บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ตรินไกลโคซิลทรานเฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยแป้ง โครงสร้างของไซโคลเด็กซ์ตรินประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นวงกลมด้วยพันธะ α-1,4-glycosidic โดยไซโคลเด็กซ์ตรินหลักมี 3 ชนิด คือ แอลฟาไซโคลเด็กซ์ตริน (cyclohexaamylose), เบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (cycloheptaamylose) และ แกมมาไซโคลเด็กซ์ตริน (cyclooctaamylose) สารประกอบไซโคลเด็กซ์ตรินมีคุณสมบัติในการรับสารอินทรีย์ภายนอก (guest molecule) เข้าไปในช่องว่างระหว่างโมเลกุลหรือโพรงโมเลกุล (cavity) ของไซโคลเด็กซ์ตริน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบรวม (inclusion complex) ไซโคลเด็กซ์ตรินไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ข้อดีของไซโคลเด็กซ์ตรินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ของการเพิ่มคุณสมบัติการละลายของโมเลกุลอิสระอื่นๆ (guest) เพิ่มความคงตัว ลดการระเหย ลดการสลายตัวเนื่องจากความร้อนและสารเคมี ป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมี เป็นต้น จึงนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ เช่น ใช้ในการห่อหุ้มยา เครื่องสำอาง พลาสติก (Kim *et al.*, 1997) การเกษตร และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการตรึงกลิ่น รส และสีของอาหาร (อรุณี ตรีศิริโรจน์ และคณะ, 2539) ปัจจุบันไซโคลเด็กซ์ตรินมีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทั้งในรูปของไซโคลเด็กซ์ตรินบริสุทธิ์และมีการนำเข้าในลักษณะสารที่ผ่านกระบวนการทำปฏิกิริยากับไซโคลเด็กซ์ตรินแล้ว เช่น สารแต่งกลิ่นรสในน้ำหัวเชื้อ เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง ซึ่งการพัฒนาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากวัตถุดิบภายในประเทศถือว่าเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมทั้งทางด้านอาหารและยา ทำให้ลดการนำเข้าจากต่างประเทศได้

ปัจจุบันเอนไซม์ CGTase ที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินมีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase จึงเป็นก้าวแรกในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินภายในประเทศ โดยเอนไซม์ CGTase ผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus macerans* (Rha *et al.*, 2005), *Bacillus stearothermophilus* (Rahman *et al.*, 2004), *Bacillus circulans* (Vassileva *et al.*, 2005), *Klebsiella pneumoniae* (Gawande and Patkar, 2001), *Paenibacillus macerans*

(Rimphanitchayahit *et al.*, 2005), *Thermoanaerobacter* sp. (Kim *et al.*, 1997) เป็นต้น ซึ่ง *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูง สามารถแยกได้จากแหล่งต่างๆ เช่น แยกจากมันฝรั่งเน่า (Pakzad *et al.*, 2004), ดิน (Mahat *et al.*, 2004), ดินจากสวนยาง (Illias *et al.*, 2002), ข้าวสาลีและรำข้าวสาลี (Larsen *et al.*, 1998), น้ำพุร้อน (Rahman *et al.*, 2004) เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากแหล่งต่างๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อที่คัดเลือกได้โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้เพื่อนำมาผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ และศึกษาแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

บทตรวจเอกสาร

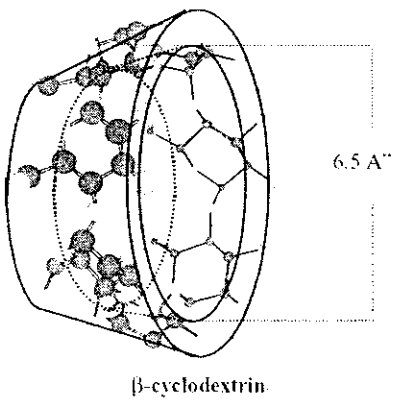
1. ไซโคลเด็กซ์ตริน (Cyclodextrin, CD)

1.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของไซโคลเด็กซ์ตริน

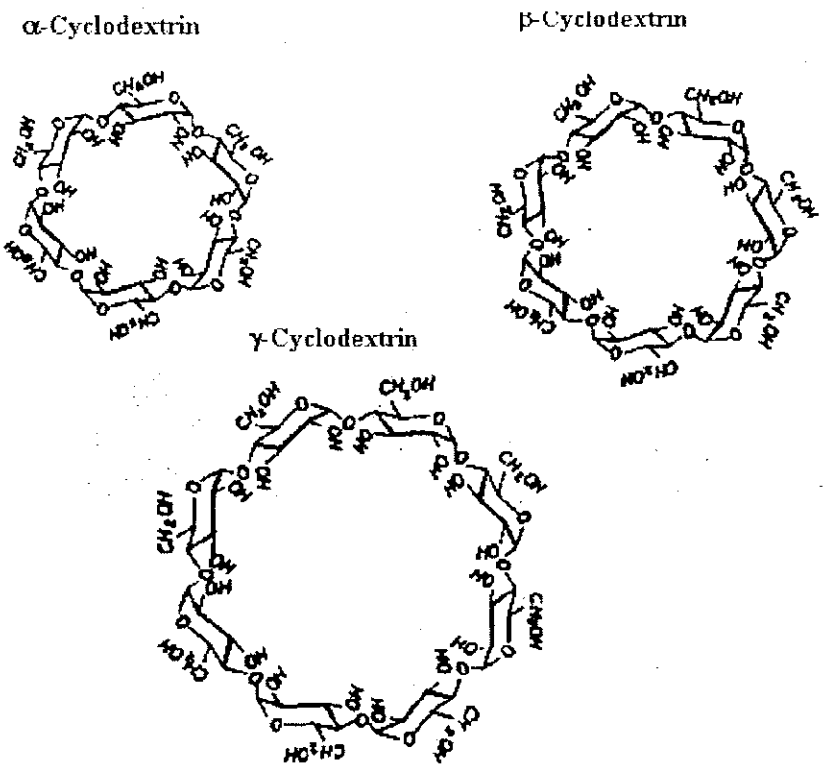
ไซโคลเด็กซ์ตริน (cycloamylose, schardinger-dextrin) มีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวน ดังภาพที่ 1 ประกอบด้วย glucopyranose เชื่อมกันด้วยพันธะ α-1,4-glycosidic เป็น non-reducing maltooligosaccharide ไซโคลเด็กซ์ตรินผลิตจากแป้งโดยเอนไซม์ cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) จะย่อยแป้งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ แล้วเชื่อมปลายทั้งสองข้างเกิดเป็นโมเลกุลวงแหวนเนื่องจากเอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยความยาวของโซ่ได้อย่างจำเพาะ จึงทำให้ผลที่ได้เป็นวงแหวนของไซโคลเด็กซ์ตรินซึ่งอาจจะมี glucopyranose 6-12 หน่วยต่อ 1 วงแหวน รูปแบบของวงแหวนโดยทั่วไปประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส 6, 7 หรือ 8 โมเลกุล ซึ่งเรียกว่า α-CD , β-CD และ γ-CD ตามลำดับ ดังภาพที่ 1 (b) ไซโคลเด็กซ์ตรินเหล่านี้สามารถรวมกับโมเลกุลต่างๆ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วทำให้คุณสมบัติของโมเลกุลเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงไป เช่น ความสามารถในการละลาย คุณสมบัติการระเหย และความคงตัวของสารเคมี (Hedges, 1992)

Hedges (1992) รายงานว่าใน ค.ศ. 1891 Villiers เป็นผู้ที่อธิบายเกี่ยวกับไซโคลเด็กซ์ตรินโดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus amylobacter* ในอาหารที่มีแป้ง แล้วทำการแยกและศึกษาคุณลักษณะของผลผลิตที่ได้ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกและเรียกผลผลิตนี้ว่า cellulosine ต่อมาใน ค.ศ. 1903 Schardinger ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย พบว่า *Bacillus macerans* ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งแล้วให้ผลผลิตเป็นไซโคลเด็กซ์ตริน การค้นพบไซโคลเด็กซ์ตรินโดย Schardinger นี้เป็นแหล่งอ้างอิงที่สำคัญ หลังจากนั้นใน ค.ศ. 1931 Pringshein ได้ศึกษาพบว่าไซโคลเด็กซ์ตรินสามารถรวมกับโมเลกุลอื่นๆ เกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้

ต่อจากนั้นใน ค.ศ. 1950 Freundenberg ได้อธิบายโครงสร้างทางเคมีของไซโคลเด็กซ์ตรินและใน ค.ศ. 1957 French ได้สรุปเกี่ยวกับไซโคลเด็กซ์ตรินซึ่งครอบคลุมถึงการผลิตและสมบัติทางเคมีของไซโคลเด็กซ์ตริน จากการศึกษาของ French นี้จึงเป็นพื้นฐานของการศึกษาเรื่องต่างๆ ของไซโคลเด็กซ์ตรินในเวลาต่อมา



(a)



(b)

ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ตริน

(a) β-cyclodextrin (b) α-, β- and γ- cyclodextrin

Figure 1 Structure of cyclodextrins

(a) β-cyclodextrin (b) α-, β- and γ- cyclodextrin

ที่มา: Yanez และคณะ (2004)

โครงสร้างของไซโคลเด็กซ์ตรินเป็นโมเลกุลรูปวงแหวนมีกลุ่มไฮดรอกซิลข้างนอกโมเลกุล ซึ่งมีผลต่อการละลายของไซโคลเด็กซ์ตริน ส่วนอะตอมของไฮโดรเจนและกลุ่มกลูโคซิดิก ออกซิเจน (glucosidic oxygen groups) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลมีผลกระทบต่อการไม่ชอบน้ำของไซโคลเด็กซ์ตริน โดยภายในที่ไม่ชอบน้ำนี้จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอินทรีย์ที่เข้ามารวมตัว เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น คาร์บอน 6 อะตอมของโมเลกุลกลูโคสสามารถหมุนอย่างอิสระมีผลทำให้ปลายโพรงด้านหนึ่งแคบกว่าด้านที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่จับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 (Hedges, 1992) ไซโคลเด็กซ์ตรินสามารถรวมกับโมเลกุลอิสระอื่นๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติที่ต้องการทางเคมีและทางกายภาพ เช่น ความสามารถในการละลาย การระเหย และความเสถียรทางเคมี

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของไซโคลเด็กซ์ตรินมีความสำคัญต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารต่างๆ และการประยุกต์ใช้ของสารประกอบเชิงซ้อนของไซโคลเด็กซ์ตริน คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเป็นตัวกำหนดความเหมาะสมของโมเลกุลอิสระที่จะรวมกับไซโคลเด็กซ์ตรินแต่ละชนิด เช่น ขนาดโพรงของไซโคลเด็กซ์ตรินที่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลอิสระ เช่น α-CD จะใช้ในการผลิตสารประกอบเชิงซ้อนกับสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งมีคาร์บอน 4 อะตอม หรือต่ำกว่า ส่วน γ-CD ใช้ในการผลิตสารประกอบเชิงซ้อนกับสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และสภาวะจำเพาะของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเท่านั้น เช่น อุณหภูมิ พีเอช (Hedges, 1992)

ลำดับความสามารถในการละลายน้ำของไซโคลเด็กซ์ตริน ทั้ง 3 ชนิด คือ $\beta < \alpha < \gamma$-CD เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความสามารถในการละลายของไซโคลเด็กซ์ตรินเพิ่มขึ้นด้วยดังตารางที่ 1 ข้อแตกต่างนี้เกิดขึ้นเนื่องจากปริมาณแรงดึงในวงแหวนที่ต่างกัน โดยใน β-CD กลุ่มไฮดรอกซิล ตัวที่ 2 และ 3 ของโมเลกุลกลูโคสที่ใกล้กันชี้ไปในทางที่ทำปฏิกิริยาด้วยกันกับตัวอื่นๆ ซึ่งทำให้กลุ่มไฮดรอกซิลตัวที่ 2 และ 3 ไม่เกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำ และแข็งแรงกว่ากลุ่มไฮดรอกซิลที่เหมือนกันใน α- และ γ-CD ส่งผลให้ความสามารถในการละลายของ β-CD ลดลง (Manor and Saenger, 1972)

ความคงตัวของไซโคลเด็กซ์ตรินสัมพันธ์กับความร้อน ข้อมูลที่ได้จากเครื่อง scanning colorimeter โดยอาศัยการสแกนพลังงานความร้อนของ β-CD แผนภาพแสดงการบันทึกอุณหภูมิของ α-, β- และ γ-CD เหมือนกันทุกประการ จากการศึกษาพบว่าภายใต้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ไม่มีปฏิกิริยาการดูดความร้อนหรือคายความร้อนที่สังเกตได้ การดูดซับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสมีผลทำให้น้ำที่มีอยู่ในผลึกของไซโคลเด็กซ์ตรินเกิดการระเหย หลังจาก

นั้นไม่เกิดปฏิกิริยาใดๆขึ้น จนกระทั่งอุณหภูมิสูงถึง 300 องศาเซลเซียส ความร้อนจะถูกดูดซับอีกครั้งมีผลทำให้เกิดการหลอมเหลวของผลึกและเกิดการสลายตัวของไซโคลเด็กซ์ตริน

ตารางที่ 1 การละลายของไซโคลเด็กซ์ตรินในน้ำ (กรัม/100 มิลลิลิตร)

Table 1 Solubility of cyclodextrins in water (g/100mL)

Temperature	Solubility (g/100 mL)		
(°C)	α-CD	β-CD	γ-CD
25	12.8	1.80	25.6
45	29.0	4.50	58.5
60	66.2	9.00	129.5

ที่มา: ดัดแปลงจาก Manor และ Saenger (1972)

การดูดความชื้นของไซโคลเด็กซ์ตรินซึ่งทดลองโดยนำไซโคลเด็กซ์ตรินที่แห้งสนิทไปวางไว้ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ความชื้นของ α- และ β-CD ถึงจุดสมดุล มีความชื้นร้อยละ 12 และ 23 ตามลำดับ ในขณะที่ความชื้นของ γ-CD ใกล้ถึงจุดสมดุล แต่ยังมีการดูดความชื้นจากบรรยากาศ และเมื่อเพิ่มเวลาอีก 48 ชั่วโมง ความชื้นของ γ-CD จึงถึงจุดสมดุลซึ่งพบว่ามีความชื้นร้อยละ 17 คุณสมบัติของไซโคลเด็กซ์ตรินเรื่องสมดุลความชื้นและพฤติกรรมการไหลคล้ายสมบัติของแป้ง

ไซโคลเด็กซ์ตรินถูกย่อยได้ด้วยกรดแก่ อัตราการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิ เมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นอัตราการย่อยก็จะเพิ่มขึ้นด้วย อัตราการย่อย β-CD ช้ากว่าอัตราการย่อยของแป้งภายใต้ความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิเดียวกัน แต่ไซโคลเด็กซ์ตรินทนต่อการย่อยด้วยด่าง

ไซโคลเด็กซ์ตรินทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสในระดับที่แตกต่างกัน เนื่องจากโครงสร้างของไซโคลเด็กซ์ตรินมีกลูโคสต่อกันเป็นวงไม่มีปลายสาย จึงไม่ถูกย่อยโดยกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรือเบต้าอะไมเลส (β-amylase) ซึ่งต้องการปลายสายในการย่อย แอลฟาอะไมเลสบางชนิดย่อย α- หรือ β-CD ได้ ในขณะที่ไม่สามารถย่อย γ-CD ได้ อัตราการย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสของไซโคลเด็กซ์ตรินน้อยกว่าอัตราการย่อยของแป้ง (Hedges, 1992) เมื่อย่อยไซโคลเด็กซ์ตรินด้วยเอนไซม์ดังกล่าวได้ผลผลิตเป็นกลูโคส และโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ซึ่งมีปริมาณสูงสุดเท่ากับจำนวนหน่วยของกลูโคสในไซโคลเด็กซ์ตรินที่ถูกย่อย

1.2 การใช้ประโยชน์ของไซโคลเด็กซ์ตริน

เนื่องจากไซโคลเด็กซ์ตรินมีโมเลกุลเป็นรูปวงแหวน ทำให้สามารถรวมกับโมเลกุลอิสระอื่นๆ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งอาจอยู่ภายในหรือภายนอกโมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ตรินทำให้คุณสมบัติของโมเลกุลนั้นๆ เปลี่ยนแปลง

การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโมเลกุลอิสระอื่นๆ กับไซโคลเด็กซ์ตรินทำให้เกิดผลดีมากมาย ซึ่งรวมถึงความสามารถในการละลายของโมเลกุลอิสระเพิ่มขึ้น โมเลกุลอิสระมีความคงตัวมากขึ้น ทำให้ป้องกันการระเหย ลดการสลายตัวของโมเลกุลอิสระ เนื่องจากความร้อนหรือแสง ป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีอื่นๆได้ นอกจากนี้ยังสามารถกำหนดทิศทางปฏิกิริยาเคมี และการแยกจากกันของสารเคมีต่างๆ จากข้อดีเหล่านี้จึงมีการนำไซโคลเด็กซ์ตรินมาใช้ในงานต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อาหาร ยา การวิเคราะห์ การวินิจฉัย เคมีภัณฑ์เกษตร เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขอนามัย และอุตสาหกรรมต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ตรินการละลายของสารประกอบจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่งภายในโพรงของไซโคลเด็กซ์ตรินซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยส่วนที่ชอบน้ำ ผลที่ได้ทำให้การละลายในน้ำเพิ่มขึ้น การละลายในน้ำที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีความสำคัญในทางเภสัชกรรม คือ เมื่อยามีการละลายไม่เพียงพอจะทำให้แพทย์ต้องใช้ยาในปริมาณสูงเพื่อที่จะให้การรักษาคนไข้ได้ผล ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อน จะช่วยเพิ่มปริมาณของยาให้ละลายในเนื้อเยื่อได้มากขึ้น ทำให้ปริมาณของยาที่ต้องการใช้ในการรักษาต่ำลง ทั้งยังให้ผลเหมือนกับยาที่ยังไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อน

ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ไซโคลเด็กซ์ตรินมีผลทำให้รสชาติและส่วนผสมอื่นๆของอาหารดีขึ้น ใช้เพิ่มความใสของไซรัปในส้มกระป๋องโดยไซโคลเด็กซ์ตรินเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ hesperidin ซึ่งเป็นสารที่มีผลทำให้ไซรัปมีสีคล้ำ ดังนั้นเมื่อเกิดสารเชิงซ้อนจึงทำให้ได้ไซรัปที่มีความใส β-CD สามารถที่จะลดความขมในน้ำผลไม้ได้โดยลด naringin และ limonin ซึ่งเป็นสารที่ให้ความขมในน้ำผลไม้ (Konno *et al.*, 1981 อ้างโดยจินตนา เพชรมณีโชติ, 2539) การกำจัด naringin และ limonin ออกจากน้ำผลไม้ทำได้โดยใช้คอลัมน์พอลิเมอร์ของ β-CD ทั้งแบบครั้งเดียวและแบบต่อเนื่อง โดยที่ส่วนประกอบอื่นๆ เช่น รสชาติผลไม้ ความเป็นกรดทั้งหมดและวิตามินซีของน้ำผลไม้ไม่เปลี่ยนแปลง พอลิเมอร์นี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย

สารหลายชนิดที่ระเหยหรือระเหิดอย่างรวดเร็ว เมื่อทำปฏิกิริยากับผนังโพรงของไซโคลเด็กซ์ตรินให้พลังงานออกมาเพิ่มขึ้นเป็นเครื่องกั้นไม่ให้การระเหยหรือการระเหิดเกิดขึ้น ผลที่ได้ทำให้การระเหยหรือการระเหิดลดลงอย่างรวดเร็วหรือถูกจำกัด จึงนำไปใช้ประโยชน์ในการยืดระยะ

เวลาเก็บสารที่ระเหยง่าย นอกจากนี้การเกิดสารเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ตรินยังสามารถลดหรือจำกัดการสูญเสียสารบางอย่างเนื่องจากการระเหยหรือการสลายตัวได้ด้วย และการลดการระเหยยังสามารถกำจัดกลิ่นของอาหารและยาที่ไม่ต้องการ โดยสารให้กลิ่นจะเกิดสารเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ตรินทำให้การระเหยลดลง สารประกอบส่วนใหญ่จากอุตสาหกรรมเคมีต่างๆ มีกลิ่นและเป็นพิษต่อสุขภาพ การใช้ไซโคลเด็กซ์ตรินจึงสามารถลดกลิ่นและลดความเป็นพิษที่ปล่อยออกมาสู่บรรยากาศโดยการลดการระเหยของสารเหล่านั้นได้

ปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลอื่นๆ กับผนังโพรงของไซโคลเด็กซ์ตรินทำให้สารประกอบคงตัว โดยเฉพาะสารประกอบที่มีพันธะคู่ที่เกิดออกซิเดชั่น (oxidation) ง่ายหรือการเกิด cis-trans isomerisation ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบกับผนังโพรงของไซโคลเด็กซ์ตรินสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและ cis-trans isomerisation ได้นาน

ไซโคลเด็กซ์ตรินมีความคงตัวมากและสามารถเก็บเป็นระยะเวลานานโดยไม่มีการสูญเสียคุณสมบัติทางกายภาพ การเก็บไซโคลเด็กซ์ตรินควรจะเก็บในที่แห้งเพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์และในภาชนะที่ปิดเพื่อป้องกันการดูดกลิ่นและไอของสารอื่นๆ ในบรรยากาศ ภาชนะที่ใช้เก็บควรจะสะอาด และต้องไม่มีการบรรจุสารอินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ตรินในระหว่างการเก็บหรือเมื่อเคลื่อนย้ายจากการเก็บเพื่อนำไปใช้

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้ไซโคลเด็กซ์ตรินในอุตสาหกรรม

Table 2 Applications of cyclodextrins in the industries

ประเภทของอุตสาหกรรม	ปัจจัยหลัก	ผลิตภัณฑ์สุดท้าย
อาหาร		
การทำอิมัลชัน	น้ำมันและไขมัน	มาร์การีน เค้ก ครีมปั่น น้ำสลัด
ความเสถียร	กลิ่นรส เครื่องเทศ	มัสตาร์ดเค้ก และคุ้กกี้ ผักดอง
	สี และรงควัตถุ	ผักอบแห้ง
กำบังรสและกลิ่น		น้ำผักและผลไม้ นม ข้าวหุง
ปรับปรุงคุณภาพ		ลูกอม เนยแข็ง ซอสถั่วเหลือง ผลไม้และน้ำผลไม้ประเภทส้มและมะนาวบรรจุกระป๋อง สารกันบูด
ลดการระเหย	เอทานอล	
เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขอนามัย		
การทำอิมัลชัน	น้ำมันและไขมัน	ครีมสำหรับใบหน้า โลชั่น ยาสีฟัน
ความเสถียร	กลิ่นรสและกลิ่นหอม	น้ำหอม
เคมีภัณฑ์เกษตร		
ความเสถียร	pyrolnitrin และ pyretroids	สารกำจัดเชื้อรา และกำจัดแมลง
ลดการระเหย	ฟอสเฟตอินทรีย์ (DDVP)	สารกำจัดแมลง
	thiocarbamic acid	สารกำจัดวัชพืช
ลดความเป็นพิษ	2-amino-4-methyl-phosphynobutyric acid	สารกำจัดเชื้อรา
ยาและผลิตภัณฑ์ยา		
ปรับปรุงการละลาย		prostaglandin, steroids, cardiac glycosides non-steroidal anti-inflammatory agents, barbiturates, phenotoin sulfonamides, sulfonylureas, benzodiazepines

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้ไซโคลเด็กซ์ตรินในอุตสาหกรรม (ต่อ)

Table 2 Applications of cyclodextrins in the industries (Cont.)

ประเภทของอุตสาหกรรม	ปัจจัยหลัก	ผลิตภัณฑ์สุดท้าย
ความเสถียรทางเคมี		prostacyclin, cardiac glycosides
ไฮโดรลิซิส		aspirin, atropine, procain
ออกซิเดชัน		aldehydes, epinephrine,
โฟโตลิซิส		phenothiazines
ดีไฮเดรชัน		phenothiazines, ubiquinones
ปรับปรุง bioavailability		vitamins
		prostaglandin E, ONO-802
การทำผง		aspirin, phenyltoin, digoxine,
		indomethacin, acetohexamide,
ลดการระเหย		barbiturates, piroxicam, non-
		steroidal antiinflammatories
ปรับปรุงรสชาติและกลิ่น		ONO-802, clofibrate,
การลดความเป็นพิษ-		benzaldehyde, nitroglycerine,
รบกวนในท้อง		vitamin, K_1, K_2 methylsalicylate
ลดการสลายเม็ดเลือด-		Iodine, naphthalene, d-camphor, l-
แดง		menthol, methylcinnamate
		prostaglandins, alkylparabens
		nonsteroidal anti-inflammatory
		agents
		phenothiazines, flufenamic acid
		benzylalcohol, antibiotics

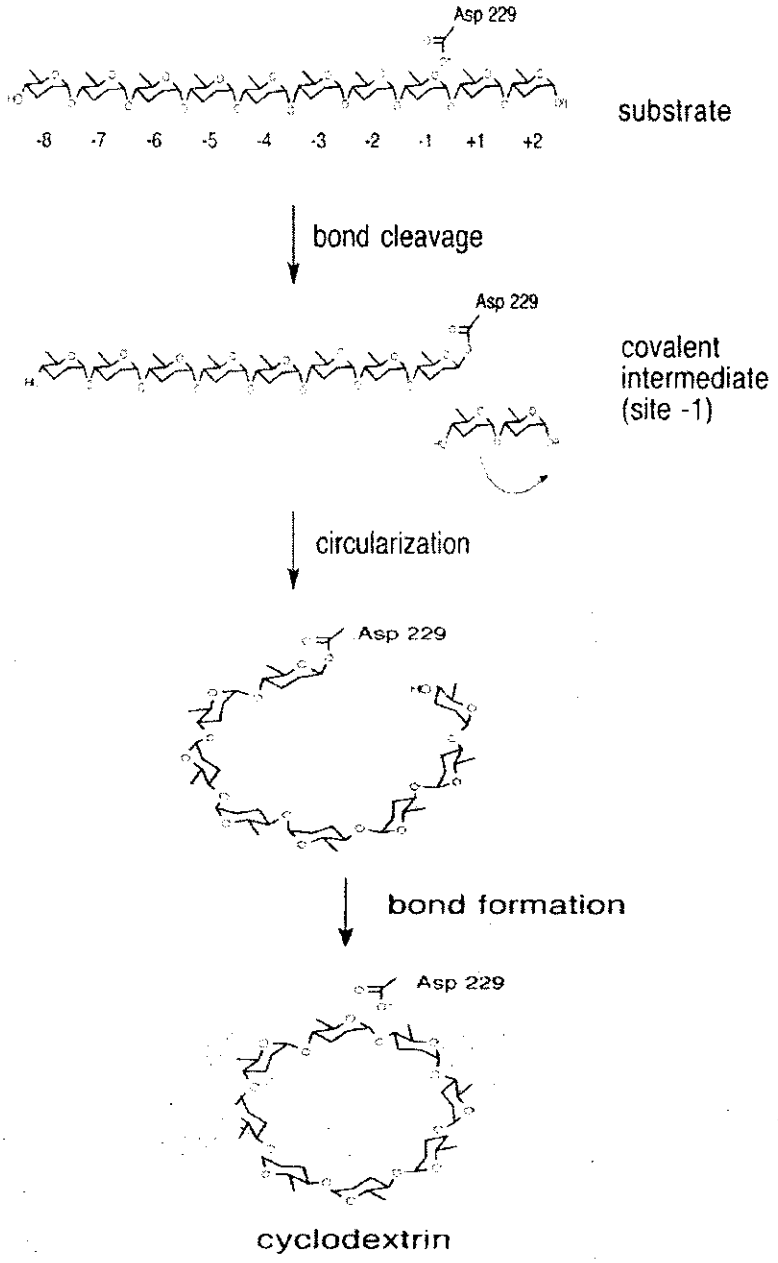
ที่มา : ปรับปรุงจากเอกสารเผยแพร่ของบริษัท Nihon Shokuhin Kako และ Roqutte อ้างโดย สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล (2547)

2. เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ตรินไกลโคซิลทรานเฟอเรส (Cyclodextrin glycosyltransferase)

2.1 การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase

Cyclodextrin glycosyltransferase (1,4-α-D-glucan: 1, 4-α-D- glycopyranosyltransferase) : E.C.2.4.1.19 เอนไซม์นี้ตรวจพบได้จากแบคทีเรียหลายชนิดและพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูง เอนไซม์ CGTase ทำงานย่อยแป้งเป็นสายสั้นๆ แล้วเชื่อมปลายด้วยปฏิกิริยา α-1,4-D-glucopyranosyltransfer ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังภาพที่ 2

เอนไซม์ CGTase ผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด (Nakamura and Horikoshi, 1976) และมีคุณสมบัติต่างๆ กัน เช่น พีเอชที่เหมาะสม, อุณหภูมิที่เหมาะสม, ความคงตัว, และสัดส่วน α-CD, β-CD และ γ -CD ที่ผลิตได้ต่างกัน แต่การทำงานของเอนไซม์ CGTase ทั้งหมดมี 3 ปฏิกิริยาเหมือนกัน คือ cyclisation, transglycosylation และ hydrolysis ในปฏิกิริยา cyclisation แป้งซึ่งเป็นสารตั้งต้นจะถูกตัดออกเป็นส่วนๆ และปลายของแต่ละส่วนจะถูกเชื่อมเข้าด้วยกันเกิดเป็นโครงสร้างวงแหวนเรียกว่า ไซโคลเด็กซ์ตริน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้สามารถผันกลับได้ และโครงสร้างวงแหวนสามารถเปิดออกโดยเอนไซม์ CGTase ภายใต้ปฏิกิริยา transglycosylation ซึ่งเกี่ยวพันกับการตัดสารตั้งต้น เช่น แป้งหรือโมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ตริน สารตั้งต้นหลังจากถูกตัดจะแยกออกเป็นโมเลกุลของกลูโคสหรือโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีผลทำให้ความยาวของส่วนที่ไม่ใช่วงแหวนเปลี่ยนไป ถ้าโมเลกุลของน้ำทำหน้าที่เป็นตัวรับในปฏิกิริยาการตัด (cleavage reaction) เรียกว่า ปฏิกิริยา hydrolysis เหมือนกับปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และถ้าปฏิกิริยานั้นมีเอนไซม์มากเพียงพอเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดความสมดุลระหว่างไซโคลเด็กซ์ตรินและ non cyclic-dextrin ความสมดุลเดียวกันนี้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้แป้งหรือไซโคลเด็กซ์ตรินใดๆ เป็นสารตั้งต้น



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยา cyclization ของเอนไซม์ CGTase

Figure 2 Cyclization reaction of CGTase

ที่มา: Uitdehaag และคณะ (2002)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* sp.

การผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. มีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้องกับปริมาณการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase

เอนไซม์ CGTase เป็นเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน ซึ่งสามารถผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Larsen *et al.*, 1998) โดยเชื้อจะมีการปลดปล่อยเอนไซม์ CGTase ออกนอกเซลล์เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase และ death phase (Illias *et al.*, 2002) เช่น Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 38-2, Alkalophilic *Bacillus* sp. ไอโซเลต 1011, *Bacillus circulans*, *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus ohbensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Klebsiella pneumoniae* M5, *Micrococcus* sp. (Fogarty and Kelly, 1990 อ้างโดย จินตนา เพชรมณีโชติ, 2539) เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase สามารถแยกได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ดินจากสนามหญ้า (จินตนา เพชรมณีโชติ, 2539), ดินจากสวนยาง (Illias *et al.*, 2002), น้ำพุร้อน (Rahman *et al.*, 2004), มันฝรั่งเน่า (Pakzad *et al.*, 2004) เป็นต้น

จินตนา เพชรมณีโชติ (2539) ศึกษาการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต PS304 จากตัวอย่างดิน เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในพีเอช 7.5-8.5 ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ออกสู่นอกเซลล์ที่พีเอช 8.0-9.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดังกล่าวมีความคงตัวที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 4-37 องศาเซลเซียส และให้ผลิตผลเป็นกลูโคส มอลโทส มอลโทไตรโอส และไซโคลเด็กซ์ตริน 3 ชนิด ในอัตราส่วน $\alpha : \beta : \gamma = 1.14 : 4.76 : 1$ ตามลำดับ *Bacillus* ไอโซเลต PS304 มีการเจริญเป็นสองเท่าในเวลา 3.85 ชั่วโมง มีอัตราเจริญจำเพาะ 0.18 ต่อชั่วโมง และใช้ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

2.2.2 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญและการสร้างไซโคลเด็กซ์ตรินจากเอนไซม์ CGTase แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันขึ้นกับไอโซเลตของจุลินทรีย์และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ

Ibrahim และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* G1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในอาหารสูตร Horikoshi (แป้งร้อยละ 1.0, เปปโตนร้อยละ 0.5, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.1, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.02, Na_2CO_3 ร้อยละ 1.0 พีเอชเริ่มต้น 10.1) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3

พบว่า แป้งมันสำปะหลัง (tapioca starch) ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 16.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ โดย soluble starch และ แป้งสาคู มีกิจกรรมเอนไซม์สูงเช่นกันที่ 16.71 และ 16.29 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* G1

Table 3 Effect of carbon sources on CGTase production from *Bacillus* G1

Gelatinized carbon source 1% (w/v)	CGTase activity (U/ml)	Dry cell weight (g/l)	Final pH
Sago starch	16.29 ± 0.30	7.36 ± 0.31	8.74
Tapioca starch	16.85 ± 0.11	7.70 ± 0.27	8.85
Soluble starch	16.71 ± 0.24	6.98 ± 0.33	8.40
Corn starch	15.45 ± 0.14	6.55 ± 0.09	8.65
Glucose	10.19 ± 0.12	3.05 ± 0.14	8.26
Fructose	11.96 ± 0.05	3.30 ± 0.43	8.28
Lactose	10.56 ± 0.33	3.17 ± 0.43	8.41
Xylose	11.36 ± 0.38	3.92 ± 0.09	9.41
No carbon source	0.59 ± 0.06	0.90 ± 0.05	9.72

ที่มา : Ibrahim และคณะ (2005)

2.2.3 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบร้อยละ 8-10 ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญของเซลล์ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ และการสังเคราะห์เอนไซม์ CGTase เพื่อใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

Ibrahim และคณะ (2005) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* G1 ในอาหารสูตร Horikoshi ที่เติมแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.5 พบว่าเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีในการผลิตเอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมเอนไซม์สูง 17.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนมีการผลิตเอนไซม์ CGTase น้อยที่สุด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* G1

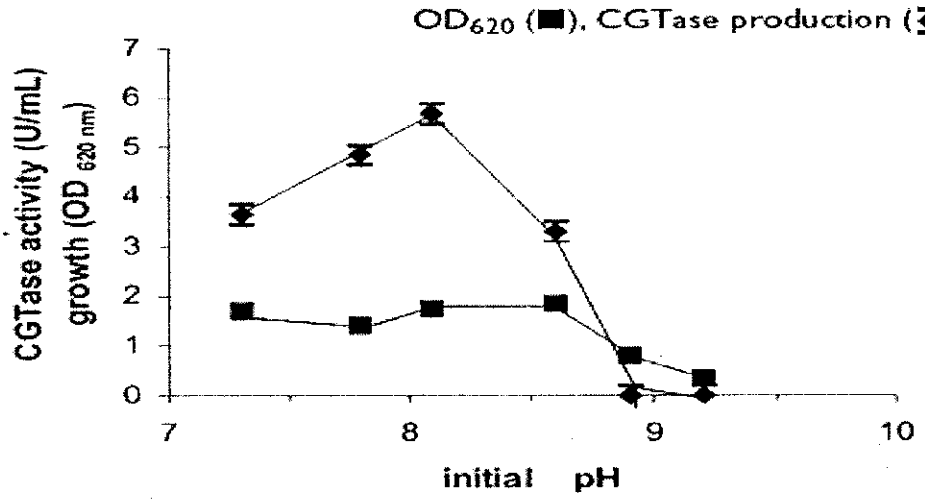
Table 4 Effect of nitrogen sources on CGTase production from *Bacillus* G1

Sample 0.5% (w/v)	CGTase activity (U/ml)	Dry cell weight (g/l)	Final pH
Soya bean(HVP)	16.44 ± 0.01	4.84 ± 0.43	8.45
Urea	05.49 ± 0.01	4.54 ± 0.21	9.30
Glutamate	11.30 ± 0.12	5.10 ± 0.02	8.96
Yeast extract	16.83 ± 0.29	5.78 ± 0.13	8.63
Peptone	17.05 ± 0.15	6.82 ± 0.32	8.58
$NaNO_3$	6.47 ± 0.03	4.19 ± 0.05	8.52
NH_4NO_3	6.70 ± 0.46	4.44 ± 0.23	9.08
$(NH_4)_2SO_4$	3.02 ± 0.05	3.48 ± 0.17	8.60
No nitrogen source	0.17 ± 0.01	0.72 ± 0.02	9.43

ที่มา: Ibrahim และคณะ (2005)

2.2.4 สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

2.2.4.1 พีเอช จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการความเป็นกรด-ด่าง หรือค่าของพีเอชที่แตกต่างกัน และแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (alkalophilic bacteria) Rosso และคณะ (2002) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นระหว่าง 7.3-9.2 พบว่าเชื้อ *Bacillus circulans* สามารถเจริญได้ดีในอาหารพีเอชระหว่าง 7.3-8.6 และลักษณะการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่เชื้อ *B. circulans* สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงที่สุดในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 8.3 ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *B. circulans*

Figure 3 Effect of initial pH on growth and CGTase production from *B. circulans*

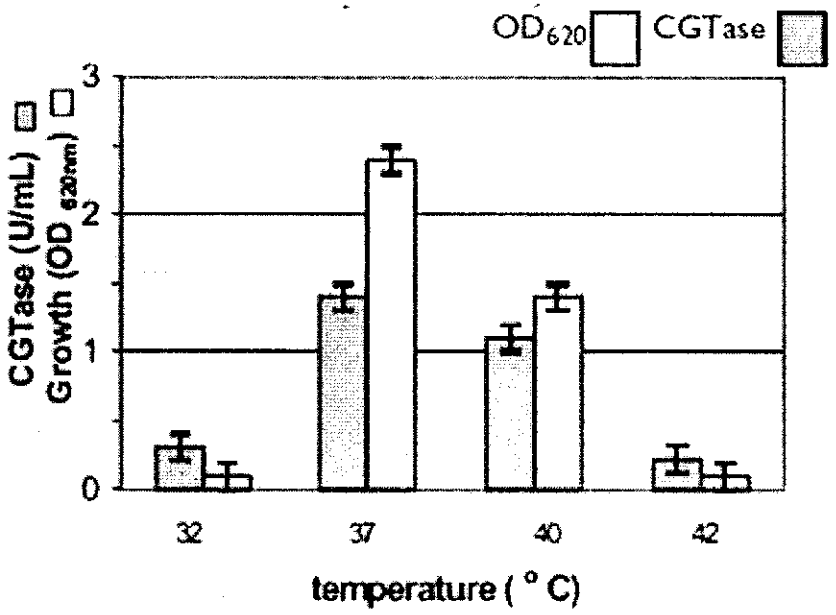
ที่มา: Rosso และคณะ (2002)

อรุณี ตรีศิริโรจน์ และคณะ (2539) ทำการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus circulans* (ATCC 9995) และการผลิตเอนไซม์ CGTase ในระบบที่มีการควบคุมพีเอชของระบบให้คงที่อยู่ในช่วงพีเอช 7.0-8.0 ด้วยโซเดียมคาร์บอเนต และไม่มีการควบคุมพีเอช รูปแบบการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ไม่แตกต่างกันทั้งที่มีการควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอช โดยรูปแบบการเจริญเป็นแบบ diauxic โดยในระบบที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ระดับพีเอชจะค่อยๆ เริ่มลดลงจากชั่วโมงที่ 8 จนถึงชั่วโมงที่ 21 พีเอชลดลงเป็น 6.0 ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงในช่วงที่พีเอชลดลงเช่นเดียวกัน และเมื่อน้ำตาลรีดิวซ์หมดไปพีเอชของระบบจะค่อยๆ ปรับตัวขึ้นเองอย่างช้าๆ การปรับตัวของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจากองค์ประกอบของอาหารประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนตที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และในช่วงที่มีการปรับตัวของพีเอชให้สูงขึ้นก็เป็นช่วงที่เชื้อมีการสร้างเอนไซม์อย่างรวดเร็วด้วย เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่เวลา 96 ชั่วโมง วัดพีเอชได้ 7.4

2.2.4.2 อุณหภูมิ การผลิตเอนไซม์ CGTase สามารถผลิตได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ที่เจริญและผลิตเอนไซม์ CGTase ที่ทนต่ออุณหภูมิต่างๆ ซึ่งการคัดเลือกขึ้นอยู่กับแหล่งจุลินทรีย์และการนำไซโคลเด็กซ์ตรินไปประยุกต์ใช้

Rosso และคณะ (2002) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อ

สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่มากนัก แต่มีการผลิตเอนไซม์ CGTase ต่ำกว่า เนื่องจากเอนไซม์มีความคงตัวลดลงที่อุณหภูมิสูง ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *B. circulans*

Figure 4 Effect of incubation temperature on growth and CGTase production from *B. circulans*

ที่มา: Rosso และคณะ (2002)

การเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการผลิตเอนไซม์ CGTase จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิเหมาะสม มีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดและคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมินั้นๆ ดังตัวอย่างจุลินทรีย์ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus* spp.

Table 5 Optimum temperature for CGTase production from *Bacillus* spp.

Microorganism	Optimal temperature (^{o}C)	References
Bacillus sp. BE101	30	Lee and Kim, 1991
B. circulans (TISTR)	37	Charoenlap *et al.*, 2004
B. circulans ATCC 21783	40	Vassileva *et al.*, 2005
B. stearothermophilus HR1	50	Rahman *et al.*, 2004

2.3 กิจกรรมการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ CGTase

2.3.1 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CGTase

พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เป็นสภาวะที่เอนไซม์สามารถทำงานในการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุดในเวลาน้อยที่สุด เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเอนไซม์จะมีสภาวะการทำงานที่แตกต่างกันขึ้นกับคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด

Cao และคณะ (2005) ศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. 277 พบว่า ในช่วงพีเอช 5.0-9.0 เอนไซม์ยังมีกิจกรรมการทำงานสูงกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับพีเอช 8.5 ที่มีกิจกรรมการทำงานสูงสุด และในช่วงอุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมการทำงานสูงกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่เอนไซม์ CGTase มีกิจกรรมการทำงานได้ดีที่สุด

Larsen และคณะ (1998) ศึกษาเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus* sp. F8 โดยศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่าจากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72 kDa สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7.0-8.0 และเอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 8.0 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.3.2 ความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ

Cao และคณะ (2005) ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus* sp. 277 ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ พบว่าเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0 -10.0 และเมื่อนำเอนไซม์ CGTase ที่เก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 ไปทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ

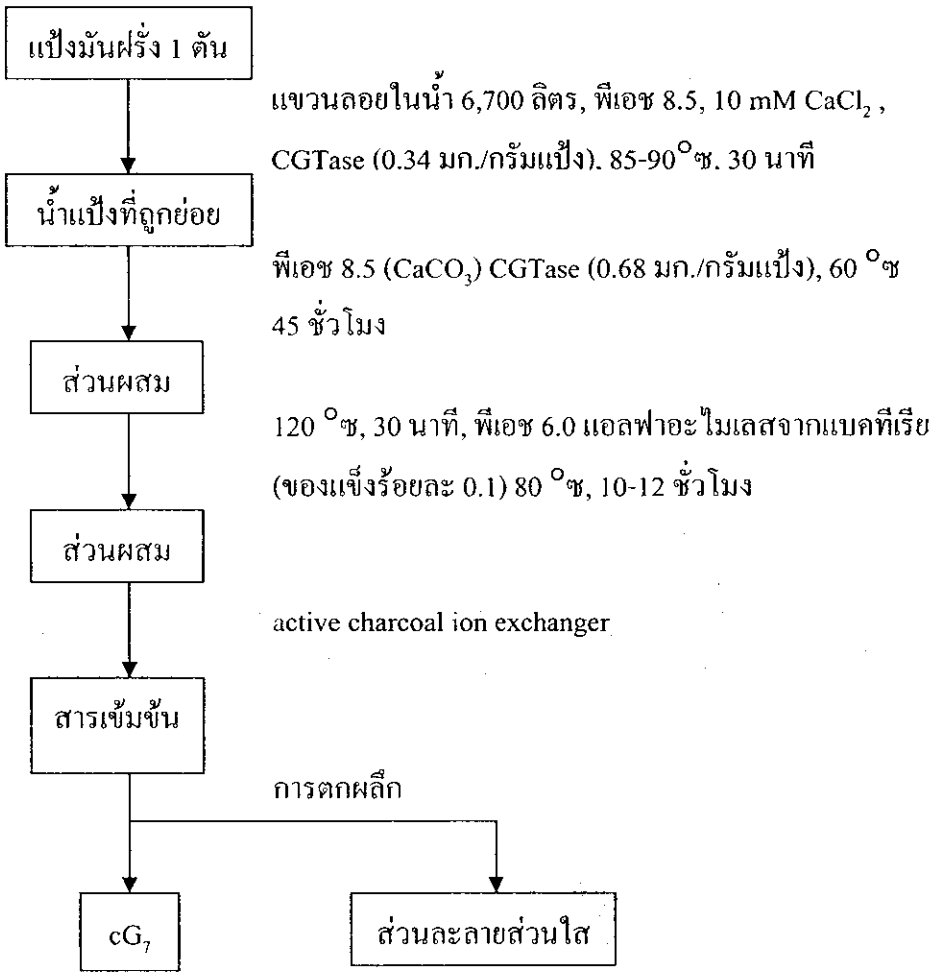
พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวสูงจนถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกความคงตัวของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมเอนไซม์เหลือเพียงร้อยละ 14

Larsen และคณะ (1998) ศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus* sp. F8 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ CGTase มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-8.0 และมีความคงตัวสูงจนถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว

2.4 การผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

ปัจจุบันไซโคลเด็กซ์ตรินมีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมพลาสติก (อิมัลชัน) ป้องกันการรวมตัวกับออกซิเจนและเพิ่มความคงตัวของสาร (Lee and Kim, 1991) จึงมีการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินในระดับอุตสาหกรรม ดังแสดงในภาพที่ 5

ไซโคลเด็กซ์ตรินเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากการย่อยแป้ง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ CGTase จึงทำให้มีองค์ประกอบหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลกลูโคส เอนไซม์ CGTase ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายกลุ่มโดยเฉพาะ *Bacillus* sp. การผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินเริ่มจากการเตรียมน้ำแป้งและทำการย่อยครั้งแรกโดยให้ได้ค่า DE ต่ำกว่า 10 แล้วจึงดำเนินกิจกรรมเอนไซม์ CGTase ในการดำเนินกิจกรรมที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานอาจมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ จึงจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายเข้าร่วมกิจกรรมของเอนไซม์และตัวทำละลายจะเป็นตัวกำหนดผลิตภัณฑ์ที่ได้ เช่น เมื่อใช้โทลูอีนจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มี β-CD แต่เมื่อใช้ decanol จะได้ α - CD ในขณะที่การใช้ naphthol ผสมกับ methylethyl ketone จะได้ γ-CD (Hedges, 1992)



ภาพที่ 5 การผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน (cG_7) ในระดับอุตสาหกรรม (1 ตันแป้ง/ครั้ง)

Figure 5 Production of cyclodextrin in the industrial scale (1 ton/time)

ที่มา: Bender (1986) อ้างโดย กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2546)

อรุณี ตรีศิริโรจน์ และคณะ (2539) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. 3 ชนิด คือ *Bacillus circulans* (ATCC 9995), Alkalophilic *Bacillus sp.* (ATCC 21783) และ *Bacillus* sp. B95 ที่คัดเลือกได้จากดิน พบว่าไอโซเลต ATCC 9995 และไอโซเลต ATCC 21783 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้ง (soluble starch) ร้อยละ 1 และ corn steep liquor ร้อยละ 5 เป็นสับสเตรทหลักจะผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูงกว่าเชื้อไอโซเลต B95 และเมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไซโคลเด็กซ์ตริน โดยนำเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น

500, 1000 และ 1,500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มาทำการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลต ATCC9995 ให้ผลผลิตร้อยละ 56 ของสับสเตรทเริ่มต้น ในขณะที่เชื้อไอโซเลต ATCC21783ให้ผลผลิตน้อยกว่าร้อยละ 40 ของสับสเตรทเริ่มต้น

Kim และคณะ (1995) พัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน โดยการให้ความร้อนแป้งข้าวโพดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำเข้าสู่การผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน พบว่าการให้ความร้อนแก่แป้งข้าวโพดก่อนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CGTase โดยจะเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของไซโคลเด็กซ์ตรินมากกว่ามอลโตเด็กซ์ตรินที่ผลิตได้ อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์ CGTase ในการผลิตด้วย โดยใช้สับสเตรทเข้มข้นร้อยละ 7.5 และเอนไซม์ CGTase 48 ยูนิตต่อกรัมแป้งข้าวโพด

Kim และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งข้าวโพดดิบ โดยบ่มแป้งข้าวโพดกับเอนไซม์ CGTase ทนร้อนที่อุณหภูมิสูงโดยปราศจากการปรับสภาพสับสเตรทและเอนไซม์เบื้องต้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้ CGTase จากเชื้อ *Thermoanaerobacter* sp. คือ 90 องศาเซลเซียส วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ คือ เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงทำให้การผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินไม่ลดลง สามารถวิเคราะห์สับสเตรทที่เหลือได้ง่าย นอกจากนี้วิธีนี้ไม่ต้องปรับสภาพสับสเตรทก่อน สภาวะที่ใช้ในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน คือ แป้งข้าวโพดร้อยละ 7.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เอนไซม์ 22 ยูนิตต่อกรัมแป้ง และอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา 65 องศาเซลเซียส เพราะการใช้อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส โครงสร้างของแป้งจะถูกทำลายและยากที่จะแยกแป้งออกจากไซโคลเด็กซ์ตรินที่ผลิตได้ จากการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินพบว่าสามารถเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นไซโคลเด็กซ์ตรินและมอลโทเด็กซ์ตรินร้อยละ 27.9 และ 31.4 ตามลำดับ เหลือสับสเตรทร้อยละ 40.7 หลังปั่นเหวี่ยงแยกแป้งข้าวโพดออก มีผลิตภัณฑ์ไซโคลเด็กซ์ตรินร้อยละ 47 โดยการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน 12.68 มิลลิกรัม ใช้เอนไซม์ CGTase 1 ยูนิต

Larsen และคณะ (1998) ศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus* sp. F8 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ CGTase มีอัตราส่วนการผลิต α-CD, β-CD, γ-CD และ δ-CD (กลูโคส 9 หน่วย) จากแป้ง (soluble starch) คือ 0.09:1:0.2:0.14 เมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักทำให้อัตราส่วนของ δ-CD ลดลงต่ำกว่า γ-CD และอัตราส่วนของ α -CD และ β-CD เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไซโคลเด็กซ์ตรินชนิดอื่น จากการวิเคราะห์พบว่า δ-CD ถูกสลายตัวโดยเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Paenibacillus* sp. F8 ได้ง่ายเมื่อเทียบกับ α -CD, β-CD และ γ-CD

Charoenlap และคณะ (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งสาคู โดยนำเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus circulans* (TISTR 907) มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่จุดอิ่มตัวร้อยละ 50-70 พบว่าช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่

เหมาะสมสำหรับการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งสาคู คือ 4.5-5.0 และ 55-60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ β- CD เป็นผลิตภัณฑ์ที่พบมากถึงร้อยละ 65 ของผลิตภัณฑ์ไซโคลเด็กซ์ตรินทั้งหมด จากการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ β-CD ที่ผลิตจากเอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วนกับเอนไซม์ CGTase ไม่บริสุทธิ์ พบว่าปริมาณผลผลิตไม่แตกต่างกันและให้ผลผลิตสูง โดยสัดส่วนของเอนไซม์ CGTase ต่อแป้งสาคู และความเข้มข้นแป้งที่เหมาะสมในการผลิต β-CD คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase 50 ยูนิตต่อกรัม (เอนไซม์/แป้งสาคู) และแป้งสาคูเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. แป้ง (Starch)

3.1 ชนิดและองค์ประกอบของแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 : 10 : 5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านของปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซิง (reducing end group) แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพกติน) วางตัวในแนวรัศมี แป้งจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 6) ทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบคุณสมบัติของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน

Table 6 Comparison of amylose and amylopectin

Properties	Amylose	Amylopectin
Basic structure	Essentially linear	Branched
Stability in aqueous	Retrogrades	Stable
Degree of polymerization	C. 10^3	C. 10^4-10^5
Average chain length	C. 10^3	C. 20-25
β-amylase hydrolysis	87%	54%
β-amylase and debranching enzyme hydrolysis	98%	79%
Iodine complex max.	650 nm	550 nm

ที่มา : Aiyer (2005)

แป้งสาคู (Sago starch)

สาคูเป็นพืชเมืองร้อนตระกูลปาล์ม อยู่ในวงศ์ Palmae ที่พบทั่วไปในประเทศไทยมี 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)

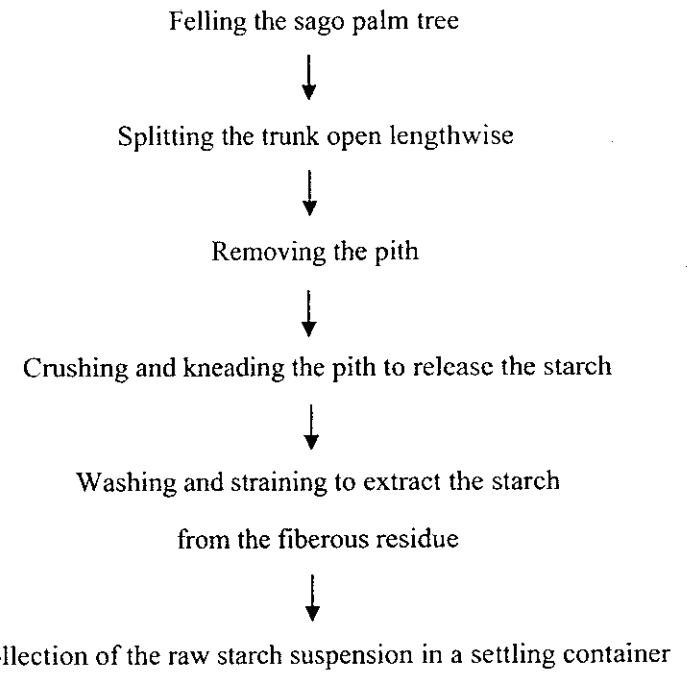
การผลิตแป้งสาคูในประเทศไทยทำกันมากในภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงมา กรรมวิธีการผลิตแป้งสาคูดังแสดงในภาพที่ 6 โดยนำต้นสาคูมาปอกเปลือกออกเหลือแต่ไส้ใน ซึ่งส่วนไส้ในต้นสาคูนั้นมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ประมาณร้อยละ 30 น้ำร้อยละ 50 และส่วนประกอบอื่น ๆ อีกร้อยละ 20 (ตารางที่ 7) นำส่วนไส้ในมาขูดย่อยให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงแป้งที่ได้ไปยีบนผ้ากรองเพื่อให้แป้งตกลงไปในอ่างที่มีน้ำรองรับอยู่ ทำเช่นนี้จนแป้งออกหมดเหลือแต่กาก แป้งที่ได้จะมีสีขาวออกเหลือง และต้องนำแป้งที่ได้ไปผ่านการฟอกสีก่อนนำไปทำแห้ง เพื่อให้ได้แป้งที่มีสีขาวและได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค

ปัจจุบันนี้การผลิตแป้งสาคูมีไม่มากนัก เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตมีหลายขั้นตอนมีการใช้ประโยชน์ในขอบเขตที่จำกัด ประกอบกับในปัจจุบันนี้มีแป้งชนิดอื่นเข้ามาใช้แทนที่แป้งสาคูได้ เช่น แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากแป้งสาคูจึงน้อยลง

ในประเทศมาเลเซียพบว่าแป้งสาคูมีความสำคัญ คือ เป็นสินค้าส่งออกอันดับ 5 รองจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรจำพวก กระดาษ ปาล์มน้ำมัน โกโก้ และยางพารา โดยส่วนใหญ่จะส่งออกไปยังประเทศในแถบยุโรปและอเมริกา ซึ่งจะใช้ประกอบอาหาร เพิ่มความข้นหนืดให้กับซุป หรือใช้ทำขนมจำพวกพุดดิ้ง (pudding) สำหรับประเทศอินโดนีเซียและอินเดียนั้นจะนำแป้งสาคูไปต้มกับน้ำตาลเพื่อทำขนมหรือเยลลี่

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเพื่อพัฒนาการใช้ประโยชน์จากแป้งสาคูให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากการใช้ประกอบอาหารหรือขนมต่าง ๆ และใช้เป็นอาหารสัตว์เพียงอย่างเดียว โดยอาศัยความรู้และกระบวนการทางด้านวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชีวภาพและจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารไซโคลเด็กซ์ตริน (Solichein, 1995) การใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งอาหารที่มี

ปริมาณโปรตีนสูง การผลิตไฮฟรุคโตสไซรัป ขนมปัง เส้นหมี่ และอาหารทารก (Gumbira-Sa'id, 1995) และการผลิตน้ำตาลกลูโคส (นิยม กำลังดี, 2539) หรือการพัฒนานำแป้งสาคูมาใช้เป็นสารยึดเกาะในการผลิตกระดาษ วัสดุสิ่งทอ และไม้อัด ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอุตสาหกรรมการผลิตยาบางชนิด ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม soft drink บางชนิดและผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมท และยังรวมไปถึงการนำแป้งสาคูไปหลอมขึ้นรูปเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ นำไปทำเชื้อเพลิง ผลิตแอลกอฮอล์และเอทานอล (Abd-Aziz, 2002) เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากแป้งสาคูดังแสดงในตารางที่ 8



ภาพที่ 6 กระบวนการสกัดแป้งสาคู

Figure 6 Processing of sago starch extraction

ที่มา : Wikipedia (2006)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบทางเคมีของแป้งสาคูเปรียบเทียบกับแป้ง ข้าว และมันสำปะหลัง (ต่อ100 กรัม)

Table 7 Chemical composition of sago starch compared with starch, rice and cassava (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)

ตารางที่ 8 การใช้ประโยชน์จากต้นสาคู

Table 8 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, caramel, (color milk), fructose, syrups, etc.
Sago pitch	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)

แป้งมันสำปะหลัง (Tapioca starch)

ถิ่นกำเนิดของมันสำปะหลังอาจกล่าวได้ว่าอยู่ในอเมริกาใต้ บราซิล/เม็กซิโก มีการเรียกชื่อต่างๆ กันตามรากศัพท์ภาษาอังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน โปรตุเกส เช่น cassava, mandioca, yucca, tapioca และ manioc ในทางพฤกษศาสตร์มันสำปะหลังเป็นพืชในวงศ์ (Class) ใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledoneae) ตระกูล (Family) Euphobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz. แต่เดิมมีการใช้ชื่อว่า *Manihot utilissima* Pohl. (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญอันดับ 5 รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง เป็นพืชที่เพาะปลูกมากในเขตร้อน และสามารถปลูกได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและแห้ง มันสำปะหลังไม่สามารถปลูกได้ในดินที่มีความชื้นสูง ฝนตกหนัก หรือดินเค็ม อีกทั้งยังสามารถขยายพันธุ์ได้ง่าย และต้นทุนการเพาะปลูกไม่สูง จึงทำให้เป็นที่นิยมปลูกกันมาก โดยเฉพาะเกษตรกรที่มีรายได้ต่ำ

แป้งมันสำปะหลังจัดเป็นแป้งที่มีปริมาณอะไมโลสค่อนข้างต่ำ คือ ร้อยละ 18-23 และมีขนาดแตกต่างกัน โครงสร้างของอะไมโลสจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นตรงและส่วนที่เป็นกิ่ง โดยอัตราส่วนของโครงสร้างที่เป็นเส้นตรงต่อโครงสร้างที่เป็นกิ่งจะมีค่าเท่ากับ 0.58 ต่อ 0.42 แป้งที่มีอะไมโลสสูงจะพองตัวต่ำกว่าแป้งที่มีอะไมโลสต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของอะไมโลสที่เป็นเส้นตรงจะทำให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลได้ดี และอะไมโลสอาจจับตัวกับไขมันทำให้ขัดขวางการพองตัวของเม็ดแป้งได้ แป้งมันสำปะหลังจัดเป็นแป้งที่มีอะไมโลสต่ำจึงมีการพองตัวที่ดี (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

ประเทศไทยส่งออกมันสำปะหลังเป็นอันดับ 1 ของโลก รองลงมา คือ ประเทศอินโดนีเซีย และประเทศเวียดนาม ตามลำดับ โดยสามารถผลิตมันสำปะหลังแห้งได้ปีละประมาณ 400,000 – 600,000 ตัน และส่งออกประมาณ 180,000 – 350,000 ตันต่อปี โดยส่งออกไปยังจีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น สิงคโปร์ มาเลเซีย เกาหลีใต้ และยุโรปตะวันออก สามารถทำรายได้เข้าประเทศไทยปีละประมาณ 2 หมื่นล้านบาท พื้นที่การเพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมา คือ ภาคกลางและภาคเหนือตามลำดับ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

แป้งข้าวโพด (Corn starch)

แป้งข้าวโพดจัดเป็นแป้งที่มีมากที่สุดในโลก ผลิตจากข้าวโพด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* L. อยู่ในวงศ์ Gramineae มีต้นกำเนิดในอเมริกาแล้วกระจายไปยังทวีปแอฟริกา อินเดีย ออสเตรเลีย และประเทศยุโรปที่มีอากาศอบอุ่น ผลผลิตประมาณครึ่งหนึ่งใช้เป็นอาหารมนุษย์ นอกจากนั้นใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์และอื่น ๆ ข้าวโพดมีถิ่นกำเนิดแถบบริเวณประเทศตะวันตก และเป็นที่นิยมบริโภคกันแถบประเทศทวีปอเมริกากลางและใต้ สำหรับประเทศไทยข้าวโพดเป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคในรูปอาหารว่างระหว่างมื้ออาหารมาช้านานแล้ว และยังมีการปลูกข้าวโพดเพื่อการเลี้ยงสัตว์กันมาก จนถึงปัจจุบันข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศอีกด้วย

แป้งข้าวโพดได้จากการสกัดเอาแป้งจากเมล็ดข้าวโพดที่แก่และแห้งแล้วโดยการโม่แยกส่วนคัพพะและเปลือกออกเหลือเอนโดสเปอร์มซึ่งเป็นส่วนของเนื้อแป้งไว้ สำหรับประเทศไทยนิยมใช้แป้งข้าวโพดน้อยมาก เนื่องจากมีราคาค่อนข้างแพง สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีราคาถูกกว่าในการประกอบอาหารที่ต้องการความข้นหนืดและเหนียวแทน ถึงแม้ว่าความหนืดจะไม่คงตัวหรือคืนตัวง่ายกว่าที่ใช้แป้งข้าวโพดก็ตาม

แป้งข้าวเจ้า (Rice starch)

ข้าวเจ้าหรือ *Oryza sativa* L. มีต้นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศโดยมีปริมาณการผลิตถึง 20 ล้านตันต่อปี องค์ประกอบหลักที่สำคัญของข้าว คือ แป้ง, โปรตีน, ไขมัน, เยื่อ และ เถ้า ซึ่งข้าวส่วนใหญ่จะผ่านการขัดสีสำหรับบริโภคโดยตรงและทำให้เกิดปลายข้าวหรือข้าวท่อนซึ่งมีมูลค่าต่ำเกิดขึ้น เป็นข้าวหักหรือข้าวเกรดสองที่ไม่เหมาะต่อการบริโภคโดยตรง แป้งข้าวเจ้ามีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ มากมาย ใช้เป็นส่วนประกอบของแป้งฝุ่นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแป้งฝุ่นสำหรับเด็ก เนื่องจากแป้งไม่เป็นพิษและไม่มีสารระคายเคือง และใช้เป็นสารทำให้แข็งในการซักรีด (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

3.2 คุณสมบัติของแป้ง

3.2.1 การดูดซับน้ำ การพองตัวและการละลาย

เมื่อเติมน้ำลงในแป้งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำที่เติมลงไปภายใต้สภาวะบรรยากาศของห้อง จนเกิดสมดุลระหว่างความชื้นภายในเม็ดแป้งกับน้ำที่เติมและความชื้นในบรรยากาศ ปริมาณน้ำที่ถูกดูดซึมจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ แป้งส่วนใหญ่เมื่อเกิดสมดุลภายใต้บรรยากาศปกติจะมีความชื้น 10 ถึง 17 %

น้ำที่อยู่ในเม็ดแป้งมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบ คือ น้ำในผลึก น้ำในรูปที่ไม่อิสระ (bound water) และน้ำในรูปอิสระ (free water) โดยมีการจับกับแป้งได้แน่นตามลำดับ และแป้งที่มีความชื้น 8 ถึง 10 % สามารถจับกับน้ำได้แน่นกว่าแป้งที่มีความชื้นสูงกว่านี้ เนื่องจากการจับของน้ำกับหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของกลูโคสแต่ละหน่วยของแป้ง จะได้สตาร์ชโมโนไฮเดรต $[n(C_6H_{10}O_5 \cdot H_2O)]$

3.2.2 ความหนืด

3.2.2.1 ปัจจัยการเกิดความหนืด

ความหนืดเป็นสมบัติเฉพาะตัวที่สำคัญของแป้ง เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ปัจจัยที่มีผลต่อความหนืดของแป้ง ได้แก่ ชนิดของแป้ง และการดัดแปรแป้งด้วยวิธีต่างๆ

3.2.2.2 การเกิดเจลาทิไนเซชัน (gelatinization)

โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) จำนวนมาก ยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจน มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) แต่เนื่องจากเม็ดแป้งอยู่ในรูปของร่างแห (micelles) ดังนั้นการจัดเรียงตัวลักษณะนี้จะทำให้เม็ดแป้งละลายในน้ำเย็นได้ยาก ดังนั้นในขณะที่แป้งอยู่ในน้ำเย็นเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำและพองตัวได้เล็กน้อย แต่เมื่อให้ความร้อนกับสารละลายน้ำแป้ง พันธะไฮโดรเจนจะคลายตัวลง เม็ดแป้งจะดูดน้ำแล้วพองตัว ส่วนผสมของน้ำแป้งจะมีความหนืดมากขึ้นและใสขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของน้ำอิสระที่เหลืออยู่รอบๆ เม็ดแป้งน้อยลง เม็ดแป้งเคลื่อนไหวได้ยากขึ้น ทำให้เกิดความหนืด ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า การเกิดเจลาทิไนเซชัน

การเกิดเจลาทิไนเซชันของเม็ดแป้งแบ่งได้ 3 ระยะ คือ ระยะแรกเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำเย็นได้อย่างจำกัดและเกิดการพองตัวแบบผันกลับได้ เนื่องจากร่างแหระหว่างไมเซลล์ (micelles) ยืดหยุ่นได้จำกัด ความหนืดของสารแขวนลอยจะไม่เพิ่มขึ้นจนเห็นได้ชัด เม็ดแป้งยังคงรักษารูปร่างและโครงสร้างแบบที่เกิดการบิดแสงระนาบโพลาไรซ์ได้ (birefringence) เมื่อใส่สารเคมีหรือเพิ่มอุณหภูมิให้สารละลายน้ำแป้งจนถึงประมาณ 65 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่แท้จริงขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะที่ 2 เม็ดแป้งจะพองตัวอย่างรวดเร็ว ร่างแหระหว่างไมเซลล์ภายใน

เม็ดแป้งจะอ่อนแอลง เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำเข้ามามากและเกิดการพองตัวแบบผันกลับไม่ได้ เรียกว่า การเกิดเจลาทิไนเซชัน เม็ดแป้งมีการเปลี่ยนรูปร่างและโครงสร้างแบบที่เกิดการบิดแสงระนาบโพลาไรซ์ได้ ความหนืดของสารละลายน้ำแป้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แป้งที่ละลายได้จะเริ่มละลายออกมา เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิต่อไปอีกจนสู่ระยะที่ 3 รูปร่างเม็ดแป้งจะไม่แน่นอน การละลายของแป้งจะเพิ่มขึ้น เมื่อนำไปทำให้เย็นจะเกิดเจล การเกิดเจลาทิไนเซชันของแป้งจะทำให้หมู่ไฮดรอกซิลของแป้งสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ได้ดีขึ้น รวมทั้งพร้อมที่จะถูกย่อยด้วยน้ำย่อยต่างๆ ได้ดีกว่า

3.2.2.3 การเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation)

เมื่อแป้งได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลาทิไนเซชันแล้วให้ความร้อนต่อไป จะทำให้เม็ดแป้งพองตัวเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่พองตัวเต็มที่และแตกออก โมเลกุลของอะมิโลสขนาดเล็กจะกระจัดกระจายออกมาทำให้ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยให้เย็นตัว โมเลกุลอะมิโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล เกิดเป็นร่างแหสามมิติโครงสร้างใหม่นี้สามารถอุ้มน้ำและไม่มีการดูดน้ำเข้ามาอีก มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดลักษณะเจลเหนียว คล้ายฟิล์มหรือผลึก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) หรือการคืนตัว (setback) เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงไปอีกลักษณะการเรียงตัวของโครงสร้างจะแน่นมากขึ้น โมเลกุลอิสระของน้ำที่อยู่ภายในจะถูกบีบออกมานอกเจล ซึ่งเรียกว่า syneresis ปรากฏการณ์ทั้งสองนี้จะทำให้เจลมีลักษณะขาวขุ่นและมีความหนืดเพิ่มขึ้น

การคืนตัวของแป้งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของแป้ง ความเข้มข้นของแป้ง กระบวนการให้ความร้อน กระบวนการให้ความเย็น อุณหภูมิ ระยะเวลา พีเอชของสารละลาย ปริมาณและขนาดของอะไมโลส (amylase) อะไมโลเพกทิน (amylopectin) และองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ในแป้ง ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำและความเข้มข้นของแป้งสูง แป้งสามารถคืนตัวได้ดี ในช่วงพีเอช 5-7 แป้งสามารถคืนตัวได้เร็วที่สุด สำหรับช่วงพีเอชที่สูงหรือต่ำกว่านี้แป้งจะคืนตัวได้ช้าลง

3.3 การใช้แป้งเป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ

การนำแป้งมาใช้ประโยชน์เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ แป้งที่ใช้จะต้องนำมาผ่านการย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก หรือกลายเป็นพอลิแซคคาไรด์สายสั้น ๆ เสียก่อน ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้ง แสดงในตารางที่ 9 โดยส่วนใหญ่มักจะใช้เอนไซม์เป็นตัวทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ดังกล่าว แป้งที่ผ่านการย่อยแล้วและนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นพบได้ 2 รูปแบบ คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซคคาไรด์

ในกระบวนการย่อยแป้งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้โดยง่าย แต่บางครั้งในการนำแป้งมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อนั้น ไม่จำเป็นต้องทำการย่อยแป้งจนเสร็จสมบูรณ์ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถนำโอลิโกแซคคาไรด์ไปใช้ในการเจริญได้เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 9 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยแป้ง

Table 9 Products from hydrolyzed starch

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

ที่มา : ดัดแปลงจาก Fabiano และ Perego (2002)

3.4 การใช้แป้งในการผลิตผลิตภัณฑ์

รูปแบบการใช้ประโยชน์จากแป้งในอุตสาหกรรมต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงไปตลอด อุตสาหกรรมหนึ่งในปัจจุบันอาจถูกแทนที่ด้วยอุตสาหกรรมหนึ่งที่กำลังพัฒนาต่อไปในอนาคตได้ การคิดค้นใหม่ๆ ทำให้เกิดการประยุกต์ใช้แป้งเพิ่มขึ้น เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อในการผลิต หรือสารตั้งต้นในการผลิต

นิยม กำลังดี (2539) ได้ศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งจาก *Aspergillus niger* พบว่าสามารถย่อยแป้งสาคูดิบ และมีความสามารถในการผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูง ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* คือ ความเข้มข้นของแป้งสาคูดิบเริ่มต้นที่ร้อยละ 15 พีเอชของสารละลายเป็น 5.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่สภาวะดังกล่าวนี้เอนไซม์จากเชื้อ *A. niger*ให้ค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเป็น 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 10 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุดเป็น 23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงแรกของการบ่ม

Yetti และคณะ (2000) ศึกษาการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Acremonium* sp. ย่อยแป้งสาคู พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ 55 องศาเซลเซียส และ 5.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ยังคงตัวในพีเอชที่ 3-7 และที่อุณหภูมิที่สูงถึง 60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์มีความสามารถในการย่อยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน มีค่า K_m

ของความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 3.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราเร็วสูงสุดของการเกิดกิจกรรมเท่ากับ 391 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที และสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้คือ EDTA

Mohamad และคณะ (2002) ศึกษาการผลิต kojic acid โดยใช้เชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 และใช้แป้งสาคูที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชันเป็นแหล่งคาร์บอน 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 31.00 กรัมต่อลิตร เมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอชของการหมัก

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

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ได้
2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน
3. ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp.
4. ศึกษาแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินโดยเอนไซม์ CGTase

ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase จากแหล่งต่างๆ และนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase จากแป้ง จากนั้นทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้ รวมถึงศึกษาแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน เพื่อให้สามารถผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินได้สูงสุดภายในระยะเวลาที่สั้นที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้เชื้อ *Bacillus* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase
2. สามารถนำแป้งมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอนไซม์ CGTase และไซโคลเด็กซ์ตรินได้
3. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase
4. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้ง