บทที่ 1

บทนำ

1. นิยามและการแบ่งชนิดของกลูโคอะไมเลส

กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase, Amyloglucosidase, E.C. 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสที่สลายพันธะอัลฟา (1,3) (1,4) และ (1,6) ในแป้ง (glycosidic linkage) จากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) โดยทำงานจากปลายนอกสุดเข้ามา (exo-acting) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเบตา-ดี-กลูโคส (β-D-glucose) ที่ละ 1 โมเลกุล

ยังมีเอนไซม์อื่น ๆ อีกมากที่สามารถย่อยแป้งได้โดยสลายพันธะอัลฟา (1,4) และ/หรือ อัลฟา (1,6) Forgarty และ Kelly (1979) จัดกลุ่มเอนไซม์ย่อยแป้งได้เป็น 6 กลุ่ม ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างของเอนไซม์อื่น ๆ จากกลูโคอะไมเลสได้ นอกจากนี้ Manjunath (1983) ยังได้แสดงความแตกต่างระหว่างกลูโคอะไมเลสกับอะไมเลสอื่น ๆ โดยอาศัยคุณลักษณะเฉพาะตัว การจัดกลุ่มทั้ง 2 วิธี ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

กลูโคอะไมเลสเองยังอาจจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นพวกที่สามารถย่อยแป้งและเบตาลิมิตเดกซ์ตริน (β-limit dextrin) ได้อย่างสมบูรณ์ กลุ่มที่ 2 สามารถย่อยแป้งได้เพียง 80% และย่อยเบตาลิมิตเดกซ์ตรินได้เพียง 40% (Fleming, 1968) กลุ่มที่ 2 นี้ไม่สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ แม้ว่าจะสามารถสลายพันธะอัลฟา (1,6) ได้ ต้องใช้อัลฟา-อะไมเลสช่วย จึงจะย่อยแป้งให้สมบูรณ์ได้ (Marshall & Whelan, 1976) กลูโคอะไมเลสทั้ง 2 กลุ่ม สามารถย่อยน้ำตาลแพนโนส (panose) และอัลฟาลิมิตเดกซ์ตริน (α-limit dextrin) ได้อย่างสมบูรณ์

2 แหล่งที่สามารถผลิตกลูโคอะไมเลส

กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์นอกเซล (extracellular enzyme) ผลิตได้จากทั้งพืช, สัตว์ และจุลินทรีย์ ในกลุ่มจุลินทรีย์อาจพบในแบคทีเรีย เช่น *Clostidium acetobutylicum* และ *Flavobacterium* sp. พบในยีสต์บางชนิด เช่น *Endomyces* sp., *Endomycopsis* sp., *Saccharomyces diastaticus* และ *Candida pelliculosa* ในราจะพบว่าผลิตกลูโคอะไมเลสได้ดีที่สุด พบใน *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Amylomyces* spp., *Chlamydomucor* spp. และ *Penicillium* เป็นต้น

3 การเก็บรักษาเชื้อ (maintenance)

คุณภาพของสปอร์ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นมีผลโดยตรงต่อปริมาณผลผลิต (yield) ของกลูโคอะไมเลส เมื่อมีการถ่ายเชื้อบนอาหารแข็งที่สมบูรณ์ (rich agar medium) เช่นสารสกัดมอลท์หลาย ๆ ครั้ง การผลิตกลูโคอะไมเลสจะลดลงเรื่อย ๆ แม้ว่าปริมาณสปอร์จะคงที่ เช่น *Aspergillus niger* เมื่อถ่ายเชื้อ 6 ครั้ง ปริมาณเอนไซม์จะลดลงถึง 50% ถ้าใช้อาหารสูตรปรับต่ำ (minimum medium)(Czapek Dox) ปริมาณเอนไซม์จะคงเดิม แต่อัตราการสร้างสปอร์จะลดลง (Crueger, 1984)

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยเกี่ยวกับกลูโคอะไมเลสส่วนใหญ่ก็นิยมใช้อาหารแข็งเอียงของ Czapek Dox หรือ PDA (ภาคผนวก ข) แล้วเก็บหลอดอาหารแข็งเอียงนั้นที่ 4 °ซ นำมาถ่ายเชื้อตามระยะเวลาที่เหมาะสม

Hayashida (1975) เก็บเชื้อ *A. awamori* var *kawachi* บนข้าวนึ่ง เก็บในเดซิเคเตอร์ (desiccator) ที่ 4 °ซ แล้วนำมาถ่ายเชื้อเป็นครั้งคราว ตามระยะเวลาที่เหมาะสม

นอกจากวิธีเก็บเชื้อราในสภาพเส้นใยทั้ง 2 วิธีนี้แล้ว ยังมีวิธีเก็บเชื้อราอีกวิธีคือ การไลโอฟิไลซ์สปอร์ของ รา (lyophilized) โดยใช้น้ำนมเป็นตัวช่วย

4. วิธีวิเคราะห์แอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลส (assay)

วิธีวิเคราะห์แอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสมีหลายวิธี แต่อาจแบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ ตามสับสเตรทที่ใช้ ดังนี้

4.1 ใช้แป้งเป็นสับสเตรท อาจใช้แป้ง, อะไมโลส (amylose), อะไมโลเพคติน (amylopectin), ไกลโคเจน (glycogen) แต่ที่นิยมใช้คือแป้งละลายน้ำ (soluble starch) อาศัยหลักการหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งเป็นดัชนีบอกปริมาณของกลูโคอะไมเลส

วิธีหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นทำได้หลายวิธี ดังนี้

4.1.1 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้สารเคมี เช่น ดีเอนเอสเอ (DNSA, 3,5-dinitrosalicylic acid) (Bernfeld, 1955) หรืออัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (Somogyi and Nelson, 1952) ทั้ง 2 วิธีนี้ ปัจจุบันไม่เป็นที่นิยม เพราะสารเคมีไม่สามารถแยกกลูโคสออกจากน้ำตาลรีดิวซ์ชนิดอื่น ๆ

4.1.2 ให้กลูโคสทำปฏิกิริยากับโอ-โทลูอิดีน (O-toluidine) ซึ่งจะให้สารประกอบสีเขียวในกรดอะซิติก (glacial acetic acid) (Chiang & Johnson, 1977)

4.1.3 การใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส ที่พีเอช 7.0 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส ดังนี้

$$\text{glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{glucose oxidase}} \alpha\text{-D-gluconolactone} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{chromogen} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{สารประกอบให้สี} + H_2O$$

โครโมเจน (chromogen) อาจจะใช้ O-dianisidine (Sigma, 1980) หรือ O-toluidine (Middleton, 1968) และ 2,6-dichlorophenol indophenol (Dobrick, 1958)

4.1.4 การใช้เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (glucosedehydrogenase, Gluc DH) (NOVO, 1978)

$$\beta\text{-D-glucose} + NADP^+ \xrightarrow{\text{gluc DH}} \text{D-gluconolactone} + NADPH + H^+$$

4.1.5 การใช้วิธีอิเลคโตรเคมี electrochemistry วัดกลูโคสโดยเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิค (gluconic acid) ให้ H_2O_2 ซึ่งถูกออกซิไดส์ที่แพทตินัมอาโนด (platinum anode) ได้กระแสไฟฟ้าเป็นปฏิภาคกับกลูโคส (Paul, 1978)

4.2 <u>ใช้ไนโตรเฟนิลกลูโคไซด์เป็นสับสเตรท</u> (p-nitrophenyl-glucoside, pNPG) (NOVO, 1973) อาศัยหลัก กลูโคอะไมเลสจะไฮโดรไลซ์พันธะของไนโตรเฟนิลกลูโคไซด์ และวัดปริมาณไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น โดยวัดการดูดกลืนแสง (absorption) ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

$$p\ NPG \xrightarrow{\text{glucoamylase}} \text{glucose} + \text{p-nitrophenol}$$

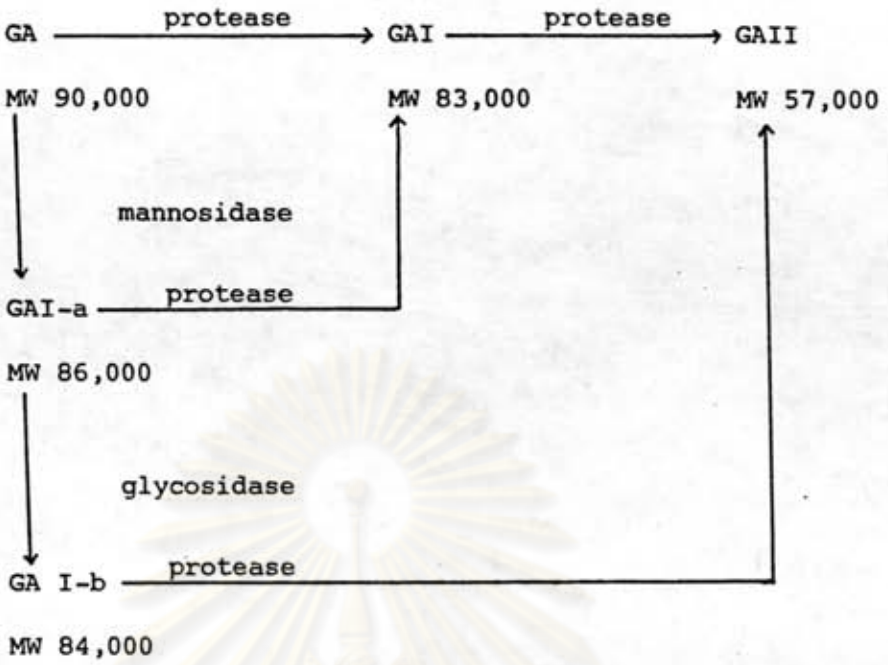
5. หน่วยของแอคทิวิตีกลูโคอะไมเลส (unit of activity)

ส่วนมากนิยมใช้นิยามว่า 1 หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตกลูโคสได้ 1 ไมโครโมล (μmol) ต่อนาที ที่สภาพมาตรฐาน (Hayashida, 1975; Yoshino and Hayashida, 1978)

ยังมีนิยามหน่วยอีกระบบใช้น้ำหนักกลูโคสเป็นเกณฑ์ เรียกหน่วยไดอะไซม์ (diazyme unit) กำหนด 1 หน่วย คือปริมาณเอนไซม์ที่ให้กลูโคส 1.0 กรัม ใน 1 ชั่วโมง ที่สภาพมาตรฐาน (Manjunath et al, 1983)

6. กลูโคอะไมเลสต่างรูปแบบ (multimolecular forms)

กลูโคอะไมเลสทั้งใน *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. จะเป็นเอนไซม์ผสมตั้งแต่ 2-4 รูป ซึ่งแยกจากกันได้ด้วย DEAE-cellulose chromatography Yoshino (1978) และ Hayashida (1976, 1978) เสนอว่า การที่มีหลายรูปแบบเกิดจากกลูโคอะไมเลสถูกย่อยให้โมเลกุลเล็กลงโดย โปรติเอส (protease), แมนโนซีเดส (mannosidase) ดังแสดงในรูปที่ 1 นอกจากนี้ยังสามารถสร้างอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. awamori* var *kawachi* ให้ผลิตแต่กลูโคอะไมเลส GAI ชนิดเดียว โดยใช้อาหารที่ไม่มี Zn ซึ่งทำให้ไม่มีการสร้างโปรติเอสในอาหาร ช่วยป้องกันกลูโคอะไมเลสไม่ให้ถูกย่อยเป็นรูปอื่น แต่ถ้าอาหารมี Zn จะมีกลูโคอะไมเลสครบทั้ง 3 รูป



รูปที่ 1 การเกิดกลูโคอะไมเลสต่างรูป (Manjunath et al, 1983)

นอกจากโปรติเอสถูกสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Zn แล้ว โปรติเอสน่าจะถูกสร้างขึ้นเมื่อแหล่งไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ เชื้อจึงมีความจำเป็นต้องผลิตโปรติเอสเพื่อย่อยโปรตีนนั้น ถ้าโปรติเอสถูกผลิตออกมามาก กลูโคอะไมเลสอาจจะถูกย่อยจนเสียการทำงานของเอนไซม์เลยก็ได้ ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปรตีนโมเลกุลเล็ก น่าจะช่วยลดรูปแบบของกลูโคอะไมเลส และน่าจะช่วยเพิ่มการทำงานของกลูโคอะไมเลสด้วย

ใน *Rhizopus* sp. พบกลูโคอะไมเลส 3 รูป ซึ่งมีปลายคาร์บอน (C-terminal) เหมือนกัน แต่ปลายไนโตรเจน (N-terminal) ของแต่ละรูปจะแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากโปรติเอส (Takahashi et al, 1982) ได้มีรายงานว่าในเอนไซม์ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมไม่พบแอคทิวิตีของโปรติเอสทั้งนี้อาจเกิดจากขั้นตอนการผลิตที่ยับยั้งการทำงานของโปรติเอสไว้ (Manjunath et al, 1979)

อย่างไรก็ตาม สำหรับ *A. niger* AN-1 พบว่ากลูโคอะไมเลสแต่ละรูปมีองค์ประกอบแตกต่างกันมาก อาจจะเนื่องจากกลูโคอะไมเลสแต่ละรูปมาจากยีนที่ต่างกัน (Manjunath, 1983)

7. อุณหภูมิ, พีเอช และเกลือที่มีผลต่อแอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลส

โดยทั่วไปกลูโคอะไมเลสจากราจะเสถียรที่พีเอช ระหว่าง 3-8 และที่อุณหภูมิสูงถึง 40 °ซ กลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะมีแอคทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิประมาณ 40 °ซ ซึ่งต่ำกว่ากลูโคอะไมเลสจาก *Aspergillus* sp. จะทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 °ซ ส่วนมากกลูโคอะไมเลสจะมีการทำงานสูงสุดที่พีเอชประมาณ 4-5 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการตัวช่วย (co-factor) ในการทำงาน หรือช่วยทำให้เสถียร อย่างเช่นอัลฟาอะไมเลสต้องการ Ca^{2+} แต่ Moriyama (1976, 1980) พบว่ากลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. จะเสถียรต่ออุณหภูมิสูง เมื่อเติมกลูโคส หรือกลูโคโนแลกโตน (gluconolactone), แลคโตส หรือกลีเซอรอล (glycerol) โดยกลูโคสและกลูโคโนแลคโตนจะรวมตัวที่ active site สำหรับแลคโตสและกลีเซอรอลจะช่วยลดค่าคงที่ ไดอิลเคตริคในสารละลาย (dielectric constant)

8. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส

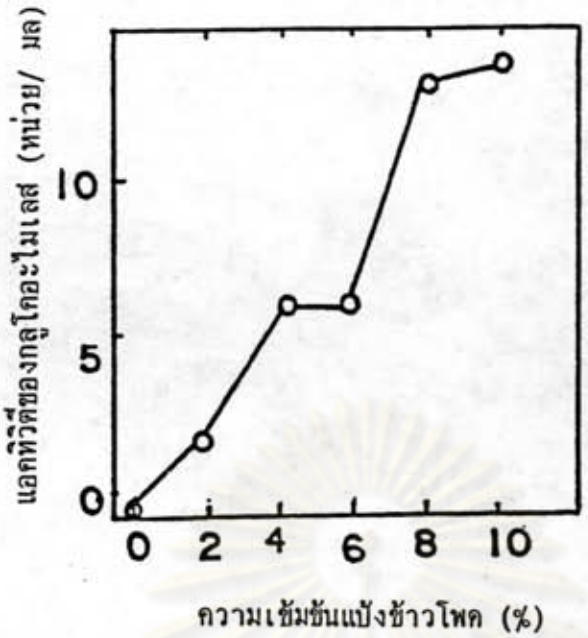
8.1 แหล่งคาร์บอน

ปริมาณการผลิตกลูโคอะไมเลสของราจะตอบสนองต่อโครงสร้างและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารนั้น ๆ โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกลูโคอะไมเลส จะเป็นสารโมเลกุลเชิงซ้อนของน้ำตาล พวกโพลีแซคคาไรด์ เช่น เดกซ์ตริน แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง ในขณะที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ไซโลส ฟรุกโตส จะยับยั้งการผลิตกลูโคอะไมเลส เพราะให้พลังงานมากพอแก่การเจริญโดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อยแป้ง

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอน แล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อปริมาตรกลูโคอะไมเลสด้วย เช่น สำหรับ *Aspergillus awamori* จะผลิตกลูโคอะไมเลสปริมาณสูงเป็น 2 ช่วง เมื่อความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดเพิ่มขึ้น ช่วงแรกคือ เมื่อแป้งข้าวโพดเข้มข้น 4-6% และอีกช่วงคือ ที่ความเข้มข้น 8-10% ดังแสดงในรูปที่ 2 ข้อเสียคือความเข้มข้นแป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นมากกว่า 6% จะมีความหนืดสูง (Qadeer, 1971)

ตารางที่ 1 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของกลูโคอะไมเลส (Forgarty et al., 1979)

เชื้อรา	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)
Aspergillus awamori	4.5	60
A. awamori var. *kawachi* I and II		
A. niger I	4.5-5.0	
II	4.5-5.0	
A. oryzae A-1, A-2, A-3 and B-2	4.1-4.7	
A. oryzae I	4.5	60
II	4.5	50
III	4.5	40
A. phoenicis	4.6	60
Cephalosporium charticola Lindau	5.4	60
Coniophora cerebella	4.0-4.5	
Corticium rolfsii	4.5	40-60
Endomycopsis capsularis	4.5	40-50
Humicola lanuginosa I	4.9	
II	6.6	65-70
Mucor rouxianus I	4.6	55
II	5.0	55
Penicillium oxalicum I	5.0	55-60
II	4.5	60
Piricularia oryzae	6.5	50-55
Rhizopus delemar	4.5	40



รูปที่ 2 อิทธิพลของแป้งข้าวโพดต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส โดย *A. awamori* NRRL 3112 (Qadeer, 1971)

การแก้ปัญหาความหนืดทำได้โดย liquefy ด้วยเอนไซม์จากมอลท์ หรืออัลฟาอะไมเลส (Aunstrup, 1972; Smiley, 1967; Baribo, 1967) วิธีนี้มีข้อดีคือ ลดความหนืดของอาหารเหลว ลดพลังงานที่ใช้ในการกวนน้ำหมัก ช่วยให้มีการถ่ายเทความร้อนระหว่างการฆ่าเชื้ออาหารเหลวได้ดี รวมทั้งลดการเคือดล้นระหว่างการพ่นไอน้ำฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ยังจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกลูโคอะไมเลสใน *A. niger* ได้ (Smith, 1979)

8.2 <u>แหล่งไนโตรเจน</u>

ประสิทธิภาพการผลิตกลูโคอะไมเลสขึ้นกับความสามารถในการใช้โพลีเปปไทด์หรือสารประกอบไนโตรเจนที่เล็กกว่า เช่น กรดอะมิโน เพราะสารประกอบไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ที่จะช่วยให้ราผลิตกลูโคอะไมเลสได้สูง มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่มักจะเป็นการศึกษากับรา *Aspergillus* sp. เช่น การใช้เส้นใยจากการหมักยาเพนนิซิลิน และ corn steep liquor เหมาะสำหรับ *A. awamori*, น้ำสกัดถั่วเหลืองหรือถั่วเขียว เหมาะสำหรับ *A. usamii*, กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน และรำข้าวสำหรับ *Amylomyces* sp., โปรตีนถั่วลิสง สำหรับ *A. niger* และรำข้าว สำหรับ *Rhizopus oryzae*

(Barton, 1969; Sukhumavasi, 1982; จตุรพร พรศิลปทิพย์, 2528; Ramachandran, 1979; ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์, 2526)

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์นั้น จะพบว่าเกลือของแอมโมเนีย จะให้ผลผลิตสูงกว่าเกลือไนเตรท (Barton, 1972)

8.3 <u>เกลืออนินทรีย์</u>

โดยทั่วไปราจะถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ที่ปล่อยออกนอกเซลมากกว่าเดิม เมื่อใช้ซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่จำเป็นสำหรับการเจริญ (Barton, 1972)

นอกจากนี้ฟอสเฟต, Mg^{2+}, Fe^{2+} ก็จะกระตุ้นการผลิตกลูโคอะไมเลส แต่ในอุตสาหกรรม Fe^{2+} อาจไม่จำเป็นต้องเติม เพราะในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจะมีอยู่แล้ว

9. <u>ปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการผลิตกลูโคอะไมเลสบนอาหารแข็ง</u>

การเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็งนั้น มีปัจจัยสำคัญต้องควบคุมให้เหมาะสมหลายประการ ได้แก่ การควบคุมขนาดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยที่สำคัญ การผลิตกลูโคอะไมเลสด้วย *Amylomyces* sp. ต้องปรับความชื้นเป็น 50% ในขณะที่ *R. oryzae*, และ *A. niger* ต้องการความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 40% (จตุรพร, 2528, ไกรฤกษ์, 2526 Pichayangkura และคณะ, 1981)

นอกจากความชื้นในอาหารแล้ว ความชื้นในอากาศที่เพาะเลี้ยงเชื้อราก็เป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *R. oryzae* ต้องใช้อากาศที่อิ่มตัวด้วยความชื้น อุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่ต้องควบคุมด้วยความระมัดระวัง เพราะเมื่อราเจริญจะเกิดความร้อน ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น และลดการสร้างกลูโคอะไมเลส (ไกรฤกษ์, 2526) อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของเชื้อรา เช่น *Amylomyces* sp. ต้องเพาะเลี้ยงที่ 30 °ซ สำหรับ *R. oryzae* 35 °ซ และ *A. oryzae* 35 °ซ (Narahara และคณะ, 1982)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และพีเอช เป็นสิ่งที่จำเป็นต้องควบคุมให้เหมาะสมเช่นเดียวกัน ซึ่งสภาพที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา นอกจากนี้การพลิกกลับอาหารแข็งระหว่างการหมัก ก็จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง เพื่อให้สารอาหาร, พีเอช รวมทั้งอากาศมีความสม่ำเสมอ ตลอดทั้งระบบ ซึ่งการพลิกกลับอาหารแข็งจะสิ้นเปลืองแรงงานมาก ถ้าจะหลีกเลี่ยงการพลิกอาหารก็จะต้องทำชั้นอาหารให้บาง ซึ่งจะสิ้นเปลืองเนื้อที่และค่าใช้จ่ายในการทำถาดชั้นมากขึ้น

การเพาะเชื้อในอาหารแข็งนิยมการคลุกสปอร์ลงบนอาหาร ทำให้ระยะเวลาการผลิตเอนไซม์ช่วงหนึ่งเสียไปกับการงอกจากสปอร์และกระจายเส้นใยให้ทั่วถึงอาหารแข็งนั้น ปริมาณสปอร์ที่เหมาะสมสำหรับ *Amylomyces* sp. คือ 5×10^5 สปอร์/ก.อาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าปริมาณสปอร์มากเกินไปจะทำให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ลดลง (จตุรพร, 2528)

เมื่อเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งได้แล้ว การสกัดเอนไซม์ออกจากอาหารแข็งก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ ไกรฤกษ์ (2526) พบว่าถ้าบดแป้งเชื้อจนเซลแตกจะให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าการสกัดด้วยบัฟเฟอร์อย่างเดียว

10. <u>ปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการผลิตกลูโคอะไมเลสบนอาหารเหลว</u>

การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวนั้น ปัจจัยความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อและความชื้นในอากาศไม่มีความสำคัญเลย แต่พีเอชในอาหารกลับเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นหรือลดลง ได้รวดเร็วกว่าในอาหารแข็ง อย่างไรก็ตามการหมักในถังหมักสามารถควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ โดยการเติมกรดหรือด่าง หรือใช้บัฟเฟอร์ในอาหาร งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวในประเทศไทย ส่วนมากจะเป็นระดับขวดแก้ว ซึ่งยังไม่สามารถควบคุมพีเอชในอาหารได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวทำได้ไม่ดีนัก *Endomycopsis* sp. ผลิตได้ 0.82 หน่วย/มล. (สุกัญญา, 2522)

อุณหภูมิ การให้อากาศและการกวน เป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถควบคุมได้แน่นอนกว่าการหมักบนอาหารแข็ง สิ้นเปลืองแรงงานน้อยกว่า และสามารถป้องกันการติดเชื้ออื่นที่มาจากอากาศที่ให้ได้ดีกว่า

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นกับชนิดของเชื้อ มีความสำคัญต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส เช่นเดียวกับการผลิตในอาหารแข็ง แต่ในอาหารเหลวมีข้อได้เปรียบที่การกระจายสารอาหารทั่วถึงดีกว่า และไม่มีปัญหาการควบคุมขนาด รูปร่างของอาหาร

การใช้เชื้อเริ่มต้นก็มักจะใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อเช่นเดียวกับการผลิตบนอาหารแข็ง เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาในระดับถังหมัก การใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นเม็ดของเส้นใยจึงยังไม่มีการทำวิจัย โดยเฉพาะ *Rhizopus* sp. ซึ่งไม่สามารถกระจายเส้นใยลงในอาหารเหลวได้

ในการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ไม่มีความสำคัญหลังการหมักเพียงกรองหรือปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วแยกเซลออกเท่านั้น จะเห็นได้ว่าการผลิตกลูโคอะไมเลส ในอาหารเหลวมีปัจจัยที่ต้องควบคุมน้อยกว่าในอาหารแข็ง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบที่จะลดต้นทุนค่าใช้จ่ายลง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปัจจัยที่สำคัญสำหรับการผลิตกลูโคอะไมเลสด้วยการเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว

การผลิตบนอาหารแข็ง	การผลิตในอาหารเหลว
1. การปรับความชื้นเริ่มต้นในอาหาร	1. พีเอชของอาหาร
2. การควบคุมขนาดและรูปร่างอาหาร	2. อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง
3. ความชื้นในอากาศ	3. การให้อากาศ
4. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	4. การกวน
6. พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	5. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ
7. การพลิกกลับอาหารแข็ง	6. ปริมาณสปอร์ที่ใช้
8. ปริมาณสปอร์ที่ใช้	
9. การสกัดเอนไซม์จากอาหารแข็ง	

11. รูปแบบการเตรียมกลูโคอะไมเลสในทางการค้า

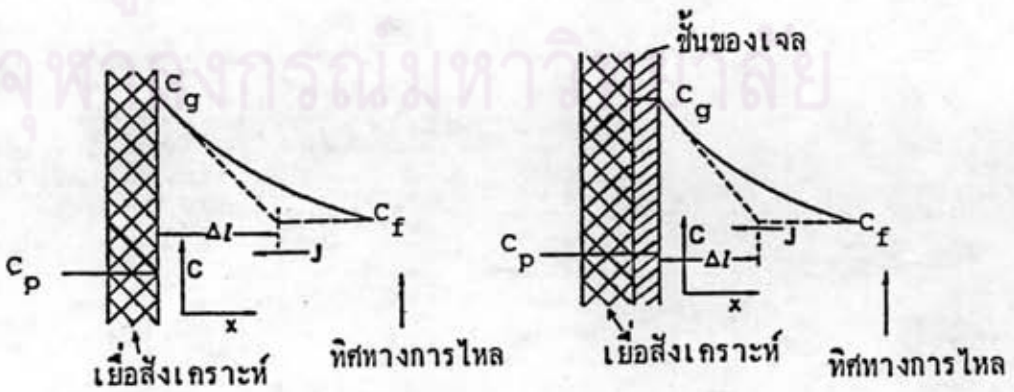
กลูโคอะไมเลสที่มีในรูปของเหลวและผง ในการทำเอนไซม์เหลวเข้มข้นอาจใช้วิธีทำให้เข้มข้นภายใต้สูญญากาศ และเติมโซเดียมคลอไรด์ หรือกรดเบนโซอิคเป็นสารกันบูด (Aunstrup, 1972) นอกจากนี้อาจใช้วิธีระเหยเข้มข้นแบบหมุน (rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ หรืออุตราฟิลเตรชัน ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ (membrane) ขนาดโมเลกุล 25,000 และขนาด 60,000 (Andrzejczuk, 1978)

สำหรับเอนไซม์ผงทำการตกตะกอนด้วย 95% แอลกอฮอล์ หรือ 90% แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว แล้วนำมาทำให้แห้ง เก็บในภาชนะกันความชื้น (moisture-proof package) (Andrzejczuk, 1978)

12. การเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์ด้วยอุลตราฟิลเตรชัน

การใช้อุลตราฟิลเตรชัน เพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์เป็นการแยกสารโมเลกุลเล็กออกจากเอนไซม์ในอาหารเหลวจากการหมัก โดยใช้แรงดันไฮดรอลิกผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ (membrane) ที่มีขนาดรูพรุนเล็กมาก

เมื่อตัวถูกละลายไหลผ่านเยื่อภายใต้ความดัน จะเกิดโพลาไรเซชัน (polarization) โดยอัตราการเคลื่อนที่ของสารโมเลกุลใหญ่มา-ที่เยื่อแผ่นสังเคราะห์มีค่ามากกว่าสารโมเลกุลเล็กที่ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ได้ ทำให้เกิดการสะสมของสารโมเลกุลใหญ่ที่ผิวของเยื่อแผ่นสังเคราะห์หนาขึ้นเป็นกำแพง (hydraulic barrier) จะลดอัตราการไหล (flux) ของสารละลาย และจะทำให้สารโมเลกุลเล็กผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์น้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การเกิดโพลาไรเซชัน (Aiba, Humphrey and Millis, 1973)

12.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออุลตราฟิลเตรชัน

การใช้เทคโนโลยีอุตราฟิลเตรชันจะเน้นที่การควบคุมไม่ให้เกิดโพลาไรเซชัน การเกิดโพลาไรเซชันจะขึ้นกับปัจจัยระหว่างกระบวนการหลายปัจจัย ได้แก่

12.1.1 อุณหภูมิ การใช้อุณหภูมิต่ำจำเป็นสำหรับรักษาสภาพเอนไซม์ แต่อุณหภูมิต่ำจะทำให้ตัวถูกละลายผ่านเยื่อสังเคราะห์ได้น้อยลง เพราะรูของเยื่อแผ่นสังเคราะห์จะหดตัวที่อุณหภูมิต่ำ (Chen et. al, 1985)

นอกจากนี้การลดอุณหภูมิจะทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลลดการแพร่ (diffusion) ของตัวถูกละลายออกจากเยื่อแผ่นสังเคราะห์ ทำให้เพิ่มการเกิดโพลาไรเซชัน (Wang et al, 1979)

12.1.2 ความเป็นกรดด่าง (pH) พีเอชมีผลต่อการละลายและโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน ที่พีเอชต่ำ โปรตีนจะผ่านเยื่อสังเคราะห์ได้ดีกว่าที่พีเอชสูง และอัตราการไหล (flux) จะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชลดลง (Chen et. al, 1985)

12.1.3 ความดัน ไม่มีผลต่อการไหลของตัวถูกละลายผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ แต่การเพิ่มความดันจะเพิ่มการแพร่ของตัวถูกละลายออกจากเยื่อแผ่นสังเคราะห์ ช่วยลดการเกิดโพลาไรเซชัน แต่ถ้าใช้ความดันสูงเกินไปกำแพงโพลาไรเซชันจะถูกอัดแน่นกับเยื่อแผ่นสังเคราะห์ ทำให้อัตราการไหลลดลงได้

12.1.4 อัตราเร็วในการป้อนย้อนกลับ (recirculation rate) การเพิ่มอัตราเร็วในการป้อนย้อนกลับ จะลดการเกิดโพลาไรเซชัน โดยทำให้เกิดแรง shear เพิ่ม แต่แรง shear มากก็อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้

12.1.5 ปริมาณเกลือในสารละลาย ที่ปริมาณเกลือในสารละลายสูง การเกิดโพลาไรเซชันก็จะมากขึ้นตามลำดับ

12.2 ค่า rejection เป็นค่าแสดงความสามารถป้องกันไม่ให้ตัวถูกละลายผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ในสภาพที่จำเพาะจะแสดงได้ในรูปสัมประสิทธิ์รีเจคชัน (rejection coefficient, R) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์รีเจคชันจากสมการ

$$R = 1 - (C_p/C_f) \qquad (1)$$

12.3 <u>อัตราการไหลของตัวทำละลาย</u> (solvent flux)

ถ้ากำหนดให้ตัวถูกละลายสามารถผ่านหรือไม่ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ได้อย่างอิสระแล้ว อัตราการไหลจะขึ้นกับชนิดของเยื่อแผ่นสังเคราะห์ รูปแบบจำลองของการเกิดโพลาไรเซชันในกรณีที่ตัวถูกละลายไม่ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ แสดงไว้ในสมการ (2)

$$J = K_s \ln (C_g/C_b) \qquad (2)$$

จากสมดุลมวลสาร เมื่อตัวถูกละลายไม่ผ่านเยื่อสังเคราะห์

$$C_f V_f = C_r V_r \qquad (3)$$

$$C_r = C_f V_f / V_r \qquad (4)$$

แทนค่า C_r ในสมการ (2) เมื่อ $C_b = C_r$

$$J = K_s \ln C_g/C_f - K_s \ln V_f/V_r \qquad (5)$$

ถ้าค่า K_s, C_g และ C_f คงที่ เมื่อเขียนกราฟ semi-log ของ volume reduction factor (V_f/V_r) กับอัตราการไหล (J) จะได้เป็นเส้นตรง ความชันของกราฟจะแสดงค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลและจุดตัดแกนวาย จะเป็นค่าของอัตราส่วนของความเข้มข้นของกำแพงโพลาไรเซชัน กับ ความเข้มข้นของสารโมเลกุลใหญ่เริ่มต้น

13. <u>การใช้ประโยชน์ของกลูโคอะไมเลส</u>

1. การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อม ในปัจจุบันในเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส และกลูโคอะ-ไมเลส ผลิตกลูโคสจากแป้งแทนการใช้กรด เพราะการใช้กรดจะให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by product) ที่ไม่ต้องการ ทำให้น้ำเชื่อมมีกลิ่นและรสไม่ดี กลูโคสที่ได้ไม่บริสุทธิ์

2. การผลิตแอลกอฮอล์ และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น ไทย ผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อราย่อยแป้งเป็นกลูโคสมาตั้งแต่สมัยโบราณ ซึ่งแตกต่างจากประเทศตะวันตกที่มักจะใช้เอนไซม์จากข้าวมอลท์ แต่ปัจจุบันได้หันมาใช้อัลฟาอะไม-เลส และกลูโคอะไมเลสจากรามแทนข้าวมอลท์

3. ในอุตสาหกรรมขนมปัง จะเติมเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส, กลูโคอะไมเลส และกลูโคสไอโซเมอเรส ลงในแป้ง (dough) เพื่อเพิ่มคุณภาพและปรับปรุงรสชาดของขนมปังให้ดีขึ้น (Berchtold et. al., Eur Pat., 1985)

4. การผลิตข้าวสุกสำเร็จรูป (cooked rice) จะใช้เอนไซม์ผสมอัลฟาอะไมเลส, กลูโคอะไมเลส, โปรติเนส ฯลฯ ในการหุงข้าว เพื่อเพิ่มรสชาด กลิ่นหอม และยืดอายุการเก็บ (shelf life) ของข้าวสุกสำเร็จรูป (Amano Pharma, Co., Jpn. Pat., 1985)

5. ในยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปาก การเติมกลูโคอะไมเลสและเปอร์ออกซิเดส จะช่วยลดกรดจากจุลินทรีย์ในปาก ป้องกันการสะสมพลัค (plaque) โรคเหงือกอักเสบ (gengivitis) และแผลในปาก (aphthous lesion) (Hoogendoorn, 1985)

14. <u>ตลาดและความต้องการกลูโคอะไมเลส</u>

กลูโคอะไมเลสเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมหลายประเภทดังกล่าวแล้ว ในตลาดเอนไซม์จากจุลินทรีย์ของโลก กลูโคอะไมเลสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีผลผลิตและมียอดขายเป็นอันดับ 2 ของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้งหมด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 (Hacking, 1986)

ประเทศไทยยังไม่มีอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์โดยตรงเลย กลูโคอะไมเลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมในประเทศไทยนั้นสั่งจากต่างประเทศทั้งสิ้น โดยสั่งเข้าในชื่อการค้าต่าง ๆ กันคือ glucoamylase, AMG, glucozyme, optidex และ diazyme มูลค่ารวมและปริมาณการนำเข้ารวมของกลูโคอะไมเลส แสดงในตารางที่ 4 โดยรวบรวมจากมูลค่าและปริมาณการนำเข้าของกลูโคอะไมเลสในชื่อการค้าต่าง ๆ (วรัญญา ผ่านเจริญ, 2528)

15. <u>เหตุจูงใจในการทำวิจัย</u>

กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในอุตสาหกรรม แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกลูโคอะไมเลสเป็นการค้า จึงจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศมูลค่าปีละหลายล้านบาท แต่การผลิตกลูโคอะไมเลสในประเทศไทยยังมีการศึกษากันน้อย และนิยมศึกษาในอาหารแข็ง ซึ่งไม่เหมาะที่จะขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีปัจจัยที่ต้องควบคุมมากกว่าสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงานในการควบคุมการผลิตสูงมาก (Aunstrup, 1972) ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงการผลิตเอนไซม์นี้ในอาหารเหลว โดยใช้วัตถุดิบที่หาง่ายและราคาถูก

012883

ตารางที่ 3 ปริมาณการผลิตเอนไซม์และยอดขายเปรียบเทียบของโลก (Hacking, 1986)

เอนไซม์	ผลผลิตต่อปี (ตันของโปรตีนเอนไซม์บริสุทธิ์)	ยอดขายเปรียบเทียบ
โปรติเอสจากแบคทีเรีย	500	40
กลูโคอะไมเลส	300	14
อัลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus* spp.	300	12
กลูโคสไอโซเมอเรส	50	12
เพคติเนส	10	10
เรนนินจากจุลินทรีย์	10	7
อัลฟาอะไมเลสจากรา	10	3
โปรติเอสจากรา	10	1
อื่น ๆ	-	1

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณและมูลค่ากลูโคอะไมเลสที่นำเข้าประเทศไทย

ปี พ.ศ.	ปริมาณนำเข้า (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2521	0.8	3.5
2523	5.4	9.4
2524	4.7	56.6
2525	6.4	36.9
2526	4.7	88.1
2527	6.1	81.8

16. <u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. เพื่อศึกษาการผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลว โดยใช้วัตถุดิบในประเทศ

2. เพื่อศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลวระดับขวดแก้วทรงกรวย

3. เพื่อศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลวระดับถังหมัก 5 ลิตร

4. เพื่อศึกษาการเตรียมกลูโคอะไมเลสเข้มข้นที่ผลิตจาก *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย