บทที่ 2

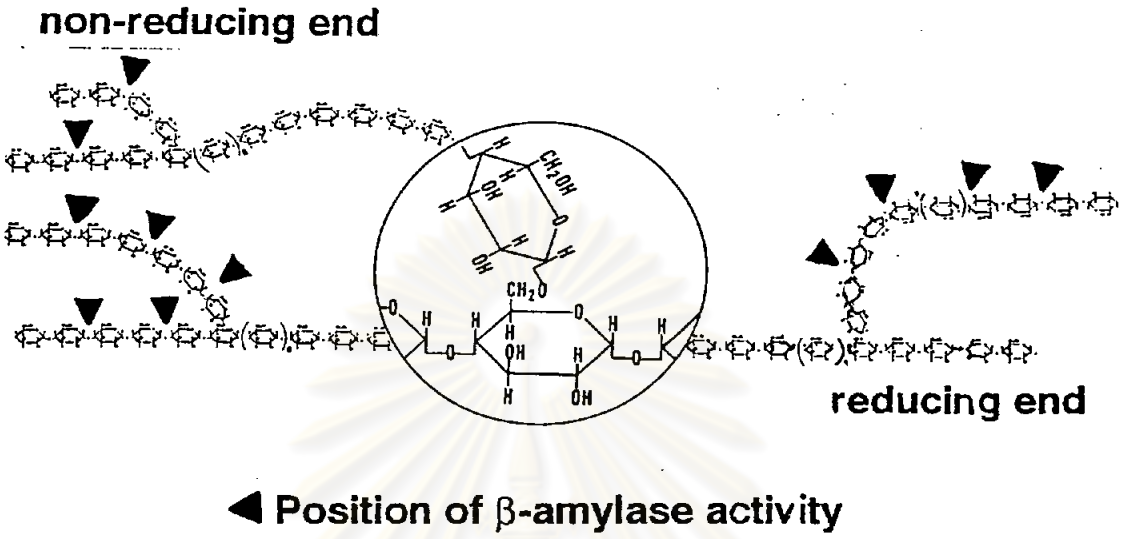
วารสารปริทัศน์

บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน (β-limit dextrin)

บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินเป็น D-glucan ที่ได้จากการย่อยอะไมโลเพคตินอย่างสมบูรณ์ด้วยบีต้า-อะไมเลส โดยบีต้า-อะไมเลสย่อยพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-(1,4) ในลักษณะการตัดพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบ จากปลายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายทีละ 1 หน่วยของมอลโตสหรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคสและหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ α-(1,6) หรือหน่วยกลูโคสที่ถูกดัดแปร ทำให้ได้ไฮโดรไลเสทที่ประกอบด้วยมอลโตส และ D-glucan (Scotch and Elder, 1955; Kaper *et al.*, 1987) อัตราส่วนของ D-glucan ต่อมอลโตสประมาณ 2 ต่อ 3 ถึง 4 ต่อ 1 ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของอะไมโลเพคตินต่ออะไมโลสในเม็ดแป้ง (Kaper *et al.*, 1987) จากการย่อยนี้บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินที่ได้ มีโครงสร้างทางเคมีเป็นหน่วยกลูโคสที่ต่อกันเป็นสายตรงด้วยพันธะไกลโคซิลที่ α-(1,4) และสายตรงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิลที่ α-(1,6) จึงมีลักษณะเป็นสายที่มีกิ่งก้านซึ่งสายกิ่งก้านด้านนอกสุดมีเพียง 1 หรือ 2 หน่วยกลูโคสเท่านั้น (ภาพที่ 1) และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยมากกว่า 17,200 (Kaper *et al.*, 1987)

การผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน

บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน ถูกค้นพบในการย่อยแป้งมันฝรั่งที่เกิดเจลาติไนเซชันด้วยมอลท์ซึ่งมีบีต้า-อะไมเลสอยู่ (Kaper *et al.*,1987) ขั้นตอนการผลิตที่สำคัญมีอยู่ 3 ขั้นตอน คือ ลิเคอแฟคชัน (liquefaction) แซคคาริฟิเคชัน (saccharification) และการทำให้บริสุทธิ์ (purification) โดยมีรายละเอียดของขั้นตอนทั้ง 3 (ภาพที่ 2) ดังนี้



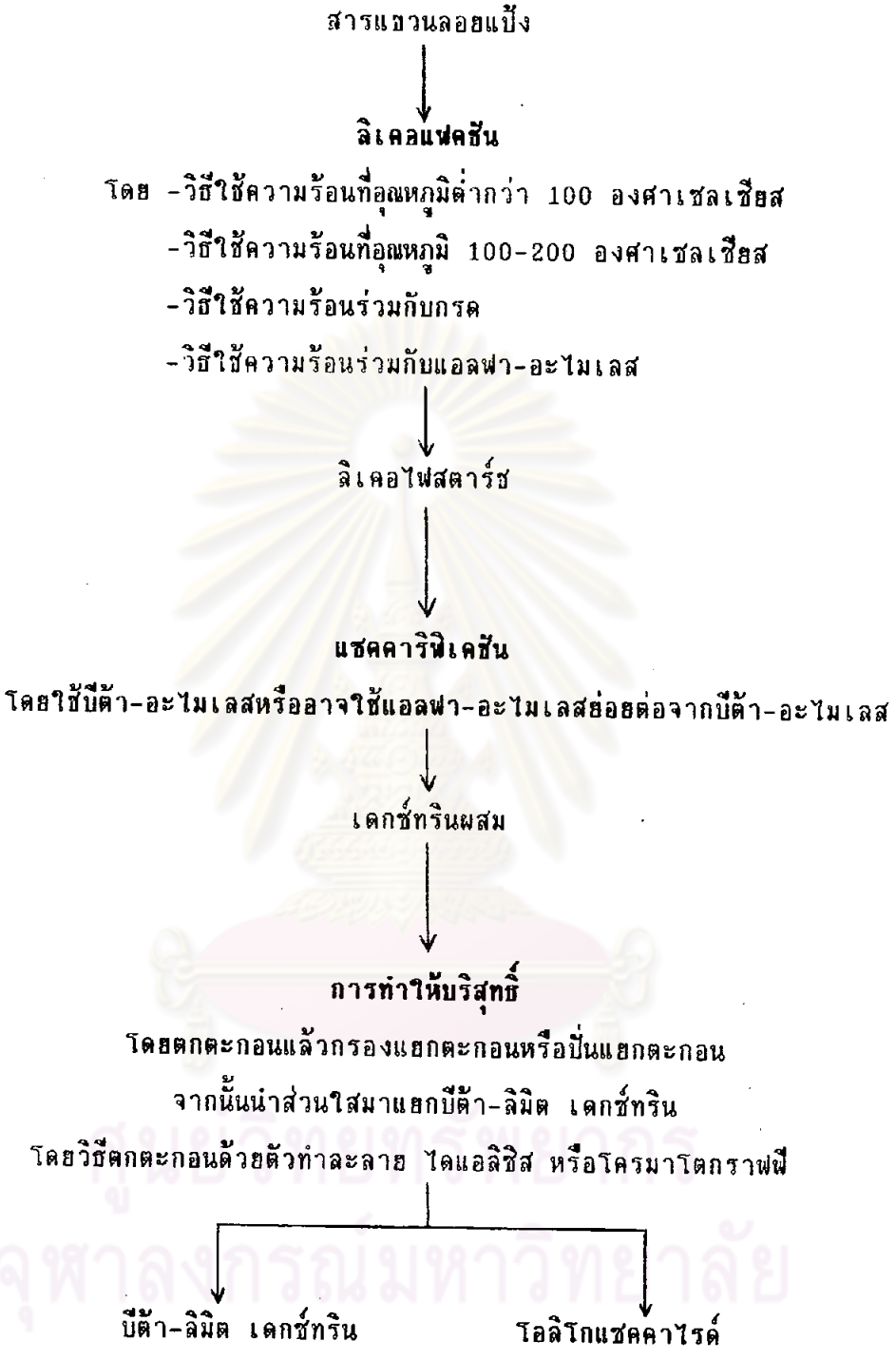
ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน
(Scotch and Elder, 1955)

1. ลิเคอแฟคชัน

ลิเคอแฟคชันคือ การทำให้เม็ดแป้งละลายในน้ำ โดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิในการกลายเป็นเจลของแป้ง (gelatinization temperature) หรือให้ความร้อนพร้อมกับย่อยแป้งด้วยกรดหรือแอลฟา-อะไมเลส เพื่อลดความหนืดของสารละลายแป้งทำให้บีต้า-อะไมเลสย่อยอะไมโลเพคตินให้เป็นบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินในขั้นตอนต่อไปได้ง่าย ผลผลิตจากขั้นตอนนี้เรียกว่า"ลิเคอไฟสตาร์ช" (liquefied starch) รายละเอียดในการทำลิเคอแฟคชันมีดังนี้

1.1 การใช้ความร้อน

1.1.1 ให้ความร้อนแก่สารแขวนลอยแป้งซึ่งมีความเข้มข้นในช่วง 0.5 ถึง 0.6 กรัมต่อเดซิลิตร ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียสทำให้แป้งเกิดเจลาติไนเซชันบางส่วนแล้วย่อยสารละลายแป้งด้วยบีต้า-อะไมเลส (ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ หรืออะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ซึ่งมีปริมาณ dimethyl sulfoxide ร้อยละ 20) ที่อัตราส่วนของบีต้า-อะไมเลสต่อแป้งในช่วง 13.3 ถึง 16 kilo international unit ต่อ 100 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.7 เวลาของการย่อย 48 ชั่วโมง ย่อยด้วยบีต้า-อะไมเลสซ้ำอีกครั้ง จะได้สารละลายที่มีบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินผสมอยู่ วิธีนี้ต้องใช้ความเข้มข้น



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน

(รวบรวมจากรายงานของ Morehouse, Malzan and Day, 1972; Biliaderis, Grant and Vose, 1981; Robin, 1981; Kruger and Marchylo, 1982; Kainuma, 1984; Brook and Griffin, 1987; 1989; Kaper *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*,1989; Nebesny, 1990b)

ของแป้งเริ่มต้นต่ำกว่าวิธีอื่นๆ เพราะความหนืดของสารละลายแป้งขัดขวางการกระจายตัวของบีต้า-อะไมเลส และอะไมโลสที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 1 เกิด retrogradation ทำให้ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ ดังนั้นวิธีนี้เตรียมปริมาณบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินได้ต่ำกว่าร้อยละ 1 จึงนิยมในการเตรียมบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินสำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ต่างๆ (Biliaderis, Grant and Vose, 1981; Robin, 1981; Kruger and Marchylo, 1982)

1.1.2 ให้ความร้อนแก่สารแขวนลอยแป้ง ที่อุณหภูมิในช่วง 100 ถึง 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานจนกระทั่งเม็ดแป้งเกิดเจลาติไนเซชันอย่างสมบูรณ์ (ไม่เห็น birefringence ของเม็ดแป้งเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงโพลาไรส์) วิธีนี้ใช้เตรียมบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินในอุตสาหกรรมอาหารและยา โดยการใช้ steam jet cooker ให้ความร้อนที่อุณหภูมิในช่วง 155 ถึง 160 องศาเซลเซียสแก่สารแขวนลอยแป้งซึ่งมีความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 20 ถึง 23 กรัมต่อเดซิลิตร อุณหภูมิสูงและแรงจากการกวนทำให้สารละลายแป้งไม่กลายเป็นเจลและช่วยการกระจายของบีต้า-อะไมเลสในขั้นตอนต่อไป (Kaper *et al.*, 1987)

1.2 การใช้ความร้อนร่วมกับกรดหรือแอลฟา-อะไมเลส

วิธีนี้ให้ความร้อนพร้อมกับย่อยโมเลกุลแป้งด้วยกรดหรือแอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูง การใช้กรดทำให้ได้ปริมาณเดกซ์ทรินในลิเคอไฟสตาร์ชมากกว่าการใช้แอลฟา-อะไมเลส เมื่อลิเคอไฟสตาร์ชมีค่าสมมูลเดกซ์โตรสเท่ากัน (ตารางที่ 1) แต่การใช้แอลฟา-อะไมเลสดีกว่าการใช้กรดหลายประการคือ ภาวะการเกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง เอนไซม์มีความจำเพาะจึงให้ผลผลิตที่มีสมบัติสม่ำเสมอ ผลผลิตไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเนื่องจาก Maillard reaction ปราศจากสารที่ไม่ต้องการอันเนื่องจากปฏิกิริยาของกรด (ปทุมพร ฉิมเอนก, 2534; ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม, 2534) และลิเคอไฟสตาร์ชที่ได้มีปริมาณกลูโคสต่ำกว่าถึง 5 เท่า (ตารางที่ 1) (Kainuma, 1984)

การเพิ่มระดับการย่อยแป้ง โดยการเพิ่มเวลาในการย่อยแป้งด้วยแอลฟา-อะไมเลสทำให้เดกซ์ทรินในลิเคอไฟสตาร์ชมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยลดลง เวลาของการย่อยเพิ่มขึ้นจาก 1.2 เป็น 3, 6 และ 12 นาที ทำให้เดกซ์ทรินในลิเคอไฟสตาร์ชมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยลดลงจาก 6,810 เป็น 5,950, 5,200 และ 4,900 ตามลำดับ เมื่อใช้แอลฟา-อะไมเลสซึ่งสกัดจาก *Bacillus subtilis* ย่อยแป้งมันฝรั่ง (น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 392,000) ซึ่งมีความเข้มข้น 35 กรัมต่อเดซิลิตร ที่ภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และอัตราส่วนของแอลฟา-อะไมเลสต่อแป้ง 36 AS (1 AS คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง 2.63 กรัมต่อชั่วโมง เมื่อแป้งอยู่ในรูปสารละลายซึ่งมีแคลเซียม

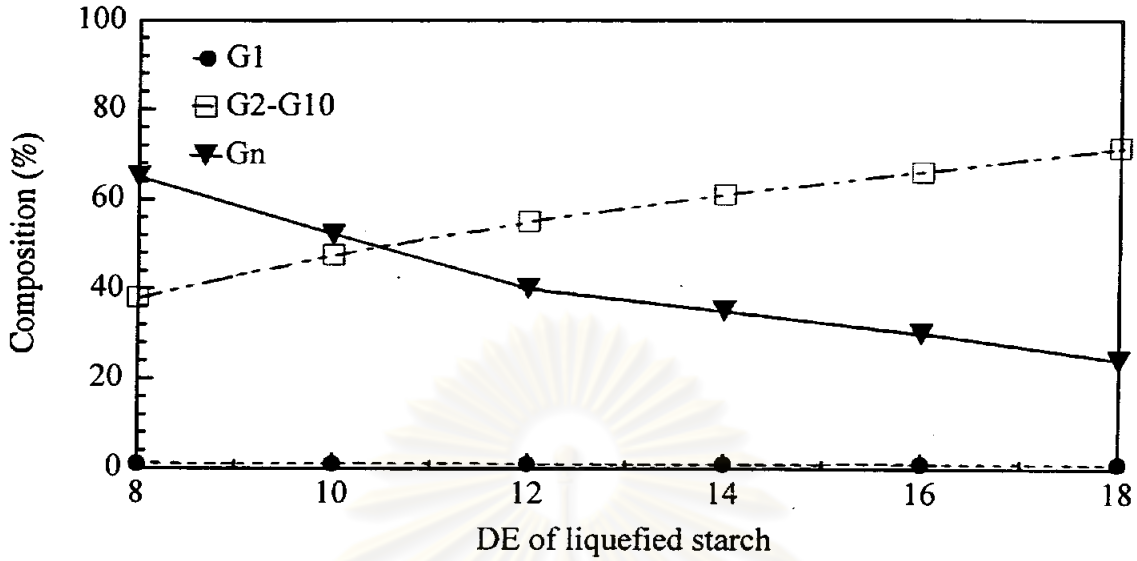
0.0043 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.6 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ต่อ 100 กรัม (Nebesny, 1990b) จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟา-อะไมเลสโดยทำให้ลิเคอไฟสตาร์ชมีค่าสมมูลเดกซ์โตรสเพิ่มขึ้นในช่วง 8 ถึง 18 พบว่าโมเลกุลแป้งถูกย่อยเป็นให้เป็นเดกซ์ทริน และเดกซ์ทรินยังถูกย่อยต่อให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ แต่โอลิโกแซคคาไรด์ไม่ถูกย่อยเป็นกลูโคส ทำให้ได้ลิเคอไฟสตาร์ชที่มีปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าร้อยละ 40 (ภาพที่ 3) (Morehouse, Malzan and Day, 1972) เนื่องจากบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินได้จากการย่อยลิเคอไฟสตาร์ชที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงด้วยบีต้า-อะไมเลส ดังนั้นการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินไม่ควรเตรียมลิเคอไฟสตาร์ชให้มีค่าสมมูลเดกซ์โตรสสูงกว่า 8

เนื่องจากแอลฟา-อะไมเลสที่ใช้ในวิธีการนี้เป็นแอลฟา-อะไมเลสที่ทนความร้อนสูง ดังนั้นวิธีหยุดแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ทำได้โดยลดความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 3.5 หรือ 5.0 ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (Chen and Chang, 1984; Brooks and Griffin, 1987; 1989; Nebesny, 1990a; 1990b)

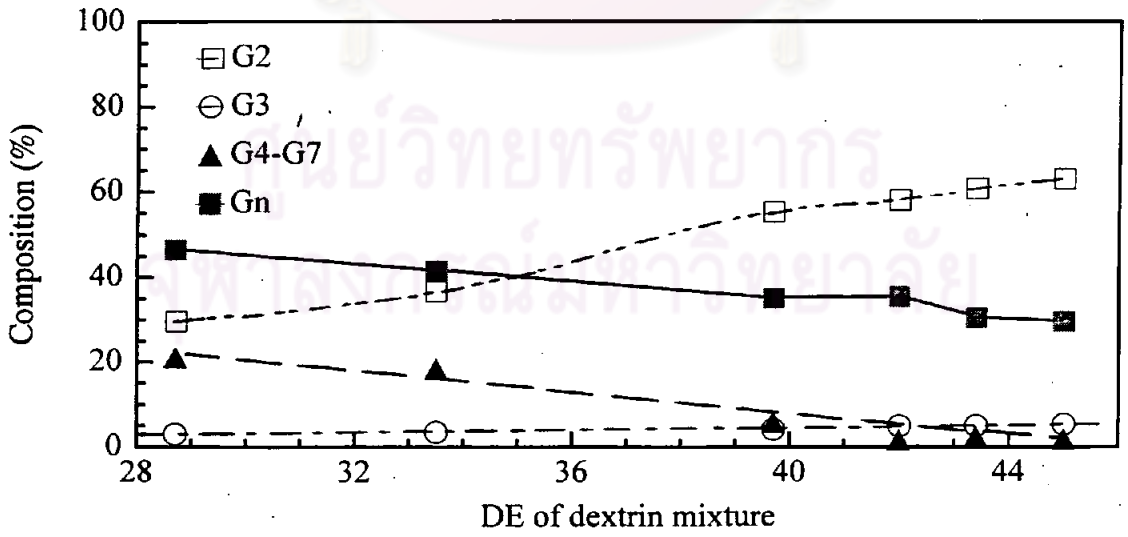
ตารางที่ 1 ปริมาณองค์ประกอบของลิเคอไฟสตาร์ชที่เตรียมโดยการย่อยแป้งด้วยกรดและที่เตรียมโดยการย่อยแป้งด้วยแอลฟา-อะไมเลส (Kainuma, 1984)

วิธีเตรียมลิเคอไฟสตาร์ชที่มีค่าสมมูลเดกซ์โตรส 15	องค์ประกอบ (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)						
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	Gn
กรด	3.7	4.4	4.4	4.5	4.3	3.3	75.4
แอลฟา-อะไมเลส	0.7	5.5	6.9	5.2	5.5	10.6	65.2

หมายเหตุ G1=กลูโคส G2=มอลโตส.....Gn=เดกซ์ทริน



ภาพที่ 3 ปริมาณองค์ประกอบของลิเคอไฟสตาร์ชที่มีค่าสมมูลเดกซ์โตรสต่างๆ ที่ได้จากขั้นตอนลิเคอแฟคชันโดยวิธีใช้ความร้อนร่วมกับแอลฟา-อะไมเลส (Morehouse, Malzan and Day, 1972)



ภาพที่ 4 ปริมาณองค์ประกอบของเดกซ์ทรินผสมที่มีค่าสมมูลเดกซ์โตรสต่างๆ ที่ได้จากขั้นตอนแซคคาริฟิเคชันโดยใช้บีต้า-อะไมเลส (Nebesny, 1990b)

2. แซคคาริฟิเคชัน

แซคคาริฟิเคชันเป็นขั้นตอนการย่อยลิเคอไฟสตาร์ชอย่างสมบูรณ์ด้วยบีต้า-อะไมเลส โดยไม่มีแอลฟา-อะไมเลสหรือกลูโคอะไมเลสปน ทำให้ได้ "เดกซ์ทรินผสม" ที่มีบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินผสมอยู่

กรณีที่ขั้นตอนลิเคอแฟคชันทำโดยวิธีการใช้ความร้อน (ข้อ 1.1 บทที่ 2) เมื่อทำแซคคาริฟิเคชันได้บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินแล้ว อาจย่อยบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินที่ได้ต่อด้วยแอลฟา-อะไมเลสให้ค่าสมมูลเดกซ์โตรสเพิ่มขึ้นไม่เกิน 3 หน่วย เพื่อลดขนาดของบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินและทำให้ได้สารละลายใสเมื่อตั้งทิ้งไว้ (Kruger and Marchylo, 1982) จากนั้นอาจย่อยต่อด้วยบีต้า-อะไมเลสเพื่อเพิ่มปริมาณมอลโตส (Kaper *et al.*, 1987)

กรณีที่ขั้นตอนลิเคอแฟคชันทำโดยวิธีใช้ความร้อนร่วมกับแอลฟา-อะไมเลส (ข้อ 1.2 บทที่ 2) ระหว่างทำแซคคาริฟิเคชัน บีต้า-อะไมเลสย่อยมอลโตเตตระโอส (G4) ถึงมอลโตเฮปโตส (G7) และสายกิ่งก้านด้านนอกสุดของเดกซ์ทรินไปเป็นมอลโตส ทำให้ปริมาณมอลโตสและค่าสมมูลเดกซ์โตรสสูงขึ้น จนกระทั่ง G4 ถึง G7 หมด (ภาพที่ 4) และน้ำหนักโมเลกุลของเดกซ์ทรินไม่ลดลง และทำให้ค่าสมมูลเดกซ์โตรสของเดกซ์ทรินผสมไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 5) แสดงว่าบีต้า-อะไมเลสย่อยลิเคอไฟสตาร์ชอย่างสมบูรณ์ (Nebesny, 1990b)

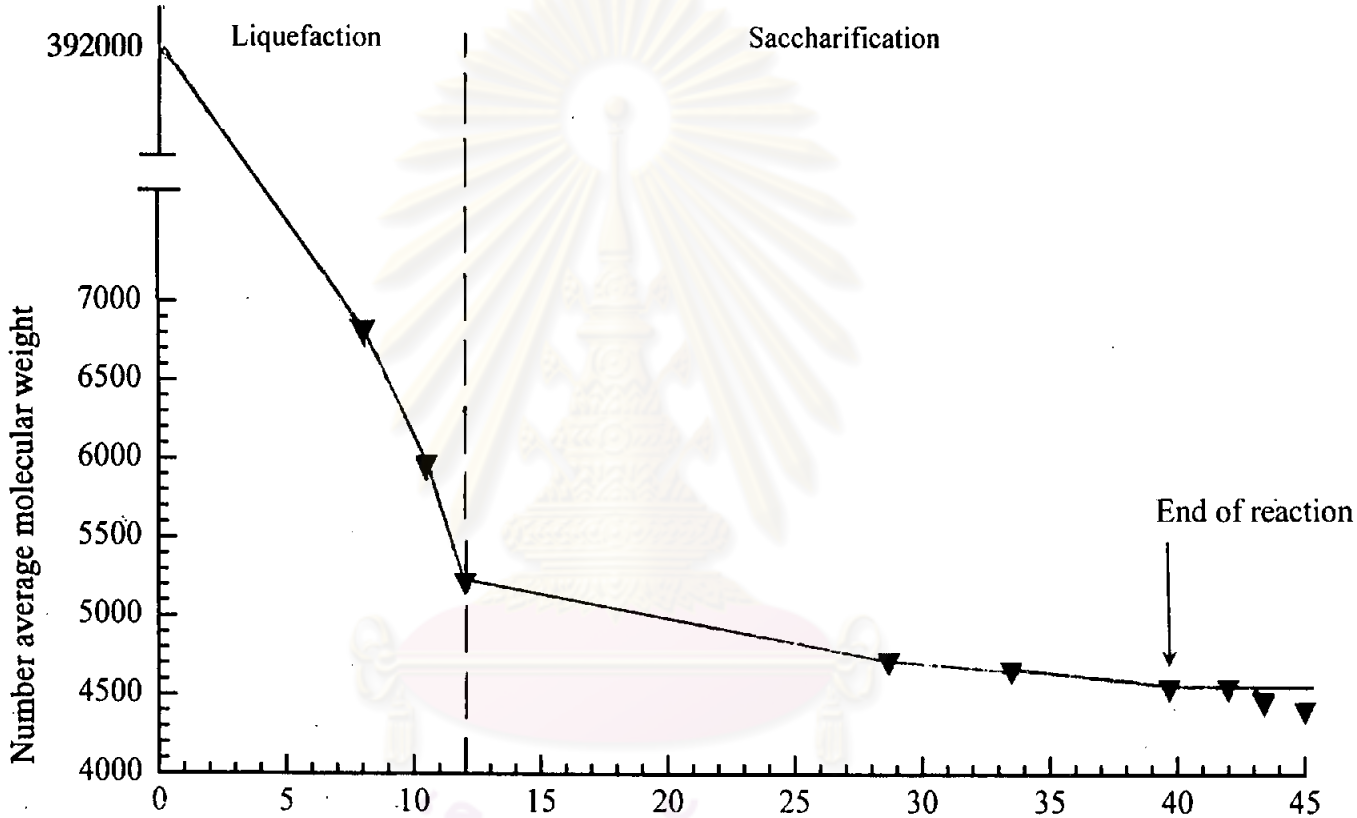
ปริมาณบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินในเดกซ์ทรินผสมขึ้นอยู่กับปริมาณอะไมโลเพคตินในแป้ง กล่าวคือ ปริมาณอะไมโลเพคตินในแป้งสูงขึ้นทำให้ได้บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินสูงขึ้น แป้ง waxy corn ซึ่งมีอะไมโลเพคตินสูงกว่าแป้งมันฝรั่ง 1.3 เท่า ทำให้ได้บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินสูงกว่า 1.3 เท่าเช่นกัน เมื่อผลิตด้วยวิธีเดียวกัน (ตารางที่ 2)

วิธีหยุดแอคติวิตีของบีต้า-อะไมเลสทำได้โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 2.5 หรือให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที (Kaper *et al.*, 1987; Nebesny, 1990b)

3. การทำให้บริสุทธิ์

การผลิตในขั้นตอนแซคคาริฟิเคชันพบว่า สารละลายเดกซ์ทรินผสมที่ได้ประกอบด้วยบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน โอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นมอลโตส และตะกอนของโปรตีนของเอนไซม์ที่เสียสภาพธรรมชาติและแป้งที่ไม่ถูกย่อย ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

3.1 การแยกส่วนของโปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติและแป้งที่ไม่ถูกย่อย ทำได้โดยวิธีเก็บที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนอะไมโลสที่ไม่ถูกย่อย จากนั้นแยกตะกอนของอะไมโลสและโปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติออก โดยวิธีกรอง



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสมมูลเดกซ์โตรสของเดกซ์ทรินผสมและการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเดกซ์ทริน ระหว่างขั้นตอนลิเคอแฟคชันและแซคคาริฟิเคชัน (Nebesny, 1990b)

(Kaper *et al.*, 1987) หรือวิธีปั่นแยก (Brooks and Griffin, 1987; 1989; Kaper *et al.*, 1987) แล้วนำส่วนใสซึ่งมีบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินมาแยกออกจากโอลิโกแซคคาไรด์

3.2 การแยกบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินออกจากโอลิโกแซคคาไรด์ ทำได้โดยวิธีไดแอลิซิส (Biliaderis, Grant and Vose, 1981) วิธีตกตะกอนด้วยตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ อะซีโตน (Nebesny, 1990a; 1990b) หรือวิธีโครมาโตกราฟฟีซึ่งวิธีนี้ใช้ได้ทั้งในระดับการทดลอง (Robin, 1981; Brook and Griffin, 1987; 1989; Kruger and Marchylo, 1982) และในระดับอุตสหกรรม (Yoshida *et al*, 1989)

ตารางที่ 2 ปริมาณองค์ประกอบของเดกซ์ทรินผสมที่ได้จากการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินด้วยวิธีลิเคอแฟคชันด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส จากนั้นแซคคาริฟิเคชันด้วยบีต้า-อะไมเลสและแอลฟา-อะไมเลส ตามลำดับ (Kaper *et al.*, 1987)

ชนิดของแป้งที่ใช้	องค์ประกอบ (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)		
	G2	G3	Gn
แป้ง waxy corn (อะไมโลเพคติน 100%)	34.0	-	66.0
แป้งมันฝรั่ง (อะไมโลเพคติน 79 %)	50.0	1.0	49.0

หมายเหตุ G2=มอลโตส G3=มอลโตไตรโอส และ Gn=บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน

ในการวิจัยนี้ทำการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน โดยขั้นตอนลิเคอแฟคชันใช้วิธีการให้ความร้อนพร้อมกับการย่อยสารแขวนลอยแป้งด้วยแอลฟา-อะไมเลส และขั้นตอนแซคคาริฟิเคชันใช้วิธีการย่อยลิเคอไฟสตาร์ชด้วยบีต้า-อะไมเลส เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินให้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างๆกัน จากการแปรน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของลิเคอไฟสตาร์ช โดยการแปรอัตราส่วนของแอลฟา-อะไมเลสต่อแป้งแห้ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน

การผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินมีปัจจัยที่สำคัญคือ

1. ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ เพราะค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการแตกอิออนกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งมีผลต่อการจับกับสับสเตรทและการแตกอิออนของสับสเตรทกับโคแฟคเตอร์ให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมกับการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลผลิต ดังนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วงหนึ่งเท่านั้น (Segel, 1976)

2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการละลายของเม็ดแป้งและแอคติวิตีของแอลฟา-อะไมเลส การเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่าอุณหภูมิในการกลายเป็นเจล (geltinization temperature) ของแป้งทำให้แป้งละลายน้ำได้มากขึ้น เพราะความร้อนทำให้น้ำแพร่เข้าในเม็ดแป้งได้เร็วขึ้น (Waniska and Gomez, 1992) และการเพิ่มอุณหภูมิยังทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เพราะการเพิ่มอุณหภูมิช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ที่โมเลกุลของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา ทำให้อัตราการชนกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเพิ่มขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติและแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง (Segel, 1976)

3. อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อแป้ง

ปริมาณของแป้งควรทำให้เอนไซม์อิ่มตัวด้วยสับสเตรทพอดี ถ้าปริมาณเอนไซม์ต่ำกว่าปริมาณที่ทำให้เอนไซม์อิ่มตัวด้วยสับสเตรท ความเร็วในการย่อยจะต่ำทำให้เสียเวลาในการย่อยนานและการย่อยอาจไม่สมบูรณ์และทั่วถึง แต่ถ้าปริมาณเอนไซม์สูงกว่าปริมาณที่ทำให้เอนไซม์อิ่มตัวด้วยสับสเตรทจะสิ้นเปลืองเอนไซม์ และอาจมีกลิ่นของเอนไซม์ตกค้างในผลิตภัณฑ์ ในภาวะการผลิตโดยทั่วๆไป เมื่อความเข้มข้นของแป้งอยู่ในช่วงร้อยละ 20 ถึง 40 มักใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0.03 ถึง 0.1 (Yankov *et al.*, 1986)

4. เวลา

เวลาในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์มีผลต่อปริมาณเดกซ์ทรินและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเดกซ์ทริน ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1 หัวข้อการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทริน

5. แรงทำลายการเกาะกันระหว่างอนุภาคเม็ดแป้งในสารละลายแป้ง

แรงเฉือนจะช่วยการละลายของเม็ดแป้ง เม็ดแป้งที่เกิดเจลาติไนเซชันแล้วแต่ไม่ได้รับแรงเฉือนทำให้อะไมโลสสามารถละลายออกจากเม็ดแป้งในปริมาณจำกัด คือร้อยละ

20 ของปริมาณอะไมโลสทั้งหมด ถ้าได้รับแรงเฉือนเพียง 40 วินาทีทำให้อะไมโลสละลายได้ถึงร้อยละ 80 (Jackson *et al.*, 1988) และจากการทดลองให้ความร้อนแก่สารแขวนลอยแป้งร่วมกับการให้แรงเฉือนจากการเขย่าและการกวน พบว่า การละลายของแป้งเพิ่มขึ้นเมื่อแรงเฉือนสูงขึ้นและเวลาที่ให้แรงนานขึ้น (Gomez *et al.*, 1989) ทั้งนี้เพราะแรงที่ให้แก่สารแขวนลอยแป้ง เช่น โดยการคน เขย่า กวน หรือการทำเอกซ์ทรูชันจะทำลาย particle interaction ระหว่างเม็ดแป้ง ทำให้เม็ดแป้งกระจายตัวออกจึงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับน้ำของเม็ดแป้งทำให้การละลายมากขึ้น (Waniska and Gomez, 1992)

6. ปริมาณอะไมโลสในเม็ดแป้ง

ปริมาณอะไมโลสในเม็ดแป้งเพิ่มขึ้นทำให้การละลายลดลง เช่น แป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 เป็น 25, 52 และ 71 มีการละลายลดลงจากร้อยละ 80 เป็น 20, 10 และ 0 เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสพร้อมให้แรงเขย่า เพราะเม็ดแป้งที่มีอะไมโลสสูงการดูดซับน้ำจะต่ำ (Waniska and Gomez, 1992)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่าการผลิตบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินให้ได้ผลผลิตสูงนั้น ต้องผ่านขั้นตอนการละลายเม็ดแป้งและย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาเอนไซม์สูงสุด ซึ่งมีปัจจัยสำคัญคือค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อปริมาณแป้งและเวลา นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่ต้องคำนึงถึง คือ แรงทำลายการเกาะกันระหว่างอนุภาคเม็ดแป้งในสารละลายแป้ง และความเข้มข้นของอะไมโลสในสารแขวนลอยแป้งเริ่มต้น เป็นต้น

วัตถุดิบ

ในการผลิต บีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินต้องการแอลฟา-อะไมเลสและบีต้า-อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งซึ่งในการทดลองใช้แป้งถั่วเขียว ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์และแป้งที่ใช้มีดังนี้

1. แอลฟา-อะไมเลส

แอลฟา-อะไมเลสมีชื่อสามัญว่า diastase และมีชื่อตามระบบว่า α-(1,4) glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 มี Ca^{+2} 1 ตัวต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล ถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนอิออน เช่น Cl^-, Br^-, F^- ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม สำหรับแอลฟา-อะไมเลสที่สกัดได้จาก *A. oryzae*, *B. subtilis* และ *B. licheniformis* คือ 4.8 ถึง 5.8, 5.85 ถึง 6.0 และ 5.5 ถึง 6.5 ตามลำดับ แอลฟา-อะไมเลสย่อยพันธะไกลโคซิลที่ α-(1,4)

ในลักษณะตัดภายในพอลิเมอร์อย่างอิสระ โดยแอลฟา-อะไมเลสสามารถย่อยอะไมโลสได้เป็นมอลโตสและมอลโตไตรโอส และสามารถย่อยอะไมโลเพคตินได้เป็นกลูโคส มอลโตสและแอลฟา-ลิมิต เดกซ์ทรินที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 4 หน่วยหรือมากกว่า (Wong, 1989; Fanks and Greenwood, 1975; Fogarty, 1983; Reilly, 1985)

รูปแบบการย่อยของแอลฟา-อะไมเลสมี 3 แบบคือแบบที่ 1 Single chain หลังจากแอลฟา-อะไมเลสย่อยพันธะของสับสเตรทเพียงพันธะเดียวแบบสุ่ม ส่วนหนึ่งของผลผลิตที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยต่ออย่างสมบูรณ์ได้เป็นโมเลกุลเล็ก เช่น มอลโตส มอลโตไตรโอส โดยย่อยจากปลายด้านที่มีหมู่รีดิวซ์ไปยังปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ แบบที่ 2 Multiple attack หลังจากแอลฟา-อะไมเลสย่อยพันธะของสับสเตรทเพียงพันธะเดียวแบบสุ่ม เอนไซม์ตามย่อยโมเลกุลผลผลิตที่เกิดขึ้นต่อแบบจำเพาะให้เป็นโมเลกุลเล็กจำนวนหนึ่ง แบบที่ 3 Multiple chain เอนไซม์จะย่อยพันธะเพียงพันธะเดียว สำหรับการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทครั้งหนึ่งๆ (ภาพที่ 6) (Fanks and Greenwood, 1975)

2. บีต้า-อะไมเลส

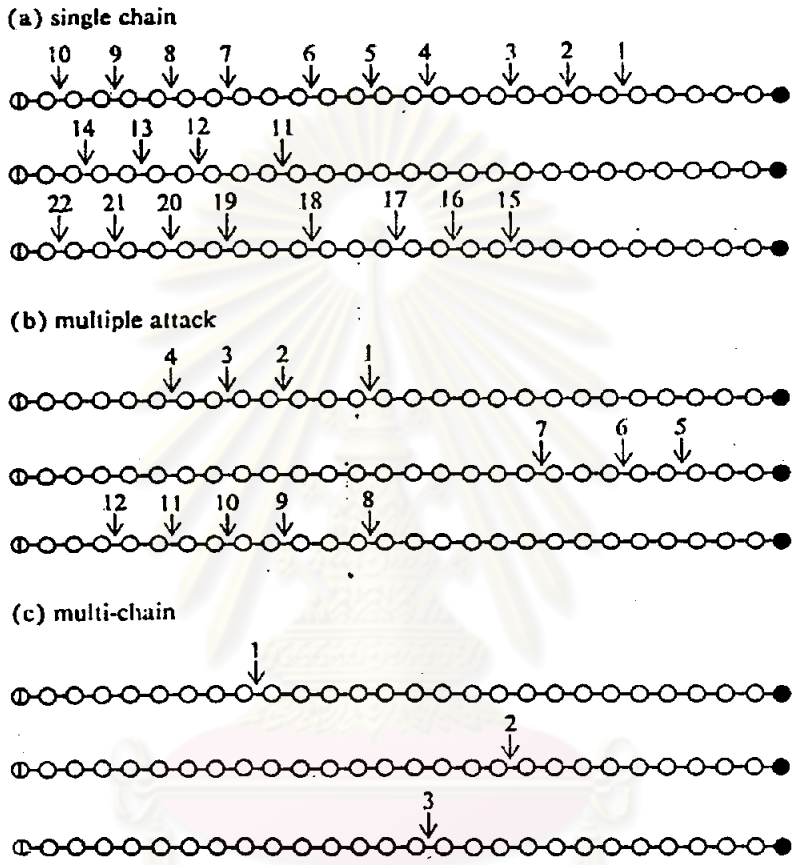
บีต้า-อะไมเลสมีชื่อเรียกตามระบบว่า α-(1,4) glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 บีต้า-อะไมเลสที่สกัดจากมันเทศในแต่ละหน่วยประกอบด้วย 4 tetramer ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 210,000 บีต้า-อะไมเลสนี้ 1 โมเลกุลมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 52,000 มีสารพวกซัลไฟดริลอยู่ในบริเวณเร่ง (Cundney and McPherson, 1993) โลหะไม่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ แคลเซียมและแมกนีเซียมอิออนเป็นสารยับยั้ง (Inhibitor) แอคติวิตีของเอนไซม์ (Hagenimana, Vezina and Simard, 1994) พบโดยทั่วไปในพืชชั้นสูง ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับบีต้า-อะไมเลสจากบาร์เลย์ ข้าวสาลีและมันเทศคือ 5.0 และจากถั่วเหลืองคือ 6.0 (Wong, 1989) การย่อยของบีต้า-อะไมเลสเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-(1,4) ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายทีละ 1 หน่วยของมอลโตสหรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคส และหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ α-(1,6) ได้ผลผลิตเป็นบีต้า-ลิมิต เดกซ์ทรินมอลโตไตรโอสและส่วนใหญ่เป็นบีต้า-มอลโตส (Fanks and Greenwood, 1975; Fogarty, 1983; Reilly, 1985)

3. แป้งถั่วเขียว

แป้งถั่วเขียวผลิตได้จากถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata (L) Wilzek*) ประกอบด้วยสตาร์ชมากกว่าร้อยละ 95 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนที่เหลือคือโปรตีน ไขมันและเถ้า (Galvez and Resurreccion, 1993) มีอุณหภูมิที่ทำให้แป้งถั่วเขียวละลายในน้ำเป็นแป้ง

เปียก (pasting temperature) ในช่วง 68.5 ถึง 74.5 องศาเซลเซียส เม็ดแป้งมีรูปร่างเป็นรูปวงรี มีขนาดในช่วงระหว่าง 8 ถึง 35 ไมครอน มีอุณหภูมิที่ทำให้เม็ดแป้งเกิดเจลาติไนเซชัน (gelatinization temperature) ในช่วง 62.0 ถึง 71.5 องศาเซลเซียส สตาร์ชประกอบด้วยปริมาณอะไมโลเพคตินในช่วงร้อยละ 71 ถึง 81 (Kweon *et al.*, 1992, Lee and Kim, 1992; Galvez and Resurreccion, 1993) อะไมโลสมีร้อยละของการถูกย่อยด้วยบีต้า-อะไมเลส (%β-amylolysis) ในช่วงร้อยละ 74.76 ถึง 78.4 (Biliaderis, Grant and Vose, 1981; Lee and Kim, 1992) มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 324,900 และค่าปริมาตรอุทกพลวัต 251 มิลลิลิตรต่อกรัม เมื่อวัดด้วย Ubbelohde viscometer และใช้โปแทสเซียมไฮดรอไซด์ 1 นอร์มอลเป็นตัวทำละลาย (Biliaderis, Grant and Vose, 1981) อะไมโลเพคตินมีร้อยละของการถูกย่อยด้วยบีต้า-อะไมเลส 64.65 ความยาวของสายโซ่เฉลี่ย (average chain length) ในช่วง 18.6 ถึง 26.8 หน่วยกลูโคส สายโซ่ด้านนอกมีความยาวเฉลี่ย (average outer length) 17.79 หน่วยกลูโคส สายโซ่ด้านในมีความยาวเฉลี่ย (average inner length) 5.63 หน่วยกลูโคส (Kweon *et al.*, 1992; Lee and Kim, 1992) และมี degree of branching ร้อยละ 3.72 ถึง 5.4 (Lee and Kim, 1992)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 รูปแบบการย่อยของแอลฟา-อะไมเลส ตำแหน่งของลูกศรและตัวเลขแสดงถึงลำดับการย่อยของเอนไซม์ 1 โมเลกุล (Fanks and Greenwood, 1975)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย