

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง

ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

The cyclodextrins production from cassava starch

by *Saccharomyces cerevisiae*



T117333



เลขหมู่ 117333
เลขทะเบียน
วันเดือนปี 20 ก.ค. 2554

12240030

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

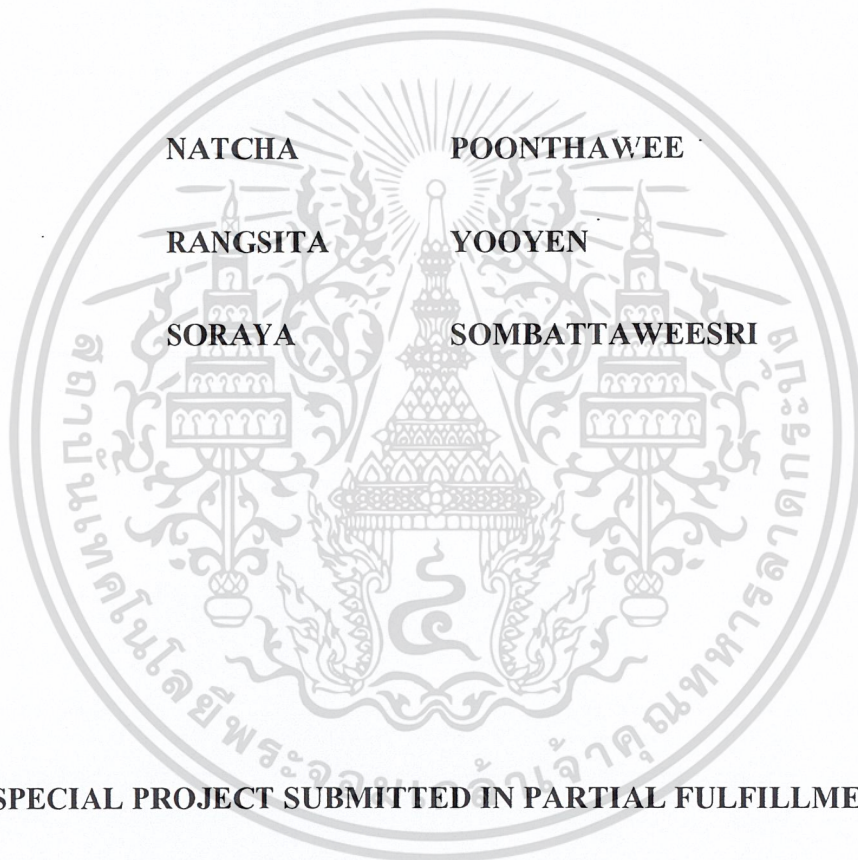
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ปีการศึกษา 2553 นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE CYCLODEXTRINS PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH

BY *Saccharomyces cerevisiae*



**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE**

IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลังด้วยยีสต์

Saccharomyces cerevisiae

The cyclodextrins production from cassava starch by

Saccharomyces cerevisiae

ชื่อนักศึกษา

นางสาวณัชชา

พูนทวี

50050706

นางสาวรังสิตา

อยู่เย็น

50050754

นางสาวโสธรา

สมบัติทวีศรี

50050777

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต

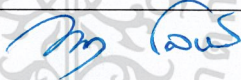

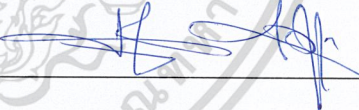
สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ – สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลังด้วยยีสต์

Saccharomyces cerevisiae

The cyclodextrins production from cassava starch by

Saccharomyces cerevisiae

ชื่อนักศึกษา

นางสาวณัชชา พูนทวี 50050706

นางสาวรังสิตา อยู่เย็น 50050754

นางสาวโสธรา สมบัติทวีศรี 50050777

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิต cyclodextrins จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของสารละลายที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยวิธี Somogyi-Nelson, Phenol sulfuric และ HPLC พบว่า น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน การคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* บนอาหารแข็ง SS ที่ผสมอินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ พบว่า ไอโซเลทของเชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง SS ผสมกับบรอมฟินอลบลูให้อัตราส่วนระหว่างบริเวณสีต่อบริเวณเชื้อเจริญมากที่สุด (1.49) และรองลงมา ได้แก่ ฟีนอล์ฟทาลิน (1.46), โบรโมไทมอลบลู (1.40) และไทมอลบลู (1.37) ตามลำดับ จากนั้นเมื่อนำเชื้อยีสต์มาศึกษาการผลิต cyclodextrins ในอาหารเหลว MYS ที่สภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เซลล์ที่เจริญในน้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุด (น้ำหนักเซลล์แห้ง 5 กรัมต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสง 7.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร) ขณะที่ผลิต cyclodextrins สูงสุด (เมื่อเจริญในอาหารเหลว MYS ที่ใช้น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง) ที่ระดับ 0.252 ของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
คำสำคัญ : ไซโคลเดกซ์ทริน, แป้งมันสำปะหลัง, *Saccharomyces cerevisiae*
 ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The cyclodextrins production from cassava starch by <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Students	Natcha	Poonthawee	50050706
	Rangsita	Yooyen	50050754
	Soraya	Sombattaweesri	50050777
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Biotechnology		
Academic Year	2010		
Advisor	Associate Professor Dr.Somchai Krairuk		

ABSTRACT

The cyclodextrins production by using enzymatic digestion (α -amylase) of cassava starch for 0, 24, 48, 72 and 96 hours (respectively) as substrate was studied. The digested products were analyzed by Somogyi-Nelson method, Total sugar (Phenol sulfuric) method and HPLC, respectively. It was found that the digestion of cassava starch for 24 hr. was suitable for C-source in the cultivation. The isolates of yeast *Saccharomyces cerevisiae* were selected and purified on SS medium containing different pH-indicators. The results showed that, the selected isolate on SS medium with bromphenol blue showed the highest maximum ratio of clear zone and growth zone (1.49). While, the others pH-indicators showed lower ratio (phenolphthalein (1.46), bromothymol blue (1.40) and thymol blue (1.37), respectively). The cyclodextrins production by the selected isolate of *S. cerevisiae* was studied by the cultivation in MYS medium, 200 rpm of rotary shaker, at 30°C for 7 days. It was concluded that, the MYS medium containing cassava starch hydrolysate at 24 hr. presented the highest growth (dry cell weight of 5 g/l and 7.5 OD_{660 nm}). Moreover, the maximal production of cyclodextrins (0.252 OD_{553 nm}) was observed after 72 hr. of cultivation in the MYS medium containing cassava starch hydrolysate at 48 hours as carbon source.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่สามารถถือลิขสิทธิ์ อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : cyclodextrin, cassava starch, *Saccharomyces cerevisiae*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษสำเร็จได้ ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ความรู้และความคิดเห็นที่เป็นประโยชน์จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานสอโครงการพิเศษ และกรรมการสอโครงการพิเศษ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่ให้ความกรุณาสละเวลาในการตรวจสอบ ให้คำแนะนำและแก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆของโครงการพิเศษนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นิสา ไกรรักษ์ และบุคลากรทุกท่านที่มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือ และข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง แก่โครงการพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา คณาจารย์ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ญาติพี่น้องและเพื่อนทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และให้กำลังใจในการทำโครงการพิเศษ ตลอดจนการนำเสนอในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวณัชชา พูนทวี

นางสาวรังสิตา อยู่เย็น

นางสาวโสธญา สมบัติทวีศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	X
คำย่อและสัญลักษณ์	XII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 Cyclodextrins	4
2.1.1 โครงสร้างและคุณสมบัติ	4
2.1.2 กระบวนการผลิต cyclodextrins	9
2.1.3 การประยุกต์ใช้ cyclodextrins ในอุตสาหกรรม	18
2.2 แป้ง (Starch)	21
2.2.1 แป้ง	21
2.2.2 แป้งมันสำปะหลัง	23
2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 เอนไซม์อะไมเลส (enzyme amylase)	27
2.4.1 เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase)	28
2.4.2 ผลที่เกิดจากเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้ง	29
2.5 โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)	29
2.5.1 ความรู้ทั่วไป	29
2.5.2 ทฤษฎีและหลักการ	30
2.5.3 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	32
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	35
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	38
3.1 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ	38
3.1.1 เชื้อยีสต์	38
3.1.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์	38
3.2 แป้ง (Starch)	38
3.3 สารเคมี	38
3.4 อุปกรณ์	39
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย	40
3.5.1 การคัดแยกและการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์	40
3.5.2 ศึกษาการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ระยะเวลาต่างๆ	40
3.5.2.1 การย่อยแป้งมันสำปะหลัง	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส	41
3.5.2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble sugars) ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Method	41
3.5.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ด้วยวิธี Somogyi-Nelson	41
3.5.2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	41
3.5.3 การคัดเลือกยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่สามารถผลิต cyclodextrins ได้	41
3.5.4 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์	41
3.5.4.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum)	41
3.5.4.2 การวิเคราะห์หนาแน่นเซลล์แห้ง	41
3.5.4.3 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	42
3.5.5 การวิเคราะห์ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง	42
3.5.5.1 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 40 °C	42
3.5.5.2 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 100 °C	43
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	44
4.1 การคัดแยกและการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์	44
4.2 ผลการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส	45

เอกสารนี้เป็นที่ระยะเวลาต่างๆ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การคัดเลือกยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่สามารถผลิต cyclodextrins ได้	49
4.4 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์	50
4.5 การวิเคราะห์ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง	51
4.5.1 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 40 °C	51
4.5.2 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 100 °C	53
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	59
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการเตรียม	60
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์	62
ภาคผนวก ง ตารางบันทึกผลการทดลอง	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	คุณสมบัติของ cyclodextrins	8
2.2	การประยุกต์ใช้ประโยชน์จาก cyclodextrins ในอุตสาหกรรม	19
2.3	แสดงปริมาณของอะไมโลสและอะไมโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิด	26
ง.1	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่เวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ (ชั่วโมง) โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง ที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง) เป็นแหล่งคาร์บอน	66
ง. 2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร ที่เกิดจากการดูดซับฟีนอล์ฟทาลิน ของ cyclodextrins ที่เวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ (ชั่วโมง) โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง ที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างกัน (ชั่วโมง) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการวิเคราะห์ ปริมาณ cyclodextrins ที่ 40 °C และนำส่วนใสที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการ ย่อยเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน มาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อ การวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins โดยวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 100 °C	67
ง. 3	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร ของหลอดทดสอบการสลายตัว ของฟีนอล์ฟทาลิน โดยทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที	67
ง. 4	แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมัน สำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์บรอมฟีนอลบลู	68
ง. 4-1	แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมัน สำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์บรอมฟีนอลบลู (ต่อ)	69
ง. 5	แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมัน สำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์โบรโมไทมอลบลู	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง. 5-1 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์โบรโมไทมอลบลู (ต่อ)	71
ง. 6 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาติน	72
ง. 6-1 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาติน (ต่อ)	73
ง. 7 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์ไทมอลบลู	74
ง. 7-1 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์ไทมอลบลู (ต่อ)	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของ α -, β - และ γ - cyclodextrin	4
2.2	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ α -, β - และ γ - cyclodextrin	5
2.3	ตัวอย่างแบบจำลองโมเลกุลของ γ - cyclodextrin	6
2.4	การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน guest – cyclodextrins	7
2.5	ปฏิกิริยาเร่งโดยเอนไซม์ CGTase โดยแต่ละวงกลมแทนหน่วยกลูโคส วงกลมโปร่ง คือ น้ำตาลที่ปลายรีดิวิซ์	12
2.6	กระบวนการผลิต cyclodextrins โดยใช้ตัวทำละลาย (solvent process)	14
2.7	กระบวนการผลิต cyclodextrins โดยไม่ใช้ตัวทำละลาย (non-solvent process)	16
2.8	การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโมเลกุล cyclodextrins	18
2.9	โครงสร้างของอะไมโลส	22
2.10	โครงสร้างของอะไมโลเพกทิน	23
2.11	หัวมันสำปะหลัง	24
2.12	ยีสต์สายพันธุ์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.13	แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส	28
2.14	ไดอะแกรมแสดงการแยกสารในโครมาโตกราฟี	31
2.15	ไดอะแกรมของเครื่อง HPLC	32
4.1	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่ได้จากการคัดแยกเชื้อในจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน	44
4.2	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ (Reducing sugars) และ น้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble sugars) จากการย่อยน้ำแป้ง มันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	45
4.3	HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลูโคส, มอลโตส และ ผลิตภัณฑ์จากการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลัง ด้วยเอนไซม์แอลฟา- อะไมเลส เป็นระยะเวลาต่างๆ	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.4	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส จากการ ย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	48
4.5	แสดงผลการผลิต cyclodextrins ของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> บนจานอาหารแข็ง SS ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	49
4.6	แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ ย่อยเป็นเวลาต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน	50
4.7	แสดงภาพการสแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ ฟีนอล์ฟทาลิน ซึ่งได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 553 นาโนเมตร	51
4.8	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตรของฟีนอล์ฟทาลิน ที่ถูกดูดซับไว้ภายในโพรงของ cyclodextrins เทียบกับหลอดทดสอบการ สลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยเป็นระยะเวลา ต่างกัน คือ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน	52
4.9	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตรของฟีนอล์ฟทาลิน ที่ถูกดูดซับไว้ภายในโพรงของ cyclodextrins เทียบกับหลอดทดสอบการ สลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่ 40 และ 100 องศาเซลเซียส	53
ค. 1	กราฟมาตรฐานของ Total soluble sugars ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Method	62
ค. 2	กราฟมาตรฐานของ Reducing sugars ด้วยวิธี Somogyi-Nelson	63
ค. 3	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส	65
ค. 4	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโตส	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

CGTase	:	cyclodextrin glycosyltransferase
CDs	:	cyclodextrins
α -CD	:	α -cyclodextrin
β -CD	:	β -cyclodextrin
γ -CD	:	γ -cyclodextrin
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในประเทศไทย ประเทศเขตร้อนและแพร่หลายไปทั่วโลก แต่อย่างไรก็ตามราคาในตลาดโลกก็ยังคงถูกเมื่อเทียบกับแป้งชนิดอื่น (Atichokudomchai และ Varavinit, 2002) ในประเทศไทยนับว่าเป็นพืชไร่ที่สำคัญทางเศรษฐกิจ โดยมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังประมาณ 8.26 ล้านไร่ กระจายปลูกทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคเหนือ ในพื้นที่ 43 จังหวัด เป็นพืชที่ทำรายได้ให้เกษตรกรมากเป็นอันดับที่ 3 รองจากข้าว และอ้อย โดยมีแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญ คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก (นิรนาม, 2549) ดังนั้นการคัดแปร หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลังให้มีคุณสมบัติดีขึ้น สามารถเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ และช่วยให้เกษตรกรผู้ผลิตมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแป้งมันสำปะหลังจากพอลิเมอร์โมเลกุลสายยาวไปเป็นโมเลกุลที่ต่อเป็นวงกลม (cyclic structure) ซึ่งเรียกโครงสร้างใหม่นี้ว่า cyclodextrins cyclodextrins มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากแป้งเดิม ได้แก่ การละลายน้ำ และโครงสร้างที่เป็นวงกลมมีโพรงภายในทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย การประยุกต์ใช้ cyclodextrins ส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นตัวห่อหุ้มบรรจุ (packaging material) เนื่องจากมีโพรงอยู่ในโมเลกุล จึงนำมาใช้บรรจุสารต่างๆไว้ภายใน ได้แก่ สารประเภทละลายได้ง่าย สารที่ไม่ละลายน้ำ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารหอมระเหย เป็นต้น การบรรจุสารเหล่านี้ภายในโพรง cyclodextrins ทำให้คุณสมบัติของสารเปลี่ยนไป และยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารออกมามากมายนอกโครงสร้างได้ด้วย

โครงสร้างของ cyclodextrins เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริเวณปลายสายมาเชื่อมต่อกันเป็นวงแหวน ประกอบด้วยหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4 glycosidic linkage) ซึ่งได้จากการย่อยแป้งโดยเกิดปฏิกิริยาทรานส์-ไกลโคซิเลชัน (transglycosilation) ของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase ; CGTase) cyclodextrins ที่พบทั่วไปมี 3 ประเภท คือ แอลฟา-, เบต้า- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทริน (α -, β -, γ - cyclodextrins) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 6, 7 และ 8 โมเลกุล ตามลำดับ (เปี่ยมสุข, 2551) และที่พบได้ในปริมาณน้อยคือ cyclodextrins ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 9 โมเลกุล เรียกว่า เดลตา-ไซโคลเดกซ์ทริน

(δ -cyclodextrins) แต่ถ้าหากมีน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 9 โมเลกุล จะอยู่ในลักษณะของ cyclodextrins กิ่งแทน (สารโรจน์, 2547) จากจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่ต่างกันนี้ทำให้ขนาดของโพรง cyclodextrins มีขนาดแตกต่างกัน มีผลทำให้ความสามารถในการละลายต่างกันด้วย บริเวณโพรงของ cyclodextrins จะแสดงคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ขณะที่บริเวณผิวนอกแสดงคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) จึงทำให้ cyclodextrins มีคุณลักษณะพิเศษที่สามารถจับกับโมเลกุลอื่นไว้ในโพรงได้ เกิดเป็นฟังก์ชันใหม่ที่มีคุณสมบัติของตัวกระทำอิมัลชัน (emulsifying agents) สารลดความตึงผิว (surfactants) และตัวเร่ง (catalysts) ในปฏิกิริยาทางเคมี

กระบวนการสังเคราะห์ cyclodextrins ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการเตรียมสารตั้งต้นให้เหมาะสมต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ และขั้นตอนการสังเคราะห์ cyclodextrins จากเอนไซม์ CGTase ซึ่งวิธีการเตรียมสารตั้งต้นสำหรับการผลิต cyclodextrins มี 2 วิธี คือ การเตรียมโดยใช้เอนไซม์ย่อยโมเลกุลแป้งให้มีขนาดเล็กลง และอีกวิธีหนึ่ง คือ การเตรียมแป้งโดยวิธีทางกายภาพ เช่น การบด การรีด หรือ การให้ความร้อน ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น (substrate) และ วิธีการเตรียมแต่ละวิธี (ไพโรจน์ และคณะ, 2552)

ปัจจุบัน cyclodextrins ที่ผลิตได้โดยอาศัยกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อแบคทีเรียนั้นมีราคาแพง หาซื้อได้ยาก เนื่องจากในประเทศไทยมีการผลิตในปริมาณน้อย ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และในกระบวนการผลิตอาจพบปัญหาเรื่องกลิ่น ดังนั้นจึงมีความสนใจนำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มาใช้ในการผลิต cyclodextrins ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการคัดแยกและพัฒนาสายพันธุ์ให้มีความสามารถในการเจริญ และย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แม้ว่าเชื้อยังคงเจริญช้า แต่ถ้านำสารละลายแป้งมันสำปะหลังมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) ที่เวลาต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลที่เชื้อสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญ และขณะเดียวกันก็ได้ปริมาณพอลิเมอร์น้ำตาลที่เชื้อยีสต์สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิต cyclodextrin ได้ ดังนั้นการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งสับสเตรทที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก ไม่มีความเป็นพิษ ไปเป็น cyclodextrins เพื่อเพิ่มมูลค่า อีกทั้งกระบวนการดังกล่าวช่วยลดและแก้ไขปัญหากลิ่นที่ดีกว่าการใช้แบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาวิธีการคัดแยกและเลี้ยงยีสต์ที่สามารถผลิต cyclodextrins ได้
- 1.2.2 ศึกษากระบวนการผลิต cyclodextrins จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
- 1.2.3 ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ cyclodextrins ที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษากระบวนการผลิต cyclodextrins จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งสับสเตรท และ cyclodextrins ที่ผลิตได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 นำความรู้ที่ได้ไปต่อยอด หรือ นำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงกระบวนการผลิต cyclodextrins เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น
- 1.4.2 สามารถผลิต cyclodextrins ได้ โดยใช้สับสเตรทที่มีอยู่มากภายในประเทศ เพื่อลดการนำเข้า cyclodextrins จากต่างประเทศ
- 1.4.3 เพื่อเพิ่มความรู้และฝึกทักษะในเชิงปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

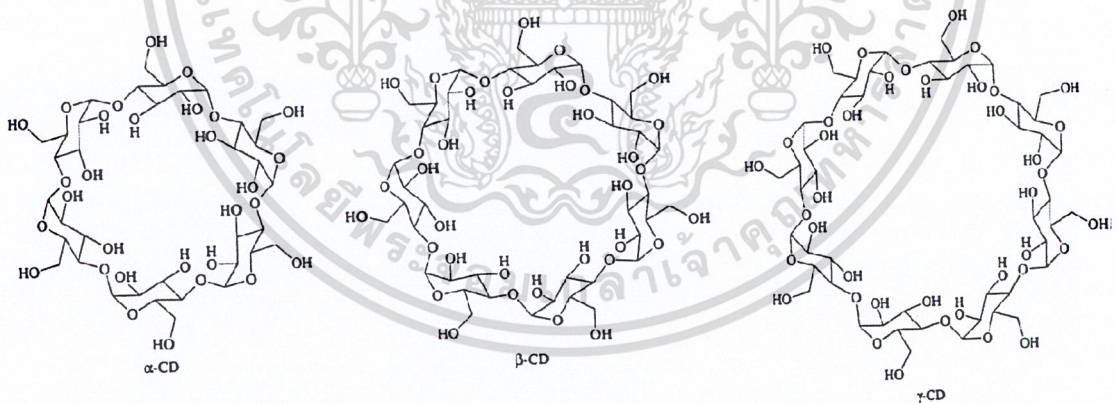
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Cyclodextrins

2.1.1 โครงสร้างและคุณสมบัติ

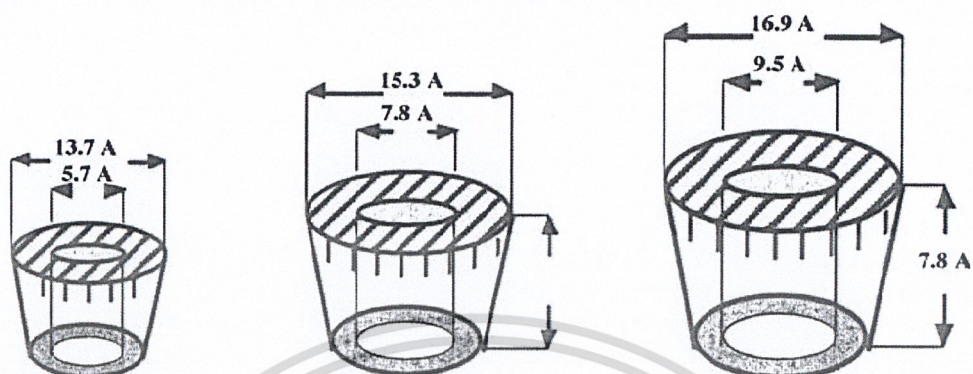
cyclodextrins เป็นโพลิไซคลิกคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase ; CGTase) ทำให้มีโครงสร้างเป็นวงแหวนปิด ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 6, 7 และ 8 โมเลกุล ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4 glycosidic bond) เรียกว่า แอลฟา-, เบต้า- และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทริน (α -, β -, γ - cyclodextrin) ตามลำดับ (รูปที่ 2.1 และ 2.2) (Del-Valle, 2004)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ α -, β - และ γ - cyclodextrin

ที่มา : Astray (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

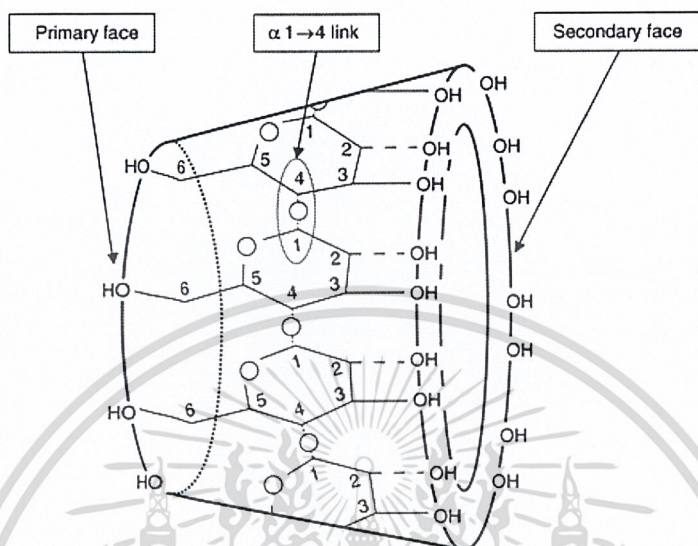


รูปที่ 2.2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ α -, β - และ γ -cyclodextrin

ที่มา : <http://www.chromatography-online.org/Chiral-GC/Contemporary-Chiral-Stationary-Phases/Cyclodextrin.html> (25/04/54)

วงแหวน cyclodextrins มีรูปร่างคล้ายถ้วยเปิดทั้ง 2 ด้าน (torus-shaped) ทุกหน่วยของน้ำตาลกลูโคสจะหันหมู่ที่มีขั้วออกด้านนอกโมเลกุล โดยหันหมู่ไฮดรอกซีปฐมภูมิ (primary hydroxyl) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ไปทางปลายเปิดด้านแคบ และหมู่ไฮดรอกซีทุติยภูมิ (secondary hydroxyl) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ไปทางปลายเปิดด้านกว้าง และหันส่วนที่ค่อนข้างไม่มีขั้วคือ ไฮโดรเจนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 5 รวมทั้งไกลโคซิดิกออกซิเจนเข้าด้านในโมเลกุล (เปี่ยมสุข, 2551) ทำให้ผิวด้านนอกของ cyclodextrins แสดงสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic region) จึงละลายน้ำได้ ส่วนผิวด้านในของช่องว่างหรือโพรงในโมเลกุล (inner cavity) แสดงสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) (รูปที่ 2.3) (มนจิรา, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



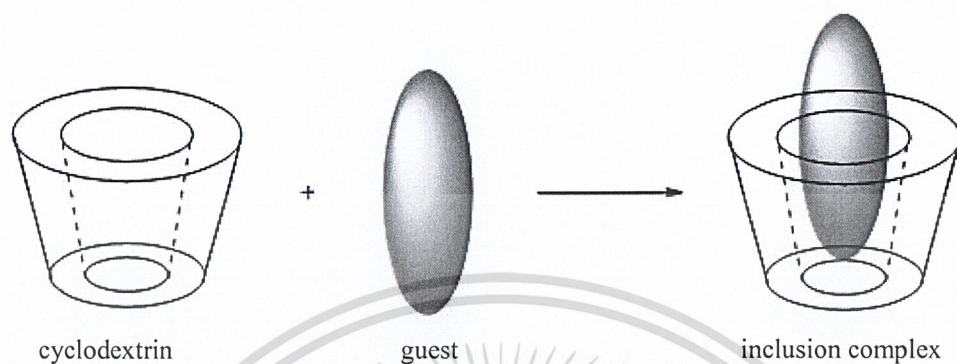
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างแบบจำลองโมเลกุลของ γ -cyclodextrin

ที่มา : <http://bj.oxfordjournals.org/content/early/2009/05/24/bj.aep093.full> (25/04/54)

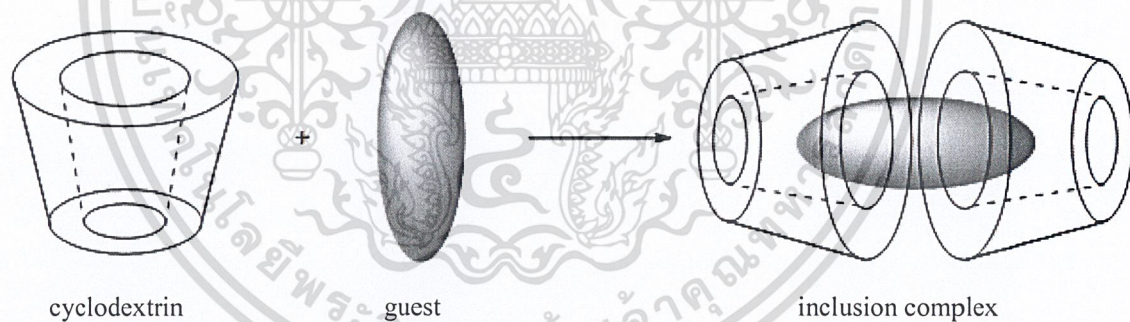
จากคุณสมบัติพิเศษเหล่านี้จึงทำให้ cyclodextrins สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (inclusion complex) กับโมเลกุลต่างๆที่ถูกดูดซับ (guest molecule) ได้ ด้วยปฏิสัมพันธ์ที่เรียกว่า host-guest interactions หรือ molecular encapsulation เช่น พันธะไฮโดรเจน ไฮโดรโฟบิก และ แรงแวนเดอร์วาลส์ โดย cyclodextrins ทำตัวเป็น host ในขณะที่โมเลกุลที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่า น้ำที่สามารถเข้าไปแทนที่น้ำในโพรงตรงกลางของ cyclodextrins ได้ จะทำหน้าที่เป็น guest ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (เปี่ยมสุข, 2551) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น ทำให้สมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของสารที่ถูกดูดซับเปลี่ยนแปลงไป และเพิ่มความสามารถในการละลายของสาร เพิ่มความเร็วในการละลายของตัวยา เพิ่มความคงรูปของรสชาติ กำจัดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ของ ผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอาง รวมทั้งควบคุมการหลุดของสารประกอบ เช่น ในตัวยา และ น้ำหอม เป็นต้น (ปาวิณา และวริศรา, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



(ข)



รูปที่ 2.4 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน guest - cyclodextrins (ก) แบบ 1 : 1 และ (ข) แบบ 1 : 2

ที่มา : http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufjf.br/resenhas_ciclodextrinas.html (25/04/54)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของ cyclodextrins

คุณสมบัติ	α -CD	β -CD	γ -CD
ลักษณะปรากฏ	เป็นผง	เป็นผง	เป็นผง
จำนวนกลูโคสในโมเลกุล	6	7	8
สูตรโมเลกุล	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	972	1135	1297
ขนาดโพรงตรงกลางโมเลกุล (A° , เส้นผ่าศูนย์กลาง)	5.0	6.2	7.9
เส้นผ่าศูนย์กลางปลายเปิดด้านนอก (A°)	14.6	15.4	17.5
เส้นผ่าศูนย์กลางปลายเปิดด้านใน (A°)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
ความสูง	7.9	7.9	7.9
ปริมาตรของโพรง (มล./โมล)	100	150	200
$[\alpha]_D$ ที่ 25 $^\circ C$	150 ± 0.5	162.5 ± 0.5	177.4 ± 0.5
เปอร์เซ็นต์ความชื้นสมดุล (ความชื้นสัมพัทธ์ 85% และ 30 $^\circ C$)	12	14	18
ช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลว ($^\circ C$)	255-260	255-265	240-245
แรงดึงผิว (MN/m)	71	71	71
Crystal water content (wt.%)	10.2	13-15	8-18
โมเลกุลของน้ำในช่องว่าง	6	11	17
เปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ (ที่ 25 $^\circ C$)	14.5	1.85	23.2

ที่มา : เปียมสุข (2551), ตาโรจน์ (2547) และ Dodziuk (2006)

คุณลักษณะในการทำงานของ cyclodextrins สามารถสรุปได้ดังนี้

- สามารถสร้างความเสถียรให้กับสารที่ไม่คงตัว (labile substances)

cyclodextrins สามารถช่วยทำให้สารที่ไม่คงตัวต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet ; UV) หรือสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้นั้นมีความเสถียรขึ้นได้

- สามารถยึดสารระเหย (volatile substances) เอาไว้ได้

cyclodextrins สามารถช่วยเก็บรักษาสารปรุงแต่งกลิ่นรสให้คงอยู่ได้เป็นระยะเวลายาวนาน ด้วยการป้องกันการระเหย หรือด้วยการทำให้เป็นผง กรณีที่เป็นสารพิษระเหยก็เช่นกัน สามารถทำให้เป็นผงที่ไม่ระเหยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สามารถกำบังกลิ่นไม่พึงประสงค์ (undesired odors) ไว้ได้

cyclodextrins สามารถช่วยกำบังรสขม กลิ่นไม่ปกติ รสและกลิ่นอื่นๆที่ไม่ต้องการได้

- การเพิ่มความสามารถในการละลายให้กับสารที่ไม่ละลาย (unsoluble substances)

cyclodextrins สามารถช่วยเพิ่มคุณสมบัติการละลายน้ำให้แก่สารที่ละลายน้ำได้ไม่ดี ทำให้สารละลายในน้ำได้ง่ายขึ้น ส่วนใหญ่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมยา โดยจะไปรวมตัวกับตัวยาบางชนิดเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำของตัวยาเพิ่มขึ้น (ไพโรจน์ และคณะ, 2552) นอกจากนี้ยังช่วยทำให้น้ำมันและไขมันมีความเสถียรขึ้นในลักษณะของอิมัลชัน และสามารถลดการดูดซับน้ำ และช่วยทำให้สารหนืดเป็นผงได้ (สาโรจน์, 2547)

2.1.2 กระบวนการผลิต cyclodextrins

cyclodextrins เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (CGTase) โดยใช้แป้ง หรือ คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบคล้ายแป้งเป็นสารตั้งต้น เช่น อะไมโลส อะไมโลเพคติน ไกลโคเจน และมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ไพโรจน์ และคณะ, 2552)

เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (CGTase) และกลไกการทำงานในการสังเคราะห์ cyclodextrins

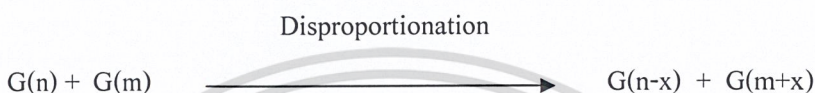
เอนไซม์ไซโคล (มอลโท) เดกซ์ทรินไกลโคซิล (หรือกลูโคโน) ทรานส์เฟอเรส (CGTase, EC 2.4.1.19) มีชื่อตามระบบว่า 1,4- α -D-glucan 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase (cyclizing) มีลักษณะเป็นพอลิเพปไทด์สายเดี่ยว มีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน ส่วนใหญ่ต้องการ Ca^{+2} ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.0 - 7.0 (ยกเว้น CGTase ทนด่าง) และอุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส (ยกเว้น CGTase ทนร้อน) ตามระบบ E.C. จะจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มทรานส์เฟอเรส ซึ่งทำงานโดยการเคลื่อนย้ายหมู่กลูโคซิล และเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ จึงจัดรวมอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzymes) มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาโดยการตัดพันธะ α -1,4 glycosidic ในสายของแป้ง (ไม่ตัดบริเวณโซ่กิ่ง) ที่เป็นสารตั้งต้น ได้เป็น cyclodextrins ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และอาจมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นๆ เช่น ลิมิตเดกซ์ทริน โอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะแตกต่างกันไปตามประเภทของเอนไซม์ CGTase ประเภทของสารตั้งต้น และสภาวะที่ใช้ในการบ่ม

ปฏิกิริยาหลักของเอนไซม์ CGTase คือ การโยกย้ายหมู่กลูโคซิล หรือทรานส์กลูโคซิเลชัน ในสายแซ็กคาไรด์เดียวกัน หรือระหว่างสาย (intra- หรือ intermolecular transglucosylation) โดยเอนไซม์ CGTase สามารถเร่งปฏิกิริยานี้ได้เป็น 3 แบบหลักๆ (เปี่ยมสุข, 2551) คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) ปฏิกริยา Disproportionation

ปฏิกริยาการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลระหว่างโอลิโก หรือ พอลิแซ็กคาไรด์สายตรงจากตัวให้ไปยังตัวรับ โดยการตัดพันธะไกลโคซิดิก ชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4 glycosidic bond) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกริยานี้ ก็จะมีทั้งแซ็กคาไรด์สายสั้นและสายยาวผสมกัน (สมพงศ์, 2543) ดังปฏิกริยา

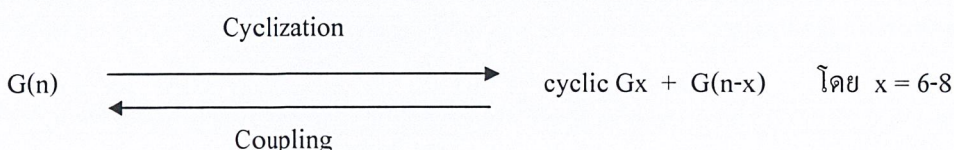


เมื่อ G = กลูโคส
 n, m = จำนวนหมู่กลูโคซิลของสารตั้งต้น
 x = จำนวนหมู่ที่ถูกโยกย้าย

ปฏิกริยานี้ไม่จำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase และจะเกิดได้ดีเมื่อสารตั้งต้นมีขนาดความยาวมากกว่า 100 หน่วยกลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่า ปฏิกริยานี้จะมีผลต่อปฏิกริยาการสังเคราะห์ cyclodextrins ก็ต่อเมื่อสายโอลิโกหรือพอลิแซ็กคาไรด์มีขนาดเหมาะสมที่จะเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกริยา cyclization (เปี่ยมสุข, 2551)

2) ปฏิกริยา Cyclization

ขั้นตอนการสังเคราะห์วงแหวนปิดของ cyclodextrins จากสายโอลิโกหรือพอลิแซ็กคาไรด์ปลายเปิด (ไพโรจน์ และคณะ, 2552) เป็นปฏิกริยาการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลที่เกิดขึ้นภายในสายแซ็กคาไรด์เดียวกัน (intramolecular transglucosylation) ที่ตัวให้ซึ่งถูกตัดหมู่กลูโคซิล (ตัดพันธะ α -1,4 glycosidic) ออกไปจะทำหน้าที่เป็นตัวรับ โดยนำปลายรีดิวซ์ของส่วนที่ถูกตัดออกไปมาต่อกับปลายอนรีดิวซ์ในส่วนเดียวกัน เกิดเป็น โมเลกุลของ cyclodextrins ดังปฏิกริยา

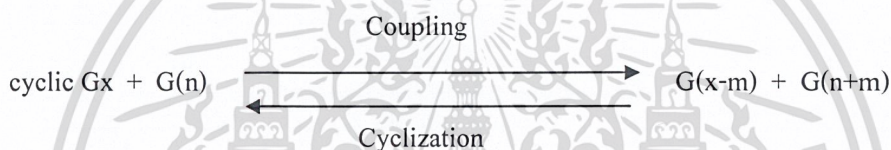


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยานี้จะจำเพาะเฉพาะเอนไซม์ CGTase และเกิดได้ดีเมื่อสารตั้งต้นเป็นสายแซ็กคาไรด์ที่มีขนาดความยาว 16-18 หน่วยกลูโคส (เปี่ยมสุข, 2551)

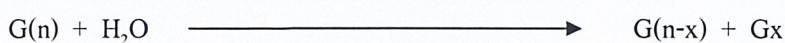
3) ปฏิกิริยา Coupling

คือปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยา cyclization ซึ่งเป็นการตัดพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4 glycosidic bond) ในวงแหวนของ cyclodextrins (สมพงศ์, 2543) เพื่อนำไปต่อกับสายโอลิโกหรือพอลิแซ็กคาไรด์ โดย cyclodextrins จะทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่กลูโคซิล ในขณะที่โอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นจะทำหน้าที่เป็นตัวรับ เกิดเป็นสายโอลิโกแซ็กคาไรด์หรือพอลิแซ็กคาไรด์ปลายเปิดที่มีความยาวมากขึ้น ดังปฏิกิริยา



ปฏิกิริยานี้ถือเป็นปฏิกิริยา disproportionation ชนิดพิเศษที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase และเกิดได้ดีเมื่อมีสารตั้งต้นตัวรับเป็นโอลิโก หรือ พอลิแซ็กคาไรด์สายสั้น หรือน้ำตาลโมเลกุลเล็กประมาณ 2-4 หน่วยกลูโคส นอกจากนี้ตัวรับอาจเป็นสารโมเลกุลเล็กชนิดอื่นที่มีหมู่ไฮดรอกซิล โดยอาจเป็นโมเลกุลสายตรงหรือเป็นวงก็ได้ เช่น แอลกอฮอล์ ไฮโดรควิโนน ฟลาโวนอยด์ ซึ่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคซิลมายังโมเลกุลเหล่านี้ จะทำให้เกิดสารประกอบกลูโคไซด์ที่มีประโยชน์ (เปี่ยมสุข, 2551)

นอกจากปฏิกิริยาหลักในการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เอนไซม์ CGTase ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้ง (hydrolysis) ได้ (รูปที่ 2.5) โดยการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลไปยังโมเลกุลของน้ำซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับ (เปี่ยมสุข, 2551) และเฉพาะปฏิกิริยาการย่อยสลายเท่านั้นที่จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีจำนวนของปลายรีดิวซ์เพิ่มขึ้น (สมพงศ์, 2543) ดังปฏิกิริยา

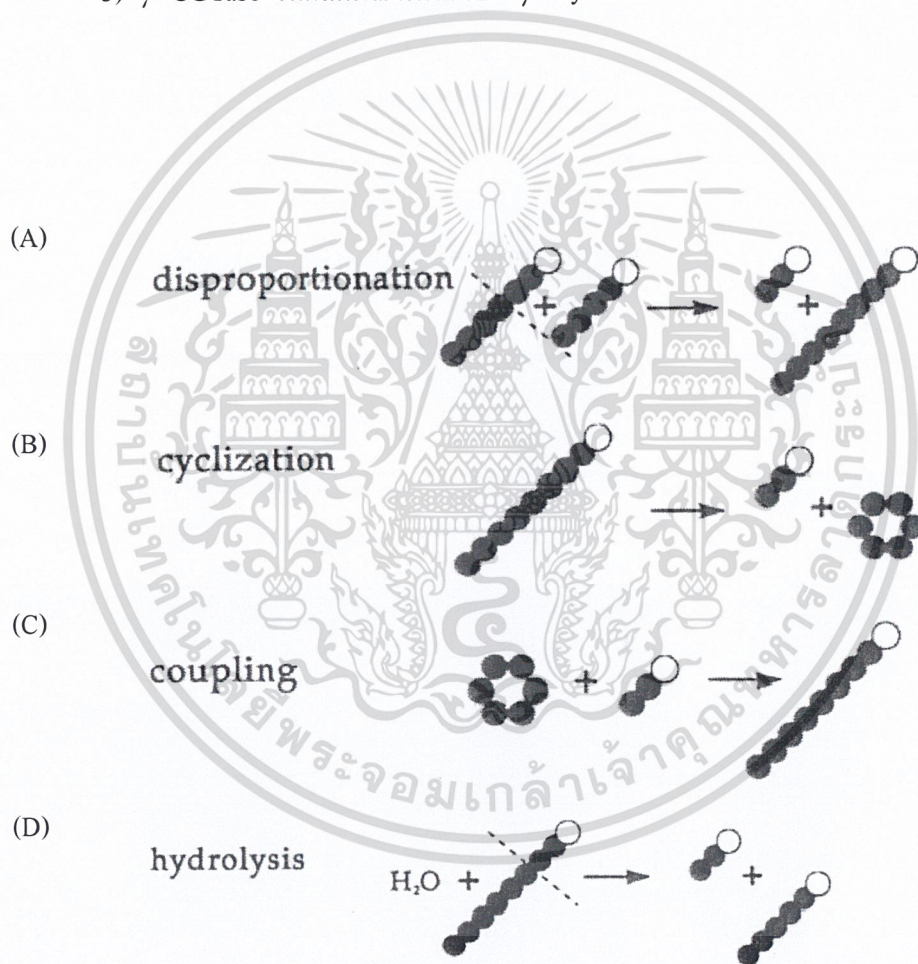


เอนไซม์ CGTase เร่งปฏิกิริยานี้ได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเนื่องจากเอนไซม์ CGTase สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบ ดังนั้นจึงจัดเป็นเอนไซม์หลายหน้าที่ (multifunctional enzyme)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ cyclodextrins ที่เกิดจากเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่มี 3 ประเภทหลักปะปนกัน คือ α -, β - และ γ - cyclodextrins โดยสัดส่วนของ cyclodextrins ทั้ง 3 ประเภทจะขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของเอนไซม์ รวมทั้งสถานะในการผลิต สามารถแบ่งเอนไซม์ CGTase ตามความจำเพาะของผลิตภัณฑ์ได้เป็น 3 ประเภท (เปี่ยมสุข, 2551) ดังนี้

- 1) α -CGTase ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น α - cyclodextrin
- 2) β -CGTase ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น β - cyclodextrin
- 3) γ -CGTase ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น γ - cyclodextrin ซึ่งพบน้อยมาก



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาเร่งโดยเอนไซม์ CGTase โดยแต่ละวงกลมแทนหน่วยกลูโคส วงกลมโปร่งคือ น้ำตาลที่ปลายรีดิวิซ์
ที่มา : เปี่ยมสุข (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

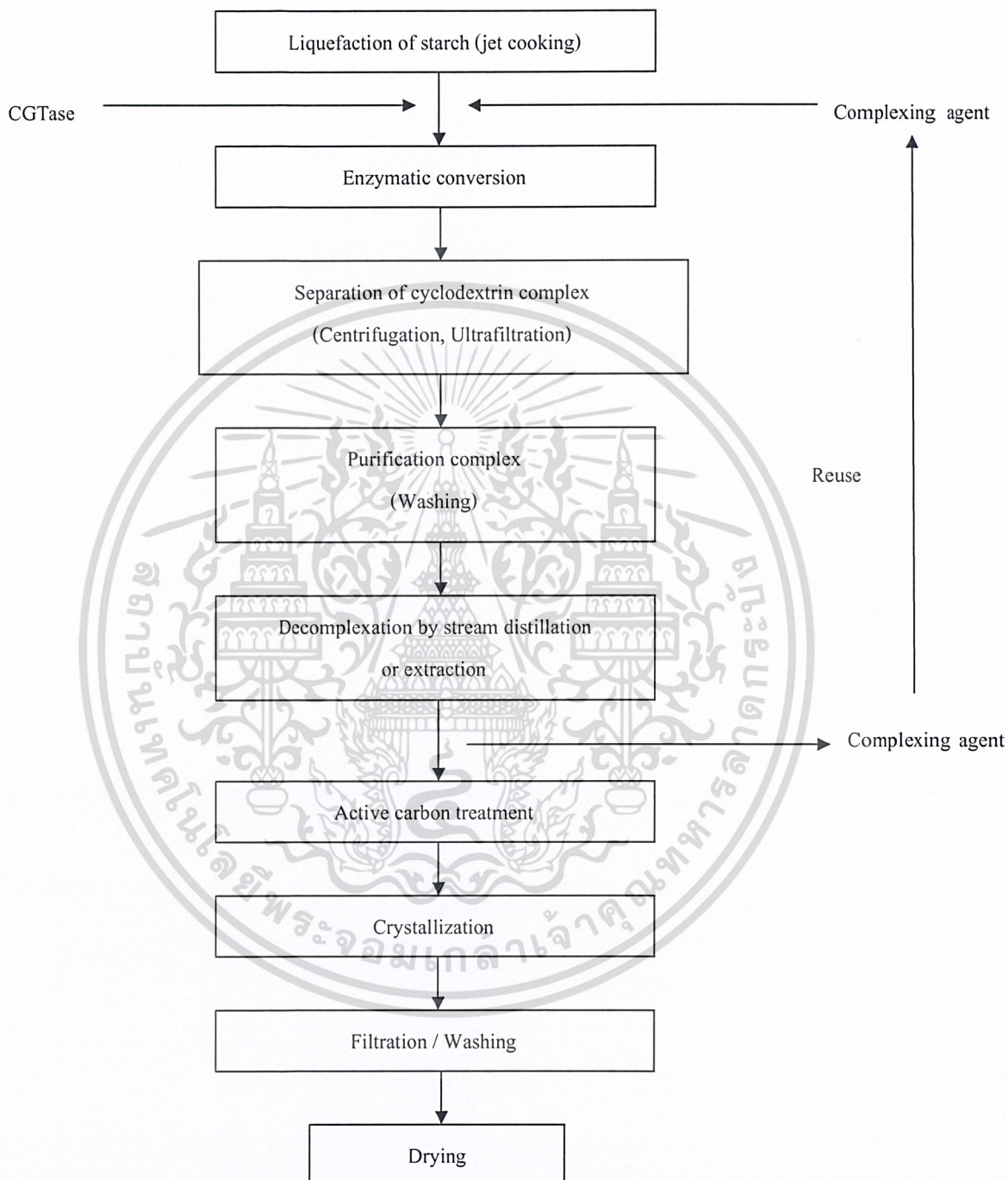
กระบวนการผลิต cyclodextrins

การผลิต cyclodextrins จากแป้งที่เป็นสารตั้งต้น ส่วนใหญ่การผลิตในปัจจุบันจะใช้แป้งมันฝรั่งและแป้งข้าวโพด เพราะแป้งที่มีปริมาณของอะไมโลเพกทินสูง จะเป็นสารตั้งต้นที่ดีกว่าแป้งที่มีอะไมโลสสูง เนื่องจากเอนไซม์ CGTase จะใช้อะไมโลเพกทินได้ดีกว่า จึงให้ผลิตภัณฑ์ cyclodextrins สูงกว่า และด้วยเหตุนี้แป้งมันสำปะหลังซึ่งมีปริมาณของอะไมโลเพกทินสูงเช่นเดียวกัน จึงน่าจะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นได้ดีกว่าแป้งมันฝรั่งและแป้งข้าวโพด รวมทั้งแป้งมันสำปะหลังยังเป็นอุตสาหกรรมแป้งที่มีการผลิตมากในประเทศไทย จึงทำให้มีราคาต่ำอีกด้วย ซึ่งในขั้นตอนแรกของกระบวนการผลิต จะต้องเจลาติไนซ์แป้งด้วยความร้อน (80-120 องศาเซลเซียส) และอาจมีการเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เพื่อช่วยในการย่อยแป้งที่อุณหภูมิสูงก่อนการเติมเอนไซม์ CGTase ซึ่งมักทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส และถ้าเอนไซม์ CGTase สามารถทำงานที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ได้ ก็จะเป็นการลดเวลา ค่าใช้จ่ายในการลดอุณหภูมิลง และลดขั้นตอนในการใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (เปี่ยมสุข, 2551)

กระบวนการผลิต cyclodextrins ในอุตสาหกรรมมี 2 วิธี คือ

1. กระบวนการผลิตที่ใช้ตัวทำละลาย (solvent process) เป็นวิธีการที่ใช้กันมากในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในประเทศแถบตะวันตก (ดังรูปที่ 2.6) วิธีนี้ทำได้โดยการเติมสารอินทรีย์ที่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexing agent) กับ cyclodextrins เฉพาะชนิดแล้วตกตะกอนจากส่วนผสมของปฏิกิริยา ทำให้เกิดข้อดี คือ สารอินทรีย์นี้จะช่วยในการแยกผลิตภัณฑ์ cyclodextrins ออกจากผลิตภัณฑ์อื่น สามารถคัดเลือกผลิตภัณฑ์ cyclodextrins ชนิดเดียวที่ต้องการได้ง่ายขึ้น และได้ผลผลิตสูงขึ้น แต่มีข้อจำกัด คือ สารอินทรีย์ที่เติมซึ่งมักเป็นตัวทำละลายจะต้องมีความเป็นพิษต่ำ และสามารถถูกกำจัดออกได้โดยการกลั่น ตัวอย่างสารอินทรีย์ที่นำมาใช้ เช่น โทลูอีน และ ไซโคลเฮกเซน ช่วยในการตกตะกอน β -cyclodextrins แต่การนำผลิตภัณฑ์ cyclodextrins ที่เตรียมได้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยามักไม่เป็นที่ยอมรับ จึงได้มีการพัฒนาโดยใช้สารในกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่ำกว่า ได้แก่ แอลกอฮอล์สายตรง (เช่น เอทิลแอลกอฮอล์) อีเทอร์ เอสเทอร์ และ คีโตน ตัวอย่างเช่น การใช้สาร 1-decanol ในการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนและตกตะกอน α -cyclodextrins โดยสารอินทรีย์นี้องค์การอาหารและยา หรือ FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้มีปริมาณของสารเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ไม่เกิน 5 ppm ซึ่งเป็นปริมาณที่สภาสุขภาพของยุโรปกำหนดไว้ (เปี่ยมสุข, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 กระบวนการผลิต cyclodextrins โดยใช้ตัวทำละลาย (solvent process)

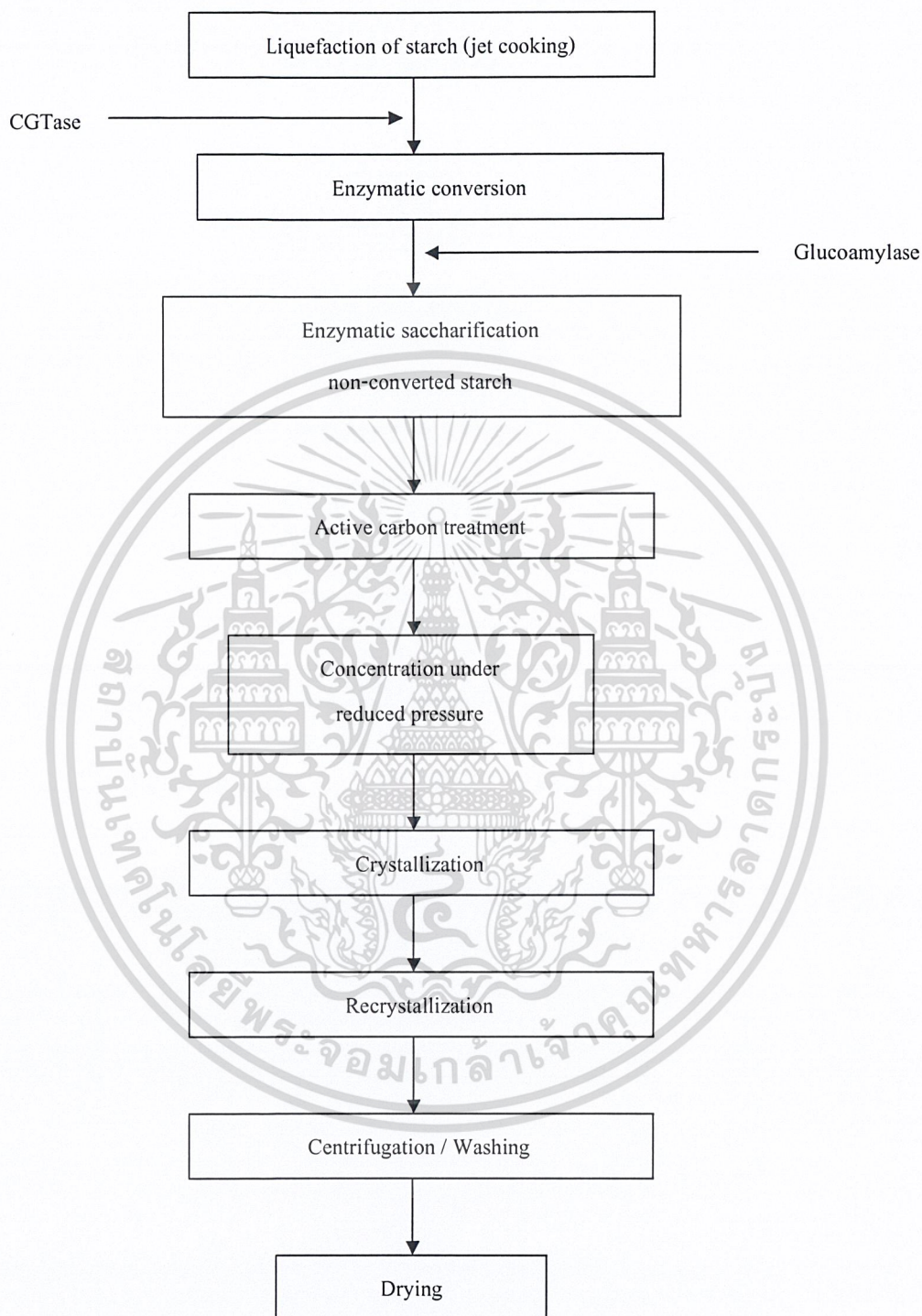
ที่มา : ไพโรจน์ และคณะ (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กระบวนการผลิตที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย (non-solvent process) เป็นวิธีที่ไม่มีการเติมสารอินทรีย์ (complexing agent) ลงไปในกระบวนการ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ cyclodextrins ทั้ง 3 ประเภทปนกัน โดยสัดส่วนของ cyclodextrins แต่ละประเภทจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ CGTase สภาพของปฏิกิริยาที่ใช้ และกระบวนการผลิต cyclodextrins ที่เตรียมได้อาจถูกนำไปใช้งานในรูปของผลิตภัณฑ์ผสม หรือนำไปแยก cyclodextrins แต่ละประเภทออกจากกัน โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนแคตไอออน แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก ดังตัวอย่างการผลิต β -cyclodextrins ตามสิทธิบัตรของ Horikoshi และบริษัทของ NSK และการแยก γ -cyclodextrins จาก cyclodextrins ส่วนผสมในน้ำใส (Supernatant Celdex) ที่ได้จากการผลิต β -cyclodextrins ซึ่งต้องใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสย่อยโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรงที่ปะปนอยู่ และแยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนแคตไอออน และแบบดูดซับด้วยแรงไฮโดรโฟบิก แล้วชะด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูง นอกจากการใช้โครมาโตกราฟีในการแยก cyclodextrins ยังมีการใช้วิธีอื่น เช่น บริษัท Mercian Co., Ltd. ในญี่ปุ่น ใช้เทคโนโลยีการดูดซับบนเม็ดโคโคซานที่มีการติดลิแกนด์ที่จะจับอย่างจำเพาะกับ cyclodextrins แต่ละประเภท

อีกตัวอย่างหนึ่ง เป็นการผลิต cyclodextrins ผสม เช่น K-50 (มีปริมาณ cyclodextrins 50% โดยเป็นชนิดแอลฟา 30%) และ SD-20 (มี cyclodextrins 20% ปนกับเดกซ์ทรินชนิดแตกกิ่ง) ของบริษัท Ensuiko Sugar Refining ซึ่งเน้นการผลิตสเกลใหญ่ การผลิตใช้ขั้นตอนเหมือนกัน ต่างกันที่วัตถุดิบแป้ง โดย K-50 ใช้แป้งมันฝรั่ง ส่วน SD-20 ใช้แป้งข้าวโพดชนิดแว็กซ์ (waxy) ซึ่งมีโซ่กิ่งมาก โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 7-10% เท่ากัน และใช้เอนไซม์ CGTase 2 ชนิด คือ ในขั้นตอนลิกวิฟายแป้งใช้ CGTase จาก *B. stearothermophilus* ทนร้อน บ่ม 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.5-7.0 เวลา 1 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิลงให้เหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติม CGTase จาก *B. macerans* บ่มต่ออีก 15 ชั่วโมง แล้วหยุดเอนไซม์ด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ลดอุณหภูมิอีกครั้งหนึ่ง ต่อจากนั้นจึงกรองแยกผลิตภัณฑ์ cyclodextrins จากส่วนผสมของปฏิกิริยาด้วยการกรองแบบอัลตรา (ultrafiltration) แล้วทำให้เข้มข้นด้วยกระบวนการรีเวิร์สออสโมซิส (RO) แยก cyclodextrins จากเดกซ์ทรินด้วย โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน แล้วลดปริมาณด้วยการระเหย และพ่นแห้งเพื่อให้ได้ผงผลิตภัณฑ์ (เปี่ยมสุข, 2551) โดยทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมจะนิยมใช้กระบวนการนี้เพื่อสังเคราะห์ β -cyclodextrins เนื่องจากเป็น cyclodextrins ที่ละลายน้ำได้น้อยที่สุด จึงทำให้สามารถแยกออกจาก cyclodextrins ประเภทอื่นๆ ได้ง่าย (ไพโรจน์ และคณะ, 2552) ดังรูปที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิต cyclodextrins โดยไม่ใช้ตัวทำละลาย (non-solvent process)

ที่มา : ไพโรจน์ และคณะ (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต cyclodexreins

ในการสังเคราะห์ cyclodextrins เพื่อให้ได้ชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมากที่สุดนั้น มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ สามารถจำแนกได้ดังนี้

1) ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น

สารตั้งต้นหรือแป้งที่จะนำมาใช้ในการผลิต cyclodextrins นั้นมีผลต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยแป้งแต่ละชนิดก็จะมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกันไป เช่น อัตราส่วนระหว่างอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน จึงทำให้แป้งแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase ที่ใช้ในการผลิต cyclodextrins แตกต่างกันไป และมีการรายงานว่ อะไมโลเพกทินเป็นสารตั้งต้นในการผลิต cyclodextrins ได้ดีกว่าอะไมโลส เนื่องจากเอนไซม์ CGTase จะเริ่มเข้าทำปฏิกิริยาที่ปลายอนรีดิวซ์ในโมเลกุลของแป้ง ซึ่งในอะไมโลเพกทินจะมีปลายอนรีดิวซ์มากกว่าอะไมโลส นอกจากนี้การใช้แป้งชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้นแตกต่างกันก็ทำให้อัตราการสังเคราะห์ cyclodextrins แตกต่างกันได้ด้วย

2) ชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของเอนไซม์

เอนไซม์ CGTase ที่ใช้ในการผลิต cyclodextrins ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้จากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เช่น *Klebsiella pneumoniae* , *Brevibacterium* sp. และส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Bacillus* ดังนั้นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน ก็จะทำให้แสดงลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันด้วย เช่น ค่าพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง การให้ผลิตภัณฑ์ cyclodextrins หลัก และอัตราส่วนของ cyclodextrins แต่ละชนิด (สมพงษ์, 2543) นอกจากนี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase แล้ว ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase ก็มีผลต่อการผลิต cyclodextrins ด้วยเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาอิทธิพลของเอนไซม์ CGTase ต่อการผลิต cyclodextrins พบว่า ถ้าเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 10 เท่า จะทำให้การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเป็น 35.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ก็ยังมีกรรายงานอีกด้วยว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะทำให้ได้ cyclodextrins เพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ก็ต้องคำนึงถึงต้นทุนจากราคาของเอนไซม์ที่ใช้ด้วย

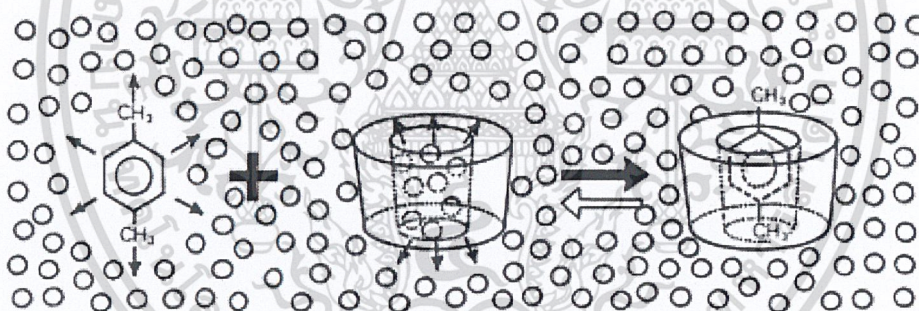
3) ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ CGTase กับแป้ง จะมีผลต่ออัตราส่วนของ cyclodextrins แต่ละชนิด ซึ่งมีการรายงานว่ ช่วงแรกของการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นจะมีการสังเคราะห์ α -cyclodextrins ได้มาก แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาให้ยาวนานขึ้น อัตราส่วนของ β -cyclodextrins จะมีปริมาณสูงสุด (ไพโรจน์ และคณะ, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การประยุกต์ใช้ cyclodextrins ในอุตสาหกรรม

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า cyclodextrins สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ได้แก่ เป็นสารเพิ่มความเสถียร เพิ่มการละลายน้ำ เพิ่มความคงตัวทางชีวภาพ กำจัดกลิ่นและสารที่ไม่พึงประสงค์ เป็นต้น ทั้งนี้ก็เป็นเพราะโครงสร้างของ cyclodextrins ที่มีโพรงตรงกลางโมเลกุลทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลของ guest ได้ (เปี่ยมสุข, 2551) โดยเมื่อ cyclodextrins ละลายน้ำ โมเลกุลของน้ำก็จะถูกผลักออกจากโพรง ถ้าหากเติมโมเลกุลของ guest ที่ไม่มีขั้วและมีขนาดพอเหมาะกับความยาวของโพรงของ cyclodextrins ลงไป จะเกิดการรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (inclusion complex) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ซึ่งจะแยกตัวออกจากรูปของของแข็งหรือผลึกขนาดเล็ก โดยสมบัติทางกายภาพของโมเลกุลที่ถูกห่อหุ้มไว้ภายในโพรงของ cyclodextrins จะเปลี่ยนแปลงไป และเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โมเลกุลทั้งสองก็สามารถที่จะแยกออกจากกันได้ โมเลกุลไม่มีขั้วของ guest ที่แยกได้นั้น จะมีสมบัติทางกายภาพกลับคืนมาเหมือนเดิม (ไพโรจน์ และคณะ, 2552)



รูปที่ 2.8 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโมเลกุล cyclodextrins

ที่มา : <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/cyclodextrins-pharmaceuticals-overview-0> (25/04/54)

จากการที่ cyclodextrins สามารถรวมตัวกับโมเลกุลของสารที่ทำหน้าที่เป็น guest แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้นั้น จึงทำให้มีการนำ cyclodextrins มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จาก cyclodextrins ในอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	ปัจจัยหลัก	ผลิตภัณฑ์สุดท้าย
อาหาร		
การทำอิมัลชัน	น้ำมันและไขมัน	มาร์การีน เค้ก ครีมปั่น น้ำสลัด
ความเสถียร	กลิ่นรส เครื่องเทศ สีและรงควัตถุ	มัสตาร์ด เค้กและคุกกี้ ผักดอง ผักอบแห้ง
กำบังรสและกลิ่น		น้ำผักและผลไม้ นม ข้าวหุง
ปรับปรุงคุณภาพ		ลูกอม เนยแข็ง ซอสถั่วเหลือง ผลไม้และน้ำผลไม้ประเภทส้มและมะนาวบรรจุ กระป๋อง
ลดการระเหย	เอทานอล	สารกันบูด
เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์		
สุขอนามัย		
การทำอิมัลชัน	น้ำมันและไขมัน	ครีมสำหรับใบหน้า โลชั่น ยาสีฟัน
ความเสถียร	กลิ่นรสและกลิ่นหอม	น้ำหอม
เคมีภัณฑ์เกษตร		
ความเสถียร	Pyrolnitrin และ pyrethroids	ยาฆ่าเชื้อรา และยาฆ่าแมลง
ลดการระเหย	ฟอสเฟตอินทรีย์ (DDVP) Thiocarbamic acid	ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช
ลดความเป็นพิษ	2-amino-4-methyl- phosphynobutyric acid	ยาฆ่าเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จาก cyclodextrins ในอุตสาหกรรม (ต่อ)

ประเภทของอุตสาหกรรม	ปัจจัยหลัก	ผลิตภัณฑ์สุดท้าย
ยาและผลิตภัณฑ์ยา		
ปรับปรุงการละลาย		prostaglandin, steroids, cardiac, glycosides, non-steroidal anti-inflammatory agents, barbiturates, phenotoin
ความเสถียรทางเคมี		sulfonamides, sulfonyleureas, benzodiazepines
ไฮโดรไลซิส		prostacyclin, cardiac glycosides
ออกซิเดชัน		aspirin, atropine, procain
โฟโตไลซิส		aldehydes, epinephrine, phenothiazines
ดีไฮเดรชัน		phonothiazines, ubiquinones vitamins prostaglandin E, ONO-802
ปรับปรุง bioavailability		aspirin, phenytoin, digoxine, indomethacin acetoexamide, barbiturates, piroxicam non-steroidal anti-inflammatories
การทำเป็นผง		ONO-802, cloibrate, benzaldehyde, nitroglycerine, vitamin K ₁ , K ₂ , methylsalicylate
ลดการระเหย		Iodine, naphthalene, <i>d</i> -camphor <i>l</i> -menthol, methylcinnamate
ปรับปรุงรสชาติและกลิ่น		phostaglandins, alkylparabens
การลดความเป็นพิษ – รบกวนในท้อง		nonsteroidal antiinflammatory agents
ลดการสลายเม็ดเลือด		phenothiazines, flufenamic acid benzylalcohol,
แดง		antibiotics

ที่มา : สาโรจน์ (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า cyclodextrins จะมีศักยภาพสูงและสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างหลากหลาย แต่เนื่องจากยังมีข้อจำกัดทางด้านต้นทุนในการผลิตสูง จึงทำให้นักวิจัยจำนวนมากพยายามที่จะหาวิธีในการลดต้นทุนการผลิต เช่น การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต cyclodextrins ได้สูง การตัดแปรเอนไซม์โดยใช้กระบวนการทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) หรือ วิศวกรรมโปรตีน (Protein engineering) เพื่อเพิ่มผลได้ (yield) ของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการผลิต cyclodextrins ที่จำเพาะต่อประเภทที่ต้องการ หรือพัฒนาเอนไซม์ CGTase ให้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช และอุณหภูมิสูงได้

2.2 แป้ง (Starch)

2.2.1 แป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน (C:H:O) ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของแอลฟา-ดี-กลูโคส (α -D-glucose) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสเป็นหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่า ปลายรีดิวซ์ (reducing end group) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคสสองชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และ พอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพกทิน) วางตัวในแนวรัศมี (สุลีสพร, 2550)

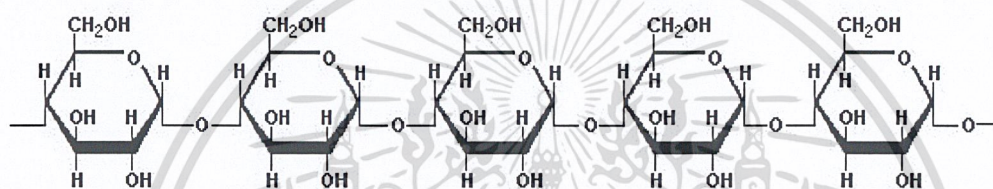
องค์ประกอบหลักภายในเม็ดแป้ง

องค์ประกอบหลักภายในเม็ดแป้งมี 2 ส่วน ได้แก่ อะไมโลส (amylose) ที่มีอยู่ร้อยละ 15 - 30 ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเกาะเกี่ยวกันเป็นสายโซ่ยาว และ อะไมโลเพกทิน (amylopectin) ที่มีอยู่ร้อยละ 70 - 85 ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสมาเกาะเกี่ยวกันในรูปที่มีกิ่งก้านที่แตกแขนงออกไปคล้ายกิ่งไม้ โดยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glucosidic linkage) และพอลิเมอร์ของอะไมโลสและอะไมโลเพกทินจะเกาะเกี่ยวกันอย่างแน่นหนาด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) (จารียา และนันท์จารี, 2552)

1) อะไมโลส (Amylose)

อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4 glycosidic bond) ดังรูปที่ 2.9 แป้งจากธัญพืช เช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งข้าวฟ่าง จะมีปริมาณอะไมโลสสูงประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์ เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้งจากหัวและราก เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง แป้งสาธู มีปริมาณอะไมโลสต่ำประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ แป้งข้าวเหนียว (Waxy starch) ไม่มีอะไมโลสเลย แป้งมันฝรั่งและแป้งมันสำปะหลัง มีขนาดโมเลกุลของอะไมโลสอยู่ในช่วง 1000 ถึง 6000 สูงกว่าแป้งข้าวจ้าวและแป้งสาลีซึ่งมีขนาดโมเลกุลของอะไมโลส อยู่ในช่วง 200 ถึง 1200 โดยแป้งที่มีโมเลกุลของอะไมโลสยาวขึ้นมีแนวโน้มที่จะเกิดการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของอะไมโลส

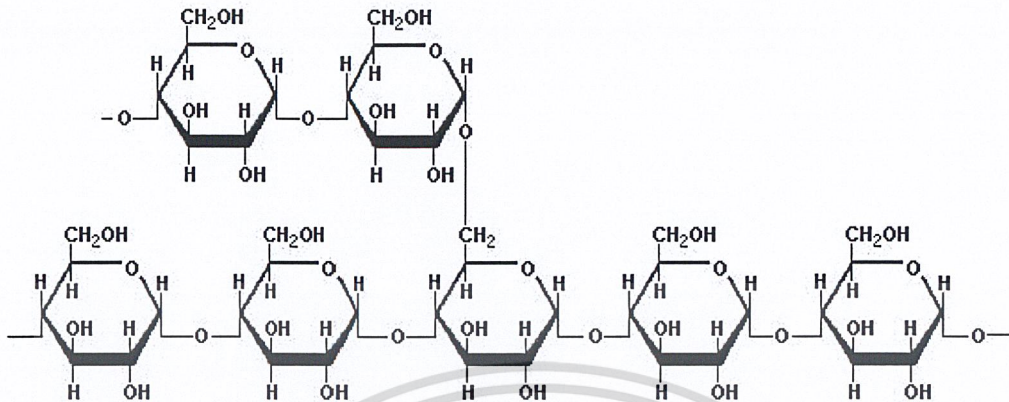
ที่มา : <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html> (25/04/54)

อะไมโลสสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ ไอโอดีน และสารประกอบอินทรีย์ อื่นๆ ได้ เช่น บิวทานอล กรดไขมัน สารลดแรงตึงผิว ฟีนอล และไฮโดรคาร์บอน สายพอลิเมอร์ของอะไมโลสจะพันเกลียวล้อมรอบสารประกอบอินทรีย์ โดยที่สารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้จะไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ อะไมโลสที่รวมตัวกับไอโอดีนแล้วจะให้สีน้ำเงินซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่บ่งบอกถึงแป้งที่มีอะไมโลสเป็นองค์ประกอบ

2) อะไมโลเพคติน (Amylopectin)

อะไมโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส โดยส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4 glycosidic bond) และส่วนที่เป็นกิ่งจะเป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้น ที่มีขนาดโมเลกุล (DP) อยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,6 (α -1,6 glycosidic bond) (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2550) ดังรูปที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของอะไมโลเพคติน

ที่มา : <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html> (25/04/54)

หน่วยกลูโคสที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,6 (α -1,6 glycosidic bond) 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณหน่วยกลูโคสในอะไมโลเพคตินทั้งหมด ขนาดโมเลกุลของอะไมโลเพคตินในแป้งแต่ละชนิดจะมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วย อะไมโลเพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1000 เท่าของอะไมโลส คือ ประมาณ 10^7 ถึง 10^8 ดาลตัน และมีอัตราในการคืนตัวต่ำ เนื่องจากอะไมโลเพคตินมีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่ง (กล้านรงค์ และเกลือกลู, 2550)

2.2.2 แป้งมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง

ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Manihot esculenta* (L.) Crantz.

วงศ์ (Family) Euphorbiaceae

สกุล (Genus) *Manihot*

ชนิด (Species) *Esculenta*

มันสำปะหลังมีชื่อเรียกสามัญหลายชื่อตามภาษาต่างๆ เช่น ภาษาอังกฤษเรียกว่า แคสซาวา (Cassava) หรือทาพิโอกา (Tapioca) ประเทศแถบทวีปอเมริกาใต้เรียกว่า ยูคา (Yuca) แมนดิโอคา (Mandioca) ประเทศแถบทวีปแอฟริกาเรียกว่า แมนนิออก (Manioc)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นมีลักษณะคล้ายข้อ เพราะเกิดจากก้านใบแก่ร่วงหล่นไป สีของลำต้นบริเวณใกล้ยอดจะมีสีเขียว ส่วนที่ต่ำลงมาจะมีสีแตกต่างกันไปตามลักษณะของพันธุ์ เช่น สีเงิน สีเหลือง สีน้ำตาล ใบมีสีเขียวมีก้านใบยาวติดกับลำต้น แผ่นใบเว้าเป็นแฉกมี 3-9 แฉก มันสำปะหลังมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน แต่อยู่แยกคนละดอก ดอกตัวผู้มีขนาดเล็กอยู่บริเวณส่วนปลายของช่อดอก ส่วนดอกตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าอยู่บริเวณส่วนโคนของช่อดอก ดอกตัวเมียจะบานก่อนดอกตัวผู้ ประมาณ 1 สัปดาห์ การผสมเกสรจึงเป็นการผสมข้ามระหว่างต้น หลังจากปลูกแล้วประมาณ 2 เดือน รากจะเริ่มสะสมแป้งและมีขนาดใหญ่ขึ้นตามอายุเรียกว่า หัว (รูปที่ 2.11) จำนวนหัว รูปร่าง ขนาด และน้ำหนักแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ส่วนต่างๆของมันสำปะหลังมีกรดไฮโรไซยานิก (HCN) ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ ใบและเปลือกมีสารนี้มากกว่าเนื้อสด และพันธุ์ต่างๆ ก็มีปริมาณสารนี้แตกต่างกันออกไป หัวมันสำปะหลังสดมีน้ำอยู่ประมาณ 60-65 เปอร์เซ็นต์ มีแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตประมาณ 20-35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาทำแห้งให้มีความชื้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีคาร์โบไฮเดรต 70 เปอร์เซ็นต์ จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในครัวเรือนเพื่อการบริโภคเป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ และใช้แปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ตลอดจนใช้ในอุตสาหกรรมแป้งแปรรูป (modified starch) และอุตสาหกรรมอื่นๆ (ศุภวรรณ, 2551)



รูปที่ 2.11 หัวมันสำปะหลัง

ที่มา : http://www.rd1677.com/rd_chainat/top_chainat.php?id=66523 (25/04/54)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) เป็นแป้งที่เก็บสะสมอยู่ในหัว มีปริมาณแป้งสะสมอยู่ประมาณ 14-28 เปอร์เซ็นต์ เป็นพืชเพาะปลูกเพื่อการบริโภคที่สำคัญในบริเวณประเทศเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนของโลก (สมพงษ์, 2543) แป้งมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาว ซึ่งลักษณะเด่นของแป้งมันสำปะหลัง คือ มีความบริสุทธิ์สูง มีสิ่งปนเปื้อนต่ำ โดยจะมีสตาร์ชอยู่มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโปรตีนและไขมันอยู่ค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์) มีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 0.04 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเม็ดแป้งมีลักษณะรูปร่างเป็นเม็ดกลมหรือรูปไข่ และอาจมีรอยบุ๋มที่ปลายด้านหนึ่งของเม็ด เม็ดแป้งโดยส่วนใหญ่จะมีขนาดปานกลาง คือ อยู่ในช่วง 3-40 ไมครอน มีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 12-15 ไมครอน และมีค่า degree of polymerization (DP) ตั้งแต่ 1,100-3,220 (ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการวัดขนาด) ลักษณะโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งเมื่อตรวจดูด้วย X-ray diffractometer (XRD) จะมีทั้งที่เป็นแบบ A และแบบ C ที่ใกล้เคียงกับแบบ A (C_A) (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2550)

แป้งมันสำปะหลังจัดเป็นแป้งที่มีปริมาณอะไมโลสค่อนข้างต่ำ คือ 18-23 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 จึงทำให้มีกำลังการพองตัว และมีค่าความสามารถในการละลายน้ำสูง โดยค่ากำลังการพองตัวซึ่งวัดได้จากน้ำหนักของเม็ดแป้งที่พองตัวอย่างอิสระในน้ำค่อน้ำหนักแห้งของแป้ง จะมีค่าประมาณ 50 และการละลายได้ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ลักษณะการพองตัวของแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆจะเป็นแบบขั้นตอนเดียว (single stage swelling) อุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนซ์จะอยู่ในช่วง 58-70 องศาเซลเซียส พลังงานที่ใช้ในกระบวนการเจลาติไนซ์ชั้นประมาณ 14-17 จูลต่อกรัม โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) และเนื่องจากแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณอะไมโลสต่ำดังกล่าว จึงทำให้เกิดการจับกันของหมู่ไฮดรอกซิลของอะไมโลสในระหว่างเย็นตัวต่ำ (retrogradation) ดังนั้นแป้งมันสำปะหลังจึงเป็นแป้งที่เกิดการคืนตัวต่ำ และจะให้ลักษณะของแป้งเปียกที่ใส ไม่ทึบแสง เมื่อเทียบกับแป้งชนิดอื่น

ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณของอะไมโลสและอะไมโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิด

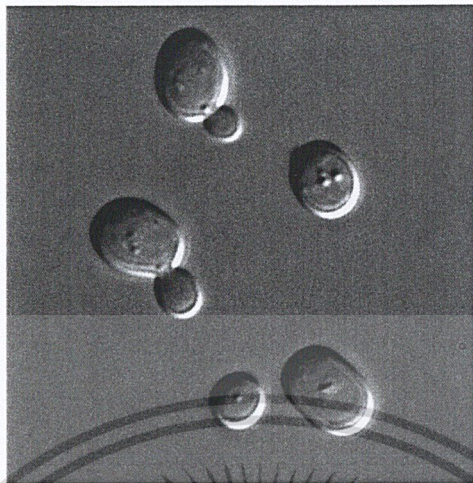
แป้ง	อะไมโลส (%น้ำหนักแห้ง)	อะไมโลเพกทิน (%น้ำหนักแห้ง)
มันฝรั่ง	21	79
มันเทศ	17.8	82.2
ข้าวโพด	28	72
ข้าวโพด (เหนียว)	0	100
ข้าวสาลี	28	72
ข้าวโอ๊ต	27	73
ข้าวบาร์เลย์	22	78
ข้าวบาร์เลย์ (เหนียว)	0	100
มันสำปะหลัง	17	83

ที่มา : กล้าณรงค์ และเกื้อกุล (2550) และ สมพงษ์ (2543)

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการงานวิจัยนี้ คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ในกลุ่มของยีสต์แท้ (True yeasts) ที่จัดอยู่ในคลาส Ascomycetes แฟมิลี Saccharomycetaceae เซลล์มีลักษณะเป็นรูปร่างกลม รูปไข่ หรือยาวรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมโครเมตร อาจมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) แล้วจึงเกิดคอนจูเกชัน (conjugation) หรืออาจจะเกิดจากดิพลอยด์เซลล์ (diploid cell) เมื่อทำหน้าที่เป็น vegetative stage โดยแอสโคสปอร์จะมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ตามปกติจะมี 4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส (ascus) สามารถหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ เช่น เอทิลแอลกอฮอล์ ยกเว้นน้ำตาลเล็กโตส ไม่สามารถใช้ในเตรทได้ *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร การผลิตแอลกอฮอล์และไวน์ คือ ใช้เป็นยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) ยีสต์สำหรับผลิตเบียร์ (Brewer's yeast) และจัดเป็นยีสต์หมักลอยผิว (Top-fermenting yeast) เนื่องจากเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้ว เชื้อยีสต์จะลอยตัวอยู่ที่ผิวหน้าของของเหลว (สาวิตรี, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg (25/04/54)

2.4 เอนไซม์อะไมเลส (enzyme amylase)

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ประเภท extracellular enzyme ที่สามารถย่อยแป้งได้ (ดังรูปที่ 2.13) พบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด เอนไซม์นี้แบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) Endoamylase ย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α -1,4 glycosidic linkage ถ้าย่อยไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโตส และเดกซ์ทริน แต่ถ้าเกิดการย่อยได้อย่างสมบูรณ์จะได้เป็นมอลโตสและกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ α -amylase หรือ amylo (1-4) dextrinase เอนไซม์นี้พบได้ทั้งในสัตว์ พืช จุลินทรีย์ สำหรับจุลินทรีย์ที่สร้าง เช่น *Bacillus subtilis* *Aspergillus oryzae* เป็นต้น

2) Exoamylase ย่อยแป้งจากปลายอนริคิวัชเข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ β -amylase และ glucoamylase สำหรับเอนไซม์ β -amylase หรือ amylo (1-4) maltosidase จะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α -1,4 glycosidic linkage เข้าไปที่ละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะที่ต่อแบบ α -D (1-6) linkage ได้ ผลที่ได้จากการย่อยจึงเป็นน้ำตาลมอลโตส และลิมิตเดกซ์ทรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย เอนไซม์นี้พบมากในพืช รัชูพืช และมันเทศ จุลินทรีย์ที่สร้างส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย เช่น *B. Cereus*, *B. megaterium* ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลส หรือ γ -amylase หรือ amylo (1-4,1-6) glucosidase หรือ α -D (1-4) glucan glycohydrolase สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรโฟบิกคลัสเตอร์ (Hydrophobic cluster) ปัจจุบันพบเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทนความร้อน ประมาณ 10 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์จากแบคทีเรีย *Dictyoglomus thermophilum*, *Methanococcus jamnanschili*, *Pyrococcus furiosus* และ *Pyrococcus horikoshii* ที่มีโครงสร้างปฐมภูมิต่างจาก เอนไซม์ในสกุล 13 โดยขาดบริเวณอนุรักษ์ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสกุล 13 เอนไซม์เหล่านี้จึงถูก จำกัดไว้ในสกุล 57 (เปี่ยมสุข, 2551)

2.4.2 ผลที่เกิดจากเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้ง

แป้งเป็นสารคาร์โบไฮเดรตพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยอะไมโลส (amylose) และ อะไมโลเพกทิน (amylopectin) อะไมโลสจะประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสต่อกันเป็นโซ่ยาวด้วย พันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4 glycosidic linkage) ไม่มีการแตกแขนง ประกอบด้วย กลูโคสประมาณ 1,100-4,000 โมเลกุล มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำแต่จะกระจายอยู่ในน้ำในลักษณะที่เป็นไมเซลล์ (micelle) และให้สีน้ำเงินกับสารละลายไอโอดีน ส่วนอะไมโลเพกทินเกิดจากกลูโคส ต่อกันด้วยพันธะ α -1,4 glycosidic linkage ที่มีการแตกแขนงทุกๆ 25 หน่วยของกลูโคส ซึ่งตรง ตำแหน่งที่แตกแขนงนี้จะต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 glycosidic linkage นอกจากนี้ก็ยังมีพันธะ α -1,3 glycosidic linkage ด้วยเช่นกัน อะไมโลสมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก เมื่อละลายน้ำอยู่ใน รูปสารละลายคอลลอยด์ และให้สีน้ำตาลหรือม่วงแดงกับไอโอดีน

เมื่อแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่อไปนี้

1. มีความเป็นรีดิวิซสูงขึ้น
2. การให้สีของสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป
3. ความหนืดลดลง
4. ความสามารถในการเบี่ยงเบนแสง (optical rotation) ลดลง (ดวงพร, 2530)

2.5 โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)

2.5.1 ความรู้ทั่วไป

โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณ เพื่อกำจัดสารที่ปนเปื้อนมากับสารละลายตัวอย่าง โดยสามารถแยกสารออกจากสารละลายตัวอย่างที่ซับซ้อนได้ ดังนั้น โครมาโตกราฟีจึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในสาขาต่างๆ เช่น เคมี ชีวเคมี การเกษตร เกษตรกรรม อุตสาหกรรม การแพทย์ วิศวกรรมเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโตกราฟีใช้ครั้งแรกโดยนักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซียชื่อ ไมเคิล ชวิตต์ (Mikhail Tswett) ในปี ค.ศ. 1903 ซึ่งใช้ในการแยกรงควัตถุในพืช โครมาโตกราฟี (chromatography) เป็นคำที่มาจากภาษากรีก คือ chromato แปลว่า สี และ graphy แปลว่า เขียนหรือบันทึก โดยไมเคิล ชวิตต์ ได้ให้คำจำกัดความของโครมาโตกราฟีว่า เป็นการแยกองค์ประกอบของผสมบนสารดูดซับที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่งอยู่ในระบบที่มีการเคลื่อนที่

โครมาโตกราฟีสามารถจำแนกได้ตามพื้นฐานของการแยก หรือ อาศัยลักษณะปรากฏทางกายภาพ โดยการจำแนกตามพื้นฐานของการแยก ได้แก่ แอดซอร์บโครมาโตกราฟี-นอร์มอลเฟสโครมาโตกราฟี (adsorption chromatography-normal phase chromatography) รีเวอร์สเฟสโครมาโตกราฟี (reverse-phase chromatography) เป็นต้น ส่วนการจำแนกโดยอาศัยลักษณะปรากฏทางกายภาพ ได้แก่ โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography ; PC) โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography ; HPLC) เป็นต้น (พัฒนา, 2547 และศุภลักษณ์, 2552)

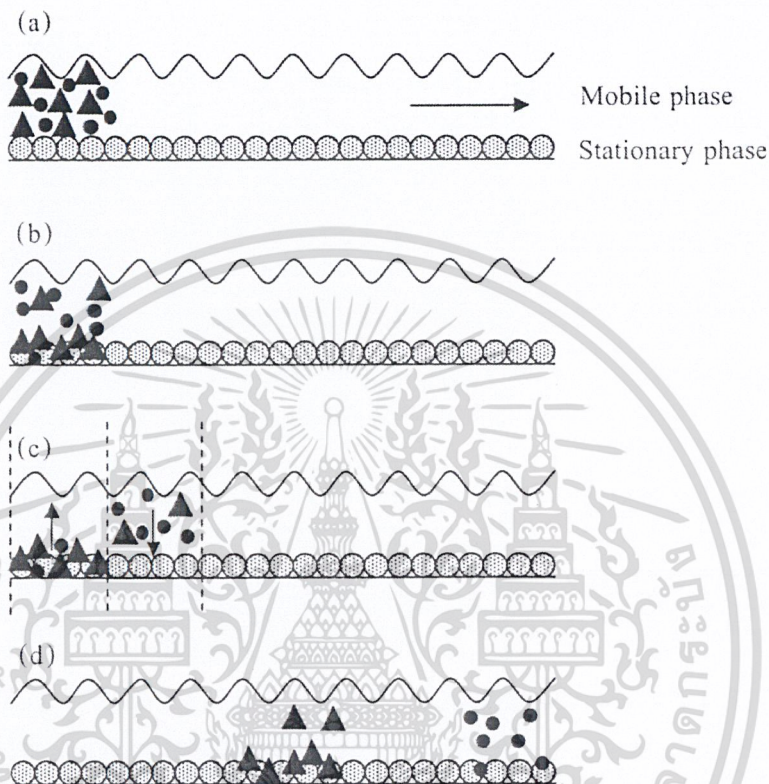
โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) หรือ HPLC เป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีที่ประยุกต์ทฤษฎีของโครมาโตกราฟีของเหลว (liquid chromatography; LC) ใช้ในการแยกสารและวิเคราะห์ส่วนประกอบ (component) ที่ซับซ้อนได้ โดยเฟสอยู่กับที่หรือเฟสอยู่นิ่ง (stationary phase) จะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่เคลือบบนของแข็งที่มีขนาดเล็กมาก (3-10 ไมโครเมตร) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) ส่วนเฟสเคลื่อนที่ หรือ โมบายเฟส (mobile phase) จะเป็นของเหลว (พัฒนา, 2547 และศุภลักษณ์, 2552) HPLC เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เช่น เกษษกรรม ชีวภาพ และตัวอย่างด้านสิ่งแวดล้อม ฯลฯ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ง่ายต่อการใช้งาน และไม่มีข้อจำกัดใดๆในเรื่องของการระเหย หรือ ความเสถียรของสารละลายตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (ณัฐกานต์ และคณะ, 2553)

2.5.2 ทฤษฎีและหลักการ

การแยกสารในโครมาโตกราฟีจะอาศัยการกระจายตัวที่แตกต่างกันของสารบนเฟสอยู่นิ่ง หรือ เฟสเคลื่อนที่ ถ้าสารชนิดหนึ่งชอบที่จะอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่ชอบอยู่กับเฟสอยู่นิ่ง กล่าวคือ สารตัวอย่างที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่จะไหลผ่านเฟสอยู่นิ่งภายในคอลัมน์ โดยอาศัยปฏิกิริยาเป็นตัวขับเคลื่อน และจะเกิดการกระจายตัวของสารระหว่างเฟสอยู่นิ่งและเฟสเคลื่อนที่ได้ต่างกัน ดังนั้น สารที่ชอบหรือยึดติดกับเฟสอยู่นิ่งอย่างแน่นก็จะเคลื่อนตัวไปกับการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้ช้า ในขณะที่สารอื่นที่ไม่ชอบหรือยึดติดกับเฟสอยู่นิ่งอย่างหลวมๆก็จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ทำให้เกิดการแยกของสาร โดยสารที่ถูกแยกภายในคอลัมน์จะถูกตรวจวัดโดยเครื่องตรวจวัดที่เหมาะสมซึ่งต่อกับคอลัมน์ (in-line detector) และ output ของเครื่องตรวจวัดจะเป็นสัญญาณไฟฟ้า และแสดงผลโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินทิเกรเตอร์ (integrator) หรือคอมพิวเตอร์ ซึ่งแสดงออกมาเป็นแถบ (band) หรือพีค (peak) ที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณได้ (พัฒนา, 2547 และศุภลักษณ์, 2552)



รูปที่ 2.14 ไดอะแกรมแสดงการแยกสารในโครมาโตกราฟี :

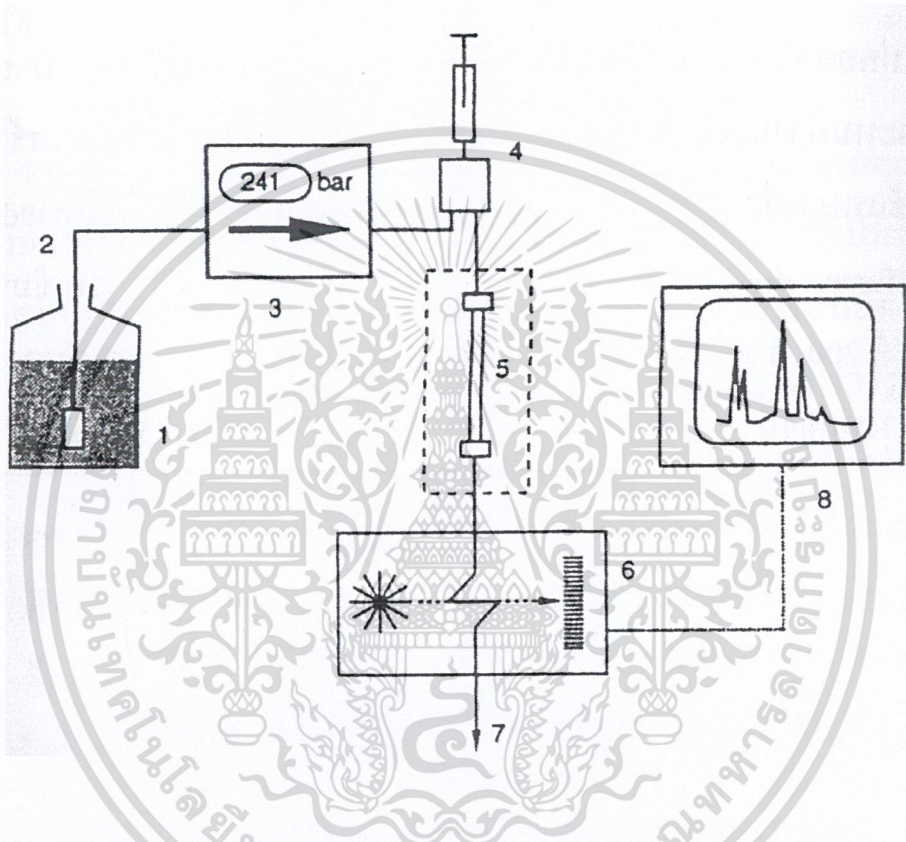
- ใส่สารละลายซึ่งมีสาร 2 ชนิด คือ ▲ และ ● ลงในคอลัมน์
- สารชนิด ▲ ชอบที่จะอยู่กับเฟสอยู่นิ่ง และสารชนิด ● จะอยู่ในเฟสเคลื่อนที่มากกว่า
- เมื่อมีตัวระใหม่เข้าไปจะเกิดสมดุลใหม่ขึ้นภายในคอลัมน์ โดยโมเลกุลของสารในเฟสเคลื่อนที่อาจถูกจับโดยเฟสอยู่นิ่ง ในขณะที่โมเลกุลของสารที่ถูกดูดซับอยู่แล้วจะกลับเข้ามาอยู่ในเฟสเคลื่อนที่แทน
- จะเกิดกระบวนการนี้ซ้ำไปเรื่อยๆ จนกระทั่งสารทั้งสองแยกออกจากกัน โดยสารประกอบ (●) ซึ่งชอบอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในขณะที่สารประกอบ (▲) ชอบอยู่กับเฟสอยู่นิ่งจะออกมาช้ากว่า

ที่มา : ศุภลักษณ์ (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ ดังนี้
(รูปที่ 2.15)



รูปที่ 2.15 ไลออะแกรมของเครื่อง HPLC : 1 = ภาชนะใส่เฟสเคลื่อนที่, 2 = ท่อส่งเฟสเคลื่อนที่พร้อม frit, 3 = ปั๊ม, 4 = ส่วนฉีดสาร, 5 = คอลัมน์ (พร้อมเครื่องควบคุมอุณหภูมิ), 6 = เครื่องตรวจวัด, 7 = น้ำทิ้ง, 8 = ส่วนแสดงผล

ที่มา : ศุภลักษณ์ (2552)

- 1) ภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) อาจเป็นขวดแก้ว หรือขวดพลาสติก ฯลฯ
- 2) เครื่องกำจัดฟองอากาศ (degasser) เป็นอุปกรณ์ในการกำจัดฟองอากาศในสารละลายก่อนเข้าสู่เครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3) ท่อส่งเฟสเคลื่อนที่พร้อมตัวกรอง
- 4) ปั๊มความดันสูง (pump) เป็นอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่ส่งให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านไปในเครื่อง HPLC ด้วยอัตราเร็วที่เหมาะสม ซึ่งปั๊มที่ใช้ในระบบนี้จะต้องทำจากวัสดุที่ทนต่อสารเคมีและการกัดกร่อนได้ดี เช่น เหล็กกล้าไร้สนิม โดยปั๊มที่ใช้ใน HPLC มี 2 ประเภท คือ
 - 4.1) ปั๊มที่ให้ความดันคงที่ หรือ ปั๊มลม (constant pressure pumps or pneumatic pumps) และ
 - 4.2) ปั๊มที่ให้ปริมาตรคงที่ หรือ อัตราการไหลคงที่ (constant volume pumps or constant flow pumps)
- 5) ส่วนฉีดสาร (injection port หรือ injector) เป็นตำแหน่งสำหรับฉีดสารตัวอย่างเข้าไป โดยอินเจกเตอร์ที่ใช้ในระบบของ HPLC มีอยู่ 2 แบบด้วยกัน คือ
 - 5.1) แบบออนคอลัมน์อินเจกชัน (on-column injection) และ
 - 5.2) แบบอินเจกชันวาล์ว (injection valves)
- 6) คอลัมน์ (column) เป็นส่วนที่บรรจุเฟสอยู่หนึ่ง ซึ่งจะเกิดการแยกสารโดยโครมาโตกราฟี คอลัมน์มี 2 ชนิด คือ
 - 6.1) คอลัมน์วิเคราะห์ (Analytical column) มีความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 4-10 มิลลิเมตร วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น สแตนเลส (stainless steel), โพลีเอทิลีน (polyethylene), แก้ว และ โพลีเอเทอร์คีโตน (polyetherketone:PEEK) เป็นต้น สำหรับส่วนที่เป็นวัสดุที่บรรจุอยู่ภายใน ได้แก่ ซิลิกาเจลเรซิน (silica based resins gels bonded phases) เป็นต้น
 - 6.2) การ์ดคอลัมน์ (Guard column) นิยมต่อระหว่างส่วนฉีดตัวอย่าง (injector) และส่วนของคอลัมน์วิเคราะห์ ซึ่งจะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับสารตัวอย่างรวมทั้งตัวทำละลาย เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์วิเคราะห์ส่วนวัสดุที่บรรจุในการ์ดคอลัมน์จะคล้ายคลึงกับคอลัมน์วิเคราะห์
- 7) เตาอบ (oven) หรือ เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) ทำหน้าที่ในการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ ซึ่งในเครื่อง HPLC อาจมีหรือไม่มีก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากการแยกสารละลายตัวอย่างด้วย HPLC ไม่ค่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิห้อง

- 8) เครื่องตรวจวัด (Detector) ทำหน้าที่ ติดตามสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ โดยสัญญาณของเครื่องตรวจวัดจะเป็นสัญญาณไฟฟ้า เครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ในระบบ HPLC เช่น

8.1) เครื่องตรวจวัดแบบยูวี-วิสิเบิล (UV-VIS detector) เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดใน HPLC จุดเด่นของเครื่องตรวจวัดแบบนี้ คือ มีความไวค่อนข้างสูง ช่วงเส้นตรงจะกว้าง การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มีผลต่อความไว และสามารถใช้ในการระเหยแบบเกรเดียนต์ได้ โดยสามารถใช้กับสารละลายตัวอย่างที่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงได้ในช่วง 190 ถึง 900 นาโนเมตร

8.2) เครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence detector) เป็นเครื่องตรวจวัดที่มีความไวสูงและเฉพาะ เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ที่ได้ออกมาจากตัวอย่างที่ถูกกระตุ้น (excited) ด้วยคลื่นแสงยูวี โดยที่คลื่นแสงยูวีจากแหล่งกำเนิดแสง (หลอดซินอน หรือคิวที เรียม) จะไปตกกระทบที่ flow cell คลื่นแสงที่ปล่อยออกจากตัวอย่างจะกระจายไปทุกทิศทาง แต่จะถูกตรวจวัดที่มุม 90 องศา เทียบกับลำแสงที่ตกกระทบ การตรวจวัดจะต้องเลือกความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นที่ปล่อย (emission wavelength) ให้เหมาะสมตามชนิดของสารที่จะตรวจวัด ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะผ่านไปยังฟิวเตอร์ตัดแสงที่ไม่ต้องการออก

8.3) เครื่องตรวจวัดแบบดรรชนีหักเหแสง (Refractive index detector ; RI detector) จัดเป็นเครื่องตรวจวัดแบบไม่เฉพาะ โดยเครื่องตรวจวัดแบบ RI จะอาศัยความแตกต่างของค่าดรรชนีหักเหของสาร และสารอ้างอิง ซึ่งหมายถึงเฟสเคลื่อนที่นั่นเอง ค่าดรรชนีหักเหของแถบที่มีสารที่ถูกชะออกมาจะมีค่าแตกต่างจากเฟสเคลื่อนที่บริสุทธิ์ ซึ่งสัญญาณของเครื่องวัดจะเข้มมากถ้าความแตกต่างของค่าดรรชนีหักเหของสาร และเฟสเคลื่อนที่มีมาก

- 9) ส่วนบันทึกและประมวลผล (Integrator) โครมาโตแกรมที่ได้จากสัญญาณเครื่องตรวจวัด สามารถนำมาจำแนกชนิดของสารได้โดยการวัดเวลาชะ (retention

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

time) นอกจากนี้ ความสูงของพีค (peak height) หรือพื้นที่ใต้พีค (peak area) ที่ได้ จากสัญญาณเครื่องตรวจวัด สามารถใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ปริมาณของ องค์ประกอบของสารละลายตัวอย่างได้ โดยนำมาคำนวณเปรียบเทียบกับ สารละลายมาตรฐาน

10) ข้อต่อโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC fittings)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สมพงษ์ นิลมณี (2543) ทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง โดยนำแป้งที่มี ความเข้มข้น 2.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (CGTase) (500 หน่วยต่อกรัมแป้ง) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ได้ผลผลิตรวม ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และสัดส่วนของ $\alpha : \beta : \gamma$ -cyclodextrins เป็น 1.0 : 2.8 : 1.7 ส่วนสภาวะ ที่เหมาะสมในการผลิต α - และ β -cyclodextrins ให้ได้ผลผลิตสูง คือ การใช้แป้งความเข้มข้น 2.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ บ่มกับเอนไซม์ CGTase (1250 หน่วยต่อกรัมแป้ง) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้ผลผลิตรวมประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และสัดส่วนของ $\alpha : \beta : \gamma$ -cyclodextrins เป็น 10.8 : 12.7 : 1.0 ในการเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิต cyclodextrins นั้นสามารถทำได้โดยใช้แป้งความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์ ย่อยด้วยเอนไซม์ พูลูลูนาส (96 หน่วยต่อกรัมแป้ง) นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (0.0024 หน่วยต่อกรัมแป้ง) เป็นเวลา 20 นาที ในการศึกษาขนาดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อผลิต cyclodextrins พบว่า DP 9 ที่ได้จากการแยกขนาดแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ พูลูลูนาส (pullulanase) ให้ผลผลิตรวมสูงสุดและให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β -cyclodextrins ส่วน DP 7 จะให้ผลิตภัณฑ์ α -cyclodextrins มากกว่า β -cyclodextrins จากการศึกษาการเพิ่ม ผลิตภัณฑ์พบว่าสัดส่วนของ $\alpha : \beta : \gamma$ -cyclodextrins ขึ้นกับ complexant ที่เติม ปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการบ่ม นอกจากนี้การผลิต cyclodextrins โดยใช้ 2-butanol (20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร ต่อปริมาตร) จะให้ผลผลิต β -cyclodextrins สูงสุด เมื่อต้องการการผลิต γ -cyclodextrins ในสัดส่วนที่สูงจะต้องบ่มแป้งกับเอนไซม์ CGTase (50 หน่วยต่อกรัมแป้ง) และเอทานอล (20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร)

Kim และคณะ (1997) ศึกษาการผลิต cyclodextrins โดยใช้แป้งข้าวโพดดิบที่ยังไม่ผ่าน กระบวนการ pretreatment เป็นสารตั้งต้น และนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงเกินไปร่วมกับ เอนไซม์ CGTase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการแจ้งลิขสิทธิ์ไว้แล้ว ไม่อนุญาตให้ผู้อื่นนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

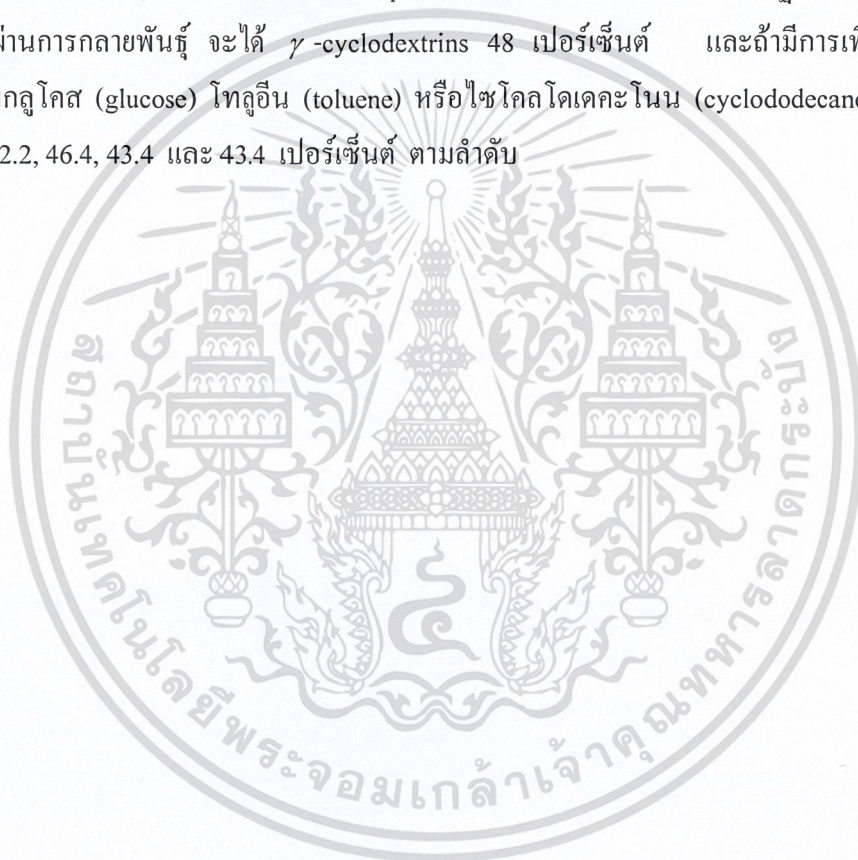
เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ CGTase ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Thermoaerobacter* sp. ข้อดีของการผลิต cyclodextrins ด้วยวิธีนี้ คือ cyclodextrins ที่ผลิตได้จะไม่เกิดการสลายตัว และเป็นการใช้เอนไซม์ CGTase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถกำจัดสารตั้งต้นที่เหลือได้ง่ายด้วยวิธีทางกายภาพ และสามารถนำสารตั้งต้นที่เหลือไปใช้สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆได้ อย่างไรก็ตาม การผลิต cyclodextrins ด้วยวิธีนี้ยังมีข้อดีอีกอย่างหนึ่ง คือ ไม่ต้องทำการ pretreatment สารตั้งต้นก่อน และเอนไซม์ที่ใช้มีประสิทธิภาพดี สภาวะที่ใช้ในการผลิต cyclodextrins มีดังนี้ สารตั้งต้น คือ แป้งข้าวโพด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 65 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารตั้งต้น คือ 7.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เอนไซม์ 22 หน่วยต่อแป้ง 1 กรัม สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็น cyclodextrins และมอลโตเดกซ์ทริน ได้ 27.9 และ 31.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คงเหลือสารตั้งต้นอยู่ 40.7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากกำจัดแป้งข้าวโพดที่เหลือออกโดยวิธีการปั่นเหวี่ยง จะได้ผลิตภัณฑ์ cyclodextrins สุทธิ 47 เปอร์เซ็นต์ โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ CGTase สามารถเปลี่ยนไปเป็น cyclodextrins ได้ 12.68 มิลลิกรัม

Charoenlap และคณะ (2004) ศึกษาการผลิต cyclodextrins จากแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางทางด้านอาหาร เกษษกรรม และอุตสาหกรรมกระดาษในการศึกษานี้ได้นำเอนไซม์ *Bacillus circulans* CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว 50-70 เปอร์เซ็นต์ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต cyclodextrins จากแป้งสาธูอยู่ในช่วง 4.5-5.0 และ 55-60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในการผลิต cyclodextrins ด้วยวิธีนี้พบว่า เกิดผลิตภัณฑ์เป็น β -cyclodextrins มากที่สุด ประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ของ cyclodextrins ทั้งหมด ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้เอนไซม์ CGTase ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมของการผลิต β -cyclodextrins ด้วยเอนไซม์ CGTase ต่อแป้งสาธู คือ 50 หน่วยต่อแป้งสาธู 1 กรัม และแป้งสาธู 60 กรัมต่อลิตร

Goh และคณะ (2007) ศึกษาเอนไซม์ H43T CGTase ที่ผ่านการทำการกลายพันธุ์ (mutant) สามารถผลิต γ -cyclodextrins ได้มากถึง 39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเอนไซม์ปกติที่สามารถผลิตได้ 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ผลของสภาวะและปฏิกิริยาในการผลิต γ -cyclodextrins จะศึกษาโดยใช้เอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการกลายพันธุ์ ผลของสารตั้งต้นที่ผสมกับบัพเฟอร์ แป้งที่ผ่านกระบวนการ pretreatment และความเข้มข้น พีเอช และสุดท้ายจะใช้เอนไซม์ในการตัดพันธะกิ่งเพื่อให้ได้อัตราส่วนของ γ -cyclodextrins มากขึ้น โดยแป้งมันสำปะหลังและอะซิเตทบัพเฟอร์จะให้ค่าคอนเวอร์ชัน (conversion) สูงที่สุด คือ 16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับแป้ง 4 ชนิดและบัพเฟอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 ชนิดที่ผสมรวมกัน การใช้แป้งที่ผ่านการเจลาติไนซ์จะให้เปอร์เซ็นต์การผลิต γ -cyclodextrins และค่าคอนเวอร์ชันมากกว่าแป้งมันสำปะหลังดิบ การใช้พีเอชที่ 8-9 จะทำให้สัดส่วนของ γ -cyclodextrins เพิ่มขึ้น โดยสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแป้งที่เพิ่มขึ้นด้วย เมื่อทำการเจลาติไนซ์แป้งมันสำปะหลัง 2.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิต γ -cyclodextrins ได้ 46 เปอร์เซ็นต์ และการใส่เอนไซม์พุลลูลานเนส (pullulanase) จะช่วยลดความหนืดของแป้งมันสำปะหลัง ดังนั้นจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ CGTase อย่างน้อยที่สุด 20-30 เท่า ถ้าใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการ pretreatment 4 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการกลายพันธุ์ จะได้ γ -cyclodextrins 48 เปอร์เซ็นต์ และถ้ามีการเพิ่มปฏิกิริยาด้วยการผสมกลูโคส (glucose) โทลูอีน (toluene) หรือไซโคลโดเดคาโนน (cyclododecanone) จะให้ผลได้เป็น 42.2, 46.4, 43.4 และ 43.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 เชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. นิสา ไกรรักษ์ ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

3.1.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Starch Soybean agar (SS medium) ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง และ แป้งถั่วเหลือง ร้อยละ 4 ตามลำดับ และวุ้น ร้อยละ 1.5

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MYS ประกอบด้วยเปปโตน ร้อยละ 5, มอลต์สกัด ร้อยละ 3, ยีสต์สกัด ร้อยละ 3, แป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 1 (อาหารแข็งใส่วุ้น ร้อยละ 1.5)

3.2 แป้ง (Starch)

แป้งมันสำปะหลัง ตราปลามังกร

แป้งถั่วเหลือง จากมูลนิธิโครงการหลวงดอยคำ

3.3 สารเคมี

3.3.1 เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase)

3.3.2 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, KOH)

3.3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)

3.3.4 สารมาตรฐานเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (Standard β -cyclodextrins)

3.3.5 อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยบูรพา การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 บรอมฟินอลบลู (Bromphenol blue)

- 3.3.8 โบรโมไทมอลบลู (Bromothymol blue)
- 3.3.9 ฟีนอล์ฟทาเลอิน (Phenolphthalein)
- 3.3.10 ไทมอลบลู (Thymol blue)
- 3.3.11 แลคโตฟีนอล คอตตอนบลู (Lactophenol cotton blue)
- 3.3.12 กลูโคส (Glucose)
- 3.3.13 มอลโตส (Maltose)
- 3.3.14 น้ำอัลตราเพียว (Ultrapure water)
- 3.3.15 สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)
- 3.3.16 สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)
- 3.3.17 สารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 (Phenol 5%)
- 3.3.18 กรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 95.5 (Conc. Sulfuric acid 95.5%)

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 ขวดดูแรนพร้อมฝาปิดขนาด 2,000 มิลลิลิตร
- 3.4.2 เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
- 3.4.3 เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)
- 3.4.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น ES-315 บริษัท Tomy
- 3.4.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.4.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัท Memmert
- 3.4.7 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 3.4.8 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000
- 3.4.9 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 221 S บริษัท Sartorius

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ก็ตาม กรุณาติดต่อฝ่ายขายของบริษัท Brindor อย่างอังกถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.10 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท Brindor

- 3.4.11 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3.4.12 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Mini Centrifuge) รุ่น C-1200 200v/50 Hz บริษัท National labnet
- 3.4.13 เครื่องเขย่าพร้อมควบคุมอุณหภูมิ (Orbital Incubator) รุ่น Gellen Kamp (500)
- 3.4.14 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น Helios alpha บริษัท Thermo scientific
- 3.4.15 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น Waters 2414 บริษัท Waters ประเทศ Ireland
- 3.4.16 กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Sartorius
- 3.4.17 แผ่นเมมเบรนไฟเบอร์ (Membrane Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Pall Gelman Laboratory

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การคัดแยกและการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์

นำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* รหัส SS02 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยตากลงบนจานอาหารแข็ง SS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีเดี่ยวที่มีขนาดใหญ่ มาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธีการเดียวกัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยการย้อมสีด้วยแลคโตฟีโนล คอตตอนบลู (lactophenol cotton blue) เมื่อได้ยีสต์ที่บริสุทธิ์แล้ว สังเกตลักษณะโคโลนีและศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ลงในหลอดอาหารแข็งเอียง (slant) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเก็บไว้เป็นเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป

3.5.2 ศึกษาการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ระยะเวลาต่างๆ

3.5.2.1 การย่อยแป้งมันสำปะหลัง

ละลายแป้งมันสำปะหลังในน้ำกลั่นความเข้มข้นร้อยละ 30 นำไปให้ความร้อนบนเครื่องกวนสาร เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมสารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไป ทำการย่อยต่อโดยควบคุมอุณหภูมิของสารละลายให้อยู่ในช่วง 65-70 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำแป้งปริมาตร 200 มิลลิลิตร เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อนำมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ออกกฎหมายให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส (ภาคผนวก ก)

3.5.2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble sugars) ด้วยวิธี Phenol – Sulfuric Method (Dubois และคณะ, 1956)

3.5.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1994)

3.5.2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography ; HPLC) (Goh, 2007)

3.5.3 การคัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถผลิต cyclodextrins ได้ เลือกลโคโลนีเดียวที่ได้จากการคัดแยก 24 โคลโลนี มาปลูกเป็นรอยเดี่ยวตามขวางลงบนจานอาหารแข็ง SS ที่ผสมอินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ และใช้น้ำแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ บรอมฟินอลบลู (พีเอช 3.0-4.6), โบรโมไทมอลบลู (พีเอช 6.0-7.6), ไทมอลบลู (พีเอช 8.0-9.6) และ ฟีนอล์ฟทาลีน (พีเอช 8.0-10.0) และไม่ผสมอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบรอยปลูก และเลือกรอยปลูกของยีสต์ที่สามารถผลิต cyclodextrins ได้ดีที่สุด โดยการหาอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) จากนั้นถ่ายเชื้อที่คัดเลือกลงในหลอดอาหารแข็งเอียง (slant) 3 หลอด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.4 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์

3.5.4.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum)

ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารแข็งเอียงที่ได้จากข้อ 3.5.3 แล้วใช้ลูป (loop) ขูดเชื้อที่เจริญอยู่ให้ผสมกับน้ำกลั่น จากนั้นเทส่วนผสมที่ได้ใส่ในพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วได้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น ขูดหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

3.5.4.2 การวิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง

ขูดหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตรร้อยละ 1 มาเลี้ยงในพลาสติกอาหารเหลว MY5 ที่มีน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และแป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเฉพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ

200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 8.00 และ 16.00 น. ในแต่ละวัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักไม่อาจรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แห้ง โดยดูดตัวอย่างใส่ลงในหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาส่วนนํ้าออก กำจัดแบคทีเรียที่ติดมากับตะกอนเซลล์ด้วยนํ้าร้อน 2-3 ครั้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดที่มีตะกอนเซลล์ใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) และชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง วิเคราะห์ผลโดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและเวลาในการเจริญเติบโต

3.5.4.3 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เตรียมสารละลายเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.5.4.2 เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์ผลโดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง ($OD_{660\text{nm}}$) และเวลาในการเจริญเติบโต

3.5.5 การวิเคราะห์ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.5.1 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่างส่วนนํ้าที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจากข้อที่ 3.5.4.2 มาวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins เทียบกับหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีดัดแปลงของ Gawande และ Parker (2001) โดยผสมตัวอย่างส่วนนํ้ากับบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 และฟีนอล์ฟทาลิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอัตราส่วน 2 : 7 : 1 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ลงในอ่างนํ้าแข็ง (ice bath) ทันที รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร ส่วนแบลนค์ (blank) จะใช้นํ้ากลั่นแทนตัวอย่างและทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เตรียมหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน โดยผสมสารละลายเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน (β -cyclodextrin) ความเข้มข้นร้อยละ 1 กับบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 และฟีนอล์ฟทาลิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอัตราส่วน 2 : 7 : 1 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ลงในอ่างนํ้าแข็ง (ice bath) ทันที รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร บันทึกผลและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.2 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins เทียบกับหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน โดยผสมตัวอย่างส่วนใสที่ใช้เป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน กับรีเอเจนต์ในอัตราส่วนเดียวกันกับการทดลองในข้อ 3.5.5.1 โดยควบคุมอุณหภูมิและเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

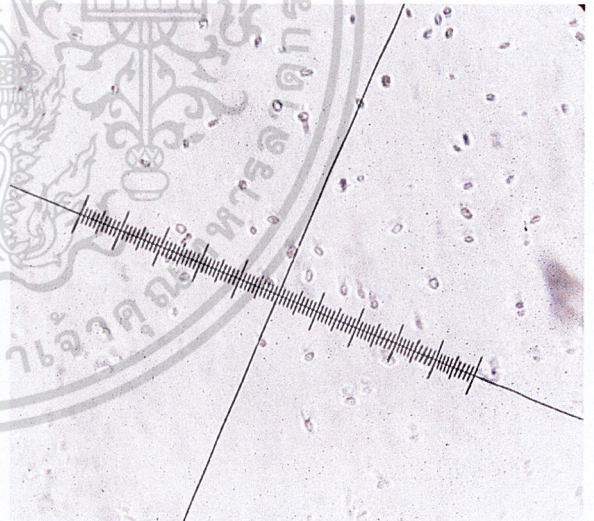
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกและการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์

นำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากหลอดอาหารวุ้นเอียงรหัส SS02 ที่ได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง SS ซึ่งประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังและแป้งถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหาร พบว่า มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น รูปร่างกลม โค้งนูน และเมื่อนำไปศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่า มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมรี ดังรูปที่ 4.1 จากนั้นจึงเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง SS เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



(a)



(b)

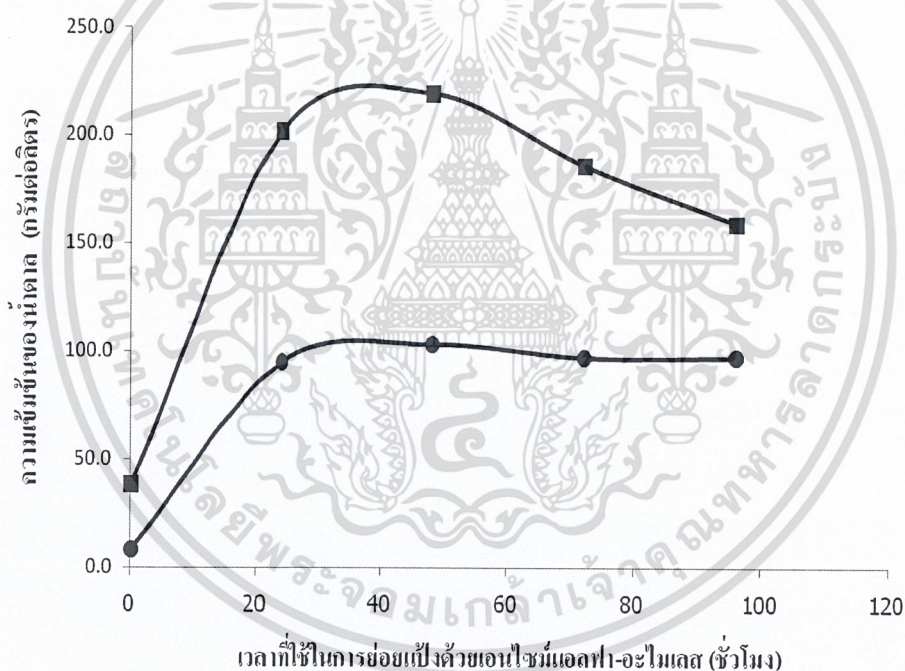
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการคัดแยกเชื้อในจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

(a) ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง SS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ (b) ลักษณะรูปร่างของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40X) โยชนด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ระยะเวลาต่างๆ

ทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ร้อยละ 1 โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 65-70 องศาเซลเซียส บนเครื่องกวนสารให้ความร้อน (magnetic stirrer) เก็บตัวอย่างน้ำแป้งที่ย่อยได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่าประกอบภายในน้ำแป้ง โดยนำตัวอย่างน้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1994) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เป็น Total soluble sugars ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric (Dubois และคณะ, 1956) ดังรูปที่ 4.2 และวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography ; HPLC) ดังรูปที่ 4.3



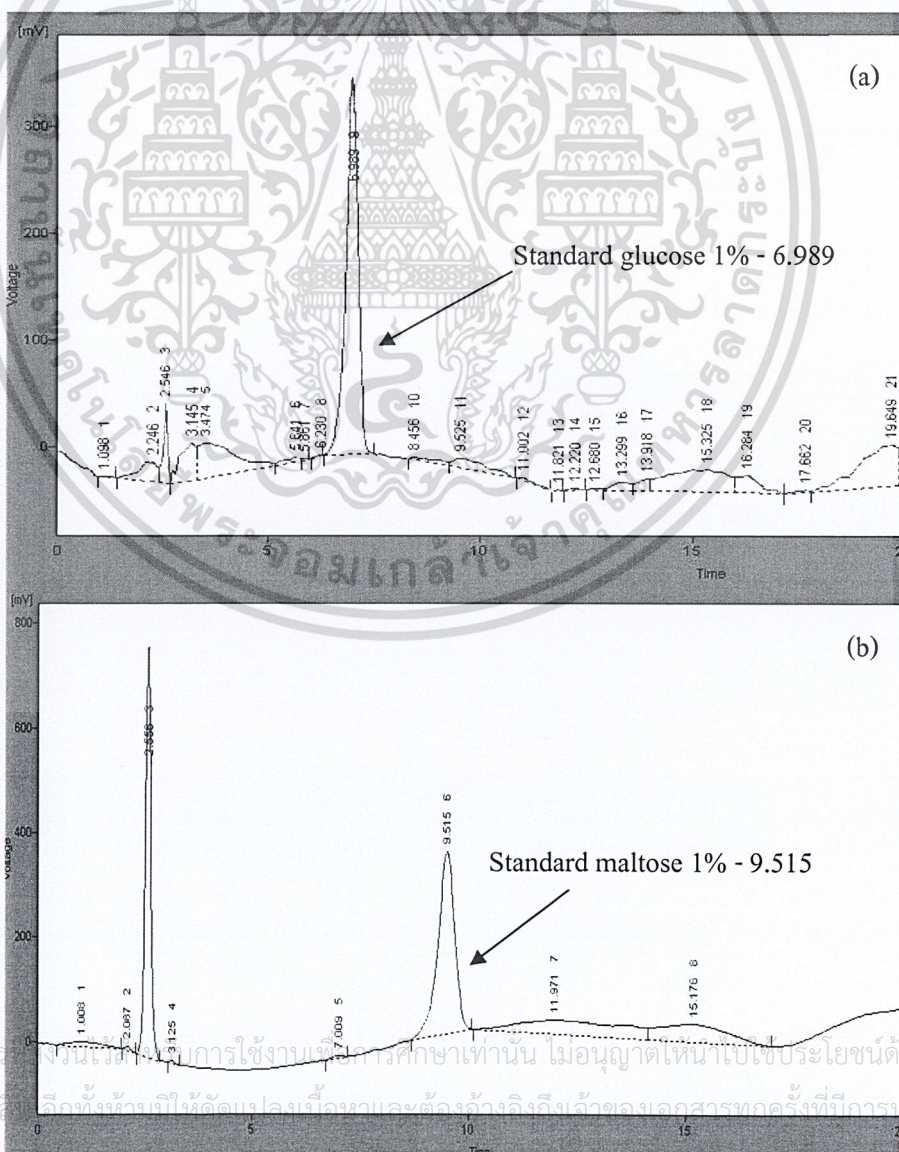
(●) Reducing sugar (g/l)

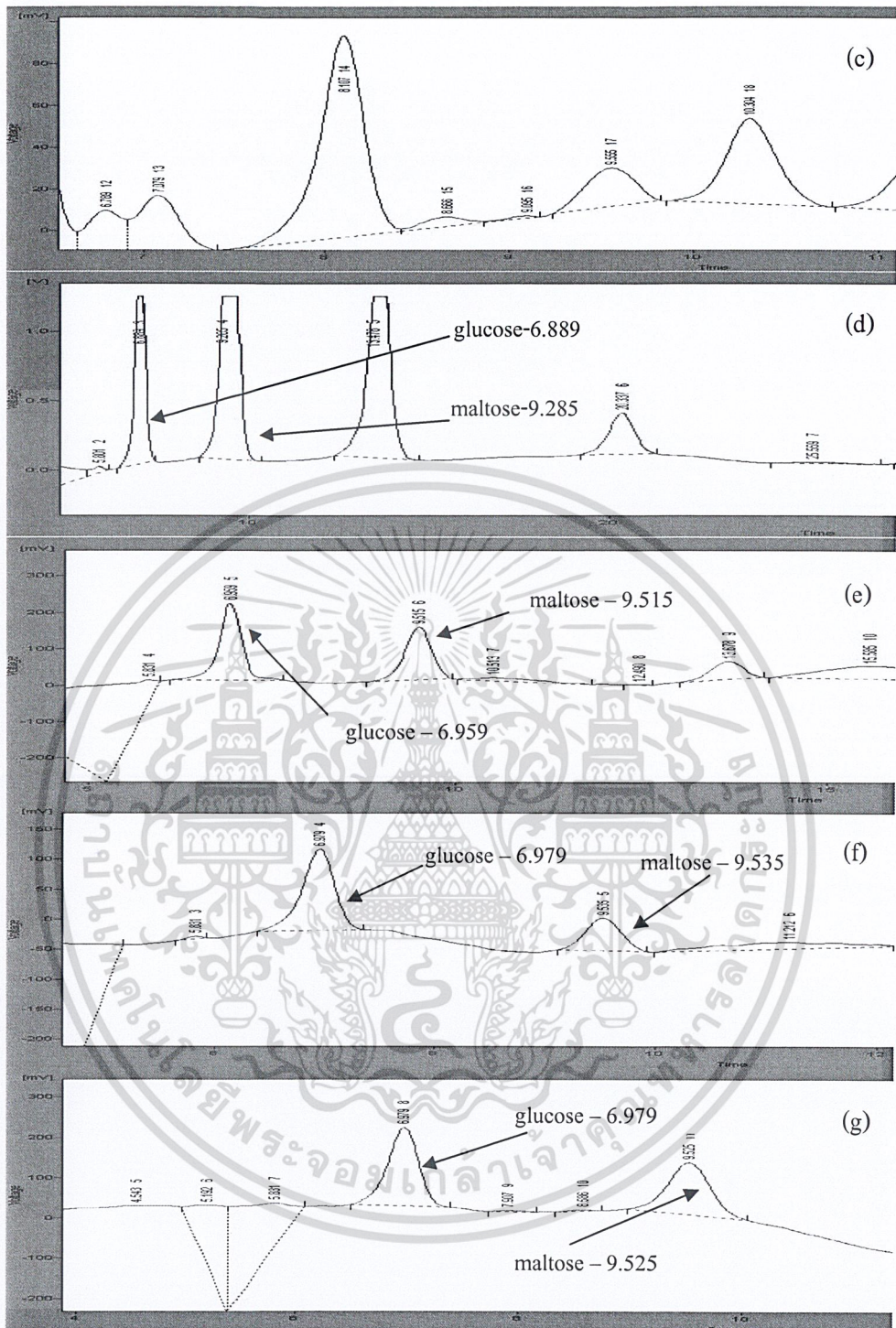
(■) Total soluble sugar (g/l)

รูปที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) และน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble sugars) จากการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า ในช่วงแรกของการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังตั้งแต่เวลาที่ 0 ชั่วโมง จนถึง 48 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) และน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble sugars) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าที่ 48 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดมากที่สุด คือ 103.1103 และ 219.1350 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาในการย่อยน้ำแป้งเพิ่มขึ้น พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยแป้ง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Apar และ Özbek (2005) ที่ศึกษาการสูญเสียกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในการย่อยแป้งข้าวเจ้า (rice starch) พบว่า การย่อยแป้งจะถูกยับยั้งด้วยกลูโคส มอลโตส และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อย เช่นเดียวกับ การรายงานของอารี (2550) ที่พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งโดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสส่วนใหญ่จะยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*





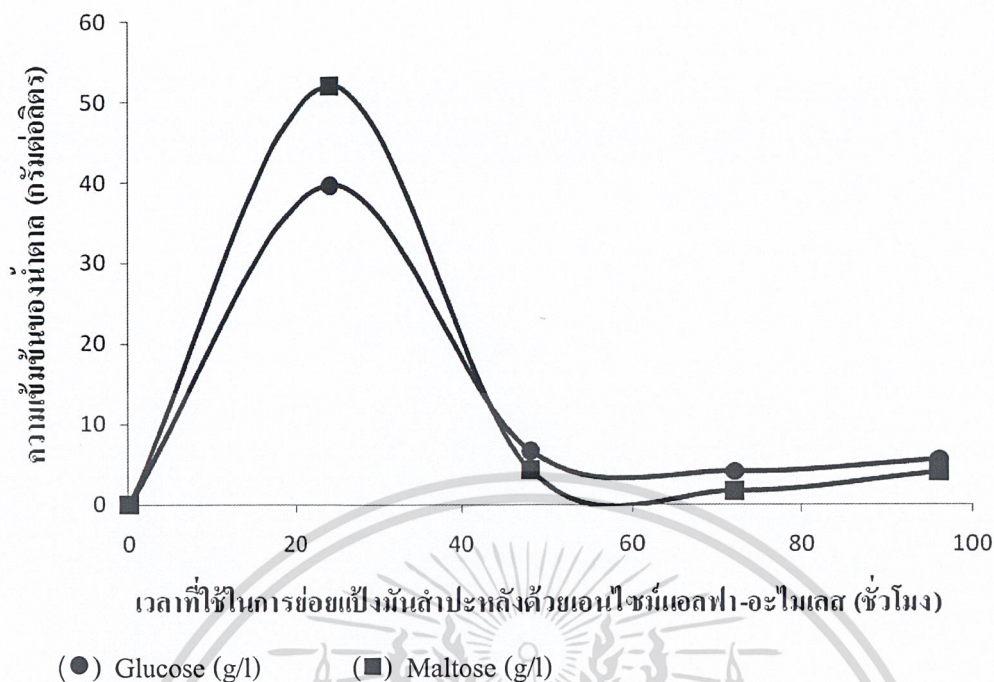
รูปที่ 4.3 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลูโคส, มอลโตส และผลิตภัณฑ์จากการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นระยะเวลาต่างๆ

(a) สารมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1%

(b) สารมาตรฐานมอลโตส ความเข้มข้นร้อยละ 1%

(c)-(g) ผลิตภัณฑ์จากการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสจากการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.3 และ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานกลูโคสและมอลโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือ HPLC พบว่า สารมาตรฐานกลูโคสและมอลโตสจะมีเวลาชะ (retention time) เท่ากับ 6.989 และ 9.515 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 4.3 (a) และ (b)) และเมื่อนำน้ำแป้งที่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นระยะเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเดียวกัน (รูปที่ 4.3 (c)-(g)) พบว่า ในน้ำแป้งที่ผ่านการย่อย ส่วนใหญ่จะพบกลูโคสและมอลโตสเป็นองค์ประกอบ จากนั้นเมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสและมอลโตสในน้ำแป้ง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.4) จะเห็นว่า ในช่วงแรกของการย่อยน้ำแป้งมันสำปะหลังตั้งแต่เวลาที่ 0 ชั่วโมง จนถึง 24 ชั่วโมง ไม่พบน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส โดยพบว่าที่ 48 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสมากที่สุด คือ 6.639 และ 4.288 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อหลังจากระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น พบว่า ทั้งน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส จะมีปริมาณลดลงเป็นผลเนื่องมาจากการวิเคราะห์ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคการเจือจางที่เหมาะสม แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC แต่อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายสารละลายแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในช่วงระยะเวลา 0 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำตาลที่ได้มีความสอดคล้องกันเมื่อวิเคราะห์ด้วย

วิธีการทั้ง 3 เทคนิคข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การคัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถผลิต cyclodextrins ได้

นำยีสต์ที่ได้ มาคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญและผลิต cyclodextrins ได้ดีที่สุดในอาหารแข็ง SS โดยใช้ น้ำแป้งมันสำปะหลังที่ข่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผสมอินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ โบรโมไทมอลบลู (bromothymol blue), บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue), ไทมอลบลู (thymol blue) และฟีนอล์ฟทาเลิน (phenolphthalein) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการผลิต cyclodextrins ของยีสต์จากการสังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นโดยรอบบริเวณที่เชื้อมีการเจริญ และวัดความยาวเป็นอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสต่อบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone: growth zone) ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่า ยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง SS ที่ผสมบรอมฟีนอลบลูให้อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสต่อบริเวณเชื้อเจริญมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ อาหารแข็ง SS ที่ผสมฟีนอล์ฟทาเลิน, โบรโมไทมอลบลู และ ไทมอลบลู โดยมีค่าอัตราส่วนเท่ากับ 1.49, 1.46, 1.40, 1.37 ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง SS ที่ผสมกับโบรโมไทมอลบลูมาใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MYS เพื่อให้มีการผลิต cyclodextrins ต่อไป



(a)

(b)

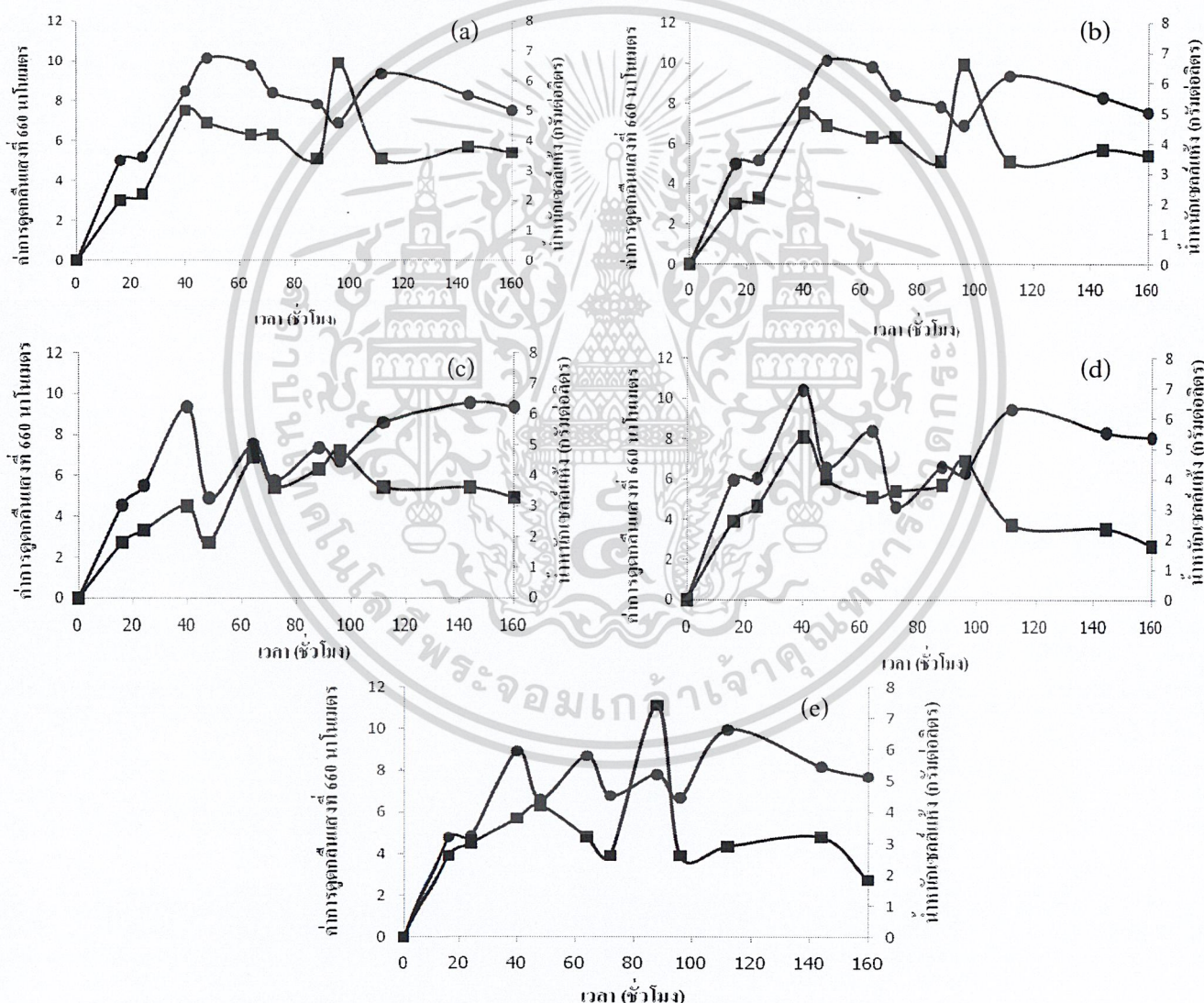
รูปที่ 4.5 แสดงผลการผลิต cyclodextrins ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* บนอาหารแข็ง SS ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

- (a) การวัดความยาวบริเวณใสและบริเวณเชื้อเจริญด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์
- (b) บริเวณใสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดไฟลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์

นำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ให้อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสต่อบริเวณเชื้อเจริญมากที่สุดมาเลี้ยงในอาหารเหลว MYS ในสภาวะเขย่า โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 8.00 และ 16.00 น. ของแต่ละวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ($OD_{660\text{ nm}}$) แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ และแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เพื่อแสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์โดยใช้น้ำแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยเป็นเวลาดังกันเป็นแหล่งคาร์บอน

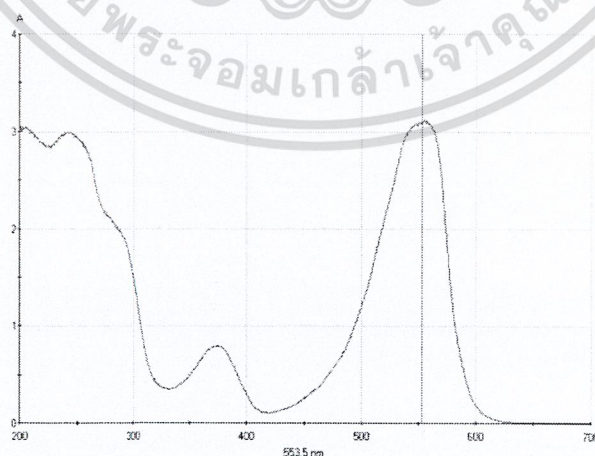
เอกสารนี้เป็นเอกสาร (●) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (■) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ (a) 0 ชั่วโมง (b) 24 ชั่วโมง (c) 48 ชั่วโมง (d) 72 ชั่วโมง (e) 96 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.6 (a) และ (b) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการใช้น้ำแข็งที่ข่อยเป็นเวลา 0 และ 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ พบว่า ในช่วงแรกของการเจริญตั้งแต่เวลาที่ 0 ชั่วโมง จนถึง 48 ชั่วโมง เป็นช่วงที่มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยที่ 48 ชั่วโมงจะมีการเจริญสูงสุด สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ($OD_{660\text{ nm}}$) และน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าสูงสุด ในขณะที่รูป (c), (d) และ (e) ที่ได้จากการใช้น้ำแข็งที่ข่อยเป็นเวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จะพบการเจริญสูงสุดที่เวลา 40 ชั่วโมง เนื่องจากน้ำแข็งที่ข่อยเป็นเวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง อาจมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูงทำให้สภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (ซึ่งระหว่างการทดลองสังเกตพบการสะสมเอทานอล (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง))

4.5 การวิเคราะห์ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

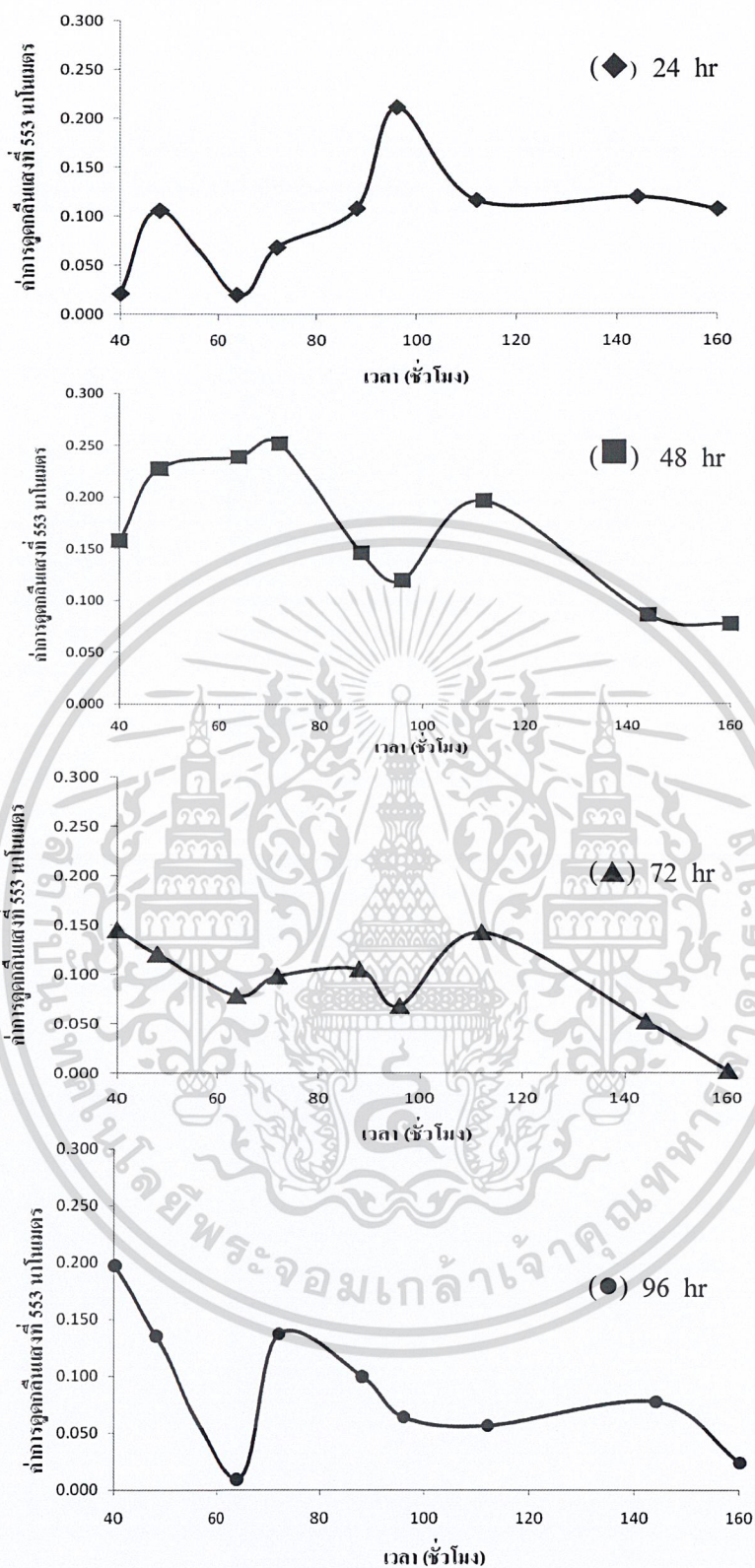
4.5.1 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อตามระยะเวลาและแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน มาทำการวิเคราะห์ปริมาณของ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีดัดแปลงของ Gawande และ Parker (2001) โดยควบคุมอุณหภูมิและเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ฟีนอล์ฟทาลีนมีการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.7 โดยค่าการดูดกลืนแสงที่หายไปเมื่อเทียบกับหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลีน จะเป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณ cyclodextrins ซึ่งมีการดูดซับฟีนอล์ฟทาลีนเข้าไปภายในโพรงนั่นเอง (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.7 แสดงภาพการสแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของฟีนอล์ฟทาลีน ซึ่งได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 553 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ขอยืมไปชั่วคราวเพื่อใช้ในการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

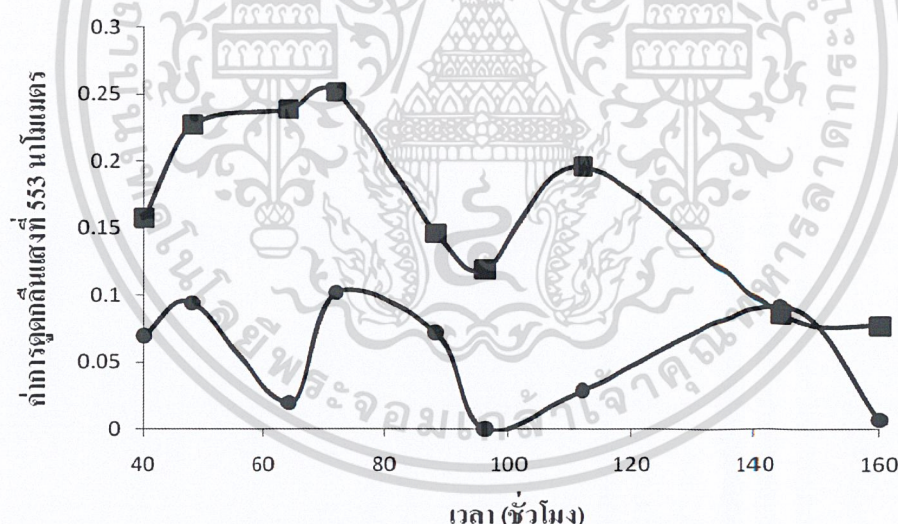


รูปที่ 4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตรของพินอล์ฟทาลินที่ถูกดูดซับไว้ภายในโพรงของ cyclodextrins เทียบกับหลอดทดสอบการสลายตัวของพินอล์ฟทาลิน โดยใช้ น้ำแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยเป็นระยะเวลาต่างกัน คือ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.8 พบว่า ส่วนโสมที่ใช้เป้งมันสำปะหลังที่ข่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณ cyclodextrins มากที่สุด โดยในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 40 ถึงชั่วโมงที่ 72 เชื้อมีการผลิต cyclodextrins เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีการผลิต cyclodextrins มากที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง และค่อยๆลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 160 แสดงว่า เชื้อมีการผลิต cyclodextrins ได้ดีที่สุดหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.5.2 การวิเคราะห์ cyclodextrins ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

เมื่อศึกษาการวิเคราะห์ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยควบคุมอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีการผลิต cyclodextrins มากที่สุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้เป้งมันสำปะหลังที่ข่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำมาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins โดยควบคุมอุณหภูมิและเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เทียบกับหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน ได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.9



(■) 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (●) 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

รูปที่ 4.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตรของฟีนอล์ฟทาลินที่ถูกดูดซับไว้ภายในโพรงของ cyclodextrins เทียบกับหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน โดยใช้ น้ำเป้งมันสำปะหลังที่ข่อยเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่ 40 และ 100 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเป็นการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.9 สังเกตได้ว่า cyclodextrins ที่วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีปริมาณลดลงมากเมื่อเทียบกับ cyclodextrins ที่วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อาจเนื่องจากความร้อนส่งผลให้พินอล์ฟทาลีนเกิดการสลายตัว หรือความร้อนทำให้ cyclodextrins สลายตัว ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ cyclodextrins คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์ cyclodextrins โดยการควบคุมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins ได้น้อยมาก อาจเกิดจากเชื้อมีการผลิต cyclodextrins น้อย เนื่องจากเชื้ออาจนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลสไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่านำไปใช้ในการผลิต cyclodextrins หรือ มีสารอื่น เช่น เอทานอลที่เป็นตัวทำละลายในพินอล์ฟทาลีน หรือองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโมเลกุลขนาดพอเหมาะ เข้าไปอยู่ในโครงสร้างที่เป็นโพรงของ cyclodextrins ทำให้ การวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเทียบกับหลอดทดสอบ การสลายตัวของพินอล์ฟทาลีนแล้วมีค่าการดูดกลืนแสงน้อย ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins ด้วยการวิเคราะห์ HPLC ซึ่งจะให้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำมากกว่า วิธีการวิเคราะห์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิต cyclodextrins โดยใช้สารละลายน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นระยะเวลาต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำแป้งด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography ; HPLC) พบว่า น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสสูงที่สุด คือ 39.628 และ 51.942 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทของยีสต์ที่มีการผลิต cyclodextrins ได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลทที่เจริญบนอาหารแข็ง SS ที่ผสมกับบรอมฟินอลบลู และใช้น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่ามีอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสต่อบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) เท่ากับ 1.49 จากนั้นจึงนำไอโซเลทที่คัดแยกได้นี้มาเลี้ยงในพลาสติกอาหารเหลว MYS ในสภาวะเขย่าเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างและนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ($OD_{660\text{ nm}}$) พบว่า เซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว MYS ที่ใช้น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร และ 7.5 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร พบว่า เซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว MYS ที่ใช้น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีการผลิต cyclodextrins สูงสุด คือ 0.252 โดยมีการผลิตสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ยีสต์มีการเจริญได้ดีที่สุด เมื่อใช้น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่จะมีการผลิต cyclodextrins ได้ดีที่สุด เมื่อใช้น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน

ข้อเสนอแนะ

- ในการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins ที่แน่นอนควรใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือ HPLC ในการยืนยันผลการทดลอง โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน cyclodextrins
- ควรทำการวิเคราะห์หาเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase ; CGTase) ใน culture ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ไปยังบุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2550. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารียา แซ่มสิงห์ และ นันทิ์จารี หอมนาน. 2552. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในอาหารเหลวที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2552.

ณัฐกานต์ วรกุล, ทิพย์นภา โคน้อย และ ทิวากร ศิริพงษ์. 2553. การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลและยีสต์ออกโตไลเซท เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2553.

ดวงพร คันทโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม: ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นิรนาม. 2549. คู่มือการเพิ่มผลผลิตชุดการปลูกมันสำปะหลัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ยูทีไลท์ จำกัด.

ปวีณา ประญาวสิน และ วริศราเสประธานนท์. 2544. การบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งด้วยพอลิเมอร์เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2544.

ปราณี อานเป็ร้อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์คัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2547. โครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง: หลักการและการประยุกต์ใช้. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ไพโรจน์ วิริยจารี, ชรินทร์ เตชะพันธุ์, เรวัตร์ พงษ์พิสุทธินันท์ และ สุภาพร พุททโสภณัฐ. 2552. การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งชนิดต่างๆ และ การประยุกต์ใช้สำหรับการกักเก็บกลิ่น. โครงการวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มนจิรา เขยคำแหง. 2546. การศึกษาการสังเคราะห์และสมบัติของสารเชิงซ้อนระหว่างพอลิเมอร์บางชนิดกับเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2546.

ศุภลักษณ์ ศรีजारณย์. 2552. โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ศุภวรรณ ใจแสน. 2551. ยุคทองมันสำปะหลัง พืชพลังงานแหล่งอนาคต. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์นาคา.
- ศุสิทธิ์ กิจจะ. 2550. การผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซินทรานพอเรสจากเชื้อ *Bacillus sp.*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2550.
- สมพงศ์ นิลมณี. 2543. การผลิตไซโคลเด็คซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2543.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีทางชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพอาหารการหมัก และสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อารี ฤทธิบูรณ์. 2550. เทคโนโลยีของเอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Apar, D.K., and Özbek, B. 2005. α -Amylase inactivation during rice starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40: 1367-1379.
- Atichokudomchai, N., & Varavinit, S. 2002. Characterization and utilization of acid-modified cross-linked Topica starch in pharmaceutical tablets. *Carbohydrate Polymer*, 53: 263-270.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23: 1631-1640.
- Charoenlap, N., Dharmsthiti, S., Sisisansaneeyakul, S. and Lertsiri, S. 2004. Optimization of cyclodextrin production from: Sago starch. *Bioresour. Technology*, 92: 49-54.
- Del-Valle, E.M.M. 2004. Cyclodextrin and their uses: a review. *Process Biochem.*, 39: 1033-46.
- Dodziuk, H. 2006. Cyclodextrins and Their Complexes. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 18.
- Dubois et al., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Gawande, B.N., and Parker, A.Y. 2001. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS- 22. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 735-743.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Goh, K.M., M, N.M., Hassan, O., Rahman, R.N.Z.R. and Illias, R.M. 2007. The effects of reaction conditions on the production of γ -cyclodextrin from tapioca starch by using a novel recombinant engineered CGTase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49: 118-126.
- Kim, T.J., Chan Kim, B. Soo dee, H. 1997. Production of cyclodextrin using raw corn starch without a pretreatment. *Enzyme Microbial. Technolgy*, 20: 506-509.
- Leemhuis, H. et al. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnology*, 94: 137-155.
- Nelson, N. 1994. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153: 375-380.
- O'Neil, M.J. 2006. *The Merck index*, 14th ed.; Merck & Co., Inc.; Rahway, New Jersey, USA.
 [Online]. Available : <http://bj.oxfordjournals.org/content/early/2009/05/24/bja.aep093.full>
 (25/04/54)
- [Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/File:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg
 (25/04/54)
- [Online]. Available : <http://www.chromatography-online.org/Chrial-GC/Contemporary-Chiral-Stationary-Phases/Cyclodextrin.html> (25/04/54)
- [Online]. Available : <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/cyclodextrins-pharmaceuticals-overview-0> (25/04/54)
- [Online]. Available : http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_ciclodextrinas.html
 (25/04/54)
- [Online]. Available : http://www.rd1677.com/rd_chainat/top_chainat.php?id=66523 (25/04/54)
- [Online]. Available : <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html> (25/04/54)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

1. การเตรียมอาหาร

1.1 อาหารสูตร Soybean starch agar (SS agar) สำหรับการคัดแยกเชื้อ (screening)

ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง (ที่ผ่านการย่อย)	2.4	เปอร์เซ็นต์
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม
วุ้น	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 ด้วย 1 นอร์มัล โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

1.2 อาหารสูตร MYS ตัดแปลง สำหรับการเลี้ยงเชื้อ

ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง (ที่ผ่านการย่อย)	1	เปอร์เซ็นต์
เปปโตน	50	กรัม
มอลต์สกัด	30	กรัม
ยีสต์สกัด	30	กรัม
วุ้น	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 ด้วย 1 นอร์มัล โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (Borate buffer) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 10)

เตรียมได้โดยผสมสารละลายกรดบอริก (boric acid) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ละลาย boric acid 3.0195 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร) กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ละลาย NaOH 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน boric acid : NaOH เป็น 27.5 : 20 (โดยปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลายอินดิเคเตอร์ (Merk index, 2006)

1.2.1 บรอมฟีนอลบลู (Bromphenol blue) พีเอช 3.0-4.6

ละลายอินดิเคเตอร์ 0.1 กรัม ใน 0.02 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 7.45 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 250 มิลลิลิตร

1.2.2 โบรโมไทมอลบลู (Bromothymol blue) พีเอช 6.0-7.6

ละลายอินดิเคเตอร์ 100 มิลลิกรัม ใน 0.1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.6 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2.3 ไทมอลบลู (Thymol blue) พีเอช 8.0-9.6

ละลายอินดิเคเตอร์ 100 มิลลิกรัม ใน 0.1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.15 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2.4 ฟีนอล์ฟทาเลอิน (Phenolphthalein) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ละลายอินดิเคเตอร์ 0.5 กรัม ในเอทานอลร้อยละ 95 350 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

1.3 1 นอร์มัล โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 5.811 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 การเตรียมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5

ละลายฟีนอล (phenol) 50.0 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ได้ไว้ในขวดสีชา

1.5 การเตรียมสารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

ละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.0 กรัม และโปรแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต 40.0 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.0 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอน จะต้องกรองออกก่อนนำไปใช้

1.6 การเตรียมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

ละลาย $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50.0 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.0 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอน จะต้องกรองออกก่อนนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

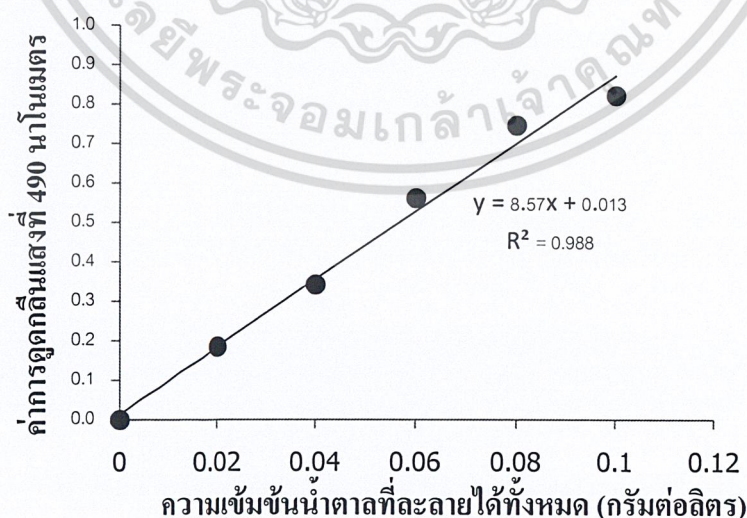
1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble sugars) ด้วยวิธี Phenol - Sulfuric Method (Dubois และคณะ, 1956)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (95.5 เปอร์เซ็นต์)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายฟีนอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่า
3. เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที
4. ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งทันที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร
5. การทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ทำได้โดยใช้สารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 กรัมต่อลิตร (กลูโคสที่นำมาเตรียมเป็นสารละลายจะต้องอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 ชั่วโมง) ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร และทำวิธีการเดียวกับตัวอย่าง จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดในสารละลายตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้



รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานของ Total soluble sugars ด้วยวิธี Phenol - Sulfuric Method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

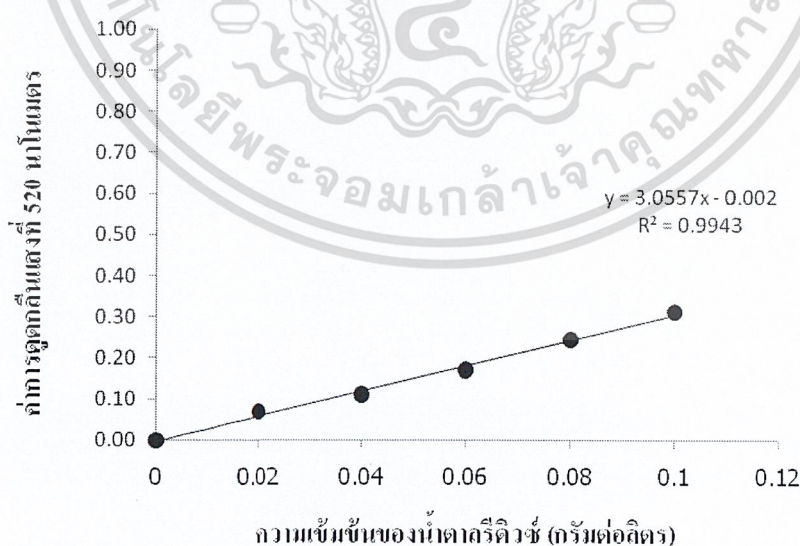
2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ด้วยวิธี Somogyi–Nelson (Nelson, 1994)

สารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)
2. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่า
3. ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งทันที
4. เติมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร
6. การทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ทำได้โดยใช้สารละลายแป้งมันสำปะหลังสุกที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 กรัมต่อลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร และทำวิธีการเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้



รูปที่ ๒. กราฟมาตรฐานของ Reducing sugars ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (ดัดแปลงจาก Goh และคณะ, 2007)

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

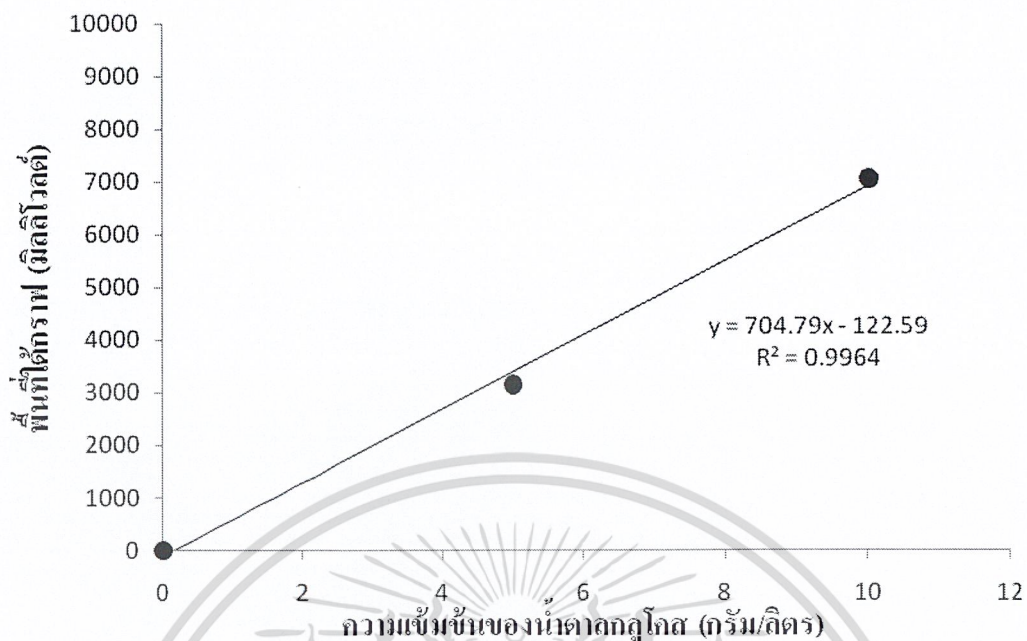
สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้แก่

คอลัมน์	:	Asahipak Shodex NH ₂ P-50 4E
ขนาด	:	20 เซนติเมตร
เฟสเคลื่อนที่	:	อะซิโตไนไตรล์และน้ำ ในอัตราส่วน 70:30
อัตราการไหล	:	1 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาณตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์	:	20 ไมโครลิตร
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง	:	30 นาที
เครื่องตรวจวัด	:	แบบ Refractive index detector (RI detector)

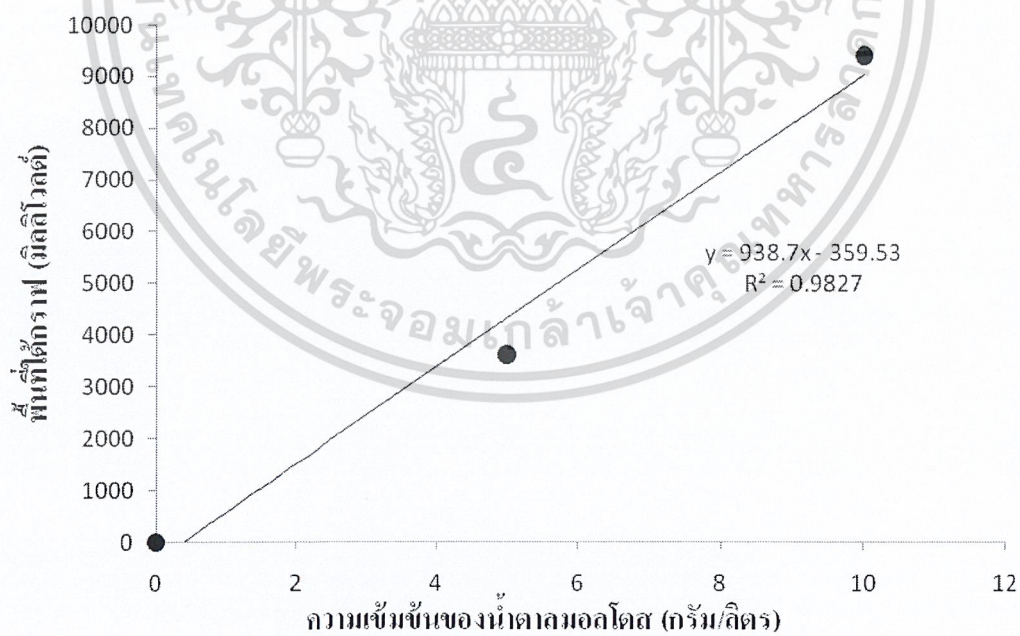
การเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ : ตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบได้มาจากส่วนใสซึ่งได้จากการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่เก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ตามชั่วโมงที่กำหนด โดยส่วนใสนี้จะผ่านการกรองด้วยแผ่นเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins ด้วยเทคนิค HPLC

3.2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส และมอลโตส

การทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ทำได้โดยใช้สารละลายกลูโคสและมอลโตสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสในสารละลายตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้



รูปที่ ค. 3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ ค. 4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ ง.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่เวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ (ชั่วโมง) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง) เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร					น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)					แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)				
	0	24	48	72	96	0	24	48	72	96
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	4.36	5.00	5.93	4.53	4.78	2.40	2.00	2.60	1.80	2.60
24	4.50	5.17	6.03	5.49	4.86	2.20	2.20	3.10	2.20	3.00
40	6.06	8.48	10.40	9.36	8.92	2.60	5.00	5.40	3.00	3.80
48	7.16	10.12	6.56	4.88	6.62	3.80	4.60	4.00	1.80	4.20
64	6.13	9.78	8.36	7.50	8.70	4.20	4.20	3.40	4.60	3.20
72	7.21	8.39	4.62	5.74	6.78	3.00	4.20	3.60	3.60	2.60
88	5.58	7.82	6.60	7.34	7.80	4.40	3.40	3.80	4.20	7.40
96	9.06	6.90	6.29	6.71	6.69	3.60	6.60	4.60	4.80	2.60
112	6.42	9.34	9.44	8.56	9.94	4.00	3.40	2.47	3.60	2.90
144	6.81	8.28	8.28	9.56	8.18	2.60	3.80	2.35	3.60	3.20
160	6.60	7.53	8.04	9.34	7.69	2.27	3.60	1.78	3.27	1.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง. 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร ที่เกิดจากการดูดซับฟีนอล์ฟทาลินของ cyclodextrins ที่เวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ (ชั่วโมง) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างกัน (ชั่วโมง) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins ที่ 40 °C และนำส่วนใสที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน มาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการวิเคราะห์ปริมาณ cyclodextrins โดยวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 100 °C

เวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร ที่เกิดจากการดูดซับฟีนอล์ฟทาลินของ cyclodextrins				
	แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง) และวิเคราะห์ที่ 40 °C				แป้งที่ผ่านการย่อยระยะเวลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ที่ 100 °C
	24	48	72	96	
40	0.021	0.158	0.145	0.197	0.070
48	0.106	0.228	0.121	0.135	0.094
64	0.020	0.239	0.079	0.009	0.020
72	0.068	0.252	0.099	0.137	0.102
88	0.108	0.146	0.106	0.099	0.072
96	0.211	0.120	0.068	0.064	0.000
112	0.116	0.196	0.143	0.056	0.029
144	0.120	0.086	0.052	0.077	0.092
160	0.107	0.077	0.002	0.024	0.007

ตารางที่ ง. 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร ของหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน โดยทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที

วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 100 °C	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร ของหลอดทดสอบการสลายตัวของฟีนอล์ฟทาลิน	
	ระดับการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริง
ก่อนทำปฏิกิริยา	10	5.53
หลังทำปฏิกิริยา	3	2.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์บรอมฟีนอลบลู

รายนาม ลำดับที่	บริเวณส่วนใส (clear zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	บริเวณเชื้อเจริญ (growth zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่าง บริเวณส่วนใสและ บริเวณเชื้อเจริญ
	ตำแหน่งที่วัด						ตำแหน่งที่วัด						
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
1	3.00	2.06	2.44	2.47	2.94	2.58	1.98	1.78	1.88	2.05	2.14	1.97	1.31
2	2.82	2.45	2.12	2.69	3.30	2.68	2.04	1.94	1.49	2.22	2.21	1.98	1.35
3	3.14	2.17	1.74	1.87	1.82	2.15	2.16	1.81	1.51	1.27	1.30	1.61	1.33
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2.36	2.15	1.97	1.88	1.82	2.04	1.85	1.80	1.74	1.48	1.57	1.69	1.21
6	2.82	2.68	1.88	2.29	2.47	2.43	2.20	2.34	1.60	1.90	1.76	1.96	1.24
7	2.51	2.22	1.97	1.87	1.67	2.05	2.06	2.02	1.52	1.34	1.30	1.65	1.24
8	2.47	2.47	1.82	1.81	1.52	2.02	2.14	2.08	1.59	1.56	1.22	1.72	1.17
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	3.27	2.72	2.43	1.54	1.85	2.36	2.64	2.10	2.00	1.28	1.46	1.90	1.25
11	3.34	2.36	2.00	1.70	1.77	2.23	2.60	2.04	1.64	1.41	1.36	1.81	1.23

ตารางที่ ๕.5 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์โบรโมไทมอลบลู

รายนามที่	บริเวณส่วนใส (clear zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	บริเวณเชื้อเจริญ (growth zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่าง บริเวณส่วนใสและ บริเวณเชื้อเจริญ
	ตำแหน่งที่วัด						ตำแหน่งที่วัด						
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
1	2.49	2.43	2.58	2.47	2.77	2.55	2.11	2.12	1.98	1.97	2.19	2.07	1.23
2	2.66	2.81	2.77	2.62	2.00	2.57	2.15	2.06	2.21	1.93	1.70	2.01	1.28
3	2.86	2.25	2.43	2.33	2.76	2.53	2.32	1.86	1.92	1.93	2.13	2.03	1.24
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2.79	2.55	2.84	2.17	2.71	2.61	2.15	2.27	2.29	1.82	2.23	2.15	1.21
6	3.28	2.69	2.62	2.64	2.54	2.75	2.52	2.22	1.90	2.36	2.43	2.29	1.20
7	2.25	2.46	2.69	2.13	2.55	2.42	1.46	2.00	2.10	1.86	1.97	1.88	1.29
8	3.80	3.23	2.42	2.37	2.55	2.87	3.02	2.01	1.94	1.98	1.99	2.19	1.31
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	2.78	2.45	2.19	1.96	2.15	2.31	2.27	2.20	1.59	1.20	1.84	1.82	1.27
11	2.60	2.38	2.41	2.42	2.19	2.10	2.17	1.91	1.89	1.37	1.22	1.71	1.40
12	2.92	2.97	2.59	2.66	2.68	2.76	2.05	2.20	2.30	1.73	1.75	2.01	1.38

ตารางที่ 6 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีน

รายนามที่	บริเวณส่วนใส (clear zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	บริเวณเชื้อเจริญ (growth zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่าง บริเวณส่วนใสและ บริเวณเชื้อเจริญ
	ตำแหน่งที่วัด						ตำแหน่งที่วัด						
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
1	1.17	1.80	2.25	2.08	2.77	2.01	1.04	1.18	1.67	1.49	2.11	1.50	1.34
2	1.78	1.34	2.02	1.98	2.23	1.87	1.50	1.18	1.60	1.53	1.78	1.52	1.23
3	1.45	1.81	1.75	1.82	2.07	1.78	1.22	1.38	1.44	1.34	1.67	1.41	1.26
4	1.14	1.71	1.79	1.70	1.58	1.58	1.27	1.41	1.54	1.28	1.19	1.34	1.18
5	1.46	1.55	1.64	1.62	2.21	1.70	1.32	1.09	1.15	1.34	1.59	1.30	1.31
6	2.30	2.00	2.07	1.76	1.68	1.96	1.79	1.71	1.57	1.49	1.24	1.56	1.26
7	1.85	2.01	1.91	1.76	1.72	1.85	1.58	1.57	1.57	1.51	1.49	1.54	1.20
8	1.94	1.94	1.94	2.08	1.81	1.94	1.53	1.68	1.55	1.73	1.37	1.57	1.24
9	1.63	1.67	2.70	2.73	2.72	2.29	1.36	1.32	1.97	2.34	2.09	1.82	1.26
10	2.60	2.54	1.64	1.98	2.25	2.20	1.88	2.12	1.20	1.60	1.73	1.71	1.29
11	1.97	1.60	2.45	2.37	2.27	2.13	1.48	1.33	1.72	1.73	1.69	1.59	1.34
12	1.65	1.43	2.04	3.10	3.39	2.32	1.25	1.16	1.54	2.09	1.89	1.59	1.46

ตารางที่ ง. 6-1 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีน (ต่อ)

รายนามที่	บริเวณส่วนใส (clear zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	บริเวณเชื้อเจริญ (growth zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่าง บริเวณส่วนใสและ บริเวณเชื้อเจริญ
	ตำแหน่งที่วัด						ตำแหน่งที่วัด						
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
13	2.24	2.23	2.50	2.48	2.43	2.38	1.74	1.77	1.98	1.70	1.74	1.79	1.33
14	1.98	2.09	2.48	2.92	2.07	2.31	1.55	1.73	1.89	1.92	1.66	1.75	1.32
15	2.07	1.72	2.48	2.50	3.02	2.36	1.96	1.41	1.89	2.09	2.67	2.00	1.18
16	2.03	2.21	2.63	2.84	2.98	2.54	1.62	1.79	2.17	2.08	2.33	2.00	1.27
17	2.29	1.74	2.64	3.04	2.57	2.46	1.87	1.55	1.74	1.92	1.89	1.79	1.37
18	1.96	1.88	2.73	2.50	2.74	2.36	1.78	1.62	1.81	1.70	1.59	1.70	1.39
19	1.49	1.54	1.83	1.96	1.75	1.71	1.32	1.32	1.06	1.54	1.08	1.26	1.36
20	1.40	1.20	1.60	1.48	1.36	1.41	1.12	1.00	1.05	1.10	0.90	1.03	1.36
21	1.39	1.57	1.54	1.84	1.84	1.64	1.06	1.32	1.36	1.33	1.41	1.30	1.26
22	1.38	1.65	1.57	1.30	1.78	1.54	1.07	1.27	1.28	1.12	1.33	1.21	1.27
23	1.61	1.43	2.36	1.54	2.25	1.84	1.32	1.83	1.54	1.21	1.74	1.53	1.20
24	3.06	2.43	1.54	1.83	1.92	2.16	2.75	1.91	1.14	1.43	1.35	1.72	1.26

ตารางที่ ง. 7 แสดงอัตราส่วนระหว่างบริเวณส่วนใสและบริเวณเชื้อเจริญ (clear zone : growth zone) ของยีสต์ที่เจริญบนจานอาหารแข็ง SS ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน และผสมอินดิเคเตอร์ไทมอลบลู

รายนามที่	บริเวณส่วนใส (clear zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	บริเวณเชื้อเจริญ (growth zone)					เฉลี่ย (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่าง บริเวณส่วนใสและ บริเวณเชื้อเจริญ
	ตำแหน่งที่วัด						ตำแหน่งที่วัด						
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
1	2.33	2.54	2.45	2.74	2.87	2.59	1.91	1.99	1.96	2.28	2.45	2.12	1.22
2	2.52	2.26	2.16	2.40	3.08	2.48	1.68	1.69	1.76	2.05	2.43	1.92	1.29
3	3.65	3.21	2.03	2.37	2.70	2.79	2.65	1.41	1.68	2.10	2.35	2.04	1.37
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2.51	2.03	2.05	2.60	2.66	2.37	2.06	1.65	1.53	2.17	2.31	1.94	1.22
6	2.15	2.27	2.95	3.04	3.57	2.80	1.67	1.70	2.11	2.38	3.04	2.18	1.28
7	2.78	3.40	3.05	3.55	3.02	3.16	1.84	2.37	2.65	2.63	2.37	2.37	1.33
8	3.40	2.71	2.65	3.03	3.08	2.97	2.60	2.01	2.17	2.24	2.12	2.23	1.33
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	2.49	2.74	2.65	2.77	2.89	2.71	2.13	2.23	2.20	2.39	2.46	2.28	1.19
11	2.64	2.05	2.09	1.69	2.32	2.16	2.39	1.68	1.79	1.43	1.93	1.84	1.17
12	2.87	2.73	2.89	2.07	1.81	2.47	2.13	2.10	2.15	1.64	1.62	1.93	1.28

