การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

ปริญญานิพนธ์

ของ

ชโลธร วันแอเลาะห์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา

มีนาคม 2553

การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

ปริญญานิพนธ์

ของ

ชโลธร วันแอเลาะห์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา
มีนาคม 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

บทคัดย่อ

ของ

ชโลธร วันแอเลาะห์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา
มีนาคม 2553

ชโลธร วันแอเลาะห์. (2553). *การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (อุตสาหกรรมศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: อาจารย์ ดร.ไพรัช วงศ์ยุทธไกร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ถนอมสิน ดิสถาพร.

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังและหาคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการผลิตด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนและระหว่างการหมัก โดยทำการหมักเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ปริมาณเริ่มต้น 9,155 มิลลิกรัมต่อลิตร กำหนดให้น้ำทิ้งที่ใช้ในการทดลองมี 2 สภาวะ คือ น้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการหมักน้ำทิ้งที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่ 7 ตลอดการทดลอง ทำการวิเคราะห์น้ำหมักทุก 7 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่ามีแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในระหว่างทำการหมัก โดยที่ระยะเวลาการหมัก 21 วัน มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ดังนี้คือ น้ำหมักที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, น้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย 11,353–11,945 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 11,958–14,034 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหมักที่อุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, น้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย 25,022–31,661 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 17,797–21,735 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 30–37 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี คือ 52.57 และ 42.71 หน่วย ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 47–55 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีทั้ง 2 ไอโซเลท คือ 64.46, 16.34 และ 34.07 หน่วย ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ทำการย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 10–50 นาที ปริมาณเอนไซม์ 1.35% ของน้ำหนักแป้งแห้ง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย และที่ระยะเวลาการย่อย 40 นาที เอนไซม์

อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส ให้ค่า DE 15.36, 15.09, 15.08 และ 15.12 ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171–2536 พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส ทั้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมัก 21 วัน ที่ระยะเวลาในการย่อยแป้ง 40 นาที มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171–2536 มีรายละเอียดดังนี้ คือ เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนแล้ว มีสีน้ำตาลแดง สามารถละลายน้ำได้ มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 65.54, 65.91, 63.23 และ 65.18 ตามลำดับ มีเถ้าซัลเฟตร้อยละ 0.44, 0.40, 0.42 และ 0.40 ตามลำดับ มีน้ำตาลรีดิวซิงร้อยละ 10.07, 9.94, 9.54 และ 9.85 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.11, 0.12, 0.09 และ 0.07 ตามลำดับ

PRODUCTION OF MALTODEXTRIN USING BACTERIAL ENZYME FROM WASTEWATER FERMENTATION OF TAPIOCA STARCH INDUSTRY

AN ABSTRACT

BY

CHALOTORN WAN-AE-LOR

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Education Degree in Industrial Education

at Srinakharinwirot University

March 2010

Chalotorn Wan-ae-lor. (2010). *Production of maltodextrin using bacterial enzyme from wastewater fermentation of tapioca starch industry*. Master thesis, M.Ed. (Industrial Education). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Pairust Vongyuttakrai, Asst. Prof. Tanomsin Disataporn.

This research were study to the production and the quality of maltodextrin using bacterial enzyme from wastewater fermentation of tapioca starch industry. The experiments were conducted in 4 steps:

First step: Testing the quality of wastewater and fermented water of tapioca starch industry. The researcher took some water from wastewater treatment pond have contain microorganisms of 9,155 mg/l at pH 7. The tapioca wastewater were used in non treatment and treatment for COD at 1,200 mg/l. The experiments were fermentation at 30–37^{0}C and 47–55^{0}C. The results showed that, the microorganisms were increases and the fermentation of 21 dates have microorganisms higher than 7 and 14 dates respectively. The 21 dates fermented water at 30–37^{0}C added non treatment wastewater have microorganisms for 11,353-11,945 mg/l. The 21 dates fermented water at 30–37^{0}C added treatment wastewater for COD at 1,200 mg/l have microorganisms of 11,958-14,034 mg/l. The 21 dates fermented water at 47– 55^{0}C added non treatment wastewater have microorganisms of 25,022-31,661 mg/l and the 21 dates fermented water at 47– 55^{0}C added treatment wastewater for COD at 1,200 mg/l have microorganisms for 17,797-21,735 mg/l.

Second step: The researcher selected of microorganisms that produced amylase and tested for amylase activity. The results showed that, bacterial enzyme from 21 dates fermented water at 30–37^{0}C added treatment wastewater for COD at 1,200 mg/l have amylase activity higher than 21 dates fermented water at 30–37^{0}C added non treatment wastewater were 52.57 and 42.71 units respectively and bacterial enzyme from 21 dates fermented water at 47–55^{0}C added treatment wastewater for COD at 1,200 mg/l have amylase activity higher than 2 isolates of 21 date fermented water at 47–55^{0}C added non treatment wastewater were 64.46, 16.34 and 34.07 units respectively.

Third step: The researcher produced the maltodextrins from tapioca starch, obtained by using amylase 1.35% of dry starch weight at 80^{0}C for 10–50 minutes.

The results showed that, the reducing sugar content and DE (Dextrose Equivalent) values increased with increasing time. For 40 minutes, DE values of maltodextrins from bacterial enzyme from 21 dates fermented water added non treatment wastewater and treatment wastewater for COD at 1,200 mg/l at 30–37^{0}C and 47–55^{0}C were 15.36, 15.09, 15.08 and 15.12 respectively.

Fourth step: The researcher tested the quality of maltodextrins by method of Thai Industrial Standard 1171–2536. The results showed that, maltodextrins from bacterial enzyme from 21 dates fermented water added non treatment wastewater and treatment wastewater for COD at 1,200 mg/l at 30–37^{0}C and 47–55^{0}C have the values of indicator were red brown, soluble in water, total solid content were 65.54, 65.91, 63.23 and 65.18% respectively, sulfated ash content were 0.44, 0.40, 0.42 and 0.40% respectively, reducing sugar content were 10.07, 9.94, 9.54 and 9.85% respectively and protein content of maltodextrins were 0.11, 0.12, 0.09 and 0.07% respectively. The results of this experiment showed that, the quality of maltodextrins using bacterial enzyme from wastewater fermentation of tapioca starch industry passed the standard requirement of Thai Industrial Standard 1171 – 2536.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรม
แป้งมันสำปะหลัง

ของ

ชโลธร วันแอเลาะห์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน มีนาคม พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.ไพรัช วงศ์ยุทธไกร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ถนอมสิน ดิสถาพร)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.อัมพร กุญชรรัตน์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ไพรัช วงศ์ยุทธไกร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ถนอมสิน ดิสถาพร)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.อุปวิทย์ สุวคันธกุล)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความอนุเคราะห์ให้คำปรึกษาอย่างดียิ่ง จากอาจารย์ ดร.ไพรัช วงศ์ยุทธไกร ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ถนอมสิน ดิสถาพร กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ดร.อัมพร กุญชรรัตน์ และอาจารย์ ดร.อุปวิทย์ สุวคันธกุล ซึ่งเป็นกรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม ตลอดจนอาจารย์โอภาส สุขหวาน ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบแก้ไขพร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วีรวัฒน์ เลิศวนวัฒนา กรรมการผู้จัดการ บริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้เก็บน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน ให้เก็บแบคทีเรียจากบ่อบำบัดน้ำทิ้ง และให้ความอนุเคราะห์ในการให้ใช้สถานที่และเครื่องมือพื้นฐานในการทดลอง บริเวณห้องปฏิบัติการพัฒนาผลิตภัณฑ์ จนทำให้การทดลองครั้งนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณสุรพันธ์ ลดาวัลย์ ที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำต่างๆ และอำนวยความสะดวกในด้านการเก็บน้ำทิ้งและแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำทิ้ง ขอขอบพระคุณ ดร.ตวงพร ตู้โกเมน และคุณวรรณศิริ สัตยามระ ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำในเรื่องการใช้เครื่องมือต่างๆ ในห้องปฏิบัติการตลอดจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณอนุสิทธิ์ สุขม่วง รักษาการ ผู้อำนวยการสำนัก และคุณอรทัย ลีลาพจนาพร หัวหน้ากลุ่มฝึกอบรม สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้ใช้ห้องปฏิบัติการ บริเวณอาคารสถานศึกษาเคมีปฏิบัติ และให้ความกรุณาให้คำแนะนำต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ อุตสาหกรรมศึกษา ภาคพิเศษ รุ่นที่ 16 และขอขอบคุณพี่หญิง พี่จอย พี่อุ้ม พี่วรรษ พี่จัง พี่จู้ พี่หน่อย พี่มนตรี พี่แจ๋ หญิง เสา ต้อม ที่ให้คำปรึกษา ให้ข้อเสนอแนะในการทดลองด้านต่างๆ และเป็นกำลังใจให้ตลอดจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายผู้วิจัยขอน้อมระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ครู อาจารย์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา ให้ความรู้ คำปรึกษาแนะนำและเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ชโลธร วันแอเลาะห์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	4
	นิยามศัพท์เฉพาะ	5
	กรอบแนวคิดการวิจัย	7
	สมมุติฐานการวิจัย	7
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	8
	มันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลัง	9
	น้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง	32
	การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์	40
	การสกัดเอนไซม์จากจุลินทรีย์	46
	มอลโทเดกซ์ทริน	59
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	71
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	81
	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	81
	วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง	81
	สถานที่และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง	83
	วิธีดำเนินการทดลอง	83
	สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	103

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**	105
	ตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนและระหว่างการหมัก	105
	ตอนที่ 2 การทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส	112
	ตอนที่ 3 การทดสอบการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน	116
	ตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน	122
5	**สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	128
	สรุปผลการวิจัย	128
	อภิปรายผลการวิจัย	132
	ข้อเสนอแนะทั่วไป	137
	ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป	137
บรรณานุกรม		138
ภาคผนวก		142
	ภาคผนวก ก	143
	ภาคผนวก ข	146
	ภาคผนวก ค	162
ประวัติย่อผู้วิจัย		164

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 เนื้อที่ ผลผลิต ผลผลิตต่อไร่ ราคาและมูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกร ขายได้ ปี 2543 – 2552..... 10

2 เนื้อที่ ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ เป็นรายภาค ปี 2550 – 2552..... 11

3 ลักษณะประจำพันธุ์มันสำปะหลัง (1)..... 12

4 ลักษณะประจำพันธุ์มันสำปะหลัง (2)..... 13

5 ส่วนประกอบหลักในหัวมันสำปะหลัง..... 14

6 คุณสมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน..... 21

7 ปริมาณและสัดส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งแต่ละชนิด..... 22

8 คุณสมบัติของแป้งเปียกของแป้งชนิดต่างๆ..... 23

9 ลักษณะน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังชนิดสลัดแห้ง..... 28

10 การแบ่งจุลินทรีย์ตามระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ..... 51

11 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียของการย่อยแป้งด้วยกรดและเอนไซม์..... 68

12 แสดงสมบัติน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนและบ่อบำบัดน้ำเสีย..... 106

13 แสดงสมบัติน้ำทิ้งระหว่างการหมัก..... 107

14 แสดงเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่เพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Starch agar ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 112

15 แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก เพาะเลี้ยงในอาหาร Production medium ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังตกตะกอนด้วยเอธานอล..... 115

16 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE จากการย่อยสตาร์ชในแป้งมันสำปะหลัง (ของแข็งร้อยละ 25) ด้วยเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* เปรียบเทียบกับเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก ทำการย่อย ณ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 10 – 50 นาที..... 117

17 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE จากการย่อยสตาร์ชในแป้งมันสำปะหลัง (ของแข็งร้อยละ 25) ด้วยเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* เปรียบเทียบกับเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก ณ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส หลังการระเหยน้ำ..... 120

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

18 แสดงคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ที่ได้จากเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis*..... 122

19 แสดงคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ที่ได้จากเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จาก น้ำหมัก ที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส..... 124

20 แสดงคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ที่ได้จากเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จาก น้ำหมัก ที่หมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส..... 126

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่เป็นแบบมาตรฐาน..... 19
2 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลส..... 20
3 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน..... 21
4 แผนผังสมดุลมวลสารของน้ำในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง..... 25
5 แผนผังสมดุลมวลสารของแป้งมันสำปะหลัง..... 26
6 อุตสาหกรรมการย่อยแป้งเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ..... 62
7 การย่อยอะไมโลสและอะไมโลเพคตินด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ..... 64
8 การย่อยอะไมโลเพคตินด้วยแอลฟาอะไมเลสทำให้เกิดเดกซ์ทริน..... 65
9 การย่อยอะไมโลเพคตินด้วยเบตาอะไมเลสทำให้เกิดมอลโตสและเดกซ์ทริน..... 66
10 ขั้นตอนการหมัก การแยกแบคทีเรีย การผลิตและทดสอบคุณภาพมอลโทเดกซ์ทริน... 84
11 แสดงขั้นตอนการรีฟลักซ์หาปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งและน้ำจากกระบวนการหมัก..... 87
12 แสดงขั้นตอนการอบจานระเหยเพื่อหาปริมาณสารทั้งหมด..... 89
13 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย..... 90
14 แสดงขั้นตอนการเผากระดาษกรองเพื่อหาปริมาณสารแขวนลอยระเหย..... 91
15 แสดงขั้นตอนการบ่มเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ..... 92
16 กระบวนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน..... 94
17 แสดงขั้นตอนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน..... 95
18 แสดงขั้นตอนการหาน้ำตาลรีดิวซิงของมอลโทเดกซ์ทริน..... 100
19 แสดงขั้นตอนการหาของแข็งทั้งหมดของมอลโทเดกซ์ทริน..... 102
20 แสดงปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ
30–37 องศาเซลเซียส..... 109
21 แสดงปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ
47–55 องศาเซลเซียส..... 110
22 แสดงปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก..... 111
23 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซิง..... 114
24 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการย่อยแป้ง..... 118
25 แสดงค่า DE ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการย่อยแป้ง..... 119

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

26 แสดงบ่อบำบัดน้ำทิ้งของบริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด..... 147

27 แสดงบ่อบำบัดน้ำเสีย บริเวณบ่อที่ 6 ของบริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด ซึ่งเป็นจุดที่เก็บแบคทีเรีย..... 147

28 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการรีฟลักซ์หาปริมาณซีโอดี..... 148

29 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการติเตรตเพื่อหาจุดสมมูลย์..... 148

30 แสดงสีของสารละลายที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อถึงจุดสมมูลย์..... 148

31 แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งหมด..... 149

32 แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย..... 149

33 แสดงวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย..... 149

34 แสดงการนำกระดาษกรองเข้าเตาเผา 550 องศาเซลเซียสเพื่อหาปริมาณสารแขวนลอยระเหย..... 150

35 แสดงการวัดพีเอชของน้ำทิ้งด้วยพีเอชมิเตอร์..... 150

36 แสดงการบ่มจานเพาะเชื้อในเครื่องบ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำเพื่อทำการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส..... 151

37 แสดงโคโลนีของเชื้อ บนอาหารแข็ง Starch agar..... 151

38 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ย่อยสลาย Starch..... 152

39 แสดงโคโลนีของเชื้อที่เกิดจากการ Streak plate บนอาหารแข็ง Starch agar..... 152

40 แสดงโคโลนีของเชื้อที่เกิดจากการเพาะเชื้อแบบ Point inoculation บนอาหารแข็ง Starch agar..... 153

41 แสดงการบ่มเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิสำหรับการบ่มเชื้อจุลินทรีย์..... 153

42 แสดงขั้นตอนการปั่นแยกเซลล์โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ..... 154

43 แสดงการทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยวิธี Solvent precipitation..... 154

44 แสดงตะกอนเอนไซม์ที่ได้จากการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ..... 155

45 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส..... 155

46 แสดงอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส..... 156

47 แสดงเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส..... 156

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

48 แสดงสารละลายที่ใช้หากราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส..... 157

49 แสดงการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน..... 157

50 แสดงมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตได้..... 158

51 แสดงผลการทดสอบลักษณะชี้บ่งของมอลโทเดกซ์ทริน..... 158

52 แสดงวิธีการทดสอบการละลายของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนก่อนนำไป
ระเหยแห้ง..... 158

53 แสดงวิธีการหาของแข็งทั้งหมดของมอลโทเดกซ์ทริน..... 159

54 แสดงวิธีการหาเถ้าซัลเฟตของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนให้ความร้อนบน
Hot plate จนตัวอย่างกลายเป็นเถ้า..... 159

55 แสดงวิธีการหาเถ้าซัลเฟตของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนเข้าเตาเผาที่
อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส..... 160

56 แสดงวิธีการหาน้ำตาลรีดิวซิงของมอลโทเดกซ์ทริน..... 160

57 แสดงวิธีการหาโปรตีนของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนการย่อยโดยใช้ H_2SO_4..... 160

58 แสดงวิธีการหาโปรตีนของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนการกลั่นแอมโมเนีย..... 161

59 แสดงวิธีการหาโปรตีนของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนการติเตรตกับ H_2SO_4..... 161

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง เป็นอุตสาหกรรมการเกษตรประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ปัจจุบัน ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกแป้งมันสำปะหลังใหญ่ที่สุดในโลก โดยในปี พ.ศ. 2552 ประเทศไทยมีกำลังการผลิตมันสำปะหลังโรงงาน 30.088 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 35,805 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552: 19) มีการส่งออกแป้งมันสำปะหลัง ตั้งแต่เดือนมกราคม – ธันวาคม พ.ศ. 2552 เป็นจำนวน 2,496,677 ตัน คิดเป็นมูลค่า 29,495.3 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553: ออนไลน์) และในอนาคตอันใกล้ มีแนวโน้มที่จะเพิ่มกำลังการผลิตมากขึ้นเรื่อยๆ โดยอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังของประเทศไทย แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังสำเร็จรูป อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังแปรรูป และอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์อื่นๆ จากแป้งมันสำปะหลัง เช่น การผลิตน้ำตาลกลูโคส และกลูโคสไซรัป เป็นต้น (เดชา พิมพิสุทธิ์. 2550: 51) อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง เป็นอุตสาหกรรมที่มีการใช้น้ำเป็นจำนวนมาก โดยทั่วไป ในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน จะก่อให้เกิดน้ำทิ้งประมาณ 10 – 20 ลูกบาศก์เมตร มีภาวะความสกปรกของสารอินทรีย์สูง โดยมีปริมาณบีโอดี ประมาณ 55 – 200 กิโลกรัม ปริมาณซีโอดี ประมาณ 130 – 400 กิโลกรัม ปริมาณสารแขวนลอย ประมาณ 40 – 140 กิโลกรัม ฟอสฟอรัสทั้งหมด ประมาณ 0.2 – 0.6 กิโลกรัม และไนโตรเจนทั้งหมด ประมาณ 3 – 10 กิโลกรัม (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549: 6) นอกจากนี้ ยังพบวัสดุเหลือทิ้งในรูปของแข็ง ได้แก่ เปลือก ราก และกากมันสำปะหลังอีกด้วย และในกระบวนการผลิตจะมีการสูญเสียแป้งมันสำปะหลังหลายขั้นตอน เช่น การสูญเสียแป้งมันสำปะหลังไปกับเปลือกมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง ลมร้อน และน้ำเสีย ข้อมูลจากแนวทางการจัดการด้านสิ่งแวดล้อมสำหรับอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังจะเกิดแป้งสูญเสียประมาณ 40 กิโลกรัมต่อหนึ่งตันแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549: 9) จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก รวมทั้งน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม ซึ่งกระทบต่อชุมชนโดยรอบและเกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อมส่วนรวม ซึ่งมีผลต่อเนื่องอย่างกว้างขวาง หากไม่มีการบำบัดอย่างถูกต้อง

แนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหามลพิษทางน้ำ จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ คือ การนำน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่มีสารอินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆ ไปเป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายหรือใช้ประโยชน์จากสารอินทรีย์และแร่ธาตุเหล่านั้นได้ และนำจุลินทรีย์นั้นไปใช้ประโยชน์อีกต่อหนึ่ง โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ เป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อให้ได้กรดอินทรีย์ ผลที่ได้จากกระบวนการหมักดังกล่าวจะให้เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง ซึ่งแนวทางนี้เป็นการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยชีววิธี เป็นกระบวนการนำจุลินทรีย์มาใช้ป้องกัน บำบัด หรือลดปริมาณสารมลพิษซึ่งปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม การฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยวิธีนี้ ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนต่ำ ไม่เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม เพราะสารมลพิษจะถูกเปลี่ยนไปเป็นมวลชีวภาพของเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีพิษ ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาเพื่อกำจัดและนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ โดยอาศัยเทคโนโลยีที่เหมาะสม หรือการเปลี่ยนรูปวัสดุเหลือทิ้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถขายได้เพื่อเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือทิ้ง ช่วยลดภาระทางการเงินในการบำบัดน้ำทิ้งหรือวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงาน ลดการเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะทำให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในด้านเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม

ประเทศไทย มีการนำเอนไซม์มาใช้งานในอุตสาหกรรมทางด้านอาหารเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารหมักดอง อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์อื่นๆ จากแป้งมันสำปะหลังเป็นหลัก เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเหล่านี้ มาจากทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนั้น การศึกษาการผลิตเอนไซม์จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาใช้เองในประเทศ สำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์อื่นๆ จากแป้งมันสำปะหลังเป็นหลัก มีการนำเอนไซม์มาทำการย่อยแป้งเพื่อผลิตเป็นมอลโทเดกซ์ทริน ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน เพราะเป็นการทำให้มอลโทเดกซ์ทรินมีค่าสมมูลเดกซโทรส (Dextrose Equivalent) เป็นไปตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ ในขั้นตอนการย่อยแป้ง มีการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยแป้งแทนการใช้กรด เนื่องจากการย่อยแป้งด้วยกรดต้องทำปฏิกิริยาร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิสูง ประสิทธิภาพในการย่อย ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย และยังก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เช่น เกิดสารเฟอร์ฟูรอล เป็นต้น (พักตร์ประไพ ประจำเมือง. 2546: 12) ในปัจจุบัน นิยมย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์ เพราะใช้สภาวะไม่รุนแรง การเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะ ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาง่าย ไม่เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ และไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความทนทานต่อการกัดกร่อนสูงเช่นเดียวกับการใช้กรด เอนไซม์อะไมเลสมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ ซึ่งเป็นลักษณะการทำงานที่มีความจำเพาะ ทำให้มีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ในการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

โดยทั่วไป สามารถนำมอลโทเดกซ์ทรินไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารได้หลากหลาย จากการที่มอลโทเดกซ์ทรินเป็นแป้งที่ผ่านการย่อยโมเลกุลบางส่วนโดยใช้ความร้อนหรือกรดหรือเอนไซม์ ทำให้มีสมบัติละลายน้ำได้ดี มีความหนืดต่ำ และไม่มีกลิ่นรส เหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทเครื่องดื่มและผงปรุงรสต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นตัวพากลิ่นรสหรือเป็น Bulking agent ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทซุปหรือซอสผง ใช้ประโยชน์ในด้านการจับกลิ่นในกระบวนการ Spray dry ใช้เป็นสารทดแทนไขมัน ใช้ในอุตสาหกรรมขนมหวานแช่แข็ง หรือใช้ในด้านอื่นๆ นอกจากในทางอุตสาหกรรมอาหารอีกมากมาย

ผู้วิจัยจึงเห็นว่าวิธีการที่จะช่วยลดปริมาณแร่ธาตุอาหารที่ยังเหลืออยู่ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง คือ วิธีการทางชีวภาพ โดยการนำน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ไปเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ทำการหมักให้ได้เอนไซม์และนำไปใช้ในการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินเพื่อลดต้นทุนการผลิตและยังเป็นการลดปัญหาสภาพแวดล้อมอีกด้วย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

2. เพื่อหาคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการผลิตด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

ความสำคัญของการวิจัย

ผลจากการวิจัยเรื่องนี้ เป็นประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังแปรรูป ในการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน และอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ คือ

1. น้ำทิ้งและจุลินทรีย์จากบ่อบำบัดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มจากของเหลือใช้ได้ และช่วยลดต้นทุนในการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ในส่วนของวัตถุดิบที่ใช้คือ เอนไซม์ ในขั้นตอนการย่อยแป้งเป็นมอลโทเดกซ์ทริน

2. การนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องใช้เอนไซม์เป็นวัตถุดิบในการผลิตลดลง เช่น อุตสาหกรรมการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน กลูโคสไซรัป เพคติน และน้ำผลไม้ เป็นต้น

3. ปริมาณแร่ธาตุอาหารที่ยังเหลืออยู่ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังลดลง ซึ่งเกิดจากการนำน้ำทิ้งไปเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายหรือใช้ประโยชน์จากแร่ธาตุเหล่านั้นได้ เป็นการช่วยลดภาระทางการเงินและเวลาในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงาน และลดการเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ขอบเขตของการวิจัย

เพื่อให้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ บรรลุผลตามจุดมุ่งหมายที่ได้ตั้งไว้ ผู้วิจัยได้กำหนดขอบเขตการศึกษาไว้ดังต่อไปนี้ คือ

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า ได้แก่ น้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน (Sedimentation Pond) ในอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง จากบริษัทที่ได้รับการรับรองมาตรฐานความปลอดภัยทางด้านอาหาร และมาตรฐานอื่นๆ ได้แก่ GMP, HACCP, ISO9000 และ ISO14000 เป็นต้น ในการทดลองครั้งนี้ นำน้ำทิ้งมาจาก บริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด

ตัวแปรที่ศึกษา

1. **ตัวแปรต้น**

   1.1 ปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งที่ใช้ในการหมัก

   1.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

   1.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

   1.4 ระยะเวลาที่เอนไซม์ใช้ในการย่อยแป้งเป็นมอลโทเดกซ์ทริน

2. **ตัวแปรตาม**

   คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ได้แก่

   2.1 ลักษณะชี้บ่ง

   2.2 การละลาย

   2.3 ของแข็งทั้งหมด

   2.4 เถ้าซัลเฟต

   2.5 น้ำตาลรีดิวซิง

   2.6 โปรตีน

3. **ตัวแปรควบคุม**

   3.1 พีเอชของน้ำหมักระหว่างทำการหมัก

   3.2 สมบัติน้ำทิ้งแป้งมันสำปะหลังระหว่างทำการหมัก

   3.3 สมบัติน้ำจากระบบบำบัด

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. **ปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งที่ใช้ในการหมัก** หมายถึง ปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังจากบริเวณบ่อตกตะกอน ก่อนทำการหมัก โดยทำการทดลอง 2 สภาวะ คือ น้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีให้ได้ประมาณ 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร การควบคุมความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง ทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งที่นำมาจากบ่อตกตะกอน แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำที่ใช้ในการเจือจางจนได้ค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. **อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก** หมายถึง อุณหภูมิที่แบคทีเรียแอนแอโรบสามารถทำการหมักได้ โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 47 – 55 องศาเซลเซียส

3. **ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก** หมายถึง ระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่ต้องใช้ในการหมัก เป็นระยะเวลาที่ของเสียที่อยู่ในถังหมักถูกกำจัด เพื่อให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนให้มีปริมาตรคงที่ ใช้ควบคุมประสิทธิภาพของกระบวนการหมักแบบชีวภาพ โดยอัตราการย่อยสลายในกระบวนการหมักจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บกักอินทรีย์สารจนถึงค่าสูงสุดค่าหนึ่ง ต่อจากนั้นก็จะลดลง โดยทำการทดสอบที่ระยะเวลาหมักตั้งแต่ 7, 14 และ 21 วัน โดยจะเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกสัปดาห์

4. **ระยะเวลาที่เอนไซม์ใช้ในการย่อยแป้งเป็นมอลโทเดกซ์ทริน** หมายถึง ช่วงระยะเวลาที่เอนไซม์จะสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังจนเปลี่ยนเป็นมอลโทเดกซ์ทริน โดยทำการทดสอบที่ระยะเวลาย่อยตั้งแต่ 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที

5. **พีเอชของน้ำหมักระหว่างทำการหมัก** หมายถึง พีเอชของน้ำหมักที่ได้ทำการวิเคราะห์และปรับพีเอชให้ได้ 7 ตลอดการทดลอง

6. **สมบัติน้ำทิ้งแป้งมันสำปะหลังระหว่างทำการหมัก** หมายถึง สมบัติทางเคมีของน้ำทิ้ง โดยนำน้ำทิ้งจากบ่อตกตะกอน มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี ปริมาณสารทั้งหมด ปริมาณสารแขวนลอย ปริมาณสารแขวนลอยระเหยและพีเอช โดยกำหนดให้น้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี มีปริมาณซีโอดีอยู่ระหว่าง 2,200 – 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. **สมบัติน้ำจากระบบบำบัด** หมายถึง สมบัติทางเคมีของน้ำจากระบบบำบัด โดยนำน้ำจากระบบบำบัด มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี ปริมาณสารทั้งหมด ปริมาณสารแขวนลอย ปริมาณสารแขวนลอยระเหยและพีเอช โดยกำหนดให้น้ำจากระบบบำบัดมีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 9,155 มิลลิกรัมต่อลิตร

8. **คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน** หมายถึง คุณลักษณะทั่วไป คุณลักษณะทางฟิสิกส์และเคมี ตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ดังต่อไปนี้

8.1 ลักษณะชี้บ่ง เป็นสีใดสีหนึ่งตั้งแต่สีน้ำเงินปนแดงเล็กน้อย สีม่วง สีม่วงแดง จนถึงสีน้ำตาลแดง

8.2 การละลาย ละลายน้ำได้บางส่วนหรือทั้งหมด

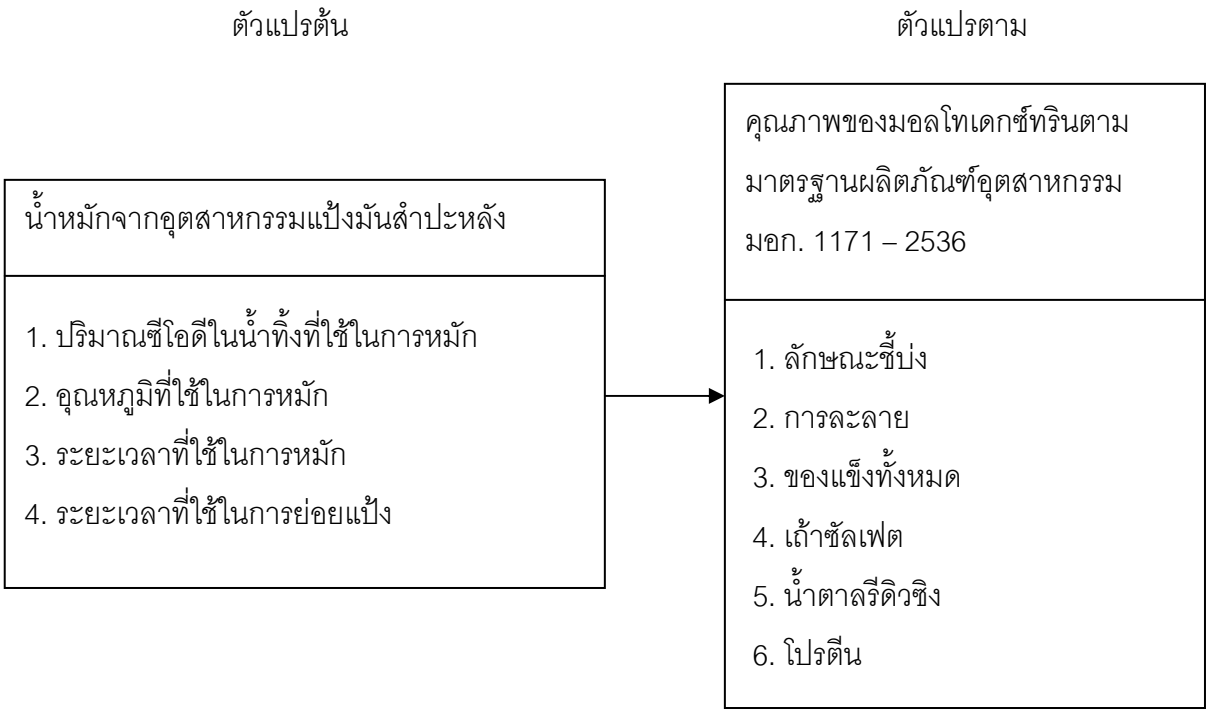
8.3 ของแข็งทั้งหมด (เฉพาะมอลโทเดกซ์ทริน) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 60

8.4 เถ้าซัลเฟต ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

8.5 น้ำตาลรีดิวซิง (คิดเป็นน้ำตาลเดกซ์โทรส) ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 5.0 ถึงน้อยกว่า 20.0

8.6 โปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



สมมุติฐานการวิจัย

1. เอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งที่ใช้ในการหมัก อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยแป้งที่แตกต่างกัน มีผลต่อคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536

2. มอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาวิจัยการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ผู้วิจัยได้ค้นคว้าเอกสารตำรา และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ดังนี้

1. มันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลัง
    1.1 มันสำปะหลัง
    1.2 แป้งมันสำปะหลัง
    1.3 แป้งมันสำปะหลังดัดแปร
2. น้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง
    2.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ
    2.2 การวิเคราะห์ทางเคมี
    2.3 การวิเคราะห์ทางชีวภาพ
3. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์
    3.1 สารอาหาร
    3.2 การเลี้ยงแบคทีเรียแอนแอโรบ
4. การสกัดเอนไซม์จากจุลินทรีย์
    4.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อแบคทีเรีย
    4.2 ชนิดและลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส
    4.3 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม
    4.4 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ
    4.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์
5. มอลโทเดกซ์ทริน
    5.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536
    5.2 กระบวนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน
    5.3 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน
6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. มันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลัง

อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นอุตสาหกรรมการเกษตรประเภทหนึ่งซึ่งมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย นอกจากจะเป็นสินค้าที่ผลิตเพื่อใช้ภายในประเทศแล้วยังเป็นสินค้าส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ข้อมูลจากสมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย พบว่าภายในปี พ.ศ. 2552 (มกราคม – ธันวาคม) มีการส่งออกแป้งมันสำปะหลังจำนวน 2,496,677.248 ตัน (แป้งมันสำปะหลังสำเร็จรูป จำนวน 1,798,100.043 ตัน, แป้งมันสำปะหลังแปรรูป จำนวน 698,577.205 ตัน) คิดเป็นมูลค่า 29,495,280,220 บาท (สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย. 2553: ออนไลน์) ในปัจจุบันยังมีการค้นคว้าทดลองเพื่อผลิตแป้งมันสำปะหลังแปรรูปชนิดใหม่ๆอยู่ตลอดเวลา ในอนาคตอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังจะยังคงเป็นอุตสาหกรรมการเกษตรที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศอย่างแน่นอน

วัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง คือ หัวมันสำปะหลังสด ซึ่งมีอยู่มากมายหลายชนิด ทั้งชนิดหวานที่สามารถรับประทานได้ และชนิดค่อนข้างขมและมีกรดไฮโดรไซยานิค ซึ่งจะเป็นอันตรายได้หากรับประทานโดยตรง จึงต้องนำมาแปรสภาพก่อนแล้วจึงนำไปรับประทานได้ ในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน จะก่อให้เกิดน้ำทิ้งประมาณ 10 – 20 ลูกบาศก์เมตร มีภาวะความสกปรกของสารอินทรีย์สูง โดยมีปริมาณบีโอดี ประมาณ 55 – 200 กิโลกรัม ปริมาณซีโอดี ประมาณ 130 – 400 กิโลกรัม ปริมาณสารแขวนลอย ประมาณ 40 – 140 กิโลกรัม ฟอสฟอรัสทั้งหมด ประมาณ 0.2 – 0.6 กิโลกรัม และไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 3 – 10 กิโลกรัม (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549: 6)

1.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้ บราซิล/เม็กซิโก มีชื่อเรียกต่างๆ กัน เช่น cassava, mandioca, yucca, tapioca และ manioc มันสำปะหลังเป็นพืชในวงศ์ใบเลี้ยงคู่ ตระกูล Euphobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Manihot esculenta Crantz. (กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543: 62)

ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่การเพาะปลูกมันสำปะหลังประมาณ 8.584 ล้านไร่ (1 ไร่ เท่ากับ 1,600 ตารางเมตร) คิดเป็นมูลค่าการผลิต 30.09 ล้านตัน โดยพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รายละเอียดดังตาราง 1 และ 2

ตาราง 1 เนื้อที่ ผลผลิต ผลผลิตต่อไร่ ราคาและมูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ ปี 2543 – 2552

ปี	เนื้อที่เพาะปลูก (1,000 ไร่)	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (1,000 ไร่)	ผลผลิต (1,000 ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กก.)	ราคาที่เกษตรกรขายได้ (บาท/กก.)	มูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ (ล้านบาท)
2543	7,406	7,068	19,064	2,697	0.63	12,010
2544	6,918	6,558	18,396	2,805	0.69	12,693
2545	6,224	6,176	16,868	2,731	1.05	17,712
2546	6,435	6,386	19,718	3,087	0.93	18,337
2547	6,757	6,608	21,440	3,244	0.8	17,152
2548	6,524	6,162	16,938	2,749	1.33	22,528
2549	6,933	6,693	22,584	3,375	1.29	29,134
2550	7,623	7,339	26,916	3,668	1.18	31,760
2551	7,750	7,397	25,156	3,401	1.93	48,551
2552	8,584	8,292	30,088	3,628	1.19	35,805

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2552). *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2551.* หน้า 19.

ตาราง 2 เนื้อที่ ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ เป็นรายภาค ปี 2550 - 2552

ภาค	เนื้อที่เพาะปลูก (ไร่)			เนื้อที่เก็บเกี่ยว (ไร่)			ผลผลิต (ตัน)			ผลผลิตต่อไร่ (กก.)		
	2550	2551	2552	2550	2551	2552	2550	2551	2552	2550	2551	2552
รวมทั้งประเทศ	7,622,883	7,750,413	8,583,557	7,338,809	7,397,089	8,292,146	26,915,541	25,155,797	30,088,024	3,668	3,401	3,628
เหนือ	1,112,989	1,155,594	1,462,652	1,077,490	1,100,088	1,407,607	3,894,434	3,805,126	5,286,978	3,614	3,459	3,756
ตะวันออกเฉียงเหนือ	4,210,676	4,242,134	4,513,883	4,041,061	4,043,856	4,360,695	14,577,925	13,448,028	15,570,654	3,607	3,326	3,571
กลาง	2,299,218	2,352,684	2,607,022	2,220,258	2,253,154	2,523,844	8,443,182	7,902,643	9,230,392	3,803	3,507	3,657

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2552). *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2551*. หน้า 20.

ในส่วนของพันธุ์มันสำปะหลังนั้น ทางกรมส่งเสริมการเกษตร ได้รวบรวมลักษณะพันธุ์ที่น่าสนใจที่ปลูกในประเทศไทยไว้ 9 พันธุ์ รายละเอียดดังตาราง 3 และ 4

ตาราง 3 ลักษณะประจำพันธุ์มันสำปะหลัง (1)

ลักษณะพันธุ์	**ระยอง 1**	**ระยอง 2**	**ระยอง 3**	**ระยอง 5**
สีต้น	เขียวเงิน	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอมเขียว
สีก้านใบ	เขียวปนม่วง	เขียวอมม่วง	เขียวอ่อนปนแดง	แดงเข้ม
สียอดอ่อน	ม่วง, มีขนเล็กๆ	เขียวอมม่วง	เขียวอ่อน	ม่วงอ่อน
ความสูงต้น (ซ.ม.)	200 - 300	180 - 220	130 - 180	170 - 220
ระดับการแตกกิ่งแรก (ซ.ม.)	สูง (180)	ค่อนข้างสูง (150)	ต่ำ (180)	สูง (100)
จำนวนแตกกิ่ง	น้อย	ปานกลาง	มาก	น้อย
สีเปลือกหัว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน
สีเนื้อหัว	ขาว	เหลืองอ่อน	ขาว	ขาว
ผลผลิต (ตัน/ไร่)	3.22	3	2.73	4.02
เปอร์เซ็นต์แป้ง (%)	18.3 (ฤดูฝน) 24 (ฤดูแล้ง)	ใกล้เคียงระยอง 1	23 (ฤดูฝน) 28 (ฤดูแล้ง)	22.3
อายุการเก็บรักษาท่อนพันธุ์ (วัน)	30	*	30 (ลำต้น) 15 (กิ่ง)	*

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. หน้า 63; อ้างอิงจาก กรมส่งเสริมการเกษตร. (2537). *พันธุ์มันสำปะหลังและลักษณะประจำพันธุ์*.

ตาราง 4 ลักษณะประจำพันธุ์มันสำปะหลัง (2)

ลักษณะพันธุ์	**ระยอง 60**	**ระยอง 90**	**เกษตรศาสตร์ 50**	**ศรีราชา 1**	**ห้านาที**
สีต้น	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอมส้ม	เขียวเงิน	เขียวเงิน	น้ำตาลอมเขียว
สีก้านใบ	เขียวอ่อนปนแดง	เขียวอ่อน	เขียวอมม่วง	เขียวปนม่วง	แดงเข้ม
สียอดอ่อน	เขียวอมน้ำตาล	เขียวอ่อน	ม่วง,(ไม่มีขนอ่อน)	เขียวปนม่วง	เขียวอ่อน
ความสูงต้น (ซ.ม.)	175 - 250	160 - 200	200 - 300	231	250 - 350
ระดับการแตกกิ่งแรก (ซ.ม.)	สูง (150)	สูง (120)	สูง (150)	สูง (170)	สูง (180)
จำนวนแตกกิ่ง	ปานกลาง	มาก	น้อย	น้อย	น้อย
สีเปลือกหัว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	ขาวนวล	น้ำตาลเข้ม
สีเนื้อหัว	ขาวครีม	ขาว	ขาว	ครีม	ขาว
ผลผลิต (ตัน/ไร่)	3.52	3.65	3.67	-	2–3 (สภาพไร่) 5 (สภาพสวน)
เปอร์เซ็นต์แป้ง (%)	18.5	23.7	23.3	21.9	14
อายุการเก็บรักษาท่อนพันธุ์ (วัน)	30	15	30	*	*

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. หน้า 63; อ้างอิงจาก กรมส่งเสริมการเกษตร. (2537). *พันธุ์มันสำปะหลังและลักษณะประจำพันธุ์*.

มันสำปะหลังเป็นพืชที่เก็บสะสมอาหารไว้ในราก โดยสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรต ส่วนประกอบของหัวมันสำปะหลังจะมีความแตกต่างกันบ้าง เนื่องจากพันธุ์ของมันสำปะหลัง อายุเก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำฝนในช่วงแรกก่อนการเก็บเกี่ยว และอื่น ๆ โดยทั่วไปหัวมันสำปะหลังที่มีอายุ 12 เดือน ได้รับปริมาณน้ำฝนเพียงพอ และไม่มีฝนตกชุกขณะเก็บเกี่ยว จะมีส่วนประกอบแสดงได้ดังตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนประกอบหลักในหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบในหัวมันสำปะหลัง	**ปริมาณ (ต่อ 100 กรัมน้ำหนักหัวมันสำปะหลัง)**
น้ำ	60.21 – 75.32
เปลือก	4.08 – 14.08
เนื้อ (แป้ง)	25.87 – 41.88
ไซยาไนด์ (ppm)	2.85 – 39.27
องค์ประกอบในเนื้อมันสำปะหลัง	**ปริมาณ (ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเนื้อมันสำปะหลัง)**
แป้ง	71.9 – 85.0
โปรตีน	1.57 – 5.78
เยื่อใย	1.77 – 3.95
เถ้า	1.20 – 2.80
ไขมัน	0.06 – 0.43
คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่แป้ง	3.59 – 8.66

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต; และคณะ. (2542). *เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ โครงการเพื่อบรรเทาผลกระทบทางสังคมเนื่องจากวิกฤตการณ์ทางเศรษฐกิจ การแปรรูปและการใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง*. หน้า 2.

การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง

1. การบริโภคเป็นอาหารโดยตรง ปกติที่นิยมรับประทานจะเป็นหัวมันสำปะหลังชนิดหวาน (มีกรดไซยานิคน้อย เช่น มันพันธุ์ห้านาที เป็นต้น) การบริโภคโดยตรงส่วนใหญ่นิยมนำหัวมันสำปะหลังมาทำขนมหวานหรือของหวาน โดยประเทศในแถบอเมริกาใต้ อัฟริกา อินโดนีเซีย นิยมบริโภคมันสำปะหลังเป็นอาหารหลัก (พักตร์ประไพ ประจำเมือง. 2546: 5)

2. อุตสาหกรรมมันเส้น เมื่อเก็บเกี่ยวหัวมันสดแล้ว ก็จะทำการแปรรูปโดยใช้เครื่องตีหัวมันเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปตาก เมื่อแห้งดีแล้วก็ทำการเก็บเพื่อส่งขายเป็นวัตถุดิบให้กับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมมันอัดเม็ดต่อไป ปกติมันสด 2.5 กิโลกรัมจะผลิตเป็นมันเส้นได้ 1 กิโลกรัม

3. อุตสาหกรรมมันอัดเม็ด ผลิตโดยการอัดมันเส้นภายใต้สภาวะความร้อนและความดัน โดยเครื่องอัด หลังจากอัดแล้วจะมีลักษณะเป็นท่อนยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ความชื้นประมาณ 14% นิยมใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอาหารสัตว์ เนื่องจากมันเม็ดจะมีปริมาณแป้งสูง (มากกว่า 65%) จึงใช้เป็นแหล่งอาหารให้พลังงานของสัตว์ (กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2542: 4)

4. อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังสามารถนำมาผลิตเป็นแป้งซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมกาว เป็นต้น

1.2 แป้งมันสำปะหลัง

1.2.1 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

หลักการของกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง คือ การสกัดแป้งจากหัวมันสำปะหลังโดยการใช้น้ำเป็นตัวสกัด ซึ่งน้ำจะถูกแยกออกหรือระเหยไปในท้ายที่สุด และมีการใช้เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ที่มีรอบการหมุนสูง เพื่อแยกโปรตีนและสิ่งเจือปนอื่นๆ ออกจากแป้งมันสำปะหลัง คุณภาพของแป้งมันสำปะหลังจะขึ้นอยู่กับขั้นตอนการสกัดแป้งเป็นสำคัญ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549: 19)

กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มีขั้นตอนดังนี้

1. การรับและการจัดเก็บหัวมันสำปะหลัง

หลังจากที่หัวมันสำปะหลังถูกส่งมายังโรงงาน หัวมันสำปะหลังจะผ่านการชั่งน้ำหนักและการทดสอบหาปริมาณแป้งโดยใช้หลักของการลอยตัวของหัวมันสำปะหลังในน้ำ (Buoyancy) เพื่อประเมินปริมาณแป้งและราคา โดยทั่วไปหัวมันสำปะหลังจะถูกส่งเข้าสู่กระบวนการผลิตภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันไม่ให้ปริมาณแป้งในหัวมันลดลง เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์และจุลินทรีย์

2. การเตรียมหัวมันสำปะหลัง

2.1 การกำจัดดินทรายและรากมันสำปะหลัง

หัวมันสำปะหลังที่ได้คุณภาพจะนำเข้าสู่ตะแกรงร่อนดินทราย (Sand Removal Drum) เพื่อกำจัดดินทรายที่ติดมากับหัวมันสำปะหลังและทำให้ผิวนอกของหัวมันหลุดออก ของเสียที่เกิดขึ้นทั้งหมดอยู่ในรูปของแข็ง ซึ่งปริมาณของของแข็งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศและสถานที่เพาะปลูกมันสำปะหลัง โดยทั่วไปหัวมันสำปะหลังหนึ่งตันจะมีของเสียในรูปของแข็งประมาณ 20 กิโลกรัม ในทางปฏิบัติ ตะแกรงร่อนดินทรายไม่สามารถกำจัดรากมันสำปะหลังได้ทั้งหมด ดังนั้น ของเสียในรูปรากมันสำปะหลัง (Stalks and Tails) ที่เกิดขึ้นจริงจะมีปริมาณประมาณ 10 กิโลกรัมต่อหนึ่งตันหัวมันสำปะหลัง

2.2 การปอกเปลือกและการล้างหัวมันสำปะหลัง

หัวมันสำปะหลังจะถูกส่งผ่านสายพานหรือเครื่องยกจากตะแกรงร่อนดินทรายไปยังเครื่องปอกเปลือกและเครื่องล้างหัวมันสำปะหลัง ในการปอกเปลือก เครื่องแยกที่มีรอบการหมุนสูงจะแยกเปลือกและสิ่งเจือปนต่างๆ (ได้แก่ ทรายที่ยังหลงเหลืออยู่ หิน และโลหะ) ออกจากหัวมันสำปะหลัง จากนั้นจะใช้วิธีฉีดน้ำพ่นเป็นฝอยเพื่อทำความสะอาดหัวมันสำปะหลังที่ปอกเปลือก

3. การบดหัวมันสำปะหลัง

3.1 การสับและการบด

หัวมันสำปะหลังที่สะอาดจะถูกส่งไปยังเครื่องสับโดยใช้สายพานต่อเนื่อง (Chain Conveyor) หรืออาจใช้เครื่องตักหัวมัน (Rasp Bucket Conveyor) เครื่องสับจะสับหัวมันสำปะหลังให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1- 2 นิ้ว ชิ้นมันสำปะหลังที่สับแล้วจะตกเข้าสู่เครื่องบดมัน (Root Rasper) เพื่อให้ได้หัวมันสำปะหลังที่เป็นเม็ดละเอียด (มันสำปะหลังบด แป้ง Fruit Water เป็นต้น)

3.2 การแยก Fruit Water โดยใช้ Decanter

ภายหลังการบด จะทำการแยก Fruit Water จากแป้ง และสูบออกไปโดยใช้ Decanter หัวมันสำปะหลังมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากถึงประมาณ ร้อยละ 60-70 โดยน้ำหนัก ส่วนที่เป็นของเหลวนี้เรียกว่า Fruit Water ซึ่งมีสารประกอบที่ละลายน้ำได้ เช่น เกลือ (โพแทสเซียม) สารประกอบไนโตรเจน และฟอสฟอรัส และน้ำตาล เป็นต้น สารอาหารเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ง่ายด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งก่อให้เกิดองค์ประกอบที่ไม่ต้องการ เช่น กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์ ดังนั้น ขั้นตอนแยก Fruit Water จะทำให้แป้งที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น

ดังนั้น เพื่อเป็นการลดการเกิดสารที่ไม่ต้องการเช่น กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ จึงใช้เครื่อง Decanter เพื่อแยก Fruit Water ออกจากแป้งและกากมันสำปะหลัง ในขั้นตอนนี้จะมีการเติมน้ำเข้าสู่ระบบเพื่อเจือจาง Fruit Water

1. การสกัดมันสำปะหลัง

ในขั้นตอนการสกัดแป้ง จะเป็นการแยกแป้งออกจากเซลลูโลส ซึ่งได้แก่ เส้นใยและกากมันสำปะหลัง ด้วยเครื่องสกัดที่ต่ออนุกรม (Multi-Stage Extractor) ซึ่งประกอบด้วยชุดสกัด 3 - 4 ชุดต่อเนื่องกัน โดยไม่มีถังพัก เครื่องสกัดจะมีลักษณะเป็นตะแกรงหมุนเหวี่ยงรูปโคน ซึ่งในชุดแรกจะใช้ตะแกรงขนาด 60 - 80 Mesh และชุดสุดท้ายจะเป็นการสกัดละเอียดโดยใช้ผ้ากรองขนาด 90 Mesh

น้ำแป้งข้นจะผ่านเข้าสู่เครื่องกรองหมุนเหวี่ยงรูปกรวย ซึ่งมีการพ่นน้ำเข้ามาในทิศทางสวนทาง (Counter Current) กับการไหลของน้ำแป้ง เพื่อให้เกิดการแยกตัวระหว่างแป้งและเส้นใย น้ำที่ใช้นี้เป็นน้ำที่เกิดจากขั้นตอนการทำแป้งให้บริสุทธิ์ ในขั้นตอนนี้จะมีการเติมน้ำกำมะถันเพื่อยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ ที่จะเปลี่ยนโมเลกุลของแป้งเป็นกรดแลคติค

กากมันสำปะหลังจากขั้นตอนการสกัดแป้งจะมีน้ำอยู่ในปริมาณมากถึงร้อยละ 90 - 95และมีปริมาณแป้งน้อยมาก จึงมีการแยกออกจากน้ำแป้งโดยใช้เครื่องอัดกากและนำไปตากแดดบนพื้นซีเมนต์ กากแห้งนี้จะถูกส่งขายไปยังโรงงานผลิตอาหารสัตว์ต่อไป

น้ำแป้งจากกระบวนการสกัดแป้งจะมีความเข้มข้นประมาณ 3 Baume' (Be') (เท่ากับแป้งแห้ง 54 กิโลกรัมในน้ำ 1 ลูกบาศก์เมตร) ซึ่งประกอบด้วยสิ่งเจือปนต่างๆ ที่ละลายน้ำ เช่น โปรตีน ไขมัน น้ำตาล (Fruit Water ที่เหลือ) และสิ่งเจือปนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น เซลลูโลสอนุภาคเล็กๆ จากการบด (กากที่เหลือ) สิ่งเจือปนที่ไม่ละลายน้ำนี้จะถูกกำจัดออกในขั้นตอนการทำแป้งให้บริสุทธิ์ซึ่งเป็นขั้นตอนถัดไป

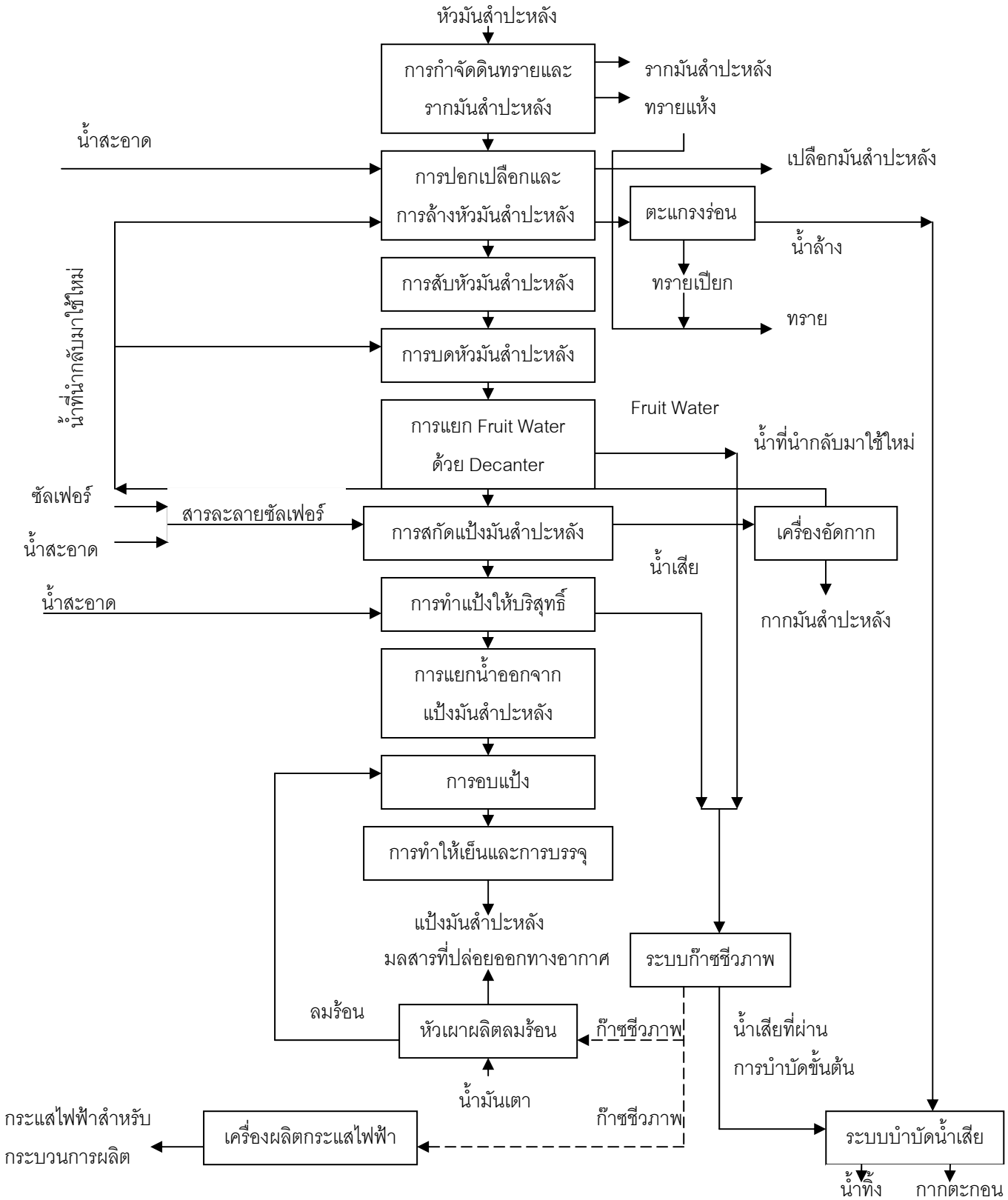
2. การทำแป้งให้บริสุทธิ์

กากมันสำปะหลังที่มีแป้งผสมอยู่จะถูกสูบไปยังเครื่องกรอง และ Sand Cyclone เพื่อให้ได้แป้งที่มีคุณภาพดีและป้องกันการจับตัวกันเป็นก้อนของแป้ง หลังจากนั้น ส่วนที่เป็นของเหลวข้นนี้จะเข้าสู่เครื่องแยกซึ่งอาจเป็นเครื่องแยกแป้งชนิดหมุนเหวี่ยง (Centrifugal Separator) หรือ ไฮโดรไซโคลน (Hydrocyclone) ส่วนใหญ่จะใช้เครื่องแยกแป้งต่อกันเป็นชุดเพื่อให้ได้แป้งที่มีคุณภาพดี เครื่องแยกแป้งดังกล่าวจะแยกน้ำแป้งซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 20 ถึง 22 Baume' (Be') ออกจากน้ำ น้ำแป้งที่มีความเข้มข้นสูงนี้จะเข้าสู่ขั้นตอนการอบแห้ง และน้ำเสียที่เกิดขึ้นโดยปกติจะถูกส่งเข้าระบบบำบัดน้ำเสีย

3. การแยกน้ำออกจากแป้ง การอบแห้ง การลดอุณหภูมิ และการบรรจุผลิตภัณฑ์

น้ำแป้งข้นจะถูกแยกน้ำออก และส่งเข้าสู่เครื่องอบโดยใช้ตัวส่งที่มีลักษณะเป็นเกลียวเครื่องอบจะเป็น Pneumatic Flash Dryer ซึ่งทำให้เกิดการระเหยโดยใช้ลมร้อนอุณหภูมิประมาณ 200 องศาเซลเซียส การอบแป้งจะใช้เวลาสั้นเพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีการรวมตัวเป็นก้อน และแป้งไม่เกิดการสลายตัวหรือเปลี่ยนสภาพ แป้งที่ยังร้อนอยู่นี้จะถูกแยกต่อไปโดยใช้ไซโคลน

แป้งจะต้องถูกลดอุณหภูมิทันทีหลังจากที่แห้งแล้ว ดังนั้นจึงมีการติดตั้งไซโคลนเย็น (Cooling Cyclone) ไว้ที่เครื่องอบ ไซโคลนร้อนและไซโคลนเย็นจะได้รับการออกแบบให้มีประสิทธิภาพในการแยกแป้งจากอากาศได้สูงถึงร้อยละ 99.95 เครื่องควบคุมอากาศอัตโนมัติจะเป็นตัวรักษาความชื้นของแป้งมันสำปะหลังสุดท้ายให้มีความชื้นอยู่ระหว่างร้อยละ 12 – 13 ซึ่งกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่เป็นแบบมาตรฐาน แสดงในภาพประกอบ 1



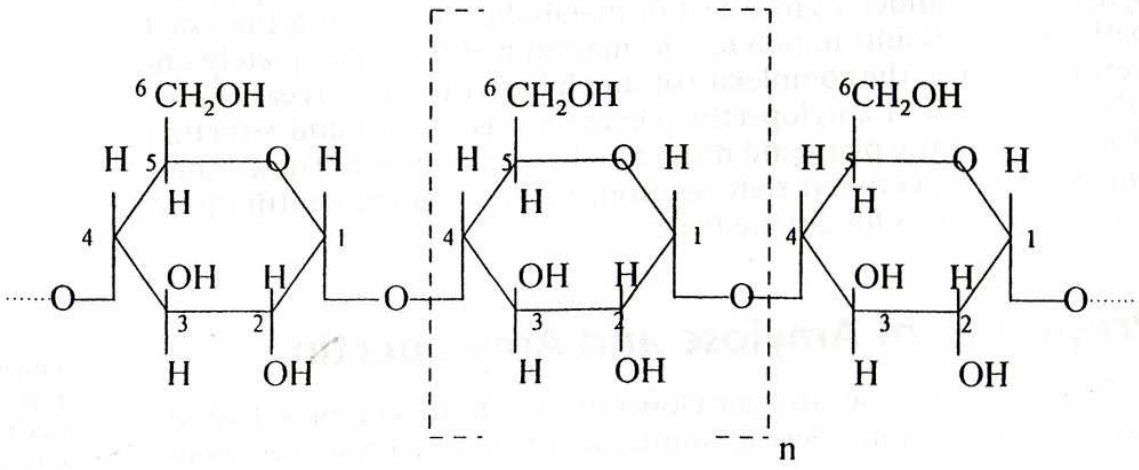
ภาพประกอบ 1 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่เป็นแบบมาตรฐาน

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). *คู่มือการประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐนิเวศน์ อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง*. หน้า 2-5.

1.2.2 คุณสมบัติของแป้งมันสำปะหลัง

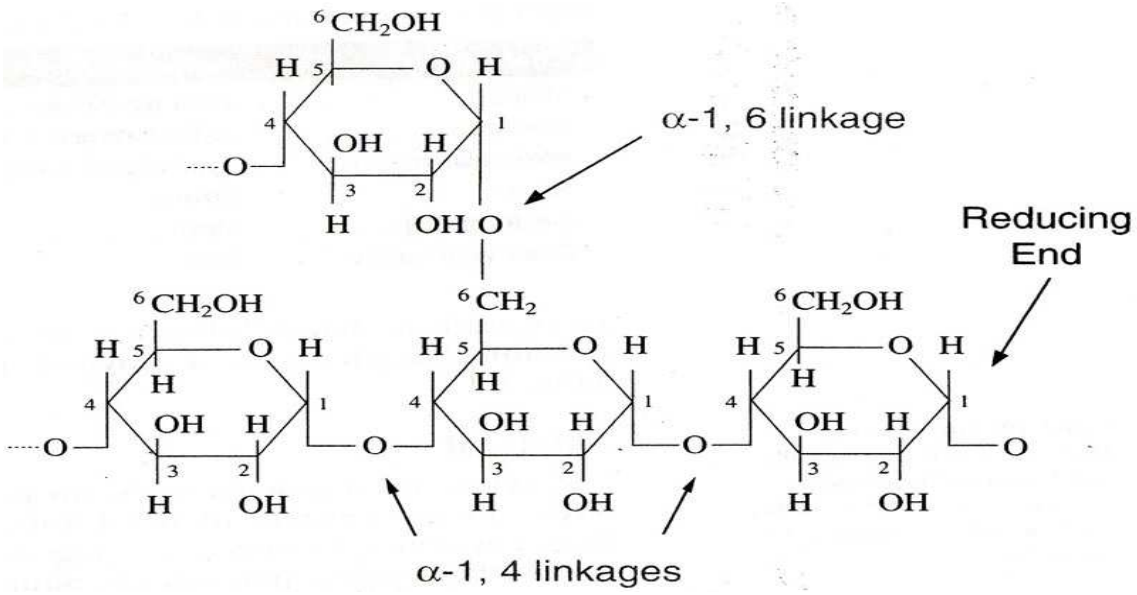
แป้งมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาว มีความบริสุทธิ์สูง มีสิ่งปนเปื้อนต่ำ มี Starch มากกว่าร้อยละ 95 มีปริมาณโปรตีนและไขมันอยู่ค่อนข้างต่ำ (<1%) มีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 0.04% ลักษณะของเม็ดแป้งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมีรูปร่างเป็นเม็ดกลมหรือรูปไข่ มีขนาดอยู่ในช่วง 3 – 40 ไมครอน มีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 12 – 15 ไมครอน (กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543: 82)

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งประกอบด้วย โพลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือโพลิเมอร์เชิงเส้น คือ อะไมโลส และโพลิเมอร์เชิงกิ่ง คือ อะไมโลเพคติน โดยอะไมโลสจะประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4- glucosidic linkage และอะไมโลเพคติน ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4- glucosidic linkage และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นโพลิเมอร์กลูโคสสายสั้น มี DP (Degree of polymerization) อยู่ในช่วง 10 – 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,6- glucosidic linkage ดังแสดงในภาพประกอบ 2 และ 3



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลส

ที่มา: Thomas and Atwell. (1999). *Starches*. p. 4.



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างทางเคมีของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

ที่มา: Thomas and Atwell. (1999). *Starches*. p. 3.

อะไมโลสและอะไมโลเพคติน มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 คุณสมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

คุณสมบัติ	**อะไมโลส**	**อะไมโลเพคติน**
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	α-1,4	α-1,4 และ α-1,6
ขนาด	200 – 2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. หน้า 14.

แป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งที่มีปริมาณอะไมโลสค่อนข้างต่ำ คือ 18 – 23% และมีขนาดแตกต่างกัน โดยมีค่า DP ตั้งแต่ 1,100 – 3,220 อัตราส่วนของโครงสร้างที่เป็นเส้นตรงต่อกิ่งจะมีค่าเท่ากับ 0.58 ต่อ 0.42 ซึ่งแตกต่างกับแป้งชนิดอื่น โดยปริมาณและสัดส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งแต่ละชนิด แสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ปริมาณและสัดส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งแต่ละชนิด

	แป้งมันฝรั่ง	**แป้งข้าวโพด**	**แป้งสาลี**	**แป้งมันสำปะหลัง**	**แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว**
อะไมโลส (%น.น.แห้ง)	21	28	28	17	0
อะไมโลเพคติน (% น.น.แห้ง)	79	72	72	83	100
DP อะไมโลส	3,000	800	800	3,000	-
DP อะไมโลเพคติน	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6
จำนวนโมเลกุลอะไมโลส ($X10^{20}$) ในแป้ง 1 กรัม	30	130	130	20	0
จำนวนโมเลกุลอะไมโลเพคติน ($X10^{17}$) ในแป้ง 1 กรัม	150	130	130	150	190
สัดส่วนจำนวนโมเลกุลของอะไมโลสต่ออะไมโลเพคติน	200	1,000	1,000	150	0
DP เฉลี่ยของโมเลกุลแป้ง	14,000	3,000	3,000	18,000	2,000,000

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. หน้า 22.

โดยปกติเม็ดแป้งจะไม่ละลายในน้ำเย็น แต่เมื่อให้ความร้อนแก่เม็ดแป้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ เม็ดแป้งจะเกิดการพองตัว เนื่องจากพลังงานความร้อนจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างของเม็ดแป้ง ทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถเข้าไปจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระของเม็ดแป้งได้ แป้งที่มีอะไมโลสสูงจะมีกำลังการพองตัวต่ำกว่าแป้งที่มีอะไมโลสต่ำ แป้งมันสำปะหลังจึงมีกำลังการพองตัวที่ดี ในระหว่างที่ให้ความร้อนแก่เม็ดแป้งที่แขวนลอยในน้ำ เม็ดแป้งจะเริ่มพองตัวและเริ่มสูญเสียความสามารถในการเบี่ยงเบนแสงโพลาไรซ์ (Birefringence) ทำให้การพองตัวของเม็ดแป้งเป็นแบบผันกลับไม่ได้ เม็ดแป้งเกิด Gelatinization ขึ้น โดยอุณหภูมิที่จุดนี้เรียกว่า Gelatinization temperature แป้งแต่ละชนิดจะมี Gelatinization temperature แตกต่างกัน แป้งมันสำปะหลังจะมีอุณหภูมิในการเกิด Gelatinization อยู่ในช่วง 58 – 70 องศาเซลเซียส เมื่อเม็ดแป้งได้รับความร้อนจะอยู่ในสภาพของแป้งเปียก (Paste) ที่มีความหนืดมาก เมื่อแป้งเปียกเย็นลงจะเกิดเป็นเจลขึ้น แป้งเปียกของแป้งมันสำปะหลังถ้าได้รับความร้อนและแรงกลอย่างต่อเนื่องจะมีความหนืดลดลงอย่างรวดเร็ว นั่นคือ แป้งเปียกของแป้งมันสำปะหลังจะไม่คงตัวมากนัก เมื่อแป้งเปียกของแป้งมันสำปะหลังเย็นตัวลง ความหนืดจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังมีอะไมโลสค่อนข้างต่ำ ทำให้การจับตัวกันของหมู่ไฮดรอกซิลของอะไมโลสในระหว่างเย็นตัวต่ำ (Retrogradation) แป้งมันสำปะหลังจึงเป็นแป้งที่เกิดการคืนตัวต่ำ ให้ลักษณะแป้งเปียกที่ใส ไม่ทึบแสง ซึ่งคุณสมบัติของแป้งเปียกของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังแสดงในตามราง 8

ตาราง 8 คุณสมบัติของแป้งเปียกของแป้งชนิดต่างๆ

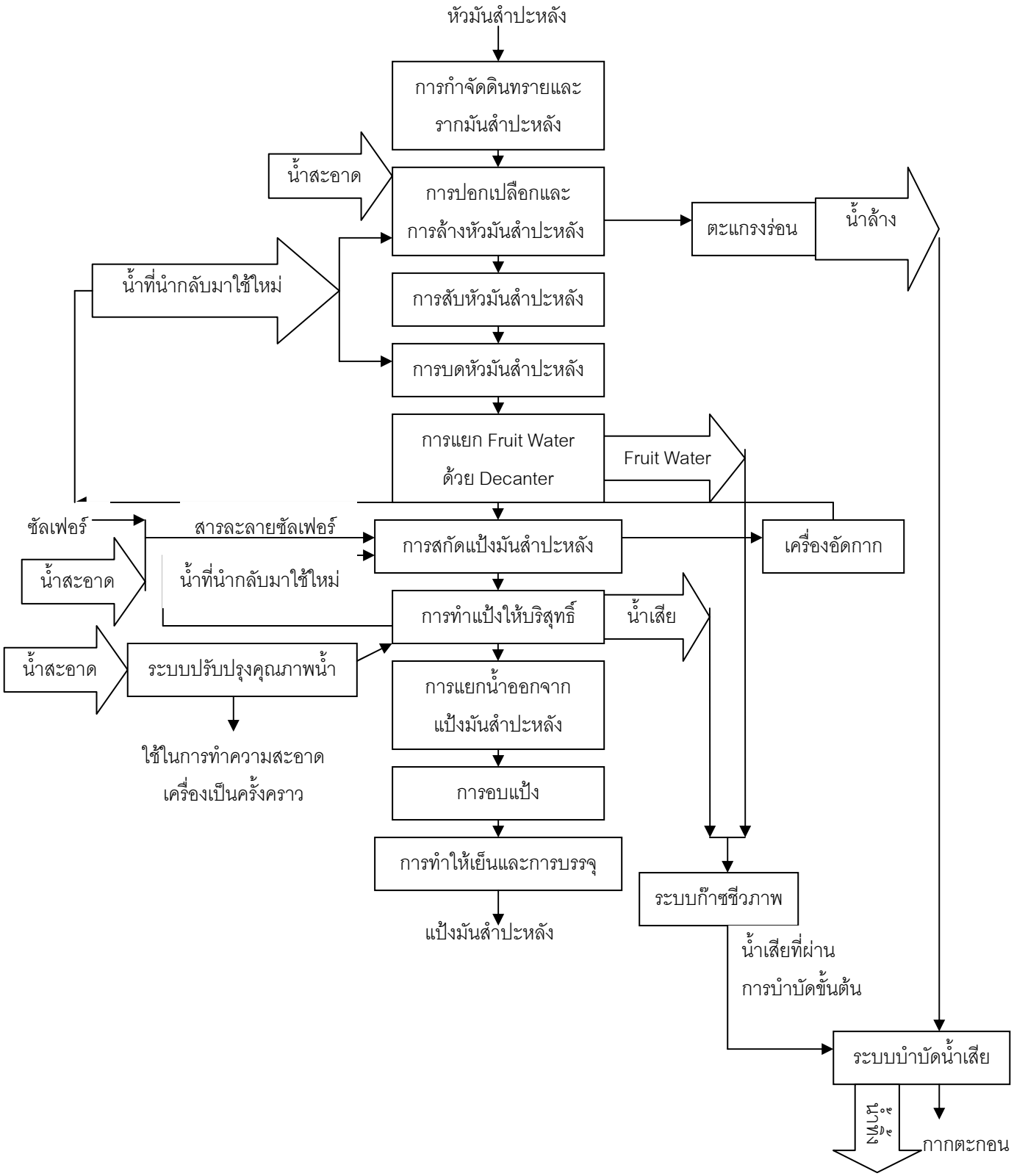
คุณสมบัติ	**แป้งมันฝรั่ง**	**แป้งข้าวโพด**	**แป้งสาลี**	**แป้งมันสำปะหลัง**	**แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว**
Pasting temperature	ต่ำ	สูง	สูง	ต่ำ	ปานกลาง
ความหนืด	สูงมาก	ปานกลาง	ค่อนข้างต่ำ	สูง	ค่อนข้างสูง
เนื้อสัมผัส	ยาว	สั้น	สั้น	ยาว	ยาว
ความใส	เกือบใส	ปานกลาง	ขุ่น	ใส	ใส
ความทนต่อแรงเฉือน	ค่อนข้างต่ำ	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ
การเกิดรีโทรเกรเดชัน	ปานกลาง	สูง	สูง	ต่ำ	ต่ำมาก

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. หน้า 84.

1.2.3 ลักษณะน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

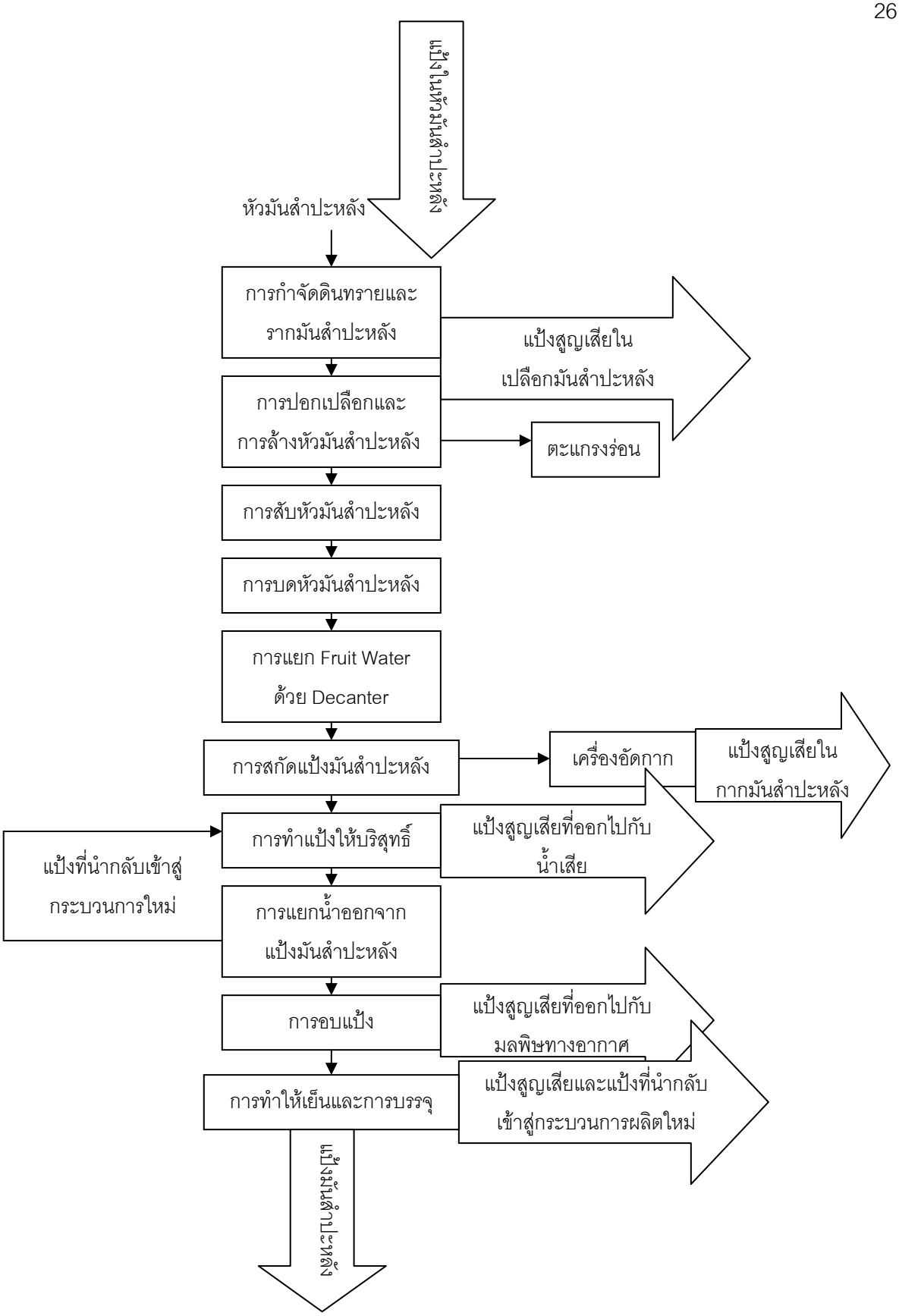
โรงงานแป้งมันสำปะหลังเป็นโรงงานที่ใช้น้ำในกระบวนการผลิตค่อนข้างมาก โดยในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน จะก่อให้เกิดน้ำทิ้งประมาณ 10 – 20 ลูกบาศก์เมตร มีภาวะความสกปรกของสารอินทรีย์สูง โดยมีปริมาณ บีโอดี ประมาณ 55 – 200 กิโลกรัม ปริมาณ ซีโอดี ประมาณ 130 – 400 กิโลกรัม ปริมาณสารแขวนลอย ประมาณ 40 – 140 กิโลกรัม ฟอสฟอรัสทั้งหมด ประมาณ 0.2 – 0.6 กิโลกรัม และไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 3 – 10 กิโลกรัม นอกจากนี้กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังจะเกิดแป้งสูญเสียประมาณ 40 กิโลกรัมต่อหนึ่งตันแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549: 6)

น้ำที่ใช้ในการผลิตจะผ่านการปรับปรุงคุณภาพก่อนเข้าสู่ขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การล้าง การปอกเปลือก และการทำแป้งให้บริสุทธิ์ และน้ำส่วนหนึ่งจะนำไปใช้ในการผลิตสารละลายซัลเฟอร์เพื่อใช้ในขั้นตอนการสกัดแป้งอีกด้วย น้ำที่ผ่านกระบวนการผลิตแล้วจากเครื่องอัดกาก และขั้นตอนการทำแป้งให้บริสุทธิ์จะมีการนำกลับมาใช้ใหม่ และป้อนเข้าสู่ขั้นตอนต่างๆ ต่อไป ดังแสดงในภาพประกอบ 4 และ 5 น้ำเสียจากกระบวนการผลิตในที่สุดจะถูกรวบรวมเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียต่อไปก่อนระบายทิ้ง



ภาพประกอบ 4 แผนผังสมดุลมวลสารของน้ำในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). *คู่มือการประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐนิเวศน์ อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง*. หน้า 2-10.



ภาพประกอบ 5 แผนผังสมดุลมวลสารของแป้งมันสำปะหลัง

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). *คู่มือการประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐนิเวศน์ อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง*. หน้า 2-8.

ลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังแบบสลัดแห้ง มาจากการล้างหัวมัน (Root Washing) และเครื่องแยก (Separator) น้ำทิ้งทั้งหมดรวมกันเป็นน้ำทิ้งรวม (Combined Waste) มีลักษณะทางฟิสิกส์และเคมีดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ลักษณะน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังชนิดสลัดแห้ง

ลักษณะทางฟิสิกส์และเคมี	หน่วย	น้ำทิ้ง		
		การล้างหัวมัน	เครื่องแยก	น้ำทิ้งรวม
อุณหภูมิ	^{0}C	27.0 – 31.0	28.0 – 30.0	23.0 – 33.0
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช)	-	4.2 – 7.1	4.1 – 6.0	3.4 – 6.0
ปริมาณสารแขวนลอย	Mg/l	344 – 7,280	1,110 – 4,200	793 – 8,400
ปริมาณสารแขวนลอยระเหย	Mg/l	980 – 6,040	1,010 – 1,990	752
ปริมาณสารทั้งหมด	Mg/l	1,770 – 8,850	5,310 – 7,940	3,560 – 6,800
ปริมาณสารระเหยทั้งหมด	Mg/l	1,270 – 7,110	4,850 – 7,020	3,188 – 3,628
ปริมาณตะกอนหนัก	Mg/l	10 – 100	15 – 110	21 – 200
ปริมาณกรดไขมันระเหย	Mg/l as CH_3COOH	255 – 500	265 – 1,080	130 – 1,200
ซีโอดี	Mg/l	2,000 – 12,780	7,460 – 13,250	3,100 – 19,500
บีโอดี	Mg/l	200 – 3,750	4,800 – 11,660	3,000 – 8,407
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	Mg/l	40 – 50	118 – 154	0.75 – 242
สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน	Mg/l	0 – 10	4 – 29	0 – 22
สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน	Mg/l	14.5 – 40	101 – 340	0.75 – 220
ฟอสเฟต	Mg/l	1.22 - 24	3 - 31	0 - 17

ที่มา: พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. (2546). *ศึกษาการลอกแป้งบนผืนผ้าด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสากหรรมแป้งมันสำปะหลัง*. หน้า 19. (อ้างอิงจาก สุเมธ ชวเดช; และ เกษม ปึงชวลิตโสภี. (2529). *โครงการ วิจัยพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์และเพื่อกำจัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง เรื่อง การผลิตกรดอินทรีย์จากน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง*. หน้า 9.)

1.3 แป้งมันสำปะหลังดัดแปร

แป้งดัดแปรสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำแป้ง (Starch) เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งสาลี มาเปลี่ยนสมบัติทางเคมีและ / หรือทางฟิสิกส์จากเดิมด้วยความร้อนและ / หรือเอนไซม์และ / หรือสารเคมีชนิดต่างๆ เพื่อให้เหมาะกับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม มอก. 1073 – 2535)

1.3.1 ประเภทของแป้งดัดแปร

การดัดแปรแป้งนั้นสามารถแบ่งได้หลายประเภท ซึ่งในงานวิจัยนี้จะแบ่งกลุ่มตาม กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2543) ดังนี้

1.3.1.1 การดัดแปรทางเคมี (Chemical modification) แบ่งออกเป็น

1) การเกิดอนุพันธ์ (Derivertization) ได้แก่ การแทนที่สารในโมเลกุลเดี่ยวของแป้งทั้งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Starch acetate) และปฏิกิริยาอีเทอร์ริฟิเคชัน (ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Hydroxyethly starch) รวมทั้งการแทนที่โมเลกุลที่มีหมู่ฟังก์ชันมากกว่า 1 หมู่ (ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Cross – linked starch)

2) การลดขนาดโมเลกุลแป้งด้วยกรด (Acid thinning) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Acid – modified starch

3) เดกซ์ทริไนเซชัน (Dextrinization) เป็นการลดขนาดหรือเปลี่ยนการจับเกาะ โดยใช้ความร้อน หรือความร้อนกับกรด ได้ผลิตภัณฑ์เป็นมอลโทเดกซ์ทริน

4) ออกซิเดชัน (Oxidation) ทำให้เกิดการฟอกสีและลดขนาดของโมเลกุลโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Oxidized starch

5) การย่อยสลาย (Hydrolysis) โดยใช้น้ำย่อยหรือกรด เพื่อย่อยสลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Enzymatically modified starch

1.3.1.2 การดัดแปรทางกายภาพ (Physical modification) แบ่งออกเป็น

1) เจลาติไนเซชัน (Gelatinization) เป็นการให้ความร้อนแป้งจนผ่านขั้นตอนของเจลาติไนเซชันแล้วทำแห้งทันที ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Pregelatinized starch

2) แป้งละลายน้ำเย็น (Granular-Cold-Water-Soluble-Starch: GCWSS) เป็นการแปรรูปจนได้แป้งที่สามารถละลายได้ในน้ำเย็น โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเกิดเจลาติไนเซชัน

3) การลดขนาดเม็ดแป้งโดยทางกล ทำให้เม็ดแป้งแตกโดยทางกล จะได้เม็ดแป้งขนาดเล็กกว่าปกติ

4) Annealing เป็นการให้ความร้อนในขณะที่เม็ดแป้งอยู่ในอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเจลาติไนเซชัน

5) การแปรรูปด้วยความร้อนชื้น (Heat moisture treatment) เป็นการให้ความร้อนสูงกว่าจุดเจลาติไนเซชันแก่แป้งในขณะที่แป้งมีความชื้นต่ำ

1.3.1.3 การดัดแปรทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnological modification) เป็นการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแป้งโดยใช้การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เช่น

1) Waxy starch คือ แป้งที่มีอะไมโลสต่ำหรือไม่มีเลย

2) High – amylase starch คือ แป้งที่มีอะไมโลสสูง

แป้งดัดแปรแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันตามวิธีการผลิต ดังนั้นการนำแป้งดัดแปรไปใช้งานในอุตสาหกรรมต่างๆ จึงขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแป้งชนิดนั้นๆ และความเหมาะสมในการนำแป้งดัดแปรไปใช้งาน

1.3.2 คุณสมบัติของแป้งดัดแปร

1.3.2.1 การเกิดอนุพันธ์ (Derivertization) แป้งอนุพันธ์จะมีอุณหภูมิเจลาติไนเซชันต่ำกว่าแป้งดิบ มีการพองตัวและละลายมากกว่าแป้งดิบ และทนต่อการคืนตัวหลังแช่แข็ง ตัวอย่างแป้งอนุพันธ์ มีดังต่อไปนี้

Hydroxyethyl starch จะมีอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนซ์ต่ำลง แป้งพองตัวได้ในน้ำเย็น แป้งเปียกมีความเหนียว คงตัว ฟิล์มที่ได้มีความใส เป็นมันเงา ยืดหยุ่นมากขึ้น มีความต้านทานต่อ กรด ด่าง และสารออกซิไดซ์อย่างอ่อนได้ สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งเป็นสารให้ความข้น ใช้เคลือบกระดาษและสิ่งทอ เป็นต้น

Starch acetate จะมีอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนซ์ต่ำลง มีอัตราการคืนตัวลดลง ความหนืดคงที่ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ไม่เกิดการบีบตัวของน้ำออกมานอกเจล (Syneresis) ฟิล์มมีความใส มันเงา ยืดหยุ่น สามารถนำแป้งไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารแช่แข็ง ใช้เคลือบกระดาษเส้นด้าย หรือผลิตเป็นกระดาษกาว เป็นต้น โดย Starch acetate ที่ใช้กับอาหารต้องมีปริมาณแอซีทิลไม่เกิน 2.5% ตามข้อกำหนดของ FDA (The Food and Drug Administration)

Cross – linked starch เม็ดแป้งแข็งแรง ไม่แตกง่าย มีการละลายลดลง อุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนซ์สูงขึ้น แป้งเปียกมีความต้านทานต่อแรงเฉือนและกรดมากขึ้น ฟิล์มมีความหนืดคงตัว สามารถใช้เป็นสารเพิ่มความข้นในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง เช่น ซอสน้ำสลัด อาหารกระป๋อง ใช้เคลือบกระดาษและสิ่งทอ เป็นต้น

Resistant starch เป็นแป้งที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก มีคุณสมบัติเทียบเท่าเส้นใยอาหาร แป้งมีอนุภาคเล็ก มีการอุ้มน้ำไม่มาก ในอุตสาหกรรมอาหาร นิยมใช้เป็นแหล่งเยื่อใยสำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำ เช่น คุกกี้ ขนมปังกรอบ เป็นต้น

1.3.2.2 การลดขนาดโมเลกุลแป้งด้วยกรด (Acid thinning) แป้งเปียกที่ได้จะเหลวใส ความหนืดลดลง สามารถให้ความร้อนแก่แป้งที่มีความเข้มข้นสูงได้ เมื่อเย็นตัวลงจะเกิดการคืนตัว ได้เจลแข็งทึบแสง สามารถใช้ในการผลิตลูกกวาด ท็อฟฟี่ ใช้เคลือบเส้นด้ายและกระดาษ กันไม่ให้หมึกซึมผ่านกระดาษ และใช้ผลิตกระดาษลูกฟูก เป็นต้น

1.3.2.3 เดกซ์ทริไนเซชัน (Dextrinization) เดกซ์ทรินเป็นแป้งที่มีความหนืดต่ำ กระจายตัวในน้ำได้ดี ฟิล์มมีคุณสมบัติในการยึดเกาะและเป็นกาวที่ดี ใช้มากในอุตสาหกรรมกาว หรือเป็นแหล่งสารอาหารคาร์โบไฮเดรตในการผลิตยาปฏิชีวนะ

1.3.2.4 ออกซิเดชัน (Oxidation) แป้งมีลักษณะเป็นประจุลบ อัตราการคืนตัวของแป้งเปียกลดลง แป้งเปียกที่ร้อนจะมีความหนืดต่ำลง แป้งเปียก สารละลาย และฟิล์มมีความใส เจลที่ได้มีความคงตัวสูง แป้งเปียกมีคุณสมบัติเหมาะสมในการทำหมากฝรั่งและลูกอม ใช้ในซุปกึ่งสำเร็จรูป น้ำสลัด มายองเนส ใช้เป็นสารยึดเกาะสำหรับเคลือบกระดาษ เคลือบเส้นใยในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมก่อสร้าง เช่น ฝาผนัง ฉนวน เป็นต้น

1.3.2.5 การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ (Enzymatical hydrolysis) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ ได้แก่ น้ำเชื่อมกลูโคส น้ำเชื่อมฟรักโทส และไซโคลเดกซ์ทริน เป็นต้น

1.3.2.6 เจลาติไนเซชัน (Gelatinization) ผลิตภัณฑ์ Pregelatinized starch สามารถละลายและกระจายตัวได้ในน้ำเย็นหรือที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีการเกิดเจล ดูดซับน้ำได้มากกว่าแป้งดิบ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น พุดดิ้ง ซอส พาย ครีมหน้าขนม ส่วนผสมของซุปผง ขนมเค้ก ขนมขบเคี้ยว เป็นสารยึดเกาะและสารช่วยแตกตัวในการผลิตยาเม็ด ใช้เป็นกาวติดผนังห้อง และเคลือบกระดาษ เป็นต้น

1.3.2.7 การดัดแปรทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnological modification) ตัวอย่างแป้ง มีดังต่อไปนี้

Waxy starch ไม่เกิดการคืนตัว มีความมันเงาสูง สามารถทำให้ชุ่มน้ำได้รวดเร็ว ใช้ในอุตสาหกรรมกาว เพื่อผลิตเทปกาว ฉลากปิดขวด ใช้เคลือบผ้าในขั้นตอนสุดท้าย เพื่อให้เนื้อผ้ามีความเงางามและคงทน

High – amylase starch เม็ดแป้งพองตัวได้ยาก อุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนซ์สูงกว่าแป้งดิบ ฟิล์มมีความแข็งแรงและยืดหยุ่นได้ดี ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเนื้อสัมผัสที่คงทนไม่แตกง่าย ใช้เป็นสารเคลือบบนพื้นผิววัสดุ และใช้เป็นกาว เป็นต้น

จากการศึกษาเรื่องมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังดัดแปร สามารถสรุปได้ว่า มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศ มีองค์ประกอบแตกต่างกันตามสายพันธุ์ต่างๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งนำมาบริโภคโดยตรง ผลิตเป็นมันเส้น มันอัดเม็ด ผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลังหรือแป้งมันสำปะหลังดัดแปร ซึ่งในอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้น จะก่อให้เกิดน้ำทิ้งซึ่งมีความสกปรกสูง เนื่องจากมีแป้งสูญเสียไปกับกระบวนการผลิตมาก ซึ่งถ้าไม่มีระบบบำบัดน้ำเสียที่ดีแล้ว จะก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก

2. น้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

ตัวกำหนดที่ใช้แสดงลักษณะของน้ำทิ้งที่ทำการวิเคราะห์อยู่ทั่วไป แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. การวิเคราะห์ทางกายภาพ (Physical methods) ได้แก่ อุณหภูมิ ความขุ่น สี กลิ่น เป็นต้น

2. การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical methods) ได้แก่ พีเอช ซีโอดี บีโอดี เป็นต้น

3. การวิเคราะห์ทางชีวภาพ (Biological methods) ได้แก่ การตรวจหาโคลิฟอร์ม การนับจากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count) เป็นต้น (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525: 22)

2.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

การตรวจลักษณะน้ำทิ้งทางกายภาพ มีวิธีวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

2.1.1 อุณหภูมิ

วัดโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ชนิดอ่านค่าเป็นองศาเซลเซียส ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2513 ยอมให้อุณหภูมิของน้ำที่ปล่อยลงสู่ลำน้ำสาธารณะได้ไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส

2.1.2 สี

วัดโดยนำน้ำมาแยกโดยใช้แรงเหวี่ยง เพื่อให้ของแข็งที่แขวนลอยอยู่ตกตะกอนจนหมด ได้น้ำใส แล้วนำน้ำใสนั้นใส่ลงในหลอดเนสเลอร์ นำไปเปรียบเทียบกับสารละลายสีมาตรฐานที่เตรียมไว้ ในกรณีที่สีของน้ำมีความเข้มข้นมาก จะต้องทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นก่อนนำมาเทียบสี

2.1.3 กลิ่น

ตรวจสอบกลิ่นโดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากกลิ่น จนได้กลิ่นน้อยที่สุด จะต้องมีผู้สูดกลิ่นอย่างน้อย 5 คน และต้องเก็บไว้ในขวดแก้วและวิเคราะห์ทันทีที่เก็บมา แต่ถ้าจำเป็นจะต้องเก็บไว้ จะต้องเก็บโดยปิดฝา แช่ตู้เย็นซึ่งปราศจากกลิ่นใดๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.4 ความขุ่น

ความขุ่นของน้ำเกิดจากมีสารแขวนลอยต่างๆ อยู่ เช่น ดิน ตะกอน สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ แพลงตอนและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่นๆ ควรทำการวิเคราะห์ทันทีที่เก็บตัวอย่างมา แต่ถ้าไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในวันนั้น จะต้องเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และควรทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

2.1.5 สภาพนำไฟฟ้า

สภาพนำไฟฟ้าเป็นตัวเลขที่บอกถึงความสามารถของน้ำตัวอย่างในการนำกระแสไฟฟ้า จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นทั้งหมดของสารที่มีประจุที่ละลายอยู่ในน้ำตัวอย่างและอุณหภูมิขณะที่ทำการวัด นอกจากนี้ ชนิด ความเข้มข้น และจำนวนประจุของสารที่มีประจุก็มีผลต่อความสามารถในการนำไฟฟ้าของน้ำตัวอย่าง สารประกอบที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้ดี คือ สารประกอบอนินทรีย์ของกรด ด่างและเกลือ ตามลำดับ ในขณะที่สารประกอบอินทรีย์ เช่น ซูโครส เบนซิน จะเป็นตัวนำไฟฟ้าที่เลว

2.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

การตรวจลักษณะน้ำทิ้งทางเคมี มีวิธีวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

2.2.1 พีเอช (pH)

พีเอช เป็นค่าแสดงปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคไฮโดรเจน [H^+] ในน้ำ น้ำทิ้งที่มีสมบัติเป็นกรดจะมีค่าพีเอชน้อยกว่า 7 เป็นด่างจะมีค่าพีเอชมากกว่า 7 และเป็นกลางจะมีพีเอชเท่ากับ 7 ค่าพีเอชของน้ำทิ้งมีความสำคัญในการกำจัดด้วยวิธีการทางเคมี ฟิสิกส์และชีววิทยา

การวัดพีเอชทำได้ 3 วิธี คือ

1. ใช้กระดาษพีเอช ซึ่งจะมีสีเปลี่ยนไปตามค่าพีเอชของน้ำทิ้ง เมื่อนำมาเทียบกับแถบสีมาตรฐานจะได้ค่าพีเอชโดยประมาณ
2. ใช้เทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ทราบค่าพีเอช โดยการเติมอินดิเคเตอร์ (Indicator) ปริมาณเท่าๆ กัน
3. ใช้เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

2.2.2 ปริมาณของแข็ง (Solids)

ของแข็ง หมายถึง สารทุกอย่างในของเหลวยกเว้นน้ำ การวิเคราะห์ของแข็งในน้ำเสีย มีวิธีวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

2.2.2.1 ตะกอนหนัก (Settleable Solids)

หมายถึงปริมาณของแข็งที่จมตัวลงสู่ก้นภาชนะ เมื่อตั้งทิ้งไว้ ภายในเวลา 1 ชั่วโมง มีหน่วยเป็น ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

2.2.2.2 ปริมาณสารแขวนลอย (Suspended Solids)

หมายถึงส่วนที่เหลือค้างบนกระดาษกรองใยแก้วมาตรฐาน 0.45 μm หลังจากกรองตัวอย่างและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

2.2.2.3 ปริมาณสารละลาย (Dissolved Solids)

หมายถึงสารที่สามารถผ่านกระดาษกรองใยแก้วมาตรฐาน และยังเหลืออยู่หลังจากระเหยไอน้ำจนแห้งและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 หรือ 108 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จะได้ค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เนื่องจากการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส โลหะไฮดรอกไซด์บางชนิดยังคงมีน้ำละลายอยู่ ทำให้ได้ค่าสูงกว่า ส่วนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส สารอินทรีย์จะลดลงโดยการระเหยเป็นไอ คลอไรด์และเกลือไนเตรทจะสูญหายไป ไบคาร์บอเนตจะถูกเปลี่ยนกลับเป็นคาร์บอเนต ซึ่งบางส่วนอาจสลายเป็นรูปของออกไซด์ (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 24)

2.2.2.4 ปริมาณสารทั้งหมด (Total Solids)

หมายถึงปริมาณสารที่เหลืออยู่ในภาชนะหลังจากระเหยน้ำออกจากน้ำตัวอย่างจนหมด แล้วนำไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นลงในเดสิกเกเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักของของแข็งในภาชนะนั้น จะได้ปริมาณของของแข็งทั้งหมด มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

2.2.2.5 ปริมาณสารระเหยและปริมาณสารคงตัว (Volatile Solids and Fixed Solids)

ปริมาณสารระเหย หมายถึงปริมาณของสารที่สลายไปได้ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ ตะกอนที่เหลืออยู่ไม่สลายไป เรียกว่าปริมาณสารคงตัว ส่วนใหญ่จะเป็นสารอนินทรีย์

การทดสอบนี้มีข้อผิดพลาดอยู่หลายอย่างเนื่องจากการระเหยหายไปของน้ำในผลึก การระเหยหายไปของสารอินทรีย์ก่อนเผา การออกซิเดชั่นที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์

บางชนิด และการสลายของเกลือแร่ระหว่างการเผาไหม้ การทำให้ของแข็งทั้งหมดร้อนที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จะทำให้น้ำและสารอินทรีย์ระเหยไป ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ถูกต้อง ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่านี้ สารอินทรีย์อาจจะไม่ถูกออกซิไดซ์ในเวลาที่กำหนด แต่การสลายตัวของเกลืออนินทรีย์จะลดลงด้วย เกลือส่วนใหญ่จะคงตัว ยกเว้น Magnesium carbonate ที่ถูกสลายตัวที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 25)

2.2.3 เอมแอลเอสเอส (Mixed Liquor Suspended Solids, MLSS)

หมายถึงปริมาณหรือความเข้มข้นของจุลชีพ (Microorganisms) ในถังเติมอากาศระบบเอกทิเวเตดสลัดจ์ คิดเป็นปริมาณสารแขวนลอยของมิกซ์ลิเคอร์ (Mixed liquor) ซึ่งหมายถึงของผสมระหว่างน้ำทิ้งกับตะกอนจุลชีพในถังเติมอาหาร

ประโยชน์ของการหาค่าเอมแอลเอสเอส ก็เพื่อนำไปคำนวณหาอัตราส่วนของอาหารต่อมวลจุลชีพ (Food to Mass ratio, F/M) ซึ่งคิดจากอัตราส่วนระหว่างบีโอดีที่เข้าสู่ถังเติมอากาศกับปริมาณเอมแอลเอสเอสที่อยู่ในถังเติมอากาศนั้น อัตราส่วนดังกล่าวนี้เป็นตัวกำหนดและควบคุมระบบบำบัดที่สำคัญ เพราะเป็นค่าที่ใช้คุมขนาดของถังเติมอากาศ เวลาในการเติมอากาศ ปริมาณตะกอนจุลชีพ และประสิทธิภาพของระบบบำบัด ระบบบำบัดแบบเอกทิเวเตดสลัดจ์ที่มีประสิทธิภาพในการลดบีโอดีได้สูงกว่าร้อยละ 90 มีค่าอัตราส่วนอาหารต่อมวลจุลชีพปกติไม่เกิน 0.4 และมีเอมแอลเอสเอสประมาณ 4,000 – 5,000 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเอมแอลเอสเอส ใช้วิธีการหาเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารแขวนลอย โดยใช้มิกซ์ลิเคอร์ แทนตัวอย่างน้ำทิ้ง (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525: 52)

2.2.4 เอมแอลวีเอสเอส (Mixed Liquor Volatile Suspended Solids, MLVSS)

หมายถึงปริมาณอินทรีย์สารที่เป็นของแข็ง และใช้เป็นตัวแทนมวลของจุลชีพได้ดีกว่าเอมแอลเอสเอส (ซึ่งจะรวมของแข็งทั้งที่เป็นอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร) มักจะมีค่าเป็นประมาณ ร้อยละ 50 – 80 ของค่าเอมแอลเอสเอส ประโยชน์ของการหาเอมแอลวีเอสเอสก็เช่นเดียวกันกับเอมแอลเอสเอส คือใช้เป็นเครื่องชี้ปริมาณจุลชีพในระบบบำบัด และใช้เป็นค่ากำหนดในการออกแบบหรือควบคุมการทำงานของระบบบำบัดได้ถูกต้องกว่าเอมแอลเอสเอส

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเอมแอลวีเอสเอส ใช้วิธีการหาเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารแขวนลอยระเหย โดยใช้มิกซ์ลิเคอร์ แทนตัวอย่างน้ำทิ้ง (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525: 53)

2.2.5 บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand ; BOD)

หมายถึงปริมาณของออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร การวิเคราะห์หาค่าบีโอดี เป็น

การวิเคราะห์เพื่อที่จะทราบถึงปริมาณความสกปรกของน้ำในแม่น้ำลำคลอง น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อประโยชน์ในการออกแบบระบบบำบัด ควบคุมคุณภาพน้ำทิ้งและประสิทธิภาพของระบบ โดยคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่จุลชีพต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ เนื่องจากออกซิเจนในอากาศสามารถละลายน้ำได้ในจำนวนจำกัดคือประมาณ 9 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดังนั้นในน้ำเสียซึ่งมีความสกปรกมาก จำเป็นต้องทำให้ปริมาณความสกปรกเจือจางลงอยู่ในระดับซึ่งสมมูลย์พอดีกับปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ ซึ่งเกี่ยวข้องกับจุลชีพในน้ำ จึงจำเป็นต้องทำให้มีสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลชีพ คือไม่มีสารพิษ และมีอาหารเสริมสำหรับจุลชีพอย่างเพียงพอ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525: 56)

ปฏิกิริยาของบีโอดี ในการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย แบ่งเป็น 2 ระยะ

ระยะที่ 1 ย่อยสลายสารประกอบคาร์บอน ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในเวลา 5 – 10 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดังสมการ

$$\text{Carbohydrate} + O_2 \xrightarrow{\text{Bacteria}} CO_2 + H_2O$$

ระยะที่ 2 ย่อยสลาย Inorganic Nitrogen Compounds (Nitrification) และจะดำเนินการถึง Stable ประมาณ 20 วัน

$$NH_3 \xrightarrow{\text{Nitrozomonaz}} NO_2 \xrightarrow{\text{Nitrobacter}} NO_3$$

2.2.6 ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand : COD)

หมายถึงปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการใช้เพื่อออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในน้ำให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ดังสมการ

$$C_a H_a O_b N_c + (n + a/4 - b/2 - 3c/4)\, O_2 \longrightarrow nCO_2 + (a/2 - 3c/2)\, H_2O + cNH_3$$

สารประกอบอินทรีย์เกือบทุกชนิดยกเว้น Aromatic Hydrocarbon จะถูกออกซิไดซ์โดย Strong Oxidizing Agent ($K_2Cr_2O_7$) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และ Amino Nitrogen จะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 26)

2.2.7 ไนโตรเจน (Nitrogen)

สารประกอบไนโตรเจนที่เกี่ยวข้องกับน้ำเสีย แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.2.7.1 สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กรดนิวคลิอิก ซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืช สัตว์ และของเสียที่ขับถ่ายออกมา

2.2.7.2 สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย ไนไตร์ท ไนเตรท อาจอยู่ในรูปของปุ๋ยหรือเกลือของยูเรีย สารประกอบไนโตรเจนสามารถเปลี่ยนรูปจากสารอินทรีย์เป็นรูปสารอนินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวะ สารอนินทรีย์สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้โดยแบคทีเรีย ซึ่งกระบวนการคือ การเปลี่ยนสารอินทรีย์ในรูปที่ไม่ละลาย ให้เป็นรูปที่ละลายและแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้

กระบวนการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนแบ่งเป็น

1. Oxidation เกิดในระบบที่มีออกซิเจนอย่างเหลือเฟือ โดยอินทรีย์ไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนเป็น $NH_3 - N$ และ $NH_3 - N$ จะเกิดออกซิเดชั่นเป็น ไนไตร์ท และ ไนเตรท เรียกว่ากระบวนการ Nitrification

$$Org - N + O_2 \dashrightarrow NH_3 - N + O_2 \dashrightarrow NO_2 \dashrightarrow NO_3 - N$$

2. Reduction เกิดในระบบที่มีออกซิเจนลดลงหรือขาดออกซิเจน แบคทีเรียจะนำออกซิเจนในสารประกอบไนเตรทมาใช้เกิดปฏิกิริยาตรงข้ามกับ Denitrification

$$NO_3 \dashrightarrow NO_2 \dashrightarrow NH_3 \dashrightarrow N_2$$

ผลสุดท้ายที่ได้คือก๊าซไนโตรเจน ซึ่งเป็นปัญหาในระบบบำบัดน้ำเสีย เพราะจะทำให้ Sludge ลอยตัวขึ้น (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 27)

2.2.8 ฟอสฟอรัส (Phosphorus)

ฟอสฟอรัสมักอยู่ในรูปของฟอสเฟต โพลีฟอสเฟตและอินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งอินทรีย์ฟอสเฟตสามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นฟอสเฟตโดยการต้มกับกรด และสามารถตรวจวัดปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดโดยการทำให้เกิดสี

2.3 การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

การตรวจลักษณะน้ำทิ้งทางชีวภาพ มีวิธีวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

2.3.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบน้ำทิ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์

แบคทีเรีย (Bacteria) เป็นจุลชีพที่สำคัญที่สุดในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบชีววิทยา เนื่องจากสามารถย่อยทำลายสารอินทรีย์ทั้งชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ โดยปกติแบคทีเรียเป็นจุลชีพเซลล์เดียว มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rod) กลม (Coccus) หรือเป็นเกลียว (Spiral) แต่ชนิดที่สำคัญที่สุดได้แก่ชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่งเคลื่อนไหวได้ ในบางครั้งอาจอยู่รวมเป็นกลุ่ม (Cluster) หรือเป็นลูกโซ่ (Chain)

เชื้อรา (Fungi) จัดเป็นพืชชั้นต่ำ หลายเซลล์ ไม่มีคลอโรฟิล (Chlorophyll) จึงสังเคราะห์แสงไม่ได้ เซลล์พืช มีชื่อเฉพาะเรียกว่าไมซีเลียม (Mycelium) ซึ่งประกอบด้วยไซโตปลาสม (Cytoplasm) มีหลายนิวเคลียส เชื้อราส่วนใหญ่อยู่ในดินและในน้ำ ดำรงชีพได้โดยใช้พลังงานจากขบวนการหายใจหรือการหมักสลายตัวของสารอินทรีย์ละลายในธรรมชาติ บางชนิดดำรงชีพแบบปาราสิต (Parasite) อยู่บนพืชหรือสัตว์อื่น

สาหร่าย (Algae) เป็นพืชเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ มีสารคลอโรฟิล ทำให้สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ได้จากแสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดสามารถใช้สารอินทรีย์จากธรรมชาติได้โดยไม่ต้องใช้แสงอาทิตย์ ปฏิกิริยาชีวเคมีของการสังเคราะห์สารอินทรีย์ของสาหร่ายนี้ยังได้ออกซิเจนออกมาด้วย ซึ่งเป็นประโยชน์แก่แบคทีเรีย

โปรโตซัว (Protozoa) เป็นสัตว์เซลล์เดียวสามารถเจริญเติบโตได้โดยอาศัยสารอินทรีย์ อาหารของโปรโตซัวส่วนใหญ่ได้แก่แบคทีเรีย โปรโตซัวแบ่งตามลักษณะรูปร่างได้ 3 กลุ่มคือ อมีบอย (Amoeboid) มีหนวด (Flagellate) และมีขน (Ciliate)

โรติเฟอร์ (Rotifer) เป็นสัตว์หลายเซลล์ มีขนรอบบริเวณปาก ซึ่งใช้ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่และโบกอาหารเข้าปาก โรติเฟอร์สามารถยืดหดตัวไปมาได้โดยอาศัยหางเป็นรูปแฉกที่ยึดติดกับผนังซึ่งอยู่กับที่ เช่น ผนังของบ่อเติมอากาศ (Aeration tank) และผนังบ่อตกตะกอน (Settling tank) เป็นต้น

ครัสเตเซียน (Crustacean) เป็นสัตว์หลายเซลล์ มีเปลือกแข็ง (Shell) หุ้มตัว สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดำรงชีวิตอยู่ได้โดยกินสารอินทรีย์ที่ไม่ละลาย สาหร่ายและแบคทีเรีย ตัวอย่างได้แก่ แดฟเนีย (Daphnia) และโคปิปอด (Copepod) เป็นต้น (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525: 229 - 230)

2.3.2 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

มาตรฐานของน้ำทิ้งจะกำหนดปริมาณของแบคทีเรีย คือชนิดโคลิฟอร์ม ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น การตรวจสอบว่าน้ำปราศจากเชื้อโรคหรือไม่ ทำได้โดยตรวจหาแบคทีเรียชี้แนะ (Bacteriological indicator) เช่น โคลิฟอร์ม ถ้าตรวจพบแสดงว่าน้ำนั้นน่าจะไม่ปลอดภัย โคลิฟอร์มแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามแหล่งที่มา คือ

1. ฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) พวกนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น ถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระ ทุกครั้งที่เกิดโรคระบาดเกี่ยวกับทางเดินอาหาร จะพบแบคทีเรียชี้แนะนี้ ตัวอย่างเช่น อี. โคไล (*E. coli*)

2. นันฟีคัลโคลิฟอร์ม (Non – fecal coliform) พวกนี้อาศัยอยู่ในดินและพืช อันตรายน้อยกว่าพวกแรก แต่เป็นแบคทีเรียชี้แนะถึงความไม่สะอาดของน้ำได้ ตัวอย่างเช่น เอ. แอโรจิเนส (*A. aerogenes*)

2.3.3 การตรวจหาโคลิฟอร์ม

การตรวจหาโคลิฟอร์มที่นิยมใช้มี 3 วิธีคือ

1. วิธีเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number, MPN or Mutiple Tube Technique)

2. วิธีเยื่อกรอง (Membrane Filter)

3. วิธีนับจากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count)

(ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525: 235 - 236)

จากการศึกษาเรื่องการตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้ง สามารถสรุปได้ว่า ในการตรวจสอบคุณภาพของน้ำทิ้งต้องทำการวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ โดยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ, ความขุ่น, สีและกลิ่น ทางเคมี ได้แก่ พีเอช, ปริมาณของแข็ง, บีโอดี, ซีโอดี, เอมแอลเอสเอส, เอมแอลวีเอสเอส, ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ส่วนทางชีวภาพ ได้แก่ การตรวจหาโคลิฟอร์ม โดยต้องทำการควบคุมคุณภาพให้ได้ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ก่อนที่จะปล่อยลงสู่ลำน้ำสาธารณะได้

3. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

จุลินทรีย์มีกระจายหรือเจริญอยู่ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ และอากาศ รวมทั้งอยู่ตามส่วนต่างๆของร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะบริเวณผิวหนังชั้นนอก ซึ่งเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้ดี จุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ ต้องการสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโต ตามแต่ละประเภท เช่น บางชนิดต้องการสภาวะที่มีออกซิเจน บางชนิดต้องการสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้สารอาหารยังเป็นสิ่งสำคัญในการเจริญของแบคทีเรีย เป็นแหล่งของพลังงาน แหล่งของคาร์บอน แหล่งของไนโตรเจน และแหล่งของเกลือแร่ วิตามิน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ต้องจัดสภาพแวดล้อมและอาหารให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงด้วย

3.1 สารอาหาร

แหล่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีดังนี้

3.1.1 แหล่งพลังงาน (Energy source) เป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์นำไปสร้างพลังงานเพื่อการเจริญและกิจกรรมต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาล เป็นแหล่งพลังงานที่ดี นอกจากนี้ยังสามารถใช้พวกเอสเทอร์ แอลกอฮอล์ เพปไทด์ กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ รวมทั้งเกลือของกรดได้ด้วย มีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น เซลลูโลส บางชนิดสามารถย่อยแป้งได้ และมีจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้ไขมันเป็นแหล่งพลังงาน และจะใช้ก็ต่อเมื่อสารพลังงานชนิดอื่นที่ใช้ง่ายๆ เช่น น้ำตาล ถูกใช้ไปหมดแล้วเท่านั้น โดยไขมันจะถูกย่อยสลายไปเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันโดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสก่อน จากนั้นจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จึงจะสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ จุลินทรีย์พวกแอโรบจะมีความเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของไขมันมากกว่าพวกแอนแอโรบ และพวกที่สามารถย่อยไขมันได้ก็มักจะย่อยสลายโปรตีนได้ (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 8)

3.1.2 แหล่งคาร์บอน (Carbon source) เป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์นำไปสร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ส่วนที่เป็นธาตุคาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ แต่ส่วนใหญ่แล้วจะได้จากสารประกอบอินทรีย์

จากความต้องการแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์เพื่อการเจริญนั้น ทำให้สามารถจำแนกจุลินทรีย์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ Chemoheterotroph ซึ่งใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน และจุลินทรีย์ Chemolithotroph ซึ่งใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 29)

3.1.3 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) เป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้สร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นไนโตรเจน จุลินทรีย์มีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนได้กว้าง

บางชนิดใช้ก๊าซไนโตรเจน บางชนิดใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เกลือ ไนไตรต์ ไนเตรท หรือแอมโมเนียม บางชนิดใช้สารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน โปรตีน เพปไทด์ (นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541: 75) แล็กทิกแอสิดแบคทีเรียบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารที่มีโพลิเพปไทด์เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ไม่สามารถย่อยเคซีอีนและเจริญได้ไม่ดีถ้ามีกรดอะมิโนบางชนิดอยู่ในอาหาร (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 9)

3.1.4 แหล่งเกลือแร่ (Mineral source) เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียมและเหล็ก แร่ธาตุเหล่านี้มักเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วๆ ไป อยู่ในรูปของเกลือ นอกจากนี้ ยังมี Trace element ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อย เป็นส่วนประกอบของสารที่จำเป็นต่อการเจริญและเป็น Cofactor สำหรับการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ โคบอลท์ ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เป็นต้น

3.1.5 แหล่งวิตามินและสารช่วยการเจริญ วิตามินทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินต่างๆ ได้จากอาหารลี้ยงเชื้อ บางชนิดต้องการวิตามิน 1 ชนิดหรือมากกว่า เพื่อการเจริญเติบโต

นอกจากสารอาหารดังที่กล่าวมาแล้ว น้ำเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำจะเป็นตัวทำละลาย เพื่อให้สารอาหารอยู่ในรูปที่จุลินทรีย์สามารถสามารถนำไปใช้ได้ และยังต้องมีสารที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ (Buffer) มีความสามารถต้านทางต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชได้ ควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ได้แก่ เกลือฟอสเฟต หรือเกลือซิเตรท เป็นต้น

3.2 การเลี้ยงแบคทีเรียแอนแอโรบ

แบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เรียกแบคทีเรียเหล่านี้ว่า แอโรบ (Aerobe) แต่ยังมีแบคทีเรียอีกมากที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เรียกว่า แอนแอโรบ (Anaerobe) แบคทีเรียเหล่านี้ต้องการสภาวะรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียแอนแอโรบ แบ่งได้เป็น Aerotorerant anaerobe และ Obligate anaerobe

กลุ่ม Aerotorerant anaerobe เป็น Facultative anaerobe เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียเหล่านี้จะใช้ออกซิเจนเป็นสารรับอิเล็กตรอนในการสังเคราะห์ ATP โดยวิธี Aerobic respiration ในสภาวะรีดิวซ์ แบคทีเรียเหล่านี้จะสร้าง ATP โดยวิธี Anaerobic respiration หรือ Fermentation

กลุ่ม Obligate anaerobe เป็นแอนแอโรบที่เจริญในสภาวะรีดิวซ์เท่านั้น แต่อาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มอีก กลุ่มหนึ่งสามารถทนรับการสัมผัสอากาศในระหว่างการถ่ายเชื้อได้แต่เจริญในสภาวะรีดิวซ์เท่านั้น อีกกลุ่มหนึ่งเป็น Strick anaerobe หรือ Fastidious anaerobe ไม่ทนการสัมผัสอากาศในระหว่างการถ่ายเชื้อ และต้องการสภาวะรีดิวซ์ในการเจริญ

3.2.1 การหมัก

การหมักในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม หมายถึง กระบวนการผลิตผลผลิตใดๆ ก็ตาม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (Mass culture) ซึ่งจะครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน (สมใจ ศิริโภค. 2537: 1) สามารถแบ่งการหมักออกเป็นแบบต่างๆ ได้ดังนี้

3.2.1.1 การหมักแบ่งตามความต้องการอากาศได้เป็น

1. Aerobic fermentation เป็นการหมักที่ต้องการอากาศ เช่น การหมักกรดอะซิติก และกรดซิตริก

2. Anaerobic fermentation เป็นการหมักที่ไม่ต้องการอากาศ เช่น การหมักอะซิโตน และบิวทานอล (สมใจ ศิริโภค. 2537: 3)

3.2.1.2 การหมักแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

1. Batch fermentation เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในระบบแล้ว จะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ เพิ่มลงไปอีก

2. Continuous fermentation เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง โดยมีการเติมอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอด ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

3. Fed – batch fermentation เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก (สมใจ ศิริโภค. 2537: 4)

3.2.2 กระบวนการหมัก

กระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารโดยแบคทีเรีย สามารถแบ่งได้ 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอนไฮโดรไลซีส (Hydrolysis)

เป็นขั้นตอนการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรท โปรตีน และไขมัน ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กที่สามารถละลายน้ำได้ เป็นปฏิกิริยาที่ต้องอาศัยเอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ของจุลินทรีย์ (Extracellular enzyme) สารอินทรีย์ที่มีขนาดเล็กลงและละลายน้ำได้ สามารถเคลื่อนย้ายเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารเหล่านี้เพื่อสร้างพลังงานและสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนนี้จะเป็นอะไร ขึ้นอยู่กับชนิดสารตั้งต้น เช่น ถ้าสารตั้งต้นเป็นคาร์โบไฮเดรท จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ไขมันจะเปลี่ยนเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล เป็นต้น จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนนี้เป็นพวก Hydrolytic bacteria และ Fermentative bacteria

การย่อยสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรท

สารประกอบคาร์โบไฮเดรทส่วนมากเป็นพวก α – glycoside เช่น Starch, Sucrose และ Amylose จะถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ Amylase ซึ่งถูกขับออกมาจากจุลินทรีย์ เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลพืช ถูกย่อยสลายได้ยาก แต่มีโปรโตซัวและแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น Clostridium sp. สามารถย่อยสลายเซลลูโลสเป็นเซลโลไบโอส ซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปได้ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ ลิกนินเป็นอนุพันธ์ของ Phenylpropane ถูกย่อยสลายได้ยาก ถ้าสารประกอบใดมีลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย การย่อยสลายจะลดลงถึงร้อยละ 30

การย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจน เช่น โปรตีน ยูเรีย เพียวรีน และพิริมิดีน มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ สารประกอบไนโตรเจนจะถูกย่อยสลายได้กรดอะมิโน กรดอะมิโนบางชนิดจะถูกย่อยสลายเป็นไพรูเวท และจะเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนและจุลินทรีย์ โปรตีนถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ Protease และ Peptidase กรดอะมิโนที่ได้จะถูกย่อยสลายต่อไปเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน หรือถูกนำไปใช้สร้างเซลใหม่ได้โดยตรง จุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายโปรตีนในกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน ได้แก่ พวก Clostridium

การย่อยไขมัน

ไขมัน เป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นอินทรีย์ เช่น เอสเทอร์ เมทธานอล ในกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้อากาศ จุลินทรีย์ Clostridium บางชนิดสร้างเอนไซม์ Lipase ออกมาย่อยไขมัน ไขมันจะถูกย่อยให้เป็นกลีเซอรอลและ

กรดไขมัน เช่น กรดสเตียริก กรดโอเลอิก เป็นต้น กรดไขมันจะถูกย่อยสลายในกระบวนการย่อยสลายแบบใช้อากาศ โดยกระบวนการ β – oxidation กลีเซอรอลจะถูกสลายต่อ ตามกระบวนการ Glycolysis ให้ผลผลิตเป็นไพรูวิท กรดไขมันจะถูกออกซิไดซ์ด้วยปฏิกิริยา β – oxidation ได้กรดอะซิติกและไฮโดรเจนอิออน

2. ขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ (Acid production)

ขั้นตอนนี้เป็นการย่อยสลายผลิตภัณฑ์ ต่อจากขั้นตอนไฮโดรไลซิสเพื่อนำไปใช้สร้างเซลใหม่ และใช้เป็นพลังงาน อินทรีย์สารโมเลกุลเล็กจะถูกแบคทีเรียพวก Facultative และ Obligate anaerobe ใช้เป็นแหล่งพลังงาน เกิดกระบวนการหมัก มีผลทำให้เกิดสารที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์และรูปรีดิวซ์ รูปออกซิไดซ์ ได้แก่ พวกกรดอินทรีย์ระเหย ที่มีคาร์บอนอะตอมไม่เกิน 5 อะตอม เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก เป็นต้น แบคทีเรียที่ทำหน้าที่ช่วงนี้ คือ แบคทีเรียที่สร้างกรด หรือ Non – methanogenic bacteria ส่วนรูปรีดิวซ์นั้นมีอยู่หลายอย่าง ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย และตัวรับอิเลคตรอน เช่น แบคทีเรียที่สร้างกรดบางชนิดใช้ไฮโดรเจนอิออนเป็นตัวรับอิเลคตรอน ทำให้เกิดไฮโดรเจนโมเลกุล ถ้าหากไม่มีการสร้างไฮโดรเจนโมเลกุล แบคทีเรียเหล่านี้จะใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นตัวรับอิเลคตรอน ทำให้เกิด เมทธานอล เอทธานอล หรือกรดแลกติก เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสร้างกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้

ผลผลิตพวกกรดอินทรีย์ระเหยจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Methanogenic bacteria เพื่อเกิดเป็นก๊าซมีเทนจากการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีไฮโดรเจนเป็นแหล่งอิเลคตรอน ทำให้ปริมาณซีโอดีลดลง ปริมาณก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงประสิทธิภาพของระบบบำบัด

3. ขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทน (Methane production)

ในการย่อยสลายสารอินทรีย์จนได้ก๊าซชีวภาพ อาศัยการทำงานของแบคทีเรีย 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ Non – methanogenic bacteria และ Methanogenic bacteria

Non – methanogenic bacteria แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สร้างมีเทน ส่วนใหญ่เป็น Facultative bacteria ได้รับพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นกรดไขมันระเหยง่าย กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนียและซัลไฟด์ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 4.0 – 6.5 มีอัตราการเจริญเติบโตสูง แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ 2 เท่า ในเวลา 24 ชั่วโมง

Methanogenic bacteria แบคทีเรียที่สร้างมีเทน ส่วนใหญ่เป็น Obligate anaerobic bacteria เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ขาดออกซิเจน ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.0 – 7.8 ใช้เวลาประมาณ 3 – 5 วัน ในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของการเกิดก๊าซมีเทนเกิดขึ้นได้จากการดีคาร์บอกซิเลท และการรีดักชันก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการ

การเปลี่ยนกรดอะซิติกเป็นก๊าซมีเทน

$$CH_3COOH \dashrightarrow CH_4 + CO_2$$

การเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซมีเทน

$$CO_2 + 4H_2 \dashrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

การเปลี่ยนกรดโพรพิออนิกเป็นก๊าซมีเทน

$$4CH_3CH_2COOH + 2H_2O \dashrightarrow 4CH_3COOH + CO_2 + 3CH_4$$

3.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ

อาหารเสริมสร้าง ระบบนี้ต้องการอาหารเสริมสร้างต่ำมาก อัตราส่วนบีโอดี : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส ที่ต้องการต่ำสุดเท่ากับ 100 : 1.1 : 0.2 สารที่นิยมใช้คือ ยูเรียและกรดฟอสฟุริก

สภาพไร้ออกซิเจนอิสระ ระบบบำบัดต้องอยู่ในสภาพปราศจากออกซิเจนอิสระ โดยเฉพาะพวกมีเทนฟอร์มเมอร์

อุณหภูมิ แบคทีเรียสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม 2 ช่วง คือ ช่วงเมโซฟิลิค (Mesophilic range) คือช่วงอุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส และช่วงเทอร์โมฟิลิค (Thermophilic range) คือช่วงอุณหภูมิ 47 – 55 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ แบคทีเรียจะทำงานได้ไม่ดี

พีเอช น้ำทิ้งก่อนเข้าระบบต้องปรับพีเอชให้เป็นกลาง (พีเอช 7) หรืออยู่ในช่วง 6 – 8 ระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนอิสระจะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อพีเอชของระบบอยู่ในช่วง 6.6 – 7.8

ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณก๊าซที่เพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติในระบบการหมัก เป็นตัวชี้ให้เห็นว่าระบบกำลังล้มเหลว อาจเนื่องมาจากน้ำทิ้งมีสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ง่ายปนอยู่มาก ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากในสภาพไม่มีออกซิเจน

ปริมาณความเป็นด่างทั้งหมดและความเป็นด่างไบคาร์บอเนต ค่าความเป็นด่างไบคาร์บอเนตจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์เมื่อมีกรดอินทรีย์เกิดขึ้นในระบบ ทำให้ค่าพีเอช

เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ถ้ามีกรดอินทรีย์มากเกินไป จนทำลายแอมโมเนียไนโตรเจนที่มีอยู่หมดไป ทำให้เกิดกรดอินทรีย์อิสระเหลืออยู่ ทำให้พีเอชลดต่ำลงมาก ต้องปรับพีเอชทันที โดยใช้โซดาไฟหรือปูนไลม์

ปริมาณซีโอดี บีโอดี และสารแขวนลอย การตรวจวิเคราะห์ค่าซีโอดี บีโอดี และสารแขวนลอยในน้ำทิ้งก่อนเข้าระบบและน้ำสุดท้ายที่ผ่านระบบบำบัด เป็นประโยชน์ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบว่าผิดปกติหรือไม่ ในระบบถังหมัก มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี บีโอดีและสารแขวนลอยได้ร้อยละ 55 – 60, 75 – 80 และ 60 – 75 ตามลำดับ

จากการศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ สามารถสรุปได้ว่าในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้น ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละประเภท ทั้งในส่วนของความต้องการออกซิเจน และสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแหล่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ แหล่งพลังงาน (คาร์โบไฮเดรต, ไขมัน, โปรตีน) แหล่งคาร์บอน (คาร์บอนไดออกไซด์, สารประกอบอินทรีย์) แหล่งไนโตรเจน (ก๊าซไนโตรเจน, สารอนินทรีย์ไนโตรเจน, สารอินทรีย์ไนโตรเจน) แหล่งวิตามินและเกลือแร่ และน้ำ สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแอนแอโรบนั้น ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ก่อให้เกิดกระบวนการหมักแบบไม่ต้องการอากาศ เกิดกรดอินทรีย์และก๊าซมีเทน ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม คือ ไม่มีออกซิเจนอิสระ พีเอชของระบบอยู่ในช่วง 6 – 8 และมีอุณหภูมิเหมาะสมที่จุลินทรีย์จะทำงานได้ คือที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส และ 47 – 55 องศาเซลเซียส

4. การสกัดเอนไซม์จากจุลินทรีย์

โดยทั่วไปการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากกระบวนการหมักและการทำให้บริสุทธิ์ เป็นขั้นตอนที่เสียค่าใช้จ่ายประมาณ 20 – 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด (สมใจ ศิริโภค. 2537: 196) ดังนั้นจึงควรเลือกใช้วิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ให้ผลผลิตสูง และเสียค่าใช้จ่ายน้อย อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วิธีใดนั้น ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่จะทำการสกัด หรือเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีอยู่ เป็นต้น

4.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อแบคทีเรีย

การสร้างเอนไซม์อะไมเลสขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ดังต่อไปนี้

4.1.1 ช่วงการเจริญ (Growth rate)

เมื่อนำแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วงแรกเซลล์จะยังไม่เพิ่มจำนวน ต่อมาจะเจริญอย่างรวดเร็ว และเริ่มมีอัตราการเจริญคงที่และลดลงไปในที่สุด การเจริญของแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 4 ระยะ ได้แก่

1. ระยะพัก (Lag phase) เมื่อนำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างไปจากเดิม แบคทีเรียจะไม่แบ่งเซลล์ทันทีทันใด เซลล์จะมีจำนวนเท่าเดิม แต่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เพราะแต่ละเซลล์จะมีการสังเคราะห์โปรโตปลาสซึมและสารอื่นเพิ่มขึ้น เช่น เอนไซม์ DNA

2. ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Logarithmic) แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ระยะนี้เซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงกว่าระยะอื่น และแบคทีเรียทุกเซลล์จะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมและสมบัติทางสรีระวิทยาในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ระยะเวลาช่วงนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ พีเอช สารอาหารต่างๆ เป็นต้น

3. ระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) ระยะนี้แบคทีเรียจะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ เนื่องจากเกิดสภาวะสมดุลระหว่างการทวีจำนวนและการตาย เพราะสภาวะเริ่มเปลี่ยนแปลง มีสารพิษต่างๆ เกิดขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ต่างๆ มีการศึกษาเชื้อ *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* พบว่า การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และสูงสุดในช่วง Stationary phase คือ 60 ชั่วโมง

4. ระยะเซลล์ตาย (Death phase) เป็นระยะสุดท้ายในการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียจะตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการขาดแคลนสารอาหาร และมีปริมาณสารพิษเพิ่มมากขึ้นจนแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 40 - 41)

4.1.2 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงานจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์แสง โดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง เป็นต้น และจากรายงานของ สุทธิ ภมรสมิตและวินัย กลิ่นหอม พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง รำข้าว มีผลให้ได้ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอาหารบริสุทธิ์ราคาแพง เช่น มอลโตส กลูโคส และแป้งบริสุทธิ์ และอัตราเร็วในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะเกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราผ่านไปเพียง 3 วัน หรือ 72 ชั่วโมง (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 41) สอดคล้องกับลัดถาพร ศรีมหาสงคราม (2525: 38) ที่พบว่า น้ำทิ้งจาก

โรงงานที่เกี่ยวข้องกับแป้ง เช่น แป้งมันสำปะหลัง พบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก โดยแป้งมันสำปะหลัง 7 เปอร์เซ็นต์ จะให้การเจริญของเชื้อและผลิตเอนไซม์สูงสุดเป็นเวลา 60 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังลงในอาหารเหลวมากขึ้นทำให้เชื้อเจริญดีขึ้น ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากขึ้นจนถึงจุดหนึ่งการผลิตเอนไซม์จะคงที่แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณแป้งมากขึ้นก็ตาม จากนั้นการผลิตเอนไซม์จะค่อยๆ ลดลง

4.1.3 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8 – 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป แห่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท (สมใจ ศิริโภค. 2537: 92) จากการศึกษาของลัดถาพร ศรีมหาสงคราม (2525) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุดคือเปปโตน รองลงมาคือเคซีนไฮโดรไลเสท ทริพติเคสเปปโตน แอสพาราจีน และบีฟแอคแทรค ตามลำดับ ส่วนเกลือแอมโมเนียมไนเตรทและเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ต่ำ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดี คือ เปปโตนเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (แหล่งไนโตรเจน) และแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (แหล่งคาร์บอน) โดยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอินทรีย์จะช่วยให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากขึ้น

4.1.4 เกลือของสารอนินทรีย์

เกลือแร่มีความสำคัญในการควบคุมขบวนการอิเลคโตรไลท์ของเซลล์ โดยทั่วไปเกลือแร่ที่แบคทีเรียและจุลินทรีย์ต้องการมาก ได้แก่ แมกนีเซียม โปตัสเซียม มังกานีส แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส และกำมะถัน จากการศึกษาของ สายสมร ลำยอง พบว่ากลไกการทำงานของแอลฟาอะไมเลสต้องอาศัยอิออนของคลอไรท์ที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 0.01 โมลาร์ (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 42)

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุลและสมใจ ศิริโภค (2541: 36) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่า Inoculum medium ควรประกอบด้วย Soluble starch, Peptone, Yeast extract, NaCl และน้ำกลั่น ส่วน Production medium ควรประกอบด้วย Starch, Casitone, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ และน้ำกลั่น

4.2 ชนิดและลักษณะของเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์ที่สร้างโดยแบคทีเรีย แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. เอนไซม์ที่สร้างขึ้นแล้วถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ทำหน้าที่ย่อยสารอาหารที่อยู่นอกเซลล์ เพื่อให้สามารถดูดซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่าย

2. เอนไซม์ที่อยู่ตามบริเวณขอบผิวของเยื่อเซลล์ (Periphery enzyme) ทำหน้าที่ในการดูดซึมการเข้าออกของสารให้แก่เซลล์

3. เอนไซม์ที่ทำหน้าที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) เพื่อสร้างพลังงานและสารต่างๆ ให้แก่เซลล์

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์และถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์ เรียกว่า Extracellular enzyme สามารถย่อยแป้งได้ พบในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด แบ่งตามตำแหน่งของการย่อยแป้งเป็น 2 ประเภท คือ Endoamylase สามารถย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α (1 – 4) glycosidic linkage ถ้าการย่อยสลายไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโทส และเดกซ์ทริน ถ้าการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้มอลโทสและกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้คือ แอลฟาอะไมเลส อีกประเภทหนึ่งคือ Exoamylase ซึ่งย่อยแป้งจาก Non – reducing end เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ในส่วนของเบต้าอะไมเลสจะให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลมอลโทสและ Limit dextrin ส่วนกลูโคอะไมเลสหรือแกมมาอะไมเลส จะได้กลูโคสเพียงอย่างเดียว (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 42 - 43)

เอนไซม์อะไมเลส แบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

1. แอลฟาอะไมเลส (α - amylase) มีชื่อทางการค้าที่รู้จักกันว่า Termamyl มีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (Diastase) มีชื่อตามระบบว่า α – 1,4 – glucan 4 – glucanohydrolase พบได้ทั่วไปทั้งพืชและสัตว์ ในคนพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน มีบทบาทในการย่อยสลายแป้ง เป็นโอลิโกและไดแซคคาไรด์ เป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ คือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α – 1,4 ในลักษณะตัดภายในสายโพลิเมอร์ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (Glucan) และลิมิตเดกทรินซ์ (Limit dextrin) มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2 – 6 หน่วย และยังมีโครงสร้างรูปเดิม

2. เบต้าอะไมเลส (β - amylase) มีชื่อตามระบบว่า α – 1,4 – glucan maltohydrolase พบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลท์, ข้าวสาลี และถั่วเหลือง เป็นต้น มักพบร่วมกับแอลฟาอะไมเลส มีมวลโมเลกุล 152,000 มี pH optimum ที่ 6.5 ปฏิกิริยาย่อยสลายของเบต้าอะไมเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α – 1,4 ในลักษณะการตัดสายโพลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วย

มอลโทส หรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิล α – 1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็นกลูแคน ลิมิตเดกทรินซ์ และส่วนใหญ่เป็นมอลโทสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิม

3. แกมมาอะไมเลส หรือ กลูโคอะไมเลส หรือ อมิโลกลูโคซิเดส (γ - amylase, Glucoamylase, Amyloglucosidase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า α – 1,4 – glucan glucohydrolase เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ต่างๆ มี pH optimum ที่ 4.0 – 4.4 สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ (α – 1,4, α – 1,6 และ α – 1,3) การตัดสายโพลิเมอร์จะตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้ β – configuration หรือเบตาดีกลูโคสและส่วนของกลูแคน และลิมิตเดกทรินซ์ (ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543: 121 – 122)

ผลของเอนไซม์อะไมเลสที่มีต่อแป้ง

โมเลกุลของแป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน อะไมโลส ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสต่อกันเป็น chain ยาว ด้วย α – (1,4) glycosidic bond มีความยาวประมาณ 1,100 – 4,400 หน่วยของกลูโคส มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่สามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน อะไมโลเพคติน ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสต่อกันด้วย α – (1,4) glycosidic bond ซึ่งมีการแตกแขนงทุกๆ 25 หน่วยของกลูโคส ตรงตำแหน่งที่แตกแขนง ต่อกันด้วย α – (1,6) glycosidic bond มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 1,000,000 ละลายน้ำอยู่ในรูป Colloidal solution ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำตาล แป้งดิบไม่ละลายน้ำและต้านทานการย่อยสลายของเอนไซม์ การให้ความร้อนแก่แป้งดิบในขณะเป็นสารละลายจะทำให้เกิด Gelatinization จะมีความหนืดเพิ่มขึ้น เนื่องจาก Granule ของแป้งขยายตัวดูดซึมน้ำเข้าไป สูญเสียลักษณะ Birefringence สามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้เร็วขึ้น

อิทธิพลของพีเอช (pH) ต่อการทำงานของเอนไซม์

ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอยู่ที่ 6.9 เอนไซม์จาก *B. subtilis*, *A. oryzae* และข้าวมอลท์ ต้องการพีเอชอยู่ระหว่าง 4.0 – 6.0 แอลฟาอะไมเลสส่วนใหญ่จะคงทนต่อพีเอช ระหว่าง 4.0 – 10.0 แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียจะทำงานได้ดีในช่วง 3.0 – 9.5 ที่เหมาะสม คือ 6.0

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

จุลินทรีย์มีเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีตลอดจนทนต่อการแปรเปลี่ยนของอุณหภูมิในช่วงที่ต่างกัน โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญมากที่สุด (Optimum temperature) แตกต่างกัน เมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่า Minimum temperature หรือสูงกว่า Maximum

temperature จุลินทรีย์จะหยุดเจริญ สามารถแบ่งจุลินทรีย์ตามระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดังตาราง 10

ตาราง 10 การแบ่งจุลินทรีย์ตามระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

กลุ่มจุลินทรีย์	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**		
	ต่ำสุด (Minimum)	**เหมาะสม** (Optimum)	**สูงสุด** (Maximum)
Psychrophile	(-5) – (+5)	12 – 15	15 – 20
Phychrotroph	(-5) – (+5)	25 – 30	30 – 35
Mesophile	5 – 15	30 – 37	35 – 45
Thermophile	40 - 45	55 – 75	60 – 90

ที่มา: พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. (2546). *ศึกษาการลอกแป้งบนผืนผ้าด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสากหรรมแป้งมันสำปะหลัง.* หน้า 45.

อุณหภูมิที่เหมาะสมในขณะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์สำหรับเชื้อ *B. subtilis* คือ 30 – 35 องศาเซลเซียส และเชื้อ *B. amyloliquefaciens* คือ 37 องศาเซลเซียส (ลัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2525: 50)

แหล่งของเอนไซม์อะไมเลส

เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในกลุ่ม Aspergillus ได้แก่ *A. niger*, *A. candidus*, *A. oryzae* ราในกลุ่ม Mucoraceous fungi ได้แก่ Rhizopus sp., Mucor sp., *Amylomyces rouxii* และราชนิดอื่นๆ เช่น Penicillium

ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Endomycopsis fibuligera*, *E. capsularis*, *E. burtonii*, Candida sp., Torulopsis sp., *T. mogii*, *T. norvegensis*, *Saccharomyces diastaticus*

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus, B. stearothermophilus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Aerobacillus macerans*, *Bacterium cassavanum, Actinomyces microflavus*, Sarcina sp.

4.3 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม

กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมที่เป็นการค้ามี 2 วิธี คือ

4.3.1 Semi – solid culture เป็นกรรมวิธีการผลิตเอนไซม์ในเอเชีย วิธีทั่วไป คือ เลี้ยงจุลินทรีย์ (ใช้เชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยอาหารที่เป็นของแข็งและส่วนผสมของน้ำ 50% อาหารเลี้ยงเชื้ออาจเป็นรำข้าวเจ้าหรือแหล่งคาร์บอนอื่นๆ มีการเสริมสารอาหารพวกโปรตีน เกลือ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการ Sterile อาหารเลี้ยงเชื้อและทำให้เย็นแล้ว ใส่จุลินทรีย์ลงบนอาหาร แผ่กระจายไปบนถาด Incubate ไว้ในตู้หรือห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น มีอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อผ่านเข้าไปด้วย ในระหว่าง Incubate จะตรวจดู Activity ของเอนไซม์ทุกวัน จนได้ปริมาณที่สูงที่สุดจึงทำการแยกเอนไซม์ออก โดยการสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ แล้วทำการกรอง ส่วนเหลวที่กรองได้คือเอนไซม์

4.3.2 Submerged culture วิธีนี้ใช้ผลิตเอนไซม์ทั้งที่เป็นเชื้อรา และแบคทีเรีย แหล่งอาหารจะเป็นสารประกอบอินทรีย์ โดยมีส่วนที่เป็นของแข็ง 2 – 6% นอกนั้นเป็นของเหลว และมีสารอาหารอื่นๆ อีก การผลิตเอนไซม์แบบ Submerged culture ถ้าทำในห้องปฏิบัติการ อาจใช้ Flask และ Incubate ไว้บน Shaker โดยมีอัตราการสั่นแตกต่างกันไปแล้วแต่ความเหมาะสมของเอนไซม์ที่ผลิตแต่ละชนิด ผลจากการสั่น ทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศตลอดเวลา (พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. 2546: 48)

4.4 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโภค (2540, 2541) ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส และหาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

1. การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยการนำตัวอย่างดินหรือน้ำจากแหล่งต่างๆ มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสม Spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง และตรวจหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนี เชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะให้บริเวณใสรอบโคโลนี เลือกเก็บมาแยกจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar

2. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในขั้นต้น นำเชื้อที่แยกได้ มาเพาะเชื้อแบบ Point inoculation ลงบนอาหารแข็ง Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เก็บเฉพาะเชื้อที่ให้ความกว้างของบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป จากนั้นนำเชื้อมาใส่ลงในอาหาร

เหลว Inoculum medium ซึ่งประกอบด้วย Soluble starch, Yeast extract, Peptone, Nacl และน้ำกลั่น บ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร Production medium ซึ่งประกอบด้วย Soluble starch, Casamino acid, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ และน้ำกลั่น โดยใช้ Inoculum size 10% บ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ Broth ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์โดยใช้ Refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใส ซึ่งเป็น Crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ต่อไป

3. การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส ทำโดยเจือจาง Crude enzyme ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 เติมสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงโดยวิธีของ Bernfeld คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่า Starch และ Corn starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ที่ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร Casitone และ Polypeptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ที่ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร และต้องมีการเติม แมกนีเซียมซัลเฟต, โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแคลเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ คือที่ 37 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 8

Prakash, B. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali – stable α– amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. โดยทำการเพาะเลี้ยง *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 ในอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วย Soluble starch จากมันฝรั่ง 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) Tryptone, NaCl 200 g/l, $MgCl_2.6H_2O$ 10 g/l, KCl 5 g/l, Trisodium citrate 3 g/l และ Agar 20 g/l พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน จะเกิดบริเวณใสรอบๆ แบคทีเรียที่สามารถย่อยแป้งได้ นำแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย Peptone 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) NaCl 200 g/l, $MgCl_2.6H_2O$ 10 g/l, KCl 5 g/l, Trisodium citrate 3 g/l และ Agar 20 g/l เมื่อนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่า *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 สามารถผลิตเอนไซม์ α – amylase ที่มีคุณสมบัติเป็น Extracellular enzyme ทนเกลือ ทนด่างและทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสให้ได้ปริมาณสูงสุด ได้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย NaCl 20% หรือ KCl 15% แป้งข้าวเจ้า 0.5% และ Tryptone ที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเติม

50 mM $CaCl_2$ การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเพิ่มขึ้นอีก 29% แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส 2 ชนิด คือ อะไมเลส I (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 72 kDa) และอะไมเลส II (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 62 kDa) มีค่าสูงสุดที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีปริมาณ NaCl 0 – 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่เอนไซม์อะไมเลส I จะทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์อะไมเลส II ในสภาวะที่มี NaCl น้อย

4.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

การที่จะนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้อย่างสูงสุดนั้น เอนไซม์ต้องผ่านการศึกษาคุณสมบัติจำเพาะต่างๆ เช่น คุณสมบัติในด้านอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ น้ำหนักโมเลกุลและผลกระทบของสารประเภทต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น โดยก่อนทำการศึกษาคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ ต้องนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ก่อน แต่เนื่องจากเอนไซม์ต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติต่างกัน ดังนั้น การระบุถึงวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จึงทำได้ยาก แต่สามารถระบุถึงขั้นตอนและเทคนิคที่ใช้โดยทั่วไปได้

ขั้นตอนแรกคือการสกัดเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีน ในออกมาอยู่ในรูปของสารละลายที่ปราศจากเซลล์ วิธีการที่ใช้ขึ้นอยู่กับว่าเอนไซม์ชนิดนั้นเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในหรือภายนอกเซลล์ หากเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ต้องทำการแยกเซลล์ก่อน แต่หากเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ ต้องทำให้เซลล์แตกออกให้หมด เพื่อปล่อยให้เอนไซม์ออกจากสารละลายภายนอกก่อนและทำการแยกเซลล์โดยทั่วไปจะใช้วิธีที่สะดวกและมีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ Centrifugation เป็นการปั่นด้วยความเร็วสูงในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อเหวี่ยงให้เศษของเซลล์หรือสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่ต้องการแยกออกไปอัดติดกันที่ปลายแรงเหวี่ยงของภาชนะ ส่วนที่เป็นสารละลายใสที่ได้ เรียกว่า Supernatant และส่วนตะกอนที่ได้เรียกว่า Pellet

การทำให้เข้มข้นเป็นวิธีการที่ต้องใช้ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งการทำให้เข้มข้นทำได้หลายวิธี วิธีที่ใช้กันมาก ได้แก่

1. Ultrafiltration เป็นการแยกสารโมเลกุลเล็กออกโดยใช้ Semi – permeable membrane วิธีนี้สามารถแยกโปรตีนและสารอื่นๆ ที่มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ออกได้ โดยการเลือกใช้ Membrane ที่มี Pore size ที่เหมาะสม วิธีการคือ ใช้แรงดันจากท่ออากาศไปดันให้สารละลายวิ่งผ่าน Membrane ออกไปตามสายยางลงสู่ที่รองรับ Membrane pore จะมีขนาดจำเพาะที่จะกั้นโมเลกุลขนาดหนึ่งๆ หรือใหญ่กว่านั้นไม่ให้ผ่านไป และปล่อยให้โมเลกุลที่เล็กและตัวทำละลายผ่านได้สะดวก โปรตีนหรือเอนไซม์ที่ต้องการจะต้องมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของ Membrane pore จึงจะกั้นให้โมเลกุลยังคงอยู่ในสารละลายภายใน Unit ได้

2. Ammonium sulfate saturation precipitation หรือการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติม จะขึ้นอยู่กับ % Ammonium sulfate saturation ที่มีอยู่เดิมและที่ต้องการให้เป็น โดยโปรตีนที่นำมาตกตะกอนจะต้องมีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 100 mg/ml วิธีการคือ บรรจุสารละลายที่ต้องการทำให้เข้มข้นในบีกเกอร์ซึ่งมี Magnetic bar ตั้งไว้บน Magnetic stirrer ทั้งชุดนี้ต้องอยู่ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆ เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปทีละน้อยจนหมด ตั้งไว้ให้กวนไปเรื่อยๆ ที่อุณหภูมิต่ำต่อไปอีกประมาณ 1 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย แล้วนำทั้งหมดไป Centrifuge ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วสูงอย่างน้อยประมาณ 10,000 รอบ/นาที นานไม่ต่ำกว่า 1 ชั่วโมง เก็บ Pallet ที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์ ปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนได้หมด จากนั้นนำไปใส่ใน Dialysis tube แล้วนำไป Dialyze เพื่อให้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตละลายออกให้หมด โดยทั่วไป จะทำการ Dialyze ในบัฟเฟอร์ปริมาณไม่ต่ำกว่า 10 เท่าของปริมาตรเอนไซม์ แล้วตั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และต้องมีการกวนตลอดเวลา ครั้งละไม่ต่ำกว่า 2 ชั่วโมง และมีการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ประมาณ 2-3 ครั้ง

3. Organic solvent precipitation หรือการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารอินทรีย์ เช่น Acetone ซึ่งมักจะใช้ในปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรสารละลาย หรือ Ethanol ใช้ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย เป็นต้น วิธีนี้ โปรตีนที่ได้จะบริสุทธิ์กว่าวิธี Ammonium sulfate saturation precipitation แต่ตะกอนที่ได้นำไปละลายต่อได้ยาก นอกจากนี้ สารอินทรีย์ที่ใช้มักมีราคาแพงและส่วนใหญ่จะติดไฟง่าย

สำหรับวิธีการที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ทั่วไปจะใช้วิธี Column chromatography ซึ่งเทคนิคนี้จะแยกโปรตีนออกจากกันโดยอาศัยส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน คือ Mobile phase และ Stationary phase โดย Mobile phase คือสารละลายที่มีเอนไซม์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ และ Stationary phase คือ Matrix ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลมที่มีขนาดเล็กมากๆ ผลิตจากวัสดุหลายประเภท และมีการปรับปรุงคุณสมบัติเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน โดยอุปกรณ์ที่ใช้ทำ Column chromatography ประกอบไปด้วย Column ที่ใช้ในการแยกโปรตีน Fraction collector ที่ใช้เก็บสารละลายที่ออกจาก Column และ Peristaltic pumps ที่ควบคุมสารให้ละลายไหลตามความเร็วที่ต้องการอย่างสม่ำเสมอ โดยแต่ละ Fraction ที่ได้จาก Column จะถูกนำไปหาค่าระดับโปรตีนด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทั่วๆ ไปที่วัดได้ที่ความยาวคลื่นระดับต่ำกว่าความยาวของ Visible light โดยจะวัดเป็นค่า OD_{280} แล้วจึงนำไป Plot ลงในกราฟอีกครั้งหนึ่ง

การแยกโปรตีนเพื่อทำให้บริสุทธิ์ หรือการทำ Protein purification อาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของโปรตีนต่างชนิดกัน สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. Gel filtration หรือ Gel chromatography หลักการคือ แยกชนิดของโปรตีนหรือเอนไซม์ขนาดโมเลกุล โดยใช้ Matrix ที่มีรูพรุน โปรตีนจะวิ่งลงมาตาม Column ด้วยความเร็วที่ต่างกัน คือ โปรตีนขนาดเล็ก ซึ่งจะลอดเข้าไปตามรูของ Matrix ได้ จะใช้เวลานานกว่าในการวิ่ง สำหรับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มากๆ จะลอดรูพรุนของ Matrix ไม่ได้ก็จะวิ่งผ่านไปได้เร็ว ส่วนพวกที่มีขนาดปานกลางจะวิ่งเร็วกว่าพวกที่มีขนาดเล็ก แต่ช้ากว่าพวกขนาดใหญ่ ตามลำดับกันไป

2. Ion exchange chromatography เป็นการแยกโปรตีนตามประจุ หลักการโดยทั่วไปคือ โดยปกติแล้วโปรตีนมีทั้งประจุบวกและลบ อยู่ที่ผิวโมเลกุล ซึ่งประจุบวก จะได้จาก Lysine, Histidine, Arginine และอีกเล็กน้อยจาก N – terminal ของโมเลกุล ส่วนประจุลบ ได้จาก Aspatic acid, Glutamic acid และ C – terminal ซึ่ง Net charge จะขึ้นกับสัดส่วนของปริมาณประจุที่ได้จาก Amino acid ที่เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังขึ้นกับระดับพีเอชของสภาพแวดล้อมด้วย ระดับพีเอชที่มีประจุลบและบวกเท่ากัน เรียกว่า Isoelectric point หรือ pI โปรตีนส่วนใหญ่จะมี pI ที่ประมาณพีเอช 5.0 – 9.0 ถ้าพีเอชสูงกว่า pI จะทำให้โปรตีนนั้นมีประจุลบ และถ้าพีเอชต่ำกว่า pI จะทำให้โปรตีนเป็นประจุบวก

สำหรับ Ion exchange matrices ที่ถูกสร้างขึ้นให้มีประจุบวกเพื่อจับกับโปรตีนประจุลบ เรียกว่าเป็น Anion exchanger หรือทำให้เป็นประจุลบ เพื่อจับกับโปรตีนประจุบวก เรียกว่าเป็น Cation exchanger แล้วแต่ความต้องการในการใช้ การเลือกใช้พีเอชระดับใด ขึ้นกับว่าโปรตีนที่สนใจนั้น Stable ที่พีเอชระดับใด ถ้า Stable ที่พีเอชต่ำกว่า pI ใช้ Cation exchanger ถ้า Stable ที่พีเอชสูงกว่า pI ใช้ Anion exchanger

เมื่อผ่านสารละลายตัวอย่างที่มีเอนไซม์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์เข้าไปใน Column แล้วปล่อยให้โปรตีนไปจับกับ Matrix โปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนมาและมีประจุชนิดเดียวกับ Matrix จะหลุดออกไปจาก Column เมื่อโปรตีนที่ปนเปื้อนหลุดออกไปหมดแล้ว จึงทำการ Elute โปรตีนที่ติดอยู่กับ Matrix ออก ซึ่งทำได้โดยใช้ Salt gradient ในช่วง 0 – 0.5 NaCl

3. Hydrophobic interaction chromatography คือการอาศัย Hydrophobicity ของโปรตีนในการแยก วิธีนี้มี Mobile phase เป็น Polar และมี Stationary phase เป็น Non – polar คือ Matrix ที่ถูก fixed ด้วย Organic groups ซึ่งมักใช้เป็น Aliphatic chain ขนาด C_8 หลักการคือ โดยปกติโปรตีนมักอยู่ในลักษณะที่มี Hydrophilic outer shell ล้อมรอบ Hydrophobic core แต่สามารถทำให้โปรตีนมี Hydrophobicity เป็นช่วงๆ ที่ Surface ได้ เนื่องจาก Amino acid บางตัวที่เป็น Non – polar ได้แก่ Alanine, Methionine, Tryptophane และ Phenylalanine ลักษณะนี้มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ เป็นวิธีรักษา Conformation ของตัวโปรตีนเอง อีกทั้งยังใช้ในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ เช่น Antigen – antibody หรือ Hormone – receptor ปริมาณ Hydrophobicity ของโปรตีนแต่ละ

ชนิดไม่เท่ากัน ทำให้สามารถใช้คุณสมบัตินี้แยกโปรตีนได้ สำหรับ Matrix ที่ใช้กันทั่วไป ส่วนใหญ่เป็น Agarose เช่น Octyl จะมี Hydrophobicity สูงกว่า Phenyl ดังนั้น หากโปรตีนมี Hydrophobicity สูงอยู่แล้ว ควรใช้ Phenyl type ซึ่งจะทำให้ Elute ได้ง่าย

นอกจากนี้ ยังมีวิธีอื่นๆ อีกหลายวิธี เช่น Affinity chromatography และ High performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่ง HPLC นี้มักใช้กับสารตัวอย่างปริมาณน้อยเพียง 1 – 10 mg จึงใช้เฉพาะในงานตรวจวิเคราะห์เท่านั้น และสามารถใช้แยกชนิดของสารอื่นๆ ได้ทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน เป็นต้น (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2545: 39 – 54)

ลัตถาพร ศรีมหาสงคราม (2525) ได้ทำการศึกษาเรื่องการผลิตเอนไซม์อมิเลสจากบักเตรีเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนนั้น ได้ทำการนำสารละลายที่มีเอนไซม์ที่ต้องการ จำนวน 1 ลิตร มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20 – 70 เปอร์เซ็นต์ ขณะตกตะกอน เอนไซม์แช่อยู่ในน้ำแข็ง ค่อยๆ เติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดแล้วลงไปทีละน้อย คนเบาๆ ตลอดเวลาจนกระทั่งความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20 เปอร์เซ็นต์ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง นำเข้าเครื่องเหวี่ยง 5,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แยกตะกอนไปละลายในบัฟเฟอร์ พีเอชเหมาะสม จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะ ส่วนน้ำใสนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจนความเข้มข้นอิ่มตัว 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเข้าเครื่องเหวี่ยง 5,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร พีเอชเหมาะสม ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยแป้งของเอนไซม์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสในขณะที่เป็น Crude enzyme และหลังจากที่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซ็นต์แล้วทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 6 – 9 เท่า

จิราพร นาวารักษ์ (2542) ได้ทำการศึกษาเรื่องการทำเอนไซม์อะมิเลสจากเมล็ดข้าวสาลีงอกให้บริสุทธิ์บางส่วนและการประยุกต์ใช้ผลิตสารจับกลิ่นหอม โดยทดลองสกัดเอนไซม์อะไมเลสจากต้นอ่อนข้าวสาลีอายุ 1 วัน โดยใช้สารละลาย 6 ชนิด ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ tris – HCl 0.05 M พีเอช 7.4 ที่มี 0.0005 M $CaCl_2$, สารละลายบัฟเฟอร์ tris – HCl 100 mM พีเอช 8.1, 40% เอธานอล ในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM Sodium acetate พีเอช 5.4, 0.1 M NaCl, 2% Na_2CO_3 และน้ำ โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรของสารละลายในการสกัด 100 มิลลิลิตร ต่อปริมาณข้าวสาลี 20 กรัม ใช้ระยะเวลาในการสกัด 30 นาที พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ tris – HCl 0.05 M พีเอช 7.4 ที่มี 0.0005 M $CaCl_2$ มีความเหมาะสมต่อการสกัดเอนไซม์อะไมเลสจากต้นอ่อนข้าวสาลีมากกว่าสารละลายชนิดอื่นที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากสกัดได้ปริมาณเอนไซม์มากกว่าและมีค่าแอคติวิตี

จำเพาะสูงกว่าสารละลายชนิดอื่น และเมื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ พบว่าการสกัดเอนไซม์โดยใช้ระยะเวลา 40 นาทีจะให้ปริมาณเอนไซม์และแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดสูงสุด และอัตราส่วนปริมาณต้นอ่อนข้าวสาลีงอกต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการสกัดเอนไซม์อะไมเลสคือ 1:5 – 1:6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

มีการศึกษาผลการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยทำการตกตะกอนเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในสารสกัดเอนไซม์ 100 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวเพิ่มขึ้น 0 – 90 เปอร์เซ็นต์ และแยกตะกอนโปรตีนออกที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยการเหวี่ยง พบว่าที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 50 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเอนไซม์อะไมเลสตกตะกอนมากที่สุดและได้ตะกอนเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มากกว่าความเข้มข้นอิ่มตัวค่าอื่น เพราะได้ตะกอนที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูง

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลการตกตะกอนเอนไซม์จากสารสกัดจากข้าวสาลีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายที่ใช้ในการตกตะกอนคือ อะซิโตน เมธานอลและเอธานอล โดยใช้ปริมาตรของสารสกัดเอนไซม์ 100 มิลลิลิตร และใช้ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ 200 มิลลิลิตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เอธานอลสามารถตกตะกอนเอนไซม์อะไมเลสได้มากกว่าอะซิโตน และเมธานอล และให้แอคติวิตีสูงกว่า และเมื่อตกตะกอนโดยใช้ปริมาตรเอธานอลเพิ่มขึ้นเป็น 300 มิลลิลิตร ทำให้ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสตกตะกอนมากขึ้น แต่แอคติวิตีจำเพาะมีค่าสูงขึ้นเพียงแค่เล็กน้อย

จากการศึกษาเรื่องการสกัดเอนไซม์จากจุลินทรีย์ สามารถสรุปได้ว่าวิธีการสกัดเอนไซม์จากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่จะทำการสกัด โดยเอนไซม์อะไมเลสที่นำมาใช้ในการทดลองนั้น เป็น Extracellular enzyme สามารถย่อยแป้งได้ การผลิตเอนไซม์ในห้องปฏิบัติการนั้นทำได้โดยการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงนำไปปั่นแยกเซลล์ เพื่อให้ได้ Crude enzyme จากนั้นจึงนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น และนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ก่อนที่จะเก็บรักษาเพื่อใช้งานต่อไป

5. มอลโทเดกซ์ทริน

มอลโทเดกซ์ทรินเป็นผลผลิตจากการย่อยแป้งด้วยกรดหรือเอนไซม์ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นตัวกลางพากลิ่นรส (Flavor carrier) หรือเป็น Bulking agent ในผลิตภัณฑ์ประเภทซุปหรือซอสผง เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม คือ ละลายน้ำได้ดี มีความหนืดต่ำ และไม่มีกลิ่นรส ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ทำให้สามารถนำมอลโทเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นได้อย่างกว้างขวางอีกด้วย

5.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ได้ให้ความหมายของเดกซ์ทรินสำหรับอุตสาหกรรมอาหารและสมมูลเดกซโทรส ไว้ดังนี้

เดกซ์ทรินสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (เดกซ์ทริน) หมายถึง แป้ง เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งสาลี ผ่านการย่อยโมเลกุลบางส่วนโดยกระบวนการใช้ความร้อน หรือใช้กรดหรือด่างหรือบัฟเฟอร์หรือเอนไซม์และความร้อน เพื่อให้มีสมบัติละลายน้ำและเหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

เดกซ์ทรินแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

1. เดกซ์ทรินขาว (White dextrin)
2. เดกซ์ทรินเหลือง (Yellow dextrin)
3. มอลโทเดกซ์ทริน (Maltodextrin)

สมมูลเดกซโทรส (Dextrose equivalent) หมายถึง ปริมาณร้อยละของน้ำหนักของน้ำตาลรีดิวซิงคิดเป็นเดกซโทรสที่มีอยู่ในกลูโคสไซรัปที่แห้ง

คุณลักษณะของมอลโทเดกซ์ทริน มีรายละเอียดดังนี้

1. คุณลักษณะทั่วไป

มีลักษณะเป็นของเหลว ข้น สีเหลืองอ่อน

2. คุณลักษณะทางฟิสิกส์และเคมี

2.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid content) ร้อยละ ไม่น้อยกว่า 60

2.2 เถ้าซัลเฟต (Sulphated ash) ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

2.3 น้ำตาลรีดิวซิง (คิดเป็นน้ำตาลเดกซ์โทรส) ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น อยู่ระหว่าง 5.0 ถึงน้อยกว่า 20.0

2.4 โปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

3. สารปนเปื้อนที่อนุญาตให้มีได้ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 ซัลเฟต ไม่เกินร้อยละ 0.02

3.2 คลอไรด์ ไม่เกินร้อยละ 0.2

3.3 โลหะหนัก (คิดเป็นตะกั่ว) ไม่เกิน 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.4 ตะกั่ว ไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.5 สารหนู ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4. สุขลักษณะ

จุลินทรีย์ที่อาจมีในมอลโทเดกซ์ทริน ต้องเป็นไปตามที่กำหนด ดังนี้

4.1 จุลินทรีย์ทั้งหมด ไม่เกิน 5,000 โคโลนีในตัวอย่าง 1 กรัม

4.2 ยีสต์และรา ไม่เกิน 100 โคโลนีในตัวอย่าง 1 กรัม

4.3 เอสเชอริเชีย โคไล (Escherichia coli) โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (MPN) น้อยกว่า 3 ในตัวอย่าง 1 กรัม

คุณสมบัติบางประการของมอลโทเดกซ์ทริน (รุ่งนภา ประดิษฐพงษ์. 2539: 18 - 22)

1. การดูดความชื้น มอลโทเดกซ์ทรินมีความสามารถในการดูดความชื้นจากอากาศได้ต่ำ เนื่องจากมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่น้อย เหมาะสำหรับนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ที่แห้ง ความสามารถในการดูดความชื้นจะเพิ่มตามค่า DE ที่สูงขึ้น

2. ความสามารถในการละลาย มอลโทเดกซ์ทรินชนิดที่มีค่า DE สูงจะละลายน้ำได้ดีกว่าชนิดที่มีค่า DE ต่ำ เนื่องมาจากมอลโทเดกซ์ทรินที่มีค่า DE ต่ำกว่าจะมีปริมาณแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำอยู่จำนวนมากกว่า

3. การเกิดความขุ่น (Haze) เมื่อเก็บสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินไว้ระยะเวลาหนึ่ง อาจเกิดความขุ่นขึ้น เนื่องจากแซ็กคาไรด์ขนาดใหญ่เกิดการรวมตัวกัน อาจเกิดเป็นตะกอนขนาดใหญ่ตกแยกออกจากสารละลายหรือเป็นตะกอนขนาดเล็กแขวนลอยอยู่ในสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินมีผลต่อการเกิดความขุ่น โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดความขุ่นขึ้นในสารละลายจะมีค่าต่ำลงตามค่า DE โดยทั่วไปสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินที่มีค่า DE ต่ำกว่า 15 มีแนวโน้มจะเกิดความขุ่นได้ง่าย

4. ความหนืด สารละลายมอลโทเดกซ์ทรินจะแสดงลักษณะความหนืดเป็นแบบ Newtonian คือ เมื่อสารละลายได้รับความร้อนเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ความหนืดมีค่าลดลง

5. การควบคุมการเกิดผลึก มอลโทเดกซ์ทรินมีสมบัติช่วยควบคุมการเกิดผลึกของน้ำตาลในอาหารได้ โดยขัดขวางไม่ให้น้ำตาลที่มีปริมาณมากเกินจุดอิ่มตัวเกิดการรวมตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างผลึกที่แข็งแรง

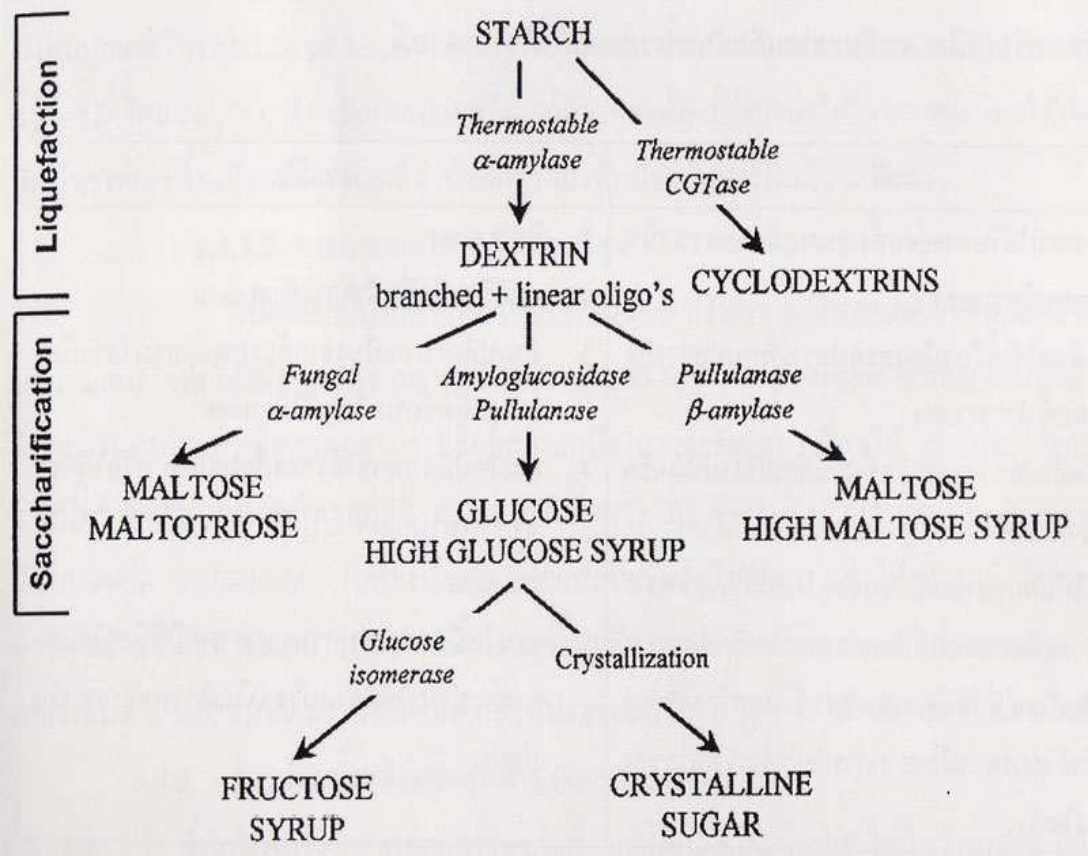
6 การเกิดแผ่นฟิล์ม สารละลายมอลโทเดกซ์ทรินสามารถเกิดเป็นแผ่นฟิล์มที่มีลักษณะมันวาว และมีสมบัติสามารถป้องกันการผ่านเข้าออกของออกซิเจนได้ พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินชนิดที่มีค่า DE สูงจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มได้ดีกว่าชนิดที่มีค่า DE ต่ำ

7. การทำให้อิมัลชันคงตัว มอลโทเดกซ์ทรินไม่มีคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ แต่สามารถทำให้อิมัลชันคงตัวอยู่ได้เนื่องจากส่วนที่เป็นโมเลกุลแซ็กคาไรด์สายยาว ทำให้เกิดความหนืดขึ้น ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพอิมัลชันไว้ได้

5.2 กระบวนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

มอลโทเดกซ์ทริน $(C_6H_{12}O_5)_nH_2O$ จัดอยู่ในประเภทเดียวกับกลูโคสไซรัป แต่มีค่า DE อยู่ในระดับต่ำ คือ DE ไม่เกิน 20 ได้จากการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งด้วยกรดหรือเอนไซม์ มอลโทเดกซ์ทรินอาจอยู่ในรูปของสารละลายเข้มข้นหรือผงสีขาว ไม่มีกลิ่นรส หรือหวานเล็กน้อย

นอกจากมอลโทเดกซ์ทรินแล้ว การย่อยสลายโมเลกุลของแป้งยังสามารถทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ได้อีก ดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 อุตสาหกรรมการย่อยแป้งเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ

ที่มา: พักตร์ประไพ ประจำเมือง (2546). *การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ*. หน้า 15; อ้างอิงจาก Van der maarel MJEC; et al. (2002; 94). *Properties and applications of starch-converting enzymes of the* α *–amylase family. Journal of Biotechnology*. p. 137-155.

กระบวนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ประกอบด้วย

5.2.1 การย่อยแป้ง แบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ

1. การย่อยแป้งด้วยกรด กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 – 180 องศาเซลเซียส โดยกรดจะทำการย่อยสลายพันธะระหว่างกลูโคสแบบสุ่ม ทำให้ได้สารที่มีโมเลกุลกลูโคสตั้งแต่ 1 – 4 โมเลกุลหรือมากกว่านั้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการได้ ปริมาณของกรดที่ใช้ต้องมีความเหมาะสม ถ้าใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีคล้ำ เกิดเกลือและผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เช่น เกิดสารเฟอร์ฟูรอล หรือหากใช้ความ

เข้มข้นของกรดน้อยเกินไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้าและเกิดการย่อยที่ไม่สมบูรณ์ (พักตร์ประไพ ประจำเมือง. 2546: 12)

2. การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

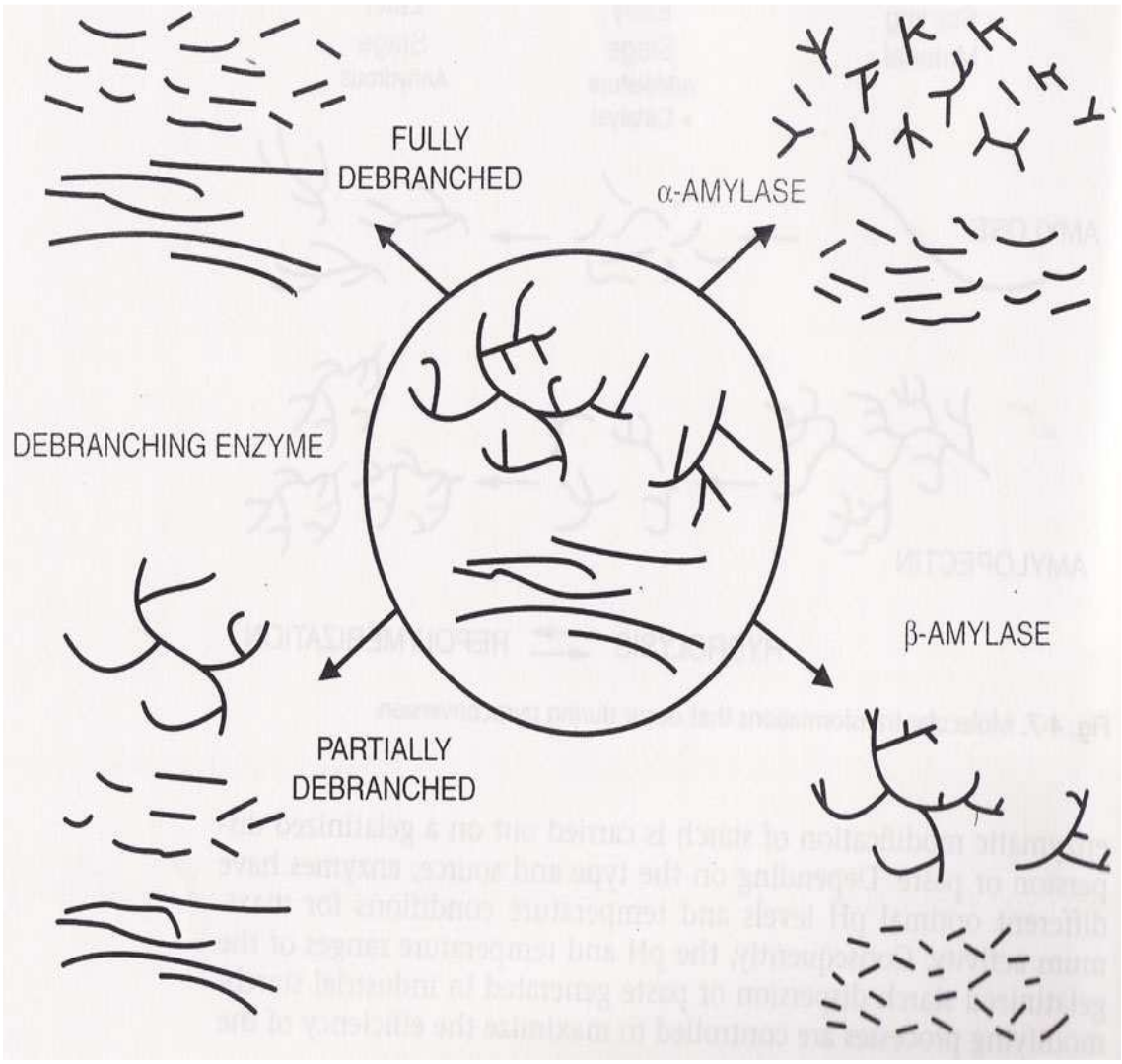
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง แบ่งตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์ ได้ 3 กลุ่ม คือ

2.1) Exo - enzyme เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก การทำงานจะตัดจากนอกเข้ามาใน โดยเริ่มจากปลายของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคติน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสหรือมอลโตส เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ กลูโคอะไมเลส เบต้าอะไมเลส และฟอสโฟรีเลส

2.2) Endo – enzyme เป็นเอนไซม์ที่ทำงานในโมเลกุลแป้ง โดยจะตัดพันธะ α-1,4 ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถตัดพันธะ α-1,6 ได้ ลักษณะการทำงานเป็นแบบสุ่มตัดภายใน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส

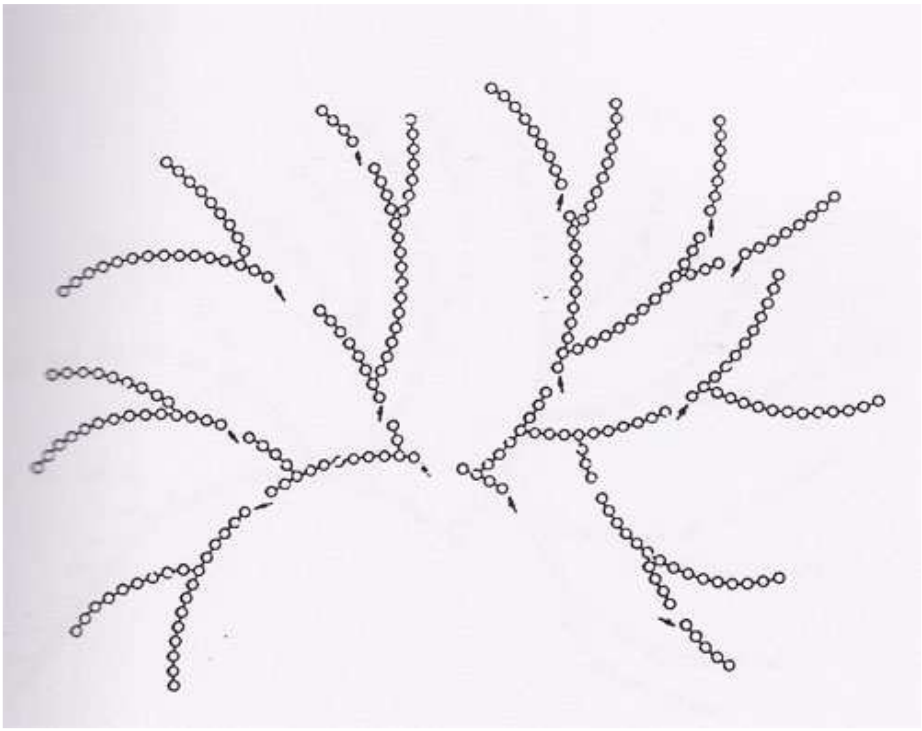
2.3) Debranching enzyme เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยจุดที่เป็นกิ่งก้านของไกลโคเจนและอะไมโลเพคตินได้ดี เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซอะไมเลส และพูลูลาเนส (กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543: 152 - 153)

การย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกัน จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพประกอบ 7, 8 และ 9



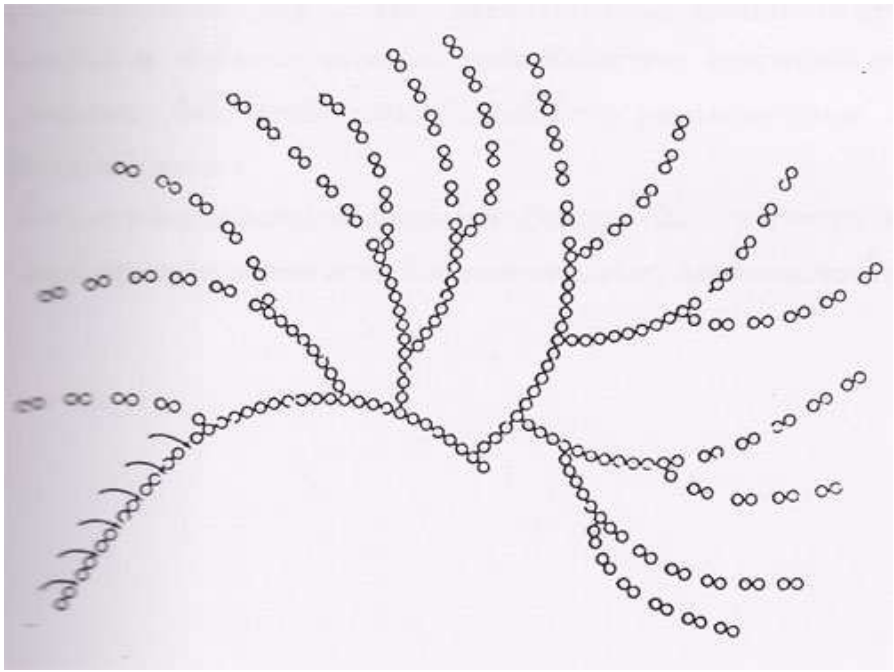
ภาพประกอบ 7 การย่อยอะไมโลสและอะไมโลเพคตินด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ที่มา: Thomas and Atwell. (1999). *Starches*. p. 42.



ภาพประกอบ 8 การย่อยอะไมโลเพคตินด้วยแอลฟาอะไมเลสทำให้เกิดเดกซ์ทริน

ที่มา: พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. (2546). *ศึกษาการลอกแป้งบนผืนผ้าด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสากหรรมแป้งมันสำปะหลัง*. หน้า 16; อ้างอิงจาก Lillian Hoagland Meyer. (1970). *Food Chemistry*. p 78.



ภาพประกอบ 9 การย่อยอะไมโลเพคตินด้วยเบตาอะไมเลสทำให้เกิดมอลโตสและเดกซ์ทริน

ที่มา: พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. (2546). *ศึกษาการลอกแป้งบนผืนผ้าด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง*. หน้า 17; อ้างอิงจาก Lillian Hoagland Meyer. (1970). *Food Chemistry*. p 79.

3. การย่อยแป้งด้วยกรดร่วมกับเอนไซม์ เป็นวิธีที่ปรับปรุงขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย นิยมใช้กับการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินที่มี DE สูง (DE 15 – 20) โดยขั้นแรกจะใช้กรดย่อยแป้งก่อนให้มีค่า DE อยู่ในช่วง 5 – 15 เพื่อลดความหนืดของแป้งก่อนที่จะใช้เอนไซม์ย่อยในขั้นต่อไปจนได้ DE ตามต้องการ (รุ่งนภา ประดิษฐพงษ์. 2539: 11)

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการย่อยแป้งด้วยกรดและเอนไซม์ พบว่าทั้งสองวิธีมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ดังแสดงในตาราง 11 ซึ่งในปัจจุบันนิยมผลิตมอลโทเดกซ์ทรินโดยใช้เอนไซม์หรือใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้กรดเพียงอย่างเดียว

ตาราง 11 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียของการย่อยแป้งด้วยกรดและเอนไซม์

	การย่อยแป้งด้วยกรด	การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์
ผลดี	1. คะตะลิสต์ที่ใช้ในปฏิกิริยามีราคาถูกและหาได้ง่าย	1. สภาวะที่ใช้ในการย่อยทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างไม่รุนแรง
	2. ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เร็ว	2. ไม่ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อนซึ่งมีราคาแพง
	3. วัตถุดิบไม่ต้องผ่านการปรับสภาพให้ง่ายต่อการย่อย	3. ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นไม่ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เฟอร์ฟูรอล และสารเคมีอื่นๆ
	4. คะตะลิสต์มีเสถียรภาพมากเก็บไว้ใช้ได้นาน โดยไม่เสื่อมเสีย	4. ทำให้เกิดการตกผลึกของกลูโคสได้ดีกว่าเพราะมีสารแปลกปลอมที่มีผลต่อการตกผลึกน้อย
		5. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าการย่อยแป้งด้วยกรด เนื่องจากการย่อยอย่างจำเพาะของเอนไซม์
ผลเสีย	1. ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อนซึ่งมีราคาแพง	1. มีราคาแพง
	2. ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบสุ่มทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการรวมอยู่ด้วย	2. ปฏิกิริยาเกิดขึ้นช้าต้องใช้เวลานาน
	3. น้ำตาลที่ได้ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เฟอร์ฟูรอล และสารเคมีอื่น เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี	3. สิ้นเปลืองมากเนื่องจากต้องสูญเสียเอนไซม์เนื่องจากถูกดูดซับบนวัสดุที่ไม่ถูกย่อย
	4. ปฏิกิริยาเกิดในสภาวะที่รุนแรงโดยต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง	4. เอนไซม์มีอายุการใช้งาน เสื่อมสภาพ หรือให้ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน
	5. ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาน้ำเชื่อมที่ได้ต้องนำมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางจึงทำให้มีเกลือเกิดขึ้นปะปนในน้ำเชื่อม	5. เอนไซม์อาจถูกรบกวนจากสารเคมีที่มีอยู่ได้และการจะนำมาใช้ต้องแน่ใจว่าไม่มีสารเคมีเหล่านั้นปะปน

ที่มา: พักตร์ประไพ ประจำเมือง. (2546). *การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ*. หน้า 15 - 16.

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนั้น เอนไซม์จะย่อยพันธะ α-1,4 แบบสุ่มภายในโมเลกุล ในช่วงแรกการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ต่อมาจะช้าลงและมีความเฉพาะเจาะจงต่อการย่อยมากขึ้น หรือมักจะย่อยพันธะ α-1,4 ที่อยู่บริเวณใกล้ปลายรีดิวซ์ของโอลิโกแซ็กคาไรด์ และไม่ย่อยมอลโทสหรือมอลโทไตรโอส หากยังคงปล่อยให้เอนไซม์ย่อยต่อไปจะเกิด Limited amylose ซึ่งทำให้อัตราการย่อยของแอลฟาอะไมเลสช้าลงมาก

การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ จะใช้ปริมาณเอนไซม์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.01 – 1.0 ของน้ำหนักแป้งแห้ง โดยอาจเติมเอนไซม์ในระหว่างการย่อย 2 – 3 ครั้ง นิยมใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ชนิดที่ทนความร้อนสูง ซึ่งมาจากแบคทีเรีย เช่น แอลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus subtilis* , *B.amyloliquefaciens* และ *B.licheniformis* เป็นต้น เอนไซม์ชนิดที่นิยมใช้มากที่สุด มีชื่อทางการค้าว่า “เทอร์มามิล” (Termamyl) เป็นแอลฟาอะไมเลสจาก *B.licheniformis* เนื่องจากทนความร้อนได้สูงที่สุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งส่วนใหญ่ คือ มอลโทเพนทาโอส (G5) และมอลโทเฮกซาโอส (G6) เทอร์มามิลมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50,000 – 60,000 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเทอร์มามิลต้องมีแคลเซียมไอออน ความเข้มข้น 100 – 200 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ค่าความเป็นกรด - ด่าง ควรอยู่ในช่วง 5.5 – 6.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 90 – 95 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการย่อยแป้งจนมีระดับ DE ตามต้องการแล้วจะหยุดปฏิกิริยาการย่อยทันที ถ้าใช้กรดย่อยจะปรับความเป็นกรด – ด่าง ให้มีค่าเป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโซเดียมไบคาร์บอเนตพร้อมลดอุณหภูมิให้เย็นลง ถ้าย่อยด้วยเอนไซม์ต้องปรับความเป็นกรด – ด่างให้ลดลงอยู่ในช่วง 3.7 – 3.9 พร้อมกับให้ความร้อนสูงเพื่อทำลายกิจกรรมของเอนไซม์

5.2.2 การทำให้บริสุทธิ์ (Refining) หลังจากย่อยแป้งและปรับค่าความเป็นกรด – ด่างแล้ว นำไปผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกไป จากนั้นนำสารละลายที่ได้กรองผ่านแผ่นกรองภายใต้สุญญากาศเพื่อแยกส่วนไม่ละลายที่ยังเหลืออยู่ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการกำจัดสีและกลิ่นออกโดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) สารละลายมอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จะมีลักษณะใส หากต้องการความบริสุทธิ์มาก ต้องนำมาผ่านเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุ (Ion - exchange resin) เพื่อกำจัดสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ โลหะหนัก เกลือ และสารอินทรีย์ที่เป็นกรดอ่อน

5.2.3 การทำให้เข้มข้น เป็นการนำสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินมาระเหยน้ำออกภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายมอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้น มีปริมาณของแข็งอยู่ร้อยละ 75 หรือนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) จะได้มอลโทเดกซ์ทรินผงละเอียดสีขาว มีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 3 – 5 (รุ่งนภา ประดิษฐพงษ์. 2539: 12 - 14)

5.3 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ยึดตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 เดกซ์ทรินสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ดังนี้

5.3.1 ลักษณะชี้บ่ง

เมื่อทดสอบตาม มอก. 1171 – 2536 แล้ว ต้องเป็นสีใดสีหนึ่งตั้งแต่สีน้ำเงินปนแดงเล็กน้อย สีม่วง สีม่วงแดง จนถึงสีน้ำตาลแดง

5.3.2 การละลาย

เมื่อทดสอบตาม มอก. 1171 – 2536 แล้ว ละลายน้ำได้บางส่วนหรือทั้งหมด

5.3.3 ความชื้น

เมื่อทดสอบตาม AOAC (1990) ข้อ 925.45 B แล้ว เดกซ์ทรินขาว ความชื้น ร้อยละไม่เกิน 12 และเดกซ์ทรินเหลือง ความชื้น ร้อยละไม่เกิน 6

5.3.4 ของแข็งทั้งหมด

เมื่อทดสอบตาม มอก. 268 – 2521 กลูโคสซีรัป แล้ว ของแข็งทั้งหมด (เฉพาะมอลโทเดกซ์ทริน) ร้อยละไม่น้อยกว่า 60

5.3.5 เถ้าซัลเฟต

เมื่อทดสอบตาม AOAC (1990) ข้อ 900.02 C แล้ว เถ้าซัลเฟต ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

5.3.6 น้ำตาลรีดิวซิง

เมื่อทดสอบตาม มอก. 268 – 2521 กลูโคสซีรัป แล้ว น้ำตาลรีดิวซิง (คิดเป็นน้ำตาลเดกซ์โทรส) ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 5.0 ถึงน้อยกว่า 20.0

5.3.7 โปรตีน

เมื่อทดสอบตาม AOAC (1990) ข้อ 920.87 แล้ว โปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

รายละเอียดวิธีการทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน อยู่ในบทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย ตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

จากการศึกษาเรื่องมอลโทเดกซ์ทรินและการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินสามารถสรุปได้ว่า มอลโทเดกซ์ทริน คือแป้งที่ผ่านการย่อยบางส่วนโดยกระบวนการใช้กรดหรือเอนไซม์ และความร้อน มีค่า DE อยู่ระหว่าง 5 – 20 ในกระบวนการผลิตนิยมใช้เอนไซม์ย่อยแป้งมากกว่าการใช้กรด เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะ ควบคุมได้ง่าย ใช้สภาวะไม่รุนแรง และไม่เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์ที่มีค่า DE ตามที่ต้องการแล้ว จะทำการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ความร้อนสูง จากนั้นจึงทำให้บริสุทธิ์ หากต้องการมอลโทเดกซ์ทรินผง ต้องนำไปทำให้เข้มข้นก่อนนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานการวิจัยเรื่องการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าและศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้งานต่างๆ กัน เพื่อนำมาใช้ในการพิจารณาประกอบการคัดเลือกตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา ดังนี้

งานวิจัยภายในประเทศ

ลัดถาพร ศรีมหาสงคราม (2525: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากบักเตรีเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง ได้ทำการคัดเลือกเชื้อบักเตรีที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้จำนวน 332 สายพันธุ์จากตัวอย่างทั้งหมด 296 เชื้อ เชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดคือ *Bacillus subtilis* PR_1 ซึ่งแยกจากแป้งหมักทำขนมจีนจากจังหวัดนครราชสีมา และได้นำเชื้อสายพันธุ์นี้มาศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} ผลการศึกษาหาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ได้ว่า ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีคือ เปปโตนเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน แป้งมันสำปะหลัง 7 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน มี pH 7.0 อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *B. subtilis* PR_1 และ *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที พบว่าการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และสูงสุดในช่วง stationary phase คือ 60 ชั่วโมง activity สูงสุด 100 unit/ml สำหรับเชื้อ *B. subtilis* PR_1 และ 81 unit/ml สำหรับเชื้อ *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้มีความเหมาะสมในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 50 – 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวของเอนไซม์ที่ pH 6.0 – 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 20 นาที ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะลดลง

การศึกษาการเจริญของเชื้อ *Bacillus* ในถังหมัก โดยใส่กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ อาหารเลี้ยงเชื้อ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *B. subtilis* PR_1 และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} ให้ความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ผลปรากฏว่าเชื้อ *B. subtilis* PR_1 จะให้เอนไซม์อะไมเลส

activity สูงสุด 397 unit/ml ภายในเวลา 64 ชั่วโมง และ *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} ให้เอนไซม์มี activity สูงสุด 270 unit/ml ภายใน 60 ชั่วโมง

การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว (saturation) 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* PR_1 และ *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} มีความบริสุทธิ์ขึ้น 9 และ 6 เท่าตามลำดับ เมื่อนำเอนไซม์เหล่านี้มาทำให้แข็งแห้ง (lyophilization) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงจากเริ่มแรก 26 เปอร์เซ็นต์สำหรับเอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* PR_1 และ 24 เปอร์เซ็นต์สำหรับเอนไซม์ที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512}

การนำเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้มาย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 1 ลิตร ทั้งที่อยู่ในสภาพแป้งดิบและแป้งที่ต้มจนเดือด เอนไซม์ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* PR_1 ย่อยสลายแป้งที่ต้มแล้วได้ 334 unit/ml และแป้งดิบ 43 unit/ml ส่วนเอนไซม์จากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} ย่อยสลายแป้งต้มแล้วได้ 336 unit/ml และแป้งดิบได้ 23 unit/ml แสดงว่าเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งที่ต้มแล้วได้ดีกว่าแป้งดิบ และเอนไซม์จาก *B. subtilis* PR_1 ย่อยสลายแป้งดิบได้ดีกว่า *B. amyloliquefaciens* IMB_{1512} ถึงสองเท่า

สมลักษณ์ เนาวรัตน์พนมมาศ (2538: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการผลิตและการใช้กลูโคสไซรัปจากสตาร์ชข้าวโพดในไอศกรีม โดยทำการย่อยสตาร์ชข้าวโพดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 - 0.04 นอร์มัล เป็นเวลา 15 - 45 นาที และเอนไซม์เทอร์มามิลชนิด 120 L ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.5 - 3 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักสตาร์ชแห้ง เป็นเวลา 40 - 120 นาที ได้ค่า DE เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของกรดหรือเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อย ค่า DE ที่ได้มีค่าตั้งแต่ 11 - 60 และ 23 - 40 ตามลำดับ การผลิตกลูโคสไซรัปให้ได้ระดับ DE เป็น 20, 30 และ 40 โดยวิธีการใช้กรด ใช้ความเข้มข้นกรด 0.02 นอร์มัล 25 นาที, 0.02 นอร์มัล 45 นาที และ 0.03 นอร์มัล 45 นาที ตามลำดับ และวิธีการใช้เอนไซม์ ใช้เอนไซม์ร้อยละ 0.5, 40 นาที, ร้อยละ 0.5, 120 นาที และร้อยละ 3, 60 นาทีตามลำดับ กลูโคสไซรัป ที่ผลิตได้มีค่าสีเพิ่มขึ้นตามระดับ DE ที่เพิ่มขึ้นและไซรัป DE 20 มีความหวานน้อยที่สุด DE 30 และ 40 จากวิธีการย่อยทั้ง 2 วิธี มีความหวานไม่แตกต่างกัน เมื่อนำกลูโคสไซรัปมาใช้ในไอศกรีมกลิ่นรสวานิลา โดยแทนที่ซูโครสร้อยละ 30 พบว่า ไอศกรีมที่ใช้กลูโคสไซรัป มีความหนืดและความแน่นแข็งมากกว่า แต่มีระยะเวลาในการแช่แข็ง อัตราการหลอมละลายต่ำกว่า และการหลอมละลายช้ากว่าไอศกรีมควบคุม แต่กลูโคสไซรัปไม่มีผลต่ออัตราการฟูตัวของไอศกรีม ไอศกรีมควบคุมมีค่าความหนืด ความแน่นแข็ง และเวลาในการแช่แข็ง เป็น 800 cP, 71.42 มม. และ 27 นาที ตามลำดับ ไอศกรีมที่ใช้กลูโคสไซรัปมีค่าดังกล่าว อยู่ในช่วง 815 - 880 cP, 52.50 -65.10 มม. และ 21 - 25 นาที ตามลำดับ เมื่อใช้ไซรัปที่มี DE สูงขึ้น ไอศกรีมมีความหนืดและ

ความแน่นแข็งลดลงแต่มีระยะเวลาในการแช่แข็งมากขึ้น วิธีการย่อยของไซรัปไม่มีผลต่อความหนืด เวลาในการ แช่แข็ง ความแน่นแข็ง อัตราการหลอมละลาย และลักษณะการหลอมละลายของไอศกรีม การประเมินผลทางประสาทสัมผัสของไอศกรีม พบว่าวิธีการย่อยและระดับ DE ไม่มีผลต่อความแน่นแข็ง ความเรียบเนียน ความหวาน สี กลิ่นรส และการยอมรับรวมอย่างมีนัยสำคัญ

รุ่งนภา ประดิษฐพงษ์ (2539: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวโดยเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลส เพื่อใช้รักษากลิ่นหอมของข้าวสาร โดยทำการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน DE (Dextrose Equivalent) 10, 15 และ 20 จากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลส (0.02% และ 0.05% ของน้ำหนักแป้งแห้ง ตามลำดับ) ที่ 80^{0}ซ พบว่าการเตรียมน้ำแป้งข้าวเจ้าเข้มข้น 25% และน้ำแป้งข้าวเหนียวเข้มข้น 30% มีความเหมาะสมต่อการผลิตมากที่สุด เมื่อย่อยนานขึ้น (5 – 60 นาที) จะมีปริมาณสตาร์ชเหลว น้ำตาลรีดิวซ์และ DE เพิ่มขึ้น การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเหนียวได้ปริมาณมอลโทเดกซ์ทรินมากกว่าจากแป้งข้าวเจ้า 1.5 เท่า ในสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินมีแซ็กคาไรด์โมเลกุลเล็กที่พบมาก คือ DP3 (3.60 – 6.52%), DP5 (4.76 – 8.20%), DP6 (5.10 – 7.12%) และ DP7 (3.13 – 5.60%) ที่ความเข้มข้น 10% มอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวมีความหนืดไม่แตกต่างกัน (4.5 – 5.25 RVU) แต่ที่ความเข้มข้น 25% มอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเจ้ามีความหนืด (6.00 – 7.00 RVU) สูงกว่ามอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเหนียว (5.00 – 5.50 RVU) ที่ DE เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นำมอลโทเดกซ์ทรินทั้ง 6 ชนิดมาปรับปรุงความหอมของข้าวสารใน 2 ลักษณะคือ ใช้มอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้น 25% เคลือบลงบนเมล็ดข้าวหอม (80 กรัม/ข้าว 1 กก.) และผสมมอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้น 10% กับกลิ่นใบเตยสังเคราะห์เข้มข้น 25% ใช้เคลือบบนเมล็ดข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม (80 กรัม/ข้าว 1 กก.) หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30^{0}ซ) และ 45^{0}ซ ข้าวที่ผ่านการเคลือบทั้ง 2 ลักษณะมีความขาวน้อยกว่า เนื้อสัมผัสนุ่มกว่าและความหนืดสูงสุดรวมทั้งความหนืดลดลงจากเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (RVA) มีค่าต่ำกว่าข้าวธรรมดา และจากผลทางประสาทสัมผัสพบว่าข้าวหอมที่เคลือบมอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเหนียว DE 20 มีกลิ่นหอมมากที่สุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากข้าวหอมธรรมดา และข้าวหอมที่เคลือบมอลโทเดกซ์ทรินทุกชนิดนุ่มกว่าข้าวหอมธรรมดาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนข้าวที่ผ่านการเคลือบกลิ่นหอมมีกลิ่นหอมและกลิ่นรสมากกว่าข้าวธรรมดา เมื่อนำข้าวที่เคลือบกลิ่นหอมนี้ผสมกับข้าวธรรมดา (ไม่มีกลิ่นหอม) ในอัตราส่วน 1:3 ข้าวที่ได้มีกลิ่นหอมแรงเทียบเท่ากับข้าวหอมธรรมดา แต่ถ้าผสมในอัตราส่วน 1:1 ข้าวที่ได้มีกลิ่นหอมแรงในระดับที่ผู้บริโภคชอบมากที่สุด

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุลและสมใจ ศิริโภค (2540: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยการแยก

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างต่างๆ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 104 และ 34 ไอโซเลต แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 63 และ 47 ไอโซเลต ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส แยกได้จำนวน 82 และ 27 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาคัดเลือกซ้ำโดยนำเชื้อที่ให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป มาเลี้ยงในอาหารเหลว และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้สูง คือ A, JA8 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ TR และ BS สำหรับเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้สูง คือ CHB9, JB33 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ 1.4SA และ C2 ส่วนเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้สูง คือ AUA2 และ M18 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส คือ TR และ BS ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาศึกษารูปร่างและการติดสีย้อมแกรม ได้ผลทำให้จำแนกได้ว่าอยู่ในจีนัส *Bacillus* ทั้งหมด

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุลและสมใจ ศิริโภค (2541: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ของเชื้อที่คัดเลือกได้ พบว่า A และ Bs ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ประมาณ 98 และ 7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส และบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในอาหารที่มี soluble starch และ corn starch 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ casitone และ polypeptone ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทั้ง 2 ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแคลเซียมคลอไรด์ สำหรับ A ต้องการในปริมาณ 0.5, 3.0 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน Bs ต้องการแร่ธาตุดังกล่าวในปริมาณ 0.3, 5.0 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 8

CHB_9 และ 1.4SA ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ประมาณ 96 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส และบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในอาหารที่มีมอลโทส 10 และ 8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ tryptone และ casitone ปริมาณ 10 และ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทั้งสองได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต สังกะสีคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ในปริมาณ 0.25, 5.0, 0.3 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10

AUA_2 และ TR ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ประมาณ 3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในอาหารที่มี olive oil 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อทั้งสอง ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 13 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุที่เชื้อทั้งสองต้องการได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแคลเซียมคลอไรด์ ในปริมาณ 0.5, 1.0 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5

จิราพร นาวารักษ์ (2542: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการทำเอนไซม์อะไมเลสจากเมล็ดข้าวสาลีงอกให้บริสุทธิ์บางส่วนและการประยุกต์ใช้ผลิตสารจับกลิ่นหอม จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและทำเอนไซม์อะไมเลสจากข้าวสาลีงอกให้บริสุทธิ์พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์อะไมเลสจากข้าวสาลีงอกคือ ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris – HCl 0.05 M pH 7.4 ที่มี 0.0005 M $CaCl_2$ สกัดโดยใช้ระยะเวลา 40 นาที ใช้ปริมาณข้าวสาลีงอก 20 กรัมต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ 100 – 120 มล. เมื่อนำเอนไซม์อะไมเลสที่สกัดได้โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris – HCl 0.05 M pH 7.4 ที่มี 0.0005 M $CaCl_2$ มาตกตะกอนโดยใช้เกลือและตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตัวทำละลายอะซิโตน เมธานอลและเอธานอล พบว่าเอธานอลสามารถตกตะกอนเอนไซม์อะไมเลสได้ปริมาณมากที่สุดและมีแอคติวิตีดีที่สุด

จากการนำเอนไซม์อะไมเลสซึ่งสกัดด้วย Tris และตกตะกอนด้วยเอธานอลมาผลิตมอลโทเดกซ์ทรินโดยใช้กระบวนการผลิตแบบ 1 ขั้นตอนและ 2 ขั้นตอนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 20% (w/v) เอนไซม์ 25 หน่วยต่อกรัมแป้ง ทำปฏิกิริยาที่ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 85^0ซ นาน 30 นาทีในขั้นตอนที่ 1 และในขั้นตอนที่ 2 ใช้เอนไซม์ 5.0 หน่วยต่อกรัมแป้ง ทำปฏิกิริยาต่ออีก 10 นาที สามารถผลิตมอลโทเดกซ์ทรินที่มีคุณสมบัติทางกายภาพดีกว่ามอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตแบบ 1 ขั้นตอน

เมื่อนำมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตแบบ 1 และ 2 ขั้นตอนมาทดลองจับกลิ่นน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมพบว่า มอลโทเดกซ์ทรินผลิตแบบ 2 ขั้นตอนสามารถจับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมได้ดีกว่ามอลโทเดกซ์ทรินผลิตแบบ 1 ขั้นตอน เมื่อศึกษาองค์ประกอบของสารที่ถูกจับกลิ่นในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมโดยกระบวนการฟรีสดรายและเปรียบเทียบระหว่างมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตได้กับเดกซ์ทรินมาตรฐาน เบตาไซโคลเดกซ์ทริน เดกซ์ทริน 10 เดกซ์ทริน 15 และเดกซ์ทริน 20 พบว่าการจับกลิ่นโดยใช้อัตราส่วนปริมาณเดกซ์ทรินต่อน้ำ 1:1 สามารถรักษากลิ่นให้คงอยู่ได้ปริมาณสูงสุด และพบว่าปริมาณสารที่ถูกจับกลิ่นเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเดกซ์ทรินชนิดต่างๆ สำหรับระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษากลิ่นของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมโดยเดกซ์ทริน พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการสูญเสียของกลิ่นน้อยคือที่ 4^0ซ

พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง (2546: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการลอกแป้งบนผืนผ้าด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง โดยนำน้ำจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งปริมาณ 10 ลิตร มีแบคทีเรียเริ่มต้นในการทดลองที่ปริมาณความเข้มข้น 2,040 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในการทดลองนี้เป็นการหมักแบบไร้อากาศและเป็นการหมักแบบต่อเนื่องโดยมีการเติมสารอาหารให้กับแบคทีเรียด้วยน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ปริมาณ 1 ลิตรต่อวัน ที่มีค่าซีโอดี 28,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผู้วิจัยได้ทำการหมักน้ำทิ้งที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 7 และเติมสารอาหารให้กับแบคทีเรียด้วยน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ทุกวัน ผลปรากฏว่า น้ำทิ้งที่หมักครบ 7 วัน มีปริมาณแบคทีเรียจากการทดสอบด้วยเอมแอลวีเอสเอส 3,190 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหมักครบ 14 วัน มีปริมาณแบคทีเรียจากการทดสอบด้วยเอมแอลวีเอสเอส 4,480 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหมักครบ 21 วัน มีปริมาณแบคทีเรียจากการทดสอบด้วยเอมแอลวีเอสเอส 5,760 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลจากการหมักเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปรากฏว่ามีแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

เมื่อนำน้ำหมักที่ครบ 21 วัน มาทดสอบพบว่ามีค่าซีโอดี 26,991 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งทั้งหมด 18,089 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณเอมแอลเอสเอส 6,390 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณเอมแอลวีเอสเอส 5,760 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 7 มาลอกแป้งจากผืนผ้าฝ้ายชีตติงที่มีปริมาณสารลงแป้งร้อยละ 7.34 นำมาลอกแป้งที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีจุ่มอัดใช้เวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียจะย่อยสลายแป้งจนหมด

เมื่อนำน้ำหมักที่ครบ 21 วัน มาลอกแป้งจากผืนผ้าฝ้ายชีตติงที่มีปริมาณสารลงแป้งร้อยละ 7.34 นำมาลอกแป้งที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส แบบมีอัตราส่วนน้ำต่อวัสดุ 10 ต่อ 1 โดยวิธีแช่ใช้ระยะเวลา 20 ชั่วโมงแบคทีเรียจะย่อยสลายแป้งจนหมด เมื่อนำน้ำหมักที่ครบ 21 วัน มาลอกแป้งจากผืนผ้าฝ้ายชีตติงที่มีปริมาณสารลงแป้งร้อยละ 7.34 นำมาลอกแป้งที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส โดยวิธีจุ่มอัดใช้ระยะเวลา 20 ชั่วโมง แป้งจะย่อยสลายบางส่วน เมื่อนำน้ำหมักที่ครบ 21 วัน มาลอกแป้งจากผืนผ้าฝ้ายชีตติงที่มีปริมาณสารลงแป้งร้อยละ 7.34 นำมาลอกแป้งที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส แบบมีอัตราส่วนน้ำต่อวัสดุ 10 ต่อ 1 โดยวิธีแช่ใช้ระยะเวลา 20 ชั่วโมง แป้งจะย่อยสลายบางส่วน

การทดสอบความแข็งแรงคือการทดสอบแรงดึงขาดของผ้า โดยทดสอบผ้าก่อนการลอกแป้ง ผ้าฝ้ายชีตติงที่มีปริมาณสารลงแป้งร้อยละ 7.34 ซึ่งทอแบบลายขัด โดยมีจำนวนเส้นด้ายยืนต่อเส้นด้ายพุ่ง 1 ต่อ 1 ขนาดเส้นด้าย 32 เท็กซ์ มีจำนวนเส้นด้ายยืนและเส้นด้ายพุ่ง 42 เส้นต่อตารางเซ็นติเมตร ในการทดลองผู้วิจัยใช้ผ้าในการทดลองมีค่าแรงดึงขาดตามมาตรฐาน มอก. 65 – 2517 จากการทดสอบแรงดึงขาดของผ้าก่อนการลอกแป้ง พบว่าแรงดึงขาดเฉลี่ยที่ทำให้ผ้าด้านยืนขาดมี

ค่าแรงดึงขาดเฉลี่ย 230.39 นิวตัน และแรงดึงขาดเฉลี่ยที่ทำให้ผ้าด้านพุ่งขาดมีค่าแรงดึงขาดเฉลี่ย 228.27 นิวตัน

เมื่อนำน้ำหมักที่ครบ 21 วัน มาลอกแป้งจากผืนผ้าฝ้ายชีตติงที่มีปริมาณสารลงแป้งร้อยละ 7.34 ซึ่งทอแบบลายขัด โดยมีจำนวนเส้นด้ายยืนต่อเส้นด้ายพุ่ง 1 ต่อ 1 ขนาดเส้นด้าย 32 เท็กซ์ มีจำนวนเส้นด้ายยืนและเส้นด้ายพุ่ง 42 เส้นต่อตารางเซนติเมตร จากการทดลองลอกแป้งออกจากผืนผ้าที่ 30 – 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีจุ่มอัดใช้ระยะเวลา 24 ชั่วโมงแป้งหมด และนำผ้ามาทดสอบแรงดึงขาดพบว่าผ้าตามด้านยืนมีค่าแรงดึงขาดเฉลี่ย 212.59 นิวตัน ผ้าด้านพุ่งมีแรงดึงขาดเฉลี่ย 211.26 นิวตัน โดยวิธีแช่อัตราส่วนน้ำต่อวัสดุ 10 ต่อ 1 ใช้ระยะเวลาแช่ 20 ชั่วโมงแป้งหมด เมื่อนำผ้ามาทดสอบแรงดึงขาดพบว่าผ้าตามด้านยืนมีค่าแรงดึงขาดเฉลี่ย 210.84 นิวตัน ผ้าด้านพุ่งมีแรงดึงขาดเฉลี่ย 208.61 นิวตัน ผลจากการทดสอบแรงดึงขาดจากผ้าที่ผ่านการลอกแป้งด้วยน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มีค่าแรงดึงขาดตามมาตรฐาน มอก. 65 – 2517

เมื่อนำน้ำหมักที่ครบ 21 วัน มาลอกแป้งจากผืนผ้าฝ้ายชีตติงที่มีปริมาณสารลงแป้งร้อยละ 7.34 ซึ่งทอแบบลายขัด โดยมีจำนวนเส้นด้ายยืนต่อเส้นด้ายพุ่ง 1 ต่อ 1 ขนาดเส้นด้าย 32 เท็กซ์ มีจำนวนเส้นด้ายยืนและเส้นด้ายพุ่ง 42 เส้นต่อตารางเซนติเมตร จากการทดลองลอกแป้งออกจากผืนผ้าที่ 60 – 70 องศาเซลเซียส โดยวิธีจุ่มอัดใช้ระยะเวลา 20 ชั่วโมง และนำผ้ามาทดสอบแรงดึงขาดพบว่าผ้าตามด้านยืนมีค่าแรงดึงขาดเฉลี่ย 209.89 นิวตัน ผ้าด้านพุ่งมีแรงดึงขาดเฉลี่ย 198.45 นิวตัน โดยวิธีแช่อัตราส่วนน้ำต่อวัสดุ 10 ต่อ 1 ใช้ระยะเวลาแช่ 20 ชั่วโมง เมื่อนำผ้ามาทดสอบแรงดึงขาดพบว่าผ้าตามด้านยืนมีค่าแรงดึงขาดเฉลี่ย 208.52 นิวตัน ผ้าด้านพุ่งมีแรงดึงขาดเฉลี่ย 209.00 นิวตัน ผลจากการทดสอบแรงดึงขาดจากผ้าที่ผ่านการลอกแป้งด้วยน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เมื่อนำมาทดสอบความแข็งแรงของผ้ามีค่าแรงดึงขาดตามมาตรฐาน มอก. 65 – 2517

พักตร์ประไพ ประจำเมือง (2546: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ โดยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Thermamyl 120L) ในขั้นตอนการเกิดแซคคาริฟิเคชัน พบว่าในระดับห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้นกากมันสำปะหลัง 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1,000 หน่วย ความเป็นกรด – ด่าง 6.5 – 7.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Optimax^{TM}7525) 600 หน่วย ที่ความเป็นกรด – ด่าง 4.3 – 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ให้เกิดการเปลี่ยนกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคส 69.80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับประสิทธิภาพการย่อย 72.71 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นขยายการผลิตสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นกากมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตรการย่อย 35 ลิตร เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100 หน่วยต่อปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร นาน 40 นาที ความเป็นกรด – ด่าง 6.5 – 7.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 150 หน่วยต่อปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร ที่ความเป็นกรด – ด่าง 4.3 – 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงด้วยใบกวนชนิด helical ribbon 100 รอบต่อนาที ให้ประสิทธิภาพการย่อยสูงถึง 106.35 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกลูโคส โดยการเติมกากมันสำปะหลังเพิ่มในขั้นตอนลิเคอแฟคชัน พบว่าการเติมกากมันสำปะหลัง 50 เปอร์เซ็นต์ของกากมันสำปะหลังเริ่มต้น ให้ประสิทธิภาพการย่อย 89.90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำน้ำเชื่อมที่ได้ไปผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* เปรียบเทียบกับการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 6.05 และ 4.59 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำเชื่อมที่ย่อยได้ไปผลิตกลูโคสไซรัปสามารถผลิตกลูโคสไซรัปได้ค่าสมมูลเดกโทรส (DE) เป็น 82 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยต่างประเทศ

Jin, Fengxie. และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Thermostable α – amylase and α – galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp.JF strain. โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp.JF ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตเอนไซม์ ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตหรือแป้งจากธัญพืช 4 กรัม Tryptone 4 กรัม KH_2PO_4 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม $CaCl_2$ 0.2 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม และ $MnSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม พีเอช 7.2 – 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 55 – 68 องศาเซลเซียส และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมักปริมาตร 1 ลิตร ประกอบไปด้วย แป้งสาลี 6 กรัม แป้งถั่วเหลือง 6 กรัม Tryptone 2 กรัม จากการทดลองใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตและแป้งจากธัญพืชที่แตกต่างกัน พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ α – amylase สูงที่สุดเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี raffinose แป้งถั่วเหลือง แป้งสาลีหรือแป้งข้าวโพด และ Tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ α – amylase สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ Industrial medium ที่มีผลให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ α – amylase ได้สูงที่สุด ประกอบไปด้วยแป้งสาลี 0.6% แป้งถั่วเหลือง 0.6% และ Tryptone 0.2% บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีการผลิตเอนไซม์ α – amylase สูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 76 ชั่วโมง

Asgher, M. และคณะ (2006 : บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาเรื่อง A thermostable α – amylase from the moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* JS-2004 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันฝรั่งเป็น

ส่วนผสม ศึกษาการเติมแคลเซียม ยีสต์แอกเทรกท์และกลูโคส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าหลังจากเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เกิดการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 72 U/mL การเติมแคลเซียมและยีสต์แอกเทรกท์ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเพิ่มการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ในขณะที่การเติมกลูโคสที่ระดับ 1.0% จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะสามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงจากเดิม 12% และ 48% ตามลำดับ หากเก็บเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง 6% การเติม Ca^{2+} จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 117% แต่การเติม CO^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ และการเติม Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+} และ Mn^{2+} มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย นั่นคือ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* JS-2004 สามารถสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ทนความร้อนได้ในระดับสูง มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแป้งและอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ได้

Prakash, B. และคณะ (2009: บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali – stable α– amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. พบว่าแบคทีเรียทนเกลือ *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 สามารถผลิตเอนไซม์ α – amylase ที่มีคุณสมบัติเป็น Extracellular enzyme ทนเกลือ ทนด่างและทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลสให้ได้ปริมาณสูงสุดต้องคำนึงถึงปริมาณของ NaCl พีเอช อุณหภูมิ และสารอาหารต่างๆ ได้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย NaCl 20% หรือ KCl 15% แป้งข้าวเจ้า 0.5% และ Tryptone ที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเติม 50 mM $CaCl_2$ การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะเพิ่มขึ้นอีก 29% แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส 2 ชนิด คือ อะไมเลส I (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 72 kDa) และอะไมเลส II (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 62 kDa) มีค่าสูงสุดที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีปริมาณ NaCl 0 – 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่เอนไซม์อะไมเลส I จะทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์อะไมเลส II ในสภาวะที่มี NaCl น้อย เอนไซม์อะไมเลสทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Maltotetraose, Maltotriose, Maltose และ Glucose

จากรายงานการวิจัยต่างๆ สามารถสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยการนำน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังมาเป็นแหล่งคาร์บอนมีความเป็นไปได้ และยังเป็นการนำน้ำทิ้งกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีกด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการหมักแบบไร้อากาศ เช่น ปริมาณของซีโอดีในน้ำทิ้ง อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ซึ่งเมื่อนำมาหมักเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์แล้ว สามารถสกัดเอนไซม์เพื่อนำไปผลิตมอลโทเดกซ์ทรินได้ โดยนำน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน ผสมกับตะกอนแบคทีเรียที่เก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งจากบริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด มาหมักเพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้ผลิตเอนไซม์ โดยน้ำทิ้งแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลอง มี 2 สภาวะ คือ น้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี และน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีให้ได้ประมาณ 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส หมักแบบต่อเนื่อง โดยช่วงแรกให้แบคทีเรียปรับสภาพนาน 1 สัปดาห์ ทำการควบคุมระยะเวลาเก็บกัก โดยเริ่มเก็บน้ำตัวอย่างมาวิเคราะห์พีเอช ปริมาณซีโอดี ปริมาณสารทั้งหมด ปริมาณสารแขวนลอยและปริมาณสารแขวนลอยระเหย ทุก 7 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดเอนไซม์ ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ในการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง และทำการทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน ในโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังมาทำการตรวจสอบคุณภาพ แล้วทำการหมัก นำจุลินทรีย์ที่ได้จากการหมักมาทำการคัดแยกเอาเฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ทำการสกัดเอนไซม์ ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาผลิตเป็นมอลโทเดกซ์ทรินและทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน รายละเอียดของวิธีดำเนินการวิจัย ประกอบด้วย

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง
2. วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทดลอง
3. สถานที่และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง
4. วิธีดำเนินการทดลอง
5. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ น้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนของบริษัท สยามมอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้จากการสุ่มเก็บน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน โดยทำการสุ่มเก็บ 3 ครั้ง ครั้งแรกทำการสุ่มเก็บน้ำทิ้งในวันที่ 13 สิงหาคม พ.ศ. 2552 สุ่มเก็บน้ำทิ้งครั้งที่สองในวันที่ 14 สิงหาคม พ.ศ. 2552 สุ่มเก็บน้ำทิ้งครั้งที่สามวันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2552

2. วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการทำการหมักน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง การผลิตมอลโทเดกซ์ทริน การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ดังนี้คือ

2.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 วัตถุดิบ ได้แก่แป้งมันสำปะหลังที่ได้คุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 274 – 2521, α - Amylase from *Bacillus subtilis*

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้ง น้ำจากระบบบำบัด และน้ำหมัก ได้แก่ Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), Sulfuric Acid (H_2SO_4), Ammonium iron (II) sulphate, Silver

sulfate (Ag_2SO_4), Mercury (II) sulphate ($HgSO_4$), สารละลายเฟอโรอิน อินดิเคเตอร์, Sodium hydroxide (NaOH)

2.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์แบคทีเรีย สกัดเอนไซม์อะไมเลส และหาแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ Beef extract, Soluble starch, Agar, Nutrient agar, Yeast extract powder, Peptone, Dextrose ($C_6H_{12}O_6$), Sodium chloride, Casein hydrolysate, Potassium sodium (+) – tartrate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$), Paraffin, Corn starch, Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$), Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), 3,5 – Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$), Ethanol

2.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ได้แก่ Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$), Sodium hydroxide (NaOH), Hydrochloric acid (HCl), Potassium sorbate ($K_6H_7KO_2$), Dextrose ($C_6H_{12}O_6$), Potassium sodium (+) – tartrate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$), Copper (II) sulphate ($CuSO_4.5H_2O$), Methylene blue indicator, A diatomite product

2.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพมอลโทเดกซ์ทริน ได้แก่ สารละลายไอโอดีน Sulfuric Acid (H_2SO_4), Dextrose ($C_6H_{12}O_6$), Potassium sodium (+) – tartrate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$), Copper (II) sulphate ($CuSO_4.5H_2O$), Sodium hydroxide (NaOH), Methylene blue indicator, Boric acid (H_3BO_3), Potassium sulphate (K_2SO_4), Mixed indicator

2.2 **เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง** ได้แก่ พีเอชมิเตอร์, Reflux apparatus, เทอร์โมมิเตอร์, เครื่องชั่งละเอียด, เตาเผา, เครื่องอังไอน้ำ, เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ, เครื่องบ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำ, เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ, UV/VIS Spectrophotometer, Refractometer, เครื่องกลั่นโปรตีน, เครื่องย่อยโปรตีน, เครื่องติเตรตอัตโนมัติ, เครื่องดูดอากาศ

2.3 **อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง** ได้แก่ เตาแผ่นร้อน, บิวเรตต์, ปิเปต, จานระเหย, ตู้อบลมร้อน, เดสิกเกเตอร์, กระดาษกรองใยแก้ว, กรวยกรองบุคเนอร์, กระบอกตวง, เครื่องแก้ว, จานเพาะเชื้อ, ตู้เย็น, ตู้กรองอากาศให้ปลอดเชื้อ, อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิสำหรับการบ่มเชื้อจุลินทรีย์, เครื่องกวนสารเคมี, เครื่องผสมสาร, ปั๊มสุญญากาศ, นาฬิกาจับเวลา และอุปกรณ์อื่นทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

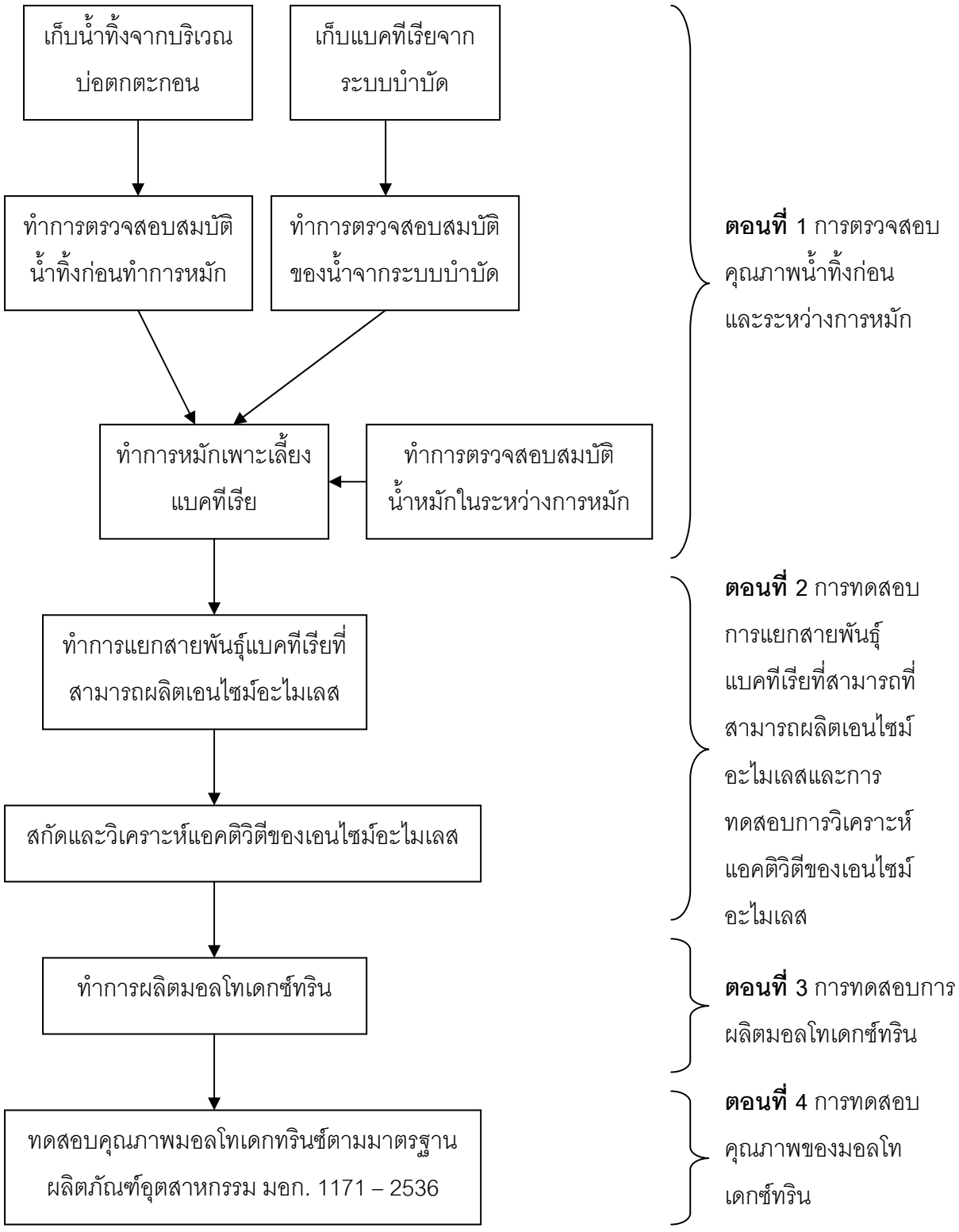
3. สถานที่และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

3.1 สถานที่ที่ใช้ในการทดลอง ในการศึกษาทดลองเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่ถูกต้องและสมบูรณ์ ผู้วิจัยใช้สถานที่ในการทดลองในการตรวจสอบคุณภาพน้ำ แยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสที่ อาคารสถานศึกษาเคมีปฏิบัติ สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 75/7 ถ.พระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400 ผลิตและทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินที่ บริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด 38/6 หมู่ 11 ถ.ปทุมธานี-ลาดหลุมแก้ว ต.คูบางหลวง อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี 12140

3.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาทดลอง การทดลองใช้เวลา 4 เดือน คือช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 โดยทำการหมักน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนการหมักและระหว่างทำการหมัก แยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส ทำการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินและทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

4. วิธีดำเนินการทดลอง

ผู้วิจัยดำเนินการทดลองตามขั้นตอน ดังแสดงในภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 ขั้นตอนการหมัก การแยกแบคทีเรีย การผลิตและทดสอบคุณภาพมอลโทเดกซ์ทริน

รายละเอียดของวิธีการดำเนินการทดลอง ตามภาพประกอบ 10 มีดังนี้

ตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนและระหว่างการหมัก

1.1 การสุ่มเก็บน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนและเก็บแบคทีเรียจากบ่อบำบัดน้ำทิ้ง

ในการทดลองผู้วิจัยได้สุ่มเก็บน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน ทั้งหมด 3 ครั้ง จากบริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด เมื่อทำการสุ่มแต่ละครั้ง จึงนำมาวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี ปริมาณสารทั้งหมด ปริมาณสารแขวนลอย ปริมาณสารแขวนลอยระเหยและทำการวัดพีเอช ส่วนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลอง ได้ทำการเก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำทิ้ง นำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี ปริมาณสารทั้งหมด ปริมาณความเข้มข้นของจุลชีพและทำการตรวจวัดพีเอช

1.2 ทำการหมักน้ำทิ้งและวิเคราะห์น้ำจากกระบวนการหมัก

โดยนำแบคทีเรียที่เก็บมาปริมาณ 2 ลิตร เติมสารอาหารให้กับแบคทีเรียทุกวัน ปริมาณ 0.5 ลิตรด้วยน้ำทิ้งบริเวณบ่อตกตะกอน โดยน้ำทิ้งที่ใช้ในการทดลองมี 2 สภาวะ คือ น้ำทิ้งบริเวณบ่อตกตะกอนที่ไม่ได้ทำการปรับค่าปริมาณซีโอดีและน้ำทิ้งบริเวณบ่อตกตะกอนที่ควบคุมความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำให้คงที่ตลอดการทดลองที่ปริมาณซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมความเข้มข้นของสารในน้ำทิ้งโดยการวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งที่นำมาจากบ่อตกตะกอน แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำที่ใช้ในการเจือจางจนได้ค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร การทดลองนี้ไม่มีการเติมสารอาหารเสริม การหมักเป็นแบบต่อเนื่อง (Continuous process) ที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส และ 47 – 55 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่ 7 ตลอดการทดลอง โดยทำการปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ (Weight by Volume)

น้ำทิ้งในถังหมักถูกกวนตลอดเวลาด้วย Magnetic stirrer ครบ 1 สัปดาห์ เริ่มเก็บน้ำจากระบบมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี ปริมาณสารทั้งหมดและปริมาณความเข้มข้นของจุลชีพ ซึ่งน้ำหมักก่อนการวิเคราะห์งดเติมน้ำจากบริเวณบ่อตกตะกอน เป็นเวลา 1 วันเพื่อให้แน่ใจว่าแป้งได้ถูกย่อยสลายหมด โดยการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน ถ้าปรากฏเป็นสีเหลืองแสดงว่าแป้งถูกย่อยสลายหมดไม่มีแป้งเหลืออยู่เลย และนำน้ำหมักที่หมักได้ตามระยะเวลาไปทดสอบกิจกรรมการย่อยแป้ง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar ก่อนนำไปคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส วิเคราะห์น้ำหมักทุก 7 วัน และทำการหมัก 3 สัปดาห์

1.3 การวิเคราะห์น้ำทิ้งและน้ำจากกระบวนการหมัก

1.3.1 การวิเคราะห์หาค่าซีโอดี

เป็นการหาปริมาณอินทรีย์สารในน้ำหมักโดยวิธี Open reflux โดยคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการออกซิไดซ์อินทรีย์สารด้วยสารเคมีที่มีอำนาจในการออกซิไดซ์สูง ในสารละลายที่เป็นกรด

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการรีฟลักซ์ (Refluxing apparatus)

1. ขวดกลมก้นแบน (Flat bottom flask) ชนิดที่มีปากแบบกราวจอยท์ ขนาดบรรจุ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. เครื่องควบแน่น (Condenser)

3. เตาแผ่นร้อน (Hot plate)

วิธีวิเคราะห์

1. ใส่เมอคิวรี (II) ซัลเฟต ($HgSO_4$) ปริมาณ 0.4 กรัม ลงในขวดรีฟลักซ์ เติมน้ำหมักหรือน้ำหมักที่ทำให้เจือจางแล้วลงไป 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่มีความเข้มข้น 0.0417 โมลาร์ จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นซึ่งมีซิลเวอร์ซัลเฟตเจือปนอยู่ (ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต 22 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 ขวด ซึ่งมีน้ำหนัก 4.1 กิโลกรัม) จำนวน 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ glass bead 5 – 6 เม็ดเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเดือดอย่างรุนแรง

2. นำขวดรีฟลักซ์ต่อกับเครื่องควบแน่น แล้วรีฟลักซ์หรือต้มให้เดือดเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ล้างเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะถอดเครื่องควบแน่นออกจากขวดรีฟลักซ์

3. เจือจางส่วนผสมที่ได้ด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรประมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วติเตรตหาปริมาณของไดโครเมตที่มากเกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ โดยใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดสมมูลย์สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

4. ทำแบลงค์ (Blank) โดยใช้น้ำกลั่น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร แทนน้ำหมัก และทำการวิเคราะห์พร้อมไปกับตัวอย่าง

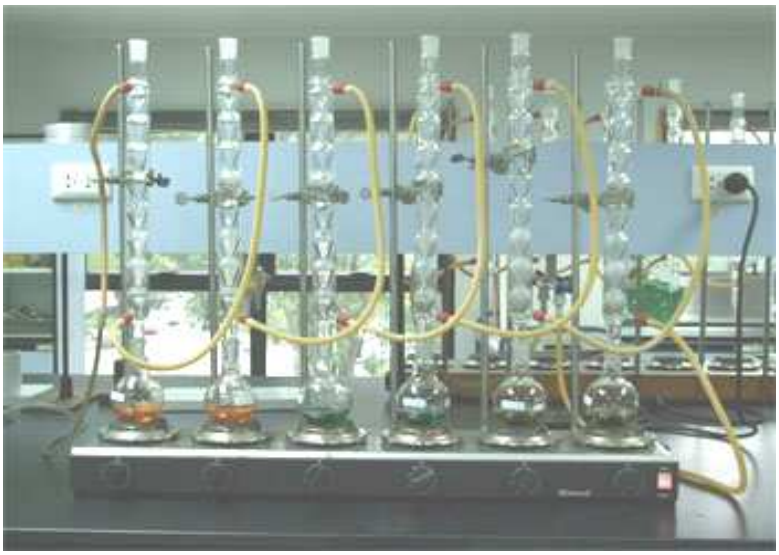
การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มก./ล.)} = \frac{(a - b)\ M \times 8{,}000}{\text{ปริมาตรของน้ำหมัก (ลบ.ซม.)}}$$

a = ปริมาตรของไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งใช้ติเตรตกับแบลงค์ (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

b = ปริมาตรของไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งใช้ติเตรตกับน้ำหมัก (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

M = ความเข้มข้นของไอร์ออน (II) แอมโมเนียมซัลเฟต (โมลาร์)



ภาพประกอบ 11 แสดงขั้นตอนการรีฟลักซ์หาปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งและน้ำจากกระบวนการหมัก

1.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งหมด

ปริมาณสารทั้งหมด เป็นปริมาณสารที่เหลืออยู่ในภาชนะหลังจากการระเหยน้ำออกจากน้ำหมักจนหมด โดยนำน้ำหมักปริมาตร 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในถ้วยระเหย และนำไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นลงในเดสิกเกเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักของของแข็งในภาชนะนั้น เทียบหาปริมาณของสารทั้งหมดซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานระเหย (Evaporating dish)
2. เครื่องอังไอน้ำ (Steam bath หรือ Water bath)
3. ตู้อบความร้อน
4. เดสิกเกเตอร์
5. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมจานระเหย จานที่ใช้ต้องอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดสิกเกเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนัก

2. เลือกใช้ปริมาตรของน้ำตัวอย่างให้เหมาะสม โดยปกติใช้ 50 หรือ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. ค่อยๆ รินน้ำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณของสารทั้งหมด ลงในถ้วยระเหยที่ตั้งบนเครื่องอังไอน้ำ เมื่อไอน้ำระเหยออกหมด นำจานระเหยไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในเดสิกเกเตอร์

4. ชั่งจานระเหยทันทีที่เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของปริมาณสารทั้งหมด ซึ่งคำนวณเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารทั้งหมด (มก./ล.)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารทั้งหมด (มก.) X 1,000}}{\text{ปริมาตรของน้ำหมักตัวอย่าง (ลบ.ซม.)}}$$

ภาพประกอบ 12 แสดงขั้นตอนการอบจานระเหยเพื่อหาปริมาณสารทั้งหมด

1.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย (ปริมาณเอมแอลเอสเอส)

ปริมาณตะกอนแขวนลอยที่สามารถกรองได้ด้วยกระดาษกรองใยแก้ว “Whatmann” GF/C (Nonfiltrable solids) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรองใยแก้ว เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร
2. กรวยกรองบุคเนอร์ (Buchner pump)
3. เครื่องดูดอากาศ (Suction pump)
4. ตู้อบความร้อน (Drying oven) 25 – 180 องศาเซลเซียส
5. เดสิกเกเตอร์
6. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. อบกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิกเกเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนัก
2. เลือกปริมาตรน้ำตัวอย่างซึ่งจะให้ค่าของแข็งออกมาโดยประมาณอย่างน้อยที่สุด 2.5 มิลลิกรัม (เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของกระดาษกรอง)
3. วางกระดาษกรองลงในกรวยบุคเนอร์ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ
4. ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวยบุคเนอร์
5. กรองน้ำตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการโดยอาศัยแรงดูดช่วย

6. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ติดอยู่ข้างกรวยจนหมดและรอจนกว่าจะแห้ง

7. ปิดเครื่องดูดอากาศ แล้วใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองใส่ภาชนะทนไฟ เช่น จานเพาะเชื้อ กระจกนาฬิกา หรือถ้วยอะลูมิเนียม นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง

8. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในเดสิกเกเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเอมแอลเอสเอส (มก./ลบ.ดม.)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารแขวนลอย (มก.) X 1,000}}{\text{น้ำตัวอย่างที่ใช้ (ลบ.ซม.)}}$$

ภาพประกอบ 13 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย

1.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอยระเหย (ปริมาณเอมแอลวีเอสเอส)

ปริมาณของสารที่สลายไปได้ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ ส่วนตะกอนที่เหลืออยู่ไม่สลายไปเรียกว่าปริมาณสารคงตัว ส่วนใหญ่เป็นสารอนินทรีย์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เตาเผา (Muffle furnace) ใช้ได้ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรองที่วิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอยแล้วมาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียสจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ประมาณ 15 – 20 นาที) ปล่อยให้เย็นในเดสิกเกเตอร์

2. ชั่งกระดาษกรองทันทีที่เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จะได้น้ำหนักสารคงตัวที่เหลืออยู่ ซึ่งจะนำไปคำนวณหาปริมาณสารแขวนลอยระเหย

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารคงตัว (มก./ล.)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารคงตัว (มก.) X 1,000}}{\text{ปริมาตรของน้ำหนักตัวอย่าง (ลบ.ซม.)}}$$

ปริมาณสารแขวนลอยระเหย (มก./ล.) = ปริมาณสารแขวนลอย (มก./ล.) - ปริมาณสารคงตัว (มก./ล.)

ภาพประกอบ 14 แสดงขั้นตอนการเผากระดาษกรองเพื่อหาปริมาณสารแขวนลอยระเหย

ตอนที่ 2 การทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

2.1 ทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

โดยนำน้ำหมักมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมา Spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar (ภาคผนวก ค) ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ตรวจหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนี เชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะให้บริเวณใสรอบโคโลนี เลือกเก็บโคโลนีที่ให้บริเวณใสมาแยกจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar จากนั้นทำการเพาะเชื้อแบบ Point inoculation ลงบนอาหารแข็ง Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บเฉพาะเชื้อที่ให้ความกว้างของบริเวณใสตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป

จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาใส่ลงในอาหารเหลว Inoculum medium (ภาคผนวก ค) และบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร Production medium (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยใช้ Inoculum size 10% บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ Broth ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์โดยใช้ Refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใส (Supernatant) ซึ่งเป็น Crude enzyme มาทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นต่อไป

ภาพประกอบ 15 แสดงขั้นตอนการบ่มเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.2 ทดสอบการทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยวิธี Solvent precipitation

โดยนำ Crude enzyme ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ ตั้งไว้ใน Ice bath บน Magnetic stirrer ค่อยๆ เติม Ethanol ปริมาตร 2 เท่าของ Crude enzyme ลงไป ทิ้งไว้ 15 นาที แยกตะกอนออกโดยใช้ Refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้มาทำให้แห้งโดยการซับด้วยกระดาษกรอง วางในเดสิกเกเตอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนแห้งสนิท นำมาทำเป็นผงโดยการบดด้วยโกร่ง เก็บผงโปรตีนในขวดที่มีฝาปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ต่อไป

2.3 ทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

นำผงโปรตีนที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Bernfeld ซึ่งทำโดยเติมสารละลาย DNSA 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสและแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit enzyme) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งให้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิกรัมในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

จากนั้นนำเอนไซม์อะไมเลสที่มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดในแต่ละสภาวะ มาทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตอนที่ 3 การทดสอบการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

ในการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ผู้วิจัยได้นำแป้งมันสำปะหลังจาก บริษัท สยามมอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด มาวิเคราะห์ความชื้น จากนั้นเตรียมน้ำแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 25% นำมาย่อย โดยดัดแปลงตามวิธีของ Brooks และ Griffin ใช้ระยะเวลาย่อยตั้งแต่ 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง เพื่อคำนวณค่า Dextrose equivalent (DE) ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยในช่วงระยะเวลาต่างๆ และหาเวลาที่ย่อยได้ DE 15 จากนั้นนำมาระเหยน้ำออก ได้มอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ขั้นตอนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ดังแสดงในภาพประกอบ 16 และ 17

เตรียมน้ำแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 25% ปริมาณ 500 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร

↓

เติมสารละลาย $CaCl_2$ ให้มี Ca^{2+} ปริมาณ 200 ส่วนในล้านส่วน

↓

ปรับพีเอชให้เป็น 6.5 ด้วย 0.5 N NaOH

↓

เติมเอนไซม์อะไมเลส 0.03% ของน้ำหนักแป้งแห้ง

↓

ย่อยในอ่างน้ำร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 80^0C ตามเวลาที่กำหนด

↓

ลดอุณหภูมิลงโดยการนำมาแช่ในน้ำเย็น

↓

ปรับพีเอชเป็น 3.7 – 3.9 ด้วย 0.5 N HCl

↓

ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที

↓

ทิ้งให้เย็น

↓

นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาเติม A diatomite product ปริมาณร้อยละ 2 ของน้ำหนักสารละลาย

↓

กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 โดยใช้สภาพสุญญากาศเข้าช่วย

↓

ระเหยน้ำออก ที่อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส

↓

สารละลายมอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้น (ปริมาณของแข็งไม่น้อยกว่าร้อยละ 60)

ภาพประกอบ 16 กระบวนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

ภาพประกอบ 17 แสดงขั้นตอนการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

ตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

ทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ดังต่อไปนี้

4.1 ลักษณะชี้บ่ง

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนให้เข้ากัน แล้วหยดสารละลายไอโอดีน 0.02 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 2 ถึง 3 หยด

เมื่อทดสอบตามวิธีดังกล่าวนี้แล้ว ต้องเป็นสีใดสีหนึ่ง ตั้งแต่สีน้ำเงินปนแดงเล็กน้อย สีม่วง สีม่วงแดง จนถึงสีน้ำตาลแดง

4.2 การละลาย

วิธีทดสอบ

ชั่งตัวอย่างคิดเป็นน้ำหนักแห้งประมาณ 2 กรัม ให้ได้น้ำหนักแน่นอน ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 27 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส จำนวนหนึ่งแล้วเติมน้ำกลั่นดังกล่าวจนถึงขีดปริมาตร เขย่านาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองวัตแมน เบอร์ 12 หรือที่มีคุณภาพเทียบเท่า เก็บสารละลายที่กรองได้ในภาชนะที่สะอาดและแห้ง ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่กรองได้ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในจานระเหยที่สะอาด แห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไประเหยจนแห้งในอ่างน้ำเดือด แล้วนำไปอบในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิกเกเตอร์ นำไปชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำอีกจนน้ำหนักคงที่ น้ำหนัก

ที่ชั่งได้นี้ลบด้วยน้ำหนักจานระเหย เป็นน้ำหนักกาก ซึ่งเมื่อนำไปคำนวณแล้ว จะเป็นปริมาณเดกซ์ทรินที่ละลายน้ำ

วิธีคำนวณ

$$\text{ส่วนที่ละลายน้ำได้ (ร้อยละ)} = \frac{200}{100} \times \frac{M_2}{M_1} \times 100$$

เมื่อ M_1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

M_2 คือ น้ำหนักกาก เป็นกรัม

เมื่อทดสอบตามวิธีดังกล่าวแล้ว ละลายน้ำได้บางส่วนหรือทั้งหมด

4.3 คุณลักษณะทางฟิสิกส์และทางเคมี (ของแข็งทั้งหมด เถ้าซัลเฟต น้ำตาล รีดิวซิงและโปรตีน)

4.3.1 ของแข็งทั้งหมด

ชั่งกีเซลกัว 30 กรัมใส่ในถ้วย นำถ้วยพร้อมฝาปิดและแท่งแก้วสำหรับคนใส่ตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 100 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ความดันไม่เกิน 25 มิลลิเมตรของปรอท เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นปิดเครื่องสูบสุญญากาศแล้วปล่อยอากาศแห้งเข้าในตู้ จนกระทั่งถึงระดับความดันบรรยากาศ ก่อนที่จะนำถ้วยออกจากตู้อบสุญญากาศให้วางแท่งแก้วสำหรับคนไว้ในถ้วยและปิดฝา นำไปใส่ในเดสิกเกเตอร์ ทิ้งให้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแน่นอน (m_1)

ชั่งตัวอย่างประมาณ 8 – 10 กรัมให้ทราบน้ำหนักแน่นอน โดยให้ละเอียดถึง 0.001 กรัม (m_0) ในบีกเกอร์ที่แห้ง เติมน้ำอุ่น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ถ่ายตัวอย่างทั้งหมดลงในถ้วยที่บรรจุกีเซลกัว ใช้น้ำกลั่นที่อุ่นครั้งละ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ล้าง 3 ครั้ง คนจนกระทั่งตัวอย่างและกีเซลกัวเป็นเนื้อเดียวกัน อบถ้วยบรรจุตัวอย่าง ฝาปิดและแท่งแก้วอบในตู้อบสุญญากาศเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ความดันไม่เกิน 25 มิลลิเมตรของปรอท ในระหว่างนี้ค่อยๆ ปล่อยอากาศผ่านเครื่อง หลังจากอบครบ 5 ชั่วโมงแล้วให้ปิดเครื่องสูบสุญญากาศแล้วปล่อยอากาศแห้งเข้าในตู้ จนกระทั่งถึงระดับความดันบรรยากาศ นำถ้วยออกจากตู้อบสุญญากาศ ใช้แท่งแก้วบดกีเซลกัวแล้วอบเช่นเดียวกับครั้งแรกเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ก่อนนำจานออกจากตู้อบสุญญากาศให้ปิดฝาก่อน นำไปใส่ในเดสิกเกเตอร์ ทิ้งให้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบในตู้อบสุญญากาศอีกครั้งเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิกเกเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ (m_2) (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 268-2521: 10-11)

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ร้อยละของน้ำหนัก)} = (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m_0}$$

เมื่อ m_0 คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

m_1 คือ น้ำหนักถ้วย ฝาปิด แท่งแก้วสำหรับคนและกีเซลกัว เป็นกรัม

m_2 คือ น้ำหนักถ้วย ฝาปิด แท่งแก้วสำหรับคน กีเซลกัว และตัวอย่าง หลังจากทำให้แห้งแล้วเป็นกรัม

เมื่อทดสอบตามวิธีดังกล่าวแล้ว ของแข็งทั้งหมด (เฉพาะมอลโทเดกซ์ทริน) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 60

4.3.2 เถ้าซัลเฟต

ชั่งตัวอย่างหนัก 5 กรัม ใส่ลงในจานขนาด 50 – 100 มิลลิลิตร เติม 10% H_2SO_4 จำนวน 5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนบน Hot plate จนตัวอย่างกลายเป็นเถ้า จากนั้นนำไปเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 550 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็น เติม 10% H_2SO_4 จำนวน 2 – 3 มิลลิลิตร นำไประเหยในอ่างระเหย ทำให้แห้งบน Hot plate จากนั้น นำไปเข้าเตาเผาอีกครั้งหนึ่งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (AOAC. 1990: 1012)

เมื่อทดสอบตามวิธีดังกล่าวแล้ว ต้องมีเถ้าซัลเฟต ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

4.3.3 สมมูลเดกซ์โทรสตามวิธีของเลนและอีย์นอน (Lane and Eynon's volumetric method)

สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม

1. สารละลายเฟห์ลิง (Fehling's solution)

1.1 สารละลาย ก. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) 34.64 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.2 สารละลาย ข. ละลายโปตัสเซียมโซเดียมตาร์เตรตเตตระไฮเดรต ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) 173 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 50 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ผสมสารละลาย ก. และ ข. เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 1 วันที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรอง

2. เมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ (Methylene blue indicator)

ละลายเมทิลีนบลู 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

การหาค่ามาตรฐานสารละลายเฟห์ลิง

เมื่อเตรียมสารละลายเฟห์ลิงแล้ว ให้นำมาหาค่ามาตรฐานโดยการติเตรตกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเดกซ์โทรส ดังนี้

อบเดกซ์โทรสบริสุทธิ์ให้แห้งในตู้อบสุญญากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ชั่งเดกซโทรสนี้มา 5.00 กรัมละลายในน้ำกลั่น แล้วถ่ายใส่ขวดตวงมาตรฐานขนาด 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดสารละลายเฟห์ลิง 25.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในขวดแก้วชนิดทนความร้อน ต้มให้เดือดแล้วติเตรตกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเดกซ์โทรสตามวิธีการติเตรตแบบมาตรฐานซึ่งจะกล่าวต่อไป จดปริมาตรสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเดกซ์โทรส (A)

วิธีเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างมอลโทเดกซ์ทรินในบีกเกอร์ที่แห้งสนิทให้ทราบน้ำหนักแน่นอน (m_0) ถ่ายใส่ขวดตวงมาตรฐานขนาด 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

วิธีติเตรต

วิธีติเตรตแบบอินครีเมนตัล

ใช้ปิเปตดูดสารละลายเฟห์ลิง 25.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในขวดแก้วก้นแบนชนิดทนความร้อนขนาด 300 – 400 ลูกบาศก์เซนติเมตร บรรจุสารละลายตัวอย่างในบุเร็ตชนิดที่มีก้านยาวยื่นต่อออกมาเพื่อความสะดวกในการติเตรต ไขสารละลายตัวอย่างประมาณ 15 ลูกบาศก์เซนติเมตรจากบุเร็ตลงในขวดแก้วก้นแบนชนิดทนความร้อนซึ่งมีสารละลายเฟห์ลิงอยู่ เขย่าให้เข้ากันและต้มให้เดือดโดยใช้ตะเกียงบุนเสน เมื่อเดือดได้ 10 ถึง 15 วินาทีแล้ว หากสารละลายเฟห์ลิงยังคงมีสีน้ำเงินอยู่ให้ไขสารละลายตัวอย่างไปอีกครั้งละ 5 ถึง 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าและปล่อยให้เดือดต่อ 2 ถึง 3 วินาที ถ้าสารละลายเฟห์ลิงยังคงมีสีน้ำเงินอยู่ก็ให้ทำเช่นนี้เรื่อยๆ ไปจนกระทั่งสีน้ำเงินของสารละลายเฟห์ลิงจางลง เติมสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 3 ถึง 4 หยด ติเตรตต่อไปแต่ให้ใช้สารละลายตัวอย่างครั้งละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรหรือน้อยกว่านั้นจนกระทั่งสีน้ำเงินของเมทิลีนบลูหายไป ในระหว่างติเตรตจะต้องให้สารในขวดแก้วเดือดและควรเขย่าให้เข้ากันตลอดเวลา จดจำนวนลูกบาศก์เซนติเมตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ไป

วิธีติเตรตแบบมาตรฐาน

ไขสารตัวอย่างลงในขวดแก้วซึ่งมีสารละลายเฟห์ลิง 25.0 มิลลิลิตรอยู่ โดยไขให้มีปริมาตรน้อยกว่าค่าที่ทราบตามวิธีอินครีเมนตัลประมาณ 0.5 ถึง 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร และหลังจากต้มให้เดือด 2 นาทีพอดีแล้ว เติมสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 3 ถึง 4 หยด ติเตรตต่อไปโดยใช้สารละลายตัวอย่างครั้งละ 2 ถึง 3 หยดจนกระทั่งสีน้ำเงินของเมทิลีนบลูหายไป การเติมแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 10 วินาที การติเตรตนี้ต้องเสร็จภายใน 1 นาที นับตั้งแต่เติมสารละลายเมทิลีนบลู ในระหว่างติเตรตจะต้องให้สารในขวดแก้วเดือด และควรเขย่าให้เข้ากันตลอดเวลา จดจำนวนลูกบาศก์เซนติเมตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (V) (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 268-2521: 14-17)

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (คิดเป็นเดกซ์โทรส) ร้อยละ} = \frac{500 \times A}{V \times m_0}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเดกซ์โทรสที่ใช้ในการติเตรต ตามวิธีการหาค่ามาตรฐานของสารละลายเฟห์ลิง เป็นลูกบาศก์เซนติเมตร

V คือ ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการติเตรต ตามวิธีติเตรตแบบมาตรฐาน เป็นลูกบาศก์เซนติเมตร

m_0 คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

$$\text{สมมูลเดกซ์โทรส} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง เป็นร้อยละ} \times 100}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด เป็นร้อยละ}}$$

เมื่อทดสอบตามวิธีดังกล่าวแล้ว น้ำตาลรีดิวซิง (คิดเป็นน้ำตาลเดกซ์โทรส) ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 5.0 ถึงน้อยกว่า 20.0

ภาพประกอบ 18 แสดงขั้นตอนการหาน้ำตาลรีดิวซิงของมอลโทเดกซ์ทริน

4.3.4 โปรตีน

ชั่งตัวอย่างหนัก 0.7 – 2.2 กรัม ในขวดแก้วรูปชมพู่ เติม HgO 0.7 กรัม, K_2SO_4 หรือ Na_2SO_4 ชนิดผงจำนวน15 กรัม และ H_2SO_4 จำนวน 25 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งหมดฟอง และสารละลายใส (ใช้เวลามากกว่า 30 นาที) ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร ให้อุณหภูมิน้อยกว่า 25 องศาเซลเซียส เติมสารละลายซัลไฟต์ หรือสารละลายไทโอซัลเฟต 25 มิลลิลิตร ผสมให้เกิดตะกอนของ Hg เติม Zn เล็กน้อย และเติม NaOH (H_2SO_4 15 มิลลิลิตร จะใช้ NaOH 15 กรัมหรือจำนวนเพียงพอที่จะทำให้เป็นด่างเข้มข้น และสารละลายซัลไฟต์ หรือสารละลายไทโอซัลเฟต อาจผสมกับสารละลาย NaOH ก่อนเติมลงในขวดแก้วรูปชมพู่ก็ได้) ต่อขวดแก้วรูปชมพู่เข้ากับคอนเดนเซอร์ ที่ส่วนปลายจุ่มอยู่ในสารละลายกรดมาตรฐาน เติมอินดิเคเตอร์ 5 – 7 หยด เขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนจนกระทั่ง NH_3 ถูกกลั่นไปหมด นำตัวอย่างออกมา ติเตรตกรดส่วนเกินด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH (AOAC. 1990:781 – 782)

วิธีคำนวณ

$$\%\ N = \frac{((\text{mL std acid} \times \text{normality acid}) - (\text{mL std NaOH} \times \text{normality NaOH})) \times 1.4007}{\text{g sample}}$$

นำ % N มาคูณด้วย 5.7 จะได้เป็น % โปรตีน

เมื่อทดสอบตามวิธีดังกล่าวแล้ว โปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5

สำหรับวิธีการทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ในส่วนของปริมาณของแข็งทั้งหมดและโปรตีนตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 นั้น ผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้วิธีการทดสอบ ดังต่อไปนี้

1. ของแข็งทั้งหมด

วิธีทดสอบ

ชั่งทรายละเอียดหนัก 25 – 30 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมกับใส่แท่งแก้วสำหรับคนลงไปด้วย นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ เอาออกจากตู้อบแล้วนำมาใส่ในเดสิกเกเตอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักจดบันทึกไว้ (ให้เป็น W1) ชั่งสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินลงในถ้วยทราย (ให้มีปริมาณของแข็งในมอลโทเดกซ์ทรินประมาณ 1 กรัม) จดบันทึกน้ำหนักของตัวอย่างและถ้วยทราย (ให้เป็น W2) นำไปให้ความร้อนบนเตาไฟฟ้า (Hot plate) ใช้แท่งแก้วคนเป็นครั้งคราวจนกระทั่งทรายร่วนแห้ง จึงนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 – 10 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนักไว้ (ให้เป็น W3) นำค่าที่จดบันทึกไว้มาคำนวณหาปริมาณของแข็งในสารละลายมอลโทเดกซ์ทริน (ดัดแปลงจากวิธีของ รุ่งนภา ประดิษฐพงษ์ 2539: 234 (ดัดแปลงจาก AOAC. 1990: 1011))

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณของแข็ง (ร้อยละ)} = \frac{(W3 - W1)}{(W2 - W1)} \times 100$$

เมื่อ W1 คือ น้ำหนักบีกเกอร์ แท่งแก้วสำหรับคนและทรายละเอียด เป็นกรัม

W2 คือ น้ำหนักน้ำหนักบีกเกอร์ แท่งแก้วสำหรับคน ทรายละเอียด และตัวอย่าง เป็นกรัม

W3 คือ น้ำหนักน้ำหนักบีกเกอร์ แท่งแก้วสำหรับคน ทรายละเอียด และตัวอย่าง หลังจากทำให้แห้งแล้ว เป็นกรัม

ภาพประกอบ 19 แสดงขั้นตอนการหาของแข็งทั้งหมดของมอลโทเดกซ์ทริน

2. โปรตีน

วิธีทดสอบ

ชั่งตัวอย่างหนักประมาณ 2 กรัม ใส่หลอดย่อย เติมตัวเร่งปฏิกิริยา 10 กรัมและ H_2SO_4 จำนวน 25 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนกระทั่งหมดฟอง และสารละลายใส (ใช้เวลามากกว่า 30 นาที) ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นประมาณ 75 มิลลิลิตร ให้อุณหภูมิน้อยกว่า 25 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเข้าเครื่องกลั่นโปรตีน ใช้กรดบอริก 4% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ผ่านการกลั่นมาติเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีน (Pomeranz; & Meloan. 1994: 737-743 และ James. 1995: 41-43)

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ ไนโตรเจน (Total nitrogen)} = \frac{(A - B) \times C \times 0.014 \times 100}{D}$$

$$\% \text{ โปรตีน (Crude protein)} = \% N \times 6.25$$

เมื่อ A คือ มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ติเตรตกับตัวอย่าง

B คือ มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ติเตรตกับ Blank

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

D คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาค่าร้อยละ (Percentage) โดยใช้สูตร

$$P = \frac{f}{n} X\ 100$$

P	แทนร้อยละ
f	แทนความถี่ที่ต้องการแปลงให้เป็นร้อยละ
n	แทนจำนวนความถี่ทั้งหมด

2. หาค่าเฉลี่ย (arithmetic mean) โดยใช้สูตร

$$\overline{X} = \frac{\sum x}{n}$$

$\overline{X}$	แทนค่าเฉลี่ย
$\sum x$	แทนผลรวมทั้งหมดในกลุ่ม
n	แทนจำนวนคะแนนในกลุ่ม

3. หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) โดยใช้สูตร

$$S = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - \left(\sum x\right)^2}{n\,(n-1)}}$$

S	แทนส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
X	แทนคะแนนแต่ละตัว
n	แทนจำนวนคะแนนในกลุ่ม
Σ	แทนผลรวม

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองหมักน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน ในโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง โดยการหมักเป็นแบบไร้อากาศ ตามกระบวนการที่ได้กำหนดไว้แล้ว จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาทำการตรวจสอบคุณภาพ แล้วนำจุลินทรีย์ที่ได้จากการหมักมาทำการคัดแยกเอาเฉพาะจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ทำการสกัดเอนไซม์และนำเอนไซม์ที่ได้มาผลิตเป็นมอลโทเดกซ์ทริน ทำการทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลนำเสนอในรายละเอียด โดยแยกออกเป็น 4 ขั้นตอน

ตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนและระหว่างการหมัก

ตอนที่ 2 การทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

ตอนที่ 3 การทดสอบการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

ตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

ตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนและระหว่างการหมัก

การทดลองการหมักน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน ในโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ได้มีการสุ่มเก็บน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนมาวิเคราะห์หาสมบัติน้ำทิ้ง โดยสุ่มเก็บน้ำทิ้ง 3 ครั้ง และทำการเก็บแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียมาทำการวิเคราะห์หาสมบัติน้ำทิ้ง ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนและน้ำทิ้งในบ่อบำบัดน้ำทิ้ง มีผลการวิเคราะห์สามารถแสดงรายละเอียดไว้ดังตาราง 12

ตาราง 12 แสดงสมบัติน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนและบ่อบำบัดน้ำทิ้ง

สมบัติน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การสุ่มเก็บน้ำมาตรวจสอบ			แบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสีย (มิลลิกรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
ปริมาณซีโอดี	2,222	1,210	2,438	5,096
ปริมาณสารทั้งหมด	6,651	2,619	6,947	7,004
ปริมาณสารแขวนลอย	445	194	528	9,950
ปริมาณสารแขวนลอยระเหย	429	185	518	9,155
พีเอช	6.06	6.18	5.77	7.48

จากตาราง 12 พบว่าน้ำทิ้งที่สุ่มเก็บมาทดสอบ มีปริมาณซีโอดีอยู่ระหว่าง 1,210 - 2,438 มิลลิกรัมต่อลิตร นั่นคือ มีปริมาณแป้งที่เป็นสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งค่อนข้างสูง และมีพีเอชอยู่ระหว่าง 5.77 – 6.18 ส่วนแบคทีเรียที่เก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำทิ้ง พบว่ามีปริมาณสารแขวนลอยระเหย 9,155 มิลลิกรัมต่อลิตร และพีเอช 7.48

ทำการหมักเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีปริมาณเริ่มต้น 9,155 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมอาหารให้แบคทีเรียด้วยน้ำทิ้งที่ไม่ได้ทำการปรับค่าปริมาณซีโอดี เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่มีการควบคุมความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำให้คงที่ ที่ปริมาณซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส ผลการเพาะเลี้ยงแสดงรายละเอียดตามตาราง 13

ตาราง 13 แสดงสมบัติน้ำทิ้งระหว่างการหมัก

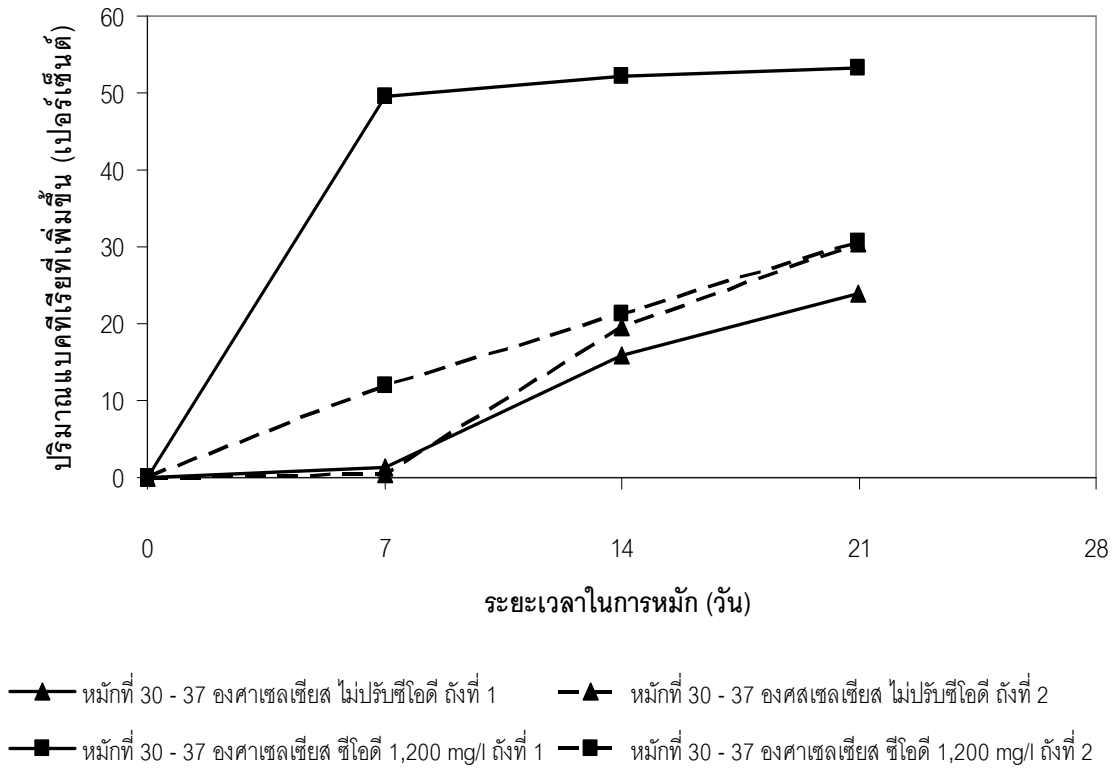
ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก	ทำการหมัก 2 ครั้ง	ปริมาณซีโอดี (COD) mg/l	ปริมาณสารทั้งหมด (TS) mg/l	ปริมาณสารแขวนลอย (MLSS) mg/l	ปริมาณสารแขวนลอยระเหย (MLVSS) mg/l	หมายเหตุ
แบคทีเรียจากบ่อบำบัด		5,096	7,004	9,950	9,155	
7 วัน	ถังที่ 1	5,958	9,454	10,265	9,275	ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส
	ถังที่ 2	7,213	9,404	10,189	9,199	
14 วัน	ถังที่ 1	6,693	10,297	12,275	10,613	
	ถังที่ 2	7,809	10,324	12,606	10,944	
21 วัน	ถังที่ 1	7,161	11,220	13,832	11,945	
	ถังที่ 2	8,173	11,074	13,240	11,353	
7 วัน	ถังที่ 1	5,331	7,014	14,389	13,701	ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส
	ถังที่ 2	2,979	7,064	10,942	10,254	
14 วัน	ถังที่ 1	5,737	7,408	15,096	13,933	
	ถังที่ 2	3,426	7,459	12,264	11,101	
21 วัน	ถังที่ 1	5,994	7,754	16,140	14,034	
	ถังที่ 2	3,814	7,738	14,064	11,958	

ตาราง 13 (ต่อ)

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก	ทำการหมัก 2 ครั้ง	ปริมาณซีโอดี (COD) mg/l	ปริมาณสารทั้งหมด (TS) mg/l	ปริมาณสารแขวนลอย (MLSS) mg/l	ปริมาณสารแขวนลอยระเหย (MLVSS) mg/l	หมายเหตุ
7 วัน	ถังที่ 1	8,153	9,644	23,233	22,289	ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส
	ถังที่ 2	8,859	9,576	28,916	27,972	
14 วัน	ถังที่ 1	8,446	11,649	26,162	24,971	
	ถังที่ 2	9,163	11,376	32,964	31,323	
21 วัน	ถังที่ 1	8,718	13,734	27,389	25,022	
	ถังที่ 2	9,341	12,768	34,028	31,661	
7 วัน	ถังที่ 1	5,331	7,560	22,387	21,308	ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส
	ถังที่ 2	4,704	8,076	18,517	17,438	
14 วัน	ถังที่ 1	5,657	8,708	23,191	21,376	
	ถังที่ 2	5,100	9,078	19,450	17,635	
21 วัน	ถังที่ 1	5,838	9,145	24,319	21,735	
	ถังที่ 2	5,371	9,365	20,381	17,797	

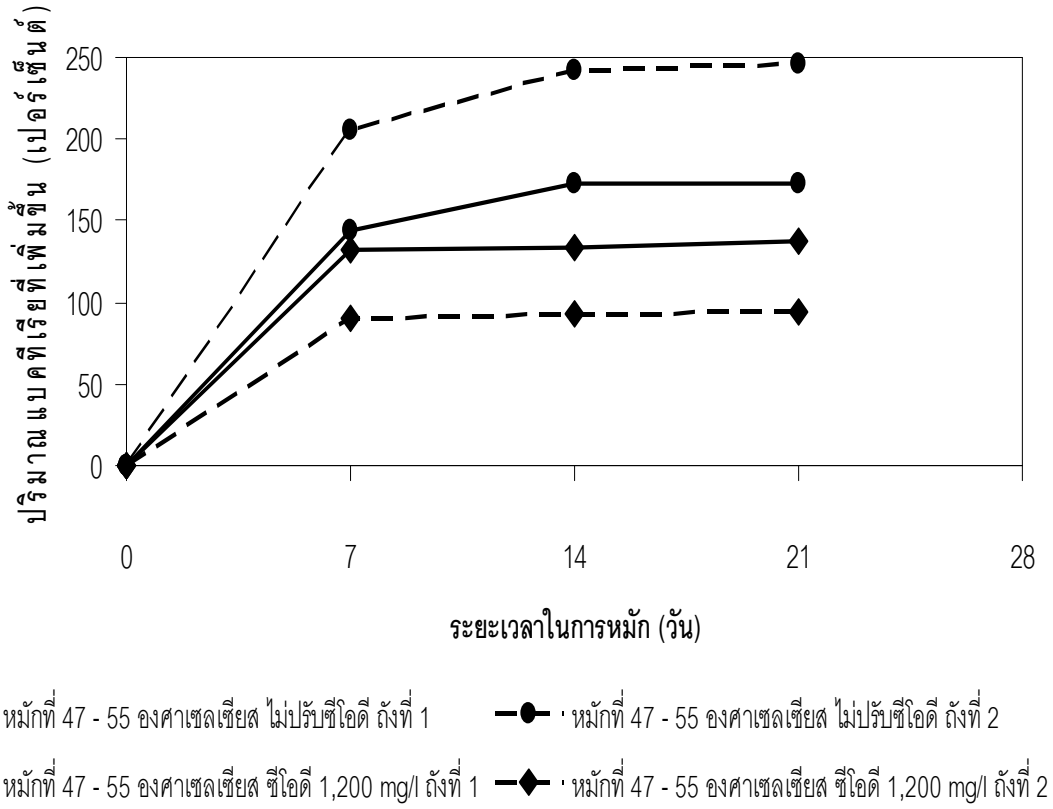
จากตาราง 13 ผลจากการหมักที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส พบว่าที่ระยะเวลาหมัก 21 วัน มีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าที่ระยะเวลาหมัก 7 และ 14 วัน ซึ่งแสดงว่าปริมาณแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นระหว่างทำการหมัก โดยที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาหมัก 21 วัน เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 11,353 – 11,945 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 11,958 – 14,034 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาหมัก 21 วัน เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 25,022 – 31,661 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ

17,797 – 21,735 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักแต่ละสัปดาห์แสดงรายละเอียดในภาพประกอบ 20 และ 21



ภาพประกอบ 20 แสดงปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส

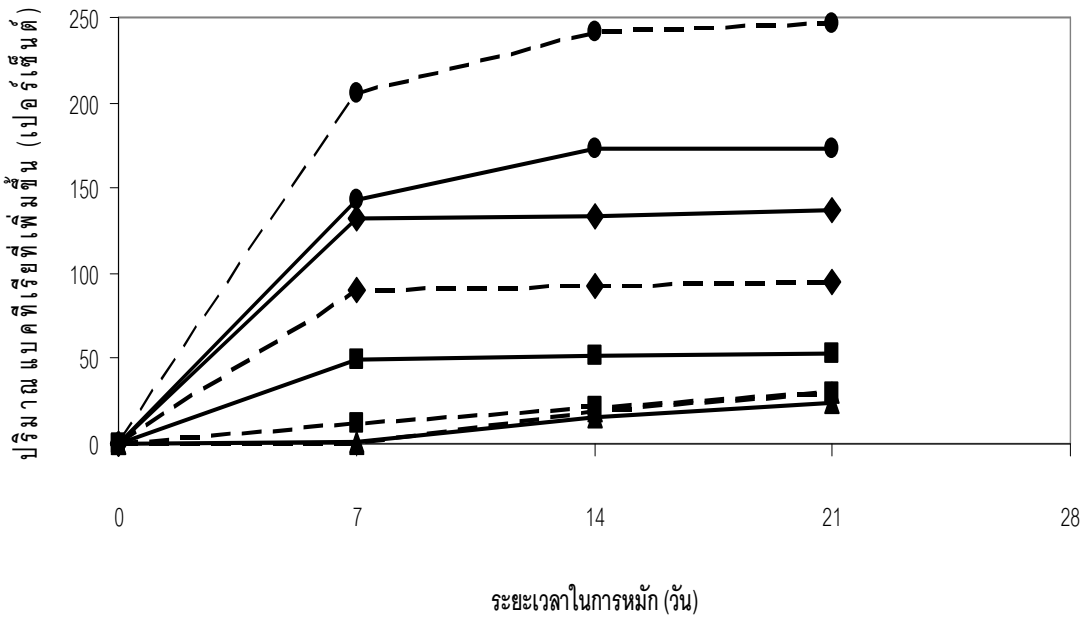
จากภาพประกอบ 20 พบว่าเมื่อหมักครบ 21 วัน การเติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี คือ เพิ่มขึ้น 30.62 – 53.29% และ 24.01 – 30.48% ตามลำดับ แต่มีแนวโน้มว่า หากทำการหมักต่อไป การเติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียน้อยลงเรื่อยๆ หรือคงที่ ในขณะที่การเติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี จะยังคงมีการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียออกไปอีกระยะหนึ่ง เนื่องจากมีอาหาร (แป้ง) เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย



ภาพประกอบ 21 แสดงปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส

จากภาพประกอบ 21 พบว่าเมื่อหมักครบ 21 วัน การเติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร คือเพิ่มขึ้น 173.32 – 245.83% และ 94.40 – 137.41% ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ พบว่าในสัปดาห์แรกของการหมัก ทั้ง 2 สภาวะการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 การเติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณของแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ ในขณะที่การเติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี ยังคงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 2 และค่อนข้างคงที่เมื่อผ่านสัปดาห์ที่ 3

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก พบว่าเมื่อหมักครบ 21 วัน ที่อุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส คือมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 173.32 – 245.83% (เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี) และ 94.40 – 137.41% (เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในขณะที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 24.01 – 30.48% (เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี) และ 30.62 – 53.29% (เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 แสดงปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก

ตอนที่ 2 การทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และการทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

ผู้วิจัยเลือกน้ำหมักที่มีระยะเวลาในการหมัก 21 วันในทุกสภาวะการทดลองมาทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ผลการทดลองแสดงรายละเอียดตามตาราง 14

ตาราง 14 แสดงเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่เพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Starch agar ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

น้ำหมัก	ปริมาณสารแขวนลอยระเหย (MLVSS) mg/l	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี cm	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส cm
ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	11,945	0.9	1.2
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	14,034	0.8	1.1
ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	31,661	0.3 1.0	1.3 1.25
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	21,735	0.7	1.2

จากตาราง 14 พบว่าน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและทำการหมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท และมี 1 ไอโซเลทที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตร

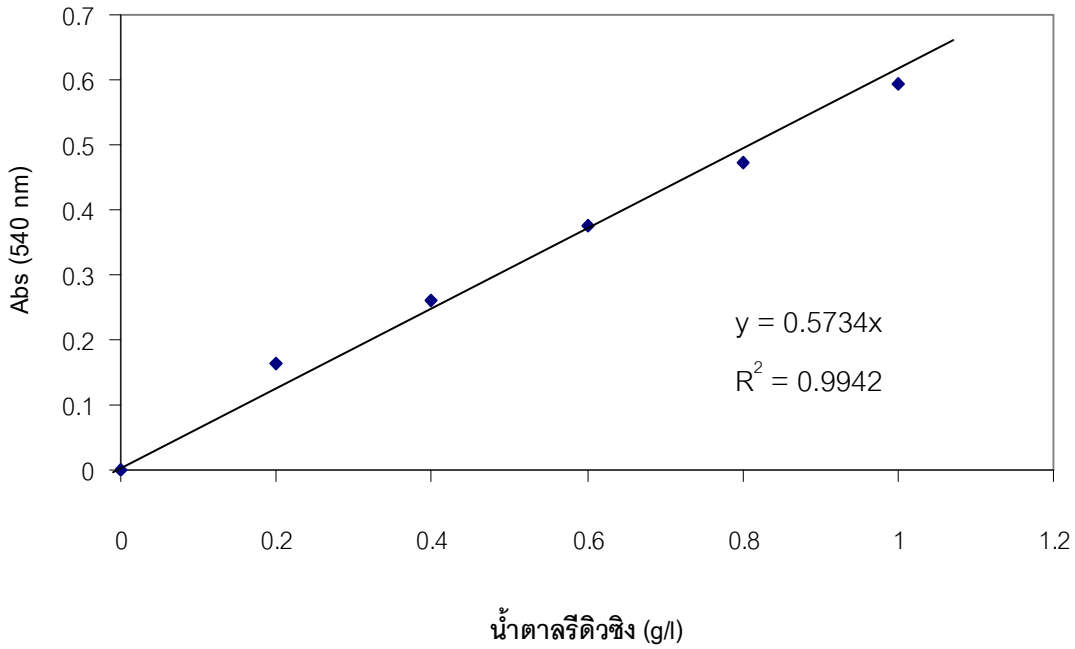
น้ำหมักที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตรและทำการหมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท มี 4 ไอโซเลทที่ให้บริเวณใส และมี 1 ไอโซเลทที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตร

น้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและทำการหมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท มี 2 ไอโซเลทที่ให้บริเวณใสและให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตร

น้ำหมักที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตรและทำการหมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท มี 7 ไอโซเลทที่ให้บริเวณใสเมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีน และมี 1 ไอโซเลทที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตร

จากผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในน้ำหมักนั้น มีทั้งแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้และผลิตเอนไซม์อะไมเลสไม่ได้ ซึ่งแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสไม่ได้นั้น เมื่อเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Starch agar จะไม่เกิดบริเวณใสจากการทดสอบกับสารละลายไอโอดีน และพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ แต่มีปริมาณของเอนไซม์ไม่มาก โดยพิจารณาจากบริเวณใสรอบๆ โคโลนีที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร

จากนั้น ผู้วิจัยได้ทำการสกัดและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โดยกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซิง แสดงในภาพประกอบ 23 และผลการทดลองแสดงรายละเอียดตามตาราง 15



ภาพประกอบ 23 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซิง

ตาราง 15 แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก เพาะเลี้ยงในอาหาร Production medium ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังตกตะกอนด้วยเอธานอล

น้ำหมัก	แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย)
ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	42.71
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	52.57
ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	16.34 34.07
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	64.46

จากตาราง 15 พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 47–55 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงมากกว่าเชื้อแบคทีเรียจากสภาวะการทดลองอื่น และที่อุณหภูมิการหมักเดียวกัน เชื้อแบคทีเรียในน้ำหมักที่ใช้น้ำทิ้งที่มีปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นแหล่งของอาหารให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำหมักที่ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีเป็นแหล่งของอาหาร

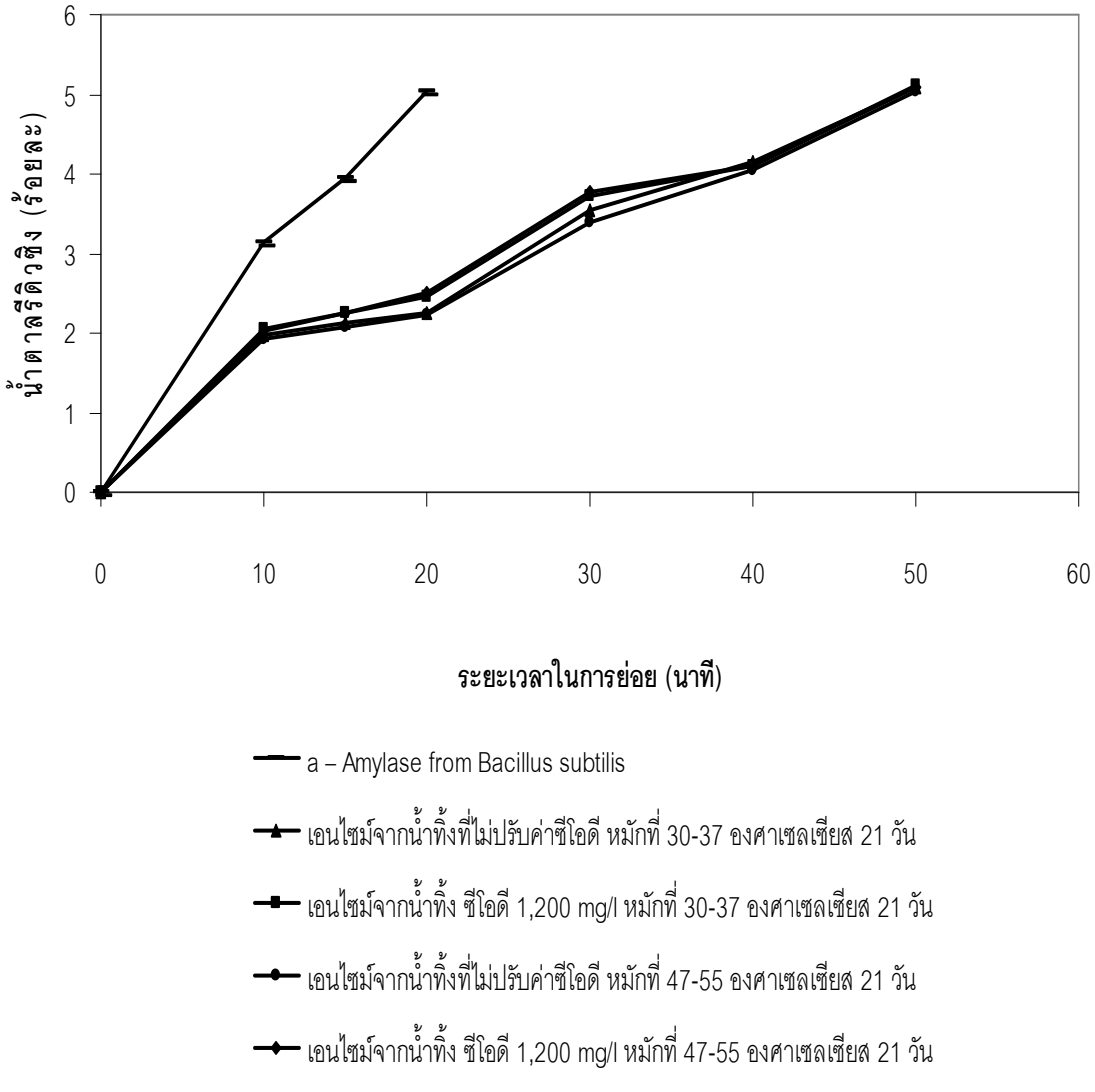
ตอนที่ 3 การทดสอบการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

ในสภาวะการทดลองที่อุณหภูมิการหมัก 47–55 องศาเซลเซียส ไม่มีการปรับค่าซีโอดี ผู้วิจัยได้เลือกเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส 34.07 หน่วย มาทำการทดลองในขั้นต่อไป จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าการใช้เอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* ปริมาณ 0.03% ของน้ำหนักแป้งแห้ง ย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้มอลโทเดกซ์ทรินที่มีค่า DE ประมาณ 15 ซึ่งเป็นค่า DE ที่ผู้วิจัยต้องการ และเมื่อพิจารณาแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสของ α – Amylase from *Bacillus subtilis* ที่มีค่า 1,546.20 หน่วย ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เอนไซม์จากน้ำหมักที่ปริมาณ 1.35% ของน้ำหนักแป้งแห้ง หรือคิดเป็น 45 เท่าของปริมาณเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* มาทำการทดลองผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ผลการทดลองแสดงรายละเอียดตามตาราง 16

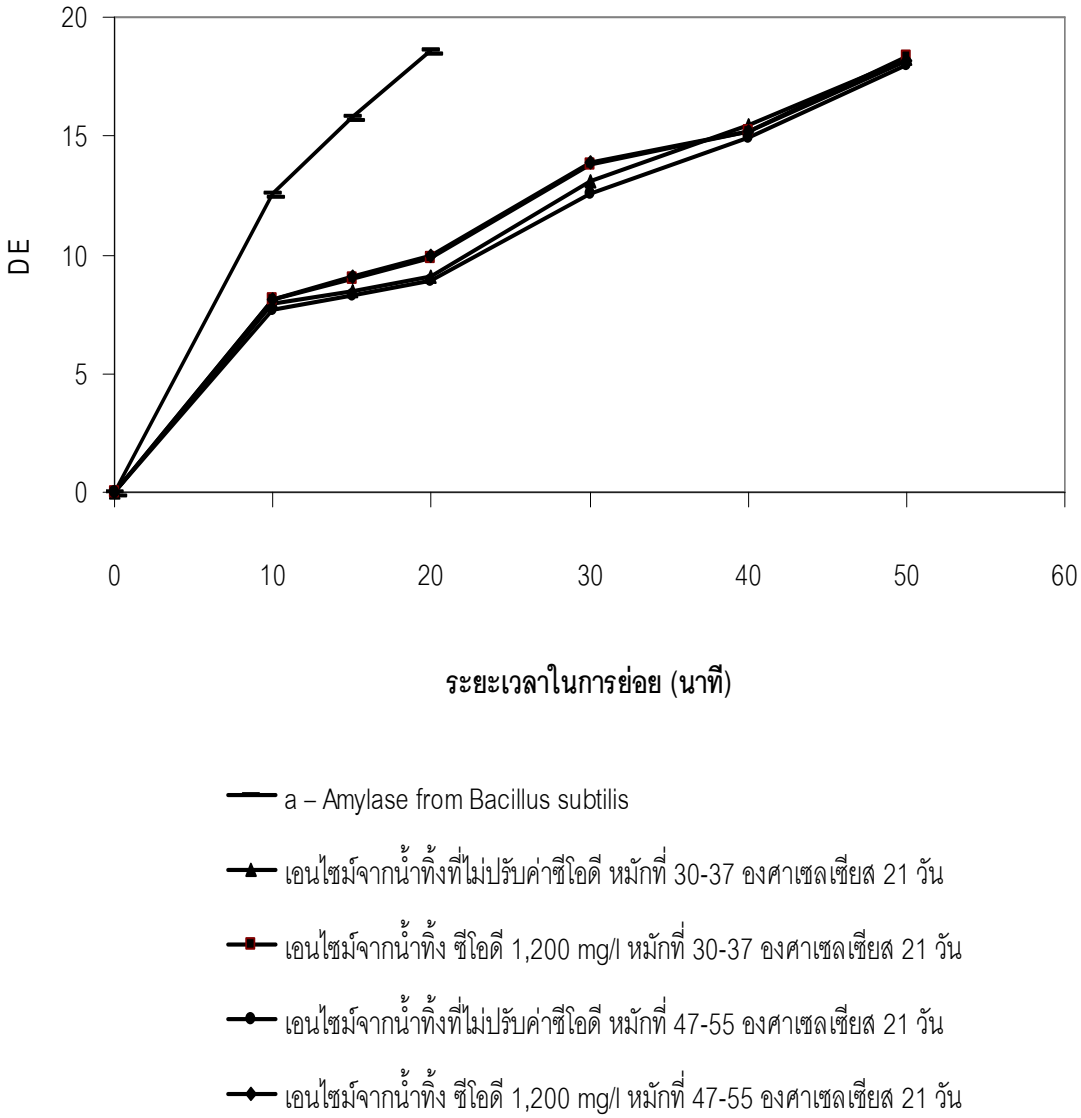
ตาราง 16 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE จากการย่อยสตาร์ชในแป้งมันสำปะหลัง (ของแข็งร้อยละ 25) ด้วยเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* เปรียบเทียบกับเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก ทำการย่อย ณ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 10 – 50 นาที

ชนิดของเอนไซม์	**เวลาย่อย (นาที)**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (ร้อยละ)**	DE
α – Amylase from *Bacillus subtilis*	10	3.14	12.55
	15	3.94	15.78
	20	5.03	18.62
ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	10	1.98	7.91
	20	2.26	9.05
	30	3.54	13.11
	40	4.16	15.42
	50	5.10	18.22
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	10	2.04	8.14
	20	2.46	9.83
	30	3.72	13.80
	40	4.10	15.20
	50	5.12	18.30
ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	10	1.92	7.66
	20	2.24	8.94
	30	3.40	12.59
	40	4.04	14.96
	50	5.03	17.97
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	10	2.03	8.12
	20	2.50	10.00
	30	3.76	13.91
	40	4.10	15.16
	50	5.08	18.14

จากตาราง 16 นำผลการทดลองที่ได้มาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการย่อยกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE ดังแสดงในภาพประกอบ 24 และ 25



ภาพประกอบ 24 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการย่อยแป้ง



ภาพประกอบ 25 แสดงค่า DE ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการย่อยแป้ง

จากภาพประกอบ 24 และ 25 สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* ปริมาณร้อยละ 0.03% ของน้ำหนักแป้งแห้ง พบว่าเมื่อย่อยไปได้ 15 นาที จะได้ค่า DE 15.78 และเมื่อเปรียบเทียบผลของการย่อยแป้งมันสำปะหลังระหว่างเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่สภาวะการทดลองต่างๆ กัน ที่ปริมาณเอนไซม์ 1.35% ของน้ำหนักแป้งแห้ง พบว่าเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักในทุกสภาวะการหมัก ที่เวลาการย่อยเท่ากัน คือ 40 นาที จะได้ค่า DE ประมาณ 15 ใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยได้เลือกสภาวะที่ทำการทดลองผลิตมอลโทเดกซ์ทริน และนำมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ไประเหยน้ำออก ที่อุณหภูมิ 55–60 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE ผลการทดลองแสดงรายละเอียดตามตาราง 17

ตาราง 17 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE จากการย่อยสตาร์ชในแป้งมันสำปะหลัง (ของแข็งร้อยละ 25) ด้วยเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* เปรียบเทียบกับเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก ณ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส หลังการระเหยน้ำ

ชนิดของเอนไซม์	**เวลาย่อย (นาที)**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (ร้อยละ)**	DE
α – Amylase from *Bacillus subtilis* ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	15	9.63	15.46
	40	10.07	15.36
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	40	9.94	15.09
ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	40	9.54	15.08
ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	40	9.85	15.12

จากตาราง 17 พบว่าที่ปริมาณเอนไซม์เท่ากัน 1.35% ของน้ำหนักแป้งแห้ง และที่ระยะเวลาการย่อยเท่ากัน 40 นาที เอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส เวลาหมัก 21 วัน และเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส เวลาหมัก 21 วัน ให้ค่า DE ดังต่อไปนี้ คือ 15.36, 15.09, 15.08 และ 15.12 ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* ใช้ปริมาณเอนไซม์และเวลาที่น้อยกว่า คือ 0.03% ของน้ำหนักแป้งแห้งและเวลา 15 นาที ตามลำดับ ให้ค่า DE 15.46

ตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

เมื่อได้สารละลายมอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้นตามที่ผู้วิจัยต้องการแล้ว นำไปทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ในส่วนของเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* ให้ผลการทดสอบแสดงรายละเอียดตามตาราง 18

ตาราง 18 แสดงคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ที่ได้จากเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis*

คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ตามมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536	**เกณฑ์ที่กำหนด**	**ชนิดของเอนไซม์**
		α – Amylase from *Bacillus subtilis*
ลักษณะชี้บ่ง	สีน้ำเงินปนแดงเล็กน้อย, สีม่วง, สีม่วงแดง, สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง
การละลาย	ละลายน้ำได้บางส่วนหรือทั้งหมด	ละลายน้ำได้ (ค่าการละลาย = 96.18)
ของแข็งทั้งหมด	ร้อยละไม่น้อยกว่า 60	62.29
เถ้าซัลเฟต	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5	0.44
น้ำตาลรีดิวซิง	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 5.0 ถึงน้อยกว่า 20.0	9.63 (DE = 15.46)
โปรตีน	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5	0.09

จากตาราง 18 มอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 คือ เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนแล้ว มีสีน้ำตาลแดง สามารถละลายน้ำได้ มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 62.29 มีเถ้าซัลเฟตร้อยละ 0.44 มีน้ำตาลรีดิวซิงร้อยละ 9.63 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.09

สำหรับผลการทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตจากเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดสอบแสดงรายละเอียดตามตาราง 19

ตาราง 19 แสดงคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ที่ได้จากเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส

คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536	**เกณฑ์ที่กำหนด**	**ชนิดของเอนไซม์**	
		ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน	**ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส / 21 วัน**
ลักษณะชี้บ่ง	สีน้ำเงินปนแดงเล็กน้อย, สีม่วง, สีม่วงแดง, สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง
การละลาย	ละลายน้ำได้บางส่วนหรือทั้งหมด	ละลายน้ำได้ (ค่าการละลาย = 85.94)	ละลายน้ำได้ (ค่าการละลาย = 86.92)
ของแข็งทั้งหมด	ร้อยละไม่น้อยกว่า 60	65.54	65.91
เถ้าซัลเฟต	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5	0.44	0.40
น้ำตาลรีดิวซิง	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 5.0 ถึงน้อยกว่า 20.0	10.07 (DE = 15.36)	9.94 (DE = 15.09)
โปรตีน	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5	0.11	0.12

จากตาราง 19 มอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก ที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาหมัก 21 วัน ทั้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 คือ เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนแล้ว มีสีน้ำตาลแดง สามารถละลายน้ำได้ มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 65.54 และ 65.91 ตามลำดับ มีเถ้าซัลเฟตร้อยละ 0.44 และ 0.40 ตามลำดับ มีน้ำตาลรีดิวซิงร้อยละ 10.07 และ 9.94 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.11 และ 0.12 ตามลำดับ

สำหรับผลการทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตจากเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่หมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดสอบแสดงรายละเอียดตามตาราง 20

ตาราง 20 แสดงคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ที่ได้จากเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่หมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส

คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536	**เกณฑ์ที่กำหนด**	**ชนิดของเอนไซม์**	
		ไม่มีการปรับค่าซีโอดี / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน	**ปรับค่าซีโอดี 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร / อุณหภูมิที่ทำการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส / 21 วัน**
ลักษณะชี้บ่ง	สีน้ำเงินปนแดงเล็กน้อย, สีม่วง, สีม่วงแดง, สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง
การละลาย	ละลายน้ำได้บางส่วนหรือทั้งหมด	ละลายน้ำได้ (ค่าการละลาย = 87.18)	ละลายน้ำได้ (ค่าการละลาย = 86.96)
ของแข็งทั้งหมด	ร้อยละไม่น้อยกว่า 60	63.23	65.18
เถ้าซัลเฟต	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5	0.42	0.40
น้ำตาลรีดิวซิง	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 5.0 ถึงน้อยกว่า 20.0	9.54 (DE = 15.08)	9.85 (DE = 15.12)
โปรตีน	ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น ไม่เกิน 0.5	0.09	0.07

จากตาราง 20 มอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก ที่หมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาหมัก 21 วัน ทั้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 คือ เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนแล้ว มีสีน้ำตาลแดง สามารถละลายน้ำได้ มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 63.23 และ 65.18 ตามลำดับ มีเถ้าซัลเฟตร้อยละ 0.42 และ 0.40 ตามลำดับ มีน้ำตาลรีดิวซิงร้อยละ 9.54 และ 9.85 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.09 และ 0.07 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างมอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และ 47-55 องศาเซลเซียส ทั้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินทั้ง 4 ตัวอย่าง มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 โดยค่าที่ได้จากการทดสอบคุณภาพต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การทดลองการผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ผู้วิจัยสามารถสรุปผลและอภิปรายผลได้ดังนี้ คือ

สรุปผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนและระหว่างการหมัก

ในการทดลองครั้งนี้ น้ำหมักมีแบคทีเรียเริ่มต้นที่ปริมาณความเข้มข้น 9,155 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการหมัก 3 สัปดาห์ ควบคุมพีเอชที่ 7 ตลอดการทดลอง

ผลจากการหมักเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปรากฏว่ามีแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในทุกสภาวะการทดลอง โดยน้ำหมักที่หมักครบ 21 วัน ที่อุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส คือเพิ่มขึ้น 173.32 – 245.83% (เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี) 94.40 – 137.41% (เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเพิ่มขึ้น 24.01 – 30.48% (เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี) 30.62 – 53.29% (เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ

หากทำการหมักที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียสต่อไป มีแนวโน้มว่าการเติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียน้อยลงเรื่อยๆ หรือคงที่ ในขณะที่การเติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี จะยังคงมีการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียออกไปอีกระยะหนึ่ง

การหมักที่อุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส พบว่าในสัปดาห์แรกของการหมัก มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ของการหมัก การเติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณของแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ ในขณะที่การเติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี ยังคงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 2 และค่อนข้างคงที่เมื่อผ่านสัปดาห์ที่ 3 หากทำการหมักต่อไป มีแนวโน้มว่าแบคทีเรียจะมีปริมาณคงที่หรือใกล้เคียงกับที่ระยะเวลาหมัก 21 วัน

ตอนที่ 2 การทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

นำน้ำหมักที่ระยะเวลาการหมัก 21 วัน มาทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและน้ำหมักที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส รวมถึงน้ำหมักที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลทที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตร ส่วนน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี ที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลทที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตรเมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีน

นำเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสตั้งแต่ 1.0 เซนติเมตรขึ้นไปมาสกัดเอนไซม์อะไมเลส และทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 30–37 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี คือ 52.57 และ 42.71 หน่วย ตามลำดับ

เชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 47–55 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีทั้ง 2 ไอโซเลท คือ 64.46, 16.34 และ 34.07 หน่วย ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 47 – 55 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงมากกว่าเชื้อแบคทีเรียจากสภาวะการทดลองอื่น

ตอนที่ 3 การทดสอบการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 – 50 นาที พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย เมื่อเปรียบเทียบผลของการย่อยแป้งมันสำปะหลังระหว่างเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่สภาวะการทดลองต่างๆ กัน ที่ปริมาณเอนไซม์ 1.35% ของน้ำหนักแป้งแห้ง เวลาการย่อย 40 นาที พบว่าเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส ให้ค่า DE ใกล้เคียงกัน คือ 15.36, 15.09, 15.08 และ 15.12

ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* ใช้ปริมาณเอนไซม์และเวลาที่น้อยกว่า คือ 0.03% ของน้ำหนักแป้งแห้งและเวลา 15 นาที ตามลำดับ ให้ค่า DE 15.46

ตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

นำสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้นที่ผลิตได้ ไปทดสอบคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ α – Amylase from *Bacillus subtilis* มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 คือ เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนแล้ว มีสีน้ำตาลแดง สามารถละลายน้ำได้ มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 62.29 มีเถ้าซัลเฟตร้อยละ 0.44 มีน้ำตาลรีดิวซิงร้อยละ 9.63 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.09

มอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส ทั้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี และมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 คือ เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนแล้ว มีสีน้ำตาลแดง สามารถละลายน้ำได้ มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 65.54, 65.91, 63.23 และ 65.18 ตามลำดับ มีเถ้าซัลเฟตร้อยละ 0.44, 0.40, 0.42 และ 0.40 ตามลำดับ มีน้ำตาลรีดิวซิงร้อยละ 10.07, 9.94, 9.54 และ 9.85 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.11, 0.12, 0.09 และ 0.07 ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงว่าสามารถผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังได้ และมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตได้มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536

สำหรับวิธีการหมักเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ได้เอนไซม์อะไมเลสนั้น สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส และน้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนที่ใช้เป็นอาหารสำหรับแบคทีเรียนั้น สามารถใช้ได้ทั้งน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและน้ำทิ้งมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม คือ 21 วัน เนื่องจากหากทำการหมักนานกว่านี้ ปริมาณแบคทีเรียจากการหมักมีแนวโน้มคงที่ ไม่เพิ่มปริมาณมากขึ้นกว่าเดิม

นำน้ำหมักที่ระยะเวลาการหมัก 21 วัน มาทำการสกัดเอนไซม์อะไมเลสและทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าอยู่ระหว่าง 16.34 – 64.46 หน่วย เมื่อนำเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากการทดลองไปผลิตมอลโทเดกซ์ทริน ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.35% ของน้ำหนัก

แป้งแห้ง เวลาการย่อย 40 นาที ได้มอลโทเดกซ์ทรินที่มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ดังต่อไปนี้

1. ลักษณะชี้บ่ง ให้สีน้ำตาลแดง

2. การละลาย สามารถละลายน้ำได้ มีค่าการละลายร้อยละ 85.94 – 87.18

3. ของแข็งทั้งหมด ร้อยละ 63.23 – 65.91

4. เถ้าซัลเฟต ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 0.40 – 0.44

5. น้ำตาลรีดิวซิง ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 9.54 – 10.07 (คิดเป็นค่า DE 15.08 – 15.36)

6. โปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 0.07 – 0.12

เมื่อพิจารณาจากสมมุติฐานการวิจัยที่ตั้งไว้ พบว่า

1. เอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณซีโอดีในน้ำทิ้งที่ใช้ในการหมักและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักแตกต่างกัน เมื่อนำมาทดลองผลิตมอลโทเดกซ์ทรินแล้ว มีผลทำให้คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ไม่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างมอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินทั้ง 4 ตัวอย่าง มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 โดยค่าที่ได้จากการทดสอบคุณภาพต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากในขั้นตอนการวิจัยมีขั้นตอนการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และผู้วิจัยได้นำเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสตั้งแต่ 1.0 เซนติเมตรขึ้นไปมาทำการทดลองในขั้นต่อไป ซึ่งจากผลการคัดเลือกแบคทีเรียนี้ ทำให้ได้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ให้แอคติวิตีใกล้เคียงกัน เมื่อนำไปผลิตเป็นมอลโทเดกซ์ทริน จึงให้คุณภาพใกล้เคียงกัน

2. เอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังที่มีระยะเวลาที่ใช้ในการหมักแตกต่างกัน เมื่อนำมาทดลองผลิตมอลโทเดกซ์ทรินแล้ว มีผลทำให้คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ไม่แตกต่างกัน

เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการหมักน้ำทิ้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ วิเคราะห์น้ำหมักในวันที่ 7, 14 และ 21 จากนั้นนำน้ำหมักที่มีปริมาณแบคทีเรียสูงที่สุดในแต่ละสภาวะที่ทำการทดลองมาทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและทดลองผลิต

มอลโทเดกซ์ทรินต่อไป ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลาหมัก 21 วัน ทุกสภาวะการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียสูงที่สุด ดังนั้นเมื่อนำน้ำหมักที่หมักเป็นระยะเวลา 21 วัน มาทำการทดลองในขั้นต่อไป จึงมีผลทำให้คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินที่ได้ไม่แตกต่างกัน

3. เอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง เมื่อนำมาทดลองผลิตมอลโทเดกซ์ทริน โดยระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยแป้งแตกต่างกัน มีผลทำให้คุณภาพของมอลโทเดกซ์ทรินตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 แตกต่างกัน นั่นคือ เมื่อทำการย่อยแป้งเป็นระยะเวลา 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE ของมอลโทเดกซ์ทรินจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย

4. มอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 โดยค่าที่ได้จากการทดสอบคุณภาพต่างๆ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ คือ ลักษณะชี้บ่ง มีสีน้ำตาลแดง การละลาย สามารถละลายน้ำได้ มีค่าการละลายร้อยละ 85.94 – 87.18 ของแข็งทั้งหมด ร้อยละ 63.23 – 65.91 เถ้าซัลเฟต ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 0.40 – 0.44 น้ำตาลรีดิวซิง ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 9.54 – 10.07 และโปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนักไม่รวมความชื้น 0.07 – 0.12

อภิปรายผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพน้ำทิ้งก่อนและระหว่างการหมัก

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง โดยน้ำหมักมีแบคทีเรียเริ่มต้นที่ปริมาณความเข้มข้น 9,155 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการหมัก 3 สัปดาห์ ควบคุมพีเอชที่ 7 ตลอดการทดลอง ผลปรากฏว่ามีแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในทุกสภาวะการทดลอง โดยน้ำหมักที่หมักครบ 21 วัน ที่อุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส คือเพิ่มขึ้น 173.32 – 245.83% (เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี) 94.40 – 137.41% (เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเพิ่มขึ้น 24.01 – 30.48% (เติมน้ำทิ้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี) 30.62 – 53.29% (เติมน้ำทิ้งที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ

การเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ เนื่องจากในน้ำทิ้งที่ใช้ในการทดลองนั้นมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังปะปนอยู่มาก ซึ่งแบคทีเรียในน้ำหมักสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญและอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักแบบ

ไร้อากาศ สอดคล้องกับพรรษมณฑ์ แซ่จั่ง (2546: 116) ที่ทดลองหมักน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์แบบไร้อากาศและหมักแบบต่อเนื่อง โดยมีการเติมสารอาหารให้กับแบคทีเรียทุกวัน เป็นเวลา 21 วัน พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสอดคล้องกับธงชัย พรรณสวัสดิ์ (2525: 258) ที่กล่าวว่า อุณหภูมิในระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนอิสระนั้น แบคทีเรียสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม 2 ช่วง คือ ช่วงเมโซฟิลิค (Mesophilic range) คือช่วงอุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และช่วงเทอร์โมฟิลิค (Thermophilic range) คือช่วงอุณหภูมิ 47–55 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้แบคทีเรียจะทำงานได้ไม่ดี ประสิทธิภาพของระบบจะลดต่ำลง

ตอนที่ 2 การทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการทดสอบการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

นำน้ำหมักที่ระยะเวลาการหมัก 21 วัน มาทดสอบการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีและน้ำหมักที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส รวมถึงน้ำหมักที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลทที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตร ส่วนน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี ที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 47-55 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลทที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 1.0 เซนติเมตรเมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีน

ในน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังจะมีแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสปะปนอยู่มาก ดังนั้น เมื่อนำน้ำหมักจากการทดลองมาเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Starch agar ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยแป้ง เมื่อทดสอบโดยการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนี แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะให้บริเวณใสรอบโคโลนี และแบคทีเรียที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงจะให้บริเวณใสรอบโคโลนีกว้างมากกว่าแบคทีเรียที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสต่ำ

สอดคล้องกับ ลัดถาพร ศรีมหาสงคราม (2525: 38) ที่ทดลองเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ มาทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูง โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารวุ้นแป้งมันสำปะหลัง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ราดทับด้วยสารละลายไอโอดีน แบคทีเรียที่สร้างวงใสรอบโคโลนีแสดงว่าสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ เลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างวงใสรอบโคโลนีกว้าง 5 – 10 มิลลิเมตร พบว่ามีเชื้อที่สร้างวงใสอยู่ในช่วงนี้ 112 เชื้อ โดยตัวอย่างที่เป็นน้ำนั้นพบว่า น้ำตามหนองบึงพบจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสน้อยกว่าน้ำทิ้งจากโรงงานที่เกี่ยวข้องกับ

การใช้แป้งหรือผลทางการเกษตรที่จะให้แป้ง เช่น ถั่ว ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง เป็นต้น แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสปะปนอยู่มากในน้ำทิ้งจากโรงงานเนื่องจากสามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้

นำเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสตั้งแต่ 1.0 เซนติเมตรขึ้นไปมาสกัดเอนไซม์อะไมเลส และทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 30–37 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี คือ 52.57 และ 42.71 หน่วย ตามลำดับ

เชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 47–55 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดีทั้ง 2 ไอโซเลท คือ 64.46, 16.34 และ 34.07 หน่วย ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่ใช้อุณหภูมิในการหมัก 47–55 องศาเซลเซียส ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสสูงมากกว่าเชื้อแบคทีเรียจากสภาวะการทดลองอื่น

แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่างชนิดกัน จากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียจากน้ำหมักที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ทั้งหมดอยู่ในจีนัส *Bacillus* แต่ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นสปีชีส์ใด แบคทีเรียแต่ละชนิดจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์แตกต่างกัน และแบคทีเรียแต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

สอดคล้องกับพรรษมณฑ์ แซ่จั่ง (2546: 45 - 46) ที่กล่าวว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั่วไปมีเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีตลอดจนทนต่อการแปรเปลี่ยนของอุณหภูมิในช่วงที่ต่างกัน จุลินทรีย์แต่ละชนิดจึงมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญมากที่สุด หรือ Optimum temperature ต่างกัน เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงหรือสูงกว่า Optimum temperature จุลินทรีย์จะเจริญช้าลง โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีมากมาย ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus, B. stearothermophilus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Aerobacillus macerans*, *Bacterium cassavanum, Actinomyces microflavus*, Sarcina sp. ซึ่งสอดคล้องกับลัดถาพร ศรีมหาสงคราม (2525: 50) ที่กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในขณะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสสำหรับเชื้อ *B. subtilis* คือ 30 – 35 องศาเซลเซียส และเชื้อ *B. amyloliquefaciens* คือ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ *B. stearothermophilus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ *B. coagulans* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ตอนที่ 3 การทดสอบการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 – 50 นาที พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและค่า DE จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย เมื่อเปรียบเทียบผลของการย่อยแป้งมันสำปะหลังระหว่างเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่สภาวะการทดลองต่างๆ กัน ที่ปริมาณเอนไซม์ 1.35% ของน้ำหนักแป้งแห้ง เวลาการย่อย 40 นาที พบว่าเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 30-37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี, ที่มีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 47-55 องศาเซลเซียส ให้ค่า DE ใกล้เคียงกัน คือ 15.36, 15.09, 15.08 และ 15.12 ตามลำดับ

เอนไซม์อะไมเลสจะย่อยพันธะ α-1,4 แบบสุ่มภายในโมเลกุลของแป้ง ในช่วงแรกการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และช้าลงในเวลาต่อมาเนื่องจากมีความเฉพาะเจาะจงต่อการย่อยมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรุ่งนภา ประดิษฐพงษ์ (2539: 194) ที่ทดลองผลิตมอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวโดยเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลส ทำการย่อยสตาร์ชที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0.05 ของน้ำหนักแป้งแห้ง ปริมาตรน้ำแป้ง 50 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อย่อยสตาร์ชนานขึ้นจะมีปริมาณสตาร์ชเหลว ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและ DE เพิ่มขึ้น

ตอนที่ 4 การทดสอบคุณภาพของมอลโทเดกซ์ทริน

จากการนำสารละลายมอลโทเดกซ์ทรินเข้มข้นที่ผลิตได้ ไปทดสอบคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักที่หมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และ 47–55 องศาเซลเซียส ทั้งที่ไม่มีการปรับค่าซีโอดี และมีการปรับค่าซีโอดีเป็น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 คือ เมื่อทดสอบกับสารละลายไอโอดีนแล้ว มีสีน้ำตาลแดง สามารถละลายน้ำได้ มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 65.54, 65.91, 63.23 และ 65.18 ตามลำดับ มีเถ้าซัลเฟตร้อยละ 0.44, 0.40, 0.42 และ 0.40 ตามลำดับ มีน้ำตาลรีดิวซิงร้อยละ 10.07, 9.94, 9.54 และ 9.85 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.11, 0.12, 0.09 และ 0.07 ตามลำดับ

มอลโทเดกซ์ทรินที่ได้จากการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังทุกตัวอย่าง มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ได้แก่ ลักษณะชี้บ่ง การละลาย ของแข็งทั้งหมด

เถ้าซัลเฟต น้ำตาลรีดิวซิงและโปรตีน เนื่องจากในระหว่างการทดลอง มีขั้นตอนการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยผู้วิจัยได้นำเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสตั้งแต่ 1.0 เซนติเมตรขึ้นไปมาทำการทดลองในขั้นต่อไป ซึ่งจากผลการคัดเลือกแบคทีเรียนี้ ทำให้ได้แบคทีเรียที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสใกล้เคียงกันในทุกสภาวะการทดลอง เมื่อนำแบคทีเรียไปสกัดเอนไซม์อะไมเลสและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส จึงส่งผลให้แอคติวิตีไม่แตกต่างกันมากในแต่ละตัวอย่าง ทำให้มอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตได้มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 โดยค่าที่ได้จากการทดสอบคุณภาพต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่าจะมีสภาวะที่ใช้ในการหมักแตกต่างกันก็ตาม

จากการนำน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังมาทำการหมักเพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และสกัดเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียเพื่อนำไปผลิตมอลโทเดกซ์ทรินที่มีมาตรฐานตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 เดกซ์ทรินสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าสามารถทำได้จริง แต่เมื่อเทียบกับเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลส ที่ใช้ทางการค้าแล้ว เอนไซม์ที่ผลิตได้ มีแอคติวิตีหรือประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลรีดิวซิงต่ำกว่า ซึ่งในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยเห็นว่าสามารถนำน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ แต่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มากขึ้นและขยายการผลิตเพิ่มขึ้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้งานได้จริงในระดับอุตสาหกรรมและผลิตเพื่อเป็นการค้าต่อไป

ข้อเสนอแนะทั่วไป

จากผลการวิจัย พบว่าสามารถผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังได้ และมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตได้มีคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1171 – 2536 ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะดังนี้

1. สนับสนุนให้โรงงานที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง เห็นถึงความสำคัญในการนำน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากการนำน้ำทิ้งมาทำการหมักเพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และสกัดเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียเพื่อนำไปผลิตมอลโทเดกซ์ทรินสามารถทำได้จริง และเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มจากของเหลือใช้ได้ ลดการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศ ช่วยลดภาระทางการเงินและเวลาในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงาน และยังเป็นการลดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

2. สนับสนุนให้บุคลากรหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่มีศักยภาพเพียงพอ ทำการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเพิ่มกำลังการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อนำไปสู่การผลิตเพื่อเป็นการค้าและสามารถนำไปใช้งานได้จริงในระดับอุตสาหกรรม

ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

1. ศึกษาหาสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ในขั้นตอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีแอคติวิตีสูงสุดและเปรียบเทียบวิธีการต่างๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เพื่อให้สามารถนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังเป็นจำนวนมาก โดยขยายกำลังการผลิตเพิ่มขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปสู่การผลิตที่เป็นการค้าและเป็นการยืนยันผลการทดลองอีกครั้งหนึ่ง

3. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). *คู่มือการประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐนิเวศน์ อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง.* กรุงเทพฯ: กรมโรงงานอุตสาหกรรม.

กล้าณรงค์ ศรีรอต; และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กล้าณรงค์ ศรีรอต; และคนอื่นๆ. (2542). *การแปรรูปและการใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง.* ใน เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ โครงการเพื่อบรรเทาผลกระทบทางสังคมเนื่องจากวิกฤตการณ์ทางเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล; สุมาลี เหลืองสกุล; และ สมใจ ศิริโภค. (2540). *การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล; สุมาลี เหลืองสกุล; และ สมใจ ศิริโภค. (2541). *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

จิราพร นาวารักษ์. (2542). *การทำเอนไซม์อะมิเลสจากเมล็ดข้าวสาลีงอกให้บริสุทธิ์บางส่วนและการประยุกต์ใช้ผลิตสารจับกลิ่นหอม.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

เดชา พิมพิสุทธิ์. (2550). *การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐนิเวศน์ อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง.* หนังสือครบรอบ 30 ปี สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. (2525). *คู่มือการวิเคราะห์น้ำทิ้ง.* กรุงเทพฯ: คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำทิ้งสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). *จุลชีววิทยาทั่วไป.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). *เอ็นไซม์ทางอาหาร.* กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง. (2546). *การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ถ่ายเอกสาร.

พรรษมณฑ์ แซ่จั่ง. (2546). *ศึกษาการลอกแป้งบนผืนผ้าด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (อุตสาหกรรมศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

รุ่งนภา ประดิษฐพงษ์. (2539). *การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวโดยเอนไซม์แอลฟา-อะมิเลสเพื่อใช้รักษากลิ่นหอมของข้าวสาร.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ลัตถาพร ศรีมหาสงคราม. (2525). *การผลิตเอนไซม์อมิเลสจากบักเตรีเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย. (2553). *สถิติส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังไทย (2001 – ปัจจุบัน)*. สืบค้นเมื่อ 18 กุมภาพันธ์ 2553, จาก http://www.thaitapiocastarch.org/export.asp

สมใจ ศิริโภค. (2537). *เทคโนโลยีการหมัก.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สมลักษณ์ เนาวรัตน์พนมมาศ. (2538). *การผลิตและการใช้กลูโคสไซรัปจากสตาร์ชข้าวโพดในไอศกรีม.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2539). *จุลชีววิทยาทางอาหาร.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. (2545). *การทดลองการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์.* นครปฐม: สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2521). *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กลูโคสซีรัป มอก. 268 – 2521 เล่ม 95 ตอนที่ 100.* กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2535). *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม แป้งดัดแปรสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร มอก. 1173 – 2535 เล่ม 109 ตอนที่ 14.* กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2536). *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เดกซ์ทริน สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร มอก. 1171 – 2536 เล่ม 110 ตอนที่ 107.* กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2552). *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2551*. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). *สถิติการส่งออก (Export) แป้งมันสำปะหลัง : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน.* สืบค้นเมื่อ 18 กุมภาพันธ์ 2553, จาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php

Asgher, M.; et al. (2007). A thermostable α – amylase from the moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*. (79): 950.

Bernfeld, Peter. (1955). Amylases, α and β. *In Methods in Enzymology*. Colowick, S. P.; & Kaplan, N. O. V.1. pp. 149-158. New York: Academic Press.

Brooks, J. R.; & Griffin, V. K. (1987, May). Liquefaction of Rice Starch from Milled Rice Flour Using Heat - Stable Alpha - Amylase. *Journal of Food Science.* (52): 712 – 714.

Helrich, Kenneth. (1990a). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Volume One.* 15th ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, Inc.

----------. (1990b). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Volume Two.* 15th ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, Inc.

James, C.S. (1995). *Analytical Chemistry of Food*. London: Chapman & Hall.

Jin, Fengxie.; et al. (2001). Thermostable α – amylase and α – galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp.JF strain. *Process Biochemistry*. (36): 559 – 564.

Pomeranz, Yeshajahu.; & Meloan, Clifton E. (1994). *Food Analysis: Theory and Practice.* 3rd ed. New York: Chapman & Hall.

Prakash, B.; et al. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali – stable α – amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry.* (44): 210 – 215.

Thomas. D. J.; & Atwell, W. A. (1999). *Starches.* Minnesota: Eagan Press.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
จดหมายขอความอนุเคราะห์

ที่ ศธ 0519.12/8330

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

11 มิถุนายน 2552

เรื่อง ขอความอนุเคราะห์เพื่อการวิจัย

เรียน กรรมการผู้จัดการ บริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด

เนื่องด้วย นางสาวชโลธร วันแอเลาะห์ นิสิตระดับปริญญาโท สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้รับอนุมัติให้ทำปริญญานิพนธ์ เรื่อง "การผลิตมอลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง" โดยมี อาจารย์ ดร.ไพรัช วงศ์ยุทธไกร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ถนอมสิน ดิสถาพร เป็นคณะกรรมการควบคุมการทำปริญญานิพนธ์ ในการนี้ นิสิตมีความประสงค์จะขอความอนุเคราะห์น้ำทิ้งจากบริเวณบ่อตกตะกอนและแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสียของ บริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด เพื่อนำมาเป็นกลุ่มตัวอย่างสำหรับการวิจัยงานปริญญานิพนธ์

จึงเรียนมาเพื่อขอความอนุเคราะห์ ได้โปรดพิจารณาให้ นางสาวชโลธร วันแอเลาะห์ ได้เก็บข้อมูลเพื่อการวิจัย และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

สำนักงานคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
โทร. 0-2649-5067

หมายเหตุ : สอบถามข้อมูลเพิ่มเติมกรุณาติดต่อนิสิต โทรศัพท์ 081-4053-931

ที่ ศธ 0519.12/1009

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

๗ ตุลาคม 2552

เรื่อง ขอความอนุเคราะห์เพื่อการวิจัย

เรียน กรรมการผู้จัดการ บริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด

เนื่องด้วย นางสาวชโลธร วันแอเลาะห์ นิสิตระดับปริญญาโท สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้รับอนุมัติให้ทำปริญญานิพนธ์ เรื่อง "การผลิตมวลโทเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง" โดยมี อาจารย์ ดร.ไพรัช วงศ์ยุทธไกร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ถนอมสิน ดิสถาพร เป็นคณะกรรมการควบคุมการทำปริญญานิพนธ์ ในการนี้ นิสิตมีความจำเป็นต้องเก็บข้อมูลเพื่อการวิจัย โดยขอใช้สถานที่และเครื่องมือพื้นฐานในการวิจัย บริเวณห้องปฏิบัติการพัฒนาผลิตภัณฑ์ สำหรับการวิจัยงานปริญญานิพนธ์ ในระหว่างเดือนตุลาคม 2552

จึงเรียนมาเพื่อขอความอนุเคราะห์ ได้โปรดพิจารณาให้ นางสาวชโลธร วันแอเลาะห์ ได้ใช้เครื่องมือดังกล่าว และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

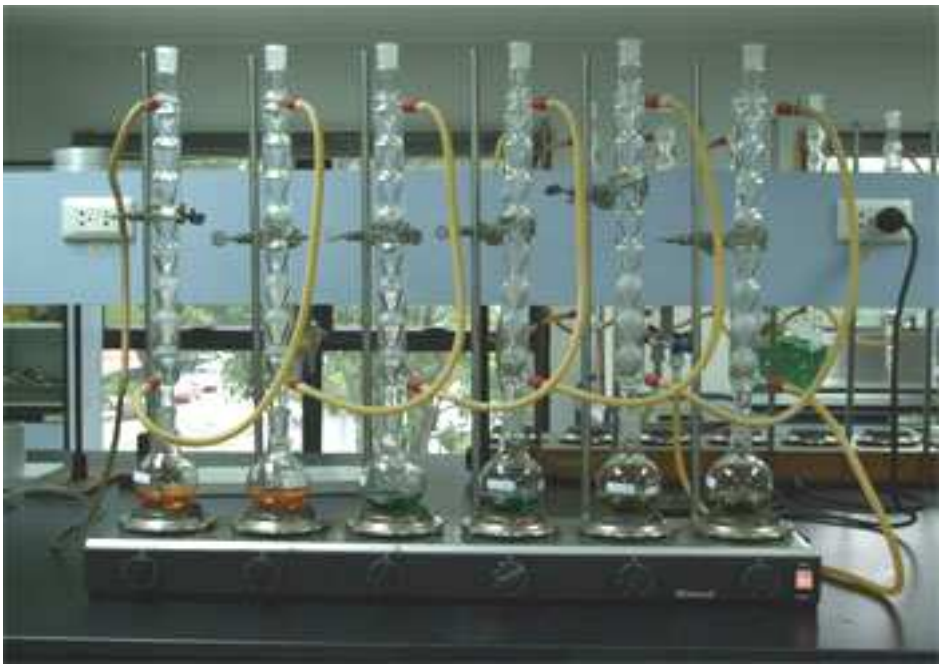
สำนักงานคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
โทร. 0-2649-5067
หมายเหตุ : สอบถามข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อนิสิต โทรศัพท์ 081-4053-931

ภาคผนวก ข

ภาพแสดงขั้นตอนในการทดสอบและภาพประกอบเกี่ยวกับอุปกรณ์

ภาพประกอบ 26 แสดงบ่อบำบัดน้ำทิ้งของบริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด

ภาพประกอบ 27 แสดงบ่อบำบัดน้ำเสีย บริเวณบ่อที่ 6 ของบริษัท สยาม มอดิฟายด์ สตาร์ช จำกัด ซึ่งเป็นจุดที่เก็บแบคทีเรีย

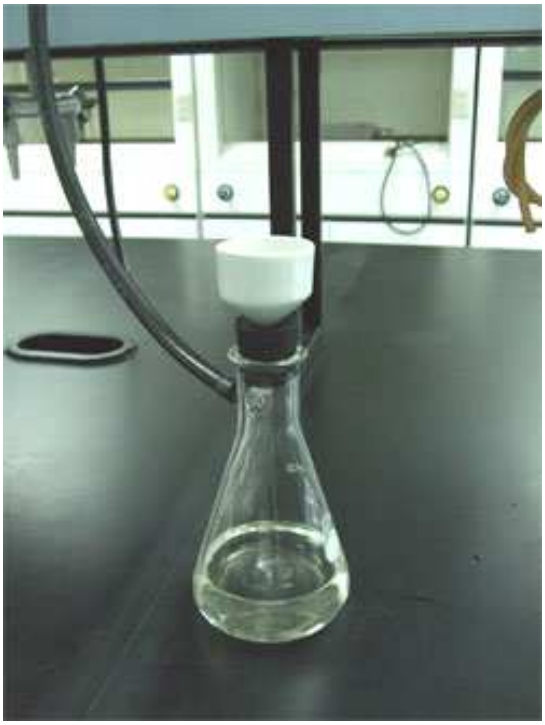


ภาพประกอบ 28 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการรีฟลักซ์หาปริมาณซีโอดี

ภาพประกอบ 29 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการติเตรต
เพื่อหาจุดสมมูลย์

ภาพประกอบ 30 แสดงสีของสารละลายที่
เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อถึงจุดสมมูลย์

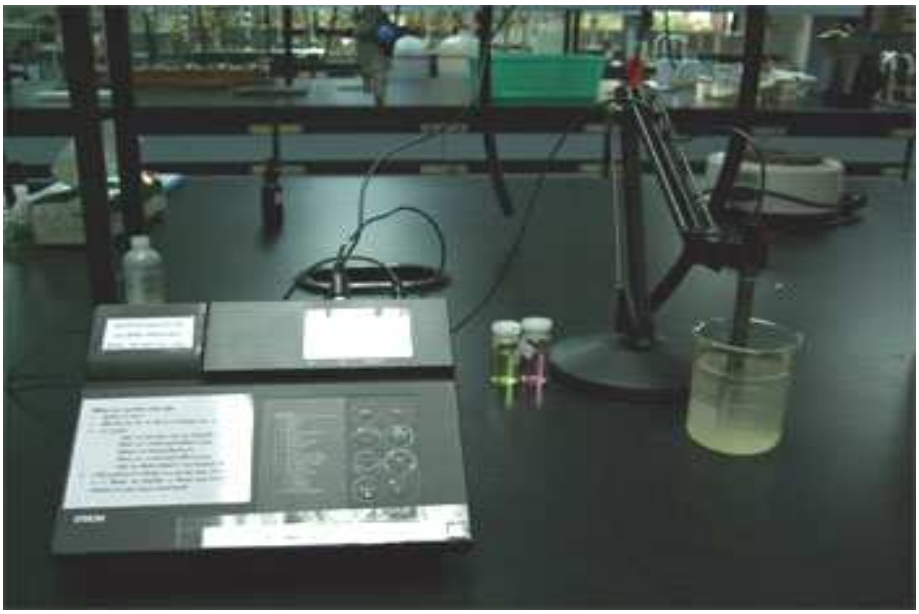
ภาพประกอบ 31 แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งหมด



ภาพประกอบ 32 แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย

ภาพประกอบ 33 แสดงวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย

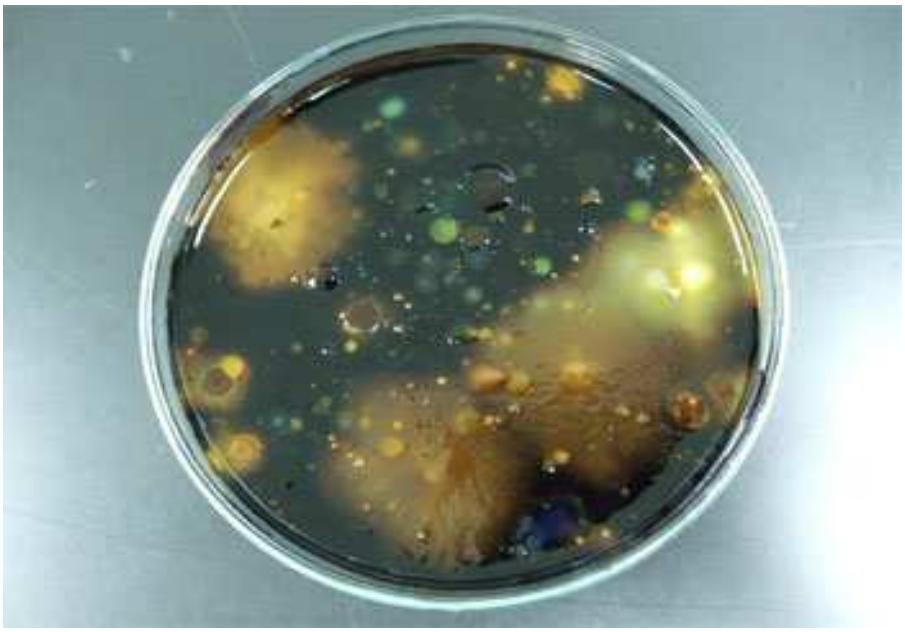
ภาพประกอบ 34 แสดงการนำกระดาษกรองเข้าเตาเผา 550 องศาเซลเซียสเพื่อหาปริมาณสารแขวนลอยระเหย



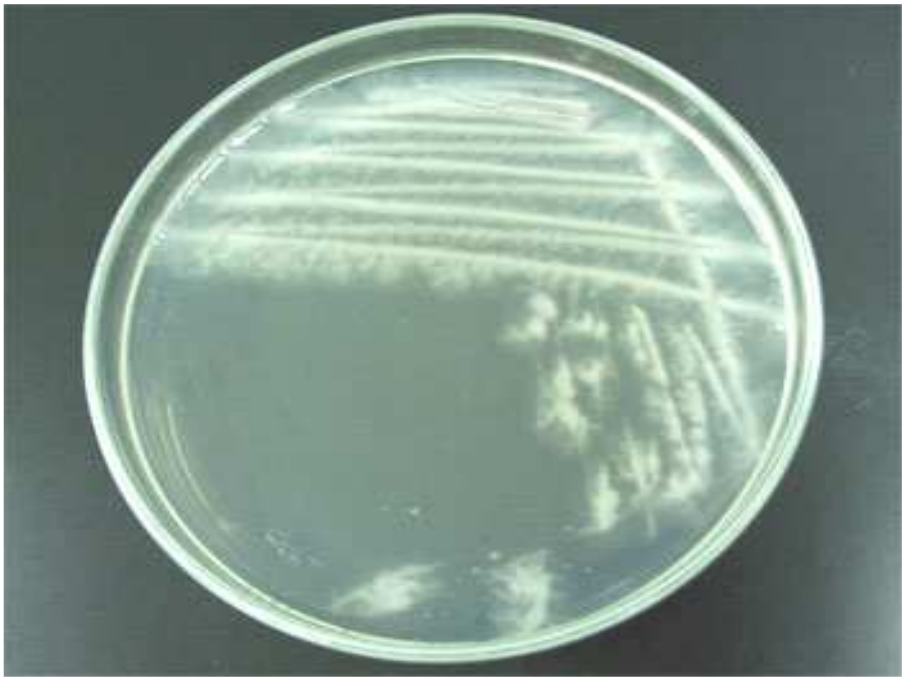
ภาพประกอบ 35 แสดงการวัดพีเอชของน้ำทิ้งด้วยพีเอชมิเตอร์

ภาพประกอบ 36 แสดงการบ่มจานเพาะเชื้อในเครื่องบ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำเพื่อทำการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

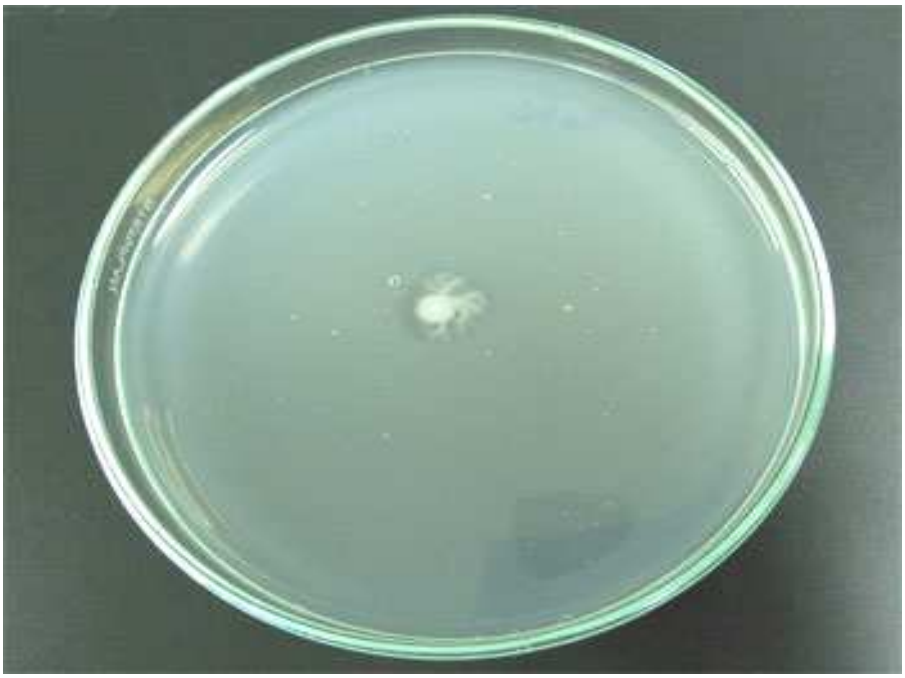
ภาพประกอบ 37 แสดงโคโลนีของเชื้อ บนอาหารแข็ง Starch agar



ภาพประกอบ 38 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ย่อยสลาย Starch



ภาพประกอบ 39 แสดงโคโลนีของเชื้อที่เกิดจากการ Streak plate บนอาหารแข็ง Starch agar

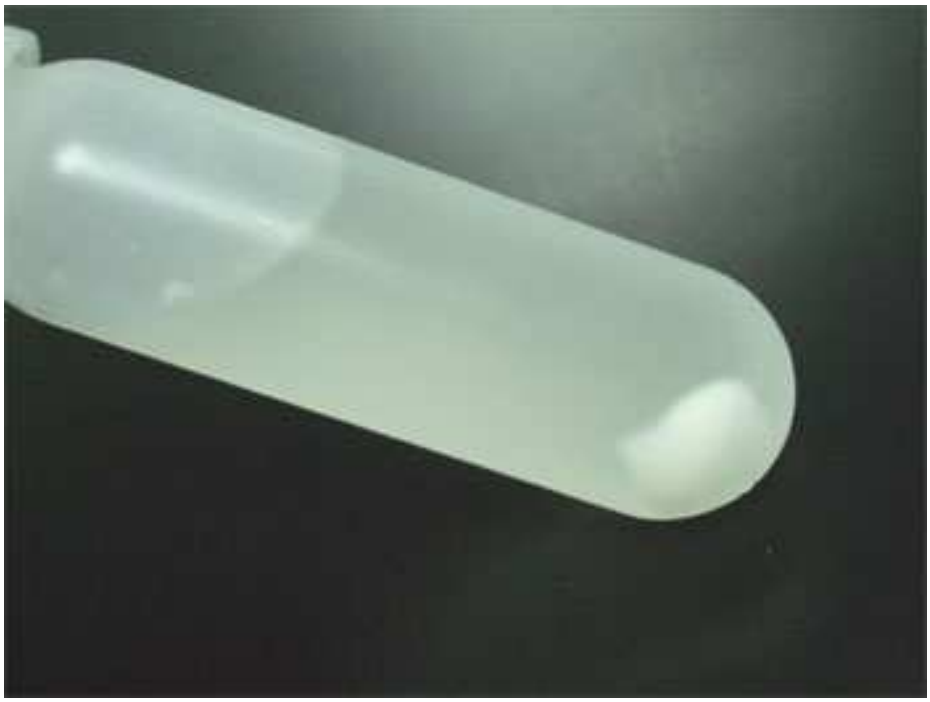


ภาพประกอบ 40 แสดงโคโลนีของเชื้อที่เกิดจากการเพาะเชื้อแบบ Point inoculation บนอาหารแข็ง Starch agar

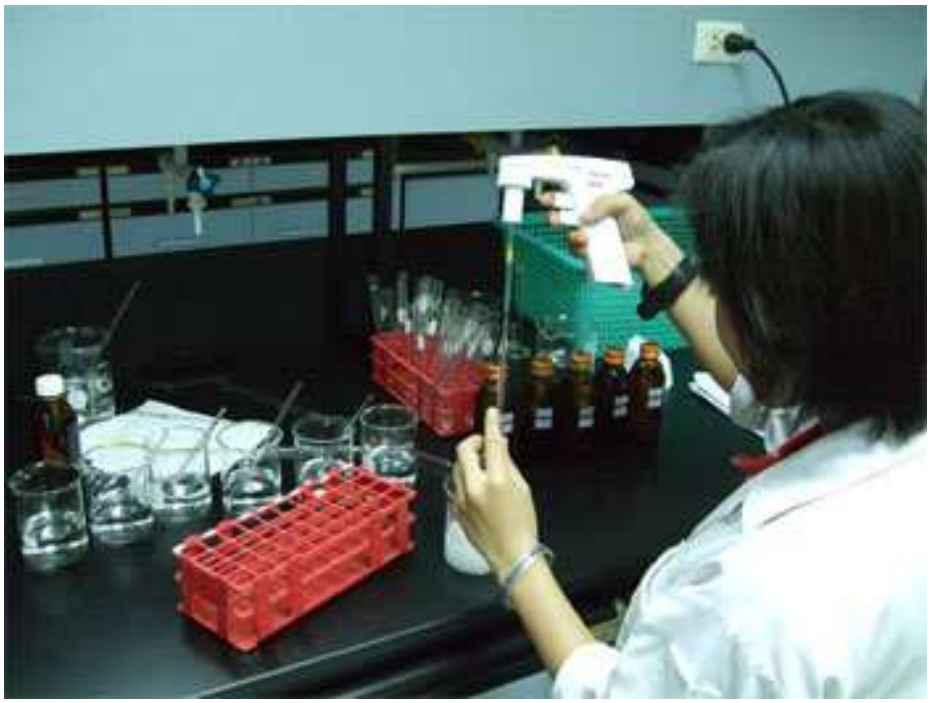
ภาพประกอบ 41 แสดงการบ่มเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิสำหรับการบ่มเชื้อจุลินทรีย์

ภาพประกอบ 42 แสดงขั้นตอนการปั่นแยกเซลล์โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ

ภาพประกอบ 43 แสดงการทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยวิธี Solvent precipitation



ภาพประกอบ 44 แสดงตะกอนเอนไซม์ที่ได้จากการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ



ภาพประกอบ 45 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

ภาพประกอบ 46 แสดงอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

ภาพประกอบ 47 แสดงเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

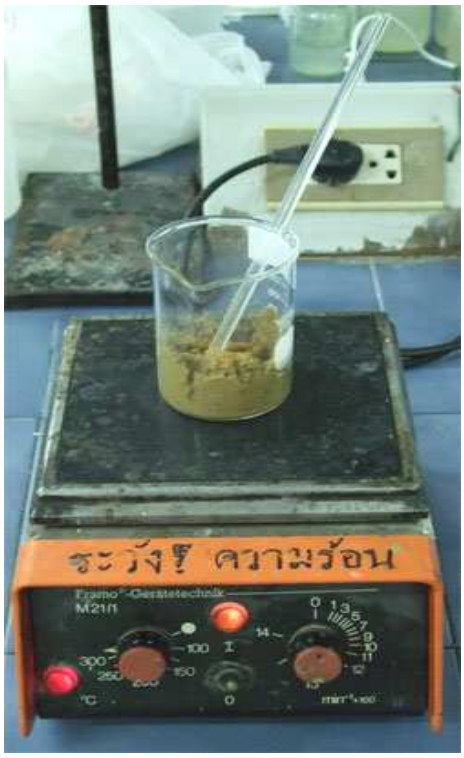
ภาพประกอบ 48 แสดงสารละลายที่ใช้หากราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ภาพประกอบ 49 แสดงการผลิตมอลโทเดกซ์ทริน

ภาพประกอบ 50 แสดงมอลโทเดกซ์ทรินที่ผลิตได้

ภาพประกอบ 51 แสดงผลการทดสอบลักษณะชี้บ่งของมอลโทเดกซ์ทริน

ภาพประกอบ 52 แสดงวิธีการทดสอบการละลายของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนก่อนนำไประเหยแห้ง



ภาพประกอบ 53 แสดงวิธีการหาของแข็งทั้งหมดของมอลโทเดกซ์ทริน

ภาพประกอบ 54 แสดงวิธีการหาเถ้าซัลเฟตของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนให้ความร้อนบน Hot plate จนตัวอย่างกลายเป็นเถ้า

ภาพประกอบ 55 แสดงวิธีการหาเถ้าซัลเฟตของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส

ภาพประกอบ 56 แสดงวิธีการหาน้ำตารีดิวซิงของมอลโทเดกซ์ทริน

ภาพประกอบ 57 แสดงวิธีการหาโปรตีนของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนการย่อยโดยใช้ H_2SO_4

ภาพประกอบ 58 แสดงวิธีการหาโปรตีนของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนการกลั่นแอมโมเนีย

ภาพประกอบ 59 แสดงวิธีการหาโปรตีนของมอลโทเดกซ์ทริน ขั้นตอนการติเตรตกับ H_2SO_4

ภาคผนวก ค
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1. Starch agar

Agar	12	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Beef extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร, pH 7.0

2. Inoculum medium

Soluble starch	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร, pH 7.0

3. Production medium

Corn starch	15	กรัม
Casein hydrolysate	10	กรัม
KH_2PO_4	3	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร, pH 7.0

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวชโลธร วันแอเลาะห์
วันเดือนปีเกิด	25 ตุลาคม 2524
สถานที่เกิด	อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	26/1 หมู่ 1 ตำบลละหาร อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี 11110
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษาปีที่ 3
	จาก โรงเรียนบางบัวทอง
พ.ศ. 2542	มัธยมศึกษาปีที่ 6
	จาก โรงเรียนบางบัวทอง
พ.ศ. 2546	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
	จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2553	การศึกษามหาบัณฑิต (กศ.ม.)
	จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ