บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์หลายชนิดประกอบด้วยโปรตีนกับสารอินทรีย์อื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เรียกว่าโคเอนไซม์ (Coenzyme) ส่วนที่เป็นโปรตีนเรียกว่า อะโปเอนไซม์ (Apoenzyme) เมื่อรวมตัวกันจึงเป็นเอนไซม์ที่สมบูรณ์ที่เรียกว่า โฮโลเอนไซม์ (Holoenzyme) เอนไซม์อาจถูกทำลายด้วยความร้อน ตกตะกอนด้วยเอทานอลหรือเกลืออินทรีย์ที่เข้มข้น เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และไม่สามารถไดอะไลซ์ (Dialyze) ผ่านเยื่อเลือกผ่านได้ นอกจากนี้ยังมีความเฉพาะเจาะจง (Specifity) อย่างสูงต่อวัสดุหมัก ซึ่งเป็นสารที่เอนไซม์ไปเร่งปฏิกิริยา และมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้สูง (High catalytic efficiency) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

ชนิดของเอนไซม์

แบ่งตามลักษณะการสร้างเอนไซม์

1. เอนไซม์ที่ถูกเหนียวนำให้เกิดขึ้น (Inductive enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีสารอาหารหรือวัสดุหมัก ซึ่งจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างเอนไซม์ ถ้าไม่มีวัสดุหมักชนิดนี้เซลล์จะไม่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวและเรียกวัสดุหมักนี้ว่า ตัวเหนี่ยวนำ (Inducer)

2. เอนไซม์ที่มีอยู่ประจำ (Constitutive enzyme) เป็นเอนไซม์ที่เซลล์สร้างได้เองเป็นปกติโดยไม่ขึ้นกับสารอาหารหรือวัสดุหมัก

แบ่งตามแหล่งที่เอนไซม์ทำงาน

1. เอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์เรียกว่า เอกซ์ตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (Extracellular enzyme) หรือ เอกโซเอนไซม์ (Exoenzyme) เมื่อทำปฏิกิริยากับวัสดุหมักแล้วทำให้โมเลกุลเล็กลงจนเข้าสู่เซลล์ได้ ตัวอย่างเอนไซม์ เช่น โปรตีนเนส เจลาติเนส มอลเทส เป็นต้น

2. เอนไซม์ที่สร้างขึ้นและทำงานภายในเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับวัสดุหมัก ภายในเซลล์ เรียกว่า อินตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (Intracellular enzyme) หรือ เอนโดเอนไซม์ (Endo enzyme) ตัวอย่างเช่น ไฮโดรเลส ออกซิเดส

เอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลสเป็น เอกตราเซลลูลาร์ เอนไซม์ ที่สามารถย่อยแป้งได้หลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับว่าจะย่อยแป้งที่ตำแหน่งใด แป้งที่ประกอบด้วยกลูแคน 2 ชนิดคือ อะไมเลส (ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วย พันธะแอลฟา 1,4) และอะไมโลแพคติน (เป็นอะไมเลสที่มีโซ่กิ่งเพิ่มขึ้นโดยมีพันธะ 1,6 เป็นตัวเชื่อม) เอนไซม์อะไมเลสสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามตำแหน่งการย่อยแป้ง (ดวงพร คันธโชติ, 2530) ได้แก่

1. เอนโดอะไมเลส (Endoamylase) เป็นอะไมเลส ประเภทที่ย่อยแป้งแบบสุ่มที่พันธะแอลฟา 1,4 กลูโคซิมิกของอะไมเลส หรือ อะไมโลเพคตินแต่ไม่ย่อยที่พันธะ1,6 กลูโคซิมิกของอะไมโลแพคตินถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโทสและกลูโคส แต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโทสและเดกซ์ทริน เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส

2. **เอกโซอะไมเลส** (Exoamylase) เป็นอะไมเลส ประเภทที่ย่อยแป้งจาก Non-reducing end เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยเบต้าอะไมเลสจะย่อยแป้งที่ตำแหน่งพันธะ แอลฟา 1,4 กลูโคซิมิก เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส ทำให้น้ำตาลมอลโทสและ Limit dextrin ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย

แหล่งของเอนไซม์

เอนไซม์อะไมเลส จะพบอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เพราะเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการใช้ประโยชน์ของแป้ง ซึ่งเป็นอาหารสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต แต่ปริมาณเอนไซม์ที่พบนั้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอวัยวะและชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ แหล่งที่ได้รับความนิยมและสนใจมากในขณะนี้คือ จุลินทรีย์ (ปาริชาติ วัฒนา, ประภา เฟื่องฟูพงศ์ และมาลัย เมืองน้อย, 2519) ทั้งนี้เพราะไม่มีข้อจำกัดมากเหมือนพืชและสัตว์

1. **เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้** เช่น *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger, A. oryzae,* และ *A. candidus*

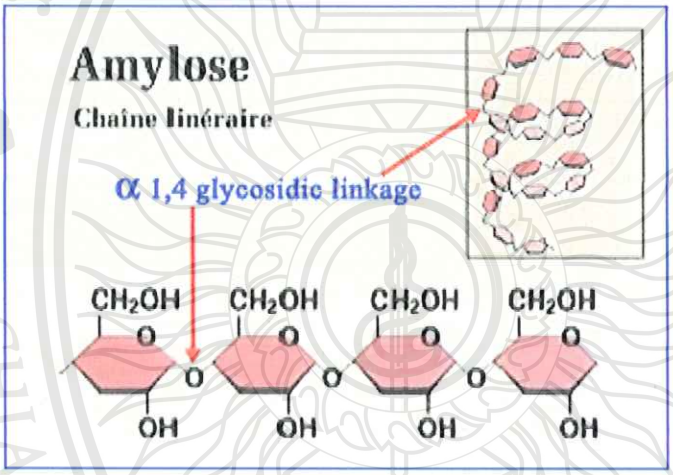
2. **ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้แก่** *Candida* sp., *Pichia* sp., *P.acacia, Sporobolomyces* sp., *Torulopsis* sp.

3. แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้แก่ *Bacillus* sp, *B.subtilis*, *B. stearothermophilus, B. coagulans,* และ *Clostridium* sp. (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

แป้ง (Starch)

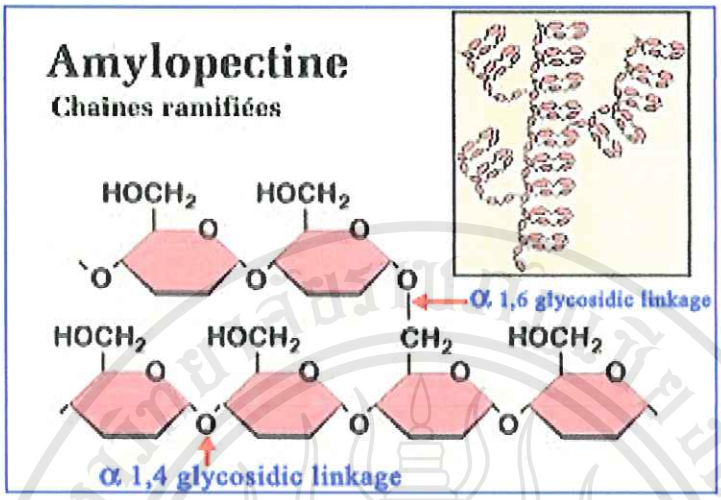
แป้งเป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดสะสมชนิดหนึ่งที่พบมากในพืช โครงสร้างทางเคมีของแป้งจะประกอบไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส ประมาณ 15-20 % และ อะไมโลเพกติน ประมาณ 80-85%

1. แอลฟา-อะไมโลส (α- amylose) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากโมเลกุลของกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะ a 1,4 glycosidic ประมาณ 250–300 โมเลกุล มีโครงสร้างขดเป็นเกลียว (ดังภาพที่ 2.1) เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะให้สีน้ำเงิน



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ แอลฟา - อะไมโลส
ที่มา: นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544

2. อะไมโลเพกติน (amylopectin) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าเกิดจากโมเลกุลของกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ a1,4 glycosidic และ a1,6 glycosidic มาเชื่อมต่อกันประมาณ 1,000 โมเลกุล ทำให้มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา (ดังภาพที่ 2.2) และเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะให้สีน้ำตาลแดง

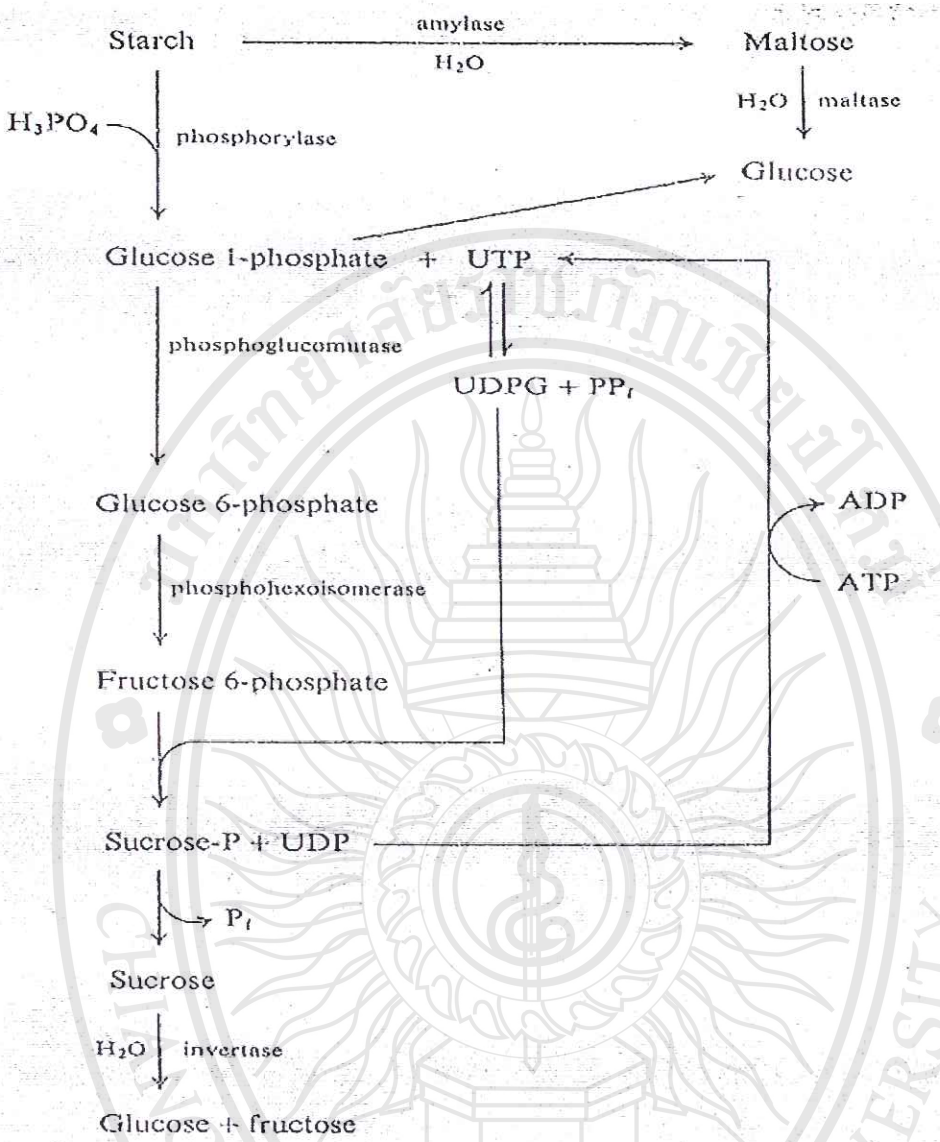


ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ อะไมโลแพคติน

ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544

ผลของเอนไซม์อะไมเลสที่มีต่อแป้ง

แป้งสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด คือ α -amylase , β -amylase และ starch phosphorylase เอนไซม์ amylases เร่งปฏิกิริยาการสลายแป้งไปเป็นหน่วยย่อยที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลคือ มอลโตส จากนั้นมอลโตสจะถูกสลายต่อไปด้วยเอนไซม์ maltase (ดังภาพที่ 2.3) เอนไซม์ α -amylase จะเร่งการสลายพันธะ a -(1-4) ของอะไมโลสแบบสุ่ม ได้ fragment ~ 10 glucose subunit เรียกว่า maltodextrins ซึ่งจะสลายไปเป็นมอลโตสอย่างช้า ๆ โดย α -amylase สามารถสลายพันธะ α -(1-4) ของอะไมโลเพกตินได้เช่นกัน แต่ไม่ตัด α -(1-6) branch points จึงเหลือ limit dextrins (> 3 glucosylunis) ส่วน β -amylase ตัด maltose units เริ่มจาก non-reducing end ถึง α -(1-6) branching point ให้ maltose และ limit dextrins สำหรับ starch phosphorylase ตัดพันธะ α -(1-4) แต่ให้ glucose-1-phosphate และต้องใช้ H_2O ในการตัดแต่ละพันธะแป้งดิบมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (nondispersible) และต้านทานต่อการย่อยสลายของเอนไซม์แป้งที่อยู่ในรูป granule หรือแป้งดิบจะไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ต้องให้ความร้อนแก่แป้งให้อยู่ในรูปสารละลาย จะทำให้เกิดการgelatinization เกิดความหนืดเพิ่มขึ้น เนื่องจาก granule ของแป้งขยายตัวดูดซึมน้ำเข้าไป ทำให้สูญเสียลักษณะ birefringence ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้เร็วขึ้น



ภาพที่ 2.3 ผลของเอนไซม์อะไมเลสที่มีต่อการย่อยแป้ง

ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติบางประการที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลส ชนิดต่าง ๆ

Criterion	Relation rate		
	α-amylase	β-amylase	glucoamylase
Reducing group formation	Fixed as equal	Fixed as equal	Fixed as equal
Loss in viscosity	fast	Slow	slow
Lass in iodine color	fast	Slow	slow
Maltose production	slow	fast	none
Glucose production	none	none	fast

ที่มา : Reed and Underkofler, 1966

ตารางที่ 2.2 เอนไซม์: แหล่งของจุลินทรีย์และคุณสมบัติบางประการ

Microbial sources	Molecular weight	Optimum temp (°C)
α- amylase		
Bacillus amyloliquefaciens	49,000	70
Bacillus licheniformis	62,000	90
β- amylase		
Pseudomonas sp. BQ 6	37,000	45-55
Glucoamylase		
Aspergillus awamori	83,700-88,000	60
Aspergillus niger	99,000	60
Aspergillus oryzae	76,000	60

ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์อะไมเลส ส่วนใหญ่จะมีการทำงานดีขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 40 องศาเซลเซียส และการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงที่อุณหภูมิสูงกว่า 40-60 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์ที่ลดลงในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากการเพิ่มการสั่นสะเทือนเนื่องจากอุณหภูมิ (thermal agitation) ของโมเลกุลที่เกิดจากการสลับกันระหว่างเอนไซม์และสับเสตรท ซึ่งทำให้ลดสัมพรรคภาคทางเคมี (affinity) ของเอนไซม์ที่มีต่อสับเตรท และอีกส่วนหนึ่งเกิดจากการทำลายเอนไซม์เนื่องจากความร้อน อัลฟาอะไมเลส มี่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จะสามารถทนทานต่อความร้อนได้ดีกว่า เบต้าอไมเลส โดยเฉพาะ อัลฟาอะไมเลสจาก *B.subtilis* และ *B. stearo thermophiles* เป็นเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้ดีกว่า อัลฟาอะไมเลสจากพืช และ สัตว์

อิทธิพลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

อิทธิพลของความเป็นกรดด่าง pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องมาจากทำให้เกิดการแตกตัวของ side-chian group โดย group ที่มีความจำเพาะ 2 group คือ substratc binding group และ catalytic group ซึ่งจะทำให้ได้กราฟเส้นโค้งรูประฆังเกิดจากการเขียนระหว่างค่าของ pH กับ activity แตกต่างกันไปตามธรรมชาติของกรุ๊ฟทั้งสองนี้ อัลฟาอะไมเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น จากน้ำลายมนุษย์ และจากตับอ่อนของหมูพบว่า pH optimum เท่ากันคือ pH 6.9 (Stein and Fisher , 1960) ในขณะที่เอนไซม์จากมอล์ของข้าวบาร์เลย์ต้องการ pH ที่เป็นกรดกว่าคือ 4.0-6.0 (Schwimmer and Balls , 1949) อัลฟาอะไมเลส ส่วนใหญ่จะคงทนต่อ pH 4.0-10.0 ซึ่ง อัลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียจะทำงานได้ดีอยู่ในช่วง 3.0-9.5 และ pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.0 (Fukumoto, Yamamoto and Tsuru,1958)

กระบวนการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากจุลินทรีย์

วิธีที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากจุลินทรีย์โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา โดยเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100-115 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที ปริมาณต้นเชื้อ 3-5 เปอร์เซ็นต์ จะต้องควบคุมการให้อากาศและการกวน วิธีนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิตและควบคุมสภาพต่าง ๆ ได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือมีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย

2. กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแห้ง วิธีนี้นิยมใช้กับรามากกว่าแบคทีเรีย โดยจะเลี้ยงเชื้อในสภาพที่เป็น Mold bran คือ ในรำข้าวที่มีความชื้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และจะแบ่งเป็นวิธี

ย่อย ๆ ต่างๆกันขึ้นกับภาชนะที่ใช้ วิธีนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด แต่มีข้อเสียคือต้องใช้แรงงานมากกว่าแบบการหมักในอาหารเหลว

การนำเอนไซม์อะไมเลส ไปใช้ประโยชน์

อุตสาหกรรมทอผ้า

กรรมวิธีในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ดังนั้นจะทำให้ด้ายดิบขาดได้ง่าย ฉะนั้นก่อนที่จะนำมาทอ ต้องนำเส้นได้ไปชุบน้ำแป้ง เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนแล้วต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกไปโดยนำไปย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส แล้วจึงนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีนี้ใช้ได้กับการทอผ้าจาก ฝ้าย ขนแกะ และเพรเทียม

การทำน้ำผลไม้ให้ใส

โดยปกติน้ำผลไม้คั้นจะมีลักษณะขุ่น เพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่ เอนไซม์อะไมเลสลงไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองน้ำตาลนำไปทำเยลลี่ต่อไป (Windish and Mhatre, 1965)

การผลิตแอลกอฮอล์ และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์

ในประเทศจีนได้เริ่มมีการผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อราย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล มาตั้งแต่สมันโบราณ จากรายงานปรากฏว่า ญี่ปุ่นได้ใช้หลักการนี้ของจีนผลิตแอลกอฮอล์เมื่อประมาณ 1700 ปีมาแล้ว ปัจจุบันนี้การผลิตแอลกอฮอล์ในญี่ปุ่นก็ยังนิยมใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งจากเชื้อรา ซึ่งแตกต่างจากแถบยุโรปและอเมริกา ซึ่งมักจะใช้ข้าวมอลต์ กันในระยะแรก แต่ปัจจุบันนี้ทั้งในยุโรปและอเมริกาได้หันมาใช้อัลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส จากราแทนเอนไซม์จากข้าวมอลต์

การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง

โดยในระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆมักจะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด และเมื่อประมาณปี 1953 มีรายงานการใช้เอนไซม์มาช่วยในการผลิตน้ำเชื่อมจากข้าวโพด ในปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้ง โดยขบวนการของเอนไซม์กำลังเป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคส

กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในทางชีวเคมีหมายถึง การสร้างพลังงาน จากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์เนื่องจากเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งต่างจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจนที่ใช้

ออกซิเจน เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม หมายถึงกระบวนการผลิตผลผลิตใด ๆ เพื่อให้ได้เซลล์จุลินทรีย์จำนวนมาก(mass culture) ซึ่งจะครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้และไม่ใช้ ออกซิเจน

ประเภทของการเพาะเลี้ยงเซลล์

ในทางเทคโนโลยีชีวภาพอาจแบ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้หลากหลาย ขึ้นอยู่กับเกณฑ์พิจารณาที่นำมาใช้แบ่ง เป็น 5 ประเภท ดังนี้

1. การแบ่งประเภทการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามผลผลิตของการเพาะเลี้ยง

1.1 ผลผลิตเป็นตัวเซลล์จุลินทรีย์ (microbial cell) เช่น การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ (bakers' yeast) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อใช้ เป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single Cell Protein; SCP

1.2 ผลผลิตเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (microbial enzyme) ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) เอนไซม์ไลเปส (lipase) เอนไซม์โปรติเอส (proteases) เป็นต้น ผลผลิตเป็นสารเมแทบอไลท์ (microbial metabolite) อาจเป็นสารเมทาบอไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) เช่น เอทานอล บิวทานอล ไลซีน วิตามิน เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ใน ระยะ ล็อกของ การเจริญ (log phase) และสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการ เมแทบอบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในระยะสเตชันนารี (stationary phase) ของการเจริญ แต่มีความสำคัญ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (growth promoter) หรือมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค เป็นต้น

1.3 ผลผลิตที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปของสารประกอบที่เติมลงไป (transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้น เช่น กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (การเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม) การผลิตสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

2. การแบ่งประเภทการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจน

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบให้อากาศ (aerobic fermentation) เป็นการหมักภายใต้สภาวะที่มีการเติมอากาศให้แก่ จุลินทรีย์ระหว่างที่เกิดกระบวนการหมัก เช่น การหมักกรดซิตริกและกรดน้ำส้ม เป็นต้น

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบไม่ให้ อากาศ (anaerobic fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการให้อากาศให้แก่ จุลินทรีย์ระหว่างการหมัก เช่น การหมักแอซิโตนและบิวทานอล

3. การแบ่งประเภทการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบไม่ปลอดเชื้อ (septic fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพเปิด ไม่จำเป็นต้องกำจัดจุลินทรีย์อื่นก่อนเริ่มการหมัก เช่น การผลิตอาหารหมัก การผลิตสุรากลั่น การผลิตแอลกอฮอล์และเซลล์ยีสต์จากน้ำทิ้งบางประเภท

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งปลอดเชื้อ (semi-septic fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพปิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปลอดเชื้อ (aseptic fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับ วัตถุดิบก่อนเริ่มหมัก และในระหว่างกระบวนการหมักต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อกับทุกขั้นตอนการดำเนินงาน การหมักแบบนี้จึงปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดอื่น นอกจากจุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักของกระบวนการ เช่น การหมักสารเมแทบอไลท์ที่มีมูลค่าสูงหลายชนิด

4. การแบ่งประเภทการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) อาหารแข็งที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์อาจเป็นวัตถุดิบตั้งต้นของการหมัก เช่น การหมักมันสำปะหลังหรือเมล็ดข้าว เพื่อให้ราสร้างสารสี การหมักถั่วเหลืองเพื่อทำเต้าเจี้ยวหรือซีอิ๊ว

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว (submerged state fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น อาหารกากน้ำตาล อาหารสังเคราะห์ที่ปรุงแต่งให้มีสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการครบ

5. การแบ่งประเภทการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

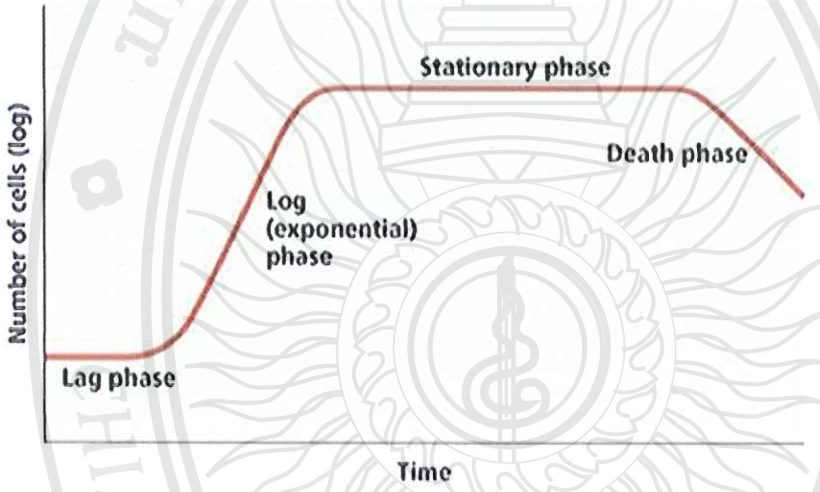
5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแบตช์ (Batch fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบปิดคือ ให้สารอาหารเริ่มต้นในปริมาณมากเกินพอกับความต้องการเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ และเมื่อเพาะกล้าจุลินทรีย์ลงไปในระบบแล้วปล่อยให้จุลินทรีย์มีการเจริญและการหมักโดยไม่มีการเติมสารอาหารลงไปอีก

5.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบเปิด ที่มีการเติมอาหารใหม่พร้อม ๆ กับการถ่ายอาหารเก่าและเซลล์จุลินทรีย์ออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา จุลินทรีย์จึงมีการเจริญและการหมักอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาที่มีการเติมอาหารใหม่เข้าในระบบ

5.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเฟดแบตช์ (Fed-batch fermentation) คือการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแบตช์ซึ่งมีการให้อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง หรือให้อาหารเป็นลำดับ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าและเซลล์จุลินทรีย์ออกจากระบบการหมักแบบนี้เริ่มต้นหมักในลักษณะเดียวกับการหมักแบบแบตช์ แต่เมื่อสารอาหารใกล้หมดจะมีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยืดการเจริญและกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ออกไป

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

แบ่งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ Lag phase Logarithmic phase Stationary phase Death phase และนำมา plot graph จะได้รูป sigmoid curve ดังภาพที่ 2.4 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์



ภาพที่ 2.4 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544

ช่วงที่ 1 เรียก Lag phase ระยะที่จุลินทรีย์ยังไม่มีการเพิ่มจานวน อยู่ระหว่างการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เซลล์จะมีการปรับตัว: สังเคราะห์โพรโทพลาสซึมใหม่ เอนไซม์ โคเอ็นไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เพื่อเตรียมพร้อมสาหรับสาหรับการแบ่งเซลล์ เซลล์มีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้น โดยเซลล์จะยาวขึ้น โปรตีนและน้ำหนักแห้งของเซลล์จะเพิ่มขึ้น

ช่วงที่ 2 เรียก Log phase หรือ Exponential phase ระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ถือเป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์สูงสุด สารอาหารถูกใช้อย่างรวดเร็ว จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เซลล์มีกระบวนการเมแทบอลิซึมตลอดจนสรีรวิทยาไม่แตกต่างกัน การแบ่ง

เซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่า ๆ กัน ระยะเวลาการเพิ่มประชากรเป็นสองเท่าจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

ช่วงที่ 3 เรียก Stationary phase ระยะที่จุลินทรีย์มีการเจริญคงที่ เพราะอาหารเริ่มหมดและมีการสร้างผลิตผลที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นอัตราการเกิดจะใกล้เคียงกับอัตราการตาย

ช่วงที่ 4 เรียก Death phase เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการตายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เพราะขาดสารอาหารสำหรับเซลล์ และเกิดการสะสมของสารพิษมากเกินกว่าจะมีชีวิตอยู่ได้

การเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งนอกเหนือไปจากการควบคุมกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพแล้ว ยังต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพของการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดเท่าที่จะเป็นไปได้ กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์อาจใช้วัตถุดิบเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง อาจไม่จำเป็นต้องเก็บเกี่ยวผลผลิตแยกออกมาจากวัสดุหมัก เช่น การหมักข้าวหมาก หรืออาจใช้วิธีการที่ไม่ยุ่งยากในการแยกผลผลิตออกจากวัสดุหมัก เช่น การหมัก ซีอิ๊ว แต่ในกรณีที่เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก จะอยู่ในส่วนของน้ำหมัก และมีปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับปริมาตรของน้ำหมัก จึงจำเป็นต้องมีวิธีการที่เหมาะสมใน การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และทำให้ ผลิตภัณฑ์ นั้นบริสุทธิ์ด้วยก่อนขั้นตอนของการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ต้องมีข้อมูลก่อนว่าผลิตภัณฑ์หมักที่ได้อยู่ในลักษณะใด เช่น อยู่ในรูปของเซลล์จุลินทรีย์ หรืออยู่ในรูปสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เรียกว่า เมแทบอไลท์ โดยอาจเป็นสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นแล้วเก็บไว้ภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลิอิค วิตามิน เอนไซม์และยาปฏิชีวนะบางชนิด หรืออาจเป็นสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นแล้วขับออกนอกเซลล์ และละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำหมัก เช่น กรดอะมิโน กรดซิตริก แอลกอฮอล์ เอนไซม์และยาปฏิชีวนะบางชนิด นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์บางชนิดที่พบอยู่ได้ทั้งในเซลล์และในน้ำหมัก การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ทำโดยแยกเอาเซลล์หรือเส้นใยของจุลินทรีย์หรือสารอาหารที่ไม่ละลายน้ำออกจากน้ำหมัก ซึ่งอาจทำได้โดยการกรอง (filtration) การตกตะกอน (sedimentation) การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอยู่ภายในเซลล์ จำเป็นต้องทำให้เซลล์แตกก่อน โดยอาจใช้วิธีกายภาพหรือเคมี ขึ้นกับสมบัติของผลิตภัณฑ์ ด้วย เช่น หากผลิตภัณฑ์ไม่ทนต่อกรด ก็ไม่สามารถใช้กรดทำให้เซลล์แตกได้ ซึ่งเมื่อเซลล์แตกแล้ว ก็สามารถแยกส่วนกากเซลล์ออกได้ตามวิธีการที่กล่าวแล้ว เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก มักมีปริมาณน้อย จึงจำเป็นต้องทำให้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นขึ้น โดยอาศัยกระบวนการทำให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งอาจใช้วิธีการดูดซับด้วยสารแลกเปลี่ยนประจุ

(ion exchanger) ซึ่งควรทราบคุณสมบัติ ทางเคมีและฟิสิกส์ของผลิตภัณฑ์ด้วยในกรณีที่ ต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง อาจต้องนำผลิตภัณฑ์ มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่างๆ เช่น การตกตะกอน การทำโครมาโทกราฟี (chromatography) หรือการฟอกสี เมื่อผลิตภัณฑ์ มีความบริสุทธิ์ตามต้องการแล้ว จึงนำมาทำให้แห้งหรือทำให้ตกผลึกก่อนนำไปใช้งานหรือจำหน่าย กระบวนการต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมัก และการทำให้ผลิตภัณฑ์ มีความบริสุทธิ์ขึ้นมีดังนี้

1. **การสกัด** เป็นวิธีการสำคัญวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้แยกผลิตภัณฑ์ได้เร็วคือ การสกัดด้วยสารละลาย (solvent extraction) วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักระดับใหญ่ได้อย่างรวดเร็ว เช่น การแยกยาปฏิชีวนะเพนนิซิลินออกจากน้ำหมักได้ภายในเวลาเพียง 90 นาที วิธีนี้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่มีความคงทนต่ำ เพราะสามารถสกัดผลิตภัณฑ์ออกมาได้อย่างรวดเร็ว

2. **โครมาโทกราฟี** เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างในคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของสาร เช่น ขนาด โมเลกุล ประจุ สมบัติการละลายและความจำเพาะตัวทางชีวภาพ ระบบโครมาโท กราฟี ทุกชนิดมีองค์ประกอบที่สำคัญ อยู่ 2 ส่วน คือ ส่วนคงที่ (stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งอิสระหรือของเหลวที่เกาะหรือฉาบอยู่บนตัวค้ำจุน (supporting medium) ส่วนนี้ จะเป็นทางผ่านของสารที่ ต้องการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งสารตัวอย่างอาจเกาะอยู่กับส่วนนี้ชั่วขณะ จนกว่าจะมีส่วนทีสองมาชะออกไป ส่วนที่สอง คือ ส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) ส่วนนี้อาจเป็นของเหลวหรือแก๊สที่ทำหน้าทีชะแยกสารออกจากส่วนคงที่

3. **การระเหย** วิธีการนี้ช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นต่ำมีความเข้มข้นสูงขึ้น เนื่องจากได้ระเหยเอาตัวทำละลายออกไปบ้าง ทั้งนี้อาจทำการระเหยด้วยสุญญากาศ ในกรณีที่ตัวอย่างไม่ทนความร้อน

4. **การใช้แผ่นเยื่อ** (membrane) วิธีการสามารถแยกผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลขนาดต่าง ๆ ขึ้นกับชนิดของแผ่นเยื่อและวิธีการที่ใช้

5. **การทำให้เป็นผลึกและการตกตะกอน** เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงการทำให้ เป็นผลึกจะทำ ในที่อุณหภูมิต่ำ หรือโดยการระเหยก็ได้ แต่วิธีแรกเป็นวิธีที่นุ่มนวลและเหมาะสมกว่า ส่วนการตกตะกอนนิยมใช้การเติมสารเคมีเพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์หรือสารตกตะกอนลงมา

6. **การทำให้แห้ง อาจทำโดยใช้ความร้อนหรือความเย็น** ขึ้นกับคุณสมบัติของสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ว่าทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากน้อยเพียงใด

การผลิตแป้งขนมจีนหมัก

1. การหมักข้าว โดยนำปลายข้าวมาล้างด้วยน้ำสะอาดใส่ข้าวในภาชนะสำหรับหมักข้าว ซึ่งทำด้วยไม้ไผ่สาน เช่น กระบุงหรือเข่ง หมักโดยการตั้งทิ้งไว้กลางแดด หรือในร่ม ถ้าหมักกลางแดดข้าวจะมีเป็นสีขาว ถ้าเอาไว้ในร่มจะได้ข้าวสีเหลืองอมส้ม นิยมหมักปลายข้าวเป็นเวลา 2 วัน ในระหว่างการหมักต้องล้างปลายข้าวทุกวัน การใช้ปลายข้าวหมักจะทำให้เปื่อยยุ่ยเนื่องมาจากแป้งถูกไฮโดรไลซ์ ได้สารประกอย Dextrin และ Maltose โดยเอนไซม์อะไมเลสซึ่งอยู่ในแป้งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการหมักทุกชนิด

2. การโม่หรือการบดปลายข้าวหมัก เมื่อหมักปลายข้าวครบสองวัน แล้วล้างปลายข้าวให้สะอาด นำไปบดด้วยโม่หินที่หมุนด้วยมอเตอร์ไฟฟ้าหรือนำไปยีผ่านผ้าขาวที่ผูกไว้ที่ปากโอ่งขณะโม่ใส่เกลือประมาณร้อยละ 7 ของน้ำหนักข้าว

3. การนอนน้ำแป้ง น้ำแป้งที่ได้จากการโม่หรือบดแล้วกรองด้วยผ้าขาวบางใส่ลงในโอ่งปล่อยทิ้งไว้ให้แป้งตกตะกอนนาน 1-2 วัน แล้วดูดน้ำส่วนบนออก 2-3ครั้ง ขั้นตอนนี้มีผลให้แป้งมีสีขาวและมีกลิ่นหมักน้อยลง โดยดูดน้ำทิ้งทุกวันพร้อมใส่เกลือทุกครั้งที่เปลี่ยนน้ำ

4. การทับน้ำแป้ง การทับน้ำแป้งเป็นการกำจัดน้ำส่วนเกินออกไปโดยนำแป้งที่ได้จากการนอนน้ำแป้งใส่ในถุงผ้าบิดแล้วผูกปากถุงด้วยเชือกให้แน่นทับด้วยของหนักไว้ 1 คืนแป้งที่ได้จากขั้นตอนนี้มีความชื้นประมาณร้อยละ 42-44

5. การนึ่งแป้ง แป้งที่ผ่านการทับน้ำแล้วจะเป็นก้อนแข็งเนื้อแป้งเกาะกันแน่น นำก้อนแป้งนี้ไปต้มหรือนึ่งให้สุกจากผิวเข้าไปประมาณครึ่งนิ้วในขั้นตอนนี้จะมีผลต่อความเหนียวของแป้งขนมจีน ถ้าแป้งสุกมากหรือน้อยไปขนมจีนจะขาดได้ง่ายและไม่สามารถจับเป็นเส้นได้

6. การนวดแป้ง การนวดแป้งเป็นการผสมแป้งดิบและแป้งสุกที่ผ่านขั้นตอนการทำให้สุกเป็นบางส่วนเข้าด้วยกัน นอกจากนี้ยังทำให้เม็ดแป้งแตก ทำให้แป้งมีความเหนียวมากขึ้น การนวดแป้งอาจนวดด้วยมือหรือนวดด้วยเครื่องนวดให้เข้ากันดี ถ้าแป้งแห้งเกินไปให้เติมน้ำลงไปขั้นตอนนี้ แป้งที่นวดแล้วจะมีความชื้นประมาณร้อยละ 70-75

7. การกรองแป้ง เนื่องจากการนวดแป้งไม่สามารถทำให้แป้งแตกออกได้หมดบางส่วนยังมีเม็ดเล็กๆ ปนอยู่จะต้องกรองแป้งผ่านผ้าขาวบางเพื่อให้แป้งที่ผ่านการกรองมีความละเอียดสม่ำเสมอโรยได้สะดวก

8. การโรยเส้นขนมจีน การโรยเส้นขนมจีนอาจทำได้หลายวิธี ถ้าเป็นการผลิตแบบพื้นบ้านมักใช้แว่นหรือเฝื่อน แว่นมีลักษณะเป็นแผ่นโลหะกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 นิ้ว เจาะรูเล็ก ๆ ตามขนาดที่ต้องการเต็มผิวหน้าของโลหะวางแผ่นโลหะกลมตรงกลางผืนผ้าซึ่งเจาะ

เป็นวงกลมขนาดเดียวกับแผ่นโลหะแล้วเย็บตรึงขอบแผ่นโลหะติดกับผ้า เมื่อใส่แป้งขนมจีนลงในแว่นแล้วต้องรวบปลายผ้าให้เข้ากัน ใช้อีกมือหนึ่งบีบเพื่อให้แป้งผ่านรูเล็ก ๆ ลงไปบนกระทะเป็นวงกลมพยายามอย่าให้เส้นขาด สำหรับเฝือนนั้นเป็นภาชนะรูปทรงกระบอก ทำด้วยโลหะอาจเป็นสังกะสีหรือเหล็กปลอดสนิม เจาะรูเล็ก ๆ ที่ก้น มีหู 2 หู สำหรับยึดในภาชนะที่ทำการกดมีภาชนะอีกหนึ่งใบที่มีขนาดเล็กกว่า สามารถสวมเข้าไปในภาชนะใบแรกได้พอดี ในขณะที่โรยเส้นควรรักษาอุณหภูมิของน้ำไว้ที่ 90-95 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นลอยขึ้นมาตักใส่น้ำเย็นแล้วใส่อ่างน้ำเพื่อทำเป็นจับต่อไป

9. การจับเส้นขนมจีน จับเส้นขนมจีนที่แช่อยู่ในน้ำ วิธีจับเส้นขนมจีนทำโดยใช้มือจับขนมจีนขึ้นมาจากน้ำ เรียงเส้นขนมจีนให้เป็นเส้นซ้อนกันโดยให้เรียงกันประมาณ 7-8 เส้น แล้วพันเส้นขนมจีน ที่นิ้วชี้หรือนิ้วหัวแม่มือ ให้เส้นขนมจีนห้อยลงมาตามขนาดของจับที่ต้องการวางขนมจีนในลักษณะคว่ำมือลงในภาชนะ ทิ้งให้สะเด็ดน้ำแล้วนำมารับประทานได้ (จันทร์เฉิดฉาย สังเกตุกิจ, 2552)

กรรมวิธีการผลิตขนมจีน จะมีน้ำทิ้งเกิดขึ้นในขั้นตอนที่ 8 การโรยเส้นขนมจีน และขั้นตอนที่ 9 การจับเส้นขนมจีน สารอินทรีย์ในน้ำทิ้งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีความเข้มข้นของแป้งค่อนข้างสูง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุมาลี เหลืองสกุล,สมใจ ศิริโภค และขจีนาฏ โพธิเวช (2542) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขยะและน้ำเสีย พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย xylan, cellulose, starch, skim milk และ tributyrin คือ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ส่วนราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย xylan, cellulose และstarch คือราในสกุล *Aspergillus*

ธนภัทร สายเจริญ(2545) ได้เพาะเลี้ยง *alkaliphilic iBacillus firmus* I K-1 ที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำทิ้งโรงงานกระดาษบางประอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ในอาหารที่มีแป้ง ข้าวเจ้า แป้งสาลี แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมของ อะไมเลสสูงสุด เมื่อศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ พบว่าสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 11.0 และมีเสถียรภาพในช่วง 8-11 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 70 องศาเซลเซียส โดยมีเสถียรภาพในช่วง 30 – 50 องศาเซลเซียส

วรพจน์ สุนทรสุข และเกวลี จันทร์พันธุ์ (2545) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ในบ่อกุ้งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันได้ดีซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์

Bacillus cereus มีกิจกรรมของ โปรติเอสอะไมเลสและไลเปสสูง (57.1, 4.5 และ 0.33 U/ml ตามลำดับ) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในห้องปฏิบัติเป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ ปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนและปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจน แบคทีเรียดังกล่าวผลิตสารพิษในปริมาณน้อยมากอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารในคนและไม่ก่อผลเสียต่อกุ้ง

อำพล มั่นเสกวิทย์,สาโรจน์ ศิริศันสนีย์กุล และสาวิตรี จันทรานุรักษ์ (2545) แยกจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอส อะไมเลสและไลเปส ในตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงแข็งที่ประกอบด้วย skim milk, starch และ tributyrin เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบจุลินทรีย์ที่สามารผลิตโปรติเอส อะไมเลส และไลเปสได้มีจำนวน 45, 29 และ 4 ไอโซเลต เมื่อนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาคัดเลือกซ้ำ โดยเลือกโคโลนีที่ให้ความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางสูงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไอโซเลตทั้ง 3 สายพันธุ์มาศึกษารูปร่างและการติดสีแกรม พบว่าเป็นสายพันธุ์ของแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus*

เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, ศิริโฉม ทุ่งเก้า และเยาวภา ไหวพริบ (2549) ได้ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดย B. licheniformis ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงจากแหล่งคาร์บอนที่ได้แก่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ น้ำแป้งถั่วเหลือง ความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ พีเอชเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 28.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรณี แก่นสาร (2550) ได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จากตัวอย่างดินในพื้นที่ทิ้งขยะในจังหวัดอุบลราชธานี พบจุลินทรีย์ ไอโซเลทที่ 3 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ธีรพงษ์ สุขสว่าง (2550) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการหมักแบบแห้งด้วยรา Rhizopus oligosporus โดยใช้กากมันสำปะหลัง 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อใช้ปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์และความชื้นเริ่มต้น 55 เปอร์เซ็นต์ มี ความเหมาะสมในการผลิตเอนไซมอะไมเลส โดยมี ค่ากิจกรรมอะไมเลส สูงสุดคือ 8,987.60 ยูนิตต่อกรัมในชั่วโมงที่ 84

พัชรี สินธุนาวา และคณะ (2550) ได้คัดแยกจุลินทรีย์ ที่ย่อยสลายสารโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน จากตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งต่างๆในอำเภอ พระนครศรีอยุธยา สามารถแยกจุลินทรีย์ได้จำนวน 241 ไอโซเลต พบว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและ

คาร์โบไฮเดรต คือ แบคทีเรียในสกุล Bacillus ส่วนจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันคือ แบคทีเรียในสกุล Acinetobacter

ศิวพร เงินถาวร และ วรรณา ชูศรีจันทร์ (2552) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสชนิดทนอุณหภูมิสูงจากดินในจังหวัดสุพรรณบุรีและนครศรีธรรมราช จำนวน 11 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ทั้งสิ้น 15 ไอโซเลท เมื่อทดสอบลักษณะทางรูปร่างและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น คล้ายกับแบคทีเรียในจีนัส Bacillus จากแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลทพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ A-22-2 เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสในปริมาณสูงที่สุด เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงใน Starch medium ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 50 °C พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ A-22-2 สามารถหลั่งเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 131.67 และ 320.56 U/ml ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ A-22-2 สามารถคงตัวอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 60° C อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

สุธีรา ศรีสมัย (2556) ได้คัดเลือก และศึกษาการเจริญของสเตรปโตมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลสได้ พบว่า สเตรปโตมัยทั้ง 78 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ มีความสามรถในการผลิตเอนไซม์ โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลสได้ เอนไซม์ที่ สเตรปโตมัย กลุ่มนี้สร้างได้เป็นจำนวนมากที่สุดคือ เอนไซม์ไลเปส รองลงมาคือ เอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส คิดเป็นร้อยละ 60.26, 48.72,และ 39.74 ตามลำดับ

อพัชชา จินดาประเสริฐ (2556) ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อเป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง จำนวน 179 ไอโซเลท พบเชื้อจำนวน 103 ไอโซเลทที่ให้ผลการเกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารและศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อย Soluble Starch พบค่า enzyme activity อยู่ในช่วง 1.95-3.61 U/ml

เดวี่ แอนด์โยเกอร์สวอรัน (Devi and Yogerswaran,1999) พบว่า *Micrococcus halobius* OR-1 ผลิตอะไมเลสและพลูลูลาเนสที่ย่อยสลายแป้งที่มี ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ได้ อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 90 นาที และเอนไซม์มี ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมเท่ากับ 8 และมีเสถียรภาพในช่วงความเป็นกรด-เบส 6 - 12

รามาคานแดร้น และคณะ(Ramachandran et,al.,2004) ศึกษาการผลิตแอลฟาอะไมเลสจากตะกอนของน้ำมันมะพร้าวด้วยรา *Aspergillus oryzae* โดยการหมักแบบแห้งพบว่าเมื่อใช้ตะกอนของน้ำมันมะพร้าวอย่างเดียวสามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสได้ 1,372 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการผลิตที่ 24 และเมื่อมีการเติมอาหารเสริมโดยเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์แป้งและ 1 เปอร์เซ็นต์ เปปโตนทำให้เพิ่มการผลิตแอลฟาอะไมเลสเป็น 3,388 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง