บทที่ 2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วารสารปริทัศน์

2.1 ชนิดของอะไมเลส และการทำงาน

2.1.1 ชนิดของอะไมเลส (แบ่งตามความสามารถในการเข้าทำลายพันธะในโมเลกุล)

อะไมเลส เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง ไกลโคเจน และอนุพันธุ์ของโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ต่าง ๆ โดยทำลายพันธะอัลฟา-1, 4-กลูโคซิดิค (α-1, 4-Glucosidic linkage) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และให้ผลผลิตเป็นกลูโคส มอลโตส และเด็กซ์ทริน (Dextrin) (3,50)

2.1.1.1 อัลฟา อะไมเลส หรือ อัลฟา-1, 4-กลูแคน-4-กลูคาโนไฮโดรเลส (α- Amylase or α-1,4-Glucan 4-Glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ซึ่งทำลายพันธะอัลฟา-1, 4-กลูโคซิดิค (α-1, 4- Glucosidic linkage) ภายในโมเลกุลของสารประกอบที่ถูกย่อย (substrate) แบบสุ่ม (random fashion) (3,37,38,50)

2.1.1.2 เบต้า อะไมเลส หรือ อัลฟา-1, 4-กลูแคนมอลโตไฮโดรเลส (β-amylase or α-1,4-Glucan Maltohydrolase) เป็นเอนไซม์ ซึ่งจะทำลายพันธะอัลฟา-1,4-กลูโคซิดิค (α-1, 4- Glucosidic linkage) จากปลายด้านที่ไม่มีกลุ่มรีดิวซิ่ง (non-reducing sugar end) เข้าไปและให้โมเลกุลของมอลโตส (Maltose) เมื่อเอนไซม์พบกับพันธะ อัลฟา-1,6(α-1,6 linkage) เช่น ในอะไมโลเพคติน (Amylopectin) หรือไกลโคเจน การทำงานจะหยุดลงจะได้เด็กซ์ทริน (high-molecular weight limit dextrin) เกิดขึ้น (3,37,38,50)

2.1.1.3 กลูโคอะไมเลส หรือ อัลฟา-1, 4-กลูแคน กลูโคไฮโดรเลส (Glucoamylase,or α-1,4-Glucan Glucohydrolase) เป็นเอนไซม์ซึ่งทำลายพันธะจากปลายด้านที่ไม่มีกลุ่มรีดิวซิ่ง (non-reducing sugar end) เข้าไปเช่นกัน และให้โมเลกุลของกลูโคส

การทำงานของ เอนไซม์จะลดลงอย่างผิดปกติ เมื่อพบกับพันธะอัลฟา-1, 6(α-1, 6 linkage) ในอะไมโลเพคติน หรือไกลโคเจน (Glycogen) (3,37,38,50)

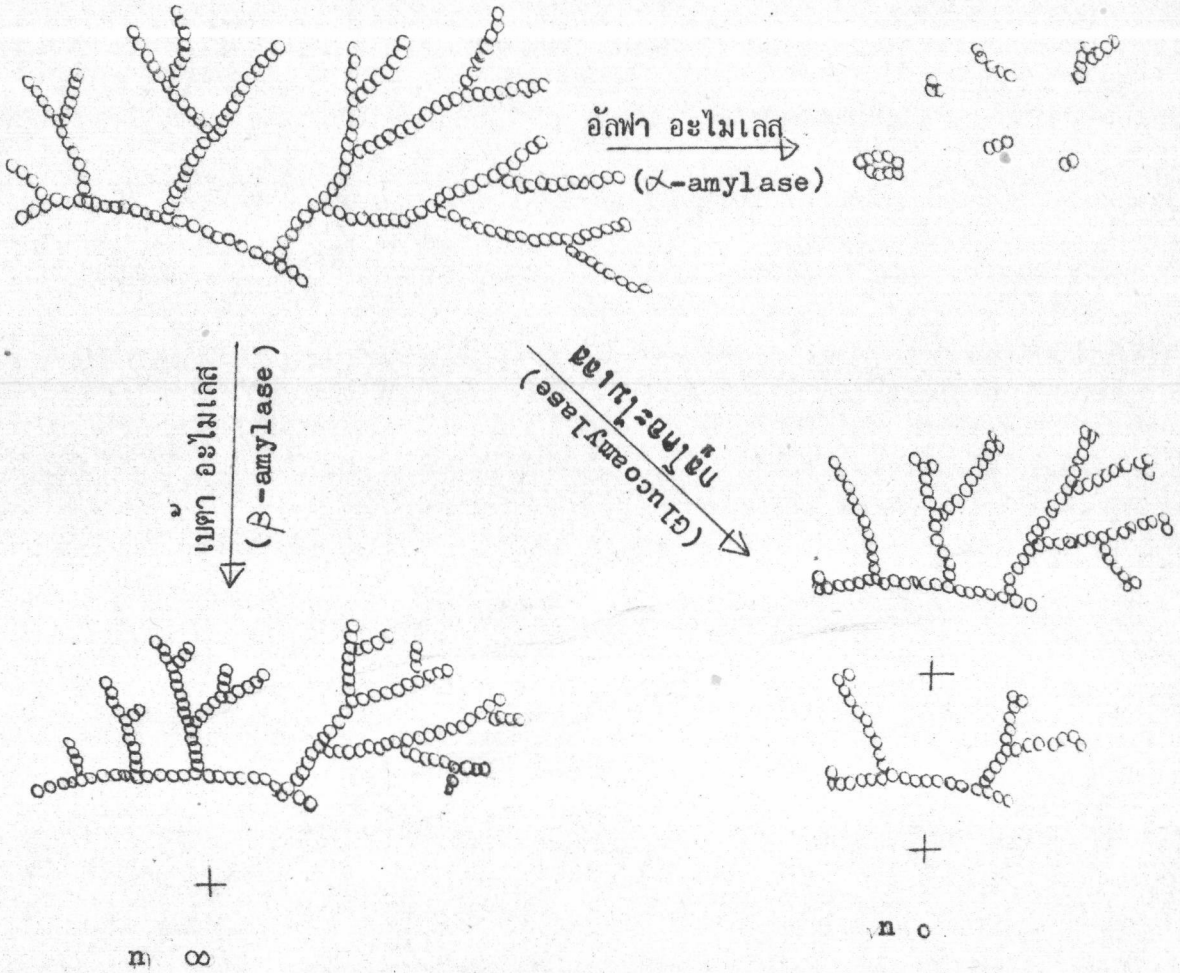
2.1.2 ธรรมชาติของสารประกอบที่ถูกย่อย (Substrate) และผลจากการย่อย

แป้งประกอบด้วยอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ปริมาณของหน่วยกลูโคส (Glucose unit) ในอะไมโลส (Amylose) มีประมาณ 300-400 หน่วย และอะไมโลส (Amylose) ประกอบด้วยพันธะอัลฟา-1, 4-กลูโคซิดิค (α-1, 4- Glucosidic linkage) เท่านั้น อัลฟาและเบต้า อะไมเลส ($\alpha$and β-amylase) จะย่อยสลายพันธะนี้ได้อย่างสมบูรณ์ไปเป็นมอลโตส แต่อย่างไรก็ดีในบางครั้งจะยังคงเหลือมอลโตไตรโอส (Maltotriose) อยู่บ้าง กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) จะย่อยสลายอะไมโลส (Amylose) อย่างสมบูรณ์เป็นกลูโคสเช่นกัน โดยจะมีมอลโตสและมอลโตไตรโอส (Maltotriose) คงเหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดปฏิกริยา ทั้งนี้เพราะการทำงานของ เอนไซม์เป็นไปอย่างช้า ๆ (2,3,16,50)

การย่อยสลายที่สมบูรณ์แต่ช้านี้จะเกิดในอะไมโลเพคติน (Amylopectin) เมื่ออะไมโลเพคตินถูกย่อยด้วยอัลฟาอะไมเลส (α-amylase) เฉพาะโอลิโกเมอร์ (oligomer) ที่มีขนาดเล็กเท่านั้น (ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย) จะเหลืออยู่ ในขณะที่ เบต้า-อะไมเลส (β- amylase) และกลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) จะย่อยสลายจากปลายที่ไม่มีกลุ่มรีดิวซิ่ง (non-reducing sugar end) เข้าไป และการทำงานของ เอนไซม์จะสมบูรณ์ เมื่อทุก ๆ สายของโมเลกุลถูกทำลายจนถึงจุดที่มีพันธะ อัลฟา-1, 6-กลูโคซิดิค (α-1, 6- Glucosidic linkage) ดังนั้นจะได้โพลิเมอร์ (Polymer) ที่มีขนาดใหญ่เหลืออยู่ แต่กลูโคอะไมเลสจะสามารถย่อยสลายพันธะอัลฟา-1, 6 (α-1, 6-linkage) ได้อย่างช้า ๆ (ดังรูป 1) (50)

2.1.3 วิธีทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของ เอนไซม์

โดยทั่ว ๆ ไป วิธีที่ใช้ศึกษาการทำงานของ เอนไซม์ต่อแป้งในระหว่างการย่อยสลายได้แก่ ติดตามอัตราการลดลงของความหนืด ดูความสามารถของแป้งในการให้สีน้ำเงินกับไอโอดีน มีกลุ่มรีดิวซิ่งเพิ่มขึ้น และมีมอลโตส กลูโคส หรือ เด็กซ์ทริน เกิดขึ้น (50,51)



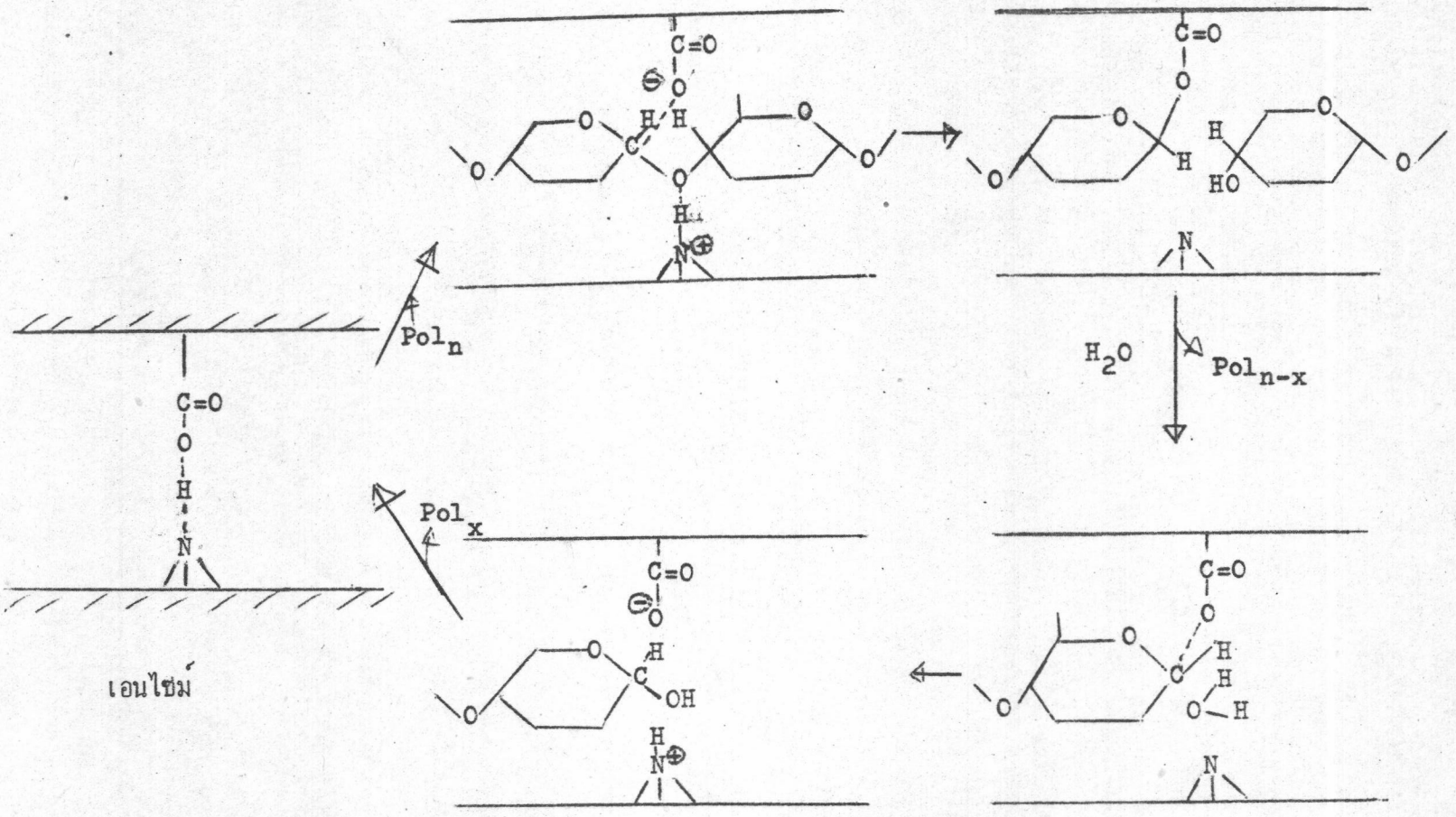
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของอะไมโลเพคติน (Amylopectin) และการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสทั้ง 3 แบบ วงกลมแต่ละวงแทนโมเลกุลของกลูโคส อัลฟาอะไมเลส (α- amylase) จะย่อยสลายอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ให้โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccheride) ซึ่งประกอบด้วย 2-6 โมโนเมอร์ (Monomer) เบตา- อะไมเลส (β- amylase) จะย่อยสลายได้บางส่วนให้มอลโตส จนกระทั่งพบกับพันธะอัลฟา-1,6 (α -1,6 linkage) ก็จะหยุดทำงาน กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) จะย่อยสลายให้กลูโคสโดยทำลายพันธะอัลฟา-1,4-กลูโคซิดิค (α-1,4-Glucosidic linkage) (50)

เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะมีความสามารถในคุณสมบัติเหล่านี้ได้ต่างกัน เช่น อัลฟา อะไมเลส (α- amylase) จะทำลายพันธะอัลฟา-1,4-กลูโคซิดิค (α-1,4-Glucosidic linkage) แบบสุ่ม (random fashion) ทำให้ความหนืดของแป้งและการเกิดสีน้ำเงินกับไอโอดีน (iodine) ลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพราะคุณสมบัติทั้ง 2 ข้อนี้ขึ้นกับความสามารถในการรวมตัวของโมเลกุลของโพลีเมอร์ (Polymer) ที่มีขนาดใหญ่ การย่อยสลายพันธะกลูโคซิดิค (Glucosidic linkage) ที่ใกล้จุดศูนย์กลางของสารประกอบที่จะถูกย่อย (substrate) เพียงหนึ่งพันธะหรือเล็กน้อย จะทำให้คุณสมบัติทางด้านความหนืด และการให้สีน้ำเงินกับไอโอดีนเปลี่ยนแปลงได้มาก ในขณะที่การทำลายพันธะที่ปลายสายของโมเลกุลจากเอนไซม์ประเภท เบต้า อะไมเลส (β-amylase) หรือกลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) จะให้ผลน้อยมาก (40)

อัตราการลดความหนืดหรือการเกิดสีกับไอโอดีนจะไม่สามารถบอกความแตกต่างของเอนไซม์ได้ เพราะอัตราการเปลี่ยนแปลงไม่ได้ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์เท่านั้น แต่ยังขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีอยู่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สูง ๆ ของ เบต้า อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส อาจลดความหนืดได้อย่างรวดเร็ว เพราะมีพันธะที่ถูกทำลายหลายพันธะภายในเวลารวดเร็ว ในทำนองเดียวกันความเข้มข้นต่ำ ๆ ของ อัลฟา อะไมเลส อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติด้านนี้น้อยหรือช้าก็ได้ ดังนั้นจึงใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มรีดิวซิ่งที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ในขั้นพื้นฐานได้ วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาปริมาณของกลุ่มรีดิวซิ่งที่เกิดขึ้นได้แก่ วิธีซึ่งใช้กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5- dinitrosalicylic acid) โปแตสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์ (potassium ferricyanide) และสารละลายอัลคาไลน์คิวปริค (alkaline cupric solution)

2.1.4 <u>อัลฟา อะไมเลส</u> (α - amylase) (36,37,38,50,51,52)

อัลฟาอะไมเลสจะย่อยแบบสุ่ม ที่โมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยอัลฟา-1,4-กลูโคซิลิค (α-1,4- Glucosidic linkage)ผลการย่อยจะได้น้ำตาลมอลโตส (Maltose) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ก็มีมอลโตไตรโอส (Maltotriose) และเพนโตส (Pentose) (51,52) (ดังรูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงการทำงานของ อัลฟา อะไมเลส และสูตรโครงสร้างของมัน (14)

(Proposed Mechanism of Action of Amylases)

อัลฟา-อะไมเลสมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมทำขนมปัง (Baking) เครื่องดื่ม (beverage) แอลกอฮอล์ (alcohol) ซึ่งแป้งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นมอลโตส (Maltose) และอุตสาหกรรมแป้ง (Starch Industry) เป็นต้น (20,36,37,38)

อัลฟา อะไมเลส พบในพืช (13) ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวมอลล์ ส่วนสัตว์ ได้แก่ จากน้ำลาย เลือด และจุลินทรีย์ จากพวกรา Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, บักเตรี Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens โดยคุณสมบัติของอัลฟา-อะไมเลส จะมีโครงสร้างเป็นโปรตีน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) มาต่อกันเป็นสายยาว โดยส่วนประกอบของกรดอะมิโนจะแตกต่างกันตามแหล่งกำเนิดของเอนไซม์ (ดังตารางที่ 1), มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 (52) เป็นกรดอ่อน ๆ (slighly acidic) เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีแตกต่างออกไปตามแหล่งกำเนิดของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2)

2.2 อุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (2, 18, 35, 37, 38, 47)

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตควรเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobic organism) ในการเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซล (Extracellular enzyme) เพราะเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าพวกที่สร้างเอนไซม์ไว้ในเซล (Intracellular enzyme) กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์ที่ทำเป็นการค้ามี 2 วิธีคือ

2.2.1 Semi-solid culture หรือ Tray process

วิธีนี้ใช้ผลิตเอนไซม์เป็นการค้าในเอเชีย โดยเฉพาะญี่ปุ่น ซึ่งปัจจุบันยังใช้อยู่ (20) โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ (โดยเฉพาะเชื้อราใช้มากกว่าบักเตรี) ในอาหารที่มีน้ำผสมอยู่ 50% อาหารเลี้ยงเชื้ออาจใช้รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี มันสำปะหลัง หรือแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ในบางครั้งอาจมีการเติมสารอาหารเสริมพวกโปรตีน เกลือแร่ ฯลฯ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการฆ่าเชื้อ (Sterilization) แล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใส่จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ลงไปคลุกเคล้าให้ทั่วและแผ่กระจายไปบนถาด ยกไปบ่ม (Incubation) ในตู้หรือห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ, ความชื้นในขณะบ่มจะมีการฆ่าเชื้อในอากาศที่เข้าไปยังถาดเลี้ยงเชื้อ เพื่อป้องกันการปะปนของเชื้ออื่น ในระหว่างบ่ม อาจมีการตรวจสอบ Activity ของเอนไซม์เป็นระยะ ๆ

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของอัลฟา-อะไมเลส จากแหล่งกำเนิดต่าง ๆ (กรัมของกรดอะมิโน ต่อ 100 กรัมของโปรตีน) (14)

(Amino acid) กรดอะมิโน	อัลฟา อะไมเลสจากตอมน้ำลาย	อัลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อน	อัลฟา-อะไมเลส จาก B. subtilis		อัลฟา-อะไมเลส จาก A. oryzae	
Aspartic acid	19.3	14.5	15.09	14.49	16.53	15.91
Threonine	4.5	3.9	6.36	5.59	10.86	8.38
Serine	7.8	4.1	6.24	5.21	6.48	6.04
Glutamic acid	9.6	10.5	13.46	12.94	6.95	8.09
Proline	3.6	3.6	4.14	3.37	4.18	4.22
Glycine	6.82	6.7	5.64	6.01	6.59	5.68
Alanine	4.43	6.9	6.02	5.29	6.80	5.92
Valine	6.89	7.8	5.55	6.14	4.69	6.03
Methionine	2.4	2.1	1.26	1.47	2.20	2.14
Isoleucine	5.80	11.5	3.97	4.55	5.20	6.34
Leucine	5.77		6.42	6.10	8.30	7.64
Tyrosine	5.51	5.3	8.31	9.05	9.55	10.88
Phenylalanine	7.20	10.1	5.85	6.01	4.25	3.99
Histidine	3.24	3.9	3.80	3.90	2.02	1.82
Lysine	6.33	4.9	7.30	7.42	5.94	4.77
Arginine	8.75	5.8	6.78	6.09	2.72	2.97
Tryptophan	7.2	6.7	6.19	6.22	3.97	3.78
Half-cystine	4.4	2.3	0	0	1.6	2.09
Ammonia	-	1.6	13.2	1.74	1.50	1.68

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของอัลฟา อะไมเลส จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ (51)

คุณสมบัติ	บักเตรี		รา		อื่น ๆ	
	Liquefying	Saccharifying	Rhizopus	A.oryzae or A.niger	Endomycopsis	Oospora
Heat stability, °C	65-90	55-70	50-65	50-70	3.5	50-70
pH stability	4.8-10.6	4.0-7.8	5.4-7.0	4.7-9.5	6.0-7.5	6.0-10.5
Optimum pH	5.4-6.0	4.8-5.2	3.6	4.9-5.2	5.4-	5.6
Activity/mg	1800	1190	475	980	760	970
Adsorption on starch	++	-	+	+	+	+
Stability by Ca ion	+	-	-	+	?	+
Action on starch						
Maximum hydrolysis ratio (%)	35	70	48	48	90	37
Main product	Dextrin Maltose	Glucose Maltose Maltotriose	Maltose	Maltose	Glucose	Dextrin Maltose
Action on maltose	-	-	-	-	+	-
Action on phenylmaltose	-	+	+	+	+	-

จนได้ปริมาณมากที่สุด จึงทำการแยกเอนไซม์ออก โดยการสกัดเอนไซม์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำ หรือบัฟเฟอร์ แล้วทำการกรองส่วนของเหลวที่ได้ก็คือเอนไซม์ (2,21,35,43,48)

2.2.2 Submerged culture

วิธีนี้ใช้กันมากในการผลิตเอนไซม์ในแถบยุโรปและอเมริกา ซึ่งใช้ได้ทั้งกับบักเตรีและรา ประกอบไปด้วยถังหมัก โดยจะต้องมีลักษณะเหมาะสมสามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ และสามารถบันทึกและควบคุมสภาวะแวดล้อม ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ ได้ เช่น อัตราการกวน pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารอาหาร อัตราการให้อากาศ ตลอดจนการชักตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ และถ่ายเทน้ำหมักจากถังหมักหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่งภายใต้สภาพที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ โดยรูปแบบของถังจะมีลักษณะเป็นทรงกระบอกตั้งตรงในแนวดิ่ง มีส่วนประกอบต่าง ๆ ได้แก่ ใบกวน ท่อให้อากาศที่ปลอดเชื้อ Baffle ท่อน้ำสำหรับถ่ายเทความร้อน และมีระบบการให้ความร้อน โดยวัสดุที่ใช้ในการสร้างถังหมักอาจเป็นแก้ว ไม้ หรือเหล็ก โดยกรณีของแก้วจะใช้กับถังหมักขนาดเล็ก ซึ่งมีข้อดีคือมีพื้นผิวเรียบ ไม่เป็นพิษ ไม่เกิดการกัดกร่อน สามารถมองเห็นลักษณะของน้ำหมักภายในได้ และทนต่อแรงกดดันได้สูง เพราะในระหว่างการฆ่าเชื้อ โดยปกติเราจะใช้ไอน้ำที่มีความดันสูงถึง 15-20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (5,8,35,51)

นอกจากใช้ถังหมักที่มีขนาดความจุมากแล้ว อาจใช้ flask แล้วบ่มไว้บนเครื่องเขย่า โดยมีอัตราการสั่นแตกต่างกัน เพื่อใช้ในการหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และ strain ของเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ (2,5)

ในการผลิตเอนไซม์เป็นการค้า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้หมักใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่นพวกมันสำปะหลัง (22,25) ยีสต์แห้ง (11) และบางครั้งอาจเติมสารอื่น ๆ ที่จำเป็นเช่น เกลือแร่ ฯลฯ ลงไปด้วย

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของทั้งสองวิธีนี้

2.3 ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการผลิตอัลฟา อะไมเลส ได้แก่ (2,22,51)

1. ชนิดของจุลินทรีย์และระบบของเมตาโบลิซึม

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยวิธี Semi-solid และ Submerged process (22)

Semi-solid	Submerged process
1) ต้องการเนื้อที่เป็นจำนวนมาก เพื่อที่จะใช้ขยายถาดเลี้ยงเชื้อ	1) ใช้ถังหมัก (Fermentor)
2) ใช้แรงงานมาก	2) ใช้แรงงานน้อย
3) ระบบการควบคุมต่าง ๆ มีน้อย	3) ระบบการควบคุมต่าง ๆ ต้องระมัดระวังอย่างมาก
4) เกิดปัญหา contamination มีน้อย	4) ปัญหา contamination เป็นปัญหาที่ต้องระวังมาก
5) Recovery ของเอนไซม์ ประกอบด้วยการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย การกรองหรือ Centrifugation และบางครั้งก็ทำให้น้ำระเหยและ/หรือทำการตกตะกอนเอนไซม์	5) Recovery ประกอบด้วยการกรอง หรือ Centrifugation และบางครั้งก็ทำให้น้ำระเหยและ/หรือทำการตกตะกอนเอนไซม์

2. ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราส่วนระหว่างแหล่งของคาร์บอน กับไนโตรเจน และแร่ธาตุต่าง ๆ

4. สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ pH การให้อากาศ (aeration) และการกวน (agitation)

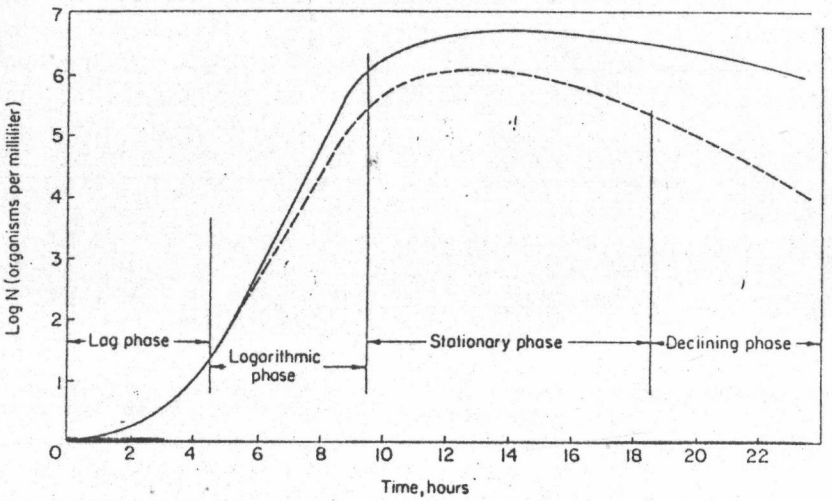
2.3.1 ชนิดของจุลินทรีย์ และระบบของเมตาโบลิซึม (2,22,51) โดยมีหลักการพิจารณาคือ จะต้องคัดเลือกชนิดของเชื้อหรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มี Activity สูงสุด มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว และใช้อาหารได้อย่างกว้างขวาง ไม่เป็นเชื้อโรคหรือสร้างสารพิษ หรือสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นที่ยากต่อการกำจัดปะปนออกมาด้วย ไม่กลายพันธุ์ง่าย และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มาก สามารถแยกเอนไซม์ออกจากส่วนประกอบทั้งหมดของเซลได้ง่าย

ในปี 1878 Dr. Ahlburg (9) เป็นผู้แยกพบเชื้อรา Aspergillus oryzae จากโคจิในการหมักซีอิ๊วเป็นครั้งแรก และต่อมาได้มีการศึกษาประสิทธิภาพและชนิดของเอนไซม์ของเชื้อราชนิดนี้กันอย่างกว้างขวาง และในปี 1957 Yamamoto (53) พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจาก A.oryzae ได้ในปริมาณที่สูงเช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอส (Protease)

2.3.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส โดยลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะแบ่งเป็น 4 ช่วงคือ Lag phase, Logarithmic phase, Stationary phase และ Declining phase (ดังรูปที่ 3) ซึ่งในการผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่จะตัดช่วง lag phase ให้น้อยลงหรือให้หมดไป เพื่อลดระยะเวลาในการผลิตให้สั้นลง และประหยัดพลังงานด้วย เมื่อเชื้ออยู่ในช่วง Logarithmic phase ก็จะเริ่มมีการผลิตเอนไซม์ออกมาและจะมีค่ามากที่สุดเมื่อเข้าสู่ช่วง Stationary phase (22,51) ในช่วง Stationary phase เชื้อจะเจริญเติบโตได้ช้าลง และจะเริ่มตายหรือย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) ซึ่งเข้าสู่ช่วง Declining phase (51)

2.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ, อัตราส่วนของวัตถุดิบระหว่างแหล่งของคาร์บอน กับไนโตรเจน และแร่ธาตุต่าง ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเป็นในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์จากรานั้น (25) จะประกอบด้วยคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสเฟต เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นก็มีพวกอิออนโลหะ (metal ion) ได้แก่ Mg^{++} หรือ heavy metal ion บางตัวได้แก่ Mn^{++}, Zn^{++}, Na^{+}, Fe^{++}

ส่วนพวกวิตามิน (vitamin) cation หรือ anion ตัวอื่น ๆ จะมีผลต่อการผลิตเส้นใย (mycelial growth) และอัลฟา-อะไมเลส (amylase synthesis) น้อย



รูปที่ 3 แสดงระยะการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (22)

<u>แหล่งของคาร์บอน</u> (carbon source) จะทำหน้าที่ (22) เป็นสารอาหารที่จำเป็น essential nutrient สำหรับการเจริญเติบโตของราและเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้าง อัลฟา-อะไมเลส แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน มอลโตไตรโอส

แป้งจะทำหน้าที่เป็นแหล่งของคาร์บอนในการผลิตอัลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด (22) ส่วนกลูโคส ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลเล็กกว่า จะให้เอนไซม์ออกมาน้อย ทั้งนี้เนื่องจากการที่เชื้อราจะสร้างอะไมเลสออกมานั้นจะต้องได้รับการกระตุ้นด้วยสารประกอบที่มี α-1,4-กลูโคซิดิค (α-1, 4-Glucosidic linkage) (22) โดยลำดับความสามารถของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์อัลฟ่า-อะไมเลสมีดังนี้คือ (21) แป้ง (starch) ไกลโคเจน มอลโตไตรโอส เด็กซ์ทริน มอลโตส ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส (fructose) เล็คโตส (lactose) กลีเซอรัล (glycerol) กาแลคโตส (galactose)

007320

สำหรับกลูโคสนั้นอาจมีผลไปยับยั้งการเกิดอัลฟา-อะไมเลสได้เนื่องจาก (22) เชื้อราสามารถนำกลูโคสไปใช้ในขบวนการเมตะโบลิซึมได้เลยโดยไม่จำเป็นต้องสร้างอัลฟา-อะไมเลสออกมา

แป้งที่นำมาใช้อาจอยู่ในรูปของ เมล็ดพืช (whole meal) หรือรูปของแป้ง (starch) โดยมาจากธัญพืช (cereals) ต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวโพด (maize) ข้าวสาลี (wheat) ข้าวไรน์ (rye) ข้าวฟ่าง (sorghum) ข้าวบาร์เลย์ (barley) มันฝรั่ง (potato) มันสำปะหลัง (cassava) เป็นต้น การที่จะเลือกใช้แป้งชนิดไหนนั้นมีข้อพิจารณาคือ ควรจะผลิตได้ในประเทศ ราคาถูก หาง่าย เป็นวัตถุดิบที่มีทุกฤดูกาล ไม่มีกรรมวิธีผลิตยุ่งยากนัก และมีแนวโน้มที่จะให้อัลฟา อะไมเลสสูง

<u>แหล่งของไนโตรเจน</u> ทำหน้าที่ (21) เป็น precursor ของกรดอะมิโน (amino acid) ที่ราจะนำไปใช้สร้างเอนไซม์และโปรตีนภายใน ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของรา ตลอดจนเป็นตัวทำให้เกิดสภาวะสมดุลย์ของอาหารเสริมในการผลิตเอนไซม์ และ pH อย่างถูกต้อง

แหล่งของไนโตรเจนที่สามารถใช้ได้อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ (22,26,27,42) เช่น ของเสียจากโรงงานกลั่นเหล้า เบียร์ น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เมล็ดฝ้าย เมล็ดถั่ว เป็นต้น เหล่านี้ล้วนอยู่ในรูปอินทรีย์สาร ส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ก็มี แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) และ ยูเรีย เป็นต้น คุณภาพของแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ก็จะขึ้นกับชนิดของกรดอะมิโน (amino acid) ที่เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ การที่จะเลือกแหล่งของไนโตรเจน เป็นอะไรนั้นจะต้องคำนึงถึงราคา เป็นวัสดุหาง่าย หรือเป็นของเสียหรือของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น จากโรงงานสุราหรือเบียร์ ซึ่งจะมีของเสียที่เป็นโปรตีนจากเซลยีสต์ออกมาวันละมาก ๆ อันจะเป็นการกำจัดของเสีย (waste) ของโรงงานดังกล่าวไปในตัวด้วย และยังเป็นผลดีต่อสภาพแวดล้อมของแม่น้ำลำคลอง เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียไปในตัว

ของเสียจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ หรือเบียร์ สามารถใช้เป็นแหล่งของโปรตีนที่ดี (26,27) เนื่องจากจะมีเซลยีสต์ที่ใช้ในการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์อยู่ด้วย ยีสต์ดังกล่าวจะมีโปรตีนสูงประมาณ 45.0% โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4) และมีกรดอะมิโน (amino acid) ที่คล้ายคลึงกับที่เป็นโครงสร้างของอัลฟา-อะไมเลสของรามาก (ตารางที่ 5)

แร่ธาตุต่าง ๆ มีแร่ธาตุอยู่หลายตัวที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการสร้างเอนไซม์ เช่น เกลือฟอสเฟต (phophate) จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการผลิตพลังงานสำหรับใช้ในกิจการของเซล

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของยีสต์ชนิดต่าง ๆ (กรัม/100 กรัมโปรตีน)

(Gross composition of various food yeasts) (23)

ส่วนประกอบ (constituent)	S. cerevisiae molasses	C. utilis sulphite liquor	S. fragilis milk whey	S. cerevisiae beer
Protein	50	55	54	45
Lipids	6	5	1	6
Moisture	5	6	7	6
Ash	7	8	9	8
Sodium	0.3	0.001	-	0.2

ตารางที่ 5 กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในยีสต์ชนิดต่าง ๆ (กรัม/100 กรัมโปรตีน)
(Essential amino acid composition of various food yeasts)(23)

Amino acid	S.cerevisiae molasses	C.utilis sulphite liquor	S.fragilis milk whey	S.cerevisiae beer
Lysine	8.2	6.7	8.8	7.3
Valine	5.5	6.3	6.6	5.2
Leucine	7.9	7.0	9.9	6.3
Isoleucine	5.5	5.3	5.5	5.7
Threonine	4.8	5.5	5.5	4.8
Methionine	2.5	1.2	1.5	1.2
Phenylalanine	4.5	4.3	3.9	4.4
Tryptophan	1.2	1.2	1.5	1.1
Histidine	4.0	1.9	2.5	1.5
Arginine	5.0	5.4	4.9	4.7

และเป็นตัวปรับหรือควบคุม pH (Buffering agent) ในอาหาร ส่วน Mg^{++} จะมีความสำคัญในขบวนการเมตะโบลิซึมของเซล และมีผลอย่างมากต่อการผลิต อัลฟา อะไมเลส โดยพบว่าถ้าไม่ใส่ Mg^{++} ลงไปจะทำให้ได้เอนไซม์ลดลงถึง 50% (25) สำหรับ Trace element นอกจากพวก Fe^{++} แล้วก็ไม่มีตัวไหนที่มีความสำคัญมากต่อการผลิตอะไมเลส

2.3.4 <u>สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์</u> ซึ่งได้แก่อุณหภูมิ การให้อากาศ และการกวน

- <u>อุณหภูมิ</u>

บักเตรีและราส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมมักจะเจริญได้ดีในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส (2,33) แต่บางพวกก็ต้องการอุณหภูมิสูงในการเจริญ (thermophile) คือเจริญได้ดีที่ 45-65 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงอุณหภูมินี้จะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ ได้ง่าย (2)

ดังนั้นในขณะที่ทำการผลิต ต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ เพื่อให้ได้ผลผลิตตรงตามต้องการ นั่นคือ ต้องมีระบบการให้ความร้อนในตอนเริ่มแรก และให้ความเย็นในเวลาต่อมา เนื่องจากเมื่อเชื้อเจริญจะให้ความร้อนออกมา (22,49)

- <u>pH</u>

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันไป (49) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุม pH ให้คงที่ เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ได้อย่างเต็มที่ การที่จะใช้บัฟเฟอร์ (buffer) เช่น ฟอสเฟต เป็นตัวปรับ pH นั้นทำได้ยากในแง่อุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามอาจใช้สารที่มีราคาถูกกว่าเช่น (45) กรดเกลือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ แอมโมเนีย มาใช้ปรับ pH แทน

- <u>การให้อากาศและการกวน</u> (Aeration and Agitation)

การให้อากาศมีความจำเป็นมากสำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน เพราะถ้าอาศัยออกซิเจนจากอากาศที่ละลายลงไปตามธรรมชาติแล้ว เชื้อจะได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอกับความต้องการ

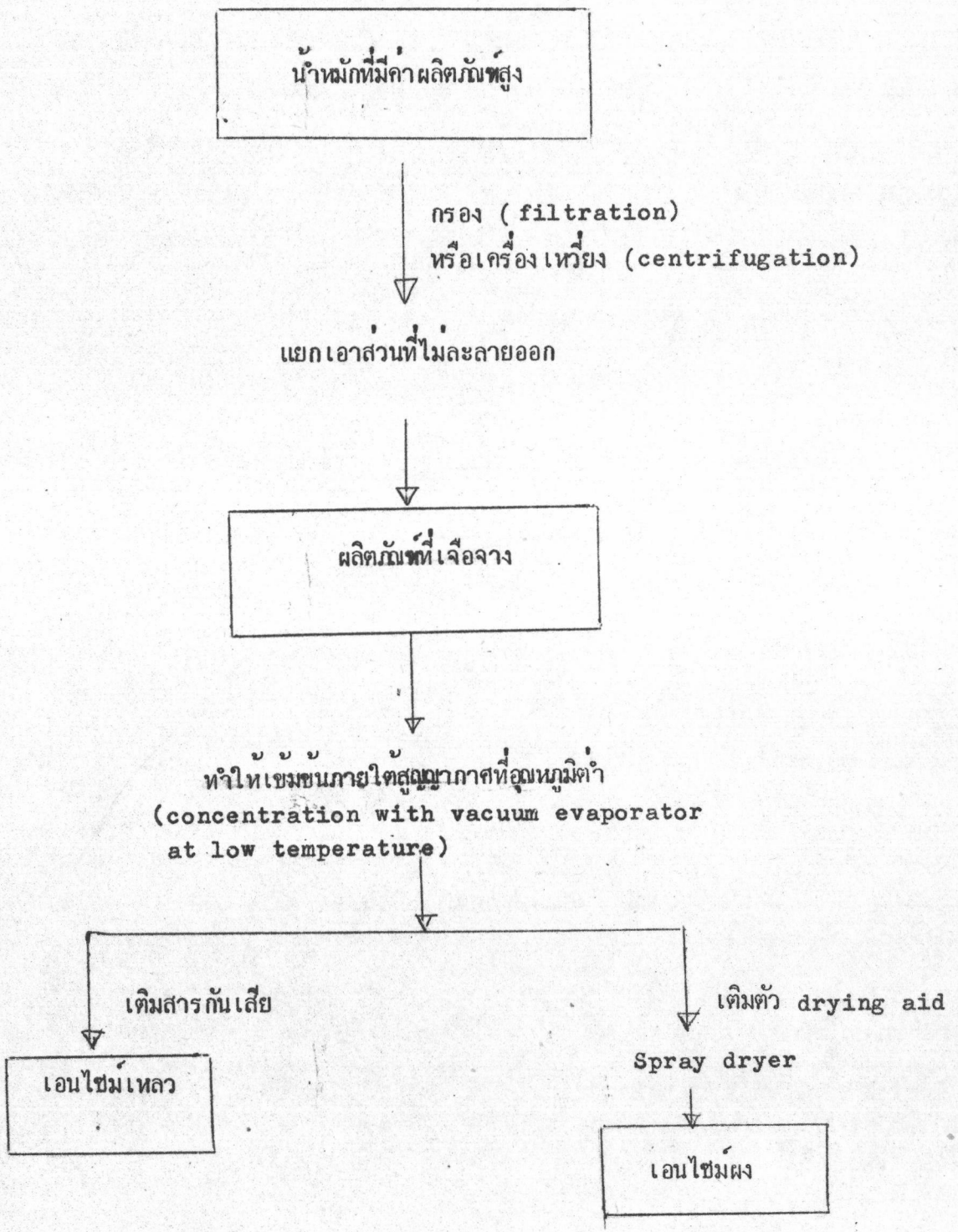
ของเซล ทำให้การเจริญหรือผลิตเอนไซม์เป็นไปอย่างไม่เต็มที่ และยังทำให้น้ำหมักจุลินทรีย์และอากาศเองผสมผสานกันไม่ได้ดี เครื่องหมักแบบถังกวนจะมีใบกวน และเครื่องช่วยกวนตีอากาศให้เป็นฟองเล็ก ๆ ระบบนี้จะต้องช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกวนให้น้ำหมัก อากาศ จุลินทรีย์จะผสมกันอย่างดี และยังช่วยให้การถ่ายเทมวลสารผ่านเข้าออกจากเซลได้ดีขึ้น (2,5,31,41,49)

การกวนจะช่วยให้น้ำหมัก เชื้อจุลินทรีย์ และอากาศผสมผสานกัน ทำให้ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ภายในถังหมักใกล้เคียงกัน ดังนั้นความเร็วในการกวนจะมีความสัมพันธุ์กับการถ่ายเทออกซิเจนจากอากาศสู่น้ำหมัก และการผสมสารภายในถังหมักให้เข้ากัน (31,49) ถังกวนสามารถให้ออกซิเจนกระจายลงในน้ำหมักได้สูงกว่า 0.1-1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm) ซึ่งเป็นความเข้มข้นวิกฤติของออกซิเจนสำหรับเชื้อหมักที่ต้องการออกซิเจน (49) และเมื่อเราเพิ่มอัตราการให้อากาศ (aeration) เพียงอย่างเดียวก็จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มขึ้น (26) แต่ในกรณีที่ถังหมักขนาดใหญ่มีทั้งการให้อากาศและการกวน พบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมจะน้อยกว่าที่ให้อากาศอย่างเดียว โดยพบว่าการให้อากาศที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.5-1.0 VVM (ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) และอัตราการกวนจะขึ้นกับความหนืดของน้ำหมัก และการให้อากาศด้วย (22,26,49)

2.4 <u>การแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซล</u> (รูปที่ 4)

2.4.1 <u>การกรอง</u> อัลฟา อะไมเลส เป็น Extracellular enzyme ดังนั้นเอนไซม์จะละลายอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งเราสามารถแยกออกได้โดยง่ายด้วยการกรอง (filtration หรือใช้เครื่องเหวี่ยง (centrifugation) แยกเอาพวกเส้นใย (mycelium) หรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกไป ของเหลวใสที่ได้จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การที่จะใช้เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) หรือการกรอง (filtration) ขึ้นอยู่กับขนาดของเส้นใยราที่ได้หลังการย่อยสลาย ถ้าขนาดใหญ่ก็แยกได้ง่ายโดยการกรอง แต่ถ้ามีขนาดเล็กจะกรองยาก จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องเหวี่ยงแทน(ดังตารางที่ 6)



รูปที่ 4 แผนผังแสดงการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากน้ำหมัก (32)

ตารางที่ 6 แสดงขนาดของจุลินทรีย์ และชนิดของ เครื่อง เหวี่ยงที่ใช้ (32) (Dimension of microorganism and centrifugation method)

ขนาดของจุลินทรีย์ (Microorganism)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (μ) ((Diameter)	ขนาดของ เครื่อง เหวี่ยง (Centrifugation method)
ไวรัส, phages	0.01 - 0.1	ultracentrifuge
บักเตรี	0.3 - 7.0	normalcentrifuge
ยีสต์	4.0 - 7.0	" ———— "
รา (filamentous fungi)	10.0 - 15.0	" ———— "

ของเหลวใสที่ได้จะมีความเข้มข้นของอัลฟา อะไมเลสต่ำ จึงจำเป็นต้องทำให้เข้มข้นขึ้น หรือถ้าไม่ทำให้เข้มข้นก็สามารถใช้ได้เลยโดยเติมสารลงไปเป็นตัว stabilizer หรือ Activator เพื่อปรับ pH ของเอนไซม์โดยใช้ในปริมาณต่ำ ไม่เกิน 1% หรือน้อยกว่านี้ (11) หลังจากเติมสารพวกนี้แล้วก็ทำการกรองอีกครั้ง (ตารางที่ 7)

2.4.2 <u>การทำให้เข้มข้น</u> เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมทั่ว ๆไป มักจะเป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องการความบริสุทธิ์มากนัก เพราะขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ยุ่งยาก และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก ดังนั้นจึงเอาสารละลายเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นโดยผ่านเข้าเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อป้องกันการสูญเสีย activity ของเอนไซม์ โดยมีค่า total solid ประมาณ 35% จากนั้นอาจจะเก็บเอนไซม์ในรูปของของเหลว (liquid enzyme) หรือทำให้เป็นผงโดยผ่านเข้าเครื่อง spray dryer ต่อไป

ในขบวนการนี้อาจมีการเติมสารกันเสีย (preservative) ลงไปจำนวนเล็กน้อย (11) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibit growth and contamination) เช่น พวก Toluene, Organic acid หรือเกลือของมัน Phenolic compound และ Sodium fluoride ซึ่งสารกันเสียที่ใส่ลงไปต้องแน่ใจว่าไม่มีเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือถ้ามีเหลืออยู่บ้างก็ไม่ควรเกิน 10 ppm แต่ถ้าเป็นเอนไซม์ที่ใช้กับอาหารก็ไม่ควรเกิน 0.05 ppm (11)

นอกจากทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยวิธีนี้แล้ว อาจทำโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วย protein precipitants ได้แก่ เกลือ และ organic solvent เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต แคลเซียมอะซิเตท methanol, acetone และ isopropanol เป็นต้น ซึ่งอาศัยหลักการ salting out ของโปรตีนคือ โปรตีนจะตกตะกอนที่ Isoelectric point ดังนั้น pH ของสารละลายเอนไซม์ที่จะทำการตกตะกอนจะต้องปรับให้เหมาะสมเพื่อจะได้ตะกอนโปรตีนมาก โดยทั่วไป pH 4 จะเป็น pH ที่ดีในการตกตะกอนเอนไซม์-โปรตีน และอุณหภูมิในระหว่างที่ตกตะกอนควรจะอยู่ในระหว่าง 4-5 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการสูญเสีย activity ของเอนไซม์อันเนื่องมาจากความร้อนที่เกิดขึ้นโดยปฏิกริยาเคมีในขณะที่เติมสารเคมีลงในสารละลายเอนไซม์

ตารางที่ 7 แสดงสารที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์ใส (11)

Ammonium phosphate dibasic	Gelatin
Ammonium phosphate monobasic	Gum arabic
Ascobic acid	Hydrated lime
Calcium salts (Chloride, formate sulfate or phosphate)	Hydrochloric acid
	Phosphoric acid
Cellulose fibre	Sodium citrate
Cysteine	Sodium gluconate
Diatomaceous earth	Sodium phosphate monobasic sodium sulfite

ส่วนในการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นมีหลายขั้นตอน (2) และมีการสูญเสีย activity ของเอนไซม์ในขั้นตอนที่ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และมักจะใช้วิธีการต่าง ๆ ผสมกัน เช่น dialysis พร้อมกับ ultrafiltration gel filtration, ion exchange technique,affinity chromatography,electrophoresis และ crystallization (2)

2.5 การทำอัลฟา อะไมเลส ให้อยู่ในรูปที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม

2.5.1 คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ เอนไซม์ที่เข้มข้นนอกจากจะมีเอนไซม์ที่ต้องการแล้ว อาจมีสารอื่นที่เป็น inert organic หรือ สารประกอบ อนินทรีย์ อยู่ด้วย เช่น คาร์โบไฮเดรต เถ้า โปรตีน อยู่ด้วย สำหรับเอนไซม์ที่ใช้สำหรับโรงงานผลิตอาหารทั่ว ๆ ไปมักจะใช้ในรูปนี้ เนื่องจากราคาถูก เพียงแต่มีข้อพิจารณาว่าสิ่งแปลกปลอมที่ติดมาจะไม่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้

ส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ทั่ว ๆ ไป (Proximate analysis of typical alcohol precipitated microbial enzyme) มีดังนี้ (11)

ความชื้น %	5 - 7
โปรตีน %	30 - 40
คาร์โบไฮเดรต %	35 - 40
เถ้า %	10 - 20
ไขมัน %	0.01 - 0.1

และต้องมีปริมาณสารเจือปนน้อย (ในกรณีที่นำไปใช้ในอาหาร) สารเจือปนที่อาจจะมีได้ ดังแสดงในตารางที่ 8

2.5.2 รูปแบบของผลิตภัณฑ์ (11) เอนไซม์เข้มข้นที่ได้ต้องมีการเก็บรักษาไว้เป็นอย่างดี เพื่อป้องกันการปนเปื้อนหรือรักษา activity ของเอนไซม์ไว้ให้คงที่ก่อนที่จะนำไปใช้ในรูปของแข็งหรือของเหลว และไม่ว่าจะอยู่ในรูปใดก็ตาม เอนไซม์เหล่านี้จะต้องผ่านการตรวจ (assay) เสียก่อน โดยดูจากปริมาณ substrate ที่ถูกเอนไซม์ย่อยภายใต้สภาพที่ควบคุม ในสภาพของแข็ง อาจผสม แป้ง น้ำตาลเด็กโตส เด็กซ์โตรส ซูโครส เจิลลาติน (sucrose gelatin)

ตารางที่ 8 แสดง NOVO Food Grade Specification (41)

	ขีดจำกัด (Limit)
โลหะหนัก, ppm (Heavy metal)	40
ตะกั่ว, ppm (Lead)	40
อะซินิค, ppm (Arsenic)	3
อัลฟ่าท็อกซิน (Aflatoxin)	ไม่พบ
เชื้อที่นับได้ เซล/กรัม (Total viable count, cell/g)	5×10^4
โคลิฟอร์ม เซล/กรัม (coliform, cell/g)	30
E.coli	ไม่พบ
รา/กรัม เซล/กรัม (mould/g)	100
P. aeruginosa เซล/10 กรัม	ไม่พบ
Salmonella เซล/50 กรัม	ไม่พบ

และ casein เมื่อผสมแล้วต้องให้ได้ activity ตามที่กำหนด และถ้าอยู่ในสภาพของเหลว ก็มักจะใส่สาร atabilizer เพื่อป้องกันการสูญเสีย activity ในระหว่างการเก็บ โดยสีของของเหลวจะมีสีต่าง ๆ คือ จากสีน้ำตาลอ่อน ๆ (ginger ale) ไปจนถึงสีดำ (darken products) จากนั้นนำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้น โดยการระเหยภายใต้สูญญากาศ แล้ว standardized ให้ได้ activity ตามที่ต้องการ

เอนไซม์ทั้ง 2 รูปแบบอาจใส่สารที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ลงไปด้วย เช่น เกลือฟอสเฟต $CaSO_4$ เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH

2.6 การนำอัลฟา อะไมเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (36,37,38,46)

อัลฟา อะไมเลส เป็นกลุ่มของเอนไซม์คาร์โบไฮเดรต (carbohydrase) ที่ใช้กันมากตัวหนึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ก็ยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกเช่น อุตสาหกรรมผลิตเส้นใย, อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีส่วนใช้ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรม (ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวช่วยย่อยอาหาร) และ อุตสาหกรรมผงซักฟอกอีกด้วย โดยจะกล่าวรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. อุตสาหกรรมการทำขนมปัง (bread making)

อัลฟา อะไมเลส จะไปช่วยเสริมปริมาณของเอนไซม์ที่มีอยู่แล้วโดยธรรมชาติในแป้งสาลี ช่วยปรับปรุงคุณภาพแป้งโด (dough) และขนมปังที่อบเสร็จแล้ว โดยความสำคัญในการใช้อะไมเลสจะเกี่ยวข้องกับโดเป็นส่วนใหญ่ เพราะแป้งมีน้ำตาลน้อย คือประมาณ 0.5% และเป็นน้ำตาลประเภทโมโนและไดแซคคาไรด์ ซึ่งน้ำตาลระดับนี้ไม่พอกับการทำงานของยีสต์ การแก้ปัญหานี้ไม่สามารถแก้ได้โดยการเพิ่มน้ำตาลพวกซูโครส และเด็กซ์โตรส เพราะการเติมน้ำตาลจะทำให้การหมักเป็นไปอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้แกส และโครงสร้างของขนมปังสูญเสียไป ดังนั้นการผลิตขนมปังที่มีคุณภาพดีจึงนิยมเติม อัลฟา อะไมเลส ลงไปด้วย เพื่อให้ไปเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลซึ่งยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ ทำให้การหมักเกิดต่อเนื่องกัน พบว่าเอนไซม์ อัลฟา อะไมเลส จากรา Aspergillus oryzae จะใช้ได้ดีที่สุด (2,28)

2. อุตสาหกรรมผลิตน้ำเชื่อม (syrup) (41)

เนื่องจากแป้งเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่แพร่หลายมาก และเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำเชื่อมที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งปัจจุบันความต้องการน้ำเชื่อมนี้มีมากคือ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับขนมหวาน (confectionary) หมากฝรั่ง (chewing gum) น้ำเชื่อม ขนมปัง ไอศกรีม อาหารเช่แข็ง แยม และเยลลี่ เบียร์ เครื่องดื่มต่าง ๆ โดยจะใช้เอนไซม์เป็นตัวย่อยสลาย เอนไซม์ที่ใช้อาจจะได้จากสัตว์ พืช หรือจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ไม่ว่าในอุตสาหกรรมอาหารหรืออื่น ๆ นิยมใช้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปไม่บริสุทธิ์มากนัก (crude form) ดังนั้นอาจจะมีเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ปะปนมาด้วย เช่น Proteolytic หรือ cellulase ก็ได้

- เอนไซม์จากตับอ่อน (pancrease) ของสัตว์ไม่เหมาะสมสำหรับที่จะใช้เพราะมีราคาแพง และทนต่อความร้อนได้น้อย pH ที่เหมาะสมค่อนข้างสูงและมีกลิ่นเหม็น

- เอนไซม์จากพืช เช่นข้าวบาร์เลย์ หรือข้าวสาลี ใช้ได้แต่มีข้อเสียคือ ทำให้ไซรัพมีสีหรือกลิ่นแปลกปลอมซึ่งในการกำจัดสีค่อนข้างสิ้นเปลือง อาจแก้ได้โดยใช้ข้าวมอลล์ที่บริสุทธิ์มากขึ้น (purified malt) แต่ราคาสูงขึ้น

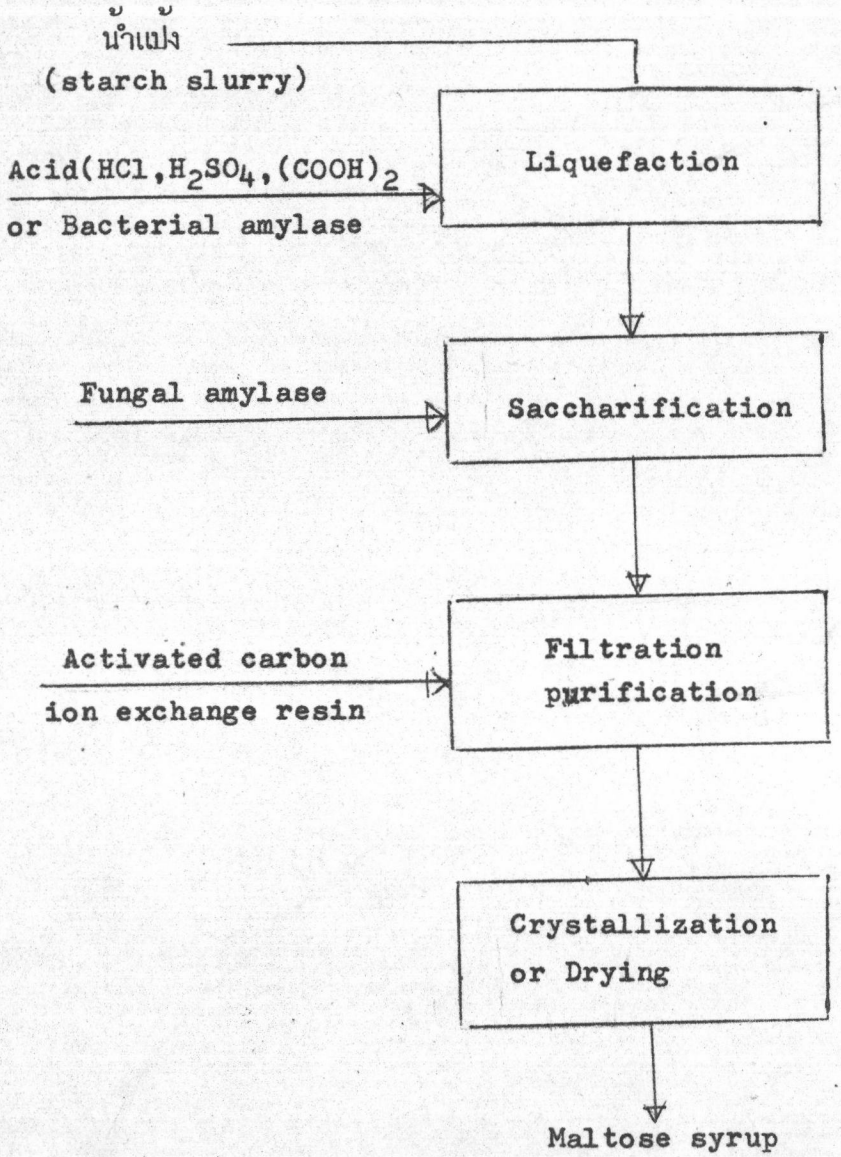
- เอนไซม์จากบักเตรี รา และยีสต์ กำลังได้รับความนิยมและมีความสำคัญมากขึ้นในปัจจุบัน เช่นใช้ใน การผลิตมอลโตสไซรัพ Maltose syrup และ high conversion syrup (รูปที่ 5,6)

3. อุตสาหกรรมการผลิตเหล้าสาเก ซีอิ๊ว และ Miso

ในขบวนการหมักดังกล่าวได้ใช้อัลฟา อะไมเลสทางอ้อมคือ จะมีการใส่เชื้อ A.oryzae ลงไปในการเตรียมโคจิ (koji)เพื่อให้ผลิตเอนไซม์อัลฟา อะไมเลส และโปรติเอสไปย่อยแป้งซึ่งเป็นวัตถุดิบ (2)

4. ใช้ในกิจการอื่น ๆ

ได้แก่ อัลฟา อะไมเลสจากบักเตรี และ A.oryzae โดยอัลฟา อะไมเลส จากบักเตรี ใช้ผสมลงในผงซักฟอก และเอนไซม์จากเชื้อราใช้ย่อยแป้งที่ไม่ต้องการในน้ำผลไม้และเยลลี่ (2)

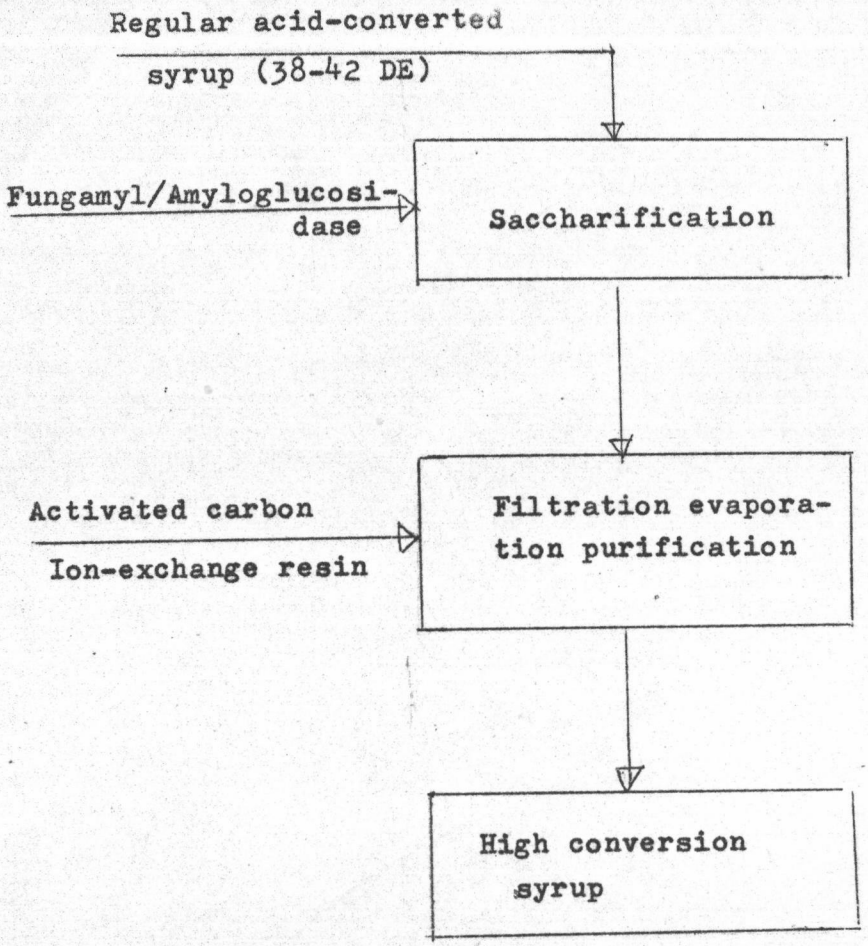


คุณสมบัติของ High-maltose syrup

DE	40-50 %
Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	45-60 %
Dextrose ($C_6H_{12}O_6$)	2-7 %

หมายเหตุ Fungal amylase เป็นชื่อเรียก อัลฟา อะไมเลสจาก A.oryzae

รูปที่ 5 แผนผังแสดงการผลิตมอลโตสไซรัพ (Maltose syrup) (41)



คุณสมบัติของ High conversion syrup

DE	63-67 %
Dextrose ($C_6H_{12}O_6$)	34-40 %
Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	33-37 %

หมายเหตุ Fungamyl เป็นชื่อเรียกอัลฟา อะไมเลสจาก A.oryzae ทางการค้าของ NOVO

รูปที่ 6 แผนผังแสดงการผลิต High conversion syrup (41)

จะเห็นได้ว่าประโยชน์ของเอนไซม์ อัลฟา อะไมเลส มีมากมาย จากยอดขายอะไมเลสทั้งหมด พบว่าตลาดมีความต้องการเอนไซม์เหล่านี้มาก โดยเรียงลำดับดังนี้คือ Amyloglucosidase 50%, Bacterial amylase 40%, Fungal amylase 10% (41) ดังนั้นงานวิจัยของเราต่อไปก็จะทำการศึกษาอะไมเลสจากแหล่งต่าง ๆ