วิธีที่เหมาะสมในการขจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยจำลองโดยเดกซ์แทรนเนส

นางสาวผกาแก้ว เต็มคำขวัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN :974-14-2153-2
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SUITABLE METHOD FOR DEXTRAN REMOVAL IN SIMULATED CANE JUICE BY DEXTRANASE

Miss Phakakaew Temkamkwan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN : 974-14-2153-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	วิธีที่เหมาะสมในการขจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยจำลองโดยเดกซ์แทรนเนส
โดย	นางสาวผกาแก้ว เต็มคำขวัญ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผกาแก้ว เต็มคำขวัญ : วิธีที่เหมาะสมในการขจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยจำลองโดยเดกซ์แทรนเนส. (SUITABLE METHOD FOR DEXTRAN REMOVAL IN SIMULATED CANE JUICE BY DEXTRANASE) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา 151 หน้า. ISBN: 974-14-2153-2

ทำการหาภาวะเหมาะสมในการนำเดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ไปใช้ในการกำจัดเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย โดยเปรียบเทียบแอคติวิตีระหว่างเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายที่ใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการสร้างพันธะ พบว่า เดกซ์แทรนเนสอิสระมีแอคติวิตีอยู่ในช่วง 250 ถึง 300 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 55 องศาเซลเซียส และ 4.5 ตามลำดับ ในขณะที่แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอยู่ในช่วง 40 ถึง 50 หน่วยต่อปริมาณทรายทั้งหมด 5 กรัมที่ใช้ตรึง อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 55 องศาเซลเซียส และ 5.0 ตามลำดับ จากการศึกษาการทำงานของเดกซ์แทรนเนสทั้งแบบอิสระ และแบบตรึงรูปในน้ำอ้อย พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายเดกซ์แทรนได้ดีพอกับในบัฟเฟอร์ นั่นคือ สิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำอ้อยไม่ส่งผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์ จากการที่น้ำอ้อยจากโรงงานน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากซึ่งทำให้เป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จึงทำการทดลองต่อโดยใช้สารละลายน้ำตาลทราย 13% แทนน้ำอ้อย พบว่าเอนไซม์ที่ใช้ซึ่งนำมาจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีการปนเปื้อนด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสที่สามารถย่อยสลายน้ำตาลทรายให้น้ำตาลรีดิวซ์ขึ้น จึงทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านลงในคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A ซึ่งทำให้สามารถลดการปนเปื้อนเอนไซม์อื่นได้ส่งผลให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้เป็น 32,810 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่า Km ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 เท่ากับ 2.6305 ไมโครโมล และ Vmax เท่ากับ 3.407 ไมโครโมลเดกซ์แทรนที-2000 ต่อนาที และเมื่อนำมาหา residential time สำหรับการย่อยเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1 และ 2% ในสารละลายน้ำตาลทราย13% 1 มิลลิลิตร ได้อย่างสมบูรณ์นั้น สามารถใช้เดกซ์แทรนเนส 1 หน่วย ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 6, 12, 16 และ 40 นาที ตามลำดับ และสำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปให้ค่า Km ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 เท่ากับ 1.5146 ไมโครโมล และ Vmax เท่ากับ 1.6622 ไมโครโมลเดกซ์แทรนที-2000 ต่อนาที โดย residential time ในการใช้ เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.074 หน่วย ในการย่อยเดกซ์แทรนเท่ากับ 10, 15, 30, และ 50 นาที ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต ผกาแก้ว เต็มคำขวัญ
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2548	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4572390123 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: Dextranase / Immobilized / *Penicillium* sp. SMCU 3-14

PHAKAKAEW TEMKAMKWAN : SUITABLE METHOD FOR DEXTRAN REMOVAL IN SIMULATED CANE JUICE BY DEXTRANASE. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF.SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF.SUPAT CHAROENPORNWATTANA, Ph.D., 151 pp. ISBN : 974-14-2153-2

Optimal conditions for the removal of dextran in cane juice by dextranase from *Penicillium* sp. SMCU 3-14 were carried out. Activity comparison of free enzyme with that of glutaraldehyde covalent immobilized form on 16-20 mesh river sand was in a range of 250 to 300 unit/ml with optimum temperature and pH of 55°C and 4.5, respectively while that of immobilized form was in range of 40 to 50 unit/ml and optimum temperature and pH of 55°C and 5.0. Both free and immobilized dextranase showed ability to degrade dextran equally well in both cane juice and buffer. It was further observed that impurity in cane juice tested did not interfere or inhibit action of the enzyme. However as the high level of reducing sugar in cane juice interfered with the experiment , a simulated cane juice of 13% sucrose solution was therefore employed in the later part of experiment. The high amount of reducing sugar presence in 13% sucrose was product formed by the activity of invertase contaminated in crude dextranase. Partial enzyme purification via ammonium sulfate precipitation and DEAE-BioGel A Column Chromatography gave rise of enzyme with activity of 32.810 unit/ml. The Km value of the enzyme toward its substrate dextran T-2000 was found to be 2.6305 micromole and Vmax of 3.407 micromole/min. Residential time for the degradation of 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0% dextran in 1 ml of 13%sugar by 1 unit of purified dextranase was 6, 12, 16 and 40 min, respectively. Km value of the immobilized purified dextranase was 1.5146 micromole and Vmax was 1.6622 micromole/min while residential time for the degradation of 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0% dextran in 1 ml of 13%sugar by 1.074 unit of immobilized purified dextranase was 10,15, 30 and 50 min, respectively.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature Phakakaew Temkamkwan

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature

Academic year 2005 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณามอบความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ยิ่งต่อการวิจัย และการใช้ชีวิตของข้าพเจ้า ซึ่งส่งผลให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดจนได้สละเวลาในการปรับปรุง และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้ความดูแลเป็นอย่างดี รวมทั้งให้คำปรึกษา และแนะแนวทางในการทำงานวิจัยให้แก่ข้าพเจ้า ตลอดจนได้สละเวลาในการปรับปรุง และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณาเป็นประธานและคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ได้มอบคำแนะนำต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับมาตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษาในภาควิชานี้ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ประสิทธิประศาสน์ความรู้อันทรงคุณค่าให้แก่ศิษย์ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆท่าน ที่ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร พี่อำไพ ที่ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องวัดความหนืด

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่เอ พี่แป๋ง พี่ก้อย น้องวิม น้องเฟิร์ส และน้องจั๊ม สำหรับคำปรึกษาที่ดี และความช่วยเหลือที่มีให้กันมาตลอด รวมถึงพี่ ๆ น้องๆ ในภาควิชาและเพื่อนๆร่วมรุ่นที่น่ารักทุกคนที่ใช้ชีวิตร่วมกัน ให้ความเป็นกันเอง สร้างความสนุกสนาน และมีส่วนช่วยให้มีกำลังใจในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เฉิดฉัน วสุ และเพื่อนๆ เขมะสิริอนุสสรณ์ทุกคน ที่เป็นเพื่อนที่ดี ให้คำปรึกษาในทุกๆ เรื่อง และคอยให้กำลังใจกันมาโดยตลอด ขอบคุณมาก

และสุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาเป็นอย่างดี รวมทั้งหนุ่ม แมน และครอบครัวเต็มคำขวัญทุกคน ที่ให้กำลังใจ ห่วงใยในทุกๆ เรื่องมาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ซ

สารบัญรูป .... ญ

บทที่

1. บทนำ 1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม 6
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง 43
4. ผลการทดลอง 66
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 130

รายการอ้างอิง 135

ภาคผนวก 141

ภาคผนวก ก 142

ภาคผนวก ข 143

ภาคผนวก ค 147

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 151

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1.1 เปรียบเทียบผลสำรวจอ้อย และน้ำตาลทรายตั้งแต่ปีการผลิต 2525/2526 -2541/2542 3

2.1 ปริมาณผลิตภัณฑ์และผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลโดยใช้อ้อย 100 ตัน เป็นวัตถุดิบ.....6

2.2 แสดงส่วนประกอบในน้ำอ้อย 7

2.3 แสดงองค์ประกอบเคมีในน้ำอ้อย..... 8

2.4 ปริมาณ *Leuconostoc* spp. ที่พบได้ในกระบวนการผลิต..... 22

2.5 ค่าการเปลี่ยนแปลง C.C.S. ของอ้อย 22

2.6 ปริมาณเดกซ์แทรนโดยเฉลี่ยในอ้อยสด และอ้อยไฟไหม้ภายหลังการเก็บเกี่ยว 48 ชั่วโมง....23

2.7 ตารางประเมินความเสียหายจากการทิ้งอ้อยไว้ก่อนการนำเข้า กระบวนการผลิต.....24

2.8 การสูญเสียน้ำตาลซูโครส (%) คาดคะเนจากปริมาณเดกซ์แทรนที่พบในน้ำตาลทรายดิบ...26

2.9 ปริมาณต่ำสุดของเดกซ์แทรนที่สร้างปัญหาในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาล.....26

2.10 แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ.....39

2.11 แสดงตัวอย่างรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส..... 40

4.1 แสดงผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระเทียบกับแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป..... 67

4.2 แสดงผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระเทียบกับแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (ใช้ทรายตรึงรูปในการวิเคราะห์ 0.01 กรัม)..... 70

4.3 แสดงการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำอ้อยในกระบวนการผลิตโดยการวัดอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง วิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนและน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำอ้อย..... 82

4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากจากวิธีไดแอลิซิส.....89

ตาราง หน้า

4.5 การวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต.....102

4.6 การวิเคราะห์อินเวอร์เทสแอคติวิตีที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 103

4.7 การวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่ได้จากการน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับ ส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ 106

4.8 การวิเคราะห์อินเวอร์เทสแอคติวิตีที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์.....107

4.9 การวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่ได้จากการน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับ ส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ 110

4.10 การวิเคราะห์อินเวอร์เทสแอคติวิตีที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์..... 111

4.11 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่อ เดกซ์แทรน ที-2000 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% 119

4.12 แสดงผลการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์บนทราย 121

4.13 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ตรึงรูปบนทราย ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....124

4.14 เปรียบเทียบความสามารถในการทำงาน15นาทีของเอนไซม์ตรึงรูป 1.074 หน่วย / ทราย 0.1 กรัม 129

4.15 เปรียบเทียบความสามารถในการทำงาน 15 นาที ของเอนไซม์ตรึงรูป 1.977 หน่วย / ทราย 0.1 กรัม 129

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 การขนถ่ายอ้อยโดยอาศัยเครื่องมือช่วยลาก..... 9

2.2 ลูกหีบที่เรียงต่อกันเป็นชุด 10

2.3 หม้อต้มระเหย 11

2.4 ถังพักผลึกน้ำตาล 13

2.5 หม้อปั่นน้ำตาลทราย 14

2.6 แสดงลักษณะของเดกซ์แทรน 20

4.1 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเวลา
ในการเกิดปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตี...69

4.2 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เกิดจาก
การตรึงเดกซ์แทรนเนสอิสระที่มีแอคติวิตีต่างๆ โดยเปรียบเทียบวิธีการตรึงรูป
ระหว่างการใช้ โปรตีน BSA และไม่ใช้โปรตีน BSA เป็นสารช่วยตรึง 72

4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อเดกซ์แทรน T- 2000 0.25%
ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 74

4.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปต่อเดกซ์แทรน T-2000 0.25%
ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 75

4.5 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อ
เดกซ์แทรน T- 2000 0.25%ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 76

4.6 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปต่อ
เดกซ์แทรน T- 2000 0.25%ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 77

4.7 การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.5 หน่วย ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T- 2000 0.25%
อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 79

รูปที่ หน้า

4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเกิดจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างสมบูรณ์ 81

4.9 การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T- 2000 0.25% ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส..... 84

4.10 การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T- 2000 0.25% ในน้ำอ้อยอย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 85

4.11 การใช้เดกซ์แทรนเนส และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายในการย่อยสลายเดกซ์แทรน 2%ในภาวะน้ำอ้อย โดยอาศัยเทคนิคการไดแอลิซิส.....87

4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากวิธี ไดแอลิซิส.....90

4.13 การเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมโดยการใช้ Magnetic stirrer.....92

4.14 การเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมโดยการใช้ Sonicator.....93

4.15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03 หน่วย ต่อเดกซ์แทรน 0.625% ในสารละลายน้ำตาลทราย13% จากการทดสอบการหยุดปฏิกิริยาเปรียบเทียบระหว่างการต้มหยุดปฏิกิริยา การใช้เอธานอล และการใช้เมธานอล.....95

4.16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.5 หน่วย ต่อเดกซ์แทรน 0.625% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% จากการทดสอบการหยุดปฏิกิริยาเปรียบเทียบระหว่างการต้มหยุดปฏิกิริยา การใช้เอธานอล และการใช้เมธานอล.....96

4.17 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย 13%.....98

4.18 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....99

รูปที่ หน้า

4.19 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรน ที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....100

4.20 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 30 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรน ที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....101

4.21 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A โดยใช้เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์.....105

4.22 ผลการทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีDEAE-BioGel A โดยใช้เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์.....109

4.23 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.03 หน่วยต่อมิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....113

4.24 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....114

4.25 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1 หน่วย ต่อมิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....115

4.26 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.5 หน่วย ต่อมิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....116

4.27 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.75 หน่วย ต่อมิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....117

4.28 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1 หน่วย ต่อ มิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....118

4.29 กราฟแสดงไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า Km และ Vmaxของเดกซ์แทรนเนสอิสระ ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ต่อเดกซ์แทรนที-2000 120

4.30 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.074 หน่วย ต่อมิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....122

รูปที่ หน้า

4.31 Residential time ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.977 หน่วย ต่อมิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย13%.....123
4.32 กราฟแสดงไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอต ในการหาค่า Km และ Vmax ของเดกซ์แทรนเนส ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูปต่อเดกซ์แทรนที-2000 125
4.33 แสดงการทดสอบจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.074 หน่วย.....127
4.34 แสดงการทดสอบจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.977 หน่วย.....128

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเพาะปลูก หนึ่งในพืชที่เพาะปลูกคือ อ้อย โดยเกษตรกรส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นเพื่อการผลิตน้ำตาลเป็นสำคัญ อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายของประเทศไทยจัดเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ โดยเป็นประเทศผู้ผลิต และส่งออกน้ำตาลเป็นอันดับสามของโลก (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2533) ในแต่ละปีสร้างรายได้เข้าประเทศมากกว่าสามหมื่นล้านบาท โดยพืชเศรษฐกิจที่ใช้เป็นวัตถุดิบคือ อ้อย จากข้อมูลสถิติย้อนหลังของอุตสาหกรรมอ้อย และน้ำตาลทรายในประเทศไทย พบว่า ผลผลิตอ้อย และน้ำตาลมีปริมาณสูงมากขึ้นทุกปี โดยมีการขยายตัวการผลิตน้ำตาลในอัตราสูงมากจาก 2.22 ล้านตันในปีการผลิต 2525/2526 เป็น 6.03 ล้านตันในปีการผลิต 2538/2539 เนื่องจากมีการปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตที่ดีขึ้น อีกทั้งมีการเพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกอ้อยมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันมีพื้นที่การเพาะปลูกอ้อยทั่วประเทศประมาณ 6.0 ล้านไร่ ดังแสดงในตารางที่ 1.1 โดยปลูกเป็นส่วนมากในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือตามลำดับ ผลผลิตน้ำตาลทรายดิบจากอ้อยในปัจจุบันคือ ประมาณ 90 กิโลกรัมต่ออ้อย 1 ตัน (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527)

อย่างไรก็ตามการผลิตน้ำตาลยังไม่ได้ผลผลิตสูงเท่าที่ควรเนื่องจากประสบปัญหาในระหว่างกระบวนการเก็บเกี่ยว จากการปนเปื้อนของเดกซ์แทรน (dextran) และกรด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ของจุลินทรีย์จำพวกแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ทั้งนี้แบคทีเรียพวกนี้จะเจริญได้ดีในภาวะเป็นกลางหรือกรด ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่ำๆ (เช่น 12-18% ซูโครส) ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 จึงสามารถปนเปื้อน และเจริญบริเวณรอยตัดของอ้อยที่ถูกไฟไหม้ โดยกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะทำการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นผลให้สูญเสียน้ำตาลซูโครสร้อยละ 0.2-0.6 (บุญส่ง แสงอ่อน และ วิวัฒน์ แดงสุภา, 2527) นอกจากนี้จากการที่เดกซ์แทรนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมกันเป็นสายยาว ซึ่งมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว ยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตคุณภาพของน้ำตาลทราย และผลิตภัณฑ์ที่นำน้ำตาลทรายไปใช้เป็นส่วนประกอบ โดยทำให้เกิดการอุดตันบริเวณ ท่อส่ง ตะแกรง มีผลต่อการไหล การกรอง อัตราการระเหย การทำให้เดือด และ

การตกตะกอนของน้ำอ้อย รวมทั้งส่งผลต่อลักษณะผลึกของน้ำตาลทรายที่ได้ ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียของปริมาณน้ำตาลทรายถึง 9.2% ต่อผลผลิตของน้ำตาลทรายที่ได้ต่อปี (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่1.1 เปรียบเทียบผลสำรวจอ้อยและน้ำตาลทรายตั้งแต่ปีการผลิต 2525/2526–2541/2542

ปีการผลิต	พื้นที่เพาะปลูก (ล้านไร่)	อ้อยเข้าหีบ (ล้านตัน)	น้ำตาล (ล้านตัน)
2525/26	4.08	23.92	2.22
2526/27	3.55	23.09	2.21
2527/28	3.81	25.05	2.47
2528/29	3.86	24.00	2.48
2529/30	3.46	24.44	2.54
2530/31	3.75	27.19	2.59
2531/32	4.13	36.67	2.90
2532/33	4.56	33.56	3.35
2533/34	5.28	40.44	3.83
2534/35	6.06	47.50	4.88
2535/36	6.04	34.71	3.62
2536/37	6.03	37.57	3.82
2537/38	5.64	50.46	5.27
2538/39	6.24	57.69	6.03
2539/40	6.00	56.19	5.82
2540/41	5.74	42.21	4.08
2541/42	5.91	50.06	5.19

ที่มา : อุตสาหกรรมอ้อย และน้ำตาลทรายในประเทศไทย 2541/2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีผู้สนใจศึกษาวิธีการกำจัดเดกซ์แทรนโดยวิธีต่างๆ เช่น การใช้สารเคมี หรือ Biocides ในการกำจัดจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุ รวมทั้งมีการฉีดล้างเครื่องจักรด้วยไอน้ำตามเวลาที่กำหนด แต่ในภายหลังได้มีความสนใจในการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรน ซึ่งพบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้จริงสูง เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่ต้องการภาวะที่รุนแรง อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงความประหยัด การใช้เอนไซม์อิสระนั้นเป็นการใช้งานเพียงครั้งเดียว ย่อมไม่เป็นการประหยัด แต่หากเราสามารถตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยวิธีที่เหมาะสมจะสามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ได้มากกว่าเพียงครั้งเดียว ซึ่งทำให้เกิดความคุ้มทุนสูงขึ้น ลดการปนเปื้อนของสารเคมีในผลิตภัณฑ์ ทำให้ลดปัญหาที่เกิดขึ้นจากเดกซ์แทรนลงได้ (Jolly and Prakash, 1987) การตรึงรูปเอนไซม์ในบางครั้งส่งผลให้เอนไซม์มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นหลายประการ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย คือ เอนไซม์มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทนทานต่อความเป็นกรดด่างดีขึ้น เก็บรักษาง่าย อายุการใช้งานนานมากขึ้น และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากขึ้น เป็นต้น ประสทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปนั้นคือวิธีการ ตัวพยุง สารเคมี และภาวะในการทำงานที่เลือกใช้ให้มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์น้อยที่สุด แต่มีการจับกับตัวพยุงที่ดี เพื่อสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายๆครั้ง

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งทำการกลายพันธุ์โดย สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) เพื่อนำมาตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะโควาเลนท์กับทรายแม่น้ำขนาด 16-20 เมช ทั้งนี้เนื่องจากทรายแม่น้ำเป็นวัสดุตามธรรมชาติที่หาได้ง่าย ราคาถูก ทนต่อการทำลายเชิงกล และการทำลายโดยจุลินทรีย์ ข้อดีอีกข้อหนึ่งคือ หากมีการหลุดของทรายเข้าไปในน้ำอ้อยแล้วทรายนี้จะถูกขจัดออกได้โดยการเข้าสู่ระบบกำจัดทรายเช่น การกรอง ซึ่งเป็นขั้นตอนปกติขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ความสามารถในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ และภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ ต่อการขจัดเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นพื้นฐานในการวิจัยต่อไป และสามารถนำไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม

การวิจัยในครั้งนี้ได้เปรียบเทียบความสามารถในการทำงานระหว่างเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป และเดกซ์แทรนเนสอิสระ ในการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย โดยจะสามารถพิจารณาจากผลการทดลองได้ว่า เอนไซม์ในรูปแบบใดที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด โดยพิจารณาจาก ความสามารถ และเวลาที่ใช้ในการย่อยเดกซ์แทรน รวมทั้งมีการคำนึงถึง ความสามารถในการใช้ซ้ำของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ต้นทุน และเวลาในการตรึงรูปว่ามีความเหมาะสมในการนำไปใช้จริงหรือไม่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อไปในการเพิ่มระดับการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในปริมาณที่สูงยิ่งขึ้น สำหรับการแก้ปัญหาในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย เพื่อลดการสูญเสียผลผลิตน้ำตาลทราย อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของเดกซ์แทรน และเพื่อให้ได้น้ำตาลทรายที่มีคุณภาพสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

อ้อยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* ในประเทศไทยมีการปลูกอ้อยทั่วทุกภาค อ้อยเป็นพืชที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการผลิตชีวมวลเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่มีอายุ 12 เดือนด้วยกันในเขตร้อนชื้น ภายใต้ภาวะน้ำฝนจากธรรมชาติอย่างเดียว จะมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง 0.8% และ 1.1% ในภาวะที่มีการชลประทานด้วย โดยถ้ามีการจัดการ และมีการชลประทานที่มีประสิทธิภาพ จะสามารถได้อ้อยส่วนที่จะเข้าโรงงาน (แยกยอด ใบ และขรุยของอ้อยออกแล้ว) ถึง 100 ตันต่อพื้นที่เพาะปลูก 1 เฮกแตร์ (1 เฮกแตร์ = 6.25 ไร่) และได้ชีวมวลทั้งหมด (อ้อยที่เข้าโรงงานรวมยอด ใบและ ขรุย) 148 ตัน (น้ำหนักเปียก) / เฮกแตร์

ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยนอกจากจะได้น้ำตาลแล้ว ยังได้ผลิตผลพลอยได้หลายชนิด ซึ่งถ้าแบ่งเป็นกลุ่มตามขั้นตอนที่ผลิตผลพลอยได้จะแบ่ง 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนที่ได้จากการเก็บเกี่ยวได้แก่ ยอด ใบ และขรุยของอ้อย ส่วนหลังจะได้มาระหว่างกระบวนการผลิต ได้แก่ กากอ้อย, กากน้ำตาลสุดท้าย และ กากตะกอน ในการผลิตน้ำตาลจากอ้อย 100 ตัน โดยใช้เทคโนโลยีในการผลิตปัจจุบันสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ และผลิตผลพลอยได้โดยประมาณ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณผลิตภัณฑ์และผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลโดยใช้อ้อย 100 ตัน เป็นวัตถุดิบ

ผลิตภัณฑ์และผลพลอยได้	ปริมาณ (ตัน)*	ปริมาณ (ตัน)**
น้ำตาล (recoverable sugar)	12.0	11-12
กากอ้อย (ความชื้น 50%)	27.5	25-30
กากน้ำตาลสุดท้าย (88°Brix)	3.4	5
ขี้ตะกอน (ความชื้น 77%)	3.4	-
ใบสด	7.8	-
ใบแห้ง	6.9	-
ยอดอ้อย	6.9	-

ที่มา : * GEPLACEA/UNDP, cited in Silverio (1991) ** สำรวจจากประเทศไทย

การผลิตน้ำตาลทรายนั้นจะเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งผลิตได้จากน้ำอ้อย โดยในน้ำอ้อยจะมีส่วนประกอบ และคุณสมบัติทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบในน้ำอ้อย

ส่วนประกอบในน้ำอ้อย	ปริมาณ (%)
1. น้ำ	74.50
2. เถ้า	0.50
3. ไฟเบอร์	
- เซลลูโลส	5.50
- ไซแลน	2.00
- กัม	0.50
- ลิกนิน	2.00
4. น้ำตาล	
- ซูโครส	12.50
- เดกซ์แทรน	0.90
- ลีวูโลส	0.60
5. ไนโตรเจน	0.40
6. ไข	0.20
7. เพกติน	0.20
8. กรด	0.20

ที่มา : สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบทางเคมีในน้ำอ้อย

องค์ประกอบอ้อย 100 กรัม	ปริมาณเฉลี่ย
ความเป็นกรดด่างของอ้อยที่เจริญเต็มที่	5.18
พลังงานอาหาร(food energy)	55.15 แคลอรี
ความชื้น (moisture)	84.95 เปอร์เซ็นต์
โปรตีน (protein)	0.345 กรัม
ไขมัน (fat)	0.20 กรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate)	14.30 กรัม
เถ้า (ash)	0.30 กรัม
แคลเซียม (calcium)	12.0 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส (phosphorus)	8.50 มิลลิกรัม
เหล็ก (iron)	0.55 มิลลิกรัม
โซเดียม (sodium)	2.00 มิลลิกรัม
โพแทสเซียม (potassium)	102 มิลลิกรัม
วิตามิน เอ (β-carotene equivalent)	ปริมาณเล็กน้อย
วิตามิน บี 1 (thiamine)	0.01 มิลลิกรัม
วิตามิน บี 2 (riboflavin)	0.01 มิลลิกรัม
ไนอะซิน (niacin)	0.10 มิลลิกรัม

ที่มา: Barnes (1974)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำตาลทราย คือ น้ำตาลซูโครส (sucrose) ซึ่งแยกได้จากหม้อปั่นน้ำตาล (centrifuge) วัตถุดิบซึ่งเป็นที่มาของน้ำตาลชนิดนี้ได้แก่ อ้อย (sugarcane) และหัวผักกาดหวาน (beet roots) น้ำตาลทรายซึ่งผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลทรายนั้นแบ่งออกได้หลายประเภทเช่น น้ำตาลทรายดิบ (raw sugar) น้ำตาลสีรำ (brown sugar) น้ำตาลทรายขาว (plantation white sugar) และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refined sugar) เป็นต้น นอกจากการผลิตน้ำตาลทรายแต่ละประเภทดังกล่าวจะต้องใช้กระบวนการผลิตที่ต่างกันแล้ว ในการผลิตน้ำตาลทรายประเภทเดียวกันก็ยังอาจใช้กระบวนการผลิตที่ต่างกันออกไปอีก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขีดความสามารถตลอดจนความเหมาะสมของแต่ละโรงงาน

2.1 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

น้ำตาลทรายดิบเป็นน้ำตาลที่มีผลึกเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีความชื้นสูงเนื่องจากผลึกถูกห่อหุ้มไปด้วยกากน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์ต่ำเป็นจำนวนมาก ไม่ผ่านกรรมวิธีการฟอกสี

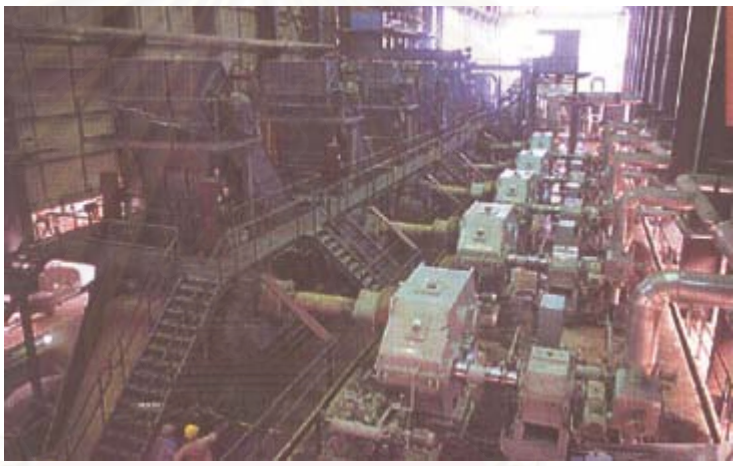
น้ำตาลทรายขาวมีลักษณะเป็นผลึกขาวมี โพลาไรเซชัน ประมาณ 99 องศา ปกติผลิตจากอ้อยโดยตรงสำหรับโรงงานที่มีลูกหีบ กระบวนการผลิตในระยะเริ่มต้นจะเหมือนน้ำตาลทรายดิบจะเริ่มแตกต่างกันตั้งแต่การทำน้ำอ้อยให้ใส

2.1.1 การขนถ่ายอ้อย (cane transportation and unloading) หลังจากผ่านการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในอ้อย หรือค่า C.C.S. แล้ว อ้อยจะถูกลำเลียงมายังลานพักอ้อย (cane yard) เพื่อทำการชั่งบันทึกน้ำหนักอ้อย ในการปล่อยให้อ้อยหล่นลงบนสะพานอ้อย (cane carrier) โดยอาศัยเครื่องมือช่วยลาก ดังรูป 2.1 เพื่อเตรียมพร้อมเข้าสู่เครื่องมือชนิดต่างๆ

รูปที่ 2.1 การขนถ่ายอ้อยโดยอาศัยเครื่องมือช่วยลาก

2.1.2 การเตรียมอ้อยก่อนเข้าลูกหีบ (cane preparation) คือการทำให้ลำอ้อยกลายเป็นชิ้นละเอียดก่อนป้อนเข้าลูกหีบ โดยอาศัยเครื่องฉีก (shredder) ฉีกย่อยอ้อยให้เป็นฝอยละเอียด โดยอาศัยการตีของแท่งค้อนที่เหวี่ยงตัวหมุนลงมา

2.1.3 การบดอ้อย (cane milling) อ้อยจะถูกลำเลียงไปโดยสะพานป้อนอ้อย เข้าสู่ลูกหีบชุดที่1 น้ำอ้อยที่สกัดได้เรียกว่าน้ำอ้อยที่สกัดได้ขั้นแรก ซึ่งเป็นน้ำอ้อยแท้ จากนั้นอ้อยจะถูกพ่นด้วยน้ำแล้วนำเข้าลูกหีบชุดต่อไป ทำให้ได้น้ำอ้อยสกัดขั้นที่สอง ส่วนผสมของน้ำอ้อยทั้งสองส่วนนี้เรียกว่า น้ำอ้อยรวม (mixed juice) ลักษณะของลูกหีบแสดงดังรูปที่2.2



รูปที่ 2.2 ลูกหีบที่เรียงต่อกันเป็นชุด

2.1.4 ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยใส (clarification) ขั้นตอนนี้จะแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยโดยการตกตะกอน เช่น

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ จะใช้วิธีที่เรียกว่า defecation method โดยนำน้ำอ้อยรวมเข้าหม้ออุ่นน้ำอ้อยเมื่ออุณหภูมิถึง 55 องศาเซลเซียส จึงเติมปูนขาวลงไปจนกระทั่งมี ค่าความเป็นกรดด่าง ประมาณ 7.0-7.2 ระยะเวลาผสมไม่ควรเกิน 3 นาที จากนั้นนำเข้าหม้ออุ่นให้น้ำอ้อยมีอุณหภูมิ 102-105 องศาเซลเซียส และผสมกับสารรวมตะกอน (flocculant) สิ่งสกปรกที่ตกตะกอนลงมาเรียกตะกอนตม (mud) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 25 ของน้ำอ้อยใส

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว จะทำน้ำอ้อยบริสุทธิ์โดยเพิ่มกรรมวิธีฟอกสีน้ำอ้อย เช่นการใช้ระบบ ซัลฟิเทชัน (sulphitation) ฟอกสีน้ำอ้อยด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และระบบคาร์บอเนชัน (carbonation) ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งทั้งสองระบบนี้ยังคงต้องใช้น้ำปูนขาว และความร้อนในการทำน้ำอ้อยบริสุทธิ์ ส่วนการแยกตะกอนออกทำให้น้ำอ้อยใส นั้น ระบบซัลฟิเทชันยังคงต้องใช้ถังพักใส เช่นเดียวกับการผลิตน้ำตาลทรายดิบ แต่ระบบคาร์บอเนชันจะใช้เครื่องกรองแบบมีผ้ากรอง

2.1.5 ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยให้เป็นน้ำเชื่อม (evaporation) น้ำอ้อยที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามระบบดังกล่าวข้างต้น จะถูกส่งเข้าชุดหม้อต้ม หม้อต้มที่ใช้อาจเป็นระบบ 4-6 ชุด หม้อต้มระเหยเหล่านี้ตั้งเรียงเป็นแถวติดต่อกันดังแสดงในรูปที่ 2.3 ใช้ความร้อนจากไอน้ำ สำหรับใบแรกใช้ความร้อนสูงถึง 128 องศาเซลเซียส ไอน้ำที่เกิดขึ้นในหม้อต้มใบแรกจะถูกนำไปใช้ต้มระเหยน้ำอ้อยในหม้อต้มใบที่สอง และไอน้ำจากหม้อต้มใบที่สองจะถูกนำไปใช้ในหม้อต้มใบที่สามเช่นกัน การทำงานของหม้อต้มระเหยจะต่อเนื่องกันจนน้ำเชื่อมมีความเข้มข้น 65 บริกซ์ ภายใต้ภาวะสุญญากาศ

รูปที่ 2.3 หม้อต้มระเหย

2.1.6 ขั้นตอนการต้มเคี่ยวน้ำเชื่อม (boiling) น้ำเชื่อมจากถังพักน้ำเชื่อมจะถูกนำไปต้มเคี่ยวซึ่งใช้ความร้อนต่ำภายใต้สุญญากาศ (vacuum pan) ความร้อนที่ใช้ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส สุญญากาศประมาณ 26-28 นิ้วของปรอท น้ำเชื่อมจะถูกเคี่ยวจนมีความเข้มข้นมากขึ้น จนกระทั่งเกิดผลึก (crystalline mass) เมื่อน้ำเชื่อมอยู่ในลักษณะที่เต็มไปด้วยผลึกน้ำตาลเรียกว่า แมสซิควิท

2.1.7 ขั้นตอนการเลี้ยงผลึกน้ำตาลทรายในถังพักผลึก (crystallization in crystallizer) เนื่องจากแมสซิควิทที่ปล่อยออกมาจากหม้อเคี่ยวประกอบด้วยผลึกน้ำตาลทรายและน้ำเลี้ยงผลึก (mother liquor) การเลี้ยงผลึกน้ำตาลทำได้ 2 วิธีคือ

การเคี่ยวให้เกิดผลึกน้ำตาลขึ้นเองจะต้องเคี่ยวจนกระทั่งความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเพิ่มถึงภาวะเหนือจุดอิ่มตัวสูงสุด และลดความเข้มข้นลงโดยเติมน้ำหรือน้ำเชื่อม เลี้ยงผลึกน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้โตถึงขนาดที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงผลึกโดยวิธีนี้ในปัจจุบันไม่นิยมเนื่องจากการควบคุมปริมาณขนาด และความสม่ำเสมอของผลึกน้ำตาลทำได้ยาก

วิธีกระตุ้นให้เกิดแกนผลึกเฉียบพลัน (shock seeding) โดยเคี่ยวน้ำเชื่อมให้มีความเข้มข้นระดับหนึ่งตามกำหนด แล้วเติมผงเชื้อน้ำตาลซึ่งได้จากการบดน้ำตาลทรายขาวที่อบแห้งละเอียดขนาด 0.03 มิลลิเมตร ลงไปในหม้อเคี่ยว หลังจากนั้น 2-3 นาที ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึงระดับหนึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นอย่างเฉียบพลัน (shock) น้ำตาลที่ละลายในน้ำเชื่อมจะแยกตัวออกมาเป็นแกนผลึกอย่างต่อเนื่องมากมาย เมื่อแกนผลึกมีมากพอแล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำเชื่อมเข้าหม้อเคี่ยวระดับหนึ่งจนความเข้มข้นลดลงถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะในการเลี้ยงแกนผลึกเพื่อให้มีขนาดโตตามต้องการ

วิธีเติมผงเชื้อน้ำตาลตามจำนวนจริง (true seeding) โดยบดน้ำตาลทรายขาวที่อบแห้งแล้วผสมกับแอลกอฮอล์แล้วเติมลงในน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นถึงระดับที่กำหนด ปิดไอน้ำที่เข้าหม้อเคี่ยวจนกระทั่งผงเชื้อน้ำตาลกระจายตัวทั่วน้ำเชื่อม แล้วจึงเปิดไอน้ำเคี่ยวต่อประมาณ 15-30 นาที เติมน้ำเชื่อมเข้าไปอย่างต่อเนื่อง เลี้ยงผลึกที่เกิดขึ้นให้มีขนาดโตตามต้องการ

รูปที่ 2.4 ถังพักผลึกน้ำตาล

2.1.8 ขั้นตอนการแยกผลึกน้ำตาลทรายในหม้อปั่นน้ำตาลทราย (curing in centrifuge) เมื่อปล่อยให้แมสซิควิทเกิดผลึกที่มีขนาดโตตามต้องการแล้ว ให้ปล่อย แมสซิควิท ลงหม้อปั่นน้ำตาลทราย เมื่อหม้อปั่นหมุนด้วยแรงเหวี่ยงหนีศูนย์ กากน้ำตาลจะระบายผ่านรูตะแกรงออกมา

รูปที่ 2.5 หม้อปั่นน้ำตาลทราย

2.1.9 ขั้นตอนการอบ บรรจุ และเก็บน้ำตาลทราย (packaging) น้ำตาลทรายดิบจะได้ผลึกน้ำตาลซูโครสร้อยละ 96-98 และความชื้นร้อยละ 1-2 ต้องนำมาอบแห้งให้มีความชื้นเหลือเพียงร้อยละ 0.5 โดยการเก็บน้ำตาลอาจจะวางกองกับพื้น หรือเก็บโดยบรรจุกระสอบ โดยภาชนะบรรจุจะต้องปิดสนิท สถานที่เก็บจะต้องปิดสนิท และควรมีพัดลมดูดความชื้นออก

2.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์

น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกใสสะอาดไร้สี มีปริมาณร้อยละของน้ำตาลซูโครสไม่ต่ำกว่า 99.5% มีเถ้า (ash) ไม่เกินร้อยละ 0.04 และมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 0.07 นับว่าเป็นอินทรีย์ที่มีความบริสุทธิ์ (purity rubric) เกือบ 100% ในการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ปกติใช้น้ำตาลทรายดิบ (raw sugar) เป็นวัตถุดิบ ดังนั้นจึงจะทำการผลิตได้อย่างต่อเนื่องตลอดปี สำหรับโรงงานที่มีโรงหีบเอง จะทำการผลิตน้ำตาลทรายดิบจากอ้อยในฤดูตัดอ้อยเพื่อสะสมไว้ป้อนโรงงานผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์

สำหรับกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์นั้น มีวิธีการทำน้ำเชื่อมให้บริสุทธิ์ได้สูงกว่าวิธีการที่ใช้ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายชนิดอื่นที่กล่าวมาแล้ว และอาจแบ่งได้หลายแบบ คือ

2.2.1 Active carbon method วิธีนี้นำน้ำตาลทรายผสมกับน้ำเชื่อมสำหรับสร้างผลึก (affination syrup) ในถังผสมที่เรียกว่า magma mingler อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปสลัดแยกน้ำเชื่อมที่ล้างออกจากผลึกน้ำตาลทรายดิบด้วยหม้อปั่นน้ำตาลทรายที่เรียกว่า affination centrifuge น้ำตาลที่ได้เป็น Washed sugar ส่วนน้ำเชื่อมที่ล้างผลึกน้ำตาลเรียก affination syrup ซึ่งส่วนหนึ่งนำกลับไปใช้ล้างผลึกน้ำตาลทรายดิบอีก สำหรับผลึกน้ำตาลทรายที่ล้างแล้วแยกจากหม้อปั่นน้ำตาลทรายนำไปหลอมละลายใน melter และผสมกับ kieselguhr ซึ่งเป็นสารช่วยกรอง (filter aid) กับผงถ่านฟอกสี (active carbon) แล้วนำไปกรอง น้ำหวานที่กรองได้เรียก filtered liquor หรือ brown liquor แล้วนำไปฟอกสีอีกที น้ำหวานที่กรองได้เรียกว่า decolorized liquor หรือ fine liquor มีลักษณะใสสะอาดเกือบไร้สี นำไปต้มระเหยในหม้อต้ม (evaporator) จนมีความเข้มข้นเป็นน้ำเชื่อม 60-65 บริกซ์ แล้วส่งต่อไปเคี่ยวให้เป็น แมสซิควิท ตกผลึกจนมีความเข้มข้น 90-93 บริกซ์ ปล่อย แมสซิควิท ลงถังพักผลึกจนผลึกโตเต็มที่ปล่อยลงหม้อปั่นน้ำตาลแยกผลึกน้ำตาลทราย ใช้น้ำล้างกากน้ำตาลออกจากผลึก ส่งไปเข้าเครื่องอบ และทำให้เย็น แบ่งชั่งบรรจุกระสอบ

สารที่ใช้ในวิธีนี้ – Kieselguhr 0.7-0.8% raw sugar

- Active carbon 0.5-0.6% raw sugar

2.2.2 Bone char method วิธีนี้มีวิธีการปฏิบัติเหมือนวิธีแรกทุกประการต่างกันเฉพาะใช้ถ่านกระดูก (Bone char) แทนผงถ่านฟอกสี

สารที่ใช้ในวิธีนี้ – Kieselguhr 0.5-0.6% raw sugar

- Bone char 25-30% raw sugar

2.2.3 Phosphatation and Activate carbon method วิธีนี้ใช้ raw liquor อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ผสมกับปูนขาว และกรดฟอสฟอริกให้เข้ากัน ตะกอนสกปรกจะลอยติดขึ้นมากับฟองอากาศ ทำการแยกตะกอนออก น้ำหวานใสที่ได้จะถูกนำไปฟอกสีต่อไปด้วยผงถ่าน

สารที่ใช้ในวิธีนี้ – Kieselguhr 0.2% raw sugar

- Active carbon 0.35-0.4% raw sugar

- Phosphoric acid (P_2O_5) 0.3-0.5% raw sugar

- น้ำปูนขาว (CaO) 0.1% raw sugar

2.2.4 Carbonation and Active carbon method นำน้ำตาลทรายดิบมาล้างด้วยน้ำเชื่อม นำไปหลอมละลายใน mingler อุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส raw liquor ที่ได้ผสมกับน้ำปูนขาวแล้วส่งเข้า continuous carbonator ซึ่งมี carbon dioxide 8-12% ผ่านเข้าไป 40-60นาที ได้ carbonated liquor pH 8.0 ทำให้มีอุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียส กรองแยกตะกอน ผสมผงถ่านฟอกสี filter liquor ที่ได้ นำไปกรองยกตะกอน ได้ fine liquor ส่งไปต้มระเหย และต้มเคี่ยวแยกเป็นน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ต่อไป

สารที่ใช้ในวิธีนี้ – Kieselguhr 0.2% raw sugar

- Active carbon 0.25-0.3% raw sugar

- น้ำปูนขาว (CaO) 0.5-0.7% raw sugar

2.2.5 Carbonation and Bone char method ใช้วิธีการเหมือนวิธีการในข้อ 4.4 แต่ใช้ถ่านกระดูกแทนผงถ่านฟอกสี

2.2.6 Carbonation, Active and Anion-exchange resin method วิธีนี้เป็นวิธีผสมซึ่งมีการฟอกสีด้วย anion-exchange resin หลังจากที่ได้ fine liquor แล้ว ให้ fine liquor ผ่านเข้าไปในถังบรรจุ Anion-exchange resin ที่ใช้คือ Amberlite IRA.401 resin นี้ สามารถกรองฟอกน้ำเชื่อมประมาณ 500 รอบ หรือมากกว่า

สารที่ใช้ในวิธีนี้ - Active carbon 0.15% raw sugar

- น้ำปูนขาว (CaO) 0.5-0.8% raw sugar

- NaCl 0.5% raw sugar

2.2.7 Carbonation, Bone-char and Anion-exchange resin method ใช้วิธีการเหมือนวิธีการในข้อ 2.2.6 แต่ใช้ถ่านกระดูกแทนผงถ่าน

2.2.8 Carbonation, Bone-char and Active carbon Anion-exchange resin method วิธีนี้รวมทุกวิธีเข้าด้วยกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฟอกสี และทำให้ได้น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ที่มีคุณภาพสูงสุด

2.3 การสูญเสียผลผลิตซูโครสในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

การสูญเสียผลผลิตน้ำตาลซูโครสนั้นเกิดตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวอ้อยจนกระทั่งขั้นตอนสุดท้ายคือ การผลิตน้ำตาลบริสุทธิ์ (refine sugar) ซึ่งมีการสูญเสียผลผลิตประมาณร้อยละ 5-35 ซึ่งมีความผันแปรอยู่ในช่วงกว้าง ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ปัจจัยทางด้านภูมิศาสตร์และเทคนิคการผลิตน้ำตาลทรายของประเทศต่างๆ (Clarke และคณะ , 1980)

2.3.1 ขั้นตอนที่เกิดการสูญเสียซูโครสมีดังนี้

- การเก็บเกี่ยวอ้อย (cane harvesting) ซึ่งเกิดการสูญเสียซูโครสประมาณร้อยละ 5-25 ในขั้นตอนนี้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สร้างเดกซ์แทรน เช่น *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบในอากาศ ดิน และน้ำ ซึ่งจำเป็นต้องปรับปรุง

ประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยว และป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ นี้โดยการใช้สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (biocide)

- การผลิตน้ำตาลทรายดิบ (raw sugar mill) นอกจากจะปรับปรุงการเก็บเกี่ยวให้มีประสิทธิภาพแล้วจะต้องนำอ้อยเข้าสู่กระบวนการผลิตทันทีหลังการเก็บเกี่ยว และในกระบวนการผลิต จะต้องมีการควบคุมขั้นตอนต่างๆ เป็นอย่างดี การสูญเสียซูโครสไปกับส่วนของกากอ้อยมีประมาณร้อยละ 3-8

- การผลิตน้ำตาลทรายบริสุทธิ์ (cane sugar refinery) ในขั้นตอนนี้ ค่าความเป็นกรดด่าง ประมาณ 7.0-9.0 ซึ่งเป็น ค่าความเป็นกรดด่าง ที่ซูโครสมีความเสถียรมากที่สุด อย่างไรก็ตามมีการสูญเสียซูโครสเนื่องจากกระบวนการ self-catalyzing ของน้ำตาลอินเวอร์ท เกิดเป็นกรดอินทรีย์ และจากการศึกษาโดยใช้ HPLC พบว่ามีการสูญเสียน้ำตาลซูโครสในขั้นตอนการทำใส (clarification) โดยวิธีคาร์บอเนชัน ซึ่งทำให้เกิดน้ำตาลอินเวอร์ท จากการศึกษาพบว่าในภาวะที่เป็นกลางหรือด่างนั้นเกิดการสูญเสียน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 0.004-0.04 ซึ่งการสูญเสียนี้ส่วนใหญ่เนื่องมาจากสารเคมี และความร้อน เมื่อสารละลายซูโครสอยู่ในภาวะที่อุณหภูมิสูง ความเข้มข้นของซูโครสสูง และ ค่าความเป็นกรดด่าง เป็นกลาง

2.3.2 ประเภทของการสูญเสียผลผลิตน้ำตาลซูโครส คือ

- การสูญเสียเนื่องจากสาเหตุทางกายภาพ (physical loss) เป็นการสูญเสียน้ำตาลซูโครสโดยตรง เนื่องจากเทคนิคการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา รวมทั้งการขนส่งอ้อย และน้ำตาล ทำอย่างไม่มีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการปนเปื้อน และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังเกิดการสูญเสียซูโครสส่วนหนึ่งไปกับส่วนของน้ำเสียในโรงงาน และส่วนของตะกอน (mud) ทั้งนี้

เนื่องจากในกระบวนการผลิตไม่สามารถล้างซูโครสออกจากส่วนของตะกอนได้หมด

- การสูญเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ (microbiological cause of sugar loss) จุลินทรีย์ในสกุล *Leuconostoc sp.* และจุลินทรีย์สร้างเมือกบางชนิด จะสร้างสารประกอบเดกซ์แทรน ก่อให้เกิดผลกระทบต่อกระบวนการผลิต คุณภาพของน้ำตาลทราย และผลิตภัณฑ์ที่นำน้ำตาลทรายไปใช้

  นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญเติบโต และใช้ซูโครสแต่ไม่สร้างสารประกอบเดกซ์แทรน ได้แก่ ยีสต์ รา แบคทีเรีย โดยเฉพาะยีสต์ในสายพันธุ์ *Saccharomyces sp.* ซึ่งเจริญเติบโตและสร้างเอทานอล แบคทีเรีย *Clostridium thermosaccharolyticum* ซึ่งสร้างกรดบิวทีริค

- การสูญเสียน้ำตาลซูโครสเนื่องจากความร้อน (thermal sucrose loss) ความร้อนก่อให้เกิดสารเชิงซ้อน และสารให้สีอื่นๆในน้ำเชื่อมระหว่างกระบวนการผลิต และในผลึกน้ำตาลในระหว่างการเก็บ กระบวนการที่เกิดขึ้นเรียกว่าการเกิดคาราเมล (caramel formation) ปฏิกิริยานี้เกิดในส่วนของโมลาส หรือน้ำเชื่อมที่เคลือบส่วนผิวของผลึกน้ำตาล ในภาวะที่มีน้ำหรือความชื้นเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา ก่อให้เกิดการสูญเสียซูโครสขณะเก็บ และอุณหภูมิภายในโกดังที่เก็บน้ำตาลสูงขึ้นด้วย การเกิดสีเพิ่มขึ้นนี้เป็นสิ่งที่บ่งชี้ว่าเกิดการสูญเสียผลผลิตน้ำตาลซูโครส

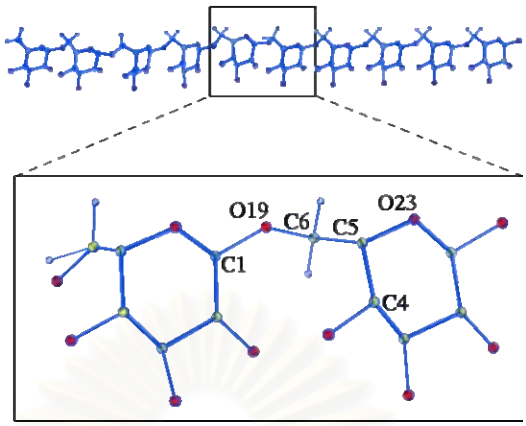
- การสูญเสียซูโครสเนื่องจากสารเคมี (chemical sucrose loss) เนื่องจากซูโครสถูกทำลายด้วยความร้อนได้คาราเมล ซึ่งเกิดขึ้นทั้งภาวะกรด และภาวะด่าง สำหรับ ค่าความเป็นกรดด่าง ที่น้ำตาลซูโครสเสถียรมากที่สุดคือ ค่าความเป็นกรดด่าง ด่าง 8.0-8.5

1. ภาวะกรดจะเกิดการผกผันของซูโครสไปเป็นกลูโคส และฟรุคโทส ในน้ำอ้อยปฏิกิริยาการผกผันถูกเร่งโดยอินเวอร์เทส (invertase) ในทุกภาวะที่ ค่าความเป็นกรดด่าง ต่ำ โดยเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และสารให้สีอื่นๆ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วในน้ำอ้อยจะมีน้ำตาลรีดิวซ์ อยู่ประมาณ 0.5 % (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527)

2. ภาวะด่าง การสูญเสียน้ำตาลซูโครสในภาวะนี้ไม่ใช่ปัญหาสำคัญ แต่ทำให้เกิดปัญหาด้านสี และเพิ่มการสูญเสียซูโครสในส่วนของโมลาส ทั้งนี้เนื่องจากในภาวะด่างซูโครสจะสลายตัวให้กรดอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดแลคติค และให้สารประกอบเชิงซ้อนที่ให้สีทั้งในรูปของ melanoidin และสารประกอบในรูปของกรดแซคคารินิค (saccharinic acid)

ปัญหาสำคัญที่พบในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายเนื่องจากมีการปนเปื้อนของเดกซ์แทรน (dextran) และกรด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยโดยจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรีย เจริญได้ดีในภาวะเป็นกลางหรือกรด ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่ำๆ (เช่น 12-18% ซูโครส) ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 จึงสามารถปนเปื้อนและเจริญบริเวณรอยตัดของอ้อยที่ถูกไฟไหม้ โดยกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะทำให้เกิดการผกผัน (inversion) ของน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นผลให้สูญเสียน้ำตาลซูโครสร้อยละ 0.2-0.6 (บุญส่ง แสงอ่อน และ วิวัฒน์ แดงสุภา, 2527) นอกจากนี้เดกซ์แทรน (รูปที่ 2.6) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมกันเป็นสายยาวเป็นผลที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase, E.C.2.4.1.5) ทำลายน้ำตาลซูโครสจะได้ผลผลิตเป็นกลูโคส และฟรุกโตสดังสมการต่อไปนี้

$$n\ \text{sucrose} \xrightarrow{\text{dextransucrasee}} (\text{glucose})n + n(\text{fructose})$$



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของเดกซ์แทรน

ดังรูปที่ 2.6 เฉพาะโมเลกุลกลูโคสเท่านั้นที่ถูกนำมาสร้างสารประกอบเดกซ์แทรน ส่วนฟรุคโทสที่เกิดขึ้นนั้นจะอยู่ในรูปของฟรุคโทสอิสระ (invert sugar หรือ reducing sugar) เมื่อถูกจุลินทรีย์ใช้แล้วอาจถูกเมแทบอไลต์ออกมาในรูปของกรดอินทรีย์ และสารให้สี ซึ่งเป็นสาเหตุให้ ค่าความเป็นกรดด่าง ของน้ำอ้อยลดลง และการผกผันของซูโครสยิ่งสูงขึ้นไปอีก ผลพลอยได้ของการสร้างสารประกอบเดกซ์แทรน คือ กรดอะซิติค กรดแลคติค แมนนิทอล และเอทานอล สารต่างๆ เหล่านี้ทำให้ ค่าความเป็นกรดด่าง ของน้ำอ้อยลดลง และสร้างสารให้สี ส่วนเดกซ์แทรนที่สร้างขึ้นนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2-20 x 10^6 ดาลตัน ประกอบไปด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสที่เกาะกันด้วยพันธะ α-1,6 α-1,4 และ α—1,3 โดยส่วนใหญ่จะเป็น α—1,6 glycosidic linkage ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น มีรูปร่างแบบเข็ม หรือมีรูปเป็นผลึกแบบ C-axis และการที่เดกซ์แทรนมีโครงสร้างของโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันจึงส่งผลให้การวิเคราะห์เดกซ์แทรนโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (Haze method) ผิดพลาด เนื่องจากถูกรบกวนด้วยสารอื่นในน้ำอ้อย อาทิเช่น แป้ง กัม และโปรตีน เชื่อว่าเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 40,000 ซึ่งเป็นเดกซ์แทรนที่ละลายน้ำได้ (soluble dextran) ทำให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการผลิต เนื่องจากไม่สามารถแยกหรือกำจัดออกได้ ทำให้ความหนืดของน้ำอ้อย น้ำเชื่อม และแมสซีควิท เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเดกซ์แทรนที่ละลายน้ำได้จะเกิด temporary adsorption บน crystal lattices ทำให้เกิดอัตราการตกผลึกช้าลง และผลึกที่ได้เป็นลักษณะรูปเข็ม ทำให้เกิดการสูญเสียของน้ำตาล 9.2% ต่อผลผลิตของน้ำตาลที่ได้ต่อปี (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527) ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต ผลผลิต คุณภาพของน้ำตาลทราย และผลิตภัณฑ์ที่นำน้ำตาลทรายไปใช้เป็นส่วนประกอบ โดยมีรายงานว่าน้ำอ้อยที่มีปัญหามากในประเทศออสเตรเลียจะพบเดกซ์แทรนถึง 5,000-13,000 ppm on Brix

แต่ถ้าในน้ำอ้อยที่พบปัญหาน้อยจะมีเดกซ์แทรน 1,500-3,000 ppm on Brix (Inkerman และ James, 1976)

2.4 ปัจจัยการเกิด เดกซ์แทรน

การเกิด เดกซ์แทรน มีสองปัจจัย คือ

2.4.1 ปริมาณจุลินทรีย์ หมายถึง ปริมาณ *Leuconostoc* sp. ที่เริ่มต้นเข้ามาในกระบวนการผลิต ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาจากดิน และปนเปื้อนที่ลำอ้อย การเก็บเกี่ยวอ้อยจึงมีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรง โดยปริมาณจุลินทรีย์จะปนเปื้อนเข้าสู่กระบวนการผลิตดังแสดงในตารางที่ 2.4 ซึ่งอ้อยที่เก็บเกี่ยวโดยเครื่องจักร (อ้อยท่อน) ยาวประมาณ 50 ซม. (เรียกว่า billet) หัวท้ายจึงมีรอยแผลมาก เป็นแหล่งให้เชื้อเพิ่มปริมาณขึ้นในระยะเวลาสั้นๆ เป็นไปได้สูง ถ้าสามารถล้างด้วยน้ำสะอาดได้ และหีบทันที ก็จะลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ การเก็บเกี่ยวด้วยแรงงานคน คนงานจะตัดยอดแล้วริดใบแล้วจึงตัดโคน (อ้อยลำ) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอ้อยลำหนึ่งจะมีเพียงแผลที่ยอดและที่โคนเท่านั้น การเข้าทำลายของเชื้อจึงน้อยกว่า ซึ่งค่า C.C.S. ของอ้อยลำ และอ้อยท่อนนั้นแสดงดังตารางที่ 2.5 แต่อย่างไรก็ตาม การเก็บเกี่ยวด้วยแรงงานคนก็มีปัญหาเรื่องเวลาเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยเช่นกัน การเก็บเกี่ยวอีกวิธีหนึ่ง คือ ใช้รถบลูโดเซอร์ดันอ้อยทั้งแปลงแล้วใช้รถเครนจับขยุ้มอ้อยขึ้นสู่รถบรรทุก วิธีนี้อ้อยจะมีเศษดินติดไปมาก แม้ว่าจะใช้น้ำฉีดล้าง แต่เชื้อโรคก็ติดไปกับลำอ้อยได้มากเหมือนกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 ปริมาณ *Leuconostoc* spp. ที่พบได้ในกระบวนการผลิต

sample	Total bacteria ($x10^6$/ml)	*Leuconostoc* ($x10^6$/ml)	% *Leuconostoc*
น้ำอ้อยสกัดขั้นแรก	243	135	56
น้ำอ้อยสกัดขั้นสุดท้าย	80	25	32
น้ำอ้อยที่สกัดจากอ้อยที่พรมน้ำ	290	114	39
น้ำอ้อยที่ผ่านตะแกรงกรองสิ่งสกปรก	182	145	80
น้ำอ้อยหลังจากเติมปูนขาว	-	282	-
น้ำอ้อยที่ผ่านการกรอง	44	0.003	-
กากตะกอน	0.28	-	-
กากอ้อย	103	7	1

ที่มา : Lillehoj et al (1984)

ตารางที่ 2.5 ค่าการเปลี่ยนแปลง C.C.S. (Commercial cane sugar) ของอ้อย

ปีการผลิต	ค่าเฉลี่ย C.C.S.	อ้อยลำ C.C.S.เปลี่ยนแปลง	อ้อยท่อน C.C.S.เปลี่ยนแปลง
1962	13.90	-0.17	-1.70
1963	14.54	-0.16	-1.30
1966	14.92	-0.28	-1.16

ที่มา : Egan (1971)

2.4.2 ความเร็วของการผลิตเดกซ์แทรน ซึ่งเดกซ์แทรนจะถูกผลิตเป็นจำนวนมาก นอกจากขึ้นอยู่กับปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ซึ่งขึ้นกับปัจจัยดังนี้

- อุณหภูมิของอากาศ อุณหภูมิของอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุ ย่อมทำให้เกิดปริมาณของเชื้อมากขึ้นในสภาพแวดล้อมในไร่อ้อย เช่น อากาศร้อนชื้น ฝนตกมาก

- ความชื้น ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุ ย่อมทำให้เกิดปริมาณของเชื้อมากขึ้นในสภาพแวดล้อมในไร่อ้อย
- ปริมาณน้ำฝน / โคลน / ดิน และสภาพเปรอะเปื้อนโคลนดิน เนื่องจากฝนจะทำให้อ้อยสกปรก คือ จะทำให้ดินโคลน และดิน เปรอะเปื้อนตามลำอ้อย เนื่องจาก เชื้อ *Leuconostoc* อาศัยอยู่ในดิน
- การที่อ้อยถูกไฟไหม้ จะทำให้อุณหภูมิที่ผิวอ้อยสูงมากกว่า 200°C จะทำให้ผิวของเปลือกอ้อยแตก และเกิดแผล ทำให้เชื้อเข้าทำลายอ้อยได้ทั้งลำ ดังแสดงในตารางที่ 2.6
- ระยะเวลาก่อนหีบอ้อย ยิ่งระยะเวลาในการรอหีบอ้อยมากเท่าใด ปริมาณ เดกซ์แทรน ที่ผลิตจากเชื้อยิ่งเพิ่มปริมาณมากขึ้น มีการประเมินถึงความเสียหายจากการทิ้งอ้อยไว้เป็นเวลานานก่อนนำเข้ากระบวนการผลิต ดังแสดงในตารางที่ 2.7
- พันธุ์อ้อย แต่ละพันธุ์จะมีความต้านทานต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจาก ปริมาณไข (wax), เยื่อใย (fiber) เป็นต้น

ตารางที่ 2.6 ปริมาณเดกซ์แทรน โดยเฉลี่ยในอ้อยสด และอ้อยไฟไหม้ภายหลังการเก็บเกี่ยว 48 ชั่วโมง

ชนิดของอ้อย	ปริมาณเดกซ์แทรน (ppm/Brix)	
	ตัดท่อนสั้น	ตัดท่อนยาว (>250mm)
อ้อยสด	770	603
อ้อยไฟไหม้	2,950	1,442

ที่มา : Clarke (1997)

ตารางที่ 2.7 ตารางประเมินความเสียหายจากการทิ้งอ้อยไว้ก่อนการนำเข้า กระบวนการผลิต

	ทิ้งไว้ 1 วัน	ทิ้งไว้ 5 วัน
ความหวานลดลง (โพลาไรเซชัน)	0.41%	2.05%
ความบริสุทธิ์ของน้ำอ้อยลดลง (purity)	2.10%	10.50%
น้ำหนักของอ้อยลดลง (ก.ก.)	1.5%	12.50%
น้ำตาลรีดิวซ์	0.036%	0.015%

ที่มา : คณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย (2529)

สำหรับประเทศไทยได้มีการทดลองในปี พ.ศ. 2535-2536 โดยเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยจากโรงงานน้ำตาลสุพรรณบุรีที่มาจากอ้อยเผา และอ้อยสด เมื่อมาบ่มไว้ 72 ชม. พบ *Leuconostoc* sp. ทุกตัวอย่าง, ค่า ค่าความเป็นกรดด่าง ลดลงจาก 5.5 เป็น 3.4, ค่าเดกซ์แทรนอยู่ในระดับสูงถึง 10 มก./มล. ซึ่งอ้อยที่ถูกเผา จะทำให้เกิดเดกซ์แทรน มากกว่าอ้อยสด 2-4 เท่า (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2540)

2.5 การเกิด เดกซ์แทรน ในระหว่างการผลิต

2.5.1 การตัดอ้อย ถ้าใช้ใบมีดที่ทื่อ จะทำให้เกิดเดกซ์แทรน มากกว่าใบมีดที่คมกว่า และยิ่งอ้อยถูกตัดเป็นท่อนสั้นๆ มาก ส่วนที่ถูกตัดย่อมมีโอกาสให้เชื้อเข้าทำลายได้มาก ส่วนเวลาการเข้าหีบ ต้องใช้เวลาเร็วที่สุดจากการตัด ไปสู่การสกัดและการฟอกใส อย่างน้อยที่สุดควรให้มีเวลาการขยายปริมาณของจุลินทรีย์น้อยที่สุด

2.5.2 การสกัด ระหว่างการสกัด ก่อนที่น้ำอ้อยจะถูกให้ความร้อน และทำการฟอกใส (defecation) เป็นช่วงที่อันตรายมากที่สุด เพราะในชุดลูกหีบจะมีปั๊ม ตะแกรง และหลายๆจุดที่การเคลื่อนที่ของน้ำอ้อยเป็นไปได้ไม่สะดวก ทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป็นอย่างดี รวมทั้งการจัดการเกี่ยวกับอุณหภูมิระหว่างการสกัด ซึ่งถ้าต่ำไป เชื้อจะเจริญเติบโตได้ดี

2.5.3 การฟอกใส การทำ hot liming หรือ cold liming จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากการใส่ปูนขาว จะทำให้ค่าความเป็นกรดด่าง เพิ่มขึ้นได้

ทำให้ช่วยลดปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อลง แต่ถ้าเป็น cold liming เชื้อจะไม่ถูกทำลาย และหลังจากการกรอง filter mud โดย vacuum drum filter น้ำอ้อยใสก็จะถูกนำกลับมาผสม ในกระบวนการฟอกใสอีกครั้ง ซึ่งก็มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์อยู่ คล้ายเป็นการเพิ่มเชื้อเข้าไปอีก

2.6 ผลกระทบของเดกซ์แทรนต่ออุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย

คุณภาพของน้ำตาลทรายดิบในต่างประเทศ กำหนดว่าต้องมีเดกซ์แทรนต่ำกว่า 250 ส่วน เพราะหากเกินกว่ากำหนดนี้ นอกจากจะถูกปรับราคาซื้อขายแล้ว ยังทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตน้ำตาลทรายบริสุทธิ์สูงขึ้นกว่าปกติอีกด้วย (สันต์ ฉายตระกูล, 2525) และผลกระทบที่เกิดเนื่องจากเดกซ์แทรนต่อกระบวนการผลิตมีดังนี้ (Chung และ Mark, 1980)

2.6.1 การสูญเสียน้ำตาลโดยตรงเนื่องจากเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสสามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้จึงเป็นการสูญเสียน้ำตาลซูโครสโดยตรงตั้งแต่อ้อยอยู่ในไร่จนถึงเข้าหีบ ตลอดจนถึงสายการผลิต

2.6.2 การผิดพลาดในการวัดค่าโพลาไรเซชัน (pol) เดกซ์แทรนโมเลกุลเล็กๆ สามารถละลายน้ำได้ และเป็นสารประกอบซึ่งมี asymatric carbon atom อยู่ปริมาณมาก มีกำลังการเบี่ยงเบนแสงโพลาไรซ์ได้มากกว่าซูโครส 3 เท่า คือ เดกซ์แทรนมีค่า specific rotation อยู่ที่ +199 ในขณะที่ซูโครสมีค่า specific rotation อยู่ที่ +66.53 (นิภา สิริไพบูลย์พงศ์, 2545) จึงต้องมีการกำจัดเดกซ์แทรนก่อนการวัดค่า โพลาไรเซชัน เพื่อลดปัญหาในการตรวจวัดค่า Pol และการวิเคราะห์คุณภาพอ้อยเพื่อคำนวณ CCS

2.6.3 การสูญเสียน้ำตาลในกากน้ำตาล เนื่องจากแมสซิควิท มีความหนืดที่สูงผิดปกติ การปั่นทำได้ยาก น้ำตาลจับเป็นผลึกได้ยาก จะทำให้มีน้ำตาลซูโครสติดไปกับกากน้ำตาล มากกว่าปกติ ทุกๆ 300 ppm ของเดกซ์แทรนที่พบในน้ำเชื่อม หมายถึงการสูญเสีย 1 หน่วย ของความบริสุทธิ์น้ำเชื่อม ไปในกากน้ำตาล

2.6.4 กระบวนการผลิตช้าลงเนื่องจากปริมาณอ้อยที่หีบได้ต่อวันจะน้อยกว่าปกติ ทั้งนี้เนื่องจาก เดกซ์แทรนโมเลกุลเล็กๆ จะรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่ ซึ่งจะทำให้เกิดความหนืดขึ้น

- การตกตะกอน และการกรองทุกกระบวนการช้าลง รวมทั้งการกรอง mud
- การต้มระเหยช้าลงเป็นเท่าตัว ทั้งนี้เพราะ heat transfer rate ลดลง และ boiling point rising (BPR) เพิ่มขึ้น
- การตกผลึกช้ารวมทั้งเดกซ์แทรนจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดนิวเคลียสใหญ่ขึ้นเองได้ในระหว่างการเคี่ยวและรูปร่างของผลึกน้ำตาลจะผิด
- การปั่น (centrifugal) น้ำตาลออกจาก กากน้ำตาล ได้ยากขึ้น เพราะความหนืดที่สูง และรูปร่างของผลึกที่ไม่ถูกต้อง ตะแกรงของหม้อปั่นจะชำรุดได้ง่าย

ตารางที่ 2.8 การสูญเสียน้ำตาลซูโครส (%) คาดคะเนจากปริมาณเดกซ์แทรน ที่พบในน้ำตาลทรายดิบ

ปริมาณ เดกซ์แทรน (ppm)	การสูญเสียน้ำตาลซูโครส (%)
500	0.2
1000	0.4
5000	2.0

ที่มา : Clarke และคณะ (1980)

ตารางที่ 2.9 ปริมาณต่ำสุดของเดกซ์แทรน ที่สร้างปัญหาในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาล

ปัญหา	ปริมาณต่ำสุดของ เดกซ์แทรน (ppm)
การอ่านค่าโพลผิดพลาด	300
ทำให้รูปร่างผลึกเสีย	600
น้ำตาล remelt รูปผลึกเสีย	400
ความหนืดเพิ่มขึ้นในการ remelt	400
การบรรจุมีปัญหา (นิ่ม, soft sugar)	400
กากน้ำตาลมีความบริสุทธิ์ สูงขึ้น (มีน้ำตาลติดไปมาก)	100
คุณภาพของผลผลิตลดลง	250

ที่มา : Clarke (1997)

2.7 การป้องกันและกำจัดเดกซ์แทรนออกจากกระบวนการผลิต

จากผลกระทบของเดกซ์แทรนดังกล่าวข้างต้น อุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลทรายจึงพยายามหาวิธีการป้องกัน และแก้ไขปัญหาการเกิดเดกซ์แทรน ซึ่งสามารถกระทำได้หลายวิธีดังนี้ (Imrie และคณะ, 1972)

2.7.1 พัฒนาสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2.7.2 การควบคุมในไร่ เป็นสิ่งที่สำคัญที่สุด เพราะเป็นการป้องกันปัญหา เนื่องจาก *Leuconostoc* sp. มาจากดิน เพราะฉะนั้น การเก็บเกี่ยวอ้อย จึงต้องไม่ให้มีการปนเปื้อนดินมามาก ไม่ควรเผาก่อนตัด

2.7.3 เวลาการเข้าหีบควรใช้เวลาน้อยที่สุด เนื่องจากเวลาที่สูญเสียไประหว่างการขนส่ง และการรอคอยการหีบทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นจึงควรนำเข้ากระบวนการผลิตทันที ไม่ควรทิ้งอ้อยค้างไว้เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในอ้อยที่ถูกเผาไฟ อ้อยที่ถูกแช่แข็งด้วยความเย็นจัด และอ้อยที่ถูกตัดเป็นท่อนด้วยเครื่องมือกล เนื่องจากเนื้อเยื่อจะถูกทำลายทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็ว

2.7.4 การดูแลอ้อยระหว่างการรอหีบ สิ่งแรกคือ ลานจอดรถ ควรปรับปรุงไม่ให้มีฝุ่นดิน ควรเก็บอ้อยไว้ในร่ม เนื่องจากแสงแดดและความร้อน คือ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส

2.7.5 พัฒนาวิธีทางกายภาพ และทางเคมี เพื่อควบคุมจำนวนจุลินทรีย์ เช่น การเก็บที่อุณหภูมิต่ำ การควบคุม a_w การควบคุม ค่าความเป็นกรดด่าง และการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อซึ่งต้องเป็นสารเคมีที่กฎหมายอนุญาตให้ใช้ได้ เป็นสารพวก quaternary ammonium วิธีการใช้อาจฉีดพ่นที่ใบมีดของเครื่องตัดอ้อย แต่การใช้วิธีทางกายภาพเพื่อป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนตามที่กล่าวมาแล้วนั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทางอุตสาหกรรม เนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ส่วนวิธีการทางเคมีนั้นสารเคมีบางชนิดนอกจากมีราคาสูงแล้ว ยังมีปัญหาด้านความปลอดภัยในการใช้

2.7.6 การหีบ

- ในกรณีที่มีการล้างก่อนหีบ ต้องคำนึงว่าน้ำล้างเป็นน้ำสะอาด (อาจใช้น้ำจาก condenser ซึ่งผ่านความร้อนฆ่าเชื้อมาแล้ว)
- น้ำพรม ควรใช้อุณหภูมิสูงมากกว่า 90 ^{O}C ถังเก็บน้ำอ้อย ปั๊ม หรือจุดต่างๆที่อับหรือขาดการเคลื่อนไหว ต้องฉีดน้ำโดยน้ำร้อน หรือไอน้ำทุกๆ 2-4 ชม. จึงทำให้มีการกำหนดจุดตรวจสอบความสะอาดในชุดลูกหีบ

2.7.7 การฟอกใส ในระหว่างการฟอกใส ควบคุมความร้อน อุณหภูมิระหว่างการกรอง พยายามให้การกรองเป็นไปอย่างเร็วที่สุด

2.7.8 การต้มเคี่ยว ระหว่างต้มเคี่ยวเป็นช่วงที่โมเลกุล เดกซ์แทรน เล็กๆ จะจับตัวเป็นสายยาว และสร้างปัญหา

สรุปปัจจัยที่ทำให้เกิดปัญหาขึ้นได้คือ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนซูโครสเป็นเดกซ์แทรน มีผู้ใช้ bactericides หรือ biocides (carbamate หรือ quaternary ammonium compounds) เพื่อฆ่าจุลินทรีย์ แต่พบว่าการใช้สารเคมีจะเป็นการเพิ่มต้นทุนที่สิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็น จึงมีผู้หันมาศึกษาการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งสามารถย่อยเดกซ์แทรนออกเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีรายงานในประเทศที่มีความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยี เช่น สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย โดยให้ผลเป็นที่น่าพอใจ สำหรับประเทศไทยนั้นยังไม่เคยมีการทดลองนำเอนไซม์ดังกล่าวมาใช้ในกระบวนการผลิตน้ำตาลเลย สาเหตุอาจเนื่องมาจากเอนไซม์มีราคาแพง (นิภา สิริไพบูลย์พงศ์, 2545)

เทคนิคการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเป็นวิธีที่น่าสนใจ มีความเหมาะสม และนิยมใช้ในปัจจุบันเนื่องจากปฏิกิริยาทางเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนสูง เกิดภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรง มีความเป็นพิษต่ำ (ไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค) แต่ในการใช้เอนไซม์อิสระนั้นทำให้สิ้นเปลืองต้นทุน เนื่องจากไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ อีกทั้งจะส่งผลถึงการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ด้วย ดังนั้นจึงมีผู้พยายามศึกษาการนำเอนไซม์มาตรึงรูปโดยวิธีต่างๆ เพื่อแก้ปัญหาที่กล่าวถึงข้างต้น ศึกษาวิธีการที่จะนำมาใช้ในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย เพื่อให้ได้น้ำตาลทรายที่มีคุณภาพดี ผลิตได้ในปริมาณมาก ต้นทุนการผลิตและพลังงานที่ใช้ต่ำ

2.8 เดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนส เป็นเอนไซม์ที่มีชื่อเรียกตามระบบสากลว่า E.C.3.2.1.11, α-1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยต้องอาศัยสารชักนำ (inducible enzyme) ซึ่งก็คือเดกซ์แทรน และถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Koenig และ Day, 1989) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะ α-1,6 ภายในสายฮอมอพอลิเมอร์เดกซ์แทรน (Koh และ Khown, 1970; Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991) ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไอโซมอลโทส และโอลิโกแซ็กคาไรด์อื่นๆ และอาจได้กลูโคสบ้างเล็กน้อย (Tsuchiya และคณะ, 1956; Koenig และ Day, 1989) ผลของการย่อยจะทำให้เหลือสายของเดกซ์แทรนที่สั้นลง (น้ำหนักโมเลกุลลดลง) โดยหากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดจำนวนกลูโคสน้อยกว่า 8 หน่วยแล้วจะทำให้คุณสมบัติความหนืดและเหนียวลดลงจนหมด ซึ่งเป็นวิธีแก้ไขปัญหาเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยซึ่งก่อความเสียหายในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายได้

2.9 แหล่งของเดกซ์แทรนเนส (เอก แสงวิเชียร, 2531)

แหล่งของเดกซ์แทรนเนสในธรรมชาติ พบใน แบคทีเรีย ยีสต์ รา และแอคติโนมัยซีตีส

2.9.1 เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย ได้แก่ จาก

Achromobacter sp., Bacillus subtilis, Bacillus sp., Baterium sp., Brevibacterium sp., Brevibacterium fuscum, Cellvebrio fluvus, Cytophaga johnsonii, Fucobacterium fusiforme, Lactobacillus bifidus, Streptococcus mitis

2.9.2 เดกซ์แทรนเนสจากยีสต์ ได้แก่ จาก

Lipomyces starkeyi

2.9.3 เดกซ์แทรนเนสจากรา ได้แก่ จาก

Aspergillus sp., A. caneus, A. luchvansis, Fusarium moniliforme, Chaetomium gracile, Gibberella fujukoroi, Penicillium funiculosum, P. luteum, P. lilacinum, P. verruculosum, P. aculeatum, Verticillium sp.

2.9.4 เดกซ์แทรนเนสจากแอคติโนมัยซีตีส ได้แก่ จาก
Actinomyces israelrii, Streptomyces cinamonensis

2.10 ลักษณะการย่อยสลายของเดกซ์แทรนโดยเดกซ์แทรนเนส มี 2 แบบ คือ

2.10.1 Exo-spliting dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจากปลายของสายเดกซ์แทรน แล้วตัดทีละโมเลกุลของกลูโคสได้ผลผลิตอยู่ในรูปน้ำตาลกลูโคส

2.10.2 Endo-spliting dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่จุดใดจุดหนึ่งในสายเดกซ์แทรนทำให้ได้พอลิเมอร์ที่สั้นลง เดกซ์แทรนเนสจากราโดยทั่วไปจะมีการย่อยสลายแบบเอนโด สายเดกซ์แทรนที่ย่อยแล้ว จะมีขนาดที่เล็กลงโดยอาจพบอยู่ในรูปของโอลิโกเมอร์ ไดเมอร์ หรือโมโนเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส แต่โดยทั่วไปแล้วมักพบอยู่ในรูปของน้ำตาลไอโซมอลโทส และ ไอโซมอลโทไตรโอส (Novo, 1983)

เดกซ์แทรนเนสจากจาก *Penicillium* sp. มีคุณสมบัติการย่อยสลายแบบ endo-1,6-α-D-glucosidase (Tsuru และคณะ, 1971; เอก แสงวิเชียร, 2531) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโทสและไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ ผลของการย่อยสลายเดกซ์แทรนนี้จะทำให้ได้เดกซ์แทรนที่มีขนาดสั้นลง และคุณสมบัติความเหนียวหนืดลดลง สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น ลดปัญหาต่างๆที่อาจเกิดขึ้นได้ เช่น การเกิดผลึกรูปเข็ม ปัญหาความเหนียวหนืดของน้ำอ้อย น้ำเชื่อม และแมสซีควิท

Fukumoto และคณะ (1971) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium luteum* ATCC 9644 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย เดกซ์แทรน 1%, $NaNO_3$ 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.2%, $MgSO_4 7H_2O$ 0.05% และ $FeSO_4 7H_2O$ 0.01% ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ 13.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Joshi และ Tamhane (1975) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากรา *Aspergillus luchuensis* Inui โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้ง 2% ปรับความเป็นกรดด่าง 5.5 พบว่าเมื่อบ่ม

เขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) จะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 335 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของการเลี้ยงเชื้อ

Shukla และคณะ (1989) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากราหลายชนิด เช่น *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., พบว่า *P. aculeatum* สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูงสุด 230 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรของ Fukumoto ที่มีเดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล $4x10^6$) 1.5% ความเป็นกรดด่าง 5.5-6.0 ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96-120 ชั่วโมง

Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia (1991) ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส พบว่า รา *Penicillium purpurogenum* และ *Paecilomyces lilacinus* ให้ปริมาณผลิตเอนไซม์สูงสุด และเมื่อทำการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *P. lilacinus* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้เป็น 2 เท่า และเอนไซม์ที่ได้มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลได้

เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Chaetomium gracile* ใช้กันมากในโรงงานน้ำตาลที่ประเทศออสเตรเลีย ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5-7 ทนอุณหภูมิสูงถึง 60-70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลสูงถึง 65 บริกซ์ (Morel du Boil,1991)

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย เอก แสงวิเชียร (2531) ได้รายงานถึงการคัดเลือกรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 จากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร Fukumoto สูตรปรับปรุงภายใต้ภาวะการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 วัน โดยสามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ 42.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร

สุภาพร ชาติวรพงศา (2536) ศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 พบว่า การใช้ไฮโดรไลเสตของชานอ้อย สามารถใช้เลี้ยงราที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ดี โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง ประกอบด้วยไฮโดรไลเสตของชานอ้อย 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน, เดกซ์แทรน 1% เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์, $NaNO_3$ 0.2% เป็นแหล่งไนโตรเจน และสารสกัดจากยีสต์ 0.2% ความเป็นกรดด่าง 6.0 สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ระหว่าง 35-42 หน่วยต่อมิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG ได้ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งให้ลักษณะโคโลนีที่เหมือนเดิม การผลิตเดกซ์แทรนเนสค่อนข้างคงที่ และที่อุณหภูมิห้อง 30-35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ ซึ่งให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นเป็น 330.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้น 3.81 เท่า ซึ่งสมบัติของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยาใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

2.11 ข้อดีจากการกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยด้วยเดกซ์แทรนเนส

การย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยด้วยเดกซ์แทรนเนสนั้นให้ผลดีต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย สามารถลดปัญหาเนื่องจากเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยได้เป็นอย่างดีในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต แต่ที่จะนำมากล่าวในที่นี้มี 2 ประเด็นคือ

2.11.1 ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยใส และเพิ่มความสามารถในการกรอง

เดกซ์แทรนทำให้ความสามารถในการกรองของน้ำอ้อยรวมต่ำ เนื่องจากตะกอน (mud) ที่เกิดขึ้นเป็นตะกอนละเอียดแขวนลอยในน้ำอ้อย ทำให้ไม่สามารถตกตะกอนในขั้นตอนการพักใสได้ทั้งหมด ตะกอนเหล่านี้อาจจะติดมากับน้ำอ้อยที่จะนำเข้าสู่ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยให้เป็นน้ำเชื่อมโดยใช้หม้อต้มระเหย ซึ่งเป็นผลให้เกิดตะกรันในหม้อต้มระเหยเป็นปริมาณมาก การแลกเปลี่ยนความร้อนได้ไม่ดี ดังนั้นการใช้เดกซ์แทรนเนสสำหรับการกำจัดเดกซ์แทรนสามารถลดปัญหาการกรองในขั้นตอนการทำใสได้เป็นอย่างดี

2.11.2 ความยาวของผลึกน้ำตาลซูโครส

จากที่ได้กล่าวมาแล้วว่าเดกซ์แทรนก่อให้เกิดปัญหาผลึกรูปเข็ม เพราะความยาวของผลึกทางด้านแกน c มากกว่าแกน b เป็นเหตุให้อัตราส่วน c/b ของผลึกน้ำตาลมีค่ามากกว่า 1 เป็นลักษณะของผลึกรูปเข็มซึ่งไม่เป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ดังนั้นการกำจัดเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนส

สามารถแก้ปัญหาความยาวของผลึกน้ำตาลซูโครสได้ โดย Day (1971) พบว่าความยาวของผลึกน้ำตาลซูโครสขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่

- ความเข้มข้น และขนาดโมเลกุลของเดกซ์แทรน
- ระดับของ super saturation ของน้ำเชื่อมขณะตกผลึก
- ความบริสุทธิ์ของน้ำเชื่อมที่ใช้เลี้ยงผลึก และอุณหภูมิขณะเลี้ยงผลึกน้ำตาล

ในทางปฏิบัติแล้ว มีการนำเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ไปใช้กับอุตสาหกรรมน้ำตาลทรายในหลายประเทศ เช่น

มีรายงานว่า ในหมู่เกาะอินเดียตะวันตกสามารถกำจัดเดกซ์แทรนออกไปได้ 68.5 % โดยการใช้เอนไซม์ 3 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำอ้อยเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สำหรับในเปอร์โตริโก และจาไมก้า มีการทดลองพบว่า เดกซ์แทรนเนสปริมาณ 6-7 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำอ้อยสามารถกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวม โดยใช้เวลา 20 นาที 50 องศาเซลเซียส (Tilbury, 1974)

Hidi และ Staker (1975) ซึ่งทำการทดลองในกากน้ำตาล-บี ซึ่งมีเดกซ์แทรนอยู่ 1400-2800 ppm เติมเดกซ์แทรนเนสในระดับที่เหมาะสมบ่มไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งทำให้กากน้ำตาล-บี มีความหนืดลดลงร้อยละ 12 อย่างรวดเร็ว เมื่อนำกากน้ำตาล-บี ไปตกผลึกเป็นน้ำตาล-ซี พบว่าลักษณะของผลึกน้ำตาล-ซี นั้นมีลักษณะเป็นรูปลูกบาศก์เมื่อเทียบกับผลึกน้ำตาล-ซี ที่เกิดขึ้นจากกากน้ำตาล-บี ที่ไม่เติมเดกซ์แทรนเนส

จากการศึกษาในประเทศออสเตรเลีย ปี ค.ศ. 1976, 1977 และ 1978 ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลพบว่าเปอร์เซ็นต์ของผลึกรูปเข็มที่เกิดขึ้นในน้ำตาลทรายดิบลดลงเมื่อเติมเดกซ์แทรนเนสในน้ำอ้อยรวม ทั้งนี้เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเดกซ์แทรนลดลงเพราะถูกย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนส ปัญหาการเกิดผลึกรูปเข็มจึงลดลงด้วย

จากการศึกษาของ Inkerman (1980) ประเทศออสเตรเลียที่นำเดกซ์แทรนเนสทางการค้า 3 ชนิด คือ Talozyme (Tate and Lyle), Glucanase D-1 (Pfizer Chemical) และ Dextranase Novo 25 L (Novo) กำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย พบว่าการใช้เดกซ์แทรนเนส Novo 25 L ให้ประสิทธิภาพการกำจัดที่สูงกว่า ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยมีปริมาณต่ำก็ตาม เดกซ์แทรนเนสที่ใช้มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 และ

พบว่าน้ำอ้อยรวมที่มีปัญหาเดกซ์แทรนมีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4.5-5.5 ซึ่งเอนไซม์จะมีแอคติวิตีเหลือเพียงร้อยละ 80 เท่านั้น

Jolly และ Prakash (1987 อ้างถึงใน เอก แสงวิเชียร, 2531) ในประเทศอินเดีย ได้ทดลองกำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อยโดยใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (Novo 25 L) 100 ppm ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า สามารถขจัดเดกซ์แทรนลงได้ 48-52%

ในปี 1989 ประเทศเม็กซิโก มีการใช้เดกซ์แทรนเนสปริมาณ 4 ตัน ในโรงงานน้ำตาลประมาณ 40% ของโรงงานทั่วประเทศ โดยทั่วไปแล้วจะใช้เอนไซม์ในช่วงระหว่าง 10-120 ppm โดยขึ้นอยู่กับช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยา และความรุนแรงของการปนเปื้อน พบว่าในกรณีที่มีการปนเปื้อนสูง อาจต้องใช้เอนไซม์สูงถึง 15,000 ppm ซึ่งคิดเป็นมูลค่า 0.11-1.32 ดอลลาร์ ต่อน้ำตาลอ้อย 1ตัน หรือ 1.00-13.00 ดอลลาร์ต่อน้ำตาลทราย 1 ตัน แต่ค่าใช้จ่ายเหล่านี้ยังน้อยกว่ามูลค่าการสูญเสียเนื่องจากเดกซ์แทรนหลายเท่าตัว (Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991)

มีการทดลองใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Chaetomium gracile* กับน้ำอ้อยเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5-6 ซึ่งสามารถลดปริมาณเดกซ์แทรนลงได้มากกว่า 60 % (Clarke MA., 1997)

2.12 ข้อด้อยของการย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนสอิสระ

จากการศึกษาในประเทศออสเตรเลีย พบว่าน้ำตาลทรายดิบน้อยกว่าร้อยละ 2 ผลิตจากน้ำอ้อยรวมที่ผ่านการเติมเดกซ์แทรนเนส โดยการเติมเดกซ์แทรนเนสจะเติมเฉพาะอ้อยบางชุดที่มีปัญหาเรื่องเดกซ์แทรนจนไม่สามารถนำเข้าสู่กระบวนการผลิตปกติได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกำจัดเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนส ไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร ถึงแม้ว่าภายหลังจากการกำจัดเดกซ์แทรนออกไปแล้วจะให้ผลดีต่อกระบวนการผลิตก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุบางประการคือ (Fulcher และ Inkerman, 1976)

2.12.1 ราคาของเอนไซม์ พบว่าราคาของเอนไซม์มีราคาสูงหากนำมาใช้ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และนอกไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต

2.12.2 ความไม่สะดวก หากนำมาใช้ในกระบวนการผลิตแบบเดิม เนื่องจากการบ่มเดกซ์แทรนเนสกับน้ำอ้อยรวม ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลา

การบ่มนานถึง 40 นาที ซึ่งจำเป็นต้องสร้างถังเก็บ (storage tank) เพื่อใช้บ่มน้ำอ้อยรวมกับเดกซ์แทรนเนส และต้องเพิ่มหน่วยนี้เข้าไปในกระบวนการผลิต จึงเป็นการไม่สะดวก

2.12.3 ปริมาณวัตถุดิบเข้าโรงงานมีมากเกินไปจนไม่สามารถกำจัดเดกซ์แทรนได้ทัน เช่น โรงงานที่มีกำลังการผลิต 400 ตันอ้อยต่อชั่วโมง ดังนั้นการกำจัดเดกซ์แทรนในอุตสาหกรรมจึงไม่สะดวก รวมทั้งต้องใช้ระยะเวลาการเก็บรวบรวมน้ำอ้อย และระยะเวลาในการบ่มน้ำอ้อยรวมกับเดกซ์แทรนเนสใช้เวลานาน อาจเกิดปัญหาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยขึ้นได้

2.13 การกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมโดยใช้ระบบต่อเนื่อง

การกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมโดยใช้ระบบต่อเนื่อง โดยอาศัยเทคนิคเอนไซม์ตรึงรูปมาประยุกต์กับอุตสาหกรรมน้ำตาลทรายจึงให้ผลดีกว่าในแง่ของประสิทธิภาพการใช้งาน และการปฏิบัติในโรงงานกล่าวคือ

2.13.1 สามารถแก้ปัญหาในเรื่องของเอนไซม์มีราคาสูงได้ เนื่องจากสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้เกิดความประหยัดในอุตสาหกรรม ดังนั้นศักยภาพที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมจึงมีความเป็นไปได้สูง

2.13.2 การควบคุมอุณหภูมิของการบ่ม สามารถควบคุมเฉพาะหน่วยที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้โดยไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิของน้ำอ้อยทั้งหมด จึงสามารถนำมาปฏิบัติในอุตสาหกรรมได้สะดวก และระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปกับเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย (residential time) ก็สามารถควบคุมได้จากอัตราการไหลของน้ำอ้อย ทำให้สามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายในระดับที่เหมาะสมได้

2.13.3 ไม่จำเป็นที่จะต้องรวบรวมน้ำอ้อยให้ได้ปริมาณมากก่อนที่จะนำไปกำจัดเดกซ์แทรน และสามารถสร้างหน่วยกำจัดเดกซ์แทรนให้เหมาะสมกับกำลังการผลิตของโรงงานได้

2.13.4 เนื่องจากการกำจัดเดกซ์แทรนในระบบต่อเนื่อง จึงไม่ทำให้จุดใดจุดหนึ่งของสายงานการผลิตหยุดชะงัก สามารถทำการได้เหมือนการผลิตปกติ

จากข้อได้เปรียบดังกล่าวจึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ศึกษาถึงการตรึงรูปเดกซ์แทรน

เนสบนตัวพยุงชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง

2.14 การตรึงรูปเอนไซม์

การตรึงรูปเอนไซม์คือ การจำกัดเอนไซม์ให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัด แต่ยังคงมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาได้ (Wang และคณะ, 1979)

2.14.1 ข้อดีของเอนไซม์ตรึงรูป (Wang และคณะ, 1979)

2.14.1.1 เพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์

2.14.1.2 สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ หรือแยกเอนไซม์ออกจากระบบได้ง่าย

2.14.1.3 เอนไซม์ที่ใช้ตรึงรูปอาจจะไม่ต้องนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อน เช่นการตรึงรูปจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์

2.14.1.4 สามารถเปลี่ยนภาวะการทำปฏิกิริยาได้โดยเลือกชนิดของตัวพยุง

2.14.1.5 กำหนดรูปร่างของเอนไซม์ได้ตามชนิดของตัวพยุงให้เหมาะสมกับชนิดของ bioreactor, stirred tank, fluidized bed และกรรมวิธีการนำไปใช้ เช่น biosensor

2.14.1.6 สามารถใช้ multienzyme system ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.14.1.7 แอคติวิตีของเอนไซม์อาจจะเพิ่มขึ้นถ้าตัวพยุงมีสารประกอบบางอย่างช่วยเสริมปฏิกิริยา

2.14.2 ข้อเสียบางประการของเอนไซม์ตรึงรูป (Wang และคณะ, 1979)

2.14.2.1แอคติวิตีอาจถูกกระทบกระเทือนเนื่องจากเปลี่ยนโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์โดยตัวพยุงที่ไม่เหมาะสม

2.14.2.2 ตัวพยุงที่ไม่เหมาะสมอาจมีผลกระทบต่อผลผลิต

2.14.2.3 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ตรึงรูปอาจเกิดขึ้นได้ยากกว่าเอนไซม์อิสระ

2.15 การตรึงรูปเอนไซม์แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้ (Wang และคณะ, 1979)

2.15.1 การเชื่อมกับตัวพยุง (carrier binding method) หมายถึงการเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 วิธีตามลักษณะการเชื่อมกับเอนไซม์

- การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) เป็นการดูดซับเอนไซม์โปรตีนบนผิวของตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำวิธีนี้มีผลกระทบเล็กน้อย หรือไม่มีผลเลยต่อการเปลี่ยนความคงรูปของเอนไซม์ ดังนั้นจึงไม่มีผลต่อการทำลายบริเวณเร่ง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ เอนไซม์เกาะกับตัวพยุงไม่แน่น
- การเชื่อมแบบไอออนิค (ionic binding method) เป็นการเชื่อมโปรตีนเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ โดยพันธะอิออนิควิธีนี้มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์น้อย ทั้งทางด้านการเปลี่ยนแปลงโครงรูปหรือบริเวณเร่ง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอ่อน เป็นผลให้เอนไซม์หลุดง่ายในขณะทำปฏิกิริยาในภาวะที่มีความเข้มข้นของอิออนิคสูง หรือมีการเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่าง
- การเชื่อมแบบโคเวเลนต์ (covalent binding method) เป็นการเชื่อมโปรตีนเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำโดยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งหากจะแบ่งชนิดของวิธีเชื่อมแบบโคเวเลนต์ตามชนิดของพันธะได้ 3 วิธีคือ

  1. พันธะไดอะโซ
  2. พันธะเพปไทด์
  3. พันธะแอลคิล

  การเชื่อมโดยพันธะโควาเลนท์นั้นอาจกระทบกระเทือนการเปลี่ยนโครงรูป และศูนย์กลางบริเวณเร่งของเอนไซม์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อซับสเตรต แต่แรงเกาะของเอนไซม์กับตัวพยุงค่อนข้างแข็งแรง

2.15.2 การเชื่อมขวาง (cross-linking method) หมายถึงการเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้ตัวกลางซึ่งเชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุล (bifunctional agent) หรือตัวกลางเชื่อมระหว่างหลายโมเลกุล (multifunctional agent)

2.15.3 การห่อหุ้ม (entrapping method) หมายถึงการบรรจุเอนไซม์ลงในช่องว่าง หรือโพรง (lattice) ของเจลที่จะสามารถซึมผ่านบางส่วน หรือห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยเมมเบรนพอลิเมอร์ที่สามารถซึมผ่านได้บางส่วน สามารถแบ่งได้ 2 วิธีคือ

- การบรรจุในตาข่าย (lattice type)
- การห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (microcapsule type)
  ทั้งสองวิธีนี้เอนไซม์ไม่เชื่อมกับเจลของช่องตาข่าย หรือเมมเบรนที่ห่อหุ้ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.10 แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ

ข้อเปรียบเทียบ	เทคนิคการตรึงเอนไซม์				
	เชื่อมโยง	ดูดยึดทางกายภาพ	ดูดยึดด้วยพันธะไอออนิค	ดูดยึดด้วยพันธะโคเวเลนต์	ดักจับ
1.วิธีการเตรียม	สะดวก	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก
2.การยึดระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง	แข็งแรง	อ่อน	ปานกลาง	แข็งแรง	ปานกลาง
3.การนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่	ไม่ได้	ได้	ได้	ได้ในบางกรณี	ไม่ได้
4.ต้นทุนในการตรึง	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ	สูง
5.ความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	ปานกลาง
6.การประยุกต์ใช้งาน	ไม่ได้	ได้	ได้	ไม่ได้	ได้
7.ป้องกันการสลายตัวของเอนไซม์จากจุลินทรีย์	ได้บางครั้ง	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ได้

ที่มา : ปรับปรุงจาก Kennedy และ Cabral (1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.11 แสดงตัวอย่างรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์	ตัวพยุงที่เลือกใช้	สารเคมีช่วยตรึง	เอกสารอ้างอิง
Penicillium funiculosum	sepharose 4B	cyanogen bromide	Suguira และ Ito (1974)
Brevibacterium fuscum var. *dextranolyticum*	sepharose 4B	cyanogen bromide	Suguira และ Ito (1975)
-	porous titanium (IV) oxide	ammonia	Kennedy และ Kay (1977)
-	porous titanium (IV) oxide	diazotised 1,3-diamino benzene	Kennedy และ Kay (1977)
-	zircinia coated alkylamine glass	glutaraldehyde	Ramesh และ Singh (1980)
Penicillium aculeutum	bentonite	-	Madhu และ Prabhu (1984)
Penicillium notatum	silanised porous glass	glutaraldehyde	Rogalski และคณะ (1977)
Penicillium funiculosum	chitosan	glutaraldehyde	Abdel-Naby และคณะ (1999)
Penicillium sp. Strain 61	silanised activated carbon	glutaraldehyde	อุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ (2535)
Penicillium sp.SMCU 3-14	calcium alginate	-	นุสรา เจริญกิจทวี (2539)

- หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.16 การตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงทราย

ทรายจัดเป็นวัสดุตามธรรมชาติที่สามารถหาได้ง่าย ราคาถูก และมีศักยภาพที่จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรึงรูปเอนไซม์ได้ดีไม่แพ้แก้วพรุน (porous glass) รวมทั้งมีหลายขนาดให้เลือกได้ตามความเหมาะสมของลักษณะงานที่จะนำไปใช้

การใช้ทรายเป็นตัวพยุงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์มีข้อได้เปรียบหลายประการอาทิเช่น ทรายมีความคงตัวสูง ทนต่อการทำลายเชิงกล และการทำลายโดยจุลินทรีย์ และมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานในภาวะที่กรดเล็กน้อย ดังนั้นจึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มทดลองตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงทราย

Byrne และ Johnson (1974) ทดลองตรึงรูปเอนไซม์ บีตา-กาแลคโทซิเดส จากรา *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces fragilis* บนตัวพยุง 2 ชนิด คือ ทรายขนาดอนุภาคเล็กกว่า 125 ไมครอน และแก้วพรุนขนาดอนุภาค 0.209 ไมครอน โดยวิธีกระตุ้นตัวพยุงด้วย $TiCl_4$ และ 3-aminopropyltriethoxy-silane (APTS) ร่วมกับการใช้กลูตารัลดีไฮด์ พบว่าการใช้ APTS ให้ประสิทธิภาพการกระตุ้นตัวพยุงที่สูงกว่าการใช้ $TiCl_4$ และพบว่าการใช้ทรายเป็นตัวพยุงสำหรับตรึงรูปบีตา-กาแลคโทซิเดส ให้แอคติวิตีเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงกว่าการใช้แก้วพรุน

จากรายงานของนุสรา เจริญกิจทวี (2539) ได้ทำการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 แบบล้อมจับด้วยแคลเซียมแอลจิเนต แต่ภายหลังพบว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจากราคาในการตรึงค่อนข้างสูง เพราะอัลจิเนตมีราคาแพง และขั้นตอนในการตรึงยุ่งยาก และมีข้อจำกัดมาก เพราะวิธีการตรึงนี้ไม่เหมาะกับสารตั้งต้นที่มีมวลโมเลกุลสูง ดังนั้นจึงไม่เหมาะในการนำมาใช้กับเดกซ์แทรน

อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) ได้ตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 บนผิวทราย โดยหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึง และสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปในระบบการทำงานในบัฟเฟอร์ โดยใช้เดกซ์แทรนบริสุทธิ์เป็นซับสเตรต พบว่าการตรึงรูปโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยตรึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งทำการกลายพันธุ์โดย สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) และทำการประยุกต์ใช้เทคนิคเอนไซม์ตรึงรูปเพื่อการศึกษาการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะโคเวเลนต์บนทรายแม่น้ำขนาด 16-20 เมช โดยทำการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ศึกษาความสามารถและเวลาที่ใช้ในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ ภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อการขจัดเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย เพื่อวิเคราะห์ว่าเอนไซม์ในรูปแบบใดที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด รวมทั้งจะมีการคำนึงถึงความสามารถในการใช้ซ้ำของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ต้นทุน และเวลาในการตรึงรูปว่ามีความเหมาะสมในการนำไปใช้จริงหรือไม่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อไปในการเพิ่มระดับการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในปริมาณที่สูงยิ่งขึ้น เพื่อประยุกต์ใช้ในโรงงานน้ำตาลทราย ซึ่งมีกำลังการผลิตที่สูงมาก นั่นคือการขจัดเดกซ์แทรนต้องทำในอุตสาหกรรมที่มีปริมาณสูงมาก แม้ว่าจะไม่สามารถดำเนินการในห้องปฏิบัติการใด ๆ แต่การออกแบบเพื่อสร้างปฏิกรณ์ที่จะใช้จริงในโรงงานนั้นต้องอาศัยพารามิเตอร์บางอย่าง ตัวอย่างเช่น ค่า Km, Vmax ของการสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย ตลอดจนเวลาที่ใช้เพื่อสลายเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้กำหนดเวลาที่ต้องใช้ในกระบวนการ (residential time) นอกจากนี้ และเนื่องจากสายการผลิตน้ำตาลนั้นมีหลายขั้นตอน จึงต้องคัดเลือกขั้นตอนในสายการผลิตที่เหมาะสมที่สุด เช่น เดกซ์แทรนไม่มากไป เพื่อลดปริมาณเอนไซม์ หรือ residential time ขณะเดียวกันต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพที่จะได้ เนื่องจากแต่ละจุดในสายการผลิตอาจมีปัจจัยที่ทำให้เอนไซม์ลดประสิทธิภาพลง เช่น จากอุณหภูมิ หรือค่าความเป็นกรดด่าง หรือสารยับยั้งเอนไซม์เนื่องจากสิ่งที่ปนเปื้อนมากับน้ำอ้อยเป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่า (platform shaker) รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific
2. เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking waterbath) รุ่น 1086 บริษัท GFL
3. โครมาโทกราฟี รุ่น Biologic บริษัท BioRad
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti Centrifuge J-30I บริษัท Beckman
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Biofuge stratos บริษัท Sorvall
7. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น Seven Easy บริษัท Mettler Toledo
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Thermo Spectronic ® 4001/4 บริษัท NRTL
9. เครื่องวัดความหนืด (viscometer) รุ่น LVDV II+ บริษัท Brookfield
10. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo
11. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd. และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation
12. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO
13. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc.
14. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC
15. เครื่อง Sonicator รุ่น RK100 บริษัท Bandelin Electronic
16. ฮีมาไซโทมิเตอร์ (haemacytometer) Schott Duran
17. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus
18. ตะแกรงร่อน 16-20 mesh รุ่น ASTME11 บริษัท Retsch
19. Concentrator tube รุ่น MIP-2 UFC 901008 Amicon Ultra-15, 10,000 MWCO บริษัท Carrigtwohill

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กลูโคส (D-glucose monohydrate) ของ Merck,
2. ทรายแม่น้ำขนาด 16-20 เมช
3. กรดไนตริก 65% ของ Merck
4. กลูตารัลดีไฮด์ ของ Fluka
5. Bovine Serum Albumin (BSA) ของ Sigma
6. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (industrial grade) น้ำหนักโมเลกุล 5,000,000-40,000,000 ของ Sigma
7. เดกซ์แทรนที-2000 (T-2000) ของ Amersham Biosciences

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 จุลินทรีย์ การเก็บรักษา และการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งปรับปรุงสายพันธุ์โดย สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) เป็นราที่กลายพันธุ์จากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น คัดแยกจากดินโดย เอก แสงวิเชียร (2531)

3.3.1.2 การเก็บรักษาราที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.2.1 การเก็บรักษาเชื้อในระยะสั้น

เขี่ยสปอร์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) ตามสูตรอาหารของ Fukumoto และคณะ (1971) ซึ่งปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2531) (ภาคผนวก ก) ที่มีเดกซ์แทรน 1% บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.1.2.2 การเก็บรักษาเชื้อในระยะยาว

เขี่ยสปอร์ และเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 แล้วจึงนำมาขูดสปอร์ออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้โดยใช้ทวีน 80 0.05% (โดยปริมาตร) ที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวกระจาย ดูดสปอร์แขวนลอยออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก ค) เพื่อกำจัดสายใยและนำสปอร์ที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป จากนั้นแขวนลอยสปอร์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% (โดยปริมาตร) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

นำสปอร์มาทำไลโอฟิไลเซชัน (lyophilization) และเก็บเชื้อในรูปสปอร์แห้ง โดยใช้บริการของหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.3.1.3 การเลี้ยงราในขวดแก้วทรงกรวย

เติม Tween-80 0.1% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดเก็บราจากข้อ 3.3.1.2.1 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยอยู่ใน Tween-80 นับสปอร์ให้อยู่ในช่วง $2x10^7$ สปอร์ต่อมล. โดยใช้ ฮีมาไซโทมิเตอร์ (haemacytometer) จากนั้นถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มล. ลงใน 50 มล.ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2531) (ภาคผนวก ก) ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ platform shaker อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นกรองอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งเดกซ์แทรนเนสที่ได้จะอยู่ในส่วนน้ำเลี้ยง นำส่วนน้ำเลี้ยงมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ปริมาณโปรตีน และคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะต่อไป

3.3.2 **วิธีวัดค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ**

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทำตามวิธีของ Fukumoto และคณะ (1971) โดยเตรียมซับสเตรตเดกซ์แทรน T-2000 ร้อยละ 0.625 ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 0.4 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ (น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแยกเซลออกจากข้อ 3.3.1.3) ซึ่งถูกเจือจาง 1000 เท่าด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุซับสเตรตซึ่งให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25% ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)

หลอดควบคุมทำโดยเตรียมซับสเตรตเดกซ์แทรน T-2000 ร้อยละ 0.625 ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 0.4 มิลลิลิตร และ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง โดยไม่เติมเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนข้างต้น

สำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ที่เวลา 0 นาที ทำโดยเตรียมซับสเตรตและหลอดควบคุม โดยเมื่อเติมเดกซ์แทรนเนสแล้วไม่ต้องบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส 15 นาที แต่นำไปแช่ในน้ำเดือด 5 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ D-glucose (ภาคผนวก ค) และสามารถวิเคราะห์แอคติวิตี (หน่วย/มิลลิลิตร) ได้ตามสูตร

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร x จำนวนเท่าของการเจือจาง x 1มิลลิลิตรเอนไซม์}}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน x 0.1 มิลลิลิตรเอนไซม์ x 15 นาที x 180}}$$

1 หน่วยเอนไซม์ (unit enzyme) คือปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่เปลี่ยนซับสเตรตเดกซ์แทรน T-2000 น้ำหนักโมเลกุล 2,000,000 ไปเป็นผลิตภัณฑ์ (คำนวณเทียบกับ D-glucose 1 ไมโครโมล) ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

3.3.3 **การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี** Somogyi-Nelson (1952)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย alkaline-copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติม Nelson reagent (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.4 **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี** Lowry (1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลายผสม Lowry D (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) 0-200

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) และสามารถวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (หน่วยคือ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ได้ตามสูตร

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร x จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน x 1000}}$$

3.3.5 การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยสร้างพันธะ โดยวิธีของ อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543)

3.3.5.1 ชั่งทรายแม่น้ำที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 16-20 เมช 5 กรัม ล้างน้ำกลั่น 2-3 รอบ

3.3.5.2 เติมกรดไนตริกร้อยละ 65 ในอัตราส่วนทรายต่อกรดเป็น 1:1 โดยเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเทกรดออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ รอบจนค่าความเป็นกรดด่างของน้ำล้างเท่ากับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำกลั่น นำทรายที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาชนะที่ปิดสนิท เพื่อเตรียมเป็นตัวพยุงสำหรับตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

3.3.5.3 เติม 2.5% กลูตารัลดีไฮด์ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 0.5 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.5.4 เทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ทิ้ง ล้างทรายด้วยน้ำกลั่นโดยเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที 4 รอบ

3.3.5.5 เติมโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 0.05 โมลาร์ 9 มิลลิลิตร และเดกซ์แทรนเนสจากน้ำเลี้ยงที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 1 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที

3.3.5.6 เทสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ จากนั้นเติม โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 0.05 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.3.5.7 ทำซ้ำขั้นตอนในข้อ 3.3.5.6 อีก 3 รอบ จนได้ปริมาตรของสารละลายครบ 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนที่ไม่ถูกตรึง เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสอิสระจากน้ำเลี้ยง จะสามารถทราบปริมาณโปรตีนที่ตรึงอยู่บนทรายได้ ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงได้โดยทางอ้อม

3.3.5.8 ทรายที่ถูกตรึงรูปแล้ว เก็บในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 0.05 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.6 การหาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตรึงรูปบนทราย

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ถูกตรึงรูปบนทรายทำตามวิธีการของ อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) โดยชั่งทรายที่ตรึงรูปแล้วลงในหลอดทดลอง 0.1 กรัม (100 มิลลิกรัม) จากนั้นเตรียมซับสเตรตเดกซ์แทรน T-2000 ร้อยละ 0.625 ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 จำนวน 0.4 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) (เท่ากับเดกซ์แทรน 0.25%ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0) ผสมเข้าด้วยกัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงปิเปตสารละลายนี้ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุทรายตรึงรูปไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) และวิเคราะห์แอคติวิตี

หลอดควบคุมทำโดยเตรียมซับสเตรตลงในหลอดทดลอง และทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนข้างต้น (โดยไม่มีการเติมทรายตรึงรูป)

สำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ที่เวลา 0 นาที ทำโดยเตรียมซับสเตรต และหลอดควบคุมโดยเมื่อเติมซับสเตรตลงในหลอดทดลองที่มีทรายตรึงรูปอยู่แล้วไม่ต้องบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส 15 นาที แต่นำไปแช่ในน้ำเดือด 5 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที

3.3.7 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้การวิเคราะห์แอคติวิตี

ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายตามข้อ 3.3.5 จากนั้นชั่งทรายตรึงรูปในหลอดทดลอง 0.01, 0.05 และ 0.1กรัม ชุดละ 9 หลอด เตรียมสับเสตรท เดกซ์แทรน T-2000 0.25% วิเคราะห์ตามขั้นตอนการตรวจสอบแอคติวิตี โดยที่แต่ละชุดจะแบ่ง 3 หลอด มาบ่มเป็นเวลา 5, 15, 25 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) เขียนกราฟแท่งเปรียบเทียบระหว่างปริมาณทราย และแอคติวิตีที่บ่มด้วยเวลาต่างๆกัน

3.3.8 การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน (BSA) เป็นสารช่วยในการตรึง

เตรียมทรายตามขั้นตอนการตรึงรูปเอนไซม์ตามข้อ 3.3.5.1 และ 3.3.5.2 จากนั้นเติม BSA 1มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในทราย เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติมกลูตารัลดีไฮด์ตามขั้นตอนการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส และแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเนสในน้ำเลี้ยงที่ใช้ตรึงเป็น 150, 300 และ 450 หน่วย วิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป เขียนกราฟแท่งเปรียบเทียบระหว่างแอคติวิตีของการตรึงรูปแบบใช้ BSA และ ไม่ใช้ BSA เป็นสารช่วยตรึง และเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนเนสในน้ำเลี้ยงที่ใช้ในการตรึง

3.3.9 การหาคุณสมบัติของเดกซ์แทนเนสตรึงรูปบนทรายเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

3.3.9.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระเตรียมการวิเคราะห์ตามวิธีวัดค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และ สำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเตรียมการวิเคราะห์ตามวิธีวัดค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตรึงรูปบนทราย โดยบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 40 45 50 55 60 65 70 75 องศาเซลเซียสตามลำดับ เป็นเวลา 15 นาที แล้ววิเคราะห์แอคติวิตี เปรียบเทียบความสามารถในการทำงานที่แต่ละช่วงอุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีกับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มทำปฏิกิริยา

3.3.9.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระเตรียมการวิเคราะห์ตามวิธีวัดค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และ สำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเตรียมการวิเคราะห์ตามวิธีวัดค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตรึงรูปบนทราย โดยซับสเตรตคือสารละลายเดกซ์แทรน T-2000 ร้อยละ 0.625 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ ตั้งแต่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 ใน 0.05 โม

ลาร์ จำนวน 0.4 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันกับ 0.6 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ ที่ต้องการ บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววิเคราะห์แอคติวิตี โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายมีดังนี้

โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4.0-5.5

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0-7.0

เปรียบเทียบความสามารถในการทำงานที่แต่ละช่วงความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีกับค่าความเป็นกรดด่างของสารผสมปฏิกิริยาที่ใช้ในการบ่มทำปฏิกิริยา

3.3.10 การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในการย่อยสลายเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์

ทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 20 25 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 นาที

วิเคราะห์โดยชั่งทรายตรึงรูป 0.1 กรัม (1.5 หน่วย) ลงในหลอดทดลอง 39 หลอด บ่มสารละลาย เดกซ์แทรน 0.25%ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายลงในหลอดทดลองที่ชั่งทรายเตรียมไว้หลอดละ 1 มิลลิลิตร และอีก 13 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (เป็นหลอดควบคุมไม่มีทรายตรึงรูป) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งครบเวลา 5 นาที จึงนำหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา 5 นาทีออกจาก เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ส่วนหลอดอื่นๆ ให้ทำปฏิกิริยาจนครบตามเวลาที่กำหนด จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา ส่วนหลอดที่ทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 70 นาทีขึ้นไป ทำโดยเมื่อเวลา ครบ 60 นาที ให้เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3 หน่วย/มิลลิลิตร ลงไปที่หลอด 70 80 90 และ 100 นาที ทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที (หลอดที่ 70 นาที) ทำปฏิกิริยาต่อไป 20 นาที (หลอดที่ 80 นาที) และเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3 หน่วย/มิลลิลิตร ลงไปในหลอดที่ 90 และ 100 นาที และเก็บตัวอย่างตามเวลา (การเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระลงไปเพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่สามารถย่อยสลายได้จาก เดกซ์แทรน 0.25%อย่างสมบูรณ์) เจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเวลาในการทำปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

3.3.11 การใช้เดกซ์แทรนเนสในการย่อยเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างสมบูรณ์

เตรียมสารละลายเดกซ์แทรน 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2% ใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ใส่ในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 6 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสจากน้ำเลี้ยง 30 หน่วย ลงไปทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที จึงนำหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอดออกจาก เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ส่วนหลอดที่เหลือเติมเดกซ์แทรนเนสจากน้ำเลี้ยง 30 หน่วย ลงไปทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที ต่อไปอีก 30 นาที จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา (เพื่อพิสูจน์ว่าการทำปฏิกิริยารอบแรกนั้นได้ย่อยเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์แล้วเนื่องจากไม่เกิดน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) เขียนกราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างสมบูรณ์

3.3.12 สมบัติทางกายภาพของน้ำอ้อย

ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยจากกระบวนการผลิตในโรงงานน้ำตาลทรายนั้น จำเป็นต้องมีการเก็บข้อมูลต่างๆของน้ำอ้อย คือ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง การวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

โดยจะเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยในช่วงเดือน พฤศจิกายน ถึง เดือน กุมภาพันธ์ (เป็นช่วงหีบอ้อย) ที่โรงงานน้ำตาลที-เอ็น จังหวัดลพบุรี โดยผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่าง วัดอุณหภูมิ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ และค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้กระดาษวัดค่าความเป็นกรดด่าง บริเวณจุดรวมน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดต่างๆ และเก็บตัวอย่างใส่ภาชนะซึ่งต้องมีการใช้น้ำร้อนฉีดล้างภาชนะ เมื่อเก็บน้ำอ้อยแล้ว จะบรรจุภาชนะในถังน้ำแข็งเพื่อรักษาความเย็น จากนั้นจะฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพื่อเก็บรักษาน้ำอ้อยให้ใช้ได้นานตลอดการทดลอง

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำโดยการเจือจางน้ำอ้อยให้เหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)

การวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอธานอล ตามวิธีของ Keniry และคณะ (1969) โดยการนำน้ำอ้อยตัวอย่างปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุน

เหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองส่วนน้ำใสด้วยผ้าขาวบาง อบหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร 4 หลอด จนแห้ง และชั่งน้ำหนักที่คงที่ เติมน้ำอ้อยที่เตรียมไว้ หลอดละ 25 มิลลิลิตร 95% เอธานอล 75 มิลลิลิตร (เพื่อการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์) และไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 10% 10 มิลลิลิตร (เพื่อกำจัดโปรตีน) เขย่าผสม และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรวบรวมตะกอน โดยเทส่วนน้ำใสทิ้ง และนำหลอดไปอบแห้งเพื่อระเหยน้ำออกจากตะกอน ละลายตะกอนอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บเฉพาะส่วนน้ำใส (อบหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร 4 หลอด จนแห้ง และชั่งน้ำหนักที่คงที่) นำส่วนน้ำใสตกตะกอนตามขั้นตอนแรกอีกครั้ง และเก็บรวบรวมตะกอน เพื่อชั่งน้ำหนักตะกอนที่ได้คือ เดกซ์แทรน และวิเคราะห์ได้เป็นร้อยละของปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย

3.3.13 การย่อยสลายเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์ด้วยเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในสารละลายบัฟเฟอร์ และในน้ำอ้อย

โดยจะทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 10 20 30 40 50 60 และ 70 นาที

วิเคราะห์โดยชั่งทราย 0.01, 0.05 และ 0.1 กรัม (0.15, 0.75 และ 1.5 หน่วย ตามลำดับ) ลงในหลอดทดลองปริมาณทรายละ 42 หลอด บ่มสารละลายเดกซ์แทรน 0.25%ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 และบ่มเดกซ์แทรน 0.25%ในน้ำอ้อย (sonicate ละลายเดกซ์แทรน T-2000 ลงในน้ำอ้อย เนื่องจากปริมาณเดกซ์แทรนที่มีอยู่จริงในน้ำอ้อยนั้นน้อยมาก) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายแต่ละตัวอย่างลงในหลอดทดลองที่ชั่งทรายเตรียมไว้หลอดละ 1 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 21 หลอด และอีกตัวอย่างละ 7 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (เป็นหลอดควบคุมไม่มีทรายตรึงรูป) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งครบเวลา 5 นาที จึงนำหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา 5 นาทีออกจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ส่วนหลอดอื่นๆ ให้ทำปฏิกิริยาจนครบตามเวลาที่กำหนด จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา เจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเวลาในการทำปฏิกิริยาของเดกซ์แทรน

เนสตรึงรูป โดยเปรียบเทียบการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูประหว่างภาวะบัฟเฟอร์ และภาวะน้ำอ้อย

3.3.14 การใช้วิธี ไดแอลิซิส เพื่อทดสอบความสามารถในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสในน้ำอ้อย

<u>วิธีเตรียมถุงไดแอไลส์</u>

นำถุงไดแอไลส์ (ที่มีรูผ่านของมวลโมเลกุลระหว่าง 120-14,000) ตัดให้ได้ขนาดยาวประมาณ 10 เซนติเมตร 9 ถุง จากนั้นต้มในEDTA 0.01% 10 นาที จากนั้นล้างน้ำกลั่นหลายๆ รอบจนสะอาด

เตรียมการทดลอง ดังนี้

- เตรียมเดกซ์แทรน 2% ในน้ำอ้อย 30 มิลลิลิตร
- เตรียมเดกซ์แทรน 2%ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 10 มิลลิลิตร
- เตรียมเดกซ์แทรน 2%ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 10 มิลลิลิตร

นำสารละลายที่เตรียมไว้ทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น

- Flask ที่ 1 ใส่เดกซ์แทรน 2% ในน้ำอ้อย 10 มิลลิลิตร
- Flask ที่ 2 ใส่เดกซ์แทรน 2% ในน้ำอ้อย 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 15 หน่วย
- Flask ที่ 3 ชั่งทรายตรึงรูปด้วยเดกซ์แทรนเนส 15 หน่วย ใส่เดกซ์แทรน 2% ในน้ำอ้อย 10 มิลลิลิตร
- Flask ที่ 4 ใส่เดกซ์แทรน 2%ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 15 หน่วย
- Flask ที่ 5 ชั่งทรายตรึงรูปด้วยเดกซ์แทรนเนส 15 หน่วย ใส่เดกซ์แทรน 2%ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 10 มิลลิลิตร

นำ flask ทั้งหมด 5 flask บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำ flask ทั้งหมด แช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ดูดสารละลายของแต่ละ flask ไว้ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) สำหรับ flask ที่ 4 และ 5 จะทำการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระลงไปอีก 15 หน่วย จำนวน 3 ครั้ง ทำปฏิกิริยาเพิ่มอีก 120 นาที และวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเติมเอนไซม์แต่ละครั้ง (เพื่อการย่อย เดกซ์แทรน 2% อย่างสมบูรณ์) ส่วนสารละลาย จาก flask ที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งมีสารละลาย flask ละ 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่ถุง ไดแอไลส์ จำนวน 9 ถุง โดยแยกแต่ละตัวอย่างออกจากกัน ทำวิธีไดแอลิซิส โดยนำถุงที่เป็นตัวอย่างเดียวกันใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นอยู่นอกถุงปริมาตร 1 ลิตร (ดังนั้นจึงมีทั้งหมด 3 บีกเกอร์ สำหรับ 3 ตัวอย่าง) โดยจะมีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในน้ำกลั่นของทุกๆรอบ และเปลี่ยนน้ำกลั่นจนกระทั่งไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาจากถุง ไดแอไลส์ อีก ซึ่งพบว่าได้ทำการเปลี่ยนน้ำกลั่นทั้งหมด 3 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำกลั่น 3 ลิตร โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) (แยกเป็นของ 3 ตัวอย่าง) เพื่อวิเคราะห์ได้ว่า

- Flask ที่ 1 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำกลั่น 3 ลิตร ปริมาณน้อยซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำอ้อยเท่านั้น เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาจากเอนไซม์ (ส่วนปริมาณเดกซ์แทรนที่อยู่ในถุง ไดแอไลส์ จะมีปริมาณเท่าเริ่มต้น)
- Flask ที่ 2 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำกลั่น 3 ลิตร ปริมาณมาก เนื่องจากเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำอ้อย และจากการเกิดปฏิกิริยาจากเดกซ์แทรนเนสอิสระ (ส่วนปริมาณเดกซ์แทรนที่อยู่ในถุง ไดแอไลส์ จะมีปริมาณน้อย หรือ ไม่มี)
- Flask ที่ 3 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำกลั่น 3 ลิตร ปริมาณมาก เนื่องจากเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำอ้อย และจากการเกิดปฏิกิริยาจากเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย (ส่วนปริมาณเดกซ์แทรนที่อยู่ในถุงไดแอไลส์ จะมีปริมาณน้อย หรือ ไม่มี)

นำสารละลายในถุงไดแอไลส์ ของแต่ละตัวอย่างมาปรับปริมาตรให้เท่ากัน จากนั้นปิเปตมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนเนสอิสระ 300 หน่วย เป็นเวลา 90 นาที (เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยเดกซ์แทรนที่เหลืออยู่ในสารละลายอย่างสมบูรณ์) เจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นอกถุง ได

แอไลส์ และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนภายในถุงไดแอไลส์ ของแต่ละตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจาก flask ที่ 4 และ flask ที่ 5 จากการทดลองนี้จะสามารถวิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสที่ตรึงบนทรายในภาวะน้ำอ้อยได้

3.3.15 การเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากขั้นตอนการวิเคราะห์ต่าง ๆ

การเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เนื่องจากการสัมผัสกับความร้อนในขั้นตอนต่างๆ ของการวิเคราะห์แอคติวิตี

วิเคราะห์โดยเตรียมสารละลายน้ำตาลทราย 20% โดยใช้ magnetic stirrer 15 นาที และ sonicator 15 นาที จากนั้น เจือจางสารละลายน้ำตาลทรายให้เป็น 5% 10% 13% 15% 20% โดยในแต่ละหลอดจะปิเปตสารละลาย 1 มิลลิลิตร และให้หลอดควบคุมคือน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองเป็น 4 ส่วนคือ ชุดที่ 1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson ทันที ชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที ชุดที่ 3 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ส่วนชุดที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที และต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้น ชุดที่ 2, 3 และ 4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับสารละลายน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองทั้ง 4 ชุด เพื่อวิเคราะห์ได้ว่าจากขั้นตอนใดในการวิเคราะห์แอคติวิตีเป็นสาเหตุให้เกิดการสร้างน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำตาลทราย

3.3.16 การหยุดปฏิกิริยาโดยใช้เอธานอล และเมธานอล แทนการต้มหยุดปฏิกิริยา

สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระทำปฏิกิริยาตามวิธีวัดค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และสำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทำปฏิกิริยาตามวิธีวัดค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตรึงรูปบนทราย โดยซับสเตรตคือ สารละลายเดกซ์แทรน T-2000 ร้อยละ 0.625 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% และบ่มเป็น 3 แบบ แบบละ 3 ชุดการทดลอง คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 15 นาที และ 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยชุดที่ 1 การต้มในน้ำเดือด 5 นาที ชุดที่ 2 การเติม absolute เอธานอล 0.1 มิลลิลิตร 5 นาที และชุดที่ 3 การเติม absolute เมธานอล 0.1 มิลลิลิตร 5 นาที เขียนกราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ และการหยุดปฏิกิริยาด้วยวิธีต่างๆ

3.3.17 การหาค่า residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

<u>สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ</u>

- เตรียมสารละลายน้ำตาลทราย 26%ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 400 มิลลิลิตร (ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ)
- เตรียมสารละลายน้ำตาลทราย 32.5% ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 50 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายเดกซ์แทรน 5% ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 200 มิลลิลิตร

ในการหา Residential time จะใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้

1. เดกซ์แทรน 0.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 14 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 42 มิลลิลิตร
2. เดกซ์แทรน 1.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 28 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 28 มิลลิลิตร
3. เดกซ์แทรน 1.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 42 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 14 มิลลิลิตร
4. เดกซ์แทรน 2.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 56 มิลลิลิตร
5. เดกซ์แทรน 2.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 32.5% 56 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 70 มิลลิลิตร

โดยจะทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 20 30 40 50 และ 60 นาที และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03, 0.3, 3, 30 หน่วย/มิลลิลิตร

วิเคราะห์โดยปิเปตสารละลายเดกซ์แทรน 0.5% ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ความเข้มข้นละ 128 หลอด (สำหรับเวลาต่างๆ 8 เวลา และ แยกเป็นเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03, 0.3, 3, 30 หน่วย/มิลลิลิตร) หลอดละ 0.9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03 หน่วย/มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 24 หลอดที่บรรจุซับสเตรต (เนื่องจากอีก 8 หลอด เป็นหลอดควบคุม ซึ่งจะประกอบด้วยซับสเตรต 0.9 มิลลิลิตร และ บัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งครบเวลา 5 นาที จึงนำหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา 5 นาทีออกจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ส่วนหลอดอื่นๆ ให้ทำปฏิกิริยาจนครบตามเวลาที่กำหนด จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา ส่วนหลอดที่ 60 นาที ทำโดยเมื่อเวลา ครบ 50 นาที ให้เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย/มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 60 นาที และทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที (เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีในสารตั้งต้น) จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา เจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)

ทดลองโดยใช้เดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3, 3, 30 หน่วย/มิลลิลิตร วิเคราะห์โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นอื่นต่อไปตามลำดับ เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น เขียนกราฟแสดง residential time สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

3.3.18 การทำบริสุทธิ์ของเดกซ์แทรนเนส

3.3.18.1 การตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 (crude enzyme) มาวัดปริมาตร ตรวจสอบโปรตีน และแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดอย่างละเอียดลงไปอย่างช้าๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ตลอดเวลาที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นคือ 0-30% หลังจากนั้นกวนเบาๆ อีก 3-4 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกตะกอนที่ได้ไว้โดยละลายตะกอนด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ในปริมาณที่น้อยที่สุด จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่เหลือไปตกตะกอนซ้ำตามวิธีดังกล่าวที่แอมโมเนียมซัลเฟต 30-50% 50-70% และ 70-90% เก็บตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงมาไดแอไลส์ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) ด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จากนั้นทำ รีเวอร์สไดแอไลส์ด้วย 30% กลีเซอรอลใน 0.05 โม

ลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจสอบโปรตีน แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และแอคติวิตีของอินเวอร์เทส

3.3.18.2 การทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A

นำโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วงที่มีแอคติวิตีสูง คำนวณปริมาณโปรตีนในการ load ลงคอลัมน์ โดยจะทำการ load โปรตีน 2 มิลลิลิตร คำนวณ bed volume (45 มิลลิลิตร) และ bed time (90 นาที) ที่จะใช้ในการชะคอลัมน์ โดยจะใช้อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2 มิลลิลิตร เมื่อผ่านโปรตีนลงไปในคอลัมน์โปรตีนส่วนที่ไม่จับกับ DEAE-BioGel A (unbound fraction) จะถูกชะออกด้วย 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นเวลา 180 นาที (ติดตามโปรตีนโดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์) จากนั้นชะโปรตีนที่ติดอยู่กับเจล (bound fraction) ออกด้วยเกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นเวลา 270 นาที จากนั้นชะโปรตีนที่ติดอยู่กับเจลอย่างแน่นออกด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นเวลา 450 นาที เก็บตัวอย่างทั้งหมด จดบันทึกค่าปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และนำมาตรวจสอบแอคติวิตีในช่วงแรกๆ ทุกๆ 5 หลอด ส่วนในช่วงที่มีปริมาณโปรตีนมาก (ช่วง bound fraction) จะวิเคราะห์ทุกๆ ตัวอย่าง จากนั้นรวมเอาตัวอย่างที่มีแอคติวิตีเดกซ์แทรนเนสสูงๆ ไว้ด้วยกัน และลดปริมาตรตัวอย่างโดยวิธี concentrating centrifugation ที่ 5,000 รอบต่อนาที 10 นาที ด้วย concentrator tube ที่มีเมมเบรนซึ่งมีค่า molecular weight cut off ที่ 10,000 ดาลตัน จากนั้นไดแอไลส์ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) ด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จากนั้นทำ รีเวอร์สไดแอไลส์ด้วย 30% กลีเซอรอลใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจสอบโปรตีน แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทสที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

3.3.18.3 การทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A โดยใช้เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-0.5 โมลาร์

เนื่องจากการทำเดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์ในข้อ 3.3.18.2 โดยใช้เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 นั้นไม่สามารถแยกเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทสออกจากกันได้ จึงทำการแยกเอนไซม์ทั้งสองโดยการเปลี่ยนเป็นเกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-0.5 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ซึ่งเปลี่ยนเป็นคอลัมน์เล็ก โดยจะทำการ load โปรตีน 0.46 มิลลิลิตร คำนวณ bed volume (9.54 มิลลิลิตร) และ bed time (19.0755 นาที) ที่จะใช้ในการชะคอลัมน์ โดยจะใช้อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1 มิลลิลิตร เมื่อผ่านโปรตีนลงไปในคอลัมน์โปรตีนส่วนที่ไม่จับกับ DEAE-BioGel A (unbound fraction) จะถูกชะออกด้วย 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นเวลา 40 นาที (ติดตามโปรตีนโดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์) จากนั้นชะโปรตีนที่ติดอยู่กับเจล (bound fraction) ออกด้วยเกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-0.5 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นเวลา 100 นาที จากนั้นชะโปรตีนที่ติดอยู่กับเจลอย่างแน่นออกด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นเวลา 100 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.18.2

3.3.19 การหาค่า residential time และค่า Km Vmax ของ เดกซ์แทรนเนสอิสระ (DEAE) เทียบกับเดกซ์แทรนเนส (DEAE) ตรึงรูปบนทราย ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

<u>สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ</u>

- เตรียมสารละลายน้ำตาลทราย 26% ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 400 มิลลิลิตร (ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ)
- เตรียมสารละลายเดกซ์แทรน 5% ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 200 มิลลิลิตร

ในการหา residential time จะใช้สารละลายที่มีต่างกันดังนี้

1. เดกซ์แทรน 0.1% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 2.8 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 53.2 มิลลิลิตร
2. เดกซ์แทรน 0.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 14 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 42 มิลลิลิตร
3. เดกซ์แทรน 1.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 28 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 28 มิลลิลิตร
4. เดกซ์แทรน 2.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 56 มิลลิลิตร

โดยจะทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 20 40 60 80 100 และ 120 นาที และแปรผันของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03, 0.3 และ 1 หน่วย/มิลลิลิตร

วิเคราะห์โดยปิเปตสารละลายเดกซ์แทรน 0.1% ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ความเข้มข้นละ 108 หลอด (สำหรับเวลาต่างๆ 9 เวลา และ แยกเป็นเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03, 0.3, 1 หน่วย/มิลลิลิตร) หลอดละ 0.9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03 หน่วย/มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 24 หลอดที่บรรจุซับสเตรต (เนื่องจากอีก 8 หลอด เป็นหลอดควบคุม ซึ่งจะประกอบด้วยซับสเตรต 0.9 มิลลิลิตร และ บัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งครบเวลา 5 นาที จึงนำหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา 5 นาทีออกจาก เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ส่วนหลอดอื่นๆ ให้ทำปฏิกิริยาจนครบตามเวลาที่กำหนด จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา ส่วนหลอดที่ 100 และ 120 นาที ทำโดยเมื่อเวลา ครบ 80 นาที ให้เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย/มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 100 และ 120 นาที ทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 และ 20 นาที ตามลำดับ (เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีในสารตั้งต้น) จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา เจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)

ทดลองโดยใช้เดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3 และ 1 หน่วย/มิลลิลิตร และจึงวิเคราะห์โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นอื่นต่อไปตามลำดับ เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น เขียนกราฟ residential time สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

เนื่องด้วยการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจากการทดลองข้างต้นนั้น ทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะห่างของเวลานานเกินไป ในการทดลองต่อไปจึงทำการเก็บตัวอย่างในช่วงที่ถี่มากขึ้น และศึกษาความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการย่อยมากยิ่งขึ้น โดยจะทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 และ 35 นาที และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.5, 0.75 และ 1 หน่วย/มิลลิลิตร เขียนกราฟแสดง residential time สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเขียนกราฟ Lineweaver-Burk Plot เพื่อวิเคราะห์ค่า Km และ Vmax

<u>สำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป</u>

- ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายโดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยใช้เอนไซม์เริ่มต้นในการตรึง ซึ่งมีแอคติวิตี 300 และ 600 หน่วย/มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายน้ำตาลทราย 26%ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 มิลลิลิตร 400 มิลลิลิตร (ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป)
- เตรียมสารละลายเดกซ์แทรน 5% ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 200 มิลลิลิตร

ในการหา residential time จะใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้

1. เดกซ์แทรน 0.1% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
สารละลาย น้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 2.8 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 67.2 มิลลิลิตร
2. เดกซ์แทรน 0.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 14 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 56 มิลลิลิตร
3. เดกซ์แทรน 1.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย

สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 28 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 42 มิลลิลิตร

4. เดกซ์แทรน 2.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย

สารละลายน้ำตาลทราย 26% 70 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 70 มิลลิลิตร

โดยจะทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 20 30 40 50 และ 60 นาที และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 1.074 และ 1.977 หน่วย/มิลลิลิตร (ทำโดยการชั่งทราย 0.1 กรัม)

วิเคราะห์โดยชั่งทราย 0.1 กรัมลงในหลอดทดลอง 24 หลอด บ่มสารละลายเดกซ์แทรน 0.1% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายเดกซ์แทรน 0.1%ลงในหลอดทดลองที่ชั่งทรายเตรียมไว้ 24 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร และอีก 8 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (เป็นหลอดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งครบเวลา 5 นาที จึงนำหลอดทดลองที่ต้องการทำปฏิกิริยา 5 นาทีออกจาก เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ส่วนหลอดอื่นๆ ให้ทำปฏิกิริยาจนครบตามเวลาที่กำหนด จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา ส่วนหลอดที่ 60 นาที ทำโดยเมื่อเวลาครบ 50 นาที ให้เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย/มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที (เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีในสารตั้งต้น) จึงค่อยหยุดปฏิกิริยา เจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)

จากนั้นจึงวิเคราะห์โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นอื่นต่อไปตามลำดับ เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น เขียนกราฟแสดง residential time สำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย และเขียนกราฟ Lineweaver-Burk Plot เพื่อวิเคราะห์ค่า Km และ Vmax

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.20 การหาจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

- ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายโดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยใช้เอนไซม์เริ่มต้นในการตรึง ซึ่งมีแอคติวิตี 300 และ 600 หน่วย/มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายน้ำตาลทราย 26%ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 มิลลิลิตร 120 มิลลิลิตร (ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป)
- เตรียมสารละลายเดกซ์แทรน 5% ในโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 50 มิลลิลิตร

ในการทดสอบการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้

1. เดกซ์แทรน 0.1% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 25 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 1 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 24 มิลลิลิตร
2. เดกซ์แทรน 0.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 25 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 5 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 20 มิลลิลิตร
3. เดกซ์แทรน 1.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 25 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 10 มิลลิลิตร + โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 15 มิลลิลิตร
4. เดกซ์แทรน 2.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เตรียมโดย
   สารละลายน้ำตาลทราย 26% 25 มิลลิลิตร + สารละลายเดกซ์แทรน 5% 25 มิลลิลิตร

การทดลองจะใช้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 1.074 และ 1.977 หน่วย/มิลลิลิตร โดยจะทำการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบ่มกับสารละลายความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ซ้ำจำนวน 6 รอบ โดยแต่ละรอบจะมีการล้างทรายตรึงรูปด้วยด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

วิเคราะห์โดยชั่งทรายความเข้มข้นละ 0.1 กรัม ลงในหลอดทดลอง 12 หลอด บ่มสารละลายเดกซ์แทรนที่เตรียมไว้ทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปต

สารละลายแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลองที่ชั่งทรายไว้แล้ว (1.074 หน่วย 3 หลอด และ 1.977 หน่วย 3 หลอด) หลอดละ 1 มิลลิลิตร และอีก 1 หลอด (เป็นหลอดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกมาเพื่อหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ลงในหลอดทดลองที่มีทรายตรึงรูปที่ใช้แล้ว หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างทราย จากนั้นเทบัฟเฟอร์ทิ้ง (เหลือเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายไว้) และเติมสารละลายเดกซ์แทรนซับสเตรตที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลองดังที่ปฏิบัติมาขั้นต้น ทำซ้ำวิธีดังกล่าวจนครบ 6 รอบ ส่วนสารละลายที่ผ่านการทำปฏิกิริยา และหยุดปฏิกิริยาแล้วนั้น เจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) เขียนกราฟเปรียบเทียบระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปฏิกิริยา กับครั้งที่ทำปฏิกิริยา และคำนวณประสิทธิภาพการทำงานที่ลดลงของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย และจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการใช้ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์

เมื่อเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 บนอาหารแข็งเอียง (slant agar) แล้วถ่ายสปอร์แขวนลอยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เมื่อนำส่วนน้ำเลี้ยงมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสต่อ เดกซ์แทรน T-2000 0.25% ในภาวะการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้เท่ากับ 243.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะได้เท่ากับ 226.51 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แสดงผลดังตารางที่ 4.1

4.2 ผลการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยสร้างพันธะ

ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทราย โดยใช้ทรายแม่น้ำ 16-20 เมช 5 กรัม ซึ่งเตรียมทรายโดยวิธีการล้างด้วยกรดไนตริกเข้มข้น จากนั้นตรึงรูปโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึง โดยเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ใช้ตรึงเป็นเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ซึ่งมีแอคติวิตีประมาณ 250 -300 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายต่อ เดกซ์แทรน T-2000 0.25% ในภาวะการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้เท่ากับ 4.33 หน่วยต่อทราย 5 กรัม ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.14 มิลลิกรัมต่อทราย 5 กรัม และคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะได้เท่ากับ 31.34 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แสดงผลดังตารางที่ 4.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ เทียบกับแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

เอนไซม์	โปรตีน	แอคติวิตี	แอคติวิตีจำเพาะ
เดกซ์แทรนเนสในน้ำเลี้ยง	1.075 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	243.50 หน่วย/มิลลิลิตร	226.51หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน
เดกซ์แทรนเนสที่ตรึงบนทราย	0.14 มิลลิลิกรัม/ทราย 5 กรัม	4.33 หน่วย/ทราย 5 กรัม	31.34 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน

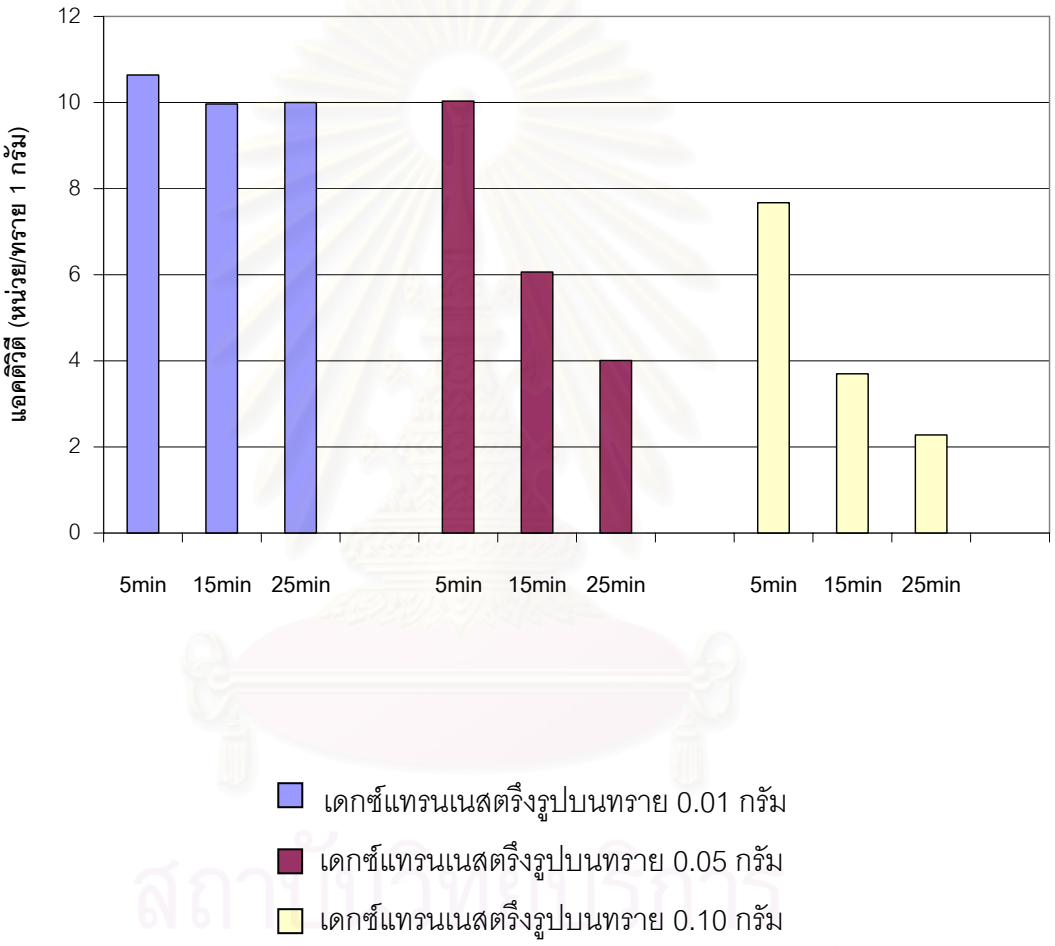
จากตารางที่ 4.1 พบว่า การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายด้วยกลูตารัลดีไฮด์นั้นให้แอคติวิตีน้อยมากเมื่อเทียบกับเดกซ์แทรนเนสในรูปอิสระ เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีโดยการชั่งทราย 0.1 กรัม ดังนั้นจึงมีการตั้งสมมติฐานว่า ปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นอาจมีปริมาณมากเกินไป ส่งผลให้เกิดการย่อยเดกซ์แทรนหมดภายในเวลาอันสั้น (ก่อนเวลา 15 นาที) จึงทำให้แอคติวิตีที่ได้น้อยเกินความเป็นจริง การทดลองต่อไปจึงแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย ในการวิเคราะห์แอคติวิตี เพื่อให้มีปริมาณที่เหมาะสมกับปริมาณซับสเตรตที่ใช้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการทดลองเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป เทียบกับปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตี

เปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตี โดยชั่งทรายที่ตรึงรูปด้วยเดกซ์แทรนเนส (ตามข้อ 3.3.5) ที่มีปริมาณ 0.01, 0.05 และ 0.1กรัม แล้วนำมาทำปฏิกิริยาต่อซับสเตรต เดกซ์แทรน T-2000 0.25% เป็นเวลาต่างๆ คือ 5 15 และ 25 นาที ในภาวะการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 พบว่าปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอคติวิตี คือ 0.01 กรัม ซึ่งให้แอคติวิตีสูงสุดคือ ประมาณ 10 หน่วยต่อทราย 1 กรัม ทั้งนี้เนื่องจากทราย 0.01 กรัม มีปริมาณเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับซับสเตรตแล้วให้แอคติวิตีของเอนไซม์คงที่ที่เวลาต่าง ๆ (ซับสเตรตมากเกินพอในการทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 0.01 กรัม) แต่สำหรับทราย 0.05 และ 0.1 กรัม เป็นปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายที่มีหน่วยของเอนไซม์มากเกินพอเมื่อเทียบกับปริมาณซับสเตรต ดังนั้นจึงเกิดการย่อยซับสเตรตที่สมบูรณ์ก่อนเวลา 15 และ 25 นาที เมื่อหาแอคติวิตีของเอนไซม์ต้องมีการคำนวณเทียบต่อ 1 นาที เวลาที่นำมาใช้คำนวณจึงเกินไปจากความเป็นจริง ส่งผลให้แอคติวิตีที่คำนวณได้น้อยกว่าแอคติวิตีที่แท้จริงของเอนไซม์ ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปในการวิเคราะห์แอคติวิตีเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจึงใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายในการวิเคราะห์ 0.01 กรัม จากค่าแอคติวิตีที่ถูกต้อง และแม่นยำ จึงทำให้การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสได้แอคติวิตีดังตารางที่ 4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปปริมาณต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตี

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระเทียบกับแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (ใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายในการวิเคราะห์ 0.01 กรัม)

เอนไซม์	โปรตีน	แอคติวิตี	แอคติวิตีจำเพาะ
เดกซ์แทรนเนสในน้ำเลี้ยง	1.193 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร	247.8 หน่วย/ มิลลิลิตร	236หน่วย/มิลลิกรัม โปรตีน
เดกซ์แทรนเนสที่ตรึงบนทราย	0.56 มิลลิกรัม/ 5 กรัม ทราย	50 หน่วย/ 5 กรัม ทราย	89 หน่วย/มิลลิกรัม โปรตีน

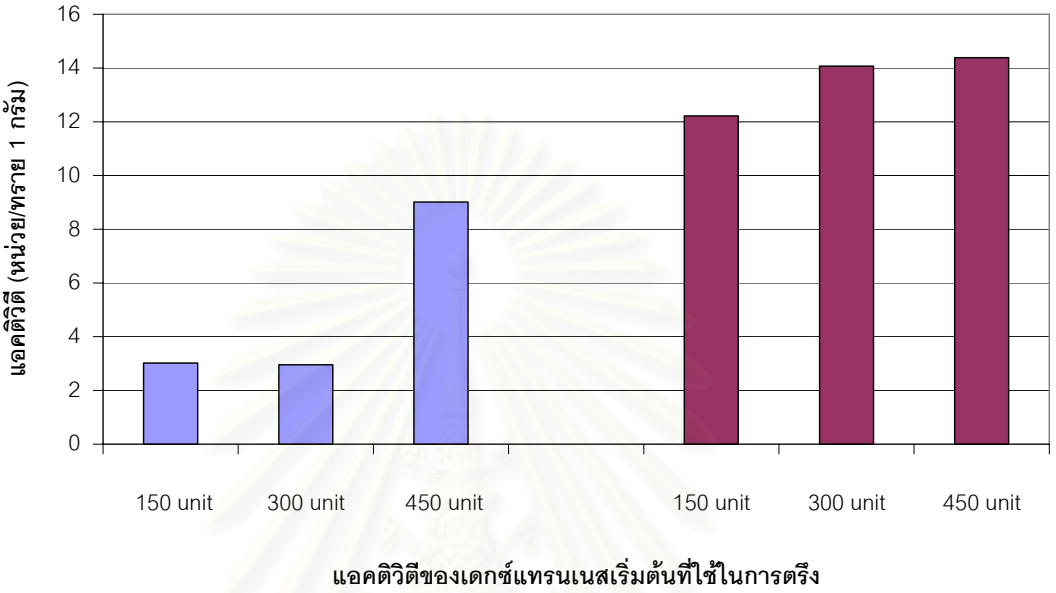
การทดลองต่อไปจะปรับปรุงวิธีการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส เพื่อให้ได้แอคติวิตีที่สูงขึ้น เนื่องจากทรายที่ใช้ในการตรึงรูปมีรูพรุนมาก และซับสเตรตที่ใช้ คือ เดกซ์แทรนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2,000,000 ดาลตัน) ซับสเตรตอาจมีการเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ยาก จึงทดลองใช้โปรตีน โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน ในการเข้ายึดเกาะภายในรูพรุนของทรายก่อน แล้วจึงสร้างพันธะกับกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อให้เดกซ์แทรนเนสนั้นยึดเกาะอยู่บริเวณผิวภายนอกของเม็ดทราย ซึ่งอาจส่งผลให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับซับสเตรตได้ดียิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการทดลองตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน (BSA) เป็นสารช่วยในการตรึง

เตรียมทรายตามขั้นตอนการตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็นตัวยึดเกาะกับรูพรุนของเม็ดทราย จากนั้นจึงใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวสร้างพันธะยึดเกาะระหว่าง โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน กับ เดกซ์แทรนเนสอิสระ โดยแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเนสในน้ำเลี้ยงที่ใช้ตรึงเป็น 150, 300 และ 450 หน่วย วิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป เปรียบเทียบระหว่างแอคติวิตีของการตรึงรูปแบบใช้ โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน และ ไม่ใช้ โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน เป็นสารช่วยตรึง จากรูปที่ 4.2 พบว่าการใช้ โปรตีน โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน เป็นสารช่วยตรึงรูปนั้นไม่ส่งผลให้การตรึงรูปดีขึ้น อีกทั้งทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีแอคติวิตีลดลงมาก คืออยู่ในช่วง 3-9 หน่วยต่อทราย 1 กรัม เท่านั้น เมื่อเทียบกับการตรึงรูปโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยตรึงเพียงอย่างเดียวที่ได้แอคติวิตีอยู่ในช่วง 12-14 หน่วยต่อทราย 1 กรัม โดยเดกซ์แทรนเนสอิสระที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาตรึงรูปคือ 300 หน่วยต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร ดังนั้นในขั้นตอนต่อไป จึงใช้การตรึงโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ดังเดิม โดยใช้เดกซ์แทรนเนสอิสระเริ่มต้นในการตรึงรูป 300 หน่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เกิดจากการตรึงเดกซ์แทรนเนสอิสระที่มีแอคติวิตีต่างๆ โดยเปรียบเทียบวิธีการตรึงรูป ระหว่างการใช้ โปรตีน โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน และไม่ใช้โปรตีน โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน เป็นสารช่วยตรึง

4.5 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทนเนสตรึงรูปบนทรายเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

4.5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

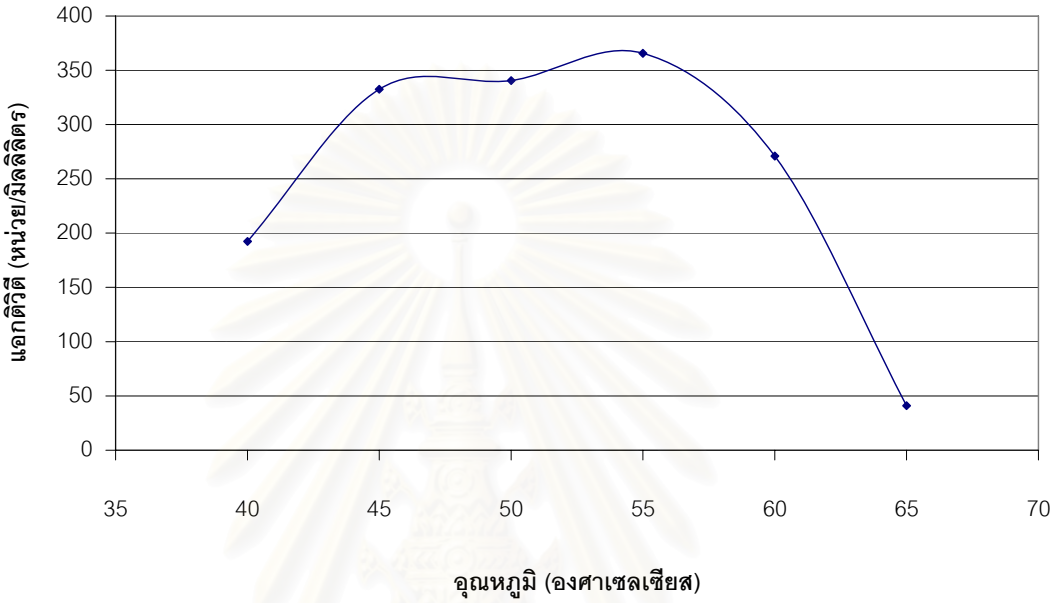
วิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสอิสระ และ เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีวัดค่าแอคติวิตี โดยมีการแปรผันอุณหภูมิต่างๆ คือ 40 45 50 55 60 65 70 75 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 โดยแสดงผลเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานที่แต่ละช่วงอุณหภูมิ ซึ่งพบว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเท่ากัน โดยให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระสูงสุด คือ 370 หน่วย และ แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงสุด คือ 82 หน่วย

4.5.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

วิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีวัดค่าแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยเตรียมซับสเตรต คือ สารละลายเดกซ์แทรน T-2000 0.25% ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ ตั้งแต่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายมีดังนี้

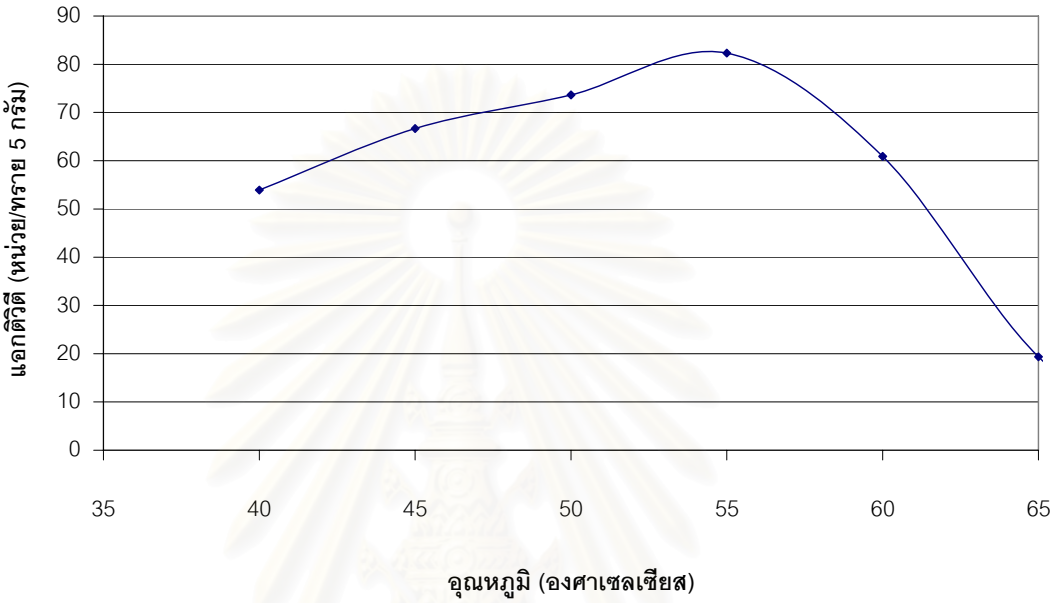
โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4.0-5.5
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0-7.0

ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 โดยแสดงผลเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานที่แต่ละช่วงความเป็นกรดด่าง ซึ่งพบว่า เดกซ์แทรนเนสอิสระมีภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 โดยให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระสูงสุด คือ 300 หน่วย และสำหรับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 โดยให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงสุด คือ 61 หน่วย



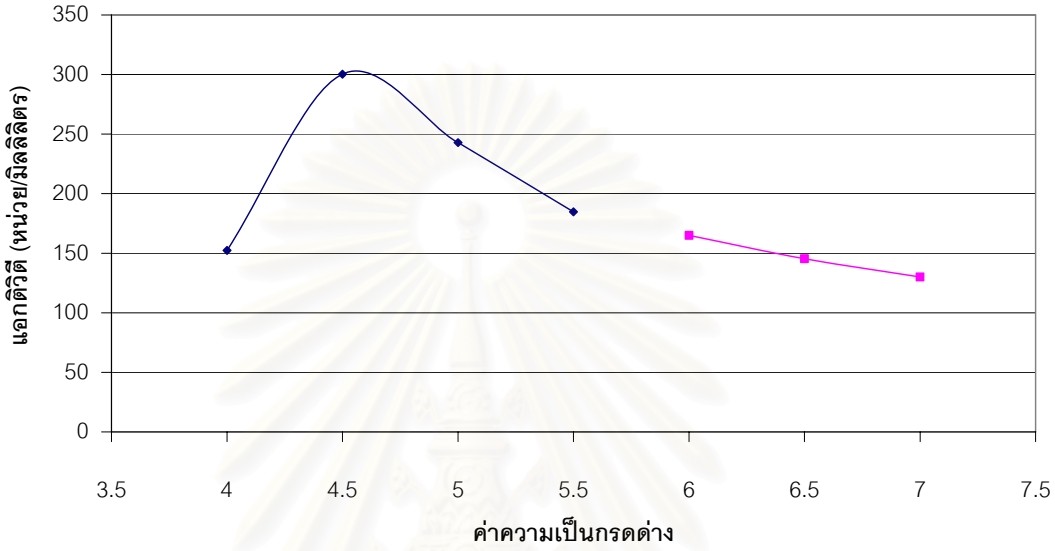
รูปที่ 4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อเดกซ์แทรน T- 2000 0.25% ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตริ้งรูปต่อเดกซ์แทรน T- 2000 0.25% ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

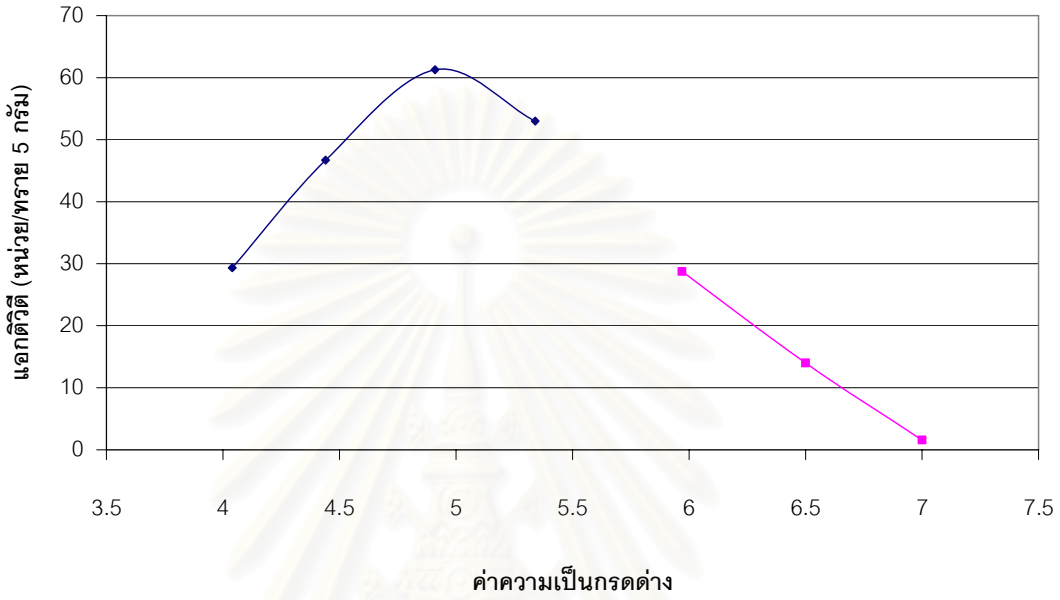


รูปที่ 4.5 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อเดกซ์แทรน T- 2000 0.25% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4.0-5.5

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0-7.0



รูปที่ 4.6 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปต่อเดกซ์แทรน T- 2000 0.25% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

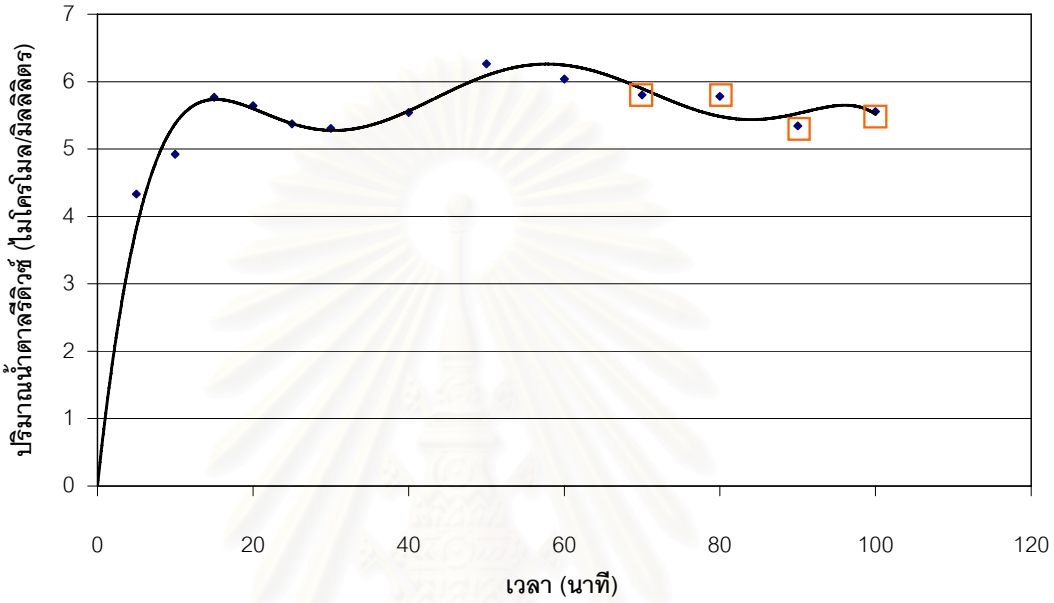
โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4.0-5.5

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0-7.0

4.6 ผลการทดลองใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในการย่อยสลายเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์

วิเคราะห์โดยใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 1.5 หน่วยเอนไซม์ (0.1 กรัม) ต่อ เดกซ์แทรน T- 2000 0.25% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 โดยมีการแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยา คือ 5 10 15 20 25 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 นาที จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 0.3 หน่วย/มิลลิลิตร ลงไปที่หลอด 70 80 90 และ100 นาที (เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่สามารถย่อยสลายได้จากเดกซ์แทรน 0.25%อย่างสมบูรณ์) จากรูปที่ 4.7 พบว่าการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 1.5 หน่วย ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 0.25% อย่างสมบูรณ์ เกิดขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่ช่วงเวลา 15 นาที เป็นต้นไป จนถึงเวลาที่ 60 นาที จากนั้นได้เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3 หน่วย/มิลลิลิตร เพื่อเป็นการยืนยันการย่อยสลายเดกซ์แทรนว่าเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จริง เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาการย่อยเดกซ์แทรนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอีก ซึ่งจากผลการทดลองนี้ใช้ยืนยันผลในการทดลองที่ 4.3 ได้ เนื่องจากการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 0.1 กรัม ในการวิเคราะห์แอคติวิตีเป็นเวลา 15 นาทีนั้น ซับสเตรตถูกย่อยเกือบหมดแล้ว ทำให้การทำงานของเอนไซม์นั้นไม่สมบูรณ์ วิธีที่เหมาะสม คือการลดปริมาณเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายที่ใช้นั่นเอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.5 หน่วย ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T- 2000 0.25% อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

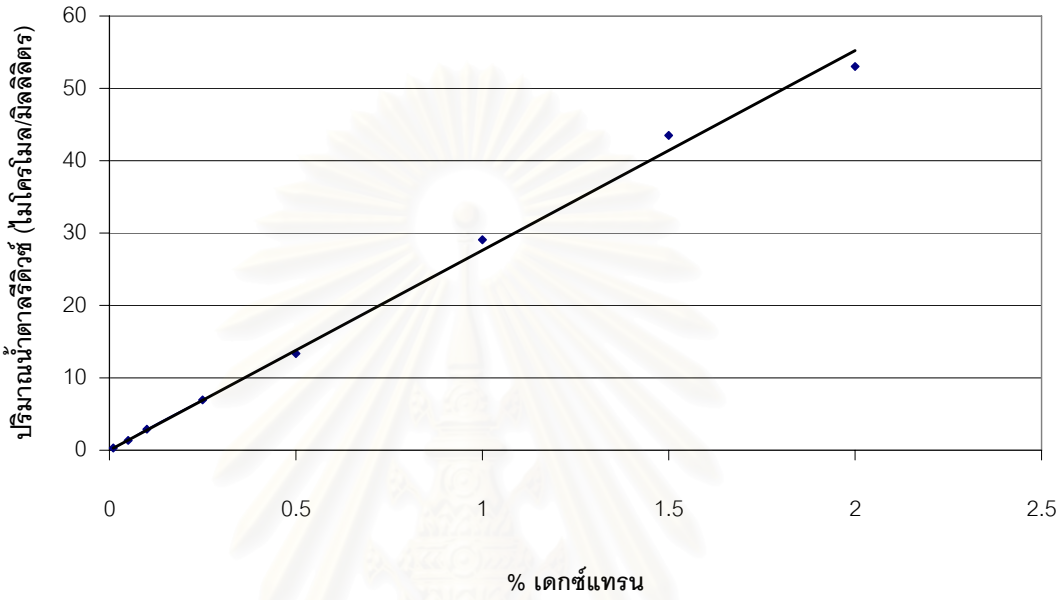
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลอดที่มีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 0.3 หน่วย

4.7 การใช้เดกซ์แทรนเนสในการย่อยเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างสมบูรณ์

วิเคราะห์โดยใช้เดกซ์แทรนเนสอิสระ 30 หน่วย ต่อเดกซ์แทรน T-2000 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 90 นาที จากรูปที่ 4.8 พบว่าการใช้เดกซ์แทรนเนสอิสระในการย่อย เดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้เวลาการทำปฏิกิริยา 90 นาทีนั้น ซับสเตรตเดกซ์แทรน T-2000 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2% เมื่อเกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์จะเปลี่ยนเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.31, 1.42, 2.9, 6.67, 13.9, 29.1, 43.9 และ 52.8 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเกิดจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำอ้อยที่อยู่ในกระบวนการผลิต

ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยนั้น จะเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ (เป็นช่วงหีบอ้อย) ที่โรงงานน้ำตาลที-เอ็น จังหวัดลพบุรี โดยผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่าง วัดอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ และค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้กระดาษวัดค่าความเป็นกรดด่างบริเวณจุดรวมน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดต่างๆ ซึ่งจากตารางที่ 4.3 พบว่าอุณหภูมิของน้ำอ้อยรวมนั้นอยู่ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.0-5.5 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอธานอลตามวิธีของ Keniry และคณะ (1969) พบว่ามีปริมาณเดกซ์แทรนร้อยละ 0.1 ของปริมาณน้ำอ้อย และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรน้ำอ้อย

ตารางที่ 4.3 แสดงการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำอ้อยที่อยู่ในกระบวนการผลิตโดยการวัดอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง การวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนและน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำอ้อย

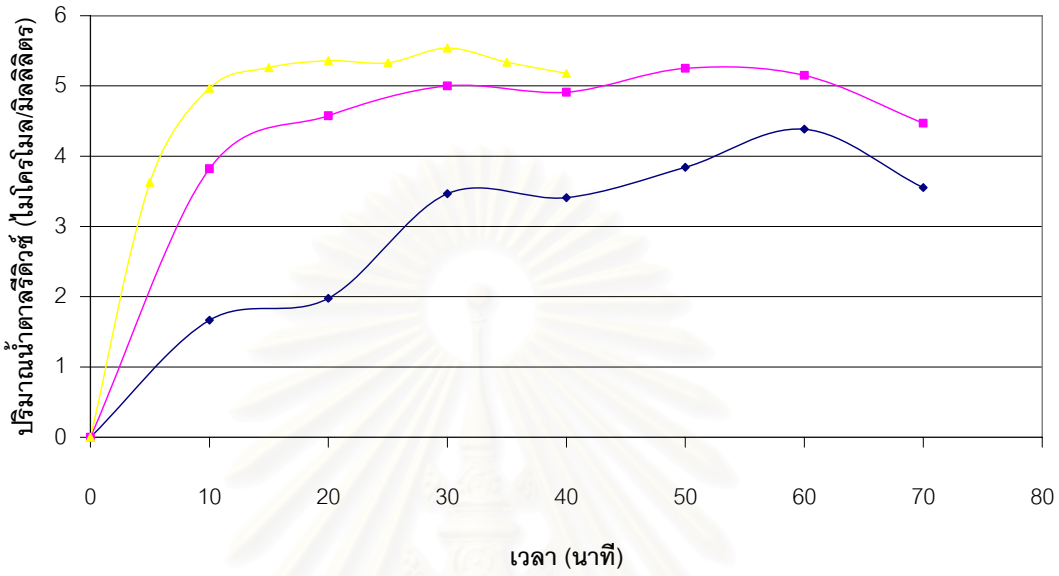
อุณหภูมิ	ค่าความเป็นกรดด่าง	%เดกซ์แทรน	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
45-55 องศาเซลเซียส	5.0-5.5	0.1	200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยนั้นน้อยมาก (เนื่องจากบริเวณที่สามารถเก็บตัวอย่างได้นั้นเป็นจุดที่ยังไม่เกิดการสะสมของเดกซ์แทรน ทั้งนี้เนื่องการผลิตน้ำตาลทรายนั้นเป็นระบบปิดจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างในบริเวณที่เป็นปัญหาได้ อีกทั้งปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยที่วิเคราะห์ได้จากวิธีการตกตะกอนด้วยเอธานอลตามวิธีของ Keniry และคณะ (1969) นั้นมีความแม่นยำ และความไวในการวิเคราะห์ต่ำ) จึงต้องมีการละลายเดกซ์แทรน T-2000 เพิ่มลงไปในน้ำอ้อย

4.9 ผลการทดลองเปรียบเทียบการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในการย่อยสลายเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์ในภาวะบัฟเฟอร์และภาวะน้ำอ้อย

วิเคราะห์โดยใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 0.15 0.75 1.5 หน่วย (0.01 0.05 0.1 กรัม) ต่อ เดกซ์แทรน 0.25%ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 และเดกซ์แทรน 0.25% ในน้ำอ้อย ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยมีการแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยา คือ 10 20 30 40 50 60 และ 70 นาที จากรูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่าการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในการย่อยสลายเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์ในสารละลายบัฟเฟอร์และน้ำอ้อยนั้น การย่อยในภาวะน้ำอ้อยจะปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนมากกว่าในภาวะบัฟเฟอร์ที่เวลาเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดในการเจือจางปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อการวัดค่าการดูดกลืนแสง เนื่องจากในน้ำอ้อยนั้นมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในปริมาณที่สูงมาก ต้องเจือจางก่อนการวัดค่าการดูดกลืนแสงมาก และจากกราฟพบว่าค่าที่วัดได้ไม่มีความแม่นยำ มีความแปรปรวนสูง จึงมีการออกแบบการทดลองสำหรับการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในภาวะน้ำอ้อยโดยการใช้วิธีไดแอไลซิสต่อไป เนื่องจากสามารถใช้เทคนิคในการแยกน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำอ้อยซึ่งมีมวลโมเลกุลเล็ก ออกจากสารละลายเดกซ์แทรนที่ละลายในน้ำอ้อยได้

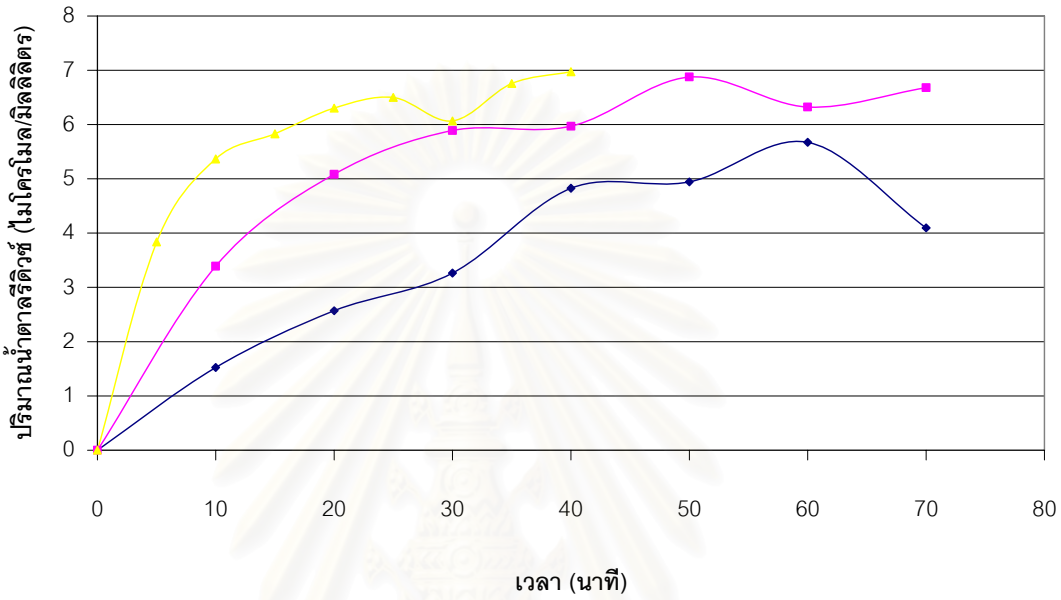
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T- 2000 0.25%ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

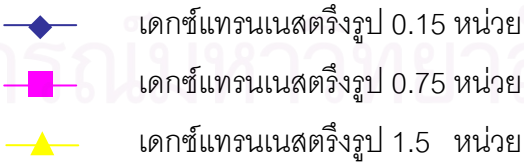
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 0.15 หน่วย
เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 0.75 หน่วย
เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.5 หน่วย



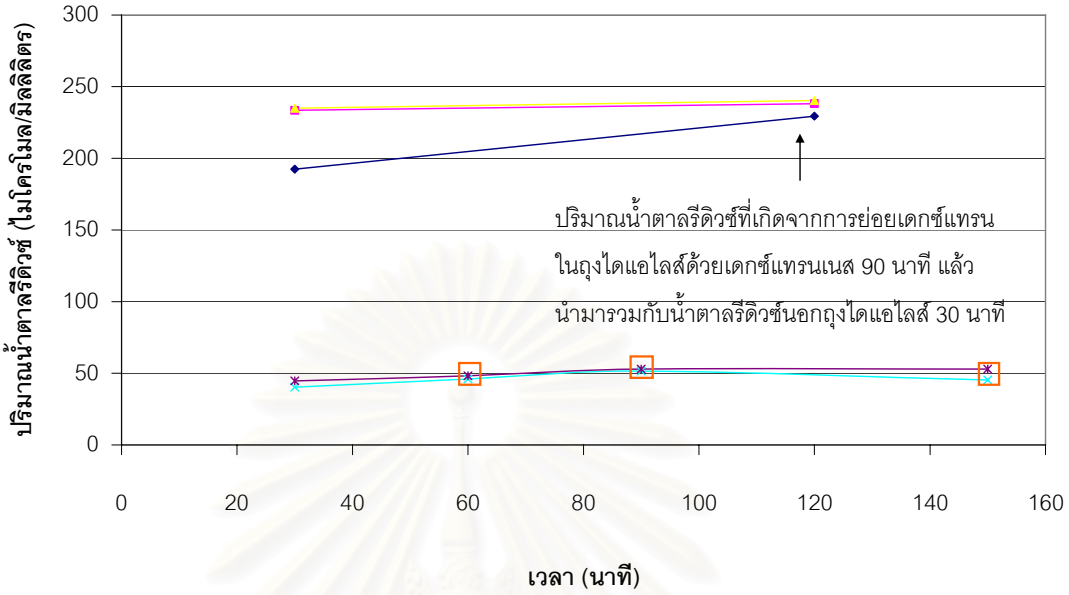
รูปที่ 4.10 การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T- 2000 0.25%ในน้ำอ้อย อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4.10 ความสามารถในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสในน้ำอ้อย

วิเคราะห์การทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 15 หน่วย (flask ที่ 2) และการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 15 หน่วย(flask ที่ 3) ต่อเดกซ์แทรน 2%ในน้ำอ้อย ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทียบกับการไม่ใช้เอนไซม์ (flask ที่ 1) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งพบว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์สูงมาก และมีผลกระทบต่อการหาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในการสลายเดกซ์แทรน ซึ่งใช้วิธีการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยเช่นกัน และหากเดกซ์แทรนมีน้อยปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจะไม่สามารถบอกได้เมื่อในระบบนี้มีน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงมากๆ ดังนั้นเพื่อให้สามารถหาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสได้จึงต้องไดแอไลซ์น้ำตาลรีดิวซ์ (หรือน้ำตาลขนาดเล็ก) ในน้ำอ้อยออกก่อน ให้เหลือเพียงเดกซ์แทรนเท่านั้น ซึ่งทำได้โดยนำสารละลายแบ่งใส่ถุงไดแอไลซ์ ทำวิธีไดแอไลซิส โดยนำถุงที่เป็นตัวอย่างเดียวกัน ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นอยู่นอกถุงปริมาตร 1 ลิตร โดยจะมีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในน้ำกลั่นของทุกๆ รอบ และเปลี่ยนน้ำกลั่นจนกระทั่งไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาจากถุงไดแอไลซ์ อีก ซึ่งจากรูปที่ 4.11 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่อยู่นอกถุงไดแอไลซ์ของสารละลายที่มีการใช้เดกซ์แทรนเนส และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เวลา 30 นาทีนั้นมีปริมาณ 240 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากน้ำอ้อย 195 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และจากการย่อยเดกซ์แทรน 45 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเท่ากับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำงานของเดกซ์แทรนเนสซึ่งย่อยเดกซ์แทรนในภาวะบัฟเฟอร์ที่เวลา 30 นาที (45 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาก flask ที่ไม่ได้เติมเอนไซม์นั้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากน้ำอ้อยเท่านั้นคือ 195 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร จากนั้นมีการนำสารละลายที่อยู่ในถุงไดแอไลซ์ ของแต่ละตัวอย่างมาปรับปริมาตรให้เท่ากัน จากนั้นปิเปตมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนเนสอิสระ 300 หน่วย เป็นเวลา 90 นาที (เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยเดกซ์แทรนที่เหลืออยู่ในสารละลายอย่างสมบูรณ์) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากรูปที่ 4.11 ที่เวลา 120 นาที flask ที่ 2 และ flask ที่ 3 ไม่เกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอีก แสดงว่าไม่เหลือเดกซ์แทรนในสารละลาย ซึ่งยืนยันได้ว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในภาวะน้ำอ้อย ส่วน flask ที่ 1 นั้น พบว่า เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ขึ้นปริมาณ 40 ไมโครโมล ซึ่งแสดงว่ายังมีเดกซ์แทรนอยู่ในสารละลายในปริมาณเท่าเดิม



รูปที่ 4.11 การใช้เดกซ์แทรนเนส และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายในการย่อยสลายเดกซ์แทรน 2%ในภาวะน้ำอ้อย โดยอาศัยเทคนิคการไดแอไลซิส

Flask ที่ 1 เดกซ์แทรน 2%ในน้ำอ้อย

Flask ที่ 2 เดกซ์แทรนเนสอิสระ 15 หน่วยต่อ เดกซ์แทรน 2%ในน้ำอ้อย

Flask ที่ 3 เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 15 หน่วยต่อ เดกซ์แทรน 2%ในน้ำอ้อย

Flask ที่ 4 เดกซ์แทรนเนสอิสระ 15 หน่วยต่อ เดกซ์แทรน 2%ใน โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

Flask ที่ 5 เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 15 หน่วยต่อ เดกซ์แทรน 2%ใน โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

หลอดที่มีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 15 หน่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 4.4 และกราฟแท่งรูปที่ 4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจาก flask ที่มีการเติม และไม่เติมเอนไซม์ โดยวิเคราะห์จากน้ำนอกถุงหลังจากผ่านการไดแอไลซิส อย่างสมบูรณ์ (แท่งสีม่วง) จากนั้นนำสารละลายในถุง ไดแอไลซ์ (มีเดกซ์แทรนอยู่ แต่น้ำตาลรีดิวซ์แพร่ผ่านออกมานอกถุงหมดแล้ว) มาย่อยอีกครั้งด้วยเดกซ์แทรนเนสอิสระ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นดังกราฟแท่งสีแดง ซึ่งพบว่า flask ที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ในรอบแรกนั้น มีปริมาณเดกซ์แทรนเหลือในสารละลายมากที่สุด ส่วน flask ที่มีการเติมเอนไซม์ในรอบแรกแล้วนั้น มีปริมาณเดกซ์แทรนเหลือในสารละลายน้อยมาก และได้แสดงผลรวมของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นดังกราฟแท่งสีเหลือง จากการทดลองนี้ยืนยันได้ว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปนั้นสามารถทำงานได้ดีในภาวะน้ำอ้อย (ที่เก็บตัวอย่างจากโรงงานน้ำตาล) เทียบเท่ากับภาวะบัฟเฟอร์

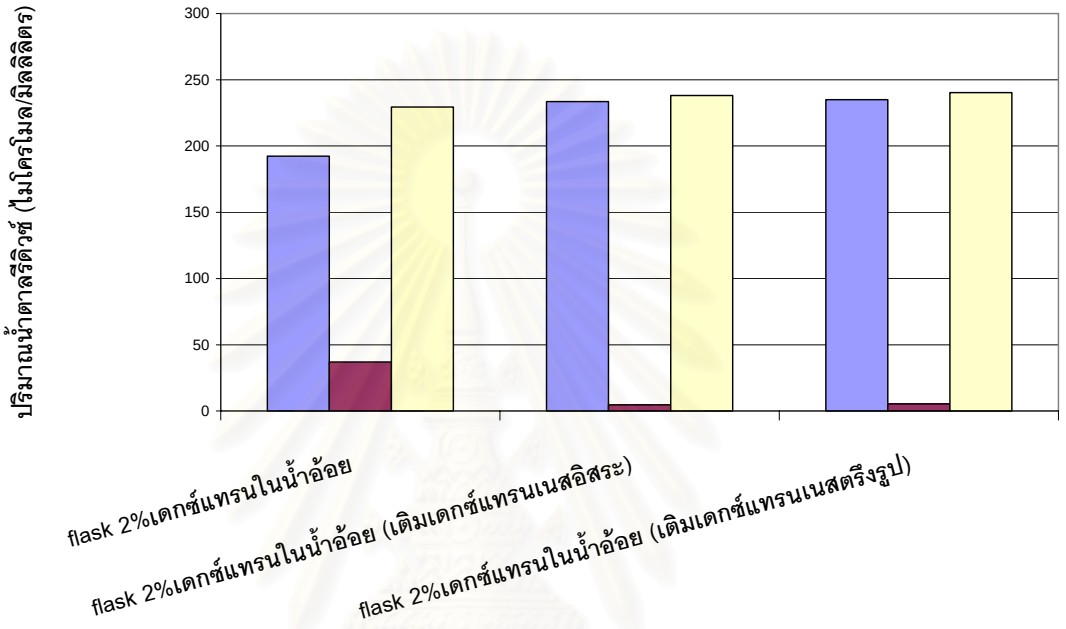
เนื่องจากการทดลองต่อๆ ไป ไม่สามารถใช้วิธีไดแอไลซิส ในการทดลองได้เนื่องจากมีความยุ่งยากในการทดลองมาก และมีการแปรผันค่าต่างๆ ในการทดลองมาก และสาเหตุจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำอ้อยมีปริมาณสูงมาก เมื่อย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยแล้วพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำอ้อยที่มีอยู่เดิมในปริมาณสูงมากบดบังปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนจากการทำปฏิกิริยาซึ่งส่งผลให้การทดลองมีความผิดพลาดสูงจากการทำ dilution เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จึงมีการใช้สารละลายน้ำตาลทราย 13% ละลายในน้ำกลั่น (เทียบเท่าปริมาณ 13%ซูโครส ที่มีอยู่ในน้ำอ้อย อ้างอิงโดย สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร) แทนการใช้น้ำอ้อย แต่เมื่อใช้ สารละลายน้ำตาลทราย 13% พบว่าเมื่อเกิดปฏิกิริยาและสัมผัสกับความร้อน น้ำตาลทรายสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาในปริมาณหนึ่ง จึงมีการออกแบบการทดลองเพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำตาลทรายต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากจากวิธีไดแอไลซิส

Flask ที่	น้ำตาลรีดิวซ์ที่ออกมานอกถุงไดแอไลซ์ (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนภายในถุงไดแอไลซ์ (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์รวมทั้งหมด (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)
1	192.44	36.98	229.42
2	233.45	4.67	238.13
3	234.99	5.32	240.31

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



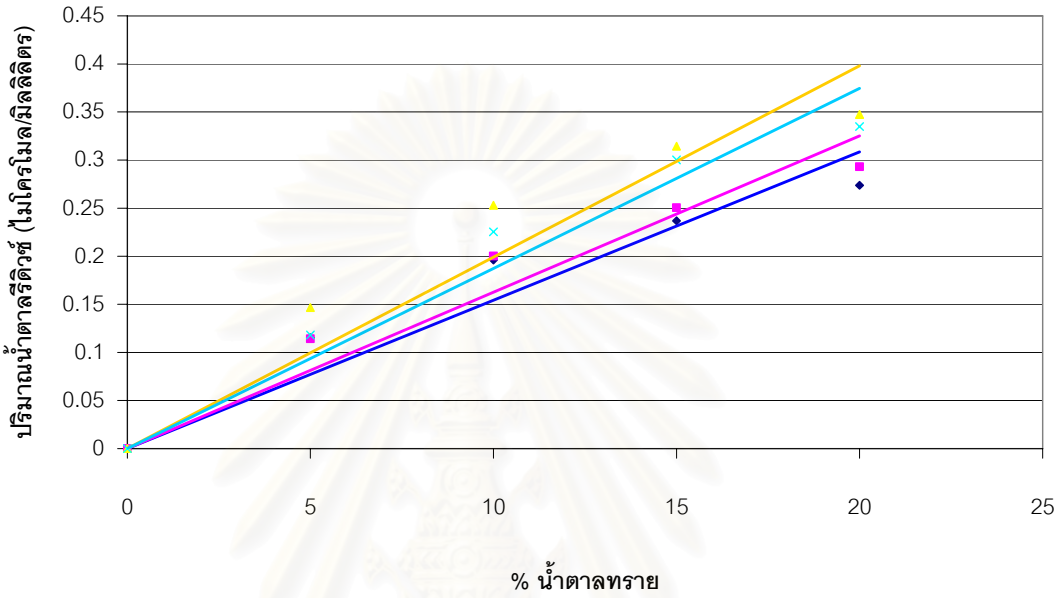
รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากวิธีไดแอไลซิส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.11 ผลการวิเคราะห์สาเหตุของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากขั้นตอนการวิเคราะห์ต่าง ๆ

การวิเคราะห์สารละลายน้ำตาลทราย 5% 10% 13% 15% 20% ที่เตรียมโดยใช้ Magnetic stirrer 15 นาที และ sonicator 15 นาที ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 4 ส่วนคือ ชุดที่ 1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson ทันที ชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที ชุดที่ 3 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ส่วนชุดที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที และต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้น ชุดที่ 2, 3 และ 4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson จากรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่า การเตรียมน้ำตาลทรายโดยวิธีการใช้ sonicator จะเกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการเตรียมโดยวิธีการใช้ magnetic stirrer และยังพบอีกว่าน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเมื่อผ่านขั้นตอนการต้มด้วยน้ำเดือด (ขั้นตอนของการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการใช้ sonicator นั้นจะเกิดความร้อนขึ้นขณะทำงานซึ่งส่งผลให้น้ำตาลทรายเปลี่ยนรูปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้ magnetic stirrer ดังนั้นการทดลองในขั้นต่อ ๆ ไป จึงเตรียมด้วยวิธีการใช้ magnetic stirrer และการทดลองต่อไป เพื่อศึกษาการหยุดปฏิกิริยาด้วยวิธีอื่นที่สามารถหยุดปฏิกิริยาแทนวิธีการต้มด้วยน้ำเดือดได้ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากน้ำตาลทรายโดยที่ไม่ผ่านขั้นตอนการโดนความร้อนเลยนั้น เกิดได้เนื่องจากขั้นตอนพื้นฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นั้นต้องมีการกระตุ้นการทำงานของอัลคาไลน์คอปเปอร์ด้วยน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาทีนั่นเอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



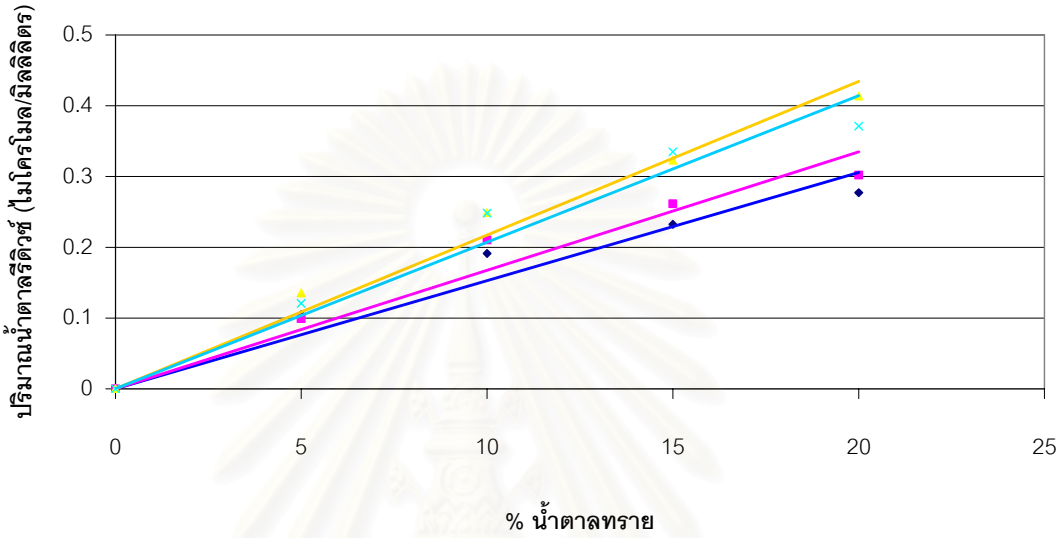
รูปที่ 4.13 การเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมโดยการใช้ magnetic stirrer

ชุดที่ 1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson ทันที

ชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที

ชุดที่ 3 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

ชุดที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที และต้มในน้ำเดือด 5 นาที



รูปที่ 4.14 การเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมโดยการใช้ sonicator

ชุดที่ 1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson ทันที

ชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที

ชุดที่ 3 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

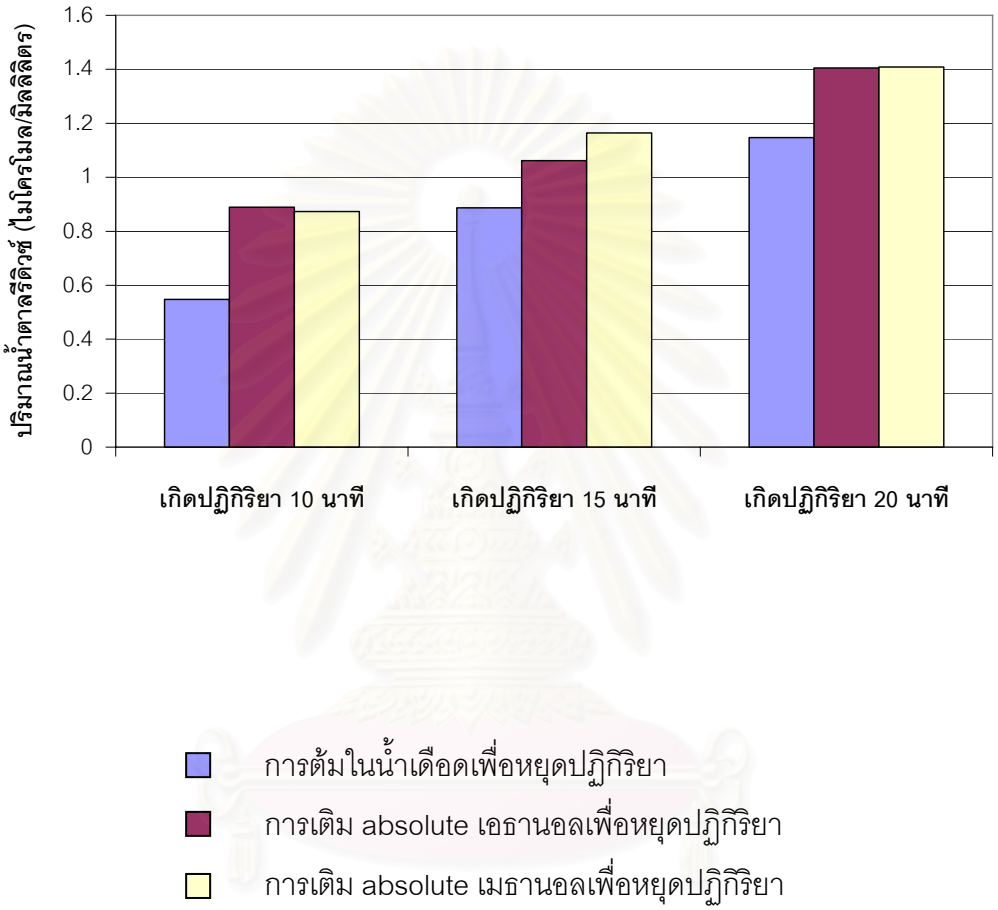
ชุดที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 15 นาที และต้มในน้ำเดือด 5 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

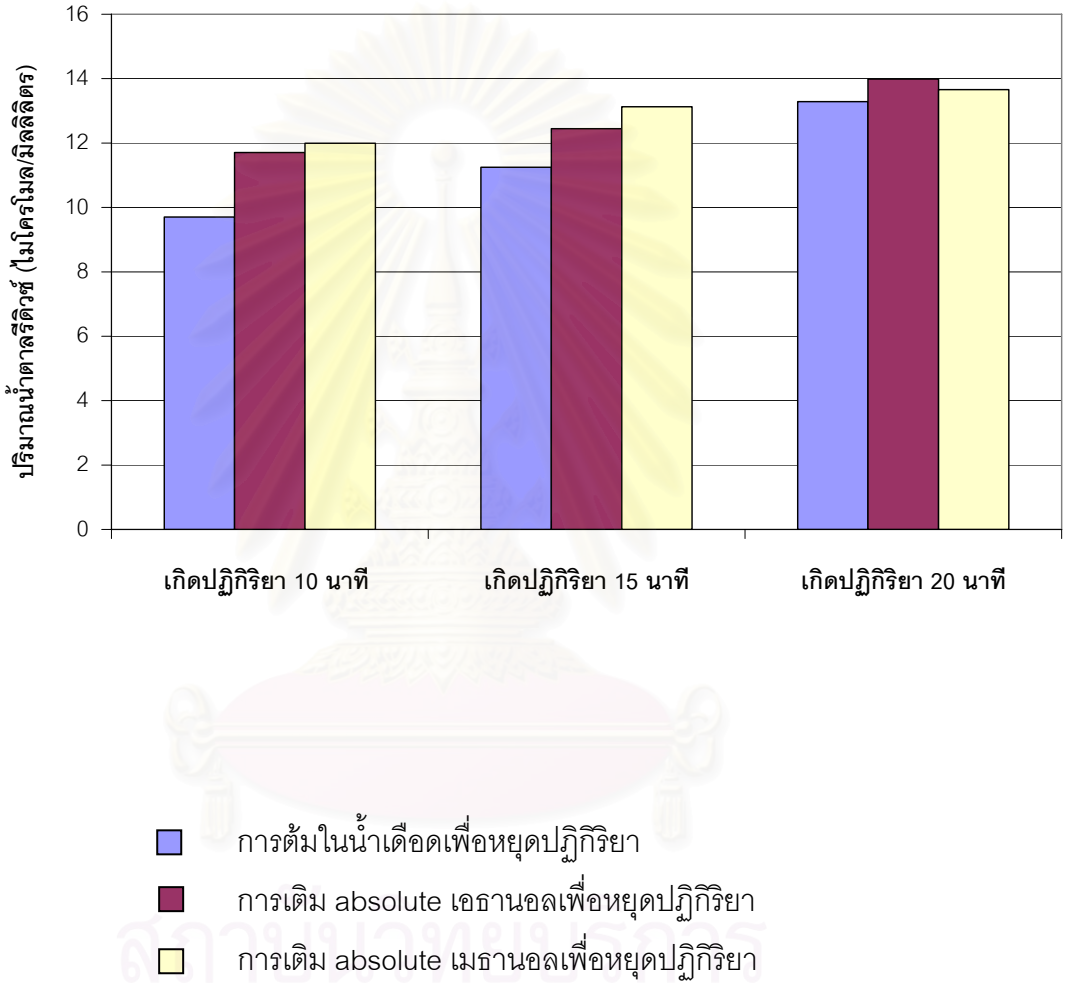
4.12 ผลการทดสอบการหยุดปฏิกิริยาโดยใช้เอธานอล และเมธานอล แทนการต้มหยุดปฏิกิริยา

จากการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยซับสเตรตที่ใช้คือ สารละลายเดกซ์แทรน T-2000 ความเข้มข้นร้อยละ 0.625 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% ซึ่งบ่มเป็น 3 แบบ แบบละ 3 ชุดการทดลอง คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 15 นาที และ 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยชุดที่ 1 การต้มในน้ำเดือด 5 นาที ชุดที่ 2 การเติม absolute เอธานอล 0.1 มิลลิลิตร 5 นาที และชุดที่ 3 การเติม absolute เมธานอล 0.1 มิลลิลิตร 5 นาที จากรูปที่ 4.15 และ 4.16 พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาเอนไซม์ 10 นาที และ 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย absolute เอธานอล และ absolute เมธานอล วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แล้ว ให้ปริมาณเท่ากับ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดที่ 15 นาที และ 20 นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ absolute เอธานอล และ absolute เมธานอล นั้น ไม่สามารถหยุดปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสทั้งแบบอิสระ และแบบตรึงรูปได้ เมื่อเทียบกับวิธีการหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด ในการทดลองต่อไปจึงใช้การหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดดังเดิม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



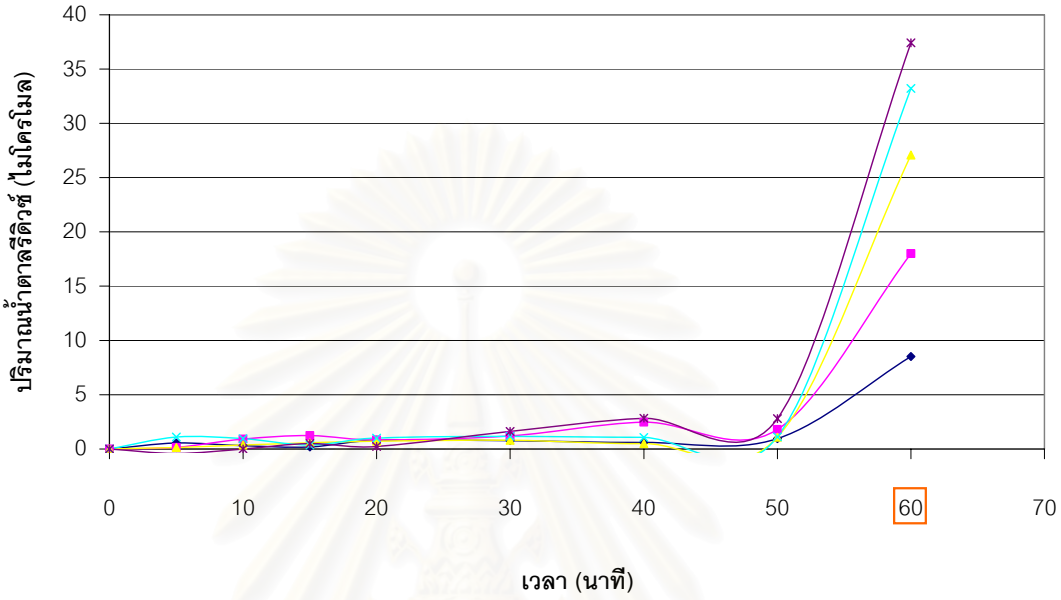
รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03 หน่วย ต่อเดกซ์แทรน 0.625% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% จากการทดสอบการหยุดปฏิกิริยา เปรียบเทียบระหว่างการต้มหยุดปฏิกิริยาด้วยการใช้เอธานอล และการใช้เมธานอล



รูปที่ 4.16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเดกซ์แทรนเนสตริงรูป 1.5 หน่วย ต่อเดกซ์แทรน 0.625%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% จากการทดสอบการหยุดปฏิกิริยา เปรียบเทียบระหว่างการต้มหยุดปฏิกิริยาด้วยการใช้ absolute เอธานอล และการใช้ absolute เมธานอล

4.13 ผลการหาค่า residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เตรียมเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% เติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03 หน่วย/มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วบ่มปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 20 30 40 50 และ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3 หน่วย/มิลลิลิตรทดลองเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น ส่วนการบ่มเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 และ 30 หน่วย/มิลลิลิตร ทดลองดังวิธีการข้างต้นเช่นกัน แต่มีการเพิ่มการทดลองสำหรับหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของเดกซ์แทรน 0.5, 1.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% โดยบ่มที่เวลา 70 นาที เพิ่มขึ้น และสำหรับความเข้มข้นของเดกซ์แทรน1.5, 2.0 และ 2.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% จะบ่มที่เวลา 80, 100 และ 120 นาทีเพิ่มขึ้น (เพื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น) และมีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย/มิลลิลิตร ที่ทุกๆเวลาสุดท้ายของแต่ละการทดลอง เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีอยู่จริงในสารตั้งต้น จากรูปที่ 4.17 4.18 4.19 และ 4.20 แสดง residential time สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ พบว่าการใช้เดกซ์แทรนเนส 0.03 และ 0.3 หน่วย นั้น ไม่สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์ได้ เนื่องจากการย่อย 0.5, 1.0, 1.5และ เดกซ์แทรน 2.0%อย่างสมบูรณ์นั้นจะต้องให้น้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 13.9, 29.1, 43.9 และ 52.8 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (จากการทดลองที่ 4.7) ส่วนการใช้เดกซ์แทรนเนส 3 หน่วย นั้นให้การย่อยเดกซ์แทรนที่ค่อนข้างสมบูรณ์เนื่องจากได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ 4.7 แต่เมื่อเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย/มิลลิลิตร ลงไปเพื่อยืนยันการย่อยเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์ พบว่าเกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอีก ซึ่งเมื่อเติมลงไปซ้ำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ซึ่งเป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้น) และจากการใช้เดกซ์แทรนเนส 30 หน่วย พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเกิดจากการย่อยเดกซ์แทรนนั้นสูงมากผิดปกติ จึงมีการทดสอบและยืนยันได้ว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดเพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์อินเวอร์เทสในน้ำเลี้ยงซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาย่อยน้ำตาลทรายได้ ซึ่งโดยปกติในเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแทบทุกชนิดจะมีการปนเปื้อนของเอนไซม์อินเวอร์เทสอยู่ (Inkerman, 1980) จึงต้องมีการทำบริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.17 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.03 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

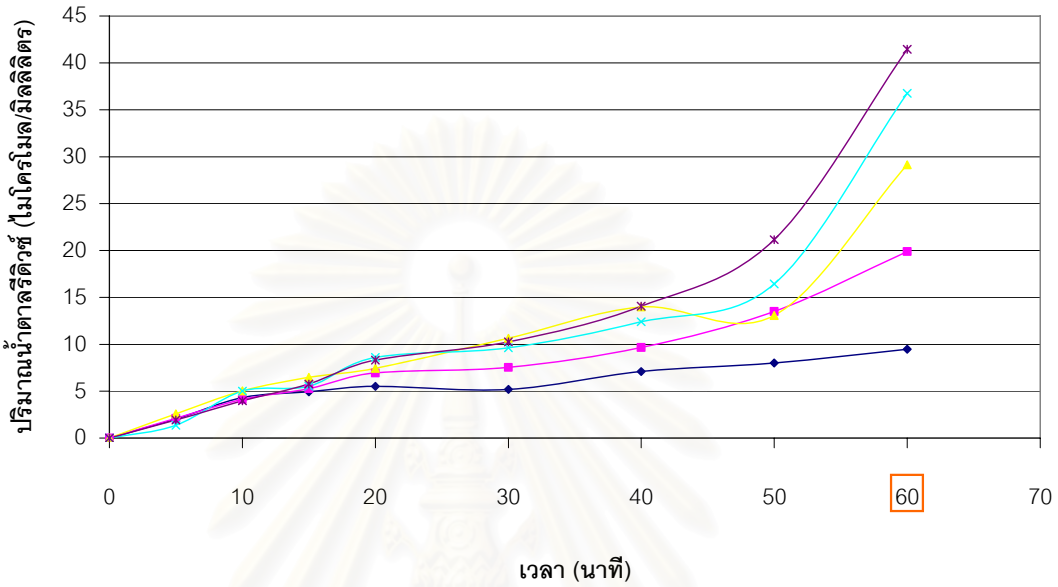
เดกซ์แทรน 1.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 1.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 2.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

หลอดที่มีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 3 หน่วย



รูปที่ 4.18 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.3 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

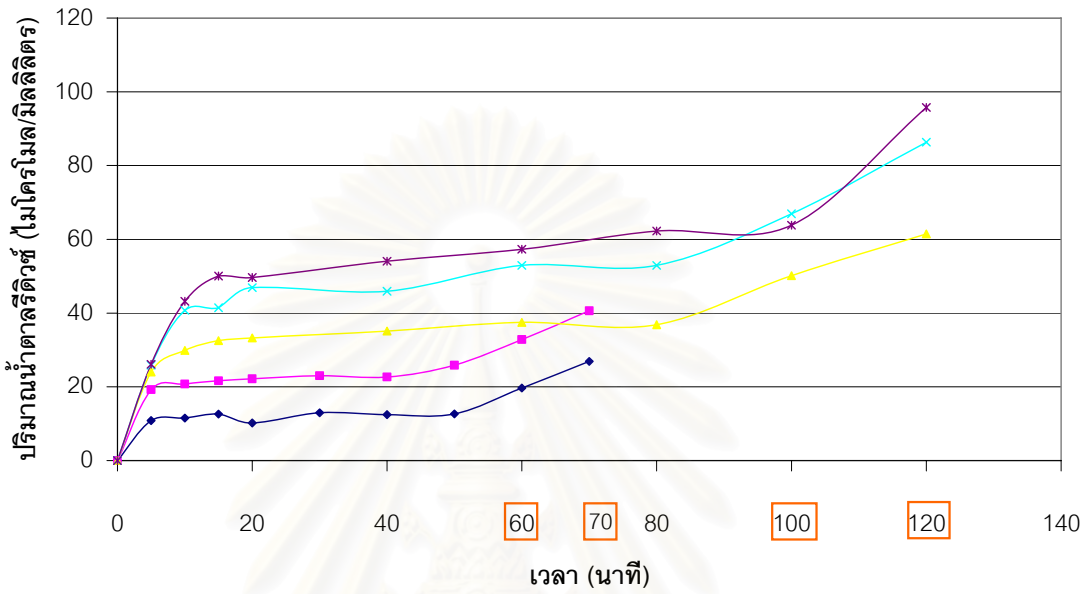
เดกซ์แทรน 1.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 1.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

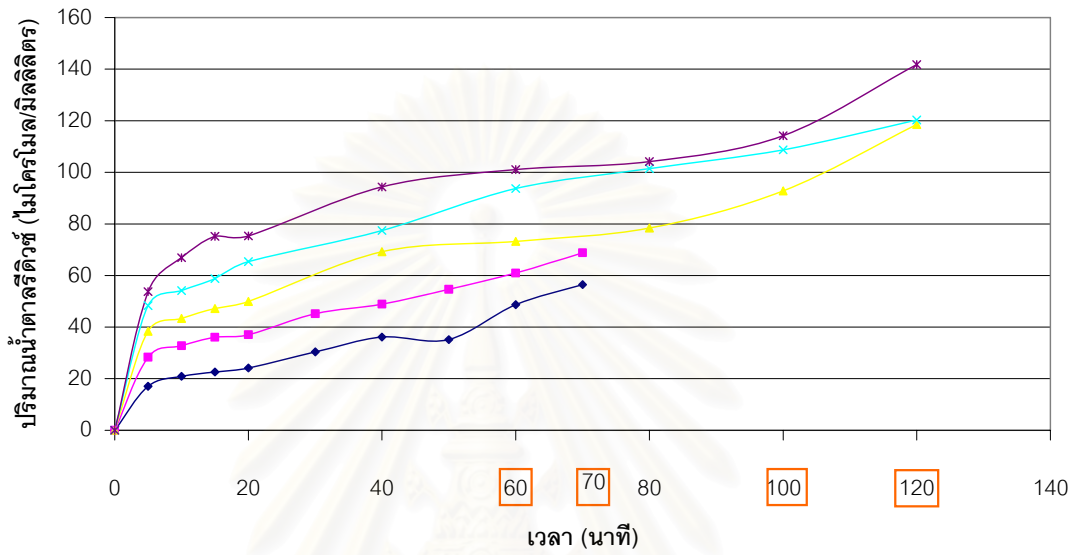
เดกซ์แทรน 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 2.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

หลอดที่มีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 3 หน่วย



รูปที่ 4.19 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย 13%



รูปที่ 4.20 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 30 หน่วย ต่อ มิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 1.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 1.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 2.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

หลอดที่มีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 3 หน่วย

4.14 การทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์

4.14.1 การตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 (crude enzyme) ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-30% 30-50% 50-70% และ 70-90% ผลการตรวจสอบโปรตีน แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และแอคติวิตีของอินเวอร์เทส ดังตารางที่ 4.5 และ 4.6 ซึ่งพบว่าตะกอนที่ได้ในช่วงแอมโมเนียมซัลเฟต 50-70% นั้นให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทสมากที่สุด คือ 49487 และ 37037 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ขั้นตอนการทำ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	ความบริสุทธิ์
น้ำเลี้ยง	500	486.84	127660	262.22	100	1
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-30%	2.56	16.74	1072	64	0.84	0.24
แอมโมเนียมซัลเฟต 30-50%	1.78	7.89	1575	199.62	1.23	0.76
แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70%	2.83	122.85	140048	1140	109.70	4.35
แอมโมเนียมซัลเฟต 70-90%	1.4	4.14	2941	710	2.30	2.71

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์อินเวอร์เทสแอคติวิตีที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

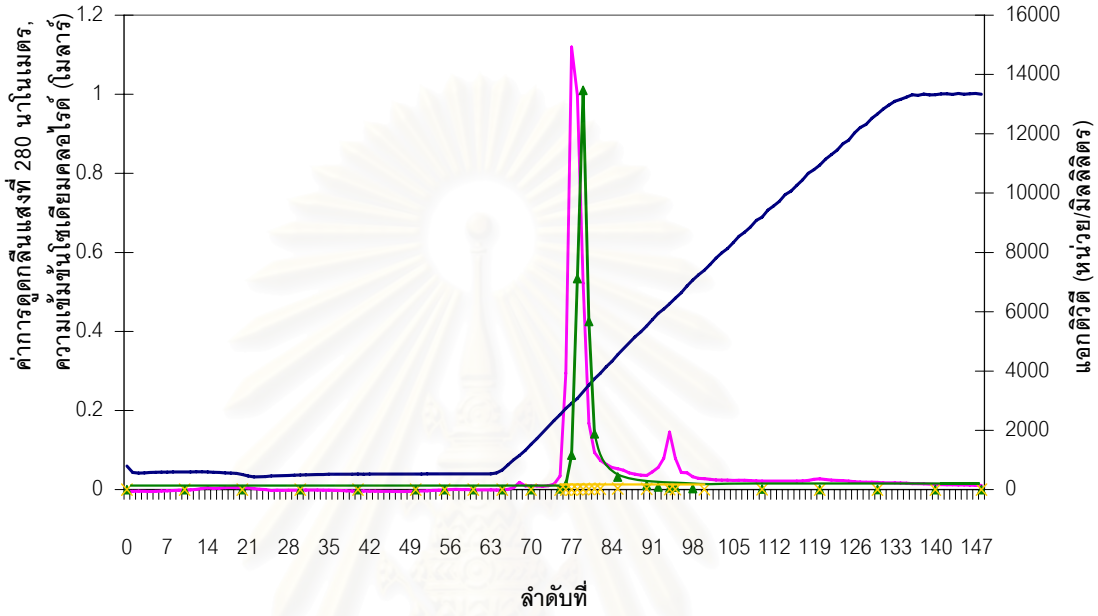
ขั้นตอนการทำ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	ความบริสุทธิ์
น้ำเลี้ยง	500	486.84	197006	404.66	100	1
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-30%	2.56	16.74	0	0	0	0
แอมโมเนียมซัลเฟต 30-50%	1.78	7.89	4349	551.20	2.21	1.36
แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70%	2.83	122.85	104814	853.19	53.20	2.11
แอมโมเนียมซัลเฟต 70-90%	1.4	4.14	55162	13324.15	28.00	32.93

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.14.2 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A

นำตะกอนโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วงที่มีแอคติวิตีสูงคือ ช่วง แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70% โดย load ลงคอลัมน์ 2 มิลลิลิตร อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นชะโปรตีนที่ติดอยู่กับเจลด้วยเกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 รูปที่ 4.21 แสดงกราฟโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทส และจากตารางที่ 4.7 และ 4.8 การทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A นั้นให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทส เท่ากับ 32810 และ 8.9 หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.21 ปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (———)
เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ (———)
แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส (———)
แอคติวิตีของอินเวอร์เทส (———)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่ได้จากการน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์

ขั้นตอนการทำ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	ความบริสุทธิ์
น้ำเลี้ยง	500	486.84	127660	262.22	100	1
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-30%	2.56	16.74	1072	64	0.84	0.24
แอมโมเนียมซัลเฟต 30-50%	1.78	7.89	1575	199.62	1.23	0.76
แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70%	2.83	122.85	140048	1140	109.70	4.35
แอมโมเนียมซัลเฟต 70-90%	1.4	4.14	2941	710	2.30	2.71
DEAE-anion exchange *load sample 2 มิลลิลิตร*	1.65	51.03	54137	1061	42.41	4.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์อินเวอร์เทสแอคติวิตีที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์

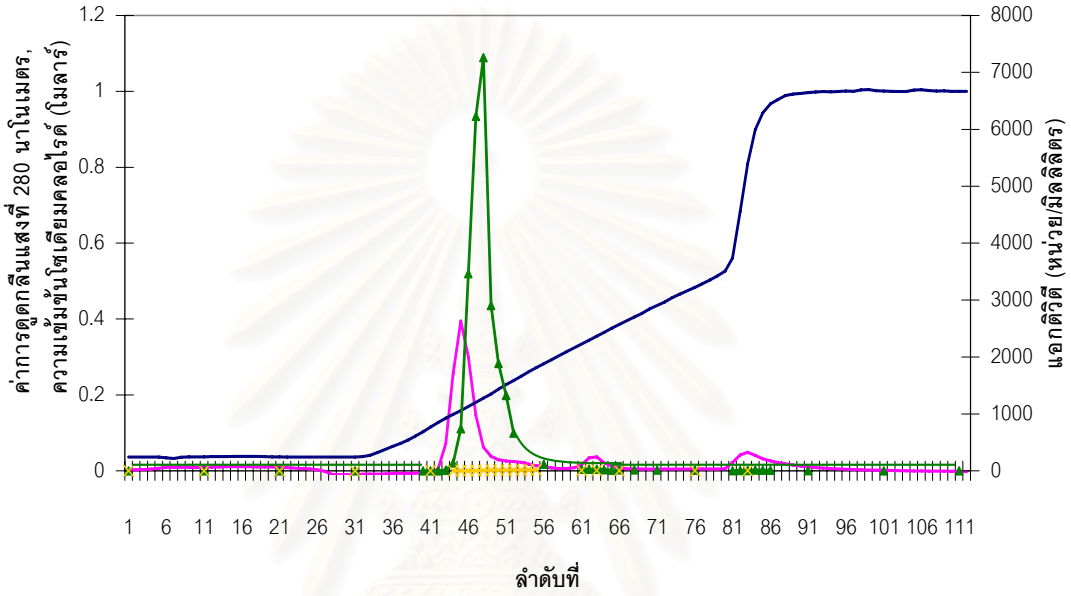
ขั้นตอนการทำ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	ความบริสุทธิ์
น้ำเลี้ยง	500	486.84	197006	404.66	100	1
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-30%	2.56	16.74	0	0	0	0
แอมโมเนียมซัลเฟต 30-50%	1.78	7.89	4349	551.20	2.21	1.36
แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70%	2.83	122.85	104814	853.19	53.20	2.11
แอมโมเนียมซัลเฟต 70-90%	1.4	4.14	55162	13324.15	28.00	32.93
DEAE-anion exchange *load sample 2 มิลลิลิตร*	1.65	51.03	14.74	0.29	0.007	0.0007

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.14.3 การทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A โดยใช้เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์

เนื่องจากผลของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในข้อ 4.14.1 โดยใช้ เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 นั้นไม่สามารถแยกเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทสออกจากกันได้ จึงแยกเอนไซม์ทั้งสองโดยการเปลี่ยนเป็นเกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ใช้คอลัมน์เล็ก โดยจะ load โปรตีน 0.46 มิลลิลิตร อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นชะโปรตีนที่ติดอยู่กับเจลด้วยเกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 รูปที่ 4.22 แสดงกราฟโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทส และจากตารางที่ 4.9 และ 4.10 การทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A นั้นให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทสเท่ากับ 6656 และ 2.9 หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่ายังมีแอคติวิตีของอินเวอร์เทสอยู่ แต่มีในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส เนื่องจากในการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยเดกซ์แทรนนั้นต้องมีการเจือจางสูง แอคติวิตีของอินเวอร์เทสจึงไม่ส่งผลกระทบใดๆ ต่อปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.22 ปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (———)
เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ (———)
แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส (———)
แอคติวิตีของอินเวอร์เทส (———)

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่ได้จากการน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์

ขั้นตอนการทำ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	ความบริสุทธิ์
น้ำเลี้ยง	500	486.84	127660	262.22	100	1
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-30%	2.56	16.74	1072	64	0.84	0.24
แอมโมเนียมซัลเฟต 30-50%	1.78	7.89	1575	199.62	1.23	0.76
แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70%	2.83	122.85	140048	1140	109.70	4.35
แอมโมเนียมซัลเฟต 70-90%	1.4	4.14	2941	710	2.30	2.71
DEAE-anion exchange *load sample 0.46 มิลลิลิตร*	1.885	21.11	12546	594	9.82	2.27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์อินเวอร์เทสแอคติวิตีที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A เกรเดียนต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์

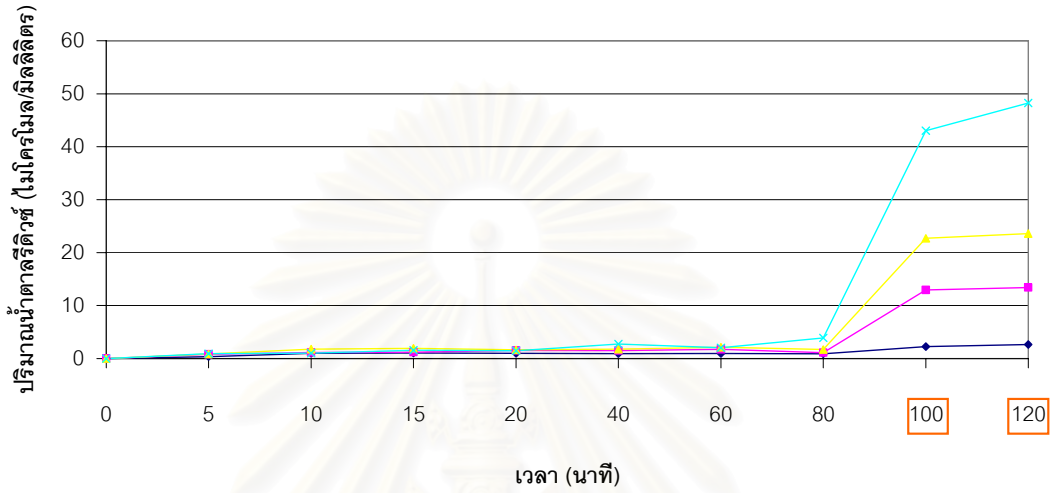
ขั้นตอนการทำ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	ความบริสุทธิ์
น้ำเลี้ยง	500	486.84	197006	404.66	100	1
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-30%	2.56	16.74	0	0	0	0
แอมโมเนียมซัลเฟต 30-50%	1.78	7.89	4349	551.20	2.21	1.36
แอมโมเนียมซัลเฟต 50-70%	2.83	122.85	104814	853.19	53.20	2.11
แอมโมเนียมซัลเฟต 70-90%	1.4	4.14	55162	13324.15	28.00	32.93
DEAE-anion exchange *load sample 0.46 มิลลิลิตร*	1.885	21.11	5.447	0.26	0.003	0.0006

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.15 การหาค่า residential time และค่า Km Vmax ของ เดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เทียบกับเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตรึงรูปบนทรายต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

4.15.1 เดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

จากการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสอิสระเป็น 0.03, 0.3 และ 1 หน่วย/มิลลิลิตร โดยทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 20 40 60 80 100 และ 120 นาที โดยมีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย/มิลลิลิตร เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีในสารตั้งต้น ผล residential time แสดงดังรูปที่ 4.23 4.24 และ 4.25 แต่เนื่องด้วยการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจากการทดลองข้างต้นนั้น เก็บตัวอย่างที่ระยะห่างของเวลานานเกินไป จึงมีการทดลองเก็บตัวอย่างในช่วงที่ถี่มากขึ้นและศึกษาความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการย่อยมากยิ่งขึ้น โดยจะทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 และ 35 นาที และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.5, 0.75 และ 1 หน่วย/มิลลิลิตร ผล residential time แสดงดังรูปที่ 4.26 4.27 และ 4.28 พบว่าการใช้เดกซ์แทรนเนส 0.03 หน่วยนั้นไม่สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนอย่างสมบูรณ์ได้ (อ้างอิงจากผลการทดลองที่ 4.7) และจากตารางที่ 4.11 การใช้เดกซ์แทรนเนส 0.3 หน่วยนั้นสามารถย่อยเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, และ 1.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% ได้สมบูรณ์ที่ 60, 80 และ 80 นาที ตามลำดับ ส่วนเดกซ์แทรน 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% นั้นต้องใช้เวลาในการย่อยมากกว่า 80 นาทีขึ้นไปจึงจะย่อยสมบูรณ์ การใช้เดกซ์แทรนเนส 0.5 หน่วยนั้นสามารถย่อยเดกซ์แทรน 0.1 และ 0.5 %ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% ได้สมบูรณ์ที่ 14 และ 20 นาที ตามลำดับ ส่วนเดกซ์แทรน 1.5 และ 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%นั้นต้องใช้เวลาในการย่อยมากกว่า 20 นาทีขึ้นไปจึงจะย่อยสมบูรณ์ การใช้เดกซ์แทรนเนส 0.75 หน่วยนั้นสามารถย่อยเดกซ์แทรน 0.1 และ 0.5 %ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% ได้สมบูรณ์ที่ 6 และ 18 นาที ตามลำดับ ส่วนเดกซ์แทรน 1.0 และ 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% นั้นต้องใช้เวลาในการย่อยมากกว่า 20 นาทีขึ้นไปจึงจะย่อยสมบูรณ์ การใช้เดกซ์แทรนเนส 1 หน่วยนั้นสามารถย่อยเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% ได้สมบูรณ์ที่ 6, 12, 16 และ 40นาทีตามลำดับ และจากรูปที่ 4.29 แสดงค่า Km ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 เท่ากับ 2.6305 ไมโครโมล และ Vmax เท่ากับ 3.407 ไมโครโมลเดกซ์แทรนที-2000 ต่อนาที



รูปที่ 4.23 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.03 หน่วย ต่อมิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 0.1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

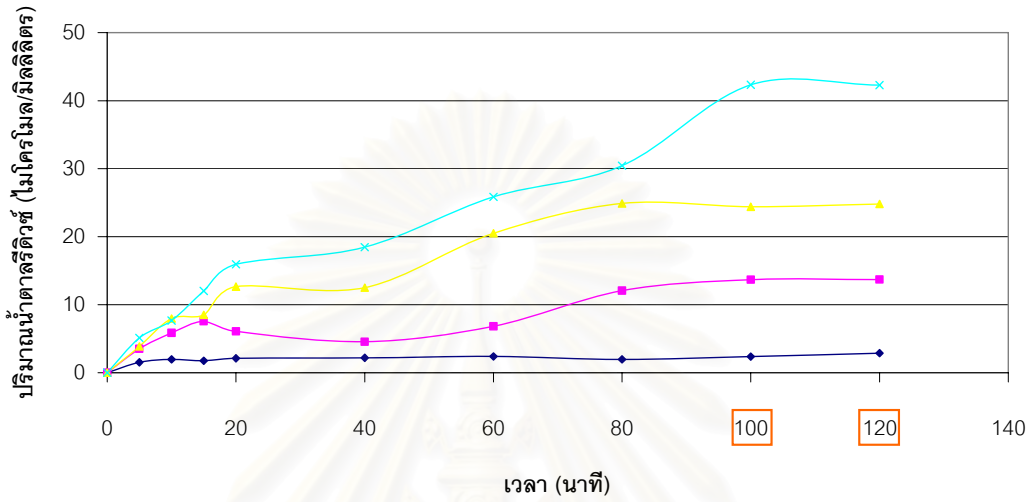
เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 1.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

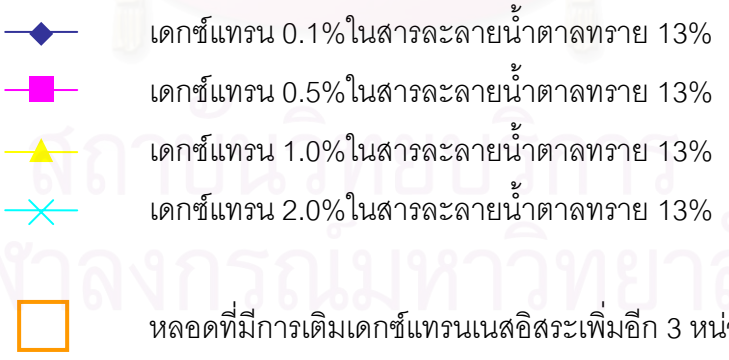
เดกซ์แทรน 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

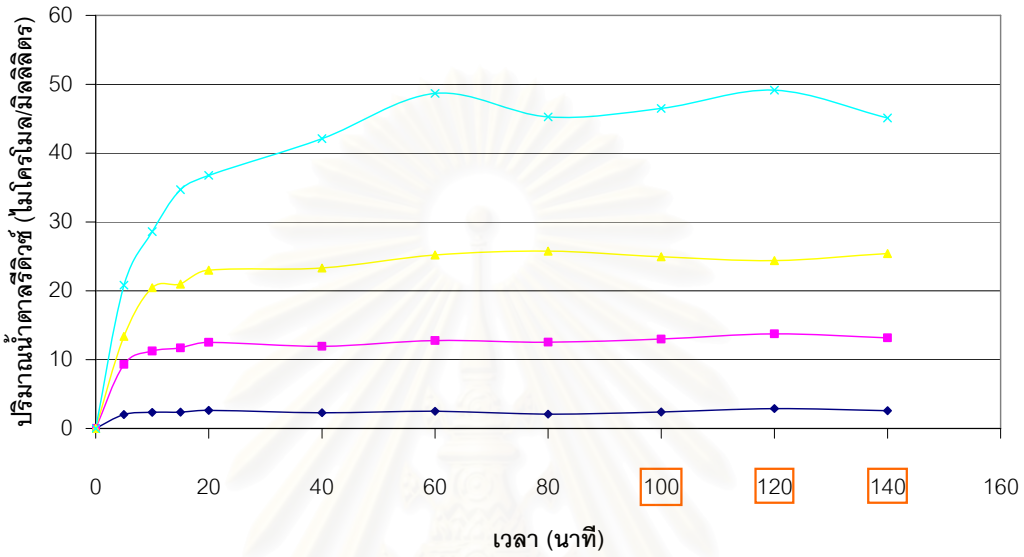
หลอดที่มีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 3 หน่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

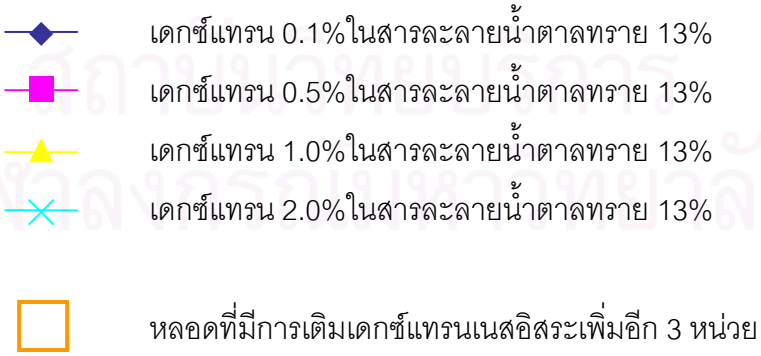


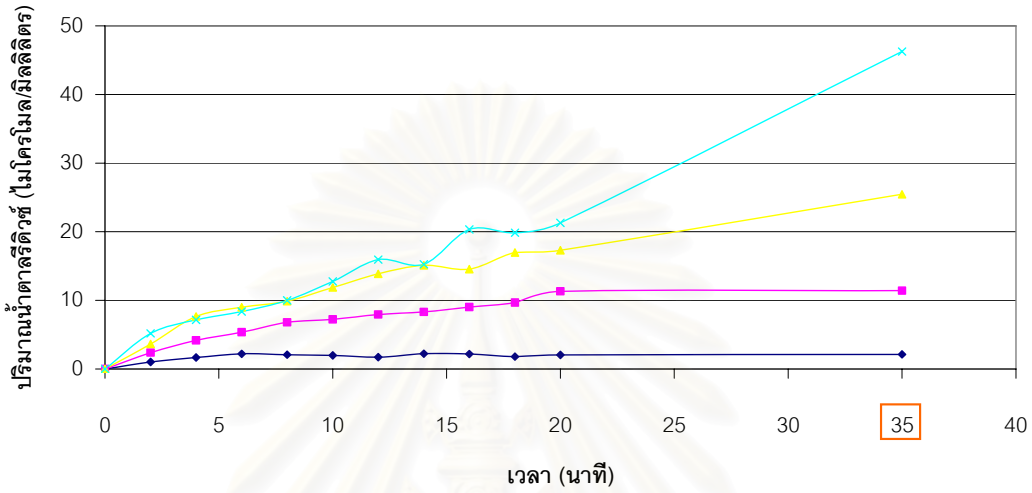
รูปที่ 4.24 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.3 หน่วย ต่อมิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%





รูปที่ 4.25 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1 หน่วย ต่อ มิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%





รูปที่ 4.26 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.5 หน่วย ต่อมิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 0.1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

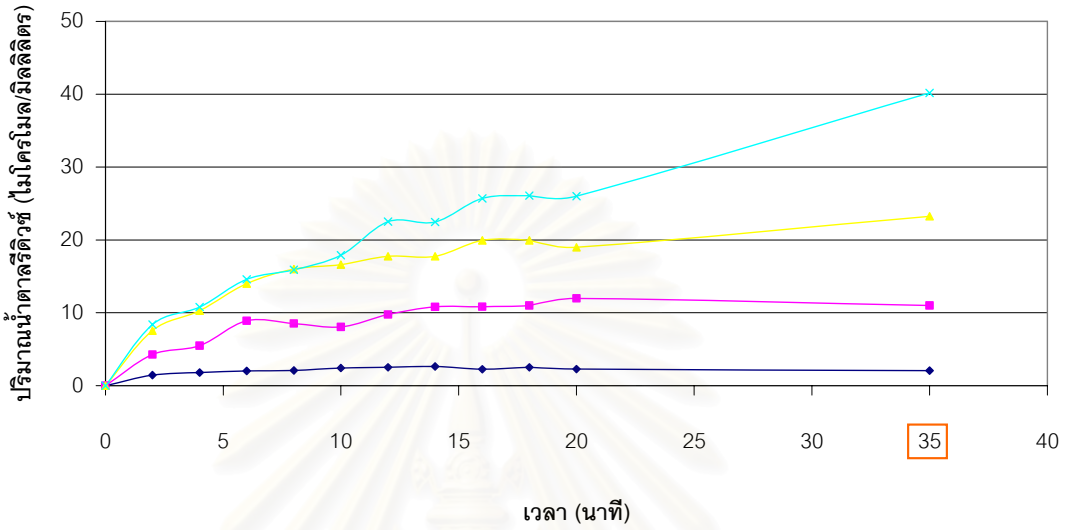
เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

เดกซ์แทรน 1.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

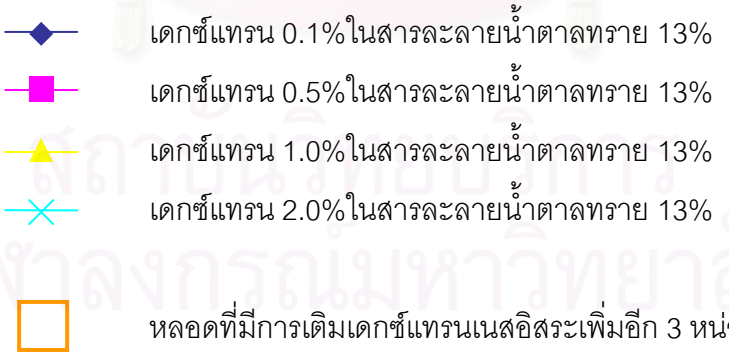
เดกซ์แทรน 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

หลอดที่มีการเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระเพิ่มอีก 3 หน่วย

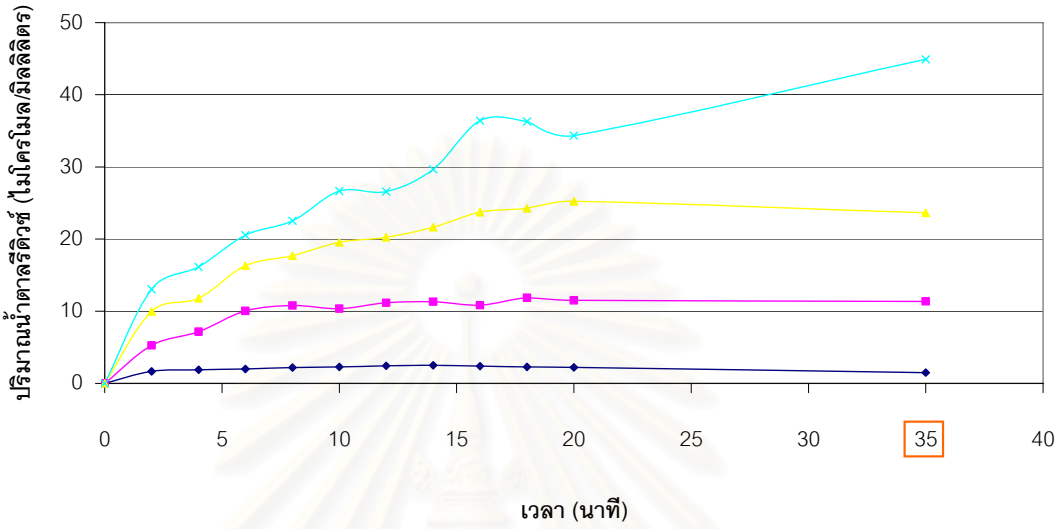
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



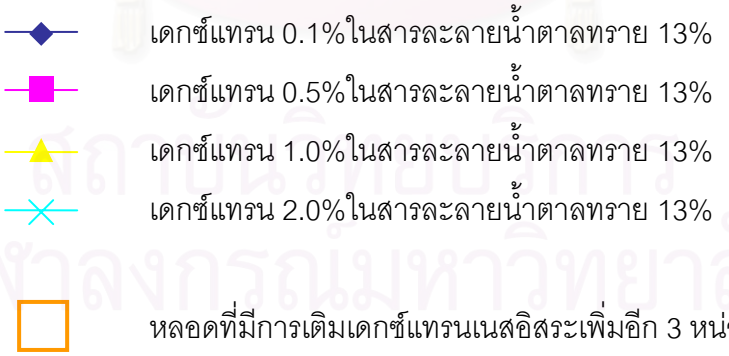
รูปที่ 4.27 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 0.75 หน่วย ต่อมิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



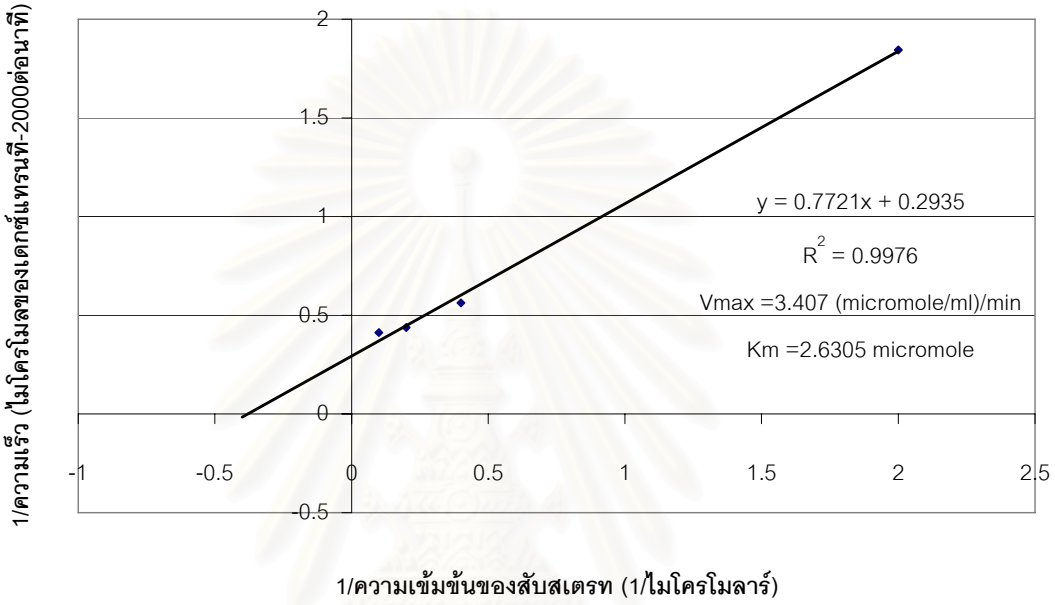
รูปที่ 4.28 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1 หน่วย ต่อ มิลลิลิตร ของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%



ตารางที่ 4.11 residential time ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

	เดกซ์แทรนเนส 0.3 หน่วย/มิลลิลิตร (นาที)	เดกซ์แทรนเนส 0.5 หน่วย/มิลลิลิตร (นาที)	เดกซ์แทรนเนส 0.75 หน่วย/มิลลิลิตร (นาที)	เดกซ์แทรนเนส 1 หน่วย/มิลลิลิตร (นาที)
เดกซ์แทรน 0.1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	60	14	6	6
เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	80	20	18	12
เดกซ์แทรน 1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	80	>20	>20	16
เดกซ์แทรน 2%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	>80	>20	>20	40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.29 กราฟแสดงไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า Km และ Vmaxของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ต่อเดกซ์แทรนที่-2000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

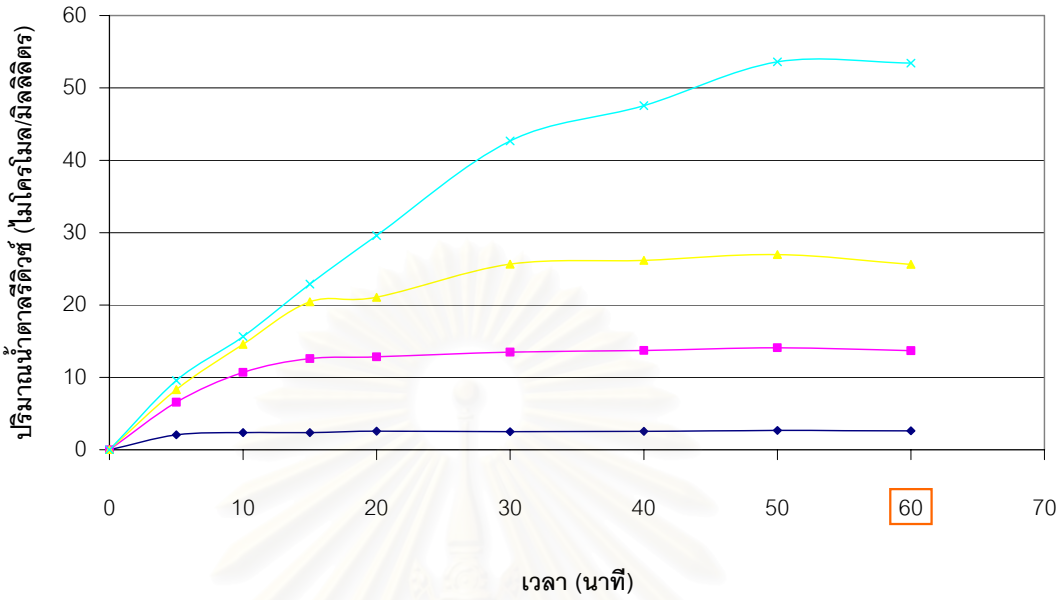
4.15.2 เดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตรึงรูปบนทราย

นำเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วซึ่งมีแอคติวิตี 300 และ 600 หน่วย/มิลลิลิตร มาตรึงรูปบนทราย ซึ่งเมื่อผ่านการตรึงรูปแล้วให้แอคติวิตีเท่ากับ 53.72 หน่วย/ทราย 5 กรัม (1.074 หน่วย/ ทราย 0.1 กรัม) และ 98.83 หน่วย/ทราย 5 กรัม (1.977 หน่วย/ทราย 0.1 กรัม) ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.12

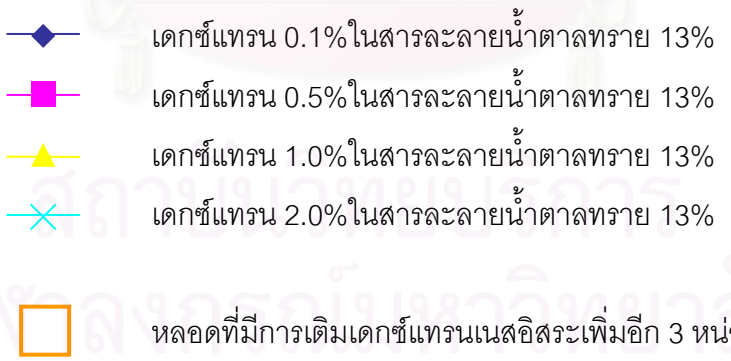
จากการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายเป็น 1.074 และ 1.977 หน่วย/มิลลิลิตร (ทำได้โดยการชั่งทราย 0.1 กรัม) โดยทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 5 10 15 20 30 40 50 และ 60 นาที หลังจากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระ 3 หน่วย/มิลลิลิตร ที่เวลา 60 นาที เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่มีอยู่จริงในสารตั้งต้น ผล residential time เป็นดังรูปที่ 4.30 และ 4.31 และจากตารางที่ 4.13 พบว่า การใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.074 หน่วย นั้นสามารถย่อยเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% ได้สมบูรณ์ที่ 10 15 30 และ 50 นาที ตามลำดับ ส่วนการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.977 หน่วย นั้นสามารถย่อยเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%ได้สมบูรณ์ที่ 5 10 20 และ 30 นาที ตามลำดับ และจากรูปที่ 4.32 แสดงค่า Km ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูปบนทรายต่อเดกซ์แทรน ที-2000 เท่ากับ 1.5146 ไมโครโมล และ Vmax เท่ากับ 1.6622 ไมโครโมลเดกซ์แทรนที-2000 ต่อนาที

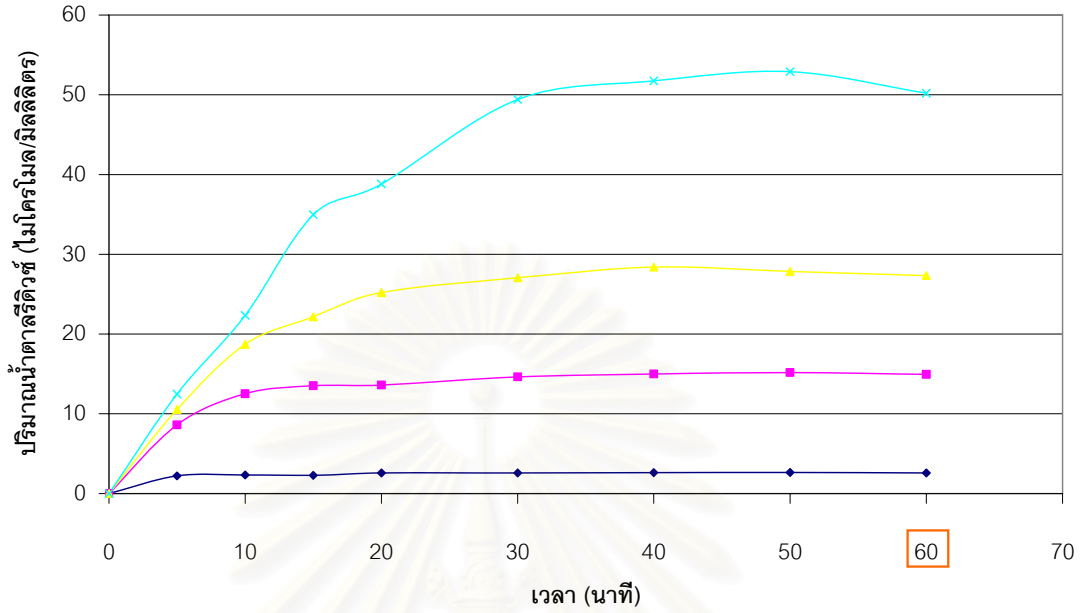
ตารางที่ 4.12 แสดงผลการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์บนทราย

เอนไซม์	แอคติวิตี	แอคติวิตี
เดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์	300 หน่วย/มิลลิลิตร	600 หน่วย/มิลลิลิตร
เดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์ตรึงรูป	53.72หน่วย/ ทราย 5 กรัม	98.83 หน่วย/ทราย 5 กรัม

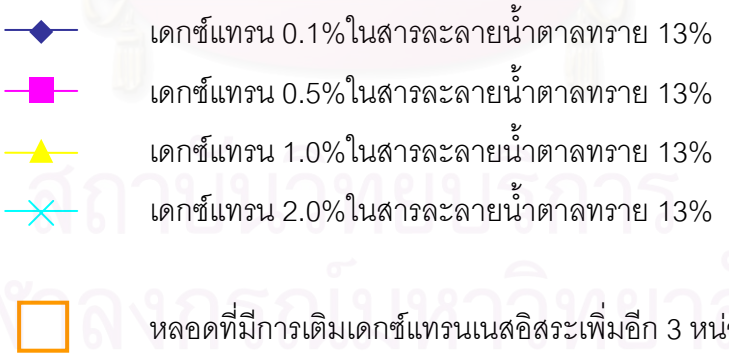


รูปที่ 4.30 residential time ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.074 หน่วย ต่อมิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%





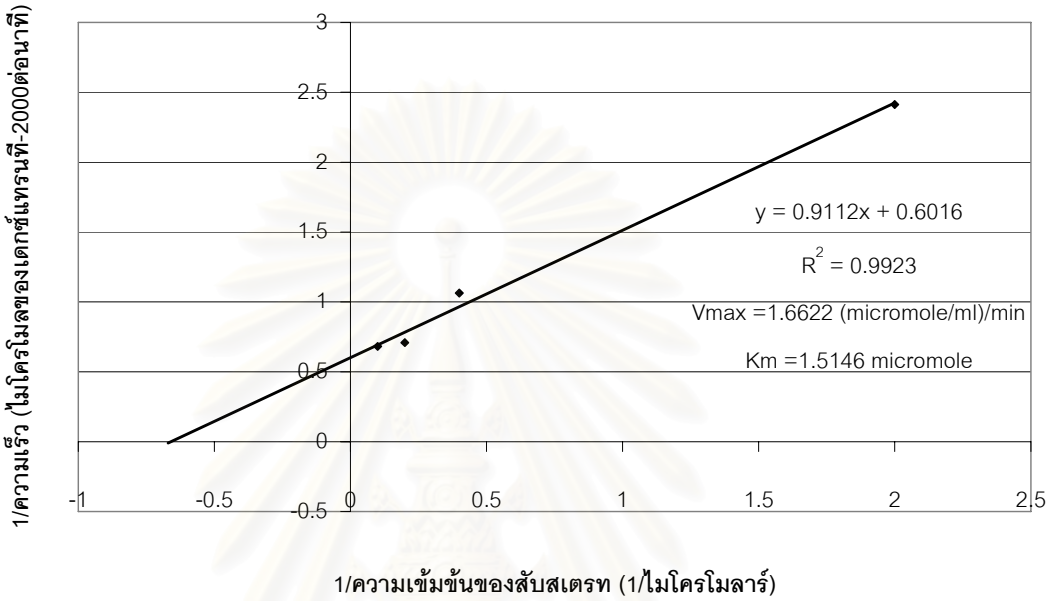
รูปที่ 4.31 residential time ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.977 หน่วย ต่อมิลลิลิตรของเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%



ตารางที่ 4.13 residential time ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ตรึงรูปบนทราย ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%

	เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.074 หน่วย/มิลลิลิตร (นาที)	เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป1.977 หน่วย/มิลลิลิตร (นาที)
เดกซ์แทรน 0.1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	10	5
เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	15	10
เดกซ์แทรน 1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	30	20
เดกซ์แทรน 2%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	50	30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.32 กราฟแสดงไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอต ในการหาค่า Km และ Vmax ของเดกซ์แทรนเนส ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูปต่อเดกซ์แทรนที่-2000

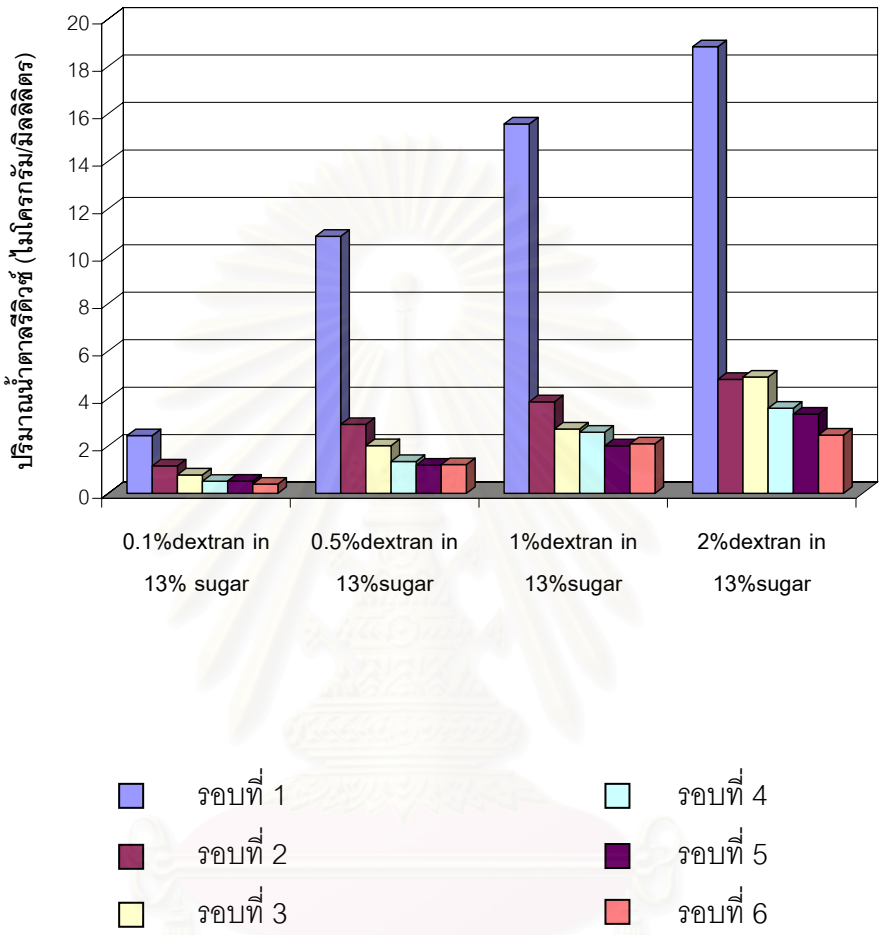
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.16 ผลการทดสอบหาจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายโดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยใช้เอนไซม์เริ่มต้นในการตรึง ซึ่งมีแอคติวิตี 300 และ 600 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อผ่านการตรึงรูปแล้วให้แอคติวิตีเท่ากับ 53.72 หน่วย/ทราย 5 กรัม (1.074 หน่วย/ทราย 0.1 กรัม) และ 98.83 หน่วย/ทราย 5 กรัม (1.977 หน่วย/ทราย 0.1 กรัม) ตามลำดับ

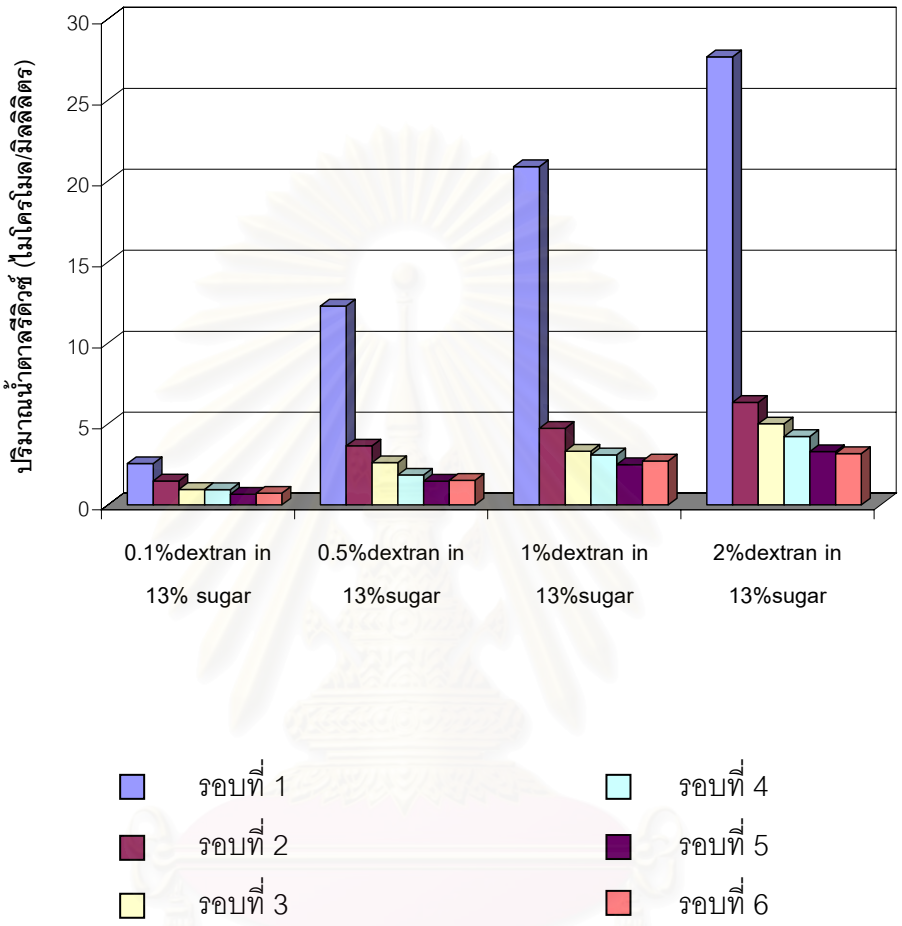
จากการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย 1.074, 1.977 หน่วย/มิลลิลิตร ใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบ่มกับสารละลายความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ซ้ำเป็นจำนวน 6 รอบ โดยแต่ละรอบจะมีการล้างเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายด้วยด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที แสดงผลการย่อยเดกซ์แทรนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ดังรูปที่ 4.33 และ 4.34 และจากตารางที่ 4.14 และ 4.15 พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในการใช้ซ้ำรอบที่ 2 ลดลงประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับการทำงานรอบแรก เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสที่ตรึงไว้กับทรายนั้นได้ถูกชะหลุดออกมาในสารละลาย เพราะเมื่อนำบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างทรายมาวิเคราะห์พบว่ามีแอคติวิตีอยู่ปริมาณมาก และเมื่อนำทรายมาใช้ซ้ำตั้งแต่ 3 รอบขึ้นไป แอคติวิตีจะเริ่มคงที่ เนื่องจากเป็นแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ตรึงอยู่บนทรายจริงๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.33 แสดงการทดสอบจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.074 หน่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.34 แสดงการทดสอบจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูป 1.977 หน่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบความสามารถในการทำงาน 15 นาที ของเอนไซม์ตรึงรูป 1.074 หน่วย / ทราย 0.1 กรัม

	รอบที่ 1(%)	รอบที่ 2(%)	รอบที่ 3(%)	รอบที่ 4(%)	รอบที่ 5(%)	รอบที่ 6(%)
เดกซ์แทรน 0.1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	47.73	32.03	21.03	21.35	16.01
เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	26.82	18.61	12.39	10.97	11.17
เดกซ์แทรน 1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	24.79	17.45	16.54	12.90	13.43
เดกซ์แทรน 2%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	25.52	26.04	19.07	17.74	13.05

ตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบความสามารถในการทำงาน 15 นาที ของเอนไซม์ตรึงรูป 1.977 หน่วย / ทราย 0.1 กรัม

	รอบที่ 1(%)	รอบที่ 2(%)	รอบที่ 3(%)	รอบที่ 4(%)	รอบที่ 5(%)	รอบที่ 6(%)
เดกซ์แทรน 0.1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	58.23	37.58	37.12	25.52	28.15
เดกซ์แทรน 0.5%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	29.64	21.27	15.01	11.93	12.35
เดกซ์แทรน 1%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	22.64	15.84	14.77	11.88	12.96
เดกซ์แทรน 2%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13%	100	22.86	18.09	15.27	11.88	11.45

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันอุตสาหกรรมน้ำตาลทรายประสบปัญหาสำคัญในกระบวนการผลิต เนื่องจากประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องจักรต่ำ ลักษณะผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้ไม่เหมาะสม และผลผลิตน้ำตาลต่ำ ซึ่งปัญหาต่างๆเหล่านี้ ส่วนหนึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนปนเปื้อนในน้ำอ้อยในระหว่างการเก็บเกี่ยว และระหว่างรอกระบวนการผลิต โรงงานน้ำตาลทรายจึงจำเป็นต้องมีวิธีที่เหมาะสมในการกำจัดเดกซ์แทรน ซึ่งโดยส่วนมากจะมีการใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน แต่เนื่องจากสารเคมีที่ใช้อาจตกค้างไปกับผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค อีกทั้งการใช้สารเคมีจะเป็นการเพิ่มต้นทุนที่สิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็น จึงมีผู้หันมาศึกษาการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสซึ่งสามารถย่อยเดกซ์แทรนออกเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เพื่อย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย และประยุกต์ใช้เทคนิคเอนไซม์ตรึงรูปเพื่อการศึกษาการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะโควาเลนท์บนทราย แม่น้ำขนาด 16-20 เมช โดยศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ศึกษาความสามารถ และเวลาที่ใช้ในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ ภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ ต่อการขจัดเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย เพื่อวิเคราะห์ได้ว่าเอนไซม์ในรูปแบบใดที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด รวมทั้งจะมีการคำนึงถึง ความสามารถในการใช้ซ้ำของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ต้นทุน และเวลาในการตรึงรูปว่ามีความเหมาะสมในการนำไปใช้จริงหรือไม่ ศึกษาพารามิเตอร์ เช่น ค่า Km, Vmax ของการสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย ตลอดจนเวลาที่ใช้เพื่อย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้กำหนดเวลาที่ต้องใช้ในกระบวนการ (residential time) เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการวิจัยต่อไปในการเพิ่มระดับการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในปริมาณที่สูงยิ่งขึ้น เพื่อประยุกต์ใช้ในโรงงานน้ำตาลทราย

การผลิตเดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เดกซ์แทรนเนสที่ได้จะอยู่ในส่วนน้ำเลี้ยง และเมื่อนำส่วนน้ำเลี้ยงมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสต่อเดกซ์แทรน T-2000 0.25%ในภาวะการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้ประมาณ 250-300 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งแอคติวิตีที่ได้สูงมากเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium luteum*

ATCC 9644 ที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ 13.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Fukumoto และคณะ, 1971) หรืองานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากราหลายชนิด เช่น *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., โดยพบว่า *P. aculeatum* สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูงสุด 230 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Shukla และคณะ, 1989)

จากนั้นได้ศึกษาวิธีการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสม โดยวิธีการใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึงบนตัวพยุง คือ ทรายแม่น้ำ 16-20 เมช ซึ่งแอคติวิตีของทรายตรึงรูปต่อเดกซ์แทรน T-2000 0.25% ในภาวะการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้เท่ากับ 50 หน่วยต่อทราย 5 กรัม (ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในการตรึง 250-300 หน่วย)

ผลการศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทนเนสตรึงรูปบนทราย พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากัน คือ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) รายงานไว้ โดยให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระสูงสุด คือ 300 หน่วยต่อมิลลิลิตร และแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงสุด คือ 61 หน่วยต่อทราย 5 กรัม ซึ่งอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างดังกล่าวเป็นภาวะที่ใกล้เคียงกับสมบัติของน้ำอ้อยรวมที่อยู่ในกระบวนการผลิต คือ อุณหภูมิของน้ำอ้อยรวมนั้นอยู่ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.0-5.5 จากการศึกษานี้จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรมโดยกระบวนการผลิตไม่จำเป็นต้องสูญเสียพลังงานเพื่อใช้ในการปรับสภาพของน้ำอ้อย เนื่องจากน้ำอ้อยมีภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอยู่แล้ว

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยพบว่ามีปริมาณเดกซ์แทรนร้อยละ 0.1 ของปริมาณน้ำอ้อย และทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงมากถึง 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรน้ำอ้อย ซึ่งอาจเกิดได้จากในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยได้ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพน้ำอ้อยจากการจุลินทรีย์ ซึ่งที่อุณหภูมิสูงซูโครสจะแตกตัวเป็นกลูโคส และฟรุคโตส (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527) ส่งผลรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากเดกซ์แทรนโดยปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนส จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคไดแอไลซิสในการกำจัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำอ้อยออกไปก่อน เพื่อวิเคราะห์การทำงานของเดกซ์แทรนเนสในการกำจัดเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยได้อย่างแม่นยำ จากผลการทดลองพบว่า สิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อน เช่น ดิน โคลน และสาร

อนุมูลต่างๆ ไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยพบว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีความสามารถในการทำงานสูงเทียบเท่าการทำงานในภาวะของบัฟเฟอร์ (ภาวะมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตี) แต่เนื่องจากการทำการทดลองต่อๆไป ไม่สามารถใช้วิธีไดแอไลส์ในการทดลองได้เนื่องจากมีความยุ่งยากในการทดลองมาก จึงมีการใช้สารละลายน้ำตาลทราย 13% ละลายในน้ำกลั่น (เทียบเท่า ซูโครส13% ที่มีในน้ำอ้อย อ้างอิงโดย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร) แทนการใช้น้ำอ้อย แต่เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลทราย 13% พบว่าเมื่อเกิดปฏิกิริยา และโดนความร้อน น้ำตาลทรายสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมา (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527) ซึ่งพบว่า การเตรียมน้ำตาลทรายโดยวิธีการใช้ sonicator จะเกิดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการเตรียมโดยวิธีการใช้ magnetic stirrer เนื่องจากการใช้ sonicator นั้นจะเกิดความร้อนขึ้นขณะทำงานซึ่งส่งผลให้น้ำตาลทรายเปลี่ยนรูปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้ magnetic stirrer และยังพบอีกว่าน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเมื่อผ่านขั้นตอนการต้มด้วยน้ำเดือด (ขั้นตอนของการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์) และจากการศึกษาการหยุดปฏิกิริยาด้วยวิธีอื่น โดยการใช้ absolute เอธานอล และ absolute เมธานอล นั้น ไม่สามารถหยุดปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสทั้งแบบอิสระ และแบบตรึงรูปได้ ดังนั้นวิธีการหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดจึงเหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์แอคติวิตี

จากนั้นได้หา residential time โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรน 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13% และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสอิสระเป็น 0.03, 0.3, 3 และ 30 หน่วย/มิลลิลิตร โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แต่จากการทดลองพบว่า เดกซ์แทรนเนสย่อยเดกซ์แทรนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มากเกินปริมาณที่ควรจะได้จริง จึงมีการทดสอบและยืนยันได้ว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดเพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์อินเวอร์เทสในน้ำเลี้ยงนั่นเอง ซึ่งโดยปกติในเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแทบทุกชนิดจะมีการปนเปื้อนของเอนไซม์อินเวอร์เทสอยู่ (Inkerman, 1980) จึงจำเป็นต้องมีการทำเดกซ์แทรนเนส ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าตะกอนที่ได้ในช่วง 50-70% แอมโมเนียมซัลเฟตนั้น ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทสมากที่สุด คือ 140048 และ 104814 หน่วยต่อ 2.8 มิลลิลิตร ตามลำดับ และได้ผ่านขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี DEAE-BioGel A พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และอินเวอร์เทสที่วิเคราะห์ได้ คือ 32,810 และ 8.93 หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่ายังมีแอคติวิตีของอินเวอร์เทสอยู่ แต่มีในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเดกซ์

แทรนเนส เนื่องจากในการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยเดกซ์แทรนนั้นต้องมีการเจือจางสูง แอคติวิตีของอินเวอร์เทสจึงไม่ส่งผลกระทบใดๆ ต่อปฏิกิริยา

เมื่อได้เดกซ์แทรนเนสที่บริสุทธิ์แล้วจึงทำการหาค่า residential time ของ เดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์ (DEAE) ต่อสารละลายเดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0%ในสารละลายน้ำตาลทราย 13 % 1 มิลลิลิตร ได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้เดกซ์แทรนเนส 1 หน่วย ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 6 12 16 และ 40 นาที ตามลำดับ โดยค่า Km ของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ต่อเดกซ์แทรนที-2000 เท่ากับ 2.6305 ไมโครโมล และ Vmax เท่ากับ 3.407 ไมโครโมลเดกซ์แทรนที-2000 ต่อนาที

residential time สำหรับเดกซ์แทรนเนสที่บริสุทธิ์ตรึงรูปบนทรายโดยแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเป็น 1.074 และ 1.977 หน่วยต่อทราย 0.1 กรัม พบว่าการย่อย เดกซ์แทรน 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0% ในสารละลายน้ำตาลทราย 13 % 1 มิลลิลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ทำได้โดยใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.074 หน่วย เป็นเวลา 10, 15, 30 และ 50 นาที ตามลำดับ หรือใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 1.977 หน่วย เป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ โดยค่า Km ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตรึงรูปบนทรายต่อเดกซ์แทรน ที-2000 เท่ากับ 1.5146 ไมโครโมล และ Vmax เท่ากับ 1.6622 ไมโครโมลเดกซ์แทรนที-2000 ต่อนาที และจากผลการทดสอบหาจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยใช้สารละลายเดกซ์แทรน และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยใช้ทรายตรึงรูปซ้ำเป็นจำนวน 6 รอบ พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในการใช้ซ้ำรอบที่ 2 ลดลงประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับการทำงานรอบแรก เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสที่ตรึงไว้กับทรายนั้นได้ถูกชะหลุดออกมาในสารละลาย เพราะเมื่อนำบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างทรายมาวิเคราะห์พบว่ามีแอคติวิตีอยู่ปริมาณมาก และเมื่อนำทรายมาใช้ซ้ำตั้งแต่ 3 รอบขึ้นไป แอคติวิตีจะเริ่มคงที่ เนื่องจากเป็นแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ตรึงอยู่บนทรายจริงๆ

โดยมีรายงานว่า ในหมู่เกาะอินเดียตะวันตกสามารถกำจัดเดกซ์แทรนออกไปได้ 68.5 % โดยการใช้เอนไซม์ 3 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำอ้อยเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สำหรับในเปอร์โตริโก และจาไมก้า มีการทดลองพบว่า เดกซ์แทรนเนสปริมาณ 6-7 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำอ้อยสามารถกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวม โดยใช้เวลา 20 นาที 50 องศาเซลเซียส (Tilbury, 1974)

Jolly และ Prakash (1987 อ้างถึงใน เอก แสงวิเชียร, 2531) ในประเทศอินเดีย ได้ทดลองกำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อยโดยใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (Novo 25 L) 100 ppm ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า สามารถขจัดเดกซ์แทรนลงได้ 48-52%

การใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Chaetomium gracile* กับน้ำอ้อยเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5-6 ซึ่งสามารถลดปริมาณเดกซ์แทรนลงได้มากกว่า 60 % (Clarke, 1997)

จากงานวิจัยนี้พบว่าการใช้เอนไซม์ในรูปแบบเดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรน้ำอ้อย จาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นรูปแบบ และปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้จริงในอุตสาหกรรม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นนับว่าต้องใช้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสมากกว่า แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้นต่างๆนั้น สามารถกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นซึ่งไม่ได้ระบุปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยเริ่มต้น และทำการกำจัดเดกซ์แทรนได้เพียง 50-60% ในเวลาที่ใกล้เคียงกัน

ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดสรุปงานวิจัยได้ว่าการนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลทราย เพื่อลดปริมาณเดกซ์แทรนนั้น ควรใช้เดกซ์แทรนเนสในรูปอิสระ โดยเลือกใช้ตามตารางที่ 4.11 โดยใช้ปริมาณเดกซ์แทรนเนส และเวลา ตามปริมาณเดกซ์แทรนที่วิเคราะห์ได้จริงในสายการผลิต เพื่อให้ต้นทุน และพลังงานที่ใช้เป็นไปอย่างเหมาะสม ส่วนเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปนั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ เนื่องจากการตรึงมีพันธะที่ยึดเหนี่ยวเอนไซม์ไม่แข็งแรง จึงทำให้การนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมาใช้ซ้ำในรอบ 2 นั้น มีแอคติวิตีที่น้อยลงมาก เนื่องจาก เอนไซม์ที่ตรึงไว้หลุดออกมาจากทราย อีกทั้งแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่นำมาใช้ตรึงเริ่มต้นมาก เมื่อเทียบกับ แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแล้ว พบว่า แอคติวิตีลดลงมาก รวมทั้งต้นทุน สารเคมี และเวลาที่ใช้ในการตรึง ไม่คุ้มค่าต่อการนำมาใช้จริง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2533. การเตรียมการจัดประชุมนักวิชาการอ้อย และน้ำตาลระหว่างประเทศครั้งที่ 21 ในประเทศไทย. วารสารน้ำตาล 6: 33-38.

กล้าณรงค์ ศรีรอต.2536.เทคโนโลยีน้ำตาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2540. เดกซ์แทรนปัญหาของอุตสาหกรรมอ้อย และน้ำตาลไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

คณะกรรมการอ้อย และน้ำตาลทราย สำนักงาน. 2529. เทคนิคกรรมวิธีผลิตน้ำตาลทราย. กรุงเทพมหานคร. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. กรุงเทพฯ.

งานวิเคราะห์ 1 ฝ่ายวิทยาศาสตร์น้ำตาลทราย. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. กระทรวงอุตสาหกรรม. รายงานการวิจัยเรื่องผลกระทบของอ้อยไฟไหม้ที่มีต่อการตรวจวัดค่าคุณภาพอ้อยตามระบบซี.ซี.เอส.

ณฐินี สุวรรณสิงห์. 2533. เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในทะเล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิภา สิริไพบูลย์พงศ์. 2545. โครงการปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส. กลุ่มส่งเสริมเทคโนโลยี และวิชาการกองพัฒนาผลิตภัณฑ์. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. กรุงเทพฯ.

นุสรา เจริญกิจทวี. 2539. การตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. SMCU3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญส่ง แสงอ่อน. 2527. บทบาทของแบคทีเรียในน้ำอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญส่ง แสงอ่อน และวิวัฒน์ แดงสุภา. 2527. แบคทีเรียในน้ำอ้อยจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายในประเทศไทย. วารสารเกษตรศาสตร์ 18: 153-161.

ฝ่ายนโยบาย และเศรษฐกิจน้ำตาล. สำนักงานคณะกรรมการอ้อย และน้ำตาล. กระทรวงอุตสาหกรรม. 2542. อุตสาหกรรมอ้อย และน้ำตาลในประเทศไทย 2541-2542.

พรทิพย์ จารุพันธ์. 2535. เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายสำหรับการกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยอย่างต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร. โครงการศึกษาวิจัยผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สันต์ ฉายตระกูล. 2510. กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และปัญหาทางเทคนิคในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย. กองวิทยาศาสตร์น้ำตาล. ศูนย์ส่งเสริมน้ำตาลทราย.

สันต์ ฉายตระกูล. 2525. เดกซ์แทรนศัตรูสำคัญของกระบวนการผลิต และคุณภาพน้ำตาลทราย. วารสารน้ำตาล. พ.ค.-มิ.ย.: 5-9.

สุภาพร ชาติวรพงศา. 2536. การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวรรณา นพพรพันธุ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อนันตพงษ์ สุขเกษ. 2543. การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวทราย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ. 2535. การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอก แสงวิเชียร. 2531. เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Abdel-Naby, M. A.; Ismail, A. S.; Abdel-Fattah, A. M.; and Abdel-Fattah, F. 1999. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. Process Biochem. 34: 391-398.

Barnes, A. C. 1974. The Sugar Cane. Billing and Sons. London: 424-469

Byrne, M. J., and John, D. B. 1974. Studies on the immobilization of β-Galactosidases. Bioch. Soc. Trans. 2: 496-497.

Chung, C. C., and Mark, W. 1980. Dextran problem in sugar refinery: A critical laboratory evaluation. Proceeding of the 1980 Technical Session on Cane Sugar Refining Research: 1-25.

Clarke, M. A. 1997. Dextran in sugar factory:causes and control Part I. Sugar Y. Azucar. October 1997: 28-40.

Clarke, M. A. 1997. Dextran in sugar factory:causes and control Part II. Sugar Y. Azucar. November 1997: 22-34.

Clarke, M. A.; Robert, E. J.; Godshall, M. A.; Brannan, F. G.; Carpenter, A.; and Coll, E. E. 1980. Sucrose loss in the manufacture of cane sugar. Sugar Y. Azucar. 75: 64-68.

Day, J. C. 1971. The habit modification of sucrose crystal growth in the presence of dextran. M. Sic Thesis, University of Queensland,Brisbane.

Egan, B. T. 1971. Post harvest deterioration losses in sugar cane. The Sugar Journal. February 1971: 9-13.

Franssen, O.; Stenekes, R. J. H.; and Hennink, W. E.; 1999. Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres. Journal of Controlled Release . 59: 219-228.

Fukumoto, J.; Tsuji, H.; and Tsuru, D. 1971. Studies on mold dextranase. J. Biochem. 69: 1113-1121.

Fulcher, R. P., and Inkerman, P.A. 1976. Dextranase II characterization of the enzyme for use in sugar mill. Proc. Qd. Soc. Sugar Cane Technol. 43rd Conf.: 295-307.

Galvez-Mariscal, A., and Lopez-Mungia, A. 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 327-331.

Hidi, P., and Staker, R. 1975. Enzymatic hydrolysis of dextran in mill. Processing of the Queensland of sugar cane Technologist Forty-second Conference: 331-343.

Imrie, F. K. E., and Tilbury, R. H. 1972. Polysaccharide in sugar cane and its production. Sugar Tech. Rev. 1: 291-361.

Inkerman, P. A. and G. P. James. 1976. Dextranase. II. Practical application of the enzyme to sugar mills. Proc. Qd. Soc. Sugar Cane Technol. 43rd Conf., 307-315 and references therein.

Inkerman, P. A. 1980. An appraisal of the use of dextranase. Proc 17thISSCT: 2411-2427.

Jolly, S. C. and Prakash, C. 1987. Removal of dextran fron cane juice. Int. Sugar J. 89: 184-186.

Joshi, V. K., and Tamhane, D. V. 1975. Fermentative production of dextranase by *Aspergillus luchuensis* Inui. Indian J. Exp. Biol.13: 55-57.

Kennedy, J. F. and Cabral, J. M. S. 1987. Enzyme immobilization. In J. F. Kennedy (ed.) Biotechnology Vol. 7a:Enzyme Technology. Fed. Repub. Of Germany,Weinheim: 349-402.

Kennedy, J. F. and Kay, I. M. 1977. The use of titanium (IV) oxide for the immobilisation of carbohydrate-directed enzyme. Carbohydrate Res. 56: 211-218.

Kennedy, J. F. and Kay, I. M. 1977. The use of titanium (IV) oxide coated with diazotised 1,3-diaminobenzene for the immobilisation of carbohydrate-directed enzyme. Carbohydrate Res. 59: 553-561.

Koenig, D.W. and Day, D.F. 1989. The Purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi.* Eur. J. Biochem. 183:161-167.

Koh, T.Y. and Khown, B.T. 1970. A rapid method for the assay of dextranase. Can. J. of Biochem. March 1:225-227.

Lillehoj, E. B.; Clarke, M. A.; and Tsang, W. S. C. 1984. *Leuconostoc* spp. In sugarcane processing samples. In proc. Conf. Sugar Proc. Res.: 141-151.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.193: 265-275.

Madhu and Prabhu, K. A. 1984. Studies on dextranase from *P. aculeatum*. Enzym. Microb. Technol. 6: 217-220.

Marotta, M.; Martino, A.; De Rosa, A.; Farina, E.; Carteni, M.; and De Rosa, M. 2002. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. Process Biochemistry. 38: 101-108.

Morel du Boil, P. G. 1991. The role of oligosaccharides in crystal elongation. In Proc. South Afr. Sugar Technol: 171-178.

Mountzouris, K. C.; Gilmour, S. G.; Grandison, A. S.; and Rastall, R. A. 1999. Modeling of oligodextran production in an ultrafiltration stirred-cell membrane reactor. Enzyme and Microbial Technology. 24: 75-85.

Novo. 1983. Product from data information B275C-GB 2000. Enzyme Division. Bagsvarerd, Denmark.

Ramesh, V., and Singh, C. 1980. Bacterial dextranase immobilized on zirconia coated alkylamine glass using glutaraldehyde. Biochem. Biophys Res. Commun. 97: 779-786.

Rogalski, J.; Szczodrak, J.; Pleszczynska, M.; and Fiedurek, J. 1997. Immobilisation and kinetics of *Penicillium notatum* Dextranase on controlled porous glass. J. Molecular Catalysis B:Enzymatic. 3: 271-283.

Shukla, G. L.; Madhu; and Prabhu, K. A. 1989. Study of some parameters for the production of dextranase by *Penicillium aculeatum*. Enzyme Microbiol. Technol. 11: 533-536.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem.195:19-23.

Sugiara, M., and Ito, A. 1974. Studies on Dextranase IV. Immobilization of dextranase from *Penicillium funiculosum* IAM 7013. Chem. Pharm. Bull. 22: 2941-2946.

Sugiara, M., and Ito, A. 1975. Studies on dextranase VIII:Some enzymatic properties of immobilized dextranase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum*. Chem. Pharm. Bull. 23: 3223-3227.

Tilbury, R. H. 1974. Further studies on enzymatic hydrolysis of dextran in mill juices by dextranase and fungal α-amylase. Proc. 15th ISSCT: 1444-1258.

Tsuchiya, H. M. et al. 1956. U.S. patent 2, 742, 399. April 17

Wang, D. I. C.; Coony, C.L.; and Demain, A.L. 1979. Enzyme kinetics and immobilization in ferment. technol. John Wiley and Sons. USA: 318-336.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร และวิธีเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธีของ Fukumoto และคณะ ซึ่งปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2531)

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	0.2	%
ไดโปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2	%
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.05	%
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.0009	%
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	0.2	%

1. ปรับความเป็นกรดด่าง 4.5-5.0 สำหรับอาหารแข็งเอียง
   ปรับความเป็นกรดด่าง 4.0 สำหรับอาหารเหลว
2. เติมเดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล 5-40 x 10^6) 1.0 %
3. เติมวุ้น (agar) 1.8-2.0 % เฉพาะอาหารแข็งเอียง
4. ต้มอาหารจนเดกซ์แทรนละลายหมด
5. เทแบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองสำหรับอาหารแข็งเอียง
   เทแบ่ง 200 มิลลิลิตร ใส่ flask ขนาด 500 มิลลิลิตรสำหรับอาหารเหลว
   เทแบ่ง 50 มิลลิลิตร ใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตรสำหรับอาหารเหลว
6. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1.สารละลายสำหรับการวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

1.1 สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 (สำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ)

เตรียมความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตท 29.0917 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (gracial acetic acid) จนเท่ากับ 4.5 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. โดยในการวิเคราะห์ต้องเจือจางเป็น 0.05 โมลาร์

1.2 สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 (สำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป)

เตรียมความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเทตท 52.0680 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (gracial acetic acid) จนเท่ากับ 5.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. โดยในการวิเคราะห์ต้องเจือจางเป็น 0.05 โมลาร์

1.3 สารละลายเดกซ์แทรน ที 2000 ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนัก) (สำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ)

ละลายเดกซ์แทรน ที 2000 จำนวน 0.625 กรัมในสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 (ข้อ 1.1) โดยการใช้เครื่อง sonicator และปรับปริมาตร ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล.

1.4 สารละลายเดกซ์แทรน ที 2000 ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนัก) (สำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป)

ละลายเดกซ์แทรน ที 2000 จำนวน 0.625 กรัมในสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 (ข้อ 1.2) โดยการใช้เครื่อง Sonicator และปรับปริมาตร ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล.

2. สารละลายสำหรับใช้ในการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

2.1 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตรค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0

เตรียมความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตท 12.1447 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (gracial acetic acid) จนเท่ากับ 4.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. โดยในการวิเคราะห์ต้องเจือจางเป็น 0.05 โมลาร์

2.2 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

เตรียมความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอตเฟต 85.48 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟต 47.73 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนเท่ากับ 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. โดยในการวิเคราะห์ต้องเจือจางเป็น 0.5 โมลาร์

3. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (1952)

3.1 สารละลาย alkaline copper reagent

เตรียมโดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 12H_2O$) จำนวน 71 กรัม และ โปแตสเซียมโซดียมทาร์เตรท (Potassium Sodium tartrate $4H_2O$) จำนวน 40 กรัม ใน

น้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 80 มิลลิลิตร และไดโซเดียมซัลเฟต180 กรัม ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดแก้วสีชา สารละลายเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนการใช้งาน

3.2 สารละลาย nelson reagent

เตรียมโดยละลาย แอมโมเนียมโมลิบเดท [$(NH_4)_6MO_7\ O_{24}4H_2O$] จำนวน 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้น จำนวน 21 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนอาร์ซิเนท ($NaHAsO_4 7H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 12 จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดแก้วสีชา สารละลายเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนการใช้งาน

4. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951)

4.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0 กรัม
โซดียมโปตัสเซียมทาร์เทรท	0.6 กรัม
น้ำกลั่น	3.0 ลิตร

4.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A	50 ส่วน
สารละลาย Lowry B	1 ส่วน

4.4 สารละลาย Lowry D ประกอบด้วย

สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent)	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

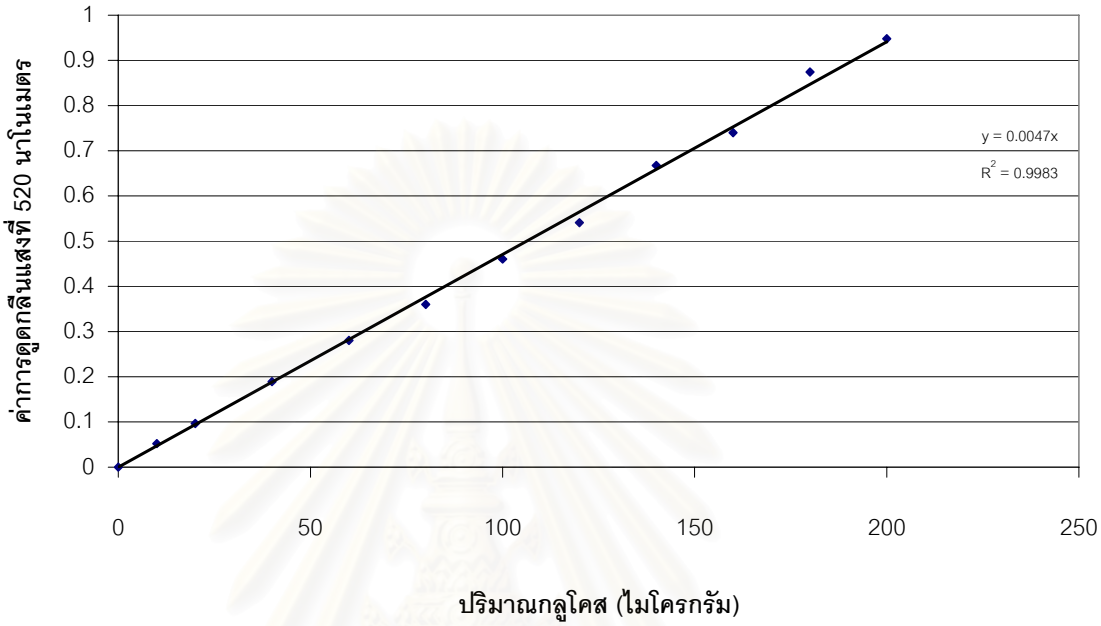
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของ D-glucose

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากนั้นเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย D-glucose ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น นำสารละลายนี้ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง วิเคราะห์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952) การทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์โดยเติมสารละลาย alkali-copper reagent ลงในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย D-glucose หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคส และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ผ1 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

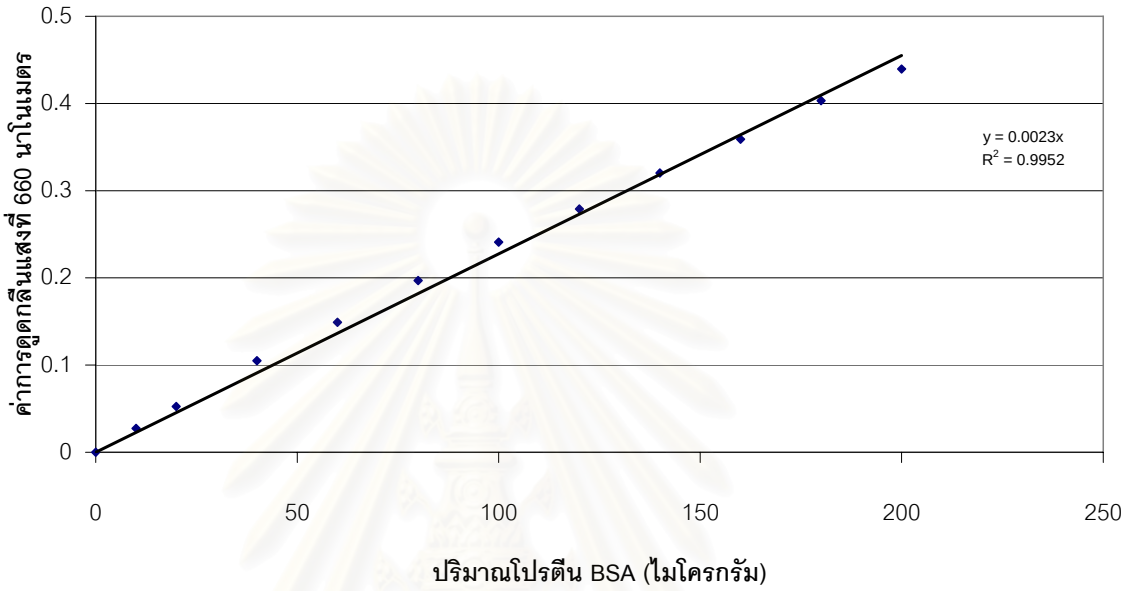
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากนั้นเตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น นำสารละลายนี้ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง วิเคราะห์โดยวิธี Lowry (1951) การทดสอบปริมาณโปรตีนโดยเติมสารละลาย Lowry C 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Lowry D 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ผ2 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับปริมาณโปรตีน BSA ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวผกาแก้ว เต็มคำขวัญ เกิดเมื่อวันอาทิตย์ที่ 7 ธันวาคม พ.ศ. 2523 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 36/8 ซอยบางบอน 5 ถนนเอกชัย แขวงบางบอน เขตบางบอน กรุงเทพมหานคร 10150

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย