บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

คีเฟอรันเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus kefiranofaciens* ที่แยกจากหัวเชื้อที่ใช้ในการหมักคีเฟอร์ ซึ่งเป็นนมเปรี้ยวพื้นบ้านที่ชาวรัสเซียเชื่อว่าเป็นยาอายุวัฒนะ โดยหัวเชื้อดังกล่าวมีชื่อเรียกว่า คีเฟอร์แกรน (Kefir grains) คีเฟอรันประกอบด้วยกลูโคสและกาแลคโตสในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง มีคุณสมบัติช่วยบำรุงร่างกาย และสามารถใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียวและใช้เป็นสารอุ้มน้ำได้ (Shiomi *et al*., 1982) จากการศึกษาคุณสมบัติของคีเฟอรัน พบว่าสามารถใช้เป็นสารทดแทนไขมันได้เป็นอย่างดี เหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง นอกจากนี้คีเฟอรันยังมีคุณสมบัติในทางการแพทย์เป็นสารต่อต้านมะเร็ง (Antitumor) สามารถนำมาผลิตยารักษาโรคเนื้องอกได้ และคุณสมบัติที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งของคีเฟอรัน คือ การเป็นสารต้านจุลชีพและเป็นสารปฏิชีวนะ ทั้งยังสามารถตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และช่วยผ่อนคลายอาการเครียดได้อีกด้วย (Kobayama *et al*., 1997)

ในการผลิตคีเฟอรันในงานวิจัยส่วนใหญ่ (Yokoi and Watanabe, 1992; Cheirsilp *et al*., 2001) จะใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นสารอาหารตั้งต้นที่มีราคาสูง ดังนั้นการหาแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกและการพัฒนากระบวนการที่จะนำวัตถุดิบนั้นมาใช้ จึงมีความน่าสนใจในการลดต้นทุนการผลิต การนำผลิตผลทางการเกษตรที่มีราคาถูกมาเปลี่ยนเป็นอาหารที่แบคทีเรียแลคติกสามารถนำไปใช้ได้ จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการลดต้นทุนของการผลิต ซึ่งหนึ่งในนั้นคือการนำแป้งสาคูมาใช้ เนื่องจากสาคูเป็นพืชที่พบมากบริเวณภาคใต้ของไทย แต่การนำสาคูมาใช้ประโยชน์ยังมีน้อย นอกจากนี้แป้งสาคูยังให้ผลผลิตสูงกว่าแป้งชนิดอื่น (Charoenlap *et al*., 2004) แต่การนำแป้งสาคูมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตคีเฟอรัน จะต้องมีการเปลี่ยนสภาพจากแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กก่อน ซึ่งกระบวนการที่เหมาะสมและมีความเป็นไปได้สูง คือ การใช้เอนไซม์เปลี่ยนแป้งซึ่งเป็นสารตั้งต้นโมเลกุลใหญ่ ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กที่เชื้อสามารถนำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตและผลิตคีเฟอรันได้

ในงานวิจัยหลายครั้งที่นำแป้งมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากจุลินทรีย์ พบว่านอกจากจะมีการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเองแล้ว ยังมี

การใช้เอนไซม์เพื่อย่อยแป้งจากสารโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กก่อนนำเข้าสู่กระบวนการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการต่อไป นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อรวมกระบวนการย่อยแป้งและการเลี้ยงเชื้อเข้าด้วยกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) และพบว่าในการรวมกระบวนการดังกล่าวจะเป็นการประหยัดเวลาและต้นทุนของการผลิตได้ทั้งยังสามารถลดขั้นตอนการผลิตให้น้อยลง โดยที่เชื้อยังสามารถเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่าเดิม เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทำการย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมด เพราะเชื้อสามารถนำโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ ที่ได้จากการย่อยแป้งในระดับหนึ่งไปใช้ได้ จึงมีผลทำให้ระยะเวลาในการผลิตโดยรวมลดลง (Huang *et al*., 2005)

มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการรวมกระบวนการ SSF อาทิเช่น พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้ ซึ่งมีผลต่ออัตราการย่อยแป้ง การเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษา การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยแป้งสาคูให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตคีเฟอรัน โดยเริ่มจากศึกษาผลของแป้งที่ผ่านการให้ความร้อน พีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของแป้งสาคูตั้งต้น ปริมาณของเอนไซม์ผสมต่อกรัมแป้งสาคูและสัดส่วนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ต่อการย่อยแป้งและการผลิตคีเฟอรันด้วยกระบวนการ SSF จากนั้นจึงศึกษาผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น และการขยายขนาดการทดลองที่มีการควบคุมและไม่มีการควบคุมพีเอชตลอดการทดลอง

บทตรวจเอกสาร

1. Exopolysaccharides (เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์)

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ : EPSs เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นหรือผลิตขึ้นในขณะที่มีการเจริญเติบโตและจะขับออกมาภายนอกเซลล์ มีลักษณะเป็นเมือก (Slime) หรือยังคงติดอยู่กับผนังเซลล์ในรูปของแคปซูล (Capsule)โดยมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักและอาจจะมีสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์รวมอยู่ในโครงสร้างของพอลีแซคคาไรด์ (Morin,1980 อ้างโดย ระพีพรรณ เติมตันท์, 2547) เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ สามารถแยกหรือสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ ราและพืช เป็นต้น

1.1. การแบ่งชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์ผลิตสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามองค์ประกอบภายในโมเลกุล ได้แก่

1.1.1. โฮโมโพลีแซคคาไรด์ (Homopolysaccharides)

ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวในโครงสร้าง ส่วนใหญ่มักเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุคโตส ประกอบด้วย 4 กลุ่มย่อย คือ

ก. α-β-glucans เช่น กลูแคน เกิดจากน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่ต่างกันจึงทำให้สามารถแบ่งกลูแคนได้หลายชนิด ได้แก่ Bacterial cellulose (β-D-glucan), Pullulan (α-D-glucan), และ Scleroglucan (1, 3-β-D-glucan)

ข. β-D-glucan เช่น Curdlan (1,3-β-D-glucan)

ค. Fructans เช่น Levan เกิดจากการเชื่อมกันของ D-fructose ด้วยพันธะ β-2,6

ง. อื่นๆ เช่น Polygalactan

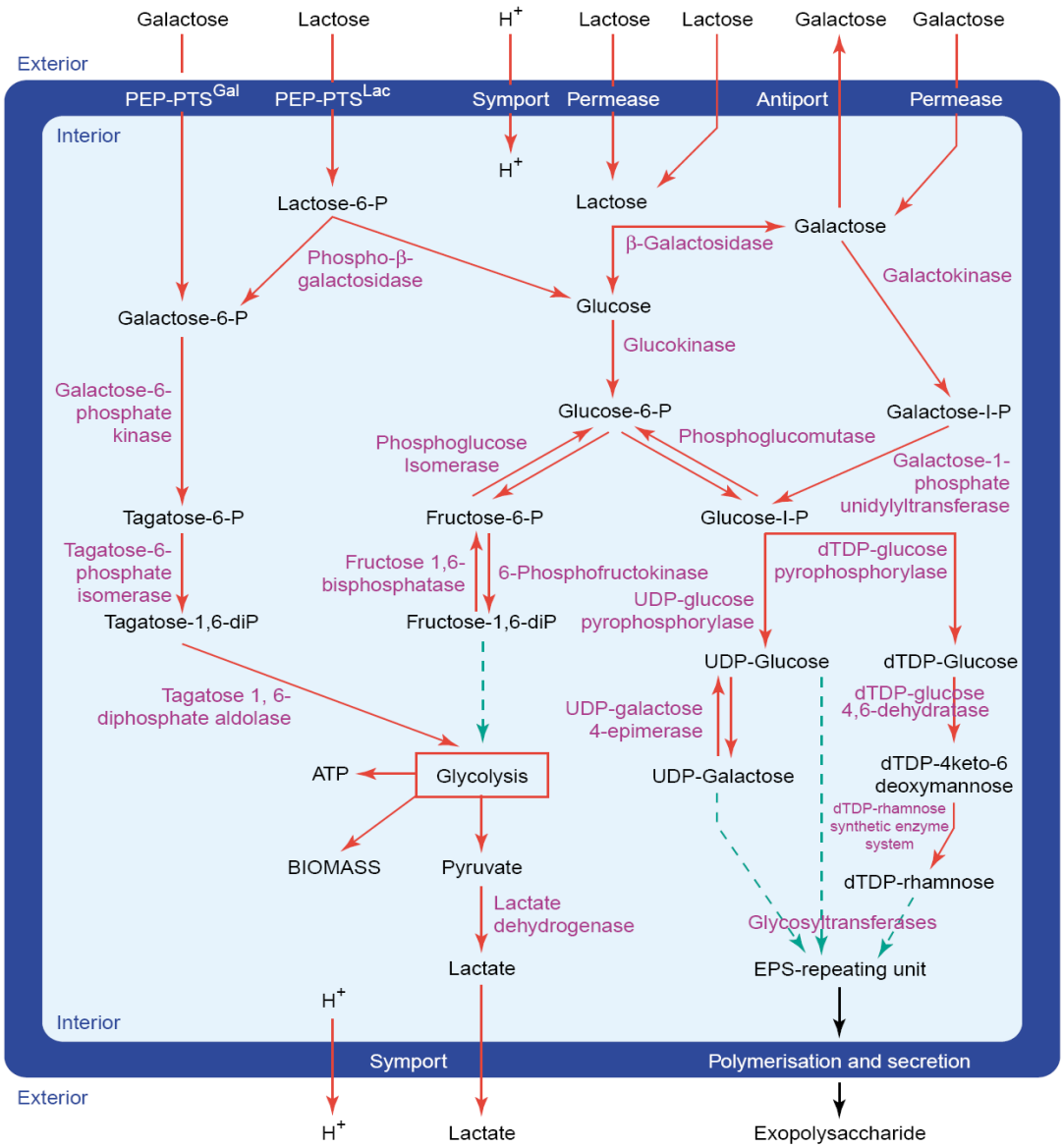
1.1.2 เฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (Heteropolysaccharides)

พอลิแซคคาไรด์โดยมากที่พบจัดอยู่ในกลุ่มนี้ โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปและมีองค์ประกอบอื่นรวมอยู่ด้วย เช่น sn-glycerol-3-phosphate, *N*-acetyl-aminosugar, หรือ Acetyl group (ระพีพรรณ เติมตันท์, 2547) แต่ในบางชนิดอาจพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ต่างกันถึง 5 ชนิด ซึ่งองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้ทำให้คุณสมบัติของพอลิแซคคาไรด์แตกต่างกันออกไปเนื่องจากพันธะและโครงสร้าง (Configuration) ของโมเลกุลแตกต่างกัน และบางครั้งอาจพบว่ามี Acyl substituents ในโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ด้วย (ศิริพร หมาดหล้า, 2544)

1.2 โครงสร้างและกลไกการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยจะอยู่ในช่วง 40-6,000 กิโลดาลตัน และโครงสร้างโดยทั่วไปจะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic linkage) โดยที่โมเลกุลของน้ำตาลจะต่อแบบซ้ำๆ กัน (Repeating unit) ระหว่าง 3-7 หน่วย เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน และจุลินทรีย์สกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันด้วย (ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2543)

สำหรับกลไกการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในแบคทีเรียแลคติก มีสารตัวกลางที่เป็นกุญแจสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Catabolic pathways คือ การสลายน้ำตาลจาก Glucose-6-phosphate ให้เกิดเป็น Fructose-6-phosphate และเข้าสู่กระบวนการ Glycolysis, Biomass production และผลิตพลังงาน ATP เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลซึ่งเป็นสารตัวกลางในการเกิดสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Welman และ Maddox, 2003; Vuyst และคณะ, 2001) ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2

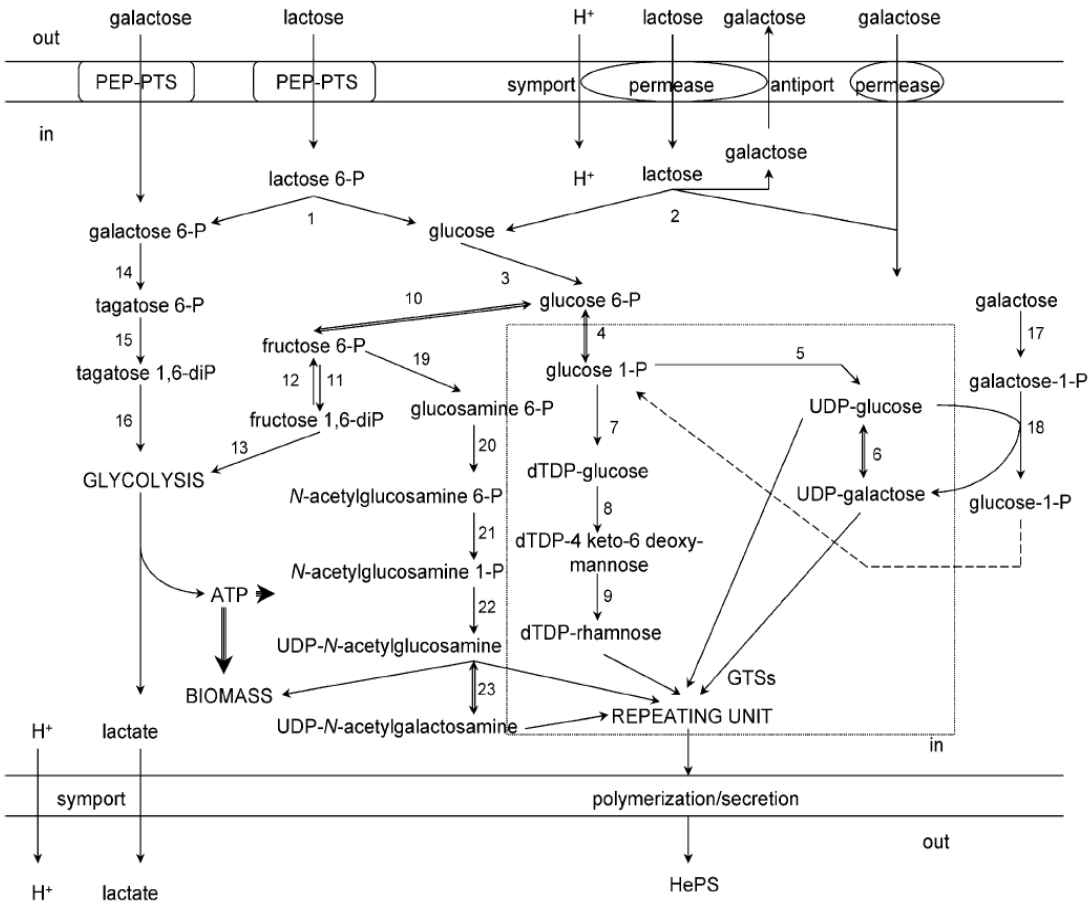


ภาพที่ 1 กลไกการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียแลคติก

Figure 1 Biosynthetic pathways leading to EPS synthetic in lactic acid bacteria

ที่มา : Welman และ Maddox (2003)

โดยกระบวนการหลักที่สำคัญจะเริ่มจากการส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ และเปลี่ยนจากน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะเปลี่ยน Glucose-6-phosphate (G-6-P) ไปเป็น Fructose-6-phosphate (F-6-P) และ Glucose-1-phosphate (G-1-P) โดยใช้เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส หลังจากนั้นจะเกิดการแตกตัวของ G-1-P ไปเป็นนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาล (UDP-glu, dTDP-glu) และเกิดการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เหล่านั้นแบบซ้ำๆ (EPSs repeating unit) โดยมีเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรสเข้ามาเกี่ยวข้องกลายเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ส่งออกนอกเซลล์



: (1) phospho-β-galactosidase, (2)β-galactosidase, (3) glucokinase, (4) phosphoglucomutase, (5) UDP-glucose pyrophosphorylase, (6) UDP-galactose 4 epimerase, (7) dTDP-glucose pyrophosphorylase, (8) dehydratase, (9) epimerase reductase, (10) phosphoglucose isomerase, (11) 6-phosphofructokinase, (12) fructose-1,6-bisphosphatase, (13) fructose-1,6-di-phosphate aldolase, (14) galactose 6-phosphate isomerase, (15) tagatose 6-phosphate kinase, (16) tagatose-1,6-di-phosphate aldolase, (17) galactokinase, (18) galactose-1-phosphate uridylyltransferase, (19) glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (20) glucosamine-phosphate acetyltransferase, (21) acetylglucosaminephosphatemutase, (22) UDP-glucosamine pyrophosphorylase, (23) UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase.

ภาพที่ 2 กระบวนการย่อยสลายน้ำตาลในการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Figure 2 Generalized diagram of the conversion of sugar to EPSs by lactic acid bacteria

ที่มา : Vuyst และคณะ (2001)

1.3 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์เป็นการผลิตโดยอาศัยกระบวนการหมักในอาหาร และใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต จากการศึกษาของ Linton และคณะ (1991 อ้างโดย ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2543) พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีชนิดหรือความหลากหลายและมีลักษณะเฉพาะมากกว่าที่ได้จากพืชหรือสาหร่าย โดยความหลากหลายดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีชนิดของน้ำตาลถึง 200 ชนิด ปัจจุบันเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ที่ผลิตในทางการค้ามีหลายชนิด เช่น แซนแทน (Xantan) เจลแลน (Gellan) และเด็กซ์แทรน (Dextran) เป็นต้น

ปัจจุบันการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกกำลังเป็นที่สนใจด้วยเหตุผลสำคัญคือ เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ในอาหารหมักหลายชนิด สารที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นจึงเป็นสารธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค มีแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกที่พบในอาหารหมักทั่วไปก็สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้เช่นกัน

Gassem และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ จากหางนมที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricur* RR และใช้ความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงเป็นตัวแสดงถึงการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ของเชื้อ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเท่ากับ 6.2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อาหารจะมีความหนืดเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เกิดขึ้น โดยผลิตได้ 0.8 กรัมต่อลิตร

Van den Berg และคณะ (1995) พบว่าแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus sake* O-1 ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในอาหารสูตร Semidefined medium ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถผลิตได้สูงถึง 1.5 กรัมต่อลิตร

Welman และคณะ (2003) ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricur* NCFB 2483 ในอาหารแลคโตส โดยเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6.0 และมีอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้เท่ากับ 0.025 กรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อกรัมแลคโตส

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกมีปัจจัยหลายอย่างที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับปริมาณ ชนิด หรือองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ ได้แก่

1.4.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการสร้างโพลีแซคคาไรด์ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นๆ ในส่วนของแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Cerning และคณะ (1994) ศึกษาการใช้น้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส แลคโตส ซูโครส มอลโตส และเมลลิไบโอส (mellibiose) ของเชื้อ *Lactobacillus casei CG*11 ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาล) มีผลต่อปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ น้ำตาลแลคโตสและกาแลคโตสจะให้ผลผลิตต่ำที่สุด ในขณะที่กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้สูงสุดเท่ากับ 160 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าการเลี้ยง *L. casei CG*11 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จะมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 86 ในขณะที่เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงร้อยละ 63

นอกจากนี้ในงานวิจัยอื่นที่ศึกษาและเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกเพื่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะมีอัตราการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ 95 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เพียง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Grobben *et al*., 1997)

1.4.2 พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Mozzi และคณะ (1996) เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL87 โดยควบคุมพีเอชของการเพาะเลี้ยงที่ระดับ 4.0, 5.0 และ 6.0 พบว่าที่พีเอช 6.0 เชื้อจะผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุด 488 กรัมต่อลิตรโดยใช้เวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง แต่ที่พีเอช 4.0 และ 5.0 ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง

Gassem และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ จากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgarigus* RR ในอาหาร lactose-enriched sweet whey permeate พบว่าการควบคุมพีเอชของน้ำหมักเป็น 6.2 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ด้วย 2N NaOH มีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดมากกว่าที่ไม่ปรับพีเอช อาจจะเนื่องมาจากการไม่ควบคุมพีเอชนั้นกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะย่อยเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ทำให้ผลผลิตที่ได้มีสายสั้นลงและมีปริมาณลดลง

1.4.3 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยในปี 1997 Gassem และคณะ ได้ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgarigus* RR ในอาหาร lactose-enriched sweet whey permeate และทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32, 37 และ 44 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะลดต่ำลง ซึ่งจากการทดลองให้ผลใกล้เคียงกับ Tallon และคณะ (2003) ที่พบว่าอุณหภูมิที่สูงในการเพาะเลี้ยงจะเป็นตัวยับยั้งการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ

1.4.4 สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก

แหล่งของแบคทีเรียแลคติกมีผลต่อคุณสมบัติของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ที่ผลิตได้โดยการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ในปัจจุบันจะใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารเนื่องจากพบว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์สูง (ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2543 และศิริพร หมาดหล้า, 2544)

1.5 การนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ จากแบคทีเรียแลคติกไปประยุกต์ใช้

การนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแบ่งได้เป็น

ก. อุตสาหกรรมอาหาร
- ใช้เป็นสารเพิ่มเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตให้มีความนุ่มลิ้น
- ใช้เป็นสารทดแทนไขมันในอาหารไขมันต่ำ
- ใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหารซึ่งมีราคาถูกกว่าสารสังเคราะห์ทางเคมีและมีความปลอดภัยกว่า

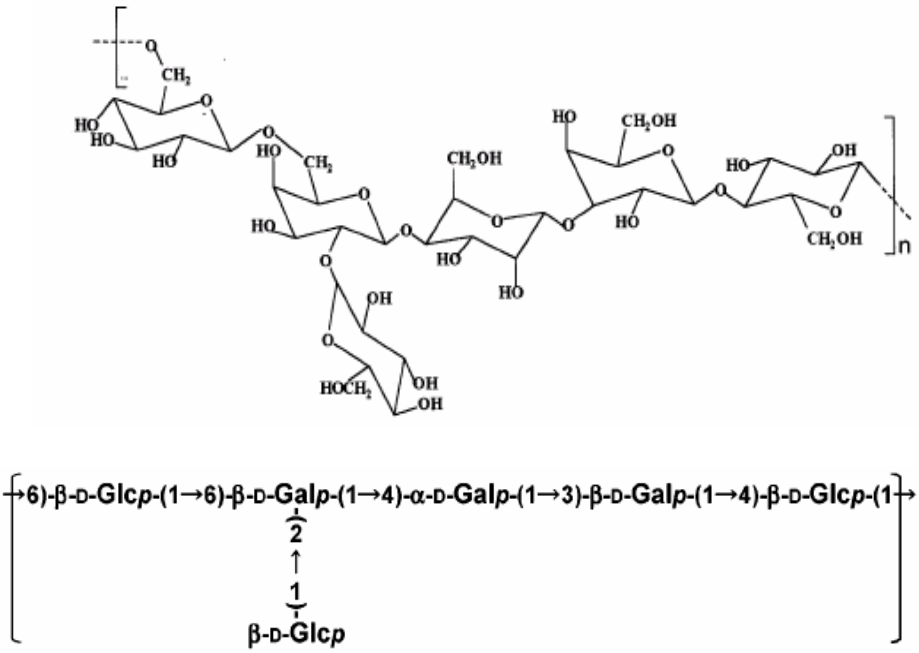
ข. ทางการแพทย์
- มีคุณสมบัติเป็นสาร Antibiotic
- รักษาโรคเนื้องอก
- ลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดให้กับผู้ป่วยเบาหวาน

2. คีเฟอรัน (Kefiran)

2.1 ลักษณะทั่วไปของคีเฟอรัน

คีเฟอรัน เป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลคโตสในอัตราส่วน 1:1 (ดังแสดงในภาพที่ 3) คีเฟอรันผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก (*Lactobacillus kefiranofaciens*) ที่แยกจากหัวเชื้อที่ใช้ในการหมักคีเฟอร์ ซึ่งเป็นนมเปรี้ยวพื้นบ้านที่ชาวรัสเซียเชื่อว่าเป็นยาอายุวัฒนะ โดยหัวเชื้อดังกล่าวมีชื่อว่า คีเฟอร์แกรน

โดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* จะผลิตคีเฟอรันซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ออกมาในรูปของ Broth kefiran หรือคีเฟอรันที่เชื้อผลิตและปล่อยออกสู่น้ำหมักและ Capsular kefiran ซึ่งเป็นคีเฟอรันที่เชื้อผลิตและยังติดอยู่กับผนังเซลล์ในรูปของแคปซูล คีเฟอรันจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000-4,000 กิโลดาลตัน โดยน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของ Capsular kefiran จะน้อยกว่าของ Broth kefiran (Yokoi *et al*., 1990) ซึ่งคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ในครั้งแรกจะอยู่บริเวณผิวหน้าเซลล์ แล้วจึงปล่อยออกสู่น้ำหมัก ลักษณะของคีเฟอรันที่สกัดได้จากน้ำหมักโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล (-20 องศาเซลเซียส) จะมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว ยืดหยุ่นได้ดี มีสีขาวออกเหลืองนวล คุณสมบัติเฉพาะของคีเฟอรันดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 3 โครงสร้างของคีเฟอรัน

Figure 3 The chemical structure of kefiran

ที่มา : Cheirsilp และคณะ (2003)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติเฉพาะของคีเฟอรัน

Table 1 Characteristics of kefiran

Test performed on kefiran	Properties of kefiran
Hydrolysis	Glucose and galactose only
Extraction with :	
(i) Cold water	Dissolved slowly
(ii) Hot water	Dissolved rapidly
Galactose : glucose ratio	1 : 1
Optical rotation	$+68^{\circ}$ (c =1, H_2O)

ที่มา : La Riviere และคณะ (1967 อ้างโดย Cheirsilp *et al*., 2003)

2.2 หัวเชื้อคีเฟอร์แกรน (Kefir grains)

คีเฟอร์แกรนเป็นก้อนเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ ซึ่งฝังตัวอยู่ในสารเมือกเหนียวประเภทโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส (คีเฟอรัน) เชื้อผสมนี้มีลักษณะเป็นก้อนเมือกตะปุ่มตะป่ำคล้ายดอกกะหล่ำ มีสีขาว ขนาดตั้งแต่ 5-20 มิลลิเมตร เมื่ออยู่ในน้ำนม คีเฟอร์แกรนสามารถเพิ่มขนาดและจำนวนได้ ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไป จะมีขนาดเท่ากับเมล็ดถั่ว ในขณะที่เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจะมีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ไปด้วย ดังนั้นคีเฟอร์แกรนจึงเป็นเสมือนเชื้อผสมที่ตรึงตัวเองอยู่บนก้อนเมือก ทำให้สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อได้อย่างต่อเนื่องไม่สิ้นสุด

การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์แกรน พบว่าจุลินทรีย์ที่อยู่ในคีเฟอร์แกรนประกอบด้วยยีสต์และแบคทีเรียแลคติก การศึกษายีสต์ที่แยกจากคีเฟอร์แกรนมีรายงานไว้ต่าง ๆ กัน โดย La Riviere (1963) พบ *Torulopsis holmii* และ *Saccharomyces delbrueckii* ในอัตราส่วนประมาณ 10:1 ยีสต์สองชนิดนี้มีประมาณ 1.4 ถึง $3.3x10^8$ เซลล์ต่อกรัมของก้อนเชื้อ Iwasawa และคณะ (1982) พบว่า *Saccharomyces exiguus* เป็นยีสต์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในคีเฟอร์แกรน นอกจากนั้นยังมีรายงานการพบ *Candida* (Torula) *kefir* และ *Candida pseudotropicalis* ในคีเฟอร์แกรนจากแหล่งอื่น ๆ สำหรับแบคทีเรียแลคติกนั้นส่วนใหญ่ได้แก่ *Lactobacillus* spp. โดยพบ *Leunostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. ประมาณร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ โดยมีรายงานการศึกษาในช่วงแรก ๆ ว่าแบคทีเรียแลคติกพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) ได้แก่ *Lactobacillus brevis*

(ATCC 8007) เป็นแลคโตบาซิลลัสที่พบมาก และมีบทบาทสำคัญในการสร้างเมือกคีเฟอรัน อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาต่อมาอีกหลายรายงานด้วยกัน ที่พบว่าแลคโตบาซิลลัสซึ่งมีอยู่มากในคีเฟอร์แกรน เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่พบเฉพาะในก้อนเชื้อผสมชนิดนี้ และให้ชื่อว่า *Lactobacillus kefiranofaciens*

นอกจากนี้การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์แกรนมีความสมดุลโดยธรรมชาติถึงแม้ว่าการหมักคีเฟอร์จะมิได้ใช้เทคนิคทำให้ปลอดเชื้อ ก็จะไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออื่น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiosis) เนื่องจากยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลในนมได้ จึงต้องอาศัยสารอาหารที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียแลคติกในขณะที่แบคทีเรียแลคติกต้องพึ่งพาสารเสริมการเจริญ (Growth factor) ที่สลายจากเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว

คุณสมบัติเฉพาะที่น่าสนใจของก้อนเชื้อคีเฟอร์แกรน จำแนกเป็น (Cheirsilp *et al*., 2003)

1. เซลล์ในก้อนเชื้อสามารถเพิ่มขนาดและจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง แต่ยังคงตรึงเซลล์อยู่ในก้อนเมือก

2. โดยปกติ ก้อนเชื้อสามารถเกิดการหมักได้เป็นเวลานาน ถ้าอยู่ในสภาวะเพาะเลี้ยงเช่นเดิม

3. ถึงแม้ว่าสภาวะที่ใช้ในการหมักจะไม่ได้ปลอดเชื้อ แต่จะไม่พบการปนเปื้อนในการหมัก ด้วยเหตุผลที่ไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะเนื่องมาจากการที่เชื้อตรึงตัวคล้ายห่อหุ้มตัวเองนั้นส่งผลให้เซลล์มีระบบป้องกันและสามารถดำเนินบทบาทของตัวเองต่อไปได้

4. การอยู่ร่วมกันของเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในก้อนเชื้อ ส่งผลให้เกิดกระบวนการหมักที่น่าสนใจ สารที่ได้จากการหมักมีคุณค่าทางโภชนาการและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนสามารถแสดงให้เห็นได้ว่าแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในก้อนเชื้อผสมนี้มีทั้งพวกที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น (Short rod) และแท่งยาวโค้ง (Curved rod) ซึ่งส่วนใหญ่จะตายและผนังเซลล์ย่อยสลายแล้ว โดยที่แบคทีเรียรูปร่างแท่งยาวนี้จะฝังตัวอยู่ในส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (ย้อมติดสี Ruthinium red) เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของกล้าเชื้อผสมชนิดนี้ พบว่าก่อนที่กล้าเชื้อจะมีลักษณะเป็นก้อนเหมือนดอกกะหล่ำนั้น เชื้อจะอยู่รวมกันในลักษณะเป็นแผ่นซึ่งมีด้านหนึ่งเรียบและอีกด้านขรุขระ เมื่อเลี้ยงในน้ำนมนานขึ้น แผ่นเชื้อนี้จะม้วนตัวเข้าหากันเรื่อยๆ จนเป็นก้อน โดยด้านที่เรียบของแผ่นเชื้อประกอบไปด้วยแบคทีเรียแท่งสั้น ส่วนด้านขรุขระจะมีทั้งยีสต์และแบคทีเรีย ส่วนแบคทีเรียที่เป็นแท่งยาวโค้งจะฝังตัวอยู่ในสารเมือก ซึ่งแบคทีเรียแท่งยาวดังกล่าวนี้ส่วนใหญ่เซลล์จะเกิดการสลายแล้ว (Autolyze) จึงเป็นที่เชื่อว่าแบคทีเรียที่ฝังตัวอยู่นี้มีบทบาทในการสังเคราะห์สารเมือก (คีเฟอรัน) (Marshall *et al*., 1984)

2.3 คุณสมบัติของคีเฟอรัน

มีสารพอลีแซคคาไรด์หลายชนิดที่ผลิตได้ในพืชชั้นสูง รา และยีสต์ และพบว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ ซึ่งคีเฟอรันเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อีกชนิดที่พบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านมะเร็ง (Antitumor) สามารถนำมาผลิตยารักษาโรคเนื้องอกได้ ทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นสารช่วยบำรุงร่างกายอีกด้วย (Shiomi *et al*., 1982)

Rodrigues และคณะ (2005) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสาร Antimicrobial agents ในสารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอรัน และผลการสมานแผลติดเชื้อจาก *Staphylococous aureus* ในหนู Wistar พบว่า หนูในกลุ่มที่ใช้ Kefir gel ความเข้มข้นร้อยละ 70 จะสามารถลดอาการอักเสบและสมานแผลให้เชื่อมติดกันภายใน 7 วันได้ และให้ผลการสมานแผลได้ดีกว่าหนูในกลุ่มที่สมานแผลด้วย neomycin – clostebol emulsion ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และยังศึกษาผลการใช้สารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอรันในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Salmonella*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Staphylococcus* และ *Escherichia coli*

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอรันในอาหารสัตว์ พบว่าสัตว์ในกลุ่มทดลองจะตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของตัวเองได้ดีขึ้น และสามารถลดระดับคลอเรสเตอรอลให้ต่ำลงและมีอาการติดเชื้อลดลง (http://www.torontoadvisors.com/Kefir/article1.htm 5/24/2005)

Santos และคณะ (2003) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial) ของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus* spp. 58 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์ โดยทำการทดสอบกับ Caco – 2 cells ซึ่งมีลักษณะคล้ายเซลล์ในลำไส้มนุษย์มีความทนกรด และทนเกลือน้ำดี ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Salmonella typhimurium* ใน Caco – 2 cells ได้ โดย *Lactobacillus acidophilus* CYC 10051 และ *Lactobacillus kefiranofaciens* CYC 10058 ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า *L. kefiranofacions* CYC 10058 ที่แยกได้ มีความสามารถในการผลิตคีเฟอรันและคีเฟอรันที่ผลิตได้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งอีกด้วย

Maeda และคณะ (2004) ศึกษาคุณสมบัติของคีเฟอรันต่อการลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือด และคุณสมบัติในการบรรเทาอาการท้องผูกในหนู โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus kefiranofaciens* ในอาหารสูตร Rice hydrolyzate (RH) เพื่อผลิตคีเฟอรัน จากนั้นนำคีเฟอรันที่ได้มาทำเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงหนู ผลการทดลองที่ได้พบว่าหนูที่มีอาการความดันโลหิตสูง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดคีเฟอรัน จะทำให้ความดันลดต่ำลงจากเดิมและมีระดับคลอเรสเตอรอลและระดับน้ำตาลในเลือดต่ำลง นอกจากนี้หนูที่มีอาการเป็นโรคเบาหวานมีระดับความรุนแรงของโรคลดลงจนเป็นที่น่าพอใจ

ในทางอุตสาหกรรมอาหาร ได้มีการพัฒนาคีเฟอรันเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่ม โดยใช้เป็นสารเพิ่มความหวาน นอกจากนี้ยังพบว่าคีเฟอรันสามารถนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียว สารทดแทนไขมัน และใช้เป็นสารอุ้มน้ำได้เป็นอย่างดี และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต ได้มีการเติมคีเฟอรันลงไปเป็นส่วนผสมของสารให้ความหวาน ซึ่งทางการแพทย์พบว่าสามารถตอบสนองต่อระบบ Immune response system ของร่างกายช่วยให้เกิดความผ่อนคลายในคนที่เกิดอาการเครียดได้ (Kobayama *et al*., 1997 and Cheirsilp *et al.*, 2003)

สำหรับประโยชน์ทางด้านสุขภาพอีกอย่างหนึ่งของผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์และคีเฟอรันพบว่า สามารถรักษาอาการโรคภูมิแพ้ ช่วยบำบัดอาการที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้ และยังมีการสำรวจผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์และโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของคีเฟอรันเป็นประจำพบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะตอบสนองต่อระบบการทำงานภายในร่างกายของผู้บริโภค ดังนี้ (http://www.torontoadvisors.com/Kefir/article1.htm 5/24/2005)

1. ช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยผลิตภัณฑ์นม (Milk digestibility)

ในผู้ป่วยบางรายที่มีลักษณะขาดแคลนเอนไซม์ย่อยนม หรือขาดเอนไซม์แลคแตสในกระเพาะอาหาร (Lactose maldigestion) การรับประทานผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์จะช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และเพิ่มเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการย่อยนม (β– galactosidase) ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับน้ำตาลแลคโตสจากผลิตภัณฑ์นมได้มากขึ้น

2. รักษาอาการโรคท้องร่วง (Recovery from diarrhea)

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO, 1995) แนะนำให้ผู้ปกครองรักษาอาการโรคท้องร่วงในเด็กโดยให้เด็กทานโยเกิร์ตหรือนมหมักคีเฟอร์ แทนนมสดชั่วคราวและยังสามารถป้องกันการขาดสารอาหารในขณะท้องร่วงได้อีกด้วย

3. ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Immunomodulating effects)

สารที่มีคุณสมบัติเป็น Prebiotic ในผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ให้เพิ่มจำนวนของ B-lymphocytes เพิ่มกิจกรรมการสังเคราะห์ natural killer cells และลดการเกิดภูมิแพ้จากอากาศ

4. ลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง (Reduction of nsk of cancer)

แพทย์สาขาระบาดวิทยาในฝรั่งเศส ทำการศึกษาพบว่า การรับประทานอาหารในปัจจุบันทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสเสี่ยงเป็นโรคมะเร็งกันมากขึ้น แต่ผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักหรือนมเปรี้ยวพื้นบ้านเป็นประจำจะช่วยรักษาอาการกระเพาะอาหารอักเสบ ช่วยยับยั้งเซลล์ผิดปกติในระบบลำไส้ให้ฝ่อลีบ จึงช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ได้

5. ควบคุมระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด (Blood Cholesterol levels)

เนื่องจากสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์จะมีคุณสมบัติเป็น Hypocholesterolemic properties คือมีระดับคลอเรสเตอรอลต่ำ จึงไม่เกิดการสะสมของระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด และยังช่วยป้องกันโรคหัวใจอุดตันได้อีกด้วย

2.4 การผลิตคีเฟอรัน

ปัจจุบันการศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตคีเฟอรันในญี่ปุ่นกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากประโยชน์ของคีเฟอรัน ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด ทำให้สารละลายมีความเข้มข้นขึ้น ใช้เป็นสารเพิ่มความเสถียร เป็นสารเพิ่มอิมัลชั่น ใช้เป็นสารทดแทนไขมัน หรือใช้เป็นสารผลิตเจล เป็นต้น (Cheirsilp *et al*., 2003)

Yokoi และคณะ (1990) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากเมล็ดคีเฟอร์ สามารถแยกและจำแนกแบคทีเรียผลิตแคปซูล 5 สายพันธุ์ ได้แก่ KPB-167A, KPB-167B, KPB-167C, KPB-167D และ KPB-167E หลังนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรหางนม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตพอลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสในอัตราส่วน 1:1 (คีเฟอรัน) ได้สูงสุด 300-400 มิลลิกรัม และจากพอลีแซคคาไรด์จำนวนดังกล่าว เซลล์จะปล่อยออกสู่น้ำหมักร้อยละ 65-80

Mitsue และ Fujio (1998) ศึกษาการเปลี่ยนรูปของคีเฟอรันที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 ซึ่งแยกได้จากเมล็ดคีเฟอร์ พบว่าสารละลายคีเฟอรันร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะเกิดเจลาทิไนซ์โดยอัตโนมัติเมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส) แต่เมื่อดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของคีเฟอรันโดยปฏิกิริยา Acylation จะได้เป็น Succinyl kefiran และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเจลแม้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส) ก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย Succinyl kefiran ร้อยละ1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (พีเอช 6.5) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม และใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางประเภทโลชั่นบำรุงผิวซึ่งให้ความรู้สึกเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังได้ดี

Mitsue และคณะ (1999) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตคีเฟอรัน *Lactobacillus kefiranofaciens* กลายพันธุ์โดยการใช้ UV และนำมาทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักพบว่า *L. kefiranofaciens* พันธุ์กลายสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 2.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 7 วัน นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตคีเฟอรันให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น โดยทดลองเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตคีเฟอรัน *L. kefiranofaciens* KF-75 (KF-75) ร่วมกับยีสต์ *Torulaspora delbrueckii* IFO-1626 (TD-1626) พบว่าให้อัตราการผลิตคีเฟอรันสูงถึง 3.74 กรัม

ต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าใช้แบคทีเรียแลคติกเพียงสายพันธุ์เดียวในการผลิต (2.38กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเดียวกัน

Micheli และคณะ (1999) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกชนิด แคปซูล-พอลีแซคคาไรด์ สายพันธุ์ *Lactobacillus* LM-17 จากเมล็ดคีเฟอร์ และหลังจากนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRSL และแยกสารละลายส่วนใสจากน้ำหมัก พบว่าสามารถสกัดคีเฟอรันบริสุทธิ์จากสารละลายส่วนใสดังกล่าวได้ 2 กรัมต่อลิตร

Cheirsilp และคณะ (2001) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* เพื่อผลิตคีเฟอรัน โดยศึกษาผลของค่าความเป็นกรด- ด่าง, ปริมาณสารตั้งต้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ต่ออัตราการผลิตเพื่อสร้างแบบจำลอง โดยจากการเลียนแบบจำลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันได้สูงสุดคือ การเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเจริญในช่วงแรกและเปลี่ยนเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่หมาะสมต่อการผลิตในช่วงหลัง นอกจากนี้ Cheirsilp และคณะ (2003) ยังศึกษาการผลิตคีเฟอรันโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus kefiranofaciens* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าอัตราการผลิตคีเฟอรันในสภาวะไร้อากาศ เท่ากับ 36 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตของเชื้อบริสุทธิ์ (24 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และจากการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมดังกล่าวในสภาวะมีอากาศ เชื้อทั้งสองตัวจะสามารถเจริญเติบโตร่วมกันได้ดีและสามารถผลิตคีเฟอรันในอัตราสูงสุดถึง 44 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองสุดท้ายเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมแบบกึ่งกะจะได้ความเข้มข้นของคีเฟอรันเท่ากับ 5.41 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 62 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 87 ชั่วโมง

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคีเฟอรันจากแบคทีเรียแลคติก

2.5.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. แหล่งคาร์บอน

Yokoi และ Watanabe (1992) ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. KPB– 67B สำหรับผลิตคีเฟอรัน จากผลการทดลองพบว่าน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและการผลิตคีเฟอรัน

Cheirsilp และคณะ (2001) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* เพื่อผลิตคีเฟอรัน โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราการใช้น้ำตาลแลคโตสจำเพาะของเซลล์ พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสมากกว่า 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้ค่าการ

เจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ลดลง สำหรับอัตราการใช้น้ำตาลแลคโตสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเกิน 60 กรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าคีเฟอรันจะประกอบด้วยกลูโคสและกาแลคโตสในอัตราส่วนที่เท่ากัน แต่จากการทดลองที่ใช้น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 ร่วมกับกาแลคโตสร้อยละ 5 เป็นสารตั้งต้นในการผลิตคีเฟอรัน กลับพบว่าปริมาณคีเฟอรันที่ได้จากการทดลองดังกล่าวจะมีปริมาณน้อยกว่าการใช้น้ำตาลแลคโตสร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน (Yokoi and Watanabe, 1992)

ข. แหล่งไนโตรเจน

สำหรับผลของแหล่งไนโตรเจน พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ทริปโตน ยีสต์สกัด เนื้อสกัดและ ไตรแอมโมเนียม ซิเตรต) ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตคีเฟอรันแตกต่างกันมากนัก แต่จะพบว่าปริมาณการผลิตคีเฟอรันจะลดลงเมื่อลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณคีเฟอรันสูงสุดที่ผลิตได้จะมีค่าเท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ทริปโตน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด และไตรแอมโมเนียม ซิเตรต) 2 กรัมต่อลิตร (Yokoi and Watanabe, 1992)

2.5.2 สภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง

ก. pH

จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* พบว่าเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตค่า pH ของน้ำหมักจะลดลง เนื่องจากเซลล์มีการผลิตกรดแลคติกออกมาสะสมในน้ำหมัก ถ้าปล่อยให้มีการหมักดำเนินต่อไป กรดแลคติคที่เพิ่มมากขึ้นจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของตัวแบคทีเรียแลคติกเอง (Yokoi and Watanabe, 1992)

Cheirsilp และคณะ (2001) ศึกษาผลของ pH ต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตคีเฟอรันจำเพาะของเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* โดยควบคุม pH ของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 4, 4.5, 5, 5.5 และ 6 จากผลการทดลองพบว่า ที่ pH 4 จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะต่ำสุด โดยที่ pH 5.0 จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด และที่ pH 4.5 จะให้อัตราการผลิตจำเพาะสูงสุด

ข. อุณหภูมิ

สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* พบว่าเมื่อควบคุมพีเอชของการเพาะเลี้ยงที่ 5.0 ในอาหารสูตร MRSL และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีความสามารถในการผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศา

เซลเซียส ความสามารถในการผลิตคีเฟอรันจะลดลงจากที่ 30 องศาเซลเซียส ร้อยละ 87 และ 83 ตามลำดับ (Yokoi and Watanabe, 1992)

ค. การให้อากาศ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคีเฟอรัน เป็นการเพาะเลี้ยงแบบไร้อากาศ Cheirsilp และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาผลของการผ่านก๊าซ CO_2 และ N_2 เข้าสู่ถังหมัก เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* ผลการศึกษาพบว่าก๊าซทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลแตกต่างกันต่อการผลิตคีเฟอรัน จากการศึกษาผลของการให้อากาศ พบว่าการให้อากาศจะทำให้ปริมาณการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แต่ทำให้ปริมาณคีเฟอรันที่ผลิตได้ลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของการกวนภายใต้สภาวะไร้อากาศพบว่าอัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แต่ทำให้ปริมาณคีเฟอรันที่ผลิตได้ลดลงเช่นเดียวกับการให้อากาศ

ง. การเติมเอทานอล

เนื่องจาก *Lactobacillus kefiranofaciens* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่อาศัยร่วมกับกลุ่มยีสต์ที่ผลิตเอทานอลในก้อนเชื้อคีเฟอร์แกรนแบบพึ่งพาอาศัยกัน จึงมีงานวิจัยที่สันนิฐานว่าเอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* ได้ แต่ผลการทดลองพบว่าการเติมเอทานอลในปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร ทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรันลดลง (Cheirsilp *et al*., 2003)

3. แป้งสาคู (Sago Starch)

3.1 ลักษณะโดยทั่วไปของแป้งสาคู

สาคูเป็นพืชเมืองร้อนตระกูลปาล์ม อยู่ในวงศ์ Palmae ที่พบมีอยู่ทั่วไปในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มียอดสีแดง และไม่มีหนาม (Metroxylon sagu Rottb.) และชนิดที่มียอดสีขาว และมีหนาม (Metroxylon rumphii Mart.) สาคูเป็นพืชที่ปลูกง่าย สามารถขึ้นได้ดีในที่ลุ่ม (มีน้ำขัง) และที่ชื้นแฉะ หรือที่ระบายน้ำได้ไม่ดี ที่พืชอื่นไม่สามารถขึ้นได้ โดยเฉพาะพื้นที่ชายเลนทางภาคใต้ของไทย (นพรัตน์ บำรุงรักษ์, 2536 อ้างโดย นิยม กำลังดี, 2539) ต้นสาคูสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการแตกหน่อเมื่อต้นเก่าตายลงก็จะมีต้นใหม่งอกมาแทนอยู่เรื่อย ๆ จึงไม่จำเป็นต้องปลูกทดแทน เมื่อต้นสาคูแก่เต็มที่จะมีจั่นดอกงอกออกตรงส่วนยอด และเมื่อออกดอกและให้ผลแล้วต้นสาคูจะสิ้นสุดระยะการเจริญเติบโตและจะยืนต้นตายเช่นเดียวกับต้นลาน ปกติต้นสาคูจะเริ่มโค่นเพื่อนำส่วนลำต้นมาสกัดแป้งได้เมื่ออายุประมาณ 9-10 ปี โดยสาคูต้นหนึ่งสามารถให้ผลผลิตแป้งได้สูงถึง 100-150 กิโลกรัม (ไพรัตน์ โสภโณดร, 2530 อ้างโดย นิยม กำลังดี, 2539)

การผลิตแป้งสาคูในประเทศไทยทำกันมากในภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงมา (กรรมวิธีการผลิตแป้งสาคูดังแสดงในภาพที่ 4) โดยนำต้นสาคูมาปอกเปลือกออกเหลือแต่ไส้ใน ซึ่งส่วนไส้ในต้นสาคูนั้นมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ประมาณร้อยละ 30 น้ำร้อยละ 50 และส่วนประกอบอื่น ๆ อีกร้อยละ 20 (องค์ประกอบทางเคมีของแป้งสาคูดังแสดงในตารางที่ 2) นำส่วนไส้ในมาขูดย่อยให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงแป้งที่ได้ไปยีบนผ้ากรองเพื่อให้แป้งตกลงไปในอ่างที่มีน้ำรองรับอยู่ ทำเช่นนี้จนแป้งออกหมดเหลือแต่กาก แป้งที่ได้จะมีสีขาวออกเหลือง และต้องนำแป้งที่ได้ไปผ่านการฟอกสีก่อนนำไปทำแห้ง เพื่อให้ได้แป้งที่มีสีขาวและได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค

ปัจจุบันนี้การผลิตแป้งสาคูมีไม่มากนัก เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตมีหลายขั้นตอนมีการใช้ประโยชน์ในขอบเขตที่จำกัด ประกอบกับในปัจจุบันนี้มีแป้งชนิดอื่นเข้ามาใช้แทนที่แป้งสาคูได้ เช่น แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากแป้งสาคูจึงน้อยลง

Felling the sago palm tree

↓

Splitting the trunk open lengthwise

↓

Removing the pith

↓

Crushing and kneading the pith to release the starch

↓

Washing and straining to extract the starch

from the fiberous residue

↓

Collection of the raw starch suspension in a settling container

ภาพที่ 4 กระบวนการผลิตแป้งสาคู

Figure 4 Proceeding to extract sago starch

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Sago 6/11/2006

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบทางเคมี ของแป้งสาคูเปรียบเทียบกับแป้ง ข้าว และมันสำปะหลัง (ต่อ 100 กรัม)

Table 2 Chemical composition of sago starch comparation with starch, rice and cassava starch (per 100 gram)

Composition	Sago	Starch	Rice	Cassava
Moisture, gram	14	12	12	9
Protein, gram	0.7	8.9	7.0	1.1
Fat, gram	0.2	1.3	0.5	0.5
Carbohydrate, gram	84.7	77.3	80	88.2
Calorie, cal	353	365	364	363
Vitamin B1, mg.	0.01	0.12	0.12	0.4
Calcium, mg.	11	16	5	28
Phosporus, mg.	13	106	140	287
Iron, mg.	1.5	1.2	0.8	4.4

แหล่งที่มา : Directorate for Nutrient, Department of Health (1972)

Ahmad และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพ-เคมีของแป้งสาคู พบว่าเม็ดแป้งสาคูมีขนาด 30 ไมโครเมตร มีความชื้นอยู่ระหว่างร้อยละ 10.6-20.0, เถ้าร้อยละ 0.06-0.43 , ไขมันร้อยละ 0.10-0.13, เยื่อใยร้อยละ 0.26-0.32, และโปรตีนร้อยละ 0.19-0.26 มีอะไมโลส ร้อยละ 24-31, มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,410 – 2,230 กิโลดาลตัน ส่วนอะไมโลเพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 6,700 – 9,230 กิโลดาลตัน อุณหภูมิของการเกิดเจลลาติไนเซชันของแป้งอยู่ระหว่าง 69.4-70.1 องศาเซลเซียส

3.2 การใช้ประโยชน์จากแป้งสาคู

ในประเทศมาเลเซียพบว่าแป้งสาคูมีความสำคัญคือเป็นสินค้าส่งออกอันดับ 5 รองจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรจำพวก กระดาษ ปาล์มน้ำมัน โกโก้ และยางพารา โดยส่วนใหญ่จะส่งออกไปยังประเทศในแถบยุโรปและอเมริกา ซึ่งจะใช้ประกอบอาหาร เพิ่มความข้นหนืดให้กับซุป หรือใช้ทำขนมจำพวกพุดดิ้ง (Pudding) สำหรับประเทศอินโดนีเซียและอินเดียนั้นจะนำแป้งสาคูไปต้มกับน้ำตาลเพื่อทำขนมหรือเยลลี่

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเพื่อพัฒนาการใช้ประโยชน์จากแป้งสาคูให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากการใช้ประกอบอาหารหรือขนมต่าง ๆ และใช้เป็นอาหารสัตว์เพียงอย่างเดียว โดยอาศัยความรู้และกระบวนการทางด้านวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชีวภาพและจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารไซโคลเด็กซ์ตริน (Solichien, 1995) การใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูง การผลิตไฮฟรุคโตสไซรัป ขนมปัง เส้นหมี่ และอาหารทารก (Gumbira-Sa'id, 1995) และการผลิตน้ำตาลกลูโคส (นิยม กำลังดี, 2539) หรือการพัฒนานำแป้งสาคูมาใช้เป็นสารยึดเกาะในการผลิตกระดาษ วัสดุสิ่งทอ และไม้อัด ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอุตสาหกรรมการผลิตยา ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม Soft drink บางชนิดและผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมท และยังรวมไปถึงการนำแป้งสาคูไปหลอมขึ้นรูปเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ นำไปทำเชื้อเพลิง ผลิตแอลกอฮอล์และเอทานอล (Abd-Aziz, 2002) เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากแป้งสาคูดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่3 แสดงการใช้ประโยชน์จากแป้งสาคู

Table 3 Utilization of Sago

Sago palm part	Usage/Utilization
Refined sago stach	An ingredient of noodles, vermicelli (beehoon), Kuah-Tiau, Biscuits, and many other foods
Sago fiber	Used industrially in products such as monosodium glutamate, glucose,
Sago pitch	caramel, (color milk), fructose, syrups, etc.
	Provides bulk for rumen fermentation
Sago fronds	Used as an animal feedstuff and in the livestock industry
	Used in the pulp and paper industries

ที่มา : Abd-Aziz (2002)

นิยม กำลังดี (2539) ได้ศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งจาก *Aspergillu niger* พบว่าสามารถย่อยแป้งสาคูดิบ และมีความสามารถในการผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูง ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* คือมีความเข้มข้นของแป้งสาคูดิบเริ่มต้นที่ร้อยละ 15 พีเอชของสารละลายเท่ากับ 5.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่สภาวะดังกล่าวนี้เอนไซม์จากเชื้อ *A. niger*ให้ค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 10 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุด 23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงแรกของการบ่ม

Yetti และคณะ (2000) ศึกษาการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. ย่อยแป้งสาคู พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ 55 องศาเซลเซียส และ 5.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความคงตัวในพีเอชที่ 3-7 และที่อุณหภูมิที่สูงถึง 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ได้มีความสามารถในการย่อยอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งสาคูให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยมีอัตราเร็วสูงสุดของการเกิดกิจกรรมเท่ากับ 391 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที และสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้คือ EDTA

Mohamad และคณะ (2002) ศึกษาการผลิต Kojic acid โดยใช้เชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 และใช้แป้งสาคูที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชั่นเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 8 ลิตร มีการกวนตลอดเวลา ใช้ความเข้มข้นของแป้งสาคูเริ่มต้น 140 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมัก 2 วัน พบว่าสามารถผลิต Kojic acid ได้เข้มข้นสูง 16.43 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองแบบกึ่งกะ มีการเติมแป้งสาคู 25 กรัมต่อลิตร จำนวน 4 ครั้ง มีการควบคุมการให้อากาศอิ่มตัวที่ระดับร้อยละ 40-50 พบว่าเมื่อควบคุมค่าพีเอชให้คงที่เท่ากับ 3 การผลิต Kojic acid จะลดลง (7.26 กรัมต่อลิตร) และปริมาณ Kojic acid สูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 31 กรัมต่อลิตร เมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอชของการหมัก

Charoenlap และคณะ (2004) ทดลองผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งสาคู โดยใช้เอนไซม์ Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) จากเชื้อ *Bacillus circulan* พบว่าอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อแป้งที่ 50ยูนิตต่อกรัมแป้งสาคู และปริมาณแป้งสาคูที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณไซโคลเด็กซ์ตรินสูงสุดร้อยละ 65 โดยมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตอยู่ในช่วง 4.5-5.0 และ 55-60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4. การย่อยสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ (Enzymatical hydrolysis)

4.1 เอนไซม์ย่อยแป้ง

เมื่อพิจารณาตามลักษณะของการทำงานของเอนไซม์ จะแบ่งได้ 3 กลุ่ม

4.1.1 เอนไซม์ย่อยภายในเส้นสายของกลูโคส (Endo-enzyme)

ก. แอลฟาอะไมเลส (Alpha-amylase ; EC 3.2.1.1 ; α (1,4)-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะภายในโมเลกุลของแป้ง โดยจะตัดโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จับกันด้วยพันธะ α-1,4 เท่านั้นไม่สามารถตัดพันธะ α-1,6 ได้ ลักษณะการทำงานเป็นการสุ่มตัดภายในเส้นสายของกลูโคส การทำงานของเอนไซม์ต้องการ Ca^{2+} เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5.5-9 และที่อุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส แอลฟาอะไมเลสสามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ เชื้อรา และแบคทีเรีย ในทางอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราและแบคทีเรียซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เมื่อใช้แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสารละลายแป้งจะทำให้ความหนืดและความสามารถในการย้อมติดสีไอโอดีนลดลงอย่างรวดเร็ว

4.1.2 เอนไซม์ย่อยปลายสายของกลูโคส (Exo-enzyme)

ข. กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase ; EC 3.2.1.3 ; γ (1,4)-glucan glucohydrolase) หรือเรียกว่า อะไมโลกลูโคสิเดส (Amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดน้ำตาลกลูโคสที่จับกันด้วยพันธะ α-1,4 และพันธะกิ่ง α-1,6 โดยการตัดพันธะกิ่งจะเกิดช้ากว่าการตัดพันธะ α-1,4 ในการย่อยแป้งให้ได้โมเลกุลของกลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟคเตอร์ (Cofactor) ในการทำกิจกรรม และจากรายงานเกี่ยวกับความคงตัวในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ โดย Fogarty และ Benson (1993 อ้างโดยวิชุดา เกตุใหม่, 2546) ซึ่งศึกษาถึงผลของพีเอชต่อความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวสูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 4.0 โดยค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 100 รองลงมาคือ ที่ค่าพีเอช 3.0 และ 5.0 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 96 และ 94 ตามลำดับ และผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเชื้อรา *A. niger* พบว่าที่อุณหภูมิในช่วง 25-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวสูงโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นร้อยละ 100 (วิชุดา เกตุใหม่, 2546)

ค. เบต้าอะไมเลส (Beta-amylase ; EC 3.2.1.2 ; β (1,4)-glucan maltohydrolase)เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะจากภายนอกเข้ามาภายใน โดยเริ่มจากปลายของอะไมโลสหรือ อะไมโลเพคตินจากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ เอนไซม์จะตัดพันธะ α-1,4 ของโมเลกุลของกลูโคสเป็นคู่ ๆ ไป ผลที่ได้จะเป็นน้ำตาลมอลโตส แต่เมื่อปฏิกิริยาเข้าใกล้จุดที่เป็นกิ่งก้านหรือพันธะ α-1,6 ของอะไมโลเพคติน เอนไซม์จะหยุดกิจกรรมทำให้เหลือโมเลกุลใหญ่ๆไว้มาก เบต้าอะไมเลสต้องการ Ca^{2+}

ในการทำกิจกรรม พบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในพืชชั้นสูง เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และพบได้ในถั่วหรือมันฝรั่งหวาน นอกจากนี้ยังสามารถสกัดเอนไซม์เบต้าอะไมเลสได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีน้ำหนักประมาณ 50 กิโลดาลตัล มีความเสถียรที่พีเอช 4-9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส

4.1.3 เอนไซม์ย่อยสายโซ่ข้าง (Debranching enzyme)

ง. ไอโซอะไมเลส (Isoamylase; EC 3.2.1.68; glucogen-6-gluconohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยจุดที่เป็นกิ่งก้านของกลูโคเจนและอะไมโลเพคตินได้ดี ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์ในการทำกิจกรรม สามารถดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอชที่ 3-4 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้สามารถแยกได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas amylodermosa*

จ. พูลูลาเนส (Pululanase; EC 3.2.1.4; pullulan 6-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะ α-1,6 ของพูลูแลน (Pullulan) และอะไมโลเพคติน แต่การทำกิจกรรมไม่สมบูรณ์เท่ากับการย่อยโดยใช้เอนไซม์ไอโซอะไมเลส และทำกิจกรรมกับไกลโคเจนได้ยาก สามารถย่อยได้สายกลูโคสที่มีความยาว 2-3 หน่วย ไม่สามารถย่อยจนได้กลูโคสโมเลกุลเดี่ยว เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในพืช สัตว์ และแบคทีเรีย เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 4.5-5.5 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4.2 กระบวนการย่อยแป้ง

กระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ส่วนใหญ่ใช้ในการผลิตไซรัป ซึ่งมีกระบวนการดังนี้ (ดังแสดงในภาพที่ 6)

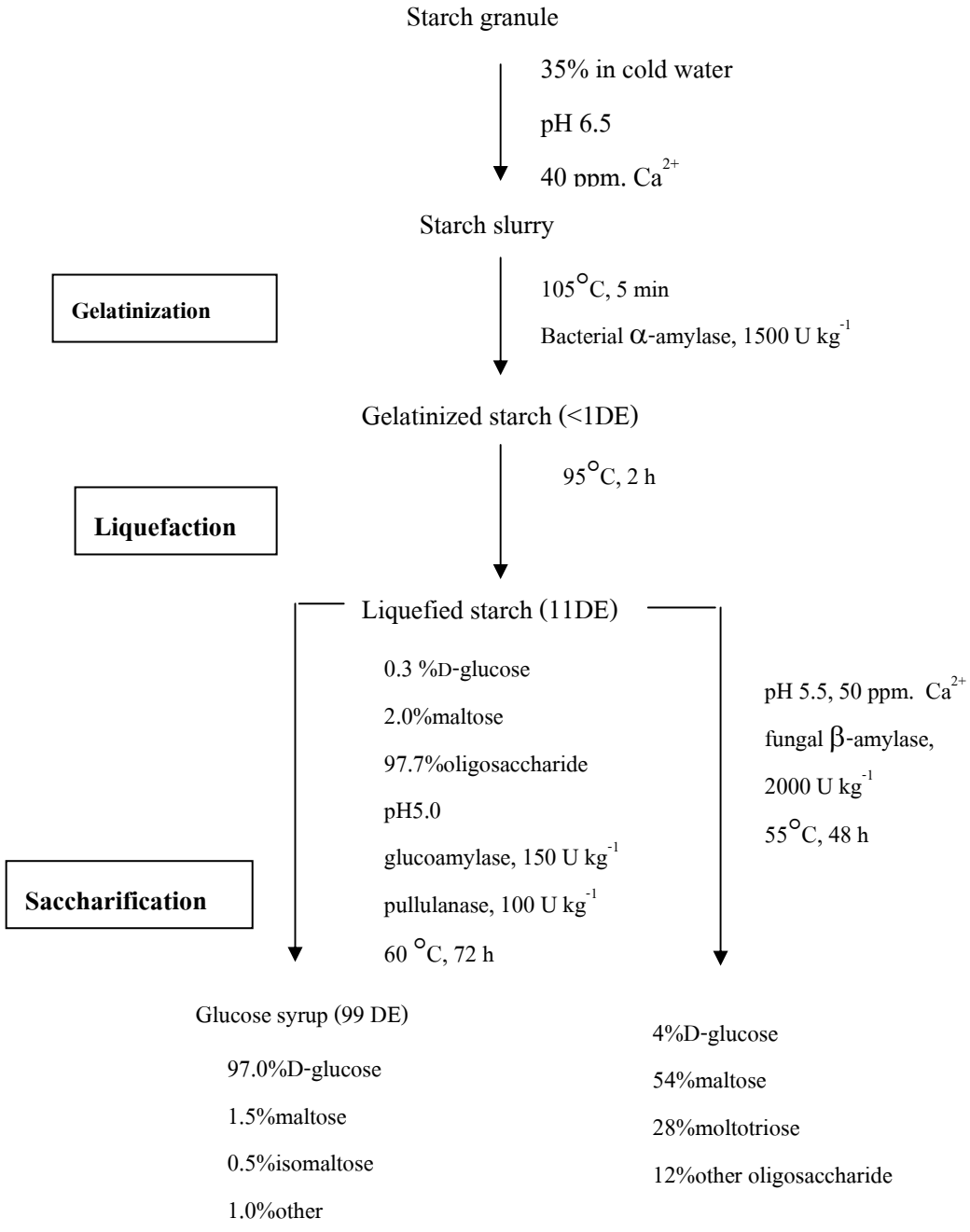
4.2.1 การเกิดเจลาทิไนเซชั่น (Gelatinization)

เริ่มด้วยการทำให้สารละลายแป้งร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่าขึ้นกับชนิดของแป้ง เพื่อให้เม็ดแป้งแตกออกมาละลายกับโมเลกุลของน้ำเกิดเป็นเจล เรียกว่า เจลาทิไนเซชั่น ซึ่งความหนืดของน้ำแป้งจะสูงขึ้น ในขั้นตอนถัดไปจึงต้องลดความหนืดลงด้วยการเติมสารช่วยลดความหนืด (Thinning reagent) เช่น กรด และเอนไซม์

4.2.2 การทำให้ใส (Liquefaction)

กระบวนการลดความหนืดของแป้งสุก คือทินนิง (Thinning) และ เด็กซ์ทรินไนเซชั่น (Dextrinization) ของแป้งที่ผ่านการทำให้สุก (เจลาทิไนเซชั่น) โดยลดพีเอชเป็น 1.5-2 และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 140-155 องศาเซลเซียส จะเกิดเจลอย่างสมบูรณ์พร้อมกับมีการย่อยสลายบางส่วน ถ้าในขั้นตอนนี้ใช้เอนไซม์แทนการเพิ่มอุณหภูมิก็จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ เอนไซม์ที่ใช้คือ α-amylase ผลผลิตส่วนใหญ่จะเป็นมอลโทเด็กซ์ทริน เนื่องจาก α-amylase ตัด

พันธะไกลโคซิล α-1,6 ไม่ได้ ยังอยู่ในรูปของลิมิตเด็กซ์ตรินที่มีกลูโคส 2-6 หน่วย ใช้เป็นสารเพิ่มเนื้อ (Filler) และสารเพิ่มความคงตัว (Stabilizer)ในอาหารได้



ภาพที่ 5 ขั้นตอนหลักของกระบวนการย่อยแป้ง

Figure 5 Diagram of starch hydrolysis

ที่มา : ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543

4.2.3 การทำให้หวาน (Saccharification)

กระบวนการนี้ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ β- ,α- , และ γ- amylase เพื่อไฮโดรไลซ์ผลผลิตจากการทำให้ใส ให้เกิดผลผลิตของน้ำตาลมอลโตส กลูโคส ขั้นตอนนี้อาจต้องเสริมด้วยเอนไซม์ย่อยสาขาแป้ง (Debranching enzyme) เพื่อย่อยสลายพันธะ α-1,6 และ α-1,3

4.2.4 การเปลี่ยนไอโซเมอร์ (Isomerization)

ใช้เอนไซม์ไอโซเมอเรส (Isomerase) เพื่อเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุคโตส หรือ ไซโลสเป็นฟรุคโตส ได้เป็นฟรุคโตสไซรัป หรือ ไอโซกลูโคส ซึ่งเป็นชื่อเรียกในยุโรป

4.3 การใช้แป้งเป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ

ในการนำแป้งมาใช้ประโยชน์เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ แป้งที่ใช้จะต้องนำมาผ่านการย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก หรือกลายเป็นพอลิเมอร์แซคคาไรด์สายสั้น ๆ เสียก่อน ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้ง ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยส่วนใหญ่มักจะใช้เอนไซม์เป็นตัวทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ดังกล่าว และแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วและนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นพบได้ 2 รูปแบบ คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซคคาไรด์

Fabiano และ Perego (2002) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากเชื้อ *Enterobacter aerogenes* โดยใช้แป้งไฮโดรไลเซสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนำแป้งข้าวโพดมาผ่านการ pretreat ด้วยความร้อนก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ได้สมมูลน้ำตาลเด็กซ์โตรสที่ร้อยละ 15-20 แล้วใช้น้ำตาลที่ได้ (ที่ความเข้มข้นดังกล่าว) เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้ผลผลิตคิดเป็นพลังงานเอลทาลปีเท่ากับ 67.3 กิโลจูนต่อโมล

ตารางที่ 4 แสดงผลผลิตจากการย่อยแป้ง

Table 4 Products from hydrolyzed starch

Composition	Content (%)
Glucose	85.0
Maltose	2.6
Trisaccharide	0.7
Oligosaccharide	6.85

ที่มา : ดัดแปลงจาก Fabiano และ Perego (2002)

ในกระบวนการย่อยแป้งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้โดยง่าย แต่บางครั้งในการนำแป้งมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อนั้น ไม่จำเป็นต้องทำการย่อยแป้งจนเสร็จสมบูรณ์ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถนำโอลิโกแซคคาไรด์ไปใช้ในการเจริญได้เช่นเดียวกัน

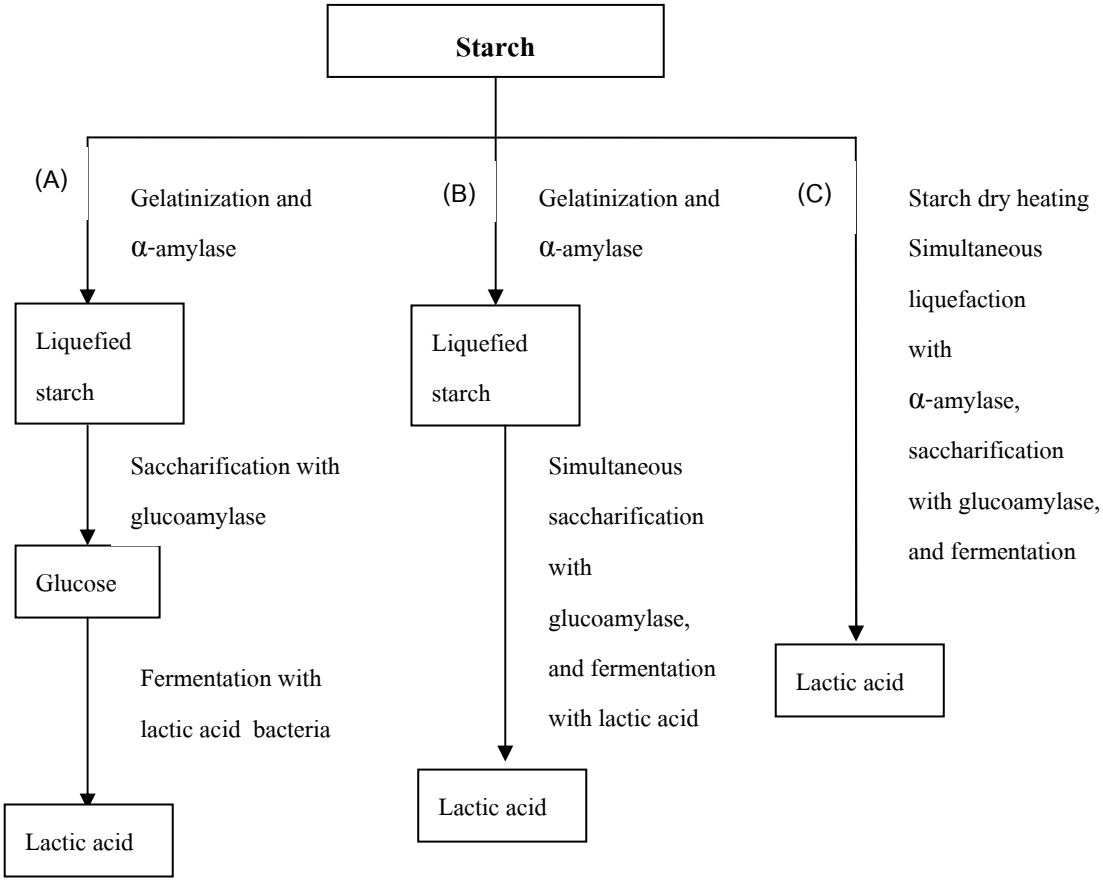
Gopal และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Bifidobacterium lactis* DR10 และ *Lactobacillus rhamnosus* DR 20 โดยใช้ ทรานส-โอลิโกแซคคาไรด์ พาวเดอร์ (TOS-P) ที่ประกอบด้วยไดแซคคาไรด์ ไตรแซคคาไรด์ เตตระแซคคาไรด์ และ เพนตะแซคคาไรด์ เป็นสารตั้งต้นนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นสารตั้งต้นลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้โอลิแซคคาไรด์ได้

Gaspas และคณะ (2005) ศึกษาการแยกองค์ประกอบในแกนกลาง (ซัง) ข้าวโพด โดยย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทนอุณหภูมิสูง ที่ 120 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 (0.05โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์) พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ จากซังข้าวโพด 100 กรัม จะได้แป้งร้อยละ 99.8 ซึ่งนำไปผลิตเป็นกลูโคสได้ 25.36 กรัม และสามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้ต่อไป

นอกจากนี้ยังมีการสนใจศึกษาการรวมกระบวนการย่อยแป้งร่วมกับการเลี้ยงเชื้อในคราวเดียวกัน(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) เนื่องจากพบว่า สามารถลดขั้นตอนที่ยุ่งยากให้สั้นลง ทั้งยังเป็นการประหยัดเวลา และต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย

Linko และ Javanainen (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากข้าวบาร์เล่ย์ โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* NRRL B-441 และเปรียบเทียบกระบวนการย่อยแป้งจากข้าวบาร์เล่ย์ โดยใช้การย่อยแป้งทีละขั้นตอนและแยกจากกระบวนการหมักกรดแลคติก (ดังแสดงในภาพที่6, A) สำหรับในภาพที่6, B เป็นการรวมขั้นตอนการแซคคาริฟิเคชั่นร่วมกับการหมัก และในกระบวนการสุดท้ายที่ทำการศึกษาจะเป็นการรวมกระบวนการย่อยแป้งทั้งหมดพร้อมกับการเลี้ยงเชื้อไว้ด้วยกัน (ดังแสดงในภาพที่ 6, C) โดยใช้ความเข้มข้นของแป้งที่ร้อยละ 26–34 และความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม (อัตราส่วนอะไมเลส:กลูโคอะไมเลส เท่ากับ 1:1) ที่ 0.02-0.2 มิลลิลิตรต่อ100 กรัมแป้ง ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 จากผลการทดลอง พบว่า ในกระบวนการ AและB เอนไซม์ผสมสามารถย่อยแป้งได้หมดภายในเวลา 24 ชั่วโมง แต่ผลิตกรดแลคติกได้เพียงร้อยละ 23-68 เนื่องจากปริมาณกลูโคสที่สูงในช่วงแรกจะเป็นตัวยับยั้งการผลิตของเชื้อ และในกระบวนการ C

ซึ่งเป็นการรวมกระบวนการให้ผลผลิตสูงถึงร้อยละ 87-98 นอกจากนี้ จากผลการทดลองยังพบว่า ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นที่จะเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลสำหรับเลี้ยงเชื้อควรอยู่ในช่วง 100-170 กรัมต่อลิตร จึงจะไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ จากผลการทดลองที่ได้ในการศึกษานี้พบว่า การรวมกระบวนการย่อยแป้งและผลิตกรดแลคติกไปพร้อมกันจะช่วยในด้านของการประหยัดเวลา ลดขั้นตอนหรือกระบวนการผลิตให้น้อยลงแต่ได้ผลผลิตที่สูงและยังช่วยลดต้นทุนการผลิตได้อีกด้วย



ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตกรดแลคติกจากการย่อยแป้ง

Figure 6 Various process alternatives for lactic acid production from starch

ที่มา : Linko และคณะ (1996)

Roy และคณะ (2000) ศึกษารูปแบบและกระบวนการย่อยแป้งเพื่อใช้ปั่นสารตั้งต้นในการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติก จากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* (NCIM 2365) โดยเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการย่อยแป้งได้กลูโคส (Simple saccharification, SS) กระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งเป็นสารตั้งต้น (Simple fermentation, SF) และการรวมกระบวนการย่อยแป้งและการหมักไปพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกรดแลคติก และอัตราการผลิตที่ได้จากการผลิตแบบ SS+SF จะได้กรดแลคติก 163 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลา 80 ชั่วโมง ในขณะที่ SSF ได้ปริมาณกรดแลคติกเท่ากันแต่ใช้เวลาในการผลิตเพียง 40 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 20

Charoenlap และคณะ (2004) นำเสนอรายงานการผลิตกรดแลคติก (L+) จากเชื้อ *Lactobacillus casei* โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลายชนิด เช่นแป้งมันฝรั่ง, แป้งข้าวโพด, หางนม และแป้งสาคู ซึ่งกระบวนการผลิตที่รวมขั้นตอนการย่อยแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนไปพร้อมกับการเลี้ยงเชื้อกำลังเป็นที่สนใจ เนื่องจากพบว่าสามารถลดขั้นตอน ประหยัดเวลาและลดต้นทุนการผลิตได้

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันฝรั่ง โดยใช้เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* ทำการเลี้ยงเชื้อและย่อยแป้งด้วยกระบวนการ SSF ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 0.85-0.92 กรัมต่อลิตร จากแป้งมันฝรั่ง 20 กรัม โดยใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมง

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแป้งและวัสดุเศษเหลือทางอาหารโดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011 ร่วมกับกระบวนการ SSF และใช้เอนไซม์อะไมเลสในการย่อยสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคสสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 19.5 กรัมจากวัสดุเศษเหลือที่เป็นสารตั้งต้น 200 กรัม

Tanaka และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากฟางข้าวโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus deldrueckii* IFO 3202 และใช้เอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยฟางข้าวร่วมกับกระบวนการ SSF พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 28 กิโลกรัมต่อเมตรฟางข้าว โดยใช้เวลาเพียง 36 ชั่วโมง

Saha (2006) ศึกษาการผลิตแมนนิทอลจากเชื้อ *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 โดยใช้อินนูลินเป็นสารตั้งต้นและอาศัยการทำงานของเอนไซม์อินนูลิเนสในการย่อยสารตั้งต้นร่วมกับกระบวนการ SSF ในการผลิต พบว่าสามารถผลิตแมนนิทอลได้สูงสุด 207.4 กรัม ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่ากระบวนการผลิตแบบเดิมที่สามารถผลิตแมนนิทอลได้เพียง 106.2 กรัม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการย่อยแป้งสาคูด้วยเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กพร้อมการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตคีเฟอรันด้วยกระบวนการ SSF
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันเมื่อใช้แป้งสาคูเป็นสารตั้งต้น

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาผลของการให้ความร้อนแก่แป้ง พีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของแป้ง สัดส่วนของเอนไซม์ต่อแป้งสาคู และอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลสในการย่อยแป้งสาคูด้วยเอนไซม์พร้อมการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตคีเฟอรัน จากนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น และศึกษาการขยายขนาดการทดลองในถังหมัก ที่มีการควบคุมพีเอช

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบถึงกระบวนการผลิตคีเฟอรันเมื่อใช้แป้งสาคูเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น
2. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสาคูพร้อมทั้งผลิตคีเฟอรันที่มีประสิทธิภาพและใช้ระยะเวลาสั้น
3. สามารถลดต้นทุนการผลิตคีเฟอรันโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาต่ำอย่างแป้งสาคูเป็นสารตั้งต้นในการผลิต