ชุดโครงการวิจัย : การเพิ่มมูลค่าผลิตผลทางการเกษตร

โครงการวิจัย : การเพิ่มมูลค่าผลิตผลทางการเกษตร
กิจกรรม : การใช้สารสำคัญในผลิตภัณฑ์ใหม่
ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การผลิตเอนไซม์ Fructosyltransferase (levansucrase) จากสิ่งมีชีวิตอาณาจักรเห็ดรา
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Production and Characterization of the Fructosyltransferase (Levansucrase) from microorganism in Fungi Kingdom

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าโครงการ นายโกเมศ สัตยาวุธ	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน นางสาวพัชรี ลิมปิษเฐียร	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน นางสาวอกนิษฐ์ พิศาลวัชรินทร์	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร	สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

Abstracts

Fructosyltransferase is an important enzyme for producing the Fructo-oligosaccharide (FOS) or prebiotic foods which is popular today. However it is very expensive and strictly international import in large quantities. This experiment aimed to develop the extraction process of fructosyltransferase enzyme from the Fungi living in the country. Research conducted at the Post-harvesting and Processing Research and Development Division between the years 2014 – 2016. Using selected six strains of fungus family, we could not found any difference in FOS production. *Aspergillus niger* and *Aureobasidium pollulans* are still the best choice for fructosyltransferase producing host. However, when increasing the amount *A. pollulans* stains, it showed slightly differents of total FOSs production. On the contrary, *Garnoderma lucidum* and *Shizophyllum commune* has produced FOSs in slow rate because of the strength of their cell wall.

The extracted enzyme kinetic was educated with using the differentiation of temperatures. Enzyme could make the rate of reaction in the first period until the critical point of 55 degree Celsius, which is the optimum temperature for the enzyme. It also found that the enzyme activity is highest at 55 degrees Celsius is equal to 0.018 minutes, which is acceptable. The repetition determined that the temperature around 48 degrees Celsius showed that the half-life of the enzyme is equal to 0.130 minutes, which is higher than the temperature at 55 degrees Celsius and the activity in the reaction of only 0.34 times of the temperature at 48 degrees Celsius. It applied then an alternative that can be used for this enzyme. The purification of enzyme could be used by Fujishima method. Crude enzyme must prepare at 0-2 ° C and using ammonium phosphate extraction. Application of enzyme in sugarcane juice found that their pH-dependence stability was observed in the range pH 5.0 - 5.16 with enzyme activity reduced by more than 70% and the Thermal stability test by using warm juice for 15 minutes at room temperature. Enzymes are found to have a stable temperature between 20-40 degree Celsius and stops when the temperature reach above 50 degrees Celsius and the production of the FOS has produced 1-6 di-ß-D-fructofuranosylsucrose (1.239 mg. , the enzyme activity of 1.86 μmol / ml) nystose (0.530 mg, the enzyme activity 0.796 μmol / ml) and a tiny amount of neokestose.

Keywords: enzymes Fructosyltransferase, Fructooligosaccharide, creatures of fungi, molasses.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ Fructosyltransferase เป็นกระบวนการสำคัญในการผลิตสารกลุ่ม Fructooligosaccharide หรืออาหาร Prebiotic ที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันหากแต่มีราคาสูงและต้องนำเข้าปริมาณมาก การทดลองนี้จึงมุ่งพัฒนากรรมวิธีการสกัดเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดราที่มีในประเทศ ดำเนินการวิจัยที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2556 - 2558 โดยทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดราที่คัดเลือกมา 6 สายพันธ์ แต่ไม่พบความแตกต่างในการผลิต Total FOS ระหว่างการใช้จุลินทรีย์ *Aspergillus niger* และ *Aureobasidium pollulans* อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ stains พบว่า *A. pollulans* มีแนวโน้มในการผลิต total FOSs ที่ดีกว่า สำหรับการศึกษาใน *Garnoderma lucidum และ Shizophyllum commune* พบว่ามีการผลิต FOS ที่ช้ากว่าทั้งนี้เนื่องมาจากผนังเซลล์ที่แข็งแรงของสิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดทำให้เวลาสกัดต้องใช้เวลามากกว่าจุลินทรีย์สองตัวแรกอย่างไรก็ตามปริมาณ total FOSs

ผลการศึกษาด้านจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น พบว่าเอนไซม์ที่สกัดจะมีอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาสูงในช่วงแรก จนกระทั่งถึงจุดที่มีอัตราเร็วสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ถือเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด และยังพบอีกว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุดที่ 55 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 0.018 นาที ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ เมื่อทดลองพิจารณาที่อุณหภูมิประมาณ 48 องศาเซลเซียส พบว่าให้ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 0.130 นาที ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และให้กิจกรรมในการเกิดปฏิกิริยาต่างกันเพียง 0.34 เท่า ดังนั้นที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำเอนไซม์มาใช้ได้นานขึ้น การผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ทำตามวิธีของ Fujishima,2005 โดยเตรียมตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบที่ 0 – 2 องศาเซลเซียสโดยใช้แอมโมเนียมฟอสเฟสในการสกัด

ผลการทดสอบเอนไซม์ในน้ำอ้อยโดยทำการทดสอบ pH-dependence stability โดยใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสกัดเป็นเวลา 30 นาทีที่ pH ต่างกันพบว่าในช่วง pH 5.0 – 5.16 มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงกว่า 70% และผลการทดสอบ Thermal stability โดยอุ่นน้ำอ้อยเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิต่างกันพบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมที่เสถียรระหว่างอุณหภูมิ 20 – 40 องศาเซลเซียสและหยุดเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และการผลิตสารกลุ่ม FOS มีการผลิต 1-6 di-ß-D-fructofuranosylsucrose (1.239 mg, โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ที่ 1.86 µmol/ml) nystose (0.530 mg, โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 0.796 µmol/ml) และการผลิต neokestose เล็กน้อย

คำหลัก : เอนไซม์ Fructosyltransferase, Fructooligosaccharide, สิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดรา, น้ำอ้อย

คำนำ

การผลิต Oligosachharides หรือ Fructans มีการพัฒนาได้จากกระบวนการ transfructosylation ในพืชและจุลลินทรีย์ โดยเราแบ่งเอนไซม์ได้เป็นสองประเภทคือเอนไซม์จากพืชและจุลลินทรีย์หากแต่อัตราการผลิต Fructans จากเอนไซม์ที่ได้จากพืชนั้นมีกำลังการผลิตที่ต่ำและมีข้อจำกัดโดยเฉพาะปัจจัยทางด้านภูมิอากาศ ดังนั้นภาคอุตสาหกรรมจึงมุ่งเน้นการผลิตเอนไซม์จากจุลลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ โดยในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ในเชื้อยีสต์ *Aureobasidium sp.* และเชื้อรา *Aspergillus niger* อย่างไรก็ตามความต้องการใช้เอนไซม์ชนิดมีมาก หากแต่ยังไม่มีความหลากหลายและศักยภาพที่จำกัดในแหล่งผลิต โดยในภูมิภาคอาเซียนนั้นยังต้องนำเข้าเอนไซม์ชนิดนี้ทั้งหมดจากเอเชียตะวันออก ทั้งนี้เพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตและสกัดเอนไซม์ fructosyltransferase จากจุลลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อเพิ่มตัวเลือกในการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวจากจุลลินทรีย์ในวงศ์เดียวกันที่พบในภูมิภาค โดยเป็นที่ทราบว่าจุลลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวนั้นได้สร้างความเสียหายอย่างมากในผลิตผลเกษตร ดังนั้นการนำจุลลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวมาใช้ประโยชน์และจุดประสงค์เพื่อการสร้างทางเลือกลดการนำเข้าเอนไซม์ที่มีราคาสูงในการส่งเสริมตลาดผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในประเทศและประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน จึงจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการส่งเสริมการพัฒนาการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพต่อไปได้

Fructoologosacharide ที่นักวิจัยส่วนใหญ่ทำการศึกษานั้นจะเป็นสารประกอบที่มีชื่อว่า [1^F(1-β-D-fructofuranosyl)$_{n-1}$-sucrose; GF_n, $n = 2 - 10$] ซึ่งไม่รวมถึงสารกลุ่มpolyfructans และ oligofructosides (neokestose, 6-kestose และสารประกอบอื่นๆในกลุ่ม) โดยเราสามารถแบ่งแหล่งผลิตเอนไซม์ fructosyltransferase เป็นสองจำพวกได้แก่ จำพวกแรกที่มาจากพืช ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง หัวบีท หัวหอมใหญ่ แก่นตะวัน และอีกจำพวกที่ได้มาจากจุลลินทรีย์วงศ์ fungi และแบคทีเรีย ได้แก่ *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Anthrobacter sp.*, *Fusarium sp.*, etc. โดยในการจัดลำดับจากหมวดหมู่ของราตาม Ainsworth รา เห็ดและ ยีสต์จะอยู่ใน Kingdom Fungi ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 Division คือ Division myxomycota ได้แก่ ยีสต์ และราเมือกต่างๆ และ eumycota สำหรับราชั้นต่ำหมายรวมถึงราใน subdivision mastigomycotina และ zygomycotina ซึ่งราใน 2 subdivision ดังกล่าวแต่เดิมนักวิณวิทยามักกล่าวรวมไว้ใน Class Phycomycetes ส่วนราชั้นสูงเช่นพวกเห็ดจะเป็น Subdivision Deuteromycotina Ascomycotina และ Basidiomycotina จากราที่มีประมาณ 5,100 genus 45,000 species พบว่า 90% เป็นราชั้นสูง โดยเราสามารถสัณนิษฐานว่าหากราชั้นต่ำซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ และมีบรรพบุรุษร่วมกันกับราชั้นสูงหรือเห็ดแล้ว ราชั้นต่ำอย่างยีสต์ซึ่งมี genetic distance ห่างกันมากกว่าที่ยังสามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้เช่นกัน เห็ดจึงมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ด้วย (จาก phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม fungi จัดจำแนกตามโปรตีนของยีนส์ 32 ชนิดที่ผลิตเอนไซม์กลุ่ม hydrolase (Parrent J.L., et al., 2009)

สำหรับชื่อของเอนไซม์ที่ผลิต Fructans นี้ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ ทั้งนี้นักวิจัยบางท่านยังใช้ชื่อว่า β-D-fructofuranosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์พวก hydrolase เลขกำกับกลุ่มเอนไซม์ EC.3.2.1.26 ในขณะที่บางท่านใช้ชื่อว่า frucosyltransferase ที่เป็นชื่อตรงจากชื่อปฏิกิริยา transfructosylation ที่มีเลข

กำกับกลุ่ม EC.2.4.1.9 สำหรับเหตุผลหลักที่ทำให้นักวิจัยบางท่านยังใช้ชื่อ β-D-fructofuranosidase นั่นเนื่องมาจากกระบวนการผลิตfructans ของเอนไซม์ดังกล่าวเกิดบริเวณด้านของเอนไซม์ที่มีความเหมือนกับเอนไซม์กลุ่ม invertase ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะมีผลอย่างมากโดยเฉพาะในกรณีที่มีความเข้มข้นของซูโครสในสารละลายสูงมาก อย่างไรก็ตามชื่อ fructosyltransferase ยังเป็นที่นิยมมากกว่าเนื่องมาจากลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ชนิดนี้ที่เป็นแบบ hydrolytic enzyme โดยในการผลิต Fructans นั้นอัตราการผลิตของเอนไซม์ที่สกัดจากพืชจะปริมาณน้อยและจำกัดเนื่องจาก ข้อจำกัดด้านสภาพภูมิอากาศ โดยในระดับอุตสาหกรรมเราจะนิยมใช้เอนไซม์ที่ได้มาจากเชื้อจุลลินทรีย์ในวงศ์ Fungi ไม่ว่าจะเป็น *Aureobasidium sp.* หรือ *A. niger* ในทศวรรษที่ผ่านมาบริษัท เมจิเซไก ประเทศญี่ปุ่นได้ประสบความสำเร็จในการผลิต FOSs ในชื่อผลิตภัณฑ์ที่ชื่อว่า Neosugar (น้ำตาลชนิดใหม่) จากเชื้อรา *A. niger* นอกจากนี้บริษัท เชยฟู้ดแอนท์เคมมิคอล สาธารณรัฐเกาหลีก็ได้ประสบความสำเร็จในกระบวนการตรึงเซลล์ของ *A.pullulans* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ตอบรับความต้องการได้มากขึ้นทำให้มีความต้องการใช้ในภาคอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น โดยเฉพาะเพื่อใช้ทนแทนสารให้ความหวานดีกว่าน้ำตาลทั่วไป เราพบน้ำตาลฟรุกโตสโมเลกุลใหญ่และโพลีเมอร์ของฟรุกโตสในรูปของคาร์โบไฮเดรตในพืชหลายชนิด โดย Allen และ Bacon ได้พบปฏิกิริยา transfructosylation จากใบของหัวบีท (*Betavulgaris L.*) ซึ่งนำไปสู่การสรุปว่าหากในสารละลายนั้นมีซูโครสผสมอยู่ภายหลังปฏิกิริยาดังกล่าวเราจะสามารถผลิต 1-kestose (1^F-β-fructosylsucrose) และ neokestose (6^F-β-fructosylsucrose) โดยเอนไซม์จะถ่ายหมู่ fructosyl จะน้ำตาลไตรแซคคาไรท์หรือน้ำตาลโมเลกุลใหญ่กว่าไปให้ซูโครสเพื่อผลิต fructans โดยเราจะพบปฏิกิริยาดังกล่าวในแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus*) โดยเราสามารถแบ่งเอนไซม์ตามลักษณะปฏิกิริยา(FOS biosynthesis)ได้ออกเป็นสามกลุ่มในการผลิตน้ำตาลไตรแซคคาไรท์ (GF_2) จากซูโครสหรือน้ำตาลโมเลกุลใหญ่กว่า ได้แก่ sucrose 1^F-fructosyltransferase (1-SST), sucrose 6^G-fructosyltransferase (6-SST), fructans 1^F-fructosyltransferase (FFT) โดยในการเพาะเชื้อจุลลินทรีย์ในวงศ์ fungi ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบหลัก เราพบการผลิต FOSs และเมื่อซูโครสในสารละลายหมดไป จุลลินทรีย์ยังสามารถนำ FOSs ที่ผลิตได้มาสังเคราะห์พลังงานแทนได้ทำให้ได้ข้อสรุปว่าน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่สังเคราะห์ได้นี้สามารถเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ในการหมักทั้งสองครั้ง (double fermentation process) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นการกำจัดน้ำตาลฟรุกโตสซึ่งถือเป็นข้อจำกัดในการเจริญเติบโตของจุลลินทรีย์และยังทำให้มีการสะสมกลูโคสเมื่อกลูโคสหมดไปจากระบบ โดยจุลลินทรีย์สามารถนำกลับไปใช้โดยใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิดข้างต้นในตัวได้ โดยในปี 1990 นั้นถือเป็นการประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้เอนไซม์จาก *A. niger* เพื่อการผลิต FOS และมีการพัฒนาไปถึงระดับอุตสาหกรรมโดยเฉพาะการผลิต FOS syrup และมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงถึง 50 – 60% (w/w) ของน้ำตาลตั้งต้น

สิ่งมีชีวิตในวงศ์ Fungi ไม่ว่าจะเป็น รา ยีสต์และเห็ดถือเป็นกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สังเคราะห์ fructans ได้ปริมาณสูง (Hidaka et al., 1998) เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาล fructooligosaccharide ที่มีโครงสร้างแบบ $1^F(1\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl})_n$-sucrose ที่มีจำนวน n = 1-3

ซึ่งได้แก่ 1-ketose(GF_2), nystose(GF_3), fructofuranosyl nystose (GF_4) โดยงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ Fructosyltransferase จากจุลินทรีย์ในวงศ์ fungi โดยใช้ปัจจัยการแปรผันอุณหภูมิตลอดจนจลนพลศาสตร์การหมักของการผลิตเอนไซม์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ จากนั้นการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่มี fructans เป็นส่วนประกอบ

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1.วัสดุทดลอง

1.1 อ้อย ใช้อ้อยคั่นน้ำที่ผลิตในประเทศไทย

1.2 จุลินทรีย์

1.2.1 รา ได้แก่ *Aspergillus niger* ATCC 20611 (Hidaka *et al.,* 1988, 1989) และ *A. niger* เชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ที่ได้จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.2.2 ยีสต์ ได้แก่ *Aureobasidium pullulans* (Jung *et al.,* 1987, 1989); (Yun *et al.*, 1990,1992, 1993a,b, c, d) และ *A. pullulans* เชื้อที่ได้จากห้องปฏิบัติการแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

1.2.3 เห็ด ได้แก่ *Schizophyllum commune* และ *Garnoderma lucidum* ที่ได้จากกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด กรมวิชาการเกษตร

1.3 ตัวกรองสาร Semi-phase extraction (SPE) ในการสกัดขั้นตอน liquid-liquid extraction ตามคู่มือ Visiprep (Supelco) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ตัวกรอง Semi-phase extraction (SPE) C18 silicate (ENVI-18, 0.5g, 6ml) และ Copolymer Styrene-divinylbenzene (PS-DVB, Bond Elut PPL, 0.2g, 3 ml) โดยใช้ตัวทำละลายเดียวกับสารสกัดโดยใช้ความเร็วในการบีบผ่านตัวกรอง 0.5 $mL.min^{-1}$

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีเพื่อใช้ทดสอบการสกัด คือ

(1) Acetone

(2) Acetonitrile

2.2 สารเคมีเพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้น้ำ Demineralize ในการทำละลาย เตรียมที่ความเข้มข้น 10 $mg.L^{-1}$ เก็บในขวดทึบเพื่อป้องกันแสงและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ คือ

(1) Enzyme Fructosyltransferase

3. เครื่องมือ

3.1 High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำ (Varian 9010) หัวฉีดชนิด (Rheodyne 7125) ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 Silica, คอลัมน์ชนิด C18 Silica (Supelcosil LC-PAH 20cm x 4.6 mm(5µm)), เตาอบชนิด Water Column Heater Module โดยใช้ตัวควบคุมอุณหภูมิชนิด Waters Temperature Control Module เพื่อควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์, ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด Fluorescence (Thermo Quest FL 3000) มีโปรแกรมแปรผล(TC4 Navigator), ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 1.5 $mL.min^{-1}$ โดยในช่วงแรกอุณหภูมิของคอลัมน์ยังไม่เสถียรดังนั้นการปรับ gradient จึงใช้ที่อุณหภูมิห้องและรอจนอุณหภูมิของคอลัมน์อยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 55 นาที

3.2 High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำ (ยี่ห้อ Shimadzu LC-6A), หัวฉีดชนิด Manual injection ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 Silica, คอลัมน์ชนิด C18 Silica (EnviroSep-PP-PAH (EPA Method 610) 125 x 4.6 mm), ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด DAD (Shimadzu SPD-SAV),เครื่องแปรผล (รุ่น SPD-SAV) และโปรแกรมแปรผล (LCanalysis), ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 0.8 $mL.min^{-1}$ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที

วิธีการทดลอง มี 3 ขั้นตอนได้แก่

ขั้นตอนที่ 1 การพัฒนากระบวนการสกัดเอนไซม์ fructosyltransferase จากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Fungi โดยมีการใช้จุลลินทรีย์

1.1 การคัดเลือกเชื้อจุลลินทรีย์ท้องถิ่นมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์และศึกษาการผลิตเอนไซม์

1. คัดเลือกจุลลินทรีย์ในกลุ่ม Fungi ที่มีการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์ fructosyltransferase จาก 3 กลุ่ม ได้แก่ รา ยีสต์ เห็ด

2. จุลินทรีย์ที่เลือกมาทั้ง 6 สายพันธุ์จำเป็นต้องมีการทำ Sucrose test เพื่อตรวจสอบการหมักน้ำตาลซูโครสและศึกษาผลการผลิต Fructans เบื้องต้นในถังหมัก ก่อนจะนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกไว้มาทดลอง โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Potato Dextose Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 3-4 วัน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น 4 C ซึ่งจะทำการเขี่ยเชื้อใหม่ทุกๆ 2-4 สัปดาห์
3. เขี่ยเชื้อราจากอาหารแข็งที่มีอายุ 3-4 วันลงในอาหารเหลวปริมาตร 25 มล. (ใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มล.) ซึ่งประกอบด้วยซูโครส 2.0%, yeast extract 1.2% และ carbon methyl cellulose (CMC) 0.2% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvaine ความเข้มข้น 0.3 M ที่มีพีเอช เท่ากับ 5.0 (ดัดแปลงจาก Hidaka et al., 1988) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 280 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นถ่ายโอนลงในอาหารเพาะเชื้ออย่างเดียวกัน (ยกเว้นการ

เติม CMC และเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของซูโครส) ที่มีปริมาตรรวมกันแล้วเท่ากับ 250 มล. ซึ่งอยู่ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มล. บ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 280 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28 C เก็บตัวอย่างทุกๆ 3-6 ชม. จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นเซลล์ ซูโครส กิจกรรมเอนไซม์และ/หรือแหล่งไนโตรเจน

1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ชนิดภายนอกเซลล์และภายในเซลล์

1.2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ fructosyltransferase

1. เตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 600 กรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยละลายซูโครส 60 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร
2. บ่มสารละลายซูโครสความเข้มข้น 600 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆกันคือ 45 50 55 60 65 และ70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. เตรียมสารละลายเอนไซม์ fructosyltransferase โดยนำเอนไซม์ดิบมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ให้ได้ความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 18,000 หน่วยต่อ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลายเอนไซม์ fructosyltransferase ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในสารละลายซูโครสที่เตรียมไว้ข้างต้น (ข้อ 1. 1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วกวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ได้ปริมาตรรวมของสารผสมปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จึงทำให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 300 ต่อกรัมซูโครส(ความเข้มข้นของซูโครสและเอนไซม์ เท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร (S_0) และ 4,500 หน่วยต่อลิตร (E_0) ตามลำดับ)
5. ทำการเก็บตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 0.5 1 2 4 6 8 10 15 และ 20 นาที โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ (โดยการเก็บตัวอย่าง 2 ชุด/ครั้ง)
6. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในสารผสมปฏิกิริยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์
7. นำหลอดทดลองที่มีสารละลายผสมจากข้อ 1.6 แช่ในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที
8. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยผสม
9. นำตัวอย่างสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

10. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายกลูโคสเป็นมาตรฐาน
11. การทดลองชุดควบคุม ทำการเติมสารละลาย DNS ลงในสารละลายสับสเตรต 0.5 มิลลิตร ก่อนการเติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร โดยให้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
12. ทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกัน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส

1.2.2 การประมาณค่าพารามิเตอร์

1. นำผลการทดลองจากข้อ 1 มาเขียนกราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ กับเวลาที่ใช้การทำปฏิกิริยา
2. หาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิริยาเอนไซม์(v_0) โดยหาค่าความชันสูงสุดของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ กับเวลาที่ในการทำปฎิกิริยา
3. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้น (v_0) ของปฏิริยาเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C)

1.2.3 วิธีการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain พีเอช 5.0

1. เตรียมสารละลาย A คือ สารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 177.99) หนัก 35.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. เตรียมสารละลาย B คือ สารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่ง $C_6H_8O_7.H_2O$ $2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210.14) หนัก 42.03กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
3. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 10.30 มิลลิลิตรกับสารละลาย B ปริมาตร 9.70 มิลลิลิตร
4. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 โดยเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ด้วยน้ำกลั่น

ขั้นตอนที่ 2 การจลนพลศาสตร์การหมักของการผลิตเอนไซม์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (Miller , 1959)

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

2 สารละลาย DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid)เตรียมโดยละลาย DNS 5 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตรเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปอย่างช้าๆจนครบ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆเติมโปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรตจำนวน 150 กรัม โดยกวนผสมให้เข้ากันตลอดเวลา ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วบรรจุในขวดสีชา สามารถเก็บสารละลาย DNS ได้นานประมาณ 3 เดือน

3. สารละลายมาตรฐานกลูโคส เตรียมโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นกลูโคสตั้งแต่ 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 ตามขั้นตอนดังนี้

1. ปิเปตตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกลูโคส (ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง กรณีของblank ให้ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิกิริยาให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง และเพื่อหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงสำหรับใช้คำนวณหาความเข้มข้นกลูโคสของตัวอย่าง

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1 มก./มล. (ไมโครลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	500
200	100	400
400	200	300
600	300	200
800	400	100
1000	500	0

2.2 กิจกรรมเอนไซม์ **fructosyltransferase** โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยซูโครสในการทำให้เกิดกลูโคส 1 มิลลิโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

สารเคมี

สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์) เตรียมโดยละลายน้ำตาลซูโครส 30กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

2.2.1 ปิเปตสารละลายน้ำตาลซูโครส 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2.2 เติมสารละลายเอนไซม์(ที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Mcllvain ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0) 0.2 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (กรณีของcontrol จะต้องต้มทำลายเอนไซม์ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีก่อน)

2.2.3 ปิเปตสารผสมปฏิกิริยา 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตรกัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

2.2.4 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตรแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรและคำนวณกิจกรรมเอนไซม์จากสูตรดังนี้

กิจกรรมเอนไซม์(หน่วย/มิลลิลิตร) = $$\frac{(A_{540})\mathrm{sample}-(A_{540})\mathrm{control}\ \mathrm{X}\ 5\ \mathrm{X}\ 10\ \mathrm{X}\ D}{m\ \mathrm{X}\ 60}$$

กำหนดให้

5 คือ เมื่อเทียบเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

10 คือ เมื่อเทียบเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารผสมปฏิกิริยาทั้งหมด 10 มิลลิลิตร

60 คือ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (นาที)

D คือ อัตราเจือจางสารละลายเอนไซม์ (เท่า)

m คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

ขั้นตอนที่ 3 การเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ Fructooligotransferase ที่สกัดจากเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ทางการค้า

1. เปรียบเทียบข้อมูลจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่สกัดจากจุลลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดและคัดเลือกเอนไซม์ Fructooligotransferase ทางการค้ามาศึกษาข้อมูลทางจลนพลศาสตร์อย่างน้อย 2 ยี่ห้อ
2. เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ของการหมักsucrose เพื่อผลิตน้ำตาลfructooligosaccharide ที่มีโครงสร้างแบบ $1^F(1\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl})_n$-sucrose ที่มีจำนวน n = 1-3 ซึ่งได้แก่ 1-

ketose(GF_2), nystose(GF_3), fructofuranosyl nystose (GF_4) โดยการวิเคราะห์โดยใช้ UV-spectrometer และ HPLC-IR ระดับห้องปฏิบัติการ

3. ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ของการหมักsucrose เพื่อผลิตน้ำตาล fructooligosaccharide ในน้ำอ้อย 25 องศาบริ๊กซ์ และวิเคราะห์ปริมาณ FOSs
4. วิเคราะห์ ประเมินผลและสรุปผลการทดลอง

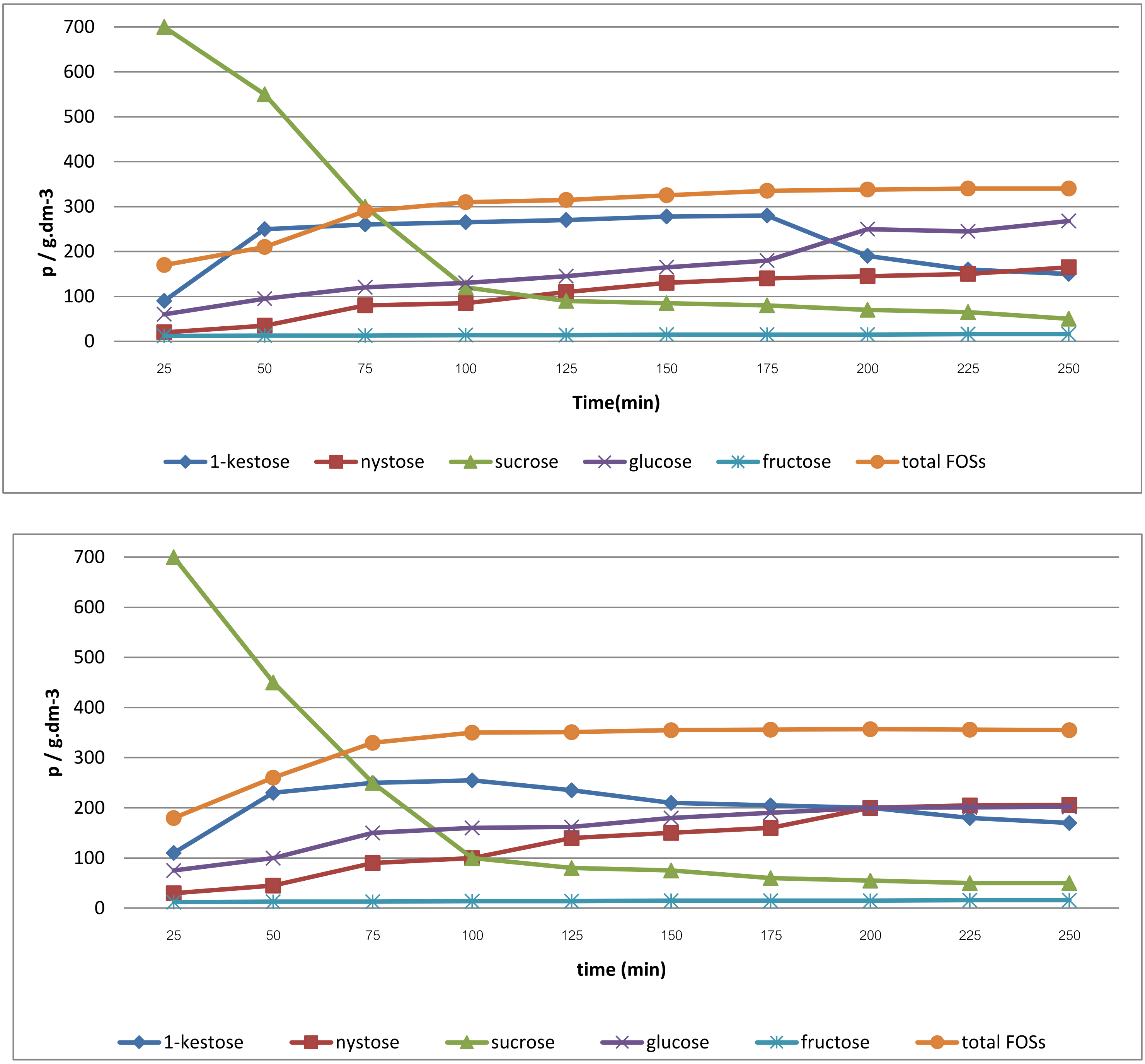
ระยะเวลา ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
แปลงเกษตรกรจังหวัดจันทบุรีและจังหวัดระยอง

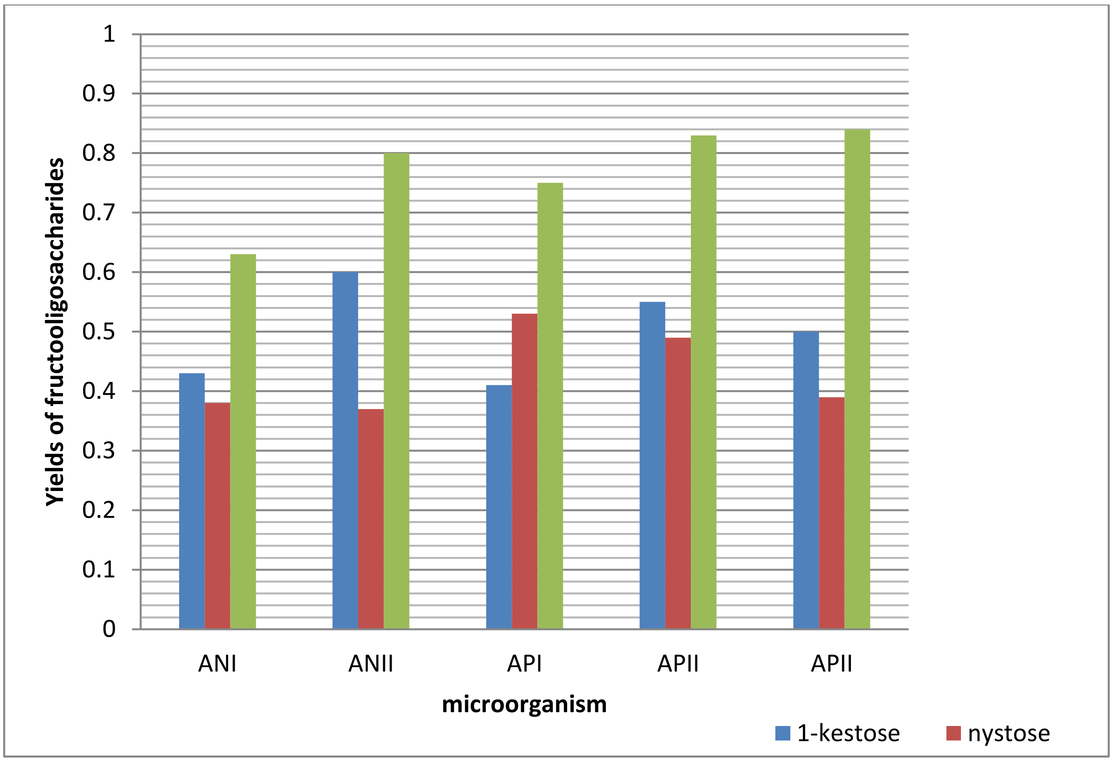
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **ผลการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ Fructosyltransferase**

ผลการทดสอบการเลี้ยงเชื้อจุลลินทรีย์ที่สกัด ได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ดังนี้ *Aspergillus niger* แบ่งเป็น Isolate จาก ATCC ประเทศญี่ปุ่น (AN I) และ Isolate คัดเลือกในประเทศ (AN II), *Aureobasidium pollulans* แบ่งเป็น Isolate จาก ATCC ประเทศเกาหลี (AP) และ Isolate คัดเลือกในประเทศ CCY 27-1-2014/ CCY 17-12-2013 (AP II และ AP III), *Garnoderma lucidum* แบ่งเป็น Isolate คัดเลือกในประเทศร่วมกับมหาวิทยาลัยขอนแก่น (GL I) และ Isolate ที่คัดเลือกโดยสำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ (GL II) และ *Schizophyllum commune* เป็น isolate ที่คัดเลือกโดยสำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ (SC I) พบว่าผลการทดสอบการหมัก sucrose ที่เปลี่ยนเป็นสารกลุ่ม fructooligosaccharide ประมาณ 90% ในเวลา 4 ชั่วโมงพบว่าจุลินทรีย์แต่ละ isolate ไม่มีความแตกต่างกันแต่มีความแตกต่างกันในชนิดของจุลินทรีย์ที่ชัดเจนอย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดมีศักยภาพในการหมัก Sucrose ที่ชัดเจนตามภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงเวลา (time course) ในการหมัก sucrose เพื่อผลิตสารกลุ่ม fructooligosaccharide ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณ sucrose เริ่มต้น 700 กรัม (บน) จุลินทรีย์ *Aspergillus niger* (ล่าง) จุลินทรีย์ *Aureobasidium pollulans*



ภาพที่ 2 แสดงประสิทธิภาพการผลิต Fructooligosaccharide ของจุลินทรีย์ *A. niger และ A. pullulens* ทั้งสิ้น 5 isolate ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

2. **ผลของคุณสมบัติทางกลศาสตร์ของเอนไซม์สกัดหยาบ**

ผลของกิจกรรมของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เอนไซม์จะมีอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาสูงในช่วงแรก จนกระทั่งถึงจุดที่มีอัตราเร็วสูงสุด ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลังจากจุดนี้แล้ว เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาจะส่งผลให้ค่าอัตราเร็วลดลงดังแสดงในภาพที่ 7 ดังนั้นอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด และยังพบอีกว่า เอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมีกิจกรรมสูงที่สุดที่ 55 องศาเซลเซียส

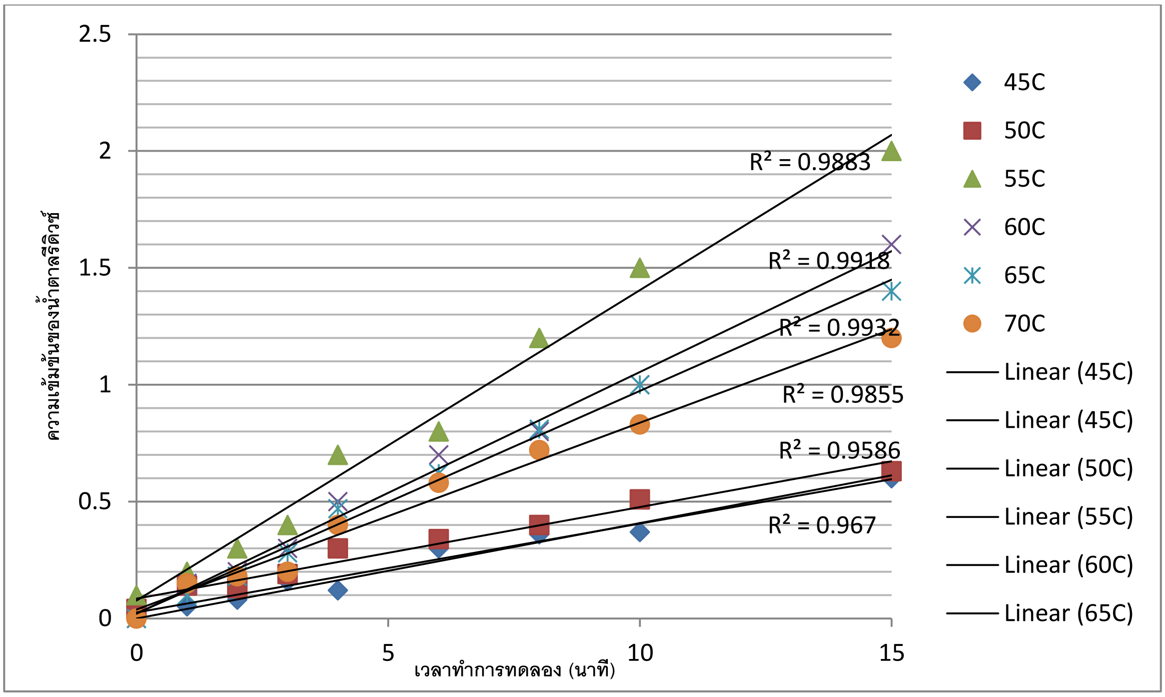
และเมื่อพิจารณาถึงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและพลังงานกระตุ้นพบค่าอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) และค่าพลังงานกระตุ้น (E_a) ของปฏิกิริยาเท่ากับ 1,7405 g l^{-1} min^{-1} และ 8.23 kcal mol^{-1} ตามลำดับ ซึ่งค่าพลังงานกระตุ้นนี้จะมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา กล่าวคือ อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาใดๆจะต่ำลง หากพลังงานกระตุ้นมีค่าสูง ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่า อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมีค่าค่อนข้างสูง เนื่องจากผลของเอนไซม์ ดังนั้นค่าพลังงานกระตุ้นในการเกิดปฏิกิริยาจึงมีค่าไม่สูงมาก (เพียง 8.23 kcal/mol)ส่งผลให้ปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปได้อย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์กับเวลาจากปฏิกิริยาเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่แปรผันตามอุณหภูมิตั้งแต่ 45-70 ℃

เวลา	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)					
(นาที)	45 ℃	50 ℃	55 ℃	60 ℃	65 ℃	70 ℃
0	0.0239	0.0378	0.1128	0.0229	0.0063	0.0108
0.5	0.1425	0.0378	0.1628	0.0763	0.1346	0.0637
1	0.1408	0.0582	0.2286	0.1308	0.1904	0.1224
2	0.1800	0.1686	0.4069	0.2046	0.2608	0.2158
4	0.295	0.1161	0.6911	0.4817	0.4808	0.3983
6	0.3338	0.3015	0.8019	0.6413	0.6796	0.5587
8	0.4092	0.3549	1.1419	0.8079	0.8467	0.7087
10	0.5142	0.3590	1.5280	0.9913	1.0113	0.8503
15	0.6446	0.7199	1.9911	1.6246	1.3775	1.1795
20	0.7542	0.8650	2.1361	1.908	1.6742	1.3683

หมายเหตุ

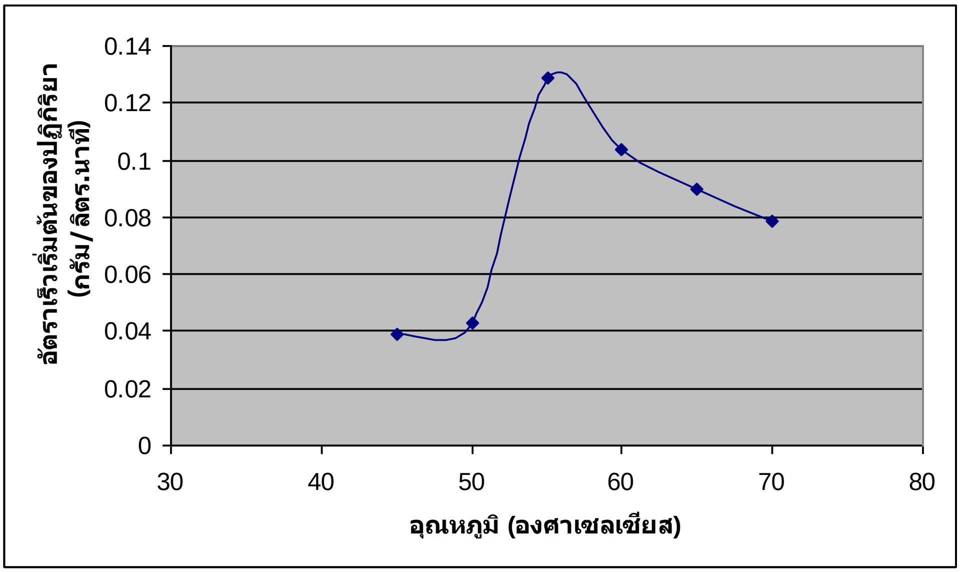
1. ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 ที่มีซูโครสเป็นสับสเทรตความเข้มข้นเริ่มต้น 300 กรัม/ลิตร และเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสความเข้มข้นเริ่มต้น 150 หน่วย/กรัมซูโครส ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvain 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0
2. ค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์จากผลการทดลอง 2 ซ้ำ (ทำการทดลอง 2 ครั้ง)



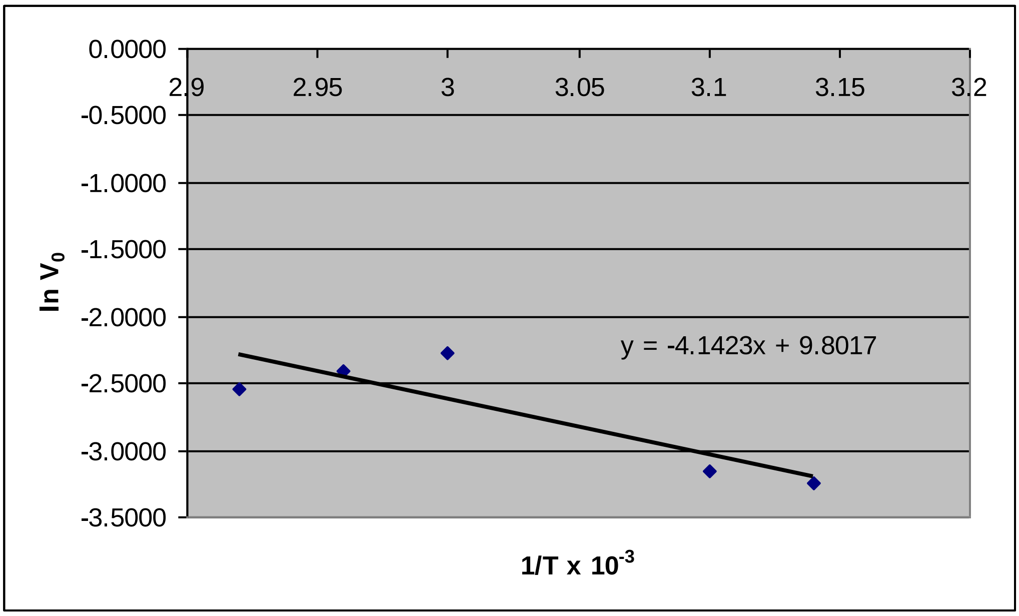
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์กับเวลาที่อุณหภูมิ 45 - 70 °C

ตารางที่ 2 อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสแปรผันตามอุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (v_0, มก./มล. นาที.)	Ln v_0	อุณหภูมิสัมบูรณ์ (T, K)	(1/T) ($\times 10^{-3}$ K^{-1})
45	0.0387	-3.2519	318	3.14
50	0.0427	-3.1536	323	3.1
55	0.1285	-2.0518	328	3.05
60	0.1037	-2.2663	333	3
65	0.0901	-2.4068	338	2.96
70	0.0785	-2.5447	343	2.92



ภาพที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 (สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvain 0.02 โมลาร์)



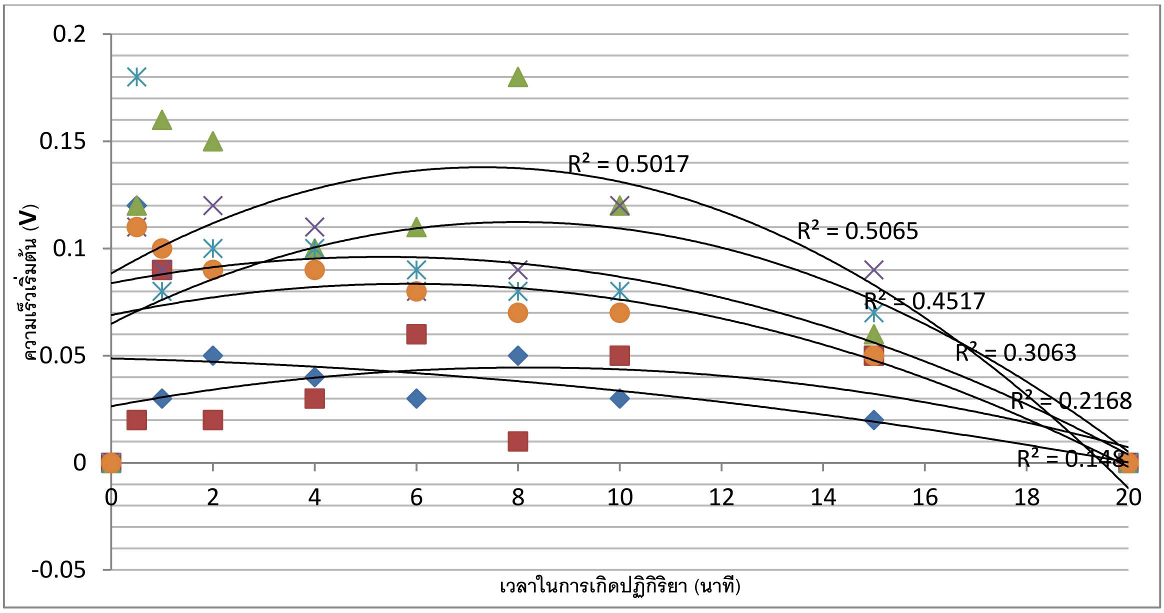
ภาพที่ 5 การประมาณค่าคงที่พลังงานกระตุ้น (E_a) ของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส

ค่าพลังงานกระตุ้น (E_a) E_a = 8.2316 kcal/mol

ค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (V_0) V_0= 1.7045 x 10^4 g l^{-1} min^{-1}

ตารางที่ 3 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสแปรผันตามอุณหภูมิต่าง ๆ

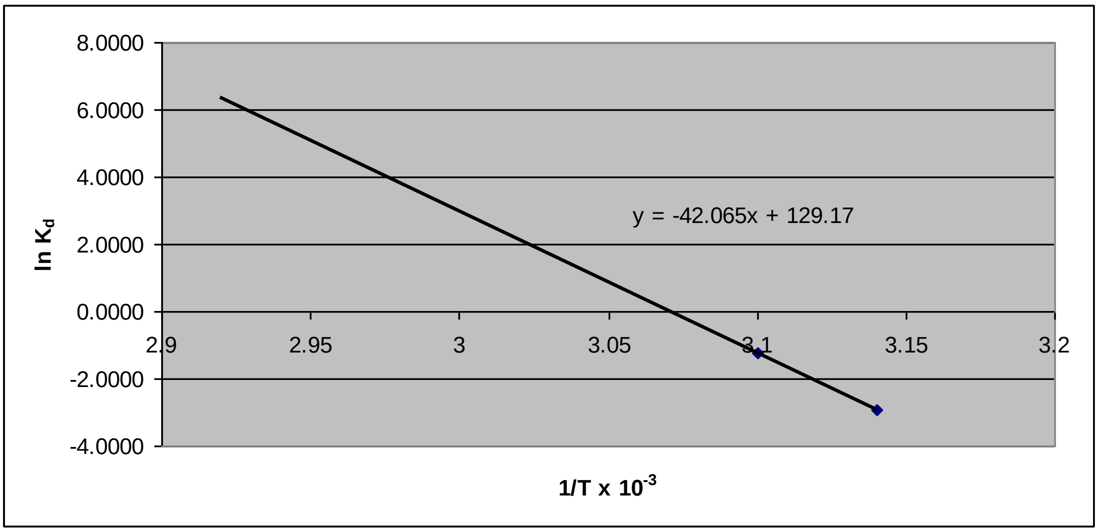
time	45^0C	V	ln V	50^0C	V	ln V	55^0C	V	ln V	60^0C	V	ln V	65^0C	V	ln V	70^0C	V	ln V
0	0.02	-	-	0.04	-	-	0.11	-	-	0.02	-	-	0.01	-	-	0.01	-	-
0.5	0.14	0.12	-2.15	0.04	0.02	-3.89	0.16	0.12	-2.16	0.08	0.11	-2.23	0.13	0.18	-1.69	0.06	0.11	-2.19
1	0.14	0.03	-3.69	0.06	0.09	-2.44	0.23	0.16	-1.82	0.13	0.09	-2.46	0.19	0.08	-2.48	0.12	0.10	-2.29
2	0.18	0.05	-2.97	0.17	0.02	-3.95	0.41	0.15	-1.87	0.20	0.12	-2.15	0.26	0.10	-2.34	0.22	0.09	-2.39
4	0.30	0.04	-3.26	0.12	0.03	-3.40	0.69	0.10	-2.32	0.48	0.11	-2.21	0.48	0.10	-2.26	0.40	0.09	-2.46
6	0.33	0.03	-3.56	0.30	0.06	-2.82	0.80	0.11	-2.18	0.64	0.08	-2.51	0.68	0.09	-2.39	0.56	0.08	-2.56
8	0.41	0.05	-3.10	0.35	0.01	-4.24	1.14	0.18	-1.71	0.81	0.09	-2.44	0.85	0.08	-2.49	0.71	0.07	-2.62
10	0.51	0.03	-3.39	0.36	0.05	-2.95	1.53	0.12	-2.11	0.99	0.12	-2.15	1.01	0.08	-2.58	0.85	0.07	-2.70
15	0.64	0.02	-3.73	0.72	0.05	-2.98	1.99	0.06	-2.80	1.62	0.09	-2.39	1.38	0.07	-2.71	1.18	0.05	-2.96
20	0.75	-	-	0.87	-	-	2.14	-	-	1.91	-	-	1.67	-	-	1.37	-	-



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ของล็อกกาลิทึมความเร็วต่อเวลาเกิดปฏิกิริยาเพื่อคำนวณค่าคงที่การสูญเสียสภาพ (K_d) ของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่อุณหภูมิ 45,50,55,60,65,70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ค่าคงที่การสูญเสียสภาพของปฏิกิริยาเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่อุณหภูมิต่างๆ

Temp	(1/T) ($x10^{-3}$ K^{-1})	Kd	ln Kd
45	3.14	0.054	-2.9188
50	3.10	0.2905	-1.2362
55	3.05	0.0839	-2.4781
60	3.00	0.0254	-3.6730
65	2.96	0.0361	-3.3215
70	2.92	0.0487	-3.0221



ภาพที่ 7 การประมาณค่าคงที่พลังงานการสูญเสียสภาพ (E_d) ของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส

ค่าพลังงานการสูญเสียสภาพ (E_d) E_d = 83.5916 kcal/mol

ค่าคงที่การสูญเสียสภาพ (K_{d0}) K_{d0} = 7.678×10^{55} min^{-1}

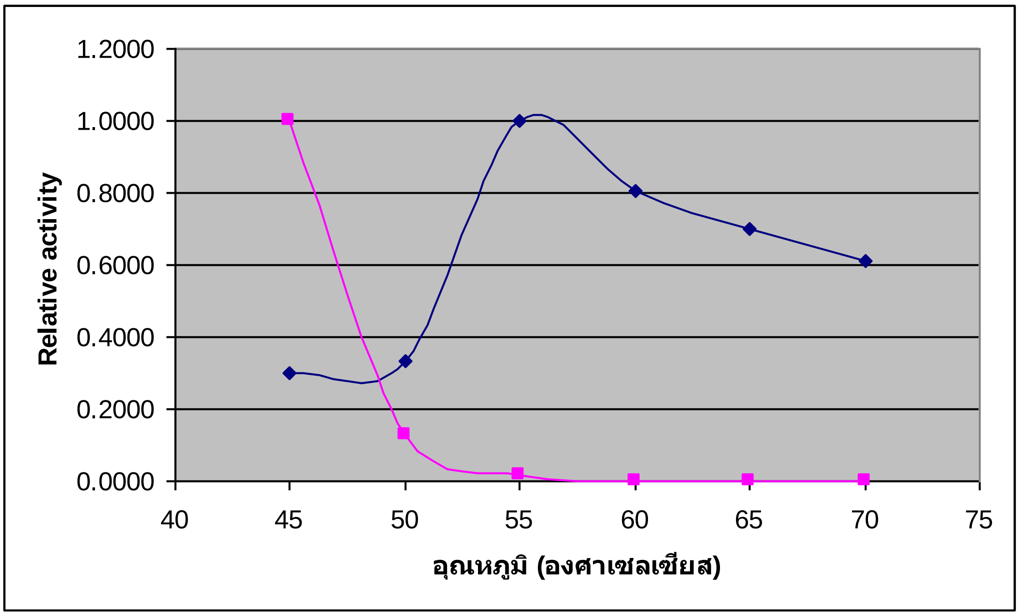
ตารางที่ 5 สรุปค่าคงที่เทอร์โมไดนามิกส์ของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสจากอิทธิพลของอุณหภูมิ

ค่าคงที่	จากกราฟเส้นตรง
E_a (kcal mol^{-1})	8.2316
E_d (kcal mol^{-1})	83.5916
v_0 (g l^{-1} min^{-1})	1.7405×10^4
K_{d0} (min^{-1})	7.678×10^{55}

ผลของค่าคงที่การสูญเสียสภาพและพลังงานกระตุ้นการสูญเสียสภาพของเอนไซม์ เมื่อพิจารณาค่าคงที่การเสียสภาพของเอนไซม์ (K_{d0}) และค่าพลังงานการเสียสภาพของเอนไซม์ (E_d) จากการทดลองพบว่า มีค่าเท่ากับ 7.678×10^{55} min^{-1} และ 83.5916 kcal mol^{-1} ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมีเสถียรภาพสูง เนื่องจากต้องใช้พลังงานสูงถึง 83.5916 kcal mol^{-1} ในการทำให้เอนไซม์เสียสภาพ นอกจากนี้ยังมีค่าคงที่ในการเสียสภาพสูงอีกด้วยและค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสจากการทดลองกิจกรรมของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสพบว่า ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด เมื่อทดลองประมาณค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.018 นาที ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ เมื่อทดลองพิจารณาที่อุณหภูมิประมาณ 48 องศาเซลเซียส พบว่าให้ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสเท่ากับ 0.130 นาที ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และให้กิจกรรมในการเกิดปฏิกิริยาต่างกันเพียง 0.34 เท่า ดังนั้นที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมาใช้ได้นานขึ้น

ตารางที่ 6 การประมาณค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสจากอิทธิพลของอุณหภูมิด้วยแบบจำลอง

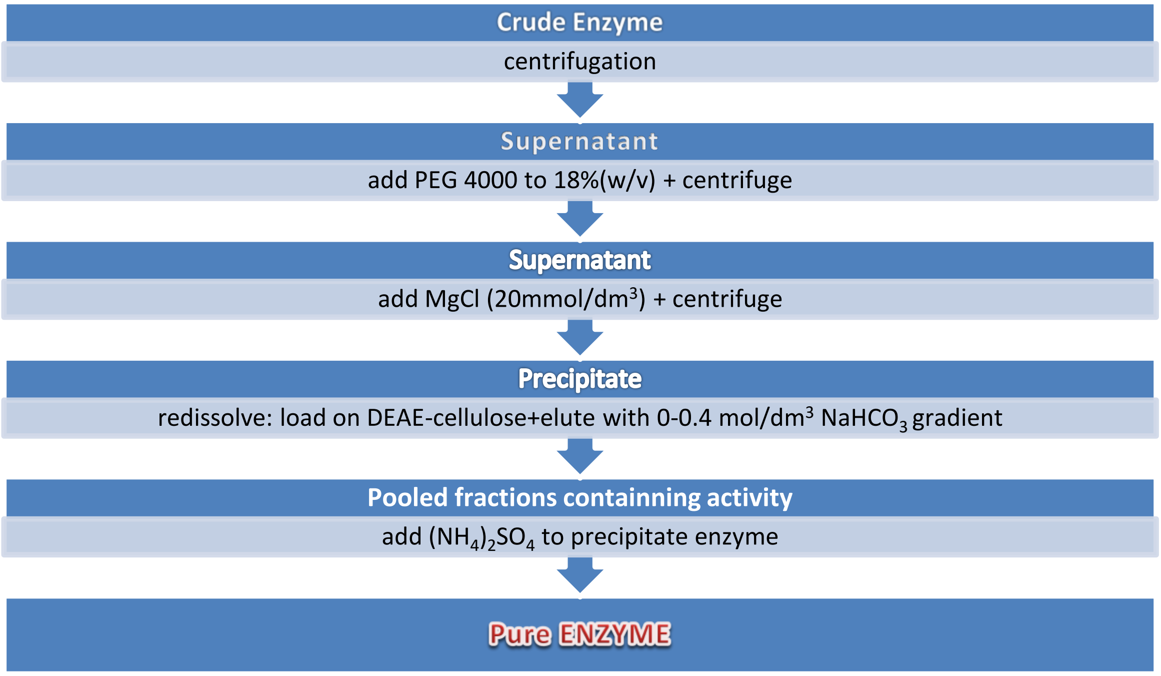
อุณหภูมิ (°C)	Relative activity (V_0/V_{omax})	ค่าครึ่งชีวิต (นาที)	Relative Half-life (Half-life / Half-life $_{max}$)
45	0.3012	14.3665	1.0000
50	0.3323	1.8718	0.1303
55	1.0000	0.2595	0.0181
60	0.8070	0.0382	0.0027
65	0.7012	0.0059	0.0004
70	0.6109	0.0010	0.0001



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง Relative activity, Relative haft-live และอุณหภูมิ

3. การศึกษาการทำเอนไซม์บริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติ

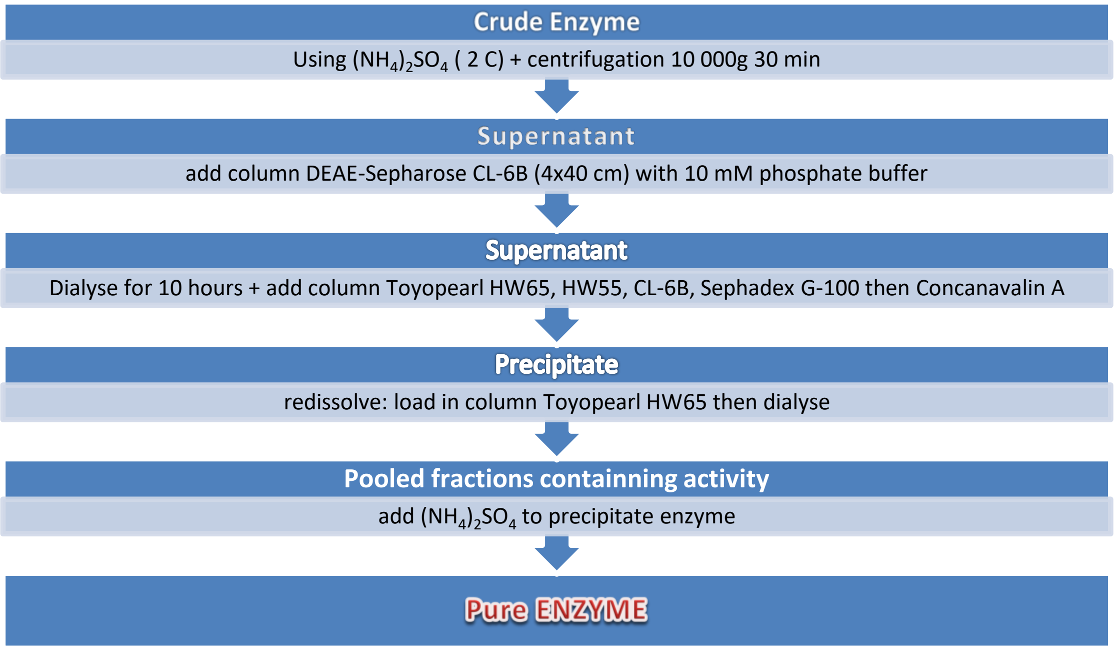
ในการศึกษาการทำเอนไซม์บริสุทธิ์โดยกระบวนการ ultracentrifugation (Hidaka,1999) สามารถสกัดได้โดยใช้กระบวนการตามภาพที่ 15 อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนที่ซับซ่อนและใช้สารเคมีราคาสูง จึงทำการทดลอง enzyme purification ซ้ำตามวิธีของ Fujishima,2005 โดยเตรียมตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบที่ 0 – 2 องศาเซลเซียสโดยใช้แอมโมเนียมฟอสเฟสในการสกัด จากนั้นทำการศึกษากิจกรรมเอนไซม์บริสุทธิ์จำนวน 3 กิจกรรม ตามวิธีของ Henry& Darbyshire,1980 ได้แก่ กิจกรรม Sucrose : Sucrose 1-Fructosyltransferase (SST, EC 2.4.1.99) เพื่อระบุปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนซูโครสเป็น 1 µmol 1-kestose ในเวลา 1 นาที, กิจกรรม Fructan : Fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC2.4.1.100) เพื่อระบุปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยน 1-kestose เป็น 1 µmol nystose ในเวลา 1 นาทีและกิจกรรม Fructan : Fractan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT) เพื่อระบุปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยน 1-kestose เป็น 1 µmol 1-6 di-ß-D-fructofuranosylsucrose ในเวลา 1 นาทีตามภาพที่ 17


Crude Enzyme
centrifugation
Supernatant
add PEG 4000 to 18%(w/v) + centrifuge
Supernatant
add MgCl (20mmol/dm^3) + centrifuge
Precipitate
redissolve: load on DEAE-cellulose+elute with 0-0.4 mol/dm^3 NaHCO$_3$ gradient
Pooled fractions containning activity
add $(NH_4)_2SO_4$ to precipitate enzyme
Pure ENZYME

ภาพที่ 9 ขั้นตอนกระบวนการทำ enzyme purification โดยกระบวนการ ultracentrifugation

ตารางที่ 7 ผลการทดลองการทำ purification จาก *A.niger*

Step	Total Volume (Cm3)	Total Protein (mg)	Total Activity (katal)	Specific activity (katal/kg)	Yield (%)	Purification factor per step
Extraction	16,600	435,000	0.0413	0.095	(100)	(1.0)
1st Centrifuge	15,700	112,000	0.0365	0.325	88.3	3.42
2nd Centrifuge	1,380	1,716	0.0223	13.02	54.0	40.0
Gel filtration	211	462	0.0200	43.17	48.4	3.32
Precipitation	-	344	0.0160	46.5	38.7	1.08



Crude Enzyme

Using $(NH_4)_2SO_4$ (2 C) + centrifugation 10 000g 30 min

Supernatant

add column DEAE-Sepharose CL-6B (4x40 cm) with 10 mM phosphate buffer

Supernatant

Dialyse for 10 hours + add column Toyopearl HW65, HW55, CL-6B, Sephadex G-100 then Concanavalin A

Precipitate

redissolve: load in column Toyopearl HW65 then dialyse

Pooled fractions containning activity

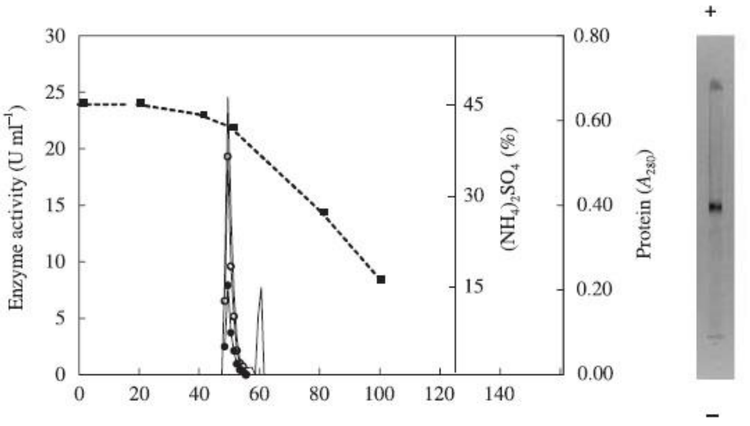
add $(NH_4)_2SO_4$ to precipitate enzyme

Pure ENZYME

ภาพที่ 10 ขั้นตอนกระบวนการทำ enzyme purification โดยกระบวนการ Henry& Darbyshire

ตารางที่ 8 ผลการทดลองการทำ purification จาก *A.niger*

Step	6G-FFT					1-FFT				ratio
	Protein (mg)	Activity (U)	Spec. activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)	Activity (U)	Spec. activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)	6G-FFT/ 1-FFT
Crude extract	64350	1215	0.02	100	1	547	0.0009	100	1	2.2
$(NH_4)_2SO_4$ sat.	2589	590	0.23	48.6	12	286	0.11	52.3	12	2.1
DEAE-Sepharose CL-6B	161	583	3.62	48.0	181	254	1.58	46.4	176	2.3
Toyopearl HW65F	40.6	269	6.63	22.1	332	147	3.62	26.9	402	1.8
Toyopearl HW55S	25.8	253	9.81	20.8	491	141	5.47	25.8	608	1.8
DEAE-Sepharose CL-6B	18.6	234	12.58	19.3	629	115	6.18	21.0	687	2.0
Sephadex G100	9.8	169	17.24	13.9	862	88.1	8.99	16.1	999	1.9
Con A Sepgarose	6.3	151	23.97	2.4	1199	73.2	11.62	13.4	1291	2.1
Toyopearl HW65F	5.2	138	26.54	11.4	1327	60.5	11.63	11.1	1292	2.3

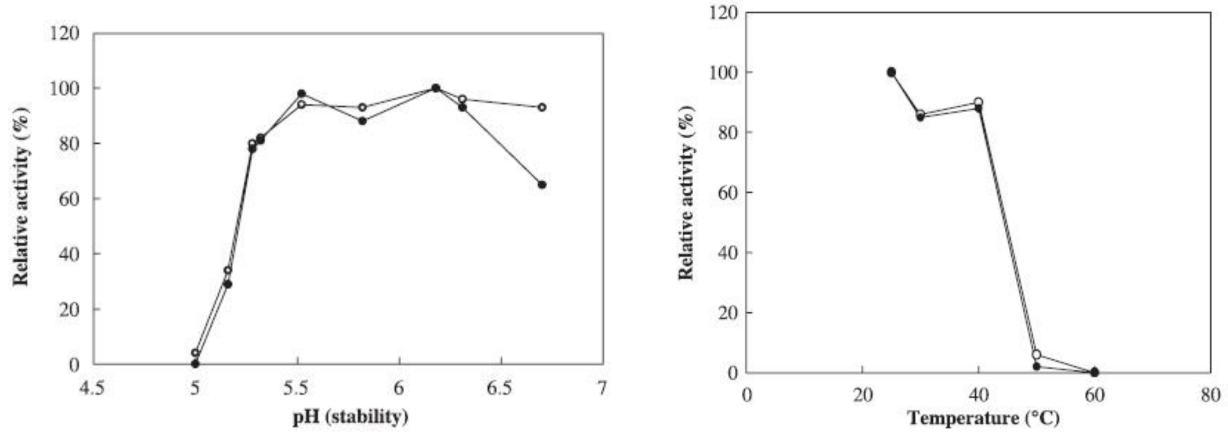


ภาพที่ 11 ผลการทดสอบ Gel electrophoresis ของ เอนไซม์สกัดบริสุทธิ์เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ 2 กิจกรรม (-O-) กิจกรรมเอนไซม์ 6G-FFT (U/ml) (-●-) กิจกรรมเอนไซม์ 1-FFT (U/ml) วิเคราะห์เมื่อทำการ saturation ด้วย $(NH_4)_2SO_4$

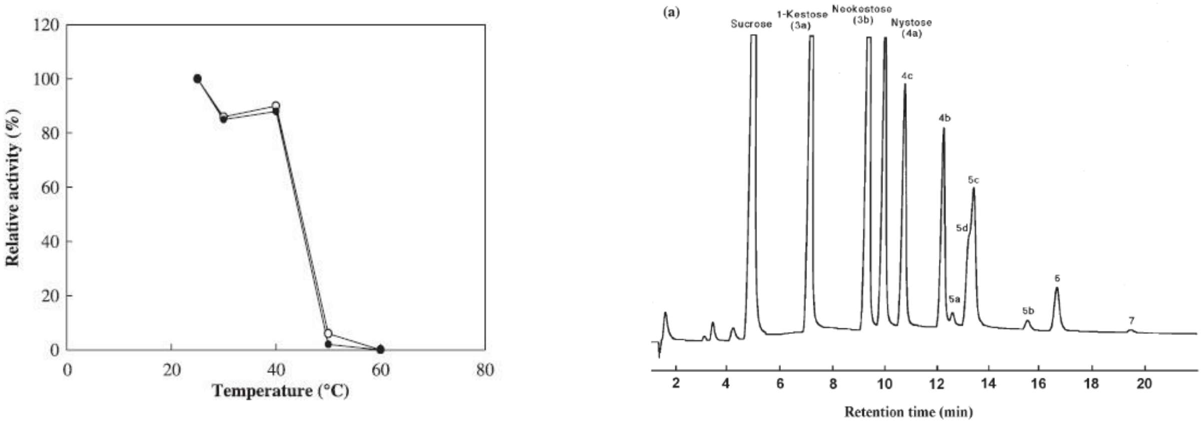
4. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่สกัดได้ในน้ำอ้อย

ผลการทดสอบเอนไซม์ในน้ำอ้อยโดยทำการทดสอบ pH-dependence stability โดยใช้อุณหภูมิที่ศึกษาได้ในขั้นตอนที่ 2 คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสกัดเป็นเวลา 30 นาทีที่ pH 5.0, 5.16, 5.28, 5.38, 5.52, 5.82, 6.18, 6.31 และ 6.70และศึกษากิจกรรมเอนไซม์ 6G-FFT และ 1-FFT พบว่าในช่วง pH 5.0 – 5.16 มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงกว่า 70% ผลการทดสอบ Thermal stability โดยอุ่นน้ำอ้อยเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 องศาเซลเซียส (20 องศาเซลเซียสเป็ยชุดควบคุม) พบว่าผลยืนยันกิจกรรมในพบในขั้นตอนที่ 2 คือเอนไซม์จะมีกิจกรรมที่เสถียรระหว่างอุณหภูมิ 20 – 40

องศาเซลเซียสและหยุดเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เมื่อทำการศึกษาการผลิตสารกลุ่ม FOS จากน้ำอ้อยพบว่ามีการผลิต 1-6 di-β-D-fructofuranosylsucrose (4c, 1.239 mg, โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ที่ 1.86 μmol/ml) nystose (4a, 0.530 mg, โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 0.796 μmol/ml) และการผลิต neokestose เล็กน้อย



ภาพที่ 12 ผลของค่าความเป็นกรดด่าง (pH stability) และผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ Fructotransferase ที่สกัดในน้ำอ้อย



ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิและผลการวิเคราะห์ HPLC ของสารสกัด FOS จากน้ำอ้อย (a) chromatogram (b) time-course production

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดรา อย่างน้อย 6 สายพันธ์ แต่ไม่พบความแตกต่างในการผลิต Total FOS ระหว่างการใช้จุลินทรีย์ *Aspergillus niger* และ *Aureobasidium pollulans* อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเพิ่ม stains โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธ์เดียวกันจากธรรมชาติ พบว่า *A. pollulans* มีแนวโน้มในการผลิต total FOSs ที่ดีกว่า สำหรับการศึกษาใน *Garnoderma lucidum และ Shizophyllum commune* พบว่ามีการผลิต FOS ที่ช้ากว่าทั้งนี้เนื่องมาจากผนังเซลล์ที่แข็งแรงของสิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดทำให้เวลาสกัดต้องใช้เวลามากกว่าจุลินทรีย์สองตัวแรกอย่างไรก็ตาม ปริมาณ total FOSs ที่ผลิตได้ยังไม่ทราบเนื่องจากจำเป็นต้องทำการทดลองเพิ่มเติม

ผลการศึกษาด้านจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เอนไซม์จะมีอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาสูงในช่วงแรก จนกระทั่งถึงจุดที่มีอัตราเร็วสูงสุด ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ถือเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด และยังพบอีกว่า เอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมีกิจกรรมสูงที่สุดที่ 55 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 0.018 นาที ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ เมื่อทดลองพิจารณาที่อุณหภูมิประมาณ 48 องศาเซลเซียส พบว่าให้ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสเท่ากับ 0.130 นาที ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และให้กิจกรรมในการเกิดปฏิกิริยาต่างกันเพียง 0.34 เท่า ดังนั้นที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดสมาใช้ได้นานขึ้น สามารถผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์โดยกระบวนการ ultracentrifugation (Hidaka,1999) จาก A. niger โดยสามารถเก็บเอนไซม์ได้กว่า 40% อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนที่ซับซ่อนและใช้สารเคมีราคาสูง จึงทำการทดลอง enzyme purification ซ้ำตามวิธีของ Fujishima,2005 โดยเตรียมตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบที่ 0 – 2 องศาเซลเซียสโดยใช้แอมโมเนียมฟอสเฟสในการสกัด จากนั้นทำการศึกษากิจกรรมเอนไซม์บริสุทธิ์จำนวน 3 กิจกรรม ตามวิธีของ Henry& Darbyshire,1980 ที่ได้ผลดีกว่า ผลการทดสอบเอนไซม์ในน้ำอ้อยโดยทำการทดสอบ pH-dependence stability โดยใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสกัดเป็นเวลา 30 นาทีที่ pH ต่างกันพบว่าในช่วง pH 5.0 – 5.16 มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงกว่า 70% และผลการทดสอบ Thermal stability โดยอุ่นน้ำอ้อยเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิต่างกันพบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมที่เสถียรระหว่างอุณหภูมิ 20 – 40 องศาเซลเซียสและหยุดเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และการผลิตสารกลุ่ม FOS มีการผลิต 1-6 di-ß-D-fructofuranosylsucrose (4c, 1.239 mg, โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ที่ 1.86 μmol/ml) nystose (4a, 0.530 mg, โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 0.796 μmol/ml) และการผลิต neokestose เล็กน้อย

เอกสารอ้างอิง

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, สัญญา จิตบรรจงกิจ, นราฤทธิ์ ประสมศาสตร์ และ ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, การผลิตเอนไซม์บีต้า-ฟรุกโตฟูเรโนซิเดสจาก *Aspergillus niger* ATCC 20611,การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . 4 - 7 กุมภาพันธ์ 2545 \. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Bale-Smith E.C., 1973, *Phytochemistry*, **12**, p.907

Coupoos-Paul I., 1993, Thèse de Doctorat en Biotechnologies et Industries Alimentaires, INPL, Nancy, France

Hidaka, H., M.Hirayama and N. Sumi. 1998 A fructo-oligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem. 52, 1181-1187.

Jung, K. H., Yun, J. W., Kang, K. R., Lim, J. Y. And Lee, J. H. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharide from sucrose. *Enzyme Microb. Technol.* 1989, **11**, 491-494.

Parrent J.L., T. James, R. Vasaitis and A. FS Taylor, Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encording for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses, BMC Evolutionary Biology 9:148, 2009.

Yun, J. W., Jeon J. W., Lee, M. G., and Song, S. K. Production of fructo-oligosaccharides by fructosyltransferase immobilized onto a ion-exchange resin, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 1993, **8**, 307-312.

Yun, J. W., Choi Y. C., Lee, M. G., and Song, S. K. Mathematical model for the production of high-purity fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 1994, **9**, 40-47.

Yun, J. W., Yun T. K., Han, S. B., and Song, S. K. Oligosaccharide formation and production of transfructosylase and transglucosylase by *Aureobasidium pullulans*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 1994, **9**, 133-139.