การผลิตสารลีแวนด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครสเพื่อการเพิ่มมูลค่ากากของเสียอุตสาหกรรม

Production of Levan by Levansucrase for Value-Added Industrial Waste

ธนวัฒน์ ราชภิรมย์[1] ณัฏฐิณี ธีรกุลกิตติพงศ์[2] และวิทวัส แจ้งเอี่ยม[3]

บทคัดย่อ

Bacillus siamensis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ลีแวนซูเครส (Levansucrase) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายซูโครสผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อโมเลกุลผ่านกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันเกิดเป็นสารลีแวนซึ่งเป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ โดยจะมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลฟรุกโทสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β(2⟶6) linkages กับ β(2⟶1) linkages ในสายหลักและโซ่กิ่งตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลีแวนด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครส ที่ความเข้มข้นของซูโครส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิต่างๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลีแวนเท่ากับ ความเข้มข้นของซูโครส 20%(w/v) pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลีแวน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาการบำบัดของเสียอุตสาหกรรมอาหารที่มีซูโครสความเข้มข้น 20% (w/v) ด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครสบริสุทธิ์ ที่ pH 6 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุด 0.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาสรุปได้ว่าเอนไซม์ลีแวนซูเครสบริสุทธิ์สามารถเปลี่ยนรูปของเสียให้เป็นสารลีแวน ซึ่งเป็นสารที่มีมูลค่า เพื่อส่งเสริมให้มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ของเสียอุตสาหกรรม ลีแวน ลีแวนซูเครส

ABSTRACT

Levansucrase is excreted from Bacillus siamensis which can degrade sucrose through hydrolysis reaction and transfructosylation reaction to form Levan. Levan is polysaacharide with the structure of fructose linked with bonds of β(2⟶6) linkages and β(2⟶1) linkages in the main chains and branched chains, respectively. In this research investigation, the researchers examined the enzyme purification of Bacillus siamensis and the conditions appropriate for the production of Levan using Levansucrase with sucrose concentration, potential of hydrogen ion (pH), and various temperatures. It was found that the conditions appropriate for the production of Levan were 20 percent (w/v) sucrose concentration, pH 6 at 37 degree

[1] หลักสูตรสาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2] หลักสูตรสาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3] หลักสูตรสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Celsius for 48 hours. The enzyme activity was at the maximum of 0.68 unit per milliliter (IU/mL). The study of food industrial waste management with 20 percent (w/v) sucrose concentration using pure Luvansucrase at pH 6 and 38 degree Celcius for 48 hours found that enzyme activity was at the maximum of 0.57 IU/mL). It can be concluded that pure Levansucrase could transform waste into Levan which is a valuable substance to promote its development to be quality products.

Keywords: *Bacillus siamensis*, industrial waste, levan, levansucrase

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาทางด้านมลพิษที่เกิดจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อชุมชนหรือครัวเรือนที่อยู่ใกล้เคียงโรงงาน ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมามีหลายด้าน เช่น ด้านสุขภาพทางร่างกายและจิตใจ ทรัพยากรทางธรรมชาติและความหลากหลายทางชีวภาพในแหล่งน้ำเสื่อมโทรมและมีจำนวนลดลง ซึ่งอุตสาหกรรมอาหารเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศ เนื่องจากมีความต้องการของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อโรงงานอุตสาหกรรมทางด้านอาหารและเครื่องดื่ม คือ ค่าใช้จ่ายในการบำบัดและกำจัดขยะ (KüçükaŞik et al., 2011) ดังนั้น การพัฒนาอุตสาหกรรมพลังงานและเคมีชีวภาพ (Bio-refineries) แบบยั่งยืนที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงได้รับความสนใจจากผู้ประกอบการอุตสาหกรรม แนวคิดนี้เกี่ยวข้องกับการผลิตสารประกอบต่างๆ เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ, สารเคมี หรือพลังงานที่ดีจากแหล่งพลังงานทดแทน เช่น ชีวมวล (Alam and Hossain., 2007) กระบวนการแปรรูปชีวมวลเป็นวัสดุชีวภาพที่เป็นประโยชน์สามารถเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของวัตถุดิบที่ทิ้งในปัจจุบันและลดปริมาณน้ำเสียที่ผลิตได้จากอุตสาหกรรมต่างๆ

ในสังคมปัจจุบันอาหารไม่ได้มีไว้เพื่อความต้องการด้านพลังงานของร่างกายเพียงเท่านั้น แต่ยังเน้นไปทางด้านการส่งเสริมสุขภาพ ความสนใจทางด้านสุขภาพที่เพิ่มขึ้นของผู้คนในการเลือกรับประทานอาหาร (Dominguez and Rodridues., 2014) ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาผู้คนให้ความสำคัญกับพฤติกรรมการบริโภคอาหารมากขึ้นและอาหารที่ให้ประโยชน์จะถูกให้ความสนใจทางด้านการรักษาสุขภาพของมนุษย์ ลีเวน (Levan) เป็นโฮโมโพลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันเป็นสายหลัก (Cerning, 1990) ถูกผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด (Ebskamp et al., 1999) การศึกษาเกี่ยวกับการรวบรวม การสังเคราะห์และการผลิตลีเวน เริ่มขึ้นระหว่างปี พ.ศ. 2413 ถึง 2483 ในเยอรมนี ฝรั่งเศส และอังกฤษ (Hendry and Wallace., 1993) นอกจากคุณสมบัติทั่วไปของลีแวนยังมีคุณสมบัติทางชีวการแพทย์ที่สำคัญ เช่น สารต่อต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการอักเสบ, ป้องกันมะเร็ง, สารต่อต้านเอดส์ เป็นต้น (Dahech and Belghith., 2011) และยังใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางในการจัดทำครีมผิวมอยเจอไรเซอร์ (Yang, 2007) การใช้ประโยชน์จากลีเวนในภาคอุตสาหกรรมมีจำนวนมาก ลีแวนจึงกลายเป็นสารพอลิแซ็คคาไรด์ที่สำคัญและเป็นสารที่มีความต้องการในตลาด โดยที่ลีแวนเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าสูง ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาทำการวิจัยในระดับปริญญานิพนธ์ของ ณัฐิวุฒิ และ ฐลัชนันท์ (2017) โดยศึกษาการวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ และพบว่ามีลักษณะโครงสร้างเป็นสารลีแวนด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ Nuclear magnetic resonance (NMR)

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตสารลีแวน (Levan) ซึ่งเป็นสารพรีไบโอติกมูลค่าสูง โดยการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลีแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ Bacillus siamensis และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลีแวนด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครสบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นของซูโครส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิต่างๆ และศึกษาการผลิตสารลีแวนจากของเสียอุตสาหกรรมที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเอนไซม์ลีแวนซูเครสจาก Bacillus siamensis

นำจุลินทรีย์ Bacillus siamensis มาทำการแยกจุลินทรีย์เบื้องต้นบนอาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตร Differentiate media ทำการคัดเลือกโคโลนีที่สร้างเมือก ทำการเลี้ยงลงในอาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตร Enrich media เพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้มีการเจริญเติบโต โดยดึงจุลินทรีย์ออกมาจำนวน 1 ลูป และใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ 1 คืน ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำจุลินทรีย์ที่ได้จากอาหารเหลวสูตร Enrich media จำนวน 1,000 ไมโครลิตร มาใส่ในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ Selective media ปริมาณ 200 มิลลิลิตร เพื่อทำการหมักให้ได้เอนไซม์ออกมา โดยเขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะได้สารละลายที่มีเอนไซม์ลีแวนซูเครสผสมอยู่ เพื่อนำสารละลายไปใช้แยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. การแยกเอนไซม์ลีแวนซูเครสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus siamensis*

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเตรียมเรซิน (TOYOPERL DEAE-650M) ลงในคอลัมน์ ปรับสภาพด้วย Phosphate buffer (pH6) จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง เข้าสู่คอลัมน์ที่อัตราการไหล 1mL/min จนหมด ต่อมาเติม Phosphate buffer (pH6) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดสารละลายส่วนเกินออกไป และทำการเติม Sodium chloride “0-1 M NaCl” โดยป้อนที่ความเข้มข้นต่ำไปสูง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการทดสอบเอนไซม์ โดยการนำสารละลายแต่ละช่วงไปบ่มเพื่อดูค่ากิจกรรมของเอนไซม์ หาความเข้มข้นของ NaCl ที่ต้องใช้เพื่อดึงเอนไซม์ออกจากผิวของเรซินและทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ และเก็บผลการทดลอง

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ลีแวนซูเครส (Levansucrase)

เตรียมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 20%(w/v) ละลายด้วย Phosphate buffer (pH 6) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร จากนั้นป้อนเอนไซม์ลีแวนซูเครส ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 6, โดยใช้ความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที แล้วเลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ และเก็บผลการทดลอง

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ลีแวนซูเครส

เตรียมน้ำตาลซูโครสที่ 10 20 และ 30%(w/v) ในสารละลาย Phosphate buffer (pH 3 6 และ 9) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ป้อนเอนไซม์ลีแวนซูเครส ลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 3 มิลลิกรัม ทำการบ่มด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นจัด 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ และเก็บผลการทดลอง

4. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

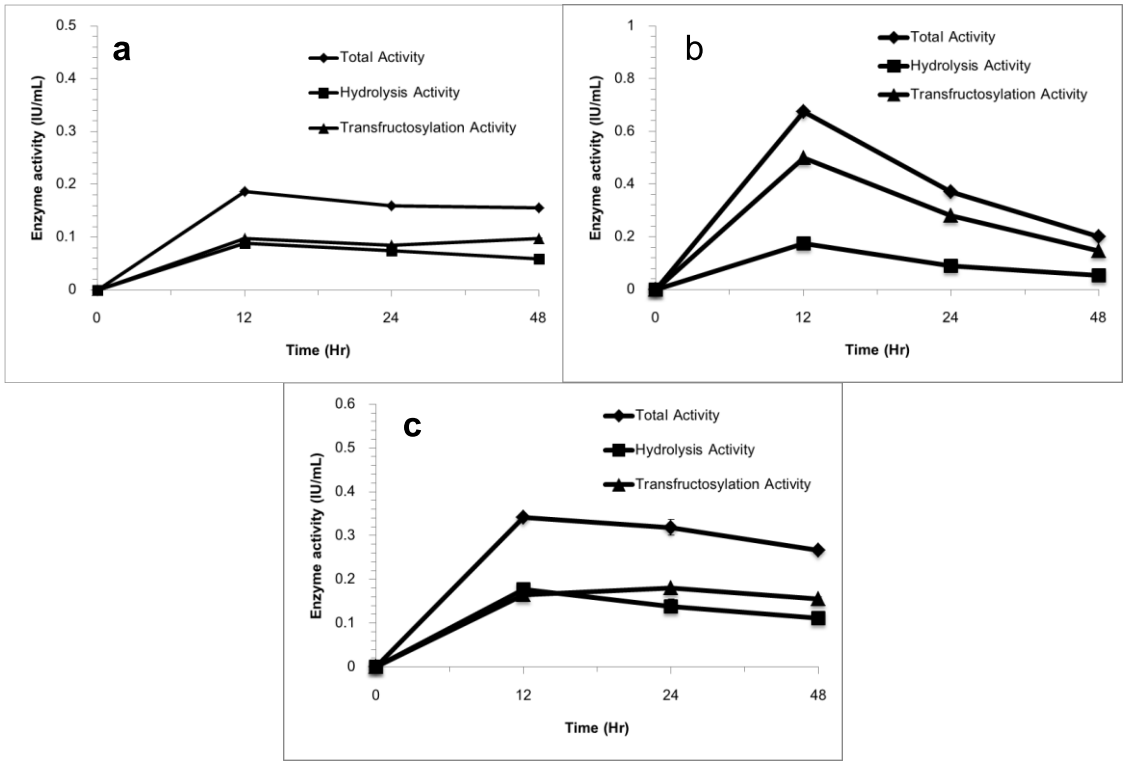
ทำการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu UFLC และคอลัมน์วิเคราะห์ รุ่น Luna 5 μm NH2 100 Å ขนาด 250 x 4.6 mm ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นอะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) และน้ำ DI ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ที่อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาทั้งหมดสามารถวัดได้จากปริมาณของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยจากการสลายพันธะของซูโครส โดยลีแวนซูเครส 1 หน่วยถูกกำหนดให้สามารถผลิตกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถวัดได้จากปริมาณฟรุกโตสอิสระที่เกิดขึ้น และกิจกรรมของปฏิกิริยา ทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสามารถคำนวณได้จากผลต่างระหว่างกิจกรรมทั้งหมดและกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ผลการวิจัย

1. ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตสารลีแวนด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครส (Levansucrase) จากการทดลองความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 10 20 และ 30% (w/v) pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ดังภาพที่ 1



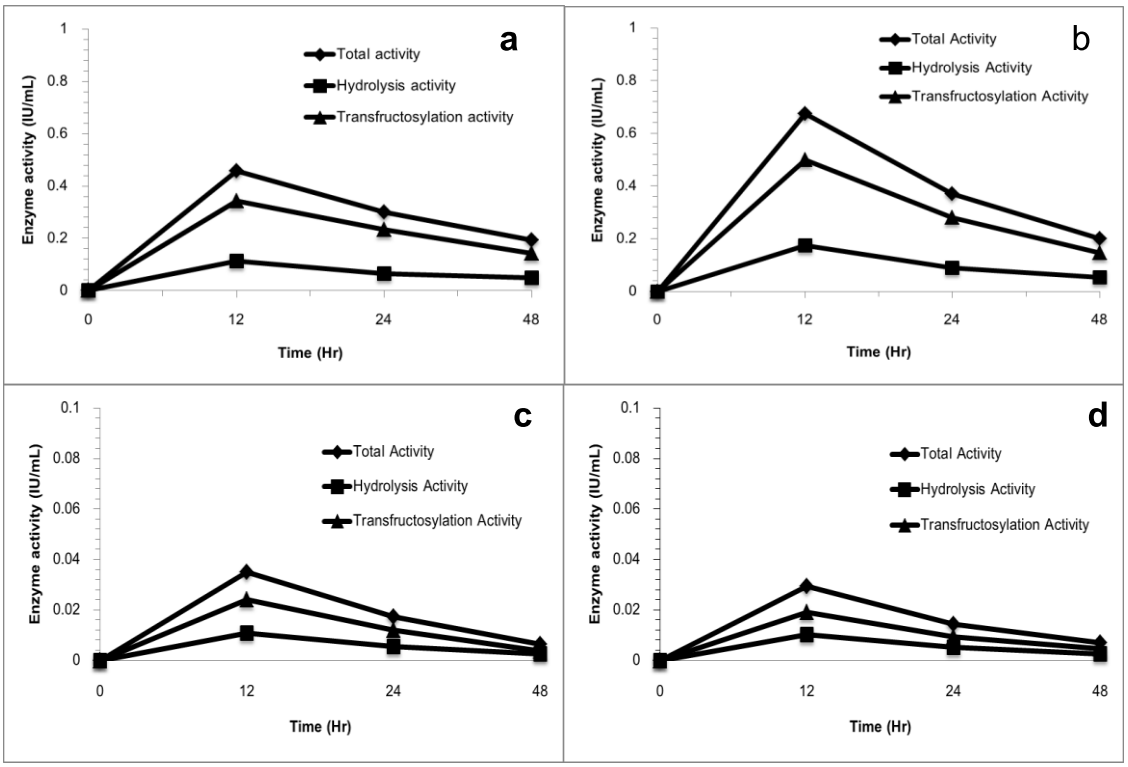
ภาพที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตสารลีแวน a) 10%(w/v) ของซูโครส b) 20%(w/v) ของซูโครส และ c) 30%(w/v) ของซูโครส ที่ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 12 ชั่วโมงพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ ทั้งหมดของซูโครสเข้มข้น 10 และ 30% (w/v) โดยมีค่า 0.17 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) อย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่า 0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสม เมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าต่ำลง อยู่ที่ 0.16, 0.37 และ 0.32 Iยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ 20%(w/v) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด และปริมาณซูโครสก็ลดลงเหลือ 1.17%(w/v) และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 10, 20 และ 30% (w/v) มีค่าเพิ่มสูงขึ้น มีค่าเท่ากับ 0.15 0.20 และ 0.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดังภาพที่ 1 ทำให้เห็นว่าที่ซูโครสเข้มข้น 20%(w/v) นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลีแวนมากที่สุด เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่า และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีซูโครสเข้มข้น 10% (w/v) มีค่าสูงสุด 0.088

และ 0.098 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีซูโครสเข้มข้น 20% (w/v) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.175 และ 0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ และอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีซูโครสเข้มข้น 30% (w/v) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.177 และ 0.164 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

2. ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการผลิตสารลีแวนด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครส

จากการทดลองความเป็นกรด-ด่าง (pH) ใน phosphate buffer ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) pH ของ Phosphate buffer 3 6 9 และ 12 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตสารลีแวน a) pH 3 b) pH 6 c) pH 9 และ d) pH 12 ที่ความเข้มข้นซูโครส 20%(w/v) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

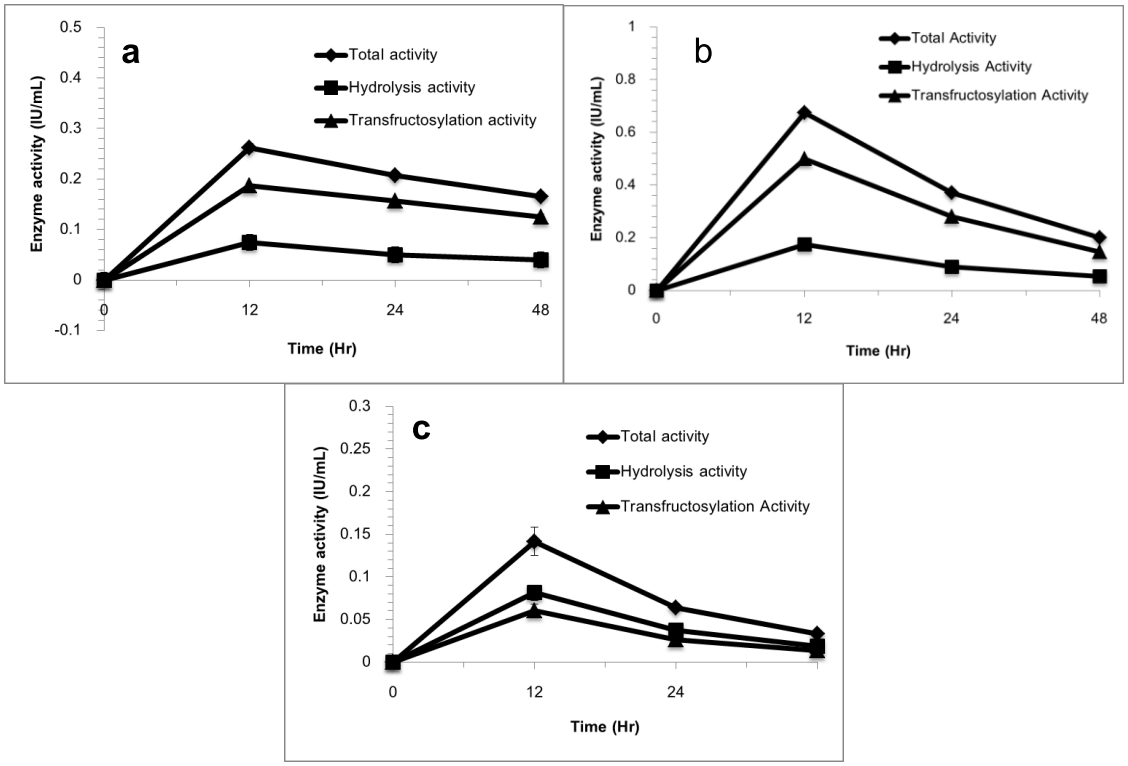
ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 12 ชั่วโมงพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของค่า pH 3, 6, 9 และ 12 โดยมีค่า 0.46 0.68 0.035 และ 0.029 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในสภาพความเป็นด่าง หรือ pH มากกว่า 7 จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด และที่สภาวะความเป็นกรด เอนไซม์ยังคงสามารถทำงานได้อยู่แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าที่ pH เท่ากับ 6 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าเพิ่มขึ้นอยู่ที่ 0.30 0.37 0.017 และ 0.014 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เห็นได้ว่าที่ pH 6 ยังคงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด และปริมาณซูโครสก็ลดลงเหลือ 1.17%(w/v) และที่สภาวะความเป็นเบส จะพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์จะยิ่งต่ำลงอีกเมื่อเวลานานขึ้น และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอาหารที่ของค่า pH 3, 6, 9 และ 12 มีค่าลดลงเท่ากับ 0.19 0.20 0.006 และ 0.006 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดัง

ภาพที่ 2 ทำให้เห็นว่าที่ pH 6 นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลีแวนมากที่สุด เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่า และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของ pH 3 มีค่าสูงสุด 0.11 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ pH 6 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.17 และ 0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ pH 9 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโต-ซิลเลชันสูงสุด 0.011 และ 0.024 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ และ pH 12 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.01 และ 0.019 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลีแวนด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครส

จากการทดลองอุณหภูมิที่มีความเข้มข้นของซูโครส 20% (w/v) pH ของ Phosphate buffer 6 ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดกิจกรรมเอนไซม์ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตสารลีแวน a) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส b) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ c) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นซูโครส 20%(w/v) pH 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

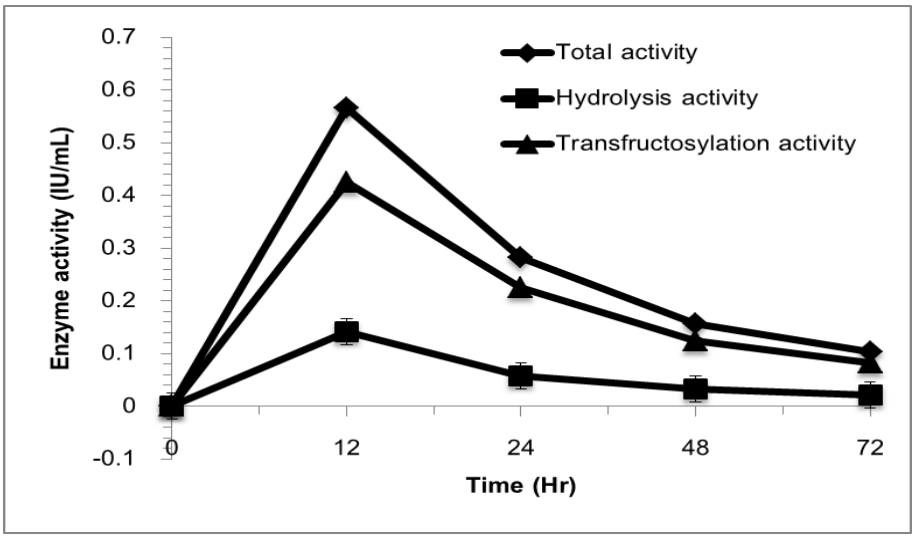
ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 12 ชั่วโมงพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอุณหภูมิ 30 37 และ 50 องศาเซลเซียส โดยมีค่า 0.26 0.68 และ 0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าต่ำอย่างเห็นได้ชัด และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงสามารถทำงานได้อยู่แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าเพิ่มขึ้น อยู่ที่ 0.21 0.37 และ 0.064 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียว ยังคงมี กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของอาหาร

ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่าลดต่ำลงเท่ากับ 0.17 0.20 และ 0.033 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ดังภาพที่ 3 ทำให้เห็นว่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นั้นเหมาะแก่การผลิตสารลีแวนมากที่สุด เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่า และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

กิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุด 0.074 และ 0.187 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.17 และ 0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันสูงสุด 0.081 และ 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

4. การผลิตสารลีแวนจากของเสียอุตสาหกรรมอาหารด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครส (Levansucrase)

การผลิตสารลีแวนจากกากของเสียอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้นของเสีย 20% (w/v) ทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง เกิดการไฮโดรไลซิสและทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน 0.142 และ 0.425 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ในขณะเดียวกันพบว่าของเสียเข้มข้น 20% (w/v) ประกอบด้วยซูโครสเข้มข้นประมาณ 17% (w/v) ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) และสามารถลดลงเหลือประมาณ 0.6% (w/v) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง มีกลูโคสและฟรุกโตสเกิดขึ้นสูงสุด 8.00 และ 1.65% (w/v) ตามลำดับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตสารลีแวน ที่ความเข้มข้นของของเสียอุตสาหกรรม 20%(w/v) pH 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุปและวิจารณ์ผล

เอนไซม์ลีแวนซูเครสที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* สามารถผลิตสารลีแวนได้ดีที่ความเข้มข้นของซูโครส 20%(w/v) pH ของ Phosphate buffer 6 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์activity สูงสุด 0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลาบ่ม 12 ชั่วโมง และเอนไซม์ลีแวนซูเครสดังกล่าวสามารถเปลี่ยนรูปของเสียอุตสาหกรรมให้เป็นสารลีแวนได้ โดยใช้เวลาบ่ม 48 ชั่วโมง มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ ห้องปฏิบัติการระหว่างดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณ บริษัท เอส เอ็ม ซีฟู้ด (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ของเสียเพื่อนำมาใช้ในการศึกษางานวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยภายใต้แผนงานบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

เอกสารอ้างอิง

ณัฐิวุฒิ ไตรโอสถ และ ฐลัชนันท์ สายเครือคำ. 2561. การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารพรีไบโอติกในรูปของลีแวนจากถั่วเหลืองหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยบูรพา.

Alam A.S. and Hossain K.M. 2007. A study on industrial waste effluents and their management at selected food and beverage industries of Bangladesh. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 11: 5-9.

Dominguez A.L., and Rodridues L.R. 2014. An overview of the recent developments on fructooligosaccharides production and applications. Food Bioprocess Technol. 7: 324-337.

Ebskamp, M. J. M., Smeekens, J. C. M. and Weisbeek, P. J.. 1999. Method for obtaining transgenic plants showing a modified fructan pattern. Google Patents.

KüçükaŞik F., H. Kazak, D. Güney. 2011. Molasses as fermentation substrate for Levan production by Halomonas sp. Applied Microbiology and Biotechnology. 89(6): 1729-1740.

Hendry G.A., and Wallace R.K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. Science and Technology of Fructans. Florida, USA : 119-139

Dahech I., and Belghith. K.S. 2011. Administration of Levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. International Journal of Biological Macromolecules. 49 (5): 942-947.

Cerning J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 87(1–2): 113-130

Yang S.T. 2007. Bioprocessing for Value-added Products from Renewable Resources, (first ed.), Elsevier, Ohio, USA.