การคัดกรอง *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนสและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

นางสาวรุ่งตระการ จันทนพันธ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING FOR EFFECTIVE INULINASE-PRODUCING *Streptomyces* AND FACTORS AFFECTING ENZYME PRODUCTION

Miss Rungtrakarn Chantanaphan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรอง *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนสและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์
โดย	นางสาวรุ่งตระการ จันทนพันธ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุ่งตระการ จันทนพันธ์ : การคัดกรอง *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนสและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (SCREENING FOR AN EFFECTIVE INULINASE-PRODUCING *Streptomyces* AND FACTORS AFFECTING THE ENZYME PRODUCTION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 91 หน้า.

งานวิจัยนี้รายงานการแยก *Streptomyces* จากดินที่เก็บจากบริเวณที่ปลูกแก่นตะวัน กระเทียม หัวหอม กระชาย ขมิ้น ข่า และคัดกรองสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนส พบว่าจากทั้งหมด 371 สายพันธุ์ ที่แยกได้มี 19 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอินูลิเนสได้ในช่วง 0.11 – 0.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ์อื่นๆผลิตอินูลิเนสได้ต่ำในช่วง 0.0004-0.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดย *Streptomyces* sp. CP01 ที่แยกได้จากดินที่ปลูกแก่นตะวันผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด จึงเลือกสายพันธุ์นี้มาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ จากการแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ สารสกัดอินนูลินจากรากแก่นตะวัน อินนูลิน บริสุทธิ์จากชีคโครี (chicory) กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แมนนิทอล และมอลโทส พบว่าสารสกัดอินนูลินจากรากแก่นตะวัน 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด และเมื่อแปรชนิดของแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจน พบว่า 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แบคโททริปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด นอกจากนี้ยังต้องการ Mg^{2+} และ Fe^{2+} โดยที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.001 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด สำหรับภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ คือ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวพบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้สูงถึง 1.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากขั้นตอนการคัดกรองถึง 3 เท่า เมื่อศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอินูลิเนสพบว่าอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 55 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความเสถียรของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิหรือค่าความเป็นกรดด่างต่างๆเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีที่เหลือพบว่าอินูลิเนสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส และสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 75 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0 – 9.0 จากการหาเอกลักษณ์ของเชื้อโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าใกล้เคียงกับ *Streptomyces griseoruber* NBRC 12873 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.34

ภาควิชา.....................จุลชีววิทยา........... ลายมือชื่อนิสิต...รุ่งตระการ จันทนพันธ์...

สาขาวิชา...จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..........

ปีการศึกษา..................2552................

5072440723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOOGY
KEYWORDS: INULINASE/ PRODUCTION/ *Streptomyces*

RUNGTRAKARN CHANTANAPHAN: SCREENING FOR EFFECTIVE INULINASE-PRODUCING *Streptomyces* AND FACTORS AFFECTING ENZYME PRODUCTION. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., 91 pp.

The present work reported isolation of *Streptomyces* from soil samples collected from Jerusalem artichoke-, garlic-, onion-, curcuma- and galingale- plantations and screening for the inulinase-producing ability. From the total 371 isolates, 19 isolates showed considerably high inulinase activities of about 0.11-0.49 U/ml whereas the rest of them given the enzyme activities in the range of 0.0004 to 0.10 U/ml. *Streptomyces* sp. CP01, a strain isolated from Jerusalem artichoke grown soil, was selected for further optimization for inulinase production as it was the best inulinase producer among them. Among various carbon sources tested including glucose, sucrose, fructose, maltose, manitol and inulin either from the commercial or Jerusalem artichoke's root tubers extract, 1% (v/v) inulin extract from Jerusalem artichoke's root tubers was found to be the best whereas Bacto peptone at 0.7%(w/v) was found to be the best nitrogen source among the other inorganic and organic nitrogen sources tested. It also required 0.025% (w/v) $MgSO_2.7H_2O$ and 0.001% $FeSO_2.7H_2O$ for the maximum enzyme production. Optimal cultivation conditions were incubation at 28° C for 24 h at pH 8. When CP01 was cultivated under the optimal conditions, 1.60 U/ml of inulinase was produced which was more than three folds higher than that of under the screening condition. Preliminary characterization of the enzyme indicated that the enzyme had optimal temperature and pH of 55° C and 6.0, respectively. When pre-incubated for 30 min at different temperatures or pH values, it was stable to temperature up to 55° C and completely lost its activity at 75° C whereas it was stable to a wide pH range from 5.0-9.0. *Streptomyces* sp. CP01 was later identified from the 16S rDNA sequence to be closely related to *Streptomyces griseoruber* NBRC 12873 with 99.34% similarity.

Department:............Microbiology................ Student's Signature Rungtrakarn Chantanaph.

Field of Study:.......Industrial Microbiology..... Advisor's Signature ....

Academic Year:...........2009.......................

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ปาริฉัตร ราวีศรี พี่กัลกิยา ชนิตรนันต์ นางสาววรรษมน นิลสันเทียะ นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์ นางสาวสุกัญญา เกิดสุข นางสาวนิโรบล เหลากลม นายรพี สินเนืองนอง ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคุณกังสดาล ทองดอนง้าว ที่ร่วมทุกข์ร่วมสุข อยู่เคียงข้างและเป็นกำลังใจให้ตลอดมาและตลอดไป

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวจันทนพันธ์ทุกคน ที่เป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย........ ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ........ จ

กิตติกรรมประกาศ........ ฉ

สารบัญ........ ช

สารบัญตาราง........ ญ

สารบัญรูป........ ฎ

บทที่

1. บทนำ........ 1

1.1 ประวัติความเป็นมา 1

1.2 โครงสร้างของอินนูลิน........ 2

1.3 การย่อยสลายอินนูลิน........ 3

1.3.1 การย่อยสลายอินนูลินด้วยวิธีทางเคมี........ 3

1.3.2 การย่อยสลายอินนูลินด้วยเอนไซม์........ 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรม........ 5

2.1 แหล่งของอินนูลิน........ 6

2.2 การจัดจำแนกอินูลิเนส........ 8

2.3 แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตอินูลิเนส........ 9

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตอินูลิเนส........ 13

2.5 ประโยชน์ของอินูลิเนส........ 16

2.6 สมบัติของอินูลิเนส........ 20

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง........ 26

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง........ 26

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง........ 27

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง........ 28

3.3.1 การแยก *Streptomyces* sp. จากดินบริเวณที่มีการปลูกต้นแก่นตะวัน กระเทียม หัวหอม กระชาย ขมิ้น ข่า........ 28

3.3.2 การเก็บรักษาเชื้อ *Streptomyces* spp........ 28

3.3.3 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* spp. เพื่อตรวจสอบความสามารถ

หน้า

ในการผลิตอินูลิเนส.. 29
3.3.4 การวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส.................................. 31
3.3.5 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตอินูลิเนส.... 32
3.3.6 การศึกษาความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนส............ 32
3.3.7 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส... 33
3.3.8 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส... 34
3.3.9 การศึกษาผลของแหล่งเกลือแร่ในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิต อินูลิเนส... 35
3.3.10 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ........................ 36
3.3.11 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ... 36
3.3.12 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01.. 36
4. ผลการทดลอง... 38
4.1 การแยก *Streptomyces* spp. จากดินบริเวณที่มีการปลูกต้น แก่นตะวัน กระเทียม หัวหอม กระชาย ขมิ้น ข่า................................ 38
4.2 ผลการสกัดอินนูลินจากรากแก่นตะวัน.. 40
4.3 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้... 41
4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการทำงานของอินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01... 42
4.5 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. CP01............................ 45
4.6 ผลของอายุหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01...... 46
4.7 ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. CP01.. 47
4.8 ผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. CP01.. 48

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

4.9 ผลของแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิต
อินูลิเนส.. 49
4.10 ผลของแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการ
ผลิตอินูลิเนส.. 50
4.11 ผลของแหล่งเกลือแร่ในการเลี้ยง *Streptomyces* sp ต่อการผลิต
อินูลิเนส.. 54
4.12 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ.................. 56
4.13 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ...................................... 57
4.14 การศึกษาความเสถียรของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp.
CP01 ต่อความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ................................ 60
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.. 63
รายการอ้างอิง.. 69
ภาคผนวก.. 80
ภาคผนวก ก.. 81
ภาคผนวก ข.. 85
ภาคผนวก ค.. 87
ภาคผนวก ง.. 88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 91

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอินูลิเนส.................................. 9

2.2 แสดงภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อผลิตอินูลิเนส....... 15

2.3 สมบัติของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ.. 22

4.1 สายพันธุ์ของ *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้... 39

4.2 ปริมาณอินนูลินที่สกัดจากหัวแก่นตะวัน 10 กรัม วิเคราะห์โดยวิธีของ Dische และ Borenfreund (1951) และวิธีของ Lingyun และคณะ (2007)..................... 40

4.3 สายพันธุ์ *Streptomyces* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตอินูลิเนสได้............ 41

4.4 ผลของอายุของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP1........... 46

4.5 ความสามารถในการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ในแต่ละขั้นตอนของการหาภาวะเหมาะสม.. 58

4.6 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01...................................... 62

5.1 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ... 67

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 ภาพโครงสร้างของฟรักโทส.. 1

1.2 ภาพโครงสร้างอินนูลิน.. 2

2.1 โครงสร้างจำเพาะของสับสเตรทต่อการทำงานของอินูเนส............................ 8

4.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01......... 43

4.2 ผลของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces*sp. CP01... 44

4.3 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. CP01... 45

4.4 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสเมื่อใช้ใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน.................................. 47

4.5 ผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01.. 48

4.6 ผลของแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01...................................... 49

4.7 ผลของความเข้มข้นของอินนูลินสกัดต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01... 50

4.8 ผลของอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01.......... 51

4.9 ผลของความเข้มข้นของแบคโททริปโทนต่อการผลิตอินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01.. 52

4.10 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตอินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01.. 53

4.11 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตต่อการผลิตอินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01.. 53

4.12 ผลของความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01.. 54

4.13 ผลของความเข้มข้นของ Fe^{2+} ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01.. 55

4.14 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้อินนูลินสกัดเป็นแหล่งคาร์บอน.. 56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.15 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อมีอินนูลินสกัดเป็นแหล่งคาร์บอนแบคโทเพบโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 8.... 57
4.16 ความเสถียรของอินูลิเนสต่อความเป็นกรดด่าง... 60
4.17 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิ... 61

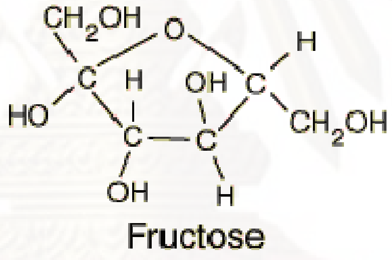
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ฟรักโทส หรือ ลีวูโลส (levulose) เป็นน้ำตาลพื้นฐานจำพวกโมโนแซคคาไรด์ (Bucke, 1977) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 มีความหวานสูงสุดในกลุ่มน้ำตาลธรรมชาติ มีสมบัติที่ดีทั้งทางด้านกายภาพและทางเคมี คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และมีความดันออสโมติกสูง สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียสได้โดยไม่เกิดการตกผลึก (Andres, 1987) ฟรักโทสถูกเลือกมาเป็นสารให้ความหวานแทนซูโครสจึงเป็นประโยชน์สำหรับคนอ้วน ผู้ป่วยโรคกระดูกผุ ผู้ที่มีการสะสมไขมันที่หลอดเลือดและผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นจึงนิยมใช้ฟรักโทสแทนซูโครสในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มและยา (Vandamme และ Derycke, 1983)



รูปที่ 1.1 ภาพโครงสร้างของฟรักโทส(www.psc.cornell.edu/.../2006/index.php?page=11)

ฟรักโทสหรือฟรักแทนสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมกระบวนการหมัก ตัวอย่างเช่น การผลิตเอทานอล อะสิโตน-บิวทานอล และ 2,3 บิวทานิโดน (Fuchs, 1992) เอทานอลและซอร์บิทอล (Duvniak และคณะ, 1991) เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิต hydroxy-methyl furfural และ levulinic acid โดยกระบวนการ catalytic conversion processes (Fuchs, 1992) และเหมาะกับเป็นสารมัธยันต์สำหรับการผลิตพอลิเมอร์ สี น้ำยาทำความสะอาด และยาฆ่าแมลง เป็นต้น (Gandini, 1990)

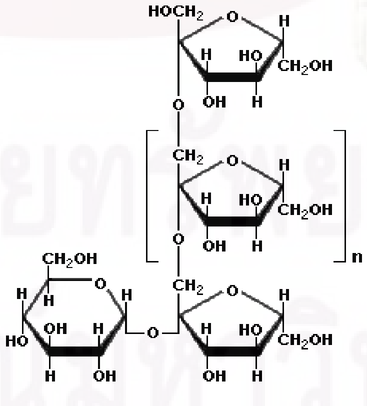
การผลิตฟรักโทสในอุตสาหกรรมอาหาร เดิมใช้ปฏิกิริยาทางเคมีโดยเป็นการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสในภาวะที่เป็นด่าง (alkaline isomerization) และอุณหภูมิสูง (Speck, 1958) เรียกปฏิกิริยานี้ว่า “Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Transformation” แต่วิธีนี้

ไม่นิยมใช้ผลิตฟรักโทสในระดับอุตสาหกรรมเพราะปฏิกิริยาดังกล่าวไม่จำเพาะ อัตราการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสต่ำ และได้สารประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องการมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Shehalata และคณะ, 1996)

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสจากแป้ง ปัจจุบันใช้เอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดส และกลูโคสไอโซเมอเรสทำงานร่วมกัน ซึ่งได้ผลผลิตเป็นน้ำเชื่อมฟรักโทสเข้มข้นประมาณ 42-45 เปอร์เซ็นต์ นอกจากเอนไซม์ดังกล่าวที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตฟรักโทสจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งแล้ว ปัจจุบันยังพบว่ามีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คือ อินูลิเนส (inulinase) ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจสูงเพื่อนำมาใช้ผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสโดยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินนูลิน ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายอินนูลินโดยเร่งปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวให้น้ำเชื่อมฟรักโทสที่มีความเข้มข้นสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Kaur และคณะ, 1992)

1.2 โครงสร้างของอินนูลิน

อินนูลินเป็นกลุ่มของพอลิแซคคาไรด์ที่มีฟรักโทสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่รู้จักกันดีคือ ฟรักแทน พบในพืชหลายชนิด (Hendry, 1987) มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-2,1 (β-2,1 linkage) โดยมีโมเลกุลของซูโครสเชื่อมอยู่ที่ปลายสาย (Vandamme และ Derycke, 1983) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 อินนูลินสะสมอยู่ในหัวหรือรากของพืชหลายชนิด เช่น หัวของแก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) หัวของชีคโครี (Chicory) รากต้นรักเร่ (dahlia) หัวหอม กระเทียม และอื่นๆ (Pandey และคณะ, 1999; Rocha และคณะ, 2006)



รูปที่ 1.2 ภาพโครงสร้างอินนูลิน (Roubroeks และคณะ, 2001)

อินนูลินสามารถย่อยได้ในลำไส้เล็กและสามารถเกิดการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ อินนูลินสามารถชักจูงให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียชนิด Bifido bacteria ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย อินนูลินเป็นที่รู้จักว่าเป็น Bifidogenic factor สามารถย่อยได้และให้พลังงานเป็นครึ่งหนึ่งของคาร์โบไฮเดรตหรือประมาณ 1-2 กิโลแคลลอรี่ต่อกรัม อินนูลินช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่เรียกว่า พรีไบโอติก อินนูลินในท้องตลาดอยู่ในรูปแบบอาหารเสริมและ Functional foods

1.3 การย่อยสลายอินนูลิน

ในการผลิตฟรักโทสจากการย่อยสลายอินนูลินสามารถย่อยสลายได้โดยการใช้วิธีทางเคมี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยกรด และวิธีทางชีวเคมี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

1.3.1 การย่อยสลายอินนูลินด้วยวิธีทางเคมี

การย่อยสลายอินนูลินด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยกรด เพื่อให้ได้ฟรักโทสเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเกิดสีเจือปนจากปฏิกิริยา และให้ผลผลิตอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น ไดฟรักโทส แอนไฮไดรด์ (difructose anhydride) ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความหวานลดลงจึงเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารเจือปนเหล่านี้ (Shehalata และคณะ, 1996)

1.3.2 การย่อยสลายอินนูลินด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายอินนูลินยังสามารถทำได้ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ อินูลิเนส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายอินนูลินได้ อย่างสมบูรณ์ในขั้นตอนเดียว ทำให้ได้ผลผลิตฟรักโทส 90 – 95 เปอร์เซ็นต์ (Gupta และคณะ,1994; Vranesic และคณะ, 2002)

จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตอินูลิเนสได้แต่ที่มีการรายงานไว้พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มรา และยีสต์ เช่น *Aspergillus* และ *Kluyveromyces* (Wei และคณะ, 1999a) ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีในภาวะเป็นกรด เอนไซม์ที่ได้จึงทำงานได้ดีในภาวะค่อนข้างเป็นกรด *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปทั้งในดิน แหล่งน้ำจืด และน้ำทะเล สามารถเจริญได้ดีในธรรมชาติที่มีภาวะแตกต่างกัน

ค่อนข้างสูง และสร้างเอนไซม์ได้หลากหลายชนิดที่ทำงานได้ดีในช่วง ความเป็นกรดด่างที่กว้าง และยังทนความร้อนได้ดี เอนไซม์ที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่ใช้เพื่อย่อยสารประกอบต่างๆในธรรมชาติ แล้วนำมาเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนในการเจริญ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย รวมทั้งจากบริเวณที่มีการเพาะปลูกต้นแก่นตะวันมาคัดกรองหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตอินูลิเนส และศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์นี้ รวมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ได้เพื่อเป็นข้อมูลในการนำเอนไซม์นี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

คัดกรอง *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตอินูลิเนสและศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์นี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตอินูลิเนสและได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินูลิเนสรวมทั้งคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

ฟรักโทส หรือลีวูโลส (levulose) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม เป็นน้ำตาลพื้นฐานจำพวกโมโนแซคคาไรด์ พบในน้ำผึ้งและผลไม้ต่างๆ เช่น เบอร์รี่ เมลอน เป็นต้น มีสมบัติที่ดีทั้งทางด้านกายภาพและทางเคมี คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีความดันออสโมติกสูง ทำให้สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดี ฟรักโทสได้มาจากการย่อยสลายซูโครส ซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคสและฟรักโทส ฟรักโทสมีความหวานมากที่สุด มากกว่ากลูโคสและซูโครส และสามารถใช้ได้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (diabetes mellitus) (Rumessen และคณะ, 1990) ช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็กในเด็ก (Gupta และคณะ, 1994) กระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมในหญิงวัยหมดประจำเดือน (Heuvel และคณะ, 2000) กระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ (Durieux และคณะ, 2001) ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Rowland และคณะ, 1998) ช่วยในการดูดซึมของลำไส้ (Wolfgang และ Sudzucker, 2004) ดังนั้นจึงนิยมใช้ฟรักโทสแทนซูโครสในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มและยา (Vandamme และ Derycke, 1983)

นอกจากนี้ฟรักโทสยังสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียสได้โดยไม่เกิดการตกผลึก (Andres, 1987) จึงเป็นที่นิยมใช้ฟรักโทสแทนซูโครสในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

การผลิตฟรักโทสในอุตสาหกรรมอาหาร เดิมใช้ปฏิกิริยาทางเคมีโดยเป็นการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสในภาวะที่เป็นด่าง (alkaline isomerization) และอุณหภูมิสูง (Speck, 1958) เรียกปฏิกิริยานี้ว่า “Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Transformation” แต่วิธีนี้ไม่นิยมใช้ผลิตฟรักโทสในระดับอุตสาหกรรมเพราะปฏิกิริยาดังกล่าวไม่จำเพาะ อัตราการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสต่ำ และได้สารประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องการมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เช่น พไซโคส (psicose) และแมนโนส ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความหวานลดลงและทำให้เกิดสีและกลิ่นที่ไม่ต้องการ จึงเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารเจือปนเหล่านี้ (Shehalata และคณะ, 1996)

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสจากแป้ง ปัจจุบันใช้เอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดส และกลูโคสไอโซเมอเรสทำงานร่วมกันเพื่อเปลี่ยนกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งเป็นฟรักโทส ซึ่งได้ผลผลิตเป็นน้ำเชื่อมฟรักโทสเข้มข้นประมาณ 42-45 เปอร์เซ็นต์ โอลิโกแซคคาไรด์ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคสประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

(Kochhar และคณะ, 1997) กระบวนการแยกฟรักโทสออกจากส่วนประกอบเหล่านี้ต้องใช้ต้นทุนสูงและไม่นิยมในทางอุตสาหกรรม (Barthomeuf และคณะ, 1991) นอกจากเอนไซม์ดังกล่าวที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตฟรักโทสจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งแล้ว ปัจจุบันยังพบว่ามีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คือ อินูลิเนส (inulinase) ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจสูงเพื่อนำมาใช้ผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสโดยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินนูลิน ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายอินนูลินโดยเร่งปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวให้น้ำเชื่อมฟรักโทสที่มีความเข้มข้นสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Kaur และคณะ, 1992)

2.1 แหล่งของอินนูลิน

อินนูลินเป็นกลุ่มของพอลิแซคคาไรด์ที่มีฟรักโทสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่รู้จักกันดีคือ ฟรักแทน พบในพืชหลายชนิด (Hendry, 1987) มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-2,1 (β-2,1 linkage) โดยมีโมเลกุลของซูโครสเชื่อมอยู่ที่ปลายสาย (Vandamme และ Derycke, 1983)

อินนูลินสะสมอยู่ในพืชหลายชนิด เช่น ต้นกระเทียมจีน, Jerusalem Artichokes หรือหัวของแก่นตะวัน หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus racemosus*) หัวหอม กระเทียม กล้วย ข้าวสาลี ข้าวไรย์ แดนเดเลียน (dandelion) หัวของชีคโครี (chicory) รากต้นรักเร่ และพืชอื่นๆที่อยู่ในตระกูลเดียวกัน (Grootwassink และ Fleming, 1980) และพบว่าแก่นตะวัน มีอินนูลินสะสมอยู่ในรากสูงถึง 14-19 เปอร์เซ็นต์ เป็นพืชล้มลุกที่ปลูกง่ายจึงหน้าจะเป็นแหล่งอินนูลินราคาถูกที่หาได้ง่าย โดยแก่นตะวันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus L.* ลักษณะดอกคล้ายบัวตอง มีถิ่นกำเนิดในแถบหนาวทวีปอเมริกาเหนือ ความสามารถปรับตัวได้ดีในเขตร้อน ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกันมาก มีความแข็งแรงคงทน จึงใช้คำนำหน้าชื่อว่า “แก่น” และเป็นพืชที่ใกล้ชิดกับทานตะวัน จึงให้ชื่อพืชชนิดใหม่ว่า “แก่นตะวัน” พืชนี้จัดเป็นพืชมีหัว พืชอาหารเพื่อสุขภาพ พืชสมุนไพรสัตว์ พืชพลังงานทดแทน และพืชเพื่อการท่องเที่ยว

หัวใช้เป็นอาหารประเภทผัก หัวสด มีรสชาติคล้ายแห้ว นำมาประกอบอาหารคาว หวานได้หลายชนิด หัวเป็นแหล่งสะสมของอินนูลิน ซึ่งประกอบด้วยฟรักโทสที่ต่อกันเป็นโมเลกุลยาว เมื่อเก็บหัวแก่นตะวันไว้ในห้องเย็นจะทำให้แก่นตะวันมีความหวานมากขึ้น

นอกจากนี้ส่วนหัวยังสามารถใช้เสริมในอาหารสัตว์ มีผลต่อการเจริญเติบโต ลดจุลินทรีย์ที่มีโทษในระบบทางเดินอาหาร สร้างภูมิคุ้มกัน ทำให้ลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และมูลสัตว์มีกลิ่นเหม็นลดลง จึงถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรในสัตว์

หัวใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ ผลผลิตหัวสด 1 ตัน สามารถผลิต เอทานอลได้ 80 – 100 ลิตร นำไปผสมกับเบนซิน เพื่อผลิตแก๊ซโซฮอล์ จึงจัดเป็นพืชพลังงานทดแทน

แก่นตะวันจะมีดอกบานเมื่ออายุประมาณ 60 วัน และทั้งแปลงปลูกจะมีต้นออกดอกประมาณ 2 เดือน ดอกมีสีเหลืองคล้ายบัวตอง มีความสวยงามไม่แพ้ทุ่งบัวตอง หรือทุ่งทานตะวัน จึงนับได้ว่าเป็นพืชเพื่อการท่องเที่ยว

แก่นตะวันเป็นไม้ล้มลุก เพาะปลูกในเขตร้อนได้ดี มีขนคล้ายหนามกระจายทั่วลำต้นและใบ จึงต้านทานต่อแมลงได้ดี ความสูงต้นประมาณ 1.5-2.0 เมตร ลักษณะหัวคล้ายหัวขิงหรือหัวข่า สามารถปลูกได้ทุกฤดูกาล ควรมีการให้น้ำเมื่อฝนทิ้งช่วงและการปลูกในฤดูแล้งในสภาพให้น้ำชลประทาน ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 60 วันหลังปลูก อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 100-140 วัน หรือสังเกตจากดอกร่วงหมด ลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและต้นเริ่มแห้ง

หัวแก่นตะวันเป็นชิ้นขนาด 3-5 เซนติเมตร และนำมาบ่มในแกลบดำเพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อนประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำต้นอ่อนมาปลูกในที่ลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร ระยะปลูกประมาณ 50x50 เซนติเมตร ขณะปลูกควรมีความชื้นสูง โดยดินที่เหมาะสม คือ ดินร่วนปนทรายละลายน้ำได้ดี

เมื่อต้นเริ่มแก่เก็บเกี่ยวและล้างทำความสะอาดหัว ใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็นเก็บได้นานประมาณ 6-8 เดือน (เอกสารแนะนำและการผลิต แก่นตะวัน ไม้ประดับและพืชสมุนไพร, รศ.ดร. สนั่น จอกลอย มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

มีการนำอินนูลินจากพืชชนิดต่างๆมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตอินูลิเนสดังนี้

Aspergillus niger NK-126 ใช้อินนูลินสกัดจากรากของ dandelion และอินนูลินบริสุทธิ์จากหัวของชีคโครีเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 52.3 และ 12.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Kango, 2008)

Fusarium oxysporum เจริญได้ในอาหารที่มีอินนูลินสกัดจากรากของ *Cichorium intybus* เป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกเซลล์ได้ (Anil และคณะ, 1989)

กลุ่มของ *Kluyveromyces* สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ฟรักแทน เช่น อินนูลิน เป็นแหล่งคาร์บอน *Kluyveromyces marxianus* YS-1 ใช้อินนูลินจากหน่อไม้ฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Singh และคณะ, 2006)

Xanthomonas campestris pv *phaseoli* ใช้หัวหอมและกระเทียมเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตอินูลิเนสได้ 101 และ 117 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Ayyachamy และคณะ, 2007)

Streptomyces sp. ใช้กระเทียม (*Allium sativum*) เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตอินูลิเนสได้

0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้แอคติวิตีสูงกว่าใช้หัวของชีคโครีเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 1.6 เท่า (Sharma และคณะ, 2006)

Staphylococcus sp. RRL1 และ *Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466 ใช้ข้าวสาลี, รำข้าว, น้ำมันมะพร้าวและแป้งข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้เฉลี่ยประมาณ 107.64 และ 122.88 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Selvakumar และ Pandey, 1999a)

2.2 การจัดจำแนกอินูลิเนส

อินูลิเนส (inulinase) เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมต่ออินนูลิน แบ่งตามรูปแบบของกลไกการไฮโดรไลซ์ออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. เอนโดอินูลิเนส (Endoinulinase, 2,1 β-D-fructan fructanohydrolase) จะย่อยสลายพันธะบีตา 2,1 ภายในโมเลกุลของอินนูลินแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูโลไตรโอส (Inulo-triose) อินนูโลเตตระโอส (Inulo-tetraose) และอินนูโลเพนตะโอส (Inulo-pentaose) (Kumiko และคณะ, 1999) ซึ่งเป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำจัดเป็นพรีไบโอติก และใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสุขภาพ (สาโรจน์ ศิริศันศนียกุล และคณะ, 2000)

2. เอกโซอินูลิเนส (Exoinulinase, β-D-fructan fructohydrolase) ตัดพันธะบีตา 2,1 ของอินนูลินออกทีละโมเลกุลทางด้านปลายนอนรีดิวส์ ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น ฟรักโทสและ อินนูลินโอลิโกเมอร์ (Kumiko และคณะ, 1999) ดังรูปที่ 2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.1 โครงสร้างจำเพาะของสับสเตรทต่อการทำงานของอินูลิเนส

2.3 แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตอินูลิเนส

ในทางอุตสาหกรรมจะใช้อินูลิเนสในการย่อยสลายอินนูลินเพื่อกระบวนการผลิตฟรักโทสเข้มข้นและการผลิตเอทานอลหรืออะซีโตนบิวทานอล จุลินทรีย์เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ที่ดีเนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่ายและให้ปริมาณเอนไซม์ที่สูง อินูลิเนสพบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์และแอคติโนมัยสีท อินูลิเนสที่ผลิตขึ้นมานี้ยังพบว่าเป็นได้ทั้งแบบที่สร้างขึ้นแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular) หรือเก็บไว้ภายในเซลล์ (intracellular) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอินูลิเนส แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอินูลิเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตีของอินูลิเนส	วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตี	เอกสารอ้างอิง
Arthrobacter sp.	-	DNS method	Kang และคณะ, 1998
Arthrobacter sp. S37	-	DNS method	Kim และคณะ, 2008
Aspergillus awamori	-	-	Nagem และคณะ, 2004
Aspergillus fumigatus	552 IU/mg protein	Nelson's method	Gill และคณะ, 2006
Aspergillus ficuum	25 IU/ml	DNS method	Chen และคณะ, 2009
Aspergillus ficuum JNSP5-06	11.02 IU/ml-	DNS method	Jing และคณะ, 2003
Aspergillus niger -12	4.6 IU/ml	-	Nakamura และคณะ, 1978
Aspergillus niger AF10	316 IU/ml	-	Zhang และคณะ, 2004
Aspergillus niger Mutant 817	17.5 IU/ml	-	Nakamura และคณะ, 1995

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตีของอินูลิเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตี	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger N402	-	-	Goosen และคณะ, 2008
Aspergillus niger NK-126	52.3 IU/ml	DNSA method	Kango, 2008
Bacillus smithii T7	135.2 IU/ml	Nelson-Somogyi method	Gubta และคณะ, 1998
Bacillus subtilis	2.1 IU/mg protein	DNS method	Wanker และคณะ, 1996
Cryptococcus aureus G7a	85.0 IU/ml	Nelson-Somogyi method	Sheng และคณะ, 2008
Cladosporium cladosporioides	0.31 IU/ml	DNS method	Ferreira และคณะ, 1991
Fusarium oxysporum	-	-	Anil และคณะ, 1989
Kluyveromyces bulgaricus	11.6 IU/ml	DNS method	Vranesic และคณะ, 2002
Kluyveromyces cicerisporus	-	-	Jing และคณะ 2008
Kluyveromyces fragilis	6.2 IU/ml	-	Negoro และ Kito, 1973
Kluyveromyces S120	409.8 IU/gds	DNS method	Chen และคณะ, 2007
Kluyveromyces sp. Y-85	59.5 IU/ml	DNS method	Wei และคณะ, 1998

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตีของอินูลิเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตี	เอกสารอ้างอิง
Kluyveromyces marxianus ATCC 16045	121 IU/ml	-	Santisteban และ Filho, 2006
Kluyveromyces marxianus ATCC 52466	122.9 IU/gds	DNS method	Selvakumar และ Pandey, 1999a
Kluyveromyces marxianus CBS 6556	-	-	Zhang และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus CDBB-L-278:	18.56 IU/mg protein	DNS method	Guerrero และคณะ, 1995
Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus	107.0 IU/ml	DNS method	Kushi และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571	391.9 IU/dgs	DNS method	Bender และคณะ, 2010
Mutant M-30 of *Pichia guillermondii* strain 1	115 IU/ml	-	Guo และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571	8.87 IU/gds	DNS method	Mazutti และคณะ, 2006
Kluyveromyces marxianus YS-1	55.4 IU/ml	DNS method	Singh และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus A1 and A2	< 32 IU/ml	-	Cruz-Guerrero และคณะ, 2006
Mutant M-30 of *Pichia guillermondii*	127.7 IU/ml	-	Yu และคณะ, 2008
Panaeolus papillonaceous	-	-	Mukerjee และ Sendupta, 1987

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตีของอินูลิเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตี	เอกสารอ้างอิง
Penicillium janczewskii	-	-	Braga และคณะ, 2007
Penicillium sp.TN-88	9.9 IU/ml	DNS method	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	61.5 IU/ml	-	Gong และคณะ, 2007
Rhizupus sp. TN-96	17.0 IU/mg protein	DNS method	Ohta และคณะ, 2002
Saccharomyces fragilis	-	-	Snyder และคณะ ,1962
Staphylococcus sp.	107.6 IU/gds	-	Selvakumar และคณะ, 1999
Staphylococcus sp. RRL1	0.618 IU/ml	DNS method	Selvakumar และ Pandey, 1999a
Streptomyces sp.	0.524 IU/ml	Nelson's method	Sharma และคณะ, 2006
Streptomyces sp. GNDU 1	0.552 IU/ml	Nelson's method	Gill และคณะ, 2003
Xanthomonas campestris pv phaseoli	-	-	Ayyachamy และคณะ, 2007

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่ระบุ

gds หมายถึง gram dry substrate

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตอินูลิเนส

การผลิตอินูลิเนสโดยจุลินทรีย์ ได้มีรายงานการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนหลากหลายชนิด รวมทั้งภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อก็แตกต่างกันตามความเหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดดังนี้

Gill และคณะ (2003) ศึกษาสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่ใช้ในการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. GNDU1 พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 0.552 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 ในอาหารที่มีอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ

Sharma และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณรากของชีคโครี่ (chicory) โดยใช้กระเทียมผง (*Allium sativum*) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้อินนูลินบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนถึง 1.6 เท่า

Singh และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 โดยใช้อินนูลินสกัดจากรากของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus racemosus*) เมื่อมีอินนูลินสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 และเมื่อมีการปรับปรุงสูตรอาหารทำให้ผลิตอินูลิเนสได้เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า และ 1.7 เท่าในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตรและในถังหมักขนาด 1 ลิตรตามลำดับ

Sheng และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Cryptococcus aureus* G7a ซึ่งแยกได้จากตะกอนน้ำทะเล โดยใช้อินนูลิน 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 85 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 42 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

Singh และคณะ (2007) จาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินูลิเนส คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 เลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 55.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Bernardo และคณะ (2008) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและการให้อากาศต่อการผลิตอินูลิเนสโดย *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 โดยใช้กลูโคส ซูโครส และฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าซูโครสสามารถให้ผลผลิตของเอนไซม์มากที่สุด 6.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Kango (2008) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* NK-126 ที่แยกได้จากเปลือกหอมใหญ่และใช้รากของ dandelion (*Taraxacum officinale*) เป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าสามารถผลิตอินนูลิเนสได้ 12.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Singh และ Bhermi (2008) ศึกษาการผลิตเอกโซอินูลิเนสที่ปล่อยออกมานอกเซลล์จาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 โดยใช้อินนูลินสกัดจากรากของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) เมื่อมีอินนูลินสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากเนื้อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 40.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2.2 แสดงภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อผลิตอินูลิเนส

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตของอินูลิเนส		ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
	ค่าความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
Aspergillus ficuum JNSP5-06	6.5	30	120	Jing และคณะ, 2003
Aspergillus fumigatus	6.5	34	72	Gill และคณะ, 2006
Aspergillus niger NK-126	-	30	12	Kango, 2008
Cryptococcus aureus G7a	5.0	28	42	Sheng และคณะ, 2007
Kluyveromyces marxianus	5.0	30	24	Parekh และ Margaritis, 1985
Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus	5.0	30	72	Paula และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus YS-1	6.5	30	60	Singh และ Bhermi, 2008
Streptomyces sp.	7.0	37	24	Sharma และคณะ, 2006
Streptomyces sp.	5.0	37	48	Sharma และคณะ, 2007
Streptomyces grisenus	7.0	30	48	Tohamy, 2006
Streptomyces sp. GNDU1	7.5	46	24	Gill และคณะ, 2003

หมายเหตุ : - หมายถึง ยังไม่ระบุ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 ประโยชน์ของอินูลิเนส

2.5.1 การผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสเข้มข้นจากอินนูลิน

ฟรักโทสเข้มข้นเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน ช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็กในเด็ก สามารถใช้เป็นสารให้ความหวานสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ช่วยกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมในหญิงวัยหลังหมดประจำเดือน ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacteria* ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ช่วยป้องกันการเป็นมะเร็งลำไส้ (Rocha และคณะ, 2006) และใช้เป็นเส้นใยสำหรับควบคุมน้ำหนักได้เพราะมีลักษณะคล้ายไขมัน ฟรักโทสถูกนำมาใช้มากในอาหาร ยา และเครื่องดื่มแทนการใช้ซูโครส อย่างไรก็ตามการผลิตฟรักโทสโดยวิธีทางเคมียังได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร (Gill และคณะ, 2006; Pandey และคณะ, 1999) ฟรักโทสสามารถผลิตได้จากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เข้ามาช่วยในการทำปฏิกิริยาโดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือแอลฟา-อะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดส และกลูโคสไอโซเมอเรส (Gong และคณะ, 2007) จุลินทรีย์จัดเป็นผู้ผลิตอินูลิเนสที่ดีที่สุดโดยจะทำการย่อยสลายอินนูลินภายในขั้นตอนเดียวและให้ฟรักโทสออกมาถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตฟรักโทสเข้มข้นจากอินนูลินและวัตถุอื่นๆที่มีอินนูลินเป็นองค์ประกอบ

กลูโคสและฟรักโทสเป็นโมโนแซคคาร์ไรด์ที่ถูกปล่อยออกมาจากอินนูลินโดยการย่อยของอินูลิเนสจากยีสต์ 2 ชนิดที่แยกได้จากน้ำทะเล คือ *Cryptococcus aureus* G7a และ *Pichia guilliermondii* strain 1 (Sheng และคณะ, 2008b; Gong และคณะ, 2008) ดังนั้นอินูลิเนสจากยีสต์ 2 ชนิดนี้อาจจะมีประสิทธิภาพที่ดีจึงนำมาใช้ในการย่อยสลายอินนูลินในอาหารและกระบวนการหมักในอุตสาหกรรม พบโมโนแซคคาร์ไรด์และโอลิโกแซคคาร์ไรด์ภายหลังจากการย่อยสลายอินนูลิน 2 ชั่วโมงโดยอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* (Kushi และคณะ, 2000) อินูลิเนสจาก *Bacillus polymyxa* MGL21 พบว่ามีกิจกรรมต่ออินนูลินและให้ฟรักโทสออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ (Kwon และคณะ, 2003)

พืชชนิดต่างๆที่พบว่าใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตฟรักโทสเข้มข้น เช่น รากต้นรักเร่ หัวของชีคโครี และหัวของต้นแก่นตะวันและยังไม่เคยมีรายงานว่าใช้หน่อไม้ฝรั่งสำหรับการผลิตฟรักโทสเข้มข้นหน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชสมุนไพรในส่วนของรากมีอินนูลินสะสมอยู่มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์และยังเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในโลก อินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 สามารถย่อยสลายอินนูลินบริสุทธิ์และสารสกัดอินนูลินจากหน่อไม้ฝรั่งสำหรับการผลิตฟรักโทสเข้มข้นได้ในระดับถังหมักอินูลิเนสสามารถย่อยสลายอินนูลินบริสุทธิ์ได้ 84.8 เปอร์เซ็นต์ และสาร

สกัดอินนูลินจากหน่อไม้ฝรั่งได้ 86.7 เปอร์เซ็นต์ และผลิตฟรักโทสได้ 43.6 และ 41.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Singh และคณะ, 2007)

ยีสต์สามารถมากย่อยสลายอินนูลินประมาณ 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.2 หน่วยต่อลิตร ซึ่งจะให้ฟรักโทสออกมา 37.5 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 20 ชั่วโมงที่ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่อินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR 3570 จะให้ฟรักโทส 35.3 กรัมต่อลิตร ในเวลา 25 ชั่วโมง การนำอินูลิเนสจากยีสต์และรามารวมกันและศึกษาการย่อยสลายอินนูลินพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 5:1 เท่าจากแอคติวิตีเดิม (Sirisansaneeyakul และคณะ, 2008)

การตรึงอินูลิเนส (immobilized inulinase) มีประโยชน์มากสำหรับการย่อยสลายอินนูลินไปเป็นฟรักโทส เช่น การตรึงอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* บนเจลาติน ถูกนำมาใช้ในการย่อยซูโครสสำหรับการผลิตฟรักโทสเข้มข้น และวัดความเสถียรของอินูลิเนสที่ถูกตรึงโดยการผ่านอินูลิเนสในคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง (fixed-bed column reactor) พบว่าเมื่อผ่านไป 33 วัน ความสามารถในการเปลี่ยนซูโครสลดลงมาอยู่ที่ 58.12 เปอร์เซ็นต์ (Paula และคณะ, 2008) อินูลิเนสจาก *Aspergillus ficuum* ถูกตรึงโดยการเชื่อมด้วยร่างแห (cross-linking) กับกลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) หรือไคติน (chitin) เพื่อผลิตฟรักโทสจากรากแก่นตะวัน ในระบบถังหมักเดี่ยว (batch reactor) พบว่าย่อยสลายอินนูลินจากรากแก่นตะวันได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟรักโทส 77.5 กรัมต่อลิตร ขณะที่ในระบบถังหมักแบบต่อเนื่อง (continuous packed-bed column reactor) ได้ฟรักโทส 61 กรัมต่อลิตร ในเวลา 0.9 ชั่วโมง ซึ่งเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ 55 เปอร์เซ็นต์ (Kim และ Rhee, 1989) เอกโซอินูลิเนสและเอนโดอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* ซึ่งถูกทำให้กลายพันธุ์แล้วสายพันธุ์ที่ 817 ถูกนำมาตรึงบนรูของอนุพันธ์เซลลูโลส (porous cellulose derivative) โดยพันธะโควาเลนซ์ และมีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 160 หน่วยต่อกรัมของตัวอนุพันธ์เซลลูโลส ในถังหมักมีอินูลิเนส 8 มิลลิลิตรและอินนูลินบริสุทธิ์จากต้นรักเร่ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 พบว่าสามารถย่อยสลาย อินนูลินได้อย่างสมบูรณ์ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟรักโทส 97 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ (Nakamura และคณะ, 1995) เซลล์ของ *Kluyveromyces marxianus* ถูกตรึงในแบเรียมแอลจิเนต (barium alginate) โดยกลูตารอลดีไฮด์ เพื่อใช้ในการย่อยสลายอินนูลิน พบว่าเมื่อใช้ย่อยสลายอินนูลินไปแล้ว 5 ครั้ง แอคติวิตีของอินูลิเนสยังคงมีเหลืออยู่ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Barranco-Florido และคณะ, 2001) อินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วบางส่วนจาก *Kluyveromyces* sp. Y-85 ถูกนำมาตรึงบน MacZroporous ionic polystyrene beads โดยพันธะโควาเลนซ์แบบร่างแห (adsorb cross-linking) ใช้สารละลายฟรักแทนจากรากแก่นตะวัน 4.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตั้งต้นในถังหมัก

แบบต่อเนื่อง (continuous packed-bed column reactor) มีเม็ด bead ที่ถูกตรึงด้วยอินูลิเนสแล้ว 70 มิลลิลิตร พบว่าสามารถย่อยสลายฟรักแทนได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟรักโทส 85 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ครึ่งชีวิต (half-life) ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้อยู่ที่ประมาณ 32 วัน (Wei และคณะ, 1999b)

2.5.2 การผลิตเอทานอลจากอินนูลิน

เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพเหลวที่มีการนำมาใช้มากในปัจจุบัน (Sanchez และ Cardona, 2008) เอทานอลถูกนำมาใช้ในการเป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี รากแก่นตะวันจัดเป็นวัตถุดิบแหล่งหนึ่งที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอล กลุ่มของยีสต์จะขาดยีนที่จะนำมาใช้ในการผลิตฟรักโทส ดังนั้นจึงต้องมีการรวม *FLO1* เข้าไปในไรโบโซมดีเอ็นเอของส่วนที่ขาด *Saccharomyces cerevisiae* ถูกนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลและฟรักโทสจากสารสกัดจากรากแก่นตะวันและสารผสมระหว่างฟรักโทสกับกลูโคส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล 5 กรัมต่อลิตรและน้ำตาล 48 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นฟรักโทส 99 เปอร์เซ็นต์ (Remize และคณะ, 1998)

เอทานอลที่ผลิตจากรากแก่นตะวันโดยใช้ *Kluyveromyces fragilis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีการผลิตอินูลิเนส รวมทั้งยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการกลั่นทางอุตสาหกรรม เช่น *Saccharomyces cerevisiae* หรือแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* หลังจากผ่านกระบวนการหมักความเข้มข้นที่ดีที่สุดของเอทานอลเมื่อใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ทั้งหมดร่วมกันเท่ากับ 0.48 กรัมต่อกรัมและ 0.46 กรัมต่อกรัม สำหรับจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลในทางอุตสาหกรรมเมื่อใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ของ *Kluyveromyces fragilis* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตอินูลิเนส *Saccharomyces cerevisiae* และ *Zymomonas mobilis* ทำงานร่วมกันจะมีการผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเมื่อใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์เดียวถึง 12 เปอร์เซ็นต์ (Szambelan และคณะ, 2004)

Aspergillus niger 12 สามารถผลิตได้ทั้งเอกโซอินูลิเนสและเอนโดอินูลิเนส *Aspergillus niger* ซึ่งถูกทำให้กลายพันธุ์ สายพันธุ์ ที่ 817 จาก *Aspergillus niger* 12 พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 4 เท่า ดังนั้นจึงนำ *Aspergillus niger* 817 มาใช้ในกระบวนการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลและกระบวนการหมักอินนูลินบริสุทธิ์เพื่อการผลิตเอทานอลร่วมกับการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* 1200 ซึ่งจะให้เอทานอลเข้มข้น 20 ถึง 21 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในระยะเวลา 3 วัน เมื่อใช้อินนูลินจาก chicory และ dahlia เป็นสารตั้งต้น และเมื่อใช้รากแก่นตะวันเป็นสารตั้งต้นพบว่าผลิตเอทานอลได้ 10.4 เปอร์เซ็นต์

(ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งใช้เวลา 15 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำสกัดจากรากแก่นตะวันเป็นสารตั้งต้นพบว่าผลิตเอทานอลได้ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งใช้เวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อใช้ผงแก่นตะวันบดละเอียดเป็นสารตั้งต้นพบว่าผลิตเอทานอลได้ 20.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งใช้เวลา 120 ชั่วโมง (Nakamura และคณะ, 1996)

2.5.3 การผลิตโอลิโกฟรักแทนจากอินนูลิน

ฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์เป็นที่นิยมมากในการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพราะมีคุณสมบัติช่วยในการทำงานของ bifidogenic และในเรื่องของสุขภาพ อินนูลินสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนโดอินูลิเนสได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ เช่น อินนูโลไตรโอส และอินนูโลเตตระโอส (Yun และคณะ, 1997) อินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์มีลักษณะโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกับฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์มากซึ่งมีหน้าที่เป็นสารให้ความหวานเป็นประโยชน์ทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Lo’pez-Molina และคณะ, 2005)

เอนโดอินูลิเนสถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายอินนูลิน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในขั้นตอนเดียว ยกตัวอย่าง เช่น *INU2* เป็นยีนที่ควบคุมการผลิตอินูลิเนสใน *Aspergillus ficuum* ถูกโคลนและให้แสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้มีการผลิตเอนโดอินูลิเนสเพียงชนิดเดียวโดยไม่มีการผลิตเอกโซอินูลิเนสและอินเวอร์เทส (invertase) ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอนโดอินูลิเนสจากยีสต์ที่ถูกโคลนยีนเข้าไปถูกนำมาใช้ในการย่อยสลายอินนูลินเพื่อผลิตฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์และพบว่าผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น 1-kestose (Kim และคณะ, 1999) เอนโดอินูลิเนสถูกทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ในการผลิตอินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากอินนูลินและพบว่าโอลิโกแซคคาร์ไรด์เป็น degree of polymerization (DP) 3 และ 4 (Yun และคณะ, 1997)

อินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ผลิตได้จากอินนูลินโดยการทำงานของเอนโดอินูลิเนสจาก *Pseudomonas* sp. ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมอินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่ได้จะอยู่ในช่วง DP2 ถึง DP7 ผลิตภัณฑ์ได้มากถึง 75.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อินนูลิน 50 กรัมต่อลิตร และใช้เอนโดอินูลิเนส 15 หน่วยต่อกรัมของอินนูลิน (Kim และคณะ, 1997)

จากการรายงานที่ผ่านมาจะเห็นว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในเซลล์ยีสต์จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Yue และคณะ, 2008; Ni และคณะ, 2008) *inu1* เป็นยีนสำหรับการผลิตเอนโดอินูลิเนสจาก *Pichia mucidolens* ซึ่งนำไปแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 เซลล์ยีสต์ที่มียีนสำหรับการผลิตเอนโดอินูลิเนสถูกนำมาใช้ในการย่อยสลายอินนูลินได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมและใช้เอนโดอินูลิเนส

46 หน่วยต่อกรัมของอินนูลิน เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จะให้อินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์สูงที่สุด 71.2 เปอร์เซ็นต์ (Kim และคณะ, 2006)

2.6 สมบัติของอินูลิเนส

มีรายงานเกี่ยวกับสมบัติของอินูลิเนส ทั้งอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน ความเสถียรต่ออุณหภูมิ และความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างดังนี้

Ohta และคณะ (2002) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์โดย *Rhizopus* sp. TN-96 พบว่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 17 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 Mn^{2+} และ Ca^{2+} ช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในขณะที่ Ag^{+} และ Hg^{2+} จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

Gill และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. GNDU1 พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 0.552 หน่วยต่อมิลลิลิตร ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5

Zhang และคณะ (2005) ศึกษาเอกโซอินูลิเนสที่ผลิตโดย *Pichia pastoris* GS115 ที่มีการใส่ยีน *INU1* จาก *Kluyveromyces marxianus* KW02 เข้าไป พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 52 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์เดิม 12 เท่า ภาวะที่เหมาะในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นอกจากนี้พบว่า $ZnCl_2$ $CuSO_4$ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้

Sharma และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของ *Streptomyces* sp. พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0

Sheng และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Cryptococcus aureus* G7a พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 55.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่ออุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.5 ถึง 6.5

Singh และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมจากอินนูลินสกัดจากรากหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus racemosus*) โดยการตรึงเอกโซอินูลิเนสที่ผลิตจาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 บน Duolite A568 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่ออุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 และ มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.5 ถึง 6.5 อินนูลิเนสที่ถูกตรึงบน Duolite A568 สามารถนำกลับมาใช้ใหม่และยังมีประสิทธิภาพการทำงานสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Kango (2008) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* NK-126 พบว่าสามารถผลิตอินนูลิเนสได้ 12.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับเท่ากับ 5.0

Singh และ Bhermi (2008) ศึกษาการผลิตเอกโซอินูลิเนสที่ปล่อยออกมานอกเซลล์จาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 โดยใช้อินนูลินสกัดจากรากของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) เมื่อมีอินนูลินสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากเนื้อเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ 40.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ภาวะที่เหมาะในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5

Bender และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 โดยการหมักบนอาหารแข็งที่มีกากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถสกัดเอนไซม์ออกมาได้มากที่สุดโดยใช้ภาวะการสกัดดังนี้ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส อัตราการปั่นกวน 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 2.3 ได้แสดงสมบัติของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

ตารางที่ 2.3 สมบัติของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Arthrobacter sp. S37	7.5	-	50	-	Kang และคณะ, 1998
Aspergillus fumigatus	6.0	4.0 – 7.0	60	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	Gill และคณะ, 2006
Aspergillus candidus	5.5	-	45	-	Kochhar และคณะ, 1999
Aspergillus niger	5.0	-	60	-	Chen และคณะ, 1997
Aspergillus niger NK-126	5.0	-	50	-	Kango, 2008
Bacillus Smithii T7	4.5	-	70	-	Gao และคณะ, 2008
Bacillus polymyxa MGL21	7.0	-	35	-	Kwon และคณะ, 2003
Clostridium acetobutylicum strain ABKn8	4.6	-	-	-	Efstathiou และคณะ, 1986

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Cryptococcus aureus G7a	5	4.5 - 6.5	50	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	Sheng และคณะ, 2008a
Kluyveromyces bulgaricus	3.6	-	30 และ 33	-	Vranesic และคณะ, 2002
Kluyveromyces fragilis	4.75	4.5 – 6.0	55	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง	Pandey และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus	4.4	4.5 – 6.0	55	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง	Rouwenhost และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus	4.75	4.5 – 6.0	55	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง	Kushi และคณะ, 2000
Kluyveromyces sp.Y-85	5.5	-	50	-	Wei และคณะ, 1998
Kluyveromyces marxianus YS-1	5.5	4.5 – 6.5	50	50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	Singh และคณะ, 2007

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Penicillium janczewskii	5.5	-	60	-	Pessoni และคณะ, 2007
Penicillium sp. TN-88	5.2	-	50	-	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	6.0	-	60	-	Gong และคณะ, 2009
Pseudomonas sp.	5.5	-		-	Kim และคณะ, 1997
Rhizupus sp. TN-96	5.5	-	40	-	Ohta และคณะ, 2002
Streptomyces sp.	6.0	-	60	70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	Sharma และคณะ, 2006
Streptomyces sp. GNDU1	5.5	-	60	80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	Gill และคณะ, 2006
Streptomyces grisenus	7.0	6.0 – 9.0	40	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง	Tohamy, 2006

หมายเหตุ : - หมายถึง ยังไม่ระบุ

จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตอินูลิเนสได้แต่ที่มีการรายงานไว้พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มรา และยีสต์ เช่น *Aspergillus* และ *Kluyveromyces* (Wei และคณะ, 1999a) ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีในภาวะเป็นกรด เอนไซม์ที่ได้จึงทำงานได้ดีในภาวะค่อนข้างเป็นกรด *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปทั้งในดิน แหล่งน้ำจืด และน้ำทะเล สามารถเจริญได้ดีในธรรมชาติที่มีภาวะแตกต่างกันค่อนข้างสูง และสร้างเอนไซม์ได้หลากหลายชนิดที่ทำงานได้ดีในช่วง ความเป็นกรดด่างที่กว้าง และยังทนความร้อนได้ดี เอนไซม์ที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่ใช้เพื่อย่อยสารประกอบต่างๆในธรรมชาติ แล้วนำมาเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนในการเจริญ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำ *Streptomyces* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย รวมทั้งจากบริเวณที่มีการเพาะปลูกต้นแก่นตะวันมาคัดกรองหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตอินูลิเนส และศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์นี้ รวมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ได้เพื่อเป็นข้อมูลในการนำเอนไซม์นี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น Kubota 1920 บริษัท Kubota, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) รุ่น Seveneasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Genesys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer Instruments Lambda 25 UV/VIS Spectronic บริษัท Perkin Elmer, Inc., USA
6. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
8. ตู้เขี่ยเชื้อ Clean รุ่น V3-4 และรุ่น V6 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส Mitsubishi Electric รุ่น MR-F56R-SL บริษัทกันยงอีเลคทริก จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W 200 และรุ่น WB 22 บริษัท Memmert Germany
11. อ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น GFL 1086 บริษัท Gesellschaft fÜr Labortechnik Co., Ltd., Germany
12. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA

13. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502-P บริษัท PMC, USA และรุ่น HS10-2 บริษัท Torrey Pines Scientific, Inc. USA
14. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
15. ตู้อบความร้อน รุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
16. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
17. ฮีมาไซโทมิเตอร์ (Haemacytometer) บริษัท Schott Duran, Germany
18. เครื่องบด Hammer Mill บริษัท Alpine, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อินนูลินบริสุทธิ์จากชีคโครี (Inulin from chicory) บริษัท Fluka, USA
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract power) บริษัท Bio Springer, France
3. กลูโคส (Glucose) บริษัท Merck, Germany
4. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
5. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
6. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
7. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
8. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
10. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
12. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
13. แบคโทเพบโทน (Bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
14 สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd.,Ireland
15. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
16. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Merck, Germany
17. ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
18. แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
19. โซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
20. แบคโททริปโทน (Bacto tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
21. ซูโครส (Sucrose) บริษัท Merck, Germany

22. แมนนิทอล (Manitol) บริษัท Merck, Germany
23. ฟรักโทส (Fructose) บริษัท Fluka, USA
24. มอลโทส (Maltose) บริษัท Difco Laboratories, USA
25. ข้าวโอ๊ต (Oatmeal) บริษัท Quaker, Malaysia
26. ข้าวไรย์ (Rice rye) บริษัท Golden Chef, Thailand
27. ถั่วเขียว (Mung bean) บริษัท Golden Chef, Thailand
28. รากแก่นตะวัน (โครงการวิจัยแก่นตะวัน สาขาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การแยก *Streptomyces* sp. จากดินบริเวณที่มีการปลูกต้นแก่นตะวัน กระเทียม หัวหอม กระชาย ขมิ้น ข่า

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาเจือจางเป็นอนุกรม ดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร กระจาย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อฮิวมิค แอซิด วิตามิน-อการ์ มีเดียม (Humic Acid-Vitamin Agar Medium, HV agar) (Hayakawa and Nonomura, 1987) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5-7 วัน สังเกตโคโลนีของ *Streptomyces* ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวและโคโลนีฝังลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเขี่ยโคโลนีมาทำให้บริสุทธิ์โดยลากเชื้อบนอาหารแข็งเบนเนต (Bennett Agar) ที่มีไซโคลเฮกซามีดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บ *Streptomyces* ที่บริสุทธิ์แล้วลงในอาหารเอียงแข็งชนิด MS (Mannitol Soy Bean Agar Medium) เพื่อใช้ในการศึกษาสมบัติต่อไป

3.3.2 การเก็บรักษาเชื้อ *Streptomyces* spp.

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. ลงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาขีดลงบนอาหารแข็งเอียงชนิด MS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วันหรือจนกว่าโคโลนีของ *Streptomyces* spp. จะสร้างสปอร์แก่เต็มที่จึงนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบขั้นต่อไป

3.3.3 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* spp. เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินูลิเนส

3.3.3.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp. ลงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาขีดลงบนขวดแบนที่มีอาหารแข็งเอียงชนิดข้าวโอ๊ต (Oatmeal) เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการสร้างสปอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วันจนกว่าโคโลนีของ *Streptomyces* spp. จะสร้างสปอร์แก่เต็มที่ จากนั้นนำมาขูดสปอร์ออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นที่ผสม tween 80 ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวทำละลาย ดูดสปอร์แขวนลอยออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์เพื่อแยกเซลล์ออกและนำสปอร์ที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 อีก 2 ครั้ง นำสปอร์ที่ได้ไปแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยนับให้สปอร์มีความหนาแน่นที่ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.3.2 การเตรียมอินูลิเนสกัดจากรากแก่นตะวัน

นำรากแก่นตะวันสดมา ล้างน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ วางใส่ถาดอลูมิเนียม นำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียสจนรากแก่นตะวันแห้ง นำรากแก่นตะวันที่อบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบดหยาบ (สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เพื่อสะดวกในการกรอง ชั่งรากแก่นตะวันที่บดแล้วมา 10 กรัมเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งที่ 100 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที นำสารสกัดมากรองด้วยผ้าขาวบางและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกกากจากรากแก่นตะวันออก วัดปริมาตรส่วนน้ำใสที่ได้เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณของอินนูลินในสารสกัดวิเคราะห์โดยวิธีของ Dische และ Borenfreund (1951) และวิธีของ Lingyun และคณะ (2007)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3.3 การคัดกรอง *Streptomyces* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์ 100 ไมโครลิตรของ *Streptomyces* spp. แต่ละสายพันธุ์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.8 – 1.0 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวชนิด Czapex 's Dox medium (Sharma and Gill, 2007) โดยมีสารสกัดอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sharma และ Gill (2007)

3.3.3.4 การผลิตอินูลิเนสโดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.3.3

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.3.3.3 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bretani (LB) นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง late log จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวชนิด Czapex 's Dox medium (Sharma and Gill, 2007) โดยมีสารสกัดอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีในข้อ 3.3.4

3.3.3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Streptomyces* sp. CP01

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสายพันธุ์ CP01 ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ภาควิชาพันธุศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3.6 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. CP01

การศึกษารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. CP01 โดยถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามรูปแบบการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3.3.7 การศึกษาอายุของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เลือกระยะการเจริญในช่วง mid log และ late log ลงในอาหารเหลวชนิด Czapex 's Dox medium (Sharma and Gill, 2007) โดยมีสารสกัดอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sharma และ Gill (2007)

3.3.4 การวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sharma และ Gill (2007) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

ก. สารละลายอินนูลินบริสุทธิ์จากรากของชีคโครี่ (Fluka, USA) 0.1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 95 ไมโครลิตร

ข. 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 55 ไมโครลิตร

ค. crude enzyme ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

สำหรับส่วนผสมของตัวเปรียบเทียบ (Blank) ประกอบด้วย

ก. สารละลายอินนูลินบริสุทธิ์จากรากของชีคโครี (Fluka, USA) 0.1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 95 ไมโครลิตร

ข. 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 105 ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดนี้มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีของ Bernfeld (1955) โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยเติม DNSA reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1 หน่วยของอินูลิเนสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายอินนูลินแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.3.5 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง late log จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวชนิด Czapex 's Dox medium (Sharma and Gill, 2007) โดยมีสารสกัดอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sharma และ Gill (2007)

3.3.6 การศึกษาความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง late log จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ ลงในอาหารเหลวชนิด

Czapex 's Dox medium (Sharma and Gill, 2007) โดยแปรความเข้มข้น ดังนี้ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีในข้อ 3.3.4

3.3.7 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส

3.3.7.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ late log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยแปรชนิดของแหล่งคาร์บอน คือ สารสกัดอินนูลินจากรากแก่นตะวัน, อินนูลินบริสุทธิ์จากรากของชีคโครี (Fluka, USA), แมนนิทอล, กลูโคส, ซูโครส, ฟรักโทส, มอลโทส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีในข้อ 3.3.4

3.3.7.2 การหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ late log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium pH 7.0

ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.7.1 นำมาแปรความเข้มข้นที่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีในข้อ 3.3.4

3.3.8 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส

3.3.8.1 ชนิดของแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ late log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.7.1 และข้อ 3.3.7.2 และแปรชนิดของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) โซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract powder) สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) แบคโทเพปโทน (Bacto peptone) และ แบคโททริปโทน (Bacto tryptone) ที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส

3.3.8.2 การหาความเข้มข้นของแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ late log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex's Dox medium pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.7.1 และข้อ 3.3.7.2 และแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.8.1 นำมาแปรความเข้มข้นที่ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส

3.3.9 การศึกษาผลของแหล่งเกลือแร่ในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. CP01 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ late log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex's Dox medium pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.7.1 และข้อ 3.3.7.2 และแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.8.1 และข้อ 3.3.8.2 โดยใช้แหล่งเกลือแร่ คือ Mg^{2+} และ Fe^{2+} ในขั้นแรกแปรความเข้มข้นของ Mg^{2+} โดยนำมาแปรความเข้มข้นที่ 0.020, 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และให้ Fe^{2+} ความเข้มข้นเท่ากับ 0.0010 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อได้ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสมแล้วจะแปรความเข้มข้นของ Fe^{2+} โดยนำมาแปรความเข้มข้นที่ 0.00025, 0.0005,0.00075, 0.0010, 0.0015 และ 0.002 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง

ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส

3.3.10 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

แปรระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0 – 11.0 โดยมีแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.8 – 3.3.9 โดยบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาบ่มเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.5 เก็บตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส

3.3.11 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.3.10 แต่แปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อในช่วง 30 – 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส

3.3.12 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

3.3.12.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอินูลิเนส

นำอินูลิเนสมาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.3.4 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.12.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

นำอินูลิเนสมาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีในข้อ 3.3.4 โดยบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.12.1 และแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างต่างๆดังนี้

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4.0 – 6.5
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 6.0 – 8.5
50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 8.0 – 9.0

3.3.12.3 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 30 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของอินูลิเนสที่เหลือ ตามวิธีการในข้อ 3.3.4 ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.12.1 และ 3.3.12.2 โดยมีอินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.12.4 ความเสถียรของอินูลิเนสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 – 9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของอินูลิเนสที่เหลือ ตามวิธีการในข้อ 3.3.4 ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.12.1 และ 3.3.12.2 โดยมีอินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยก *Streptomyces* spp. จากดินบริเวณที่มีการปลูกต้นแก่นตะวัน กระเทียม หัวหอม กระชาย ขมิ้น ข่า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยก *Streptomyces* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตอินูลิเนส โดยคัดแยก *Streptomyces* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณที่มีการปลูกต้นแก่นตะวัน กระเทียม หัวหอม กระชาย ขมิ้น ตะไคร้ ข่า โดยขั้นแรกแยกเชื้อจากตัวอย่างดินโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อฮิวมิค แอซิด วิตามิน-อการ์ มีเดียม (Humic Acid-Vitamin Agar Medium, HV agar) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีท (Hayakawa and Nonomura, 1987) จากนั้นนำโคโลนีที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งเบนเนต (Bennett Agar) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าสามารถแยก *Streptomyces* spp. ได้ทั้งหมด 371 สายพันธุ์ ซึ่งจะทำการทดสอบต่อไปถึงความสามารถในการสร้างอินูลิเนสโดยจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้นี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 สายพันธุ์ของ *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้

รหัสสายพันธุ์ *Streptomyces* spp.	แหล่งที่มาของดิน	จำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้
KA	กระชาย	22
IN	รากแก่นตะวันจากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	27
OG	หัวหอมและกระเทียม	45
AL	ข่า	12
CY	ขมิ้นเหลือง	7
CB	ขมิ้นดำ	15
CP	รากแก่นตะวันจากจังหวัดชัยภูมิ	6
KK	รากแก่นตะวันจากจังหวัดขอนแก่น	6
JA	รากแก่นตะวันในแปลงทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น	53
A, B, C, D, E, G, O	จังหวัดน่าน (ได้รับอนุเคราะห์จากนางสาวฉวีวรรณ ปันคำ)	178
ผลรวมสุทธิ		371

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการสกัดอินนูลินจากรากแก่นตะวัน

จากการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวันที่อบแห้งปริมาณ 10 กรัม ซึ่งละลายด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร ผ่านการนึ่งที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลินโดยใช้ 2 วิธีเปรียบเทียบกันได้แก่ วิธีของ Dische และBorenfreund (1951) พบว่ามีอินนูลิน 17.81 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินโดยวิธีของ Lingyun และคณะ (2007) พบว่ามีอินนูลิน 16.66 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินโดยทั้ง 2 วิธีนี้มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงใช้ค่าเฉลี่ยจาก 2 วิธีนี้เป็นค่าความเข้มข้นของอินนูลินในสารสกัดสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.2 ปริมาณอินนูลินที่สกัดจากหัวแก่นตะวัน 10 กรัม วิเคราะห์โดยวิธีของ Dische และ Borenfreund (1951) และวิธีของ Lingyun และคณะ (2007)

วิธีสกัด	ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด		น้ำตาลรีดิวซ์		เปอร์เซ็นต์อินนูลินในการสกัดเทียบกับแก่นตะวัน (น้ำหนัก/น้ำหนัก)
		มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	มิลลิกรัม	มิลลิกรัม / มิลลิลิตร	มิลลิกรัม	
Dische และ Borenfreund (1951)	75±0.04	27.60±0.03	2,070.00±0.13	3.04±0.02	288.80±0.02	17.81±0.02
Lingyun และคณะ (2007)	75±0.04	26.07±0.01	1,955.25±.0.09	3.04±0.02	288.80±0.02	16.66±0.06

4.3 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้

การทดลองนี้เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ 371 สายพันธุ์ โดยนำมาเลี้ยงตามวิธีการในบทที่ 3 ข้อ 3.3.3.4 ซึ่งบ่มเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามี 19 สายพันธุ์ที่จัดว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้พอสมควรเมื่อเทียบกับ *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นๆที่มีผู้รายงานไว้ได้แก่ *Streptomyces* sp. GNDU1 สามารถผลิตอินูลิเนสได้ 0.552 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Gill และคณะ, 2003) และ *Streptomyces* sp. สามารถผลิตอินูลิเนสได้ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Sharma และคณะ, 2006) คือ ตั้งแต่ 0.11 – 0.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ส่วนเชื้อ *Streptomyces* spp. อีก 352 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตอินูลิเนสพบว่าให้อินูลิเนสในช่วง 0.0004 – 0.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 สายพันธุ์ *Streptomyces* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตอินูลิเนสได้

สายพันธุ์ *Streptomyces* spp.	แอคติวิตีของอินูลิเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
KA01	0.15
KA10	0.12
KA12	0.14
CY04	0.14
CB10	0.15
CB14	0.26
CB15	0.16
AL02	0.14
JA04	0.11
JA06	0.13
JA09	0.12
JA12	0.14
JA19	0.13
JA22	0.12
JA48	0.14
JA53	0.14

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

KK03	0.12
CP01	**0.49**
CP02	0.13

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CP01 สามารถผลิตอินูลิเนสได้สูงสุด และเมื่อทำการทดสอบซ้ำหลายครั้งพบว่าประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนสค่อนคงที่ ดังนั้นจึงเลือก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CP01 มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CP01 เทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank (ด้วยความอนุเคราะห์ของรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต) พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces griseoruber* NBRC 12873 99.34% และได้ฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ไว้กับ GenBank ภายใต้ Accession No. GU458298

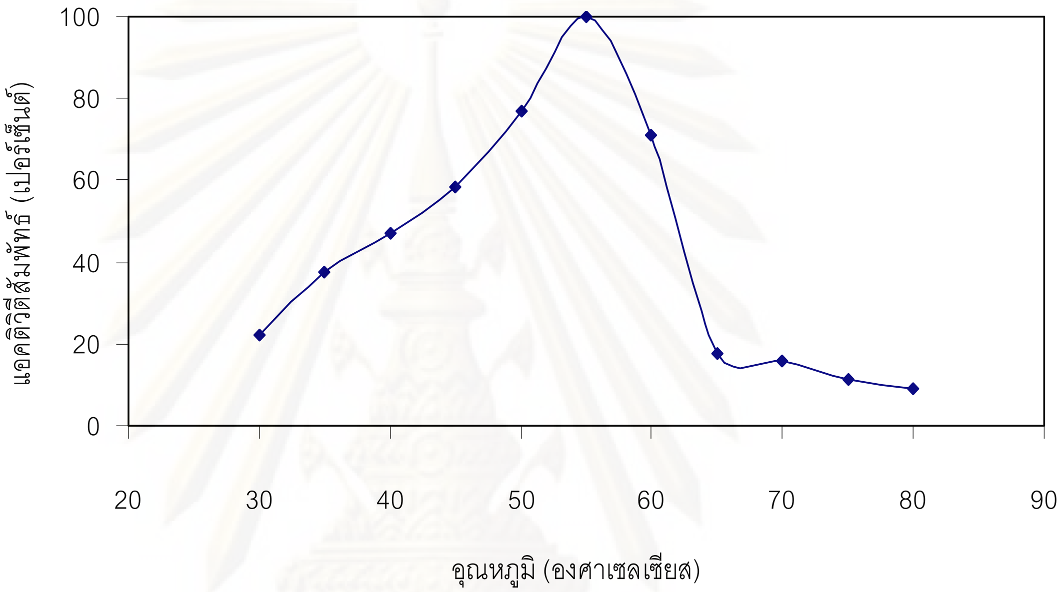
4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

ในการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส pH 6.0 ตามภาวะที่รายงานโดย Sharma และ Gill (2007) ภาวะดังกล่าวอาจจะไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้น เพื่อนำไปใช้ในการติดตามแอคติวิตีของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

จากการศึกษาการนำ crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส โดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส คือ 55 องศาเซลเซียส โดยเป็นอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสสูงที่สุด คือ 0.595 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.1

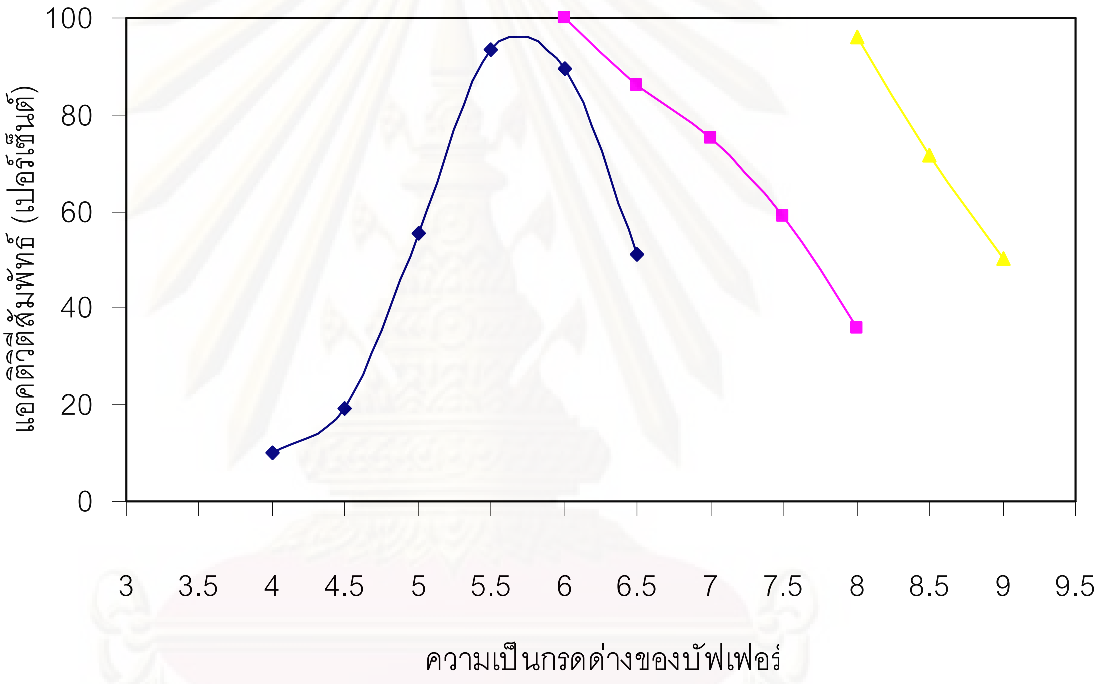


รูปที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดคือ 0.595 หน่วยต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.4.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

จากการศึกษาการนำ crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส โดยการแปรค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยแปรค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0 – 9.0 ผลการทดลองพบว่าอินูลิเนสสามารถทำงานได้ดีที่สุดเมื่อใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 โดยเป็นความเป็นกรดด่างที่ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสสูงที่สุดคือ 0.699 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

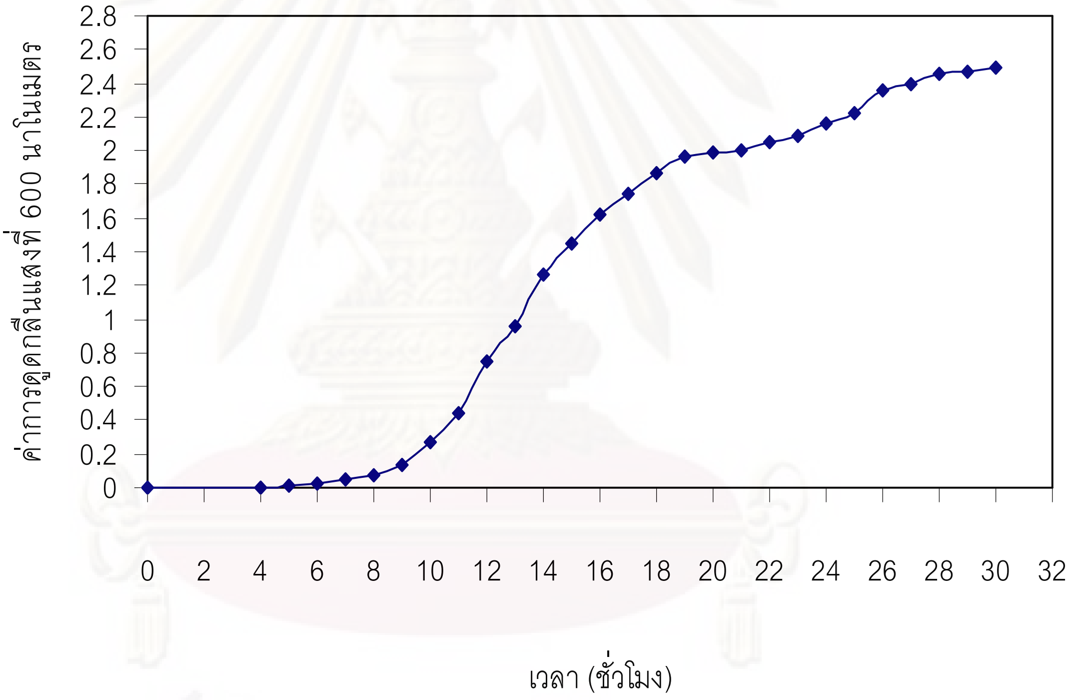
◆	โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์	pH 4.0 – 6.5
■	โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	pH 6.0 – 8.0
▲	ทริสบัฟเฟอร์	pH 8.0 – 9.0

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดคือ 0.699 หน่วยต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4.5 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. CP01

การทดลองนี้เพื่อหารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. CP01 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตอินูลิเนสต่อไป ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3 พบการเจริญของเชื้อในระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างชั่วโมงที่ 7 ถึงชั่วโมงที่ 19 โดยมีระยะ mid log อยู่ที่ชั่วโมงที่ 14 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.2 และระยะ late log อยู่ชั่วโมงที่ 18 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.8 หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ระยะ stationary และ dead phase



รูปที่ 4.3 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. CP01

4.6 ผลของอายุหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

การทดลองนี้เพื่อหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนส โดยเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) pH 7.0 ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยจะทำการเลือกหัวเชื้อที่ระยะ mid log ซึ่งบ่มเป็นเวลา 14 ชั่วโมงและระยะ late log ซึ่งบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงใน Czapex ' s Dox medium ซึ่งมีอินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองในตารางที่ 4.4 พบว่าอายุของหัวเชื้อที่ระยะ late log ซึ่งบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.92 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าระยะ mid log ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.43 หน่วยต่อมิลลิลิตร

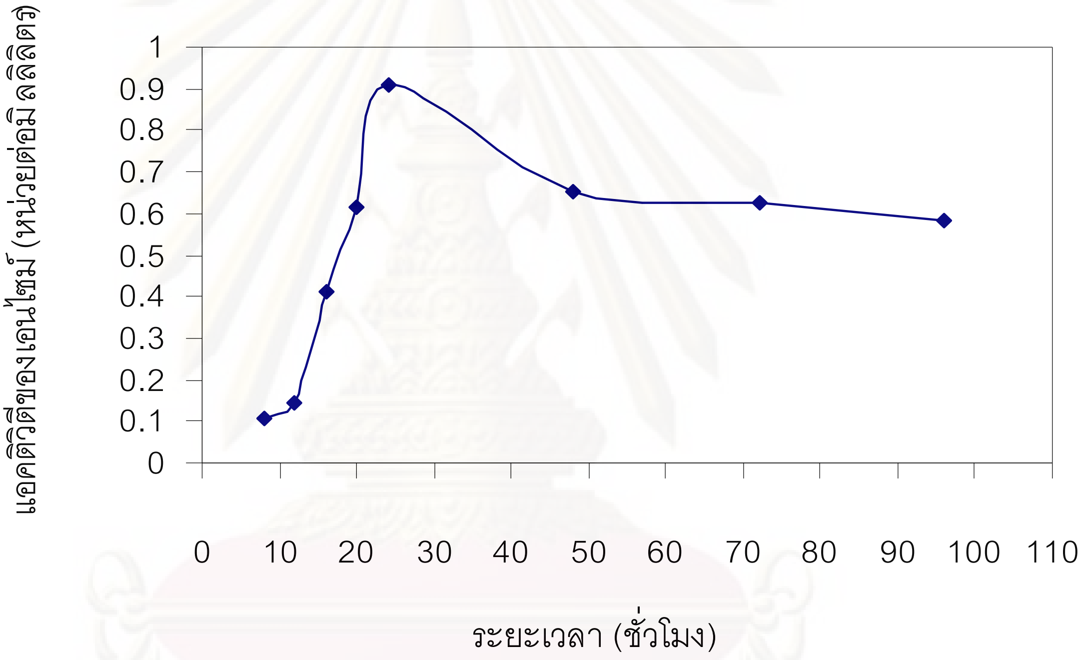
ตารางที่ 4.4 แสดงผลของอายุของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

อายุของหัวเชื้อ	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
Mid log	0.43
Late log	0.92

ดังนั้นในการทดลองต่อๆไปจะใช้หัวเชื้อที่ช่วงอายุ late log

4.7 ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสโดย ***Streptomyces*** **sp. CP01**

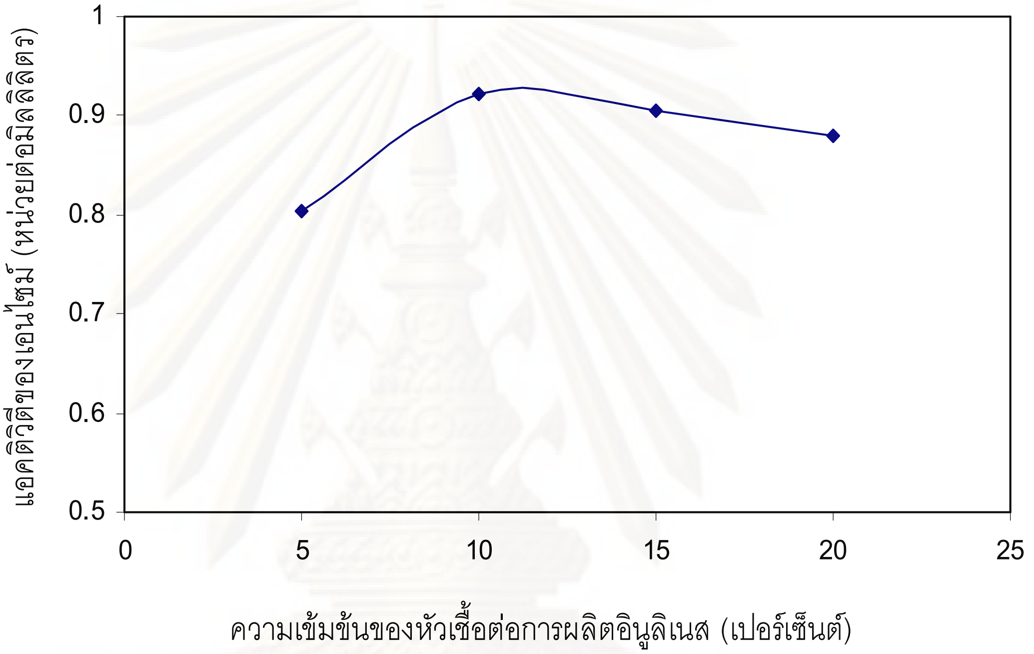
การทดลองนี้ใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium จากนั้นแปรระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 4.4 พบว่า *Streptomyces* sp. CP01 ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสสูงสุดประมาณ 0.91 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 24 ชั่วโมง และใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.4 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสเมื่อใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

4.8 ผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. CP01

จากการแปรความเข้มข้นของหัวเชื้อที่มีอายุในช่วง late log โดยใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 4.5 พบว่าหัวเชื้อที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสสูงสุดประมาณ 0.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร



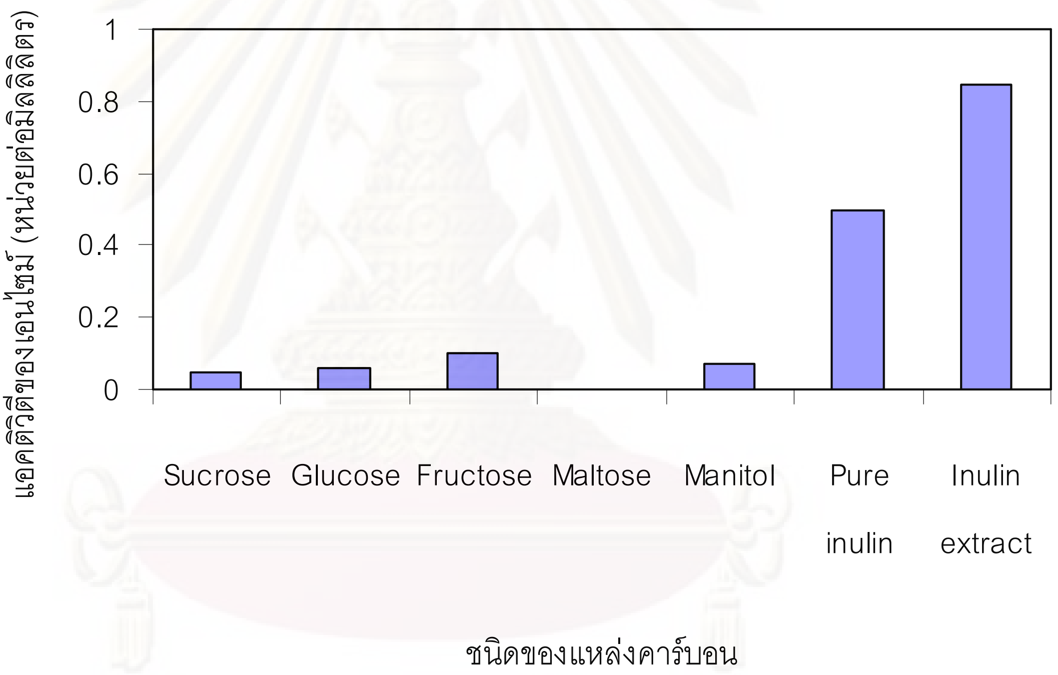
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9 ผลของแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส

4.9.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตอินูลิเนส

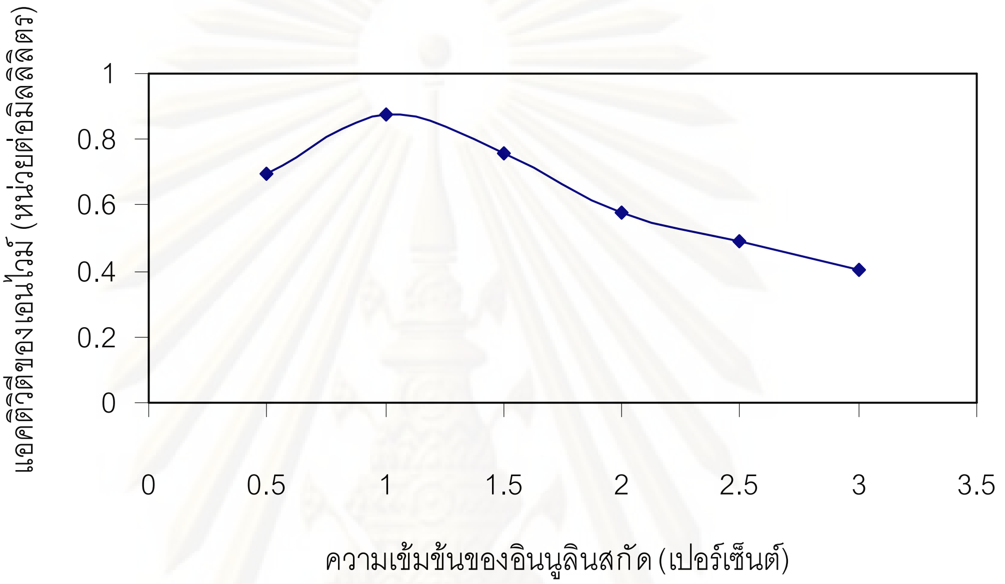
จากการแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตอินูลิเนสได้แก่ สารสกัดอินนูลิน อินนูลินบริสุทธิ์จากรากของชีคโครี แมนนิทอล กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส มอลโทส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการทดลองดังรูป 4.6 พบว่าสารสกัดอินนูลิน ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสสูงที่สุดประมาณ 0.9 หน่วยต่อมิลลิลิตรในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้สารสกัดอินนูลินเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.6 ผลของแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

4.9.2 ความเข้มข้นของสารสกัดอินนูลินที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนส

จากการแปรความเข้มข้นของสารสกัดอินนูลินที่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสสูงที่สุดประมาณ 0.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังรูป 4.7



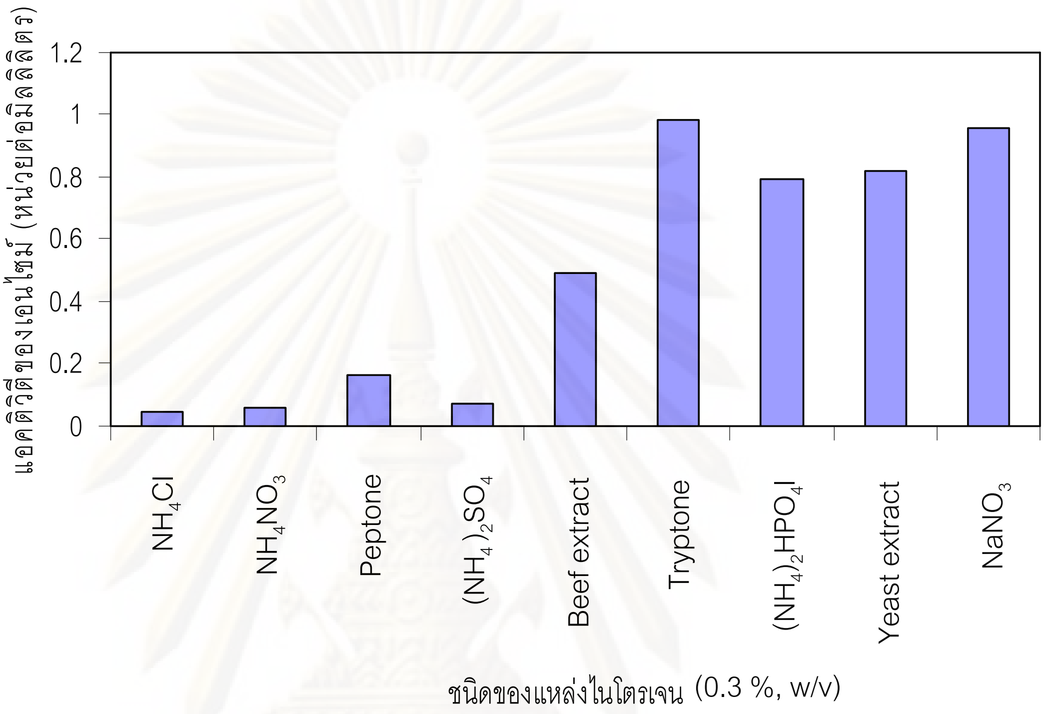
รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของอินนูลินสกัดต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

4.10 ผลของแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส

4.10.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตอินูลิเนส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium เมื่อใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรชนิดของ แหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนเพื่อการผลิตอินูลิเนสได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมไนเทรต แมนนิทอล สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อ และแบคโทเพบโทน ที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเมื่อใช้แบคโทเพบโทน เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

เท่ากับ 0.98 หน่วยต่อมิลลิลิตร ลำดับต่อมาคือ โซเดียมไนเทรต และสารสกัดจากยีสต์ ดังรูปที่ 4.8 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกแบคโททริปโทน โซเดียมไนเตรต และสารสกัดจากยีสต์ มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งของไนโตรเจนต่อไป

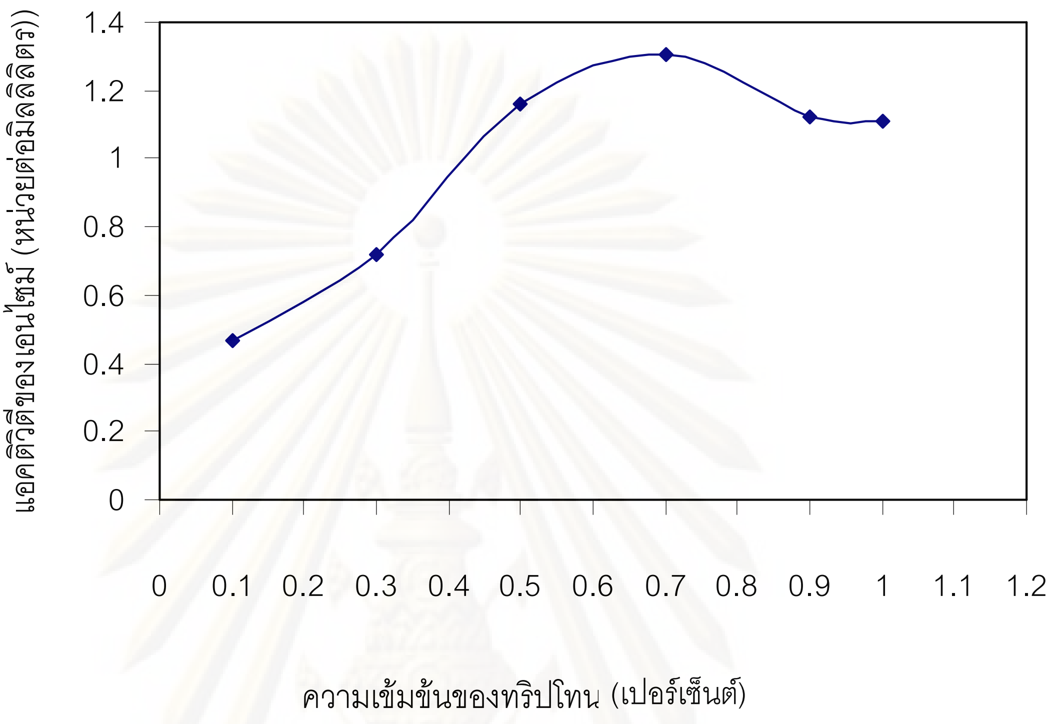


รูปที่ 4.8 ผลของอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

4.10.2 ความเข้มข้นของแบคโททริปโทน โซเดียมไนเตรต และสารสกัดจากยีสต์ ที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนส

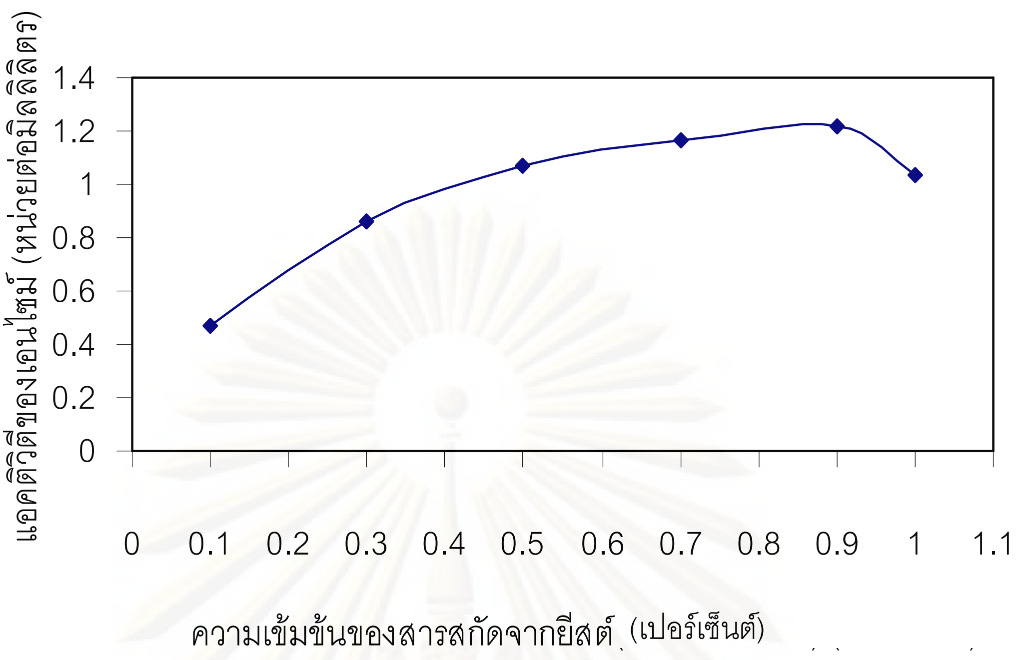
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium เมื่อใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และแบคโททริปโทน สารสกัดจากยีสต์ และโซเดียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรความเข้มข้นที่ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังรูป 4.9 - 4.11 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ของแบคโททริปโทน (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสสูงที่สุดประมาณ 1.30 หน่วยต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสเท่ากับ 1.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร และโซเดียมไนเตรตที่ความ

เข้มข้นตั้งแต่ 0.3-1.0 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของอินูลิเนสประมาณ 1.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้แบคโททริปโทน เป็นแหล่งของไนโตรเจนต่อไป

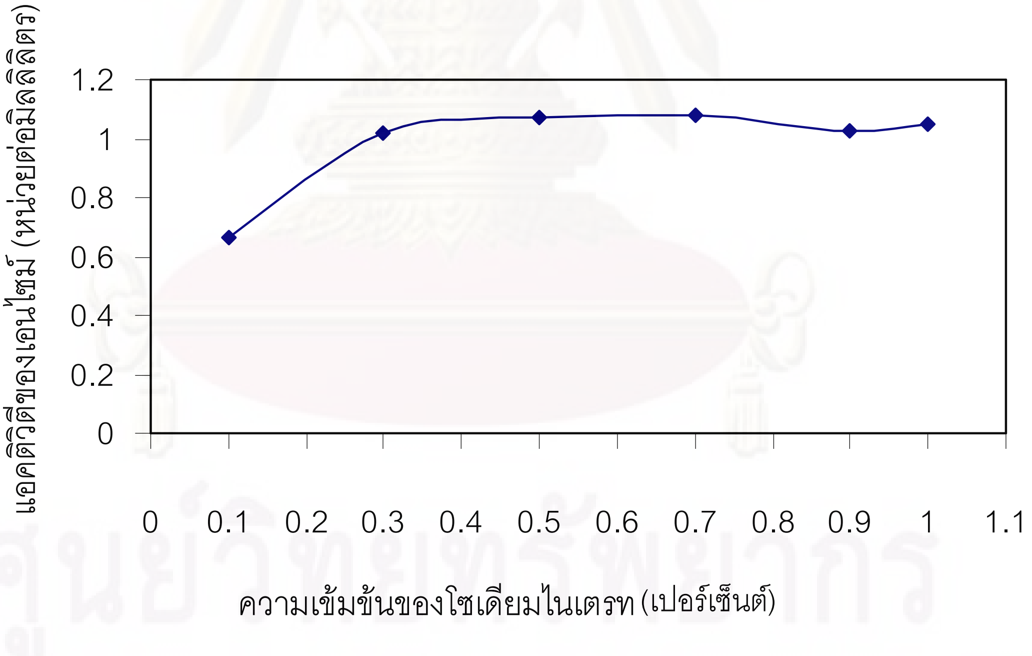


รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของแบคโททริปโทนต่อการผลิตอินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตอินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01

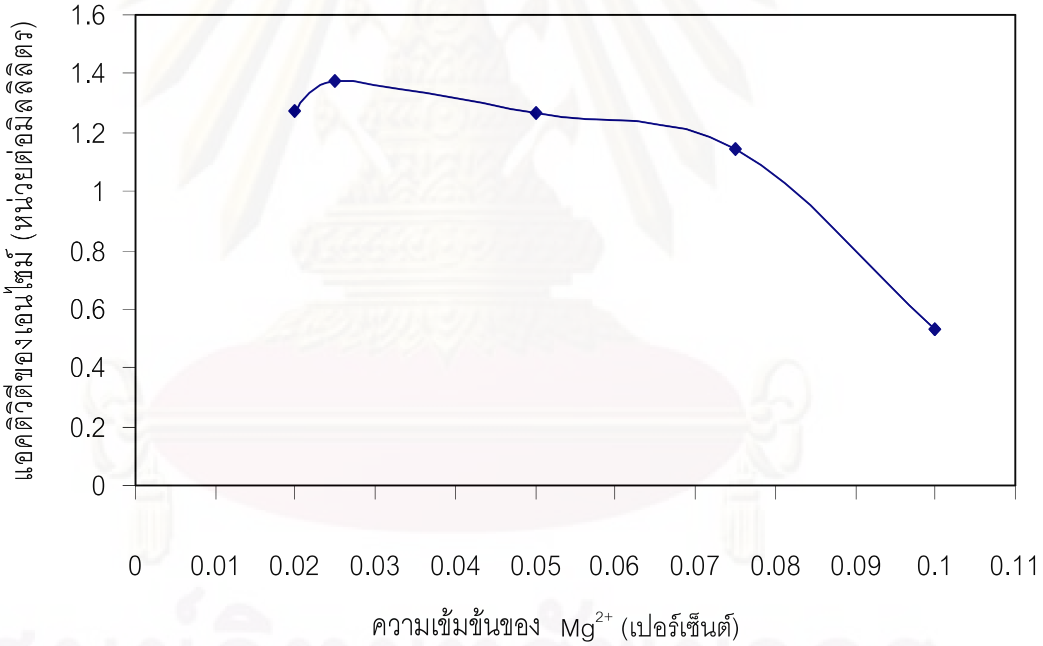


รูปที่ 4.11 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

4.11 ผลของแหล่งเกลือแร่ในการเลี้ยง *Streptomyces* sp ต่อการผลิตอินูลิเนส

4.11.1 ผลของ Mg^{2+} ต่อการผลิตอินูลิเนส

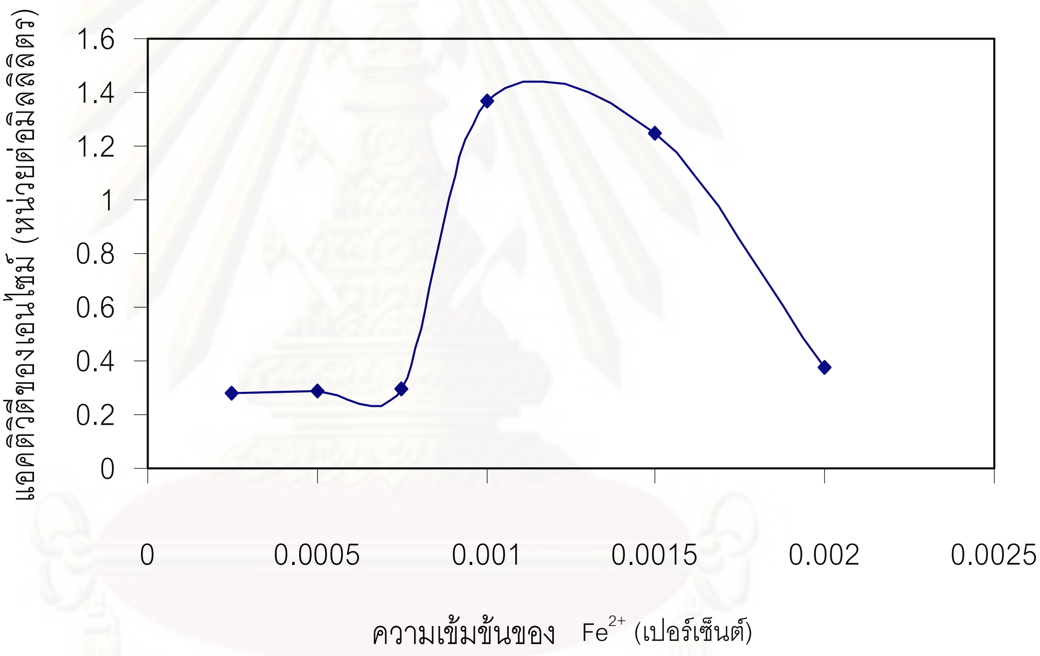
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium เมื่อใช้อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน แบคโททริปโทน 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และ Fe^{2+} 0.001 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งของเกลือแร่ ทำการแปรความเข้มข้นของแหล่งแร่ Mg^{2+} โดยนำมาแปรความเข้มข้นที่ 0.020, 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 1.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองดังรูป 4.12



รูปที่ 4.12 ผลของความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

4.11.2 ผลของ Fe^{2+} ต่อการผลิตอินูลิเนส

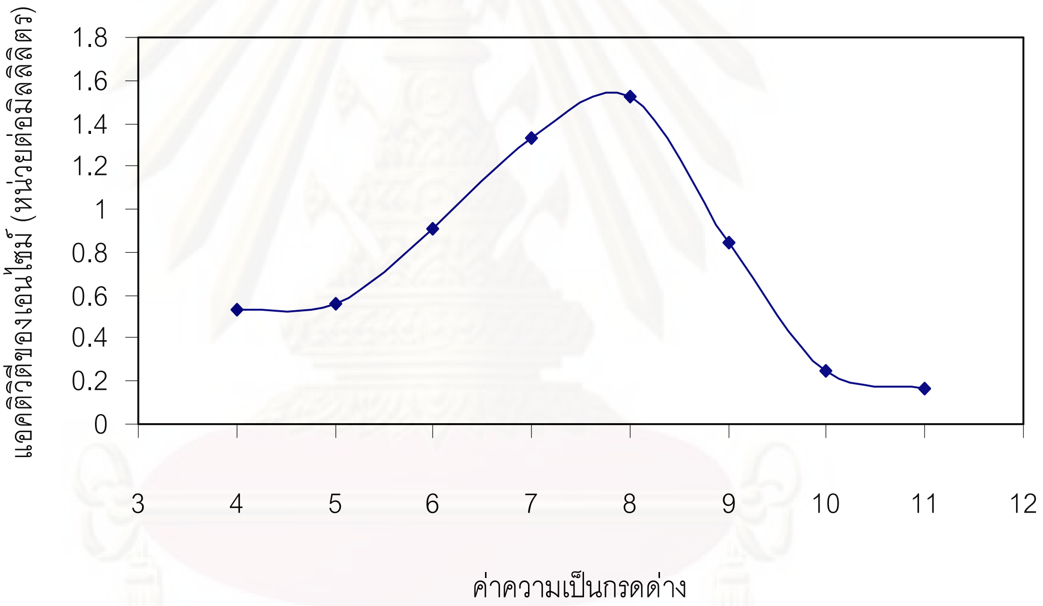
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium เมื่อใช้ อินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน แบคโททริปโทน 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และ Mg^{2+} 0.025 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งของเกลือแร่ ทำการแปรความเข้มข้นของ Fe^{2+} โดยนำมาแปรความเข้มข้นที่ 0.00025, 0.0005,0.00075, 0.0010, 0.0015 และ 0.002 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.0010 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)ให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 1.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองดังรูป 4.13



รูปที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นของ Fe^{2+} ต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

4.12 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

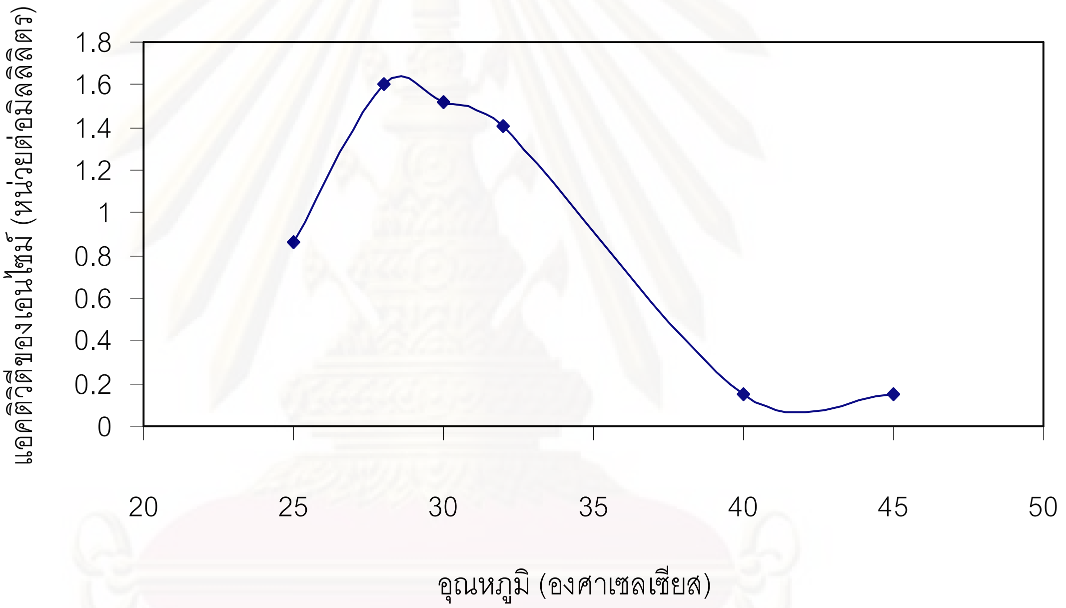
จากการแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium ที่มีอินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและแบคโทเพบโทน 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 – 11.0 และบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและแบคโททริปโทน 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีสูงที่สุดประมาณ 1.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.14 ดังนั้นจึงเลือกค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8 มาใช้ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเพื่อผลิตอินูลิเนสต่อไป



รูปที่ 4.14 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้อินนูลินสกัดเป็นแหล่งคาร์บอน

4.13 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium ที่มีอินนูลินสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและแบคโททริปโทน 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 และแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 25, 28, 30, 40 และ 45 องสาเซลเซียส บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 วัน พบว่าให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 1.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.15 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 28 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.15 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อมีอินนูลินสกัดเป็นแหล่งคาร์บอน แบคโทเพบโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 8

จากการทดลองขั้นต้นได้สรุปเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. CP01 ตั้งแต่ระดับการคัดกรองรวมถึงในแต่ละขั้นตอนของการแปรองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าภายใต้ภาวะเหมาะสม เชื้อนี้สามารถผลิตอินูลิเนสได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 3 เท่า เมื่อเทียบกับขั้นตอนแรกในช่วงคัดกรองเชื้อ

ตารางที่ 4.5 สรุปความสามารถในการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ในแต่ละขั้นตอนของการหาภาวะเหมาะสม

ขั้นตอน	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	แหล่งเกลือแร่	ภาวะบ่มเชื้อ			แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลิลิตร)
				อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ระยะเวลา (วัน)	
1. การคัดเลือกเบื้องต้น	1% อินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวัน	0.3% โซเดียมไนเตรท	0.05% Mg^{2+} และ 0.001% Fe^{2+}	30	7	3	0.49
2. แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม	1% อินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวัน	0.7% แบคโททริปโทน	0.05% Mg^{2+} และ 0.001% Fe^{2}	30	7	1	1.30
3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอิออนโลหะ	1% อินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวัน	0.7% แบคโททริปโทน	0.025% Mg^{2+} และ 0.001% Fe^{2}	30	7	1	1.37
4. pH เลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม	1% อินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวัน	0.7% แบคโททริปโทน	0.025% Mg^{2+} และ 0.001% Fe^{2}	30	8	1	1.54
5. อุณหภูมิเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม	1% อินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวัน	0.7% แบคโททริปโทน	0.025% Mg^{2+} และ 0.001% Fe^{2}	28	8	1	1.60

หมายเหตุ : ขั้นตอนที่ 1 วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 6.0, 60 องศาเซลเซียส

: ขั้นตอนที่ 2-5 วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 6.0, 55 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นจากงานวิจัยนี้พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. CP01 คือ

อินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวัน	1.0	เปอร์เซ็นต์
Bacto tryptone	0.7	เปอร์เซ็นต์
K_2HPO_4	0.1	เปอร์เซ็นต์
KCl	0.05	เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.025	เปอร์เซ็นต์
$FeSO_4.7H_2O$	0.001	เปอร์เซ็นต์

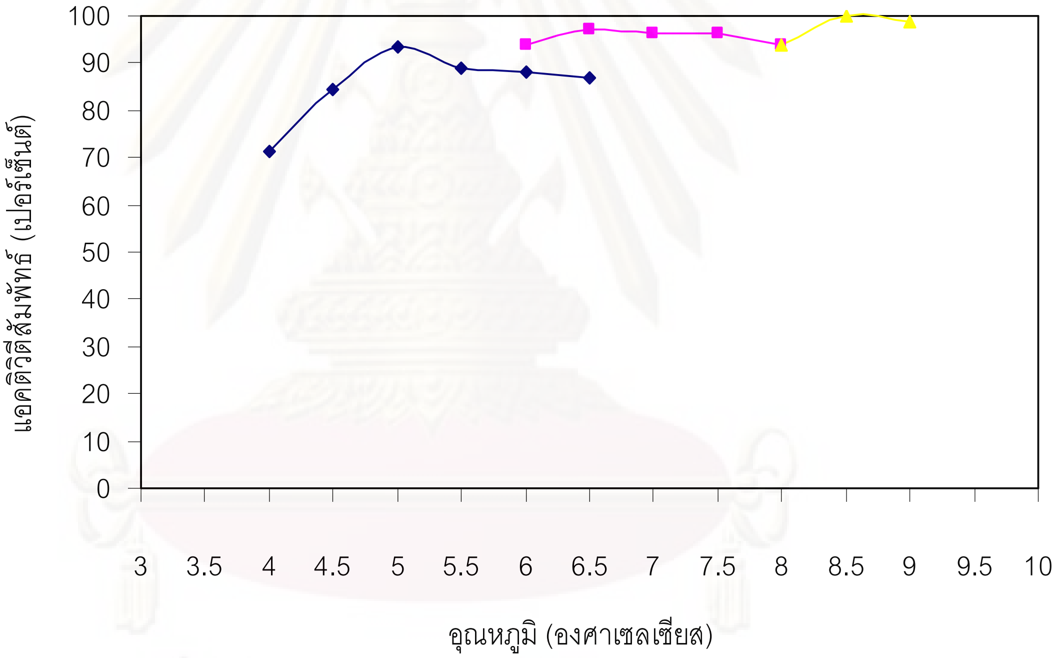
มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อคือ บ่มที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

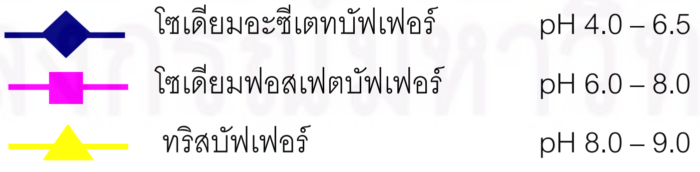
4.14 การศึกษาความเสถียรของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ต่อความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ

4.14.1 ผลของความเสถียรของอินูลิเนสต่อค่าความเป็นกรดด่าง

นำอินูลิเนสมาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 – 9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องสาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างคือ ตั้งแต่ 6.0 – 9.0 และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 94 – 98 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6.0 ลงมาเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีจนเหลือ 71 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ความเสถียรของอินูลิเนสต่อความเป็นกรดด่าง

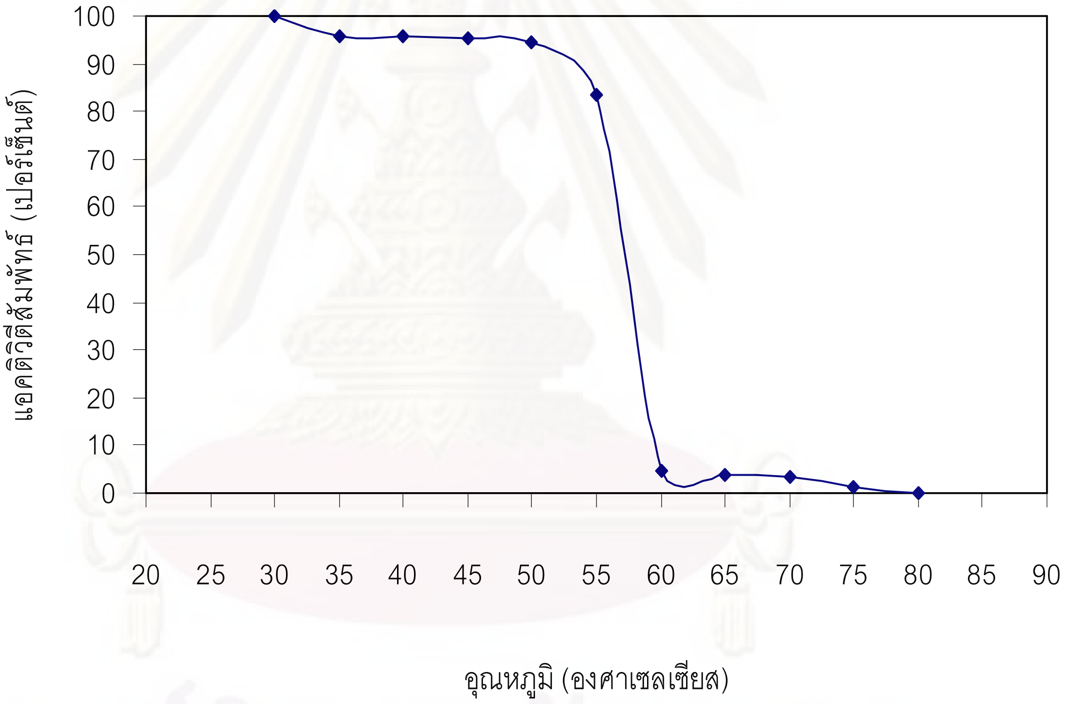


กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มคือ 1.60 หน่วยต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.14.2 ผลของความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิ

นำอินูลิเนสมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆโดยแปรอุณหภูมิในช่วง 30 – 80 องศาเซลเซียส บ่มนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสมผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17 พบว่าอินูลิเนสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่สูงถึง 83 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว จนถึงที่ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเหลือแอคติวิตีอยู่ประมาณ 4.6 เปอร์เซ็นต์ และสูยเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป



รูปที่ 4.17 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิ

กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มคือ 1.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาสมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ได้สรุปดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

สมบัติของเอนไซม์	สมบัติของอินูลิเนส จาก *Streptomyces* sp. CP01
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	55 องศาเซลเซียส
2. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน	6.0
3. ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	สูงถึง 55 องศาเซลเซียส, 30 นาที
4. ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	6.0-9.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องจากอินูลิเนสเป็นเอนไซม์ที่จัดว่ามีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินนูลินไปเป็นน้ำเชื่อมฟรักโทสเข้มข้นสูงและอินนูโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อาหารสุขภาพ รวมถึงอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล และจากข้อมูลที่กล่าวมาแล้วในบทนำว่าจุลินทรีย์หลายชนิดผลิตอินูลิเนสได้ โดยเฉพาะยีสต์ซึ่งให้ผลผลิตเอนไซม์ค่อนข้างสูงกว่าราและแบคทีเรีย เช่น *C. aureus* G7a ผลิตอินูลิเนสได้ 85 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Sheng และคณะ, 2007) และ *K. marxianus* YS-1 ผลิตได้ 55.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Singh และคณะ, 2007) แต่พบว่าเอนไซม์เหล่านี้ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงเป็นกรด คือ 4.5 – 5.0 งานวิจัยนี้จึงได้หาจุลินทรีย์ที่ผลิตอินูลิเนสที่ทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกลาง สำหรับ *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่พบในแหล่งดินทั่วไปและส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลางและบางสายพันธุ์เจริญได้ดีในภาวะค่อนข้างเป็นด่าง และเนื่องจากปัจจุบันยังมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* น้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาอินูลิเนสจาก *Streptomyces* โดยทำการแยก *Streptomyces* จากแหล่งดินที่ปลูกพืชที่มีหัวใต้ดิน ทั้งนี้เพราะอินนูลินเป็นพอลิแซคคาร์ไรด์ที่พบอยู่ในรากและหัวที่อยู่ใต้ดินของพืช จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาคัดกรองหาสายพันธุ์ที่ผลิตอินูลิเนสโดยคาดว่าน่าจะพบสายพันธุ์ที่สร้างอินูลิเนสได้ดีและทำงานได้ในช่วงค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง งานวิจัยนี้สามารถแยก *Streptomyces* sp. CP01 ได้จากดินบริเวณที่มีการปลูกแก่นตะวัน จากจังหวัดชัยภูมิ พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนสสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆโดยให้แอคติวิตีในขั้นตอนการคัดกรองเท่ากับ 0.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. GNDU1 ที่ให้แอคติวิตีเท่ากับ 0.552 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส (Gill และคณะ, 2006) และ *Streptomyces* sp. ที่ให้แอคติวิตีเท่ากับ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Sharma และคณะ, 2006)

การผลิตอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆที่มีผู้รายงานไว้ พบว่าสามารถใช้อินนูลินสกัดจากพืชได้หลากหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ อินนูลินสกัดจากหน่อไม้ฝรั่ง (Singh และ Bhermi, 2008) รากต้นรักเร่ (Singh และ คณะ, 2007) กระเทียมผง (Sharma และคณะ, 2007) Dandelion roots , Dandelion leaves, หัวหอม, กระเทียม และหัวของชีคโครี (Kango, 2008) หัว

ของแก่นตะวัน (Wei และคณะ, 1998) เป็นต้น จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนในการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่าสามารถใช้อินนูลินสกัดจากหัวของแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุด โดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับ *Kluyveromyces* Y-85 เมื่อใช้อินนูลินสกัดจากหัวของแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดเช่นเดียวกัน (Wei และคณะ, 1998b) แก่นตะวันเป็นพืชล้มลุกที่ปลูกง่ายมีอินนูลินสะสมอยู่ในหัวใต้ดินสูงถึง 14-19 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดเป็นแหล่งอินนูลินราคาถูกที่หาได้ง่ายและเหมาะสมสำหรับการผลิตอินูลิเนสระดับขยายส่วน

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของอินนูลินสกัดต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex ' s Dox medium ที่มีอินนูลินสกัดจากแก่นตะวัน 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งคล้ายกับการผลิตอินูลิเนสจาก *Aspergillus fumigatus* (Gill และคณะ, 2006) *Streptomyces* sp. GNDU1 (Gill และคณะ, 2003) และ *Streptomyces* sp. (Sharma และคณะ, 2006) ที่ให้แอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน แต่ยังมีอีกหลายรายงานที่พบว่ามีเชื้ออีกหลายชนิดที่ต้องการอินนูลินที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูง เช่น *K. marxianus* YS-1 ใช้อินนูลินสกัดจาก *Asparagus racemosus* 3.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Singh และ Bhermi, 2008) *Kluyveromyces marxianus* YS-1 ใช้อินนูลินสกัดจากรากของ Dahlia 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Singh และ คณะ, 2007) และ *Aspergillus niger* NK-126 ใช้อินนูลินสกัดจาก Dandelion 4.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Kango, 2008) จากรายงานข้างต้นพบว่า *Streptomyces* sp. CP01 ใช้ความเข้มข้นของอินนูลินสกัดในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบกับรายงานอื่นๆ จึงน่าจะเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิตในแง่การใช้แหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* sp. CP01 ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีแหล่งของไนโตรเจนทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ให้แอคติวิตีสูงใกล้เคียงกัน ได้แก่ แบคโททริปโทน สารสกัดจากยีสต์ และโซเดียมไนเทรต ดังนั้นจึงเลือกแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 นี้มาศึกษาผลของความเข้มข้นต่อการผลิตเอนไซม์และพบว่า 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แบคโททริปโทน เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยให้แอคติวิตีสูงถึง 1.30 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สารสกัดจากยีสต์โดยให้แอคติวิตีประมาณ 1.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่โซเดียมไนเทรต ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3 – 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีค่อนข้างใกล้เคียงกัน คือประมาณ 1.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์มีราคาค่อนข้างแพงซึ่งถ้ามีการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องใช้ปริมาณมาก ซึ่งจะทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง

ดังนั้นอนินทรีย์ไนโตรเจนหรือในที่นี้ คือ โซเดียมไนเทรต จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ทดแทนได้แม้จะให้ผลผลิตอินูลิเนสต่ำกว่าแบคโททริปโทเล็กน้อย เนื่องจากอนินทรีย์ไนโตรเจนส่วนใหญ่มีราคาถูก ส่วนการผลิตอินูลิเนสโดย *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นๆก็มีรายงานว่า *Streptomyces* sp. GNDU1 (Gill และคณะ, 2003) และ *Streptomyces* sp. (Sharma และคณะ, 2007) ใช้ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมไนเทรตเป็นแหล่งของไนโตรเจนเช่นกัน โดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.552 และ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่าแอคติวิตีต่ำกว่าที่ได้จาก *Streptomyces* sp. CP01 ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆมีรายงานว่าใช้สารสกัดจากยีสต์และสารสกัดจากเนื้อซึ่งเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น *A. ficuum* JNSP5-06 ใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้แอคติวิตีเท่ากับ 21.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Jing และคณะ, 2003) *K. marxianus* YS-1 ใช้สารสกัดจากเนื้อที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้แอคติวิตีเท่ากับ 40.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Singh และ คณะ, 2006) *C. aureus* G7a ใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (Sheng และคณะ, 2007) ซึ่งการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจะทำให้ต้นทุนการผลิตเอนไซม์สูง

การศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่า $MgSO_4 7H_2O$ และ $FeSO_4.7H_2O$ ช่วยเพิ่มผลผลิตเอนไซม์โดย $MgSO_4.7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด 1.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับอินูลิเนสที่ผลิตได้จาก *A. ficuum* ที่ต้องการ Mg^{2+} ในการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ (Jing และคณะ, 2003) แต่ในทางตรงข้าม Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1.0 mM มีผลยับยั้งการผลิตอินูลิเนสจาก *C. aureus* G7a และ *P. guilliermondii* strain 1 (Sheng และคณะ, 2008a; Gong และคณะ, 2008) สำหรับ $FeSO_4.7H_2O$ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับอินูลิเนสที่ผลิตได้จาก *K. marxianus* ที่พบว่า Fe^{2+} ช่วยเพิ่มการผลิตอินูลิเนส (Rouwenhorst และคณะ, 1999; Singh และคณะ, 2007) ในขณะที่ Fe^{2+} จะยับยั้งการผลิตอินูลิเนสของ *A. ficuum* JNSP5-06 (Chen และคณะ, 2009)

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ต่อการผลิตอินูลิเนส พบว่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ 8.0 ซึ่งใกล้เคียงกับ *Streptomyces* sp. GNDU1 ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 (Gill และคณะ, 2003) ซึ่งจัดว่าดีกว่า *A. ficuum* JNSP5-06, *A. fumigatus* และ *K. marxianus* YS-1 ที่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกรด

(Jing และคณะ, 2003; Gill และคณะ, 2006; Singh และ Bhermi, 2008) ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะค่าความเป็นกรดด่างเป็นกรดจะทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการสร้างถังหมักที่ทนต่อกรด *Streptomyces* sp. CP01 มีอุณหภูมิเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ คือ 28 องศาเซลเซียส ขณะที่ *Streptomyces* sp. GNDU1 และ *Streptomyces* sp มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์เท่ากับ 46 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Gill และคณะ, 2003; Sharma และคณะ, 2007) ดังนั้น *Streptomyces* sp. CP01 จึงจัดเป็นเชื้อที่ผลิตอินูลิเนสที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม *Streptomyces* ด้วยกันโดยให้ผลผลิตสูงกว่าและสามารถเลี้ยงเชื้อได้ที่อุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้องทำให้ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการให้ความร้อนเพื่อควบคุมอุณหภูมิขณะเลี้ยงเชื้อ เมื่อศึกษาระยะเวลาในการบ่มเชื้อเพื่อผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่าให้แอคติวิตีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 วัน ซึ่งคล้ายกับ *Streptomyces* sp. GNDU1 (Gill และคณะ, 2003) และ *Streptomyces* sp. (Sharma และคณะ, 2007) ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. fumigatus* และ *K. marxianus var. bulgaricus* ที่ใช้เวลาในการบ่ม 3 วัน (Gill และคณะ, 2006; Paula และคณะ, 2008) ส่วน *A. ficuum* JNSP5-06 ใช้เวลาในการบ่ม 5 วัน (Jing และคณะ, 2003)

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากันกับอินูลิเนสจาก *K. fragilis* (Pandey และคณะ, 1999), *K. marxianus* (Rouwenhost และคณะ, 1999) และ *K. marxianus var. bulgaricus* (Kushi และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกันโดยอยู่ในช่วง 40 – 60 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 5.1 ส่วนผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 6.0 ซึ่งจัดว่าเป็นภาวะที่ไม่รุนแรงนักซึ่งเท่ากันกับอินูลิเนสจาก *A. fumigatus* (Gill และคณะ, 2006) และ *Streptomyces* sp. (Sharma และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานค่อนข้างเป็นกรดดังตารางที่ 5.1

อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส แต่ก็ยังต่ำกว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. ที่รายงานโดย Sharma และคณะ (2006) และ *Streptomyces* sp. GNDU1 (Gill และคณะ, 2003) ซึ่งเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 70 และ 80 องศาเซลเซียสตามลำดับแต่ก็จัดว่าสูงกว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่นๆอีกหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 5.1 ส่วนความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างพบว่ามีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงที่กว้างกว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นจึงจัดว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 น่าจะมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 5.1 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. CP01	6.0	5.0-9.0	55	55 องศาเซลเซียส, 30 นาที	1.60	งานวิจัยนี้
Aspergillus fumigatus	6.0	4.0 – 7.0	60	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	-	Gill และคณะ, 2006
Cryptococcus aureus G7a	5	4.5 - 6.5	50	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	85.0	Sheng และคณะ, 2008a
Kluyveromyces fragilis	4.75	4.5 – 6.0	55	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง	-	Pandey และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus	4.4	4.5 – 6.0	55	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง	-	Rouwenhost และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus	4.75	4.5 – 6.0	55	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง	107.0	Kushi และคณะ, 2000

67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Kluyveromyces sp.Y-85	5.5	-	50	-	59.5	Wei และคณะ, 1998
Kluyveromyces marxianus YS-1	5.5	4.5 – 6.5	50	50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	55.4	Singh และคณะ, 2008
Streptomyces sp.	6.0	-	60	70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	0.524	Sharma และคณะ, 2006
Streptomyces sp. GNDU1	5.5	-	60	80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	0.552	Gill และคณะ, 2006
Streptomyces grisenus	7.0	6.0 – 9.0	40	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง	-	Tohamy, 2006

หมายเหตุ : - หมายถึง ยังไม่ระบุ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

68

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ฉวีวรรณ ปันคำ. 2550. การจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยวิธีลายพิมพ์ 16s-ITS RFLP วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิมิตร วรสูตร และ สนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน: สารสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน. แก่นเกษตร. 34:85-91.

ภาษาอังกฤษ

Andres, C., 1987. Fructose sweetener of choice. Food Processing. 12: 27-28.

Anil, K.G., Narinder, K., and Rangil, S. 1989. Fructose and inulinase production from waste *Cichorium intybus* roots. Biology. 29: 73-77.

Anisha, G.S., Rojan, P.J., Nicemol, J., Niladev, K.N., and Prema, I.P. 2008. Production and characterization of partially purified thermostable α-galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications. Food Chemistry. 111: 631–635.

Ayyachamy, M., Khelawan, K., Pillay, D., Permual, K., and Singh, S. 2007. Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *Phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. Letters in Applied Microbiology. 45: 439-444.

Barranco-Florida, E., Garcia-Garibay, M., Go ́mez-Ruiz, L., and Azaola, A. 2001. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. Process Biochemistry. 37: 513-519.

Barthomeuf, C., Regerat, F., and Pourrat, H. 1991. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 72: 491-494.

Bender, J., Mazutti, A.M., Luccio, D.M., and Treichel, H. 2008. Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugar cane bagasse by *Kluyveromyces*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

marxianus NRRLY-7571. Applied Biochemistry and Biotechnology.149: 195–203.

Bernardo, O., Yepez, S., Attilio, C., and Francisco, M. 2008. Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 152: 249-261.

Bernfeld, P. 1955. Amylases. In: Methods in Enzymology (eds.Colowick, P.S. and Kaplan, O.N.), vol. 1: 149-158. Academic Press, New York.

Bucke, C. 1977. Industrial glucose isomerase in enzyme and fermentation biotechnology, p. 147-171. Wiseman, A. (ed.), Jonh Wiley & Sons Inc., New York.

Chen, G., Sun, Z., Wang, Y., and Qian, X. 1997. Purification and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. Wei Sheng Wu Xue Bao. 37: 362-367.

Chen, X., Wang, J., and Li, D. 2007. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. Journal of Biochemical Engineering. 34: 179-184.

Cruz-Guerrero. AE., Olvera, JL., Garcia-Garibay, M., and Gomez-Ruiz, L. 2006. Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (*Agave* sap) and pulque. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22: 115 -117.

Dische, Z., and Borenfreund, E. 1951. A new spectrophotometric method for the detection of keto sugar trioses. The Journal of Biological Chemistry. 192: 583-587.

Durieux, A., Fougnies, C., Jacobs, H., and Simon, J.P. 2001. Metabolism of chicory fructooligosaccharides by *Bifidobacteria*. Biotechnology Letters. 23: 1523-1527.

Duvniak, Z., Turcotte, G., and Duan, Z.D. 1991. Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem artichoke by *Saccharomices cerevisiae* ATCC 36859. Applied Microbiology and Biotechnology. 35: 711–715.

Efstathiou, I., Reysset, G., and Truffaut, N., 1986. A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8. Applied Microbiology and Biotechnology. 25: 143-149.

Ferreira, M. S. S., DE Andrade, A. V. M., and Kennedy J. F. 1991. Properties of a thermostable nonspecific fructofuranosidase produced *by Cladosporium Cladosporioides* cells for hydrolysis of Jerusalem Artichoke extract. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1: 1-9.

Fuchs, A., 1992. Utilization of Inulin. Internal Report, Wageningen Agricultural University, The Netherland.

Gandini, A., 1990. Polymers and oligomers containing furan rings. Agricultural and Synthetic Polymers. 433: 195–208.

Gupta, A., Gill, A., Kaur, N., and Singh, R. 1994. High thermal stability of inulinases from *Aspergillus* species. Biotechnology Letters. 16: 733-734.

Gill, P.K., Sharma, A.D., Harchand, R.K., and Singh, P. 2003. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. Bioresource Technology. 87: 359-362.

Gill, P.K., Manhas, R.K., and Singh, P. 2006. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform *Aspergillus fumigatus*. Bioresource Technology. 97: 894-902.

Guillermo, R.C., Mario, D.B., and Faustini, S. 1995. A plate technique for screening of inulin degrading microorganism. Journal of Microbiology Methods. 22: 51-56.

Gao, W., Bo, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., and An, L. 2008. Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. Applied Biochemistry and Biotechnology. 157: 498-506.

Gong, F., Sheng, J., Chi, Z.M., and Li, J. 2007. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34: 179-185.

Gong, F., Chi, Z.M., Sheng, J., Li, J., and Wang, X.H. 2008. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 13: 533-539.

Gao, L.M., Chi, Z.M., Sheng, J., Ni, X.M., and Wang, L. 2007a. Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. Applied Microbiology and

Biotechnology. 77: 825-832.

Gao, L.M., Chi, Z.M., Sheng, J., Wang, L., Li, J., and Gong, F. 2007b. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes. Microbial Ecology. 54: 722-729.

GrootWassink, J.W.D., and Fleming, S.E. 1980. Non-specific β-fructofuranosidase (inulinase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentations, simple recovery method and some industrial properties. Enzyme and Microbial Technology. 2: 45-53.

Guo, N., Gong, F., Chi, Z.M., Sheng, J., and Li, J. 2009. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 38: 499-507.

Hayakawa, M., and Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. Journal of Fermentation Technology. 65: 501-509.

Hendry, G.A. 1987. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. The New Phytologist. 106: 201-216.

Heuvel, E.G.H.M., Schoterman, M.H.C., and Muijis, T. 2000. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal woman. The Journal of Applied Nutrition. 130: 2938-2942.

Jing, W., Zhengyu, J., Bo, J., and Augustine, A. 2003. Production and separation of exo and endoinulinase from *Aspergliius ficuum*. Process Biochemistry. 39: 5-11.

Kang, S.I., Chang, Y.J., Oh, S.J., and Kim, S.I. 1998. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. Biotechnology Letters. 20: 983-986.

Kango, N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum offcinale*) by *Aspergillus niger*. Journal of Food Process Engineering. 85: 473-478.

Kaur, N., and Gupta, A.K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Journal of Biosciences. 27: 703–711.

Kim, C.H., and Rhee, S.K., 1989. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chin. Biotechnology Letters. 2: 201-206.

Kim, D.H., Choi, Y.J., Song, S.K., and Yun, J.W. 1997. Production of inulooligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. Biotechnology Letters. 19: 369-371.

Kim, H.S., Lee, D.W., Ryu, E.J., Uhm, T.B., Yang, M.S., Kim, J.B., and Chae, K.S. 1999. Expression of the *INU2* gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters. 21: 621-623.

Kim, H.C., Kim, H.J., Choi, W.B., and Nam, S.W. 2006. Inulooligosaccharide production from inulin by *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface endoinulinase. Journal of Microbiology and Biotechnology. 16: 360-367.

Kim, K.Y., Nascimento, A.S., Goulubev, A.M., Polikarpov, I., Kim C.S., Kang, S.I., and Kim, S.I. 2008. Catalytic mechanism of inulinase from *Arthrobacter* sp. S37. Biochemical and Biophysical Research Communications. 371: 600–605.

Kochhar, A., Gupta, A.K., and Kaur, N. 1999. Purification and immobilisation of inulinase From *Aspergillus candidus* for producing fructose. Journal of The Science of Food and Agriculture. 79: 549-554.

Kochhar, A., Kaur, N., and Gupta, A.K. 1997. Inulinase from *Aspergillus versicolor* a potent enzyme for producing fructose from inulin. Journal of Scientific and Industrial Research. 56: 721-726.

Kumiko, K., Toshihiro, A., and Tae, K. 1999. Purification and properties of a thermostable inulinase (β-D-fructan fructanohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. Strain. 51: 253-258.

Kusshi, R.T., Monti, R., and Contiero. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var*.bulgaricus.* Journal of Industrail Microbiology and Biotechnology. 25: 63-69.

Kwon, H.J., Jeon, S.J., You, D.J., Kim, K.H., Jeong, Y.K., Kim, Y.H., Kim, Y.M., and Kim, B.W., 2003. Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa*. Biotechnology Letters. 25: 155-159.

Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F. and Fan, Z. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from jerusalem artichoke tubers. Journal of Food Process Engineering. 79: 1087-1093.

Lo' pez-Molina, D., Navarro-Martinez, M.D., Melgarejo, F.R., Hiner, A.N.P., Chazarra, S., and Rodriguez-Lo'pez, J.N. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynarascolymus* L.). Phytochemistry Letters. 66: 1476-1484.

Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H., and Luccio, M.D. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme and Microbial Technology. 39: 56-59.

Mukherjee, K., and Sengupta, S. 1987. Purification and properties of a non-specific β-fructofuranosidase (inulinase) from the mushroom *Panaeolus papillonaceus*. Canadian Journal of Microbiology. 33: 520-524.

Nagem, R. A. P., Rojas, A. L., Golubev A. M., Korneeva, O. S., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Neustroev, K. N., and Polikarpov, I. 2004. Crystal Structure of Exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The Enzyme Fold and Structural Determinants of Substrate Recognition. Journal of Molecular Biology. 344: 471–480.

Nakamura, T., Ogata, Y., Shitara, A., Nakamura, A. and Ohta, K. 1995. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. Journal of Fermentation and Bioengineering. 80: 164-169.

Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M., and Ohta, K. 1997. Production and purification, properties of an endo-inulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. Journal of Fermentation Bioengineering. 84: 313-318.

Negoro, H., and Kito, E. 1973. β-fructofuranosidase from *Candida kefyr*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 51: 96-102.

Ni, X.M., Yue, L.X., Chi, Z.M., Li, J., Wang, X.H., and Madzak, C. 2009. Alkaline protease gene cloning from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* HN2-3 and the protease surface display on *Yarrowia lipolytica* for bioactive peptide production. Marine Biology. 11: 81-89.

Ninawe, S., Kapoor, M., and Kuhad, C.R. 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. Bioresource Technology. 99: 1252–1258.

Ohta, K., Suetsugu, N., and Nakamueca, T. 2002. Purification and Properties of an Extracellular Inulinase from *Rhizopus* sp. Strain TN-96. Journal of Bioscience and Bioengineering. 94: 78-80.

Pandey, A., Soccol C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N., and Fontana, J.D. 1999. Recent developements in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. Applied Biochemistry and Biotechnology. 81: 35-52.

Parekh, S., and Margaritis, A. 1985. Inulinase production by *K. marxianus* in batch culture. Applied Microbiology and Biotechnology. 22: 446-448.

Paula, F.C., Cazetta, M.L., Monti, R., and Contiero, J. 2008. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Food Chemistry .111: 691–695.

Pessoni, R.A., Braga, M.R., and Figueiredo-Ribeiro Rde C. 2007. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. Mycologia. 99: 493-503.

Remize, F., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P., Dequin, S., and Blondin, B. 1998. Construction of a flocculating yeast for fructose production from inulin. Biotechnology Letters. 20: 313-318.

Rocha, J.R., Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. 2006. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chemistry. 95: 77-82.

Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., Vander Baan, A.A., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. 1988. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied and Environmental Microbiology. 54: 1131-1137.

Rowland, I.R., Rumney, C.J., Coutts, J.T., and Lievense, L.C. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rat. Carcinogenesis. 19: 281-285.

Rumessen, J.J., Bode, S., Hamberg, O., and Hoyer, E.G. 1990. Fructans of Jerusalem artichoke: intestinal transport, absorption, fermentation and influence on blood glucose, insulin and C-peptide responses in healthy subjects. The American Journal of Clinical Nutrition. 52: 675–680.

Sanchez, O.J., and Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology. 99: 5270-5295.

Selvakumar, P., and Pandey, A. 1999. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry. 34: 851–855.

Silva-Santisteban, Y.B.O., and Filho, F.M. 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. Enzyme and Microbial Technology. 36: 717-724.

Singh, R.S., Dhaliwal, R., and Puri, M. 2006. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. Process Biochemistry. 41: 1703-1707.

Singh, R.S., Sooch, B.S., and Puri, M. 2007. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresource Technology. 98: 2518-2525.

Singh, R.S., and Bhermi, H.K. 2008. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*. Bioresource Technology. 99: 7418-7423.

Sirisansaneeyakul, S., Jitbanjongkit, S., Prasomsart, N., and Luangpituksa, P. 2000. Production of β-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. The Kasetsart Journal. 34: 378-386.

Sirisansaneeyakul, S., Worawuthiyanan, N., Vanichsriratana, W., Srinophakun, P., and Chisti, Y. 2008. Production of fructose from inulin using mixed inulinase from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 543-552.

Sharma, A.D., Kainth, S., and Gill, P.K. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. Journal of food Process Engineering. 77: 486-491.

Sharma, A.D., and Gill, P.K. 2007. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. Journal of Food Process Engineering. 79: 1172-1178.

Shehalata, H., Bhosale, M.B.R., and Vasanti, V.D. 1996. Molecular and industral aspects of glucose isomerase. Microbiological Reviews. 60: 280-300.

Sheng, J., Chi, Z.M., Li, J., Gao, L.M., and Gong, F. 2007. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. Process Biochemistry. 42: 805-811.

Sheng, J., Chi, Z.M., Li, J., Wang, X.H., Yan, K.R., and Gong, F. 2008a. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin. Bioprocess and Biosystem Engineering. 32: 333-339.

Sheng, J., Chi, Z.M., Li, J., and Gong, F. 2008b. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. Applied Biochemistry and Biotechnology. 144: 111-121.

Skowronek, M., and Fiedurek, J. 2006. Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology. 38: 162–167.

Speck, J.C. 1958. The lobry de bruyn-alberda van ekenstein transformation. Advances in Carbohydrate Chemistry. 13: 63-103.

Synder, H.E., and Phaff, H.J. 1960. Studies on a beta-fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. Antonie van Leeuwenhoek. 26: 433-452.

Szambelan, K., Nowak, J., and Czarnecki, Z. 2004. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. Biotechnology Letters. 26: 845-848.

Vandamme, E.J., and Derycke, D.G. 1983. Microbial inulinase; fermentation process, properties and applications. Advances in Applied Microbiology. 29: 136-176.

Vranesic, D., Kurtanjek, Z., Santos, A.M.P., and Maugeri, F. 2002. "Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*". Food Technology and Biotechnology. 40: 67-73.

Wei, W., Zheng, Z., Liu, Y., and Zhu, Z. 1998. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling-up fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 86: 395-399.

Wei, W., Wang, S., Zhu, X., and Wan, W. 1999a. Isolation of mutant of *Kluyveromyces* sp. Y-85 resistant to catabolic repression. Journal of Bioscience and Bioengineering. 87: 816-818.

Wei, W., Wang, S., Zhu, X., and Wan, W. 1999b. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. Process Biochemistry. 34: 643-646.

Wenling, W., Zhonghui, Z., Yueying, L., and Xinsheng, Z. 1998b. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling-up fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 86: 395-399.

Wolfgang, W., and Sudzucker, A.G.M. 2004. Fructose In: Hubert. P. (Ed.) Electronic Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry seventhed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany.

Xiao, R., Tanida, M., and Takao, S. 1988. Inulinase from *Chrysosporium pannorum*. Journal of Fermentation and Technology. 66: 553-558.

Xiong, C., Jinhua,W., and Dongsheng, L. 2007. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal. 34: 179–184.

Yu, X.J., Guo,N., Chi, Z.M., Gong, F., Sheng, J., and Chi, Z.M. 2009. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. Biochemical Engineering Journal. 43: 266-271.

Yue, L.X., Chi, Z.M., Wang, L., Liu, J., Madzak, C., and Wang, X.H. 2008. Construction of a new plasmid for surface display on cells of *Yarrowia lipolytica*. Journal of Microbiological Methods. 72: 116-123.

Yun, J.W., Kim, D.H., Uhm, T.B., and Song, S.K. 1997. Production of high content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase. Biotechnology Letters. 19: 935-938.

Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y., and Wang, Y. 2004. Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. 35: 272-275.

Zhang, L., Zhao, S., Ohta, Y.W., and Wang, Y. 2005. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris*. Process Biochemistry. 40: 1541-1545

Zhang, T., Gong, F., Chi, Z., Liu, G.L., Chi, Z.M., Sheng, J., Li, J., and Wang, X.H. 2009. Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia patoris*. Antonie van Leeuwenhoek. 95: 13-22.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria-Bertani broth, Lysogeny broth (LB)

แบคโททริปโทน (Bacto tryptone)	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 สำหรับ อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็งแมนนิทอล (Manitol Soybean Agar medium, MS medium)

แมนนิทอล	20	กรัม
ถั่วเขียวบด (Mung bean)	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	500	มิลลิลิตร
น้ำประปา (Tap water)	500	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็งข้าวโอ๊ต (Oatmeal Agar)

Oatmeal	60	กรัม
วุ้นผง (Agar)	12.5	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1000	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตอินูลิเนส (Basal medium)(Sharma และ Gill, 2007)

โซเดียมไนเตรท (NaNO$_3$)	0.3	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K$_2$HPO$_4$)	0.1	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO$_4$.7H$_2$O)	0.05	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO$_4$.7H$_2$O)	0.001	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดอินนูลิน (Inulin extract)	1.0	เปอร์เซ็นต์
วุ้นผง*(Agar)	1.5	เปอร์เซ็นต์

*หมายเหตุ อาหารเหลวไม่ต้องใส่

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตอินูลิเนสซึ่งปรับปรุงแล้ว

แบคโตทริปโทน (Bacto tryptone)	0.7	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K$_2$HPO$_4$)	0.1	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO$_4$.7H$_2$O)	0.25	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO$_4$.7H$_2$O)	0.001	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดอินนูลิน (Inulin extract)	1.0	เปอร์เซ็นต์
วุ้นผง*(Agar)	1.5	เปอร์เซ็นต์

*หมายเหตุ อาหารเหลวไม่ต้องใส่

ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. อาหารแข็งฮิวมิกแอซิดวิตามิน (Humic acid vitamin agar)

กรดฮิวมิก (Humic acid)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		
วิตามินบี (B-Vitamins) ประกอบด้วย		
- ไทเอมีน ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
- ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.5	มิลลิกรัม
- ไพริดอกซิน ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxin-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
- แคลเซียม แพนโททะเนต (Calcium pantotanate)	0.5	มิลลิกรัม
- อิโนซิทอล (Inositol)	0.5	มิลลิกรัม
- กรดอะมิโนเบนโซอิก (ρ-aminobenzoic acid)	0.5	มิลลิกรัม
- ไบโอติน (Biotin)	0.25	มิลลิกรัม
ไซโคลเฮกซามีด (Cyclohexamide)	50.0	มิลลิกรัม

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

<u>หมายเหตุ</u>

- ละลายกรดฮิวมิก ในสารละลาย 0.2N NaOH ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง
- วิตามินบี (B-Vitamins) และไซโคลเฮกซามีด (Cyclohexamide) ฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรอง จากนั้นเติมลงไปในอาหารภายหลังการฆ่าเชื้อมาตรฐาน

7. อาหารแข็งเบนเนต (Bennett agar medium)

กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
เพบโทน (Peptone)	2.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.0	กรัม
ไซโคลเฮกซามีด (Cyclohexamide)	50.0	มิลลิกรัม
วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	กรัม

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1.1 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid)

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid)	1	กรัม
2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (2M NaOH)	20	มิลลิลิตร
โปแตสเซียมทาร์เทรท($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)	30	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	50	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

ละลาย 0.16 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.09 กรัม ของกรดไดไนโตรซาลิไซลิกและกวนจนกว่าจะละลายหมด จากนั้นเติมโปแตสเซียมทาร์เทรท ($C_4H_4KNaO_6$) 2.82 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายโซเดียมแอซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายโซเดียมแอซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ ได้แก่ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 โดยละลายโซเดียมแอซีเตต 1.21 2.91 5.07 6.94 และ 7.76 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างตามต้องการด้วยกรดแอซีติก และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายโซเดียมแอซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 6.5 และ 7.0 โดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.87 4.60 และ 8.55 กรัม

และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.42 8.11 และ 4.77 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร. ปรับค่าความเป็นกรดด่างตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 8.5 และ 9.0 โดยละลายทริส-เบส 12.1 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร. ปรับค่าความเป็นกรดด่างตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA **ของ** *Streptomyces* sp.CP01

```
Length: 1370
     1  GGGGATTAGT GGCGAACGGG TGAGTAACAC GTGGGCAATC TGCCCTTCAC
    51  TCTGGGACAA GCCCTGGAAA CGGGGTCTAA TACCGGATAC CACTACCGCA
   101  GGCATCTGTG GTGGTTGAAA GCTCCGGCGG TGAAGGATGA GCCCGCGGCC
   151  TATCAGCTTG TTGGTGAGGT AACGGCTCAC CAAGGCGACG ACGGGTAGCC
   201  GGCCTGAGAG GGCGACCGGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC
   251  CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA CAATGGGCGA AAGCCTGATG
   301  CAGCGACGCC GCGTGAGGGA TGACGGCCTT CGGGTTGTAA ACCTCTTTCA
   351  GCAGGGAAGA AGCGAAAGTG ACGGTACCTG CAGAAGAAGC GCCGGCTAAC
   401  TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG GCGCAAGCGT TGTCCGGAAT
   451  TATTGGGCGT AAAGAGCTCG TAGGCGGCTT GTCACGTCGG GTGTGAAAGC
   501  CCGGGGCTTA ACCCCGGGTC TGCATTCGAT ACGGGCTAGC TAGAGTGTGG
   551  TAGGGGAGAT CGGAATTCCT GGTGTAGCGG TGAAATGCGC AGATATCAGG
   601  AGGAACACCG GTGGCGAAGG CGGATCTCTG GGCCATTACT GACGCTGAGG
   651  AGCGAAAGCG TGGGGAGCGA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC
   701  GTAAACGGTG GGAACTAGGT GTTGGCGACA TTCCACGTCG TCGGTGCCGC
   751  AGCTAACGCA TTAAGTTCCC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGCTAAAA
   801  CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CAGCGGAGCA TGTGGCTTAA
   851  TTCGACGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAAGG CTTGACATAC ACCGGAAACG
   901  GCCAGAGATG GTCGCCCCCT TGTGGTCGGT GTACAGGTGG TGCATGGCTG
   951  TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA
  1001  CCCTTGTCCT GTGTTGCCAG CATGCCCTTC GGGGTGATGG GGACTCACAG
  1051  GAGACCGCCG GGGTCAACTC GGAGGAAGGT GGGGACGACG TCAAGTCATC
  1101  ATGCCCCTTA TGTCTTGGGC TGCACACGTG CTACAATGGC AGGTACAATG
  1151  AGCTGCGAAA CCGTGAGGTG GAGCGAATCT CAAAAAGCCT GTCTCAGTTC
  1201  GGATTGGGGT CTGCAACTCG ACCCCATGAA GTCGGAGTTG CTAGTAATCG
  1251  CAGATCAGCA TTGCTGCGGT GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC
  1301  CCGTCACGTC ACGAAAGTCG GTAACACCCG AAGCCGGTGG CCCAACCCCT
  1351  TGTGGGAGGG AGCTGTCGAA
```

หมายเหตุ

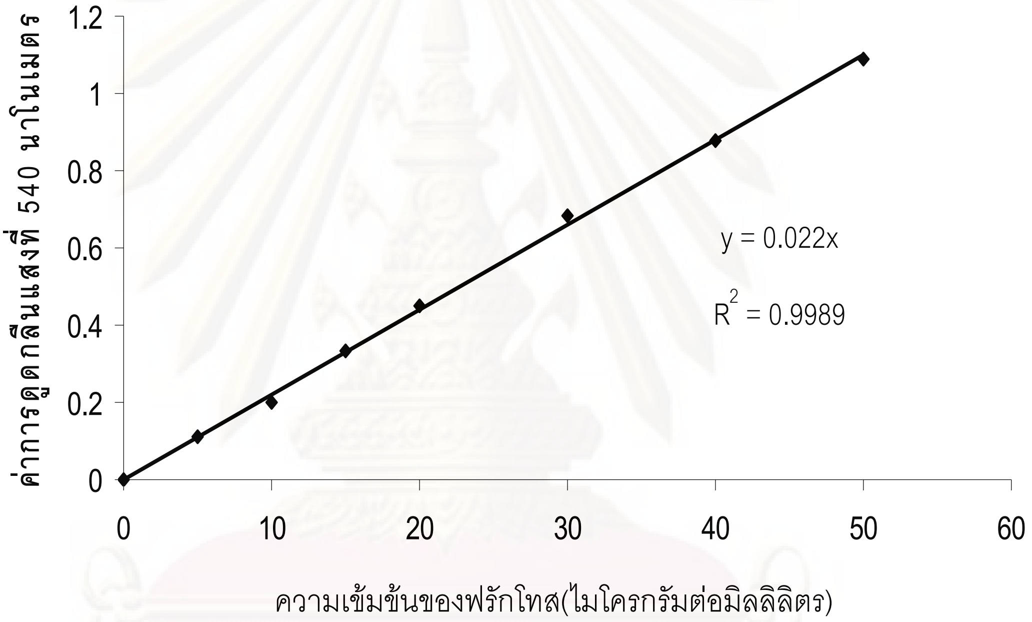
1. คู่ primer ที่ใช้ amplify 16s rDNA จาก genomic DNA คือ
   STR1F (5’-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3’)
   STR1530R (5’-AAGGAGATCCAGCCGCA-3’)
2. คู่ primer ที่ใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก PCR product คือ คู่ primer ในข้อ 1 และคู่ primer ที่ใช้ anneal กลางสาย คือ ATT025 (5’-TTAGATACCCTGGTAGTCCA-3’) และ ATT026 (5’-TGGACTACCAGGGTATCTAATC-3’)

ภาคผนวก ง

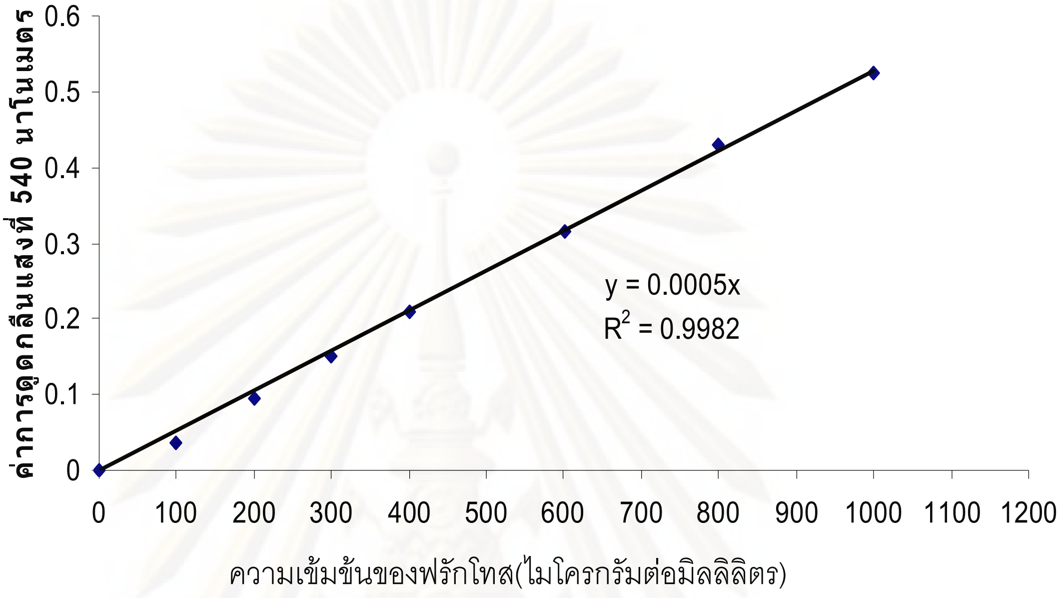
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาล

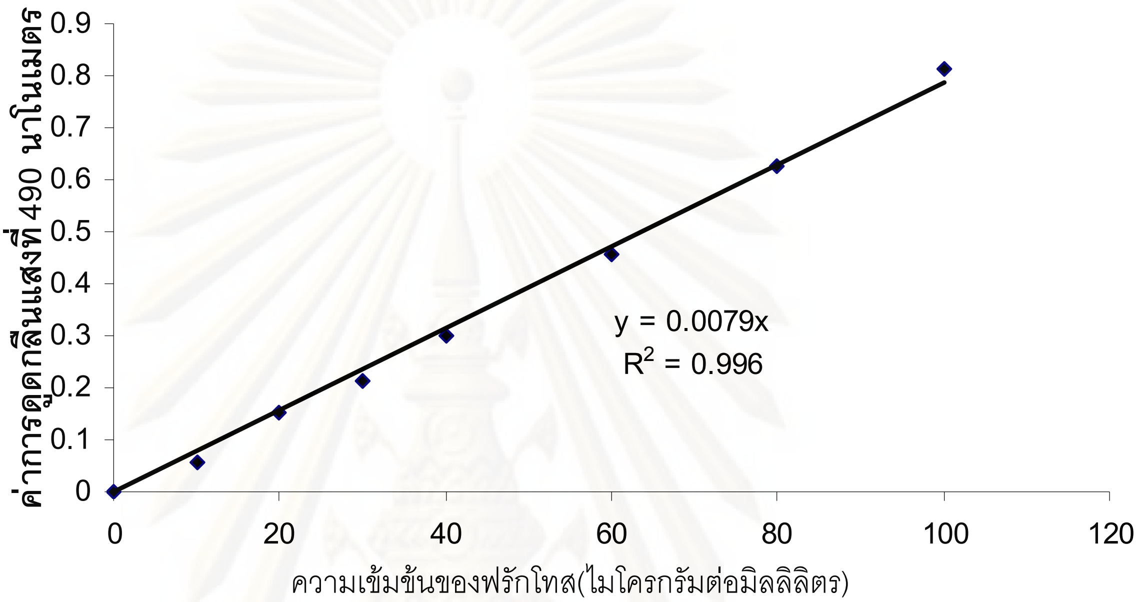
1.1 กราฟมาตรฐานอินนูลินความเข้มข้น 0 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวิธี cysteine carbazole sulfuric acid (Dische และ Borenfreund, 1951)



1.2 กราฟมาตรฐานของฟรักโทสความเข้มข้น 0 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวิธี DNS method (Miller และคณะ, 1959)



1.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดของฟรักโทสความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวิธี Phenol Sulfuric Method (Dubois และคณะ, 1956)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรุ่งตระการ จันทนพันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 8 เมษายน พ.ศ. 2528 ที่ จังหวัดพิษณุโลก ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 411/9 ถ.มหาจักรพรรดิ์ ต. ในเมือง อ.เมือง จ. พิษณุโลก 65000

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. Rungtrakarn Chantanaphan and Pairoh Pinphanichakarn. Inulinase from *Streptomyces* sp. CP01 Isolated from Thai soil. Procedding in the 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development Conference (TISD2010) March 4-6, 2010. Royal Mae Khong, Nhong Kai, Thailand. P. 399-404. (oral presentation) (Full text in CD-ROM)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย