แบบ 1

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : 38 วิจัยและพัฒนาการผลิตพืชหัว

2. **โครงการวิจัย** : 105 วิจัยและพัฒนาการผลิตมันเทศ

   กิจกรรม : 1.2 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปผลผลิตพืชหัวเพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิต

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ศึกษาการย่อยแป้งจากมันเทศเพื่อใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการหมักแอลกอฮอล์และกรดแลคติก

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Starch hydrolysis of sweet potato to be used as a substrate for ethanol and lactic acid fermentation

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นายอำนวย อรรถลังรอง สถาบันวิจัยพืชสวน

   ผู้ร่วมงาน : ผศ. ดร. เชาวรีย์ อรรถลังรอง มหาวิทยาลัยศิลปากร

5. **บทคัดย่อ**

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งจากมันเทศให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส วางแผนการทดลองแบบแบบสุ่มตลอด มีปัจจัยที่ศึกษาสำหรับการทำงานของแอลฟา-อะไมเลส คือ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ระยะเวลาที่ใช้ สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น และปริมาณเอนไซม์ ส่วนปัจจัยที่ศึกษาสำหรับกลูโคอะไมเลส คือ สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณเอนไซม์ ผลการศึกษา พบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งจากมันเทศด้วยแอลฟา-อะไมเลส คือ ใช้สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น 50:50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) บ่มที่ 75 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 และเวลาบ่มนาน 120 นาที ส่วนภาวะที่เหมาะสมสำหรับกลูโคอะไมเลส คือ ใช้มันเทศต่อน้ำกลั่น 50:50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 และเวลาบ่มนาน 48 ชั่วโมง เมื่อย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดในภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 95-98 กรัมต่อลิตร และ 105-112 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

6. คำนำ

มันเทศมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Ipomoea batatas* L. จัดเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่ 7 ของโลก เนื่องจากการปลูกมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับพืชอาหารอื่นๆ ให้ผลผลิตมากและสามารถปลูกได้หลายครั้งในรอบปี (Ruiz, 1981) มีคุณค่าทางอาหารสูงและสามารถบริโภคได้โดยตรงหรือผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นแป้งและผลิตภัณฑ์อื่นๆ ก่อนนำมาบริโภค (Panda and Ray, 2007; Panda and Ray, 2008) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการหมักด้วยจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดแลคติก เอทานอล และผลิตภัณฑ์อื่นๆ โดยแป้งซึ่งมีมากในหัวมันเทศจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก

การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสทำได้โดยกระบวนการทางเอนไซม์หรือย่อยด้วยกรด (Panda and Ray, 2008; Panda et al., 2009) แต่การย่อยแป้งด้วยกรดจะเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงและอาจเป็นอันตรายได้ ดังนั้นการใช้กระบวนการทางเอนไซม์จึงเป็นที่นิยมมากกว่า ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งอย่างน้อยสองชนิด คือ แอลฟา-อะไมเลส (**α**-amylase; EC 3.2.1.1) และอะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase; EC 3.2.1.3) หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากลูโคอะไมเลส (glucoamylase) (Anto et al., 2006; Shamala and Sreekantiah, 1998) โดยแหล่งที่มาของแอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตทางการค้าได้จากจุลินทรีย์ทั้งกลุ่มแบคทีเรียและรา ได้แก่ *Bacillus licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. subtilis* และ *Aspergillus niger* ส่วนอะไมโลกลูโคซิเดสมักได้จากเชื้อรา *A. niger* (Waites et al., 2001) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะมีประสิทธิภาพในการทำงานภายใต้ภาวะที่เหมาะสมและวัตถุดิบที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งจากมันเทศโดยแอลฟา-อะไมเลสและอะไมโลกลูโคซิเดสหรือกลูโคอะไมเลส

7. วิธีดำเนินการ

- วัสดุและอุปกรณ์

1. มันเทศ
2. แอลฟา-อะไมเลสชนิดทนความร้อน (thermostable **α**-amylase) ที่ใช้คือ BAN™ 240L (Novozymes A/S, Denmark) ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* โดยมีกิจกรรม ≥ 250 หน่วยต่อกรัม
3. กลูโคอะไมเลสที่ใช้คือ Spirizyme®Fuel (Novozymes A/S, Denmark) โดยมีกิจกรรม ≥750 หน่วยต่อกรัม
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมทาร์เทรตเป็นผลิตภัณฑ์ของ UNIVAR (Ajax Finechem, Australia)
5. กลูโคส (Biomark™ Laboratory, India)
6. 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก พีจีโอเอนไซม์ เพรปแพเรชัน (PGO Enzyme Preparation)
7. ออร์โธ-ไดอะนิซิดีน ไดไฮโดรคลอไรด์ และ สารเคมีอื่นๆ ทุกชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ของ SIGMA-ALDRICH (U.S.A.)
8. อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องทดลอง

- วิธีการ

1. ปลูกมันเทศพันธุ์ไต้หวันและเก็บเกี่ยวหัวมันเทศเมื่ออายุ 120 วัน คัดเลือกหัวมันเทศที่มีคุณภาพดี น้ำหนักไม่น้อยกว่า 300 กรัม นำมาล้างและนึ่งให้สุก ปอกเปลือกและบดผสมเนื้อมันเทศที่นึ่งสุกให้เป็นเนื้อเดียว เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองต่อไป
2. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยทดลอง 3 - 5 ซ้ำ
3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของแอลฟา-อะไมเลส ในขั้นตอนการทำให้แป้งเหลว (liquefaction) โดยนำเนื้อมันเทศนึ่งสุกมาย่อยในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปัจจัยที่ศึกษา คือ อุณหภูมิ (65, 70, 75, 80, 85 และ 90°C) ค่าความเป็นกรดด่าง (5.5, 6.0 และ 6.5) ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาที่ใช้ (60 90 และ 120 นาที) สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น (30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50 และ 55:45 น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และปริมาณเอนไซม์ (0.23, 0.89 และ 1.54 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศ) โดยทุกการทดลองข้างต้นใช้แอลฟา-อะไมเลส 0.23 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศและสัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น 50:50 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ยกเว้นการทดลองที่ศึกษาสัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่นและปริมาณแอลฟา-อะไมเลสที่เหมาะสมซึ่งต้องแปรผันระดับตามการทดลอง
4. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของกลูโคอะไมเลส ในขั้นตอน saccharification เพื่อผลิตน้ำตาลกลูโคส โดยนำแป้งเหลวจากการย่อยมันเทศในขั้นตอน liquefaction มาย่อยด้วยกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปัจจัยที่ศึกษา คือ สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น (30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50 และ 55:45 น้ำหนักต่อน้ำหนัก) อุณหภูมิ (50, 55, 60, 65, 70°C) ค่าความเป็นกรดด่าง (4.0, 4.5, 5.0, 5.3, 6.0) และปริมาณเอนไซม์ (0.70, 0.85 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศ) โดยทุกการทดลองใช้กลูโคอะไมเลส 0.85 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศ ยกเว้นการทดลองศึกษาปริมาณกลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมซึ่งต้องแปรผันระดับตามการทดลอง
5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ก่อนการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้นำตัวอย่างไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 x g, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาล โดยตัวอย่างที่เก็บหลังจากการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสจะนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugars, RS) ส่วนตัวอย่างที่เก็บหลังจากการทำงานของกลูโคอะไมเลสจะนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคส

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์นั้นใช้วิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS method) ที่ปรับปรุงจาก Miller (1959) โดยนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในค่าที่เหมาะสมมาผสมกับไดไนโตรซาลิไซลิก รีเอเจ้นท์ (DNS reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำเย็น 3 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส ใช้พีจีโอเอนไซม์ เพรปแพเรชันโดยนำตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในค่าที่เหมาะสมมาผสมกับ 2.5 มิลลิลิตรของพีจีโอเอนไซม์ รีเอเจ้นท์ที่มีออร์โธ-ไดอะนิซิดีน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

- เวลาและสถานที่

เวลา ต.ค. 2553 - ก.ย. 2555 สถานที่ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จ.นครปฐม

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยมันเทศในขั้นตอน liquefaction โดยแอลฟา-อะไมเลส

ผลของอุณหภูมิ

การแปรผันอุณหภูมิในการย่อยมันเทศของแอลฟา-อะไมเลสที่ 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 90 นาที โดยใช้ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าแอลฟา-อะไมเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ 75 องศาเซลเซียส ซึ่งเห็นได้จากการที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 65 - 75 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส กลับพบว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 1)

<u>ตารางที่ 1</u> น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันเทศในขั้นตอน liquefaction โดยแอลฟา-อะไมเลส เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 - 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที

อุณหภูมิ (°C)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
65	48.40^{d} ± 2.72
70	57.23^{b} ± 2.38
75	62.93^{a} ± 2.08
80	54.90^{bc} ± 2.86
85	50.63^{cd} ± 4.89
90	48.80^{d} ± 3.36

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ $^{a, b, c, d}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลของค่าความเป็นกรดด่าง

การศึกษาการย่อยมันเทศของแอลฟา-อะไมเลสโดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5, 6.0 และ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้น บ่มเป็นเวลา 90 นาที พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 6.0 เนื่องจากให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด (59.6 กรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้กับผลที่ได้ที่ค่าความเป็น

กรดด่าง 5.5 และ 6.5 พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าแอลฟา-อะไมเลสที่ใช้สามารถทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 - 6.5 (ตารางที่ 2)

<u>ตารางที่ 2</u> น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันเทศในขั้นตอน liquefaction โดยแอลฟา-อะไมเลส เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดด่าง บ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที

ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
5.5	57.5 [a] ± 1.57
6.0	59.6 [a] ± 0.31
6.5	56.8 [a] ± 3.41

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 5 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ [a] แสดงว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

การแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 0.0 - 2.0 กรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม โดยใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 บ่มที่ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที จากผลที่ได้พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ระดับต่างๆ ของแคลเซียมคลอไรด์นั้นไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าระหว่าง 57.5 - 59.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้บ่งชี้ว่าแอลฟา-อะไมเลสที่ใช้มีความเสถียรเพียงพอภายใต้ภาวะของการทำงานที่กำหนด แม้ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์

ผลของระยะเวลา

การแปรผันระยะเวลาในการย่อยมันเทศของแอลฟา-อะไมเลสที่เวลาต่างๆ โดยใช้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าระยะเวลาในการบ่มมีผลอย่างมากต่อความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์ 46.84, 47.59 และ 56.00 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้ระยะเวลาบ่ม 120 นาทีสำหรับแอลฟา-อะไมเลส

สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น

การศึกษาในเบื้องต้น (preliminary study) พบว่า สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่นที่ใช้นั้น ส่งผลอย่างมากต่อความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของแอลฟา-อะไมเลส เนื่องจากแป้งในมันเทศเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งหากใช้สัดส่วนของมันเทศน้อยเกินไป ก็จะได้น้ำตาลรีดิวซ์น้อยเนื่องจากมีซับสเตรตน้อย แต่หากใช้สัดส่วนของมันเทศมากเกินไปก็จะทำให้เกิดความหนืดมาก ยากต่อการแยกส่วนใสออกจากกากภายหลังเสร็จสิ้นการย่อย

การแปรผันสัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น 5 ระดับ คือ 30:70, 40:60, 45:55, 50:50 และ 55:45 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และย่อยแป้งด้วยแอลฟา-อะไมเลสที่อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่างและระยะเวลาบ่มที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับสัดส่วนของมันเทศ สัดส่วนมันเทศที่เหมาะสม ได้แก่ สัดส่วน 55:45 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) นั้น ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 69.87 กรัมต่อลิตร แต่ก็ทำให้เกิดความหนืดสูงและยากต่อการแยกส่วนใสออกจากกากภายหลังการย่อย ในขณะที่การใช้สัดส่วนมันเทศต่อน้ำกลั่น 50:50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) จะให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงเป็นอันดับสองคือ 62.39 กรัมต่อลิตรซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าที่ได้เมื่อใช้สัดส่วน 55:45 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) อีกทั้งไม่ทำให้เกิดความหนืดมากนัก จึงสามารถแยกส่วนใสออกจากกากได้ง่าย ดังนั้น สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่นที่ 50:50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) จึงมีความเหมาะสม (ตารางที่ 3)

<u>ตารางที่ 3</u> น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันเทศด้วยแอลฟา-อะไมเลสเป็นเวลา 120 นาที เมื่อแปรผันสัดส่วนมันเทศต่อน้ำกลั่นที่ค่าต่างๆ

สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
30:70	27.01^{d} ± 4.63
35:65	30.99^{d} ± 4.30
40:60	46.00^{c} ± 7.00
45:55	56.30^{bc} ± 4.61
50:50	62.39^{ab} ± 4.20
55:45	69.87^{a} ± 7.19

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ $^{a, b, c, d}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลของปริมาณแอลฟา-อะไมเลส

การแปรผันปริมาณแอลฟา-อะไมเลสที่ระดับ 0.23, 0.89 และ 1.54 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศ โดยใช้อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ระยะเวลาบ่ม และสัดส่วนของมันเทศที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าการใช้แอลฟา-อะไมเลสที่ระดับ 0.89 และ 1.54 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือได้น้ำตาลประมาณ 65-66 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้ำตาลที่ได้นั้นสูงกว่าการใช้แอลฟา-อะไมเลสที่ระดับ 0.23 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงใช้แอลฟา-อะไมเลส ที่ระดับ 0.89 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศสำหรับการย่อยมันเทศในขั้น liquefaction

การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยมันเทศในขั้นตอน saccharification โดยกลูโคอะไมเลส

สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น

ในการทดลองนี้ได้แปรผันสัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่นเช่นเดียวกับในกรณีของการใช้แอลฟา-อะไมเลส โดยนำผลผลิตที่ได้จากการย่อยด้วยแอลฟา-อะไมเลสมาย่อยต่อด้วยกลูโคอะไมเลสที่ 0.85 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับในกรณีของการใช้แอลฟา-อะไมเลส คือที่สัดส่วน 55:45 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสสูงที่สุด แต่ก็ก่อปัญหาความหนืดสูงเช่นกัน ดังนั้น จึงเลือกใช้สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น 50:50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในการทดลองต่อไป เนื่องจากได้น้ำตาลสูงและผลผลิตไม่หนืดมาก (ตารางที่ 4)

<u>ตารางที่ 4</u> น้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันเทศด้วยกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อแปรผันสัดส่วนมันเทศต่อน้ำกลั่นที่ค่าต่างๆ

สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
30:70	58.62^{f} ± 0.89	56.62^{f} ± 0.95
35:65	67.67^{e} ± 2.19	67.57^{e} ± 0.83
40:60	76.68^{d} ± 1.77	74.83^{d} ± 1.34
45:55	94.55^{c} ± 0.37	85.90^{c} ± 1.90
50:50	101.51^{b}± 2.04	98.30^{b} ± 0.30
55:45	118.61^{a}± 0.65	102.85^{a}± 1.24

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ $^{a, b, c, d, e, f}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน

ผลของอุณหภูมิ

จากการแปรผันอุณหภูมิในช่วงระหว่าง 50-70 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยมันเทศด้วยกลูโคอะไมเลส โดยใช้ค่าความเป็นกรดด่าง 5.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสจะให้น้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสสูงสุด (ตารางที่ 5) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้นี้สูงกว่าอุณหภูมิที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์เล็กน้อย

<u>ตารางที่ 5</u> น้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันเทศด้วยกลูโคอะไมเลสโดยแปรผันอุณหภูมิในช่วงระหว่าง 50-70 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
50	$106.80^{b} \pm 3.12$	$84.25^{b} \pm 4.76$
55	$105.71^{b} \pm 0.57$	$92.74^{a} \pm 2.43$
60	$104.94^{b} \pm 0.58$	$89.61^{a} \pm 0.97$
65	$111.70^{a} \pm 1.05$	$94.49^{a} \pm 1.41$
70	$105.71^{b} \pm 1.57$	$93.17^{a} \pm 5.59$

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัญลักษณ์ $^{a, b, c, d}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน

ผลของค่าความเป็นกรดด่าง

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการย่อยมันเทศโดยกลูโคอะไมเลสโดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0, 4.5, 5.0, 5.3 และ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้น บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นั้นให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสสูงสุด (104.94 และ 95.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) เมื่อใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่สูงหรือต่ำกว่า 4.5 จะได้ความเข้มข้นน้ำตาลลดลงเล็กน้อย

ผลของปริมาณกลูโคอะไมเลส

การแปรผันปริมาณกลูโคอะไมเลสที่ระดับ 0.70, 0.85 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศโดยใช้สัดส่วนของมันเทศต่อน้ำกลั่น อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าการใช้กลูโคอะไมเลสที่ระดับ 0.85 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือได้น้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 110-112 กรัมต่อลิตร และได้น้ำตาลกลูโคสประมาณ 95-97 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้ำตาลที่ได้นั้นสูงกว่าการใช้กลูโคอะไมเลสที่ระดับ 0.70 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมมันเทศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังจากที่ได้ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศโดยแอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสแล้ว จึงใช้ภาวะดังกล่าวในการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากมันเทศ พบว่าผลผลิตที่ได้มีลักษณะเป็นน้ำเชื่อมซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 95-98 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลรีดิวซ์ 105-112 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นซับสเตรตสำหรับการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์จากจุลินทรีย์ได้ต่อไป

โดยทั่วไปกระบวนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์นั้นต้องใช้อุณหภูมิสูง 70-90 องศาเซลเซียสในขั้นตอนแรก เพื่อให้แอลฟา-อะไมเลสสามารถทำงานได้ดี ความร้อนจะทำให้แป้งสุกและเกิด gelatinization ของแป้ง ขณะที่แอลฟา-อะไมเลสจะทำงานในขั้นตอน liquefaction โดยตัดพันธะ α-1,4 glycosidic linkages ภายในสายของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของแป้ง ทำให้แป้งเหลวและมีความหนืดลดลงอย่างมาก โดยผลผลิตที่ได้จากการย่อยในขั้นตอนนี้ คือ เด็กซ์ตรินและโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยต่อไปจนกระทั่งได้น้ำตาลกลูโคสในขั้นตอน saccharification ด้วยการทำงานของเอนไซม์ชนิดที่สอง คือ อะไมโลกลูโคซิเดส ซึ่งเป็น debranching enzyme และจะตัดพันธะ α-1,4 และ α-1,6 glycosidic bonds (Anto et al., 2006)

ส่วนสภาพความเป็นกรด-ด่างที่ทำให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีประสิทธิภาพสูงสุด ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงของความเป็นกรดระหว่าง 4.8-6.5 แต่เนื่องจากเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสผลิตได้จากพืช จุลินทรีย์และสัตว์ ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์ดังกล่าวมีความแตกต่างกัน และเป็นเช่นเดียวกันในกรณีของอุณหภูมิ แต่แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่าและทนอุณหภูมิสูงได้มากกว่าจึงเป็นที่นิยมใช้ทางการค้ามากกว่า (Sherry *et al*, 2005) สำหรับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างในการย่อยแป้งจากมันเทศด้วยแอลฟา-อะไมเลส คือ 75 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงความเหมาะสมดังกล่าว

แคลเซียมคลอไรด์เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้แอลฟา-อะไมเลสมีความเสถียร (stability) ในการทำงานของ (Marchal, 1999) แต่จากการทดลองนี้เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ไม่ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากหัวมันเทศมีปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอสำหรับการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จึงไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในกระบวนการย่อย ซึ่งปริมาณแคลเซียมที่พบในหัวมันเทศอยู่ระหว่าง 21-110 มิลลิกรัม/100 กรัม (Bradbury and Holloway, 1988) ช่วงเวลาในการบ่มก็มีผลต่อกระบวนการย่อยแป้งด้วยเช่นกัน Omemu และคณะ (2005) พบว่า การย่อยแป้งจากวัตถุดิบและระยะเวลาบ่มที่แตกต่างกันด้วยสารสกัดหยาบอะไมเลสที่ได้จาก *A. niger* AM07 มีผลต่อผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ แป้งมันสำปะหลังจะให้น้ำตาลรีดิวซ์ดีที่สุด 200.1 มิลลิกรัม/กรัมหลังการบ่ม 72 ชั่วโมง ส่วนมันเทศให้น้ำตาลรีดิวซ์เพียง 107.8 มิลลิกรัม/กรัม สำหรับผลจากการทดลองนี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เพิ่มขึ้นและการบ่มที่ 120 นาทีให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด

ขณะที่ Duvernay, Chinn และ Yencho (2012) พบว่า การย่อยมันเทศสดด้วย α-amylase (Liquozyme SC) อัตรา 0.45 Kilo Novo α-amylase Units ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของมันเทศ (KNU-S/g dry ISP หรือ 0.3% volume enzyme/g dry ISP) และบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสนาน 180 และ 120 นาที ให้น้ำตาลรีดิวซ์ 287.1 และ 216.2 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งของมันเทศตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันเล็กน้อยจึงแนะนำระยะเวลาบ่มที่ 120 นาที ส่วนในขั้นตอน saccharification การเติมกลูโคอะไมเลส (Spirizyme Ultra) อัตรา 5.0 AGUต่อกรัม (amyloglucosidase units, AGU/g) และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมงให้ปริมาณน้ำตาลสำหรับหมัก (fermentable sugars) 685.3 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมแป้ง (mg glucose/g starch)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสในการย่อยมันเทศ คือ มันเทศต่อน้ำกลั่น 50:50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 และบ่มที่ 75 องศาเซลเซียสนาน 120 นาที ส่วนภาวะที่เหมาะสมสำหรับกลูโคอะไมเลส คือ ใช้มันเทศต่อน้ำกลั่น 50:50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 และบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง เมื่อย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดในภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 95-98 กรัมต่อลิตร และ 105-112 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

พัฒนาต่อโดยนำสารประกอบที่ได้ไปใช้ในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์และกรดแลคติก และเผยแพร่ในการประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้อง

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากกรมวิชาการเกษตร และได้รับการสนับสนุนสถานที่ทดลองและครุภัณฑ์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

12. เอกสารอ้างอิง

Anto H, U.B. Trivedi and K.C. Patel 2006. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresour. Technol. 97: 1161-1166.

Bradbury, J.H. and W.D. Holloway. 1988 Chemistry of Tropical Root Crops: Significance for Nutrition and Agriculture in the Pacific. ACIAR Monograph No. 6, Canberra. 201 p.

Duvernay, W.H., M.S. Chinn and G.C. Yencho. 2012. Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. Industrial Crops and Products, Vol. 42, 527-537.

Marchal, L.M. 1999. Partial Enzymatic Hydrolysis of Starch to Maltodextrins on the Laboratory Scale. p 119-128. In: Carbohydrate Biotechnology Protocols. Edited by C. Bucke. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

Miller G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

Omemu A.M., I. Akpan, M.O. Bankole and O.D. Teniola. 2005. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of Aspergillus niger AM07 isolated from the soil. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (1), pp.19-25.

Panda S.H., S.K. Naskar, P.S. Sivakumar and R.C. Ray. 2009. Lactic acid fermentation of anthocyanin-rich sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) into lacto-juice. Int. J. Food Sci. Technol. 44: 288-296.

Panda S.H. and R.C. Ray. 2008. Direct conversion of raw starch to lactic acid by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 in semi-solid fermentation using sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) flour. J. Sci. Ind. Res. 67: 531-537.

Panda S.H. and R.C. Ray. 2007. Lactic acid fermentation of β-carotene rich sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) into lacto-juice. Plant Food Hum. Nutr. 62: 65-70.

Ruiz M.E., E. Lozano and A. Ruiz. 1981. Utilization of sweet potato (*Ipomoea batata* (L.) Lam) in animal feeding III. Addition of various levels of roots and urea to sweet potato forage silages. Trop. Anim. Prod. 6:3, 234-244.

Shamala T.R. and K.R. Sreekantiah 1988. Fermentation of starch hydrolysates by *Lactobacillus plantarum*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 175-178.

Sherry X., Xie, Qiang Liu, and Steve W. Cui. 2005. Starch Modification and Applications. p 357-405. In Food carbohydrates : chemistry, physical properties, and applications Edited by S. W. Cui, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida

Waites M.J., N.L. Morgan, J.S. Rockey and G. Higton. 2001. Industrial Microbiology: An Introduction. Oxford: Blackwell Science. 304 p.