การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01

นางสาวนิโรบล เหลากลม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF INULINASE FROM *Streptomyces* sp. CP01

Miss Nirobol Laowklom

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01
โดย	นางสาวนิโรบล เหลากลม
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)

นิโรบล เหลากลม : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF INULINASE FROM *Streptomyces* sp. CP01)
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 120 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีอินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้ม 40-80 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีสี่ขั้นตอน คือแมคโคร-เพรบดีอีเออี เซฟาคริลเอส-200เอชอาร์ ที-บิวทิลไฮโดรโฟบิคอินเตอร์แอคชัน และไฮดรอกซีอะปาไทต์ ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 67 เท่า จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันพบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 กิโลดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันคือ 70.8 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติของอินูลิเนสบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 55 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 6.0-9.0 เป็นเวลา 30 นาที จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอินนูลินโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางพบว่าเอนไซม์นี้เป็นเอนโดอินูลิเนส สำหรับ ค่า K_m ต่ออินนูลินและซูโครส เท่ากับ 2.36 และ 40 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และค่า V_{max} ต่ออินนูลินและซูโครส เท่ากับ 440 และ 12.3 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสารดัดแปลงกรดอะมิโน ได้แก่ เอ็น-โบรโมซัคซินิไมด์และไอโอโดอะเซตะไมด์มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ แสดงว่ากรดอะมิโนทริปโตเฟนและซีสเทอีนน่าจะเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site ของเอนไซม์

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2554

5172341323 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: INULINASE / *Streptomyces* sp. CP01

NIROBOL LAOWKLOM : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF INULINASE FROM *Streptomyces* sp. CP01. ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 120 pp.

Inulinase was purified from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. CP01 grown in liquid medium containing inulin extract from Jerusalem artichoke as a carbon source. The enzyme was purified to approximately 67 fold-purity by fractionation with 40-80% saturation of ammonium sulfate followed by four consecutive column chromatography steps on Macro-prep DEAE, Sephacryl S-200, t-butyl hydrophobic interaction and hydroxyapatite, respectively. The apparent molecular weight of the purified enzyme was 73 kDa as estimated by gel filtration and 70.8 kDa estimated by SDS-PAGE. The purified enzyme is optimally active at 55 °C and pH 6.0. It is stable at temperature up to 50 °C and at a broad range of pH from 6.0-9.0 after 30 min. Analysis of inulin hydrolysis-products by thin layer chromatography indicated that this enzyme is endoinulinase. Its K_m values for inulin and sucrose were 2.36 and 40 mM, respectively, and its V_{max} values are 440 and 12.3 mM/min/mg, respectively. When the enzyme was treated with N-bromosuccinimide and iodoacetamide, amino acid modifying agents, its activity was reduced indicating tryptophan and cystein may involve in the active site of the enzyme.

Department Microbiology Student's Signature.....

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

Academic Year 2011

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

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

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกต่างๆ แก่ผู้วิจัย รวมถึงอาจารย์ทุกท่านที่ผ่านมาในชีวิต ที่ได้อบรมสั่งสอนมาจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 3 ประจำปีงบประมาณ 2553 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่าง ๆ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณพี่กัลกิยา ชนิตรนันต์ พี่รุ่งตระการ จันทนพันธ์ คุณสุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์ ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดมา และขอขอบคุณ พี่วรรษมน นิลสันเทียะ พี่สุกัญญา เกิดสุข พี่ณฤดี อัศวเสรีเลิศ นางสาวดาริกา ลาสุดตา และนางสาวสุธาสินี จิตติมณี ที่ร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมาตลอด รวมทั้งให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย น้องสาว คุณน้า และญาติ ๆ ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ .....ช
สารบัญตาราง .....ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
บทที่
1. บทนำ 1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม 5
2.1 อินูลิเนส.....5
2.2 ประโยชน์ของอินูลิเนส.....7
2.3 แหล่งของอินูลิเนส.....9
2.4 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์.....11
2.5 น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส.....15
2.6 สมบัติของอินูลิเนส.....16
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง 25
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....25
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....26
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....29
3.3.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 และการเตรียมอินูลิเนส.....29
3.3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส.....32
3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน.....33
3.3.4 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์.....33
3.3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอินูลิเนส โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจล อีเลคโทรโฟริซิส.....37
3.3.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส.....38
3.3.7 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01.....39
4. ผลการทดลอง 43
4.1 การสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน.....43

หน้า

4.2 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 และการเตรียมอินูลิเนส.....43
4.3 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์.....44
4.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส.....57
4.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส.....58
4.6 สมบัติของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01.....64
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 78
รายการอ้างอิง 91
ภาคผนวก 103
ภาคผนวก ก 104
ภาคผนวก ข 106
ภาคผนวก ค 114
ภาคผนวก ง 118
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 120

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างอินูลิเนส..... 9
2.2 น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ 15
2.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ 16
2.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.. 18
2.5 ค่าความจำเพาะ (K_m) ของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่อสับเสตรทชนิดต่างๆ..... 19
2.6 ชนิดของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ..... 21
2.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ..... 23
4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนอินูลิเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ..... 45
4.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์..... 56
4.3 การตรวจสอบความจำเพาะของอินูลิเนสและอินเวอร์เทส..... 69
4.4 ค่าความจำเพาะต่อสับเสตรท (K_m) ของอินูลิเนส..... 72
4.5 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอินูลิเนส..... 75
4.6 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอินูลิเนส..... 76
4.7 ลักษณะสมบัติของอินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CP01..... 77
5.1 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ..... 80
5.2 สมบัติของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ..... 83
5.3 เปรียบเทียบค่า K_m และ V_{max} ของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ..... 86
5.4 ผลของอิออนโลหะและสารดัดแปลงหมู่อะมิโนต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ..... 89

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของอินนูลิน……..	5
2.2	กลไกการไฮโดรไลซ์อินนูลินของเอนโดอินูลิเนสและเอกโซอินูลิเนส……	6
4.1	การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ชะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5……...	48
4.2	การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ (Sephacryl S-200 HR) ชะโปรตีนด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0……	50
4.3	การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน ชะโปรตีนด้วย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 และเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์……	52
4.4	การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยโดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ ชะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่ความเข้มข้น .002-0.50 โมลาร์……	54
4.5	สรุปขั้นตอนการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์.....	55
4.6	การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิสของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ.....	57
4.7	การทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ของอินูลิเนสเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน.....	59
4.8	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์.....	60
4.9	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมล์เจล.....	62
4.10	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส.....	63

ภาพที่ หน้า

4.11 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส..... 64
4.12 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส..... 65
4.13 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที..... 67
4.14 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 90 นาที..... 67
4.15 ความเสถียรของอินูลิเนสต่อความเป็นกรดด่างเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที..... 68
4.16 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์อินนูลินด้วยอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 โดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่นบาง (Thin-Layer Chromatography)..... 71
4.17 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของอินูลิเนสต่ออินนูลิน..... 73
4.18 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของอินูลิเนสต่อซูโครส..... 73

บทที่ 1

บทนำ

ประวัติความเป็นมา

ฟรักโทส (fructose) มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ลีวูโลส (levulose) มีสูตรเคมี $C_6H_{12}O_6$ มีโครงสร้างได้ทั้งแบบเส้นตรง และแบบวงแหวน จัดเป็นน้ำตาลพื้นฐานจำพวกโมโนแซคาไรด์ที่พบในธรรมชาติและมีความหวานมากที่สุด โดยมีความหวานเป็น 1.3 เท่าของซูโครสและ 1.7 เท่าของกลูโคส ส่วนใหญ่จะพบมากในน้ำผึ้ง โดยเป็นองค์ประกอบถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และยังพบในผลไม้ที่มีรสหวาน เช่น มะม่วงสุก เบอร์รี่ เมลอน เป็นต้น (Bucke, 1981) นอกจากนี้ฟรักโทสยังมีสมบัติที่ดีทั้งทางกายภาพและทางเคมี คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และมีความดันออสโมติกสูง ทำให้สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดีและยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสได้โดยไม่เกิดการตกผลึก (Andres, 1987) ดังนั้นจึงนิยมใช้ฟรักโทสแทนซูโครสในอุตสาหกรรมอาหารและยา

นอกจากนี้ฟรักโทสยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ทำให้เกิดกระบวนการหมักแล้วได้เอทานอลในปริมาณสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล (Toran-Diaz และ คณะ, 1984) โดยเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนที่มีความสำคัญสำหรับเครื่องยนต์และได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นพลังงานที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดมลพิษแก่สิ่งแวดล้อม (Sanchez และ Cardona, 2008)

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสจากแป้ง ปัจจุบันใช้เอนไซม์หลายชนิดได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) กลูโคสไอโซเมอเรส (glucose isomerase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ซึ่งกลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส โดยให้ฟรักโทสที่ความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 42-45 เปอร์เซ็นต์ (Kochhar และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งได้แก่ อินูลิเนส (inulinase) ซึ่งเริ่มได้รับความสนใจสูงเพื่อนำมาใช้ผลิตฟรักโทสโดยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอินนูลิน โดยเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายอินนูลินโดยใช้ปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวให้ฟรักโทสได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็น (Kaur และคณะ, 1992, Pandey และคณะ, 1999)

อินนูลินเป็นพอลิฟรักแทนที่พบมากในพืชหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงของฟรักโทสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 2-1 (β-2,1 linkage) โดยมีโมเลกุลของซูโครสเชื่อมอยู่ปลายสาย (Vandamme และ Deryche, 1983) อินนูลินถูกสะสมอยู่ในหัวหรือรากของพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม กระเทียม รากต้นรักเร่ หัวชิกโครี่ (chicory root) และหัวของ Jerusalem artichoke เป็นต้น (Pandey และคณะ, 1999, Rocha และคณะ, 2006) Jerusalem artichoke หรือแก่นตะวัน มีอินนูลินสะสมอยู่ในรากสูงถึง 14-19 เปอร์เซ็นต์ เป็นพืชล้มลุกที่ปลูกง่ายจึงน่าจะเป็นแหล่งอินนูลินราคาถูก แก่นตะวันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus L.* ลักษณะดอกคล้ายบัวตอง มีถิ่นกำเนิดในแถบหนาวทวีปอเมริกาเหนือ สามารถปรับตัวได้ดีในเขตร้อน มีความแข็งแรงคงทน จึงใช้คำว่า “แก่น” และเป็นพืชที่ใกล้ชิดกับทานตะวัน จึงให้ชื่อพืชชนิดใหม่ว่า “แก่นตะวัน” มีการส่งเสริมการปลูกกับเกษตรกรทั่วไป (นิมิต วรสูตร และ สนั่น จอกลอย, 2542) เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสุขภาพ พืชสมุนไพรสัตว์และพืชพลังงานทดแทน

อินนูลิน อินนูโลโอลิโกแซคาไรด์ (inulooligosaccharides; IOSs) และ ฟรักโทโอลิโกแซคาไรด์ (fructooligosaccharides; FOSs) จัดเป็น functional food คือ อาหารที่มีสารอาหารซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกจากคุณค่าทางโภชนาการแล้วยังช่วยป้องกันโรค และรักษาโรคได้ คุณสมบัติที่ดีเหล่านี้ได้แก่ เป็นใยอาหาร ไม่ถูกย่อยในกระเพาะ ให้แคลอรี่ต่ำ ช่วยลดความอ้วน ไม่เพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด จึงไม่เป็นปัญหากับผู้เป็นโรคเบาหวาน ช่วยลดคลอเลสเทอรอลไตรกลีเซอไรด์และดีแอลดีในร่างกายจึงลดความเสี่ยงจากการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด อินนูลินยังเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) คือ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายกลุ่ม probiotic เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli เป็นต้น และสามารถลดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น Coliforms และ *E. Coli* เป็นต้น (Roberfroid , 2002, Kolida และคณะ, 2002, Lo'pez-Molina และคณะ, 2005) อินนูลินยังถูกใช้เป็นสารทดแทนไขมันในครีม สลัดครีม มูส เนยแข็งและไอศกรีม ผสมในโยเกิร์ต นมเปรี้ยว น้ำผลไม้ เพื่อเพิ่มใยอาหาร ใช้โอลิโกฟรุกโตส เป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลต เป็นต้น ในอุตสาหกรรมยาได้แก่ ผลิตภัณฑ์เสริมสารอาหารต่างๆ ช่วยให้การพัฒนาสูตรใหม่ๆ ดังนั้นในปัจจุบันอินนูลิน อินนูโลโอลิโกแซคาไรด์ และ ฟรักโทโอลิโกแซคาไรด์ จึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มและยา

การผลิตฟรักโทสจากการย่อยสลายอินนูลินสามารถทำได้โดยการย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมีได้แก่ การย่อยสลายด้วยกรด และวิธีทางชีวเคมี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

1. การย่อยสลายอินนูลินด้วยวิธีทางเคมี

การย่อยสลายอินนูลินด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยกรด (ความเป็นกรดด่าง 1.0-2.0 ที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส) เพื่อให้ได้ฟรักโทส เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเกิดสีเจือปนจากปฏิกิริยาและให้ผลผลิตอื่นที่ไม่ต้องการ เช่น ไดพรักโทสแอนไฮไดรด์ (difructose anhydride) ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความหวานลดลงจึงต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารเจือปนเหล่านี้ (Shehalata และคณะ, 1996)

2. การย่อยสลายอินนูลินด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายอินนูลินด้วยวิธีทางชีวเคมีโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้แก่ อินูลิเนส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายอินนูลินได้อย่างสมบูรณ์ในขั้นตอนเดียว ทำให้ได้ผลผลิตฟรักโทส 90-95 เปอร์เซ็นต์ (Gupta และคณะ, 1994; Vranesic และคณะ, 2002)

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ และสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น อาศัยในดินเค็ม ดินที่มีความเป็นกรด-ด่าง สูงเป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* สามารถผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น สารต่อต้านเชื้อรา (Lechevalier และคณะ, 1953) สารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย สารปฏิชีวนะ (Swan และคณะ, 1994) ใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดซึ่งมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จาก *Streptomyces* มีความจำเพาะต่อสับสเตรทและมีคุณสมบัติที่ดี เช่น เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอร์เรส (Chen และคณะ, 1979) บีตา-ไซโลซิเดส (Pinphanichakarn และคณะ, 2004) ไซแลนเนส (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) โปรตีเอส (Singh และคณะ, 2010) ไลเปส (Abramic และคณะ, 1999) เป็นต้น นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังสามารถผลิตอินูลิเนสได้ ซึ่งในปัจจุบันอินูลิเนสมีความสำคัญในอุตสากรรมการผลิตฟรักโทส ฟรักโทโอลิโกแซคาไรด์ และใช้ในการผลิตเอทานอลจากอินนูลิน (Sharma และ Gill, 2006)

สำหรับงานวิจัยที่ได้ดำเนินมาอย่างต่อเนื่องในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการคัดแยก *Streptomyces* จากดินที่ใช้เพาะปลูกพืชที่เป็นแหล่งสะสมของอินนูลิน พบว่า *Streptomyces* sp. CP01 ซึ่งแยกได้จากดินที่เพาะปลูกแก่นตะวัน สามารถผลิตอินูลิเนสได้ประมาณ 1.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวันเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจัดว่าสูงเมื่อเทียบกับรายงานการผลิตเอนไซม์นี้โดย *Streptomyces* ชนิดอื่นๆ ดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จะศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติต่างๆของเอนไซม์ที่ได้

วัตถุประสงค์

ทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติต่างๆของเอนไซม์ที่ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CP01 และทราบลักษณะสมบัติต่างๆของเอนไซม์ที่ได้

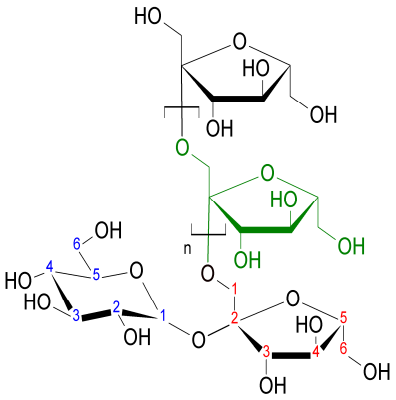
บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 **อินูลิเนส** (2,1-□-D fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7)

อินูลิเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะระหว่างน้ำตาลฟรักโทสในอินนูลินด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลฟรักโทส และอินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์ อินูลิเนสสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น อุตสาหกรรมผลิตฟรักโทส อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล และอุตสาหกรรมผลิตโอลิโกฟรักแทนจากอินนูลิน เป็นต้น (Sheng และคณะ, 2007)

อินนูลินเป็นกลุ่มของพอลิแซคาไรด์ที่มีฟรักโทสเป็นส่วนประกอบหรือที่เรียกว่าพอลิฟรักแทน พบในพืชหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงของฟรักโทสที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-2,1 (β-2,1 linkage) โดยมีโมเลกุลของซูโครสเชื่อมอยู่ปลายสาย (Vandamma และ Derycke, 1983) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 อินนูลินสะสมอยู่ในพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม กระเทียม กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus racemosus*) หัวของชิคโครี (chicory root) รากต้นรักเร่, Jerusalem artichoke (หัวของแก่นตะวัน) เป็นต้น (Grootwassink และ Flaming, 1980)



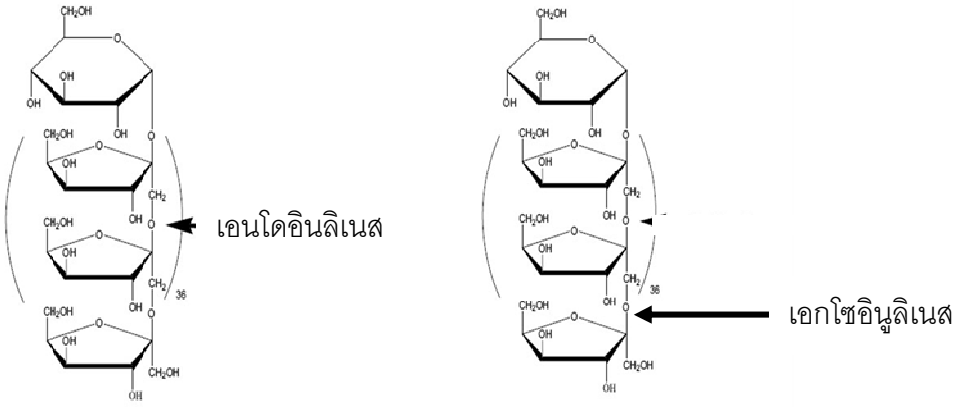
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของอินนูลิน (Vijayaraghavan และคณะ, 2009)

การจัดจำแนกชนิดของอินูลิเนสขึ้นอยู่กับรูปแบบของกลไกการไฮโดรไลซ์อินนูลินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. เอนโดอินูลิเนส (endoinulinase, 2,1, β-D-fructan fructanohydrolase : EC3.2.1.7) จะย่อยสลายพันธะบีตา 2,1 ภายในโมเลกุลของอินนูลินแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูโลไตรโอส (inulo-triose) อินนูโลเตตระโอส (inulo-tetraose) และอินนูโลเพนตะโอส (inulo-pentaose) (Kumiko และคณะ, 1999) ดังแสดงในภาพ 2.2 ซึ่งเป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำจัดเป็นพรีไบโอติก (Kolida และคณะ, 2002) และใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสุขภาพ (Sirisansaneeyakul และคณะ, 2000)

2. เอกโซอินูลิเนส (exoinulinase, β-D-fructan fructanohydrolase : EC 3.2.1.80) จะตัดพันธะบีตา 2,1 ในโมเลกุลของอินนูลินออกทีละโมเลกุลทางด้านปลายนอนรีดิวซ์ ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรักโทสและอินนูโลโอลิโกเมอร์ (Kumiko และคณะ, 1999) ดังแสดงในภาพ 2.2 ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผลิตฟรักโทสและอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล

เนื่องจากอินูลิเนสสามารถไฮโดรไลซ์อินนูลิน และซูโครส จึงนำความสามารถนี้มาใช้จัดจำแนกชนิดของอินูลิเนสโดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนในการไฮโดรไลซ์อินนูลิน (inulinase) และซูโครส (invertase) เรียกว่า ค่า I/S ratio โดย ค่า I/S ratio $> 10^{-2}$ แสดงว่ามีการย่อยสลายพันธะบีตา 2,1 ภายในโมเลกุลของอินนูลินแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูโลโอลิไตรโอสซึ่งเป็นกิจกรรมของเอนโดอินูลิเนส และค่า I/S ratio $< 10^{-4}$ แสดงว่ามีการตัดพันธะบีตา 2,1 ในโมเลกุลของอินนูลินออกทีละโมเลกุลทางด้านปลายนอนรีดิวซ์ ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรักโทสซึ่งเป็นกิจกรรมของเอกโซอินูลิเนสหรืออินเวอร์เทส (Ettalibi และ Baratti, 1987)



ภาพที่ 2.2 กลไกการไฮโดรไลซ์อินนูลินของเอนโดอินูลิเนสและเอกโซอินูลิเนส

2.2 ประโยชน์ของอินูลิเนส

การผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส (high fructose syrup)

อินูลิเนสมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายอินนูลินเป็นฟรักโทสโดยเร่งปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวในการย่อยสลายอินนูลินและให้ฟรักโทสสูงถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ (Kaur และคณะ. 1992) จึงมีการนำอินนูลินมาใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส (Fleming และ Grootwassink, 1979) ซึ่งฟรักโทส (fructose) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มีความหวานมากที่สุด สามารถใช้ได้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (diabetes mellitus) (Rumessen และคณะ, 1990) เพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็กในเด็ก (Abrams และคณะ, 2005) ใช้เป็นสารให้ความหวานสำหรับผู้ที่ลดความอ้วน กระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (Heuvel และคณะ, 2006) ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli เป็นต้น สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรค เช่น Coliforms และ *E. Coli* เป็นต้น ในระบบทางเดินอาหาร (Gibson และคณะ, 1995; Durieux และคณะ, 2001) มีรายงานการศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสโดยใช้อินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆได้แก่ *Kluyveromyces* marxianus var.*bulgaricus* (Kushi และคณะ, 2000), *Kluyveromyces. marxianus* YS-1 (Singh และคณะ, 2007) *Cryptococcus. aureus* G7a (Sheng และคณะ, 2008), *Pichia. guilliermondii* (Gong และคณะ, 2008)

การผลิตเอทานอลจากอินนูลิน

เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีการนำมาใช้มากในปัจจุบัน (Sanchez และ Cardona, 2008) สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตเอทานอลได้แก่ กลูโคส ฟรักโทส (Favela Torres และ Baratii, 1987) ซูโครส ไซโลส (Walker, 1998) และอินนูลิน (Ohta และคณะ, 1993) อินนูลินพบในพืชหลายชนิด เช่น หัวของ Jerusalem artichoke หัวหอม กระเทียม หัวของชิคโครี (chicory root) รากต้นรักเร่ เป็นต้น พบว่า หัวของ Jerusalem artichoke หรือแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตเอทานอลเนื่องจากมีปริมาณอินนูลินค่อนข้างสูงประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ (Szambelan และคณะ, 2004) เมื่อถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอกโซอินูลิเนสจะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรักโทส (Byun และ Nahm,1978) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการผลิตเอทานอล จึงมีการนำหัวแก่นตะวันมาใช้ในการผลิตเอทานอล โดยจุลินทรีย์จะผลิตอินูลิเนสออกมาย่อยสลายอินนูลินได้ฟรักโทส จากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมักแล้วได้เอทานอลออกมา มีรายงานการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้อินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Aspergillus niger* 817 และ

Saccharomyces cerevisiae 1200 (Nakamura และ คณะ, 1996) *Kluyveromyces fragilis, Saccharomyces cerevisiae* และ *Zymomonas mobilis* (Szambelan และ คณะ, 2004)

การผลิตอินนูโลโอลิโกแซคาไรด์

อินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์ (inulo-oligosaccharides; IOSs) เป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนโดอินูลิเนสได้แก่ อินนูโลไตรโอส อินนูโลเตตระโอส (Yun และคณะ 1997) ซึ่งอินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์มีโครงสร้างและคุณสมบัติคล้ายกับฟรักโตโอลิโกแซคาไรด์ซึ่งมีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ (Lo'pez-Molina และคณะ, 2005) โดยใช้เป็นสารให้ความหวาน เป็นใยอาหารที่ให้แคลลอรี่ต่ำ ช่วยลดความอ้วน ไม่เพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด จึงไม่เป็นปัญหากับผู้เป็นโรคเบาหวาน ช่วยลดคลอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์และดีแอลดีในร่างกาย จึงลดความเสี่ยงจากการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบติก สามารถใช้เป็นอาหารเสริมในอาหารสัตว์ มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และช่วยลดจุลินทรีย์ที่เป็นโทษในระบบทางเดินอาหาร ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Rowland และคณะ, 1998) ป้องกันโรคลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome) (Hunter และคณะ, 1993) สร้างภูมิคุ้มกัน ทำให้ลดการใช้สารปฏิชีวนะ และมูลสัตว์มีกลิ่นเหม็นน้อยลงด้วย เหมาะสมกับการใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เช่น ไก่และสุกร เป็นต้น การเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร (Kolida และคณะ, 2002, Lo'pez-Molina และคณะ, 2005) มีรายงานการศึกษาการผลิตอินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้อินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Pseudomonas* sp. (Kim และคณะ, 1997) *Penicillium* sp. TN-88 (Nakamura และคณะ, 1997) *Saccharomyces cerevisiae* (Kim และคณะ, 2006) *Bacillus smithii* T7(Gao และคณะ, 2009)

2.3 แหล่งของอินูลิเนส

อินูลิเนสพบได้ในพืชและจุลินทรีย์ แต่การสกัดอินูลิเนสจากพืชทำได้ยากและประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นจึงมีการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตอินูลิเนสสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตฟรักโทส อินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์ และเอทานอลจากอินนูลิน เนื่องจากเพาะเลี้ยงง่าย ให้ผลผลิตสูงและมีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอินูลิเนสได้ ได้แก่ รา ยีสต์ และ แบคทีเรีย จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอินูลิเนสดังแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างอินูลิเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Arthrobacter sp.	Kang และคณะ , 1998
Arthrobacter ureafaciens	Uchiyama, 1975
Aspergillus candidus	Kochhar และคณะ, 1999
Aspergillus fumigatus	Gill และคณะ, 2004
Aspergillus niger AF10	Zhang และคณะ, 2004
Aspergillus niger AUP19	Kumar และคณะ, 2005
Aspergillus niger MK-126	Kango และคณะ, 2008
Aspergillus niger SL-09	Ge และZhang, 2005
Aspergillus tamarii	Saber และEl-Nagger, 2009
Bacillus sp. 11	Uzunova และคณะ, 2002
Bacillus polymyxa	Kwon และคณะ, 2003
Bacillus sp. Snu-7	Kim และคณะ, 2004
Bacillus smithii T7	Gao และคณะ, 2009
Bacillus sutilis 430A	Vullo และคณะ, 1991
Bifidobacterium infantis ATCC 15697	Warchol และคณะ, 2002
Candida guilliermondii	Sirisansaneeyakul และคณะ, 2008
Chrysosporium pannorum	Xiao และคณะ, 1988

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างอินูลิเนส (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Cladosporium cladosporioides	Ferreira และคณะ, 1991
Clostridium thermoautotrophicum	Wim และ Jan, 1991
Cryptococcus aureus G7a	Sheng และคณะ, 2008
Fusarium oxysporum	Kaur และคณะ, 1992
Geobacillus stearothermophilus KP1289	Tsujimoto และคณะ, 2003
Kluyveromyces sp. Y-85	Wei และคณะ, 1998
Kluyveromyces sp.S120	Chen และคณะ, 2007
Kluyveromyces fragilis	Pandey และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus	Selvakumar และ Pandey, 1999
Kluyveromyces marxianus YS-1	Singh และคณะ, 2007
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571	Bender และคณะ, 2006
Marinimicrobium sp. LS–A18	Li และคณะ, 2011
Penicillium citrinum AR-IN2	El-Hersh และคณะ, 2011
Penicillium janczewskii	Pessoni, 2007
Penicillium purpurogenum	Sharma และ คณะ, 2005
Penicillium sp.TN-88	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	Gong และคณะ, 2008
Pseudomonas sp.	Kim และคณะ, 1997
Pseudomonas mucidolens	Kwon และคณะ, 2000
Rhizopus sp. TN-96	Ohta และคณะ, 2002
Saccharomyces cerevisiae	Szambelan และคณะ, 2004
Streptomyces sp.	Sharma และ Gill, 2007
Streptococcus mutant	Burne และคณะ, 1987
Streptomyces sp. GNDU 1	Gill และคณะ, 2003
Xanthomonas campestris pv *phaseoli*	Ayyachamy และคณะ, 2007
Zymomonas mobilis	Szambelan และคณะ, 2004

2.4 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์

อินูลิเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะระหว่างน้ำตาลฟรักโทสในอินนูลินด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลฟรักโทส และอินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์ อินูลิเนสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ส่วนมากจะถูกนำไปใช้ในรูปที่มีการตรึงเอนไซม์เนื่องจากมีประสิทธิภาพและมีราคาถูกเช่น การตรึงอินูลิเนสจาก *Aspergillus fumigatus* เพื่อผลิตฟรักโทสจากอินนูลิน (Gill และ คณะ, 2006) การตรึงอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* บนเจลาตินเพื่อผลิตฟรักโทสจากการไฮโดรไลซ์ซูโครส (de Paula และคณะ, 2008) การตรึงเอนโดอินูลิเนสเพื่อผลิตอินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์จากหัวชีคโครี (chicory juice) (Yun และคณะ, 2000) การตรึงเอนโดอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* บนไคตินเพื่อผลิตโอลิโกฟรักโทสจากรากแก่นตะวัน (Nguyen และคณะ, 2011) เป็นต้น ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นมีความสำคัญต่อการศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ เช่น โครงสร้าง หน้าที่และสมบัติของเอนไซม์ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

อินูลิเนสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์จึงละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์นี้ต้องมีการแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อก่อน โดยทั่วไปใช้วิธีการกรอง และการปั่นเหวี่ยง

การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์มีหลายขั้นตอน ได้แก่ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange chromatography) โครมาโทกราฟีแบบไฮโดรโฟบิคอินเตอร์แอกชัน (hydrophobic interaction) และเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) (Pessoni และคณะ, 2007) นอกจากนี้มีรายงานการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอล และการทำ ultrafiltration (100 kDa cut-off) เพื่อทำอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxinus* ให้บริสุทธิ์ (Golunski และคณะ, 2011) นอกจากนี้ได้มีรายงานหลายฉบับศึกษาการทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ กัน ดังนี้

Kang และคณะ (1998) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Arthrobacter* sp.ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบน DEAE- Sephacel column ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ทำให้เข้มข้นและทำโครมาโทกราฟีบน Phenyl-Toyopearl column (hydrophobic interaction chromatography) ชะโปรตีน

ออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.5-0 โมลาร์ ตามลำดับ พบว่าอินูลิเนสที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 63 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 4 เปอร์เซ็นต์

Kochhar และคณะ (1999) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Aspergillus candidus* ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบน DEAE-Sephacel column ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ทำให้เข้มข้นและทำโครมาโทกราฟีบน Sephadex G-150 ตามลำดับ

Kushi และคณะ (2000) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ให้บริสุทธิ์ โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปไลโอฟิไลซ์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน แล้วมาทำโครมาโทกราฟีบน DEAE-Trisacryl Plus และ Superose 6HR 10/30 column ตามลำดับ พบว่าอินูลิเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 34 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 5.9 เปอร์เซ็นต์

Ohta และคณะ (2002) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Rhizopus* sp. TN-96 ให้บริสุทธิ์ โดยการกรองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้เข้มข้นโดยใช้ dry polyethylene glycol แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบน DEAE-Cellulofine A-500 ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์แบบลำดับขั้นของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ตามลำดับ และนำมาทำโครมาโทกราฟีบน Sephacryl S-200 HR ว่าอินูลิเนสที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 17 หน่วยต่อมิลลิกรัม ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 12 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 0.57 เปอร์เซ็นต์

Gill และคณะ (2006) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Aspergillus fumigatus* ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบน DEAE-Sephacel column ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-2 โมลาร์ นำลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของอินูลิเนสมารวมกัน ทำให้เข้มข้นแล้วนำผงแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายกับเอนไซม์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.7 โมลาร์ จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบน Octyl-Sepharose column (hydrophobic-interaction chromatography) ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ทำให้เข้มข้นแล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบน Sephacryl S-200 แล้วตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะบน ConA-CL Agarose ชะโปรตีนออกด้วยเกรเดียนท์ลำดับขั้นของ เมธิล แอลฟา ดี แมนโนไพราโนไซด์ (methyl-α-D-mannopyranoside) ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ จากนั้นทำให้เข้มข้นแล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบน Sephacryl S-100 ตามลำดับ พบว่าอินูลิเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 74.6 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 3.2 เปอร์เซ็นต์

Singh และคณะ (2007) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1ให้บริสุทธิ์ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 45-90 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วละลายตะกอนด้วยโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นำมาทำโครมาโทกราฟีบน Sephadex G-100 พบว่าอินูลิเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23.5 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 22.4 เปอร์เซ็นต์

Sheng และคณะ (2008) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Cryptococcus aureus* G7a ให้บริสุทธิ์ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้เข้มข้นด้วยการทำ ultrafiltration (10 kDa cut-off) ด้วย Labscale™ TFF System (Millipore,USA)แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบน Saphadex G-75 ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย ÄKTA™ prime with Hitrap™ (Amersham,Biosciences, Sweden) จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบน DEAE-Sepharosel column ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยการทำ ultrafiltration (10 kDa cut-off) ด้วย Labscale™ TFF System (Millipore,USA)ตามลำดับ พบว่าอินูลิเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.44 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 22.4 เปอร์เซ็นต์

Gao และคณะ (2009) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Bacillus smithii* T7 ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบน DEAE-Sephacel column ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์ลำดับขั้นของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5-0.6 โมลาร์ แล้วตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบน SGF superdex75 gel filtration ตามลำดับ พบว่าอินูลิเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 31.4 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 27.3 เปอร์เซ็นต์

Chen และคณะ (2009) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบน Sephacryl S-200 ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์ลำดับขั้นของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-3 โมลาร์ พบว่าอินูลิเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.2 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 21 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจาก *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในดิน บริเวณแหล่งน้ำจืด และน้ำทะเล เจริญได้ดีในภาวะแวดล้อมหลากหลาย ดังนั้นจึงจัดเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาการผลิตอินูลิเนส ซึ่งน่าจะได้เอนไซม์ที่มีสมบัติหลากหลายตามภาวะแวดล้อมของแหล่งที่คัดแยกเชื้อได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังมีรายงานการผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* ค่อนข้างน้อยมาก ดังรายงานต่อไปนี้

Gill และคณะ (2003) ผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. GNDU1 พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 0.552 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ และพบว่าแอมโมเนียมอิออนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 5.5

Sharma (2006) ผลิตอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณปมรากต้นรักเร่ ในอาหารที่มีกระเทียมผงเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ 0.524 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอินนูลินบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน 1.6 เท่า ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 6.0

ต่อมา Sharma และ Gill (2007) ศึกษาการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบน DEAE-Sephacel column ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-2.0 โมลาร์ แล้วตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะบน ConA-CL Agarose ชะโปรตีนออกด้วยเกรเดียนท์ลำดับขั้นของเมธิล แอลฟา ดี แมนโนไพราโนไซด์ (methyl-α-D-mannopyranoside) ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ได้อินูลิเนสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 18 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 4.8 เปอร์เซ็นต์

2.5 น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส

มีรายงานการหาน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีขนาดแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Arthrobacter sp.	75,000	Kang และคณะ, 1998
Aspergillus candidus	54,000	Kochhar และคณะ, 1999
Aspergillus fumigatus	62,000	Gill และคณะ, 2006
Aspergillus ficuum JNSP5-06	Exo-I ; 70,000 Exo-II ; 40,000 Exo-III ; 46,000 Endo-I ; 34,000 Endo-II ; 31,000	Chen และคณะ, 2009
Aspergillus niger Mutant 817	P-IA ; 70,000 P-IB ; 68,000	Nakamura และคณะ, 1994
Bacillus smithii T7	47,000	Gao และคณะ, 2009
Cryptococcus aureus G7a	60,000	Sheng และคณะ, 2008
Geobacillus stearothermophilus KP1289	54,000	Tsujimoto และคณะ, 2003
Kluyveromyces fragilis	250,000	Pandey และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus	72,000	Rouwenhorst และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus var. *bulgaricus*	57,000	Kushi และคณะ, 2000
Penicillium sp.TN-88	68,000	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	50,000	Gong และคณะ, 2008
Pseudomonas mucidolens	55,000	Kwon และคณะ, 2000
Rhizopus sp. TN-96	83,000	Ohta และคณะ, 2002

2.6 **สมบัติของอินูลิเนส**

2.6.1 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

อินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่าง	
Arthrobacter sp.	50	7.5	Kang และคณะ, 1998
Aspergillus candidus	45	5.5	Kochhar และคณะ, 1999
Aspergillus fumigatus	60	5.5	Gill และคณะ, 2006
Aspergillus ficuum JNSP5-06	45	4.5	Chen และคณะ, 2009
Aspergillus niger Mutant 817	40	5.0	Nakamura และคณะ, 1994
Bacillus smithii T7	70	4.5	Gao และคณะ, 2009
Cladosporium Cladosporioides	60	5.0	Ferreira และคณะ, 1991
Cryptococcus aureus G7a	50	5.0	Sheng และคณะ, 2008

ตารางที่ 2.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่าง	
Geobacillus stearothermophilus KP1289	60	6.0	Tsujimoto และคณะ, 2003
Kluyveromyces fragilis	55	4.75	Pandey และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus	55	4.4	Rouwenhorst และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus var. *bulgaricus*	55	4.75	Kushi และคณะ, 2000
Kluyveromyces marxianus YS-1	55	5.5	Singh และคณะ, 2007
Penicillium sp.TN-88	50	5.2	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	60	6.0	Gong และคณะ, 2008
Pseudomonas mucidolens	55	6.0	Kwon และคณะ, 2000
Rhizopus sp. TN-96	40	5.5	Ohta และคณะ, 2002
Streptococcus salivarius KTA-19	-	7.0	Takahashi และ คณะ, 1985

2.6.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของอินูลิเนส

อินูลิเนสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความเสถียรต่อ		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่าง	
Arthrobacter sp.	30-40 (10 นาที)	-	Kang และคณะ, 1998
Aspergillus candidus	40 (1 ชั่วโมง)	-	Kochhar และคณะ, 1999
Aspergillus fumigatus	55 (4 ชั่วโมง)	4.0-9.5	Gill และคณะ, 2004
Bacillus smithii T7	70 (9 ชั่วโมง) 80 (3.5 ชั่วโมง)	4.0-9.5	Gao และคณะ, 2009
Cryptococcus aureus G7a	65-70 (2 ชั่วโมง)	4.0-6.5	Sheng และคณะ, 2008
Fusarium oxysporum	50 (10 นาที)	5.5-6.5	Kaur และคณะ, 1992
Kluyveromyces marxianus var.*bulgaricus*	40 (3.5 ชั่วโมง) 50 (40 นาที)	6.0-7.0	Kushi และคณะ, 2000
Pichia guilliermondii	60 (2 ชั่วโมง)	6.0-7.0	Gong และคณะ, 2008
Rhizopus sp. TN-96	30 (30 นาที)	5.0-8.0	Ohta และคณะ, 2002
Xanthomonas oryzae NO.5	45 (1 ชั่วโมง)	6.0-9.0	Cho และ Yun. 2002

หมายเหตุ : เครื่องหมาย - หมายถึงไม่ได้รายงานไว้

2.6.3 ความจำเพาะต่อสับเสตรทของอินูลิเนส

โดยทั่วไปอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีความจำเพาะต่ออินนูลิน ซึ่งมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกันไป และมีรายงานว่าอินูลิเนสมีความจำเพาะกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ค่าความจำเพาะ (K_m) ของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่อสับเสตรทชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของสับเสตรท	K_m (มิลลิโมลาร์)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus candidus	อินนูลิน	3.8	Kochhar และคณะ, 1999
Aspergillus ficuum	อินนูลิน	4.75	Mutanda และคณะ, 2009
Aspergillus fumigatus	อินนูลิน	0.25	Gill และคณะ, 2004
Aspergillus niger Mutant 817	อินนูลิน	P-IA ; 0.48 P-IB ; 0.50	Nakamura และคณะ, 1994
Bacillus smithii T7	อินนูลิน ซูโครส ราฟฟิโนส	4.17 32.7 5.75	Gao และคณะ, 2009
Cryptococcus aureus G7a	อินนูลิน	20.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	Sheng และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus YS-1	อินนูลิน	11.9	Singh และคณะ, 2007
Kluyveromyces marxianus CDBB-L-278	อินนูลิน ซูโครส	3.04 40.18	Cruz-Guerrero และคณะ, 1995
Kluyveromyces marxianus var. *bulgaricus*	อินนูลิน	86.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	Kushi และคณะ, 2000

ตารางที่ 2.5 ค่าความจำเพาะ (K_m) ของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่อสับเสตรทชนิดต่างๆ (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของสับเสตรท	K_m (มิลลิโมลาร์)	เอกสารอ้างอิง
Kluyveromyces marxianus YS-1	อินนูลิน ซูโครส ราฟฟิโนส	3.4 2.7 25.3	Singh และคณะ, 2007
Penicillium janczewskii	อินนูลิน	PI ; 0.81 PII ; 0.88	Pessoni ละคณะ, 2007
Pichia guilliermondii	อินนูลิน	21.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	Gong และคณะ, 2008
Pseudomonas mucidolens	อินนูลิน	11.5	Kwon และคณะ, 2000
Streptomyces sp.	อินนูลิน ซูโครส ราฟฟิโนส	1.63 66.66 12.5	Sharma และ Gill, 2007

2.6.4 ชนิดของอินูลิเนส

อินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีรูปแบบการไฮโดรไลซ์อินนูลิน 2 ชนิด คือ เอนโดอินูลิเนส (Endoinulinase, 2,1, β-D-fructan fructanohydrolase) และเอกโซอินูลิเนส (Exoinulinase, β-D-fructan fructanohydrolase) ซึ่งอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีรูปแบบการการไฮโดรไลซ์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ชนิดของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของอินูลิเนส	เอกสารอ้างอิง
Arthrobacter sp.	Endoinulinase	Kang และคณะ, 1998
Aspergillus fumigatus	Exoinulinase	Gill และคณะ, 2004
Aspergillus ficuum JNSP5-06	Exoinulinase	Chen และคณะ, 2009
Aspergillus niger Mutant 817	Endoinulinase	Nakamura และคณะ,1994
Aspergillus niger NK-126	Endoinulinase	Kango และคณะ, 2008
Bacillus sp. 11	Exoinulinase	Uzunova และคณะ, 2002
Bacillus smithii T7	Endoinulinase	Gao และคณะ, 2009
Cryptococcus aureus G7a	Exoinulinase	Sheng และคณะ, 2008
Geobacillus stearothermophilus KP1289	Exoinulinase	Tsujimoto และคณะ, 2003
Kluyveromyces sp. Y-85	Exoinulinase	Wei และคณะ, 1998
Kluyveromyces sp.S120	Exoinulinase	Chen และคณะ, 2007
Kluyveromyces fragilis	Exoinulinase	Pandey และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus	Exoinulinase	Rouwenhorst และคณะ, 1999
Kluyveromyces marxianus YS-1	Exoinulinase	Singh และคณะ, 2007
Kluyveromyces marxianus var*. bulgaricus*	Exoinulinase	Kushi และคณะ, 2000

ตารางที่ 2.6 ชนิดของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของอินูลิเนส	เอกสารอ้างอิง
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571	Exoinulinase	Mazutti และคณะ, 2006
Penicillium purpurogenum	Endoinulinase	Sharma และ คณะ, 2005
Penicillium sp.TN-88	Endoinulinase	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	Exoinulinase	Gong และคณะ, 2008
Pseudomonas mucidolens	Exoinulinase	Kwon และคณะ, 2000
Staphylococcus sp	Exoinulinase	Selvakumar และ Pandey, 1999
Streptococcus salivarius KTA-19	Exoinulinase	Takahashi และ คณะ, 1985
Streptomyces sp.	Exoinulinase	Sharma และ Gill, 2007

2.6.5 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอินูลิเนส

อิออนของโลหะหลายชนิดมีผลต่อการทำงานอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แตกต่างกันทั้งกระตุ้นการทำงานและยับยั้งการทำงาน ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของอิออนของโลหะ		เอกสารอ้างอิง
	สารกระตุ้น	สารยับยั้ง	
Aspergillus fumigatus	K^{+} และ Cu^{2+}	Fe^{2+}, Ag^{+}, Zn^{2+}, Co^{2+}และ Hg^{2+}	Gill และคณะ, 2004
Aspergillus niger Mutant 817	Mn^{2+}	Hg^{2+} และ Ag^{+}	Nakamura และคณะ, 1994
Cryptococcus aureus G7a	Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+} และ Cu^{2+}	Mg^{2+}, Hg^{2+} และ Ag^{+}	Sheng และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus YS-1	Mn^{2+} และ Ca^{2+}	Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+} และ Fe^{3+}	Singh และคณะ, 2007
Pichia guilliermondii	Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+} และ Cu^{2+}	Mg^{2+}, Hg^{2+} และ Ag^{+}	Gong และคณะ, 2008
Pseudomonas mucidolens	-	Ag^{+} Zn^{2+}และ Na^{+}	Kwon และคณะ, 2000
Rhizopus sp. TN-96	Ca^{2+}และ Mn^{2+}	Hg^{2+} และ Ag^{+}	Ohta และคณะ, 2002
Streptomyces sp.	Co^{2+}	Na^{+}, EDTA และ Hg^{+}	Sharma และ Gill, 2007

หมายเหตุ : เครื่องหมาย - หมายถึงไม่ได้รายงานไว้

Streptomyces sp. CP01 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินบริเวณที่มีการปลูกแก่นตะวันจากจังหวัดชัยภูมิ พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนส โดยสามารถผลิตอินูลิเนสได้สูงถึง 1.60 หน่วยต่อมิลลิลิตรเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอินูลิเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 6.0 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างคือ 5.0-9.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการทำอินูลิเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม และเป็นการเพิ่มฐานข้อมูลอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) รุ่น Inova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น GYROMAXIM 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., U.S.A.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น Seveneasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genessys บริษัท Spectroniic Unicam, USA, รุ่น Genesys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA และ รุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัท Perkin Elmer, Inc., USA
6. เครื่องชั่งรุ่น PG2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan, รุ่น MSL 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
8. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ clean รุ่น V3-4 และรุ่น V6 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส Mitsubishi Electric รุ่น MR-F56R-SL บริษัทกันยงอีเลคทรอนิค จำกัด(มหาชน), ประเทศไทย
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W200 และรุ่น WB2 บริษัท Memmert, Germany
11. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
12. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502-P บริษัท PMC, U.S.A.และรุ่น HS10-2 บริษัท Torrey Pine Scientific, Inc. USA

13. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Logic LP บริษัท Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
14. เครื่องอีเลคโทรโฟริซิสแบบแผ่น (slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของ BioRad, U.S.A.
15. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK100 บริษัท Bendelin Electronic, Germany
16. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-35 บริษัท Eyela, Japan
17. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
18. ตู้อบความร้อนรุ่น UL 80 บริษัท Memmert, Germany
19. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
20. ฮีมาไซโตมิเตอร์ บริษัท Schott Duran, Germany
21. แผ่นซิลิการ์เจล ($SiO_2.XH_2O$) 60 บริษัท Merck, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อินนูลินบริสุทธิ์จากชิคโครี (inulin from chicory) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
2. ซูโครส (sucrose) บริษัท Merck, Germany
3. ฟรักโทส (fructose) บริษัท Fluka, U.S.A.
4. ข้าวโอ๊ต (oatmeal) บริษัท Quaker. Malaysia
5. รากแก่นตะวัน (โครงการวิจัยแก่นตะวัน สาขาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)
6. แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE®) บริษัท Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
7. เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ (Sephacryl S-200 HR®) บริษัท Amersham pharmacia
8. ไฮดรอกซีอะปาไทด์ (Hydroxyapatite®) บริษัท Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
9. บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน (Butyl hydrophobic interaction®) บริษัท Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
10. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
11. อะคริลาไมด์ (acrylamide) บริษัท Merck, Germany
12. N,N,N',N'-เตตระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-tetramethylenediamine, TEMED) บริษัท Merck, Germany
13. N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bis acrylamide) บริษัท Merck, Germany

14. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$) บริษัท Merck, Germany
15. สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (coomassie brilliant blue G-250) บริษัท Fluka, Switzerland
16. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
17. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุล ของ BioRad, U.S.A.
18. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
19. เอทิลีนไดเอมีนเตตะอาซีติก เอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.
20. แคตะเลส (catalase) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
21. แกมมา กลอบูลิน (gamma globulin from bovine blood) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
22. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
23. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) บริษัท Merck, Germany
24. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
25. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
26. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
27. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
28. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Merck, Germany
29. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
30. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
31. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
32. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) บริษัท Merck, Germany
33. กรดแอซีติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
34. คลอโรฟอร์ม (chloroform) ของบริษัท RCI Lavscale, Ireland
35. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (tris-HCl) บริษัท Sigma-Aldrich Co., U.S.A.
36. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
37. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกซะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
38. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) บริษัท Merck, Germany

39. คอปเปอรัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Merck, Germany
40. โซเดียมซัลเฟต ($NaSO_4$) บริษัท Merck, Germany
41. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) บริษัท Merck, Germany
42. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
43. โซเดียมคาร์บอร์เนต ($NaCO_3$) บริษัท Merck, Germany
44. สารละลายโฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ (pholin phenol reagent) บริษัท Merck, Germany
45. บลาโนส :ซีเอ็มซี (blanose CMC) บริษัท Bronson and Jacob International Co., Ltd., Thailand

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 และการเตรียมอินูลิเนส

3.3.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. CP01

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารแข็งเอียงชนิดข้าวโอ๊ต (oatmeal slant) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 วัน จนสายใยเจริญเต็มที่ และสปอร์แก่เป็นสีเทา จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นผสม tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ผสม tween 80 อีก 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 2×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อย ๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.1.2 การสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน

นำหัวแก่นตะวันสดมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ วางไว้ในถาดอลูมิเนียมนำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส จนหัวแก่นตะวันแห้ง นำหัวแก่นตะวันที่อบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบดหยาบ (สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) จากนั้นชั่งหัวแก่นตะวันที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งที่ 100 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที กรองกากหัวแก่นตะวันออกผ่านผ้าขาวบางแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนละเอียดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที วัดปริมาตรส่วนน้ำใสที่ได้เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณของอินนูลินในสารสกัด วิเคราะห์ด้วยวิธี cystein carbazole sulfuric acid method (Dische และ Borenfreund, 1952) วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959) และวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol sulfuric acid method (Dubois และคณะ, 1956) คำนวณปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์) ที่ได้ดังแสดงในสมการ ที่ 1-3

1) อินนูลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Lingyun และคณะ, 2007)
= น้ำตาลทั้งหมด(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) – น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

2) อินนูลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Dische และ Borenfreund, 1952)
= อินนูลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) – น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3) เปอร์เซ็นต์อินนูลินในสารสกัดเทียบกับแก่นตะวัน (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$= \frac{[\text{ค่าเฉลี่ยอินนูลิน จาก 1และ2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) x ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร)}] \times 100}{\text{น้ำหนักผงแก่นตะวันอบแห้ง (กรัม)}}$$

3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยวิธี cystein carbazole sulfuric acid method (Dische และBorenfreund, 1952)

นำสารสกัดอินนูลินปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายซิสทีอีน ไฮโดรคลอไรด์ (cystein-HCl) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายแอลกอฮอลิก คาร์บาโซล์ (alcoholic carbazole) ความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทันที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที

คำนวณปริมาณอินนูลินจากกราฟมาตรฐานของอินนูลิน (inulin) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

3.3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959)

นำสารสกัดอินนูลินปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรไซลิก (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วต้มปฏิกิริยาในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของฟรักโทส (fructose) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)

3.3.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method (Dubois และคณะ, 1956)

นำสารสกัดอินนูลินปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของฟรักโทส (fructose) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.2)

3.3.1.6 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 เพื่อผลิตอินูลิเนส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. CP01 ความเข้มข้น 2×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ luria bertani (LB) pH 8 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตอินูลิเนสซึ่งปรับปรุงแล้ว (รุ่งตระการ จันทนพันธ์, 2552) โดยใช้สารสกัดอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากรากแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและส่วนใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส และปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนส

3.3.2.1 การตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sharma และ Gill (2007) โดยวัดปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่เกิดจากการย่อยสลายอินนูลิน ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาดังนี้

สารละลายอินนูลินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0	ปริมาตร 95 ไมโครลิตร
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0	ปริมาตร 55 ไมโครลิตร
สารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม	ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ DNS method ดังแสดงใน 3.3.1.4 เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 1-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)

กำหนดให้ 1 หน่วยของอินูลิเนส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายอินนูลินแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับฟรักโทส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

3.3.2.2 การตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของอินเวอร์เทสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sharma และ Gill (2007) โดยวัดปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่เกิดจากการย่อยสลายซูโครส ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาดังนี้

สารละลายซูโครสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0	ปริมาตร 95 ไมโครลิตร
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0	ปริมาตร 55 ไมโครลิตร
สารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม	ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ DNS method ดังแสดงใน 3.3.1.4 เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 1-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)

กำหนดให้ 1 หน่วยของอินูลิเนส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายอินนูลินแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับฟรักโทส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.3.4 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์

3.3.4.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนอินูเนส

นำส่วนน้ำใสเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วน คือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ กวนแต่ละลำดับส่วนของสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของอินูลิเนส

3.3.4.2 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.7.1 พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยก

ตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ครั้งสุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตรสารละลายที่ได้ วิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสและปริมาณโปรตีน

3.3.4.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.3.4.3.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE®)

ล้างสารแขวนลอยแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ แช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สูญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 45 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี (unbound fraction)ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับตัวกลางในคอลัมน์ออก (bound fraction) ออกโดยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ที่ความเข้มข้น 0-1000 มิลลิโมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอินูลิเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของอินูลิเนสเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี aquasorb ด้วยผง บลาโนส ซีเอ็มซี (blanose CMC) จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสและปริมาณโปรตีน

3.3.4.3.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200 HR®)

ล้างสารแขวนลอยเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ (Sephacryl S-200 HR®) ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ จากนั้นแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สูญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 45 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.4.3.1 มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอินูลิเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่พบแอคติวิตีของอินูลิเนสเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี aquasorb ด้วยผงบลาโนส ซีเอ็มซี จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสและปริมาณโปรตีน

3.3.4.3.3 คอลัมน์โครมาโทกราฟีบน ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน (t-Butyl hydrophobic interaction®)

ล้างสารแขวนลอย ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน(t-Butyl hydrophobic interaction®) ด้วยน้ำกลั่นใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สูญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 5.0 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟตที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำผงแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายกับสารละลายเอนไซม์ที่ได้จาก

ข้อ 3.3.4.3.2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.7 โมลาร์ มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลางด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับตัวกลางในคอลัมน์ (bound fraction) ออกโดยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 เก็บลำดับส่วนละ 1.0 ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอินูลิเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่พบแอคติวิตีของอินูลิเนสเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี aquasorb ด้วยผงบลาโนส ซีเอ็มซี จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสและปริมาณโปรตีน

3.3.4.3.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ (Hydroxyapatite®)

แซ่ไฮดรอกซีอะปาไทต์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง เทส่วนน้ำใสพร้อมเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ กำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 5.0 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.4.3.3 มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลางด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับตัวกลางในคอลัมน์ (bound fraction) ออกโดยโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20-500 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอินูลิเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่พบแอคติวิตีของอินูลิเนสเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี aquasorb ด้วยผงบลาโนส ซีเอ็มซี จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสและปริมาณโปรตีน

3.3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอินูลิเนส โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส (native polyacrylamide gel electrophoresis)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6.8) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้เต็มแผ่น ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออกจนหมด เทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6.9) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟรีซีส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเลคโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่จะใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 6.6) จากนั้นหยอดสารละลายโปรตีน 20 ไมโครลิตร ในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอีเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว แช่เจลในสารละลายย้อมโปรตีน (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.10) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 6.11) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

3.3.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส

3.3.6.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส โดยการทำเจลฟิลเทรชันผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์

บรรจุเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ที่เตรียมตามข้อ 3.3.4.3.2 ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 45 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.4.3.4 มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอินูลิเนสในแต่ละลำดับส่วน

จากนั้นใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานได้แก่ คะตะเลส (catalase) โกลบูลิน (globulin) และโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250,000, 150,000, และ 66,000, ดาลตัน ตามลำดับ ผ่านลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ โดยภาวะเดียวกันกับเอนไซม์ข้างต้น นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์

3.3.6.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีการของ Laemmli (1970)

นำอินูลิเนสบริสุทธิ์และสารละลายโปรตีนมาตรฐานมาทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้าง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับจุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.10) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงเต็มแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออกจนหมด เทสารละลายสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.11) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติก

สำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟริซิส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.1) เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในช่องชุดทำอีเลคโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.8) ต้มในน้ำเดือด 5 นาที หยอดสารละลายโปรตีนนี้ 20 ไมโครลิตร และโปรตีนมาตรฐานซึ่งเป็น prestained SDS-PAGE standard 7.5 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอีเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วและย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก ด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของอินูลิเนสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.3.7 **สมบัติของอินูลิเนสจาก** *Streptomyces* **sp. CP01**

3.3.7.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

นำอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส

3.3.7.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

นำอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ดังนี้

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

3.3.7.3 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิ

3.3.7.3.1 บ่มอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยไม่ใส่สับสเตรทที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของอินูลิเนสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีอินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.7.3.2 บ่มอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยไม่ใส่สับสเตรทที่อุณหภูมิ 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 60 90 120 150 และ 180 นาที ตามลำดับ แล้วนำมาหาแอคติวิตีของอินูลิเนสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีอินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.7.4 ความเสถียรของอินูลิเนสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ดังระบุในข้อ 3.3.7.2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของอินูลิเนสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีอินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.7.5 การตรวจสอบการเป็นเอกโซหรือเอนโดอินูลิเนส

3.3.7.5.1 การตรวจสอบความจำเพาะของอินูลิเนสและอินเวอร์เทส

t

นำอินูลิเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาตรวจสอบแอคติวิตีของอินูลิเนสต่ออินนูลินและซูโครส โดยวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.7.5.2 การตรวจสอบการเป็นเอกโซหรือเอนโดอินูลิเนสโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatography) ดัดแปลงจาก Nakamura และคณะ, 1994

นำอินูลิเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบการเป็นเอกโซหรือเอนโดอินูลิเนส โดยบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 20 30 60 และ 90 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์อินนูลินด้วยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่น

บาง โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล ($SiO_2.XH_2O$) 60 ของ Merck, Germany ขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร (ด้วยความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ 402 ภาควิชาจุลชีววิทยา) และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม กรดแอซิติกและน้ำ ในอัตราส่วน 3 ต่อ 10 ต่อ 1 จากนั้นนำตัวอย่างมาจุดลงบนแผ่น TLC ปริมาตรจุดละ 30 ไมโครลิตร ให้ห่างจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร จากนั้นหย่อนแผ่น TLC ลงในแนวดิ่งอย่างช้าๆ ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่นหรือเหลือขอบประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาวางไว้จนแห้ง แล้วจึงตรวจหาผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์อินนูลินด้วยการฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที นำออกมาแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลและถ่ายภาพไว้

3.3.7.6 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) ของอินูลิเนส

นำอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาผสมกับสับสเตรท คือ อินนูลินและซูโครส ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายขณะทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.5-2.0 มิลลิโมลาร์ สำหรับอินนูลิน (inulin from chicory root, SIGMA) และ 20-200 มิลลิโมลาร์ สำหรับซูโครส นำไปหาแอคติวิตีของอินูลิเนส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.7.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอินูลิเนส

นำอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาไดอะไลซ์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของ EDTA เพื่อกำจัดอิออนออกจากโมเลกุลก่อน จากนั้นนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีการในข้อ 3.3.2.1 โดยเติมอิออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ลงในสารผสมปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)

ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	($MnSO_4 \cdot H_2O$)
แคลเซียมคลอไรด์เพนตะไฮเดรต	($CaCl_2 \cdot 5H_2O$)
โซเดียมคลอไรด์	(NaCl)
เมอคิวรัสคลอไรด์	($HgCl_2$)

3.3.7.8 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอินูลิเนส

บ่มอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน ในสารดัดแปลงกรดอะมิโนชนิดต่างๆ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาหาแอคติวิตีของอินูลิเนสตามวิธีการในข้อ 3.3.2.1 โดยมีอินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มในสารดัดแปลงกรดอะมิโนเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยสารดัดแปลงกรดอะมิโนที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

Iodoacetamide (IAM)

Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

N-Bromosuccimide (NBS)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า *Streptomyces* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่พบหลากหลายในแหล่งธรรมชาติ และสามารถผลิตเอนไซม์ และสารเมทาบอไลต์ที่นำมาใช้ประโยชน์มากมาย อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดนี้น้อยมาก และมีเพียงรายงานฉบับเดียวที่กล่าวถึงการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ งานวิจัยนี้จึงรายงานการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มข้อมูลของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ รวมทั้งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์นี้ไปใช้งานต่อไป

4.1 การสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน

จากการเตรียมอินนูลินสกัดจากแก่นตะวันตามวิธีในข้อ 3.3.1.2 เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตอินูลิเนส ผลการทดลองพบว่ามีอินนูลินในสารสกัดจากหัวแก่นตะวันตามวิธีของ Lingyun และคณะ (2007) และ Dische และ Borenfreund (1951) พบว่าได้ปริมาณอินนูลินใกล้เคียงกัน โดยมีค่าประมาณ 17.0 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ

4.2 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 และการเตรียมอินูลิเนส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อผลิตอินูลิเนสซึ่งมี 1 เปอร์เซ็นต์ อินนูลินสกัดจากรากแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการในข้อ 3.3.1.6 รวมทั้งตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 พบว่า *Streptomyces* sp. CP01 สามารถผลิตอินูลิเนสได้ประมาณ 1.90 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ ในขั้นตอนต่อไปจึงได้ศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์

4.3 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์

4.3.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนอินูลิเนส

การศึกษาขั้นแรกได้ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนลำดับส่วนของอินูลิเนสในน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นและมีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ คือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวิเคราะห์แอคติวิตีของอินูลิเนสพบว่ามีแอคติวิตีของอินูลิเนสครอบคลุมอยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.1 ดังนั้นในการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของอินูลิเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้บริสุทธิ์จึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในช่วง 40-80 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนอินูลิเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ลำดับส่วนของแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ	200	192.67	142.20	0.738	100.00
0-20	0.846	0.24	0.06	0.250	0.12
20-30	0.572	0.16	0.11	0.688	0.08
30-40	0.616	0.51	0.36	0.706	0.18
40-50	1.188	6.74	5.53	0.821	3.89
50-60	1.228	6.57	12.91	1.965	9.08
60-70	1.924	11.94	20.52	1.719	14.43
70-80	1.956	14.02	11.54	0.823	8.11
80-90	1.83	11.22	1.78	0.159	1.25

4.3.2 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยง *Streptomyces* sp. CP01 โดยขยายขนาด ปั่นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากไมซีเลียมได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 460 มิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าได้แอคติวิตีของอินูลิเนสรวมทั้งหมด 1,278 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 294.40 มิลลิกรัม และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.34 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้นี้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80 เปอร์เซ็นต์ ไดอะไลส์ในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำมาวิเคราะห์แอคติวิตี พบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 2.76 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น โดยยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 63.37 เปอร์เซ็นต์

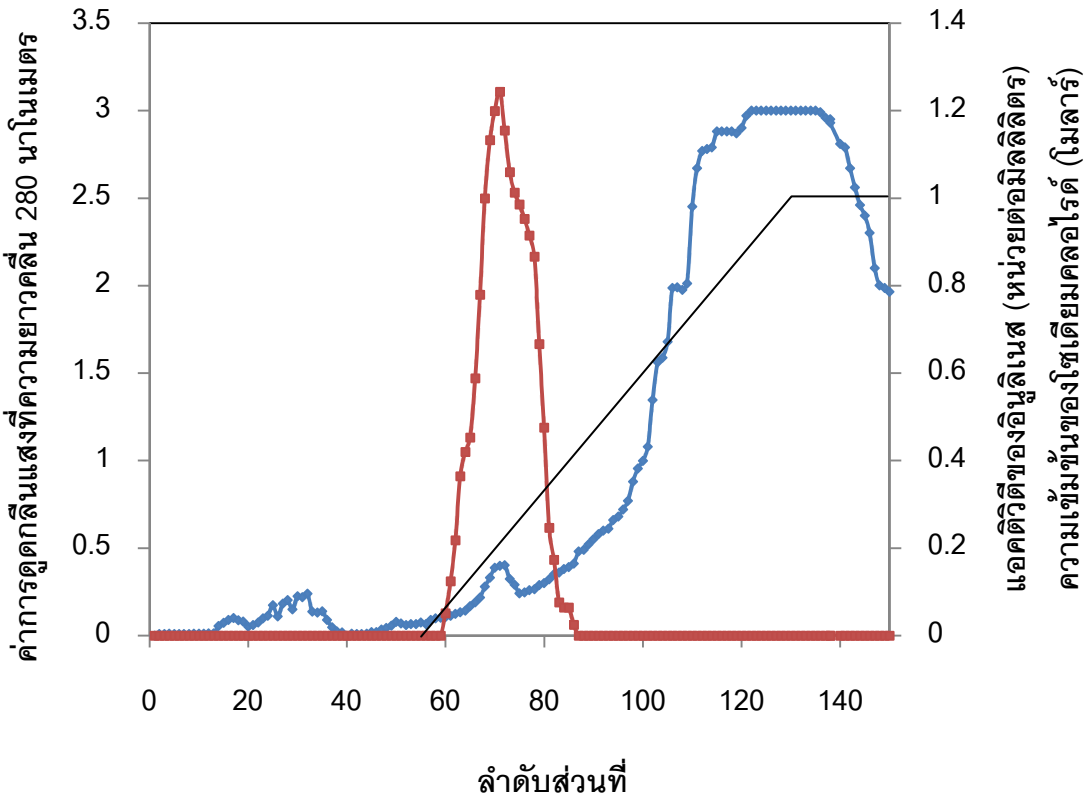
จากนั้นนำเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.3.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2.2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี 4 ชนิด คือ แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน และ ไฮดรอกซีอะปาไทต์ ตามลำดับ

4.3.3.1 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี

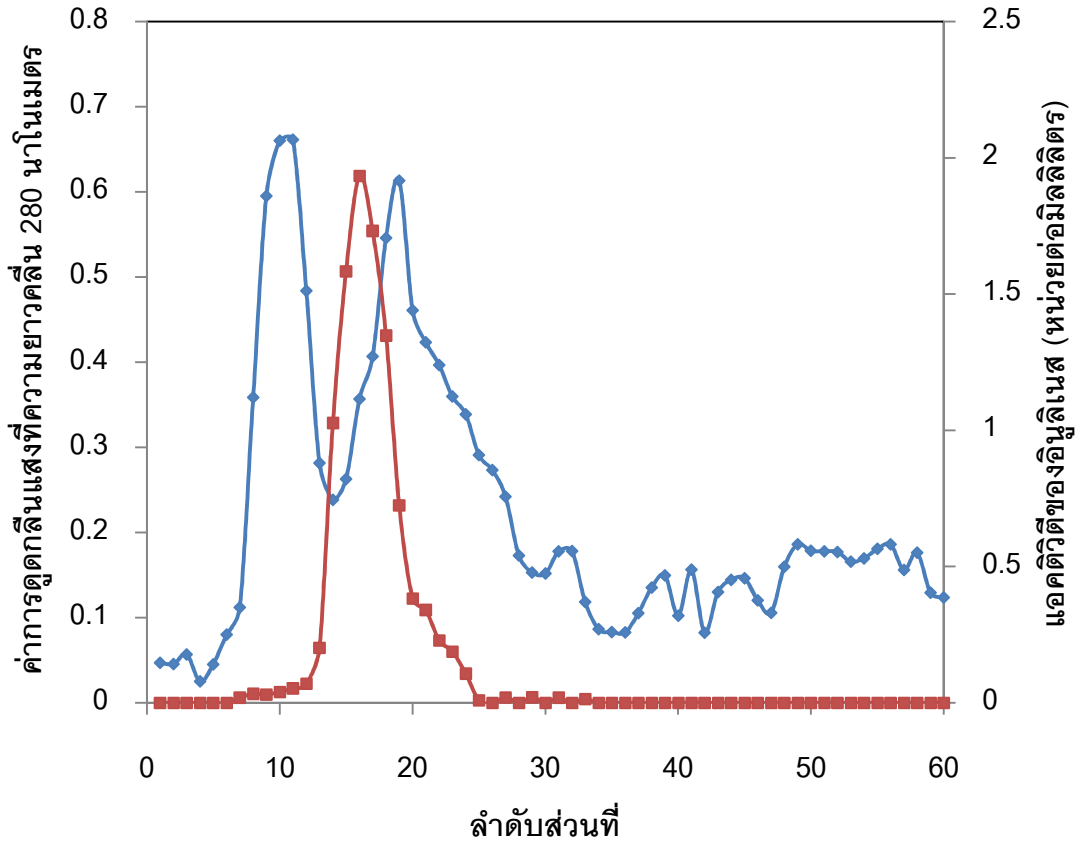
นำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นปริมาณโปรตีน 67.5 มิลลิกรัม ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการ reverse dialyze ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออีซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ (anion exchanger) ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3.1และชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ ดังนั้นจึงสามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไป ส่วนอินูลิเนสที่จับอยู่กับคอลัมน์ ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.12-0.34 โมลาร์ ขณะที่โปรตีนปนเปื้อนส่วนใหญ่ยังจับกับคอลัมน์ค่อนข้างแน่น จึงได้รวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์คือ 62-81 เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งมี แอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 404.4 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 4.9. มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 83.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นสูงถึง 19.1 เท่า และยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 31.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ชะโปรตีนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5.

4.3.3.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์

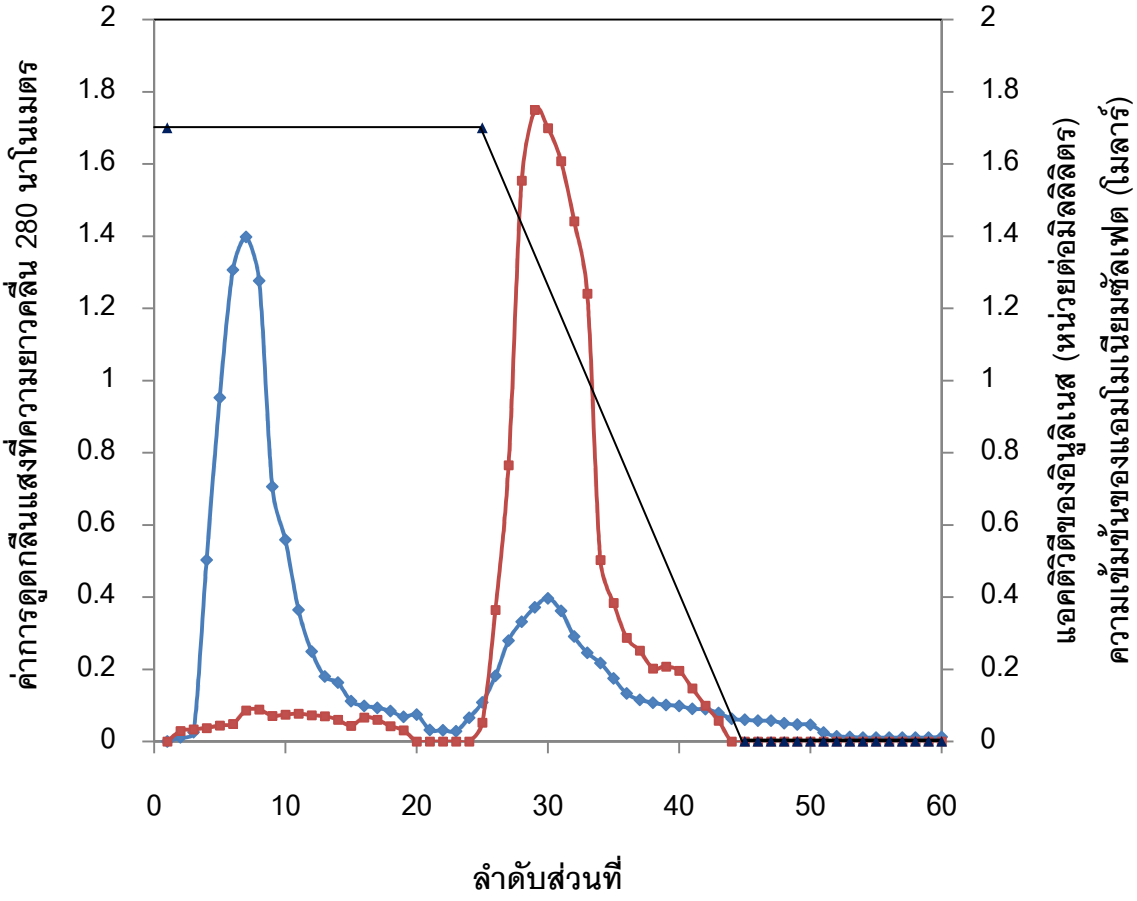
นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.3.3.1 ปริมาณโปรตีน 4.9 มิลลิกรัม ซึ่งละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 และผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการ reverse dialyze ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3.2 ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่าอินูลิเนสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 13-21 เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของอินูลิเนสเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 172.7 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 1.0. มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 167.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 38.6 เท่า และยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 13.5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.2 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ (Sephacryl S-200 HR®) ชะโปรตีนด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

4.3.3.3 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ในข้อ 4.3.3.2 คิดเป็นปริมาณโปรตีน 1.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ของ ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน และชะโปรตีนที่มีสมบัติที่ชอบน้ำออกจากโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ผลการทดลองในภาพที่ 4.3 พบว่าเอนไซม์มีสมบัติค่อนข้างไฮโดรโฟบิคโดยจับกับตัวกลางในคอลัมน์ชนิดนี้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงสามารถกำจัดโปรตีนที่มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลลิคโดยไม่จับกับคอลัมน์ซึ่งมีปริมาณมากออกไปได้ ส่วนอินูลิเนสถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 26-38 ซึ่งมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 1.6-0.7 โมลาร์ จึงรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นนำไปไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เพื่อกำจัดเกลือออก สุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 วัดปริมาตรรวมได้ 3.5 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 69.4 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.4 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 192.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 44.4 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 5.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4.3 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน ซะโปรตีนด้วย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 และเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

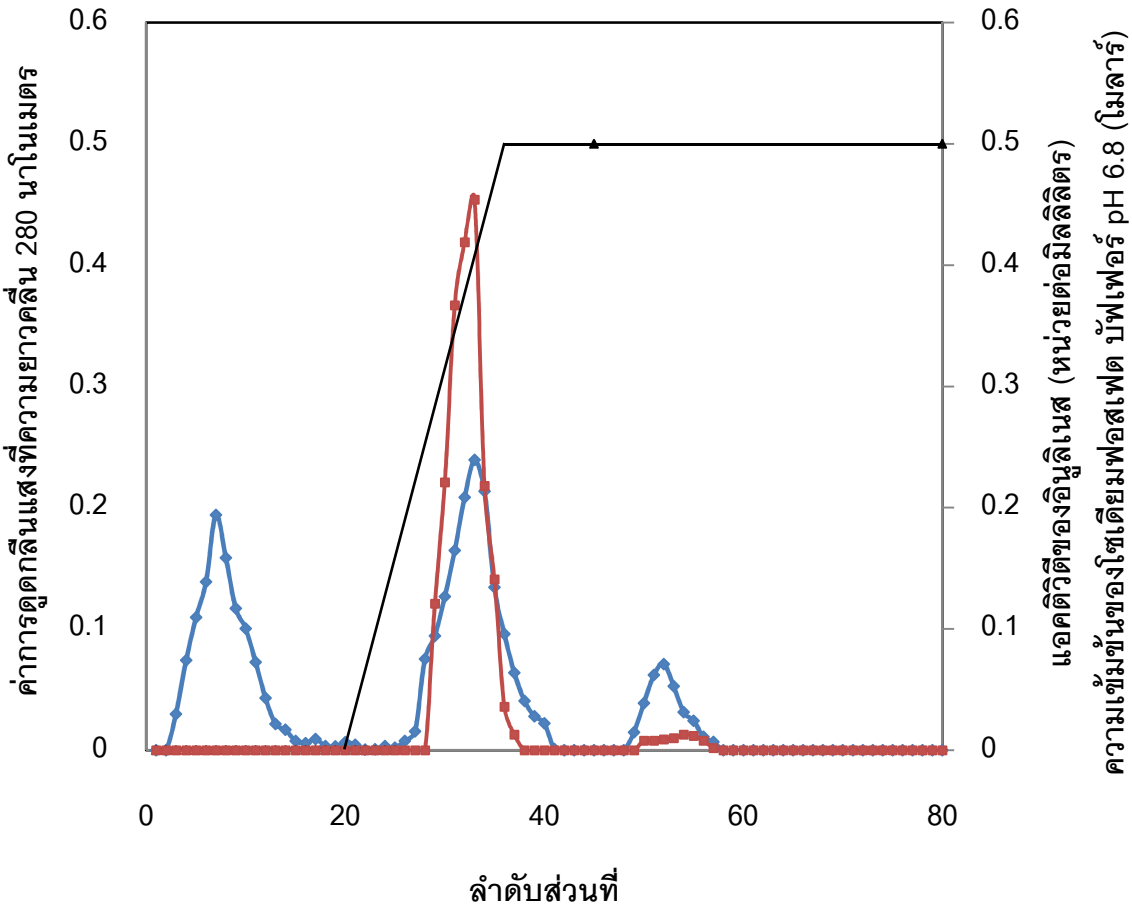
แอคติวิตีของอินูลิเนส

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต

4.3.3.4 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์

ไฮดรอกซีอะปาไทต์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของแคลเซียมฟอสเฟต มีคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟีที่เรียกว่า “mixed mode” ion exchange เพราะแคลเซียมมีประจุบวกสามารถจับกับหมู่คาร์บอกซิล ขณะที่ฟอสเฟตมีประจุลบสามารถจับกับหมู่อะมิโนของโปรตีน แต่การจับกันมีลักษณะค่อนข้างซับซ้อนกว่า ion exchange chromatography ทั่วไป จึงทำให้สามารถแยกโปรตีนที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันออกจากกันได้ (Bio-Rad Laboratories Bulletin 2156, 2009)

การทดลองนี้จึงนำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนบิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชันในข้อ 4.3.3.3 คิดเป็นปริมาณโปรตีนรวม 0.36 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ ชะโปรตีนที่จับกับตัวกลางด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ 20-500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ผลการทดลองดังในภาพที่ 4.4 พบว่าโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลางในคอลัมน์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ ส่วนอินูลิเนสจะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 26-38 ซึ่งมีความเข้มข้นของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ในช่วง 0.08-0.29 โมลาร์ เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของอินูลิเนสเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้นแล้ว วัดปริมาตรรวมได้ 2.00 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 23.2 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 290.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 66.9 เท่า และยังคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 1.8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)



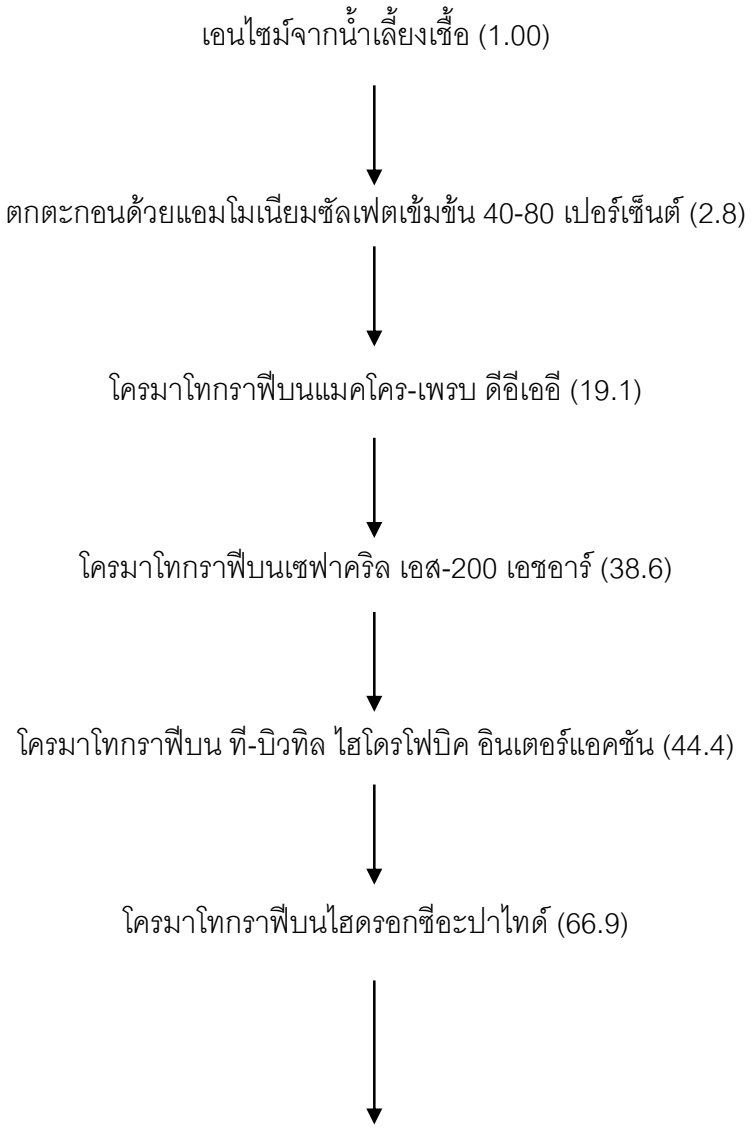
ภาพที่ 4.4 การทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยโดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ ชะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 และเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่ความเข้มข้น 0.02-0.50 โมลาร์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

แอคติวิตีของอินูลิเนส

ความเข้มข้นของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8

ได้สรุปขั้นตอนการทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์ พร้อมทั้งจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละขั้นตอนเมื่อเทียบกับเอนไซม์ตั้งต้น ดังแสดงใน ภาพที่ 4.5



หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์เมื่อเทียบกับเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

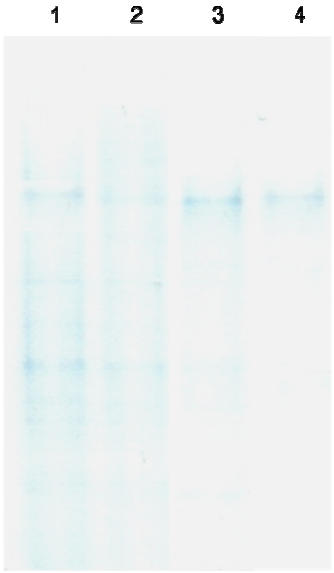
ภาพที่ 4.5 สรุปขั้นตอนการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.2 สรุปผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนการทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีทั้งหมดของอินูลิเนส (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะของอินูลิเนส (หน่วยต่อ มก.โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีของอินูลิเนส	ความบริสุทธิ์ของอินูลิเนส (เท่า)
1. เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ	460.0	294.4	1,278.0	4.3	100.0	1.0
2. ตกตะกอนด้วย 40-80 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต	13.50	67.5	809.9	12.00	63.4	2.8
3. แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี	7.2.	4.9	404.4	83.0	31.6	19.1
4. เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์	4.0	1.0	172.7	167.7	13.5	38.6
5. ที-บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน	3.5	0.4	69.4	192.2	5.4	44.4
6. ไฮดรอกซีอะปาไทต์	2.0	0.08	23.2	290.2	1.8	66.9

4.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆปริมาณเท่ากัน มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสชนิดแผ่น ย้อมโปรตีนด้วยสีคูแมสซีบลู ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่าจำนวนแถบโปรตีนค่อยๆลดลงในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสอดคล้องกับแอคติวิตีจำเพาะที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยในขั้นตอนสุดท้าย ที่ผ่านโครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทด์ พบเพียงแถบเดียว ซึ่งแสดงว่างานวิจัยนี้สามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ถึงระดับโปรตีนเดี่ยว (homogeneity)



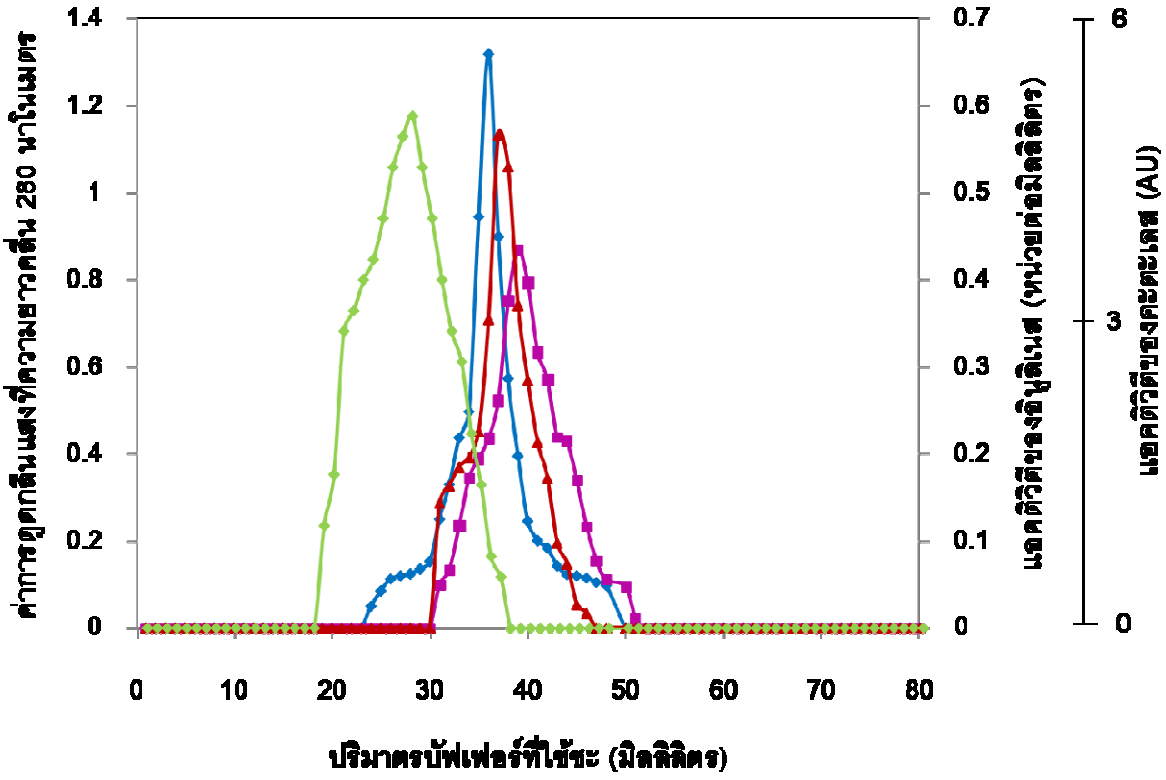
ภาพที่ 4.6 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิสของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ (5 ไมโครกรัม)

แถวที่ 1 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี
แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-200 เอชอาร์
แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน
แถวที่ 4 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์

4.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส

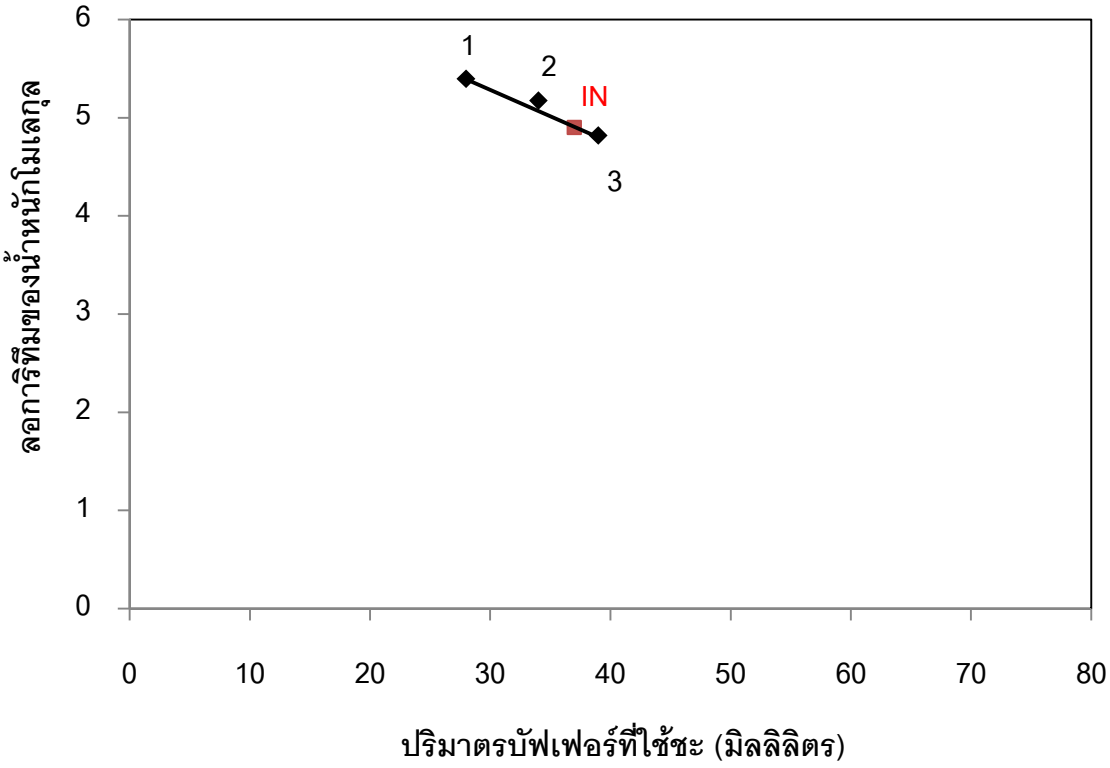
4.5.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสโดยการทำเจลฟิลเทรชันผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์

การทดลองนี้ได้หาน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสโดยการทำเจลฟิลเทรชัน โดยใช้โปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ได้แก่ คะตะเลส 250,000 ดาลตัน กลอบูลิน 150,000 และโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 66,000 ดาลตัน ตามลำดับ เป็นโปรตีนมาตรฐาน ผ่านโปรตีนเหล่านี้ลงบนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกัน และภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส ติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.7 เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ ได้ผลดังภาพที่ 4.8 จากกราฟดังกล่าวพบว่า อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73,000 ดาลตัน



ภาพที่ 4.7 การทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ ของอินูลิเนสเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

◆	คะตะเลส	น้ำหนักโมเลกุล 250,000 ดาลตัน
◆	กลอบูลิน	น้ำหนักโมเลกุล 150,000 ดาลตัน
■	โบวีนซีรัมอัลบูมิน	น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน
▲	อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp.CP01	น้ำหนักโมเลกุล 73,000 ดาลตัน



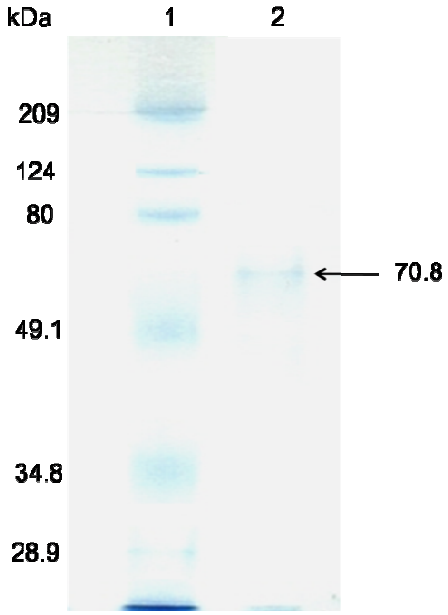
ภาพที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์

1. คะตะเลส น้ำหนักโมเลกุล 250,000 ดาลตัน
2. กลอบูลิน น้ำหนักโมเลกุล 150,000 ดาลตัน
3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน

IN คือ อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp.CP01 น้ำหนักโมเลกุล 73,000 ดาลตัน

4.5.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (SDS-PAGE)

การทดลองนี้ทำโดยนำอินูลิเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.9 พบว่าอินูลิเนสให้แถบโปรตีนเด่นชัดเพียงแถบเดียว และจากการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิ อะคริลาไมด์เจล ดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่าแถบโปรตีนเด่นชัดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70,800 ดาลตัน และ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยวิธีเจลฟิลเตรชันประมาณ 73,000 ดาลตัน แสดงว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วยสายเพบไทด์เดียว ไม่มีหน่วยย่อย



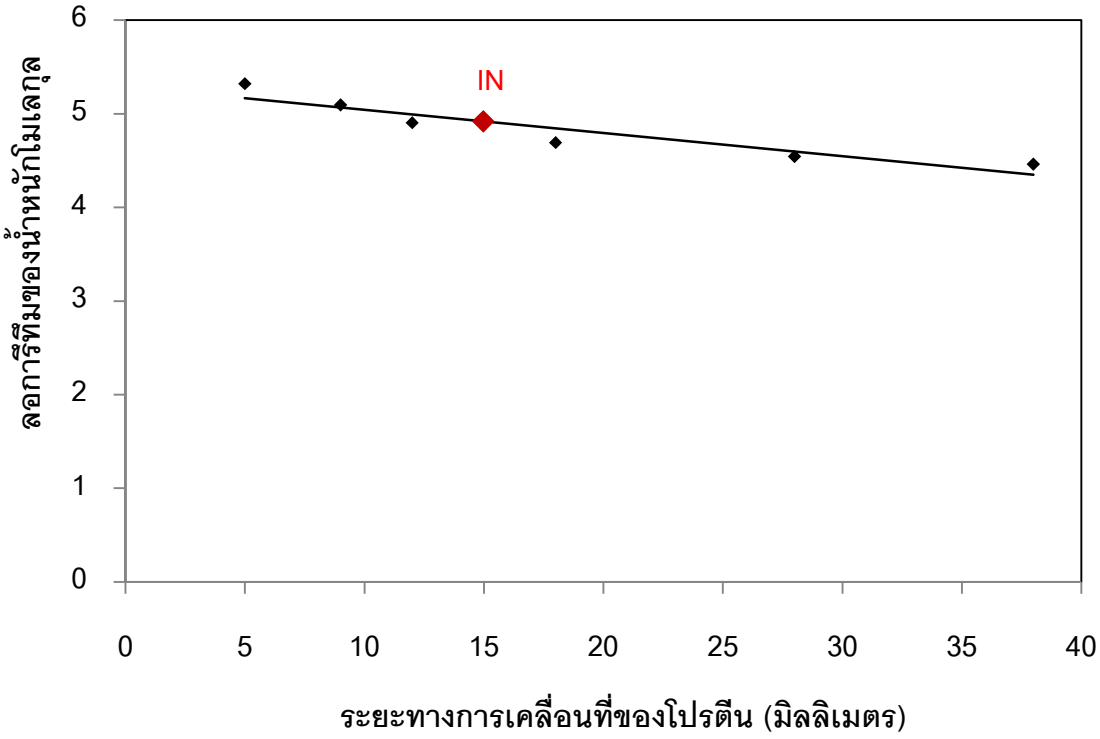
ภาพที่ 4.9 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียม-โดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมล์เจล

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 อินูลิเนสที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ (5.0 ไมโครกรัม)

โปรตีนมาตรฐานได้แก่

1. ไมโอซิน (myosin) น้ำหนักโมเลกุล 209 กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลคโตสิเดส (β-galactosidase) น้ำหนักโมเลกุล 124 กิโลดาลตัน
3. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน
4. โอวัลบูมิน (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 49.1 กิโลดาลตัน
5. คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 34.8 กิโลดาลตัน
6. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 28.9 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

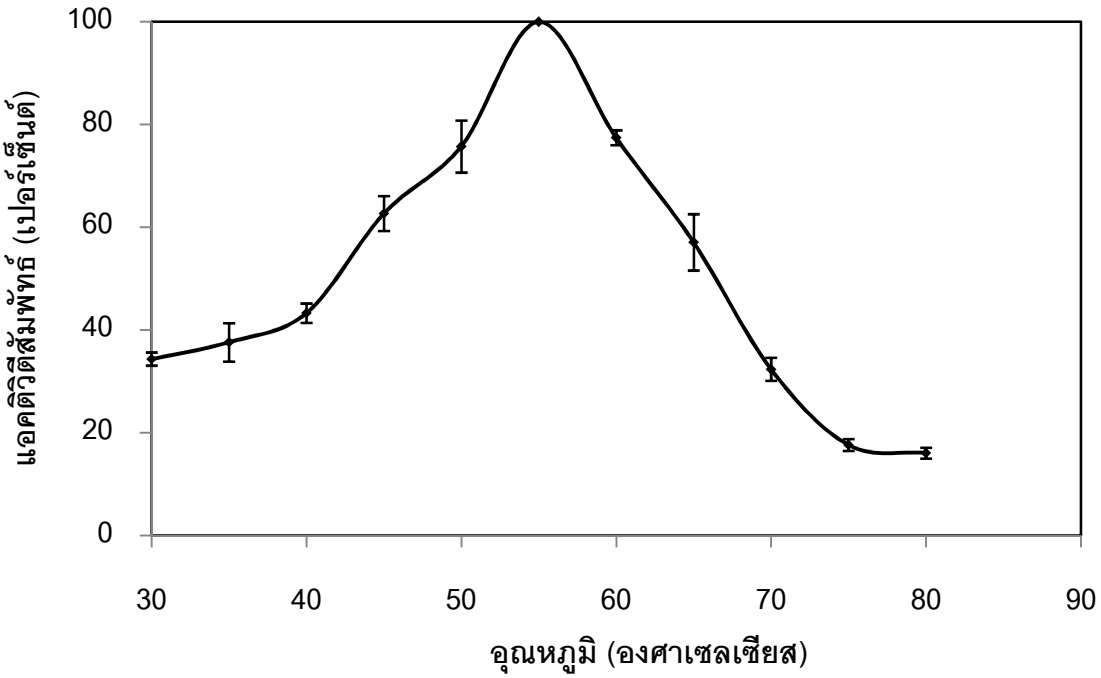
1. ไมโอซิน (myosin)	น้ำหนักโมเลกุล	209	กิโลดาลตัน
2. บีตา-กาแลคโตสิเดส (β-galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล	124	กิโลดาลตัน
3. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin)	น้ำหนักโมเลกุล	80	กิโลดาลตัน
4. โอวัลบูมิน (ovalbumin)	น้ำหนักโมเลกุล	49.1	กิโลดาลตัน
5. คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล	34.8	กิโลดาลตัน
6. ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor)	น้ำหนักโมเลกุล	28.9	กิโลดาลตัน
IN คือ อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp.CP01	น้ำหนักโมเลกุล	70.8	กิโลดาลตัน

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

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

4.6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณเท่าๆ กัน มาหาแอคติวิตีของอินูลิเนส โดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามที่ 50 และ60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็ยังมีแอคติวิตีสูงถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และที่ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็ยังสามารถทำงานได้เกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีสูงสุด ดังภาพที่ 4.11

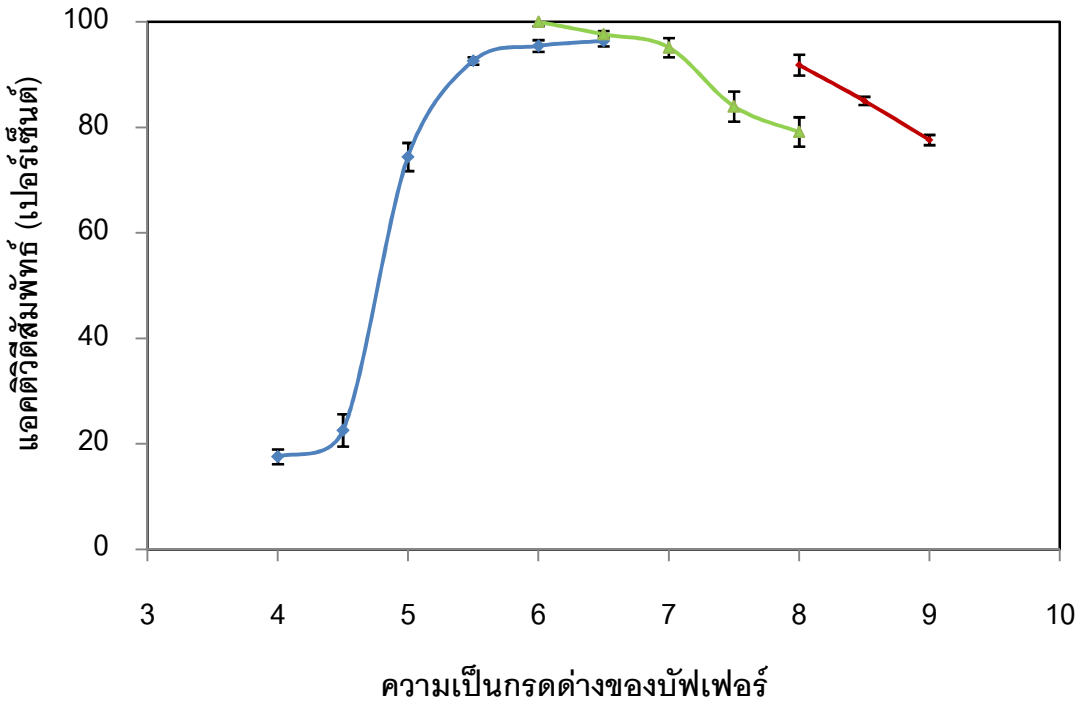


ภาพที่ 4.11 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

กำหนดให้อินูลิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (แอคติวิตีของอินูลิเนสเท่ากับ 19.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.6.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.12 พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่าง 5.5-7.0 โดยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์นี้



ภาพที่ 4.12 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนส

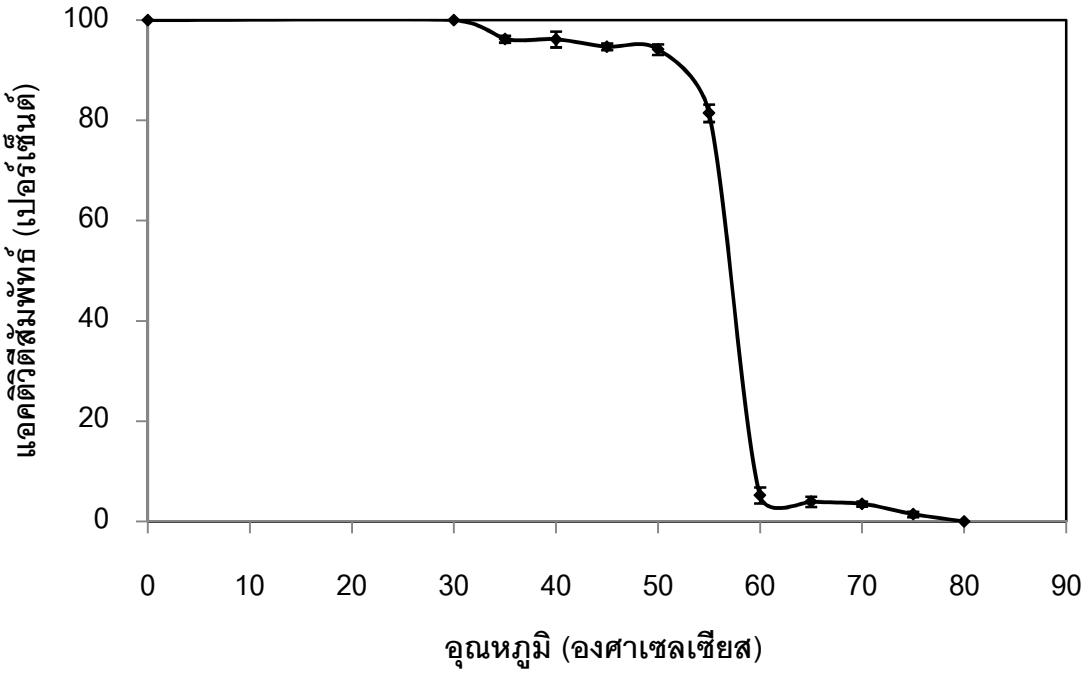
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.0
50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

กำหนดให้อินูลิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (แอคติวิตีของอินูลิเนสเท่ากับ 23.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

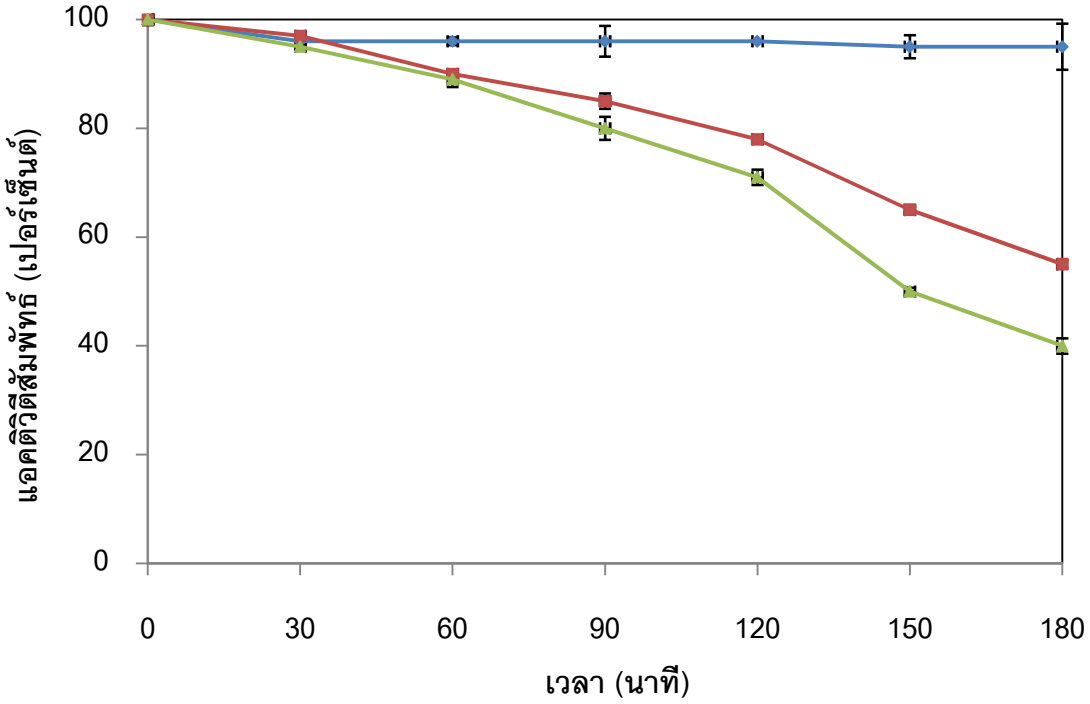
4.6.3 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิ

นำอินูลิเนสมาบ่มโดยไม่มีสับสเตรทที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 0-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.13 พบว่าอินูลิเนสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส แต่ที่ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว

งานวิจัยนี้ยังได้ทดสอบความเสถียรเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ โดยไม่มีสับสเตรทที่อุณหภูมิที่เอนไซม์มีความเสถียร คือที่อุณหภูมิ 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 60 90 120 150 และ 180 นาที ตามลำดับ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.14 พบว่าเอนไซม์นี้ทนร้อนได้ค่อนข้างดี โดยเมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานถึง 180 นาที ยังคงมีแอคติวิตีค่อนข้างคงที่ และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอคติวิตีลดลงบ้างแต่ก็ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ค่อนข้างสูงคือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ



ภาพที่ 4.13 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที



ภาพที่ 4.14 ความเสถียรของอินูลิเนสต่ออุณหภูมิต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 90 นาที

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

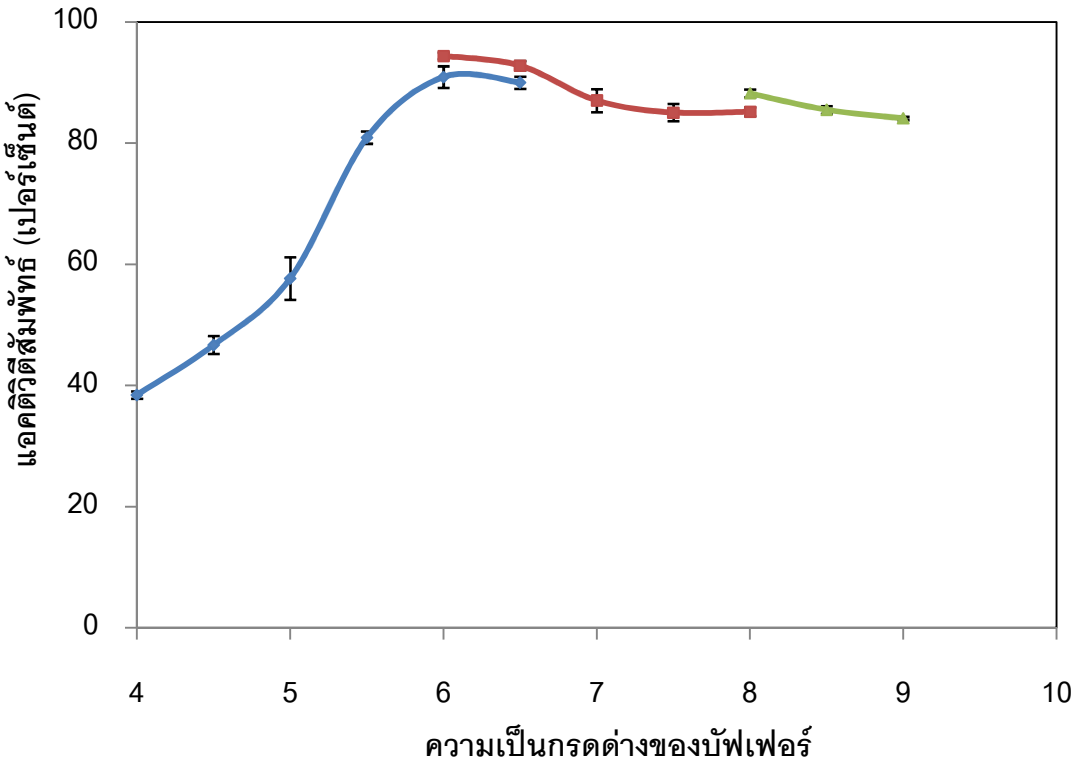
อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

กำหนดให้อินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มมีแอคติวิตีเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (แอคติวิตีของอินูลิเนสเท่ากับ 22.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.6.4 ความเสถียรของอินูลิเนสต่อความเป็นกรดด่าง

นำอินูลิเนสมาบ่มโดยไม่มีสับสเตรทในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่แปรค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่โดยทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังในภาพที่ 4.15 พบว่าอินูลิเนสเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.5-9.0 โดยยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.15 ความเสถียรของอินูลิเนสต่อความเป็นกรดด่างเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4.0-6.5

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 6.0-8.0

50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 8.0-9.0

กำหนดให้อินูลิเนสที่ไม่ผ่านการบ่มมีแอคติวิตีเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (แอคติวิตีของอินูลิเนสเท่ากับ 22.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.6.5 การตรวจสอบการเป็นเอกโซหรือเอนโดอินูลิเนส

4.6.5.1 การตรวจสอบความจำเพาะของอินูลิเนสและอินเวอร์เทส

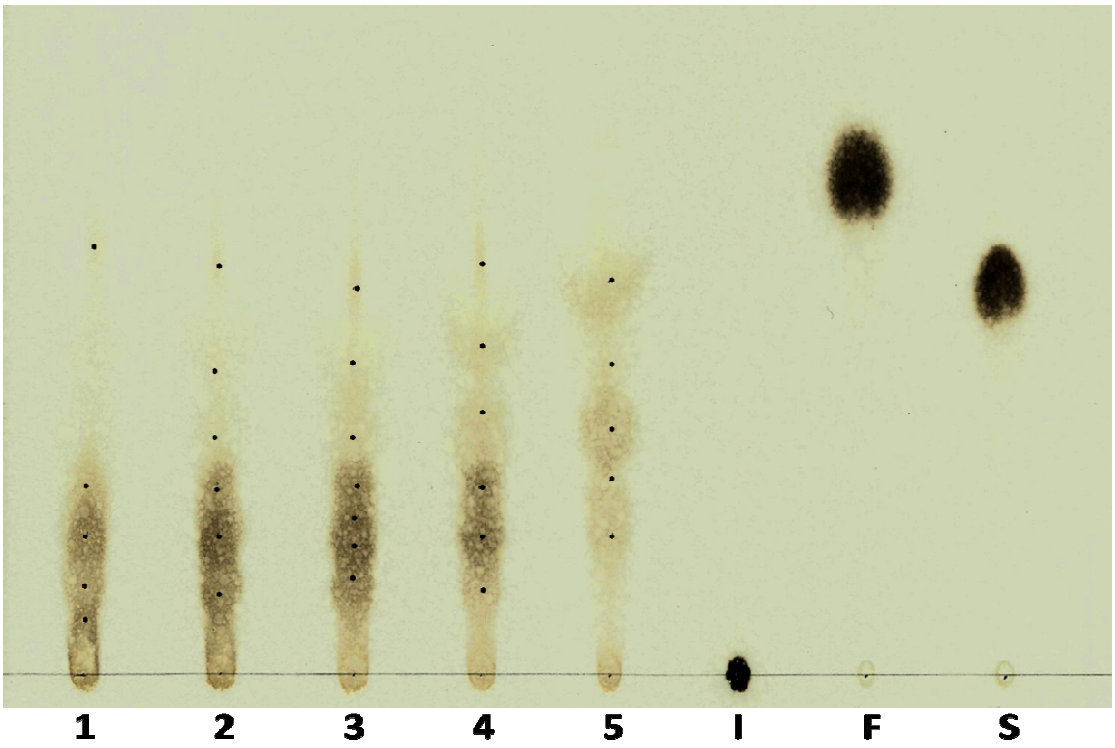
การทดลองนี้ได้นำอินูลิเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาตรวจสอบแอคติวิตีของอินเวอร์เทสหรือความสามารถในการเป็นเอกโซอินูลิเนส คือการย่อยสับเสตรทจากปลายสาย โดยวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 3.3.7.5 ได้ผลดังตารางที่ 4.3 พบว่าเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. CP01 มีแอคติวิตีของอินูลิเนสสูงกว่าแอคติวิตีของอินเวอร์เทส โดยพบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ มีค่า I/S ratio ค่อนข้างสูงคือ 210.56 ซึ่งสอดคล้องกับ Ettalibi และ Baratti (1987) ที่ระบุว่าเอนโดอินูลิเนสมีค่า I/S ratio > 10^{-2} ขณะที่เอกโซอินูลิเนสจะมีค่า I/S ratio < 10^{-4} ดังนั้นจากข้อมูลที่ได้ แสดงว่าเอนไซม์นี้มีสมบัติเป็นเอนโดอินูลิเนส

ตารางที่ 4.3 การตรวจสอบความจำเพาะของอินูลิเนสและอินเวอร์เทส

ขั้นตอนการทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)		I/S ratio
	อินูลิเนส	อินเวอร์เทส	
1. เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ	0.87	0.02	41.25
2. ตกตะกอนด้วย 40-80 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต	55.28	1.49	37.14
3. แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี	64.41	1.41	45.64
4. เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์	16.43	0.22	75.00
5. บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน	17.19	0.08	210.56

4.6.5.2 การตรวจสอบการเป็นเอกโซหรือเอนโดอินูลิเนสโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatography)

การทดลองนี้ได้ศึกษาการเป็นเอกโซหรือเอนโดอินูลิเนส โดยบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 20 30 60 และ 90 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์อินนูลินด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ คลอโรฟอร์ม กรดแอซิติก และน้ำ และตรวจหาผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์อินนูลินด้วยการฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที เมื่อน้ำตาลทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกจะเกิดเป็นจุดสีน้ำตาล แล้วเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน คือ อินนูลิน ฟรักโทส และซูโครส พบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการไฮโดรไลซ์อินนูลินของอินูลิเนสได้แก่ อินนูโลไอลิโกแซคาไรด์ เกิดเป็นจุดสีน้ำตาล และเมื่อบ่มเป็นเวลานานขึ้นอินนูลินจะถูกย่อยให้ผลิตภัณฑ์โมเลกุลเล็กเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.16 ซึ่งแสดงถึงการทำงานแบบเอนโด-เอนไซม์ จึงสรุปได้ว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีสมบัติเป็นเอนโดอินูลิเนส



ภาพที่ 4.16 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์อินนูลินด้วยอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 โดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatography)

1. บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที
2. บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาที
3. บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที
4. บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 60 นาที
5. บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 90 นาที

I คือ อินนูลิน

F คือ ฟรักโทส

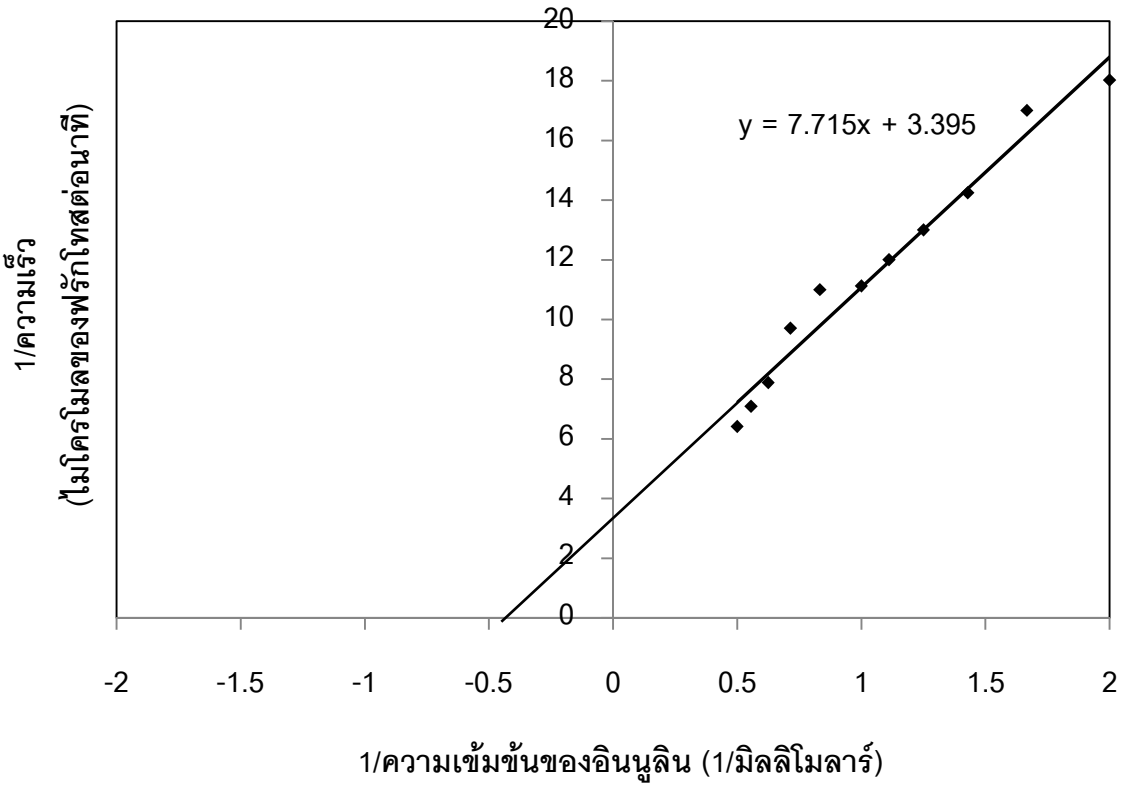
S คือ ซูโครส

4.6.6 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) ของอินูลิเนส

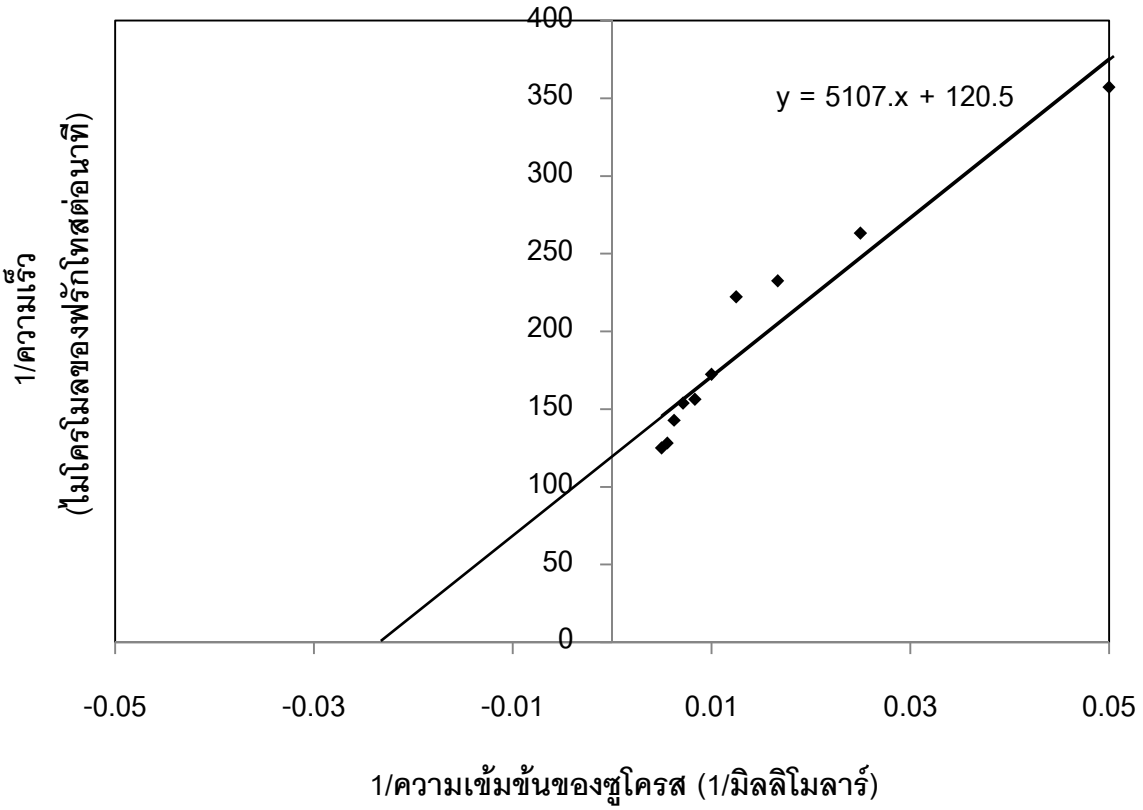
การทดลองนี้ได้ศึกษาความจำเพาะของอินูลิเนสต่อสับสเตรทได้แก่ อินนูลินและซูโครส โดยแปรความเข้มข้นของสับสเตรทในช่วง 0.5-2.0 มิลลิโมลาร์ สำหรับอินนูลิน และ 20-200 มิลลิโมลาร์ สำหรับซูโครส จากการเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) สรุปดังตารางที่ 4.4 พบว่าอินูลิเนสมีค่า K_m และ ค่า V_{max} สำหรับอินนูลินเท่ากับ 2.34 มิลลิโมลาร์ และ 440 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 4.17 และมีค่า K_m และ ค่า V_{max} สำหรับซูโครส เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ และ 12.31 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 4.18

ตารางที่ 4.4 ค่าความจำเพาะต่อสับเสตรท (K_m) ของอินูลิเนส

สับสเตรท	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
อินนูลิน	2.34	440
ซูโครส	40	12.31



ภาพที่ 4.17 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของอินูลิเนสต่ออินนูลิน



ภาพที่ 4.18 ไลน์วีเวอร์-เบิร์กพลอตในการหาค่า K_m ของอินูลิเนสต่อซูโครส

4.6.7 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอินูลิเนส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอิออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 โดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซ์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของ EDTA เพื่อกำจัดอิออนออกจากโมเลกุลก่อน มาบ่มกับอิออนของโลหะชนิดต่างๆ ที่แปรให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ถูกกำจัดอิออนออกโดย EDTA พบว่าอิออนของโลหะที่นำมาทดสอบมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์แตกต่างกันทั้งในแง่ ยับยั้ง และส่งเสริม ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า Hg^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างรุนแรง ขณะที่ Fe^{2+}และ Zn^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีเล็กน้อย สำหรับ Ca^{2+} ไม่มีผลต่อเอนไซม์ ส่วน Na^{+} Cu^{2} Mn^{2+} Mg^{2+} และ Co^{2+} มีผลในการส่งเสริมแอคติวิตีของเอนไซม์โดย Mn^{2+} เป็นอิออนที่มีบทบาทสูงสุดในการส่งเสริมแอคติวิตีของเอนไซม์

ตารางที่ 4.5 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอินูลิเนส

ชนิดของอิออนโลหะ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
Control	100
None	81
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	92
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	72
$CuSO_4 \cdot 5H_20$	85
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	104
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	71
$MnSO_4 \cdot H_2O$	129
$CaCl_2 \cdot 5H_2O$	79
NaCl	89
$HgCl_2$	7

หมายเหตุ

Control คือ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ไม่ผ่านการไดอะไลซ์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของ EDTA และวิเคราะห์วิธีมาตรฐาน และกำหนดให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์

None คือ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านการไดอะไลซ์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ของ EDTA และวิเคราะห์วิธีมาตรฐานโดยไม่เติมอิออนโลหะใดๆ ในปฏิกิริยา

4.6.8 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอินูลิเนส

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานอินูลิเนส เพื่อทดสอบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีกรดอะมิโนใดอยู่บริเวณ active site โดยการนำเอนไซม์มาบ่มกับสารดัดแปลงกรดอะมิโน ดังนี้ ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC) ดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิล (COOH), iodoacetamide (IAM) ดัดแปลงหมู่ซีสเทอีน (cysteine) phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ดัดแปลงหมู่เซรีน(serine) และ N-bromosuccimide (NBS) ดัดแปลงหมู่ทริปโตเฟน (tryptophan) ที่แปรความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า NBS มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ส่วน IAM ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้ถึง 38 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองคาดว่า อินูลิเนสน่าจะมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนและซีสเทอีนเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site ของเอนไซม์

ตารางที่ 4.6 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอินูลิเนส

ชนิดของสารดัดแปลงกรดอะมิโน	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ความเข้มข้นของสารดัดแปลงกรดอะมิโน (มิลลิโมลาร์)	
	1.0	10.0
Control	100	100
Iodoacetamide (IAM)	87.8	62.1
Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC)	101.5	98.7
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	97.34	91.5
N-Bromosuccimide (NBS)	0	0

ผลการศึกษาลักษณะสมบัติของอินูลิเนสบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. CP01 ได้สรุปดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตาราง 4.7 ลักษณะสมบัติของอินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CP01

ลักษณะสมบัติของเอนไซม์	อินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CP01
1. น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน	73,000 ดาลตัน
2. น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE	70,800 ดาลตัน
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	55 องศาเซลเซียส
4. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน	6.0
5. ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	30-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
6. ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	5.0-9.0
7. ชนิดของอินูลิเนส	เอนโดอินูลิเนส
8. ค่า K_m	อินนูลิน เท่ากับ 2.34 มิลลิโมลาร์ ซูโครส เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์
9. ค่า V_{max}	อินนูลิน เท่ากับ 440 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซูโครส เท่ากับ 12.31 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน
10. ผลของอิออนโลหะ	Mn^{2+} และ Co^{2+} มีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
11. ผลของสารดัดแปลงหมู่อะมิโน	NBS และ IAM แสดงว่า อินูลิเนสน่าจะมีกรดอะมิโน ทริปโตเฟนและซีสเทอีน เกี่ยวข้องกับบริเวณ active site ของเอนไซม์ โดยทริปโตเฟนน่าจะอยู่ในบริเวณที่สำคัญ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Streptomyces sp. CP01 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยโดย รุ่งตระการ จันทนพันธ์ (2552) ซึ่งพบว่าสามารถผลิตอินูลิเนสได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับ *Streptomyces* อื่นๆ ที่มีการรายงานไว้ (Sharma และ Gill,2007) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ โดยในขั้นตอนแรกได้ทดลองตกตะกอนโปรตีนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเอนไซม์ตกตะกอนได้ดีในช่วงความเข้มข้น 40-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคล้ายกับอินูลิเนสจาก *Aspergillus fumigatus* (Gill และคณะ, 2006) และ *Streptomyces* sp. (Sharma และ Gill,2007) แต่ในขั้นตอนการทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางในคอลัมน์และถูกชะออกจากคอลัมน์โดยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.12-0.34 โมลาร์ ซึ่งต่างจากอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp.ที่รายงานโดย Sharma และ Gill (2007) ว่าถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ต่ำกว่า คือ 0.02-0.24 โมลาร์ อินูลิเนสจาก *Xanthomonas oryzae* No.5 โดย Cho และ Yun (2002) ว่าถูกชะออกจากคอลัมน์โดยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.20-0.40 โมลาร์ แสดงว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันน่าจะมีองค์ประกอบกรดอะมิโนที่ต่างกันจึงทำให้มีประจุรวมของโปรตีนแตกต่างกัน จากนั้นนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชัน แล้วนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนบิวทิลไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน โดยอินูลิเนสจับกับตัวกลางในคอลัมน์และถูกชะด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.6-0.7 โมลาร์ แสดงว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces sp.* CP01 มีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก ซึ่งสอดคล้องกับอินูลิเนสจาก *Arthrobacter* sp. (Kang และคณะ, 1998) *Aspergillus fumigatus* (Gill และคณะ, 2006) และ *Aspergillus janczewskii* (Pessoni, 2007) ซึ่งมีรายงานว่ามีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก แสดงว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ มีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก และขั้นตอนสุดท้ายของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทต์ มีคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟีที่เรียกว่า “mixed mode” ion exchange จึงทำให้สามารถแยกโปรตีนที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันออกจากกันได้ (Bio-Rad Laboratories Bulletin 2156, 2009)

งานวิจัยนี้ได้ทำอินูลิเนสให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไปโดยผ่านสี่คอลัมน์ต่อเนื่องคือ ตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ เจลฟิลเทรชัน ไฮโดรโฟบิคอินเตอร์แอคชัน และ ไฮดรอกซีอะปาไทต์ พบว่าได้เอนไซม์บริสุทธิ์ถึงระดับโปรตีนเดี่ยว (homogeneity) ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึงประมาณ 67 เท่า และ เหลือแอคติวิตีอยู่ 1.8 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Sharma และ Gill (2007) ทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. ให้บริสุทธิ์ โดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี บนตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ (DEAE-Sephacel) และตามด้วย affinity chromatography บน ConA-CL-Agarose ได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 18 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 4.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดว่าเหลือเอนไซม์ค่อนข้างน้อยเพราะมีการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพียงสองขั้นตอนเท่านั้น นอกจากนี้จากรายงานของ Ohta และคณะ (2002) ที่ทำอินูลิเนสจาก *Rhizopus* sp. TN-96 ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโทกราฟีบน DEAE-Cellulofine A-500 ตามด้วย Sephacryl S-200 HP พบว่าได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 12 เท่า และเหลือแอคติวิตีน้อยมากเพียง 0.57 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อเทียบกับรายงานดังกล่าวข้างต้นจึงจัดว่างานวิจัยนี้สามารถทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces sp.* CP01 ให้มีความบริสุทธิ์ได้สูงมากและมีเอนไซม์เหลือ (yield) อยู่มากพอสมควร

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ โดยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73,000 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยวิธีอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล เท่ากับ 70,800 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่วิเคราะห์โดย เจลฟิลเทรชัน แสดงว่าเอนไซม์นี้เป็นโปรตีนสายเดี่ยวไม่มีหน่วยย่อย ซึ่งคล้ายกับอินูลิเนสส่วนใหญ่ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตาราง 5.1 ซึ่งตารางนี้เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่ามีความหลากหลายโดยมีขนาดตั้งแต่ ประมาณ 40,000 – 200,000 ดาลตัน สำหรับอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. (ซึ่งเป็นรายงานเดียวที่กล่าวถึงการทำให้บริสุทธิ์) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน (Sharma และ Gill, 2007) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ แสดงว่า *Streptomyces* ต่างสายพันธุ์ผลิตอินูลิเนสได้แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดผลิตอินูลิเนสได้มากกว่า 1 ชนิด เช่น *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 สามารถผลิตอินูลิเนสได้ 5 ชนิด ทั้ง endo- และ exo-inulinase ได้แก่ Exo-I , Exo-II , Exo-III , Endo-I และ Endo-II ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70,000, 40,000, 46,000, 34,000 และ 31,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Chen และคณะ 2009)

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน) (เจลฟิลเทรชัน)	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน) (SDS-PAGE)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. CP01	73,000	70,800	งานวิจัยนี้
Alternaria alternata	68,000	66,000	Sanal และคณะ, 2005
		66,000	
Aspergillus fumigatus	200,000	62,700	Gill และคณะ, 2004
		59,400	
Aspergillus fumigatus	66,000	62,000	Gill และคณะ, 2006
Aspergillus niger Mutant 817	-	P-IA ; 70,000 P-IB ; 68,000	Nakamura และคณะ, 1994
Bacillus smithii T7	-	47,000	Gao และคณะ, 2009
Chrysosporium pannorum	56,000	58,000	Xiao และคณะ, 1989
Cryptococcus aureus G7a	-	60,000	Sheng และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus	77,000	57,000	Kushi และคณะ, 2000
Kluyveromyce marxianus CBS 6556	-	72,000	Rouwenhorst และคณะ, 1999
Kluyveromyces fragilis	-	250,000	Pandey และคณะ, 1999
Penicillium sp.TN-88	-	68,000	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	-	50,000	Gong และคณะ, 2008
Rhizopus sp. TN-96	-	83,000	Ohta และคณะ, 200)
Streptomyces sp.	-	45,000	Sharma และ Gill, 2007

การศึกษาสมบัติของอินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CP01 ในขั้นแรกศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอินูลิเนสพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus* (Kushi และคณะ,2000) และ *Pseudomonas mucidolens* (Kwon และคณะ, 2000) แต่สูงกว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus polymyxa* *Fusarium oxysporum* *Aspergillus niger* และ *Rhizopus* sp. TN96 ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 35, 35–45, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Kwon และคณะ, 2003; Kaur และคณะ, 1992; Nakamura และคณะ, 1994 Ohta และคณะ, 2002) จากข้อมูลนี้แสดงว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังพบว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกันไปดังตารางที่ 5.2

ในแง่ของผลความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ในช่วงกว้างคือที่ความเป็นกรดด่าง 5.5-7.0 โดยที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นี้ ซึ่งใกล้เคียงกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Pseudomonas mucidolens* (Kwon และคณะ, 2000), *Aspergillus fumigatus* (Gill และคณะ, 2004) และ *Streptomyces* sp (Sharma และ Gill, 2007) สำหรับอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่นๆส่วนมากทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกรดเช่น อินูลิเนสจาก *Bacillus smithii* T7 (Gao และคณะ ,2009) *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 (Chen และคณะ,2009) *Kluyveromyces marxianus* YS-1 (Singh และคณะ, 2007) *Cryptococcus aureus* G7a (Sheng และคณะ, 2008) ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างประมาณ 4.0-5.0 ซึ่งเมื่อเทียบกับอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 แล้วจัดว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีคุณสมบัติที่ดีกว่า เนื่องจากทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างที่ค่อนข้างเป็นกลางทำให้สามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดการปนเปื้อนของกรด

สำหรับความเสถียรของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 ต่ออุณหภูมิ พบว่าอินูลิเนสบริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 55 องศาเซลเซียสโดยเอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเอนไซม์โดยไม่มีสับสเตรทเป็นเวลา 30 นาที แต่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว ข้อมูลที่ได้นี้พบว่ายังดีกว่าอินูลิเนสจาก *Rhizopus* sp. TN-96 ที่เสถียรต่ออุณหภูมิเพียงแค่ 40 องศาเซลเซียส และสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที (Ohta และคณะ, 2002)

งานวิจัยนี้ยังได้ตรวจสอบต่อไปโดยบ่มอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01ที่อุณหภูมิ 40 45 และ50 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานยิ่งขึ้น คือ 3ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ค่อนข้างสูงคือประมาณ 95 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าอินูลิเนสจาก *Aspergillus fumigatus* ที่เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิ 50 และ55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงมีแอคติวิตีเหลืออยู่เพียง 35.9 และ 25.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Gill และคณะ, 2004) และยังดีกว่าอินูลิเนสจาก *Fusarium oxysporum* ที่เสถียรต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 10-15 นาที (Kaur และคณะ, 1992) รวมทั้งดีกว่าอินูลิเนสจาก *Penicillium* sp.TN-88 (Nakamura และคณะ, 1997) ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตามพบว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่นๆ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5.2

อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-9.0 ซึ่งจัดว่าเป็นช่วงที่ค่อนข้างกว้าง เมื่อเทียบอินูลิเนสจากจุลินทรีย์หลายชนิดที่รายงานไว้ เช่น อินูลิเนสจาก *Pichia guilliermondii* (Gong และคณะ, 2008) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-7.0 จาก *Kluyveromyces marxianus* (Singh และคณะ, 2007) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-6.5 และ จาก *Cryptococcus aureus* G7a (Sheng และคณะ, 2008) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 -6.5 นอกจากนี้พบว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่นๆ มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 สมบัติของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp.CP01	55	6.0	30-50 (3 ชั่วโมง)	5.0-9.0	งานวิจัยนี้
Arthrobacter sp.	50	7.5	30-40 (10 นาที)	-	Kang และคณะ, 1998
Aspergillus niger Mutant 817	40	5.0	30-50 (30 นาที)	3.0-8.0	Nakamura และคณะ, 1994
Aspergillus candidus	45	5.5	40 (1 ชั่วโมง)	-	Kochhar และคณะ, 1999
Bacillus polymyxa	35	7.0	-	-	Kwon และคณะ, 2003
Bacillus smithii T7	70	4.5	70 (9 ชั่วโมง) 80 (3.5 ชั่วโมง)	4.0-9.5	Gao และคณะ, 2009
Cryptococcus aureus G7a	50	5.0	65-70 (2 ชั่วโมง)	4.0-6.5	Sheng และคณะ, 2008
Chrysosporium pannorum	50	6.0-7.0	45 (10 นาที)	4.5-8.5	Xiao และคณะ, 1989
Fusarium oxysporum	45	4.0-5.5	50 (10 นาที)	5.5-6.5	Kaur และคณะ, 1992
Kluyveromyces marxianus	50	5.5	50 (3 ชั่วโมง)	4.5-6.5	Singh และคณะ, 2007
Kluyveromyces marxianus var.*bulgaricus*	55	4.75	40 (3.5 ชั่วโมง) 50 (40 นาที)	6.0-7.0	Kushi และคณะ, 2000
Penicillium purpurogenum	50	5.1	30-60 (30 นาที)	4.0-10.0	Onodera และคณะ, 1988

ตารางที่ 5.2 สมบัติของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Penicillium sp.TN-88	50	5.2	40 (30 นาที)	5.0-7.0	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	60	6.0	60 (2 ชั่วโมง)	6.0-7.0	Gong และคณะ, 2008
Pseudomonas mucidolens	55	6.0	-	-	Kwon และคณะ, 2000
Rhizoctonai solani	35	5.0	40 (20 นาที)	5.0-6.5	Ertan และคณะ, 2005
Rhizopus sp. TN-96	40	5.5	30 (30 นาที)	5.0-8.0	Ohta และคณะ, 2002
Streptomyces sp.	70	6.0	70 (72 ชั่วโมง)	4.0-9.0	Sharma และ Gill, 2007
Xanthomonas oryzae NO.5	50	7.5	45 (1 ชั่วโมง)	6.0-9.0	Cho และ Yun, 2002

อินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 พบว่ามีสมบัติเป็นเอนโดอินูลิเนส โดยมีค่า I/S ratio ค่อนข้างสูงคือ 210.56 แสดงว่ามีการย่อยสลายพันธะบีตา 2,1 ภายในโมเลกุลของอินูลินแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินูโลโอลิโกแซคาไรด์ซึ่งสอดคล้องกับ Ettalibi และ Baratti (1987) ที่ระบุว่าเอนโดอินูลิเนสมีค่า I/S ratio > 10^{-2} ขณะที่เอกโซอินูลิเนสจะมีค่า I/S ratio < 10^{-4} นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำปฏิกิริยาที่วิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่นบาง ยืนยันว่าอินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CP01 มีการทำงานแบบเอนโด-เอนไซม์ โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นอินูโลโอลิโกแซคาไรด์ (inulo-oligosaccharide) ซึ่งสอดคล้องกับเอนโดอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* มีค่า I/S ratio เท่ากับ 53 (Kango, 2008) *Penicillium purpurogenum* มีค่า I/S ratio เท่ากับ 4,140 (Onodera และ Shiomi, 1988) *Rhizopus* sp. TN-96 มีค่า I/S ratio เท่ากับ 53 (Ohta และคณะ, 2002) ซึ่งย่อยอินูลินแล้วให้ผลิตภัณฑ์ได้แก่ อินูโลไตรโอส (inulo-triose) อินูโลเตตระโอส (inulo-tetraose) และอินูโลเพนตะโอส (inulo-pentaose) ตารางที่ 5.3 ได้แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์ต่างๆ ที่มีการผลิตเอนโดอินูลิเนส และเอกโซอินูลิเนส

การศึกษาค่าความจำเพาะของอินูลิเนสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CP01 ต่อสับสเตรท คือ อินูลิน พบว่าอินูลิเนสมีค่า K_m ต่ออินูลิน เท่ากับ 2.34 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า K_m ต่ออินูลิน ของอินูลิเนสจาก *Bacillus smithii* T7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.17 มิลลิโมลาร์ (Gao และคณะ, 2009) และ *Kluyveromyces marxianus* var.*bulgaricus* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.9 มิลลิโมลาร์ (Singh และคณะ, 2007) ตามลำดับ สำหรับค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทอีกชนิดหนึ่งคือซูโครส พบว่า มีค่าเท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ซึ่งใกล้เคียงกับค่า K_m ต่อซูโครสของอินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 40.18 มิลลิโมลาร์ (Cruz-Guerrero และคณะ, 1995) แต่สูงกว่าค่า K_m ต่อซูโครสของอินูลิเนสจาก *Bacillus smithii* T7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 32.7 มิลลิโมลาร์ (Gao และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีค่า V_{max} สำหรับอินูลินค่อนข้างสูงคือ 440 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่า ค่า V_{max} ของ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 333.3 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Gill และคณะ, 2004) ดังนั้นจึงจัดได้ว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 มีสมบัติดีกว่าอินูลิเนสจากจุลินทรีย์หลายชนิดดังกล่าวข้างต้น โดยมีความจำเพาะต่ออินูลิน และให้ความไวของปฏิกิริยาสูง

ตาราง 5.3 เปรียบเทียบชนิดของอินูลิเนส ค่า K_m และ V_{max} ของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	ชนิดของอินูลิเนส	ชนิดของสับสเตรท	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. CP01	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน ซูโครส	2.34 40	440 12.31	งานวิจัยนี้
Arthrobacter sp.	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน	1.7	-	Kang และคณะ, 1998
Aspergillus niger Mutant 817	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน	P-IA ; 0.48 P-IB ; 0.50	P-IA ; 109 P-IB ; 139	Nakamura และคณะ, 1994
Bacillus polymyxa	เอกโซอินูลิเนส	อินนูลิน	0.7	2,500	Kwon และคณะ, 2003
Bacillus smithii T7	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน ซูโครส ราฟฟิโนส	4.17 32.7 5.75	833,3 270.3 172.4	Gao และคณะ, 2009
Kluyveromyces marxianus YS-1	เอกโซอินูลิเนส	อินนูลิน ซูโครส ราฟฟิโนส	3.4 25.3 2.7	7.6 16.6 2.0	Singh และคณะ, 2007

ตาราง 5.3 เปรียบเทียบค่า K_m และ V_{max} ของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

จุลินทรีย์	ชนิดของอินูลิเนส	ชนิดของสับสเตรท	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Kluyveromyces marxianus var.*bulgaricus*	เอกโซอินูลิเนส	อินนูลิน	86.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	53.7 มิลลิกรัมต่อนาที	Kushi และคณะ, 2000
		ซูโครส	4.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	240.0 มิลลิกรัมต่อนาที	
		ราฟฟิโนส	7.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	41.0 มิลลิกรัมต่อนาที	
Penicillium sp.TN-88	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน	0.20	106	Nakamura และคณะ, 1997
Pichia guilliermondii	เอกโซอินูลิเนส	อินนูลิน	21.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.08 มิลลิกรัมต่อนาที	Gong และคณะ, 2008
Rhizopus sp. TN-96	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน	9.0	-	Ohta และคณะ, 2002
Rhizoctonai solani	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน	1.3	13.88	Ertan และคณะ, 2005
Streptomyces sp.	เอกโซอินูลิเนส	อินนูลิน	1.63	450.0	Sharma และ Gill , 2007
		ซูโครส	66.66	260.0	
		ราฟฟิโนส	12.5	150.0	
Xanthomonas oryzae NO.5	เอนโดอินูลิเนส	อินนูลิน	16.7 กรัมต่อลิตร	12.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง	Cho และ Yun, 2002

การศึกษาอิออนโลหะชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01พบว่ามีเพียง Hg^{2+} ซึ่งเป็นโลหะหนักที่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างรุนแรง ขณะที่อิออนอื่นๆที่ทดสอบ มีผลเล็กน้อย หรือ ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ และยังพบว่าอิออนบางชนิดช่วยส่งเสริมแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเฉพาะ Mn^{2+} และ Co^{2+} มีบทบาทสูงสุดในการส่งเสริมแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกันอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* Mutant 817 (Nakamura และคณะ, 1994) *Kluyveromyces marxianus* YS-1 (Singh และคณะ, 2007) และ *Streptomyces* sp. (Sharma และ Gill, 2007) ที่พบว่า Mn^{2+} มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ Co^{2+} มีบทบาทป้องกันการทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน (Singh และคณะ, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่น ๆ จัดว่าเอนไซม์นี้มีสมบัติที่ดีกว่า เนื่องจากอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ถูกยับยั้งได้ด้วยอิออนโลหะชนิดต่าง ๆ หลากหลายชนิดกว่า เช่น อินูลิเนสจาก *Kluyveromyces marxianus* YS-1 ถูกยับยั้งด้วย Cu^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, และ Ca^{2+} (Singh และคณะ, 2007) ส่วนอินูลิเนสจาก *Rhizoctonia rosani* ถูกยับยั้งด้วย Fe^{2+} Ag^{+} Zn^{2+} Mn^{2+} Mg^{2+} Ba^{2+} และ Hg^{2} (Ertan และคณะ, 2005) ขณะที่อินูลิเนสจาก *Cryptococcus aureus* G7a ถูกยับยั้งด้วย Mg^{2+}, Hg^{2+} และ Ag^{2+} (Sheng และคณะ, 2008) ส่วนอินูลิเนสจาก *Aspergillus fumigatus* ถูกยับยั้งด้วย Fe^{2+} Ag^{+} Zn^{2+} Co^{2+}และ Hg^{2} (Gill และคณะ, 2004) และอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. ถูกยับยั้งด้วย Na^{+}, EDTA และ Hg^{2+} (Sharma และ Gill, 2007) อย่างไรก็ตามจากรายงานต่างๆเหล่านี้พบว่า อินูลิเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักจะถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วย Hg^{2+} ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จาก *Streptomyces* sp. CP01 เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 5.4

จากการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอินูลิเนสพบว่า N-bromosuccimide (NBS) ซึ่งดัดแปลงกรดอะมิโนทริปโตเฟน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ iodoacetamide (IAM) ซึ่งดัดแปลงกรดอะมิโนซีสเทอีน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้ 38 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 น่าจะมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนและซีสเทอีนเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site ของเอนไซม์ โดยทริปโตเฟนน่าจะอยู่บริเวณที่ค่อนข้างมีบทบาทสำคัญกว่า สำหรับอินูลิเนสจากจุลินทรีย์อื่นๆพบว่าอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* Mutant 817 และ *Penicillium* sp.TN-88 มีกรดอะมิโนทริปโตเฟนอยู่ใน active site (Nakamura และคณะ, 1994 ; Nakamura และคณะ, 1997) ขณะที่อินูลิเนสจาก *Cryptococcus aureus* G7a และ *Pichia guilliermondii* มีกรดอะมิโนซีสเทอีนอยู่ใน active site (Sheng และคณะ, 2008 ;Gong และคณะ , 2008)

ตารางที่ 5.4 ผลของอิออนโลหะและสารดัดแปลงหมู่อะมิโนต่อการทำงานของอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของอิออนของโลหะ		ชนิดของสารดัดแปลงหมู่อะมิโน	เอกสารอ้างอิง
	สารกระตุ้น	สารยับยั้ง		
Streptomyces sp. CP01	Mn^{2+} และ Co^{2+}	Hg^{2+}	NBS และ IAM	งานวิจัยนี้
Aspergillus niger Mutant 817	Mn^{2+}	Hg^{2+} และ Ag^{+}	NBS	Nakamura และคณะ, 1994
Cryptococcus aureus G7a	Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}และ Cu^{2+}	Mg^{2+}, Hg^{2+} และ Ag^{+}	PMSF, IAM, EDTA และ 1,10-phenanthroline	Sheng และคณะ, 2008
Kluyveromyces marxianus YS-1	Mn^{2+} และ Ca^{2+}	Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+} และ Fe^{3+}	-	Singh และคณะ, 2007
Pichia guilliermondii	Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Fe^{2+} และ Cu^{2+}	Mg^{2+}, Hg^{2+} และ Ag^{+}	PMSF, IAM, EDTA และ 1,10-phenanthroline	Gong และคณะ, 2008
Penicillium sp.TN-88	Mn^{2+}	Hg^{2+} และ Ag^{+}	NBS	Nakamura และคณะ, 1997
Rhizoctonia rosani	Cu^{2+}และ Ca^{2+}	Fe^{2+} , Ag^{+}, Zn^{2+} , Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ba^{2+} และ Hg^{2+}	-	Ertan และคณะ, 2005
Streptomyces sp.	Co^{2+}	Na^{+}, EDTA และ Hg^{+}	-	Sharma และ Gill, 2007

สำหรับ *Streptomyces* แม้จะมีรายงานค่อนข้างน้อย แต่จากการเปรียบเทียบสมบัติของอินูลิเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆทั้ง รา ยีสต์ และ แบคทีเรีย พบว่าอินูลิเนสจาก *Streptomyces* ที่ได้จากงานวิจัยนี้ และที่รายงานโดย Sharma และ Gill, 2007 มีสมบัติที่ค่อนข้างดีกว่าในแง่ ทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงและที่ความเป็นกรดด่างในช่วงเป็นกลาง มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง และต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้ระบบหล่อเย็นในระหว่างการทำปฏิกิริยา และสามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดการปนเปื้อนของกรด อีกทั้งอินูลิเนสจะไม่เสื่อมสภาพเมื่ออุณหภูมิหรือความเป็นกรดด่างเกิดการเปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้งานต่อไป แต่ก็ต้องเลือกชนิดของอินูลิเนสให้เหมาะสมกับงานที่จะนำไปใช้เช่น การผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสต้องใช้เอกโซอินูลิเนส การผลิตอินนูโลโอลิโกแซคาไรด์จะต้องใช้เอนโดอินูลิเนส เป็นต้น อย่างไรก็ตามอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01 เป็นเอนโดอินูลิเนสซึ่งแตกต่างจาก อินูลิเนสของ *Streptomyces* sp. (Sharma และ Gill, 2007) ที่เป็นเอกโซอินูลิเนส

สำหรับผลงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าสามารถทำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. CP01ให้บริสุทธิ์ถึงระดับโปรตีนเดี่ยว เอนไซม์มีสมบัติเป็นเอนโดอินูลิเนสสามารถย่อยอินนูลินได้เป็นฟรักโทโอลิโกแซคาไรด์และอินนูโลโอลิโกแซคาไรด์ เอนไซม์ ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิค่อนข้างสูง และมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง อิออนของโลหะมีผลต่อการทำงานของอินูลิเนสน้อย ซึ่งจัดว่ามีสมบัติในเกณฑ์ดีเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่รายงานไว้จากจุลินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ และเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและยา การผลิตฟรักโทโอลิโกแซกคาไรด์ และอาหารเสริมต่างๆ รวมทั้งนำไปใช้ในการปรับปรุงอาหารสัตว์ ทั้งนี้อาจมีการนำอินูลิเนสจาก *Streptomyces* sp. จากทั้งสองสายพันธุ์มาทำงานร่วมกันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตเอทานอล การผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มฐานข้อมูลอินูลิเนสจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นิมิต วรสูตร และ สนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน: สาระสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน. แก่นเกษตร. 34: 85-91

รุ่งตระการ จันทนพันธ์. 2552. การคัดกรอง *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินูลิเนสและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abramic, M., Lescic, I., Korica, T. Vitale, L., Saenger, W. and Pigac, J. 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. Enzyme and Microbial Technology. 25: 522-529.

Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., Liang, L., Gunn, S. K.,Darlington, G., and Ellis, K. J. 2005. A combination of prebiotic short and long-chain fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. American Journal of Clinical Nutrition. 82: 471–476.

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

Ayyachamy, M., Khelawan, K., Pillay, D., Permaul, 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.

Bender, J.P., Mazutti, M.A., Treichel, H. and Di Luccio, M. 2006. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology. 32: 951–958.

Bucke, C. 1997. Industrial glucose isomerase . In Wiseman, A. (ed). Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. 147-171. United Kingdom: Ellis Horwood.

Burne, R.A., Schilling, K., Bowen, W., Yasbin, R.E. 1987. Expression, purification and characterization of an exo-β-D-fructosidase of *Streptococcus mutans*.

Journal of Bacteriology. 169: 4507–4517.

Byun, S.M. and Nahm, B.H. 1978. Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Science. 43: 1871–1873.

Chen, W.P. and Anderson, A.W. 1979. Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. Applied and Environmental Microbiology. 38: 1111-1119.

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

Cho, Y.J. and Yun, J.W. 2002. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No.5. Process Biochemistry. 37: 1325–1331.

Cruz-Guerrero, A.E., Garcia-pena, I., Barzana, E., Garcia-Garibay, M. and Gomez-Ruiz, L. 1995. Inulinase-hyperproduction strains of *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain. Journal of Fermentation and Bioengineering. 80: 159-163.

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

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

Dubios, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Reber, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugar and related substrance. Analytical Chemistry. 28: 350-356.

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

El-Hersh, M.S., Saber, W.I.A. and El-Ahmady,N.A. 2011. Production strategy of inulinase by *Penicillium citrinum* AR-IN2 on some agricultural by-product. Microbiology Journal.

Ettalibi, M. and Baratti, J.C. 1987 Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 26: 13–20.

Favela Torres, E. and Baratti, J. 1987. Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* from an equimolar mixture of glucose and fructose. Biomass. 13: 75-85.

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 Microbiology and Biotechnology. 31: 1-9.

Fleming, S.E., and Grootwassink, J.W.D. 1979. Preparation of high fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberorus* L.). Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 12: 1–28.

Gao, W., Bao, Y,. Liu, Y., Zhang, X., Wang, J. and An, L. 2009. Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. Applied Biochemistry and Biotechnology. 157: 498-506.

Ge, X.Y., and Zhang, W.G. 2005. Effects of octadecanoylsucrose derivatives on the production of inulinase by *Aspergillus niger* SL-09. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 1633–1638.

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., Singh, J and Singh, P. 2004. Purification and characterization of exoinulinase from *Aspergillus fumigates*. Applied Microbiology and Biotechnology. 117: 19–2.

Gill, P.K., Manhas, R.K. and Singh, P. 2006. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. Journal of Food Engineering. 76:369–375.

Gibson, G.R., Beatty, E. R., Wang, X. and Cummings, J. H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology. 108: 975–982.

Golunski, S., Astolfi, V., Carniel, N., de Oliveira, D., Luccio, M.D., Mazutti, M.A. and Treichel, H. 2011. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. Separation and Purification Technology. 7: 261–265.

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.

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.

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

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

Hunter, J,O., Tuffnel,Q, and Lee, A.J. .1993. Controlled trial of oligofructose management of irritable bowel syndrome. Journal of Nutrition. 129: 1451–1453.

Jing, W., Zhengyu, J., Bo, J., and Augustine, A. 2003. Production and separation of exo and endo-inulinase from *Aspergillus 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 officinale*) by *Aspergillus niger*. Journal of Food Engineering. 85:473–478.

Kaur, N., Kaur, M., Gupta, A., and Singh, R. 1992. Properties of β-fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. Journal of ChemicalTechnology and Biotechnology. 53:279–284.

Kaur, N.and Gupta, A,K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Bioscience. 27: 703-714.

Kierstan, M.P.J. 1978. Production of fructose syrups from inulin containing plants. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 20: 447–450.

Kim, D.H., Choi, Y.J., Song, S.K. and Yun. J.W. 1997a. 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., Chae, K.S. 1999. Expression of the *INU2* gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters. 21:621–623.

Kim, K.Y., Koo, B.S., Jo, D.and Kim, S.I. 2004. Cloning, expression and purification of exo-inulinase from *Bacillus* sp. Snu-7. Journal of Microbiology and Biotechnology. 14:344–349.

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.

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

Kochhar, A., Gupta, A. K., and Kaur, N. 1999. Purification and immobilization of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. Journal of Science of Food and Agriculture. 79: 549–554.

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of nutrition. 87: 193-197.

Kumar, G., Kunamneni, A., Prabhakar, T., and Ellaiah, P. 2005. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 1359–1361.

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

Kushi, R.T., Monti, R. and Contiero, J. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase came from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 25: 63–69.

Kwon, Y.M., Kim, H.Y. and Choi, Y.J. 2000. Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase. Journal of Microbiology and Biotechnology. 10: 238–243.

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.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lechevalier, R., Acker, F., Corke, C.T., Haenseler, C.M., and Waksman, S.A. 1953. Candicidin, a new antifungal antibiotic. Mycologia. 45: 155-171.

Li, A.X., Guo, L.Z. and Lu, W.D. 2011. Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS–A18 and inulin hydrolysis by the enzyme. World Journal of Microbiology and Biotechnology. DOI 10.1007/s11274-011-0794-3.

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 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 (*Cynara scolymus* L.). Phytochemistry Letters. 66: 1476–1484

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 267-275.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Analytical Chemistry. 31: 426–428.

Mutanda, T., Wilhelmi, B. and Whiteley, C.G. 2009. Controlled production of fructose by an exoinulinase from *Aspergillus ficuum.* Applied Biochemistry and Biotechnology. 159: 65-77.

Nakamura, T. Nagatomo, Y. Hamada, S. Nishino, Y. and Ohta, K. 1994. Occurrence of two forms of Extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. Journal of Fermentation and Bioengineering. 78: 134–139.

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., Ogata, Y., Hamada, S. and Ohta, K. 1996. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering .81: 564–566

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

Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabo, J.M. Czukor, B. and Hoschke, A. 2011. Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. Process Biochemistry. 46: 298-303.

Ohta, K., Hamada, S. and Nakamura, T. 1993. Production of high concentration of ethanol from inulin by simultaneous saccarification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environment and Microbiology. 59: 729–733.

Ohta, K., Suetsugu, N., and Nakamura, T. 2002. Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus* sp. strain TN-96. Journal of Biochemistry Biophysics and Molecular Biology. 94: 78–80.

Onodera, S. and Shiomi, N. 1988. Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. Agricultural Biology and Chemistry. 52: 2569-2576.

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

Pessoni, R.A.B. 2007. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources. Mycologia. 99: 493–503.

Pinphanichakarn, P., Tangsakul, T., Thongnumwon, T., Talawanich, Y. and

Thamchaipenet, A. 2004. Purification and characterization of β-xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 727-733.

Roberfroid, M.B. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition. 87: S139–S143.

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., Hensing, M., Verbakel, J., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J.P. 1999. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied and Environmental Microbiology. 11: 3337–3345.

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 crypt foci in rats. Carcinogenesis. 19: 281–285.

Rumessen, J.J. Bode, S.,Hamberg, E.G. and Hoyer, E.G. 1990. Fructans of Jerusalem artichokes: Intestinal transport, absorption, fermentation and influence on blood glucose, insulin and C-peptide responses in healthy subjects. American Journal of Clinical Nutrition.52: 675-681.

Sanal, F.E., Ertan, F. and Aktac, T. 2005. Production of exo-inulinase from *Alternaria alternata* growth on Jerusalem artichoke and some biochemical properties. Journal of Biological Science. 5: 497-505.

Saber, W.I.A. and El-Naggar, N.E. 2009. Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of inulinase by the new source; *Aspergillus tamarii* and hydrolysis of some inulin containing agro-wastes. Biotechnology. 8: 425-433.

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.

Sharma, A. D. and Gill, P. K., Bhullar, S.S. and Singh, P. 2005. Improvement in inulinase production by simultaneous action of physical and chemical mutagenesis in

Penicillium purpurogenum. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 929–932.

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

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 Engineering. 77: 486–491.

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

Sheng, J., Chi, Z.M., Gong, F. and Li, J. 2008. 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.

Singh, A. K., Chhatpar, H.S., 2010. Optimization of protease production by *Streptomyces* sp. A6 using statistical approach for reclamation of shellfish waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26: 1631–1639.

Singh, R.S., Dhaliwal, R. and Puri, M. 2007. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. Journal of Microbiology and Biotechnology. 17: 733-738.

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.

Sirisansaneeyakul, S., S. Jitbanjongkit, N. Prasomsart and P. Laungpituksa. 2000. Production of β-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Kasetsart Journal. (Natural Science). 34: 378-386.

Sirisansaneeyakul, S., Worawuthiyanan, N., Vanichsriratana, W.,Srinophakun, P. and Chisti, Y. 2007. Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 543-553.

Swan, D.G., Rodriguez, A.M., Vilches, C., Mendez, C., and Salas, J.A. 1994. Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I

polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Molecular and General Genetics. 242: 358-362.

Szambelan K, Nowak J, 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.

Takahashi,N., Mizuno, F.,and Takamori, K. 1985. Purification and preliminary characterization of exo-beta-D-fructosidase in *Streptococcus salivarius* KTA-19, Infection and Immunity. 47: 271–276.

Toran-Diaz, I., Jain, V. K. & Baratti, J. (1984). Ethanol production from fructose in continuous culture by free and flocculent cells of *Zymomonas mobilis.* Biotechnology Letter. 6: 389-394.

Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K.,Tsukihara, T. and Suzuki, Y. 2003. Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. Applied Microbiology and Biotechnology. 62: 180–185.

Uchiyama, T. 1975. Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulinase II on several oligofructances and bacterial levans. Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology. 397: 153–163.

Uhm, T.B., Jeon, D.Y., Byun, S.M., Hong, J.S., and Groot Wassink, J.W.D. 1987. Purification and properties of β-fructofuranosidase from *Aspergillus niger*. Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology. 926: 119–126.

Uhm, T.B., Chae, K.S., Lee, D.W., Kim, H.S., Cassart, J.P. and Vandenhaute, J. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase encoding gene, *inu2* from *Aspergillus ficuum*. Biotechnology Letters. 20: 809–81.

Ungchaithum, S. and Pinphanichakarn, P. 1998. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. PC22 growing on agricultural residues. Journal of the Science Research , Chulalongkorn University. 23: 45-50.

Uzunova, K., Vassileva, A., Ivanova, V., Spasova, D., and Tonkova, A. 2002. Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane immobilized *Bacillus* sp. 11 cells. Process Biochemistry. 37:

863–868.

Vandamme, E.J., and Derycke, D.G. 1983. Microbial inulinases: Fermentation process, properties, applications. Advances in Applied Microbiology. 29: 139–176.

Vijayaraghavan, K., Yamini, D., Ambika, V. and Sravya Sowdamini, N. Trends in inulinase production- A review. Clitical Reviews in Biotechnology. 29: 67-77.

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

Vullo, D.L., Coto, C.E., and Sineriz, F. 1991. Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). Applied and Environmental Microbiology. 57:2392–2394.

Walker, G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. Pp. 228-231. New York: John Wiley and Sons Inc.

Warchol, M., Perrin, S., Grill, J.P., and Schneider, F. 2002. Characterization of a purified β-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. Letters in Applied Microbiology. 35: 462–467.

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

Wesley, E.W., and Donal, F.D. 1983. Purification and properties of the β-fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. FEBS Letters. 160: 16–20.

Wim, J.D., and Jan, C.G. 1991. Fermentation of inulin by a new strain of *Clostridium thermoautotrophicum* isolated from dahlia tubers. FEMS Microbiology Letters. 78: 285–291.

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

Xiao, R., Tanida, M., and Takao, S. 1989. Purification and characteristics of two exo-inulinases from *Chrysosporium pannorum*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 67: 331–334.

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.

Yun, J.W., Park, J.P., Song, C.H., Lee, C.Y., Kim, J.H. and Song, S.K. 2000. Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. Bioprocess Engineering. 22: 189–194.

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.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งข้าวโอ๊ต (oatmeal slant)

ข้าวโอ๊ต (oatmeal)	60.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	12.5	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0	ลิตร

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani Broth

แบคโตทริปโตน (bacto tryptone)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 8.0 อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตอินูลิเนสซึ่งปรับปรุงแล้ว (จันทนพันธ์, 2552)

แบคโตทริปโตน (bacto tryptone)	0.7	เปอร์เซ็นต์
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.1	เปอร์เซ็นต์
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.25	เปอร์เซ็นต์
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.001	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดอินนูลิน (inulin extracy)	1.0	เปอร์เซ็นต์
วุ้นผง* (agar)	1.5	เปอร์เซ็นต์

*<u>หมายเหตุ</u> อาหารเหลวไม่ต้องใส่

ปรับระดับความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 8.0 อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1.1 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid ; DNSA reagent)

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid)	10.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	16.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต		
($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)	300.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร		

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เติมกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ละลายให้หมด แล้วค่อยๆเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต 300 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1.2 สารลายซิสทีอีน ไฮโดรคลอไรด์ (cystein-HCl)

ซิสทีอีน ไฮโดรคลอไรด์ (cystein-HCl)	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	10.0	มิลลิลิตร

1.3 สารละลายคาร์บาร์โซล์

คาร์บาร์โซล์	0.12	กรัม
absolute alcohol	100.0	มิลลิลิตร

1.4 สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

ฟีนอล	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

2.1 Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโปแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3.0	ลิตร

2.2 Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	5.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2.3 Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

2.4 Lowry D

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

3. สารละลายโซเดียมแอซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

เตรียมสารละลายโซเดียมแอซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 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 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.87 4.60 8.55 11.74 และ 13.34 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.42 8.11 4.77 2.46 และ 0.85 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างตามต้องการด้วยการผสมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แล้วเจือจางสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

เตรียมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 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

6. สารละลายสำหรับใช้ในการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

6.1 สารละลายทริสไกลซีนอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม

ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	8.3	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600.0	มิลลิลิตร

6.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ทริส

ทริส	6.0	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

6.3 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ทริส

ทริส	24.2	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

6.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	18.15	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

6.5 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
Bis (N,N,-methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.00	มิลลิลิตร

6.6 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.2	มิลลิลิตร

สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู	7.0	มิลลิลิตร

6.7 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

6.8 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล 10 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	4.20	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	3.33	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

6.9 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.20	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

6.10 สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี 250	0.1 เปอร์เซ็นต์
เมธานอล	40 เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10 เปอร์เซ็นต์

6.11 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เมธานอล	40 เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10 เปอร์เซ็นต์

7. สารละลายที่ใช้ในการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

7.1 สารละลายทริสไกลซีนอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม
ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	8.3	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600.0	มิลลิลิตร

7.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทริส	6.0	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

7.3 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ทริส

ทริส	24.2	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

7.4 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	18.15	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	8.8	

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

7.5 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

7.6 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 20 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

7.7 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
Bis (N,N,-methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.00	มิลลิลิตร

7.8 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์	3.2	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
2-บีตา-เมอแคบโตเอทานอล	1.6	มิลลิลิตร
สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู	0.2	มิลลิลิตร

7.9 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

7.10 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล 12 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.00	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

7.11 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.10	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร

7.12 สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี 250	0.1 เปอร์เซ็นต์
เมธานอล	40 เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10 เปอร์เซ็นต์

7.13 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

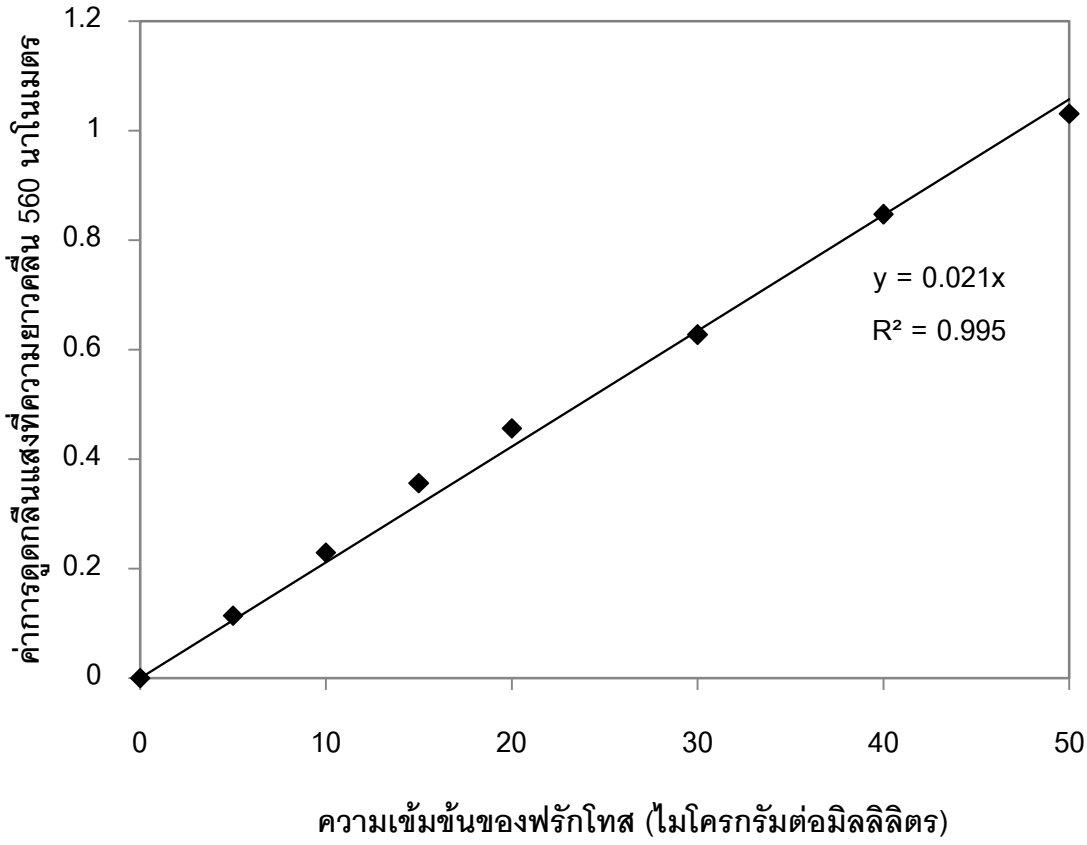
เมธานอล	40 เปอร์เซ็นต์
กรดอะซีติก	10 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ค

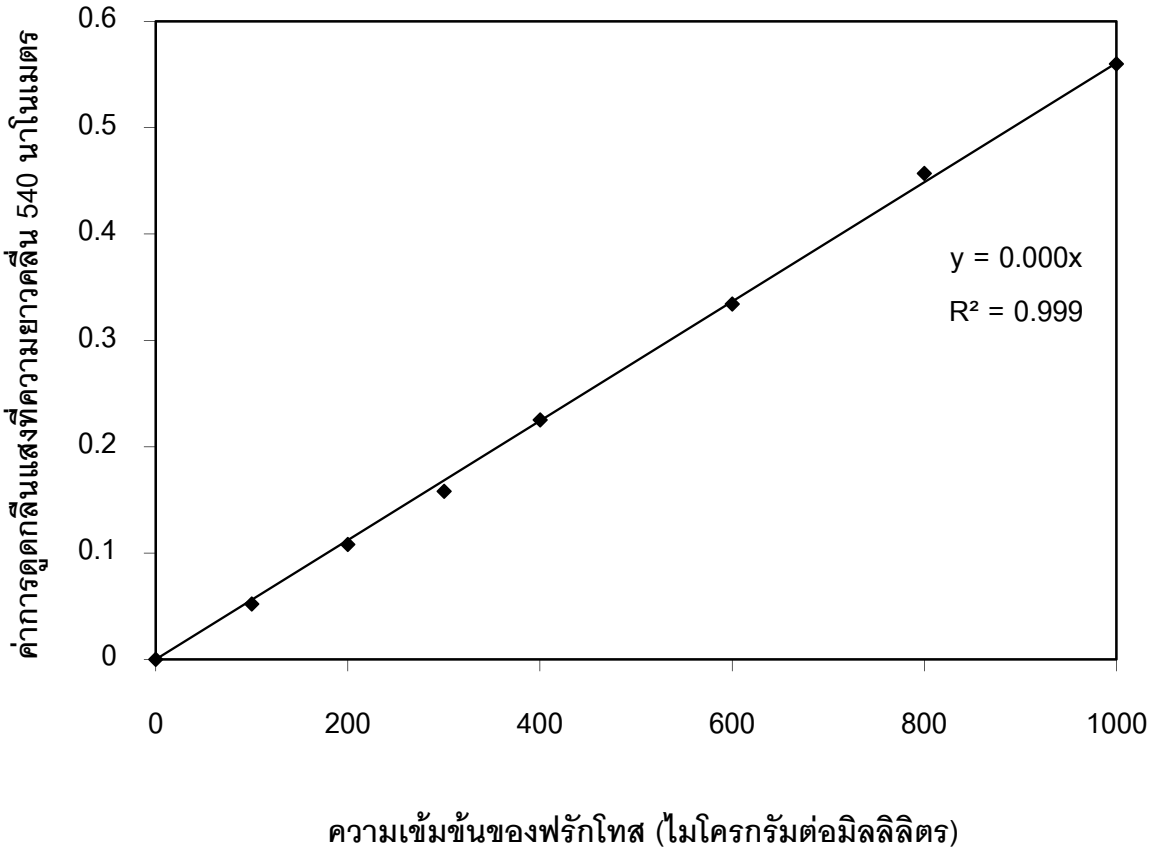
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

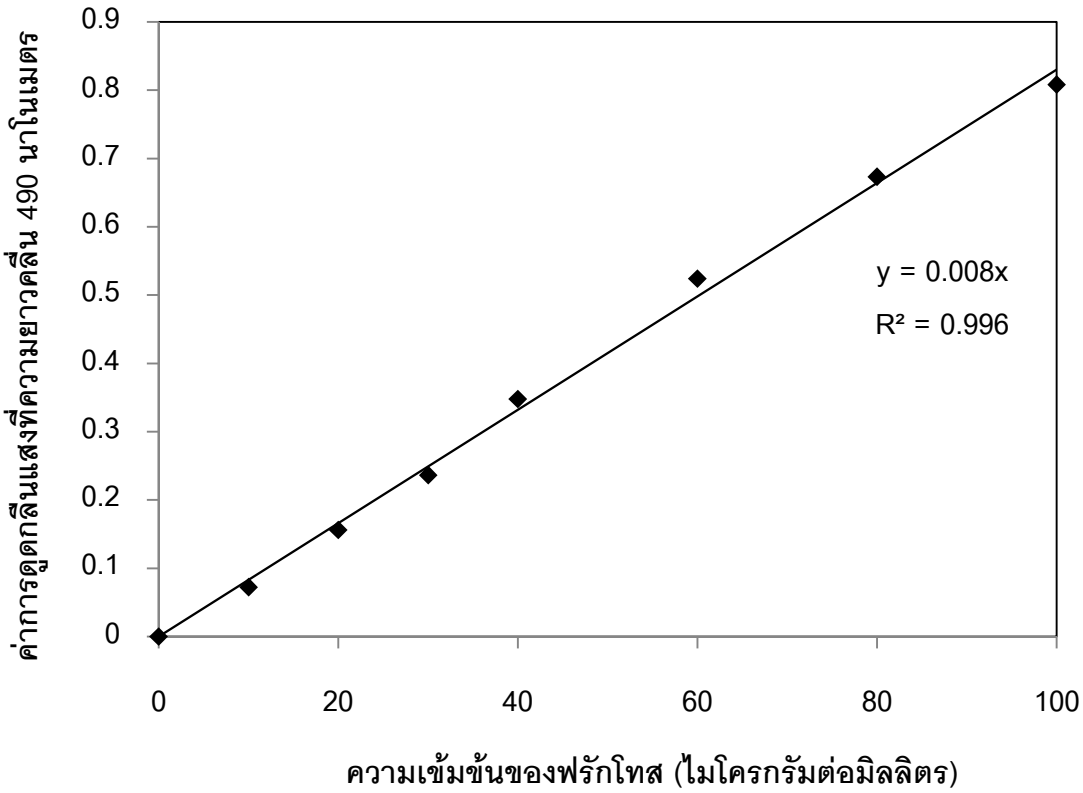
1.1 กราฟมาตรฐานอินนูลินความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวิธี cystein carbazole sulfuric acid (Dicche Borenfreund, 1951)



1.2 กราฟมาตรฐานอินนูลินความเข้มข้น 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวิธี DNS method (Miller และคณะ, 1959)

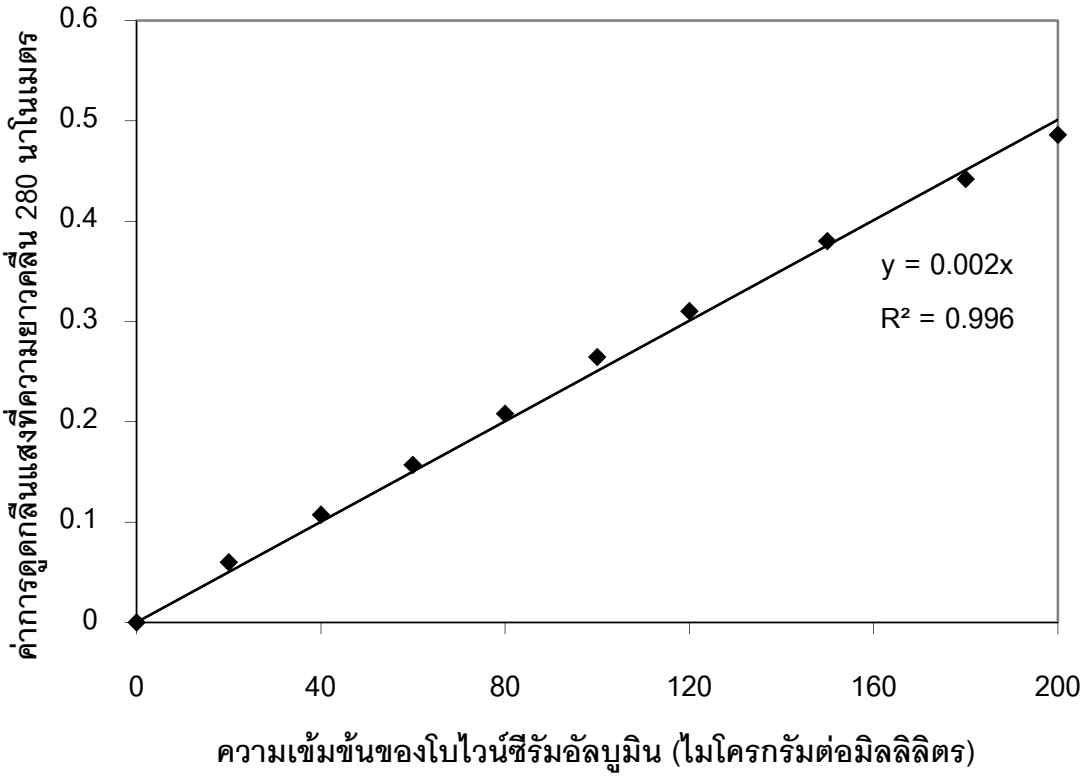


1.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดของฟรักโทสความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวิธี Phenol sulfuric method (Dubois และคณะ, 1956)



2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

กราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวิธี Lowry



ภาคผนวก ง

วิธีคำนวณ

1. การคำนวณเปอร์เซ็นต์อินนูลินในการการสกัดเทียบกับแก่นตะวัน (10 กรัม)

วิธีสกัด	ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด		น้ำตาลรีดิวซ์		เปอร์เซ็นต์อินนูลินในสารสกัดเปรียบเทียบกับแก่นตะวัน (%)
		มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	มิลลิกรัม	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	มิลลิกรัม	
Lingyun และคณะ, 2007	75	26.77	2,010	4.1	307.5	17.00
Dische และ Borenfreund, 1951	75	26.37	2,002.5	4.1	307.5	16.70

2. วิธีการคำนวณค่า V_{max}

จากรูปที่ พบว่ามีค่า K_m สำหรับอินนูลินเท่า 2.326 มิลลิโมลาร์ เพราะฉะนั้นค่า V_{max} จากกราฟเท่ากับ 0.0286 ไมโครโมลต่อนาที

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry ดังแสดงในข้อ พบว่าเอนไซม์มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.033 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร

ในปฏิกิริยาใช้เอนไซม์เจือจาง 5 เท่า เพราะฉะนั้นจะมีโปรตีนเท่ากับ 0.0065 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร

แต่ในปฏิกิริยาใช้เอนไซม์ปริมาตร 0. 1 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นจะมีโปรตีนเหลือเท่ากับ 0.00065 มิลลิกรัมโปรตีน

ดังนั้นสรุปได้ว่า

ในปฏิกิริยามีโปรตีน 0.00065 มิลลิกรัม จะมีค่า V_{max} เท่ากับ 0.286 ไมโครโมลต่อนาที เพราะฉะนั้นโปรตีน 1 มิลลิกรัม จะมีค่า V_{max} เท่ากับ 440 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิโรบล เหลากลม เกิดเมื่อวันเสาร์ที่ 11 มกราคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดอุบลราชธานี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2551 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 118 หมู่ที่ 7 ตำบลบ้านแขมเหนือ อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี 34110

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. Nirobol Laowklom, Rungtrakarn Chantanaphan and Pairoh Pinphanichakarn. Optimization for inulinase production by *Streptomyces* sp. CP01. Proceedings in the 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “International Conference on Biotechnology for Healthy Living” (TSB 2010). October 20-22, 2010. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand . p. 108-117. (poster presentation). (full text in CD-ROM).