บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวโพดหวาน

2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

ข้าวโพดหวาน (*Zea mays saccharata*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถบริโภคในลักษณะฝักสดหรือแปรรูปโดยการบรรจุกระป๋องหรือภาชนะปิดสนิทในรูปของข้าวโพดทั้งฝัก (corn on the cob) ข้าวโพดตัดเมล็ด (whole kernel) และครีมข้าวโพด (cream style corn) (นนท์, 2549) ในช่วงปี พ.ศ. 2550 - 2551 ประเทศไทยส่งออกสินค้าในกลุ่มผักกระป๋องและแปรรูปรวมกันกว่า 566,500 ตัน คิดเป็นมูลค่า 19,660 ล้านบาท ในจำนวนนี้เป็นผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องและแปรรูปถึง 304,653 ตัน คิดเป็นมูลค่า 6,100 ล้านบาท หรือเท่ากับร้อยละ 31.03 ของมูลค่าส่งออกทั้งหมดในกลุ่มผักกระป๋องและแปรรูป (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2552) ประเทศที่ผลิตข้าวโพดหวานรายใหญ่ของโลกคือ สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส ฮังการี เบลเยี่ยม แคนาดา อิตาลี ไทยและจีน ส่วนประเทศที่ส่งออกผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องมากที่สุดในตลาดโลก ปี พ.ศ. 2546 คือ ฮังการี (ร้อยละ 34) สหรัฐอเมริกา (ร้อยละ 33) และไทย (ร้อยละ 20) ตามลำดับ (สถาบันเพิ่มผลผลิตแห่งชาติ, 2548; USDA, 2009) ทางด้านราคาข้าวโพดหวานมีความผันแปรค่อนข้างสูงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

Çetinkol (1989) รายงานว่าข้าวโพดหวานมีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 22.1 ไขมันร้อยละ 1.0 โปรตีนร้อยละ 0.34 โพแทสเซียมร้อยละ 0.28 และแคลเซียมร้อยละ 0.003 ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Raroengwichit *et al.* (1999) ที่ระบุว่าข้าวโพดหวานประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 21.1 โปรตีนร้อยละ 3.4 ไขมันร้อยละ 1.0 และเถ้าร้อยละ 0.7

สุมนา (2548) ศึกษาการผลิตสุราขาวจากเศษเมล็ดข้าวโพดเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง เนื่องจากเศษเมล็ดข้าวโพดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตถึงร้อยละ 17.87 ± 0.29 และน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 1.62 ± 0.06 และทำการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ Termamyl SC และ AMG 300 L แล้วจึงหมักด้วยยีสต์ทางการค้า คือ Fermivin PDM หรือ V1116 หรือ Bourgoblanc ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 วัน ผลการศึกษาพบแอลกอฮอล์ไม่เกินร้อยละ 4.00 ± 0.29 แต่เมื่อนำไปกลั่นเพื่อปรับเป็นสุราขาว ได้แอลกอฮอล์ในระดับต่ำเพียงร้อยละ 1.12

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 ราคาข้าวโพดหวานตลาดสี่มุมเมือง กรุงเทพฯ ณ วันที่ 5 มิถุนายน พ.ศ.2552

ชื่อทางการค้าของข้าวโพดหวาน	ราคาเฉลี่ย (บาท/ฝัก)
ไฮบริกเบอร์ 1	3.50
ไฮบริกเบอร์ 2	2.00
A5 เบอร์ 1	3.00
A5 เบอร์ 2	1.80
ศรแดงเบอร์ 1	2.50
ศรแดงเบอร์ 2	1.80
มันปูเบอร์ 1	1.50
มันปูเบอร์ 2	1.20

ที่มา: กรมส่งเสริมการเกษตร (2552)

2.1.2 กระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง

กระบวนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องของแต่ละโรงงานมีขั้นตอนคล้ายคลึงกัน ดังที่ไว้ในภาพที่ 2.1 และมีรายละเอียดขั้นตอนการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง (นนท์, 2549) ดังนี้

2.1.2.1 การรับวัตถุดิบข้าวโพดหวานและตรวจสอบคุณภาพ

วัตถุดิบข้าวโพดหวานจะถูกคัดแยกฝักที่มีตำหนิ เช่น ฝักอ่อน ฝักแก่ ฝักที่แมลงเจาะ และฝักที่ไม่ได้ขนาด ซึ่งไม่สามารถนำไปผลิตได้ แยกไปทิ้ง

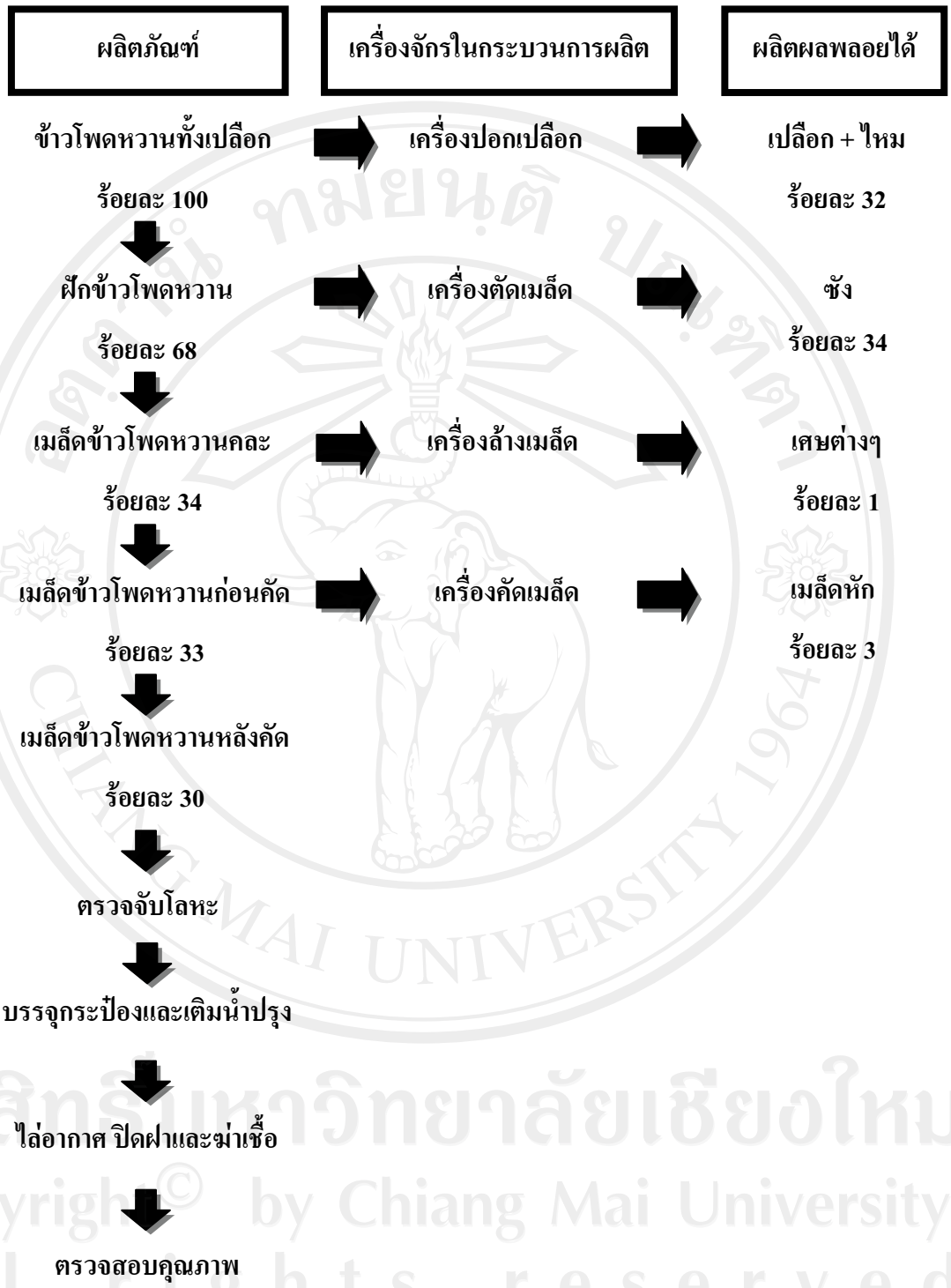
2.1.2.2 การปอกเปลือกข้าวโพด

ลำเลียงฝักข้าวโพดเข้าเครื่องปอกเปลือก (husker) เพื่อแยกเอาเปลือกออก ฝักข้าวโพดที่ยังปอกเปลือกไม่หมด จะถูกนำไปปอกด้วยพนักงานอีกครั้ง

2.1.2.3 การตัดเมล็ดข้าวโพด

ข้าวโพดที่ผ่านการปอกเปลือกจะเข้าสู่ขั้นตอนการตัดเมล็ดข้าวโพดออกจากซัง โดยเครื่องตัดเมล็ด (corn cutter) โดยฝักข้าวโพดจะผ่านไปตามสายพานลำเลียง โดยนำด้านปลายฝักข้าวโพดเข้าสู่เครื่องตัดเมล็ดด้วยพนักงาน จากนั้นเครื่องจะตัดเมล็ดและแยกซังข้าวโพดออกทางด้านล่างของตัวเครื่อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2.1 การใช้ประโยชน์จากข้าวโพดหวานในกระบวนการแปรรูปข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง

ที่มา: ปรับปรุงจาก เฉลิมฉัตร (2545) และนนท์ (2549)

2.1.2.4 การล้างเมล็ดข้าวโพด

หลังการร่อนหยาบ เมล็ดข้าวโพดจะถูกล้างด้วยเครื่องล้างเมล็ด (floatation cleaner) ซึ่งเครื่องจะทำการแยกเศษเมล็ดแตก และเส้นไหมออกโดยอาศัยหลักการลอยตัว ทั้งนี้เส้นไหมที่มีน้ำหนักเบากว่าเมล็ดข้าวโพดจะลอยอยู่บนผิวน้ำและแยกออกมาภายหลังส่วนเมล็ดข้าวโพดจะตกลงสู่ด้านล่างของเครื่องล้างเมล็ด

2.1.2.5 การร่อนเมล็ดข้าวโพดด้วยตะแกรงร่อนละเอียดหรือการคัดเมล็ด

เพื่อคัดตำหนิโดยผ่านตะแกรงร่อนละเอียด ตำหนิที่พบ ได้แก่ เมล็ดที่มีขนาดเล็กหรือแตกออกเป็นเศษเล็กเศษน้อย จากนั้นเมล็ดข้าวโพดจะถูกลำเลียงไปตามสายพานเพื่อรอการบรรจุกระป๋อง

2.1.2.6 การตรวจจับโลหะ

เมล็ดข้าวโพดถูกลำเลียงเข้าสู่เครื่องตรวจจับโลหะ (metal detector) เพื่อกำจัดเศษโลหะที่ปะปนมากับเมล็ดข้าวโพด ก่อนจะถูกคัดตำหนิครั้งสุดท้ายก่อนการบรรจุโดยพนักงานตำหนิที่คัดออก ได้แก่ เส้นไหม เมล็ดเศษเล็กและเมล็ดแตก รวมถึงเม็ดเสียที่เหลืออยู่

2.1.2.7 การบรรจุเมล็ดข้าวโพดลงกระป๋อง

บรรจุเมล็ดข้าวโพดลงกระป๋องตามขนาดกระป๋อง ที่ถูกลำเลียงจากคลังสินค้าผ่านรางปล่อยกระป๋อง โดยระหว่างการลำเลียงจะมีการฉีดพ่นน้ำเพื่อทำความสะอาดกระป๋องในระหว่างการบรรจุ โดยมีพนักงานคอยสุ่มชั่งน้ำหนักเพื่อให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการ

2.1.2.8 การเติมน้ำปรุง

น้ำปรุงมีส่วนผสมของเกลือ น้ำตาล และน้ำตามอัตราส่วนที่กำหนด โดยน้ำปรุงที่เตรียมไว้จะถูกปั๊มจากหม้อเตรียมส่วนผสมเข้าสู่หม้อพักน้ำปรุง ซึ่งมีการให้ความร้อนเพื่อเพิ่มอุณหภูมิให้กับน้ำปรุง อุณหภูมิของน้ำปรุงประมาณ 90 - 95 องศาเซลเซียส

2.1.2.9 การไล่อากาศ ปิดฝาและฆ่าเชื้อ

กระป๋องที่บรรจุเมล็ดข้าวโพดจะถูกลำเลียงเข้าสู่รางไล่อากาศ และเข้าสู่เครื่องปิดฝาอัตโนมัติ ตามลำดับ จากนั้นจึงนำกระป๋องเข้าสู่หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (retort) โดยควบคุมระยะเวลาอุณหภูมิและความดันตามความเหมาะสมของกระป๋องแต่ละขนาด นอกจากนี้ ธนะบูลย์ (2536) รายงานว่าเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการแปรรูปผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องยังขึ้นกับสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน เช่น ในการแปรรูปข้าวโพดหวานสายพันธุ์ shrunken-sh hybrid corn จะต้องลดเวลาและอุณหภูมิลงหรือต่ำกว่าข้าวโพดหวานธรรมดา เนื่องจากหากใช้ความร้อนที่สูงเกินไปจะก่อให้เกิดความผิดปกติในด้านสีและกลิ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.10 การตรวจสอบคุณภาพและการเก็บรักษา

คัดแยกกระป๋องที่มีลักษณะบุบ บวม และตึงออก สำหรับกระป๋องที่ผ่านการตรวจสอบจะถูกลำเลียงผ่านกระบวนการทำให้เย็นและทิ้งให้แห้ง เช็ดน้ำที่ผิวกระป๋องด้วยผ้าแห้งสะอาด ก่อนเช็ดอีกครั้งด้วยน้ำมันขาว (white oil) เพื่อป้องกันสนิม จัดเรียงกระป๋องและหุ้มพลาสติกเพื่อเก็บรักษา

2.2 รำข้าว

รำข้าว (bran) เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวที่มีอยู่มากและราคาถูก หากคำนวณน้ำหนักรำข้าวเทียบกับน้ำหนักข้าวเปลือกคิดเป็นร้อยละ 8 - 11 (เครือวัลย์, 2536) ทั้งนี้ในฤดูการผลิตข้าว 2551/2552 ทั่วโลกมีผลผลิตข้าวเปลือกประมาณ 665 ล้านตัน หรือคิดเป็นรำข้าว 53 – 73 ล้านตัน (กรมการข้าว, 2552) รำข้าวแบ่งได้หลายชนิด เช่น รำหยาบมีส่วนของเปลือกนอกติดกับเมล็ดข้าว จมูกข้าว (germ) ปลายข้าว (broken rice) เมล็ดข้าว (endosperm) และอาจมีส่วนของแกลบ (husk) ปนบ้าง มีเยื่อใยและซิลิกาค่อนข้างสูง รำละเอียดประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว (pericarp) ปลายข้าว และมีแกลบ ปนเล็กน้อย ส่วนรำสกัดน้ำมันเป็นกากที่ได้หลังการนำรำละเอียด หรือรำสดไปสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี ทำให้รำแต่ละชนิดมีองค์ประกอบแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของรำในหน่วยร้อยละของน้ำหนักแห้ง

ชนิด	ความชื้น (ร้อยละ)	องค์ประกอบ (ร้อยละ)				
		โปรตีน	ไขมัน	เส้นใย	เถ้า	แป้งรวม
รำละเอียด	9.66	14.46	24.41	11.30	11.03	N/a
รำละเอียด	8.98	13.82	19.70	6.42	9.51	50.55
รำละเอียด	9.56	13.51	15.16	4.96	9.42	56.93
รำละเอียด	9.00	14.18	14.29	12.53	N/a	N/a
รำข้าวขาว	10.00	13.56	12.22	4.56	N/a	N/a
รำสกัดน้ำมัน	9.00	15.39	1.65	14.18	N/a	N/a
รำหยาบ	N/a	7.00	10.00	13.00	N/a	N/a

N/a หมายถึง ไม่แจ้งข้อมูล

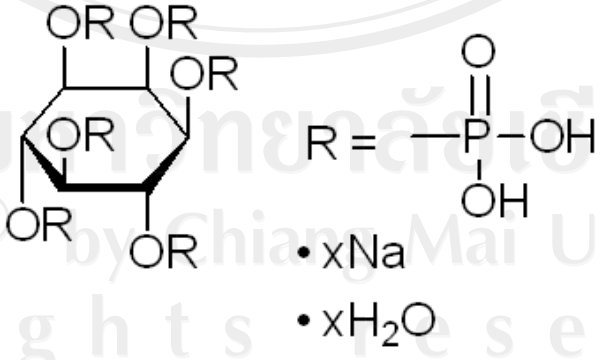
ที่มา: สุรัสสา และคณะ (2552); ศรีสกุล และคณะ (2546)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 กรดไฟติกและเอนไซม์ไฟเตส

2.3.1 กรดไฟติก (phytic acid)

กรดไฟติก (inositol hexakisphosphate หรือ myo - inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis dihydrogenphosphate) ประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก 6 กลุ่มจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวนแอลกอฮอล์ไมโออิโนซิทอลด้วยพันธะเอสเทอร์ ในรูปปราศจากน้ำมีมวลโมเลกุล 660.04 กรัมต่อโมล ดังแสดงโครงสร้างร่วมกับเกลือโซเดียมในภาพที่ 2.2 พบได้ในเซลล์สิ่งมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (eukaryotic) พืชใช้กรดไฟติกเป็นแหล่งเก็บฟอสเฟตรวมถึงสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารประกอบฟอสเฟตชนิดอื่นๆ ในยีสต์ กรดไฟติกทำหน้าที่ร่วมกับโปรตีน Gle1 ในการส่ง mRNA ออกจากนิวเคลียส (Sigma, 2008d) Jaw - Shiow *et al*. (2000) อธิบายว่าแหล่งของฟอสฟอรัสกว่าร้อยละ 75 ของธัญพืช พืชน้ำมัน และพืชตระกูลถั่วอยู่ในรูปของกรดไฟติกมีบทบาทสำคัญในระยะพักตัวและระยะการงอกของเมล็ดพืช โดยฟอสฟอรัสจะถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างกระบวนการงอกและนำไปใช้ในการผลิตโมเลกุลพลังงาน adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุกร ปลาและสัตว์ปีก ไม่สามารถนำฟอสฟอรัสในกรดไฟติกไปใช้ได้เพราะไม่มีเอนไซม์ไฟเตสในระบบย่อยอาหาร ยิ่งไปกว่านั้นกรดไฟติกยังสามารถจับตัวกับโปรตีนและไอออนโลหะอย่างแคลเซียม เหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม แมงกานีส ทองแดง และโมลิบดีนัม รวมไปถึงแป้ง เมื่อกรดไฟติกที่สัตว์เหล่านี้ย่อยไม่ได้ถูกขับถ่ายออกมาจะถูกจุลินทรีย์ในดินย่อยสลายได้ฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตซึ่งเมื่อละลายไปสะสมอยู่ในแหล่งน้ำเป็นปริมาณมากจะทำให้แหล่งน้ำเน่าเสียเนื่องจากปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี (eutrophication)



ภาพที่ 2.2 โซเดียมไฟเตต

ที่มา: Sigma (2008d)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 เอนไซม์ไฟเตส (phytase enzyme)

2.3.2.1 สมบัติของเอนไซม์

เอนไซม์ไฟเตสจัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolytic enzyme) ที่สามารถย่อยพันธะเอสเทอร์ของฟอสฟอรัสในกรดไฟติกโดยเริ่มจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 6 ตามลำดับ Dixon and Webb (1979) จำแนกเอนไซม์ไฟเตสได้สองชนิด คือ 3-phytase (EC 3.1.3.8) และ 6-phytase (EC 3.1.3.26) ชนิดหลังสามารถย่อยกรดไฟติกได้ฟอสเฟตอย่างสมบูรณ์ในขณะที่ชนิดแรกจะไม่ย่อยกรดไฟติกที่มีหมู่ฟอสฟอรัสเหลืออยู่เพียงตัวเดียว (phosphomonoester) แหล่งของเอนไซม์ไฟเตสในพืชพบได้ในเมล็ดและละอองเกสร แต่การผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากพืชไม่คุ้มค่าในเชิงพาณิชย์เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานาน จึงนิยมผลิตเอนไซม์โดยใช้จุลินทรีย์มากกว่า (Jaw - Shiow *et al*., 2000)

Cromwell *et al*. (2004) เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงสุกรสูตรปกติที่มีส่วนผสมจากข้าวโพด กากถั่วเหลือง และฟอสฟอรัสในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 0.2 โดยมีฟอสฟอรัสทั้งหมดร้อยละ 0.59 ซึ่งเป็นระดับที่สถาบัน National Research Council (NRC) ประเทศสหรัฐอเมริกาแนะนำ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงสุกรที่มีส่วนผสมเดิม แต่ลดปริมาณฟอสฟอรัสในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟตลงเหลือร้อยละ 0.1 ให้ร่วมกับเอนไซม์ไฟเตสที่มีค่ากิจกรรมการทำงานเอนไซม์ 750 หน่วยต่อกิโลกรัม พบว่าสุกรทั้งสองกลุ่มมีความแข็งแรงของกระดูก และการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p > 0.05$) แต่มูลของสุกรที่ได้รับอาหารที่มีเอนไซม์ไฟเตสมีปริมาณฟอสฟอรัสลดลงร้อยละ 18

Schlemmer *et al.* (2001) ศึกษาถึงผลของเอนไซม์ไฟเตสที่ได้จากพืช เชื้อรา และจุลินทรีย์ต่อการย่อยสลายไฟเตตในสุกรและปริมาณฟอสฟอรัสที่พบในมูลสุกร โดยสุกรจะได้รับอาหารเป็นข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวสาลี ข้าวไรน์ และถั่วเหลือง อาหารที่ให้ประกอบด้วยไฟเตต 1.88 กรัมต่อกิโลกรัม พบว่าไฟเตตในมูลสุกรลดลงจากเดิม 16.8 กรัมต่อวัน เหลือ 0.4 กรัมต่อวัน และเมื่อให้อาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหรือผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส อย่างใดอย่างหนึ่งแก่สุกร ซึ่งกระบวนการเอ็กซ์ทรูดเป็นการทำลายกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสด้วยความร้อนได้ถึงร้อยละ 99.5 พบว่าสุกรที่ได้รับอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูดจะมีฟอสฟอรัสในมูลสุกร 5.0 กรัมต่อวัน จากที่ได้รับ 9.2 กรัมต่อวัน หรือย่อยได้ร้อยละ 45.7 ในขณะที่สุกรที่ได้รับอาหารที่ผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูดมีฟอสฟอรัสในมูลสุกร 6.7 กรัมต่อวัน จากที่ได้รับ 9.5 กรัมต่อวัน หรือย่อยได้เพียงร้อยละ 29.5

Jaw - Shiow *et al*. (2000) สรุปว่าสัตว์กระเพาะเดี่ยวที่กินอาหารผสมเอนไซม์ไฟเตสจะทำให้คอมเพล็กซ์ของกรดไฟติกเกิดการเปลี่ยนแปลง ทำให้มีแหล่งอาหารฟอสฟอรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แคลเซียม และโปรตีนเพิ่มเติม สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ward (2006) ที่ระบุว่าการเติมเอนไซม์ไฟเตส ลงในอาหารสัตว์จะทำให้สัตว์นำฟอสฟอรัสไปใช้ได้เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 20 - 40 และทำให้มูลสัตว์มีปริมาณฟอสฟอรัสลดลงร้อยละ 73

2.3.2.2 การผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ยีสต์ในกลุ่มของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Schwannoiomyces castellii* และเชื้อราในกลุ่มของ *Aspergillus niger*, *A. oryzae* และ *A. ficuum* ดังแสดงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในตารางที่ 2.3 อย่างไรก็ตามไม่นิยมใช้เชื้อยีสต์ในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส เนื่องจากยีสต์จะเก็บเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์ซึ่งมีความยุ่งยาก ตรงข้ามกับ *A. niger* NRRL 3135 ที่จะปลดปล่อยเอนไซม์ไฟเตสที่ผลิตได้ออกนอกเซลล์จึงได้รับความนิยมมากกว่า ส่วนการผลิตโดยใช้เชื้อราอาจใช้ระยะเวลายาวนานถึง 10 วัน ถึงจะผลิตเอนไซม์ไฟเตสที่มีค่ากิจกรรมการทำงานในระดับสูง (Jaw - Shiow *et al*., 2000)

Krishnan *et al*. (2006) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยใช้รำข้าวสาลีและกากหลังการสกัดน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mucor racemosus* NRRL 1994 พบว่ากากงาที่ได้หลังการสกัดน้ำมันเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์ไฟเตส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 30.6 หน่วยต่อกรัมแห้ง และการใช้รำข้าวสาลีผสมกากงาในสัดส่วน 1 ต่อ 1 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากกว่าคือ 32.2 หน่วยต่อกรัมเดซิวินาที และหากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้รำข้าวสาลีผสมกากงาจะผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ 44.5 หน่วยต่อกรัมเดซิวินาที หรือเพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้รำข้าวสาลีเพียงอย่างเดียว

Li *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยใช้เชื้อยีสต์ *Kodamaea ohmeri* BG3 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้าวโอ๊ต พบว่าเชื้อยีสต์จะสามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้สูงสุดเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของข้าวโอ๊ตร้อยละ 1 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 2.3 กลูโคสร้อยละ 2.0 และโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.0 ที่ pH เริ่มต้น 6.3 และเมื่อใช้สภาวะการเขย่าที่เหมาะสมพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสจะเพิ่มขึ้นจาก 62 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น 575.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือเพิ่มขึ้น 9 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตส

เชื้อจุลินทรีย์	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไฟเตส		K_M (mmol/L)	เอกสารอ้างอิง
	pH	อุณหภูมิ (°C)		
แบคทีเรีย				
B. subtilis	6.0-6.5	60	0.500	Kim *et al*., 1998 Kerovuo *et al*., 2000
Citrobacter braakii	4.0	50	0.460	Kim *et al*., 2003
E. coli	4.5	55-60	0.130	Greiner *et al*., 1993
Klebsiella sp.	6.0	37	-	Shah and Parekh, 1990
K. terrigena	5.0	58	0.300	Greiner *et al*., 1997
Lactobacillus sanfrancesis	4.0	45	-	De Angelis *et al*., 2003
ยีสต์				
Pichia pastoris	2.5, 5.5	60	-	Han *et al*., 1999
Schwanniomyces castelii	4.4	77	0.040	Segueilha *et al*., 1992
รา				
A. carbonarius	4.7	53	0.350	Al Asheh and Duvnjak,1994
A. ficuum (phy A)	2.5, 5.0	58	0.027	Ullah and Gibson, 1987
A. ficuum (phy B)	2.5	63	0.103	Ehrlich *et al*., 1993 Ullah *et al*., 2003
A. fumigatus	4.0-5.0	58-70	-	Mullaney *et al*., 2000
A. niger ATCC 9142	5.0	65	0.100	Casey and Walsh, 2003
A. niger SK-57	2.5,5.5	50	0.019	Nagashima *et al*., 1999
A. oryzae	5.5	50	0.330	Ullah and Gibson, 1987 Shimizu, 1993

ที่มา: ปรับปรุงจาก Purva and Uttam (2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า K_M (Michaelis-Menten constant) หรือ ค่าคงที่การยึดจับ (affinity constant) ระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น (complex) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์แต่ละชนิดที่พีเอช อุณหภูมิ และสภาวะการเกิดปฏิกิริยาหนึ่งๆ ทั้งนี้เอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มาจากสิ่งมีชีวิตเดียวกันอาจมีค่า K_M ที่ต่างกันได้ เมื่อพิจารณาการยึดจับกันระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์จะพบว่าค่า K_M ต่ำแสดงว่าเอนไซม์จับกับสารตั้งต้นได้ดี

จากความสัมพันธ์ในสมการด้านล่าง ค่า K_M ได้จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ในสภาวะพีเอชคงที่ และวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อข้อมูลจลน์ เช่น การเสื่อมสภาพของเอนไซม์หลังเริ่มปฏิกิริยาหรือการที่เอนไซม์ถูกยับยั้งโดยสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Bisswanger, 2008)

$$\upsilon = \frac{V[S]}{K_M + [S]}$$

เมื่อ υ หมายถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น มีหน่วยเป็นความเข้มข้นต่อเวลา

V หมายถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดที่ความเข้มข้นสารตั้งต้น ณ อินฟินิตี้

[S] หมายถึงความเข้มข้นของสารตั้งต้น

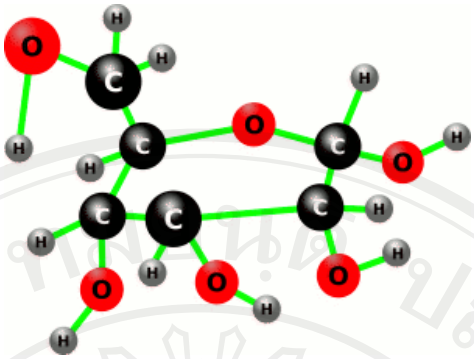
2.4 น้ำตาลและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำตาล

2.4.1 น้ำตาล

2.4.1.1 กลูโคส (glucose)

กลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) (ภาพที่ 2.3) พบได้ทั่วไปในรูปอิสระ เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) เช่น มอลโทส (maltose) ซูโครส (sucrose) แลกโทส (lactose) และแรฟฟิโนส (raffinose) และน้ำตาลโมเลกุลซับซ้อน (polysaccharide) เช่น เดกซ์ทริน (dextrin) สตาร์ช (starch) เซลลูโลส (cellulose) และไกลโคเจน (glycogen) มีสมบัติละลายในน้ำและแอลกอฮอล์ได้ดีแต่ไม่ละลายในอีเทอร์ (นิธิยา, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



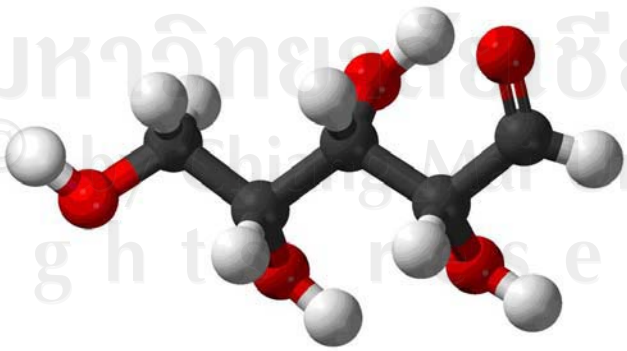
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลกลูโคส

ที่มา: Atkins (2009)

2.4.1.2 เพนโทส (pentose)

น้ำตาลเพนโทสเป็นโมโนแซคคาไรด์ มีคาร์บอน 5 อะตอม ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชั่นอัลดีไฮด์หรือคีโตนอย่างใดอย่างหนึ่ง เพนโทสที่มีหมู่ฟังก์ชั่นอัลดีไฮด์หรืออัลโดเพนโทส (aldopentose) ได้แก่ ไซโลส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) ไรโบส (ribose) และไลโซส (lyxose) ส่วนเพนโทสที่มีหมู่ฟังก์ชั่นคีโตนหรือคีโตเพนโทส (ketopentose) ได้แก่ ไรบูโลส (ribulose) และไซลูโลส (xylulose) (นิธิยา, 2549) รายละเอียดของน้ำตาลเพนโทสที่สำคัญ มีดังต่อไปนี้

- ไซโลส (ภาพที่ 2.4) พบในโลเลกุลของไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นสายน้ำตาลเพนโทสชนิดหนึ่งที่พบในซังข้าวโพด รำข้าวต่างๆ และผลไม้บางชนิด เช่น เชอรี่ ท้อ สาลี่ และพลัม



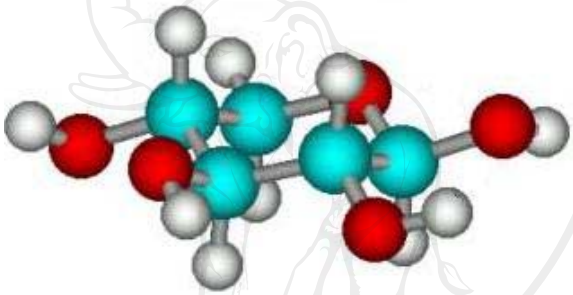
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลไซโลส

ที่มา: Wikimedia (2009)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทัศนีย์ (2533) ทดลองย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสในเปลือกข้าวโพดให้เป็นไซโลส โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) และเบต้าไซโลซิเดส (β-xylosidase) พบว่าความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพดที่เหมาะสมคือร้อยละ 3 ของน้ำหนักเปลือกข้าวโพดต่อปริมาตร แต่การเพิ่มปริมาณเปลือกข้าวโพดทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายพอลีแซคคาไรด์ (saccharification) ลดลง ในขณะที่การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่ทำให้ร้อยละของกระบวนการย่อยสลายพอลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น แต่มีผลทำให้ปฏิกิริยาสิ้นสุดเร็วขึ้น

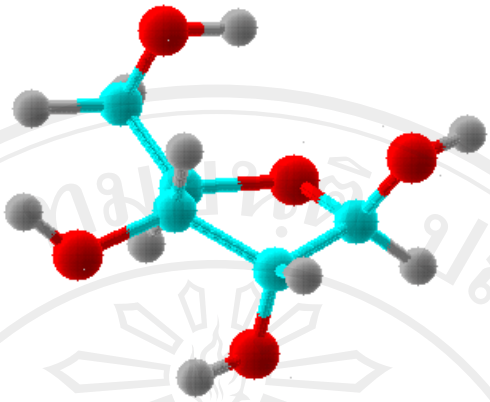
- อะราบิโนส พบในองค์ประกอบในโมเลกุลของกัม (gum) เพกติน (pectin) มิวซิเลจ (mucilage) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เมื่อทำการย่อยสลายกัมอะราบิก (gum arabic) ด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางในน้ำจะได้น้ำตาลอะราบิโนส (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลอะราบิโนส
ที่มา: Mastin (2009)

- ไรโบส (ภาพที่ 2.6) เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก คือ กรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) และโคเอนไซม์นิวคลีโอไทด์ (coenzyme nucleotide) นอกจากนี้ยังเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของวิตามินบีสอง อนุพันธ์ที่สำคัญคือ 2 - ดีออกซีไรโบส (2-deoxyribose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



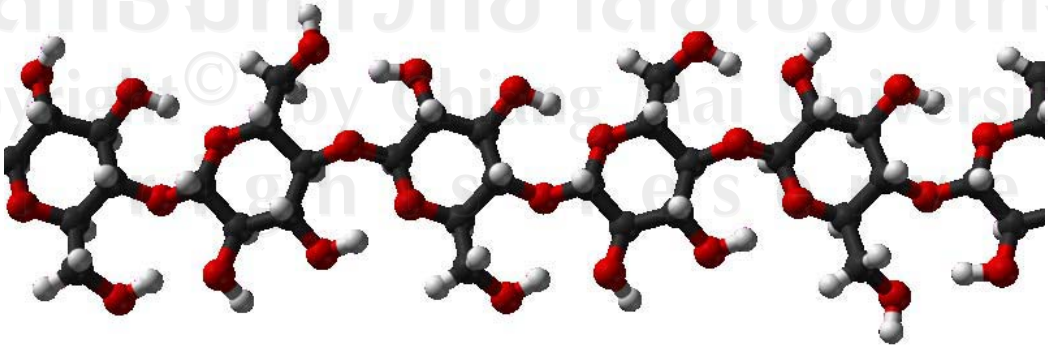
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลไรโบส

ที่มา: Fort (2008)

2.4.1.3 เซลลูโลส (cellulose)

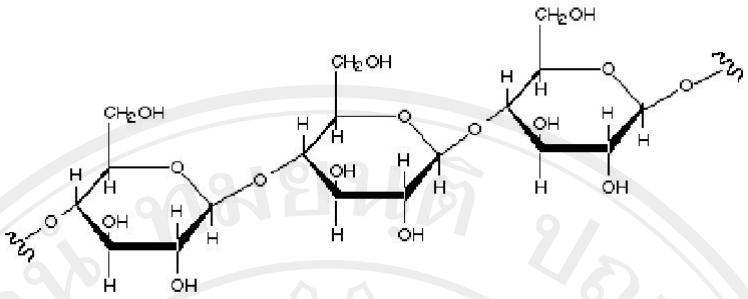
เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลีแซคคาไรด์สายตรงยาวของน้ำตาลกลูโคส ไม่มีแขนง (ภาพที่ 2.7) และเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของพืชรวมกับไซแลน (xylan) และลิกนิน (lignin) เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีสมบัติละลายน้ำได้น้อย เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง β–*D*-(1, 4) แตกต่างจากโมเลกุลแป้งที่ต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง α–*D*-(1, 4) (ภาพที่ 2.8) โมเลกุลเซลลูโลสเกาะกันตามแนวราบด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ ทำให้มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพอลีคริสตัลไลน์ (polycrystalline) ที่ยึดเกาะกันเป็นเส้นใย มีความหนาแน่นมากจึงทนทานต่อการถูกไฮโดรไลซ์และไม่ละลายน้ำ (นิธิยา, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

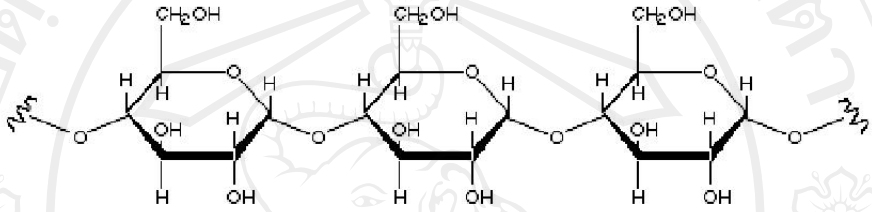


ภาพที่ 2.7 โครงสร้างเซลลูโลส

ที่มา: Yoshiharu *et al.* (2002)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.8 พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง (ก) β–*D*-(1, 4) (ข) α–*D*-(1, 4)

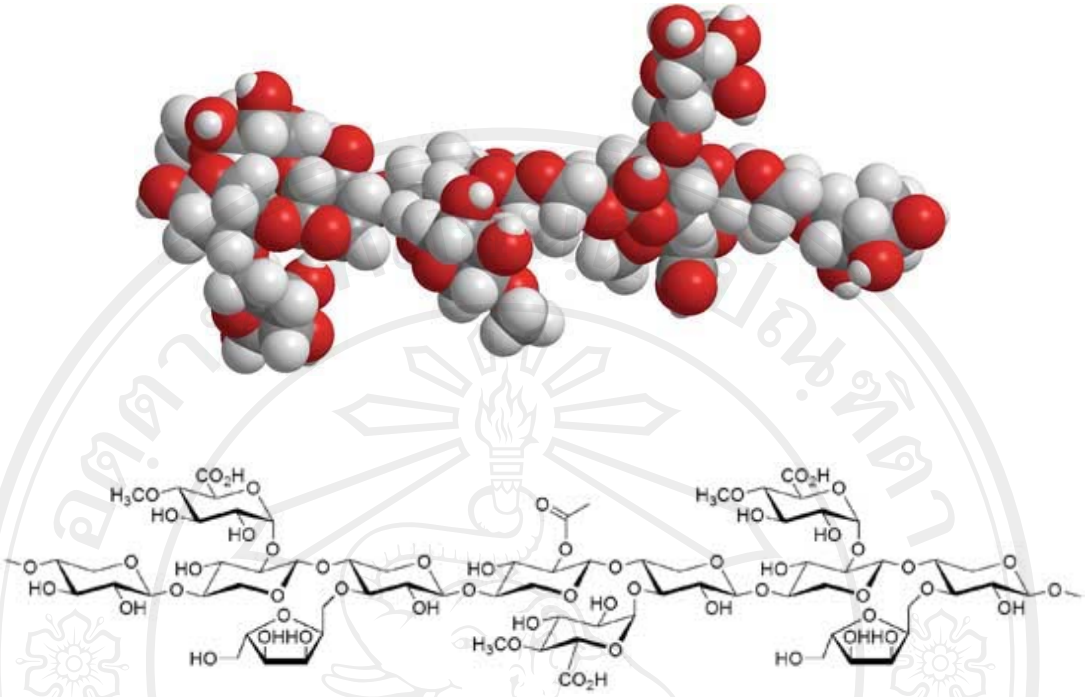
ที่มา: Alex *et al*. (2009); Larry and Chris (2009)

2.4.1.4 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หลายชนิดในโมเลกุลเดียวกัน (ภาพที่ 2.9) สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยสารละลายกรด ได้ผลผลิตเป็นโมเลกุลเดี่ยวของน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส โดยทั่วไปพืชมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 - 30 (นิธิยา, 2549) ตัวอย่างเฮมิเซลลูโลส เช่น

- กาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส กลูโคส และกาแลคโทส
- อะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส กาแลคโทส และอะราบิโนส
- อะราบิโนกาแลคแทน (arabinogalactan) ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโทสและอะราบิโนส
- กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและไซโลส
- กลูโคแมนแนน (glucomannan) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างเฮมิเซลลูโลส
ที่มา: PNNL (2008)

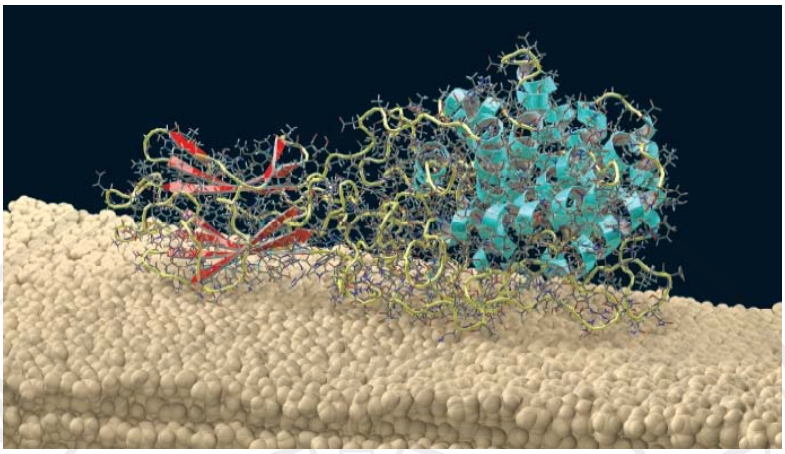
วิรงรอง (2548) ทดลองสกัดเฮมิเซลลูโลสจากเปลือก และเนื้อมะละกอด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ พบเฮมิเซลลูโลสในเปลือกและเนื้อคิดเป็นร้อยละ 17.27 และ 16.72 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยเฮมิเซลลูโลสจากมะละกอประกอบด้วยน้ำตาลกาแลกโทส กลูโคส ไซโลส แรมโนส (rhamnose) อะราบิโนส และกรดยูโรนิก (uronic acid)

2.4.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำตาล

2.4.2.1 เซลลูเลส (cellulase)

ปราณี (2543) ระบุว่าเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ผสมประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน (ภาพที่ 2.10) คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างเซลลูเลส

ที่มา: SciDAC (2007)

■ เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง (weakening) สำหรับเป็นสารตั้งต้นของเซลลูเลสลำดับถัดไป

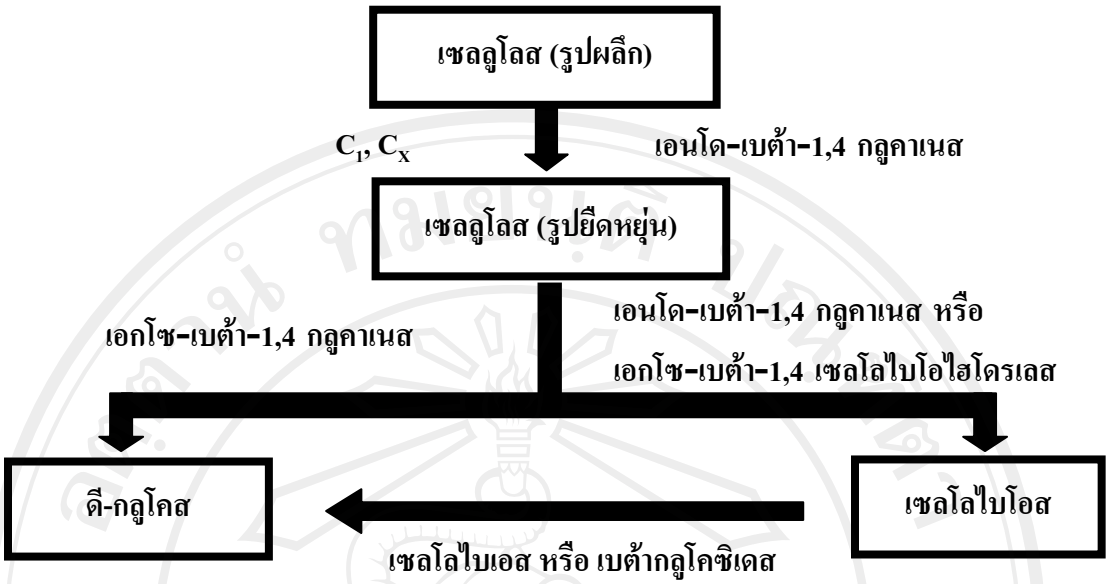
■ เอนไซม์ C_X หรือ β-1,4 glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลสหรืออนุพันธ์เซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ กล่าวคือสามารถย่อยสลายพันธะ β-1,4 ของสารตั้งต้นสังเคราะห์ เช่น คาร์บอกซีเมธิลเมธิลเซลลูโลส (CMC) หรือ ไฮดรอกซีเอธิลเซลลูโลส โดยอาจจัดแบ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้ 2 ชนิด คือ

- Endo-β-1,4 glucanases ย่อยสลายสายพอลีเมอร์ภายในสายอย่างอิสระ ได้ผลผลิตเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) และกลูโคส

- Exo-β-1,4 glucanases ย่อยสลายสายพอลีเมอร์จากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าไปอย่างมีระเบียบและมีการเปลี่ยนโครงรูปของผลผลิตจาก β- เป็น α-configuration ได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอสและกลูโคส

■ เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidases) ทำงานคล้าย exo-β-1,4 glucanases มีสารตั้งต้นพื้นฐานเป็นพอลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีจำนวนโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 2 (เซลโลไบโอส, cellobiose) ถึง 6 หน่วย (เซลโลเฮกโซส, cellohexose) โดยอัตราเร็วในการย่อยสลายจะลดลงเมื่อความยาวสายพอลีเมอร์เพิ่มขึ้น ผลผลิตที่ได้คือกลูโคสที่มีโครงรูปเปลี่ยนจากเดิม ดังแสดงหน้าที่ของเอนไซม์เซลลูเลสในแต่ละกลุ่มในภาพที่ 2.11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.11 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสทั้ง 4 กลุ่ม

ที่มา: ปราณี (2543)

Mark *et al.* (2007) ทดลองย่อยเปลือกเกรปฟรุต (grapefruit) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเพคติเนส (pectinase) ร่วมกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพื่อผลิตน้ำตาลที่ระดับ pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบระดับเอนไซม์น้อยสุดที่ให้สัดส่วนความเข้มข้นน้ำตาลสูงสุด คือ เอนไซม์ผสมระหว่างเพคติเนส เซลลูเลสและเบต้ากลูโคซิเดสที่ระดับ 5, 2 และ 2.1 มิลลิกรัมต่อกรัมเปลือกเกรปฟรุตแห้ง ตามลำดับ มีระดับ pH ที่เหมาะสมคือ 4.8 ได้สัดส่วนน้ำตาลกลูโคสต่อเปลือกเกรป-ฟรุตแห้งร้อยละ 21.99

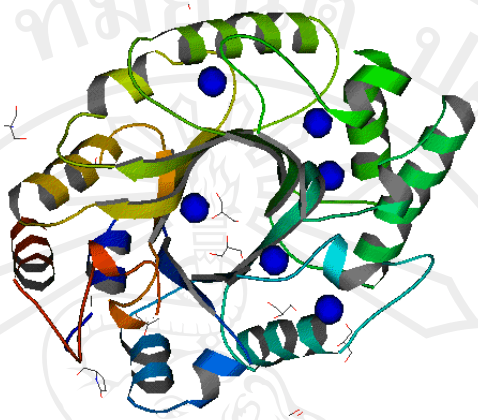
Chen and Jin (2006) ทำการศึกษาผลของเอทานอลและการเติมยีสต์ต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Penicillium decumbens* และการย่อยสลายซลลูโลส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสลดลง ซึ่งตรงข้ามกับค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้นในขณะที่การเติมยีสต์ไม่มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2.2 เพนโทซาเนส (pentosanase)

เอนไซม์เพนโทซาเนสแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถย่อยสลายพันธะที่อยู่ด้านใน (endo-) และกลุ่มที่สามารถย่อยสลายพันธะที่อยู่ด้านนอก (exo-) สำหรับเอนไซม์ที่ย่อย

สลายเฉพาะพันธะที่อยู่ด้านในมี 2 ชนิด คือ อะราบิเนส (arabinase) ซึ่งจะย่อยสลายพันธะ β-1,4-D-arabinopyranosyl glysoside ที่เป็นสายตรงสายหลัก (linear backbone) ของอะราแบน และไซลาเนส (ภาพที่ 2.12) ซึ่งจะย่อยสลายพันธะ β-1,4-*D*-xylanopyranosyl glysoside ของอะราบิโนไซแลน



ภาพที่ 2.12 โครงสร้างไซลาเนส

ที่มา: Schmidt *et al.* (1998)

สำหรับเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเฉพาะพันธะที่อยู่ด้านนอก จากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิงค์ของอะราแบน คือ อะราบิโนซิเดส (arabiosidase) ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิงค์ของไซแลน คือ ไซโลซิเดส (xylosidase) ทั้งนี้วิมลทิพย์ (2549) รายงานว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก โดยมีแหล่งอาหารคาร์บอนเป็นเปลือกข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของพรพิมล (2533) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรีย *B. circulans* สายพันธุ์ B6 ด้วยสารตั้งต้นไซแลน พบว่าการเติมน้ำตาลไซโลส กาแลคโตส หรือไซแลน สามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ ส่วนในกรณีของอะราบิโนส พบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถนำน้ำตาลอะราบิโนสมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้แต่สามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะที่มีไซแลนได้

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์เพนโทซาเนสชนิดที่ย่อยสลายพันธะที่อยู่ด้านนอก ที่ตัดหน่วยจากสายแขนง (arobinofuranosyl side chain) ออกจากอะราบิโนไซแลน (นิธิยา, 2549) ทั้งนี้ Boonpayung (2005) ได้ศึกษาทดลองปรับปรุงเสถียรภาพของเอนไซม์เพนโทซาเนสจากจุลินทรีย์ *Aspergillus* sp. FAS 128 พบว่าการใช้สารประกอบกลุ่ม bivalent metal สารประกอบกลุ่ม polyol โปรตีนและกรดอะมิโนยกเว้นน้ำตาลช่วยให้เสถียรภาพของสารละลายเพนโตซาเนสสูงขึ้น แต่การใช้ยูเรียร่วมกับแมงกานีสคลอไรด์จะช่วยเพิ่มเสถียรภาพและอัตราเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย

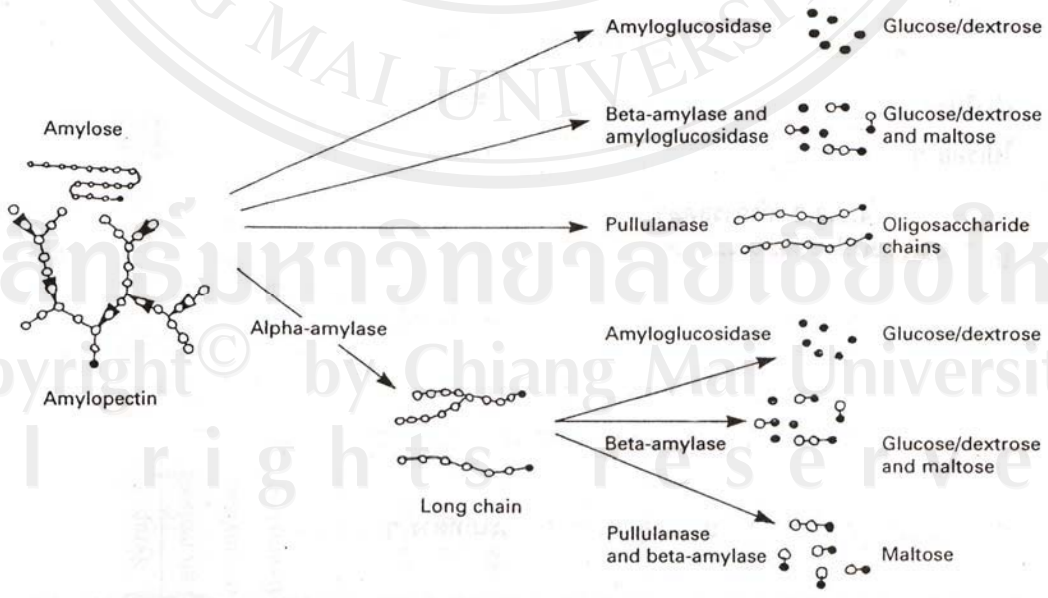
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2.3 อะไมเลส (amylase)

กล้าณรงค์ และคณะ (2540) รายงานว่าในการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส จะต้องทำให้แป้งสุกก่อนเนื่องจากแป้งดิบมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (non-dispersible) และอยู่ในรูปแกรนูล (granule) การทำให้แป้งดูดซับน้ำร่วมกับการให้ความร้อนจะทำให้พันธะไฮโดรเจนของโครงสร้างอ่อนลง การดูดน้ำมากขึ้นจนกระทั่งแตกตัว อะไมโลสและอะไมโลเพคตินถูกปลดปล่อยออกมานอกโครงสร้างทำให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เกิดได้เร็วขึ้น โดยแบ่งเอนไซม์อะไมเลสได้ 2 ประเภทตามตำแหน่งการย่อย คือ

- **เอนโดอะไมเลส (endoamylase)**

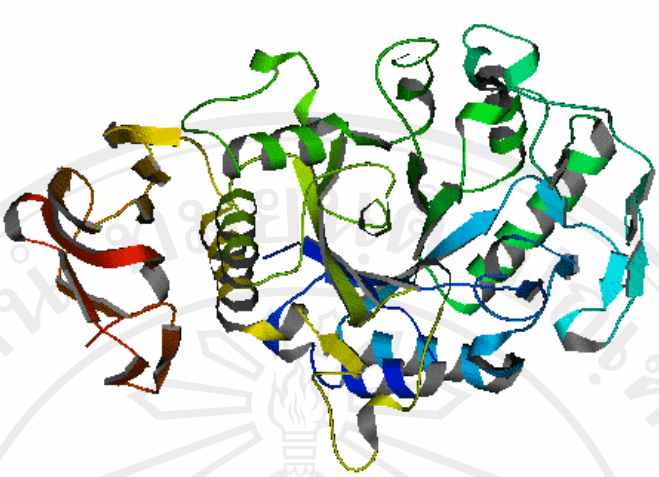
ย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ตำแหน่ง α-1,4 ลักษณะการทำงานเป็นการสุ่มตัดภายใน (ภาพที่ 2.13) เอนไซม์ประเภทนี้ คือ อัลฟ่าอะไมเลส (α-amylase) หรือ α-1,4-glucan-4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.1) ประกอบด้วย 2 พอลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) มีโครงสร้างเป็นสาขา (branch structure) (ภาพที่ 2.14) มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งหรือสารตั้งต้นอื่นๆ เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ ไดแซคคาไรด์ และสามารถย่อยภายในโมเลกุลของสารตั้งต้น (endo-enzyme) (Whistler and Bemiller, 1999) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคือ กลูโคส มอลโตสและลิมิตเดกซ์ตริน (limit dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2 - 6 หน่วย และยังมีโครงสร้างอัลฟ่า (α-configuration) ซึ่งเป็นโครงสร้างรูปเดิม (ปราณี, 2543)



ภาพที่ 2.13 ผลผลิตการย่อยสลายแป้งด้วยอะไมเลสทั้ง 3 ชนิด

ที่มา: ปราณี (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.14 โครงสร้างอัลฟ่าอะไมเลส

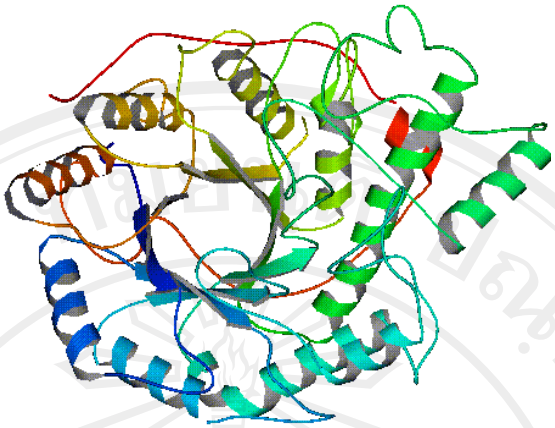
ที่มา: Aghajari *et al.* (1998)

- **เอกโซอะไมเลส (exoamylase)**

ย่อยแป้งจากปลาย non-reduced เข้าไป ได้แก่ เบต้าอะไมเลส (β-amylase) และแกมมาอะไมเลส (γ-amylase) ในส่วนเบต้าอะไมเลส หรือ α-1,4-glucan maltohydrolase (EC 3.2.1.2) (ภาพที่ 2.15) มีความเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายทีละ 1 หน่วยของมอลโตส หรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคสและจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ α-1,6 ได้ผลผลิตจากการย่อยสลายเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ทริน นอกจากนี้ส่วนใหญ่เป็นมอลโตสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิมคือได้ β-configuration

แกมมาอะไมเลส หรือ อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) หรือ α-1,4-glucan glucohydrolase (EC 3.2.1.3) สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิลได้หลายพันธะ คือ พันธะ α-1,3 พันธะ α-1,4 และพันธะ α-1,6 ลักษณะตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เป็นกลูโคสที่มีรูปร่างต่างไปจากเดิม คือได้ β-configuration

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.15 โครงสร้างเบต้าอะไมเลส

ที่มา: Mikami *et al*. (1994)

Whistler and Bemiller (1999) ระบุว่าในทางอุตสาหกรรมสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้จากเชื้อรา เช่น *A. niger* และ *A. oryzae* รวมทั้งแบคทีเรีย เช่น *B. cereus* (Hema *et al.*, 2006) และ *Pennicillium fellutanum* (Kathiresan and Manivannan, 2005) แต่เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียมีความสามารถในการทนความร้อนสูงจึงนิยมนำมาใช้ใน liquefaction process ในขบวนการย่อยแป้งที่ใช้อุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส

Yook and Robyt (2002) ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์อัลฟ่าอะไมเลสจาก *B. amyloliquefaciens* ร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Rhizopus niveus* ในการย่อยแป้งข้าวโพดละลายน้ำสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่งพบว่ามีมอลโตเดกซ์ติน (maltodextrins) หลังการย่อยร้อยละ 71 – 84

2.5 เอทานอล

2.5.1 การผลิตเอทานอลจากกลูโคส

ขั้นตอนการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อจุลินทรีย์มีด้วยกันสองช่วง ได้แก่ ช่วงที่มีการเจริญแบบใช้ออกซิเจน (aerobic cultivation) และ ช่วงที่ผลิตเอทานอล (ethanol production) ในช่วงแรกจะให้อากาศหรือออกซิเจนอย่างเต็มที่จนกระทั่งค่าอัตราการส่วนการหายใจ (Respiratory Quotient (RQ)) เพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 4 จากนั้นจึงทำการลดอัตราการไหลเข้าของอากาศลงเพื่อกระตุ้นให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอทานอลอันส่งผลให้ค่า RQ เพิ่มขึ้นถึง 12 - 25 (Shin and Rogers, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.1.1 ช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญแบบใช้ออกซิเจนเมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกลูโคส

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad (1)$$

ในทางทฤษฎีค่าสัดส่วนมวลชีวภาพต่อปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) คือ 0.4 มวลแห้งของเซลล์ต่อกรัมกลูโคสเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Shuler and Kargi (1992) พบว่าค่าที่วัดได้จริงคือ 0.38 – 0.51 กรัมมวลแห้งของเซลล์ต่อกรัมกลูโคส

2.5.1.2 ช่วงที่จุลินทรีย์มีการผลิตเอทานอลเมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกลูโคส

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad (2)$$

Shuler and Kargi (1992) อธิบายว่าค่าสัดส่วนเอทานอลที่ผลิตได้ต่อปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป ($Y_{P/S}$) ในทางทฤษฎีเท่ากับ 0.511 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส แต่ค่าที่วัดได้จริงมีค่าประมาณร้อยละ 90 – 95 ของ $Y_{P/S}$ ในทางทฤษฎี เนื่องจากกลูโคสถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นมวลชีวภาพและผลพลอยได้อื่นๆ ในกระบวนการเมตาโบลิซึม เช่น กลีเซอรอล หรืออะซิเตต

2.5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล

Dien *et al.* (2003) พบว่ามีการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมกับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อพัฒนาให้เหมาะสมกับการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในกรณีสารตั้งต้นเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอย่างลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) อันประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตซับซ้อนต่างๆ เชื้อจุลินทรีย์ต้องสามารถนำน้ำตาลหลายชนิดไปใช้ในกระบวนการหมัก โดยเฉพาะกับน้ำตาลชนิดที่ *S. cerevisiae* นำไปใช้ไม่ได้ ตัวอย่างของแบคทีเรียแกรมลบที่ถูกปรับแต่งสายพันธุกรรมจนนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ดี คือ *E. coli*, *K. oxytoca*, และ *Z. mobilis* เกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์ประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอล คือค่าสัดส่วนโดยโมลของเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกลูโคสที่ใช้ไป (yield) เนื่องจากค่าใช้จ่ายกว่า 1 ใน 2 ของอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังคือค่าวัตถุดิบ (ปฐมสุดา, 2548) ค่า yield ที่สูงแสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอทานอลโดยมีสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย และใช้น้ำตาลกลุ่มหลักอย่างกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กาแลกโตสและแมนโนสได้ทั้งหมด ลักษณะสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอทานอลแสดงในตารางที่ 2.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

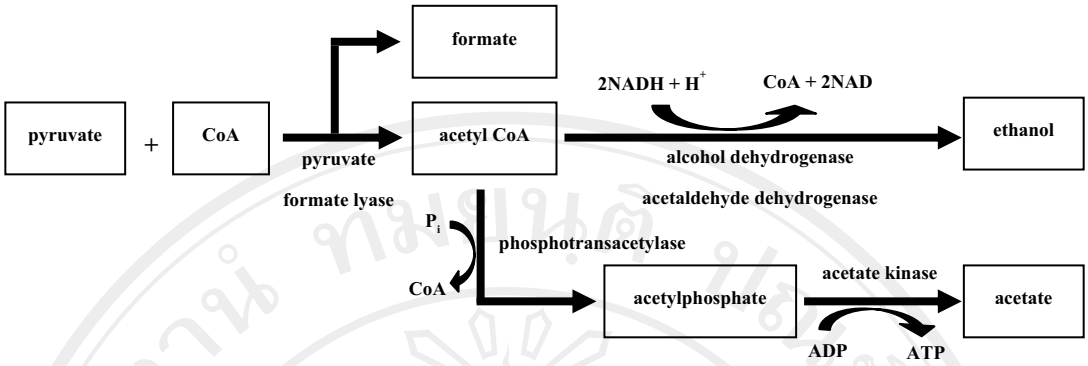
ตารางที่ 2.4 ลักษณะสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเอทานอล

คุณลักษณะที่ต้องการ	เกณฑ์ที่ใช้
ค่า yield ของเอทานอล	มากกว่าร้อยละ 90 จากค่าในทางทฤษฎี (0.511)
ความทนทานต่อเอทานอล	มากกว่า 40 กรัมต่อลิตร
ผลิตผลของเอทานอล (ethanol productivity)	มากกว่า 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
เจริญได้ง่ายและมีความทนทาน	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาไม่แพง
เจริญได้ดีในวัตถุดิบเข้มข้นที่ผ่านการย่อยแล้ว	มีความทนทานต่อสารยับยั้งการเจริญ
สามารถป้องกันเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เจริญแข่งขัน	ค่า pH ต่ำๆ หรืออุณหภูมิสูง

ที่มา: ปรับปรุงจาก Dien *et al*. (2003)

การนำ *E. coli* มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (biocatalyst) ในการผลิตเอทานอลมีข้อได้เปรียบคือสามารถใช้น้ำตาลหลายชนิดในกระบวนการหมัก และไม่ต้องการปัจจัยในการเจริญที่สลับซับซ้อน อย่างไรก็ตามข้อเสียในการใช้แบคทีเรียชนิดนี้คือ มีช่วง pH ที่เจริญได้ค่อนข้างแคบอยู่ในช่วงที่เป็นกลางระหว่าง 6.0 – 8.0 และมีความทนทานน้อยกว่ายีสต์ นอกจากนี้ยังไม่พบข้อมูลที่ยืนยันความปลอดภัยจากการใช้เซลล์ของ *E. coli* ที่เหลือจากการหมักไปเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงสัตว์ ซึ่งล้วนเป็นอุปสรรคที่ทำให้การใช้ *E. coli* เพื่อผลิตเอทานอลไม่เป็นที่นิยม Dien *et al*. (2003) อธิบายว่าในกระบวนการหมัก *E. coli* จะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลและกรดอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส (pyruvate formate lyase, PFL) เปลี่ยนไพรูเวต (pyruvate) ให้เป็นเอทานอล (ภาพที่ 2.16) การผลิตเอทานอลในลักษณะนี้ต้องใช้ NADH + H^+ สุทธิ 1 โมเลกุลต่อการผลิตเอทานอล 1 โมเลกุล (ผลิต NADH + H^+ หนึ่งโมเลกุลในกระบวนการไกลโคไลซิสหรือ Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) pathway เพื่อผลิตไพรูเวตหนึ่งโมเลกุล และใช้ NADH + H^+ สองโมเลกุลในการเปลี่ยนไพรูเวตหนึ่งโมเลกุลให้เป็นเอทานอล) เพื่อให้เกิดสมดุลของ NADH + H^+ จึงต้องมีการผลิตกรดอะซิติก (acetic acid) และกรดซัคซินิค (succinic acid) ขึ้น ในขณะที่ยีสต์และ *Z. mobilis* ผลิตแต่เอทานอล (homoethanol fermentative) เพราะใช้เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์-บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase, PDC) เปลี่ยนไพรูเวตเป็นอะเซตาลดีไฮด์ (acetaldehyde) และคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นจึงใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) เปลี่ยนอะเซตาลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอลอีกทีหนึ่ง ซึ่งในปฏิกิริยาหลังนี้ต้องใช้ NADH + H^+ หนึ่งโมเลกุล ดังนั้นการผลิตเอทานอลของยีสต์และ *Z. mobilis* จึงเป็นการผลิตที่เกิดสมดุลของ NADH + H^+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.16 การผลิตเอทานอลจากไพรูเวตโดยใช้เอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส
ที่มา: Hemschemeier and Happe (2004)

Z. mobilis เป็นจุลินทรีย์แกรมลบที่มีคุณสมบัติเด่นหลายประการที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลเพราะนอกจากจะใช้ homoethanol fermentation pathway แล้ว ยังทนทานต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงได้ถึง 120 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* แล้ว *Z. mobilis* มีค่า yield ในการผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์ร้อยละ 5 - 10 เมื่อใช้สารตั้งต้นคือกลูโคส และมีค่าผลิตผลของเอทานอล (ethanol productivity) สูงกว่า 2.5 เท่าอีกด้วย (Rogers *et al*., 1982) นอกจากนี้ *Z. mobilis* ยังเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย (GRAS – Generally Recognized As Safe) อย่างไรก็ตาม *S. cerevisiae* ยังเป็นที่นิยมในโรงงานอุตสาหกรรมเพราะมีความทนทาน แม้ว่า Doelle *et al.* (1989) และ Millichip and Doelle (1989) จะประสบความสำเร็จในการทดลองใช้ *Z. mobilis* เพื่อผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมก็ตาม เหตุผลที่ *Z. mobilis* มีค่า yield ในการผลิตเอทานอลที่สูง เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์เพียงกลุ่มเดียวที่ใช้กลูโคสด้วยกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยผ่านกระบวนการ Entner-Doudoroff (ED) pathway ทำให้สร้าง ATP น้อยกว่ากระบวนการไกลโคไลซิสสองเท่า มวลชีวภาพ (biomass) จึงเกิดขึ้นน้อยกว่าแต่ผลิตเอทานอลได้มากขึ้น โดย *Z. mobilis* ใช้น้ำตาลได้สามชนิดคือ กลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส (Dien *et al*., 2003)

K. oxytoca เป็นแบคทีเรียที่เจริญในเยื่อไม้ต่างๆ สามารถเจริญได้ในช่วง pH ต่ำถึง 5.0 และอุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียส สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวพวกเพนโทส (pentose) และเฮกโซส (hexose) หลายชนิด โดยใช้ PFL pathway ในการผลิตเอทานอล รวมถึงกรดอินทรีย์และผลิตภัณฑ์หลายชนิด

อริสสา (2546) ได้ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการหมักน้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5019 ในการหมักน้ำตาลกลูโคส และ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในการหมักน้ำตาลไซโลส พบว่าสัดส่วนน้ำตาลไซโลสต่อกลูโคสที่

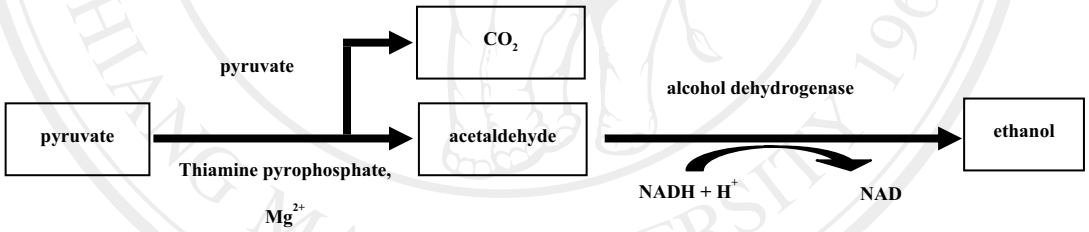
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหมาะสมคือ 1 ต่อ 8 และสัดส่วนของเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5019 ต่อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ที่เหมาะสมคือ 1 ต่อ 1 ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ สภาวะที่มีรอบการกวนคือ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

รักชนก (2539) ศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลัง ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น และความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยอาศัยจุลินทรีย์ 2 ชนิด ร่วมกันทำงาน พบว่าการอยู่ร่วมกันของ *S. cerevisiae* ATCC 4098 และ *A. oryzae* ATCC 11491 ในรูปการตรึงเซลล์ในเจลแคลเซียมอัลจิเนต สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 59 กรัมต่อลิตร ในเวลา 36 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบการกวน 250 รอบต่อนาที ที่ pH 6 ในสภาวะที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 2 และสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1

2.6 เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส

มวลชีวภาพที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดผลิตเอทานอลประกอบด้วยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ตามผังสมการเคมีที่แสดงไว้ในภาพที่ 2.17



ภาพที่ 2.17 การผลิตเอทานอลจากไพรูเวตโดยใช้เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส
ที่มา: Leksawasdi (2004)

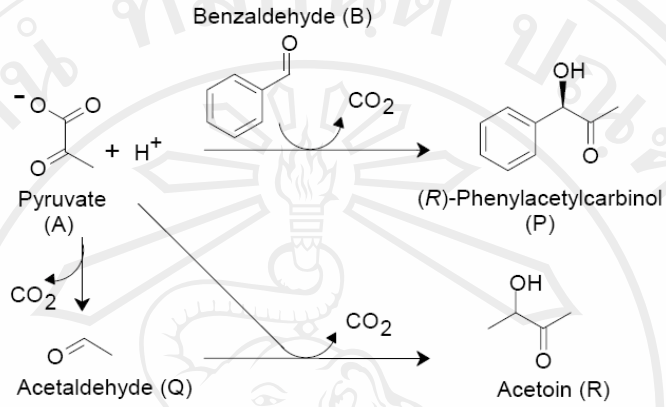
Rosche *et al.* (2005) รายงานว่าเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจากเชื้อ *C. utilis* ในสภาวะที่มีไพรูเวตมีเสถียรภาพต่อเบนซาลดีไฮด์มากกว่าสภาวะที่ไม่มีไพรูเวต ซึ่งในสภาวะที่ไม่มีไพรูเวต เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจะถูกเบนซาลดีไฮด์หยุดการทำงานโดยสมบูรณ์ภายใน 30 นาที

2.7 อาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล (*R*-phenylacetylcarbinol)

กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นที่มีสารตั้งต้นคือไพรูเวตและเบนซาลดีไฮด์ ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สามารถผลิตสารอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอล (*R*-phenylacetylcarbinol, PAC) ซึ่งใช้เป็นสารเคมีตั้งต้น (precursor) ในการผลิตยาเอฟีดรินสำหรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แก้โรคหืดหอบและซูโดเอฟีดรินสำหรับบรรเทาอาการคัดจมูกเนื่องจากไข้หวัด (ภาพที่ 2.18) ทั้งนี้ ไพรูเวตอาจเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by-product) คือ อะเซตาลดีไฮด์และอะเซโตอินได้ด้วย



ภาพที่ 2.18 การผลิต PAC และสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส
ที่มา: Leksawasdi (2004)

Rosche *et al.* (2002) ศึกษากระบวนการผลิต PAC ด้วยเอนไซม์ในระบบเบนซาลดีไฮด์อีมัลชั่น พบว่าในสภาวะที่มีสารตั้งต้นเบนซาลดีไฮด์ความเข้มข้น 400 มิลลิโมล่าร์ และไพรูเวตความเข้มข้น 600 มิลลิโมล่าร์ เมื่อเติมเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจากเชื้อ *R. javanicus* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ 7.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร สามารถผลิต PAC ได้ที่ระดับ 50.6 กรัมต่อลิตร หรือ 337 มิลลิโมล่าร์ ภายในเวลา 29 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ทั้งนี้การลดอุณหภูมิจาก 23 องศาเซลเซียส เหลือ 6 องศาเซลเซียส ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นลดลง แต่จะทำให้ความเข้มข้น PAC หลังปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

Rosche *et al*. (2005) ศึกษากระบวนการไบโอทรานฟอร์เมชั่นของเบนซาลดีไฮด์และไพรูเวตโดยมีเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจากเชื้อ *C. utilis* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ MOPS ต่ำที่ระดับ 20 มิลลิโมล่าร์ พบว่าเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสมีครึ่งชีวิตที่ 138 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเบนซาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 400 มิลลิโมล่าร์ ส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และการเติมกลีเซอรอลที่ระดับ 2 โมล่าร์ ไม่ได้ช่วยป้องกันเอนไซม์จากการถูกยับยั้งการทำงาน แต่ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นเพิ่มขึ้นร้อยละ 50 และเพิ่มระดับ PAC หลังปฏิกิริยาจากระดับ 40 เป็น 51 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Sanford *et al*. (2005) ศึกษาการผลิต PAC ด้วยระบบสองเฟสระหว่างชั้นน้ำและชั้นอินทรีย์ โดยใช้เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจาก *C. utilis* พบว่าชั้นอินทรีย์ที่เป็นออกทานอลมีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากสารตั้งต้นเบนซาลดีไฮด์ที่เป็นพิษต่อเอนไซม์ สามารถผ่านเข้าสู่ชั้นน้ำที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 มิลลิโมล่าร์ ทั้งนี้ในระบบที่มีปริมาณชั้นน้ำและชั้นอินทรีย์ในสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง เมื่อเติมเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสที่มีกิจกรรมคาร์โบไลเกสที่ระดับ 8.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบการผลิต PAC ที่ระดับ 141 กรัมต่อลิตร หรือ 937 มิลลิโมล่าร์ ในชั้นออกทานอล และ 19 กรัมต่อลิตร หรือ 127 มิลลิโมล่าร์ ในชั้นน้ำ ภายในเวลา 49 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อลดปริมาณเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสลงเหลือ 0.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบการผลิต PAC ที่ระดับ 102 กรัมต่อลิตร ในชั้นออกทานอล และ 13 กรัมต่อลิตร ในชั้นน้ำ ที่เวลาเดียวกัน

พูนสิริและคณะ (2551) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งผสมแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นจากแหล่งอื่น ให้มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ระดับ 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร เมื่อนำมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ไปทำไบโอทรานฟอร์เมชั่นในระบบเบนซาลดีไฮด์อิมัลชั่นเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ในสภาวะตั้งนิ่ง ที่มีฟอสเฟตเข้มข้น 900 มิลลิโมล่าร์ พบเชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* TISTR 5606 สามารถผลิต PAC ได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 1.19 ± 0.01 มิลลิโมล่าร์ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีฟอสเฟต *C. utilis* TISTR 5198 สามารถผลิต PAC ได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 2.73 ± 0.18 มิลลิโมล่าร์

พรรณทิวาและคณะ (2551) ศึกษาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดลำไยอบแห้งผสมกากน้ำตาลเข้มข้นสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 63.5 – 64.4 กรัมต่อลิตร เมื่อนำมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ไปทำไบโอทรานฟอร์เมชั่นแบบสองเฟสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะตั้งนิ่ง พบเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิต PAC คือ *S. cerevisiae* TISTR 5020 (4.72 มิลลิโมล่าร์) *S. cerevisiae* TISTR 5606 (3.72 มิลลิโมล่าร์) *C. utilis* TISTR 5198 (2.98 มิลลิโมล่าร์) และ *Z. mobilis* TISTR 550 (0.86 มิลลิโมล่าร์)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved