

บทที่ 1

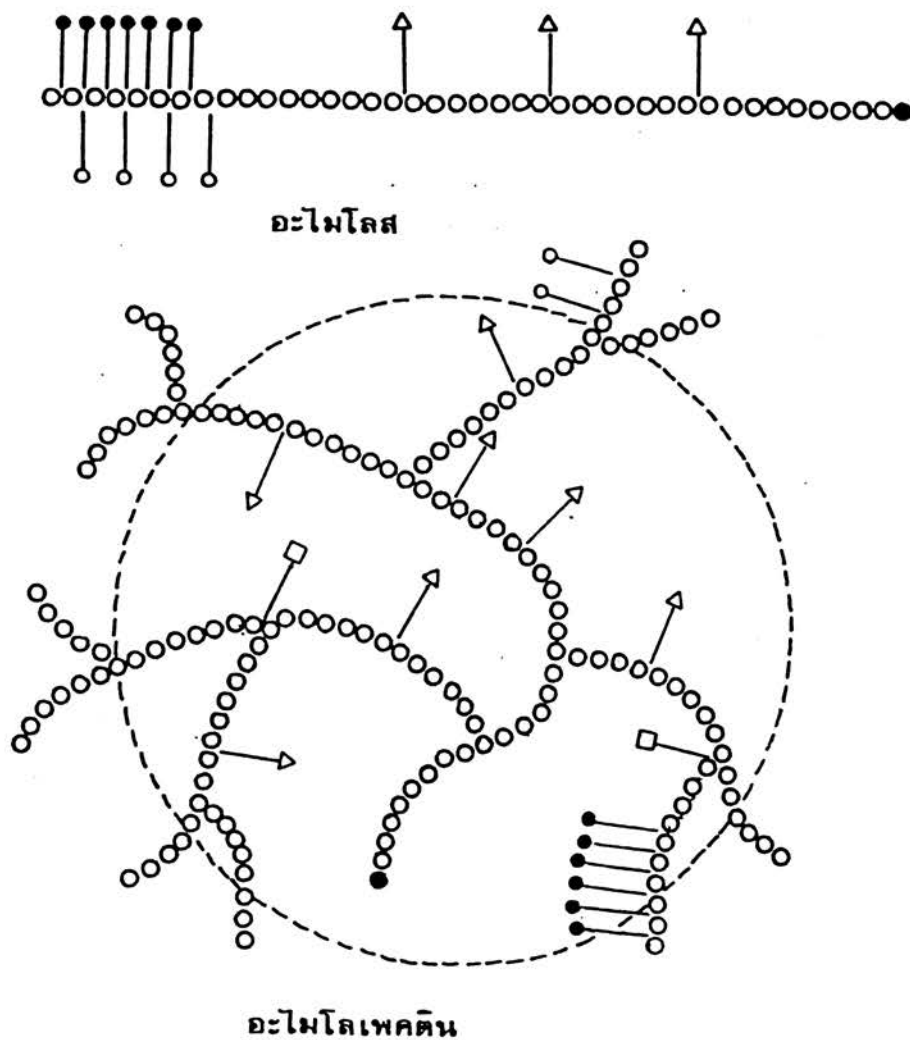
บทนำ



1. ชนิดและกลไกการทำงานของอะไมเลส

อะไมเลส (amylase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคซิดิก (α -1,4-glycosidic linkage) ของโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เช่น แป้ง ไกลโคเจน หรือ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) อะไมเลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามกลไกการทำงาน คือ เอกโซอะไมเลส (exoamylase) และเอนโดอะไมเลส (endoamylase) โดยเอกโซอะไมเลสจะย่อยสลายพันธะของโพลีแซคคาไรด์จากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) เท่านั้น ซึ่งถ้าย่อยสลายทุกพันธะให้แอลฟา กลูโคส (α -glucose) เพียงอย่างเดียวจะเรียกว่ากลูโคอะไมเลส หรือแกมมาอะไมเลส (glucoamylase or γ -amylase) แต่ถ้าย่อยสลายพันธะเว้าพันธะและให้มอลโตส (maltose) เพียงอย่างเดียวจะเรียกว่าเบต้าอะไมเลส (β -amylase) และเนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าว ไม่สามารถย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,6 กลูโคซิดิกซึ่งเป็นพันธะที่โง้ง (branch chain) ของสายอะไมโลเพคติน (amylopectin) และไกลโคเจน ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) ด้วย สำหรับเอนโดอะไมเลสจะย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคซิดิกแบบสุ่ม (random) และไม่สามารถย่อยแอลฟา 1,6 กลูโคซิดิกได้ ผลจากการทำงานของเอนไซม์คือ ความหนืดของสารละลายแป้งจะลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้หน้าตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) และเดกซ์ทรินที่มีขนาดต่าง ๆ กันเกิดขึ้น เอนไซม์นี้เรียกว่าแอลฟาอะไมเลส (α -amylase) (1)

นอกจากนี้ยังพบอะไมเลสบางชนิด ซึ่งสามารถย่อยพันธะแอลฟา 1,6 กลูโคซิดิกได้ เรียกว่าไอโซอะไมเลส (isoamylase) (1) กลไกการทำงานของอะไมเลสชนิดต่าง ๆ สรุปไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 กลไกการทำงานของอะไมเลสชนิดต่าง ๆ เมื่อมีอะไมโลสและอะไมโลเพคติน เป็นสับสเตรท (1)

- เบตาอะไมเลส
- กอูโคอะไมเลส
- ◀— แอลฟาอะไมเลส
- ไอโซอะไมเลส
- โมเลกุลกอูโคส
- ปลายที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์

2. แหล่งแอสฟาอะไมเลสในธรรมชาติ

แอสฟาอะไมเลส (E.C.3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยแป้ง ได้มีการศึกษาครั้งแรกในสารสกัดจากข้าวลาลี ในปี ค.ศ. 1811 ต่อมาได้มีการศึกษาในแหล่งอื่น ๆ อีกเช่น ในน้ำลาย ข้าวมอลท์ เลือดและที่ผลิตโดย Aspergillus oryzae ในปัจจุบันพบว่าแอสฟาอะไมเลสมีอยู่ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (2) ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แหล่งของแอสฟาอะไมเลสในธรรมชาติ (1)

แหล่ง	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง	หน่วยการทำงาน*
<u>พืช</u> ข้าวมอลท์	มอลโตส	350
<u>สัตว์</u> น้ำลาย	เดกซ์ตริน, มอลโตส	-
ตับอ่อน	เดกซ์ตริน, มอลโตส	2,500
<u>จุลินทรีย์</u> <u>B.subtilis</u>	กลูโคส, มอลโตส, เดกซ์ตริน	1,800
<u>B.stearotherophilus</u>	เดกซ์ตริน, มอลโตส	-
<u>Rhizopus</u> sp.	กลูโคส	200
<u>A.oryzae</u>	กลูโคส	170
<u>A.niger</u>	กลูโคส	250
<u>Endomycopsis</u> sp.	กลูโคส	20
<u>Oospora</u> sp.	เดกซ์ตริน	25

* นิยาม 1 หน่วยการทำงาน คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักของแหล่งเอนไซม์ 1 กรัม ในเวลา 1 นาที

3. ข้อได้เปรียบของแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียในอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมผลิตเดกซ์โตรส (dextrose) และไซรัป (syrup) จากแป้ง ในธรรมชาติ จะประกอบด้วยกระบวนการเจลาติไนเซชัน (gelatinization) ลิกวิเฟคชัน (liquefaction) และแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) โดยขั้นตอนแรกแป้งจะถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้เม็ดแป้ง (starch granule) พองตัวด้วยน้ำและตกตะกอนโปรตีน ที่เกาะติดกับผิวของเม็ดแป้ง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเจลาติไนเซชันขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง เช่นถ้าเป็นแป้งข้าวโพด ใช้อุณหภูมิประมาณ 105-110 องศาเซลเซียส แป้งที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชันจะมีความหนืดสูงมาก ขั้นตอนต่อไปคือ ลิกวิเฟคชัน ซึ่งจะเป็นการเติมธินนิงเอเจนต์ (thinning agent) เพื่อย่อยสลายแป้งบางส่วนและลดความหนืดลง ธินนิงเอเจนต์ที่ใช้กันคือกรด โดยจะมีการปรับค่าพีเอช (pH) ของไซรัปให้ได้ประมาณ 2 และทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 140-150 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที ซึ่งจะได้ไซรัปที่สามารถกรองได้ง่าย อย่างไรก็ตามความไม่จำเพาะของปฏิกิริยาที่ใช้กรด ยังผลให้เกิดผลิตภัณฑ์และสีที่ไม่พึงประสงค์ ยิ่งไปกว่านั้นมีความเข้มข้นของเกลือสูงด้วย เพื่อจะแก้ปัญหาดังกล่าวได้มีการนำแอลฟาอะไมเลสมาใช้แทนกรด โดยมีข้อจำกัดคือ แอลฟาอะไมเลสนั้น ต้องมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี เนื่องจากในทางปฏิบัติกระบวนการนี้ต้องเกิดที่อุณหภูมิสูง (ประมาณ 85-95 องศาเซลเซียส) ในช่วงเวลาสั้น (3,4) จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียเหมาะสมที่จะใช้เป็นธินนิงเอเจนต์ในกระบวนการลิกวิเฟคชัน เนื่องจากมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี (1)

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมบางประเภท จำเป็นต้องใช้แอลฟาอะไมเลสควบคู่กับดีเทอร์เจนต์ (detergent) เพื่อกำจัดสารและสีที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ แอลฟาอะไมเลสที่ใช้จะต้องทำงานได้ในสภาพที่เป็นด่าง (4) จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียเหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมประเภทนี้ เพราะมีความคงทนต่อความเป็นกรดต่างได้ในช่วงกว้าง

ตารางที่ 2 คุณสมบัติต่าง ๆ ของแอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์ (1)

คุณสมบัติ	แบคทีเรีย		รา		อื่น ๆ	
	lique- fying	saccha- rifying	<u>Rhizopus</u>	<u>Asper- gillus</u>	<u>Endomy- copsis</u>	<u>Oospora</u>
ความคงทนต่ออุณหภูมิ	65-90	55-70	50-65	55-70	35	50-70
ความคงทนต่อค่าพีเอช	4.8-10.6	4.0-7.8	5.4-7.0	4.7-9.5	6.0-7.5	6.0-10.5
ค่าพีเอชเหมาะสมต่อการ ทำงาน	5.4-6.0	4.8-5.2	3.6	4.9-5.2	5.4	5.6
หน่วยการทำงาน/มก.	1,800	1,190	475	980	760	970

ในปี ค.ศ. 1945 Peltier และ Beckord (6) ได้ทำการแยกแบคทีเรีย ที่สามารถผลิตแอลฟาอะไมเลส จากแหล่งต่าง ๆ พบว่าในขนมปัง แป้งและวัตถุดิบอื่น ๆ จากพืช เป็นแหล่งที่มีแบคทีเรียที่สามารถย่อยแป้งได้มากกว่าแหล่งอื่น ๆ และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ B. subtilis ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษากันมากในแง่ของการผลิต (7,8,9)

นอกจาก B. subtilis แล้วได้มีการศึกษาการผลิตแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น B. licheniformis (5,10,11,12) B. coagulans (10,13) B. amylo-liquefaciens (14) B. acidocaldarius (15) B. stearothermophilus (13) ฯลฯ คุณสมบัติของแอลฟาอะไมเลสจากแหล่งต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความคงทนต่ออุณหภูมิและค่าพีเอชของแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ

Bacillus sp.	ค่าพีเอช		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		เอกลีสารอ้างอิง
	ค่าเหมาะสม	ช่วงความคงทน	ค่าเหมาะสม	ช่วงความคงทน	
<u>B. subtilis</u>	6.3	5.7-6.7	65	-	9
<u>B. licheniformis</u> CUMC305	9.5	6.5-10.0	91	10-110	10
<u>B. coagulan</u> CUMC 312	8.5	4.5-11.0	85	10-90	10
<u>B. licheniformis</u> NCLB 6346	9.0	7.0-10.0	90	40-100	11
<u>B. licheniformis</u> 584	6.5	6.0-11.0	76	40-90	12
<u>B. amyloliquefaciens</u> F	5.9	5.5-6.5	65	-	14
<u>B. acidocaldarius</u>	3.5	1.2-6.5	75	-	15
<u>B. licheniformis</u> CUMC 305	6.5	5.0-10.0	48	35-50	16
<u>B. stearothermophilus</u> BS-1	-	6.0-12.0	70	40-70	17
<u>Bacillus</u> sp. NRRL B-3881	9.2	7.5-10.0	50	-	18

ได้มีการจัดแบ่งแอลฟาอะไมเลสตามอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างออกเป็น 3 กลุ่ม (19) คือ แอลฟาอะไมเลส ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดี (thermophilic α -amylase) แอลฟาอะไมเลส ที่ทนความเป็นกรดได้ดี (acidic α -amylase) และแอลฟาอะไมเลสที่ทนความเป็นด่างได้ดี (alkaline α -amylase) จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียเกือบทั้งหมดทนอุณหภูมิสูงได้ดี ตัวอย่างเช่น B. coagulan CUMC 312 (10) ผลิตแอลฟาอะไมเลส ที่มีการทำงานเหลืออยู่ร้อยละ 90 หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง B. acidocaldarius (15) สามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสที่มีการทำงานลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน เอนไซม์จาก B. stearothermophilus (20,21) ยังทำงานได้ดีแม้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน ส่วนใหญ่แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย ที่ทนอุณหภูมิล่าง มักจะทนต่อความเป็นกรดต่างได้ในช่วงแคบ แต่ก็ยังมีแบคทีเรียบางชนิด เช่น B. licheniformis CUMC 305 (10) B. coagulan CUMC 312 (10) B. acidocaldarius (15) ซึ่งนอกจากจะทนความร้อนได้สูงแล้วยังมีความคงทนต่อความเป็นกรดต่างได้ใน

ช่วงกว้างอีกด้วย ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรม

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดยแบคทีเรีย

การปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย โดยการผันแปรองค์ประกอบของอาหารทั้งชนิดและสัดส่วนโดยการลองผิดลองถูก เพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสได้มากขึ้น เป็นวิธีที่นักจุลชีวอุตสาหกรรมใช้กันมาเป็นเวลานาน ในปี 1943 Fukumoto (22) ทำการศึกษาชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ของแอลฟาอะไมเลสทำให้วิธีการดังกล่าวเปลี่ยนไป หันมาศึกษาการเจริญของเซลล์ สารอาหารที่แบคทีเรียต้องการ และการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ ซึ่งเป็นวิธีพัฒนาการผลิตที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในแบคทีเรียบางชนิด การผลิตแอลฟาอะไมเลสจะสูงที่สุดภายหลังจากที่เซลล์เข้าสู่การเจริญคงที่ (stationary phase) แล้ว (23) ซึ่งต่อมาก็มีการพบความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างแอลฟาอะไมเลสและแนวโน้มในการแตกตัวของเซลล์ (lysis) (24) คือจะมีการกระตุ้นการทำงานของออโตไลติกเอนไซม์ (autolytic enzyme) ที่บริเวณผนังเซลล์ เมื่อการเจริญ และเมตาบอลิซึม (metabolism) มีอัตราเร็วลดลงในขณะที่เซลล์เข้าสู่การเจริญคงที่ ซึ่งเป็นการปลดปล่อยแอลฟาอะไมเลส แต่มีแบคทีเรียบางชนิด เช่น B. subtilis (25) และ B. stearothermophilus (26) จะสร้างแอลฟาอะไมเลสในขณะที่เซลล์มีการเจริญทวีคูณ (logarithmic phase) และจะเพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับปริมาณเซลล์ ซึ่งได้มีการอธิบายว่าในกรณีนี้ การปลดปล่อยแอลฟาอะไมเลสและการสร้างออโตไลติกเอนไซม์ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะการเจริญ (27)

แหล่งของคาร์บอน (carbon source) เป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดยแบคทีเรีย ได้มีรายงานว่า แล็กโตส (lactose) และกาแล็กโตส (galactose) สามารถกระตุ้นการสร้างแอลฟาอะไมเลสได้ ในขณะที่กลูโคสและฟรุกโตส (fructose) ส่งเสริมอัตราการหายใจ แต่ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (28) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาใน B. licheniformis CUMC 305 (16) พบว่ากลูโคสความเข้มข้นต่ำมาก ๆ จะสามารถกระตุ้นการสร้างแอลฟาอะไมเลสได้ แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการสร้างอย่างสมบูรณ์ แบคทีเรียจะใช้แล็กโตสในอัตราที่ต่ำกว่าน้ำตาลหรือกรดอินทรีย์ตัวอื่นในการหายใจ

แสดงให้เห็นว่าการมีเมตาบอลิซึมต่ำมีผลให้มีการสร้างแอลฟาอะไมเลส่มาก นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นกลุ่มหนึ่งพบว่า แหล่งคาร์บอนไม่เพียงแต่จะมีผลต่อรูปแบบการสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลสเท่านั้น แต่ยังมีผลต่อความเร็วในการสลายคาร์โบไฮเดรตด้วย ซึ่งความเร็วในการสลายคาร์โบไฮเดรตมีสูงเท่าใด การยับยั้งการสร้างแอลฟาอะไมเลสก็ยิ่งมากเท่านั้น (1) ใน B.stearothermophilus (26) การผลิตแอลฟาอะไมเลสจะเป็นส่วนกลับกับการเจริญสำหรับการเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่ไม่ใช่โมลโตส ฟรุคโตส และแป้ง ใน B.subtilis (1) ก็มีแนวโน้มทำนองเดียวกัน สำหรับอาหารที่มีกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส (sucrose) เชื้อจะมีการเจริญดี แต่ผลิตแอลฟาอะไมเลสได้ในปริมาณน้อย ในขณะที่อาหารที่มีไกลโคเจน แล็กโตส กาแล็กโตส เรฟไฟโนส (raffinose) และไซโลส (xylose) เชื้อจะมีการเจริญต่ำแต่ผลิตแอลฟาอะไมเลสได้ดี ชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะไมเลสแบคทีเรียบางชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 4

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลสขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid) มีรายงานว่าเคซีน (casein) และสารสกัดจากถั่วเหลืองซึ่งได้จากการต้มถั่วเหลืองในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เสียจาง เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการสร้างแอลฟาอะไมเลส (29) นอกจากนี้มีรายงานว่าเคซีนที่ปราศจากวิตามิน กากถั่วเหลือง เจลาติน (gelatin) และสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) สารสกัดจากตับ (bacto-liver) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) สำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลส ในกรณีของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท ฯลฯ นั้น มีรายงานว่าไม่ช่วยให้การผลิตแอลฟาอะไมเลสมากขึ้น (16) ชนิดและปริมาณ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดยแบคทีเรียบางชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 4

นอกจากแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนแล้ว เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตแอลฟาอะไมเลส มีรายงานว่า ฟอสเฟต (phosphate) เป็นตัวกระตุ้นการสร้างแอลฟาอะไมเลสที่สำคัญ (28) นอกจากนี้ Mn^{2+} Zn^{2+} Na^{+} และ Fe^{3+} จะกระตุ้นการสร้างแอลฟาอะไมเลสได้เป็นอย่างดี (25, 28, 30) แต่ในอุตสาหกรรมไม่จำเป็นต้องเติมเกลือของอ็อกซิดดังกล่าว เพราะจะมีอยู่แล้วในวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาใน B.licheniformis CUMC 305 พบว่า Ag^{+} และ Hg^{+}

จะยับยั้งการสร้างแอลฟาอะไมเลส ในขณะที่ Fe^{3+} Mg^{2+} Mn^{2+} และ Cu^{2+} กระตุ้นการสร้าง
แอลฟาอะไมเลส นอกจากนี้ไอออนต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว Ca^{2+} เป็นไอออนที่สำคัญมากต่อการผลิต
แอลฟาอะไมเลส เนื่องจากแอลฟาอะไมเลส เป็นเมทัลโลเอนไซม์ (metalloenzyme) ที่มี
แคลเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) จากการศึกษาใน *B.amyloliquefaciens* (31)
พบว่า การเติมแคลเซียมคลอไรด์มีผลให้การผลิตแอลฟาอะไมเลสสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แต่ใน
อุตสาหกรรม ถ้าใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ก็ไม่จำเป็นต้องเติมอีก เพราะ
มีอยู่แล้วมากพอ (1) ชนิดและปริมาณเกลืออนินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะไมเลส โดย
แบคทีเรียบางชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	องค์ประกอบและปริมาณ (กรัม/ลิตร)			เอกสารอ้างอิง
	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	เกลืออนินทรีย์	
<u>B.licheniformis</u> NCIB 8061	แป้งมันฝรั่ง, 40	ถั่วเหลืองบด, 30 ข้าวบาร์เลย์บด, 100	CaCO ₃	5
<u>B.licheniformis</u> NCIB 8059	แป้งมันฝรั่ง, 200	ถั่วเหลืองบด, 75	Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄	5
<u>B.licheniformis</u> ATCC 6634	แป้งมันฝรั่ง, 40	ข้าวบาร์เลย์บด, 100 ถั่วเหลืองบด, 30	CaCO ₃ , Na ₂ SO ₄	5
<u>B.acidocaldarius</u>	แป้ง, 5	สารสกัดจากยีสต์, 5 แอมโมเนียมซัลเฟต, 2.5	MgSO ₄ , KH ₂ PO ₄ CaCl ₂	15
<u>B.licheniformis</u> CUMC 305	แป้ง, 2	เปปโตน, 5 แอมโมเนียมฟอสเฟต, 2	MgSO ₄ , FeCl ₃ Na ₂ CO ₃	16
<u>B.stearothermophilus</u>	แป้งมันฝรั่ง, 15 แล็กโตส, 5	แอมโมเนียมฟอสเฟต, 10 โซเดียมกลูตาเมต, 3.5	CaCl ₂ , KH ₂ PO ₄ , NaCl MgSO ₄ , FeSO ₄ , Biotin, vit B,	17
<u>B.amyloliquefaciens</u>	เดกซ์ทริน, 50	สารสกัดจากถั่วเหลือง, 50 แอมโมเนียมฟอสเฟต, 12	MgSO ₄ , KCl	31
<u>B.subtilis</u> FERM-P	แป้งมันฝรั่ง, 80	สารสกัดจากถั่วเหลือง, 10 โพลีเปปโตน, 10	-	32

5. การเตรียมแอลฟาอะไมเลสในเชิงการค้า

แอลฟาอะไมเลสที่ขายสู่ตลาด มีทั้งอยู่ในรูปของเหลวและของแข็งขึ้นอยู่กับชนิดของอุตสาหกรรมที่จะนำไปใช้ ในการแยกเซลล์และกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำลำ (fermented broth) ทำโดยการกรองภายใต้ความดัน (rotary vacuum filter) หรือโดยการเหวี่ยงด้วยความเร็ว (centrifuge) (1) ในการเตรียมเอนไซม์เหลว มักจะทำให้เข้มข้นเสียก่อน โดยการระเหยภายใต้สูญญากาศ (vacuum dry) หรือโดยการกรองภายใต้ความดัน (ultrafiltration) เพื่อให้เอนไซม์มีการทำงานจำเพาะ (specific activity) สูงขึ้น ในการเตรียมเอนไซม์ผงทำได้โดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต หรือตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน (acetone) เมธานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) ฯลฯ หลังจากนั้นก็ทำให้แห้ง ซึ่งทำได้โดยทิ้งไว้ในอากาศ หรือเดซิเคเตอร์ (dessicator) ที่อุณหภูมิต่ำ และทุกขั้นตอนมักจะมีการเติมแคลเซียมเพื่อช่วยรักษาสีถัยรภาพของเอนไซม์และได้ยิลด์ (yeild) สูงสุด

ขั้นตอนการเตรียมแอลฟาอะไมเลสในเชิงการค้า โดยวิธีต่าง ๆ ลสรุปไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเตรียมแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียในเชิงการค้า

แบคทีเรีย	สภาพของ เอนไซม์ที่ได้	วิธีการเตรียม	การทำงานค่า- เพาะ (หน่วย/ กรัม (มล))	เอกสารอ้างอิง
<u>B.licheniformis</u> NCIB 8061	ผง	ตกตะกอนด้วยอะซีโตน	55,000	5
<u>B.subtilis</u> FERM-P 374	ผง	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต	360,000	32
<u>B.subtilis</u> FERM-P 3881	ผง	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต	19,000	32
<u>Bacillus</u> sp.NRRL-B3881	ของเหลว	ทำให้เข้มข้นโดยการกรอง แบบจุลตรา	90,000	33
<u>Bacillus</u> sp. ATCC 21783	ผง	ตกตะกอนด้วยอะซีโตน	200,000	34
<u>B.stearothermophilus</u> ATCC 7954	ผง	ตกตะกอนด้วยเอธานอล เข้มข้นร้อยละ 95	-	35
<u>B.macerans</u>	ผง	ตกตะกอนด้วยอะซีโตน	-	36

6. บทบาทของแอลฟาอะไมเลสในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ

อะไมเลสมีบทบาทในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ มากมาย ตัวอย่างเช่น ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำเชื่อมจากแป้ง ซึ่งน้ำเชื่อมจะต้องมีค่าสมมูลย์เดกซ์โตรส (dextrose equivalent) มากกว่า 50 กระบวนการนี้จำเป็นต้องใช้แอลฟาอะไมเลสย่อยสลายพันธะของแป้ง เพื่อให้แป้งมีโมเลกุลเล็กลง และลดความหนืด เพื่อเหมาะสมสำหรับการทำงานของกลูโคอะไมเลสขั้นต่อไป (1)

ในอุตสาหกรรมทอผ้าจำเป็นต้องใช้แป้งเคลือบเส้นด้ายดิบ เพื่อให้เหนียวไม่ขาดขณะทอ หลังจากทอผ้าเสร็จแล้ว ต้องนำแป้งที่เคลือบเส้นด้ายออกด้วยแอลฟาอะไมเลส (1)

ในอุตสาหกรรมทำเยลลี่ (jelly) น้ำผลไม้ที่ใสจะข้นมากเนื่องจากมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องมีการเติมแอลฟาอะไมเลสลงไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80-95 องศาฟาเรนไฮด์ น้ำผลไม้ที่ได้จะใสเหมาะสมสำหรับทำเยลลี่ต่อไป (1)

ในอุตสาหกรรมทำขนมปังจะมีการเติมแอลฟาอะไมเลส เพื่อทำให้โมเลกุลของแป้งมีขนาดเล็กลง แล้วเติมกลูโคอะไมเลส เปลี่ยนแป้งบางส่วนเป็นน้ำตาล (1)

ในอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ที่มีแป้งเป็นวัตถุดิบ จะมีการใช้แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลก่อนการหมักด้วยยีสต์ (1)

7. เหตุฉุกเฉินในการทำวิจัย

แอลฟาอะไมเลสมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภทดังกล่าวแล้ว แต่ในประเทศไทย ยังไม่มีการผลิตแอลฟาอะไมเลสเป็นการค้า จึงจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จากข้อมูลของกรมศุลกากร (37) พบว่า มีการนำเข้าของแอลฟาอะไมเลสจากต่างประเทศมูลค่าปีละหลายล้านบาท ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณและมูลค่าแอลฟาอะไมเลสที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

ปี พ.ศ.	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2519	2,620	193,667
2520	5,580	1,549,287
2521	8,600	1,803,743
2523	36,505	6,427,110
2524	34,230	5,198,088

ดังนั้นการศึกษากการผลิตแอลฟาอะไมเลสอย่างจริงจังเป็นสิ่งจำเป็นมาก และเพื่อความ
เป็นไปได้อีกในอนาคต ควรจะใช้วัตถุดิบที่หาได้ในประเทศและราคาถูก

สำหรับแหล่งของคาร์บอนที่หาง่ายและราคาถูก คือ แปะมันสำปะหลัง ซึ่งจากราย
งานของสำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 97.5 ส่วนแหล่ง
ไนโตรเจนสามารถแยกจากหัวเหียงและกากรำข้าวที่สกัดน้ำมันแล้ว ซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือใช้
จากโรงงานน้ำมันพืชและมีปริมาณโปรตีนสูงร้อยละ 50.5 และ 16 ตามลำดับ

8. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษากการผลิตแอลฟาอะไมเลสจาก B.amyloliquefaciens KA 63
โดยใช้วัตถุดิบที่มีในประเทศ และราคาถูก
- 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดย B.amylo-
liquefaciens KA 63 ในขวดแก้วทรงกรวย
- 3) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสโดย B.amylo-
liquefaciens KA 63 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 4) เพื่อศึกษากการเตรียมและการเก็บแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตโดย B.amylo-
liquefaciens KA 63 ในเชิงอุตสาหกรรม

009244