การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่แยกได้จากกระเทียม

ประกายพลอย สร้อยเปี้ย

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่แยกได้จากกระเทียม

ประกายพลอย สร้อยเปี้ย

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

OPTIMIZATION OF INULINASE PRODUCTION BY FUNGI ISOLATED GARLIC POWDER

PRAKAIPHOI SOIPIA

A Thesis Submitted to University of Phayao

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Biotechnology

September 2022

Copyright 2022 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์

อินนูลินเนสจากราที่แยกได้จากกระเทียม

ของ ประกายพลอย สร้อยเปี้ย

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

---------- ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร. สุกัญญา จีนเหนาะ)

---------- ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร)

---------- กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร. ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ)

---------- อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา

(ดร. รวิสรา รื่นไวย์)

---------- คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก)

เรื่อง: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่แยกได้จากกระเทียม

ผู้วิจัย: ประกายพลอย สร้อยเบี้ย, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ

คำสำคัญ: อินนูลินเนส, กากกระเทียม, กระเทียมสด, Penicillium citrinum

บทคัดย่อ

อินนูลินเนสเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ β-2,1 ฟรุคโตไซด์ของอินนูลินเพื่อผลิตน้ำตาลฟรุกโตส ในปัจจุบันเอนไซม์อินนูลินเนสเป็นที่นิยมใช้กระบวนการผลิตอาหารในระดับอุตสาหกรรมและได้รับความสนใจอย่างมาก ซึ่งในกระเทียมเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีปริมาณของอินนูลินสูงและเป็นพืชเกษตรที่หาได้ง่าย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลิเนสจากกระเทียมและกากกระเทียมอบแห้ง โดยทดสอบความสามารถในการย่อยของอินนูลินเบื้องต้น สามารถคัดแยกเชื้อที่ย่อยอินนูลินได้จากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่เจริญในอาหารแข็ง selective medium ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท พบเชื้อที่แยกจากกากกระเทียมทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ IS3, IS5, IS8 และ IS10 ส่วนเชื้อที่แยกจากกระเทียมทั้งหมด 6 ไอโซเลทได้แก่ IS1, IS2, IS4, IS7, IS11, และ IS13 จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสของเชื้อทั้งหมด พบว่าไอโซเลท IS13 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 0.109±0.006 U/mL จากการวิเคราะห์สายพันธ์ของไอโซเลท IS13 ด้วยวิธีทาง ชีวโมเลกุล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่า IS13 มีความเหมือนกับรา *Penicillium citrinum* สายพันธุ์ NZD-mf99 (KM278047.1) เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสของราไอโซเลตนี้ พบว่า การเลี้ยงราในอาหารเหลว ที่เติมอินนูลินความเข้มข้น 20 g/L ปรับค่า pH 5.5 เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.128±0.006 U/mL ซึ่งเพิ่มขึ้นจากสภาวะตั้งต้น 17.43% จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากกากกระเทียมแห้งและควบคุมสภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาได้เบื้องต้น พบว่า แหล่งคาร์บอนจากกากกระเทียมให้กิจกรรมเอนไซม์ อินนูลินเนสเทียบเท่ากับการใช้แหล่งคาร์บอนจากอินนูลิน

Title: OPTIMIZATION OF INULINASE PRODUCTION BY FUNGI ISOLATED GARLIC POWDER

Author: Prakaiphoi Soipia, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2022

Advisor: Supaporn Passorn Co-advisor Khanchai Dunmek

Keywords: Inulinase Garlic Meal Fresh Garlic Penicillium citrinum

ABSTRACT

Inulinase is an enzyme that cleaves the β-2,1 fructosidic bond of inulin to produce fructose. Currently, inulinase has received more attentions and widely used in industrial food processing. Garlic is known as available agricultural source with high inulin content. Therefore, the researcher has been interested in screening of microorganisms that capable producing inulinase from garlic cloves and dehydrated garlic pulp. In preliminary screening of inulinase producing fungi, 10 isolated fungi able to generate clear zones on selective media. Fungal isolated from garlic cloves were 6 isolates, such as IS1, IS2, IS4, IS7,IS11, and IS13, while 4 isolates from dehydrated garlic bulbs, such as IS3, IS5, IS8 and IS10. Analysis the inulinase activity of these isolates found that IS13 showed the highest enzymatic activity at 0.109±0.006 Unit/ml. Identification of this fungal strain by molecular technique using ITS sequence was found that IS13 showed 100% identity to *Penicillium citrinum* strain NZD-mf99 (GenBank accession number KM278047.1). For increasing the inulinase production, optimum condition was determined. It was found that the *P. citrinum* IS13 growing in selective medium supplemented with 20g/L of inulin, adjust pH to 5.5 and culture for 7 days could produce the highest inulinase activity at 0.128±0.006 Unit/ml which higher than control condition approximately 17.43%. Interestingly, not only pure inulin, the fungal *P. citrinum* identified in this study could be used dried garlic residue as a carbon source for producing the inulinase.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่งที่กรุณามอบทุนการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ชี้แนะแนวทางในการเรียนรู้ ให้คำแนะนำ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.สุกัญญา จีนเหนาะ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง และคำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และนักวิทยาศาสตร์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการขับเคลื่อนงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกท่านที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจเสมอมา จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจนำองค์ความรู้ไปต่อยอดในอนาคตต่อไป

ประกายพลอย สร้อยเปี้ย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

สมมติฐานการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

อินนูลิน (Inulin) 4

คุณลักษณะและลักษณะทั่วไปของฟรุกแทน 5

เอนไซม์อินนูลินเนส (Inulinase) 8

ประเภทของเอนไซม์อินนูลินเนส 9

แหล่งที่มาของอินนูลินเนส 10

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ในจุลินทรีย์ 12

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 14

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ 17

พืชที่ใช้ในการทดลอง 17
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 17
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง 18
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 18
วิธีการทดลอง 19
การวิเคราะห์ทางสถิติ 24
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย 25
การคัดแยกเชื้อราจากกระเทียม 25
ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลว 31
การระบุสายพันธุ์เชื้อราที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการทางโมเลกุล 33
หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่คัดแยกได้ 38
ศึกษาความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์อินนูลินเนสจากเชื้อที่คัดเลือก โดยใช้กาก กระเทียมเป็นแหล่งคาร์บอน 41
บทที่ 5 บทสรุป 44
สรุปผลการวิจัย 44
ข้อเสนอแนะ 45
บรรณานุกรม 46
ภาคผนวก 50
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 51
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี 52
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 53
ประวัติผู้วิจัย 63

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ปริมาณ อินนูลิน และ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด) ของพืชชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นอาหาร....6

ตาราง 2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างอินนูลินเนส....11

ตาราง 3 ภาพลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของเชื้อที่คัดแยกได้จากกระเทียมกับกากกระเทียมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ผสมอินนูลิน อายุ 5 วัน....25

ตาราง 4 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี บริเวณรอบๆจากการคัดแยกเชื้อ....29

ตาราง 5 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ทั้ง 8 ไอโซเลท กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST....34

ตาราง 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์....54

ตาราง 7 กิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลวของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท....60

ตาราง 8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสของ I/S ratio การเปรียบเทียบอินนูลินกับซูโครสของรา IS1 IS11 และ IS13....61

ตาราง 9 ค่ากิจกรรมของปริมาณการเติมแหล่งคาร์บอนจากอินนูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13....61

ตาราง 10 ค่ากิจกรรมของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13....61

ตาราง 11 ค่ากิจกรรมของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13....62

ตาราง 12 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสด้วยแหล่งคาร์บอนจากกากกระเทียมและอินนูลิน จากรา IS13....62

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของอินนูลิน....4

ภาพ 2 โครงสร้างเอนไซม์อินนูลินเนส....8

ภาพ 3 ผลิตภัณฑ์อินนูลินเนส 9

ภาพ 4 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อ (ก) กระเทียม (ข) กากกระเทียม 19

ภาพ 5 กิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลวของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท ทำการ 31

ภาพ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ IS13 [ก] การเจริญของ IS13 เพาะเลี้ยงบนอาหาร 32

ภาพ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ Penicillium citrinum [ก] การเจริญของ P. citrinum.... 33

ภาพ 8 ผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ Internal transcribed spacer 33

ภาพ 9 สายพันธุ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) 35

ภาพ 10 ผลของ I/S ratio การเปรียบเทียบอินนูลินกับซูโครสของรา IS1 IS11 และ IS13.... 36

ภาพ 11 ปริมาณการเติมแหล่งคาร์บอนจากอินนูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการ 38

ภาพ 12 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนส จากรา IS13.... 39

ภาพ 13 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนส จากรา IS13.... 41

ภาพ 14 เพาะเลี้ยงเชื้อ IS13 ลงในอาหารเหลวที่ใช้กากกระเทียมและอินนูลิน....42

ภาพ 15 ผลกิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสของรา IS13 จากแหล่งคาร์บอนกากกระเทียม 43

ภาพ 16 (A) กากกระเทียมบดละเอียดในน้ำกลั่น (B) กระเทียมบดในน้ำกลั่น.... 53

ภาพ 17 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นสารมาตรฐาน 53

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อินนูลินเนสเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ β-2,1 ฟรุกโตไซด์ของอินนูลินเพื่อผลิตน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และอินนูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ เอนไซม์อินนูลินเนสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เอนโดอินนูลินเนสและเอกโซอินนูลินเนส (Singha, Singha, & Pandey, 2020) โดยเอนโดอินนูลินเนสจะตัดพันธะที่เชื่อมภายในอินนูลิน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ส่วนเอกโซอินนูลินเนสจะผลิตฟรุกโตสเป็นหลักโดยการแยกเทอร์มินัลของฟรุกโตสออกจากอินนูลิน ในปัจจุบันเอนไซม์อินนูลินเนสกำลังเป็นที่นิยมในอุตสาหกรรม สามารถนำไปประยุกต์ได้หลายทาง เช่น การผลิตฟรุกโตสไซรัป การผลิตอินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์ การผลิตไบโอเอทานอล และอื่น ๆ อีกมาก (เพียงพร บางทุ่งแบน, 2556) เอนไซม์อินนูลินเนสพบได้ในทั้งพืช ผัก ผลไม้ และจุลินทรีย์ โดยพืชที่สะสมอินนูลินสามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดด้านระยะเวลา มีกระบวนการที่ซับซ้อน จึงทำให้พบทางเลือกในการนำจุลินทรีย์มาผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส เนื่องจากจุลินทรีย์มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้มากกว่าวิธีอื่น ๆ เนื่องจากเพาะเลี้ยงที่ง่าย ใช้ระยะเวลาสั้นในการเจริญ สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และให้ผลผลิตเอนไซม์สูง จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้ เช่น ยีสต์ ราเส้นใย และแบคทีเรีย กลุ่มแอคติโนมัยซีส จากรายงานของ (Mahmoud, Mahdy, Shousha, Refaat, & Fattah, 2011) มีการทดสอบกิจกรรมอินนูลินเนส *Aspergillus niger* โดยเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลวที่มีพืชทั้ง 6 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ กระเทียม หัวหอม ชิโครี่ข้าวสาลี และแก่นตะวัน พบว่ากระเทียมสามารถผลิตเอนไซม์และมีกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสสูงถึง 1632 IU/L ซึ่งสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และมีการทดลองโดยใช้กระเทียมอบแห้งที่ 100 และ 50 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการใช้กระเทียมพบว่าการใช้กระเทียมสดเป็นซับสเตรตมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 3611 IU/L จะเห็นได้ว่ากระเทียมเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ดีในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสโดยจุลินทรีย์ ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงสนใจคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากกระเทียม และกากกระเทียม โดยทำการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นบนอาหารแข็งที่ผสมอินนูลิน จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีอินนูลินเป็นสับเสตรท เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้าง

เอนไซม์อินนูลินเนสได้สูงสุด ระบุหาสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธีการทางโมเลกุลเพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ในการศึกษา 3 ปัจจัย คือ ปริมาณความเข้มข้นของอินนูลิน ค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนส นอกจากนี้ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากกากกระเทียมแห้งและควบคุมสภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาได้เบื้องต้น

การศึกษาที่ได้สามารถเป็นแนวทางในการนำวัตถุดิบทางการเกษตรอย่างกระเทียมมาคัดแยกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสและนำเชื้อราที่คัดแยกได้ไปทดสอบต่อหรือประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในรูปแบบอื่นเพื่อนำไปสู่แนวทางการใช้ประโยชน์ในทางด้านการศึกษาเรื่องเอนไซม์ต่อไป

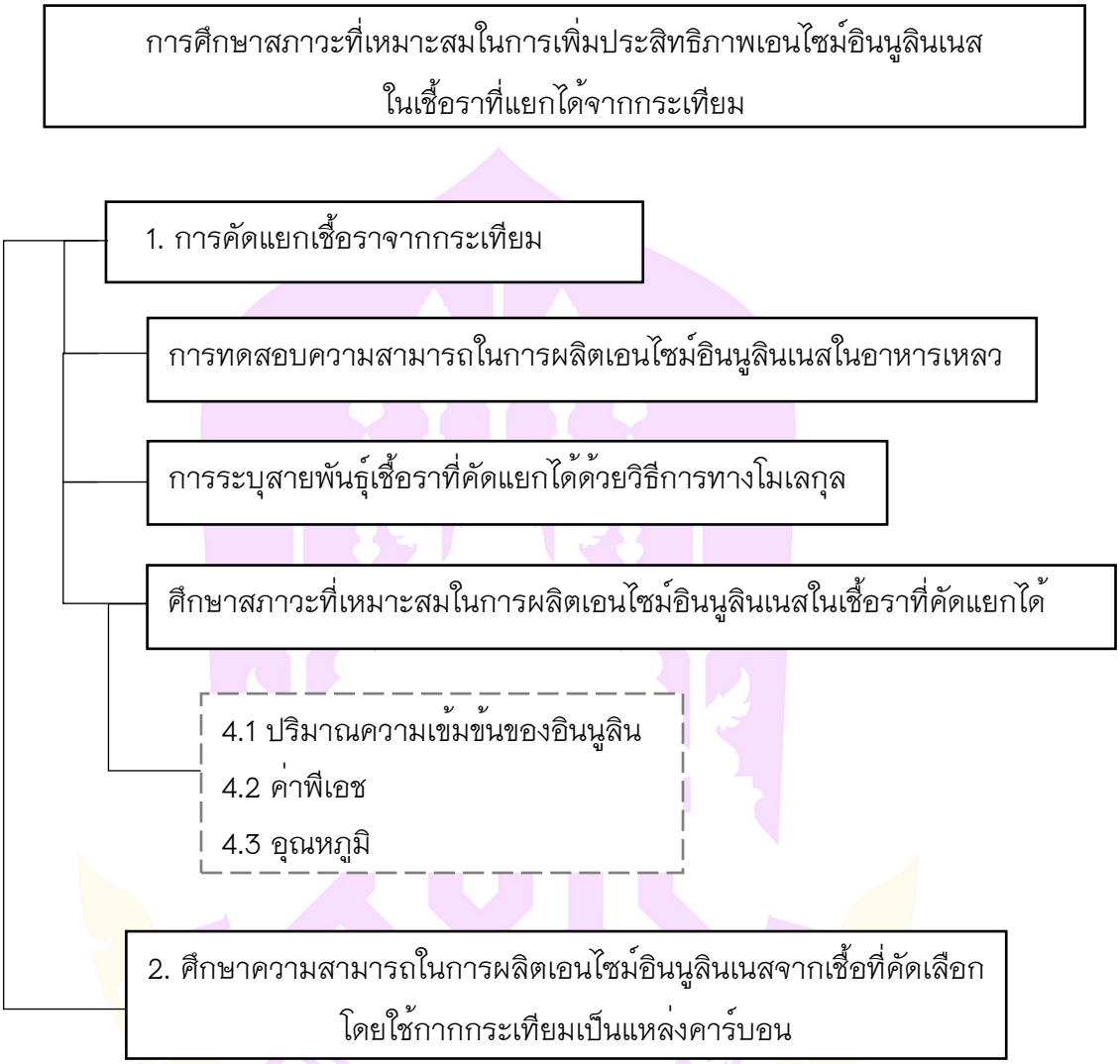
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากกระเทียม
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในเชื้อราที่คัดแยกได้

สมมติฐานการวิจัย

คัดเลือกเชื้อราจากกระเทียมที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้สูงและศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อช่วยในการส่งเสริมการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด

ขอบเขตของการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

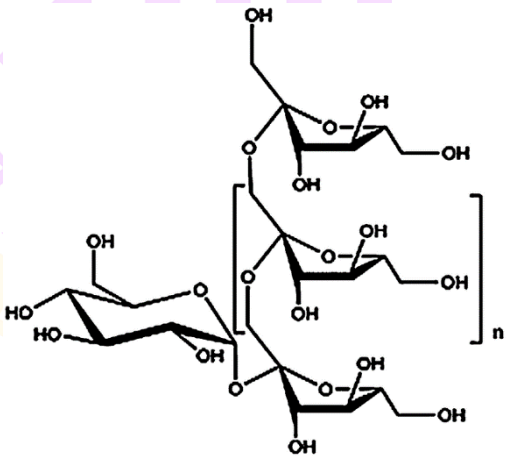
1. สามารถเพิ่มทางเลือกในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากจุลินทรีย์
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากจุลินทรีย์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อินนูลิน (Inulin)

อินนูลิน เป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ โมเลกุลของอินนูลินเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ มีโมเลกุลของน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิด มาเชื่อมต่อกันเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรักโทส (Fructose) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 เป็นองค์ประกอบมีขนาดโมเลกุลช่วง 10–60 โมเลกุล เรียกว่า ฟรักแทน เรียงต่อกันเป็นสายยาวประมาณ 2–60 โมเลกุล (β– 2, 1 linked Polyfructan) ปลายด้านนมีกลูโคสที่เชื่อมอยู่ อินนูลินพบได้ในพืช ผัก ผลไม้ พืชบางชนิดพบปริมาณอินนูลินสูง เช่น กระเทียม แก่นตะวัน หัวชิโครี หัวหอม อินนูลินมีลักษณะเป็นเส้นใยสามารถละลายน้ำได้ ซึ่งร่างกายไม่สามารถย่อยได้ในระบบทางเดินอาหาร อินนูลินมีรสชาติหวานเหมือนน้ำตาลแต่มีแคลอลี่ต่ำไม่ให้พลังงาน ถูกย่อยได้ด้วยแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมยาซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Shoaib et al. 2016)



ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของอินนูลิน

ที่มา: (Shoaib et al. 2016)

คุณลักษณะและลักษณะทั่วไปของฟรุกแทน

ฟรุกแทน เป็นสารบริสุทธิ์มีความหวาน 1 ใน 4 ของน้ำตาลทรายสามารถละลายน้ำได้ดีให้พลังงานต่ำ มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ซึ่งจะช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ส่งผลดีต่อการทำงานในระบบทางเดินอาหารและสุขภาพ อินนูลินและโอลิโกฟรุกโตสเป็นส่วนประกอบตามธรรมชาติในพืชผักและธัญพืช มีคุณสมบัติเฉพาะที่ไม่ย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร สามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียชนิดจำเฉพาะที่มีอยู่ตามลำไส้ใหญ่จำพวก *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ซึ่งจะส่งผลดีต่อสุขภาพ พรีไบโอติกมีหลายชนิด เช่น อินนูลิน ฟรุกโต–โอลิโกแซคคาไรด์ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (วินัศ ภูมินาถ, 2555)

1. ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide)

ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) จัดเป็นประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งมีขนาดโมเลกุลขนาดกลางหรือที่เรียกว่า โอลิโกแซคคาไรด์ มีขนาด 3–9 โมเลกุล ส่วนฟรุกโต–โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตขนาดโมเลกุลกลางอยู่ระหว่างน้ำตาลและแป้ง มีรสชาติออกหวานเล็กน้อย ความหวานประมาณ 30% ไม่จืดแต่ไม่หวานจัด ละลายน้ำได้ดีแต่ไม่หนืดและยังให้พลังงานต่ำ 1–1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม (วรรณคล เชื้อมงคล, 2556ม) ฟรุกโตสกับฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่เหมือนกัน โดยฟรุกโตสจะเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว ส่วนฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เป็นน้ำตาลเชิงซ้อน นอกจากนั้นยังพบในพืชที่ใช้เป็นอาหารประเภท หัวหอม กระเทียม กล้วย แก่นตะวัน หน่อไม้ฝรั่ง ข้าวไรย์ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ปริมาณ อินนูลิน และ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด) ของพืชชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นอาหาร

ชนิดของพืช	น้ำหนักแห้ง (% dry solid content)	อินนูลิน และ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (%)
หัวหอม	6	6
กระเทียม	40	16
กล้วย	14	0.7
แก่นตะวัน	29	19
Chicoly root	20	20
ข้าวไรย์	88	1

ที่มา : (วินัศ ภูมินาถ, 2555)

นอกจากนั้นอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Prebiotic) คือ เป็นอาหารของจุลินทรีย์ในลำไส้ของมนุษย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (Prebiotic) ระบบเอนไซม์ในทางเดินอาหารของร่างกายมนุษย์ ไม่ถูกย่อยและไม่สามารถช่วยให้เกิดการไฮโดรไลซ์ได้ รวมทั้งการหมักและย่อยในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียชนิดแอนาโรบิค โดยปกติในระบบลำไส้และระบบทางเดินอาหาร สามารถย่อยได้น้อยมากทำให้มีผลต่อภาวะโรคอ้วนโดยตรง ในปัจจุบันมีการพัฒนานำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหาร ดังนี้ (วินัศ ภูมินาถ, 2555)

1. นำมาใช้ทดแทนไขมันในอาหารได้หลายชนิด เช่น เครื่องดื่ม อาหารว่าง ผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ยังใช้เป็นสารทดแทนไขมัน ในครีม สลัดครีม เนยแข็ง และไอศกรีม เพื่อช่วยควบคุมไขมันในเลือด เพิ่มการดูดซึมและการใช้ประโยชน์แคลเซียมอีกด้วย

2. คุณสมบัติละลายในน้ำร้อนได้ดี ทำให้เนื้อสัมผัสให้มีความหนาขึ้นเพิ่มความข้นหนืดของผลิตภัณฑ์ จึงเหมาะสมนำมาผสมในผลิตภัณฑ์นมและโยเกิร์ต

3. สารทดแทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ให้ความหวานประมาณ 30–50% ของน้ำตาลทราย เหมาะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน และด้วยคุณสมบัติที่ไม่สามารถย่อยให้กลายเป็นกรดได้

4. เพิ่มใยอาหารในผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์ขนมอบ เพื่อลดแคลอรี่ให้น้อยลง ควบคุมน้ำหนักได้เพราะทำให้อิ่มเร็ว ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแคปซูลและยาเม็ดพวกสกัดจากใยอาหารที่มีสารจำพวกฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ อินนูลิน และฟรุกแทน

2.กระเทียม

กระเทียมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum Linn.* จัดอยู่ในวงศ์ *Alliaceae* อยู่ในตระกูลเดียวกับหอมหัวใหญ่และหอมแดง ต่างกันตรงที่หัวหอมจะเป็นบัลบ์ (bulb) ขนาดใหญ่อันเดียว ส่วนกระเทียมจะประกอบด้วยบัลบ์มีขนาดเล็ก หลายอันซ้อนเรียงกันเรียกว่า กลีบ จัดเป็นพืชสมุนไพรไทยและเป็นเครื่องเทศชนิดหนึ่งโดยมักใส่ในอาหารหลายชนิด ทั้งอาหารไทย อาหารอินเดีย กระเทียมมีชื่อสามัญท้องถิ่นอื่นอีกคือ กระเทียมขาว กระเทียมจีน (กลาง) ปะเซ้วา (กะเหรี่ยง,แม่ฮ่องสอน) หอมขาว (อุดรธานี) หอมเทียม (เหนือ) หัวเทียม (ใต้) (พิชชา ธิราช, 2556)

2.1. ลักษณะของกระเทียม

เป็นไม้ล้มลุกสูง 30–60 ซม. มีหัวใต้ดิน ลักษณะหัวกลมแป้นมีกลีบซ้อนเรียงกัน มีแผ่นเยื่อสีขาวหรือสีม่วงอมชมพูหุ้มอยู่ 3–4 ชั้น ซึ่งลอกออกได้ แต่ละหัวมี 6–10 กลีบ เกิดจากตาซอกใบของใบอ่อน บางสายพันธุ์จะมีกลีบเดียวเรียกว่า กระเทียมโทน การปลูกจะใช้กลีบกระเทียมเป็นพันธุ์ปลูกเหมาะสำหรับปลูกในดินร่วนปนทราย มีการระบายน้ำได้ดี กระเทียมจะลงหัวในช่วงที่มีอากาศหนาว ดังนั้นจึงปลูกได้ดีเฉพาะในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากส่วนของกลีบที่ใช้ ในการบริโภคใบกระเทียมก็สามารถนำไปบริโภคได้

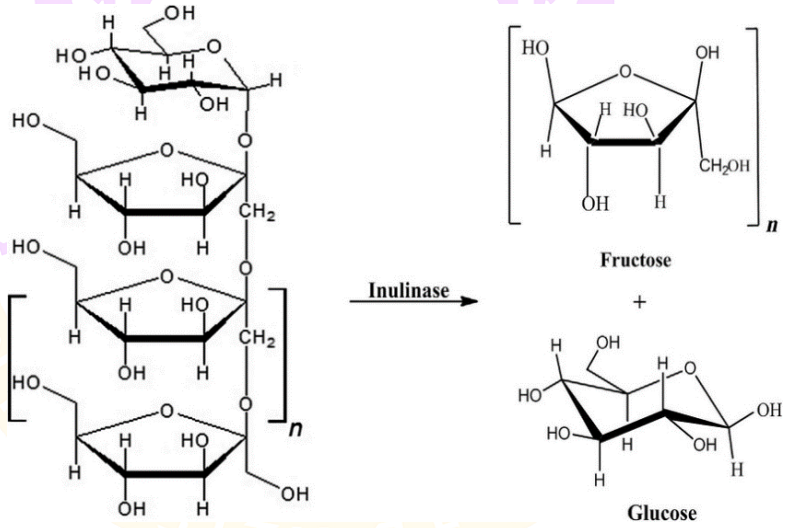
2.2 สารเคมีที่พบในกระเทียม

สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักของกระเทียมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารที่ละลายน้ำได้ได้แก่ S–allylcysteine (SAC) และ S–allylmercaptocysteine (SAMC) และสารที่ละลายในไขมัน ได้แก่ diallyl sulfide (DAS), triallyl sulfide, diallyl disulfide (DADS), diallyl polysulfides (จันเพ็ญ บางสำรวจ, 2553) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันไม่ให้ผนังของหลอดเลือดชั้นในถูกทำลายซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง ออกฤทธิ์โดยจับกับ

อนุมูลอิสระหรือเพิ่มการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ อรุณี ฝาระมี, น้ำผึ้ง ดุงโคกกรวด และชูศักดิ์ นิธิเกตุกุล (2558) สกัดอินนูลินจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารเป็นพิษ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* พบว่า สารสกัดอินนูลินจากกระเทียมโทน ตรวจสอบปริมาณด้วยเครื่อง GC พบว่ามีปริมาณ 75.18% โดยสารสกัดอินนูลินที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้สูง

เอนไซม์อินนูลินเนส (Inulinase)

เอนไซม์อินนูลินเนส (Inulinase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอินนูลินให้ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นอินนูโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Inulo-Oligosaccharides) และฟรุกโตส (Fructose) เป็นผลิตภัณฑ์รองมีโครงสร้างเคมี ดังแสดงในภาพ 2



ภาพ 2 โครงสร้างเอนไซม์อินนูลินเนส

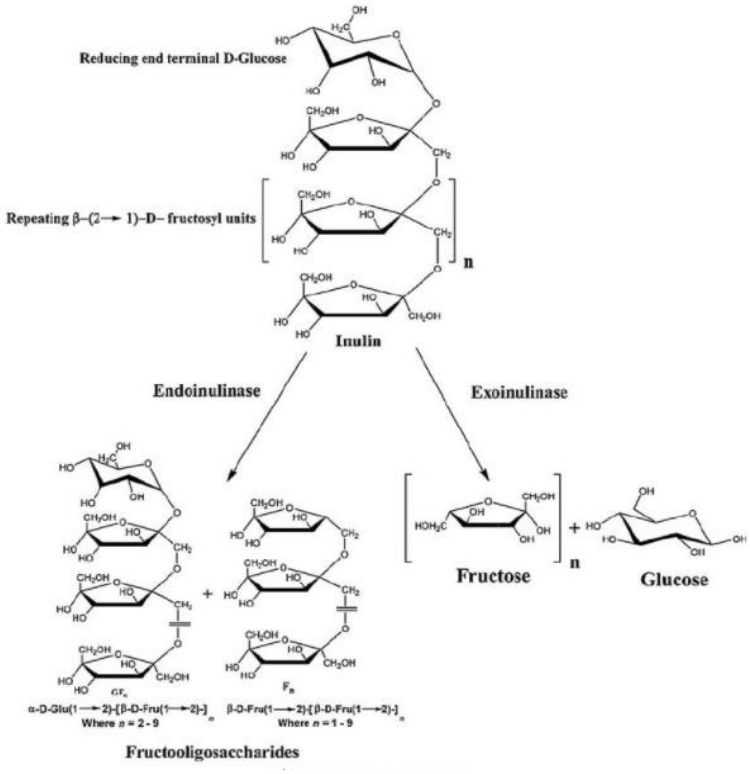
ที่มา: (Singh, Singh, & Pandey 2019)

ประเภทของเอนไซม์อินนูลินเนส

เอนไซม์อินนูลินเนส แบ่งรูปแบบของการไฮโดรไลซ์ออกเป็น 2 ชนิด คือ เอนโดอินนูลินเนสและเอกโซอินนูลินเนส

1) **เอนโดอินนูลินเนส (Endoinulinase)** จะย่อยฟรุกแทนในอินนูลินได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินนูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Inulo–Oligosaccharides) และฟรุกโตส (Fructose) เป็นสารที่ให้ความหวานและพลังงานต่ำจัดเป็นพรีไบโอติก และใช้เป็นส่วนประกอบในการทำอาหารเพื่อสุขภาพ ดังแสดงในภาพที่ 3

2) **เอกโซอินนูลินเนส (Exoinulinase)** จะทำหน้าที่ตัดพันธะบีตา 2, 1 ฟรุกโตสที่ปลายของอินนูลินออกทีละโมเลกุล ใช้ในการผลิตฟรุกโทสไซรัป ดังแสดงในภาพ 3



ภาพ 3 ผลิตภัณฑ์อินนูลินเนส

ที่มา : (Singh, & Singh, 2016, p. 423–446)

แหล่งที่มาของอินนูลินเนส

จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้สูง ใช้ระยะเวลาสั้นในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว จึงมีการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตอินนูลินเนสในอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอินนูลินเนสได้ ได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์ส่วนมากมักจะสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอินนูลินเนส ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างอินนูลินเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	อุณหภูมิ	พีเอช	กิจกรรมของเอนไซม์	เอกสารอ้างอิง
Cryptococcus aureus G7a	กระเทียม	50 °c	5.0	85.0 U/mL	Sheng, Chi, Li, Gao. & Gong, (2008)
Streptomyces sp. CP01	รากแก่นตะวัน	55 °c	6.0	1.60 U/mL	รุ่งตระการ จันทนพันธ์ (2552)
Streptomyces PC22	แก่นตะวัน	60 °c	6.5	0.16 U/mL	กัลป์กิยา ชนิตรนันท์ (2552)
Streptomyces CH7	แก่นตะวัน	55 °c	6.0	0.12 U/mL	
Candida guilliermondii TISTR 5844	อินนูลิน กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แป้ง	30- 40 °c	6.0	473.26 U/L	มลนพรรษ สงพิมพ์, พิลาณี ไวถนอมสัตย์ และวิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา(2553)
Stenotrophomonas Maltophila D457	กระเทียม	55 °c	5.0	170 U/mL	Navraj, Tariq, & Aruna (2016)
Penicillium oxalicum BGPUP-4	inulin	55 °c	5.0	4.77 (IU/mg protein)	Singh, Chauhana, Pandey, Larroche, & Kennedy, (2018)
Aspergillus tritici	*Asparagus racemosus* root	55 °c	5.5	25.39 IU/mL	Singh et al. 2020
Aspergillus tritici BGPUP6	raw *Asparagus* inulin	55 °c	5.5	4.83 (IU/mg protein)	Singh, Singh, & Kennedy, 2020

หมายเหตุ : อุณหภูมิและค่าพีเอชเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมของเอนไซมิอินนูลินเนส

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ในจุลินทรีย์

1. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้แต่ในแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณมากบางชนิดก็ผลิตได้ปริมาณน้อย ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่แตกต่างออกไป

2. แหล่งคาร์บอนและไนโตเจนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ซึ่งจะแตกต่างกันออกไปจุลินทรีย์บางชนิดจะมีอาหารจำเพาะแล้วแต่จะประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเหมาะสมต่อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปปัจจัยที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งพลังงาน วิตามิน แร่ธาตุ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างของอาหาร และออกซิเจน

แหล่งคาร์บอน หมายถึง สารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และให้พลังงานแก่จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะต้องการแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันออกไป จุลินทรีย์ที่เจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจนจะใช้แหล่งคาร์บอนแค่ 10% เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ต่างๆ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญโดยใช้ออกซิเจนจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50 – 55% ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ต่าง ๆ (ดนุวัต เพ็งอ้น, และคณะ, 2552)

แหล่งไนโตรเจน หมายถึง สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน เกลือ แอมโมเนียมต่างๆ เป็นต้น ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ถ้าไนโตรเจนของสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญ จุลินทรีย์จะไม่สามารถสังเคราะห์เซลล์ได้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะใช้ไนโตรเจนแตกต่างกันออกไป บางชนิดสามารถเจริญโดยใช้ไนโตรเจนจากอินทรีย์ บางชนิดเจริญโดยใช้ไนโตรเจนจากอนินทรีย์ ดังนั้นการเลือกใช้ไนโตรเจนให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งสำคัญ (ดนุวัต เพ็งอ้น, และคณะ, 2552)

อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) คือ อาหารที่มีส่วนประกอบของสารอาหารที่ส่งเสริมการเจริญให้จุลินทรีย์และแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานทางจุลชีววิทยามีหลายลักษณะ เช่น อาหารเหลว (Broth) อาหารแข็ง (Solid medium) โดยการเติมวุ้น 1.5–2.0% และยังมีอาหารกึ่งแข็ง (Semi – solid) ที่เติมผง วุ้น (Agar) เพียง 0.3–0.5% เพื่อใช้ในการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของไนโตรเจนก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารแตกต่างกัน ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปควรมีคุณสมบัติดังนี้ (เนียรวรรณ มีเจริญ, 2560) (เอกสารจากเว็บไซต์)

1. มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์
2. มีความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรี
3. ปราศจากสารพิษที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์
4. ปราศจากสิ่งมีชีวิตชนิดใด ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

3. สภาวะในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ค่าความเป็นกรด–ด่าง การเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นโดยกระบวนการเมทาบอลิซึม มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาถูกควบคุมด้วยพีเอช ค่าพีเอชที่เหมาะสมจะในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์จะแตกต่างกัน โดยทั่วไป ยีสต์ และราจะเจริญได้ดีในค่าพีเอชที่ต่ำกว่าพวกแบคทีเรีย ในกระบวนการหมักหลายชนิดจะทำให้มีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงได้เร็วซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงมีการปรับค่าพีเอชให้คงที่ (มลนพรรษ สงพิมพ์ และคณะ, 2553) ได้เพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5844 ลงในอาหารที่ผสมอินนูลินโดยกำหนดค่าพีเอชที่ 5.0 มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ในธรรมชาติของจุลินทรีย์จะสามารถเอาตัวรอดและเพิ่มปริมาณได้มากขึ้นอย่างรวดเร็วในอุณหภูมิที่ 10–90 องศาเซลเซียส ถ้าหากว่าอุณหภูมิสูงหรือต่ำ จะส่งผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์

อุณหภูมิที่ส่งผลให้มีการเจริญสุงสุดในช่วงเวลาสั้นเรียกว่า optimum growth temperature (ดวงฤทัย นิคมรัฐ และ มาโนช หลักฐานดี, 2560)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เพียงพร บางทุ่มแบน (2556) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินนูลินเนสโดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตร ได้คัดกรองเชื้อราจากดินที่เพาะปลูกแก่นตะวันและหัวแก่นตะวันซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้ พบว่าเชื้อที่สามารถผลิตอินนูลินเนสได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลทคือ T_1 I_6 I_{11} และ I_{12} โดยเชื้อไอโซเลท I_6 และ T_1 ระบุเป็น *Fusarium* sp. ถูกคัดเลือกมาทดสอบหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตอินนูลินเนส พบว่า *Fusarium* sp. T_1 และ *Fusarium* sp. I_6 ได้ค่ากิจกรรมของอินนูลินเนสสูงสุดเมื่อใช้ผงกระเทียมจีนและผงแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบการผลิตอินนูลินเนสโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน พบว่า *Fusarium* sp. T_1 สามารถผลิตอินนูลินเนสได้สูงกว่า *Fusarium* sp. I_6 ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินนูลินเนสของเชื้อ *Fusarium* sp. T_1 คือการใช้แหล่งคาร์บอนจากผงกระเทียมจีนมีความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 7 วัน พบกิจกรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.0376±0.0023 U/mL

Navraj et al. (2016, p. 1–14) สามารถคัดแยกเชื้อจากดินบริเวณรอบต้นกล้วยพบว่าเป็นเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* D457 นำไปทดสอบการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนส พบว่าสูตรอาหาร M9 ที่มีสารสกัดกระเทียม 1%, แอมโมเนียมซัลเฟต 1%, Na_2HPO_4 0.2%, 0.5% K_2HPO_4, 0.2% NH_4Cl, 0.4% NaCl และ 0.7% ยูเรีย, pH 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่สภาวะคงที่ ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 170 U/mL มีการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 5 ผลของไอออนโลหะชนิดต่างๆ พบว่าไอออน $Mn2^+$ ช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ได้ 108.23%

Das, Selvara & Ramananda Bhat, (2019) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตอินนูลินเนสโดย *Aspergillus flavus* var. flavus สายพันธุ์ใหม่ ในการทดลองได้มีการแยกเชื้อในดินจากป่าชายเลนพบทั้งหมด 4 ไอโซเลท ซึ่งพบว่า *Aspergillus flavus var.* flavus 16883

เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงแบบ Solid state fermentation โดยใช้อาหารประกอบด้วย *Saccharum anrundinaceum* พบว่าหลังจาก 96 ชั่วโมง มีกิจกรรมอินนูลินเนสสูงสุด 3.48 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (U/gds) จากนั้นนำมาศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอินนูลินเนส พบว่าส่วนประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารอาหารสำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ inulin 0.1, k_2HPO_4 0.05, $(NH_4)_2SO_4$ 0.002, KH_2PO_4 0.005 และ NaCl 0.02 g/gds เมื่อมีการทดสอบกิจกรรมของอินนูลินเนสพบว่า 8.57 U/gds ซึ่งสูงกว่าเดิม 2.5 เท่า

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, นิศากร วรวุฒิยานันท์, และ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ (2547) การแยกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากหัว *Jerusalem artichoke* พบจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน 15 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีอัตราการเติบโตเร็วบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีอินนูลินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ 4 สายพันธุ์นำไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตอินนูลินเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้ รวมทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และแอคติโนมัยซิสที่แยกได้ โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีอินนูลินเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาจลนพลศาสตร์การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ที่มีการเกิดกิจกรรมอินนูลินเนสสูงได้แก่ KU-F1, KU-A1 และ KU-Y1 เท่ากับ 120.22, 119.25 และ 103.42 U/mL, $x10^{-3}$ ตามลำดับ เอนไซม์ดิบของแบคทีเรีย KU-B3 คำนวณค่า I/S ratio ไม่ได้เนื่องจากไม่แสดงกิจกรรมของอินเวอร์เทส (S) เชื้อรา KU-F7 มีอัตราการผลิตอินนูลินเนสเชิงปริมาตร (Q_1) สูงที่สุดเท่ากับ 1.45 U/mL h, 10^{-3} และแอคติโนมัยซิส KU-A1 มีอัตราการเติบโตจำเพาะ $\mu = 0.069\ h^{-1}$ สูงสุด

Rawat, Jain, & Kango, (2015 p. 61-68,) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตอินนูลินเนสโดยรา *Penicillium* sp. NFCC 2768 ที่แยกจากดินของดอกรักเร่ที่มีอินนูลินเป็นส่วนประกอบ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้สารสกัดจากพืชผสม ได้แก่ ดอกรักเร่ หน่อไม้ฝรั่ง กระเทียม และหอมหัวใหญ่ พบกิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสที่ 64.54±6.92, 45.23±3.31, 41.32±4.72 และ 13.65±1.75 nkat/ml ตามลำดับ พบว่าดอกรักเร่เกิดกิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสสูงสุด ที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุลของ inulinase คือ 68 kDa

Singh, Singh, and Kennedy (2020, p. 3535–3545) ศึกษาการผลิตเอนโดนูลิเนสโดยใช้ *Aspergillus tritici* เพาะเลี้ยงแบบ shake-flask fermentations. โดยออกแบบการทดลองที่มีองค์ประกอบของสารอาหาร 4 ชนิด ดังนี้ อินนูลินจาก Asparagus 1.5 – 3.5% เปปโตน

0.2–1.8% แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2–1.8% และ pH 4.5–6.5 เพื่อปรับองค์ประกอบในการหมักให้เหมาะสมเพื่อการผลิตเอนโดนูลิเนส พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสประกอบด้วย raw inulin 2.5%, peptone 1%, $(NH_4)H_2PO_4$ 1% pH 5.5 กิจกรรมของเอนโดนูลิเนสสูงสุดเท่ากับ 25.39 IU/mL

Singh et al., (2018) ศึกษาการทำเอนไซม์เอกโซอินนูลินเนส (exoinulinases) ให้บริสุทธิ์ มีการเพาะเลี้ยง *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 ใช้ในการหมักกับอาหารที่ผสมอินนูลินทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้ ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี 3 ขั้นตอน พบว่าน้ำหนักมวลโมเลกุลของ Exo-I และ Exo-II คือ 64.85 kDa และ 32.54 kDa ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่า high specificity โดยใช้เครื่องวิเคราะห์มวลของสารชีวโมเลกุล MALDI-TOF แสดงค่าในอัตราส่วนของในรูป Vmax/Km ratio ของเอนไซม์ Exo-I และ Exo-II มีค่าเท่ากับ 3.74 และ 7.20 ตามลำดับการทำงานของเอนไซม์ Exo-I และ Exo-II มีความคงตัวที่ค่าพีเอชในช่วง pH 4.0–8.0 โดยมีพีเอชที่เหมาะสม 5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับอินนูลินเนสทั้งสองคือ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ทั้งสองชนิดยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์อยู่ 50% เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นที่ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์บริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในการเตรียมน้ำเชื่อมฟรุกโตสสูงจากอินนูลินได้สำเร็จ

Singh et al. (2020) ศึกษาการทำให้เอนไซม์อินนูลินเนสบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค 3 ขั้นตอน ดังนี้ การตกตะกอนของไอโซโพรพานอล การแลกเปลี่ยนไอออน และโครมาโตกราฟีแบบไม่รวมขนาด เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus tritici* BGPUP6 พบว่าเอนโดอินนูลินเนสมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 53.45 kDa และ 53.70 kDa เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH 4.0–7.0 โดยมี pH ที่เหมาะสม 5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส โดยมีความสามารถในการคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 50–70 องศาเซลเซียส เอนไซม์เอนโดนูลิเนสบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในการผลิต ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides) จากอินนูลินได้สำเร็จ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการ

พืชที่ใช้ในการทดลอง

1. กระเทียมสายพันธุ์พื้นเมือง จากตลาดสดหน้ามหาวิทยาลัยพะเยา 1 ร้าน อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา พิกัด E. 595815 N. 2116432
2. กากกระเทียม จากกลุ่มสกัดน้ำมันกระเทียมของชาวบ้านในเขตพื้นที่ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Autoclave
2. Hot air oven
3. pH meter
4. Rotary shaker
5. Water bath
6. Spectrophotometer
7. Auto pipette
8. Centrifuge
9. Erlenmeyer flask
10. Petri dish plastic
11. Flask
12. Test tube
13. Cuvette
14. Microcentrifuge tube

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Potato dextrose agar ((Himedia))

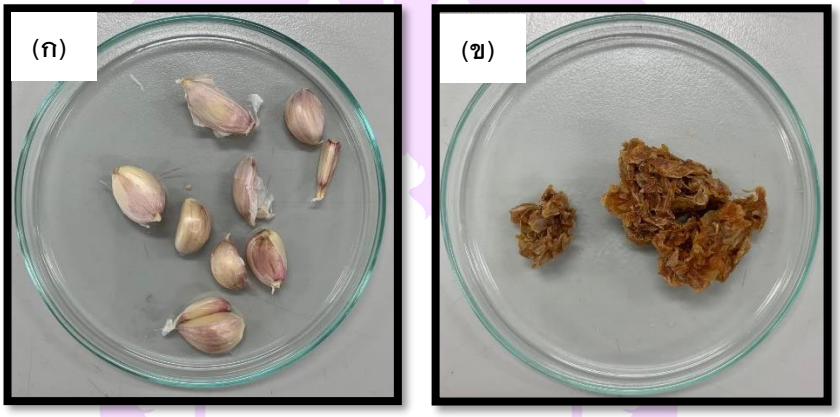
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ฟรุกโตส (Frucorse ยี่ห้อ Fisher Chemica)
2. ไอโอดีน (Iodine ยี่ห้อ Qrec)
3. ผลวุ้น (Agar ยี่ห้อ นางเงือก)
4. อินนูลิน (Inulin ยี่ห้อ กรุงเทพเคมี จำกัด)
5. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate ยี่ห้อ RCI Labscan)
6. โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate ยี่ห้อ Ajax Finechem)
7. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate ยี่ห้อ RCI Labscan)
8. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride ยี่ห้อ Ajax Finechem)
9. โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer ยี่ห้อ Qrec)
10. 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS reagent ยี่ห้อ Loba Chemie)
11. Tris–HCl 100 mM ยี่ห้อ Himedia
12. โซเดียม คลอไรด์ (Sodium Chloride 1.4 M ยี่ห้อ Loba Chemie)
13. Chloroform isoamyl alcohol ยี่ห้อ Qrec
14. Phenol : chloroform (ยี่ห้อ Loba)
15. Absolute ethanol (ยี่ห้อ RCI Labscan)
16. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 2 %
17. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 20 mM
18. CTAB buffer 2 % v/w

วิธีการทดลอง

1. คัดแยกเชื้อราจากกระเทียม

ทำการเก็บกระเทียมจากร้านค้าที่ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยพะเยา ตำแหน่งพิกัด Easting 595815 Northing 2116432 ในเดือนมิถุนายน 2563 และเก็บตัวอย่างกากกระเทียมจากกลุ่มสกัดน้ำมันกระเทียมของชาวบ้านในเขตพื้นที่ ตำบลบ้านถ้ำ อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา



ภาพ 4 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อ (ก) กระเทียม (ข) กากกระเทียม

ชั่งกระเทียม 5 กรัม กากกระเทียม 5 กรัม แยกใส่ถุงร้อนใสขนาด 3 นิ้ว x 5 นิ้ว อย่างละถุง จากนั้นบดให้ละเอียด เทลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 45 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 2-3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสมาเจือจางถึง 10^{-6} นำไป spread ลงบนอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วย ผงวุ้น 2 กรัม อินนูลิน 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 30 กรัมต่อลิตร โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 1.0 กรัมต่อลิตร (Das, Selvara & Ramananda Bhat, 2019) pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นคัดแยกเชื้อที่เกิดบนอาหารแข็งลงบนอาหารทดสอบในการผลิตเอนไซม์นำเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อและทิ้งไว้จนแห้งเย็น เจาะเส้นใยของเชื้อราบริเวณรอบนอกของโคโลนี จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราลงบนจานอาหารแข็งที่ผสมอินนูลินลงบนจานละ1 ชิ้น วางบริเวณตรงกลางของอาหารและคว่ำเส้นใยเพื่อให้สัมผัสกับจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นหยดสารละลาย lugol's iodine ลงไป 5 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที สังเกตดูการเกิด clear zone บริเวณรอบๆของโคโลนีและวัดจุด

ศูนย์กลางของการเกิด Clear zone คัดเลือกเชื้อราที่เกิด clear zone ได้ดีที่สุดเพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมอินนูลินเนสต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลว

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อที่แยกได้จากอาหารแข็ง 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราบริเวณขอบของโคโลนี 5 ชิ้น ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเหลวอยู่ 100 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วยอินนูลิน 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 30 กรัมต่อลิตร โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ที่ 5.5 ดัดแปลงสูตรอาหารมาจาก(Das, Selvara & Ramananda Bhat, 2019) เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส นาน 7 วันโดย เก็บผลการทดลองในวันที่ 3,5 และ 7

2.2 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนส

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ดัดแปลงวิธีการ*จาก* (Das, Selvara & Ramananda Bhat, 2019) ผสมอินนูลิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 กรัม ละลายในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 แบบ ดังนี้ การบ่มนั้นจะดูดสารละลายบัฟเฟอร์ใส่หลอดทดลอง 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์จากที่เลี้ยงในอาหารเหลว 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซียลเซียส 30 นาที เติม dinitrosalicylic acid (DNS) 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ส่วนการทดสอบแบบไม่บ่มหลังจากเติมสารละลายบัฟเฟอร์กับเอนไซม์เสร็จ เติม DNS reagent 500 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของอินนูลินเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, นิศากร วรวุฒิยานันท์, และ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ 2547, น. 362-369)

กิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนส = A × 0.370 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/mL)

A หมายถึง ปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา (มิลลิกรัม)

3. การระบุสายพันธุ์เชื้อราที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการทางโมเลกุล

3.1 การระบุสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน (morphological identification)

3.1.1 การทำ slide culture

เทอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ลงบนจานอาหารหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็นและแข็งตัว ใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดวุ้นอาหาร PDA ให้มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ลงบนแผ่นสไลด์ซึ่งวางอยู่บนแท่งแก้วรูปตัววี ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการเผาไฟ เขี่ยเชื้อราจากหลอดเก็บเชื้อบริสุทธิ์ มาแตะชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้านที่อยู่บนสไลด์ โดยใช้ 1 เชื้อต่อ 1 ชิ้นวุ้น ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบกระจกมาปิดชิ้นวุ้นบนสไลด์ โดยให้ชิ้นวุ้นอยู่ตรงกลางสไลด์พอดี ใช้ปากคีบ คีบสำลีชุบน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปิดฝา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน

3.1.2 การทำสไลด์กึ่งถาวร

ใช้ปากคีบค่อย ๆ คีบแผ่นกระจกปิดสไลด์ขึ้นมาจากชิ้นวุ้น วางคว่ำลงบนแผ่นสไลด์ ซึ่งมี lactophenol cotton blue หยดอยู่แล้ว ซับน้ำในส่วนที่ล้นออกมาจากกระจกปิดสไลด์ ใช้น้ำยาทาเล็บชนิดใสเคลือบบริเวณขอบรอบๆ แผ่นกระจกปิดสไลด์ ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยใช้กล้องผ่านจุลทรรศน์

3.2 การระบุสายพันธุ์โดยวิธีทางโมเลกุล (Molecular genetic identification)

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้ในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บเกี่ยวเส้นใยเชื้อราเพื่อนำมาบดด้วยโกร่ง ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา โดยใช้ GenJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo, made in EU Lithuania) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติม Digestion solution 250 ไมโครลิตร ดูดใส่ในหลอดใหม่ เติม proteinase k 20 ไมโครลิตร ลงไป นำไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส พร้อมกับ เขย่าให้เข้ากันทุกๆ 5 นาที รวมเป็นเวลาทั้งหมด 45 นาที จากนั้นเติม RNase A solution 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม Lysis buffer 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันทุกๆ 15 วินาที เติม 50% ethanol 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงแบบเบาๆ มือ จากนั้นดูดใส่ในหลอด Collection tube ในชุด kit นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที 6000 x g ถอดหลอดเก่าที่มีน้ำทิ้งไปเหลือแต่ตัวกรอง นำไปใส่ Collection tube ในหลอดใหม่ เติม wash

buffer I ลงไป 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที 8000 x g เมื่อเสร็จแล้วนำน้ำที่อยู่ในหลอดเททิ้งไป เติม wash buffer II ลงไป 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 3 นาที ≤ 12000 x g เมื่อเสร็จแล้วนำน้ำที่อยู่ในหลอดเททิ้งไป เปลี่ยนหลอดใหม่โดยใช้หลอด Microcentrifuge tube เติม Elution buffer 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที 8000 x g เติมน้ำกลั่น แล้วเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การระบุชนิดของเชื้อราที่คัดแยกได้

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่คือ ITS1 (5’–TCGGTAGGTGAACCTGCGG–3’) และ ITS4 ITS4 (5’–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3’) (T. J. White et al., 1990) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม และใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป OnePCRTM Plus โดยปฏิกิริยามีสภาวะดังนี้ ขั้นตอนที่หนึ่ง initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่สอง denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นตอน extension เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 29 รอบ และขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรส 1 เปอร์เซนต์ ที่ความแตกต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานนำ PCR Product ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ให้บริษัทอุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย (Thailand Science Park) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ITS* ที่ได้ไปวิเคราะห์ความเหมือนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) โดยใช้โปรแกรม Blastn ใช้เกณฑ์ระดับความเหมือนไม่น้อยกว่า 97% (%similarity cut–off) ในการระบุจีนัสและสปีชีส์ นำขอมูลที่ได้มาเปรียบเทียบในฐานขอมูล GenBank เพื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ (Phylogenetic Tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA11 สามารถจัดจำแนกราในระดับสปีชีส์ได้ตามแผนภูมิความสัมพันธ์

4. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากเชื้อราที่คัดแยกได้

4.1 การทดสอบปริมาณความเข้มข้นของอินนูลินที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ อินนูลินเนส

นำราที่คัดแยกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารแข็ง Potato dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของราบริเวณนอกสุดของโคโลนี 5 ชิ้น ใส่ลงอาหารเหลวที่มีปริมาณอินนูลิน 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยเก็บผลการทดลองในวันที่ 3, 5 และ 7 นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดย 1 Unit ของอินนูลินเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที (Das, Selvara & Ramananda Bhat, 2019)

4.2 การทดสอบค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เติมอินนูลินตามความเข้มข้นที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 4.1 โดยนำมาปรับค่า pH ที่ 5.0, 5.5, และ 6.0 เมื่อครบตามกำหนดนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานเอนไซม์อินนูลินเนส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เติมอินนูลินและปรับค่า pH ที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ 4.1 และ 4.2 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยเก็บผลการทดลองในวันที่ 3, 5 และ 7 นำไปทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50, 55, และ 60 องศาเซลเซียส นำวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกัน

5. ศึกษาความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์อินนูลินเนสจากเชื้อที่คัดเลือก โดยใช้กากกระเทียมเป็นแหล่งคาร์บอน

นำราที่คัดเลือกมา เพาะเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารแข็ง Potato dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของราบริเวณนอกสุดของโคโลนี 5 ชิ้น ใส่ลงอาหารเหลวที่มีปริมาณอินนูลิน 20 กรัมต่อลิตร และอาหารเหลวที่มีการผสมกากกระเทียมบดละเอียดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 120

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยเก็บผลการทดลองในวันที่ 3, 5 และ 7 เมื่อครบตามกำหนดนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way ANOVA) ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์อินนูลินเนสในเชื้อราที่แยกได้จากกระเทียม โดยการศึกษานำกระเทียมกับกากทระเทียมมาคัดแยกหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้สูงสุด โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในเชื้อราที่คัดแยกได้ ดังนี้

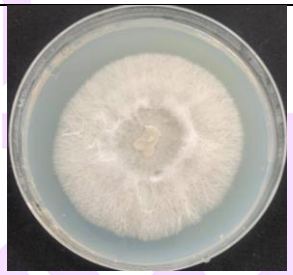
การคัดแยกเชื้อราจากกระเทียม

การคัดแยกเชื้อราจากกระเทียมและกากกระเทียมบนจานอาหารแข็งที่ใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เฉพาะชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันออกมาได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท เชื้อทั้งหมดมีลักษณะของโคโลนีดังแสดงในตาราง 3 ซึ่งจะมีลักษณะของโคโลนีและสปอร์แตกต่างกันไป

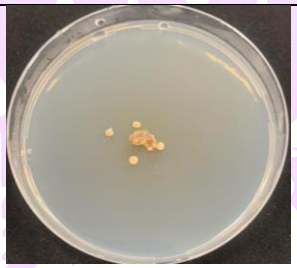
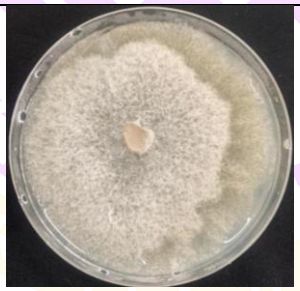
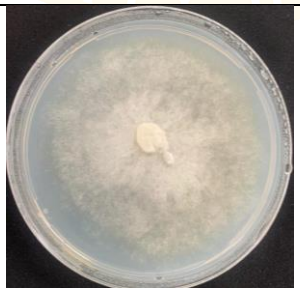
ตาราง 3 ภาพลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของเชื้อที่คัดแยกได้จากกระเทียมกับกากกระเทียมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ผสมอินนูลิน อายุ 5 วัน

ไอโซเลท IS = (inulin sample)	ภาพของเชื้อรา	ลักษณะของโคโลนีและสปอร์
IS1		เส้นใยสีขาวฟู ปุย ขอบค่อนข้างเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS2		เส้นใยสีน้ำตาลอ่อนๆ นูนขึ้นเป็นบางส่วน ขอบค่อนข้างเรียบ สปอร์สีน้ำตาลอ่อน ๆเจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง

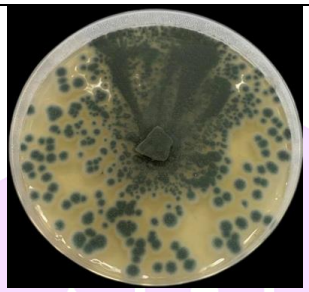
ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลท IS = (inulin sample)	ภาพของเชื้อรา	ลักษณะของโคโลนี และสปอร์
IS3		เส้นใยสีขาวฟู ขอบค่อนข้างเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS4		เส้นใยสีขาวฟู เส้นใยตรงขอบมีสีเหลืองอ่อนค่อนข้างเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS5		เส้นใยสีขาว ปุย ขอบเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS6		เส้นใยสีขาว ขอบค่อนข้างเรียบ มีการสร้างสปอร์สีน้ำตาลอ่อนๆตรงขอบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS7		เส้นใยสีขาว ขอบค่อนข้างเรียบ มีการสร้างสปอร์สีน้ำครีมอ่อนๆตรงขอบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลท IS = (inulin sample)	**ภาพของเชื้อรา**	**ลักษณะของโคโลนี** **และสปอร์**
IS8		เส้นใยสีขาวฟู ปุย ขอบค่อนข้างเรียบ มีการเจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS9		โคโลนีสีเหลือง นูนเป็นวงกลม ขอบเรียบ เจริญเติบโตช้า
IS10		เส้นใยบางสีเหลืองอ่อน ขอบค่อนข้างเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS11		เส้นใยสีขาว ขอบไม่เรียบ มีการสร้าง สปอร์สีน้ำตาลตรงขอบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS12		เส้นใยบางสีเหลืองอ่อน ขอบค่อนข้างเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลท IS = (inulin sample)	ภาพของเชื้อรา	ลักษณะของโคโลนี และสปอร์
IS13		เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียว ขอบไม่ค่อยเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง
IS14		เส้นใยสีขาว ฟู ขอบไม่ค่อยเรียบ เจริญได้ดี มีลักษณะแผ่กว้าง

เชื้อทั้ง 14 ไอโซเลท จากการคัดแยกเชื้อด้วยกระเทียมละกากกระเทียม พบว่าตัวอย่างที่มาจากกระเทียมมีทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ IS1, IS2, IS4, IS6, IS7, IS11, IS12, IS13 และ IS14 ตัวอย่างจากกากกระเทียมมีทั้งหมด 5 ไอโซเลท คือ IS3, IS5, IS8, IS9 และ IS10 โดยส่วนมากจะพบเชื้อจากตัวอย่างกระเทียม เนื่องจากกระเทียมมาจากแหล่งเพาะปลูกทางการเกษตร อาจมีเชื้อที่ติดมาจากดินหรือเชื้อจากหัวกระเทียมที่เน่า ซึ่งมีความชื้นและแหล่งอาหารที่เหมาะสม เป็นที่เจริญเติบโตของเชื้อรา ส่วนกากกระเทียมพบเชื้อจำนวนน้อยกว่า อาจเป็นเพราะกากกระเทียมได้ผ่านความร้อนสูงจากการอบมาแล้ว จึงพบเชื้อที่มีจำนวนน้อย โดยเชื้อที่พบ อาจเกิดจากเชื้อปนเปื้อนจากระยะเวลาและสภาวะการเก็บรักษาหลังจากช่วงการอบแห้ง

จากการคัดแยกเชื้อที่ได้ทั้ง 14 ไอโซเลท เจาะเส้นใยรอบโคโลนีไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหารแข็งที่ใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เฉพาะชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน หยดสารละลาย lugol's iodine เพื่อทดสอบการเกิดวงใสบริเวณรอบโคโลนี พบว่าการคัดแยกเชื้อที่เกิดวงใสบริเวณรอบโคโลนีได้จำนวนทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่ IS1 IS2 IS3 IS4 IS5 IS7 IS8 IS10 IS11 และ IS13 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบของโคโลนี ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี บริเวณรอบๆจากการคัดแยกเชื้อ

ไอโซเลท (IS)	ภาพการทดสอบ Lugol's solution	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี เซนติเมตร (cm)
IS1		3.3
IS2		4.1
IS3		3.3
IS4		3.4
IS5		3.0

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลท (IS)	ภาพการทดสอบ Lugol's solution	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี เซนติเมตร (cm)
IS7		2.5
IS8		3.5
IS10		2.3
IS11		4.5
IS13		3

จากการคัดแยกเชื้อราจากกากกระเทียมและกระเทียม หลังการทดสอบการเกิด Clear zone ด้วยการหยดไอโอดีนลงในอาหารแข็ง selective medium คัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าราทั้ง 10 ไอโซเลท มีการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจึงมีความสามารถในการย่อยอินนูลินที่ผสมในอาหารแข็ง มีความสอดคล้องกับรายงานของเพียงพร บางทุ่งแบน (2556) มีการคัดแยกเชื้อราจากดินบริเวณที่เพาะปลูกต้นแก่นตะวัน ซึ่งพืชชนิดนี้เป็นแหล่งสะสมของอินนูลิน โดยสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าราที่คัดแยกได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีอินนูลินสะสมอยู่มีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้

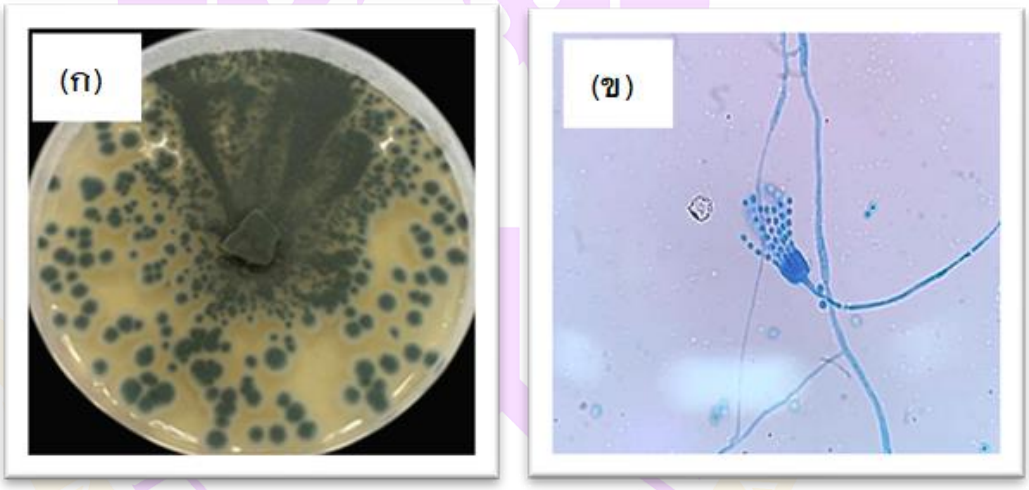
ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลว

เชื้อราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเจาะเส้นใยของเชื้อราบริเวณรอบนอกโคโลนีใส่ลงอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เฉพาะชนิด เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 5 และ 7 วัน พบว่าวันที่ 5 เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้สูงที่สุด IS13 (0.109±0.006 U/mL) ดังแสดงในภาพ 5

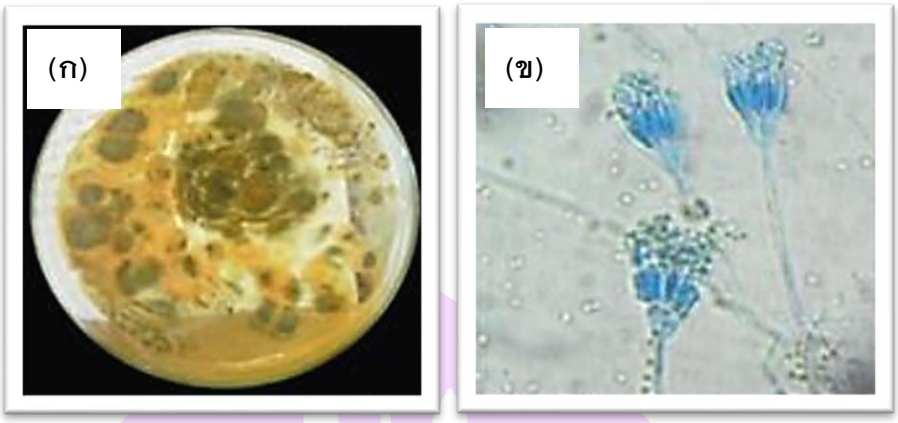
ภาพ 5 กิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลวของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารจำเพาะจุลินทรีย์เป็นเวลา 5 วัน

หมายเหตุ : *ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละ คอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$ ANOVA and Dancan's multiple range test)

จากผลกิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลวของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดมีความสามารถในการผลิตอินนูลินเนส โดยเฉพาะ IS13 สามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้สูงกว่าไอโซเลทอื่น จึงคัดเลือกเชื้อรา IS13 ไปตรวจสอบดูลักษณะสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในภาพที่ 6 พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของรา IS13 มีโคโลนีมีเส้นใยเป็นสีขาว สปอร์สีเขียวเข้ม เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้นตามขวางแต่ละ segment มีหลาย nucleus conidiophore ลักษณะรวมกลุ่มกันคล้ายแปรง เมื่อเปรียบเทียบกับภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *P. citrinum* (Saif et al. 2020) ซึ่งมีลักษณะของเส้นใย สีขาว และลักษณะของสปอร์เป็นสีเขียวเข้มเหมือนกัน ทำให้คาดได้ว่า IS13 จัดอยู่ในจีนัสเดียวกับรา *Penicillium*



ภาพ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ IS13 [ก] การเจริญของ IS13 เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 3 วัน [ข] IS13 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x

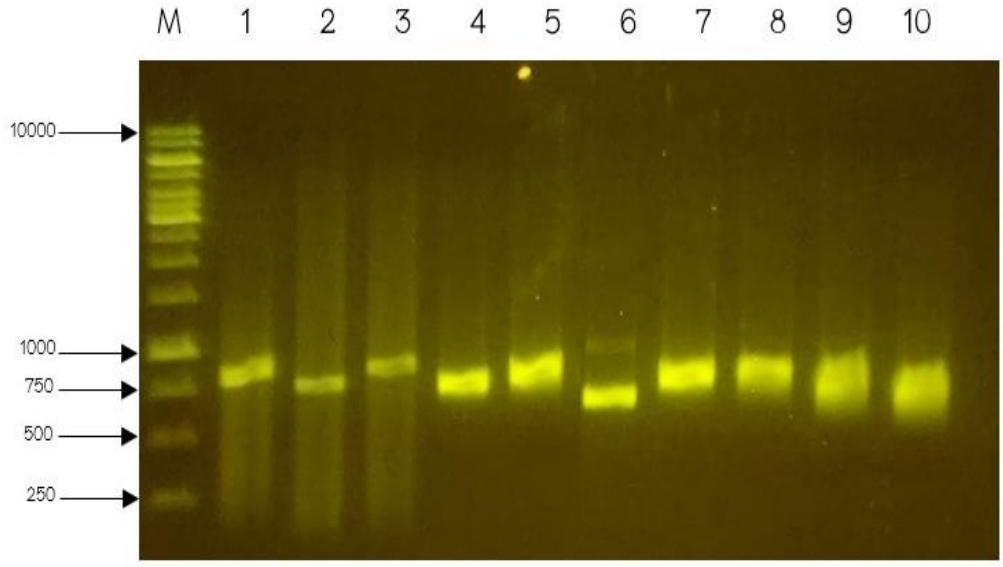


ที่มา : (Saif, Yaseen, Alameen, Mane and Undre, 2020)

ภาพ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ Penicillium citrinum [ก] การเจริญของ P. citrinum เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 3 วัน [ข] P. citrinum ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x

การระบุสายพันธุ์เชื้อราที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการทางโมเลกุล

จากการสกัดดีเอ็นเอของราทั้ง 10 ไอโซเลท มาจัดจำแนกโดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS โดยการทำ Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) ดังแสดงในภาพที่ 8 เพื่อระบุหาสายพันธุ์ของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท



ภาพ 8 ผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS): เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder เลน 1–10 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR จากราไอโซเลท IS1 IS2 IS3 IS4 IS5 IS7 IS8 IS10 IS11 และ IS13 ตามลำดับ

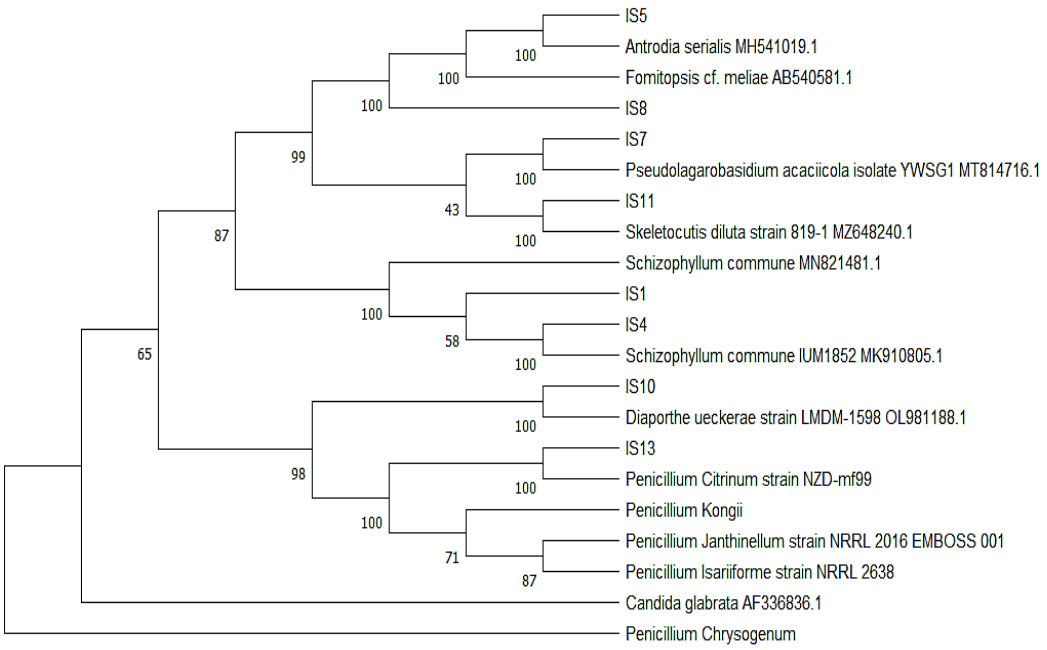
ตาราง 5 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ทั้ง 8 ไอโซเลท กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST

Isolate	% identity	% Coverage	สายพันธุ์ที่มีความเหมือนสูงสุด (ค่า GenBank accession number)
IS1	99	86	*Schizophyllum commune* (MN821481.1)
IS4	98	99	*Schizophyllum commune* (MK910805.1)
IS5	99	98	*Antrodia serialis* (MH541019.1)
IS7	99	100	*Pseudolagarobasidium acaciicola* (MT814716.1)
IS8	100	98	*Fomitopsis* cf. meliae KYO (AB540581.1)
IS10	100	99	*Diaporthe ueckerae* strain LMDM-1598 (OL981188.1)
IS11	100	98	*Skeletocutis diluta* strain 819-1 (MZ648240.1)
IS13	100	99	*Penicillium citrinum* strain NZD-mf99 (KM278047.1)

การใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เพื่อระบุสายพันธ์ของราทั้ง 10 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิคทาง PCR ซึ่งได้แสดงผลดังรูปภาพที่ 8 และการหาลำดับนิวคลีโอไทดบน Nuclear Ribosomal DNA (rDNA) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสวนของ rDNA บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ดวยไพรเมอร์คู่ ITS1 และ ITS4 พบว่าทั้ง 10 ไอโซเลท มีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 600-800 คู่เบส จากการทำปฏิกิริยา PCR และนำผลผลิตจากพีซีอาร์ที่เกิดขึ้น ส่งให้บริษัทอุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย (Thailand Science Park) ตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามี 8 ไอโซเลท ที่ตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ คือ IS1, IS4, IS5, IS7, IS8, IS10, IS11 และ IS13 ในส่วนที่ไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ คือ IS2 และ IS3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณภาพความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ได้ตามฑ์เกณฑ์ จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วน IT ของเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท ไปเปรียบเทียบความ

เหมือนกับข้อมูลในฐานข้อมูลGenBank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (Blastn) ดังแสดงในตาราง 5

จากการนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank พบว่าราทั้ง 8 ไอโซเลท สัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS จึงนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank อีกครั้ง เพื่อหาแผนภูมิสายพันธุ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ซึ่งสร้างด้วยวิธี Neighbor joining algorithm โดยใช้โปรแกรม MEGA software version 11 วิธีการที่ใช้วิเคราะห์ค่าตัวเลขที่แผนภูมิ คือค่า Bootstrap เป็นการทดสอบค่าความเชื่อมั่นของ Phylogenetic tree สามารถจัดจำแนกราทั้ง 8 ไอโซเลท ในระดับสปีชีส์ได้ตามแผนภูมิความสัมพันธ์ ดังแสดงในภาพ 9

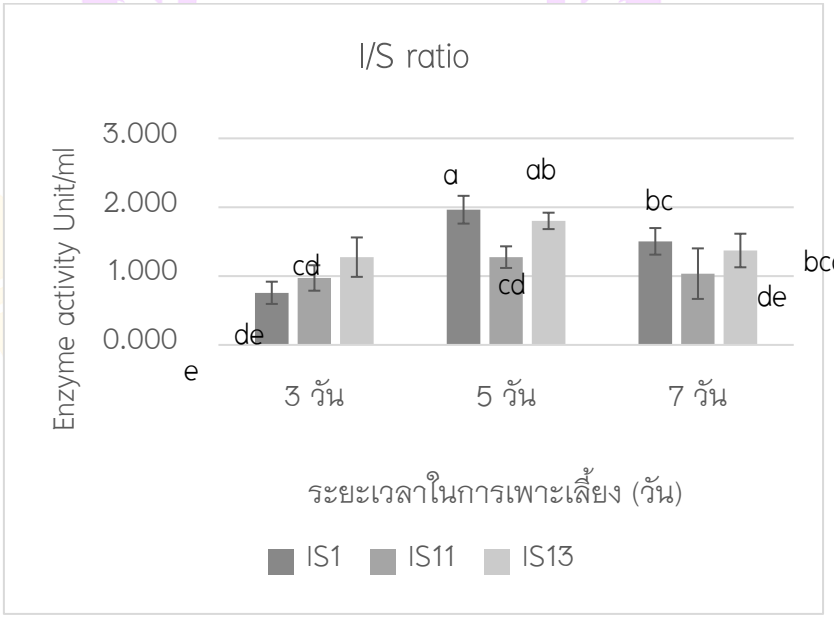


ภาพ 9 สายพันธุ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ประกอบด้วย IS1, IS4, IS5, IS7, IS8, IS10, IS11, IS13,
Schizophyllum commune IUM1852 MK910805.1,
Antrodia serialis (MH541019.1), *Pseudolagarobasidium acaciicola* YWSG1 (MT814716.1), *Schizophyllum commune* MN821481.1, *Fomitopsis cf. meliae* (AB540581.1), *Skeletocutis diluta* strain 819–1 MZ648240.1 , *Diaporthe ueckerae* strain LMDM–1598 (OL981188.1), *Penicillium citrinum*

strain NZD-mf99 (KM278047.1), *Penicillium Kongii*, *Penicillium Janthinellum* strain NRRL 2016 EMBOSS 001, *Penicillium Isariiforme* strain NRRL 2638, *Penicillium Chrysogenum*, *Candida glabrata* AF336836.1 ซึ่งสร้างด้วยวิธี Neighbor joining algorithm โดยใช้โปรแกรม MEGA software version 11

ในเบื้องต้นจากผลการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลว (ดังแสดงในภาพที่ 5) ของราทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ IS1, IS4, IS5, IS7, IS8, IS10, IS11 และ IS13 พบว่า รา IS1, IS11 และ IS13 เกิดกิจกรรมสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ จึงนำราทั้ง 3 ไอโซเลท มาวิเคราะห์หาอัตราส่วนของกิจกรรมเอนไซม์อินนูลิเนสต่อเอนไซม์ซูเครส (Inuliase/Sucrase ration ;I/S ratio) แปลผล I/S ration ค่ามากกว่า 0.01 (10^{-2}) แสดงว่าเชื้อมีการผลิตอินนูลินเนสสูง ในขณะที่ค่าน้อยกว่า 0.001 (10^{-4}) แสดงว่าผลิตเอนไซม์ invertase หรือเรียกอีกชื่อว่า Sucrase (Das, Bhat M & Selvaraj 2019) ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพ 10 ผลของ I/S ratio การเปรียบเทียบอินนูลินกับซูโครสของรา IS1 IS11 และ IS13

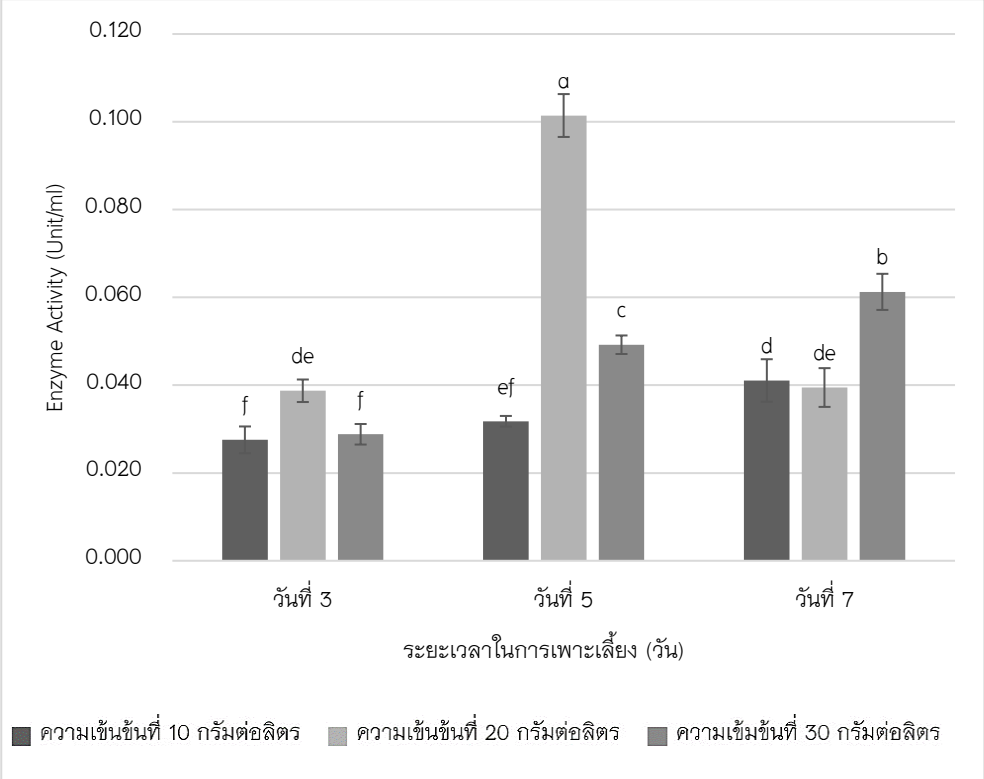
หมายเหตุ : *ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละ คอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$ ANOVA andDancan's multiple range test)

จากผลของ I/S ratio ของรา IS1 IS11 และIS13 พบว่า จากการตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ไอโซเลท IS1 มีค่าที่สูงกว่า IS13 แต่ IS1 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Schizophyllum commune* คือ เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก นิยมมารับประทานเป็นอาหารในรูปของแกงกะทิหรือลาบ (วีณา จิรัจฉริยากูล. 2559) ในขณะที่รายงานจาก Tsukatani T. et al. (2015) ในประเทศญี่ปุ่นพบว่า เชื้อรา *Schizophyllum commune* เป็นสาเหตุจากการเกิดโรคไซนัสอักเสบโดยใช้ผู้ป่วยทั้ง 28 ราย พบว่าผู้ป่วยที่มี *Schizophyllum commune* เหนี่ยวนำให้เกิด AFRS (allergic fungal rhinosinusitis) สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งเด็กและผู้ใหญ่ที่ และยังมีรายงานของ Tian, Mu, Zhang, Su, Yang, Shu, and Qing (2018) ศึกษาโรคที่เกิดทางผิวหนังจากเชื้อ *Schizophyllum commune* โดยมีผู้ป่วยหญิง อายุ 25 ปี มีอาการคันบริเวณผิวหนังตรงเท้าด้านซ้าย มีลักษณะบวมแดง เป็นตุ่ม และผื่นคล้ายเกล็ด จากรายงานที่กล่าวมาเชื้อรา *Schizophyllum commune* มีการก่อโรคกับคน ไม่พบรายงานที่เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมหรือเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส ในส่วนของรา IS13 ที่มีความเหมือน 100% กับเชื้อรา *Penicillium citrinum* strain NZD-mf99 (KM278047.1) โดยรา *Penicillium citrinum* เป็นที่นิยมมากในอุตสาหกรรม ราชนิดนี้มีรายงานว่าสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นได้อีก ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ พิทักษ์พงศ์ ป้อมปราณี (2552) คัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินในไร่อ้อย พบรา *Penicillium citrinum* มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง และยังมีบทบาทอย่างมากต่อการย่อยสลายเศษใบอ้อยได้ในระดับดี นอกจากนั้นยังมีรายงานของ Rawat et al. (2015, p. 61–68) มีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตอินนูลินเนสโดยรา *Penicillium* sp. NFCC 2768 แยกจากดินของดอกรักเร่ที่มีอินนูลินเป็นส่วนประกอบ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้สารสกัดจากพืชผสม ได้แก่ ดอกรักเร่ หน่อไม้ฝรั่ง กระเทียม และหอมหัวใหญ่ พบว่า ราที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารสกัดจากดอกรักเร่เกิดกิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสสูงสุดที่ 64.54±6.92 nkat/ml น้ำหนักโมเลกุลของ เอนไซม์อินนูลินเนสบริสุทธิ์ คือ 68 kDa pH 5.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่คัดแยกได้

4.1 ปริมาณความเข้มข้นของอินนูลินที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส

เลี้ยงรา IS13 ลงในอาหารเหลวที่เติมอินนูลินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากการศึกษาพบว่าการสร้างเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13 มีการเกิดกิจกรรมสูงสุดที่ 20 กรัมต่อลิตร โดยกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการเจริญในอาหารเหลวที่เติมปริมาณอินนูลิน 10 และ 30 ในวันที่ 3 สามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.101±0.005 U/ml ดังภาพ 11



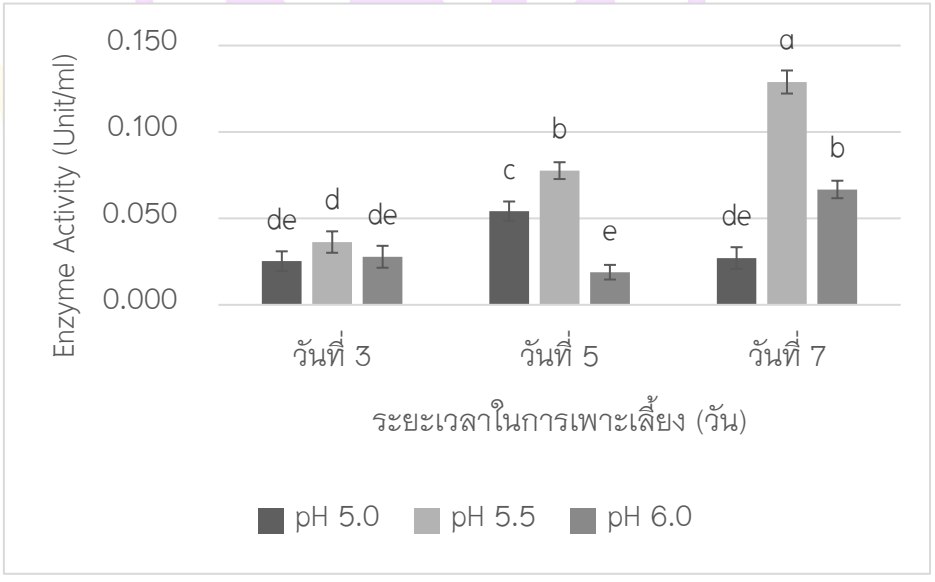
ภาพ 11 ปริมาณการเติมแหล่งคาร์บอนจากอินนูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13

หมายเหตุ : *ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$ ANOVA and Dancan's multiple range test)

จากการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของอินนูลินที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส แสดงให้เห็นว่าปริมาณความต้องการอินนูลินที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสของจุลินทรีย์ในแต่ชนิดมีความแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ในรายงานของ Singh et al. (2020) คัดแยกเชื้อราจากดินในป่าชายเลนใต้ต้นโกงกาง ได้เชื้อ *Aspergilus tritici* และนำไปเพาะเลี้ยงแบบเขย่า โดยเติมอินนูลินที่ ความเข้มข้น ในช่วง 15 – 35 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติมอินนูลินที่ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เกิดกิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสสูงสุดที่ 25.39 IU/mL

4.2 ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส

เลี้ยงรา IS13 ลงในอาหารเหลวที่เติมอินนูลินที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชที่ 5.0, 5.5, และ 6.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากการศึกษาพบว่า การสร้างเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13 มีปริมาณสูงสุดที่ pH 5.5 โดยกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการเจริญในอาหารเหลวที่ปรับค่าพีเอช 5.0 และ 6.0 pH 5.5 ในวันที่ 5 และ 7 สามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 5 และ 7 เท่ากับ 0.078±0.004 และ 0.129±0.006 U/mL ตามลำดับ ดังภาพ 12



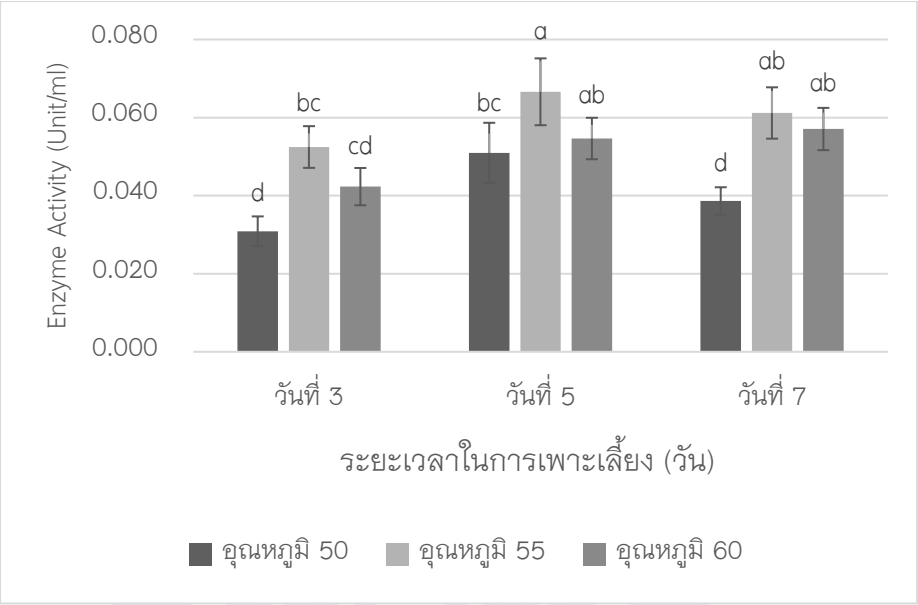
ภาพ 12 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนส จากรา IS13

หมายเหตุ : *ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละ คอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$ ANOVA and Dancan's multiple range test)

จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Singh et al. (2020) ศึกษาการทำให้เอนไซม์อินนูลินเนสบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค 3 ขั้นตอน ดังนี้ การตกตะกอนของไอโซโพรพานอล การแลกเปลี่ยนไอออน และโครมาโตกราฟีแบบไม่รวมขนาด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus tritici* BGPUP6 พบว่าเอนโดอินนูลินเนสมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 53.45 kDa และ 53.70 kDa เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เหมาะสม 5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส โดยมีความสามารถในการคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 50–70 องศาเซลเซียส เอนไซม์เอนโดนูลิเนสบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในการผลิตฟรุกโตโอลิโก–แซคคาไรด์จากอินนูลินได้ และยังมีรายงานของ Surti and Mhatre (2021, p. 164–171) การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอินนูลินเนสโดยเชื้อราที่แยกจากกระเทียมเน่าใช้ดินจากต้นดอกรักเร่และกระเทียมเน่ามาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมอินนูลิน 3 กรัมต่อลิตร pH 7 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลทุก ๆ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำตะกอนไปทดสอบด้วยวิธีการ Selivanoff เพื่อนำไปเป็นหัวเชื้อ จากนั้นนำไปศึกษาหาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสโดยใช้คาร์บอน 1% จากกลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส อินนูลิน ผงกระเทียมแห้ง ผงหัวหอมแห้ง และผงรากโกฐกระดูก หัวเชื้อ 1%, 2%, 5% และ 10% pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7, 7.5, 8.5 และ 9 เขย่าที่ 250 รอบ/นาที ผลการทดลองพบว่า สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส โดยเติมหัวเชื้อ 5% ลงในอาหาร pH 5.5 ที่มีอินนูลินและผงรากโกฐกระดูก 1% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงภายใต้สภาวะของเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที

4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนส

เลี้ยงเชื้อ IS13 ลงในอาหารเหลวที่เติมอินนูลินตามความเข้มข้นและค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการปรับอุณหภูมิในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาที่ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในวันที่ 5 และวันที่ 7 มีปริมาณการทำงานของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันโดยมีปริมาณ 0.067±0.009 และ 0.061±0.007 U/mL ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 0.057±0.005 U/mL ดังแสดงในภาพ 13



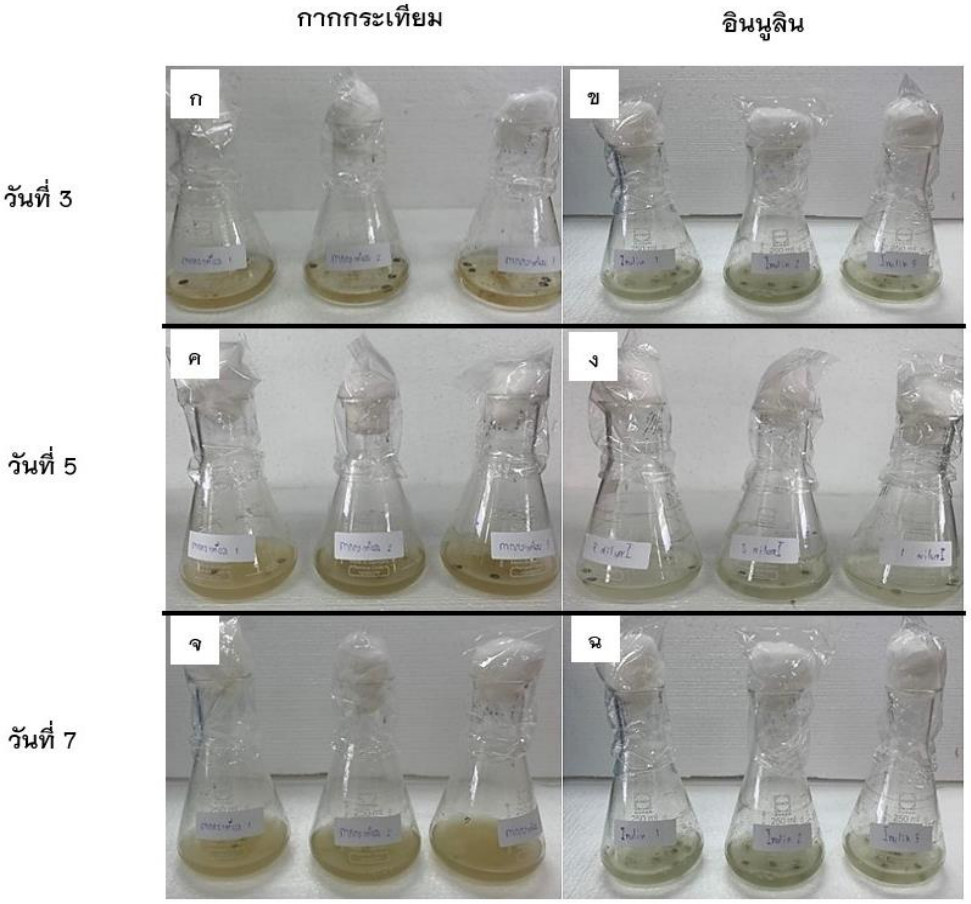
ภาพ 13 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนส จากรา IS13

หมายเหตุ : *ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$ ANOVA and Dancan's multiple range test)

จากการศึกษาครั้งนี้การทำงานของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มต่ำกว่าอุณหภูมิอื่น ๆ ในการทดลองนี้ จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิใดดีที่สุด เนื่องจากผลของค่ากิจกรรมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

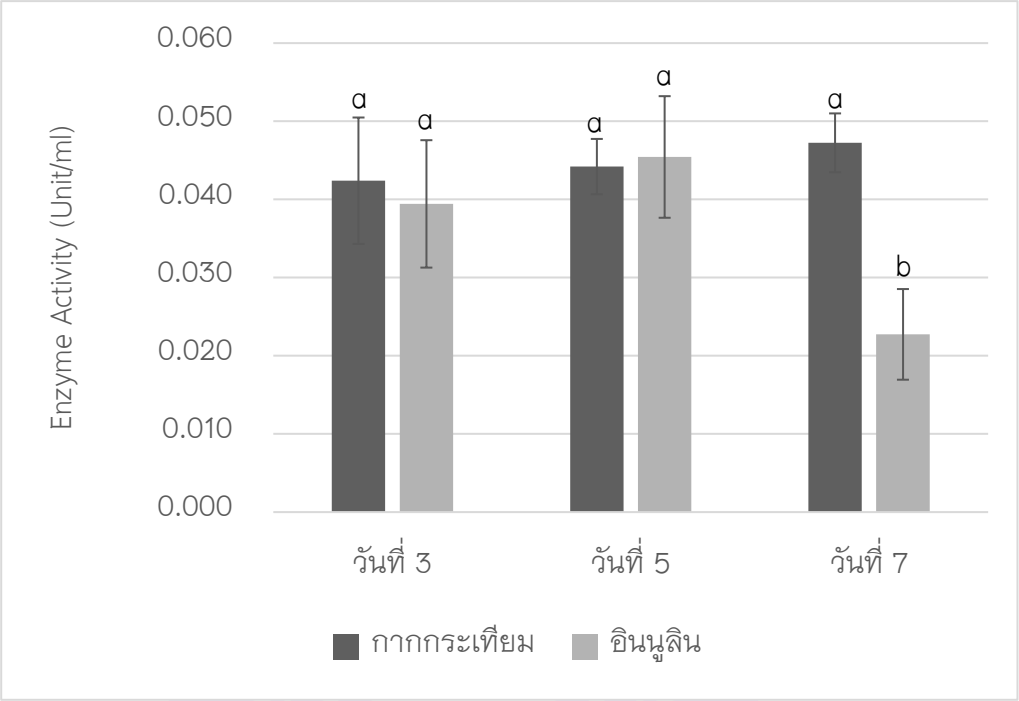
ศึกษาความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์อินนูลินเนสจากเชื้อที่คัดเลือก โดยใช้กากกระเทียมเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ IS13 ลงในอาหารเหลวโดยการเติมกากกระเทียมบดละเอียดลงไป 1% และเติมอินนูลินปริมาณความเข้มข้นที่ 20 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนส ปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมที่ 5.5 เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน นำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการปรับอุณหภูมิในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส พบว่าวันที่ 7 มีการเปลี่ยนของสีอาหารกลายเป็นสีเข้มและมีขุ่นขึ้นมากกว่าวันที่ 3 และ 5 ลักษณะของเชื้อราที่เจาะบางอันมีการรวมตัวเกาะกันเป็นก้อนดังแสดงในภาพ 14



ภาพ 14 เพาะเลี้ยงเชื้อ IS13 ลงในอาหารเหลวที่ใช้กากกระเทียมและอินนูลินเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากกากกระเทียม พบว่า วันที่ 7 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสสูงกว่าวันที่ 3 และ 5 มีค่าเท่ากับ 0.045±0.010 U/mL ส่วนแหล่งคาร์บอนจากอินนูลิน เกิดกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสสูงสุดในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.045±0.008 U/mL ดังแสดงในภาพ 15



ภาพ 15 ผลกิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสของรา IS13 จากแหล่งคาร์บอนกากกระเทียมและอินนูลิน

หมายเหตุ : *ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$ ANOVA and Dancan's multiple range test)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อราจากกากกระเทียมและกระเทียม

จากคัดแยกเชื้อพบว่ามีทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยตัวอย่างจากกระเทียมมพบเชื้อมากกว่าตัวอย่างจากกากกระเทียม ทดสอบการเกิด Clear zone ด้วยการหยดไอโอดีนลงในอาหารแข็ง selective medium คัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ซึ่งราไอโซเลท IS13 มีความสามารถในการย่อยอินนูลินได้ดีกว่าไอโซเลทอื่นๆ มีความสอดคล้องกับรายงานของเพียงพร บางทุ่งแบน (2556) การคัดแยกเชื้อราจากดินบริเวณที่เพาะปลูกต้นแก่นตะวัน ซึ่งพืชชนิดนี้เป็นแหล่งสะสมของอินนูลิน โดยสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท แสดงให้เห็นว่า ราที่คัดแยกได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีอินนูลินสะสมอยู่มีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสได้

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลว จากราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที พบว่าไอโซเลท IS13 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสได้สูงสุด เท่ากับ 0.109±0.006 U/mL

2. ระบุสายพันธุ์เชื้อราที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ความเหมือนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn ใช้เกณฑ์ระดับความเหมือนไม่น้อยกว่า 97% (% similarity cut-off) ในการระบุจีนัสและสปีชีส์ พบว่า IS13 มีความเหมือน 100% กับเชื้อราสายพันธุ์ *Penicillium citrinum* strain NZD-mf99 (KM278047.1)

3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่คัดแยกได้

เชื้อราไอโซเลท IS13 เลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมอินนูลิน ที่มีใช้ความเข้มข้นของอินนูลินที่ต่างกัน พบว่า จากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมอินนูลินความเข้มข้นที่ 20 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 วัน เกิดกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 0.101±0.005 U/mL ซึ่งปริมาณความ

ต้องการอินนูลินที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสของจุลินทรีย์ในแต่ชนิดมีความแตกต่างกัน

จากการศึกษาครั้งนี้ไอโซเลท IS13 มีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส คือ การเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมอินนูลินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH 5.5 เป็นระยะเวลา 7 วัน พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 0.128±0.006 U/mL อย่างไรในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากไอโซเลท IS13 ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้นทั้งด้านสูตรอาหารและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานและการผลิตของเอนไซม์อินนูลินเนส เพื่อนำไปเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้ต่อไป

4. ศึกษาความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์อินนูลินเนสจากเชื้อที่คัดเลือก โดยใช้กากกระเทียมเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากเชื้อที่คัดเลือก โดยใช้กากกระเทียมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแหล่งคาร์บอนจากกากกระเทียมให้กิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสเทียบเท่ากับการใช้แหล่งคาร์บอนจากอินนูลิน ดังนั้น คาดว่ารา IS13 มีศักยภาพในการใช้ผลิต FOS จากกากกระเทียมซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากทางการเกษตร นอกจากนั้นยังเป็นแนวทางในการลดต้นทุนจากการใช้อาหารทางเคมี

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่แยกได้จากกระเทียมในครั้งนี้ พบว่า การใช้ lugol's iodine เป็นการทดสอบขั้นต้นของการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรไลซีสเอนไซม์ที่ย่อยอินนูลินได้ แต่อย่างไรก็ตามขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นยังเป็นผลมาจากอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสเพื่อยืนยันความสามารถในการผลิตเอนไซม์ควบคู่กันด้วย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์อย่างละเอียด โดยการใช้ด้วยการแยกส่วนโดยใช้ DEAE–cellulose 52 และการใช้โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง Thin–Layer Chromatography (TLC) เพื่อวิเคราะห์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่างๆ (Rawat et al. 2015, p. 61–68) การศึกษาในครั้งนี้สามารถเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาวิจัยในเรื่องของเอนไซม์อินนูลินเนสได้ในครั้งต่อไป

บรรณานุกรม

กัลกิยา ชนิตรนันต์. (2552). **การผลิตและลักษณะสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสและอินนูลินเนสจาก *Streptomyces* PC22 และ CH7.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จันเพ็ญ บางสำรวจ. (2553). กระเทียมกับการต้านอนุมูลอิสระ. **วารสาร มฉก. วิชาการ**. 14(27), 113.

ดนุวัต เพ็งอ้น, อนันต์ ปินตารักษ์, พัฒน์ กสิกรรมยืนยง และ สุชัญญา อรุณรุ่งโรจน์. (2552). การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์. **สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตราฐานตรวจสอบผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้**.

ดวงฤทัย นิคมรัฐ, และ มาโนช หลักฐานดี, (2560). **การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากผัดเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอออล์.** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

เนียรวรรณ มีเจริญ.(2560).คลังความรู้ SciMath:**อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์**. สืบค้นจาก https://www.scimath.org/lesson-biology/item/7439-2017-08-11-04-33-12

ปิยาภรณ์ วังศิริกุล, และ ธีรภัทร วังศิริกุล, (2563). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากทะลายปาล์มเปล่าด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergilus niger* C-1184. **วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์**, 12(2), 259-276

พิชชา ธิราช. (2556). **การศึกษาอิทธิพลของคอปเปอร์และกรดฮิวมิกต่อการแบ่งเซลล์ปลายรากของหอมแดง.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พิทักษ์พงศ์ ป้อมปราณี. (2562). การศึกษาจุลินทรีย์ในดินไร่อ้อยที่มีบทบาทในการย่อยสลายเศษใบอ้อย. **วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง** 18(1)

เพียงพร บางทุ่มแบน. (2556). **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินนูลินเนสโดยใช้วัตถุดิบทางเกษตร.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

มลนพรรษ สงพิมพ์, พิลาณี ไวถนอมสัตย์ และวิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา. (2553). การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อนิลิเนสและอินเวอร์เทสจากยีสต์

Candida guilliermondii TISTR 5844. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** 48, 59-69

รุ่งตระการ จันทนพันธ์. (2552). การคัดกรอง Streptomyces **สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอินนูลินเนส และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีณา จิรัจฉริยากูล. (2559). **เบต้ากลูแคนจากเห็ดแครง.** ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วินัศ ภูมินาถ. (2555). ประโยชน์ของฟรุกแทนและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อสุขภาพ.**วารสารอาหาร.** 42(2), 111–116.

วรรณคล เชื้อมงคล. (2556). ประโยชน์ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทางการแพทย์. **วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ.** 8(3), 122–128

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, นิศากร วรวุฒิยานันท์ และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. (2547). การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อินนูลินเนส. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมการเกษตร. 42. 362–36

อรุณี ฝาระมี, น้ำผึ้ง ดุงโคกกรวด และชูศักดิ์ นิธิเกตุกุล. (2558). **การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอินนูลินจากกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*.** วิทยานิพนธตนฉบับ. 34(5), 479–483

Mahmoud D. A. R., Mahdy E. S. M. E., Shousha W. Gh., Refaat H. W., & FattahA. F. A., (201 Raw Garlic as a New Substrate for Inulinase Production in Comparison to Dry Garlic . **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. 5(10): 453–462

Das, D., Bhat M, R. & Selvaraj, R. (2019). Review of inulinase production using solid–state fermentation. **Annals of Microbiology**, 69(3), 201–209. doi:10.1007/s13213–019–1436–5.

Das, D. Selvaraj, R. & Ramananda Bhat, M. (2019). Optimization of inulinase production by a newly isolated strain Aspergillus flavus var. flavus by solid state fermentation of Saccharum arundinaceum. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 22. doi:10.1016/j.bcab.2019.101363.

Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B. & Undre, P. B. (2020). Identification

of Penicillium Species of Fruits Using Morphology and Spectroscopic Methods. **Journal of Physics: Conference Series.**

Navraj S., Tariq M., & Aruna K. (2016). Optimization of Inulinase Production by Stenotrophomonas Maltophila D457 Isolated from Rhizosphere Soil of Musa Acuminata using Garlic Extract**. International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology (IJRSMB)** . 2(1), 1–14.

Rawat H. K., Jain C. S. & Kango N. (2015). Production and properties of inulinase from *Penicillium* sp . NFCC 2768 grown on inulin–rich vegetal infusions. **Biocatalysis and Biotransformation.** 61–68

Surti A. & Mhatre S. (2021). Optimization of Inulinase Production by a Fungal Species Isolate from Rotten Garlic Samples. **Applied Biotechnology Reports.** 8(2): 164–171

Sheng J., Chi Z., Li J., Gao L. & Gong F. (2008). Inulinase production by the marine yeast Cryptococcus aureus G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **Process Biochemistry 42**: 805–811

Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Sharif H. R., Shakeel A., Ansari A. & Niazi S. (2016).health benefits and food applications. **Inulin: Properties, Carbohydrate Polymers.**16, 444–454

Singh R.S., Chauhana K., Pandey A. , Larroche C. & Kennedy J.F. (2018). Purification and characterization of two isoforms of exoinulinase from Penicillium oxalicum BGPUP–4 for the preparation of high fructose syrup from inulin**. International Journal of Biological Macromolecules.**

Singh R.S. & Singh R.P. (2016). Inulinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, **Isolation and Purification of Industrial Products.** 42 446

Singh R.S., Singh T. & Pandey A. (2019). Microbial Enzymes—An Overview. **Advances in Enzyme Technology**.

Singha R.S., Singha T. & Pandey A. (2020). Fungal endoinulinase production from raw *Asparagus* inulin for the production of fructooligosaccharides. **Bioresource Technology Reports.** 10:100417.

Singh R.S. , Singh T. & Kennedy J. F. (2020). Purification, thermodynamics and kinetic characterization of fungal endoinulinase for the production of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules.** 3535–3545

Tian L., Mu Y., Zhang H., Su X., Yang C., Shu X. & Qing D. (2018). First report on cutaneous infectious granuloma caused by *Schizophyllumn commune*. **BMC Infectious Diseases.**

Tsukatani T., Ogawa H., Anzawa K., Kobayashi E., Hasegawa H., Makimura K., Yoshizaki T. & Ueda N. (2015). *Schizophyllum commune*–induced allergic fungal rhinosinusitis and sinobronchial mycosis. **Medical Mycology Case Reports.** Vol 8, 10–13

T. K. GHOSE. (1987). International union of pure and applied chemistry**. Measurement of cellulase activities.** ;Vol. 59, No. 2, 257—268

White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee. & J. W. Taylor. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics**. In: PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**, 315–322.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

1.1 Potato	200	g
1.2 Dextrose	20	g
1.3 Agar	17	g
1.4 Distilled water	1,000	ml

2. อาหารเลี้ยงเชื้อใช้ทดสอบการเกิดวงใสรอบโคโลนี ดัดแปลงสูตรจาก (Das, Selvara & Ramananda Bhat, 2019)

2.1 Inulin	20	g
2.2 Ammonium Sulfate $(NH)SO_4$	30	g
2.3 Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4	1.0	g
2.4 Magnesium Sulfate $MgSO_4$	1.0	g
2.5 Calcium chloride $CaCl_2$	1.0	g
2.6 Agar 2 %	20	g

3. อาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ดัดแปลงสูตรจาก (Das, Selvara & Ramananda Bhat, 2019)

3.1 Inulin	20	g
3.2 Ammonium Sulfate $(NH)SO_4$	30	g
3.3 Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4	1.0	g
3.4 Magnesium Sulfate $MgSO_4$	1.0	g
3.5 Calcium chloride $CaCl_2$	1.0	g

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

1.1 การเตรียมสารเคมี DNS (T. K. GHOSE. 1987)

Distilled water	1416	ml
3,5–Dinitrosalicylic acid	10.6	g
Sodium hydroxide NaOH	19.8	g
Sodium Potassium tartrate $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	306	g
Phenol (melt at 50 °c)	7.6	ml
Sodium metabisulfite $Na_2S_2O_5$	8.3	g

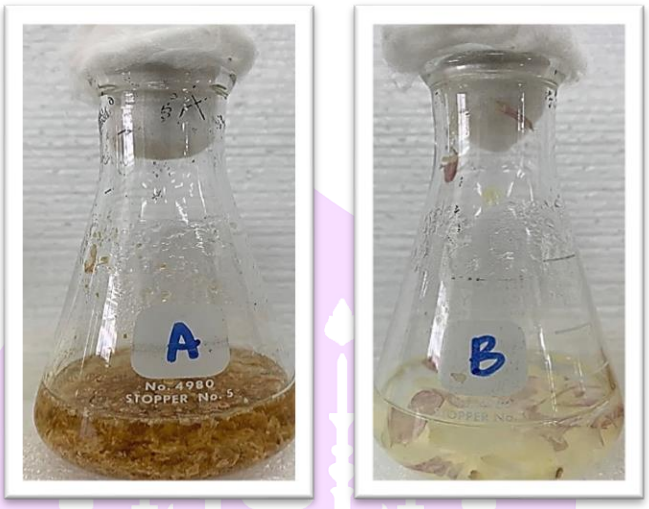
เตรียมน้ำ 1461 ml เติม 3,5–Dinitrosalicylic acid ลงไป 10.6 g คนให้ละลาย เติม NaOH 19.8 g คนให้ละลาย เติม $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ลงไป 306 g จากนั้นละลาย Phenol ด้วยความร้อน 7.6 ml แล้วเติมลงไป คนให้เข้ากัน จากนั้นเติม $Na_2S_2O_5$ ลงไป 8.3 g เก็บ stock DNS reagent ในขวดสีชาปิดฝา

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นสารมาตรฐาน (ปิยาภรณ์ วังศิริกุล และคนอื่น ๆ, 2020)

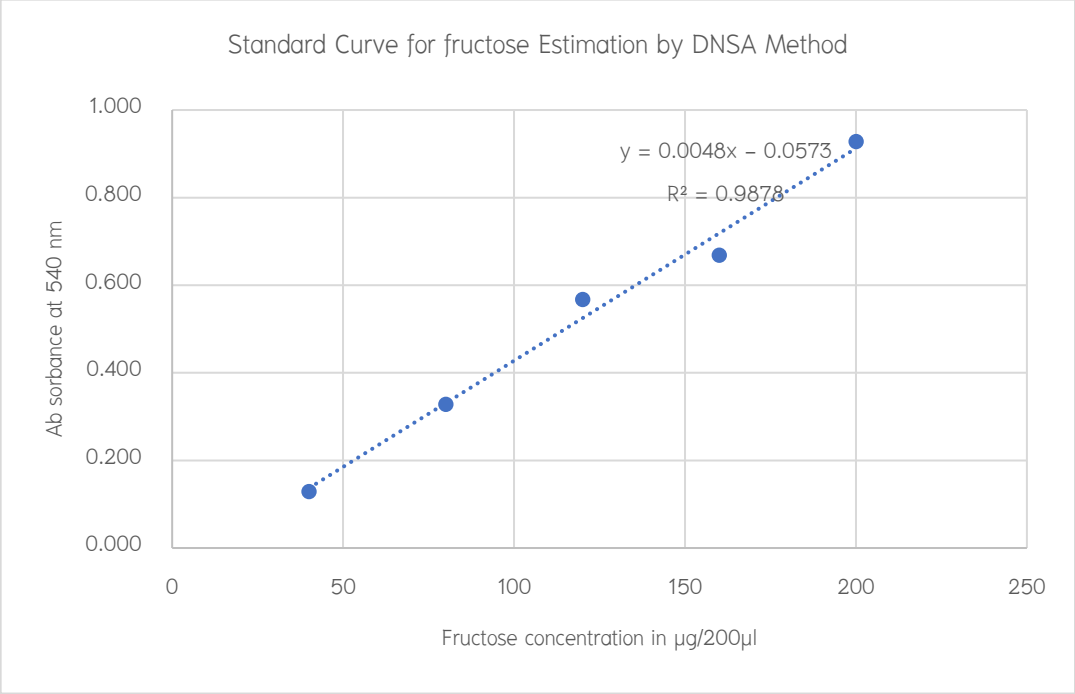
2.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ (ปิยาภรณ์ วังศิริกุล และคนอื่น ๆ, 2020)

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธี DNS ในขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตราฐาน จะเตรียมสารมาตรฐานฟรุกโตสให้มีความเข้มข้น 0, 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฟรุกโตสมาตราฐานที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นไปวิเคราะห์โดยใช้ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง สำหรับหลอด Blank ใช้น้ำกลั่นแทน เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็น จากนั้นนำไปวิเคราะห์เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรผลจากการทดลองมาสร้างกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ข้อมูล



ภาพ 16 (A) กากกระเทียมบดละเอียดในน้ำกลั่น (B) กระเทียมบดในน้ำกลั่น



ภาพ 17 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นสารมาตรฐาน

ตาราง 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไอโซเลท	ลำดับนิวคลีไทด์	แทกซอนที่แสดงค่าความเหมือนสูงสุด
IS1	>ATGC_AG06640744_1_ITS1_031_2021-06-08-P2_2021-06-08.ab1 AGTGACCTGCGGATGTCATTAGCTAGAGGAGAGGAATGTTAGGGCGCAGGTTGAATAAAGCTG AGGAGAGGGAAGAGAATGTAAACGAATGTAATCATGGTCTTGACAGACCCTAAAAAGTTAATA CAACTTTCGACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATT CCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATACCATCAACCCTCTTTTGACTTCGGTCTCGA GAGTGGCTTGGAAGTGGAGGTCTGCTGGAGCCTAACGGAGCCAGCTCCTCTTAAATGTATTAG CGGATTTCCCTTGCGGGATCGCGTCTCCGATGTGATAATTTCTACGTCGTTGACCATCTCGGGG CTGACCTAGTCAGGTTCAATAGGAGTCTGCTTCCAACCGTCTCTTGACCGAGACTAGCGACTTG TGCGCTAACTTTTGACTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT A	*Schizophyllum commune*
IS4	>ATGC_AG06640744_4_ITS1_029_2021-06-08-P2_2021-06-08.ab1 CCAGTTCATCTTGTTCTGATCCTGTGCACCTTATGTAGTCCCAAAGCCTTCACGGGCGGCGGTT GACTACGTCTACCTCACACCTTAAAGTATGTTAACGAATGTAATCATGGTCTTGACAGACCCTA AAAAGTTAATACAACTTTCGACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG	*Schizophyllum commune*

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไอโซเลท	ลำดับนิวคลีไทด์	แทกซอนที่แสดงค่าความเหมือนสูงสุด
IS4	CCCTTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATACCATCAACCCTCTTTTGA CTTCGGTCTCGAGAGTGGCTTGGAAGTGGAGGTCTGCTGGAGCCTAACGGAGCCAGCTCCTC TTAAATGTATTAGCGGATTTCCCTTGCGGGATCGCGTCTCCGATGTGATAATTTCTACGTCGTT GACCATCTCGGGGCTGACCTAGTCAGTTTCAATAGGAGTCTGCTTCTAACCGTCTCTTGACCG AGACTAGCGACTTGTGCGCTAACTTTTGGACTGAACTTCAAATCAGGAAGAATTACCGGCTA ACCTTAACCTTATCATAA	*Schizophyllum commune*
IS5	ATGC_AG06640744_5_ITS1_027_2021-06-08-P2_2021-06-08.ab1 CGGGTTGTTGCTGGCCGTCAGCGGCATGTGCACGCCCTGATCATTATCCATCTCAAACACCT GTGCACACACTGTAGGTCGGTTTGTGGCTGGAGTGGGCGCGCTCTGTGTCTGCTTTGGTTGTA GGCCTTCCTATGTTTTATTACAAACTACTTCAGTTTAAAGAATGTCACTTTTGCGTCTAACGCA TTTAAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC TCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGAATTCTCAACTCTATTTGCTTTT GTGAATAGAGCTTGGACTTGGAGGTTTATTGCCGGTACACCTGTGATCGGCTCCTCTTGAATG CATTAGCTCGAACCTTTGTGGATCAGCTATCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGTTGCTGTGAA	*Antrodia serialis*

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลำดับนิวคลีไทด์	แทกซอนที่แสดงค่าความเหมือนสูงสุด
IS5	GCATGTTAATGGGATCGGCTTCCAATCGTCCTTTACTTGGGGACAACGCCTTTGACCTTTGAC CTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCGGG	*Antrodia serialis*
IS7	>ATGC_AG06640744_7_ITS1_023_2021-06-08-P2_2021-06-08.ab1 TATGACGGTTGTTGCTGGCCCTTACTGGGCATGTGCACGCTTTGTACATTCCAATTCTTATACC TCTGTGCACTTTTCATAGATTTAGTGTGGAAGAGATCTTTTTGATCTTGGAAATGCTGGATCTG TGTTTTTACAAACGCTTTAGTATTAGAATGTCATCTGCGAATAACGCAATAAATACAACTTTCA GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGG GGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGTATTCTCAATGCCCTACATCTTTGCGGATGAAGGTGTATT GGATTTGGAGGTTTATGTTGGCTCTCTTGAGAGTCAGCTCCTCTTAAATGTATTAGCAGAGAT GTTACTGCTACTCTCCAGTGTGATAATTGTCTACACTGTTAGTAGTGCAGTAAAAATTAAGTCT ATGCTTCTAATCGTCTTCGGACAGTTTTTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCG CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAG	*Pseudolagarobasidium acaciicola*

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลำดับนิวคลีไทด์	แทกซอนที่แสดงค่าความเหมือนสูงสุด
IS8	TGTAGGCCTTCCTATGTTTTATTACAAACTACTTCAGTTTAAAGAATGTCACTGTTGCGTCTAA CGCATTTAAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTT GCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGAATTCTCAACTCTATTCA CTTTTGTGAATAGGGCTTGGACTTGGAGGTTTATTGCCGGTACACCTGTGATCGGCTCCTCTTG AATGCATTAGCTCGAACCTTTGTGGATCAGCTATCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGTTGCTG TGAAGCATGTTAATGGGATCGGCTTCCAATCGTCCTTTACTTGGGGACAATGCCTTTGACCTT TGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCCGA	*Fomitopsis cf. meliae*
IS10	>ATGC_AG06640744_10_ITS1_019_2021-06-08-P2_2021-06-08.ab1 ACGCTTCGGCGCACCCAGAAACCCTTTGTGAACTTATACCTATTTGTTGCCTCGGCGTAGGCC GGCCTCTTCACTGAGGCCCCCTGGAGACAGGGAGCAGCCCGCCGGCGGCCAACTAAACTCT TGTTTCTATAGTGAATCTCTGAGTAAAAAACATAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCT CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGT TCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGGGGCACTGCCTTCTAGCGAGGGC	*Diaporthe ueckerae*

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลำดับนิวคลีไทด์	แทกซอนที่แสดงค่าความเหมือนสูงสุด
IS10	AGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCTCGCTAGGACCCCGAGCGTAGTAGTTATATCTCGTTCT GGAAGGCCCTGGCGGTGCACTGCCGTTAAACCCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCA GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	*Diaporthe ueckerae*
IS11	>ATGC_AG06640744_11_ITS1_017_2021-06-08-P2_2021-06-08.ab1 ATTAGAAGAGGTTGTAGCTGGCCTTTCGGGGCATTGTGCACGCCTTGCTCAATTCCAACTCTT TAACACCTGTGCACTCATTGTAGGTTGGTTCATTAGCGGAAACGCTAAGAGACCTTCCTATGT TTATAACAAACTCTTTGTTGTATTATGAATGTATCACTGCGCTTTTAATAACGCATTAAATATA ACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTAT TCCGAAGGGCATGCCCGTTTGAGTGTCATTGTATTCTCAAACCCCTTCATTTTTGTGAAGTGG GTATTGGATTTGGAGGTCTTGCGGGTTTTTAATTAATCCGCTCCTCTTGAATACATTAGCTGGA AACCTTTTGTTAGGCTGGCTTCAGTGTGATAATTGTCTGCGCTGTAGTCATCTAGCACTCGTAT AAGGATTCCGCTTCTAATCGTCTTTGTATAAAGACAACTTTTTGACATCTGACCTCAAATCGG GTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAG	*Skeletocutis diluta voucher*

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ต่อ)

ไอโซเลท	ลำดับนิวคลีไทด์	แทกซอนที่แสดงค่าความเหมือนสูงสุด
IS13	>ATGC_AG06640744_13_ITS1_032_2021-06-08-P2_2021-06-08.ab1 TCGGTCCTCGGGGCCACCTCCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCG CGCCCGCCGACGGCCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATT AGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC GATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCT CTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT TGGGCCCCGTCCCCCCCCGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG GTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACC CCCAACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC ATATCAAAAG	*Penicillium citrinum*

ตาราง 7 กิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสในอาหารเหลวของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท

วันที่ 5	
ไอโซเลท	**กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)**
IS1	0.096±0.005
IS2	0.065±0.004
IS3	0.044±0.006
IS4	0.062±0.004
IS5	0.061±0.006
IS7	0.065±0.003
IS8	0.051±0.003
IS10	0.051±0.007
IS11	0.092±0.006
IS13	0.109±0.006

ตาราง 8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์อินนูลินเนสของ I/S ratio การเปรียบเทียบอินนูลินกับซูโครสของรา IS1 IS11 และ IS13

isolate	วัน (U/mL)		
	3	5	7
IS1	0.757±0.162	1.964±0.185	1.504±0.286
IS11	0.972±0.202	1.275±0.157	1.035±0.119
IS13	1.275±0.193	1.801±0.367	1.371±0.244

ตาราง 9 ค่ากิจกรรมของปริมาณการเติมแหล่งคาร์บอนจากอินนูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13

วัน	ปริมาณความเข้มข้น (U/mL)		
	10	20	30
3	0.028±0.003	0.039±0.003	0.029±0.002
5	0.032±0.001	0.101±0.005	0.049±0.002
7	0.041±0.005	0.039±0.004	0.061±0.004

ตาราง 10 ค่ากิจกรรมของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนสจากรา IS13

วัน	พีเอช (U/mL)		
	5.0	5.5	6.0
3	0.025±0.006	0.036±0.006	0.028±0.006
5	0.054±0.006	0.078±0.005	0.019±0.004
7	0.027±0.006	0.129±0.007	0.067±0.005

ตาราง 11 ค่ากิจกรรมของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อินนูลินเนส จากรา IS13

วัน	อุณหภูมิ (U/mL)		
	50	55	60
3	0.031±0.004	0.052±0.005	0.042±0.005
5	0.051±0.008	0.067±0.009	0.055±0.005
7	0.039±0.004	0.061±0.007	0.057±0.005

ตาราง 12 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลินเนสด้วยแหล่งคาร์บอนจากกากกระเทียม และอินนูลิน จากรา IS13

วันที่	กากกระเทียม (U/mL)	อินนูลิน (U/mL)
3	0.042±0.008	0.039±0.008
5	0.044±0.004	0.045±0.008
7	0.047±0.004	0.023±0.006

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ–สกุล	ประกายพลอย สร้อยเบี้ย
วัน เดือน ปี เกิด	27 เมษายน 2539
สถานที่เกิด	ลำปาง
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562– ปัจจุบัน วท.ม (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา พ.ศ. 2558–2561 วท.บ (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	59 หมู่ 7 ตำบลสมัย อ.สบปราบ จ.ลำปาง 52170
ผลงานตีพิมพ์	ประกายพลอย สร้อยเบี้ย, ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ และ สุภาพร ภัสสร (2021) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อินนูลินเนสจากราที่แยกได้จากกระเทียม.การประชุมนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 53. 67–77