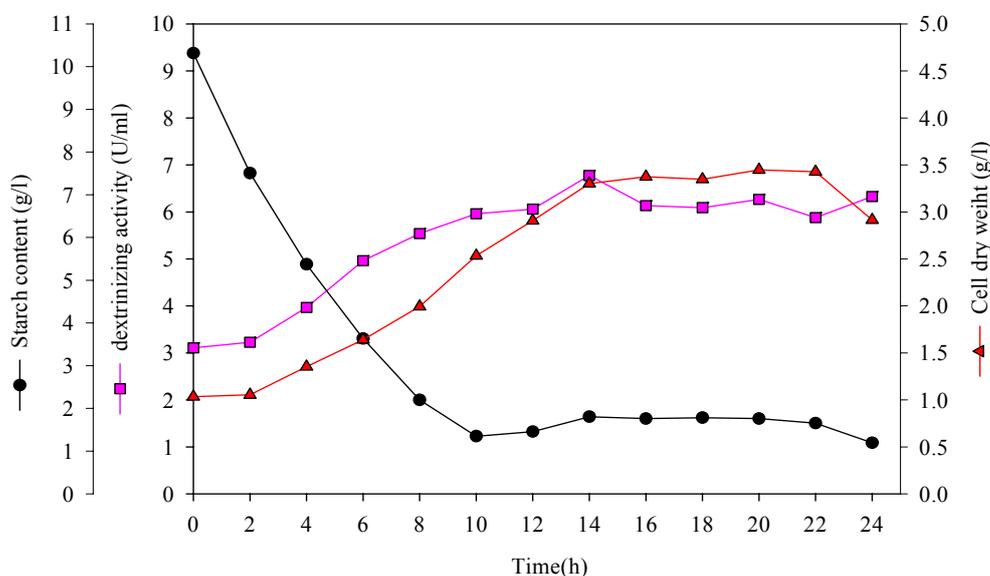
#### ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาการวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2548 ถึงสิ้นเดือน มกราคม พ.ศ. 2551

## ผลและวิจารณ์

### 1. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase จากเชื้อ *B. circulans* TISTR 907

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) โดยนำเชื้อ *B. circulans* TISTR 907 มาเลี้ยงในอาหารสูตรโฮริโกชิ (Horikoshi medium) ดังภาคผนวก ค ทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น มีค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ และมีการผลิตเอนไซม์ CGTase และความเข้มข้นของสับสเตรตก็ลดน้อยลง ดังภาพที่ 5 และจากรูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อสามารถคำนวณค่าไคเนติกส์พารามิเตอร์ของเชื้อ *B. circulans* TISTR 907 ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ CGTase ของกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จได้ ดังตารางที่ 5 ซึ่งในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* TISTR 907 ในอาหารสูตรโฮริโกชิ ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหรือเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแป้งมันสำปะหลังจะเป็นตัวเหนียวนาให้เชื้อ *Bacillus circulans* (TISTR 907) ผลิตเอนไซม์ CGTase (Tonkova, 1998) ซึ่งสามารถทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ได้โดยวิธี starch dextrinizing activity (Higuti, *et.al*, 2004) ทำการวิเคราะห์กิจกรรมทุก 2 ชั่วโมง เพื่อหาชั่วโมงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของเซลล์ *B. circulans* (TISTR 907) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโฮรีโกซี (1% starch) ที่ 37 องศาเซลเซียส ค่าพารามิเตอร์ที่วัดคือ starch dextrinizing activity (■) ความเข้มข้นแป้ง (●) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (▲ )

ในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus circulans* (TISTR 907) ในระบบการหมักแบบเปิดเสรี เพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase ในระหว่างชั่วโมงที่ 0-24 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase มีปริมาณเพิ่มขึ้น จนถึงช่วงที่จุลินทรีย์เข้าสู่ระยะ Stationary phase ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase มีค่าสูงและเริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 10 เป็นต้นไป จากรายงานของ Rosso และคณะ (2002) พบว่าเอนไซม์ CGTase ผลิตได้ดีเมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ Stationary phase และเมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโต พบว่าปริมาณของแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อจะค่อย ๆ ลดลง เป็นสัดส่วนผกผันกับปริมาณน้ำหนักเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 5 บ่งบอกได้ว่า จุลินทรีย์มีการใช้แป้งมันสำปะหลัง ในการผลิตเซลล์เอนไซม์และใช้เพื่อการเจริญเติบโต จากการศึกษาเวลาในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ จะเลือกช่วงเวลาที่อยู่ระยะเริ่มต้น Stationary phase มาใช้ในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ คือ ชั่วโมงที่ 10 12 และ 14 อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาชั่วโมงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่า จุดสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไม่แตกต่างจากจุดเริ่มต้นของระยะ Stationary phase จึงเลือกเก็บเกี่ยวเอนไซม์ในช่วงต้น Stationary phase เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการผลิตเอนไซม์ ทิพย์สุภา (2538) พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อและกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ขึ้นอยู่กับการปรับปรุงสูตรอาหาร

โสรีโกชิ ซึ่งทำการศึกษการเปลี่ยนชนิดของแป้งที่ใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตเอนไซม์ พบว่าแป้งข้าวส่างผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 7 ค่าจลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อ *B.circulans* TISTR 907 ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ CGTase ของกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ

พารามิเตอร์	ค่า
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ; $\mu$ (ชั่วโมง <sup>-1</sup> )	0.086
ผลได้ของเซลล์; $Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัม)	0.363
ผลได้ของ Starch dextrinizing; $Y_{DE/S}$ (หน่วยต่อมิลลิลิตร กรัม)	7.91
อัตราการผลิต dextrinizing activity จำเพาะ; $Q_{DE}$ (หน่วยต่อมิลลิลิตร ชั่วโมง)	0.37
อัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ; $q_s$ (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)	1.751

จากผลการทดลองในการศึกษา ค่าจลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อ *B.circulans* TISTR 907 ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ CGTase ของกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ พบว่าเชื้อ *B. circulans* มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.086 ต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้ของเซลล์ 0.363 กรัมต่อกรัม ผลได้ของ Starch dextrinizing 7.91 หน่วยต่อมิลลิลิตร กรัม อัตราการผลิต dextrinizing activity จำเพาะ 0.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ชั่วโมง และมีอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ 1.751 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง

## 2. สภาวะและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)

การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิเป็นวิธีการที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมได้อย่างประหยัดและรวดเร็ว เพราะเป็นวิธีการที่สามารถลดจำนวนการทดลองที่ใช้ โดยใช้ตารางการออกแบบการทดลองแบบทากูชิ (Rao, *et al.*, 2004) การทดลองศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยออกแบบการทดลองวิธีทากูชิ สามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของปัจจัย ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเบบโตน ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  อัตราการให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเวลาในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase ซึ่งสามารถอธิบายถึงผลของทั้งแปดปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรม dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase และอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ดังตารางที่ 8 และตารางที่ 9

ตารางที่ 8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ dextrinizing activity ในการผลิตเอนไซม์ CGTase

การทดลอง	DE ชุดที่ 1	DE ชุดที่ 2	DE ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N Ratio (dB)
1	5.550	5.677	5.401	5.543	0.138	14.869
2	5.232	5.340	5.230	5.267	0.063	14.431
3	6.539	6.865	6.353	6.586	0.259	16.359
4	4.430	3.016	4.994	4.146	1.019	11.739
5	7.125	7.295	6.408	6.943	0.471	16.789
6	6.798	6.190	6.389	6.459	0.310	16.184
7	7.657	7.883	6.985	7.509	0.467	17.476
8	6.986	7.320	7.343	7.216	0.200	17.160
9	7.562	7.567	7.458	7.529	0.061	17.534
10	6.022	6.483	6.714	6.407	0.352	16.106
11	6.828	6.186	7.497	6.837	0.656	16.617
12	6.707	8.256	6.252	7.072	1.051	16.814

ตารางที่ 8 (ต่อ)

การทดลอง	DE ชุดที่ 1	DE ชุดที่ 2	DE ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N Ratio (dB)
13	7.459	6.992	7.348	7.266	0.244	17.216
14	6.063	5.714	6.873	6.217	0.594	15.795
15	8.455	6.382	5.677	6.838	1.444	16.347
16	7.549	6.799	7.910	7.419	0.567	17.355
17	6.350	7.143	6.368	6.620	0.453	16.379
18	7.230	7.158	7.009	7.132	0.113	17.062

หมายเหตุ ระดับของแต่ละแฟกเตอร์ของแต่ละการทดลองแสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 4

ตารางที่ 9 สภาวะที่เหมาะสมของอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase

การทดลอง	Q <sub>DE</sub> ชุดที่ 1	Q <sub>DE</sub> ชุดที่ 2	Q <sub>DE</sub> ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N Ratio (dB)
1	0.555	0.568	0.54	0.554	0.014	-5.131
2	0.436	0.445	0.436	0.439	0.005	-7.153
3	0.467	0.49	0.454	0.47	0.018	-6.564
4	0.316	0.215	0.357	0.296	0.073	-11.184
5	0.713	0.73	0.641	0.694	0.047	-3.211
6	0.566	0.516	0.532	0.538	0.026	-5.400
7	0.547	0.563	0.499	0.536	0.033	-5.446
8	0.699	0.732	0.734	0.722	0.020	-2.840
9	0.630	0.631	0.622	0.627	0.005	-4.049
10	0.602	0.648	0.671	0.641	0.035	-3.894
11	0.569	0.515	0.625	0.57	0.055	-4.966

## ตารางที่ 9 (ต่อ)

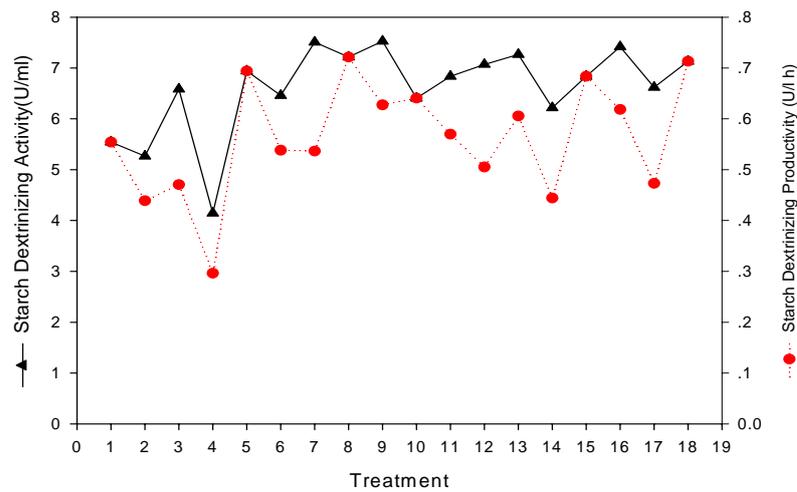
การทดลอง	Q <sub>DE</sub> ชุดที่ 1	Q <sub>DE</sub> ชุดที่ 2	Q <sub>DE</sub> ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N Ratio (dB)
12	0.479	0.590	0.447	0.505	0.075	-6.109
13	0.622	0.583	0.612	0.606	0.020	-4.367
14	0.433	0.408	0.491	0.444	0.042	-7.127
15	0.845	0.638	0.568	0.684	0.144	0.407
16	0.629	0.567	0.659	0.618	0.047	0.321
17	0.454	0.51	0.455	0.473	0.032	0.260
18	0.723	0.716	0.701	0.713	0.011	0.512

หมายเหตุ ระดับของแต่ละแฟกเตอร์ของแต่ละการทดลองแสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 4

หลักในการหาสถานะที่เหมาะสมโดยวิธีทากูชิแบ่งประเภทของการทดลองออกเป็น 3 ประเภท คือ The Smaller is better. The Norminal is the best และ The Bigger is better ซึ่งในการทดลองนี้จัดอยู่ในประเภท The Bigger is better เนื่องจากเราต้องการผลิตเอนไซม์ CGTase เพื่อให้มีค่า dextrinizing activity ที่สูงที่สุด

ค่า S/N-Ratio ของการทดลองนี้จะเป็นชนิด Larger is better type problem (ค่าตอบสนองที่มากที่สุดคือ ค่าที่ดีที่สุด) พบว่า ถ้าค่า S/N-Ratio เฉลี่ยของระดับของปัจจัยควบคุมใดมีค่ามาก พบว่าที่ระดับของปัจจัยควบคุมนั้นจะมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase มีค่าสูงที่สุด เช่น การจัดหน่วยทดลองในตารางที่ 4 จะสอดคล้องกับค่า S/N-Ratio เฉลี่ยของตารางที่ 8 จากการทดลองในหน่วยทดลองที่ 9 มีค่า S/N-Ratio เฉลี่ยมากที่สุด เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (B) คือ ระดับ 3 หรือความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร หมายความว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ที่ระดับ 3 เป็นองค์ประกอบของเงื่อนไขที่ใช้ในการทดลอง จะส่งผลให้เอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่ระดับ 1 และ 2 เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเงื่อนไขที่ใช้ในการทดลองของปัจจัยอื่น ๆ ก็พิจารณาเช่นเดียวกับปริมาณของแป้งมันสำปะหลัง

จากการทดลองทั้ง 18 ทริตเมนต์ เมื่อพิจารณาค่า dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase และค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase จากผลการทดลองในภาคผนวก ก3 สามารถนำมาเขียนกราฟ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase และค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ของแต่ละทริตเมนต์ได้ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ค่า dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase และค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ของทริตเมนต์ที่ทำการทดลอง ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

**ตารางที่ 10** การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อ dextrinizing activity ของเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)

ระดับ	ปัจจัย							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	15.838	15.866	15.793	15.581	16.334	16.437	16.526	16.389
2	16.632	15.678	16.195	16.631	15.641	15.444	16.154	16.556
3	-	17.161	16.717	16.493	16.730	16.824	16.025	15.760
ค่าต่ำสุด	15.838	15.678	15.793	15.581	15.641	15.444	16.025	15.760
ค่าสูงสุด	16.632	17.161	16.717	16.631	16.730	16.824	16.526	16.556
ค่าอิทธิพล	0.795	1.483	0.923	1.050	1.090	1.379	0.500	0.796
% ค่าอิทธิพล	9.912	18.495	11.517	13.105	13.594	17.207	6.242	9.928

หมายเหตุ A : inoculum size (%v\*v<sup>-1</sup>) E : ความเข้มข้น K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 B : ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง F : อัตราการให้อากาศ  
 C : ความเข้มข้นของเปปโติน G : ค่าความเป็นกรด-ด่าง  
 D : ความเข้มข้น Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> H : เวลาในการผลิตเอนไซม์

$$\% \text{ Main effect} = (\text{Main effect} \times 100) / \sum \text{all main effects}$$

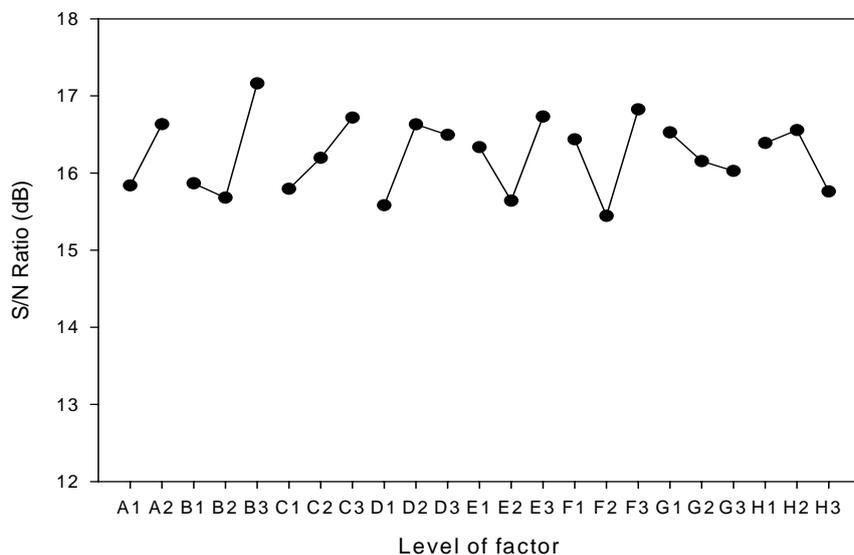
**ตารางที่ 11** การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)

ระดับ	ปัจจัย							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	-5.664	-5.636	-4.950	-4.111	-4.593	-3.931	-4.218	-2.360
2	-2.774	-5.147	-4.173	-4.296	-4.426	-5.483	-3.538	-4.269
3		-1.874	-3.534	-4.251	-3.638	-3.243	-4.902	-6.028
ค่าต่ำสุด	-5.664	-5.147	-4.950	-4.296	-4.593	-5.483	-4.902	-6.028
ค่าสูงสุด	-2.774	-1.874	-3.534	-4.111	-3.638	-3.243	-3.538	-2.360
ค่าอิทธิพล	2.891	3.273	1.417	0.185	0.956	2.239	1.364	3.669
% ค่าอิทธิพล	18.074	20.466	8.857	1.158	5.975	14.002	8.528	22.940

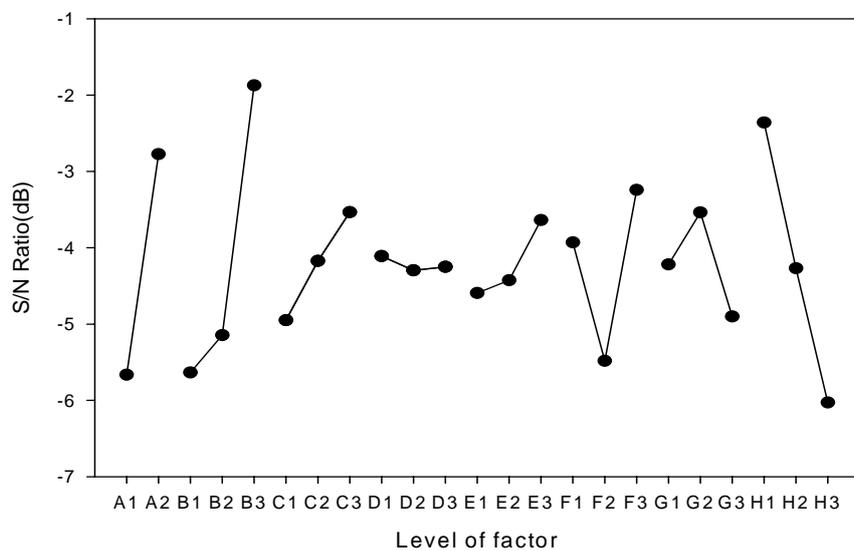
**หมายเหตุ**

A : inoculum size (% , v/v)	E : ความเข้มข้น $K_2HPO_4$
B : ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง	F : อัตราการให้อากาศ
C : ความเข้มข้นของเปปโตเน	G : ค่าความเป็นกรด-ด่าง
D : ความเข้มข้น $Na_2CO_3$	H : เวลาในการผลิตเอนไซม์

$$\% \text{ Main effect} = (\text{Main effect} \times 100) / \sum \text{all main effect}$$



ภาพที่ 7 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อ dextrinizing activity ในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)



ภาพที่ 8 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตเชิงปริมาณในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)

ตารางที่ 12 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase

ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	ระดับที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase	
	dextrinizing activity (U/ml)	อัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase (U/ml/h)
1. ปริมาณ inoculum size (%v/v)	10	10
2. ความเข้มข้นของสับสเตรต (g/l)	20	20
3. ความเข้มข้นของเปปโตน (g/l)	15	15
4. ความเข้มข้น Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g/l)	12.5	10
5. ความเข้มข้น K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	3	3
6. อัตราการให้อากาศ (rpm)	300	300
7. ค่าความเป็นกรด-ด่าง	9	9.5
8. เวลาในการผลิตเอนไซม์ (ชั่วโมง)	12	10

จากภาพที่ 7 และ 8 แสดงระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่า dextrinizing activity และอัตราการผลิตเชิงปริมาณในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) เปรียบเทียบเป็น 2 สภาวะดังตารางที่ 12 เมื่อพิจารณาระดับของปัจจัยที่มีผลต่อค่า dextrinizing activity และอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase มีเพียง 3 ระดับที่แตกต่างกันคือ ความเข้มข้น Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเวลาในการผลิตเอนไซม์ (ชั่วโมง) นำทั้งสองสภาวะมาประมาณค่าและทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองดังตารางที่ 13

**ตารางที่ 13** ค่าประมาณและผลการขึ้นชั้นการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase (dextrinizing activity, DE) และค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase (starch dextrinizing productivity,  $Q_{DE}$ ) เมื่อแปรผันปัจจัยการทดลองในระดับที่เหมาะสม

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสมของ DE		สภาวะที่เหมาะสมของ $Q_{DE}$	
	ค่าประมาณ	ผลการทดลองจริง	ค่าประมาณ	ผลการทดลองจริง
DE	10.23	8.54	8.45	9.75
$Q_{DE}$	1.22	0.71	1.7	0.97

จากการทดลองพบว่าจากสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 12 เมื่อนำมาทำการขึ้นชั้นผลการทดลอง โดยพิจารณาจากค่า dextrinizing activity ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13 คือมีค่า dextrinizing activity เท่ากับ 8.54 หน่วยต่อมิลลิลิตรและมีค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase เท่ากับ 0.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาจากค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase มีค่า dextrinizing activity เท่ากับ 9.75 หน่วยต่อมิลลิลิตรและมีค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase เท่ากับ 0.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ชั่วโมง ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า dextrinizing activity จากสภาวะของ dextrinizing activity จากการทดลองจริงมีค่า 8.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าสภาวะของอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาจากสภาวะที่ทำการขึ้นชั้นผลการทดลอง พบว่ามีระดับของปัจจัยที่แตกต่างกัน 3 ปัจจัย คือ  $Na_2CO_3$  พีเอช และเวลาในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งปัจจัยของพีเอชเมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแล้ว พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก  $Na_2CO_3$  และเวลาในการผลิตเอนไซม์ เพราะปัจจัย  $Na_2CO_3$  และเวลาในการผลิตเอนไซม์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 100% และ 99.71% ตามลำดับ จากผลการขึ้นชั้นการทดลอง พบว่า  $Na_2CO_3$  ที่ระดับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์ที่ 10 ชั่วโมง เพราะในการวาง ทริตเมนต์ตามรูปแบบทากูชิ พบว่า มีการ combination ระหว่างระดับของปัจจัย ฉะนั้น สภาวะที่ได้จากการขึ้นชั้นผลการทดลอง จึงส่งผลให้ dextrinizing activity มีค่าสูงขึ้นได้ ซึ่งจากการขึ้นชั้นผลการทดลองพบว่า สภาวะที่พิจารณาจากค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ให้ค่ากิจกรรมของ CGTase ที่มากที่สุด และอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ที่สูงที่สุด คือ 0.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ชั่วโมง จึงเลือกสภาวะดังกล่าว มาใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase ในการทดลองต่อไป

จากค่าประมาณซึ่งคำนวณโดยวิธีทากูชิในภาคผนวก ข สมการที่ 14 สภาวะที่เหมาะสม เมื่อพิจารณาจากค่า dextrinizing activity มีค่าคลาดเคลื่อนจากค่าประมาณและผลการทดลองจริงเท่ากับ 16.52% และเมื่อพิจารณาค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase มีค่าคลาดเคลื่อนจากค่าประมาณและผลการทดลองจริงเท่ากับ 41.83% และจากสภาวะที่เหมาะสมของ starch dextrinizing productivity,  $Q_{DE}$  เมื่อพิจารณาค่า dextrinizing activity มีค่าความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองจริงและค่าประมาณเท่ากับ 15.38% และเมื่อพิจารณาค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase มีค่าคลาดเคลื่อนของผลการทดลองจริงและค่าประมาณเท่ากับ 42.94%

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของ dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase

Factor	DOF	SS	MS	F	S'	Percent contribution	Confidence (%)	Significant
A	1	1.181	1.181	26.141	1.136	8.712	100.00	***
B	2	3.531	1.765	39.077	3.440	26.390	100.00	***
C	2	1.003	0.501	11.096	0.912	6.997	99.98	**
D	2	1.227	0.613	13.578	1.136	8.717	100.00	***
E	2	0.959	0.479	10.612	0.868	6.662	99.98	**
F	2	2.524	1.262	27.938	2.434	18.670	100.00	***
G	2	0.278	0.139	3.077	0.188	1.440	94.23	-
H	2	0.618	0.309	6.838	0.527	4.046	99.71	**
error	38	1.717	0.045			18.366		
total	53	13.0335				100		

หมายเหตุ	A : inoculum size (% , v/v)	E : ความเข้มข้น $K_2HPO_4$	P < 0.001	***
	B : ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง	F : อัตราการให้อากาศ	P < 0.01	**
	C : ความเข้มข้นของเปปโตน	G : ค่าความเป็นกรด-ด่าง	P < 0.05	*
	D : ความเข้มข้น $Na_2CO_3$	H : เวลาในการผลิตเอนไซม์		

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ( $Q_{DE}$ )

Factor	DOF	SS	MS	F	S'	Percent contribution	Confidence (%)	Significant
A	1	0.008	0.008	27.532	0.008	3.483	100.00	***
B	2	0.025	0.013	43.955	0.024	11.279	100.00	***
C	2	0.007	0.004	12.609	0.007	3.048	99.99	***
D	2	0.008	0.004	13.629	0.007	3.316	100.00	***
E	2	0.005	0.003	9.142	0.005	2.138	99.94	**
F	2	0.014	0.007	25.077	0.014	6.322	100.00	***
G	2	0.001	0.001	2.571	0.001	0.412	91.03	-
H	2	0.137	0.069	241.101	0.137	63.043	100.00	***
error	38	0.011	0.000			6.958		
total	53	0.217				100		

หมายเหตุ	A : inoculum size (% v/v)	E : ความเข้มข้น $K_2HPO_4$	P < 0.001	***
	B : ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง	F : อัตราการให้อากาศ	P < 0.01	**
	C : ความเข้มข้นของเปปโตน	G : ค่าความเป็นกรด-ด่าง	P < 0.05	*
	D : ความเข้มข้น $Na_2CO_3$	H : เวลาในการผลิตเอนไซม์		

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ค่า dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase จากตารางที่ 14 พบว่าร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) ของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังมีค่ามากที่สุด คือ 26.39% รองลงมา คือ อัตราการให้อากาศ ซึ่งเท่ากับ 18.67% รองลงมาคือ ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  เท่ากับ 8.717% ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8.712% ความเข้มข้นของเปปโติน เท่ากับ 6.997% ความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  เท่ากับ 6.662% เวลาในการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 4.046% และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 1.414% ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีค่าร้อยละของการสนับสนุน (Percent contribution) น้อยที่สุดและเมื่อพิจารณาจากค่าระดับความเชื่อมั่น (Confidence level) จากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่า ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นของเปปโติน ความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  และเวลาในการผลิตเอนไซม์ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิมิค่าความคลาดเคลื่อนเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 14 มีค่าเท่ากับ 1.717 ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนมีผลมาจากการทดลอง ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 18.36% Rosso และคณะทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยใช้การออกแบบการทดลองโดยวิธี Response surface method ซึ่งมีค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดลองเท่ากับ 0.28 และมีค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์เท่ากับ 5.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยพิจารณาค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase จากตารางที่ 15 พบว่าร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) ของเวลาในการผลิตเอนไซม์ CGTase มีค่ามากที่สุด คือ 63.043% รองลงมาคือ ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง มีค่าเท่ากับ 11.28% รองลงมาคือ อัตราการให้อากาศ มีค่าร้อยละอิทธิพล เท่ากับ 6.32% inoculum size เท่ากับ 3.48% ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  เท่ากับ 3.316% ความเข้มข้นของเปปโติน 3.04 % ความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  เท่ากับ 2.13% และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 0.41% ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีค่าร้อยละของการสนับสนุน (Percent contribution) น้อยที่สุด และเมื่อพิจารณาจากค่าระดับความเชื่อมั่น (Confidence level) จากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่า เวลาในการผลิตเอนไซม์ CGTase ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง อัตราการให้อากาศ inoculum size ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้นของเปปโติน และความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเป็นปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิมิค่าความคลาดเคลื่อนเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 15 มีค่าเท่ากับ 0.137 ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนมีผลมาจากการทดลอง ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 6.958%

ในการเตรียมเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้ มาใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินโดยไม่ผ่านวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เพราะจากรายงานของ Charoenlap, *et al.*, (2004) พบว่าเอนไซม์ดิบและเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งการทำบริสุทธิ์บางส่วน จะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ดิบมีความเสถียรได้ดีในช่วงพีเอชตั้งแต่ 7-9 และอุณหภูมิตั้งแต่ 30-60 องศาเซลเซียส เพราะว่าเอนไซม์ดิบช่วยป้องกันการปะทะกับสภาวะที่เป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่สูงมากเกินไปได้ ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินนั้น Wang และคณะ (2005) รายงานว่า การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินโดยเอนไซม์ CGTase เป็นกระบวนการที่เอนไซม์ทำการย่อยแป้งและทำการต่อเป็นวงเพื่อผลิตเป็นไซโคลเด็กซ์ทรินและจากปฏิกิริยา Cyclization เกิดกลูโคสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ และพบว่าปฏิกิริยา coupling ของเอนไซม์ CGTase มีผลต่อการสร้างไซโคลเด็กซ์ทริน ซึ่งเป็นการจำกัดอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นไซโคลเด็กซ์ทรินในขั้นสุดท้าย

### 3. ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ในช่วงพีเอช 5.5-12 ได้ผลความสัมพันธ์ของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยพบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ได้จากการผลิตในสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยวิธีทาคุชิ มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 9.5 และจากรายงานของ Sain และคณะ พบว่า เอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp.G1 มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส ได้ผลความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยพบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ได้จากการผลิตในสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยวิธีทาคุชิ มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส จากรายงานของ Sain และคณะ พบว่า เอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp.G1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

### การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ

การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่พีเอชช่วง 5.5-12 โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 11 โดยพบว่าที่พีเอช 7.0-9.0 เอนไซม์ CGTase จะมีความคงตัวมากเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชที่ระดับอื่น ๆ จากรายงานของ Sain และคณะ พบว่าเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวที่ระดับพีเอช 7.0-9.0 เช่นเดียวกัน เมื่อทดสอบกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ CGTase ที่มีความคงตัวที่ pH ระดับต่าง ๆ พบว่าที่ระดับพีเอชที่ 9.5 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ CGTase เมื่อทดสอบความคงตัวโดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ CGTase ของเอนไซม์ลดลงประมาณ 50% ดังภาพที่ 10 ดังนั้นเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้องนานเกินไป ส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมสัมพัทธ์ได้

### การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิช่วง 30-70 โดยบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่กำหนดดังต่อไปนี้ คือ 30, 40, 50, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลานาน 30 นาที ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 12 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 30-65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ CGTase จะมีความคงตัวมากเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชที่ระดับอื่น ๆ และพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ CGTase มีค่ากิจกรรมที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน

**ตารางที่ 16** ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่ pH ระดับต่าง ๆ

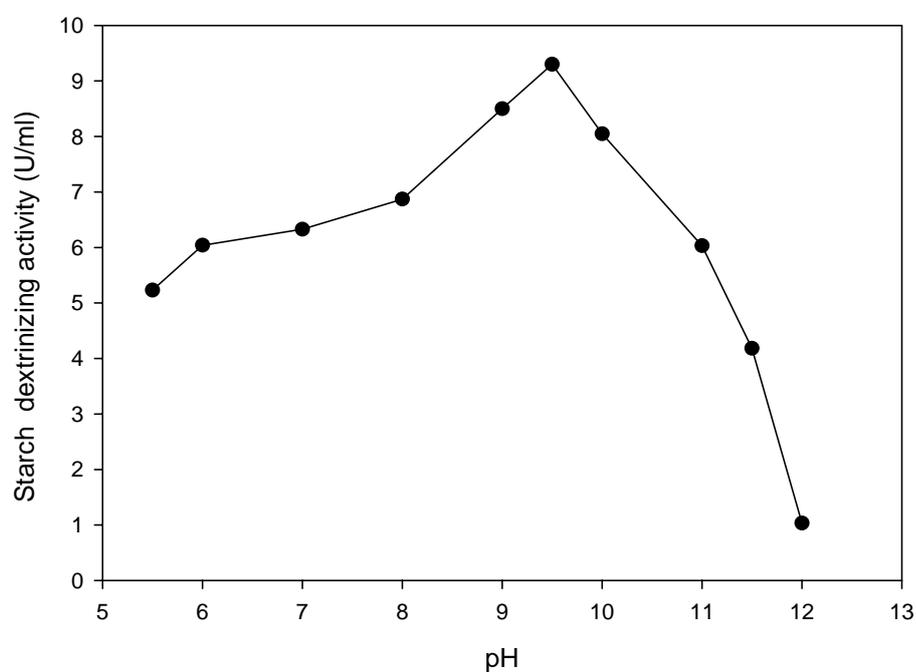
pH	5.5	6	7	8	9	9.5
Enzyme CGTase activity (U/ml)	5.230	6.038	6.327	6.869	8.500	9.300
Enzyme CGTase stability (U/ml)	2.701	2.677	9.312	8.650	7.539	5.198

ตารางที่ 16 (ต่อ)

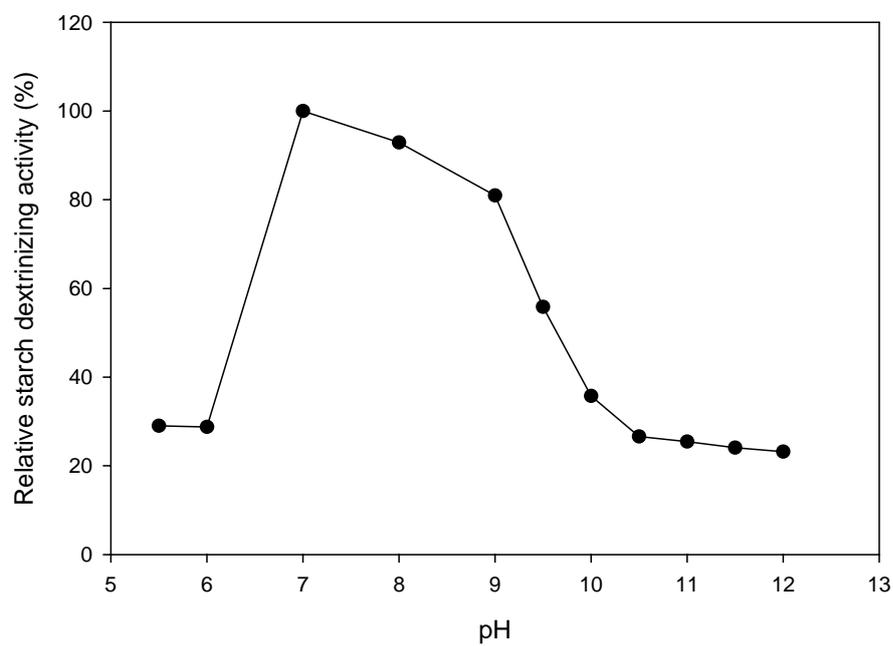
pH	10	10.5	11	11.5	12
Enzyme CGTase activity (U/ml)	8.047	7.038	6.029	4.180	1.032
Enzyme CGTase stability (U/ml)	3.327	2.477	2.371	2.242	2.159

ตารางที่ 17 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ

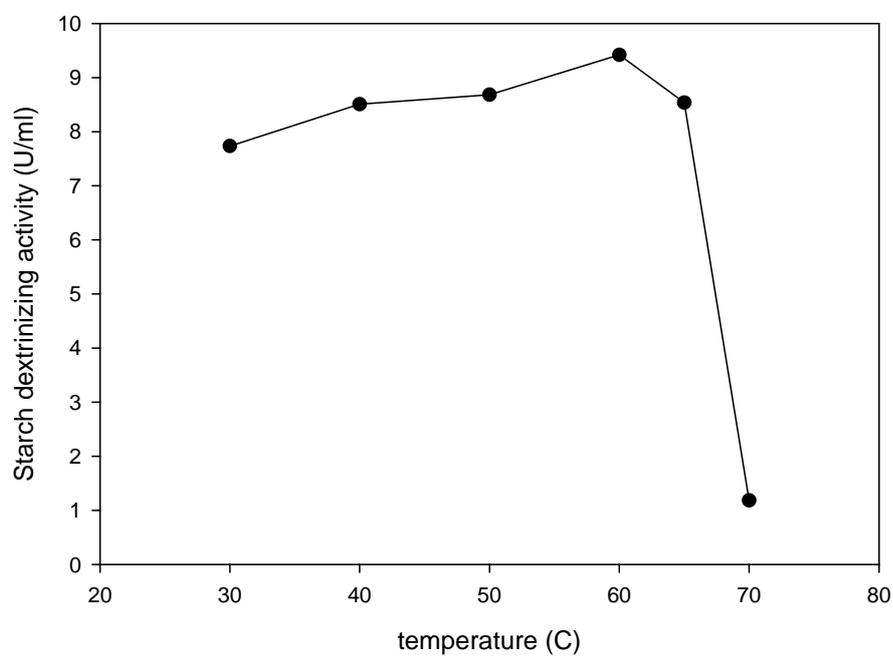
Temperature ( $^{\circ}$ C)	30	40	50	60	65	70
Enzyme activity	7.734	8.507	8.682	9.417	8.535	1.183
Enzyme stability	9.691	9.654	9.796	9.857	8.917	1.484



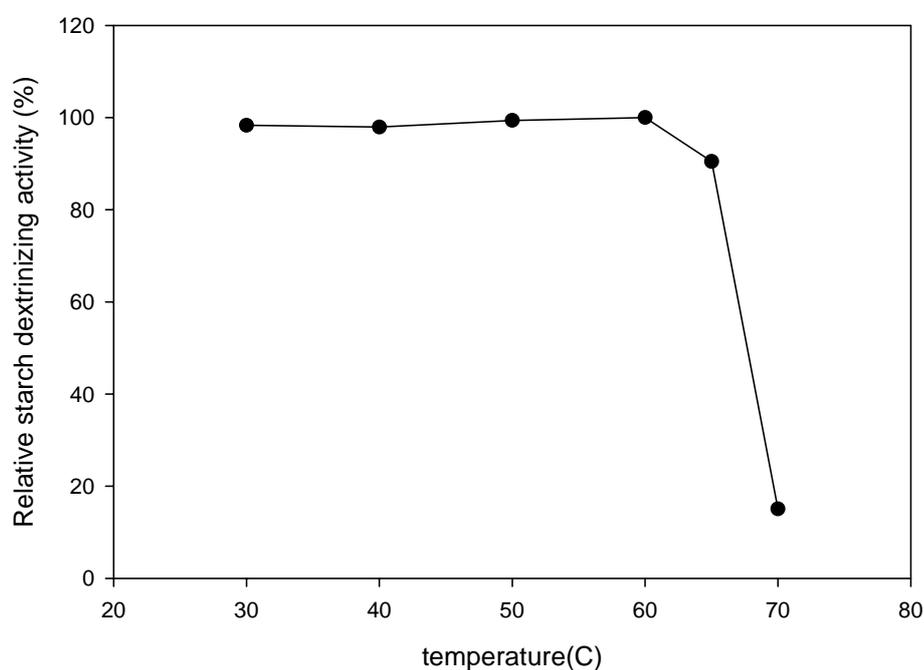
ภาพที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมที่ pH ระดับต่าง ๆ



ภาพที่ 10 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ CGTase ที่มีความคงตัวที่ pH ระดับต่าง ๆ



ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ



ภาพที่ 12 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ CGTase ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ

#### 4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ สามารถประยุกต์ใช้ในการหาอิทธิพลของปัจจัย คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase เวลาในการเกิดปฏิกิริยาและ อัตราการเขย่าที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้ ซึ่งวิธีนี้สามารถอธิบายถึงผลของทั้งสี่ปัจจัยที่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

**ตารางที่ 18** การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

การทดลอง ที่	$C_p$ ชุดที่ 1	$C_p$ ชุดที่ 2	$C_p$ ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N Ratio (dB)
1	2.020	0.977	1.273	1.423	0.537	1.962
2	4.603	3.726	3.792	4.041	0.488	12.012
3	9.647	6.232	6.919	7.599	1.806	17.183
4	3.659	4.289	5.429	4.459	0.897	12.649
5	9.532	10.761	10.146	11.387	2.235	20.819
6	6.850	5.414	4.352	5.539	1.254	14.428
7	4.567	4.687	4.446	4.567	0.121	13.186
8	9.415	9.325	8.619	9.120	0.436	19.179
9	14.861	12.529	11.387	12.925	1.770	22.074

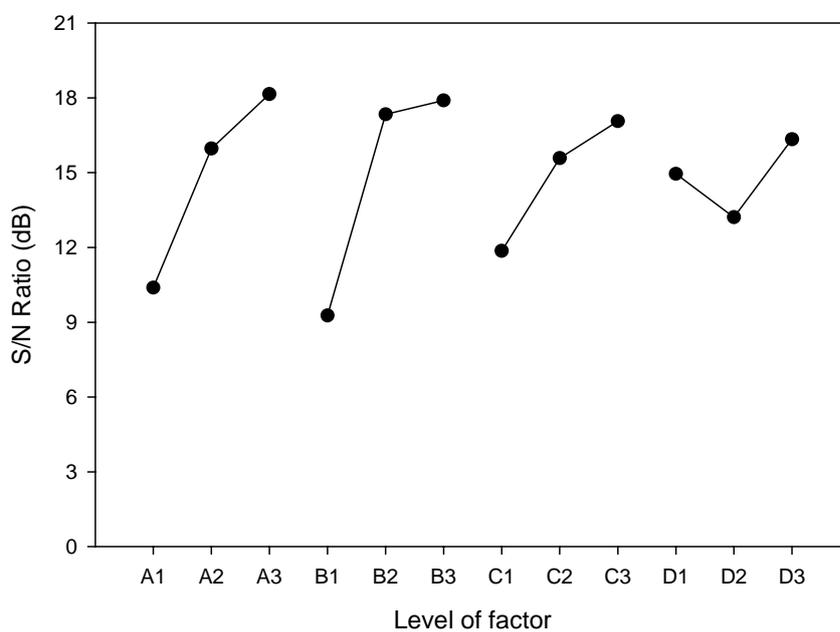
**ตารางที่ 19** การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของผลได้ของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/s}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

การทดลอง ที่	$Y_{p/s}$ ชุดที่ 1	$Y_{p/s}$ ชุดที่ 2	$Y_{p/s}$ ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N Ratio (dB)
1	0.376	0.225	0.280	0.294	0.076	-11.202
2	0.418	0.331	0.335	0.361	0.049	-8.989
3	0.577	0.374	0.434	0.462	0.104	-7.118
4	0.331	0.351	0.432	0.371	0.053	-8.776
5	0.427	0.488	0.463	0.459	0.031	-6.798
6	0.418	0.303	0.248	0.323	0.087	-10.409
7	0.185	0.190	0.271	0.216	0.048	-13.701
8	0.411	0.419	0.374	0.402	0.024	-7.957
9	0.469	0.396	0.350	0.405	0.060	-8.031

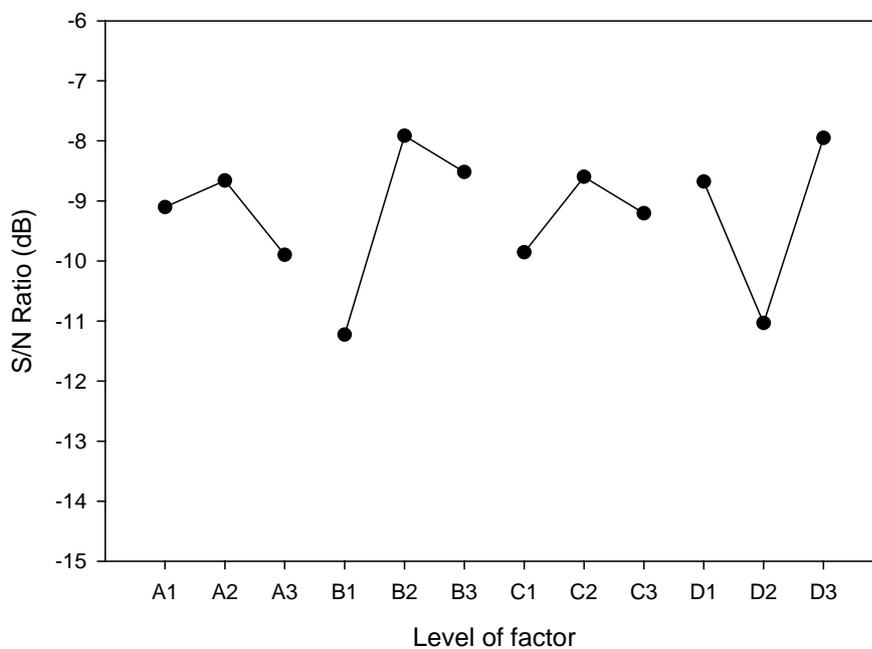
ตารางที่ 20 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

การทดลองที่	$Q_p$ ชุดที่ 1	$Q_p$ ชุดที่ 2	$Q_p$ ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	S/N Ratio (dB)
1	0.673	0.326	0.424	0.474	0.179	-7.581
2	0.767	0.621	0.632	0.673	0.081	-3.551
3	1.072	0.692	0.769	0.844	0.201	-1.902
4	0.610	0.715	0.905	0.743	0.150	-2.914
5	1.059	1.196	1.127	1.127	0.068	1.009
6	2.283	1.805	1.451	1.846	0.418	4.885
7	0.507	0.521	0.494	0.507	0.013	-5.899
8	3.138	3.108	2.873	3.040	0.145	9.637
9	2.477	2.088	1.898	2.154	0.295	6.511

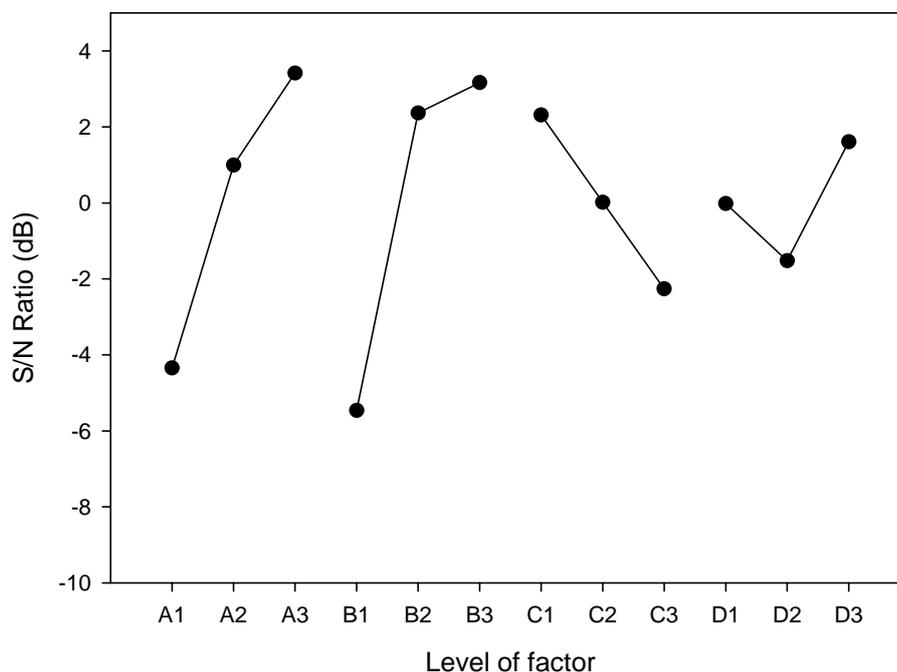
จากการทดลองทั้ง 9 การทดลองของค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ผลได้ของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ ) และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) จากการทดลองทั้ง 9 การทดลองเป็นการรวมกันของระดับปัจจัย ซึ่งจะต้องนำมาแยกเป็นแต่ละระดับของปัจจัย และนำค่า S/N Ratio ของแต่ละสภาวะมาพลอตกราฟ เพื่อหาความสัมพันธ์ของระดับของปัจจัยต่อค่า S/N Ratio (ค่าอัตราส่วนหรือค่าที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของค่าตอบสนอง) ดังภาพที่ 13-15



ภาพที่ 13 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นไซโคลเด็กซ์ทริน



ภาพที่ 14 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อผลได้ของไซโคลเด็กซ์ทริน( $Y_{p/s}$ )



ภาพที่ 15 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ )

ในการหาสภาวะที่ดีที่สุดในที่นี้ (สภาวะที่มีการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินสูงที่สุด) พิจารณาจากภาพที่ 13 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับต่าง ๆ ของ ปัจจัยควบคุมที่ใช้ในการทดลองกับค่า S/N-Ratio เฉลี่ยของความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน โดยที่สภาวะที่ดีที่สุด ในการพิจารณาความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) นั้น จะเลือกระดับของแต่ละปัจจัยที่ให้ค่า S/N-Ratio เฉลี่ยมากที่สุดมาเป็นองค์ประกอบในการหาสภาวะที่ดีที่สุด และจากกราฟในภาพที่ 14 และภาพที่ 15 จะเห็นว่าองค์ประกอบของสภาวะที่ดีที่สุด ในการพิจารณาผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) แสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 21 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	ระดับที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน		
	$C_p$ (g/l)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Q_p$ (g/g*h)
1. ความเข้มข้นของสับสเตรต (g/l)	40	30	40
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/g <sub>substrate</sub> )	50	30	50
3. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (h)	9	6	3
4. อัตราการเขย่า (rpm)	300	300	300

หลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองแล้ว นำค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/s}$ ) และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของอิทธิพลแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ขั้นตอนในการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัยคือ นำค่า S/N Ratio จากตารางที่ 18-20 มาหาส่วนต่างระหว่างค่า S/N Ratio ที่มีค่าสูงสุดและ S/N Ratio ที่มีค่าต่ำสุดของแต่ละปัจจัย และนำค่าที่ได้มาคิดเป็น % main effect หลังจากนั้น ทำการประมาณค่าความคลาดเคลื่อนของความแปรปรวน และการหาความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย โดยใช้วิธีแยกความแปรปรวนของแต่ละปัจจัย เรียกว่า การวิเคราะห์ความแปรปรวนหรือ ANOVA

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ ) และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

ระดับ	A	B	C	D
(1) ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ )				
1	10.39	9.27	11.86	14.95
2	15.97	17.34	15.58	13.21
3	18.15	17.89	17.06	16.34
ค่าต่ำสุด	10.39	9.27	11.86	13.21
ค่าสูงสุด	18.15	17.89	17.06	16.34
ค่าอิทธิพล	7.76	8.63	5.21	3.13
% ค่าอิทธิพล	31.387	34.901	21.058	12.654
(2) ผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ )				
1	-9.103	-11.226	-9.856	-8.677
2	-8.661	-7.915	-8.599	-11.033
3	-9.896	-8.519	-9.206	-7.950
ค่าต่ำสุด	-9.896	-11.226	-9.856	-11.033
ค่าสูงสุด	-8.661	-7.915	-8.599	-7.950
ค่าอิทธิพล	1.235	3.311	1.258	3.082
% ค่าอิทธิพล	13.898	37.265	14.152	34.686
(3) อัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ )				
1	-4.344	-5.465	2.314	-0.020
2	0.994	2.365	0.015	-1.521
3	3.416	3.165	-2.264	1.607
ค่าต่ำสุด	-4.344	-5.465	-2.264	-1.521
ค่าสูงสุด	3.416	3.165	2.314	1.607
ค่าอิทธิพล	7.760	8.629	4.578	3.129
% ค่าอิทธิพล	32.206	35.812	18.997	12.984

## ตารางที่ 22 (ต่อ)

### หมายเหตุ

A ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง      C : เวลาในการเกิดปฏิกิริยา  
B : ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase      D : อัตราการเขย่า

ค่า %Main effect บ่งบอกถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ปัจจัยที่มีค่า %Main effect มาก แสดงว่าปัจจัยนั้นมีอิทธิพลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินมาก และในทางกลับกัน ถ้าปัจจัยใดมีค่า %Main effect น้อย แสดงว่าปัจจัยนั้นมีอิทธิพลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินน้อย ตามลำดับ จากตารางที่ 22 แสดงค่า %Main effect ของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินของแต่ละพารามิเตอร์ที่พิจารณา พบว่า ปัจจัยของความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ที่ผลิตได้มากที่สุดคือ 34.9% รองลงมาคือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 31.38% เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 21.05% และอัตราการเขย่า 12.65% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ ) พบว่าปัจจัยของความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase มีอิทธิพลต่อผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Y_{p/S}$ ) มากที่สุด คือ 37.26% และอัตราการเขย่ามีอิทธิพลต่อผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทรินรองเป็นลำดับสอง คือ 34.68% รองลงมาคือ เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 14.15% และพบว่าแป้งมันสำปะหลังมีอิทธิพลต่อค่าผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทรินน้อยที่สุดคือ 13.89% และเมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ของอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) พบว่าปัจจัยของความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) มากที่สุด คือ 35.81% รองลงมาคือปัจจัยของแป้งมันสำปะหลังมีค่า %Main effect เท่ากับ 32.20% และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา และอัตราเร็วในการเขย่ามีค่า %Main effect เท่ากับ 18.99% และ 12.98% ตามลำดับ ซึ่งจากทั้งสามพารามิเตอร์ให้ผลเหมือนกันคือ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินมากที่สุดคือความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase ต่อกรรมสับสเตรต บ่งบอกได้ว่าความเข้มข้นเอนไซม์มีอิทธิพลต่อผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน และมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) และค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตได้ตามลำดับ

## 5. การประเมินความถูกต้องของการทดลอง

การประมาณค่าที่ได้จากสถานะที่เหมาะสมตามวิธีการออกแบบการทดลองของทากูชิ จะอาศัยค่า Expected Result At Optimum Condition สามารถคำนวณได้จากภาคผนวก ข โดยแสดงค่าผลรวมของค่าอัตราส่วน S/N เฉลี่ยของการทดลอง และ ผลต่างระหว่างค่าอัตราส่วน S/N เฉลี่ยของแต่ละปัจจัยในแต่ละระดับของการทดลอง เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมจากการคำนวณโดยวิธีทากูชิ สามารถนำค่าสถานะที่เหมาะสมมาประมาณค่าผลได้ของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

จากการทดลองโดยใช้การออกแบบการทดลองของทากูชิ เมื่อนำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ เรียบร้อยแล้วจะได้สถานะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/s}$ ) และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) ที่มีค่าที่สูงที่สุดจากการคำนวณโดยวิธีทากูชิ จากตารางที่ 22 หลังจากนั้นทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง นำผลการทดลองจากสถานะที่เหมาะสมที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าประมาณที่คำนวณจากวิธีทากูชิ ดังแสดงในตารางที่ 23 ซึ่งส่วนต่างของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินที่ได้จากการยืนยันผลการทดลองกับค่าประมาณได้นั้น สามารถนำมาทดสอบความแปรปรวนจากค่า คลาดเคลื่อนที่ได้จากการทดลองของแต่ละปัจจัยได้จากตารางวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA)

**ตารางที่ 23** การประมาณค่าและการยืนยันผลการทดลองจากสถานะที่เหมาะสมของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน โดยพิจารณา 3 สถานะ คือ ค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/s}$ ) ค่าอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) เมื่อแปรผันปัจจัยการทดลองในระดับที่เหมาะสม

พารามิเตอร์	สถานะที่เหมาะสม $C_p$		สถานะที่เหมาะสม $Y_{p/s}$		สถานะที่เหมาะสม $Q_p$	
	ค่าประมาณ	ค่าจริง	ค่าประมาณ	ค่าจริง	ค่าประมาณ	ค่าจริง
$C_p$	<b>17.668</b>	<b>15.627</b>	10.865	7.233	9.072	10.184
$Y_{p/s}$	0.402	0.537	<b>0.533</b>	<b>0.417</b>	0.373	0.518
$Q_p$	1.963	1.736	1.761	1.205	<b>3.325</b>	<b>3.395</b>

ตารางที่ 24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ )

Factor	DOF	SS	MS	F	S'	Percent contribution	Confidence (%)	Significant
A	2	93.381	46.690	28.978	90.158	24.467	100.00	***
B	2	148.292	74.146	46.017	145.070	39.369	100.00	***
C	2	29.630	14.815	9.195	26.408	7.167	99.82	**
D	2	68.180	34.090	21.157	64.957	17.628	100.00	***
error	18	29.003	1.611			11.369		
total	26	368.486				100		

หมายเหตุ	A : ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (g/l)	P < 0.001	***
	B : ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase (U/g <sub>substrate</sub> )	P < 0.01	**
	C : เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (h.)	P < 0.05	*
	D : อัตราการเขย่า (rpm)		

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

Factor	DOF	SS	MS	F	S'	Percent contribution	Confidence (%)	Significant
A	2	0.009	0.005	1.108	0.001	0.395	64.84	-
B	2	0.071	0.036	8.670	0.063	27.947	99.77	**
C	2	0.009	0.005	1.156	0.001	0.567	66.28	-
D	2	0.062	0.031	7.510	0.053	23.722	99.57	**
error	18	0.074	0.004			47.370		
total	26	0.225				100		

หมายเหตุ	A : ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (g/l)	P < 0.001	***
	B : ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase (U/g <sub>substrate</sub> )	P < 0.01	**
	C : เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (h.)	P < 0.05	*
	D : อัตราการเขย่า (rpm)		

ตารางที่ 26 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ ) ของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

Factor	DOF	SS	MS	F	S'	Percent contribution	Confidence (%)	Significant
A	2	6.891	3.445	79.716	6.805	34.600	100.00	***
B	2	6.480	3.240	74.966	6.394	32.513	100.00	***
C	2	4.233	2.116	48.963	4.146	21.083	100.00	***
D	2	1.284	0.642	14.853	1.198	6.089	99.98	**
error	18	0.778	0.043			5.715		
total	26	19.666				100.000		

หมายเหตุ	A : ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (g/l)	P < 0.001	***
	B : ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase (U/g <sub>substrate</sub> )	P < 0.01	**
	C : เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (h.)	P < 0.05	*
	D : อัตราการเขย่า (rpm)		

จากการนำค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) มาวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม โดยวิธีทากูชิได้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 22 ซึ่งระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase 50 หน่วยต่อกรัม เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 9 ชั่วโมง และอัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที พบว่าความเข้มข้นของสับสเตรตและความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase ที่ระดับสูงจะส่งผลให้ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินมีค่าสูงตามไปด้วย และจากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) จากตารางที่ 24 พบว่าร้อยละของอิทธิพล (Percent contribution) ของความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase มีค่ามากที่สุด คือ 39.37% รองลงมาคือความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเท่ากับ 24.46% อัตราการเขย่า 17.62% และเวลาในการเกิดปฏิกิริยามีค่าร้อยละของอิทธิพลน้อยที่สุดเท่ากับ 7.16% บ่งบอกให้รู้ว่า ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตได้มีผลมาจากความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase ในการเปลี่ยนสับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่าปัจจัยของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังก็เป็นปัจจัยที่สำคัญรองลงมา ส่วนอัตราการเขย่านั้นมีส่วนช่วยให้เกิดการจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เกิดการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้ดียิ่งขึ้น ส่วนปัจจัยของเวลาในการทำปฏิกิริยา พบว่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินจะมีค่ามากขึ้นเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตมากขึ้น และเมื่อพิจารณาค่าระดับความเชื่อมั่น (Confidence level) สามารถบอกได้ว่า ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase และอัตราการเขย่ามีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 100% และเวลาในการทำปฏิกิริยา มีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 99.82% บ่งบอกให้รู้ว่า ทั้ง 4 ปัจจัยที่ใช้ในการวางแผนการทดลองเพื่อผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน

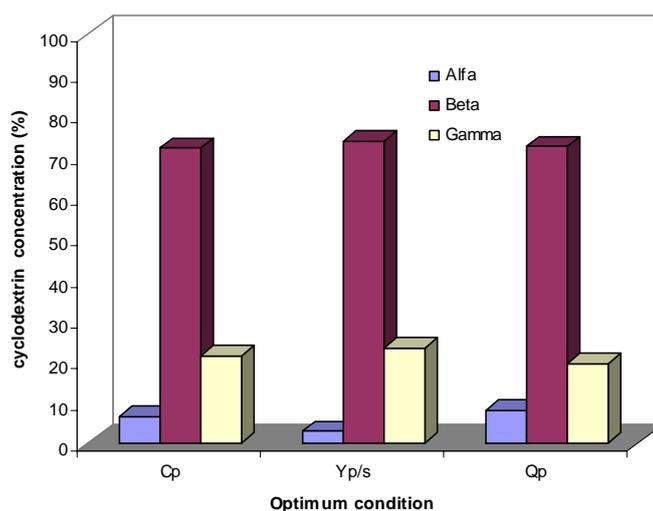
จากการนำค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน มาวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทากูชิได้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 22 ซึ่งระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase 30 หน่วยต่อกรัม เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 6 ชั่วโมง และอัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที และจากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน จากตารางที่ 25 พบว่าร้อยละของอิทธิพล (Percent contribution) ของความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase ต่อกรัมสับสเตรต มีค่ามากที่สุด คือ 27.94% รองลงมาคืออัตราการเขย่าซึ่งเท่ากับ 23.72% เวลาในการเกิดปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 0.56% ส่วนความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมีค่าร้อยละของอิทธิพลน้อยที่สุด เท่ากับ 0.39% บ่งบอกให้รู้ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase ต่อกรัมสับสเตรต และอัตราการเขย่า มีอิทธิพลต่อค่าผลได้ของ

ผลิตภัณฑ์มากที่สุด ซึ่งจัดได้ว่า ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase และอัตราการเขย่าที่มีอิทธิพลต่อค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/S}$ ) ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปัจจัยของเวลาในการเกิดปฏิกิริยา และความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง มีระดับความเชื่อมั่นน้อย และเป็นปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจมีสาเหตุมาจากเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมสัมพัทธ์ เนื่องมาจากอุณหภูมิและเวลาของระบบ

จากการนำค่าอัตราผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) มาวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทากูชิได้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 22 ซึ่งระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase 50 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 3 ชั่วโมง และอัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของอัตราผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) ให้ระดับเดียวกับสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ยกเว้นปัจจัยของเวลาในการเกิดปฏิกิริยา เพราะอัตราการเกิดปฏิกิริยาเกิดจากความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตได้ต่อหน่วยของเวลา จึงพบว่าในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง มีการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินได้มากที่สุด ค่าปัจจัยของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาจึงไม่ใช่สภาวะเดียวกับความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน และจากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ค่าอัตราผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) จากตารางที่ 26 พบว่าร้อยละการสนับสนุน (Percent contribution) ของเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 34.6% ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase มีค่ารองลงมา คือ 32.51% เวลาในการทำปฏิกิริยาซึ่งเท่ากับ 21.083% และอัตราการเขย่ามีค่าร้อยละการสนับสนุนน้อยที่สุดเท่ากับ 6.08% บ่งบอกให้รู้ว่า ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase และเข้มข้นของสับสเตรตคือแป้งมันสำปะหลังนั้นเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่ออัตราผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ส่วนปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมาคือเวลาในการทำปฏิกิริยา เพราะเมื่อพิจารณาค่าอัตราผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน คิดต่อหน่วยของเวลาในการทำปฏิกิริยานั้น ปัจจัยของเวลาจึงมีความสำคัญรองลงมาจากความเข้มข้นเอนไซม์และเข้มข้นของสับสเตรต ส่วนอัตราการเขย่านั้นมีส่วนช่วยให้เกิดการจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตมากยิ่งขึ้น และเมื่อพิจารณาจากค่าระดับความเชื่อมั่น (Confidence level) จากค่าดังกล่าวพบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase และเวลาในการทำปฏิกิริยามีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 100% และอัตราการเขย่ามีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 99.98% บ่งบอกให้รู้ว่า ทั้ง 4 ปัจจัยที่ใช้ในการวางแผนการทดลองเพื่อผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน

ตารางที่ 27 ค่าอัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตจากการยืนยันผลการทดลอง

สภาวะ	อัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ทริน			เปอร์เซ็นต์
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	$\alpha : \beta : \gamma$
ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน $C_p$	1	10.85	3.22	6.63 : 72 : 21.37
ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ $Y_{p/s}$	1	25.48	8.02	2.89 : 73.8 : 23.25
อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ $Q_p$	1	8.96	2.40	8.08 : 72.45 : 19.5



ภาพที่ 16 อัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ผลิตจากการยืนยันผลการทดลองของพารามิเตอร์ทั้ง 3 สภาวะ คือ ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/s}$ ) และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ )

จากการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง ปริมาณการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินในสารผสมปฏิกิริยาแสดงให้เห็นว่าบีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน จากการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ พบว่า มีความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินเท่ากับ 15.627 g/l ซึ่งสามารถพิจารณาสัดส่วนของ  $\alpha : \beta : \gamma$  ไซโคลเด็กซ์ทริน ได้เท่ากับ 1 : 10.85 : 3.22 หรือคิดเป็นร้อยละของ  $\alpha : \beta : \gamma$  ไซโคลเด็กซ์ทริน ได้เท่ากับ 6.33 : 71.99 : 21.37 ตามลำดับ ส่วนสภาวะของค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ ( $Y_{p/s}$ ) จากการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิพบว่า ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินเท่ากับ 7.233 g/l ซึ่งสามารถพิจารณาสัดส่วนของ  $\alpha : \beta : \gamma$  ไซโคลเด็กซ์ทริน ได้เท่ากับ 1 : 25.48 : 8.02 หรือคิดเป็นร้อยละของ  $\alpha : \beta : \gamma$  ไซโคลเด็กซ์ทริน ได้เท่ากับ 2.89 : 73.85 : 23.25 ตามลำดับ และสภาวะของอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ( $Q_p$ ) พบว่ามีความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินเท่ากับ 10.184 g/l ซึ่งสามารถพิจารณาสัดส่วนของ  $\alpha : \beta : \gamma$  ไซโคลเด็กซ์ทริน ได้เท่ากับ 1 : 8.96 : 2.40 หรือคิดเป็นร้อยละของ  $\alpha : \beta : \gamma$  ไซโคลเด็กซ์ทริน ได้เท่ากับ 8.08 : 72.45 : 19.5 ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Martins และ Hatti-Kaul (2003) พบว่าปฏิกิริยา Cyclization ของเอนไซม์ CGTase จะให้บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ตามมาด้วยแอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน อย่างไรก็ตามสภาวะการเกิดปฏิกิริยา มีอิทธิพลต่อการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน พบว่าที่ pH 10 แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทรินจะถูกสร้างขึ้นมาแทนที่แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน และการเติมเกลือ  $CaCl_2$  จะเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยา Cyclization และการสร้างบีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินอย่างมีนัยสำคัญและเกลือ  $CaCl_2$  จะเป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูงด้วย ในขณะที่แอลกอฮอล์จะเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา Cyclization ของเอนไซม์ CGTase อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Wind และคณะ(1995) พบว่าจากการใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 30% เป็นสับสเตรต สามารถเปลี่ยนเป็นไซโคลเด็กซ์ทรินได้อัตราส่วน  $\alpha : \beta : \gamma$  คือร้อยละ 36 : 44 : 20 ตามลำดับ จากอัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ทรินที่ได้ทั้ง 3 สภาวะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินที่ปริมาณของ  $\beta$ - และ  $\gamma$ -ไซโคลเด็กซ์ทรินสูงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) จากเชื้อ *Bacillus circulans* TISTR 907 และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยของธาตุอาหารและสภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase ทั้งหมด 8 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเปปโตน ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  อัตราการให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่างและเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ โดยใช้การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูจิ ซึ่งเป็นการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมของการผลิตเอนไซม์ CGTase สูงสุด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 18 หน่วยทดลอง แล้วนำเอนไซม์มาตรวจหาค่ากิจกรรมของ dextrinizing activity (U/ml) และหาอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase พบว่าเมื่อพิจารณาจากสภาวะของค่า dextrinizing activity พบว่าเอนไซม์ CGTase มีค่า dextrinizing activity เท่ากับ 8.54 U/ml และมีค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ เท่ากับ 0.71 U/ml h และเมื่อพิจารณาจากสภาวะของค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase พบว่าเอนไซม์ CGTase มีค่า dextrinizing activity เท่ากับ 9.75 U/ml และมีค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase เท่ากับ 0.97 U/ml h (จากการยืนยันผลการทดลอง) ดังนั้น จึงเลือกสภาวะที่ให้ค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase สูงที่สุด เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน คือ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเปปโตน 15 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 300 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5 และเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ 10 ชั่วโมง มาทำการผลิตเอนไซม์ CGTase

จากการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยา พบว่าเอนไซม์ CGTase มีค่ากิจกรรมที่สูงที่สุดที่ pH 9.5 โดยใช้สารละลายบอเรนบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นตัวทำละลายในปฏิกิริยา และใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา คือ 60 องศาเซลเซียส และยังพบว่าเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวในช่วง pH ตั้งแต่ 7-10 และเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 30 นาที โดยเอนไซม์ไม่เสียสภาพการทำงาน จึง

ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และสารละลายบัฟเฟอร์บอเรตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ pH 9.5 เป็นตัวทำละลาย ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

จากการศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลังในระดับพลาสติก โดยศึกษาปัจจัยในการผลิต คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase เวลาในการเกิดปฏิกิริยา และอัตราการเขย่า โดยใช้การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ 4 ปัจจัย โดยแบ่งออกเป็น 9 การทดลอง โดยในการทดลองศึกษาพารามิเตอร์ 3 ค่า คือ ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน ทำการวิเคราะห์โดยวิธีทากูชิ ได้เป็น 3 สภาวะ เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase 50 หน่วยต่อกรัม สับสเตรต เวลาในการทำปฏิกิริยา 9 ชั่วโมง และอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที จากการยืนยันผลทดลอง พบว่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินมีค่า 15.62 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทรินเท่ากับ 0.537 กรัมต่อกรัม และมีค่าอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน 1.736 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของค่าผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทริน คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase 30 หน่วยต่อกรัม สับสเตรต เวลาในการทำปฏิกิริยา 6 ชั่วโมง และอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที จากการยืนยันผลทดลอง พบว่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินมีค่า 7.233 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทรินเท่ากับ 0.417 กรัมต่อกรัม และมีค่าอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน 1.205 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของค่าอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์ CGTase 50 หน่วยต่อกรัม สับสเตรต เวลาในการทำปฏิกิริยา 3 ชั่วโมง และอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที จากการยืนยันผลทดลอง พบว่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินมีค่า 10.184 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้ของการเกิดไซโคลเด็กซ์ทรินเท่ากับ 0.518 กรัมต่อกรัม และมีค่าอัตราการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน 3.395 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

## ข้อเสนอแนะ

ในการเตรียมแป้งมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นสับสเตรตในการทดลอง พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูง จะพบปัญหาของความหนืดในการเตรียม สามารถแก้ปัญหาได้โดยการให้ความร้อนแก่แป้งมันสำปะหลังเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากความร้อนไอน้ำ มิฉะนั้นแป้งมันสำปะหลังจะเกาะกันเป็นก้อน ทำให้ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียมเปลี่ยนไป

สำหรับในกรณีที่จะใช้การทดลองนี้ไปขยายผลต่อหรือทำการศึกษาเพิ่มเติมมีแนวทางในการทำการศึกษาดังนี้ คือ สามารถกำหนดช่วงปัจจัยควบคุมให้มีช่วงของปัจจัยที่กว้างหรือครอบคลุมให้มากกว่าช่วงของปัจจัยควบคุมที่ใช้ทำการศึกษาในงานนี้ได้ และเพิ่มปัจจัยควบคุมให้มากขึ้น เช่น ขนาดของฟลาस्क เพื่อที่ทำให้กระบวนการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นหรือขยายขนาดระบบการผลิตเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- โชติรส พิทยาภรณ์ และ มาลี เจริญวิทย์วรกุล. 2530. การเปลี่ยนแปลงให้เป็นไซโคลเด็กซ์ทริน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทิพย์สุภา มาลัย. 2538. การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งข้าวเจ้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นฤมล ศิริทรงธรรม. 2004. Microencapsulation เทคนิคในการตกแต่งสำเร็จให้ฝ้ามืดกลิ่นหอม. **Text. Technol.** 55: 41-55.
- ปราณี อานเป็รื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วราวุฒิ ครูต่ง. 2528. การย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นน้ำตาลโดยเชื้อ *Aspergillus* และ *Rhizopus* สายพันธุ์พื้นบ้าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สิรินทร์ สุจินตะบัณฑิต. 2546. การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลังด้วยไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Paenibacillus T16*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2524. การผลิตเอนไซม์อะมิเลสจากבקเทรีเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุษณี ชนะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- Boonaeksap, S., S. Chaisawadi, A. Tia and C.Nuengchaknin. 1999. **Starch extraction from cassava root**. Reserch and Intellectual property promotion center.

- Charoenlap, N., S. Dharmsthiti, S. Sirisansaneeyagul and L. Lertsiri. 2004. Optimization of cyclodextrins production from sago starch. **Biores. Technol.** 92 :49-54.
- Gawande, B.N. and A.Y. Patkar. 2001. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS- 22. **Enzyme Microb. Technol.** 28: 735–743.
- Higuti, I.H., P.A. Silva and A.J. Nascimento. 2004. Studies on alkaloophilic CGTase-Producing Bacteria and effect of starch on cyclodextrin-Glycosyltransferase activity. **Inter. J.** 47 :135-138.
- Keadsin, A. 2003. **Construction of chimeric cyclodextrin glucoamylases by homologous recombination and study of their activities.** Chulalongkorn University.
- Kim, T.J., B.C. Kim and H.S. Lee. 1997. Production of cyclodextrin using raw corn starch without a pretreatment. **Enzyme Microb. Technol.** 20:506-509.
- Kobayashi, S.,1996. Cyclodextrin Producing Enzyme (CGTase). **Enzymes for Carbohydrate Engineering.** 23-40.
- Ibrahim, H.M, W.M.W. Yusoff and A.A. Hamid. 2004. Optimization of medium for the production of beta-cyclodextrin glucoamylase using Central Composite Design (CCD). **Process Biochem.** 40(2):753-758.
- Illias, R.M., T.S. Fen, N.A. Abdulrashid, W.M.W. Yusoff , A.A. Hamid, O. Hassan and K. Kamaruddin. 2002. Cyclodextrin Glucoamylase Producing Alkalophilic *Bacillus* sp.G1: its Cultural Condition and Partial Characterization of the enzyme. **J. Biol.Sci.** 5(6): 688-692.

- Liew, S.L., A.B. Ariff, A. R. Raha and Y.W. Ho. 2005. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism *Lactobacillus rhamnosus* using response surface methodology. **Inter. Food Microbiol.** 102: 137-142.
- Loftsson, T. and D. Duchene.2006. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Inter. J. Pharm.** 329: 1–11.
- Martin Del Valle, E.M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review, **Process Biochem.** 39: 1033-1046.
- Martins, R.F. 2001. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate : purification and characterisation. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 116-124.
- Martins, R.F. and R. Hatti-Kaul. 2003. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase:activity and stability features. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 819–827.
- Prasad, K.K. and S.V. Mohan. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. **Biochem. Bioeng.** 24: 17-26.
- Qi Q., X. She, T. Endo and W. Zimmermann. 2003. Effect of the reaction temperature on the transglycosylation reactions catalyzed by the cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans* for the synthesis of large-ring cyclodextrins. **Tetrahedron** 60 : 799–806.

- Rahman, R. A., R.M. Illias, M.G.M. Nawawi, A. F. Ismail, O. Hassan and K. Kamaruddin  
2004. Optimisation of growth medium for the production of cyclodextrin  
glucosyltransferase from *Bacillus sterothermophilus* HR1 using response surface  
methodology. **Process Biochem.** 39: 2053-2060.
- Rao, R.S. R.S. Prakasham, K. K. Prasad, S. Rajesham, P.N. Sarma and V. Rao. 2003.  
Xylitol production by *Candida* sp. : parameter optimization using Taguchi approach.  
**Process Biochem.** 39: 951–956.
- Rosso, A.M., S.A.Ferrarotti, N. Krymkiewicz and B.C. Nudel. 2002. Optimisation of batch  
culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus*  
*circulans* DF 9R. **Microbial Cell Factories.** 1:1-9.
- Roy, R.K. 2001. **Design of Experiments Using the Taguchi Approach** : 16 Steps to  
Product and Process Improvement, John Wiley & Sons, New York.
- Tonkova, A.,1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme Microb. Technol.;**  
22: 678-686.
- Sian, H.K., M. Said, O. Hassanb, K. Kamaruddin, A.F. Ismail, R.A. Rahma, N.A.N.  
Mahmood and R.M. Illias 2005. Purification and characterization of cyclodextrin  
glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. **Process Biochem.** 40:  
1101–1111.
- Sirisansaneeyakul, S.,T. Pornpakdeetewakul, , Luangpituksa and S. Varavinit.  
1996. Production of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. The Annual  
Reports of ICBiotech. 19, 377-383.

- Van der Veen, B.A., W.M. Van Alebeek G-J., J.C.M. Uitdehaag, B.W. Dijkstra and L. Dijkhuizen. 2000. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. **J. Biochem.** 267: 658-65.
- Vassileva, A., N. Burhan, V. Beschkov and D. Spasora. 2003. Cyclodextrin glucanotranferase production by free and agar gel immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783. **Process Biochem.** 38: 1585-1591.
- Wang, Z., Qi Q. and P.G. Wang. 2005. Engineering of Cyclodextrin Glucanotransferase on the Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Cyclodextrin Production. **Appl. Environ. Microbiol.** 72:1873-1877.
- Wind, R., W. Liebl, R.M. Buitelaar, D. Penninga, A. Spreinat, L. Dijkhuizen L. and H. Bahl. 1995. Cyclodextrin Formation by the Thermostable  $\alpha$ -Amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and Reclassification of the Enzyme as a Cyclodextrin Glycosyltransferase. **Amer. Soci. Microbiol.** 61: 1257-1265.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *B. circulans* TISTR 907 กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase และปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรดที่ถูกใช้ไป

เวลา (ชั่วโมง)	ความทึบแสง (OD <sub>600</sub> )	Dextrinizing activity (U/ml)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	
			น้ำหนักแห้งเซลล์	สับสเตรดที่ถูกใช้ไป <sup>1</sup>
0	0.1693	1.0333	3.1077	0.3394
2	0.2340	1.0533	3.2268	2.4934
4	0.5270	1.3533	3.9661	4.6257
6	1.0523	1.6533	4.9624	6.3664
8	1.4277	1.9933	5.5388	7.8024
10	1.6067	2.5333	5.9586	8.6510
12	1.7390	2.9066	6.0588	8.5422
14	1.7940	3.3003	6.7731	8.1940
16	1.7777	3.3733	6.1340	8.2375
18	1.7727	3.3466	6.0902	8.2158
20	1.7737	3.4466	6.2656	8.2375
22	1.7520	3.4266	5.8771	8.3463
24	1.7723	2.9133	6.3283	8.8033

หมายเหตุ <sup>1</sup> คำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรและความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ค: ภาพผนวกที่ ค1)

ตารางผนวกที่ ก2 จดณพศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ CGTase แบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์

*B.circulans* TISTR 97 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_{18}$ )

จำนวนการ ทดลอง	ชุดที่ 1		ชุดที่ 2		ชุดที่ 3	
	พารามิเตอร์		พารามิเตอร์		พารามิเตอร์	
	DE	Q <sub>DE</sub>	DE	Q <sub>DE</sub>	DE	Q <sub>DE</sub>
1	5.550	0.555	5.677	0.568	5.401	0.540
2	5.232	0.436	5.340	0.445	5.230	0.436
3	6.539	0.467	6.865	0.490	6.353	0.454
4	4.430	0.316	3.016	0.215	4.994	0.357
5	7.125	0.713	7.295	0.730	6.408	0.641
6	6.798	0.566	6.190	0.516	6.389	0.532
7	7.657	0.547	7.883	0.563	6.985	0.499
8	6.986	0.699	7.320	0.732	7.343	0.734
9	7.562	0.630	7.567	0.631	7.458	0.622
10	6.022	0.602	6.483	0.648	6.714	0.671
11	6.828	0.569	6.186	0.515	7.497	0.625
12	6.707	0.479	8.256	0.590	6.252	0.447
13	7.459	0.622	6.992	0.583	7.348	0.612
14	6.063	0.433	5.714	0.408	6.873	0.491
15	8.455	0.845	6.382	0.638	5.677	0.568
16	7.549	0.629	6.799	0.567	7.910	0.659
17	6.350	0.454	7.143	0.510	6.368	0.455
18	7.230	0.723	7.158	0.716	7.009	0.701

ตารางผนวกที่ ก3 ระดับของปัจจัยควบคุมในการผลิตเอนไซม์ CGTase แบบเบ็ดเสร็จโดยเซลล์  
*B.circulans* TISTR 97 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_{18}$ )

ลำดับ การ ทดลอง	ปัจจัยที่ทำการควบคุมในการทดลอง								DE	$Q_{DE}$
	A	B	C	D	E	F	G	H	(average)	(average)
1	8	10	5	10	1	200	9	10	5.543	0.554
2	8	10	10	12.5	2	250	9.5	12	5.267	0.439
3	8	10	15	15	3	300	10	14	6.586	0.47
4	8	15	5	10	2	250	10	14	4.146	0.296
5	8	15	10	12.5	3	300	9	10	6.943	0.694
6	8	15	15	15	1	100	9.5	12	6.459	0.538
7	8	20	5	12.5	1	300	9.5	14	7.509	0.536
8	8	20	10	15	2	200	10	10	7.216	0.722
9	8	20	15	10	3	250	9	12	7.529	0.627
10	10	10	5	15	3	250	9.5	12	6.407	0.641
11	10	10	10	10	1	300	10	14	6.837	0.57
12	10	10	15	12.5	2	100	9	10	7.072	0.505
13	10	15	5	12.5	3	100	10	14	7.266	0.606
14	10	15	10	15	1	250	9	10	6.217	0.444
15	10	15	15	10	2	300	9.5	12	6.838	0.684
16	10	20	5	15	2	300	9	12	7.419	0.618
17	10	20	10	10	3	200	9.5	14	6.620	0.473
18	10	20	15	12.5	1	250	10	10	7.132	0.713

ตารางผนวกที่ ก4 จนวนผลศาสตร์ของการผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์  
CGTase จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_9$ )

การ ทดลอง	ชุดที่ 1			ชุดที่ 2			ชุดที่ 3		
	$C_p$	$Y_{p/s}$	$Q_p$	$C_p$	$Y_{p/s}$	$Q_p$	$C_p$	$Y_{p/s}$	$Q_p$
1	2.020	0.376	0.673	0.977	0.225	0.326	1.273	0.280	0.424
2	4.603	0.418	0.767	3.726	0.331	0.621	3.792	0.335	0.632
3	9.647	0.577	1.072	6.232	0.374	0.692	6.919	0.434	0.769
4	3.659	0.331	0.610	4.289	0.351	0.715	5.429	0.432	0.905
5	9.532	0.427	1.059	10.761	0.488	1.196	10.146	0.463	1.127
6	6.850	0.418	2.283	5.414	0.303	1.805	4.352	0.248	1.451
7	4.567	0.185	0.507	4.687	0.190	0.521	4.446	0.271	0.494
8	9.415	0.411	3.138	9.325	0.419	3.108	8.619	0.374	2.873
9	14.861	0.469	2.477	12.529	0.396	2.088	11.387	0.350	1.898

ตารางผนวกที่ ก5 การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์ CGTase จากการ  
ออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ( $L_9$ ) ชุดที่ 1

จำนวนการทดลอง	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)					สัปดาห์ที่ใช้ไป <sup>1</sup>
	ไซโคลเด็กซ์ทริน				รวม	
	แอลฟา	บีตา	แกมมา	รวม		
1	0.039	1.786	0.194	2.020	5.374	
2	0.173	3.439	0.991	4.603	11.019	
3	0.606	6.891	2.150	9.647	16.712	
4	0.102	2.877	0.679	3.659	11.056	
5	0.663	7.342	1.526	9.532	22.344	

ตารางผนวกที่ ก5 (ต่อ)

จำนวนการทดลอง	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				สัปดาห์ที่ใช้ไป <sup>1</sup>
	ไซโคลเด็กซ์ทริน				
	แอลฟา	บีตา	แกมมา	รวม	
6	0.227	5.169	1.454	6.850	16.405
7	0.236	3.938	0.392	4.567	24.638
8	0.351	7.278	1.787	9.415	22.921
9	1.827	10.904	2.129	14.861	31.657

หมายเหตุ<sup>1</sup> จำนวนจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรและความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ค: ภาพผนวกที่ ค1)

ตารางผนวกที่ ก6 การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์ CGTase จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ (L<sub>9</sub>) ชุดที่ 2

จำนวนการทดลอง	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				สัปดาห์ที่ใช้ไป <sup>1</sup>
	ไซโคลเด็กซ์ทริน				
	แอลฟา	บีตา	แกมมา	รวม	
1	0.000	0.977	0.000	0.977	4.344
2	0.081	3.025	0.619	3.726	11.264
3	0.217	4.945	1.070	6.232	16.663
4	0.126	3.010	1.153	4.289	12.233
5	0.646	7.898	2.217	10.761	22.049
6	0.119	4.154	1.141	5.414	17.877
7	0.411	3.492	0.785	4.687	24.638

## ตารางผนวกที่ ก6 (ต่อ)

จำนวนการทดลอง	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				สัปดาห์ที่ใช้ไป <sup>1</sup>
	ไซโคลเด็กซ์ทริน				
	แอลฟา	บีตา	แกมมา	รวม	
8	0.556	6.927	1.842	9.325	22.233
9	0.846	9.718	1.965	12.529	31.657

หมายเหตุ <sup>1</sup> คำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรและความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ค: ภาพผนวกที่ ค1)

ตารางภาคผนวกที่ ก7 การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินแบบเบ็ดเสร็จโดยเอนไซม์ CGTase จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ (L<sub>9</sub>) ชุดที่ 3

จำนวนการทดลอง	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				สัปดาห์ที่ใช้ไป <sup>1</sup>
	ไซโคลเด็กซ์ทริน				
	แอลฟา	บีตา	แกมมา	รวม	
1	0.041	1.079	0.153	1.273	4.540
2	0.122	3.341	0.329	3.792	11.313
3	0.398	5.138	1.383	6.919	15.926
4	0.289	3.697	1.443	5.429	12.577
5	0.529	9.270	4.069	13.868	21.902
6	0.307	3.522	0.523	4.352	17.583
7	0.062	4.384	0.000	4.446	16.393
8	1.133	6.182	1.304	8.619	23.019
9	0.530	8.594	2.263	11.387	32.491

หมายเหตุ <sup>1</sup> คำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรและความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ค: ภาพผนวกที่ ค1)

**ภาคผนวก ข**  
**การประมาณค่าพารามิเตอร์**

ตารางผนวกที่ ข1 สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทริน ไกลโคซิลทรานเฟอเรส (CGTase) แบบเบ็ดเสร็จ

พารามิเตอร์	สูตรการคำนวณ
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ $\mu$ (ชั่วโมง <sup>-1</sup> )	$\mu = \text{Slope of plot between } \ln x \text{ and cultivation time}$
ผลได้ของเซลล์ ( $Y_{X/S}$ , กรัมต่อกรัม)	$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$
ผลได้ของ starch dextrinizing ( $Y_{DE/S}$ , หน่วยต่อกรัม)	$Y_{DE/S} = \frac{DE_t - DE_0}{S_0 - S_t}$
อัตราการผลิตจำเพาะ ( $Q_{DE}$ , หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Q_{DE} = \frac{dDE}{dT} = \left( \frac{DE_t - DE_0}{t - t_0} \right)$
อัตราจำเพาะของการใช้แป้ง ( $q_s$ , กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)	$q_s = \frac{1}{X} \left( \frac{dS}{dt} \right) = \frac{1}{\left( \frac{X_t + X_0}{2} \right)} \left( \frac{S_0 - S_t}{t - t_0} \right)$

หมายเหตุ เมื่อ X, S, P และ t หมายถึง ความเข้มข้นเซลล์ แป้งมันสำปะหลัง กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase มีหน่วยเท่ากับ กรัม/ลิตร และ เวลา มีหน่วยเท่ากับ ชั่วโมง ตามลำดับ ตัวห้อย 0 และ t หมายถึง ที่เวลาเริ่มต้น และที่เวลาใด ๆ ตามลำดับ

### การคำนวณในการออกแบบโดยวิธีทากูชิ (Roy,2001)

1. ค่า MSD เมื่อ QC=B (Bigger is better)

$$MSD = [ (1/y_1)^2 + (1/y_2)^2 + \dots + (1/y_n)^2 ] / n$$

2. อัตราส่วนที่ได้จากการเปลี่ยนรูปค่าตอบสนองของผลการทดลอง

$$S/N = -10 \log_{10} MSD$$

3. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N-1}}$$

4. เปอร์เซ็นต์อิทธิพล (% main effect)

$$\% \text{ Main effect} = \frac{(\text{Max} - \text{Min})}{\text{Max}} * 100$$

5. ค่า Factor sum of square ( $SS_{\text{Factor}}$ )

$$SS_{\text{Factor}} = \frac{N * r}{L} \sum_{k=1}^L (\bar{y}_k - \bar{y})^2$$

6. ค่า Error sum of square ( $SS_{\text{Error}}$ )

$$SS_{\text{ERROR}} = \sum (SD)^2 * (r-1)$$

7. ค่าองศาอิสระของแฟกเตอร์ ( $DOF_{\text{Factor}}$ )

$$DOF_{\text{Factor}} = L-1$$

8. ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด ( $DOF_{\text{Error}}$ )

$$DOF_{\text{ERROR}} = N(r-1)$$

9. ค่าองศาอิสระรวม ( $DOF_{\text{Total}}$ )

$$DOF_{\text{Total}} = (N*r)-1$$

10. ค่าความแปรปรวน (variance, Var)

$$\text{Var} = \frac{SS}{DOF}$$

11. ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (variance ratio,  $F_{\text{ratio}}$ )

$$F_{\text{ratio}} = \frac{\text{Var}}{\text{Var}_{\text{Error}}}$$

12. ค่าความเชื่อมั่น (confidence)

$$\text{Confidence} = 100 - F_{\text{DIST}}(F_{\text{ratio}}, DOF_{\text{Factor}}, DOF_{\text{Error}}) * 100$$

## 13. การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

(result expected at optimum condition,  $Y_{OPT}$ )

$$Y_{OPT} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_2 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T}) + (\bar{D}_3 - \bar{T}) \\ + (\bar{E}_3 - \bar{T}) + (\bar{F}_3 - \bar{T}) + (\bar{G}_3 - \bar{T}) + (\bar{H}_2 - \bar{T})$$

14. ค่าประมาณ  $Y_{expected}$ 

$$Y_{expected} = (MSD)^{1/2}$$

หมายเหตุ FDIST เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปในโปรแกรม excel โดยเป็นความสัมพันธ์ระหว่างค่า Fratio,  $DOF_{Factor}$ ,  $DOF_{Error}$  โดย  $y$ ,  $y$ ,  $N$ ,  $r$ ,  $L$ ,  $k$  และ  $T$  หมายถึง ผลการทดลองค่าเฉลี่ยของการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของแฟกเตอร์ ระดับของแฟกเตอร์ และ ค่าเฉลี่ยของผลรวมของการทดลองทั้งหมด ตามลำดับ และ 2 A , 2 B , 3 C , 3 D , 3 E , 3 F , 3 G และ 2 H หมายถึง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของการทดลองของแต่ละระดับของแฟกเตอร์ที่เหมาะสมที่ได้

ตัวอย่างการคำนวณค่า  $Q_{DE}$ 

ค่า dextrinizing activity พิจารณาข้อมูลจากการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1 โดยคำนวณจากอัตราส่วนของค่า dextrinizing activity ต่อเวลา

พิจารณาที่เวลา 10 ชั่วโมง

$$5.550/10 \\ = 0.550$$

พิจารณาที่เวลา 12 ชั่วโมง

$$5.232/12 \\ = 0.5232$$

พิจารณาที่เวลา 14 ชั่วโมง

$$\begin{aligned} & 6.539/14 \\ & = 0.6539 \end{aligned}$$

### ตัวอย่างการคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทากูชิ

ค่า dextrinizing activity พิจารณาข้อมูลจากการทดลองในภาคผนวก ก: ตารางผนวกที่ ก1

จากสูตรที่ 1

$$\begin{aligned} \text{MSD} &= [(1/y_1)^2 + (1/y_2)^2 + \dots + (1/y_n)^2] / n \\ &= [(1/5.550)^2 + (1/5.677)^2 + (1/5.550)^2] / 3 \\ &= 0.033 \end{aligned}$$

จากสูตรที่ 2

$$\begin{aligned} \text{S/N} &= -10 \log_{10} \text{MSD} \\ &= -10 \log_{10}(0.033) \\ &= 14.869 \text{ dB} \end{aligned}$$

เปรียบเทียบค่า S/N Ratio โดยพิจารณาจากค่า S/N Ratio ที่สูงสุดของแต่ละปัจจัยเป็นระดับที่เหมาะสมในการทดลอง จากนั้นนำค่าผลการทดลองของระดับที่เหมาะสมมาทำการประมาณค่า

จากสูตรที่ 13

$$\begin{aligned} Y_{\text{OPT}} &= \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_2 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T}) + (\bar{D}_3 - \bar{T}) \\ &\quad + (\bar{E}_3 - \bar{T}) + (\bar{F}_3 - \bar{T}) + (\bar{G}_3 - \bar{T}) + (\bar{H}_2 - \bar{T}) \\ &= 20.132 \end{aligned}$$

จากสูตรที่ 2

$$\begin{aligned} \text{MSD} &= 10^{-(S/N)/10} \\ &= 10^{-(20.132)} \\ &= 0.00955 \end{aligned}$$

จากสูตรที่ 14

$$\begin{aligned} Y_{\text{expected}} &= (\text{MSD})^{1/2} \\ &= (0.00955)^{(1/2)} \\ &= 10.23 \end{aligned}$$

**ภาคผนวก ก**

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีการวิเคราะห์

## 1. สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

สารเคมี

อาหารสูตรโฮริโกชิ (Horikoshi medium)

Starch solution	10	กรัมต่อลิตร
yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
peptone	5	กรัมต่อลิตร
$K_2HPO_4$	1	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$Na_2CO_3$	10	กรัมต่อลิตร

วิธีการ

1. ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
2. ปรับ pH เท่ากับ 10.0 ด้วยสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์
3. นำไปละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันในเครื่องไมโครเวฟ เป็นเวลา 2-3 นาที หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Kim, *et al.*, 1997)

### การหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีอบแห้ง

1. เตรียมหลอดทดลองขนาดเล็ก ขนาด 12x100 มิลลิเมตร ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแน่นอน
2. คูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว นำมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที
3. เทส่วนใสทิ้ง และนำเซลล์ที่ได้ไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ทิ้งให้เย็นในเคสเก็ตเตอร์เป็นเวลา 30 นาที และชั่งน้ำหนักพร้อมหลอดทดลอง จากนั้นนำไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จากสมการ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดลองและน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดลอง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

### การประมาณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งโดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

#### การวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ในช่วงการเติบโตที่อุดมเจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราเจือจางที่เหมาะสมประมาณ 4-5 อัตราเจือจาง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

## การวิเคราะห์เอนไซม์ CGTase โดยวิธี Dextrinizing activity

### สารเคมี

1. ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.5
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์
3. ไอโอดีนความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ในโพแทสเซียมไอโอไดด์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์

### วิธีการ

1. ใส่น้ำตาลละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง 15x150 มิลลิเมตร ผสมกับสารละลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร pH 5.5
  2. นำสารผสมปฏิกิริยามาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที
  3. จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
  4. เติมไอโอดีนความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ในโพแทสเซียมไอโอไดด์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
  5. ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ starch-iodine complex ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
- กำหนดให้ กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) 1 หน่วย เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ ซึ่งทำให้เกิดการลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ของสีฟ้าจาก starch-iodine complex ที่ดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรต่อนาที (Higuti, *et al.* 2004)

## การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (สับสเทรต)

### สารเคมี

2. กรดแอซีติก ความเข้มข้น 2 นอ้มลต์
3. โปแทสเซียมไอโอไดด์ ความเข้มข้น 10%(w/v)
4. โปแทสเซียมไอโอเดต ความเข้มข้น 1/600 โมลาร์

### วิธีการ

สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ค1

**ตารางผนวกที่ ค1** การเตรียมสารละลายมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง

ความเข้มข้นของสารละลาย แป้งมันสำปะหลัง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายแป้งมันสำปะหลังที่มีความ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	สารละลาย บัฟเฟอร์บอเรต (มิลลิลิตร)
0	0	1.0
0.1	0.1	0.9
0.2	0.2	0.8
0.3	0.3	0.7
0.4	0.4	0.6
0.5	0.5	0.5
0.6	0.6	0.4

ดูดสารละลายแป้งมันสำปะหลังลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 2 หลอด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เติมกรดแอสซิติค ความเข้มข้น 2 นอร์มัลลี้ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร

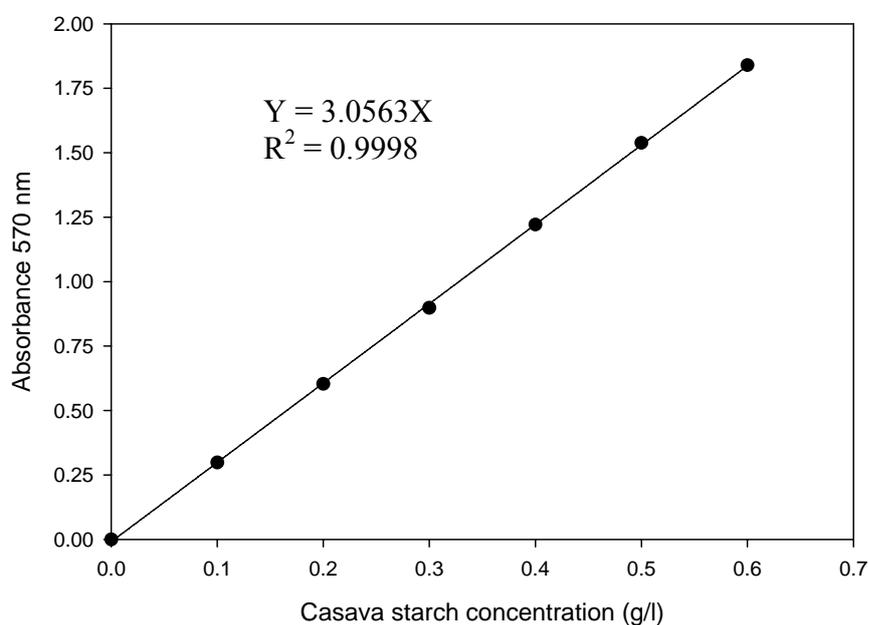
เติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ ความเข้มข้น 10%(w/v) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

เติมโพแทสเซียมไอโอเดต ความเข้มข้น 1/600 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

ทำการผสมกันด้วยเครื่องเขย่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลายแป้งมันสำปะหลัง ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับค่าความเข้มข้นของสารละลายแป้งมันสำปะหลัง พร้อมหาค่าความชันของกราฟ เส้นตรงดังภาพผนวกที่ ค1

กรณีของ Blank ดำเนินขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ๑1 กราฟสารละลายมาตรฐานแป้งมันสำปะหลัง

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งของตัวอย่าง

2.1 นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

2.2 ดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตัวอย่างละ 2 หลอด

2.3 ดำเนินการตามหัวข้อ 1.4-1.7

2.4 กรณีของ Blank ดำเนินขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

## 3. การคำนวณปริมาณแป้ง

$$\text{ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร} \times \text{อัตราเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

## การวิเคราะห์ไซโคลเด็กซ์ทริน

### สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานแอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน (Fluka)
2. สารละลายมาตรฐานบีตา-ไซโคลเด็กซ์ทริน (Fluka)
3. สารละลายมาตรฐานแกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน (Fluka)
4. Mobile phase acetonitrile กับน้ำในอัตราส่วน 75:25

### วิธีการ

#### สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายไซโคลเด็กซ์ทริน

เตรียมสารละลายไซโคลเด็กซ์ทรินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

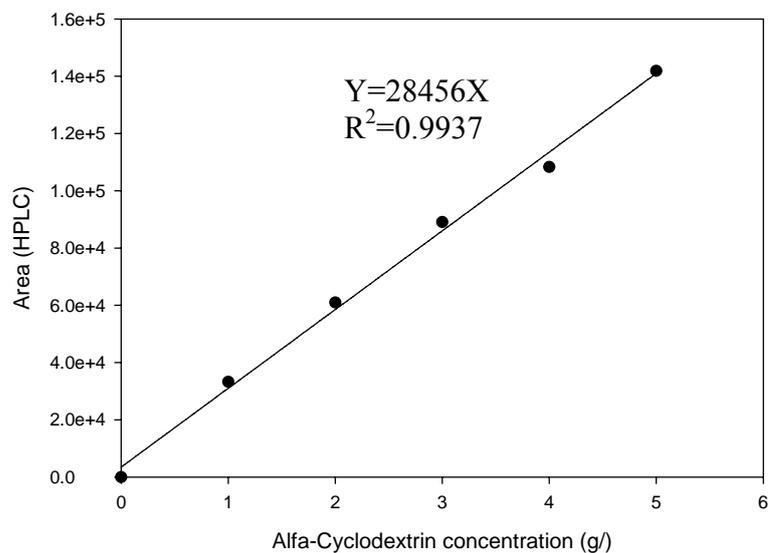
เตรียมสารละลายไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายไซโคลเด็กซ์ทรินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ค2

#### ตารางผนวกที่ ค2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโคลเด็กซ์ทริน

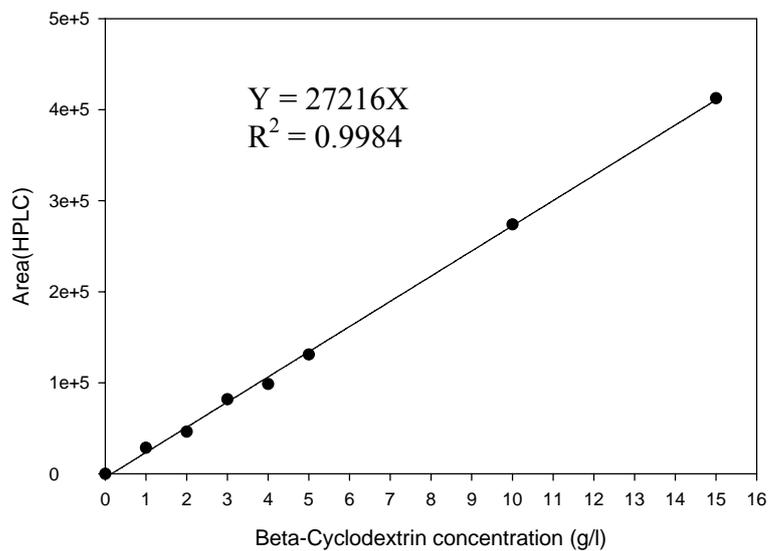
ความเข้มข้นของสารละลายไซโคลเด็กซ์ทริน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายไซโคลเด็กซ์ทรินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	สารละลายบัฟเฟอร์บอเรต (มิลลิลิตร)
0	0	5
1	1	4
2	2	3
3	3	2
4	4	1
5	5	0

ที่มา: Charoenlap *et al.*(2004)

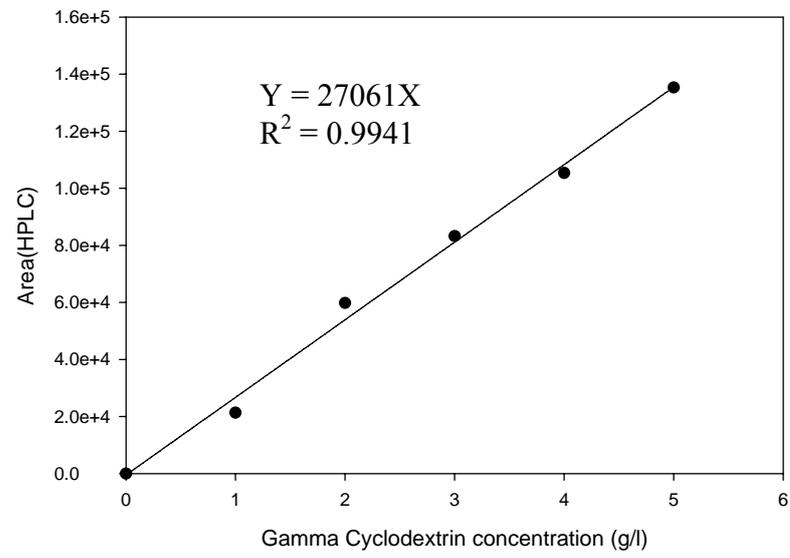
เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลายไซโคลเด็กซ์ทรินระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลายไซโคลเด็กซ์ทริน พร้อมหาค่าความชันของกราฟเส้นตรง ดังภาพผนวกที่ ค2



ภาพผนวกที่ ค2 กราฟสารละลายมาตรฐานของ แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน



ภาพผนวกที่ ค3 กราฟสารละลายมาตรฐานของบีตา-ไซโคลเด็กซ์ทริน



ภาพผนวกที่ ค4 กราฟสารละลายมาตรฐานของแกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน

ภาคผนวก ง  
จนพลศาสตร์ของเอนไซม์ดิบ

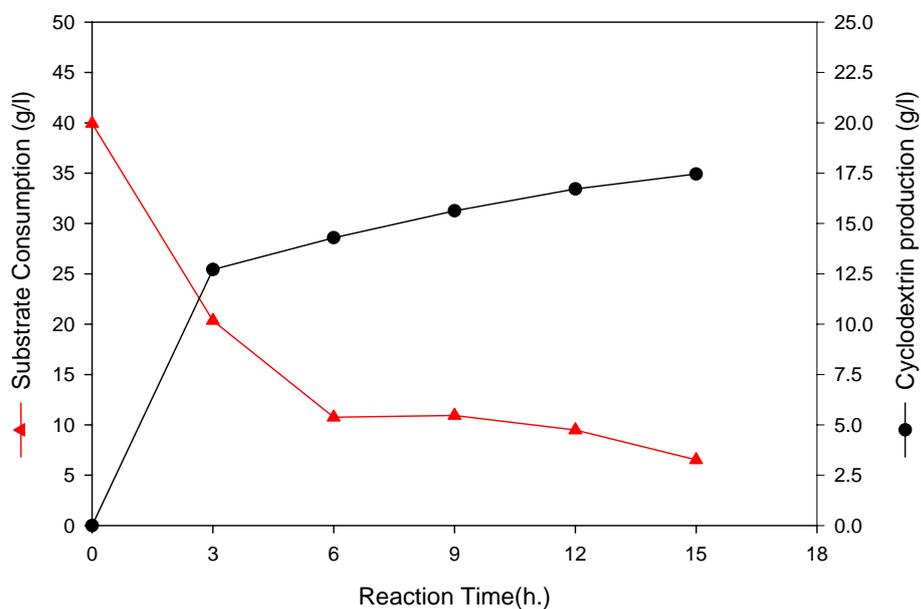
## การจนผลศาสตร์ของเอนไซม์ดิบจากปฏิกิริยาการผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน

### วิธีการ

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการยืนยันผลการทดลองในสภาวะความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ( $C_p$ ) มาทำการทดลองผลิตเอนไซม์โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์ 50 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต โดยทำปฏิกิริยาผสมระหว่างเอนไซม์ CGTase และแป้งมันสำปะหลัง มาผสมกันใน ฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร อัตราการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที pH 9.5 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในช่วงเวลาต่าง ๆ ประเมินค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินที่เกิดขึ้น และความเข้มข้นของสับสเตรตที่ลดลง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของค่าความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทริน ทำการผันแปรเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรตและเอนไซม์ ที่เวลา 0-15 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง

### ตารางผนวกที่ ๑1 การผลิตไซโคลเด็กซ์ทริน และสับสเตรตที่ถูกใช้ไปในช่วงเวลาต่าง ๆ

เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	สับสเตรตที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ไซโคลเด็กซ์ทรินที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)
0	39.926	0
3	20.343	12.709
6	10.748	14.290
9	10.920	15.627
12	9.472	16.708
15	6.528	17.454



ภาพผนวกที่ จ1 ความเข้มข้นของไซโคลเด็กซ์ทรินที่เกิดขึ้นและความเข้มข้นของสับสเตรตที่ลดลง  
ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 0-15 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ จ2 สับสเตรตที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาและอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา

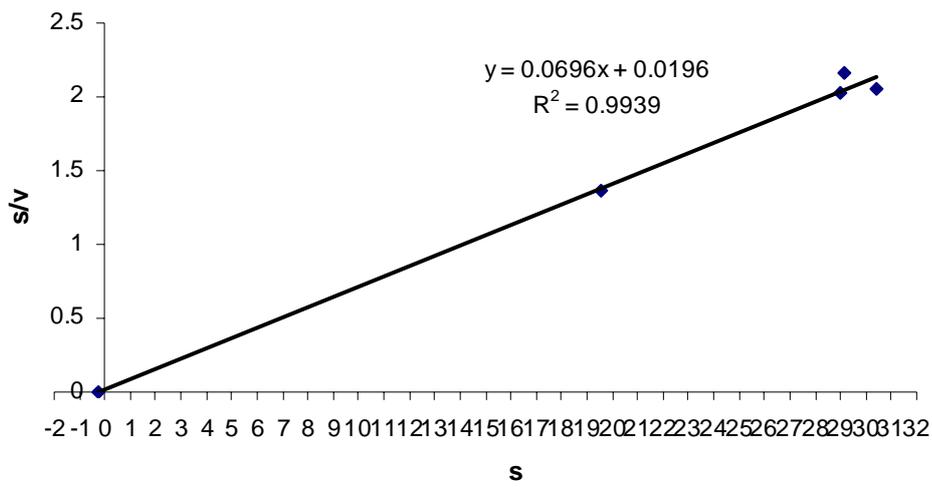
S (g/l)	19.582	29.177	29.005	30.453
V (g/1 h)	14.289	13.508	14.325	14.849

จากการเขียนกราฟ Lineweaver –Burk plot

$$1/v = (1/V_{max}) + (K_m/V_{max}) \cdot (1/s) \quad \text{—————} \quad (1)$$

สามารถเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $s$  และ  $s/v$  ดังภาพผนวกที่ จ2

$$s/v = (K_m/V_{max}) + (1/V_{max}) * S \quad \text{————— (2)}$$

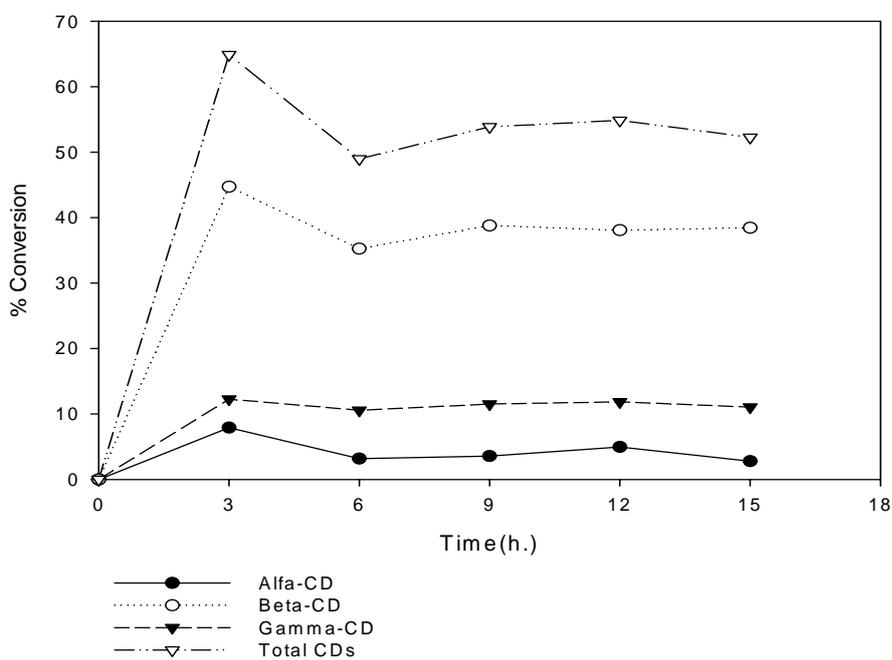


ภาพผนวกที่ จ2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $s$  กับ  $s/v$

จากการยืนยันผลการทดลอง การผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินด้วยเอนไซม์ CGTase โดยใช้วิธีการทากูชิ สามารถประมาณค่า  $V_{max}$  และค่า  $K_m$  จากการทดลอง พบว่าได้ค่า  $V_{max}$  และค่า  $K_m$  ได้เท่ากับ 14.367 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และ 0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่า  $V_{max}$  คือ ความเร็วสูงสุดของการใช้สับสเตรต เป็นการวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเอนไซม์ที่มีอยู่ ส่วนค่า  $K_m$  เป็นค่าที่แสดงสัมพรรคภาพการจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรต พบว่า ถ้า  $K_m$  มีค่าน้อย ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ดี ในทางกลับกันถ้า  $K_m$  มีค่ามากปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้น้อย ค่า  $V_{max}$  และค่า  $K_m$  สามารถหาได้จากการพลอตกราฟระหว่างอัตราการใช้สับสเตรตที่ต่อค่าเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ตารางผนวกที่ ๑3 การเปลี่ยนสับสเทรตเปลี่ยนเป็นไซโคลเด็กซ์ทรินที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	%Conversion (g/g)			
	แอลฟา	บีตา	แกมมา	รวม
	ไซโคลเด็กซ์ทริน (g/g)	ไซโคลเด็กซ์ทริน (g/g)	ไซโคลเด็กซ์ทริน (g/g)	
0	0	0	0	0
3	7.910	44.729	12.262	64.901
6	3.168	35.250	10.559	48.976
9	3.574	38.787	11.514	53.874
12	4.943	38.072	11.847	54.862
15	2.792	38.432	11.035	52.260

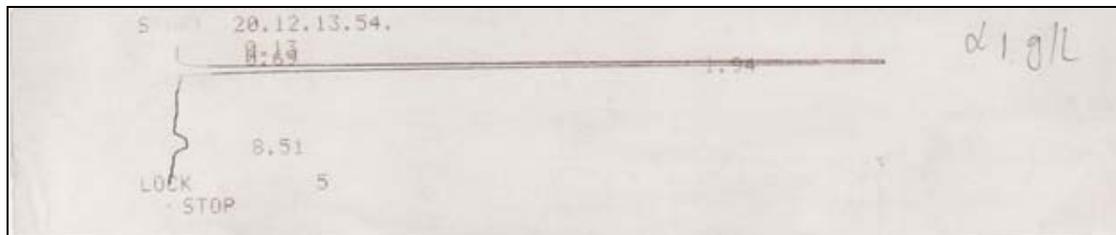


ภาพผนวกที่ ๑3 %การเปลี่ยนสับสเทรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

ในการทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเทรตและเอนไซม์ พบว่าสับสเทรตเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งสามารถคำนวณสัดส่วนการเปลี่ยนได้จาก ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นต่อปริมาณสับสเทรตที่ถูกใช้ไป ในการทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเทรตและเอนไซม์ จากสับสเทรต 100 กรัม สามารถเปลี่ยนเป็นไซโคลเด็กซ์ทริน 64.90 กรัม ภายในเวลา 3 ชั่วโมง และอัตราการเปลี่ยนจากสับสเทรตเปลี่ยนเป็นไซโคลเด็กซ์ทรินที่ชั่วโมงที่ 3 มีค่าสูงสุด ซึ่งมาจากอัตราเร็วเริ่มต้นของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ที่ 3 ชั่วโมงแรกมีค่าสูง หลังจากนั้นอัตราการเปลี่ยนสับสเทรตเปลี่ยนเป็นไซโคลเด็กซ์ทรินค่อย ๆ ลดลง หลังจากชั่วโมงที่ 3 และเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนการเปลี่ยนจากสับสเทรตเป็นไซโคลเด็กซ์ทริน พบว่าสับสเทรต 100 กรัม ส่วนใหญ่เปลี่ยนไปเป็นบีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินประมาณ 38 กรัม เปลี่ยนไปเป็นแกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทรินประมาณ 11 กรัม และเปลี่ยนไปเป็นแอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทรินประมาณ 4 กรัม

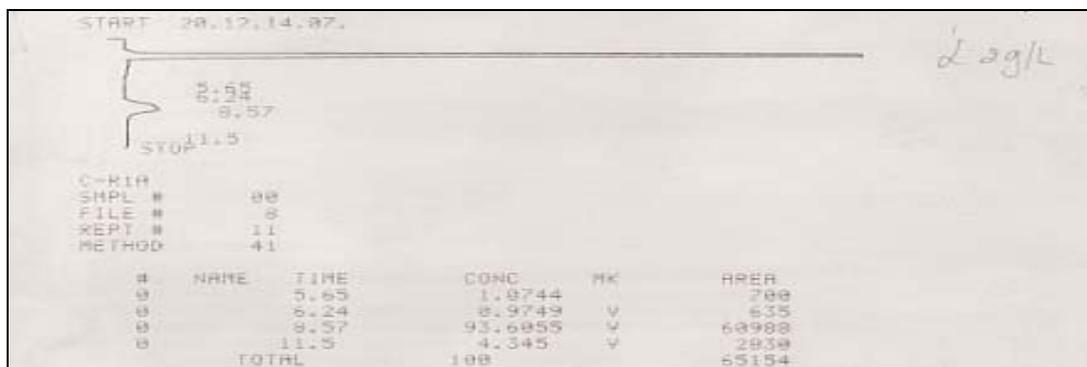
ภาคผนวก จ  
โครมาโตแกรม HPLC

สารละลายมาตรฐานไซโคลเด็กซ์ทริน



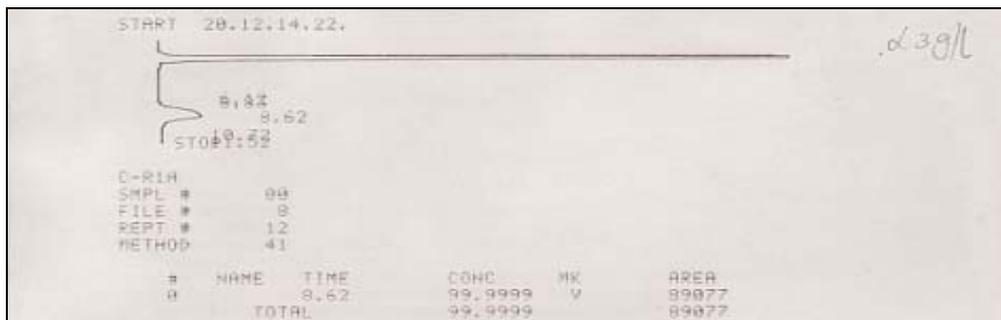
C-R1A					
SAMPL #	00				
FILE #	8				
REPT #	10				
METHOD	41				
#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.94	93.2183	V	456878
0		9.51	6.7816		33238
	TOTAL		100		490116

แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

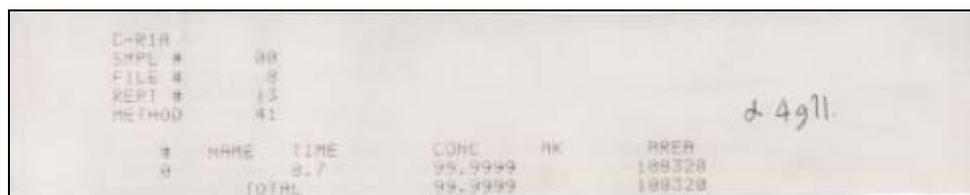
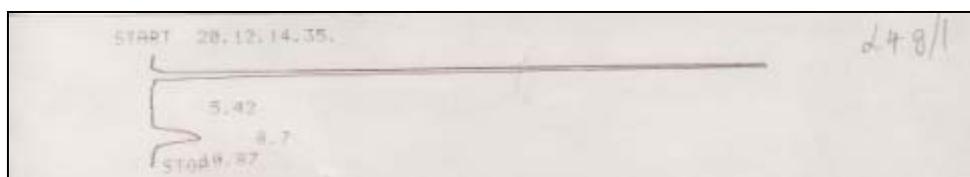


C-R1A					
SAMPL #	00				
FILE #	8				
REPT #	11				
METHOD	41				
#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		5.65	1.0744		200
0		8.24	8.9749	V	635
0		9.57	93.6055	V	60908
0		11.5	4.345	V	2930
	TOTAL		100		65154

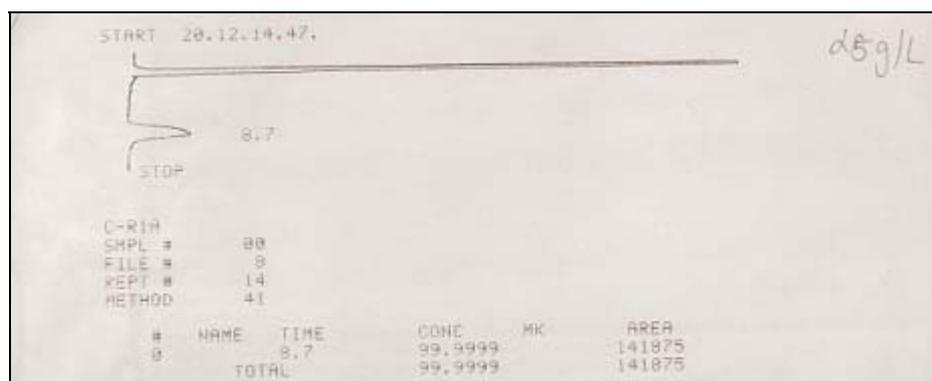
แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



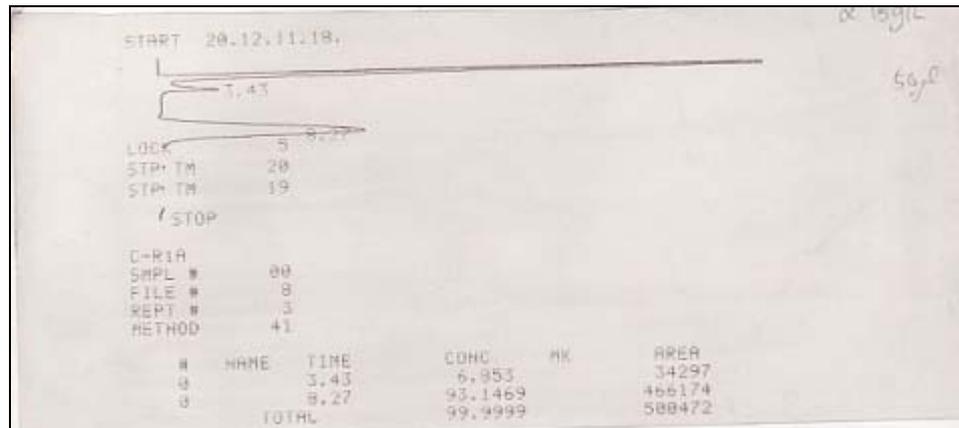
แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



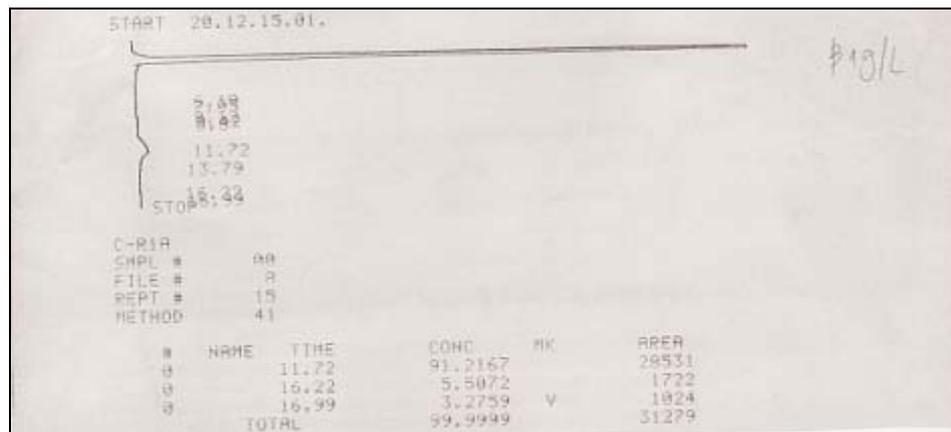
แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



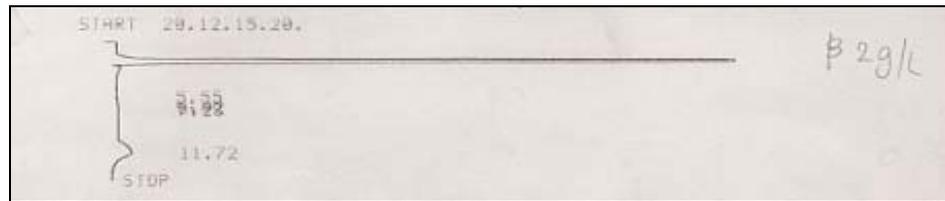
แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



```

C-RIA
SNPL #      00
FILE #       8
REPT #      16
METHOD      41
  
```

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		6.28	2.5781	V	1222
0		11.72	97.4218		46201
	TOTAL		99.9999		47424

บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

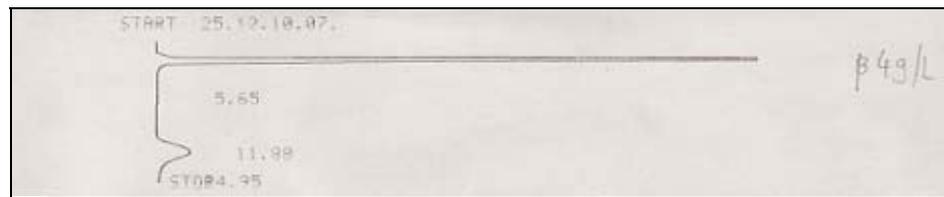


```

C-RIA
SNPL #      00
FILE #       8
REPT #      17
METHOD      41
  
```

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		11.8	98.9743		81717
0		17.03	1.8256		846
	TOTAL		100		82564

บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



C-R1A

SAMPL # 00

FILE # 8

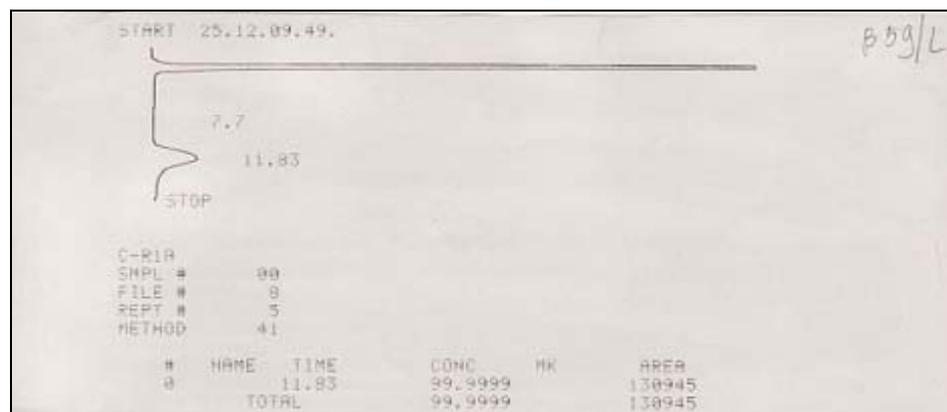
REPT # 5

METHOD 41

$\beta$  4g/L.

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		11.88	99.9999		98547
	TOTAL		99.9999		98547

บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



C-R1A

SAMPL # 00

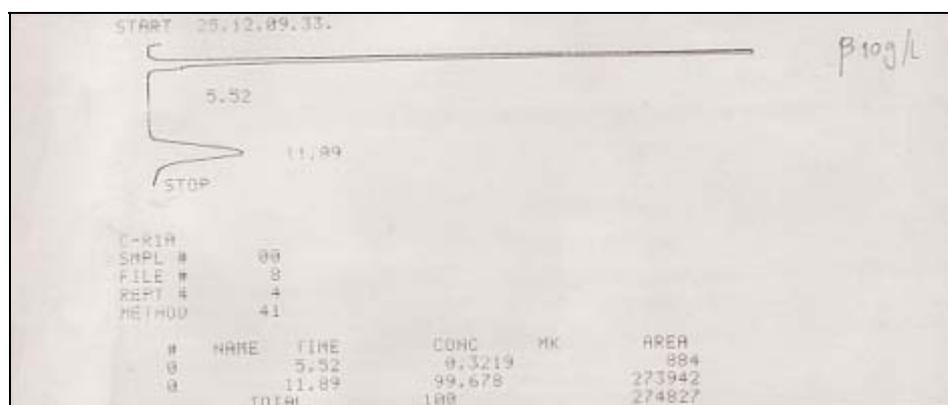
FILE # 8

REPT # 5

METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		11.83	99.9999		130945
	TOTAL		99.9999		130945

บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



C-R1A

SAMPL # 00

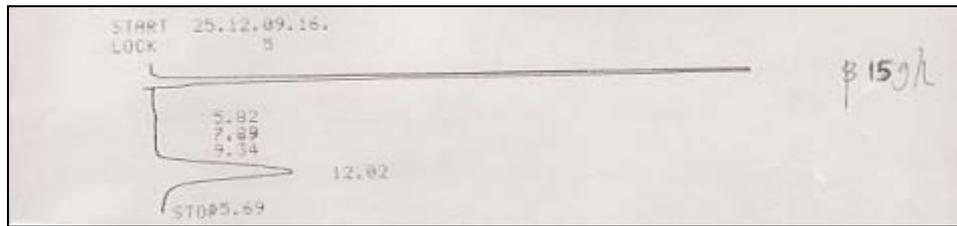
FILE # 8

REPT # 4

METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		5.52	9.3219		884
0		11.89	99.678		273942
	TOTAL		100		274827

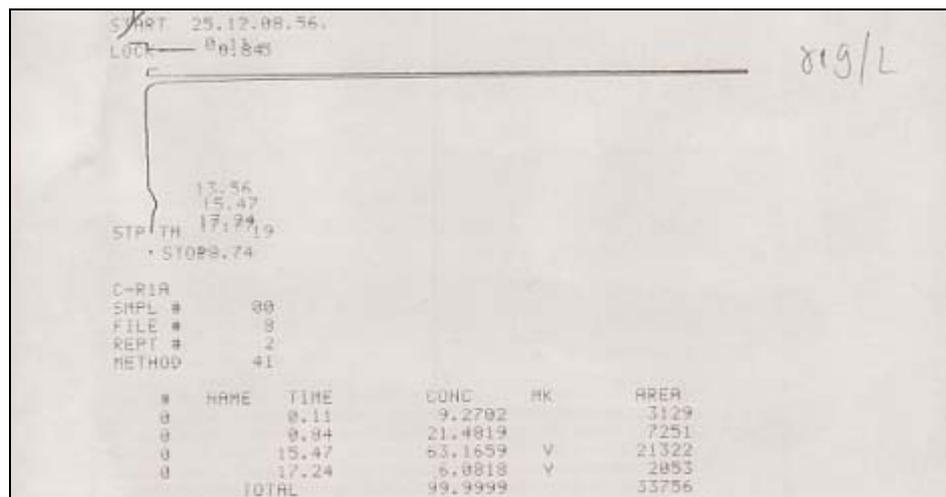
บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		12.02	99.9999	V	412503
	TOTAL		99.9999		412503

C-R1A  
SAMPL # 00  
FILE # 0  
REPT # 3  
METHOD 41

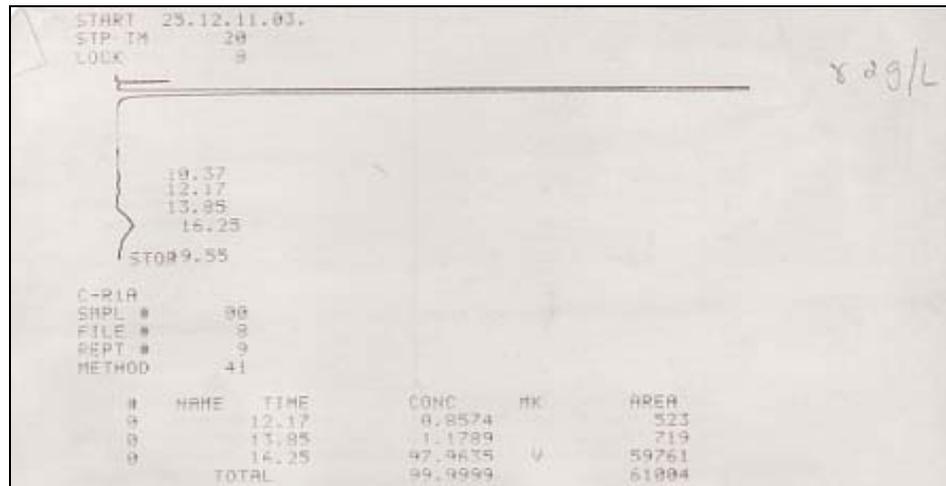
บิตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



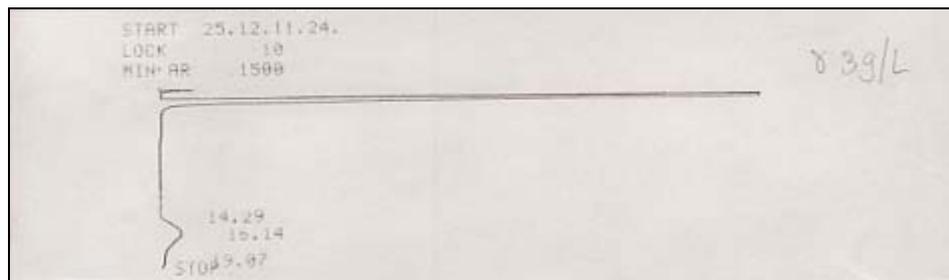
#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		0.11	9.2702		3129
0		0.84	21.4819		7251
0		15.47	63.1659	V	21322
0		17.24	6.0818	V	2053
	TOTAL		99.9999		33756

C-R1A  
SAMPL # 00  
FILE # 0  
REPT # 2  
METHOD 41

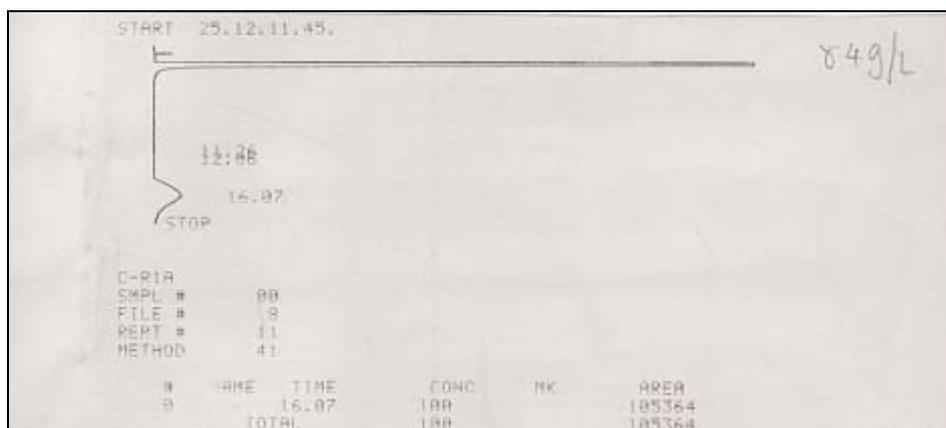
แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



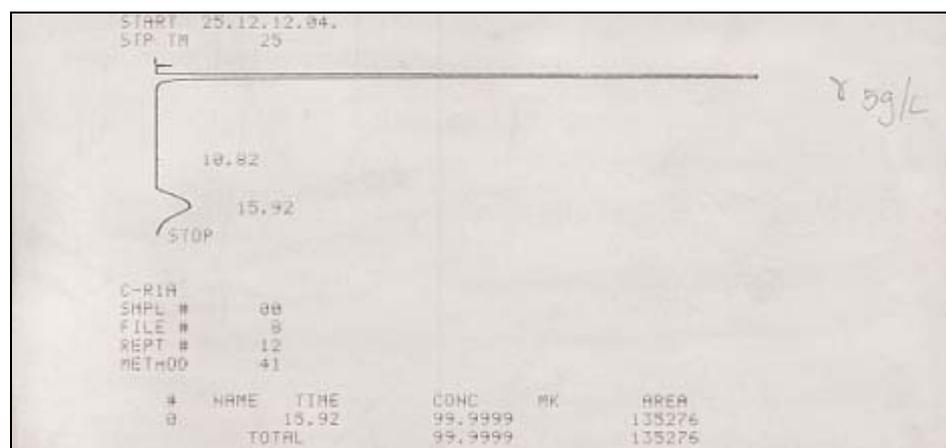
แกมมา-ไฮโคเลต็กซ์ทรินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



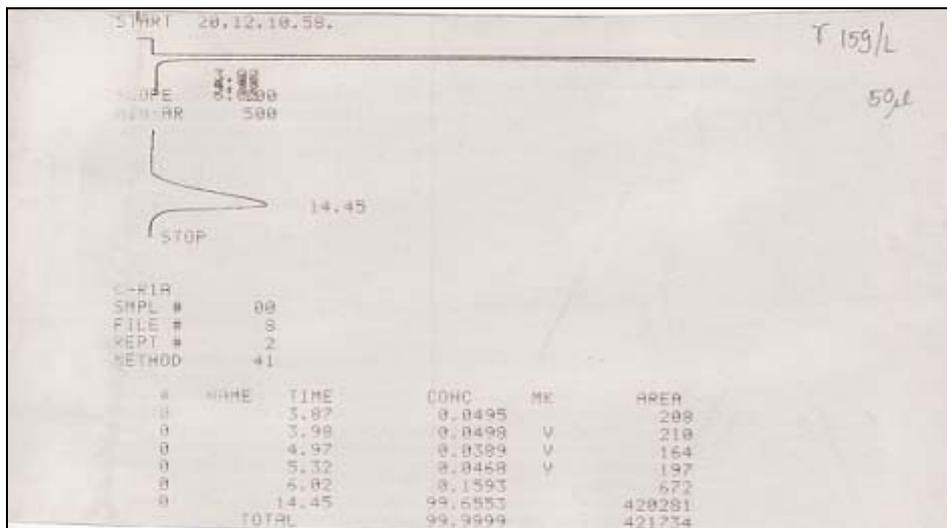
แกมมา-ไฮโคเลต็กซ์ทรินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

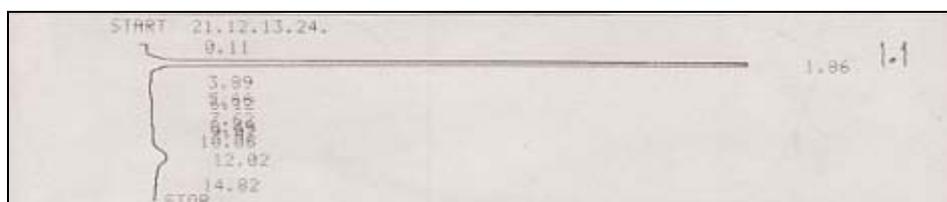


แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทรินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

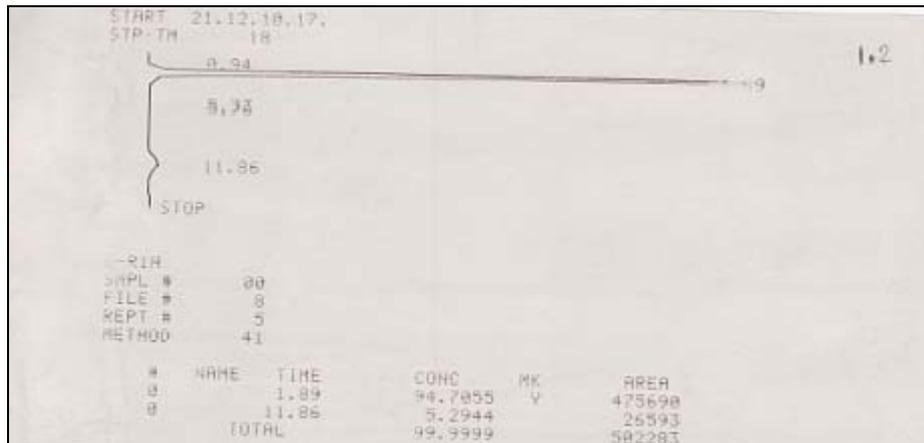
สารผสมปฏิกิริยาของแต่ละทรีตเมนต์



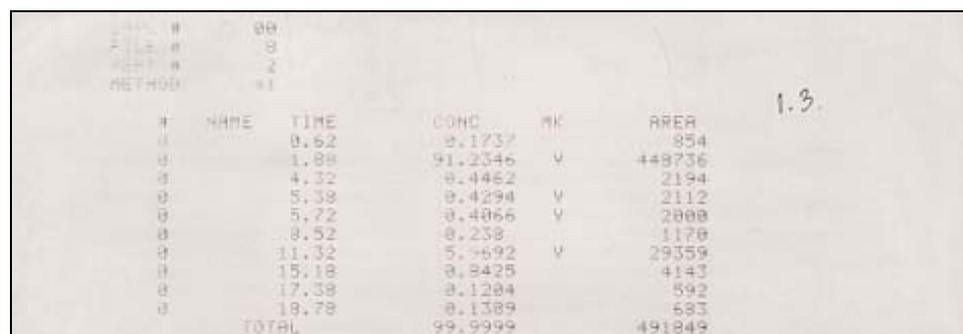
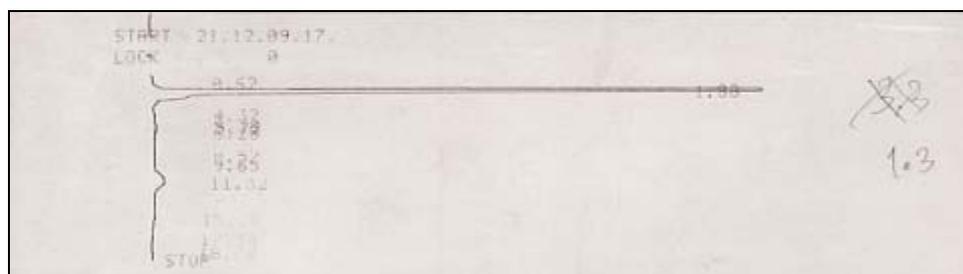
#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		0.11	0.1707		1050
0		1.86	90.0912		554328
0		3.89	0.1194	V	735
0		5.55	0.2666		1640
0		8.49	0.1823	V	1122
0		9.02	0.2445	V	1504
0		10.06	0.171	V	1052
0		12.02	7.8996	V	48606
0		14.82	0.0542	V	5256
		TOTAL	100		615296

C-HIA  
SMPL # 00  
FILE # 8  
REPT # 14  
METHOD 41

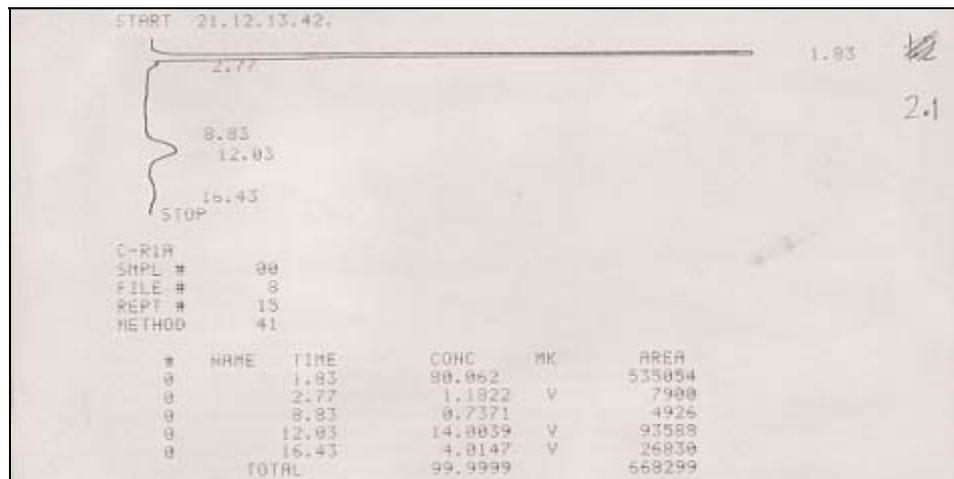
สารผสมปฏิกิริยาทรีตเมนต์ที่ 1.1



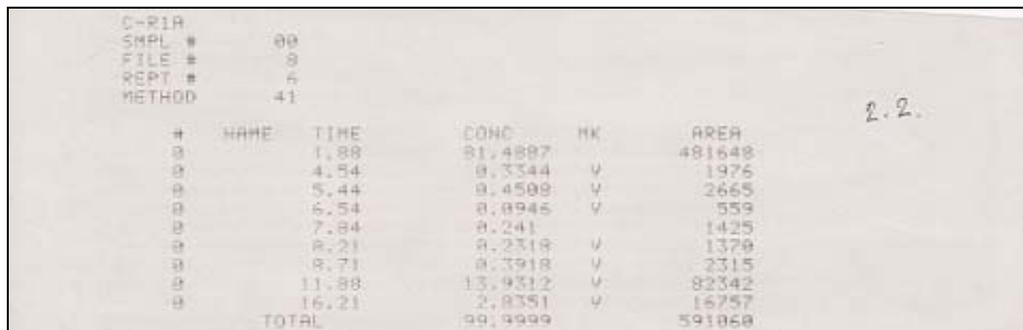
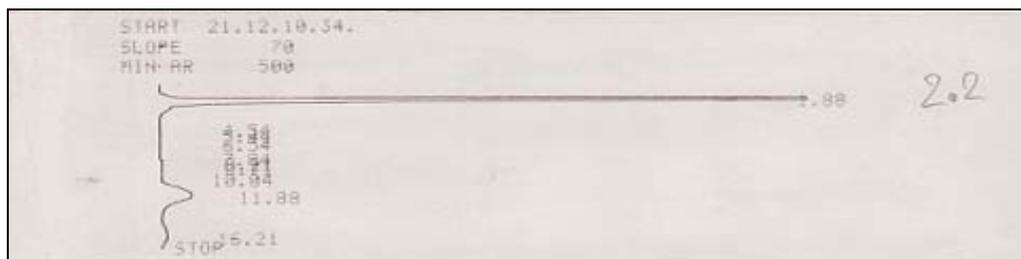
สารผสมปฏิกิริยาทรัดเมนต์ที่ 1.2



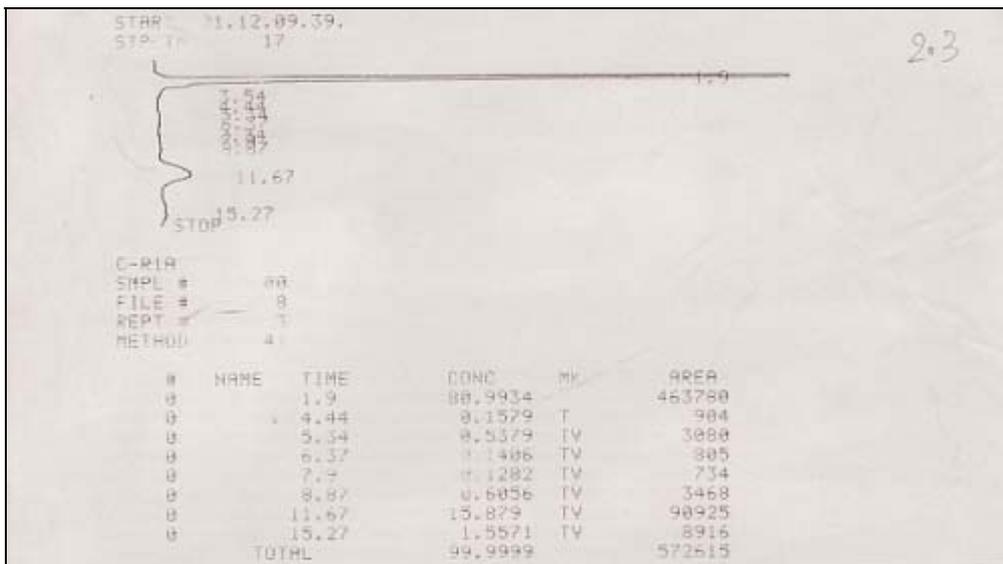
สารผสมปฏิกิริยาทรัดเมนต์ที่ 1.3



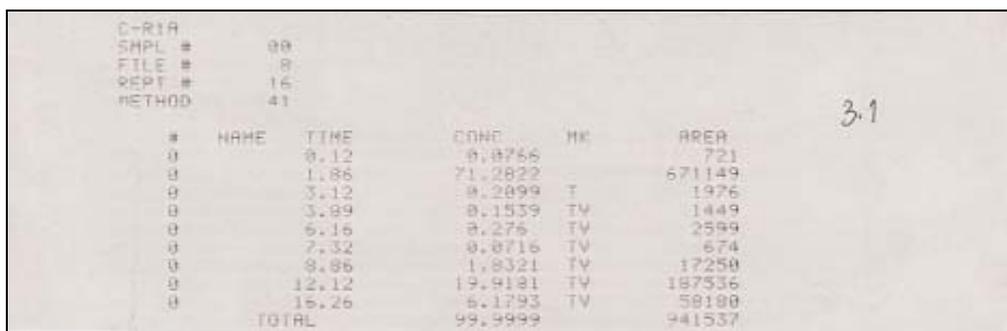
สารผสมปฏิบัติการที่ 2.1



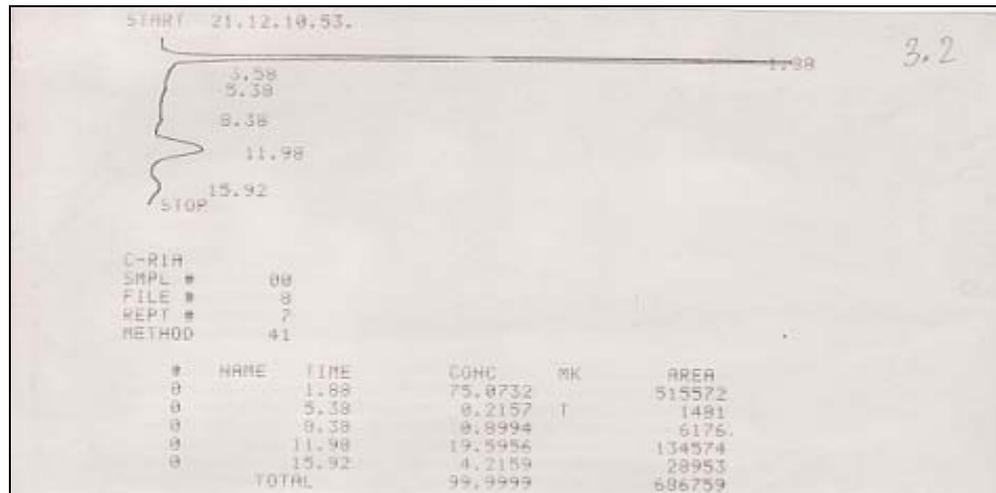
สารผสมปฏิบัติการที่ 2.2



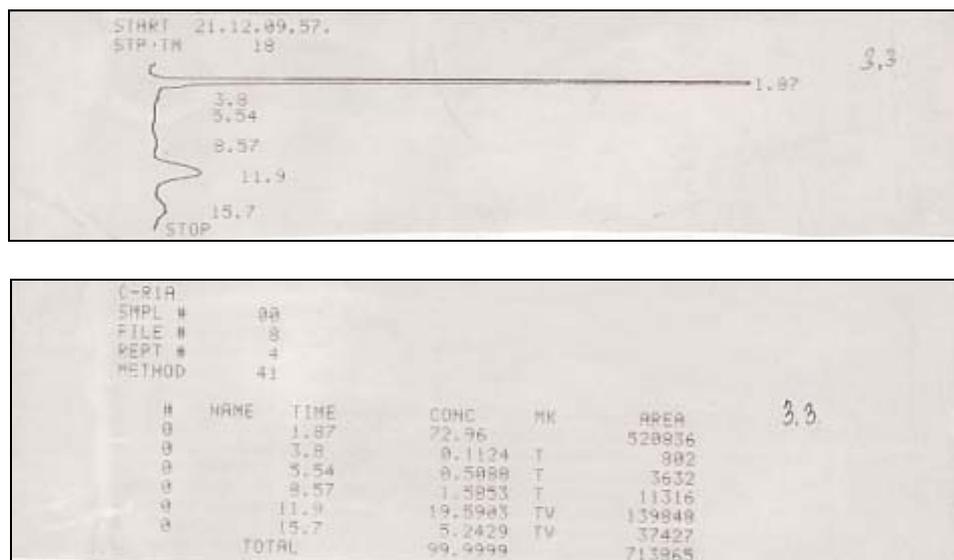
สารผสมปฏิกิริยาทริตเมนต์ที่ 2.3



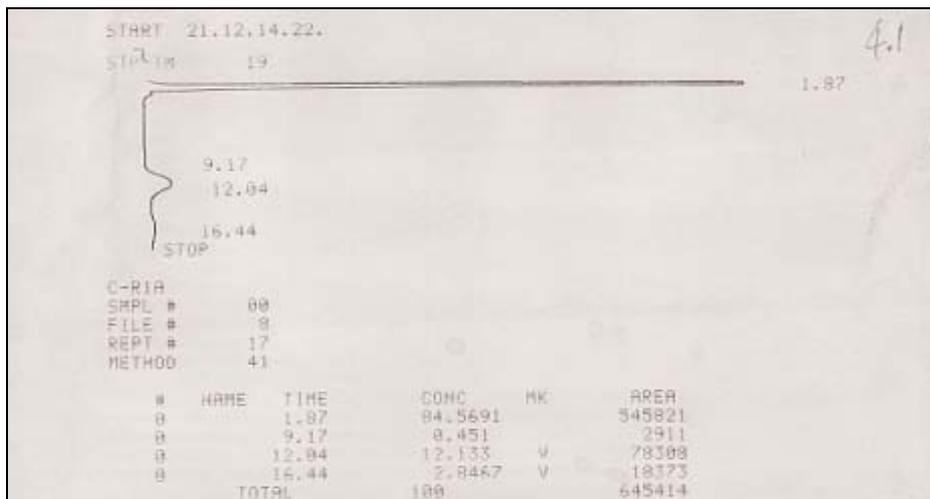
สารผสมปฏิกิริยาทริตเมนต์ที่ 3.1



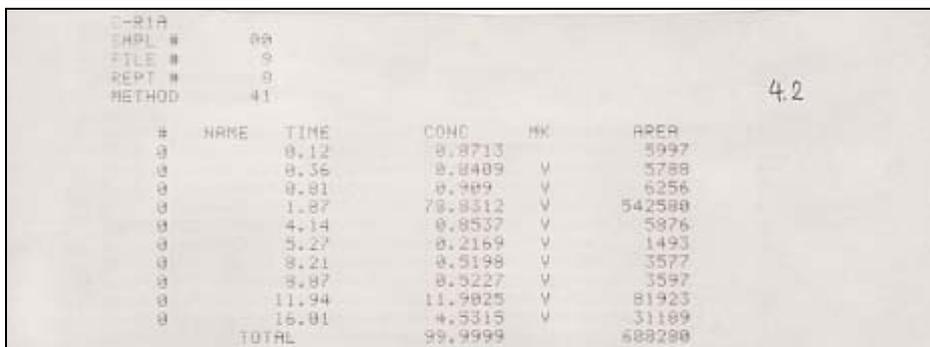
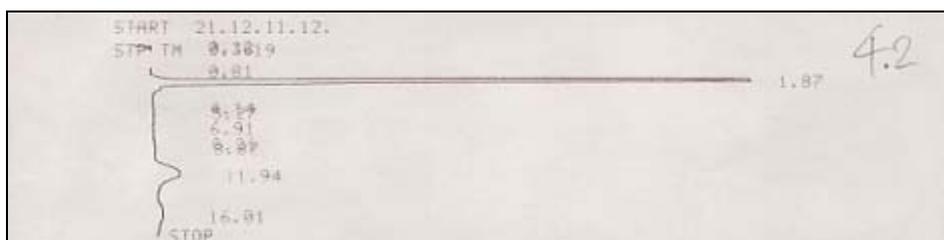
สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 3.2



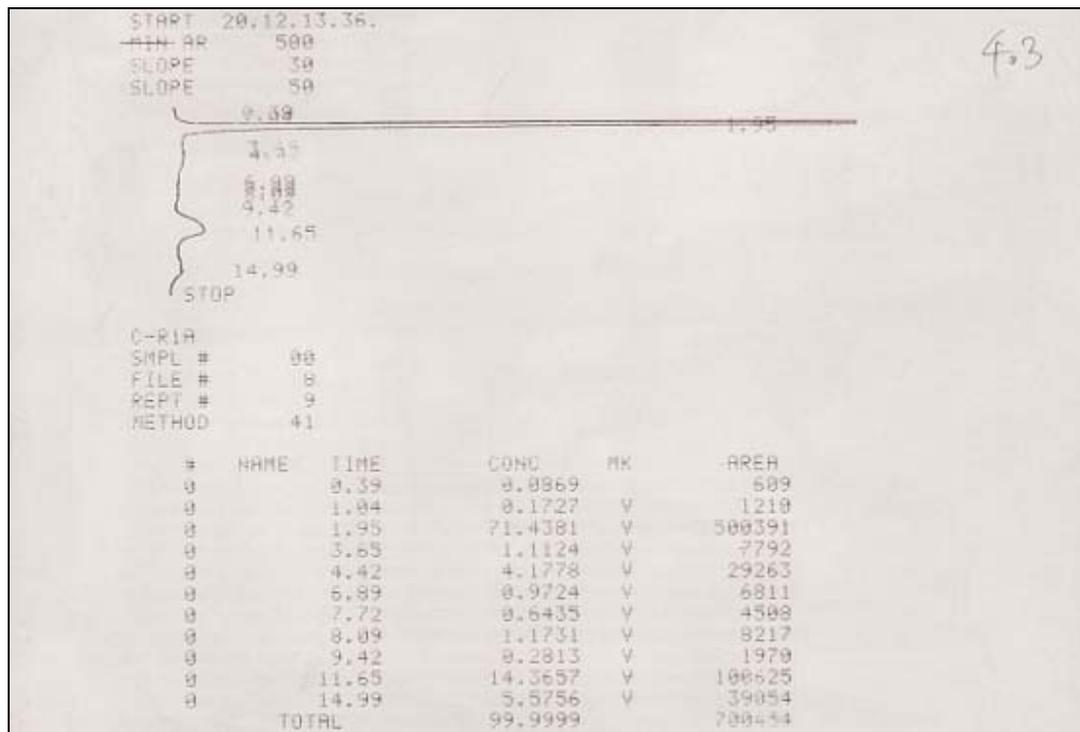
สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 3.3



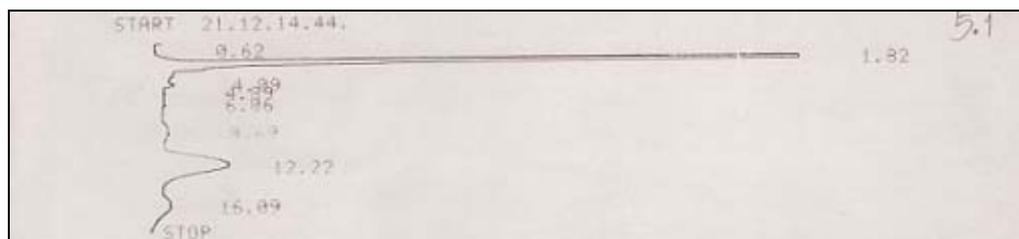
สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 4.1



สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 4.2



สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 4.3



C-R1A

SAMPL # 00

FILE # 0

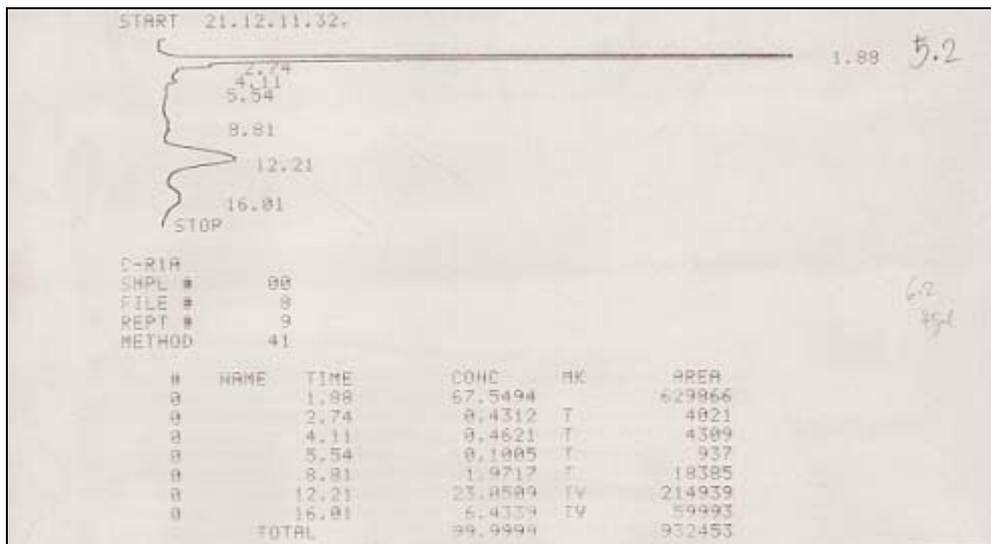
REPT # 10

METHOD 41

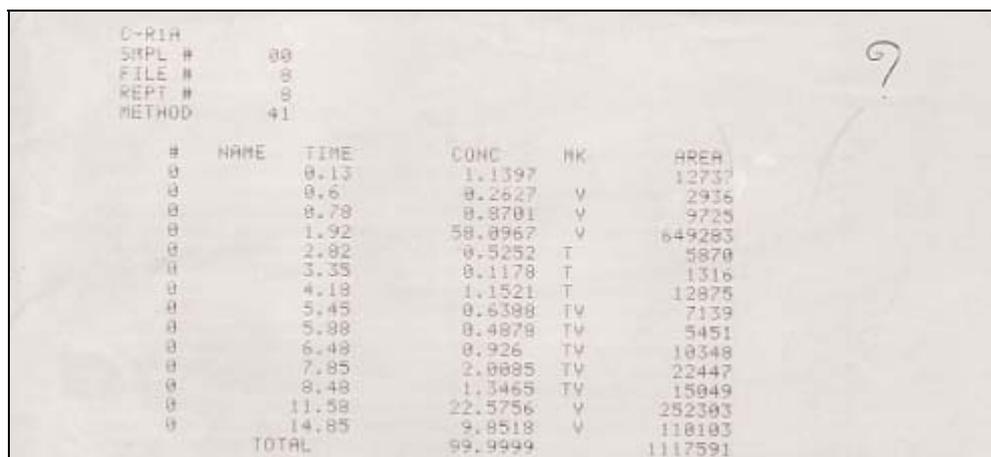
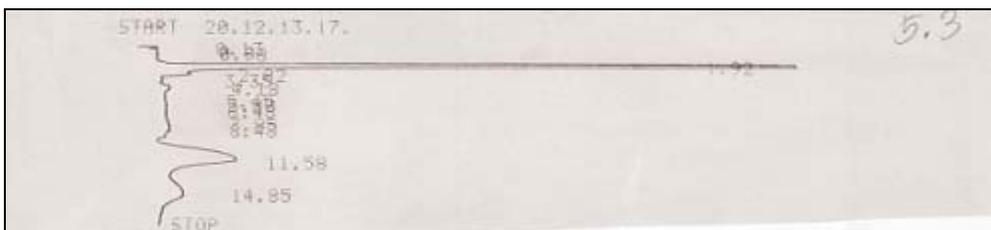
#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		1.82	69.239		597456
0		4.09	0.5321	T	4591
0		5.06	0.0973		848
0		8.69	2.100		18800
0		12.22	23.1578	V	199826
0		16.09	4.7955		41294
		TOTAL	99.9999		862389

5.1

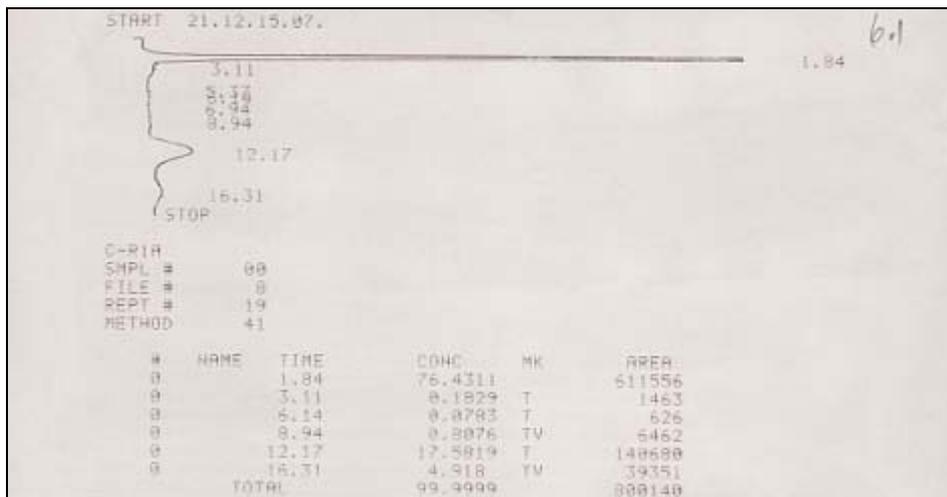
สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 5.1



สารผสมปฏิกิริยาพรีเดนคที่ 5.2



สารผสมปฏิกิริยาพรีเดนคที่ 5.3



สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 6.1

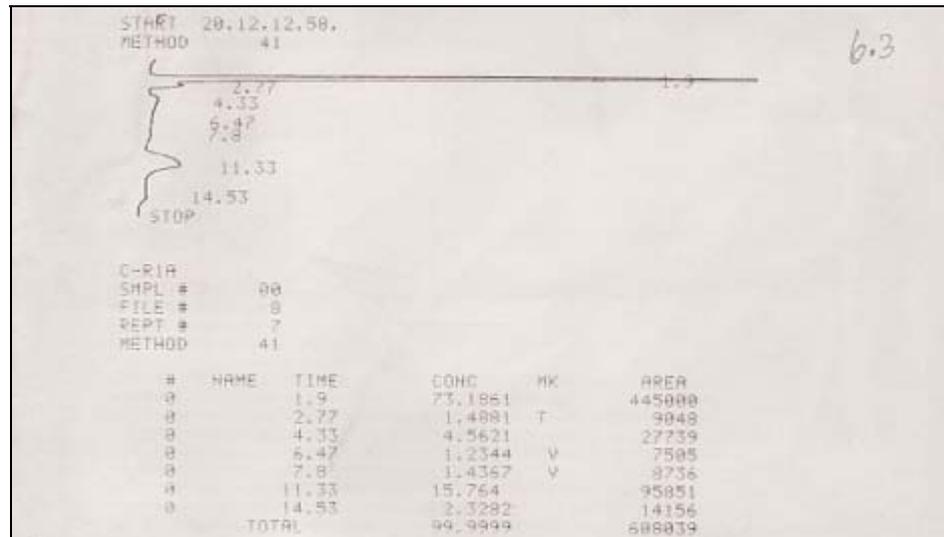


C-R1A  
 SMPL # 00  
 FILE # 0  
 REPT # 10  
 METHOD 41

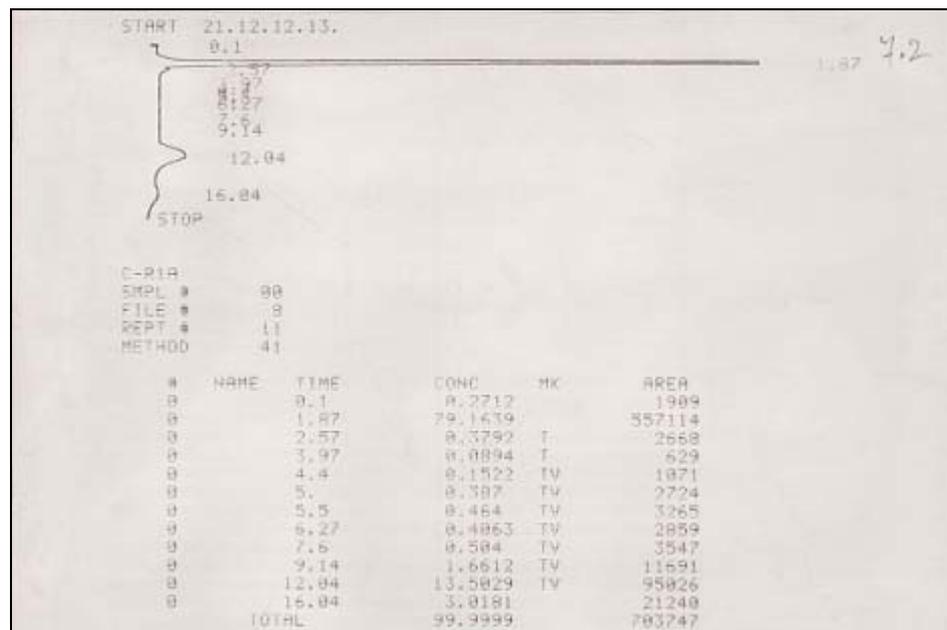
6.2

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.88	77.2282		504956
0		3.02	0.1011	T	661
0		8.15	0.1494		377
0		8.75	0.518	V	3387
0		12.08	17.2899		113057
0		16.42	4.7211	V	30871
	TOTAL		99.9999		653891

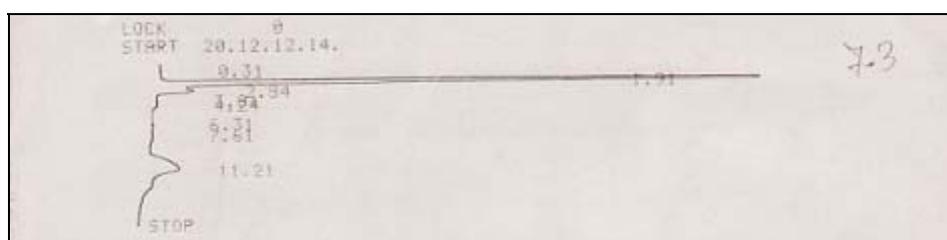
สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 6.2



สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 6.3



สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 7.2



C-R1A  
 SMPL # 00  
 FILE # 8  
 REPT # 5  
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		0.31	0.0543		308
0		1.91	71.7505	V	467828
0		2.84	5.889	V	33817
0		3.81	0.898		557
0		4.24	0.5384	V	3815
0		6.31	0.4558		2590
0		7.61	0.3882		1752
0		11.21	28.9935		119324
		TOTAL	99.9999		568386

START 20.12.12.33.  
 METHOD 40  
 STOP

7.3

สารผสมปฏิกิริยาทริตเมนต์ที่ 7.3

START 25.12.10.23.  
 LOCK 0

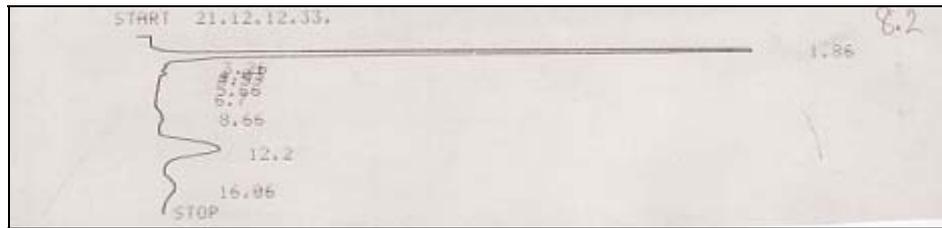
12.13  
 16.19  
 STP TR 19  
 STOP

C-R1A  
 SMPL # 00  
 FILE # 8  
 REPT # 7  
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		1.87	78.195		622573
0		4.1	0.6276	TV	5566
0		4.57	0.8927	T	822
0		5.87	0.859	T	523
0		7.37	0.1155	T	1825
0		8.7	1.1247	TV	9975
0		12.13	22.3337	TV	198882
0		16.19	5.4514	TV	19349
		TOTAL	99.9999		854919

8.1

สารผสมปฏิกิริยาทริตเมนต์ที่ 8.1

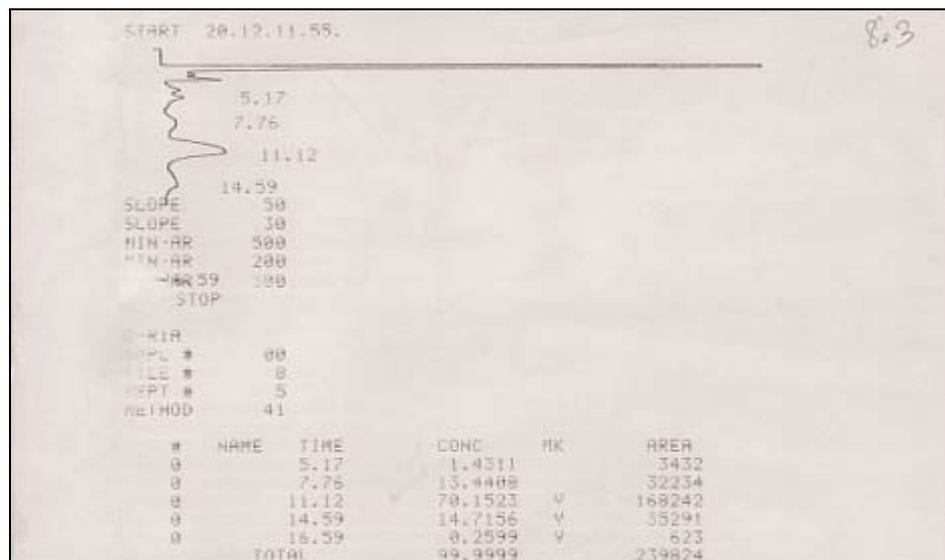


C-R1A  
SAMPL # 00  
FILE # 0  
REPT # 12  
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		1.86	78.6198		620486
0		3.26	0.1814	T	891
0		4.83	0.3471	T	3058
0		8.66	1.8089	T	15923
0		12.2	21.4572	TV	188529
0		16.86	5.6732	TV	49846
	TOTAL		99.9999		879628

8.2

สารผสมปฏิบัติการที่ 8.2



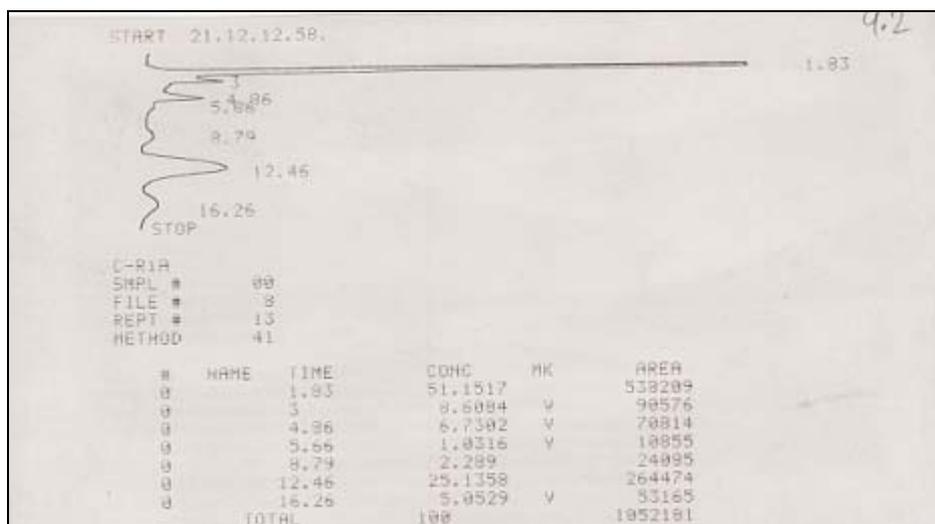
สารผสมปฏิบัติการที่ 8.3



SAMPLE # 88 9.1  
 FILE # 8  
 REPT # 8  
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		1.87	49.9293		572625
0		3.	4.7126	V	54047
0		3.6	2.036	V	23350
0		4.84	7.8878	V	90463
0		8.57	4.5343	V	52003
0		12.5	25.8763	V	296760
0		16.5	5.0232	V	57610
		TOTAL	99.9999		1146870

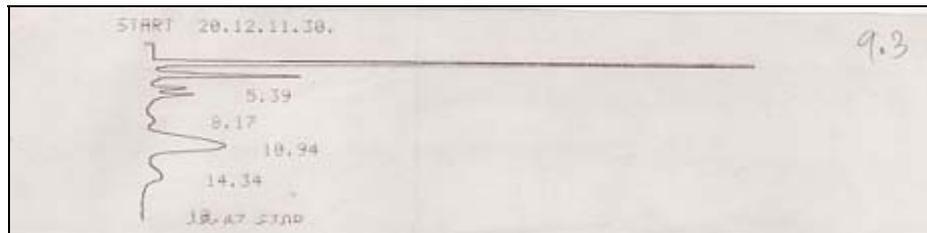
สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 9.1



C-R1A  
 SAMPLE # 88  
 FILE # 8  
 REPT # 13  
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		1.83	51.1517		538209
0		3.	0.6004	V	90576
0		4.36	6.7302	V	70014
0		5.66	1.0316	V	10055
0		8.79	2.289	V	24095
0		12.46	25.1358	V	264474
0		16.26	5.0529	V	53165
		TOTAL	100		1052101

สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 9.2



C-R1A  
SAMPL # 00  
FILE # 8  
REPT # 4  
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	PK	AREA
0		5.39	6.7698		22792
0		8.17	4.4811		15086
0		10.94	69.4729	V	233901
0		14.34	10.1879	V	61235
0		18.47	0.9176		3089
	TOTAL		100		336688

9.3

สารผสมปฏิกิริยาทรินเมนต์ที่ 9.3

**ภาคผนวก ฉ**

**การนำเสนอผลงาน**

The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnolog

# Optimization of Condition for the Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase using Taguchi Method

Onuma Lalaeng, Sarote Sirisansaneeyakul, Pramuk Parakulsuksatid, Tanaboon Sajjaanantakul\*

and Wirat Vanichsriratana

*Department of Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand*

*\*Department of Food Sciences and Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand*

## Abstract

Production of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus circulans* TISTR 907 was optimized using the Taguchi method. The design contained a total of 18 experiments, which employed the selection of cassava starch, peptone,  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2CO_3$ , agitation, cultivation time, inoculum size and initial pH as eight independent variables in this study. The optimal calculated values of these variables for maximum production of CGTase were found to be comprised of: cassava starch 20 g/l; peptone 15 g/l;  $K_2HPO_4$  3 g/l;  $Na_2CO_3$  12.5 g/l; agitation 300 rpm; cultivation time 12 h.; inoculum size 10% (v/v) and initial pH 9. The CGTase with high activity at 8.54 U/ml was also achieved.

*Key words* : Cyclodextrin glycosyltransferase, Taguchi method, Optimization of condition.

## 1. Introduction

Cyclodextrin (CD) is a closed-ring structure contains six, seven or eight of glucose units and known as  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -CD, respectively. CDs is used widely for industrial purposes, due to its commercial availability and inclusion complexes with organic and inorganic compounds. It has numerous

applications in biotechnology, food cosmetic and pharmaceutical industries [6,10,5]

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is an enzyme that degrades starch and catalyses the production of cyclic  $\alpha$ -1,4-linked glucopyranosyl chains called cyclodextrin by intramolecular transglycosylation. CGTases

are produced by various microorganisms but most reports came from *Bacillus* species such as *B.firmus* [2], *Bacillus* sp. NRRL B-21195[4], *B. stearothermophilus* [9], *B. circulans* [1], *B. macerans*, *B. agaradhaerens* [7], *Klebsiella pneumoniae*. The optimum temperatures for reactions of these enzymes are 50-60 °C [1].

Production of CGTase depends on the reaction in microorganisms towards substrate. Changing environmental factors can lead to an increase in the production of CGTase. Design of experiments is an important technique for multifactor experiment analysis because of its capability of detecting true optimum level of the factors. In this study, The Taguchi method using orthogonal array (OA) 18 was used to determine the optimum production of CGTase from *B. circulans* [10] in small-scale experiments

## 2. Material and methods

### 2.1. preparation of bacterial inoculum

*Bacillus circulans* (TISTR 907) was obtained from a stock culture of Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand. The bacteria were grown in 75 ml Horikoshi medium, containing cassava starch 10 g/l; yeast extract 5 g/l; peptone 5 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l;

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 g/l; inoculum 10%, initial pH at 9.0 and incubated at 37 °C for 18 h with shaking of 200 rpm[1].

### 2.2. Preparation of CGTase

Ten percent of *Bacillus circulans* (TISTR 907) inoculum was transferred to 100 ml of minimal medium in a 200 ml conical flask. After cultivation, the cells were removed by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min. The supernatant was used as crude enzyme solution and assayed for enzyme activity.

### 2.3. Assay of dextrinizing activity

Starch dextrinizing activity was assayed using cassava starch as substrate and measuring the decrease in iodine-staining power[2]. The reaction medium contained 0.1 ml of the enzyme solution, 0.5 ml of 1% starch solution, 0.4 ml of 0.1 M citrate buffer, pH 5.5, and incubated in a water-bath at 50°C for 10 min. The reaction was terminated with 0.5 ml of 1 M HCl. Then 0.1 ml of 4 mM iodine in 30 mM potassium iodide was added and diluted to 10 ml with water. The starch-iodine complex absorption was monitored at 620 nm.

#### 2.4. Experimental design and optimization

Taguchi has established the orthogonal array (OAs) to describe a large number of experimental situations, with the purpose mainly to reduce experimental errors and to enhance the efficiency and reproducibility of the laboratory experiments [8]. The symbolic designation of these arrays indicates the main information on the size of the experimentation, e.g. L18 has 18 trials [12]. The total degree of freedom available in the OA is equal to the number of trials minus one. Each column consists of a number of conditions depending on the levels assigned to each factor. In this study all eight columns are assigned with different factors as indicated in Table 1. Inoculum size factor has been assigned only with two levels, while the others are assigned with three levels. Table 2 shows the layout of the L18 OA used in this study. All the combination of experiments using the assigned parameter values were conducted using Horikoshi medium and incubated in shaker. After fermentation, the culture broth was separated and analyzed for CGTase.

**Table 1**

Factors and their levels assigned to different columns

Factor	level		
	1	2	3
A Inoculum (% , v/v)	8	10	-
B cassava starch(g/l)	10	15	20
C peptone(g/l)	5	10	15
D Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g/l)	10	12.5	15
E K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	1	2	3
F Agitation (rpm)	200	250	300
G pH	9.0	9.5	10.0
H Time (cultivation)	10	12	14

### 3. Result and discussions

Using the Taguchi method, the experiment conditions with different combination of cassava starch, peptone, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, agitation, cultivation time, inoculum size and initial pH were performed [3,11]. CGTase activity was then assayed, after fermentation at 37 °C for 14 h. The result was then analyzed using the appropriate analysis of variance (ANOVA) corresponding to the designate experiments.

Table 2

L<sub>18</sub> (2<sup>1</sup> x 3<sup>7</sup>) OA

Run	Factor								Dextrinizing activity(U/ml)
	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	5.5429
2	1	1	2	2	2	2	2	2	5.2697
3	1	1	3	3	3	3	3	3	6.5856
4	1	2	1	1	2	2	3	3	4.1464
5	1	2	2	2	3	3	1	1	6.9429
6	1	2	3	3	1	1	2	2	6.4591
7	1	3	1	2	1	3	2	3	7.5085
8	1	3	2	3	2	1	3	1	7.2164
9	1	3	3	1	3	2	1	2	7.5290
10	2	1	1	3	3	2	2	1	6.4067
11	2	1	2	1	1	3	3	2	6.8371
12	2	1	3	2	2	1	1	3	7.0718
13	2	2	1	2	3	1	3	2	7.2663
14	2	2	2	3	1	2	1	3	6.2167
15	2	2	3	1	2	3	2	1	6.8380
16	2	3	1	3	2	3	1	2	7.4192
17	2	3	2	1	3	1	2	3	6.6203
18	2	3	3	2	1	2	3	1	7.1322

From the 18 treatments as assigned in the orthogonal array (OAs L-18), treatment nine provided the maximum CGTase activity of

7.529 U/ml as shown in Table 2. However, this condition on treatment nine can not be guaranteed as the optimal one since the

experiments may contain noise factor, which must be taken into account. The Taguchi method, therefore, further analyzed the result by calculating the S/N- ratio by the pattern of Larger-the-better to determine the possible maximum CGTase activity and its optimal condition.

The Taguchi method recommended analyzing the means and S/N ratio using conceptual approach that involves graphing the effects and visually identifying the factors that appeared to be significant, thus making the analysis simple. The S/N – ratio can then be used to explain result at each level of control factors to the corresponsive value. The S/N - ratio by the pattern of Larger-the-better were calculated to determine the maximum CGTase activity. The analysis is plotted and shown in figure 1, which also indicated the maximum value of each factors.

The most suitable level (the highest value of the S/N- ratio) for each factors were then combined to be the optimal conditions. This can be summarized as: level '2' of factor A, level '3' of factor B, level '3' of factor C, level '2' of factor D, level '3' of factor E, level '3' of factor F, level '1' of factor G and level '2' of factor H.

These experimental results were analyzed further using the analysis of variance (ANOVA) as appropriate to the experimental design used. The obtained ANOVA results were shown in Table 3. The F-ratio is used to indicate the effect of control factors. If F-ratio is less than 1, the experimental error has more effect than control factors which suggests that the control factor is not significant. If F-ratio is higher than 2, control factors have moderate effect and if F-ratio is higher than 4, the effect of control factor is significant. From Table 3, the F-ratio of the second factor, cassava starch, is the highest value at 20.586. This indicates that the cassava starch has the highest influential effect for cyclodextrin glycosyltransferase production. Other factors: agitation, inoculum size,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , peptone,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and cultivation time are also significant but the effect of pH is insignificant for production.

The percentage contribution of each factors are also shown in Table 3 where the last column indicates the influence of each factors. Cassava starch is the most significant factor for CGTase production. This may be due to the fact that it is the main carbon source in the media.

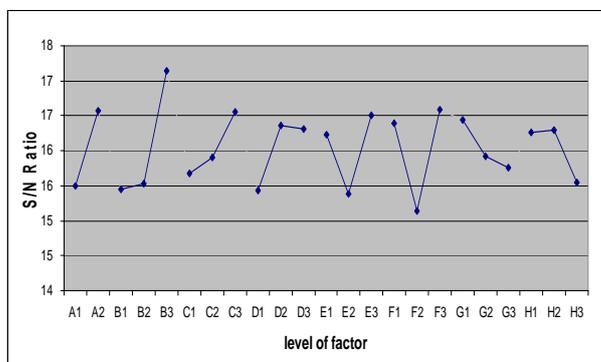


Figure 1 The Larger of better S/N graph for the CGTase production.

The second important factor is agitation in which *Bacillus circulans* requires  $O_2$  and therefore the agitation is needed. The other factors also contribute to the production although they are not as high as the first two factors prior mentioned. The pH factor contribution is insignificant for CGTase production in this study as shown with low value F-ratio of 1.6139. This may be owing to the fact that the operating of pH at 9-10 in this study is already in the usually range for this enzyme production.

Based on the Taguchi method analysis, the optimum calculated values of tested variables for maximum production of CGTase were found to be comprised of: cassava starch 20 g/l; peptone 15 g/l;  $K_2HPO_4$  3 g/l;  $Na_2CO_3$  12.5 g/l; Agitation 300 rpm; cultivated time 12 h.;

inoculum 10% (v/v) and initial pH 9. The confirmed experiment was also carried out using these optimal conditions, where the enzyme production of 8.54 U/ml was achieved.

## 5. Conclusion

The combination of factors and their levels involved in the production of CGTase by *Bacillus circulans* was carried out to determine the optimal conditions for enzyme production. The Taguchi method was used to design the experiments in this study. From the analysis, the obtained optimal conditions consisted of cassava starch 20 g/l; peptone 15 g/l;  $K_2HPO_4$  3 g/l;  $Na_2CO_3$  12.5 g/l; agitation 300 rpm; cultivation time 12 h.; inoculum 10% (v/v) and initial pH 9. The confirmed experiment of the optimal condition showed the enzyme production of 8.54 U/ml, which indicated the success of applying the Taguchi method for optimizing the CGTase production.

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the CGTase production

Factor	DOF	Sums of square	MS	F-ratio	Percent contribution
1 Inoculum (% v/v)	1	1.1810	1.1805	13.7568	8.3995
2 cassava starch(g/l)	2	3.5300	1.76508	20.5680	25.7684
3 peptone(g/l)	2	1.0030	0.50143	5.8431	6.3777
4 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g/l)	2	1.2290	0.61454	7.1611	8.1133
5 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	2	0.9574	0.47871	5.5783	6.0292
6 Agitation (rpm)	2	2.5216	1.26083	14.692	18.0306
7 pH	2	0.2770	0.13850	1.6139	0.8084
8 Time	2	0.6184	0.3092	3.6032.	3.4285
Error	20	1.7163	0.08580		23.0451
Total	35	13.033			

## References

- [1] Charoenlap, N., S. Dharmsthiti, S. Sirisansaneeyagul, and S. Lertsiri. 2004. Optimization of cyclodextrins production from sago starch. *Bioresource. Technol* 92: 49-54.
- [2] Higuti, I.H., P.A. Silva, and A.J. Nascimento. 2004. Studies on alkaloiphilic CGTase-Producing Bacteria and effect of starch on cyclodextrin-Glycosyltransferase activity. *An Int J.* 47: 135-138.
- [3] Ibrahim H.M., W.M.W. Yusoff, and A.A. Hamid. 2004. Optimization of medium for the production of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design(CCD). *Process Biochem.* 40: 753-758.
- [4] Kim, Y.K., M. Kitaoka, and K. Hayashi. 2004. Purification and characterization of an intracellular cycloalternan-degrading enzyme from *Bacillus* sp. NRRL B-21195. *Carbohydr Res.* 339: 1179–1184.

- [5] Liew, S.L., A.B. Ariff, A.R. Raha, and Y.W. Ho, 2005. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *Int Food Microbiol.* 102: 137-142.
- [6] Martin, E.M., and D. Valle. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochem.* 39: 1033-1046.
- [7] Matins, R. F., and R. H. Kaul. 2002. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme Microbiol Technol.* 30: 116-124.
- [8] Prasad, K.K., and S.V. Mohan, 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochem Eng J.* 24:17-26.
- [9] Rahman, R.A., R.M. Illias, M.G.M. Nawawi, A.F. Ismail, O Hassan, and K Kamaruddin. 2004. Optimisation of growth medium for the production of cyclodextrin glucosyltransferase from *Bacillus sterothermophilus* HR1 using response surface methodology. *Process Biochem.* 39: 2053-2060.
- [10] Rode, T., M. Frauen, B.W. Muller, H. J. Dusing, U. Schonrock, C. Mundt, and H. Wenck. 2003. Complex formation of sericoside with hydrophilic cyclodextrins: improvement of solubility and skin penetration in topical emulsion based formulations. *Pharmaceutics and Biopharma* 55: 191–198.
- [11] Rosso, A. M., S.A. Ferrarotti, N. Krymkiewicz, and B.C. Nudel. 2002. Optimisation of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus circulans* DF 9R. *Microb. Cell Fact.* 1 :1-9.
- [12] Roy, R.K. 2001. *Design of Experiments Using the Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement*, John Wiley & Sons, New York.

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	: นางสาวอรอุมา หล้าแหล่ง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	: 23 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	: จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ประวัติการศึกษา	: วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	: ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับปริญญาโท จากบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2550