สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซน เพื่อใช้ในการย่อยแป้ง

นางสาว เกตุมุกฎา รัตนพรสมปอง
นางสาว สินีนุช จงจรูญเกียรติ
นาย โอภาส คิรินทร์รัตนะ

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 39896
วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544

.b.....
.i.....

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Immobilization of glucoamylase on chitosan for strach hydrolysis

Miss Katmookda Rattanapornsompong
Miss Sineenuch Jongjaroongiat
Mr. Opaht Kirinruttana

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซน เพื่อใช้ในการย่อยแป้ง	
โดย	นางสาว เกตุมุกฎา	รัตนพรสมปอง
	นางสาว สินีนุช	จงจรูญเกียรติ
	นาย โอภาส	คีรินทร์รัตนะ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. นวลพรรณ	ณ ระนอง
	อาจารย์ มงคล	เพ็ญสายใจ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

---------- กรรมการ
(ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

---------- กรรมการ
(อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซน เพื่อใช้ในการย่อยแป้ง

โดย นางสาว เกตุมุกฎา รัตนพรสมปอง

นางสาว สินีนุช จงจรูญเกียรติ

นาย โอภาส คิรินทร์รัตนะ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

เสนอ ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

ศึกษาสภาวะในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนโดยการเชื่อมขวางด้วยกลูตา-รัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์ สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ คือ พีเอช 5.0 เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนสูงสุดเท่ากับ 888.94 หน่วยต่อกรัม ทำการแปรผันน้ำหนักเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซน 2, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้ย่อยแป้งมันสำหลังที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตแซน 10 เปอร์เซนต์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3735.30 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 360 นาที และมีอัตราเร็วของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.70 ไมโครโมลต่อนาที เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยแป้งพบว่า หลังจากการย่อยแป้งครั้งที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ถูกตรึงเหลือ 43.71 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่จะคงที่หลังจากการย่อยแป้งครั้งที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Immobilization of glucoamylase on chitosan for strach hydrolysis
Student	Miss Katmookda Rattanapornsompong
	Miss Sineenuch Jongjaroongiat
	Mr. Opaht Kirinrattana
Department	Applied Biotechnology
Special Project advisor	Asst.Prof. Dr. Nuanphan Naranong
Academic year	2000

Abstract

Optimum conditions for the immobilization of glucoamylase on chitosan by crosslinking with 1% glutaraldehyde were studied. The optimum immobilization conditions were pH 5.0, crosslinking time of 60 min at room temperature. The highest activity of immobilized glucoamylase on chitosan was 888.94 U/g. Chitosan-immobilized glucoamylase were varied to 2, 6 and 10% (w/v) for hydrolysis of 1% cassava starch at pH 5.0, 50 ^{0}C, 150 rpm. The maximum value of reducing sugar concentration was 3735.30 μmol/ml. within 360 min and the initial rate of reducing sugar production was 24.70 μmol/ l min when 5 g of chitosan-immobilized glucoamylase was used. Residual activity was 43.71% after the first time of the starch hydrolysis and the residual activitty was constant after the second time of hydrolysis.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถทำเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งท่านได้ช่วยเอาใจใส่ ให้ข้อแนะนำด้วยดีเสมอมาและกรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการและอาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ กรรมการพิจารณาโครงการพิเศษที่ช่วยให้คำปรึกษาในการทดลอง ทั้งนี้ยังขอขอบคุณ คุณวิทยา เขียวเขิน เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่ช่วยกรุณาให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมี และเจ้าหน้าที่ธุรการด้วย ที่ทำให้การทำการทดลองเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเพื่อนๆที่ช่วยเหลือ และให้ยืมอุปกรณ์ให้การทำโครงงานพิเศษนี้บรรลุไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ โครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อ โครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	36
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป	7
2.2	ส่วนประกอบทางเคมีของเม็ดแป้งชนิดต่างๆที่ผลิตในอุตสาหกรรม	8
2.3	ส่วนประกอบบางอย่างของแป้ง	9
2.4	ลักษณะการเจลาติไนเซชันของแป้งชนิดต่างๆ	12
4.1	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนแบบเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่เวลาและพีเอชต่างๆกัน	37
4.2	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนปริมาณต่างๆกันในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	40
4.3.1	แสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนมาใช่ย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	43
4.3.2	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปก่อนและหลังย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของอะไมโลส	4
2.2	โครงสร้างของอะไมโลเพคติน	4
2.3	โครงสร้างการย่อยแป้งโดยเอนไซม์อะไมเลส	5
2.4	โครงสร้างการจับตัวของกลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์	20
2.5	กระบวนการผลิตไคโตแซน	22
3.1	ไคโตแซนขนาด 80 mash	31
3.2	เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	32
3.3	เอนไซม์บนไคโตแซนก่อนย่อยแป้ง	33
3.4	เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนหลังย่อยแป้ง	34
3.5	เปรียบเทียบสีของไคโตแซนก่อนและหลังย่อยแป้ง	35
4.1	แผนภูมิแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตแซนแบบเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่เวลา และพีเอชต่างๆกัน	38
4.2	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนปริมาณต่างๆกันในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	41
4.3.1	กราฟแสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนมาใช้ย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	44
4.3.2	แผนภูมิแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปก่อนและหลังย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	45

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชเขตร้อน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot utilisisma* สามารถทนต่อความแห้งแล้งและเจริญได้ในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ จึงปลูกได้ตามเขตต่างๆทั่วโลก มีชื่อเรียกต่างๆกันไปตามแหล่งที่ปลูก เช่น คาซซาวา (cassava) , มานิฮอค (Manioc) , ทาพิโอคา (tapioca) , แมนดิโอคา (mandioca) , ยูคา (yuka) เป็นต้น สำหรับประเทศไทย มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ปลูกมากทางภาคตะวันออกและตะวันออกเฉียงเหนือ ผลผลิตของมันสำปะหลังส่วนมากใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ และใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น กาว, วุ้นเส้น, แป้งมัน, กระดาษ เป็นต้น บางส่วนส่งไปขายยังต่างประเทศในรูปของ มันเส้น, แป้งมัน, มันอัดเม็ด แต่กระนั้นก็ตามยังปรากฏว่ามีเหลืออยู่ในประเทศปีละมากๆดังนั้นจึงควรหาวิธีแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีราคาแพงขึ้น เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำเชื่อมฟรักโตส (fructose syrup) ที่มีความหวานมากเหมาะที่จะนำไปใช้รับประทานหรือผสมอาหารอื่นๆหรือใช้ในกระบวนการการหมัก (fermentation) เพื่อผลิตสารชนิดอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์ (alcohol) กรดอะมิโน (amino acid) เป็นต้น (Odighoh,1983)

เริ่มต้นได้มีการนำกรดต่างๆมาใช้ย่อยแป้ง เช่น H_2CO_3, HCl, HNO_3 และพบว่า กรด HNO_3 สามารถย่อยสลายแป้งได้ดีกว่ากรด HCl หรือ H_2SO_4 แต่การย่อยแป้งด้วยกรดอย่างเดียวจะมีปฏิกิริยาข้างเคียงเกิดขึ้นด้วย(กล้าณรงค์, 2521) และมีผลต่อรสของสารละลายกลูโคส จึงได้มีการพัฒนาการใช้เอนไซม์มาย่อยแป้งแทนการใช้กรด โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลสกับบีตาอะไมเลส ซึ่งเอนไซม์สองตัวนี้มีคุณสมบัติในการย่อยแตกต่างกัน โดยแอลฟาอะไมเลสจะย่อยพันธะ α(1-4)glycosidase linkage แบบสุ่ม ส่วนบีตาอะไมเลสจะย่อยแป้งจากปลาย non-reducing ที่ตำแหน่ง α(1-4)glycosidase linkage เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส โดยทั่วไปการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส จะใช้กับแป้งที่ถูกทำให้สุกก่อน เนื่องจากแป้งดิบมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (nondispersible) และต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โดยน้ำแป้งผสมกับสารละลายเอนไซม์อะไมเลสจะเกิดปฏิกิริยาในการย่อยที่อุณหภูมิและพีเอชเหมาะสมจนได้น้ำตาล แต่วิธีนี้จะมีการสูญเสียเอนไซม์ ดังนั้นถ้านำเอนไซม์มาตรึงกับวัสดุตรึงที่เหมาะสมก็จะเป็นการช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประหยัดเอนไซม์ โดยวัสดุที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น เซลลูโลส, ไคโต-แซน, อะกาโรส, อลูมิน่า เป็นต้น สำหรับไคโตแซนเป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆมากมาย เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ง่าย ดังนั้นถ้ามีการนำไคโตแซนมาตรึงเอนไซม์ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล จะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตและสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกับไคโตแซน โดยใช้วิธีการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์
2. ศึกษาหาปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง
3. ศึกษาถึงการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนกลับมาใช้ใหม่

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เพื่อใช้ในการศึกษาถึงสภาวะในการตรึงเอนไซม์ และการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม และผลิตภัณฑ์อื่นๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลส
2. สามารถนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกลับมาใช้ได้ใหม่ ซึ่งเป็นการประหยัดงบประมาณในการซื้อเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

แป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งซึ่งเป็นอาหารที่ให้พลังงาน ได้จากธรรมชาติโดยการสังเคราะห์แสงของพืช มีสูตรโมเลกุล $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งที่ได้จากพืชต่างชนิดกันจะมีลักษณะของเม็ดแป้งต่างกัน ซึ่งตรวจดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเฉพาะของเม็ดแป้งนี้ใช้เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของแป้งได้ โดยทั่วไปมักพบแป้งในราก ลำต้น และเมล็ดของพืช

แป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ยาว โดยปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation polymerization) ปฏิกิริยาการรวมตัวของกลูโคส 2 โมเลกุล จะสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุล (Dziedzic and Kearsley, 1984) ในโมเลกุลของแป้งประกอบด้วยโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ อะไมโลสและอะไมโลเพคติน

อะไมโลส (Amylose)

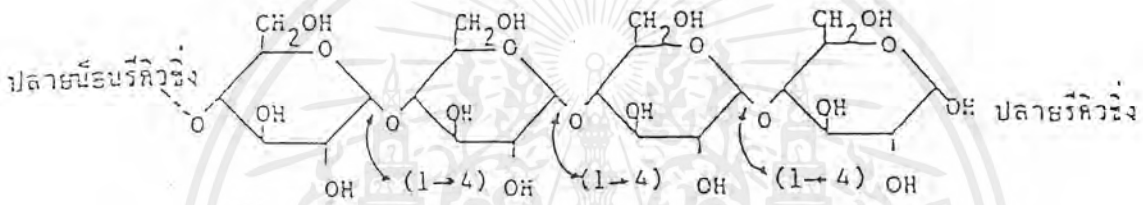
อะไมโลสประกอบด้วยดีกลูโคสประมาณ 100-1,000 หน่วย ยึดต่อกันด้วยพันธะ α(1-4) glycosidic linkage เป็นโซ่ยาว (linear chain) ไม่มีกิ่งก้าน โดยทั่วไปแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลสประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ อะไมโลสเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีน้ำเงินเข้ม (intense blue) โครงสร้างของอะไมโลสแสดงดังรูปที่ 2.1 (Dziedzic and Kearsley, 1984)

อะไมโลเพคติน (Amylopectein)

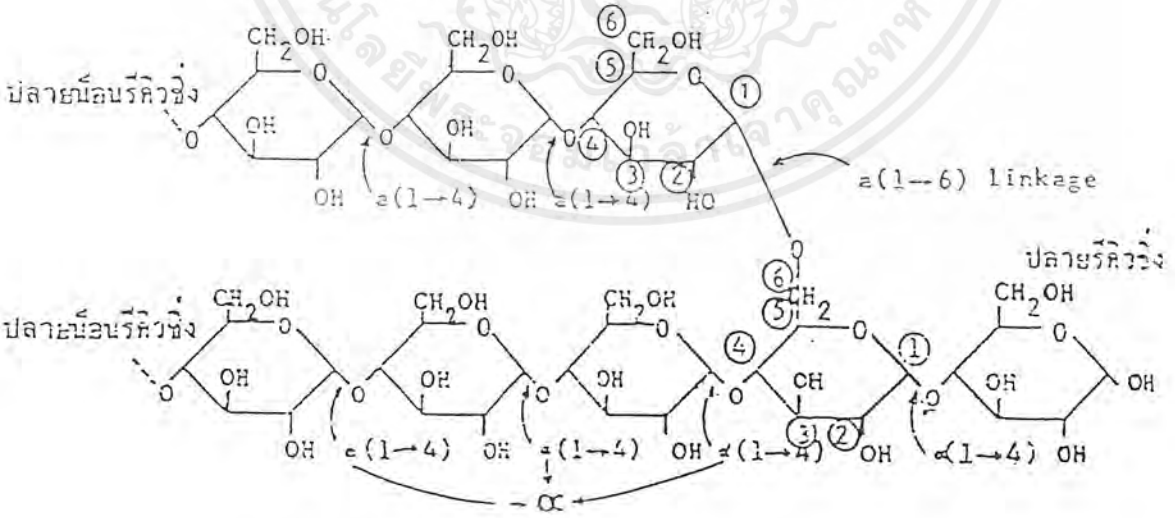
อะไมโลเพคตินประกอบด้วยดีกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วยพันธะ α(1-4) glycosidic linkage และดีกลูโคสที่มีแขนงแยกออกทุกๆ 20-30 หน่วย ตรงจุดแยกกลูโคสจะต่อกันด้วยพันธะ α(1-6) glycosidic linkage อะไมโลเพคตินเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ โดยทั่วไปแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลเพคตินประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยที่สุดประมาณ 1,000,000 และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง (violet red) โครงสร้างของอะไมโลเพคตินแสดงดังรูปที่ 2.2



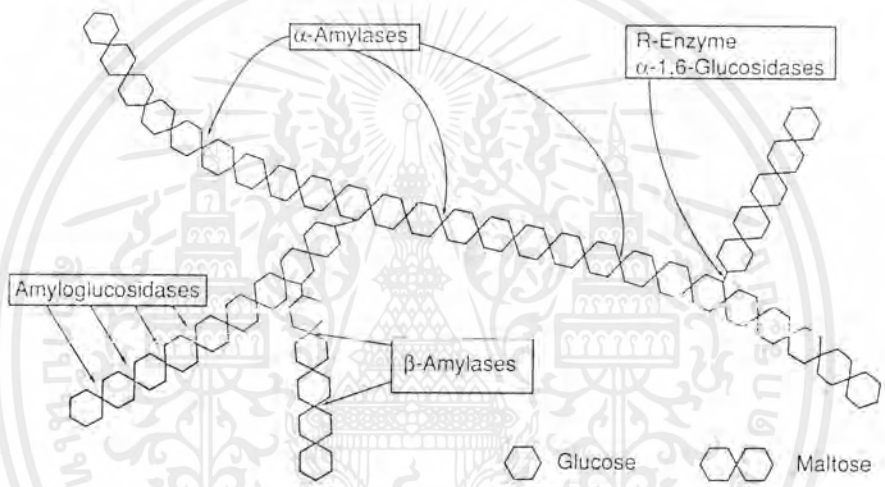
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของอะไมโลส(สุนีย์,2539)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของอะไมโลเพคติน(สุนีย์,2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้นคุณสมบัติของแป้งจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนเชิงโมลของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน (Ball and Schwimmer,1944)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างการย่อยแป้งโดยเอนไซม์อะไมเลส(Meyer,1963)

อะไมโลส	อะไมโลเพคติน
1. ละลายน้ำได้ดีกว่า	1. ละลายน้ำได้น้อยกว่า
2. เมื่อต้มในน้ำจะหนืดข้นน้อยกว่าแต่ขุ่นกว่า	2. หนืดข้นมากกว่าและใส
3. ให้สีน้ำเงินกับสารไอโอดีน	3. ให้สีแดงม่วงหรือสีน้ำตาล
4. ประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคสที่ต่อกันเป็นเส้นตรง	4. โมเลกุลต่อกันคล้ายกิ่งไม้
5. ประกอบด้วยกลูโคส 200-2100 หน่วย	5. แต่ละกิ่งมีกลูโคส 20-25 หน่วย
6. ต้มแล้วทิ้งไว้จับเป็นวุ้นได้	6. ไม่จับตัวเป็นวุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติทางกายภาพและเคมีของแป้งมันสำปะหลัง

1. โครงสร้างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

เม็ดแป้งมันสำปะหลังมีลักษณะคล้ายรูปถ้วย (Spalding,1979) มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ถึง 35 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยจำนวน (Number average diameter) เท่ากับ 20 ไมครอน (Swinkles, 1976) เมื่อตรวจดูเม็ดแป้งด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์จะเห็นลักษณะกากบาทสีดำ เรียกว่า Birefringence

ภายในเม็ดแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ซึ่งมีการเรียงตัวต่างกัน แบ่งได้เป็น 2 แบบ แบบแรก สายโพลีเมอร์ของอะไมโลสเรียงตัวขนานกันอย่างเป็นระเบียบ มี อะไมโลสบางส่วนเรียงขนานกับส่วนที่เป็นสายตรงส่วนนอกของอะไมโลเพคติน และยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้โมเลกุลบริเวณนี้จับกันอย่างหนาแน่น และมีแรงยึดเหนี่ยวสูงบริเวณนี้เรียกว่า Crystalline regions หรือ Micelles เป็นส่วนที่สำคัญที่ทำให้เกิดลักษณะ Birefringence ของเม็ดแป้ง Crystalline regions นี้ มีความสามารถในการดูดน้ำและพองตัวต่ำมาก ส่วนแบบที่สองโมเลกุลเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ แรงดึงดูดระหว่างสายโพลีเมอร์ของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินต่ำกว่าแบบแรก บริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบนี้เรียกว่า Amorphous regions เป็นส่วนที่ดูดน้ำได้ดี และพองตัวได้ง่าย (Spalding,1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. องค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลัง (Swinkles, 1990)

แป้งมันสำปะหลังมีไขมันต่ำกว่าแป้งจากธัญพืชโดยทั่วไป ส่วนองค์ประกอบอื่นนั้น มีในปริมาณใกล้เคียงกันกับแป้งชนิดอื่น องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำหลังโดยทั่วไปแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป (Swinkles, 1990)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ความชื้น	13.0
แป้ง	87.0
ไขมัน	0.1
โปรตีน	0.1
เถ้า	0.2
ฟอสฟอรัส	0.01
สารที่ให้กลิ่นรส	(ต่ำมาก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบทางเคมีของเม็ดแป้ง (Greenwood,1978)

เม็ดแป้งมีส่วนประกอบหลายอย่างเช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในรูปของวัตถุดิบ ซึ่งมักจะประกอบด้วยความชื้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน ไขมัน ฟอสฟอรัส และอนินทรีย์สารต่างๆ ส่วนประกอบเหล่านี้จะมีในปริมาณเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 2.2, 2.3) และส่วนประกอบเหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติของแป้งเมื่อนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของเม็ดแป้งชนิดต่างๆที่ผลิตในอุตสาหกรรม (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) (Osman,1967)

แป้ง	ความชื้น%	ไขมัน%	โปรตีน%	เถ้า%	ฟอสฟอรัส%
ข้าวโพด	13	0.60	0.35	0.10	0.015
มันฝรั่ง	19	0.05	0.06	0.40	0.08
ข้าวสาลี	14	0.80	0.40	0.15	0.06
มันสำปะหลัง	13	0.10	0.10	0.20	0.01
ข้าวโพดเหนียว (waxy maize)	13	0.20	0.25	0.07	0.007
ข้าวฟ่าง	13	0.70	0.30	0.08	-
ข้าว	-	0.80	0.45	0.50	0.10
สาคู	-	0.10	0.10	0.20	0.02
มันเทศ	13	-	-	0.10	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบบางอย่างของแป้ง (Wurzburg,1972)

แป้ง	ความชื้น (กรัม)	ไขมัน (กรัม)	โปรตีน (กรัม)	คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	กาก (กรัม)
แป้งสาลี	13.3	0.9	71.0	74.0	0.3
แป้งข้าวเจ้า	11.8	0.8	6.4	80.4	0.3
แป้งข้าวเหนียว	8.8	4.0	6.6	82.7	0.3
แป้งมันสำปะหลัง	9.1	0.5	1.1	88.2	2.8
แป้งข้าวโพด (สตาร์ช)	13.5	1.0	0.3	85.1	0
แป้งมันฝรั่ง	17.5	0.1	0.1	82.1	0
แป้งมันเทศ	13.2	0.9	2.2	80.8	3.0
แป้งลูกเดือย	10.4	6.7	13.5	67.8	0.6
แป้งสาคู	14.8	0.1	0.4	84.5	-
แป้งถั่วเขียว	12.0	0.3	1.7	85.4	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความชื้น

ปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์แป้งขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศที่เก็บแป้งนั้นๆ กล่าวคือ เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ลดลง แป้งจะมีความชื้นลดลงด้วย และถ้าความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น แป้งจะดูดความชื้นเข้าไปมากด้วย และความชื้นสมดุลย์ของแป้ง (equilibrium moisture) ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งด้วย ภายใต้สภาวะบรรยากาศทั่วๆไป แป้งจะมีความชื้นประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ (นน./นน.) ความชื้นสัมพัทธ์เป็นศูนย์ ประมาณความชื้นในแป้งก็จะใกล้ศูนย์ และที่ๆมีความชื้นสัมพัทธ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณความชื้นในแป้งจะมีประมาณ 5-6 เปอร์เซ็นต์ (นน./นน.) สำหรับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ในแป้ง อาจจะอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ในโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส

ไขมัน

ผลิตภัณฑ์แป้งที่ได้จากส่วนหัว ราก และลำต้นของพืช เช่น มันฝรั่ง มันสำปะหลัง สาคู จะมีสารประกอบไขมันอยู่ในปริมาณน้อยกว่า (0.1เปอร์เซ็นต์) แป้งที่ผลิตจากธัญพืช (0.6-0.8 เปอร์เซ็นต์) ไขมันในแป้งจะแทรกอยู่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับอะไมเลส เป็นอะไมโลส ลิปิด โมเลกุลเชิงซ้อนนี้จะไม่ละลายน้ำ และมีแนวโน้มที่จะไปกด (repress) การพองตัวของเม็ดแป้ง แต่เมื่อในอุณหภูมิสูงกว่า 125 องศาเซลเซียส จะทำให้โครงสร้างการเชื่อมของไขมันและอะไมโลสแตกตัวออก ส่วนของอะไมโลสก็จะละลายได้ ส่วนไขมันทำให้แป้งมีกลิ่นหืนได้เมื่อเก็บไว้นาน

ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสในแป้งมักจะอยู่รวมกับไขมัน เรียก ฟอสฟอลิปิด แป้งที่ผลิตจากราก เช่นมันสำปะหลัง มีสารฟอสฟอรัสต่ำ อย่างไรก็ตาม แป้งมันฝรั่งที่ผลิตเป็นการค้าได้มีการใช้กรรมวิธีทางเคมีเชื่อมต่อกลุ่มฟอสเฟทเอสเทอร์เข้าไปในโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสในโมเลกุลของอะไมโลเพคตินในแป้งมันฝรั่ง โดยมีปริมาณของกลุ่มฟอสเฟทในแป้งมันฝรั่ง 1 กลุ่มต่อกลูโคส 200-400 หน่วย การแทนที่ของกลุ่มฟอสเฟททำให้คุณสมบัติของอะไมโลเพคตินเปลี่ยนแปลงไป คือ เป็นโพลีอิเลคโตรไลท์ (polyelectrolyte) เมื่อแขวนลอยในน้ำและฟอสเฟทกลุ่มนี้ยังจัดเป็น ion-exchanging group ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เถ้า

ผลิตภัณฑ์แป้งทุกชนิดมีอนินทรีย์สารประกอบอยู่ในปริมาณเล็กน้อย ปริมาณเถ้าในแป้งจากธัญพืชส่วนหนึ่งจะเป็นปริมาณฟอสฟอลิปิด เถ้าของแป้งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโซเดียมโพแตสเซียม แมกนีเซียมและแคลเซียม โดยอยู่ในรูปของสารประกอบโลหะ

กลิ่น

แป้งที่ผลิตจากธัญพืช ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว ข้าวฟ่าง มักจะมีกลิ่นของธัญพืช ส่วนแป้งจากมันฝรั่งและมันสำปะหลัง ไม่มีกลิ่นแป้ง กลิ่นของแป้งธัญพืชเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของไขมัน (oxidation) ดังนั้น แป้งจากพืชหัว ราก และลำต้น ที่มักไม่มีกลิ่นอาจจะเนื่องจากแป้งเหล่านั้นมีไขมันประกอบอยู่น้อยกว่า

3. การเกิดเจลาติไนเซชัน (gelatinization) ของแป้ง

ในโมเลกุลแป้งโดยทั่วไปจะมีกลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic group) ใน Amorphous regions ซึ่งสามารถจับน้ำจากสิ่งแวดล้อมได้ ด้วยเหตุนี้แป้งโดยทั่วไปจึงมีความชื้นอยู่ร้อยละ 12 ถึง 14 และถ้าผสมน้ำเย็นลงในแป้ง อาจทำให้แป้งมีความชื้นได้ถึงร้อยละ 30 โดยไม่ปรากฏลักษณะแยกชั้นของน้ำกับแป้ง การผสมน้ำในปริมาณที่มากกว่านี้โดยไม่มีการคนตลอดเวลาจะทำให้แป้งตกตะกอน ถ้ามีการให้ความร้อนพร้อมทั้งคนตลอดเวลา เม็ดแป้งจะเริ่มพองตัวจนถึงอุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนเซชัน แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลภายในเม็ดแป้งจะถูกทำลาย เม็ดแป้งจะพองตัวมากกว่าเดิมและสูญเสียลักษณะ Birefringence เรียกว่าเกิดเจลาติไนเซชันของแป้ง อุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งมันสำปะหลังจะอยู่ในช่วง 65 ถึง 70 องศาเซลเซียส และความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) ของน้ำแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 อยู่ในช่วง 500 ถึง 1,500 Brabender units ส่วน Swelling power และ Solubility ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 71 และร้อยละ 48 ตามลำดับ (Swinkels, 1990) ตารางที่ 2.4 แสดงอุณหภูมิเจลาติไนเซชันของแป้งชนิดต่างๆ (Leach, 1965) การพองตัวของเม็ดแป้งทำให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น จะมีความใสและความหนืดเพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการพองตัวของเม็ดแป้งคือแรงยึดระหว่างพันธะไฮโดรเจนภายในเม็ดแป้ง (Hann, 1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ลักษณะการเจลาติไนเซชันของแป้งชนิดต่างๆ (Leach, 1965)

Starch		Gelatinization Temp. rang	At 95 °C	
Sources	Type	(°C)	Swellibg Power	Solubility(%)
Potato	Tuber	56-66	1,000	82
Tapioca	Root	58.5-70	71	48
Corn	Cereal	62-72	24	25
Sorghum	Cereal	68.5-75	2	22
Wheat	Cereal	52-63	21	41
Rice	Cereal	61-77.5	19	18
Waxy maize	Cereal	63-72	64	23
Waxy sorghum	Cereal	67.5-74	49	19

Swelling power มีค่าเท่ากับน้ำหนักของเม็ดแป้งที่พองตัวที่ตกตะกอนออกมาต่อกรัมของแป้งแห้ง (Swinkles, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยแป้ง</u> (สุนีย์, 2539)

อะไมโลไลติคเอนไซม์ (Amylolytic enzyme) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้แก่เอนไซม์พวกอะไมเลส ซึ่งเป็น extracellular enzyme พบทั้งในสัตว์ เซลล์พืช และจากการสร้างของจุลินทรีย์ (Adam, 1956; Underkofler, 1954)

เอนไซม์อะไมเลสสามารถแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. Endoamylase

ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α(1-4) ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์และเดกซ์ตริน ซึ่งมีสายโซ่กลูโคสขนาดต่างๆกัน เอนไซม์ประเภทนี้ คือ แอลฟาอะไมเลส หรือ amylo (1-4) dextrinase มีชื่อทางเคมีว่า 1,4-α-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.1)

2. Exoamylase

ย่อยแป้งจากปลายนอนรีดิวซ์เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ บีตาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

2.1 บีตาอะไมเลส หรือ amylo (1-4) maltosidase หรือ 1,4-α-D-glucan maltohydrolase (EC 3.2.1.2) จะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α(1-4) glycosidic linkage เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะที่ต่อแบบ α-D(1-6) ได้ ดังนั้นผลที่ได้นอกจากน้ำตาลมอลโตสแล้วจะมีพวกลิมิตเดกซ์ตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย เอนไซม์ชนิดนี้พบมากในพืชชั้นสูง เช่น ธัญพืชและมันเทศ

2.2 กลูโคอะไมเลส หรือ แกมมาอะไมเลส หรือ amylo (1-4,1-6) glucosidase หรือ 1,4-α-D-glucan glucohydrolase (EC 3.2.1.3) สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากปลายนอนรีดิวซ์ ที่ตำแหน่ง α(1-3), α(1-4) และ α(1-6) เข้าไปทีละหน่วย ถ้าผลการย่อยสมบูรณ์จะได้กลูโคสเพียงอย่างเดียว (Barker and Fleetwood,1975)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส แบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ (Yashino and Hayashida, 1978)

1. ชนิดที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ (raw starch digestive) หรือ GA-I
2. ชนิดที่ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้ (raw starch indigestive) หรือ GA-I' และ GA-II

GA-I เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยแป้งดิบให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์นี้จะถูกเปลี่ยนเป็น GA-I' และ GA-II ได้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส และ α-manosidase (Yashino and Hayashida, 1978) ซึ่งทำให้ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งของเอนไซม์อะไมเลส (สุนีย์, 2539)

เอนไซม์อะไมเลสจะพบอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เพราะเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการใช้ประโยชน์จากแป้ง ซึ่งเป็นอาหารสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต แต่ปริมาณเอนไซม์ที่พบนั้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอวัยวะและชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ในพืชพบในเมล็ดข้าวที่กำลังงอก ในสัตว์พบในน้ำลายและตับอ่อน ในปัจจุบันไม่ค่อยนิยมใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากพืชและสัตว์โดยตรง เพราะต้องใช้วัตถุดิบจำนวนมากและต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง จึงหันมาสนใจเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพราะเป็นแหล่งเอนไซม์ที่มีปริมาณไม่จำกัด (วราวุฒิ, 2528) นอกจากนี้พืชและสัตว์มีการเจริญเติบโตเป็นไปอย่างช้ามาก ระยะเวลาของการขยายพันธุ์นานต้องใช้พื้นที่ในการปลูกหรือเลี้ยงมาก ความสามารถในการใช้อาหารไม่กว้างนัก คุณภาพและปริมาณของเอนไซม์อาจเปลี่ยนตามฤดูกาลและสภาพแวดล้อม แต่ในทางตรงกันข้ามจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบเป็นอาหารได้อย่างกว้างขวาง ต้องการพื้นที่ในการผลิตน้อย ผลิตเอนไซม์ได้ครั้งละมากๆในระยะเวลาสั้น และสามารถเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการสร้างเอนไซม์ให้มีคุณภาพดีขึ้นโดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดมาใช้ แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนการผลิตและวิธีการเก็บเกี่ยวเอนไซม์มีขั้นตอนที่ยุ่งยากทำให้เอนไซม์มีราคาแพง ดังนั้นการนำเอนไซม์มาใช้จึงควรใช้ให้คุ้มค่ามากที่สุด

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง (Carman,1982),(Mitsue,1979)

การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นที่นิยมเพราะสามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัด จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยแป้ง ได้แก่

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus awamori*
- *Aspergillus oryzae*
- *Aspergillus saitoi*
- *Bacillus spp.*
- *Cephalosporium charlicola*
- *Conephora cerebella*
- *Endomycopsis fibuligera*
- *Endomycopsis capsulacis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- *Humicola languinosa*
- *Mucor rouxianus*
- *Penicillium oxalicum*
- *Rhizopus delemar*
- *Stachyborry subsimplex*
- *Tararomyces duponti*
- *Trichoderma viride*

<u>ผลของอะไมโลไลติคเอนไซม์ต่อแป้ง</u> (ณัฐพงษ์, 2535)

ในเม็ดแป้งจะมีการโพลีเมอไรซ์ของลูกโซ่อะไมโลสหรืออะไมโลเพคติน ด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้แป้งไม่ละลายน้ำ ดังนั้นเม็ดแป้งจึงต้านทานต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ณ อุณหภูมิห้องได้ (Matsuoka และคณะ,1982) เมื่อนำเม็ดแป้งละลายน้ำและเพิ่มความร้อน โมเลกุลของน้ำจะสามารถเข้าไปในโมเลกุลของแป้งได้ เพราะที่อุณหภูมิสูงความร้อนสามารถแยกพันธะไฮโดรเจนออกได้ ทำให้ OH-group ที่อยู่ภายในโมเลกุลมีโอกาสจับกับน้ำแล้วพองตัวขึ้น น้ำหนักจะเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัว และทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ทั้งทางเคมีและทางกายภาพ และปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์เกิดขึ้นได้ง่ายขึ้น (Reed and Underkofler, 1975)

กระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเกิดขึ้นสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก liquefaction เป็นขั้นตอนลดความหนืดของแป้งที่ผ่านการเจลาติไนซ์แล้ว โดยการย่อยลูกโซ่กลูโคสแบบสุ่ม (random hydrolysis) ทำให้ได้สายแซคคาไรด์สั้นๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและความหนืดลดลง ขั้นตอนที่สอง saccharification เป็นการย่อยแป้ง ทำให้ได้พวกโมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และมอลโตไตรโอส (Reed, 1975)

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส ทำให้โมเลกุลของแป้งเปลี่ยนแปลงดังนี้คือ มี reducing power สูงขึ้น คุณสมบัติในการเกิดสีกับไอโอดีน เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นน้ำตาลแดง มีความหนืดลดลง และ optical rotation ลดลง (Bernfeld, 1952)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรึงรูปเอนไซม์ (Enzyme Immobilization) (รุ่งรัตน์, 2538)

เอนไซม์ตรึงรูป คือ การทำให้เอนไซม์เคลื่อนที่ไปมาไม่ได้ หรือเคลื่อนที่ได้ในพื้นที่จำกัด และยังพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนไปที่ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีประโยชน์เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระดังนี้

1. เอนไซม์ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก
2. การผลิตที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปสามารถกระทำต่อเนื่อง และควบคุมได้ตามต้องการ
3. เอนไซม์ตรึงรูปบางชนิดสามารถทำให้มีคุณสมบัติทางด้านความคงทนได้โดยการเปลี่ยนแปลงวิธีการตรึงรูป
4. แยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่ายๆ
5. ลดต้นทุนในการผลิต

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ แบ่งได้เป็น 4 วิธี ตามหลักพื้นฐานและเทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์ดังนี้

1. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent attachment to a solid support)
2. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์ (non-covalent interaction with a solid support)
3. การโอบล้อมทางกายภาพของเอนไซม์ในโพลิเมอร์ที่เป็นโพรงหรือเยื่อกึ่งผ่านได้ (physical entrapment in or by a polymer matrix or a micelle)
4. การเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent cross-linking)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

1. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent attachment method)

การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ (solid support) โดยใช้หลักการเกิดพันธะโควาเลนท์ (covalent bonding) ของหมู่ฟังก์ชันนอลบนตัวพยุง กับปลายสายโซ่ (side chain) ของเอนไซม์ หมู่ฟังก์ชันนอลของตัวพยุงหมู่หนึ่งที่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ คือ หมู่อะมิโน (amino group) ซึ่งวิธีการกระตุ้นตัวพยุงให้มีหมู่อะมิโนที่ง่ายที่สุดนั้นทำได้โดยการบำบัดด้วยกลูตัลรัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และมีการพิสูจน์แล้วพบว่าตัวพยุงที่ถูกบำบัดด้วยวิธีนี้ สามารถนำไปใช้กับงานด้านอาหารได้ พันธะโควาเลนท์เป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายเทอิเลคตรอนอย่างสมบูรณ์ และอะตอมใช้อิเลคตรอนร่วมกัน ทำให้ไม่มีขั้วประจุในโมเลกุลที่เกิดพันธะเพราะใช้อิเลคตรอนคู่ร่วมกัน และกระจายตัวอย่างสมมาตร เนื่องจากการเกิดพันธะโควาเลนท์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายของพันธะโควาเลนท์เดิมดังนั้นเมื่อพลังงานการสลายพันธะ (dissociation energy) ยิ่งสูง โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะโควาเลนท์ที่แข็งแรงและเสถียรมากด้วยด้วยเหตุนี้ภาวะของปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนท์จึงค่อนข้างรุนแรง ทำให้มีผลโดยตรงต่อบริเวณเร่ง (active site) และโครงรูปสามมิติ (conformation) ของเอนไซม์ผลกระทบดังกล่าวมีทั้งช่วยทำให้กิจกรรม (activity) สูงขึ้นและลดลงได้ทั้งสองกรณีขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการตรึงรูป (Reilly,1979),(Kminkova,1983),(Caldini และคณะ,1994)

ในปี 1983 Katwa และ Raghavendra Rao ได้รายงานว่า การตรึงเอนไซม์กลูโค-อะไมเลส, กลูโคสไอโซเมอร์เลส และแอลฟาอะไมเลส โดยใช้วิธีโควาเลนท์ด้วย CNBr activated Sepharose-6MB โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงคือ พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ในปี 1984 Shamsuzzaman และ Haard ได้รายงานว่า Porcine pepsinogen สามารถจับกับ CNBr activated Sepharose-4B ด้วยวิธีโควาเลนท์และเกิดเป็นสารเชิงซ้อน Sepharose-pepsin โดยสารนี้จะเสถียรเมื่อใช้โปรตีนเป็นสารตั้งต้น และมี specific activity คล้ายกับเอนไซม์อิสระ

ในปี 1988 Ernst และคณะ ได้ทำการศึกษาเอนไซม์เมนดิโลไนไตรท์ ไลเอส โดยการตรึงแบบโควาเลนท์บน porous silica ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ซึ่งจะต้องใช้ปริมาณเอนไซม์มากและจะบรรจุเอนไซม์ในถังหมักที่มีการผลิต D-mandelonitrile จากเบนซัลดีไฮด์และไซยาไนด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
39896

2. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์ (Non-covalent interaction methods)

การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำโดยใช้หลักการต่างๆกัน ได้แก่ การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) ซึ่งจะเป็นตัวดูดซับของเอนไซม์บนผิวภายนอกของตัวพยุง เอนไซม์จะถูกจับไว้ด้วยแรงดึงดูดที่ค่อนข้างอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals) หรือแรงไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) เป็นต้น ส่วนอีกวิธีเป็นการเกิดพันธะไอออนิก (ionic bonding) ซึ่งเป็นการตรึงด้วยหลักการของการดึงดูดประจุของเอนไซม์กับตัวพยุงที่มีส่วนของโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนประจุได้ (ion-exchange residue) วิธีการตรึงรูปโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพนี้จะไม่ค่อยมีผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติและแอกติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากไม่มีพันธะเคมี แรงยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงจึงอ่อนมาก ทำให้เอนไซม์ที่ถูกดูดซับอาจหลุดออกไปจากตัวพยุงในระหว่างการใช้งานได้ สำหรับวิธีการยึดด้วยพันธะไอออนิกนั้นก็มีผลกระทบน้อยต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งด้านการเปลี่ยนแปลงโครงรูปสามมิติ และการเปลี่ยนแปลงบริเวณเร่ง รวมทั้งมีแรงยึดเหนี่ยวที่ค่อนข้างอ่อนเช่นกัน ทำให้เอนไซม์หลุดง่ายในระหว่างปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของไอออนสูง หรือมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย แต่อย่างไรก็ตาม ได้ มีการวิจัยโดยการปรับปรุงแรงยึดเกาะกันให้สูงขึ้น โดยทำให้เอนไซม์มีประจุมากขึ้น(Solomon and Levin,1975)

ในปี 1984 Hiroshi และคณะ ได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ invertase โดยการใช้การดูดซับบน polyethylenimide-coated cotton cloth ด้วยกลูตารัลดีไฮด์และ packed column โดยจะเกิดการดูดซับสูงสุดที่พีเอช 5.3-6.3 และใช้สารละลายเอนไซม์ invertase ต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซนต์

3. การโอบล้อมทางกายภาพของเอนไซม์ในโพลิเมอร์ที่เป็นโพรงหรือเยื่อกึ่งผ่านได้ (physical entrapment methods)

การตรึงรูปวิธีนี้เป็นการกักเอนไซม์อยู่ในตัวกลาง โดยเอนไซม์ไม่เกิดพันธะใดๆ กับตัวกลาง ถ้าตัวกลางเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นโพรง (polymer matrix) เรียกว่า เป็นการตรึงแบบแลททิซ (lattice type) ถ้าเป็นการยึดในเยื่อกึ่งผ่านได้ (semipermeable membrane) เรียกว่า เป็นการตรึงแบบไมโครแคปซูล (microcapsule type) ซึ่งทั้งสองกรณีนี้จะกีดกันการซึมผ่านของโมเลกุลเอนไซม์ แต่ขณะเดียวกันจะยอมให้สับสเตรตและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึมผ่านไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี 1984 Kumakura และ Kaetsu ได้ทำการศึกษาการกักเอนไซม์ โดย radiation polymerization เอนไซม์ที่ใช้ศึกษา คือ cellulase, 2-hydroxyethyl methacrylate และ tetraethylene-glycol diacrylate ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการกักจะใช้แคปซูลที่มีขนาดเหมาะสม คือ 0.5-2 มิลลิเมตร และมีความหนา 50-200 ไมโครเมตร โดยการเกิดปฏิกิริยาที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

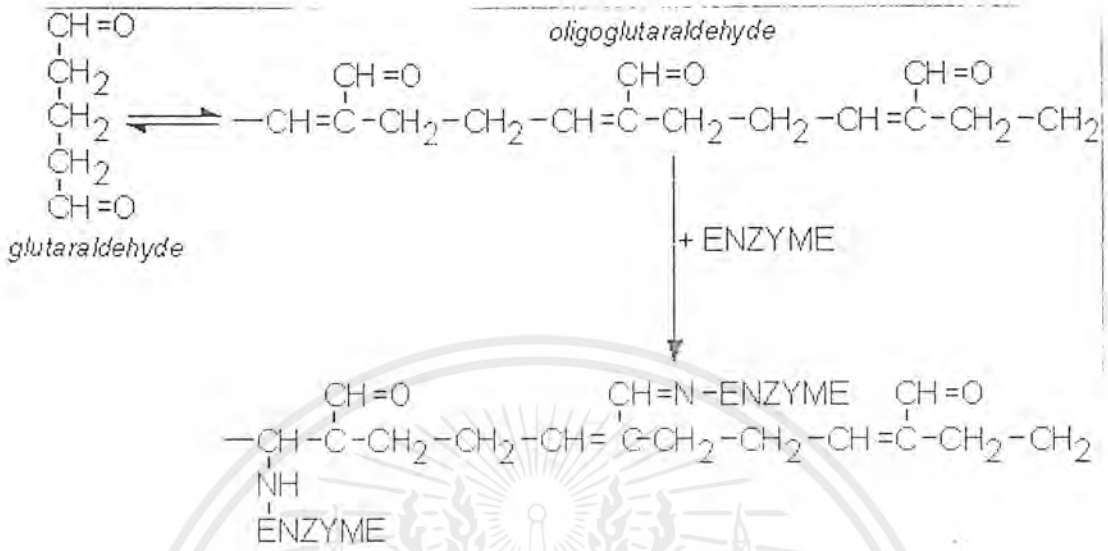
4. การเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ (cross-linking method)

การตรึงรูปวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับวิธีการสร้างพันธะโควาเลนท์ แต่วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุง แต่ใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารไบฟังก์ชันนอล (bifunctional reagent) เกาะกับเอนไซม์แบบเชื่อมขวาง ซึ่งมีผลให้เอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลใหญ่ ละลายน้ำได้น้อยลง วิธีนี้เป็นวิธียึดที่แข็งแรงแต่ต้องใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรง เอนไซม์ที่ได้มี กิจกรรมต่ำ ใช้ปริมาณเอนไซม์มาก และเสถียรภาพ (stability) ต่ำ เนื่องจากการใช้สารเชื่อมขวางก่อให้เกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ ฉะนั้นจึงมีผลต่อโครงรูปสามมิติและกิจกรรมของเอนไซม์ได้ง่ายกว่าวิธีที่ 2 และ 3 วิธีนี้จึงนิยมใช้ควบคู่กับการยึดเกาะด้วยแรงดูดซับทางกายภาพ สารไบฟังก์ชันนอลที่นิยมใช้มากที่สุดคือ กลูตารัลดีไฮด์

ในปี 1981 John และคณะ ได้รายงานว่า เอนไซม์หลายชนิด เช่น papain lactase α-chymotrysin acid phosphatase และ glucose isomerase สามารถถูกตรึงโดยการดูดซับ หรือการจับแบบโควาเลนท์โดยใช้ไคตินด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งผลของการตรึงโดยการดูดซับบน krill chitin ที่เหมาะสมคือ พีเอช 6.7 และค่า ionic strength 0.05 แต่ข้อเสียคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงได้จะมีเพียง 40%

ในปี 1985 Suniti และ Hiroshi ได้รายงานว่า กลูโคอะไมเลสใน *A. niger* จะดูดซับ β–naphtye cotton cloth โดยปฏิกิริยา hydrophobic การดูดซับเอนไซม์จะใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ที่สภาวะพีเอช 4.5 และ packed bed column โดยใช้สารละลายไฮโดรไลส์ 5% ซึ่ง naphtye cloth สามารถ regenerated โดยให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส ใน 2N NaOH เป็นเวลา 1 ชม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างการจับตัวของกลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์

<u>สมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป (Properties of Immobilized Enzyme)</u>

สมบัติบางประการของเอนไซม์ตรึงรูปที่เปลี่ยนไปโดยกระบวนการตรึงรูปนั้น ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูป
- ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูป
- ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ (K_m ,V_{max})
- เสถียรภาพที่มีต่ออายุการเก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคโตแซน (Chitosan)

ไคโตแซนเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติโดยเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ซึ่งจะพบในโครงสร้างของเปลือกนอกของกุ้ง ปู แกนปลาหมึกและเซลล์ของผนังเห็ดราและสาหร่ายบางชนิดโดยเกิดจากปฏิกิริยา deaecy-laction ของไคติน ไคโตแซนถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1859 โดย Rouget ต้มไคตินกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น

โครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน (ภาวดี และคณะ,2543)

ไคโตแซนคือโพลิเมอร์ของ D-glucosanine(2-amino-2-deoxy-D-glucose) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.5

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคโตแซน (ภาวดี และคณะ,2543)

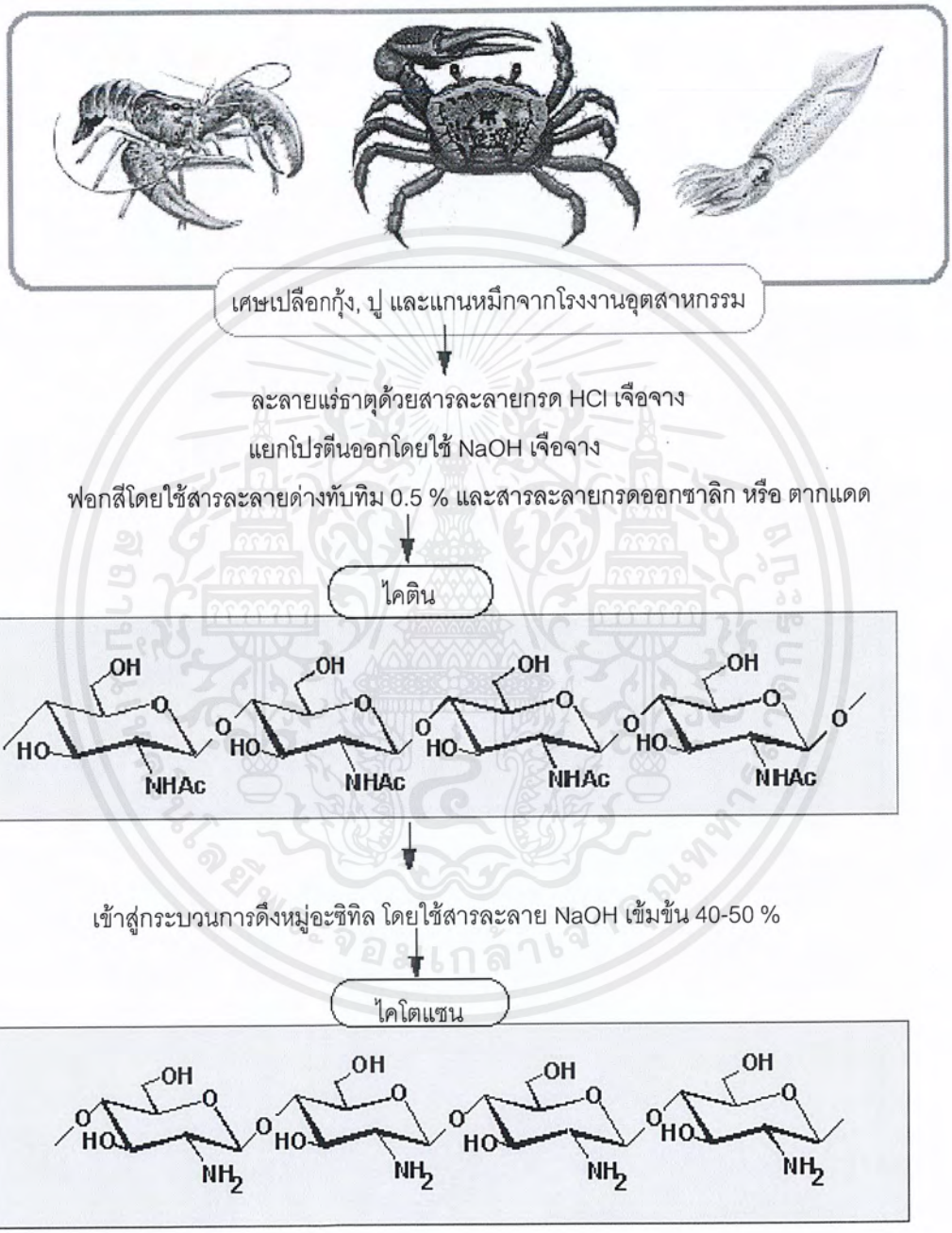
การละลาย (Solubility) ไม่ละลายน้ำ ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์(organic solvent)แต่สามารถละลายในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มี pH น้อยกว่า 6 ที่นิยมใช้คือ กรดอะซีติกและกรดฟอร์มิก สารละลายที่ได้มีความเหนียว ใส มีพฤติกรรมแบบนอน-นิวโตเนียน(non-newtoniun)ในสารละลายหมู่อะมิโนจะแตกตัว โดยจะขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pK_a) ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุของโพลิเมอร์โดย pK_aของไคโตแซนมีค่าอยู่ในช่วง 6.2-6.8

น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) ไคโตแซนมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $1x10^5$-$1x10^6$ ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการผลิต

Coagulating ability ไคโตแซนเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอนที่ดีเนื่องจากมีหมู่อะมิโนจำนวนมากที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวกและสามารถจับกับสารที่มีประจุลบได้เช่นโปรตีน สีย้อม และโพลิเมอร์อื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถจับกับโลหะหนักได้โดยไนโตรเจนในหมู่อะมิโนของไคโตแซนจะทำหน้าที่เป็นตัวให้ออกซิเจน ทำให้ไอออนของโลหะสามารถสร้างพันธะเชิงซ้อน(coordinate)กับหมู่อะมิโนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคโตแซน คือ พอลิเมอร์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง เป็นอนุพันธ์ของไคติน พอลิเมอร์ธรรมชาติที่พบใน เปลือกกุ้ง, ปู และแกนหมึก



รูปที่ 2.5 กระบวนการผลิตไคโตแซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Molecular conformation ไคโตแซนจัดเป็นเป็นโพลิอิเลคโตรไลท์ประเภทบวก (cationic polyelectroly)อย่าแรงเนื่องจากสารละลายกรดหมู่อะมิโนในสายโซ่โมเลกุลจะรับโปรตอนแล้วอยู่ในรูป -NH_3 conformationของไคโตแซนโมเลกุลในสารละลาย

การเสื่อมสภาพโดยกรด(Acid hydrolysis) การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของไคโตแซนเนื่องจากกรดเป็นแบบสุ่ม(random) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือโอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆและโมโนเมอร์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้

การเสื่อมสภาพโดยด่าง การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของไคโตแซนในด่างจะเริ่มจากปลายสุดของโซ่โมเลกุล เรียกการเสื่อมสลายแบบนี้อีกอย่างว่า peeling reaction

การเสื่อมสลายโดยเอนไซม์ จะดีกว่าการใช้สารเคมีโดยตรงเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ Chitosanase (EC 3.2.1.132) สามารถย่อยสายโซ่ไคโตแซนแบบสุ่ม ตรงตำแหน่งพันธะ-1,4-linkage ได้เป็นchitooligosaccharide , Lysozyme (EC 3.2.1.17) ย่อยสลาย N-acetylchitooligosaccharides เป็น N-acetyl-glucosamine โดยเริ่มจากปลายสายโซ่โมเลกุล(non-reducing end)

การเสื่อมสลายโดยความร้อน การให้ความร้อนแบบอบแห้ง(dry heat)ที่อุณหภูมิน้อยกว่า 80 องศาเซลเซียสมีผลทำให้สายโซ่โมเลกุลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น หากใช้อุณหภูมิสูงจะเกิดสีเหลืองหรือสีน้ำตาลขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ให้ความร้อนสำหรับการอบแห้งด้วยไอร้อน (saturated steam) จะไม่สามารถละลายหลังจากอบที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หากอบที่อุณหภูมิน้อยกว่า 120 องศาเซลเซียสไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ไคโตแซนประกอบด้วย 3 หมู่ฟังก์ชั่นที่มีความไวต่อปฏิกิริยาคือ หมู่อะมิโน (-NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2, หมู่primary alcohol (-CH_2OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และหมู่ secondary alcohol (-CHOH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของไคโตแซน (อัธยา,2541)

จากที่ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของไคโตแซนทำให้สามารถนำไปประยุกต์ให้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆอย่างแพร่หลาย ดังตัวอย่างต่อไปนี้

<u>การใช้ประโยชน์ในด้านอาหารเพื่อสุขภาพ</u>

-ใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อบำรุงสุขภาพโดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของไบฟีโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria)ที่อยู่ในลำไส้ซึ่งสามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่เป็นอันตรายเช่น *E. coli* และ *Salmonella sp.*เป็นต้น และมีคุณสมบัติต้านมะเร็งอีกด้วย

-ไคโตแซนจับกับโคเลสเตอรอลในเลือดซึ่งขั้นตอนยังไม่เป็นที่แน่ชัด

<u>การใช้ประโยชน์ในด้านอาหาร</u>

-สามารถผลิตเป็นฟิล์มเคลือบผิว จึงลดแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ป้องกันความชื้น ยืดอายุการเก็บรักษาได้

-สามารถเป็นตัวรักษาคุณภาพให้เนื้อวัวมีรสชาติที่สดใหม่ โดยป้องกันการเน่าเสียที่เกิดจากการจับอะตอมของธาตุเหล็กไว้และป้องกันการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนซึ่งทำให้เกิดการทำลายรสชาติต่างๆในระหว่างการเก็บรักษา

<u>การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์</u>

-ใช้รักษาบาดแผลและต้านการติดเชื้อของแผลทุกชนิด โดยทำให้เม็ดเลือดขาวรวมตัวอย่างรวดเร็วที่บริเวณแผล

-สามารถกระตุ้นให้เกิดกระดูกใหม่โดยนำแผ่นไคโตแซนไปแปะบนแผลโดยตรง

-ช่วยในการผ่าตัดที่มีเลือดไหลมากซึ่งไคโตแซนเป็นสารช่วยเชื่อมประสานหลอดเลือดอย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยป้องกันการสูญเสียเลือดมากจากการผ่าตัด

-ช่วยหยุดการแพร่กระจายของโรคเอดส์ได้โดยป้องกันไม่ให้ไวรัสเอดส์เกาะที่ผิวเซลล์และรบกวนการทำงานของเอนไซม์ชนิดสำคัญของไวรัส

<u>การใช้ประโยชน์ด้านการบำรุงผิวและเส้นผม</u>

-ผสมในเครื่องสำอางค์ทำให้เป็นแผ่นและติดผิวหนังได้

-ช่วยในการบำรุงเส้นผม และปรับสภาพเส้นผมให้ดำเงางาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อม

-สามารถปรับสภาพน้ำดื่ม น้ำในสระ น้ำในสถานอาบน้ำแร่และน้ำทิ้งต่างๆซึ่งจะกำจัดสารอินทรีย์และโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว ปรอทและสังกะสี เป็นต้น

มีรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำไคโตแซนมาตรึงรูปเซลล์และเอนไซม์เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกันตามจุดประสงค์ ยกตัวอย่างดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ.1966 Sun และ Payne ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของไคโตแซนที่ใช้ตรึงเอนไซม์ไทโรไซเนส (tyrosinase) 3 รูปแบบ คือ แบบเม็ด (bead) แบบเกล็ด (flake) และแบบแผ่น(crushed) ในการกำจัดสารฟีนอล พบว่า ไคโตแซนตรึงรูปแบบแผ่นสามารถให้ประสิทธิภาพในการดูดซับฟีนอลได้ดีที่สุด คือ 0.93 โมลของฟีนอลต่อโมลของเอมีน และรูปแบบเกล็ดให้ประสิทธิภาพน้อยที่สุดคือ 0.014 โมลของฟีนอลต่อโมลของเอมีน

ในปี ค.ศ.1966 Huguet และคณะ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารโพลีแคทไอออนิก พอลิเมอร์ (polycationic polymer) ระหว่างไคโตแซนและเด็กซ์แทรน (DEAE-dextran) ในการเคลือบเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตตรึงฮีโมโกลบิน (heamoglobin) และบูลเด็กซ์แทรน (blue dextran) พบว่าการใช้ไคโตแซนในการเคลือบให้ผลดีกว่าในการคงรูปอยู่ได้ในน้ำหรือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็น มากกว่า 5 เดือนหรืออย่างน้อย 2 เดือน

ในปี ค.ศ.1989 Ohtakara และคณะ ได้ทำการศึกษาการใช้ไคโตแซนในการตรึงเอนไซม์ alpha – galactosidase และ glucoamylases เพื่อใช้ในการย่อยแป้งเป็นเวลา 25-30 วัน ซึ่งใช้เม็ดไคโตแซนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร 3 แบบ และมีการทดสอบเปรียบเทียบกับเม็ดไคโตแซนที่เพิ่มการแซ่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ หลังจากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในเม็ดไคโตแซนแต่ละชนิด พบว่าการเพิ่มสารกลูตารัลดีไฮด์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้เสถียรมากยิ่งขึ้น

ในปี ค.ศ.1996 huguet และ Dellacherie ได้ทำการศึกษาผลของสารที่ทำการตรึงรูปในเม็ดแคลเซี่ยมอัลจิเนตที่เคลือบด้วยไคโตแซนได้แก่ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ฮีโมโกลบิน (human haemoglobin) และเด็กซ์แทรน (dextran) เพื่อตรวจสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึง พบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบในสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันระหว่างอัลบูมินและฮีโมโกลบินค่าพีเอชระหว่างการขึ้นรูปและการเก็บรักษามีผลต่อการตรึง สำหรับเด็กซ์แทรนพบว่าน้ำหนักโมเลกุลทำให้มีผลต่อการตรึงรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. cuvette
4. บีกเกอร์ขนาด 100, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
5. กรวยแก้ว
6. แท่งแก้ว
7. ช้อนตักสาร
8. สำลี
9. Aluminium Foil
10. กระดาษกรอง whatman no.1
11. ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุสารเคมี
12. ขวดแก้วสำหรับบรรจุสารเคมี
13. ลูกแก้ว
14. tip ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
15. ขวดพลาสติกในการเก็บตัวอย่างเอนไซม์
16. กระดาษชั่งสาร
17. rack
18. กระบอกตวง
19. กระบอกน้ำกลั่น
20. ถุงมือ
21. จุกยาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เครื่องมือ

1. ไมโครปิเปตต์
2. เครื่องชั่งละเอียด
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. water bath
5. ตู้ไมโครเวฟ
6. เดซิเคเตอร์
7. ตู้บ่มเชื้อพร้อม shaker
8. เครื่องผสมสาร (Vortex)
9. เครื่อง blender

3.3 สารเคมี

1. สารละลายน้ำตาลกลูโคส
2. ซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Citrate Phosphate Buffer)
3. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 5H_2O$)
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4 (Anhydrous)]
5. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H2O$)
6. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
8. โซเดียมซัลเฟต [Na_2SO_4 (Anhydrous)]
9. ไดโซเดียมอาร์ซีเนต [Disodium Arsenate ($Na_2HAsO_4 . 7H2O$)]
10. แอมโมเนียมโมลิบเดท [Ammoniummolydate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}4H_2O$]]
11. กรดกำมะถัน (sulfuric acid)
12. กรดซิตริก (Citric acid)
13. กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)
14. ไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง ของ Biorugs Co.Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมไคโตแซน

นำไคโตแซนไปอบที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องปั่น (blender) แล้วจึงนำมาร่อนด้วยตะแกรงร่อน ขนาด 80 mash ซึ่งจะได้ไคโตแซนขนาด 80 mash

3.4.2 การศึกษาผลของพีเอชและเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนโดยวิธีการเชื่อมขวาง (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Martino และคณะ,1996)

มีขั้นตอนดังนี้

3.4.2.1 นำไคโตแซนใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 0.25 กรัม จำนวน 24 หลอด แบ่งหลอดทดลองเป็น 3 ชุด

3.4.2.2 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ละลายใน citrate phosphate buffer พีเอช 3, 5 และ 7 ลงในหลอดทดลองชุดที่1, 2 และ 3 ตามลำดับ หลอดละ 2 มิลลิลิตร (กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสประมาณ 5,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

3.4.2.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทิ้ง

3.4.2.4 ล้างผงไคโตแซน 2 ครั้งด้วย citrate phosphate buffer พีเอชต่างๆ ตามชุดการทดลองในข้อ 3.4.2.2

3.4.2.5 หาเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยเติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์พีเอช 3, 5 และ 7 ในหลอดทดลองชุดที่ 1,2 และ 3 ตามลำดับ หลอดละ 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

3.4.2.6 หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนที่พีเอชต่างๆ ทุกๆ 15 นาที จนครบ 60 นาที ตามวิธีการหากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในข้อ 3.4.5

3.4.2.7 นำสภาวะที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนสูงสุดไปศึกษาในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การศึกษาหาปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

มีขั้นตอนดังนี้

3.4.3.1 ทำการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 2,6 และ 10 เปอร์เซนต์ น้ำหนักต่อปริมาณ ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซนต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร

3.4.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และกวนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 30 นาที เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Somogyi Nelson (ภาคผนวก ข)

3.4.3.3 นำปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.4 การศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนกลับมาใช้ใหม่

มีขั้นตอนดังนี้

3.4.4.1 นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนปริมาณที่เหมาะสมตามวิธีข้อ 3.4.3 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.4.2 เติมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซนต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร

3.4.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และกวนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 30 นาที

3.4.4.4 นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Somogyi Nelson (ภาคผนวก ข)

3.4.4.5 หลังจากย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซนต์ นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงบนไคโตแซนมาล้างด้วย citrate phosphate buffer พีเอช 5.0 2 ครั้ง

3.4.4.6 หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนที่เหลืออยู่ ตามวิธีข้อ 3.4.5

3.4.4.7 นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนกลับมาย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซนต์ ครั้งที่ 2 และ 3 โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.2-3.4.4.6 หากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนที่เหลืออยู่ในแต่ละครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

มีขั้นตอนมีดังนี้

3.4.5.1 ใส่สารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีความเจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร หรือ ใส่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซน 0.25 กรัม ลงในหลอดทดลอง

3.4.5.2 เติมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซนต์ จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที

3.4.5.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4.5.4 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที

3.4.5.5 นำสารละลายที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธี Somogyi Nelson (ภาคผนวก ข)

3.4.5.6 ทำแบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

3.4.5.7 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

หมายเหตุ

1 หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซนต์ ได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.1 ไคโตแซน ขนาด 80 mash

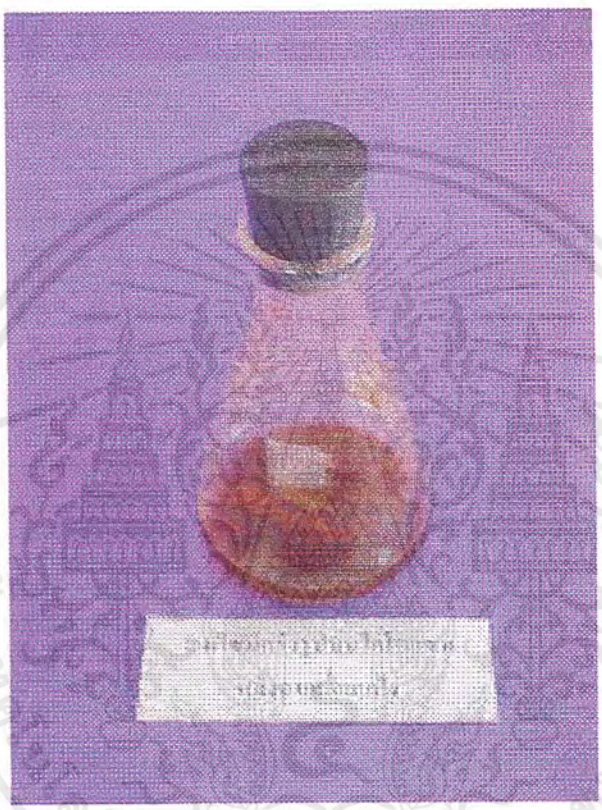
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.3 เอนไซม์บนไคโตแซนก่อนย่อยแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนหลังย่อยแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบสีของไคโตแซนก่อนและหลังย่อยแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของพีเอชและเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซน

ผลของพีเอชและเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซนต์ พบว่าพีเอชและเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนแบบเชื่อมขวาง คือ พีเอช 5.0 และเวลา 60 นาที ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปสูงสุดเท่ากับ 888.94 หน่วยต่อกรัม สำหรับผลการตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมขวางที่เวลา 15,30 และ 45 นาที จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนเท่ากับ 709.64,713.88 และ 710.12หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ

ที่พีเอช 3.0 ผลการตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมขวางที่เวลา 15,30,45 และ 60 นาที จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนเท่ากับ 689.18, 748.00, 752.23 และ 581.88 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ

ที่พีเอช 7.0 ผลการตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมขวางที่เวลา 15,30,45 และ 60 นาที จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนเท่ากับ 491.53, 539.06, 631.06และ 470.12 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

Martino (1995) และ Gallifuoco (1997) ได้ทำการศึกษาผลของพีเอชและเวลาที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์เบตากลูโคซิเดสตรึงรูปบนไคโตแซน พบว่าที่พีเอช 5.0 และบ่มกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 60 นาที ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบตากลูโคซิเดสตรึงรูปบนไคโตแซนสูงสุดเท่ากับ 490 หน่วยต่อกรัม โดยที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบตากลูโคซิเดสตรึงรูปบนไคโตแซนไม่เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการบ่ม

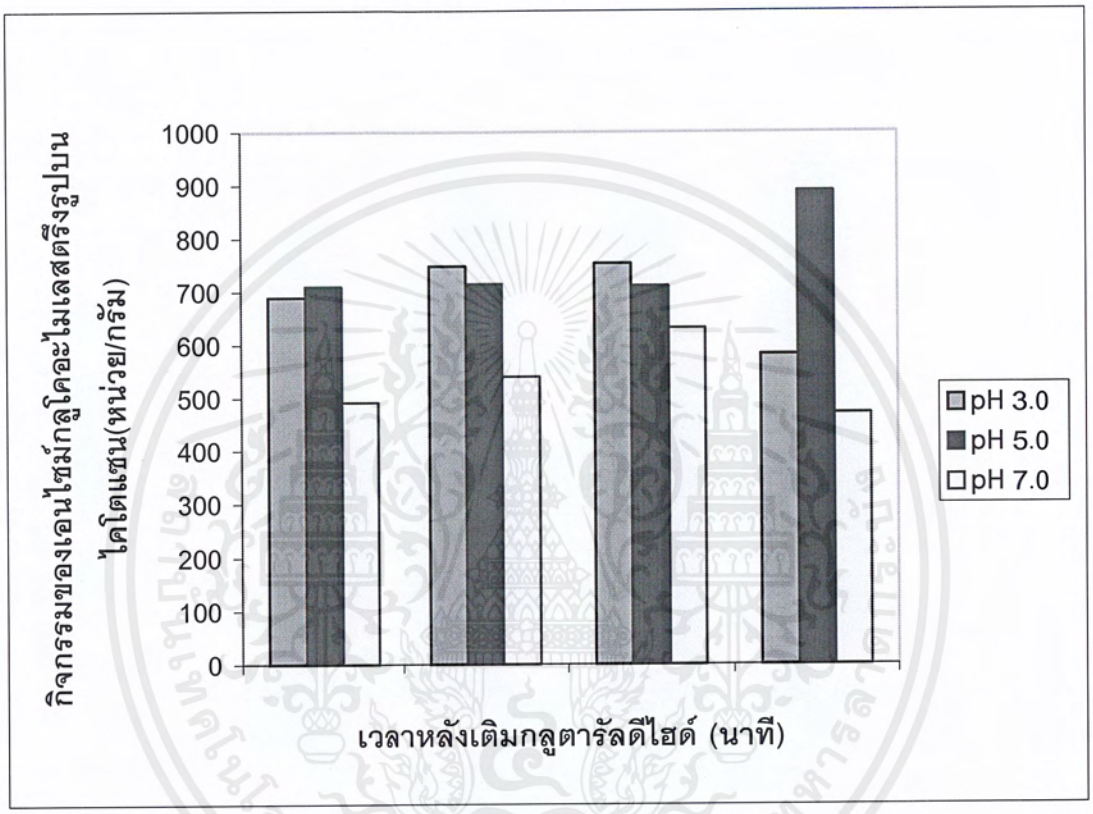
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pereiva และคณะ (2000) ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* และเปรียบเทียบเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดไคโตแซนโดยวิธีการตรึงแบบกายภาพ พบว่า ในการเปรียบเทียบพีเอชที่เหมาะสมกับทั้งเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนเม็ดไคโตแซน คือ พีเอช 7.0 และ พีเอช 6.0 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมของทั้งเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนเม็ดไคโตแซนเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนแบบเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่เวลาและพีเอชต่างๆกัน

ระยะเวลาที่บ่มกับกลูตารัลดีไฮด์ (นาที)	กิจกรรมของอนไซม์ (หน่วย/กรัม)		
	pH 3.0	pH 5.0	pH 7.0
15	689.176	709.644	491.528
30	748	713.88	539.056
45	752.232	710.116	631.056
60	581.88	888.94	470.116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตแซนแบบเชื่อมขวางด้วยกลูตา-รัลดีไฮด์ที่เวลา และพีเอชต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนปริมามาตรต่างๆคือ 2,6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร มาย่อยน้ำแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลาต่างๆ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.2

ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนที่เหมาะสมในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง คือ 10 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 360 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 2732.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 32.05 ไมโครโมลต่อนาที

ส่วนที่ปริมาณ 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1883.82 และ 2120.59 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ อัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 16.96 และ 24.21 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ดังนั้น จึงเลือกปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซน 10 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

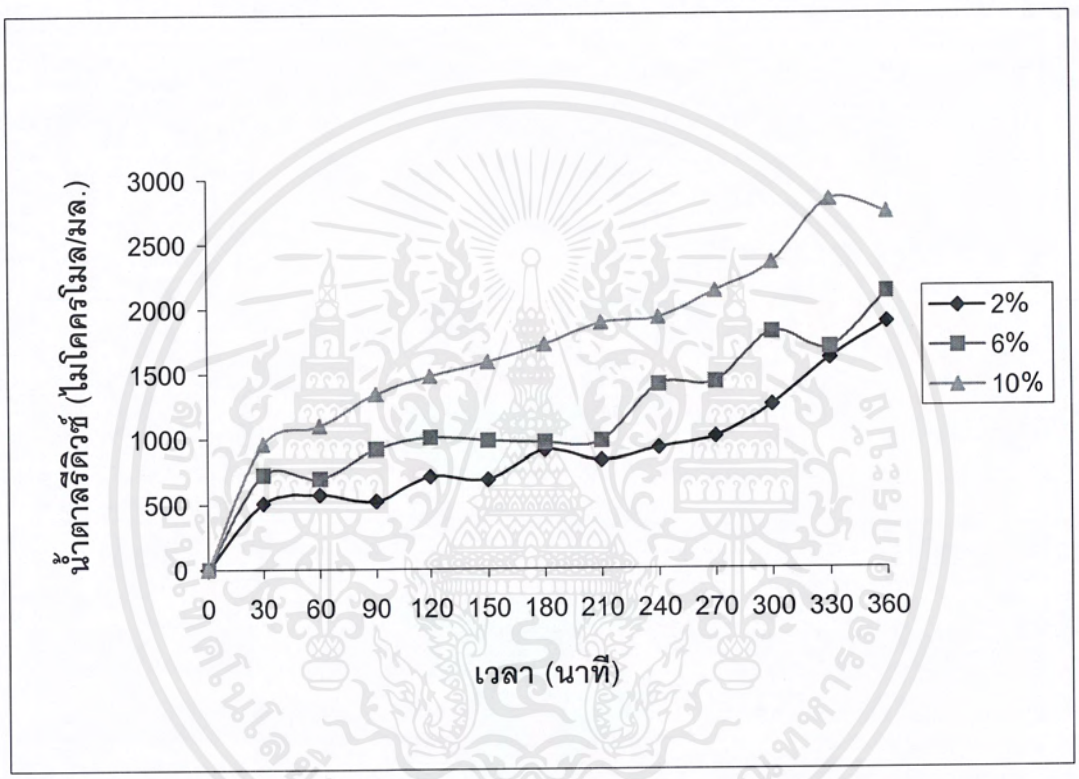
ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนปริมาณต่างๆกันในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูป (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครโมล/มล.)
2	0	0
	30	508.82
	60	576.47
	90	525.00
	120	711.77
	150	686.76
	180	913.24
	210	829.41
	240	923.53
	270	1008.82
	300	1250.00
	330	1610.29
	360	1883.82
6	0	0
	30	726.47
	60	697.06
	90	922.06
	120	1010.29
	150	983.82
	180	969.12
	210	977.94
	240	1411.76
	270	1429.41
	300	1811.76
	330	1694.18
	360	2120.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูป (%)	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (ไมโครโมล/มล.)
10	0	0
	30	961.76
	60	1098.53
	90	1339.7
	120	1482.35
	150	1591.18
	180	1723.53
	210	1888.24
	240	1927.94
	270	2126.47
	300	2345.59
	330	2832.35
	360	2732.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนปริมาณต่างๆกันในการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงบนไคโตแซนกลับมาใช้ใหม่

เมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ มาบ่มกับสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลาต่างๆ ที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนก่อนย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลังจะมีค่าเท่ากับ 778.352 หน่วยต่อกรัม

เมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนมาย่อยแป้งครั้งที่ 1 หลังจากบ่มเป็นเวลา 300 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3735.29 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรและมีอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.7 ไมโครโมลต่อนาที หลังจากการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลังครั้งที่ 1 เมื่อหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนที่เหลืออยู่ พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเหลืออยู่เท่ากับ 340.24 หน่วยต่อกรัม คิดเป็นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปที่เหลืออยู่บนไคโตแซนเท่ากับ 43.71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสก่อนย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

สำหรับการย่อยแป้งครั้งที่ 2 หลังจากบ่มเป็นเวลา 300 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 1601.47 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และมีอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.7 ไมโครโมลต่อนาที เมื่อหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนหลังจากการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลังครั้งที่ 2 พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเหลืออยู่เท่ากับ 315.29 หน่วยต่อกรัม คิดเป็นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปที่เหลืออยู่บนไคโตแซนเท่ากับ 40.51 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสก่อนย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

สำหรับการย่อยแป้งครั้งที่ 3 หลังจากบ่มเป็นเวลา 300 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 1308.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.7 ไมโครโมลต่อนาที เมื่อหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนหลังจากการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลังครั้งที่ 3 พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเหลืออยู่เท่ากับ 295.06 หน่วยต่อกรัม คิดเป็นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปที่เหลืออยู่บนไคโตแซนเท่ากับ 37.91 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสก่อนย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง ดังแสดงในตารางที่ 4.3.1 และ 4.3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3.1 แสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไตโตแซนมาใช้ย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

การย่อยแป้ง	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครโมล/มล.)
ครั้งที่ 1	0	0
	30	714.71
	60	1138.24
	90	1469.12
	120	1935.29
	150	2114.71
	180	2645.59
	210	2661.76
	240	3208..82
	270	3526.47
	300	3735.29
ครั้งที่ 2	0	0
	30	741.18
	60	750
	90	857.35
	120	870.59
	150	892.65
	180	1030.88
	210	1126.47
	240	1313.24
	270	1482.35
	300	1601.47

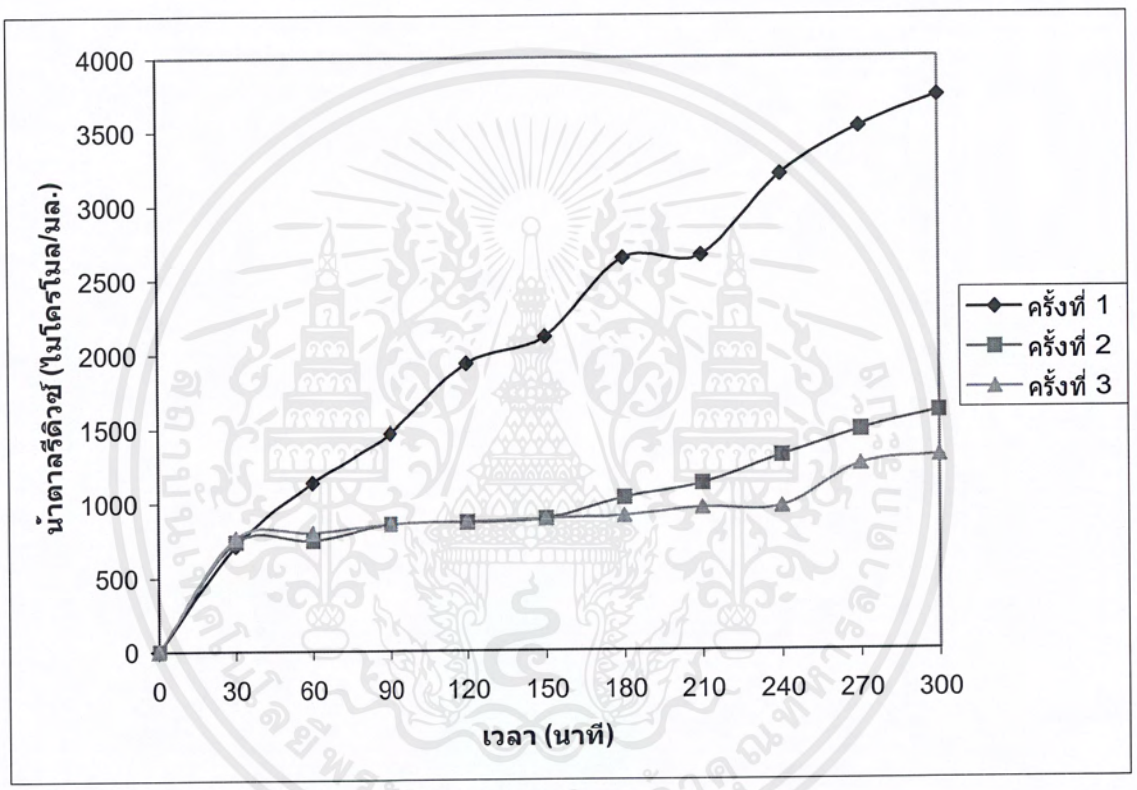
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยแป้ง	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (ไมโครโมล/มล.)
ครั้งที่ 3	0	0
	30	769.12
	60	801.47
	90	858.82
	120	875
	150	894.12
	180	908.82
	210	963.24
	240	970.59
	270	1253.94
	300	1308.82

ตารางที่ 4.3.2 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปก่อนและหลังย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

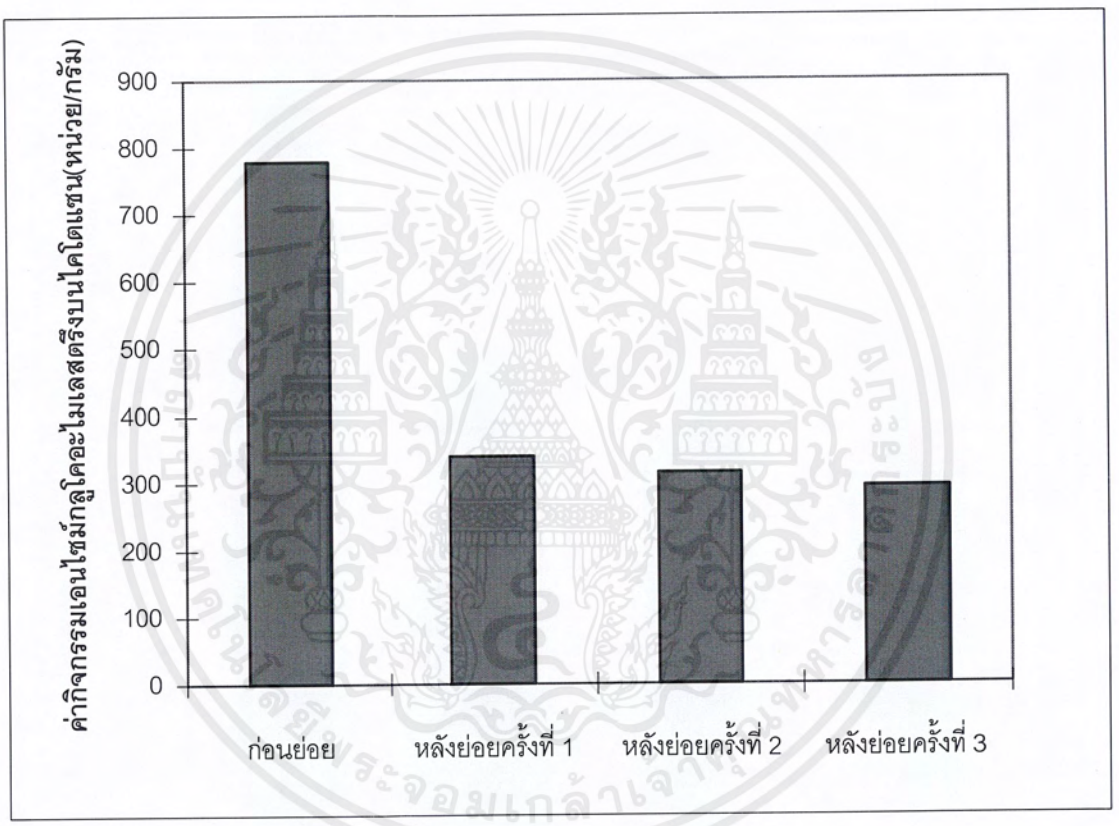
การย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะไม-เลสตรึงรูปบนไคโตแซน	
	หน่วย/กรัม	%
ก่อนการย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง	778.35	100
หลังจากย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลังครั้งที่ 1	340.24	43.71
หลังจากย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลังครั้งที่ 2	315.29	40.51
หลังจากย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลังครั้งที่ 3	295.06	37.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3.1 กราฟแสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆเมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซนมาใช้ย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3.2 แผนภูมิแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปก่อนและหลังย่อยสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schafhauser และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสบนกระดูกไก่บด (BIOBONE TM) โดยไม่ใช้พันธะโคเวเลนท์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ลดลงจาก 75.3 ± 0.8 จนถึง 43.5 ± 9.6 หน่วย / มิลลิกรัมของโปรตีนที่ใช้ตรึง ค่า K_m ของการตรึงเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสบนกระดูกไก่บดโดยใช้ไกลโคเจนเป็นสารตั้งต้นจะเพิ่มขึ้นจาก 3.04 ± 0.38 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร (เอนไซม์อิสระ) เป็น 9.04 ± 1.51 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร (เอนไซม์ตรึงรูป) หลังจากการใช้เอนไซม์ อะไมโลกลูโคซิเดสตรึงรูปบนกระดูกไก่บดต่อเนื่องกัน 5 ครั้ง ในอุณหภูมิระหว่าง 23 - 55 องศาเซลเซียส พบว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

Jonolino และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ทริปซินบนเม็ดอนุพันธ์ของเซลลูโลสด้วยปฏิกิริยาการดึงดูด อะวิดีน - ไบโอติน (avidin - biotin) และศึกษาการหมักเอนไซม์ทริปซินรวมทั้งเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทริปซินตรึงรูปบนเม็ดแก้วที่มีรูพรุนเท่ากัน (controlled - pore glass , CPG) โดยเอนไซม์ไบโอทินิเลททริปซิน (biotinilated trypsin) ในสารละลายสามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ถึง 82 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเซลลูโลสที่ตรึงเอนไซม์มีกิจกรรมเท่ากับ 0.184 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (1.15 ไมโครโมลต่อกรัม) ไบโอตินและเม็ดแก้วตรึงเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.329 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (0.987 ไมโครโมลต่อกรัม) หลังจากนำกลับมาใช้ใหม่ ไบโอตินจะลดลงเหลือ 0.159ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรในเม็ดเซลลูโลส และเหลือ 0.315 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรในเม็ดแก้ว กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินตรึงรูปบนเม็ดอนุพันธ์ของเซลลูโลสและบนเม็ดแก้วเท่ากับ 32.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร (202.03 หน่วยต่อกรัม) และ 43.45 หน่วยต่อมิลลิลิตร (130.35 หน่วยต่อกรัม) ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงบนไคโตแซน กลับมาใช้ใหม่จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อาจเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสหลุดออกจากการตรึงบนไคโตแซน เพราะน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ใช้มีความหนืดค่อนข้างสูง ทำให้สารละลายเอนไซม์หลุดออกไปจากน้ำแป้งมันสำปะหลังในขณะที่ทำการย่อย หรือในขณะที่มีการล้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงบนไคโตแซนด้วยบัฟเฟอร์ สารละลายเอนไซม์อาจจะหลุดออกไปได้และเนื่องจากเอนไซม์ตรึงบนไคโตแซนมีน้ำหนักเบาจึงทำให้หลุดออกไปในขณะล้างได้ง่าย

ดังนั้น จึงควรมีการปรับปรุงวิธีการในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนให้เหมาะสม หรือมีการเปลี่ยนวิธีการล้างเอนไซม์ เพื่อให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงบนไคโตแซนเกาะได้แน่นขึ้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงบนไคโตแซนสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ศึกษาสภาวะในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนโดยการเชื่อมไขว้ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์ สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ คือ พีเอช 5.0 เวลาที่ใช้ในการเชื่อมไขว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ถูกตรึงรูปบนไคโตแซนสูงสุดเท่ากับ 888.94 หน่วยต่อกรัม ทำการแปรผันน้ำหนักเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซน 2, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตแซน 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 3735.30 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 360 นาที และมีอัตราเร็วของการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.70 ไมโครโมลต่อนาที เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยแป้งพบว่า หลังจากการย่อยแป้งครั้งที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ถูกตรึงเหลือ 43.71 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่จะคงที่หลังจากการย่อยแป้งครั้งที่ 2

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรปรับปรุงวิธีการในการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลสบนไคโตแซนให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงขึ้นและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้
2. พัฒนาวิธีการเก็บรักษาเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตรึงรูปบนไคโตแซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต. การพัฒนาผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในด้านอุตสาหกรรม. **วารสารวิทยาศาสตร์การอาหาร**. 10(2). (2521) : 24-36

ณัฐพงษ์ บวรเรืองโรจน์. การผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสจากแป้งมันสำปะหลังในฟลูอิไดซ์เบต. **วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย** 2535

นวลพรรณ ณ ระนอง. **ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา** . ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2540

ภาวดี เมธะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟูชาติ และก้องเกียรติ คงสุวรรณ. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตแซน. MTEC **เมษายน-มิถุนายน** (2543) : 69-75

รุ่งรัตน์ ชัยกิจไทย. การย่อยสลายเพคตินด้วยเอนไซม์เพคติเนสตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน. **วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย** 2538

วาสนา แสงพิทักษ์. การย่อยแป้งด้วยเชื้อราที่ถูกตรึง. **วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย** 2529

วราวุฒิ ครูส่ง. การย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลโดยเชื้อ Aspergillus และ Rhizopus สายพันธุ์พื้นบ้าน. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** 2528

สุนีย์ โชตินีรนาท. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์และอัลทราฟิลเทรชัน. **วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย** 2539

อัธยา กังสุวรรณ. ไคติน: ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับศตวรรษที่ 21. **วารสารการประมง** 51(1). (2541) : 57-67

Adam, M. Amylase: their kinds and properties and factors which influence their activity. Food technol. 7(53). (1953) : 35-38.

Ball, A.K. and Schwimmer, S. Digestion of Raw Starch. J. Biol. Chem. 156 (1944) : 203-210.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Barker, S.A. and Fleetwood, J.G. Studies on *Aspergillus niger* Part IX. The Mechanism of Glucoamylase Action. **J. Am. Chem. Soc.** 35 (1975) : 4863-4871.

Bernfeld, P. Enzymes of Starch Degredation and Synthesis. **Adv. in Enzyme.** 12 (1951) : 380-424.

Caldini, C., Bonomi, F., Pifferi, P.G., Lanzarini, G. and Galante, Y.M. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. **Enzyme and Microb. Technol.** (1994) : 286-291.

Corman, I. and Langlykke, A.F. Action of mold enzyme in Starch Saccharrification. **Cereal Chem.** 25 (1948) : 191-201.

Dziedzic, S.Z. and Kearsley, M.W. Glucose syrup: Science and Technology. New York. **Elsevier Science.** 1984.

Ernst, W. et. al. Activitty and operational stability of immobilized mandelonitrile lyase in methanol/water mixtures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 29 (1988) : 419-425.

Greenwood, C.I. Observation on the Structure of the Starch Granule. **Polysaccharides in Food.** Butterworth. London. 1978.

Hann, R.R. Tailoring Starches for the Baking Industry. **The Bakers Dugest.** 43 (4). (1969) : 48-52.

Hiroshi, Y., Richard, K.H. and Ann, D.E. Immobilization of invertase on polyethylenimine-coated cotton cloth. **Biotechnol. Lett.** (1984) : 165-170.

Huguet, M.L. et. al. Calcium Alginate Beads Coated with Polycationic Polymers: Comparison of Chitosan and DEAE-dextran. **Process Biochem.** 31(4). (1996) : 347-353.

Huguet, M.L. and Dellacherie E. Calcium Alginate Beads Coated by Chitosan: Effect of Structure of Encapsulated Materials on Their Release. **Process Biochem.** (1996) : 745-751.

Janolino, V.G. and Swaisgood, H.E. Trypsin immobilization on derivatized cellulose beads by biospecific avidin-biotin interaction and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

characterization of the immobilized activity. Department of Food Science. North Carolina State Univ.

John, W. and Sons. Immobilization of invertase on krill Chitin. Biotechnol. Bioeng. 23 (1981) : 231-233.

Katwa, L.C. and Raghivendra Rao, M.R. Immobilization of alpha-amylase, glucoamylase and glucose isomerase on CNBr activated sepharose-6 MB. Biotechnol. Lett. 5(3). (1983) :191-196.

Kminkova, M. and Kucera, J. Comparison of pectolytic enzymes covalent bound to synthetic ion exchanges using different methods of binding. Enzyme Microb. Technol. 5 (1983) : 204-208.

Kumagura, M. and Kaetsu, I. Encapsulation of enzymes by rediation technique. Biotechnol. Lett. 6(7). (1984) : 409-412.

Leach, H.W. Gelatinization of Starch, Starch: Chemistry and Technology. Vol. 1. pp. 289-307. Academic Press. New York. 1965.

Martino, A., Pifferi, P.G. and Spagna, G. The separation of pectinlyase from β-glucosidase in a commercial preparation. J. Chem. Tech. Biotechnol. 61 (1994) : 255-260.

Martino, A., Durante, M., Pifferi, P.G., Spagna, G. and Bianchi, G. Immobilization of β-glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of nature supports. Process Biochem.31(3). (1996) :281-285.

Martino, A., Durante, M., Pifferi, P.G., Spagna, G. and Bianchi, G. Immobilization of β-glucosidase from a commercial preparation. Part 2 Optimization of the immobilization process on chitosan. Process Biochem. 31(3). (1996) : 287-293.

Matsuoka, H., Koba, Y. and Ueda, S. Alcoholic Fermentation of Sweet Potato without Cooking. J. Ferment. Technol. 60(6). (1982) : 599-602.

Meyer, L.H. Food Chem. Reinhold. New York. 1976.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mitsue, T., Saha, B.C. and Ueda, S. Glucoamylase of Aspergillus oryzae. Culture on Steamed Rice. J. Appl. Biochem. 1 (1979) : 410-422.

Odigboh, E.U. Cassava: Production, Processing and Utilization. Handbook of tropical Foods. Marcel Dekker. New York. 1983.

Osman, E.M. Starch in Food Industry. Starch: Chem. Technol. Vol. 2. pp. 163-2145 Academic. New York. 1967.

Reed, G. and Underkofler, L.A. Enzyme in food processing. New York: Academic Press. 1966.

Reilly, P.J. Starch Hydrolysis with Soluble and Immobilized Glucoamylase. Appl. Biochem. Bioeng. Vol.2 pp. 185-205. Academic Press. New York. 1979.

Schafhauser, D.Y. and Storey, K.B. Immobilization of amyloglucosidase onto granular chicken bone. Appl. Biochem. Biotechnol. 32 (1992) : 89-109.

Shamsuzzaman, K.M. and Haard, N.F. Immobilization of pepsinogen on sepharose. Biotechnol. Lett. 6(6). (1984) : 351-356.

Shosheyov, O., Bravdo, B.A. and Ikan, R. Endo-β-glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juices. J. Agric Food Chem. 38 (1988) : 1387-1390.

Somogyi, M. "Notes on Sugar Determination". J. Biol. Chem. 195 (1952) :19-23.

Spalding, S.J. Native Starches. International Flavors and Food Additives. 10 (1). (1979) : 23-24.

Solomon, B. and Levin, Y. Adsorption of Amyloglucosidase on Inorganic Carrier. Biotechnol. Bioeng. 17 (1975) : 1323-1333.

Sun, W. and Payne, G.F. Tyrosinase-Containing Chitosan-Gel: A Combined Catalyst and Sorbent for Selective Phenol Removal. Biotechnol. Bioeng. (1996) : 79-86.

Suniti, S. and Hiroshi, Y. Immobilization of glucoamylase on naphthyl cotton cloth. Biotechnol. Lett. 7(10). (1985) : 769-772.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Swinkles, J.J.M. Different Between Commercial Native Starches. **International Marketing and Sales.** Foxhol. 1983.

Ueda, S. and Saha, B.C. Behavior of *Endomycopsis fibuligera* glucoamylase towards raw starch. **Enzyme Microb. Technol.** 5 (1983) :196-198.

Underkofler, L.A. Ind. Fermentation: Fungal amylolytic enzymes. New York: Academic Press. 1954.

Wurzburg, O.B. Starch in the Food Industry. **Handbook of Food Additives.** CRC Press. New York. 1972.

Yashino, E. and Hayashida, S. Enzymatic modification of glucoamylase of *Aspergillus awamori* var. kawachi. **J. ferment. Technol.** 54(4). (1978) : 289-295.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. **การเตรียมซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์** (นวลพรรณ,2540)

   (1) เตรียมสารละลายกรดซิตริก 1 โมลาร์ โดยละลายกรดซิตริก 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (สารละลาย A)

   (2) เตรียมสารละลาย dibasic sodium phosphate โดยละลาย $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 . 12H_2O$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร (สารละลาย B)

   ผสมสารละลาย A ปริมาตร X มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร Y มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

X (มิลลิลิตร)	Y (มิลลิลิตร)	พีเอช
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

X (มิลลิลิตร)	Y (มิลลิลิตร)	พีเอช
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

2. **การเตรียมสารละลาย Somogyi reagent** (Somogyi,1952)

สารละลาย Copper reagent ประกอบด้วย

1. 10 เปอร์เซ็นต์ CuSO4 5H2O ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (10 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร)
2. Phosphate-tartrate solution เตรียมโดย

ชั่ง Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4 12H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartrate (Tetrahydrate) 120 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติม 1 N NaOH 100 มิลลิลิตรตามด้วย Na_2SO_4 (Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองตะกอนทิ้งด้วยกระดาษ Whatman no.4

3. ผสมสารละลายในข้อ 1. (100 มิลลิลิตร) และข้อ 2. (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

1. ละลาย Ammoniummolydate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}4H_2O$] 25 กรัมในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. Disodium Arsenate ($Na_2HAsO_4 . 7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
3. ผสมสารละลายในข้อ 1. และข้อ 2. เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องและควรเก็บไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์

1. **การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส** (Glucose)
   - 1.1 ใส่สารละลายน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 และ 1,000 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร
   - 1.2 ทำแบลงค์ (Blank) ทำเช่นเดียวกับสารละลายกลูโคสแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส
   - 1.3 เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร
   - 1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดทดลองเพื่อลดการระเหยของน้ำ จากนั้นนำมาทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ
   - 1.5 เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีจะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล
   - 1.6 เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรลงไป (ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดี
   - 1.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
   - 1.8 ทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ทำการหาความชันของกราฟเพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **การวหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์** (Somogyi Nelson's method)

2.1 เติมสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว

2.2 เติมสารละลาย Copper reagert 1 มิลลิลิตร

2.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดทดลองเพื่อลดการระเหยของน้ำ จากนั้นทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ

2.4 เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีจะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล

2.5 เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรลงไป (ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดี

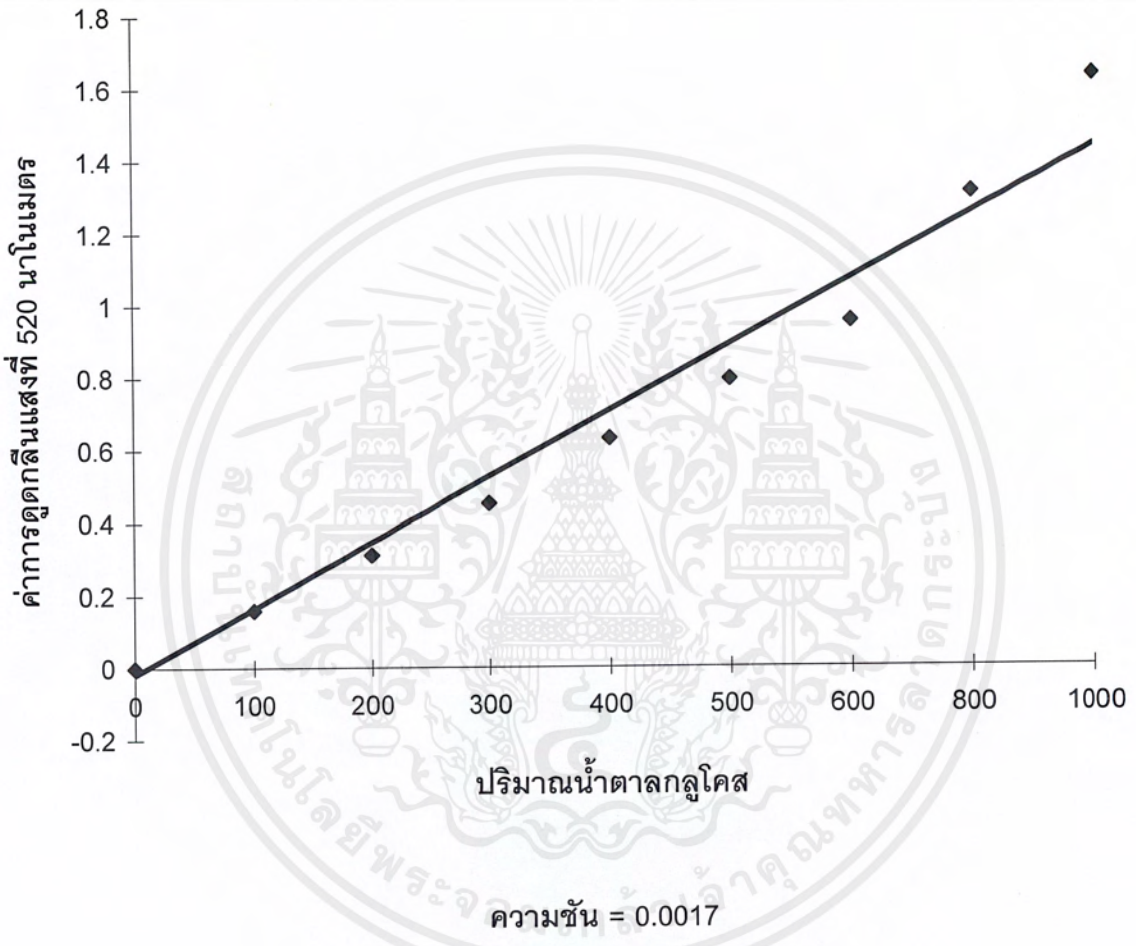
2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.7 ทำกราฟของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยเขียนกราฟระหว่างค่าน้ำตาลรีดิวซที่เกิดขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการบ่มสารตั้งต้น

2.8 คำนวณค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น $= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส}}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค



รูปที่ ค กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้