



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนากรรมวิธีการผลิตแป้งอินูลินและอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์
ทางอุตสาหกรรม

Process Development for Industrial Production of Inulin Flour and
Inulooligosaccharides

นามผู้วิจัย นายอัครชัย ปรีกกมะกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, Dr.rer.nat.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจกสูงสติดิษฐ์, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุณย์ สัจจานันตกุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงห์สีเงิน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาระบบวิธีการผลิตแป้งอินูลินและอินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ทางอุตสาหกรรม

Process Development for Industrial Production of Inulin Flour and Inulooligosaccharides

โดย

นายอักรชัย ปริกมะกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อัครชัย ปรักกมะกุล 2555: การพัฒนากรรมวิธีการผลิตแป้งอินูลินและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ทางอุตสาหกรรม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประชานกรรมการที่ปรึกษา:
รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D. 82 หน้า

การผลิตแป้งอินูลินและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมจากเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค (*Helianthus tuberosus*) เป็นทางเลือกใหม่เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค โดยศึกษากระบวนการผลิตแป้งอินูลินและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเยรูซาเล็มอาร์ทิโชคที่เหมาะสม

กระบวนการผลิตแป้งอินูลินแบบเปียกโดยใช้น้ำร้อนในการสกัดและผสมแอลกอฮอล์จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 70 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการตกตะกอน ให้ผลได้ของแป้งอินูลินที่สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนเพียงอย่างเดียว จากการศึกษาพบว่าการใช้เอนไซม์ผสมในการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ให้ผลได้ของอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (DP = 3-5) สูงกว่าการใช้เอนไซม์เดี่ยวจาก *Aspergillus niger* TISTR 3570 หรือ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 และสามารถเตรียมน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้โดยใช้การระเหยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายได้ความดัน 27 มิลลิเมตรปรอท การผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงได้โดยใช้การทำแห้งแบบพ่นฝอยที่มีการเติมมอลโทเดกซ์ทริน 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาณ ลงในสารละลายอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เพื่อเป็นสารช่วยทำแห้งและควบคุมลมร้อนที่เข้าและออกจากเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส และ 75-86 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เยรูซาเล็มอาร์ทิโชค (*Helianthus tuberosus*) เป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพใช้สำหรับผลิตแป้งอินูลินและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีมูลค่า โดยมีทางเลือกในการเตรียมนินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นน้ำเชื่อมเข้มข้นหรือเป็นผงเพื่อให้เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Akrachai Parakkamakul 2012: Process Development for Industrial Production of Inulin Flour and Inulooligosaccharides Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Wirat Vanichsriratana, Ph.D. 82 pages.

The industrial production of inulin flour and inulooligosaccharides from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) were the new choices for added value of Jerusalem artichoke. This work reported the study of suitable processes for making of inulin flour and inulooligosaccharides from Jerusalem artichoke.

The wet process for inulin flour production with using hot water extraction and mixed with alcohol until the final concentration was 70 % for precipitation gave higher yield than that using only water. It was also found that enzymatic production of inulooligosaccharides using mixed enzymes showed higher yield of oligosaccharides (DP = 3-5) than those using either enzyme from *Aspergillus niger* TISTR 3570 or *Candida guilliermondii* TISTR 5844. Inulooligosaccharide syrup can be prepared by evaporation at 45 °C under 27 mmHg_g vacuums. On the other hand, Inulooligosaccharide powder was prepared with using the spray dryer (adding 30 % (w/v) maltodextrin as carrier) and controlled of air inlet temperature 160 °C and air outlet temperature between 75-86 °C.

Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) can be partially used as for producing inulin flour and inulooligosaccharides which are value added products. Inulooligosaccharides can be further developed as concentrate syrup or powder for suitable use in food industries.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผศ.ดร. ประมุข กระจุกสุขสถิตย์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผศ.ดร. ธนะบุญย์ สัจจาอนันตกุล กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง รศ. สมบัติ ขอทวีวัฒนา ผู้แทนบัณฑิตในการสอบประมวลความรู้ และรศ.ดร. ธงชัย สุวรรณสิขณน์ ผู้แทนบัณฑิตในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ผู้ซึ่งสร้างครอบครัวที่อบอุ่นผู้เป็นความรักและกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ให้แก่ข้าพเจ้า และให้การสนับสนุนแก่ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบคุณพี่ ๆ บุคลากรในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ รุ่นพี่ และรุ่นน้องทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือเกื้อกูลต่อกันมาตลอดระยะเวลาที่ศึกษาในระดับปริญญาโท

อัครชัย ปรักกมะกุล

ตุลาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	56
สรุป	56
ข้อเสนอแนะ	57
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	59
ภาคผนวก	66
ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง	67
ภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์	74
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์	76
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนและอัตราผู้ป่วยในต่อประชากร 100,000 คน ด้วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรังปี พ.ศ. 2546-2551 ยกเว้นกรุงเทพมหานครฯ	7
2	องค์ประกอบทางเคมีของเยรูลาเล็มอาร์ทีโซค (ต่อ 100 กรัมหัวสด)	20
3	น้ำหนักในแต่ละขั้นตอนการเตรียมน้ำสกัดเยรูลาเล็มอาร์ทีโซคโดยวิธีต่าง ๆ	40
4	ผลเปรียบเทียบการสกัดแป้งอินูลินจากหัวเยรูลาเล็มอาร์ทีโซคสด 1 กิโลกรัม	40
5	องค์ประกอบของน้ำสกัดอินูลินจากเยรูลาเล็มอาร์ทีโซค	42
6	ค่าจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ <i>A. niger</i> TISTR 3570 และ <i>C. guilliermondii</i> TISTR 5844 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ เท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	45
7	องค์ประกอบของสารละลายอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์ดิบ ผสมอินูลินสควมคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง	53
8	องค์ประกอบของน้ำเชื่อมอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้น	54
9	องค์ประกอบของอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ผง ที่มีการเติมมอลโตเด็คัสตริน ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 เพื่อผลิตเอนไซม์อินูลิเนสในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	68
ก2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ <i>Candida guilliermondii</i> TISTR 5844 เพื่อผลิตเอนไซม์อินูลิเนสในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	69
ก3 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์อินูลิเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง	70
ก4 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์อินูลิเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 ความเข้มข้น 1.0 หน่วยต่อกรัม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง	71
ก5 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์อินูลิเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 ความเข้มข้น 2.0 หน่วยต่อกรัม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง	72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก6	การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์คิบผสมอินูลเนสจาก (เชื้อรา:เชื้อยีสต์) อัตราส่วน 10:1 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง	73
ข1	สรุปสูตรการคำนวณค่าพารามิเตอร์สำหรับการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์	75
ค1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครส	78
ค2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส	80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	(ก) ลักษณะต้นและดอกของยีสต์อาร์ทีโซค (ข) ลักษณะหัวของยีสต์อาร์ทีโซค	5
2	โครงสร้างทางเคมีของอินูลินและอินูโลแซ็กคาไรด์	13
3	การทำงานของเอนไซม์เอนโคและเอกโซอินูลิเนส	16
4	การทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส I และอินเวอร์เทส II	19
5	การทำงานของเอนไซม์เอนโคอินูลิเนสในการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์	21
6	กระบวนการจัดการเชื้อจุลินทรีย์ <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 และ <i>Candida guilliermondii</i> TISTR 5844	28
7	ขั้นตอนการสกัดแป้งอินูลินโดยใช้น้ำร้อนร่วมกับแอลกอฮอล์	30
8	ขั้นตอนการสกัดแป้งอินูลินโดยใช้น้ำร้อน	31
9	ขั้นตอนการเตรียมน้ำสกัดยีสต์อาร์ทีโซค	32
10	ขั้นตอนการทดลองการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากยีสต์อาร์ทีโซค	34
11	ขั้นตอนในการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผง	36
12	ขั้นตอนในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลต่าง ๆ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง	38
13	(ก) ผลการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของ <i>A. niger</i> TISTR 3570 (ข) ผลการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของ <i>C. guilliermondii</i> TISTR 5844 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อหน้าที่ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	การผลิตอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ดิบอินูลิเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัมอินูลิน ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์	46
15	การผลิตอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ดิบอินูลิเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 ความเข้มข้น 1.0 หน่วยต่อกรัมอินูลิน ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์	47
16	การผลิตอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ดิบอินูลิเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570 ความเข้มข้น 2.0 หน่วยต่อกรัมอินูลิน ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์	48
17	การผลิตอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ผสมอินูลิเนส (เชื้อรา:เชื้อยีสต์) อัตราส่วน 10:1 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัมอินูลิน ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูลิโอดีโกแซ็กคาไรด์	51

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

C_E^0	=	ความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้น
C_{FOS}	=	ความเข้มข้นฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์
C_{GF}^0	=	ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น
FOS	=	ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์
G	=	กลูโคส
F	=	ฟรุกโทส
GF	=	ซูโครส
GF_2	=	1-kestose
GF_3	=	นิสโทส
GF_4	=	1^F -ฟรุกโทฟูเรโนซิดนิสโทส
IOS	=	อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์
Inu	=	เอนไซม์อินูลิเนส
Inv	=	เอนไซม์อินเวอร์เทส
K_{iG}	=	ค่าคงที่การยับยั้งของกลูโคส
$K_{m(GF)}$	=	ค่าคงที่ไม่เคลิซของซูโครส
$K_{m(GF2)}$	=	ค่าคงที่ไม่เคลิซของ 1-kestose
$K_{m(GF3)}$	=	ค่าคงที่ไม่เคลิซของนิสโทส
r^2	=	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
r_{GF2}	=	อัตราเร็วการเกิด 1-kestose
r_{GF3}	=	อัตราเร็วการเกิดนิสโทส

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

r_{GF4}	=	อัตราเร็วการเกิด 1 ^F -ฟรุกโทฟูเรโนซิลนีสโทส
V	=	ปริมาตรสารละลาย
V_{GF}	=	อัตราการใช้ซูโครสโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง
V_{GF2}	=	อัตราการใช้ 1-kestโทสโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง
V_{GF3}	=	อัตราการใช้ นีสโทสโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง
$V_{m(GF)}$	=	อัตราเร็วการใช้สูงสุดของซูโครส
$V_{m(GF2)}$	=	อัตราเร็วการใช้สูงสุดของ 1-kestโทส
$V_{m(GF3)}$	=	อัตราเร็วการใช้สูงสุดของ นีสโทส
v_{vm}	=	ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรสารละลาย/นาที่
μ	=	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
$Y_{x/s}$	=	ผลได้เซลล์
$Y_{p/s}$	=	ผลได้ผลิตภัณฑ์
Q_s	=	อัตราการใช้ซับสเตรท
q_s	=	อัตราการใช้ซับสเตรทจำเพาะ
Q_p	=	อัตราการผลิตสารผลิตภัณฑ์
q_p	=	อัตราการผลิตสารผลิตภัณฑ์จำเพาะ
I/S	=	อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมเอนไซม์อินูลินสต่อเอนไซม์อินเวอร์เทส

การพัฒนากรรมวิธีการผลิตแป้งอินูลินและอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ทางอุตสาหกรรม

Process Development for Industrial Production of Inulin Flour and Inulooligosaccharides

คำนำ

อินูโลลิโกแซ็กคาไรด์เป็นที่รู้จักกันดีและนิยมอย่างแพร่หลายในบทบาทของสารเติมแต่งในอาหารที่มีคุณประโยชน์อย่างยิ่งต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยการทำหน้าที่เป็นเส้นใยอาหาร (Dietary fiber) ซึ่งช่วยในเรื่องการขับถ่าย ดักจับสารพิษ เป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร (Prebiotics) เป็นผลช่วยส่งเสริมให้มีสุขภาพที่ดี และปัจจุบันนิยมใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อสุขภาพ

อินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ได้จากการย่อยสลายอินูลินด้วยเอนไซม์อินูลิเนส ที่ประกอบด้วยกิจกรรมของเอนโดอินูลิเนสและเอกโซอินูลิเนส (EC 3.2.1.7) ทำให้ได้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงแต่มีความหวานเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่าอินูลิน จากงานวิจัยของ McKellar and Modler (1989) รายงานว่าขนาดโมเลกุลหรือ degree of polymerization (DP) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อ Bifidus factor หรือปัจจัยที่ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของ Bifidobacterium ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Probiotics) และ DP ของอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ที่ทำให้ค่า Bifidus factor สูงที่สุด คือ 3-5 ดังนั้นเมื่อบริโภคอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารจึงสามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารได้เร็วกว่าอินูลิน จุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกส์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมีผลในการช่วยให้สุขภาพในระบบทางเดินอาหารดีขึ้น ส่งผลให้สุขภาพโดยรวมแข็งแรง

หากมองอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ในแง่ของโภชนาการ อินูโลลิโกแซ็กคาไรด์มีความปลอดภัยในการบริโภคสูงและจัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นสารอาหารที่ให้พลังงาน แต่อินูโลลิโกแซ็กคาไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานต่ำ มีความหวานต่ำกว่าซูโครส แต่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและสภาวะความเป็นกรดมากกว่าซูโครส ทำให้เมื่อบริโภคก็จะไม่ส่งผลต่อปริมาณพลังงานที่ได้รับและระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดอีกด้วย จึงสามารถให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานบริโภค

ได้ และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างดี นอกจากนี้ยังให้ผลประโยชน์ที่ดีทางโภชนาการ อีกด้วย เมื่อจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกส์ย่อยสลายอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ จะผลิตกรดไขมันสายสั้น ๆ และวิตามินเป็นผลพลอยได้ ด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้มีความต้องการของตลาดและมูลค่าที่สูง

การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตแป้งอินูลิน อินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ และการแปรรูป อินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ให้มีความเหมาะสมกับการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มการยอมรับและมูลค่าให้กับแป้งอินูลินและอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบกรรมวิธีการผลิตแป้งอินูลิน
2. ศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์ดิบอินูลินต่อการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์
3. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของเยรูซาเล็มอาร์ทิโชคในประเทศไทย

เยรูซาเล็มอาร์ทิโชค (Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชดอกชนิดหนึ่ง มีดอกคล้ายทานตะวันและบัวตอง แต่มีขนาดเล็กกว่า อยู่ในตระกูลเดียวกับทานตะวัน มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือแต่มีการปรับตัวได้ดีในประเทศไทย ลักษณะต้นสูง 1.5-2.0 เมตร มีขนตามกิ่งและใบ มีลำต้นใต้ดิน (tuber) รับประทานได้ มีขนาดเล็กกว่ามันฝรั่งเพื่อเก็บสะสมอาหาร ซึ่งก็คืออินูลิน ใบรูปไข่ บางพันธุ์มีขอบใบหยัก มีอายุการปลูก 120-140 วัน แต่จะออกดอกเมื่ออายุประมาณ 60 วัน ให้ผลผลิต 3-6 ตันต่อไร่ จะเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ในสภาพอากาศของประเทศไทย แต่จะให้ผลผลิตดีในหน้าแล้ง ต้องการน้ำ 250-350 ลิตรต่อต้น ซึ่งถือว่าต้องการมาก เพราะเป็นพืชที่มีรากขนานอยู่ในระดับตื้น ชอบดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ พีเอช 6.0-8.0 การให้ปุ๋ยควรระมัดระวังในการให้ธาตุไนโตรเจน เพราะถ้ามากเกินไปจะลดผลได้ของหัวเยรูซาเล็มอาร์ทิโชคลง มีโรคพืชน้อย เป็นพืชที่มีการสะสมอินูลินในปริมาณสูง โดยมีปริมาณอินูลินมากถึงร้อยละ 14-19 ของน้ำหนักสด (Frank and Leenheer, 2002) ซึ่งอินูลินเป็นพอลิเมอร์ของฟรุกโทสที่เป็นอาหารสะสมในพืชชั้นสูงหลายชนิด

เยรูซาเล็มอาร์ทิโชคได้รับการพัฒนาเพื่อให้เป็นพืชเศรษฐกิจของไทยในอนาคต ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ การผลิต และการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นผลงานวิจัยของสถาบันสถาบันค้นคว้าและพัฒนากระบวนการเกษตรในเขตวิถุคมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รศ.ดร. สนั่น จอกลอย) อีกทั้งยังมีการวิจัยถึงสรรพคุณทางยา การนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารสัตว์และการนำไปใช้ในรูปแบบอื่น ๆ เช่น ผลิตเอทานอล ผลิตน้ำเชื่อม ฟรุกโทส และผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นต้น จึงคาดได้ว่าประเทศไทยจะสามารถผลิตเยรูซาเล็มอาร์ทิโชคเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตแป้งอินูลิน อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำเชื่อมฟรุกโทส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) เนื่องจากอินูลินได้เป็นที่รู้จักกันดีและนิยมอย่างแพร่หลายในสถานภาพสารเติมแต่งในอาหารที่มีคุณประโยชน์อย่างยิ่งต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยการทำหน้าที่เป็นเส้นใยช่วยเรื่องการขับถ่าย ดักจับสารพิษ เป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร



(ก)



(ข)

ภาพที่ 1 (ก) ลักษณะต้นและดอกของเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค (ข) ลักษณะหัวของเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค

2. ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (functional food)

อาหารฟังก์ชัน เป็นทฤษฎีใหม่ในวงการอาหารและโภชนาการที่ถูกกล่าวถึงอย่างมากมาตั้งแต่ศตวรรษที่ 20 ด้วยการค้นพบสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์ เช่น โปรไบโอติก อาหารเส้นใย กรดไขมันไม่อิ่มตัว โอเลโกแซ็กคาไรด์ เกลิโอแรตต่าง ๆ เป็นต้น (ไพโรจน์, 2552) และด้วยแนวคิดในการบริโภคเพื่อรองรับกับการเจริญเติบโตของร่างกาย คงรักษาน้ำหนักและป้องกันภาวะทุพโภชนาการ

ดังนั้นอาหารฟังก์ชันจึงถือว่าเป็นสิ่งจำเป็นต่อสุขภาพพลานามัยที่ดีของมนุษย์ อันเป็นผลเนื่องมาจากสถานการณ์ของโรคที่มีความรุนแรงมากขึ้น ซึ่งโรคที่มีสถิติของจำนวนผู้ป่วยและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นนั้น ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเกิดความเสื่อมโทรมของร่างกายอันเป็นผลมาจากวิถีชีวิตที่เร่งรีบและปัญหาทุพโภชนาการ (Malnutrition) เช่น ความดันโลหิตสูง หัวใจขาดเลือด อัมพฤกษ์ อัมพาต โรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน และมะเร็ง เป็นต้น โดยทั่วโลกมีสถิติการเสียชีวิตด้วยโรคที่มีสาเหตุเนื่องจากความเสื่อมโทรมของร่างกายคิดเป็นร้อยละ 60 ของสาเหตุการตายทั้งหมด โดยโรคอันดับหนึ่งที่เป็นสาเหตุการตายคือโรคมะเร็งต่าง ๆ (WHO/FAO, 2003) เมื่อพิจารณาสถานการณ์ภายในประเทศไทย พบว่ามีแนวโน้มที่ประชากรจะเสียชีวิตเนื่องจากโรคที่มีสาเหตุเนื่องจากความเสื่อมโทรมของร่างกายเพิ่มขึ้นทุกปี ทำให้อาหารฟังก์ชันเป็นที่นิยมน้อย่าง

แพร่หลายและยิ่งทวีความสำคัญมากขึ้นในสังคมปัจจุบัน เป็นผลให้ความต้องการและมูลค่าของอาหารกลุ่มนี้เพิ่มสูงขึ้น

ได้มีการคาดการณ์กันว่าตลาดอาหารเพื่อสุขภาพทั่วโลกจะขยายตัว เพิ่มมูลค่าการใช้จ่ายมากถึง 9.05 หมื่นล้านเหรียญสหรัฐฯ ภายในปี พ.ศ. 2556 หรือมีอัตราการเติบโตเมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2549 จะสูงถึงร้อยละ 200.50 ซึ่งประเทศไทยเองยังผลิตและส่งออกอาหารเพื่อสุขภาพในปริมาณที่น้อย โดยคิดเป็นร้อยละ 1 ของมูลค่าตลาดรวม เนื่องจากตลาดอาหารสุขภาพยังเป็นเรื่องใหม่ของผู้บริโภคส่วนใหญ่ และโดยมากพฤติกรรมผู้บริโภคยังเน้นความอร่อยของรสชาติมากกว่า ประเด็นสุขภาพ (Ksmecare, 2009) และได้มีการเสนอแผนพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารไทยจากสถาบันอาหารถึงรัฐบาลให้มีการสนับสนุนอย่างจริงจังเพื่อให้ยอดการส่งออกอาหารเพื่อสุขภาพของไทยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 10 ของมูลค่าการตลาดทั่วโลกภายในปี 2555 ซึ่งคิดเป็นมูลค่ากว่า 1 ล้านล้านบาท (ผู้จัดการออนไลน์, 2551)

ตารางที่ 1 จำนวนและอัตราผู้ป่วยในต่อประชากร 100,000 คน ด้วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ปี พ.ศ. 2546-2551 ยกเว้นกรุงเทพมหานคร

พ.ศ.	CVD		DM		มะเร็ง		โรคความดันโลหิตสูง		โรคหัวใจขาดเลือด		โรคหลอดเลือดสมองใหญ่	
	จำนวน	อัตรา	จำนวน	อัตรา	จำนวน	อัตรา	จำนวน	อัตรา	จำนวน	อัตรา	จำนวน	อัตรา
2546	595,655	1,064.1	213,136	380.8	56,911	101.7	218,218	389.83	92,773	165.65	84,807	151.50
2546	680,651	1,223.1	247,165	444.2	59,570	107.1	265,636	477.35	103,352	185.72	94,567	169.94
2548	754,404	1,334.1	277,391	490.5	64,642	114.3	307,671	544.08	112,352	198.68	98,895	174.88
2549	886,125	1,556.1	334,168	586.8	70,823	124.4	375,600	659.57	132,500	232.68	107,246	188.33
2550	1,011,590	1,767.7	374,518	650.4	74,834	130.8	445,300	778.12	149,510	261.26	117,571	205.45
2551	1,108,026	1,927.0	388,551	675.7	77,173	134.2	494,809	860.53	159,176	276.83	124,532	216.58

หมายเหตุ: CVD โรคหัวใจและหลอดเลือด DM โรคเบาหวาน มะเร็ง เฉพาะมะเร็งตับ ปอด เต้านมและมดลูก

ที่มา: สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข (ปี พ.ศ. 2546-2551)

3. โปรไบโอติกส์ (Prebiotics)

Prebiotics คือหนึ่งในอาหารฟังก์ชัน ซึ่งได้มีการให้ความหมายไว้ว่า เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถย่อยได้ แต่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยการกระตุ้นการเจริญเติบโตและ/หรือกระตุ้นกิจกรรมอย่างเจาะจงต่อแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่บางชนิดและช่วยให้สุขภาพดีขึ้น (Gibson and Roberfroid, 1995) แบคทีเรียที่ได้กล่าวถึงในนิยามนั้นคือแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกายที่เรียกว่า “โปรไบโอติกส์” (probiotics) เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli เป็นต้น (Gibson and Collin, 1999)

ปัจจุบันได้มีความสนใจศึกษาโปรไบโอติกส์ที่เป็นโมเลกุลเล็ก เช่น โอลิโกแซ็กคาไรด์ เนื่องจากเมื่อนุ้มนุ้ยบริโภคโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้าไป โอลิโกแซ็กคาไรด์เหล่านี้จะไปทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับโปรไบโอติกส์ได้ดีที่สุด ทำให้โปรไบโอติกส์มีโอกาสที่จะเพิ่มจำนวนและปรับสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ซึ่งจะส่งผลให้ผู้บริโภคเป็นประจำจะมีสุขภาพที่ดี อีกทั้งด้วยกระบวนการหมักของโปรไบโอติกส์จะได้สารอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ตอบแทนให้แก่เซลล์ในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่อีกด้วย เช่น กรดไขมันสายสั้น และวิตามิน เป็นต้น

โปรไบโอติกส์มีมากมายหลายชนิด ที่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย เช่น อินูลิน (inulin) อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (inulooligosaccharide) ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide) กาแลกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharide) ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharide) ไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomaltooligosaccharide) และแลคทูโลส (lactulose) เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วเนื่องจากการที่ร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถที่จะย่อยสลายสารจำพวกโปรไบโอติกส์ได้ จึงส่งผลให้โปรไบโอติกส์เป็นสารให้พลังงานต่ำช่วยส่งผลกระทบในทางที่ดีต่อลำไส้ใหญ่และการขับถ่าย จึงมักมีข้อแนะนำให้มีการบริโภคเป็นประจำ แต่ในบางครั้งการบริโภคโปรไบโอติกส์ในปริมาณมากก็ส่งผลข้างเคียงให้เกิดอาการท้องร่วงและท้องอืด นักโภชนาการจึงมีข้อแนะนำในการบริโภค โดยให้เริ่มบริโภคในปริมาณน้อย และค่อยเพิ่มปริมาณขึ้นภายหลังจากร่างกายสามารถปรับตัวให้คุ้นเคย ด้วยเหตุนี้โปรไบโอติกส์จึงถูกนำไปใช้ในลักษณะของวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) ไม่ได้ใช้เป็นส่วนประกอบหลักของอาหาร

4. วัตถุเจือปนอาหาร (food additive)

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547 เรื่องวัตถุเจือปนอาหารให้ความหมายของวัตถุเจือปนอาหารไว้ดังนี้

“ วัตถุที่ตามปกติมิได้ใช้เป็นอาหารหรือส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสีอาหาร การปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการขนส่งซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร ทั้งนี้ให้หมายความรวมถึงวัตถุที่มีได้เจือปนในอาหาร แต่มีภาชนะบรรจุไว้เฉพาะแล้วใส่รวมอยู่กับอาหารเพื่อประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นด้วย เช่น วัตถุกันชื้น วัตถุดูดออกซิเจน เป็นต้น ความในวรรคหนึ่ง ไม่รวมถึงสารอาหารที่เดิมเพื่อเพิ่มหรือปรับให้คงคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่”

จากคำจำกัดความตามประกาศข้างต้นจะเห็นว่าวัตถุเจือปนอาหารถูกให้ความหมายที่ดูแล้วยอันตรายเกินไป และมีการขยายความครอบคลุมไปถึงพวกสารดูดความชื้นและสารดูดออกซิเจนซึ่งโดยปกติผู้ผลิตจะแยกใส่ซองหรือบรรจุภัณฑ์เพราะหากเกิดการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ดี สารที่เดิมลงไปในอาหารแล้วช่วยเพิ่มคุณภาพให้อาหารไม่ว่าทางหนึ่งทางใด ถึงแม้ว่าสารนั้นจะมีหรือไม่มีคุณค่าทางอาหารเมื่อพิจารณาในแง่ของการผ่านการย่อยและดูดซึมสารอาหารภายหลังบริโภค ก็จะเรียกว่าเป็นวัตถุเจือปนอาหาร ซึ่งฟรีไบโอติกส์ก็เข้ากับหลักเกณฑ์นี้ เนื่องจากฟรีไบโอติกส์นั้นใส่ในผลิตภัณฑ์เป็นปริมาณมากไม่ได้เนื่องจากอาจจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ทำให้เกิดอาการท้องร่วงและท้องอืด ฟรีไบโอติกส์ที่เดิมเข้าไปในผลิตภัณฑ์จะช่วยเสริมคุณภาพให้กับผลิตภัณฑ์ในแง่ของการปรับเปลี่ยนลักษณะของผลิตภัณฑ์และการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

5. อินูลินและอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์

5.1 อินูลิน

คำว่าอินูลินนั้นถูกนำมากล่าวถึงครั้งแรกโดย Thomson (1818) เป็นพอลิเมอร์ตามธรรมชาติ พบทั้งในพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ จัดอยู่ในสารจำพวก “ฟรุคแทน” ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่หรือทั้งหมดจะเป็นการเชื่อมต่อกันแบบ (β 2 $\rightarrow$ 1) fructosyl-fructose ซึ่งจะมีกลูโคสหรือไม่ก็ได้ เนื่องจากไม่ใช่อะไรที่ประกอบที่สำคัญ โดยปกติอินูลินนั้นจะมีโครงสร้างเป็นโซ่ตรง ในธรรมชาติจะพบอินูลินจากพืชมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยมี DP ได้มากถึง 70 และพบอินูลินที่ผลิตจากแบคทีเรียมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยมี DP ได้มากถึง 1,000 แต่อาจพบว่าอินูลินมีการจัดเรียงตัวเป็นวงแหวนที่ประกอบด้วย 6-8 fructosyl group (Kawamara และคณะ, 1989) โอลิโกเมอร์ที่มีค่าดีกรีพอลิเมอร์ระหว่าง 7 หรือ 8 มีแนวโน้มที่จะปรับเปลี่ยนรูปแบบได้เนื่องจากมีโครงสร้างแบบเฮลิคัล (helical structure) โดยความแข็งแรงของโครงสร้างจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าดีกรีพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น

อินูลินเป็นเส้นใยอาหารที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย รสชาติไม่หวาน มีจุดหลอมเหลวที่ 190 องศาเซลเซียส ความหนืดของสารละลายอินูลินสูงที่สุด (Peak temperature: T_p) ที่ 184.5 องศาเซลเซียส ค่าเอ็นทัลปีสำหรับการหลอมเหลวของอินูลินคือ 41.75 จูลต่อกรัม ที่ความเข้มข้น 94.7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก โดยเมื่อลดความเข้มข้นของสารละลายอินูลินลงจะทำให้ค่า T_p ลดลงเนื่องจากน้ำที่อยู่ในสารละลายมีบทบาทเป็น Plasticizer อินูลินไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อินูลินละลายน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยละลายได้ 28 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เจลของอินูลินมีลักษณะคล้ายโยเกิร์ต (Kim and Wang, 1999) อินูลินสามารถจัดเรียงตัวเป็นผลึกขนาดเล็ก (micro crystal) ในน้ำหรือน้ำนม (Niness, 1999)

อินูลินให้พลังงานต่ำเพียง 1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม (Niness, 1999) มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากทนต่อการย่อยสลายจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซูเครส และมอลเทส ของคนและสัตว์ จึงไม่ทำให้ฟันผุ ไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก จึงไม่เป็นสาเหตุของการเพิ่มระดับน้ำตาลในกระแสโลหิต จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่จะเกิดการหมักโดย *Bifidobacterium* sp. ในลำไส้ใหญ่ เกิดกรดไขมันสายสั้น และวิตามินบางชนิด เป็นต้น เป็นผลิตภัณฑ์จากการหมัก ที่เป็นสารอาหารให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่บริเวณผนังลำไส้

(probiotics) อีกทั้งยังช่วยลดพีเอช ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค จึงเรียกว่า “สารพรีไบโอติกส์” (prebiotics) ลดการอักเสบของลำไส้ใหญ่ บรรเทาอาการท้องเสีย เพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุในลำไส้ ลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในลำไส้ ลดปริมาณ serum lipid ลดปริมาณคอเรสเตอรอล ลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (anonymous 1, 2005; anonymous 2, 2005) แต่ถ้าหากรับประทานในปริมาณมากจะทำให้เกิดอาการท้องร่วง จึงควรรับประทานไม่เกินวันละ 20-30 กรัมต่อวัน (Roberffroid และ Delzenne, 1998) โดยเริ่มจากการบริโภคในปริมาณน้อยเพื่อป้องกันผลข้างเคียงจากการบริโภคอินูลิน อินูลินได้รับการรับรองจาก FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกาว่าเป็นสาร GRAS (Generally recognized as safe)

สาเหตุและปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างและสะสมอินูลิน มีอยู่สองประการ คือ การสร้างไว้เพื่อเป็นอาหารสำรอง โดยสังเกตได้จากส่วนของพืชที่พบอินูลินในปริมาณสูงมักจะเป็นบริเวณที่ใช้สะสมอาหาร เช่น ในราก หัว ขอบปล้อง และการสร้างขึ้นเพื่อต้านทานสภาวะแวดล้อมอันวิฤติ โดยสังเกตได้จากพืชที่อยู่ในเขตอากาศหนาวเย็นจึงจะมีการสร้างและสะสมอินูลิน พืชบางชนิดสร้างอินูลินไว้เพื่อเป็นกลไกป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ ช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1950-1969 มีนักวิทยาศาสตร์มากมายที่ต้องการจะทราบถึงกระบวนการในการสร้างและสะสมอินูลินในพืชชั้นสูง จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1968 Edelman and Jefford ได้นำเสนอกลไกในการสร้างและการสะสมอินูลินของเยรูซาเล็มอาร์ทิโชก (Jerusalem artichoke) ไว้ดังนี้

1. เปลี่ยนซูโครสให้เป็นไตรแซ็กคาไรด์ในไซโทพลาสซึม โดยใช้เอนไซม์ sucrose-sucrose 1-fructosyltransferase (SST)
2. ขนส่งไตรแซ็กคาไรด์ไปที่แวคิวโอล โดยเอนไซม์ β , (2-1)fructan: β , (2-1) fructan 1-fructosyltransferase (FFT) ซึ่งคาดว่าจะอยู่บนผิวของ tonoplast
3. ทำให้สายยาวขึ้นจนกลายเป็นอินูลินภายในแวคิวโอล

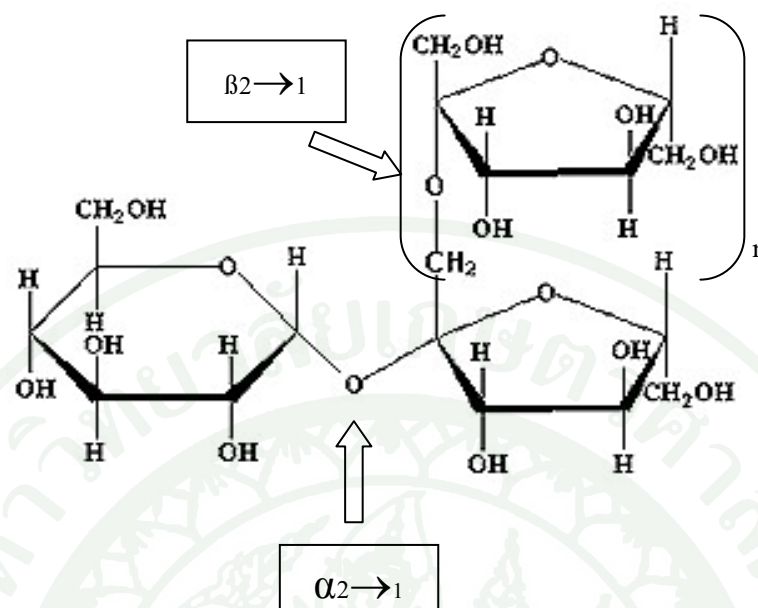
มีรายงานการประยุกต์ใช้อินูลินอย่างแพร่หลายมานานหลายสิบปี โดยส่วนมากใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารในอาหารเพื่อสุขภาพ และผลิตภัณฑ์จากนม ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Ohta *et al.*, 1992) ใช้ในทางการแพทย์เพื่อตรวจวัดประสิทธิภาพการทำงานของไต (Jung *et al.*, 1992) ใช้ในด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Seifert and Watzl, 2007)

5.2 อินูลิโอดีโกลแซ็กคาไรด์

เป็นสารที่มีโครงสร้างเช่นเดียวกับอินูลิน แต่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า โดยมีค่า DP (degree of polymerization) 2-10 เป็นสารให้ความหวานที่มีมูลค่าสูง มีความหวานเป็นหนึ่งในสามของซูโครส มีความหนืดสูงกว่าซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกัน เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่า มีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากกว่าซูโครส มีความเสถียรที่พีเอชของอาหารในช่วง 4.0-7.0 มีสมบัติการละลาย การแข็งตัว จุดเดือด และคุณสมบัติอื่น ๆ คล้ายซูโครส 1-kestose หรือ ไอโซkestose มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิ 199-200 องศาเซลเซียส มีค่าจำเพาะการหมุน $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ $+28.5^\circ$ สามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ขาวละเอียดอย่างรวดเร็ว ความหวานสัมพัทธ์เมื่อเทียบกับซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของ 1-kestose, นีสโทส, 1^F-ฟรุคโทฟูเรโนซิลนีสโทส มีค่าเท่ากับ 31.22 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Hayashi *et al.*, 1993) ไม่เป็นน้ำตาลรีดิคซ์เนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคส และตำแหน่งที่ 2 ของฟรุคโทสถูกใช้ในการสร้างพันธะไกลโคซิดิก ทำให้ไม่มีสมบัติของการเป็นน้ำตาลรีดิคซ์ (Suzuki and Chatterton, 1993)

เป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ 1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม จะมีคุณสมบัติทางชีวภาพคล้ายคลึงกับอินูลิน แต่เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่าอินูลินจึงทำให้เกิดกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร (probiotics) ได้เร็วกว่า โดยค่า DP ที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium* มากที่สุดคือ 3-5 มีการละลายที่ดีกว่าอินูลิน โดยอินูลิโอดีโกลแซ็กคาไรด์จะสามารถละลายได้บางส่วนในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้มีการแนะนำให้บริโภคเริ่มตั้งแต่ปริมาณน้อย และค่อยเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นแต่ไม่ควรเกิน 0.8 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน (ประเทศญี่ปุ่น) (Yun, 1996) แต่โดยเฉลี่ยแล้วผู้คนทั่วไปจะมีการบริโภคสารในกลุ่มฟรุคแทนน้อยกว่านั้นมากอยู่แล้วจึงไม่น่าเป็นห่วงสำหรับอันตรายในข้อนี้

อินูลิโอดีโกลแซ็กคาไรด์มีรายงานการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ และผลิตภัณฑ์จากนม เนื่องจากคุณสมบัติที่เด่นที่สุดของอินูลิโอดีโกลแซ็กคาไรด์คือการกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ได้ดี



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของอินูลินและอินูโลแซ็กคาไรด์

หมายเหตุ: n คือจำนวนหมู่ฟรุกโทซิด

6. การผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์

อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นสามารถผลิตได้โดยการใช้เอนไซม์ในกลุ่มอินูลิเนสย่อยสลายอินูลินให้เป็น ดี-ฟรุกโทส, ฟรุกโทไบโอส, โอลิโกฟรุกโทส และอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ด้วยการทำงานของเอนไซม์ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ แบบเอกโซไฮโดรเลส หรือเอกโซอินูลิเนส (exo-inulinase) และแบบเอนโดไฮโดรเลส หรือเอนโดอินูลิเนส (endo-inulinase) (Uchiyama, 1993)

6.1 เอนไซม์อินูลิเนส

6.1.1 เอนไซม์เอกโซอินูลิเนส

เอนไซม์เอกโซอินูลิเนส (EC 3.2.1.80) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ฟรุกแทน-ปีตา-ฟรุกโทซิดเอส (fructan- β -fructosidase) ซึ่งจำเพาะต่อโมเลกุลของฟรุกโทสทางด้านปลายอน-รีดิวิซ์ ดังนั้น จึงมีกิจกรรมในการสลายฟรุกโทสออกทีละโมเลกุลทางด้านปลายอน-รีดิวิซ์ของ

โมเลกุล อินูลินโดยทั่วไปแล้วเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยสลายซูโครส ราฟฟิโนส (raffinose) สตาชิโอส (stachyose) อินูลิน และเลแวนได้ (Uchiyama, 1993; Arand *et al.*, 2002)

อย่างไรก็ตาม พบว่ากลไกของปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเนื่องจากข้อจำกัดทางเทคนิคด้านการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ตลอดจนการวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยสลายนี้ แต่ในปัจจุบันการศึกษาและวิจัยโดยใช้เอนไซม์อินูลินสับรีซูทรีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความรู้เกี่ยวกับกลไกของเอนไซม์ชนิดนี้ชัดเจนยิ่งขึ้น มีการรายงานว่า เอนไซม์เอกโซอินูลินสับรีซูทรี จาก *Penicillium* sp-1, *Candida utilis* และ *Chrysosporium pannorum* แสดงกิจกรรมการย่อยสลายซูโครส ราฟฟิโนส สตาชิโอส อินูลิน และเลแวนได้ แต่ในทางตรงกันข้ามกับเอนไซม์เอกโซอินูลินสับรีซูทรี จาก *Aspergillus niger* สามารถย่อยสลายซูโครส ราฟฟิโนส สตาชิโอส และอินูลินได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเลแวนได้ เพราะฉะนั้นเอนไซม์เอกโซอินูลินสามารถแบ่งได้เป็นสองประเภทคือ กลุ่มที่มีกิจกรรมและไม่มีกิจกรรมต่อเลแวน (Uchiyama, 1993)

เนื่องจากเอนไซม์เอกโซอินูลินเนส (EC 3.2.1.80) และอินเวอร์เทสหรือบีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส (EC 3.2.1.26) จำเพาะต่อโมเลกุลของฟรุกโทสทางด้านปลายนอน-รีดิวซ์ เช่นเดียวกัน จึงมีการสร้างพารามิเตอร์ที่ใช้ในการบ่งลักษณะระหว่างเอนไซม์อินูลินเนสและอินเวอร์เทส คือ อัตราส่วน I/S (กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสต่อกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทส) ค่าอัตราส่วนที่ได้จากเอนไซม์อินูลินเนสจากเชื้อราและยีสต์ ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะต่อสับสเตรต

อินูลินและซูโครสที่แตกต่างกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิด โดยเอนไซม์อินเวอร์เทส (S) มีความจำเพาะต่อซูโครสสูงในขณะที่มีความจำเพาะต่อพอลิเมอร์อินูลินต่ำ (Uchiyama, 1993)

6.1.2 เอนไซม์เอนโคอินูลินเนส

เอนไซม์เอนโคอินูลินเนส (EC 3.2.1.7) มีกิจกรรมในการตัดพันธะบีตา 2, 1 ระหว่างโมเลกุลของฟรุกโทสกับฟรุกโทสภายในโมเลกุลของอินูลิน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมเป็นโอลิโกฟรุกแทนที่มีค่าดีกรีพอลิเมอร์แตกต่างกัน เอนไซม์เอนโคอินูลินเนสจำเพาะต่อโมเลกุลของอินูลินสูงมาก และพบว่าไม่มีกิจกรรมต่อราฟฟิโนส เลแวน และไม่สามารถย่อยสลายซูโครสได้

(Onodera and Shiomi, 1988; Uchiyama, 1993) หรืออาจย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย (Baratti and Ettalibi, 1993)

เนื่องจากเอนไซม์เอนโคอินูลิเนสจำเพาะต่อพันธะปีตา 2, 1 ระหว่างโมเลกุลของฟรุกโทสกับฟรุกโทสภายในโมเลกุลของอินูลินมาก เป็นผลให้ค่าอัตราส่วน I/S ที่ได้จากเอนไซม์เอนโคอินูลิเนสบริสุทธิ์มีค่าสูงมากอีกด้วย

6.1.3 การผลิตและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์อินูลิเนส

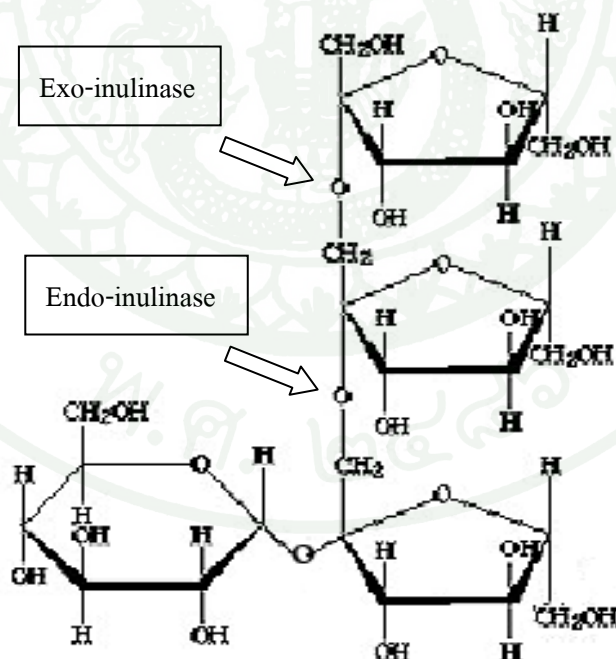
ในปัจจุบันกระบวนการในการผลิตเอนไซม์มักจะใช้จุลินทรีย์ โดยมากจะนิยมใช้เชื้อรา *Aspergillus* และยีสต์กลุ่ม *Kluyveromyces* เพราะเป็นผู้ผลิตที่มีศักยภาพสูง โดยมากมักจะผลิตแบบเบ็ดเสร็จ (batch) แต่ก็พบปัญหา catabolic repression ในยีสต์จึงพัฒนากระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous)

เนื่องจากเอนไซม์อินูลิเนสเป็นเอนไซม์อินดิคซ์ (inducible enzyme) ดังนั้นในการที่จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์ขึ้นมาจึงจำเป็นต้องใช้อินูลินเป็นตัวชักนำ จากรายงานของ Ku and Hang (1993) พบว่าปริมาณอินูลินมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อินูลิเนสของ *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1196 สอดคล้องกันกับ Sirisansaneeyakul *et al.* (2002) ที่พบว่าปริมาณอินูลินมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อินูลิเนสของเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 20611 และจากรายงานของ Sharma *et al.* (2006) ยังเป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่าแหล่งของอินูลินก็ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการนำอินูลินมาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์อินูลิเนสอีกด้วย โดย Sharma ทำการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. โดยใช้แหล่งอินูลินหลากหลายชนิดเพื่อผลิตเอนไซม์อินูลิเนส เพื่อลดต้นทุนการผลิต พบว่ากระเทียมสามารถชักนำให้ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด แต่ยังมีการศึกษาไม่เพียงพอถึงแหล่งอินูลินที่ต่างกันจะมีผลต่อรูปแบบการทำงานของเอนไซม์อินูลิเนสหรือไม่

ปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์อินูลิเนส คือ แหล่งที่ใช้ในการผลิตซึ่งแหล่งผลิตที่ต่างกันก็จะส่งผลถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ต่างกันไปด้วย กระบวนการผลิตความต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ตลอดจนวิตามินและสารเร่งการเติบโตบางชนิด รวมทั้งอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสม

6.1.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์อินูลิเนส

เนื่องจากเอนไซม์อินูลิเนสประกอบด้วย เอนไซม์เอกโซอินูลิเนสซึ่งจำเพาะต่อโมเลกุลของฟรุกโทสทางด้านปลายนอน-รีดิวซ์ มีกิจกรรมในการย่อยสลายฟรุกโทสออกทีละโมเลกุลทางด้านปลายนอน-รีดิวซ์ของโมเลกุลอินูลิน และเอนไซม์เอนโดอินูลิเนสซึ่งมีกิจกรรมในการตัดพันธะปีตา 2, 1 ระหว่างโมเลกุลของฟรุกโทสกับฟรุกโทสภายในโมเลกุลของอินูลิน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมเป็นโอลิโกฟรุกแทนที่มีค่าดีกรีพอลิเมอร์แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่ออาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอกโซและเอนโดอินูลิเนสในการย่อยสลายอินูลิน เอนไซม์เอนโดอินูลิเนสจะทำหน้าที่ตัดพันธะภายในโมเลกุลของอินูลิน ทำให้เกิดปลายนอน-รีดิวซ์มากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มสับสเตรตให้แก่เอนไซม์เอกโซอินูลิเนส จากนั้นเอนไซม์เอกโซอินูลิเนสจะทำหน้าที่ปลดปล่อยฟรุกโทสออกมา ส่วนกลไกในการย่อยสลายอินูลินของเอนไซม์อินเวอร์เทส คือ เอนไซม์อินเวอร์เทสจะทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะปีตา 2, 1 ระหว่างโมเลกุลของกลูโคสและฟรุกโทสของอินูลิน กลไกในการย่อยสลายโมเลกุลของอินูลินด้วยเอนไซม์อินูลิเนสแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การทำงานของเอนไซม์เอนโดและเอกโซอินูลิเนส

6.2 เอนไซม์อินเวอร์เทส

อินเวอร์เทสหรือปีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส (EC 3.2.1.26) หรือเอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานสเฟอร์เรส (EC. 2.4.1.9) ซึ่งสำรวจพบว่ามียูอยู่ในพืชและจุลินทรีย์บางชนิดจำเพาะต่อโมเลกุลของฟรุกโทสทางด้านปลายนอน-รีดิซ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ sucrase แต่ต่างกันตรงที่เอนไซม์ซูเครสจะย่อยจากทางกลูโคส เอนไซม์อินเวอร์เทสจะมีรูปแบบการทำงานอยู่หลายแบบ โดยรายงานของ Yoshikawa *et al.* (2006) พบว่า *Aureobasidium pullulans* DSM 2404 สามารถผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีรูปแบบการทำงานที่แตกต่างกันได้ถึง 5 แบบ แต่โดยปกติทั่วไปสำหรับจุลินทรีย์อื่น ๆ มักจะผลิตแค่เพียง 2 แบบ คือแบบ I และ II มีรายงานอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายซูโครสส่งผลต่อกิจกรรมและรูปแบบการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ผลิตจาก *Aspergillus. niger* โดย Hocine *et al.*, (2000)

6.2.1 อินเวอร์เทส I

เป็นเอนไซม์ที่พบว่ามีกิจกรรมขนย้ายหมู่ฟรุกโทซิลจากโมเลกุลของซูโครสผู้ให้ไปเชื่อมต่อกับฟรุกโทสของโมเลกุลซูโครสผู้รับที่ตำแหน่ง (β 2 $\rightarrow$ 1) ทำให้เอนไซม์อินเวอร์เทส I สามารถที่จะทำกิจกรรมได้ถึง 2 อย่างคือ hydrolase และ transferase จึงสามารถใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส I ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากซูโครส

6.2.2 อินเวอร์เทส II

เป็นเอนไซม์ที่พบว่ามีกิจกรรม hydrolase เพียงอย่างเดียว โดยจำเพาะต่อโมเลกุลของฟรุกโทสทางด้านปลายนอน-รีดิซของฟรุกโทส จะทำการตัดพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง (α 2 $\rightarrow$ 1) ให้น้ำตาลอินเวอร์ส (กลูโคสและฟรุกโทส) เป็นผลิตภัณฑ์ จึงเหมาะแก่การนำไปใช้ผลิตไซรัป

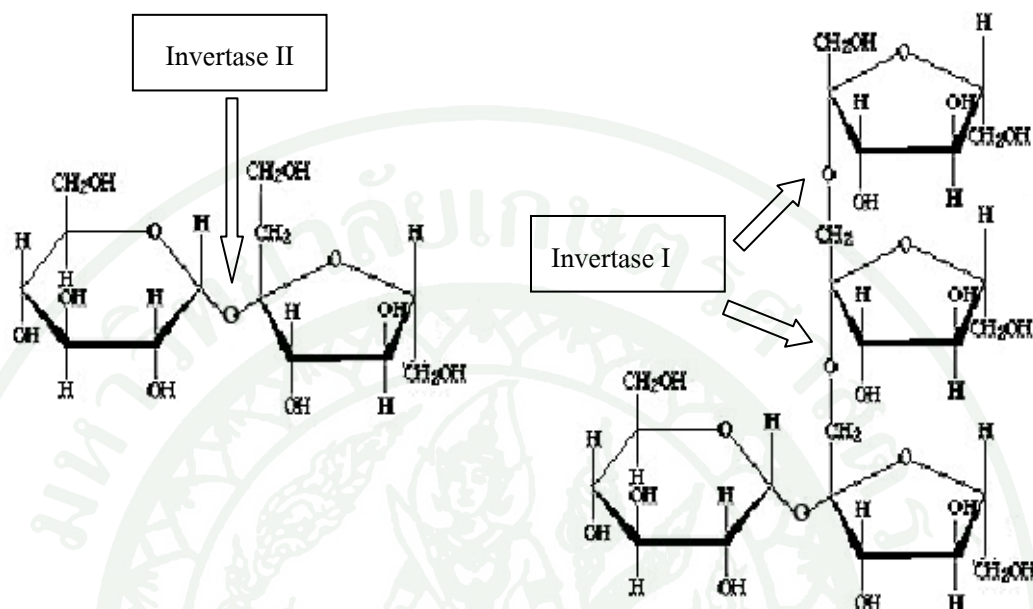
6.2.3 การผลิตและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส

ทำนองเดียวกันกับเอนไซม์อินูลิเนส เอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์อินดิคซ์โดยมากจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อินูลิเนสมักจะผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสด้วย ถ้าต้องการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสเพียงชนิดเดียว โดยทั่วไปจะนิยมผลิตโดยใช้เชื้อยีสต์ เช่น *Saccharomyces* และ

Candida ผลิตจากเชื้อรา เช่น *Aspergillus* และ *Pennisilium* มักทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และใช้สารละลายซูโครส หรือกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (Belcarz *et al.*, 2002) พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (Baig *et al.*, 2003)

6.2.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส

เนื่องจากเอนไซม์อินเวอร์เทสนั้นมีรูปแบบการทำงานที่สำคัญ คือ การตัดพันธะไกลโคซิดิกด้วยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสและการขนย้ายหมู่ฟรุกโทซิด (transfructosyl) จากโมเลกุลซูโครสผู้ให้ไปยังผู้รับ โดยที่เอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อฟรุกโทสทางด้านปลายนอน-รีดิวซ์ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมี 2 ลักษณะ คือ เป็นน้ำเชื่อมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งปัจจัยที่บ่งบอกว่าจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นแบบใดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ จึงจำเป็นต้องเลือกผลิตภัณฑ์เป้าหมายคืออะไร นอกจากนั้นยังมีปัจจัยที่สำคัญ คือ สภาพที่ใช้ในการผลิต คือ ความเข้มข้นของซูโครส มีกรณีศึกษาของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสที่รายงานโดย Kim *et al.* (1998) พบว่าความเข้มข้นของซูโครสส่งผลต่อรูปแบบการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus macerans* EG-6 โดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ 10 100 500 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เอนไซม์อินเวอร์เทสมีกิจกรรม hydrolase สูงกว่าแต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสพบว่ามีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม transferase เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hocine *et al.* (2000) ที่พบว่าความเข้มข้นของสารละลายซูโครสที่ต่ำกว่าร้อยละ 50 เอนไซม์อินเวอร์เทสจาก *A. niger* จะแสดงกิจกรรม hydrolase แต่ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นให้สูงกว่าร้อยละ 50 เอนไซม์จะแสดงกิจกรรมทรานส์เฟอเรสด้วย



ภาพที่ 4 การทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส I และอินเวอร์เทส II

6.3 การผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์

การผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์เริ่มต้นจากการสกัดอินูลินเพื่อใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิต แล้วจึงทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อินูลินสกายได้สภาวะควบคุมที่เหมาะสม จะได้ผลิตภัณฑ์อินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งกระบวนการผลิตที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นกระบวนการผลิตแบบเบ็ดเสร็จซึ่งมีการควบคุมดูแลที่ง่าย แต่มีข้อด้อยคือใช้เวลาในการเตรียมการผลิตที่มากกว่า ทำให้ต้นทุนของกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้น

6.3.1 การสกัดอินูลินจากพืช

พืชชั้นสูงเป็นแหล่งอินูลินที่สำคัญ ได้แก่พืชในตระกูล grasses ซึ่งพบว่ามีสารสะสมอินูลินอยู่มากถึง 1,200 สปีชีส์ พืชตระกูล Liliaceae มีการสะสมอินูลินอยู่มากถึง 3,500 สปีชีส์ พืชตระกูล Compositae มีการสะสมอินูลินอยู่มากถึง 25,000 สปีชีส์ ซึ่งเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค (*Helianthus tuberosus*) เป็นสายพันธุ์ของพืชตระกูล Compositae นี้ เยรูซาเล็มอาร์ทิโชคมีความน่าสนใจมากในแง่แหล่งเก็บสะสมอินูลิน เพราะนอกจากสะสมอินูลินแล้วเยรูซาเล็มอาร์ทิโชคยัง

สะสมอินโดไลโกแซ็กคาไรด์ไว้อีกด้วย แต่พบปัญหาของการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในระดับอุตสาหกรรมคือลักษณะของหัวใต้ดินของเยรูซาเล็มอาร์ทิโช๊คมีลักษณะคล้ายขิงหรือข่า ก็จะมีแฉะ มีปมเยอะจึงจำเป็นต้องพัฒนาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของเยรูซาเล็มอาร์ทิโช๊ค (ต่อ 100 กรัมหัวสด)

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละขององค์ประกอบ
น้ำ	80
คาร์โบไฮเดรต	16
น้ำตาลทั้งหมด	1-2
อินูลิน	6-7
อินโดไลโกแซ็กคาไรด์	6-7
อื่น ๆ	1-2
โปรตีนทั้งหมด	1-2
ไขมันทั้งหมด	น้อยกว่า 1
อื่น ๆ	1-2

ที่มา: Kays and Nottingham (2008)

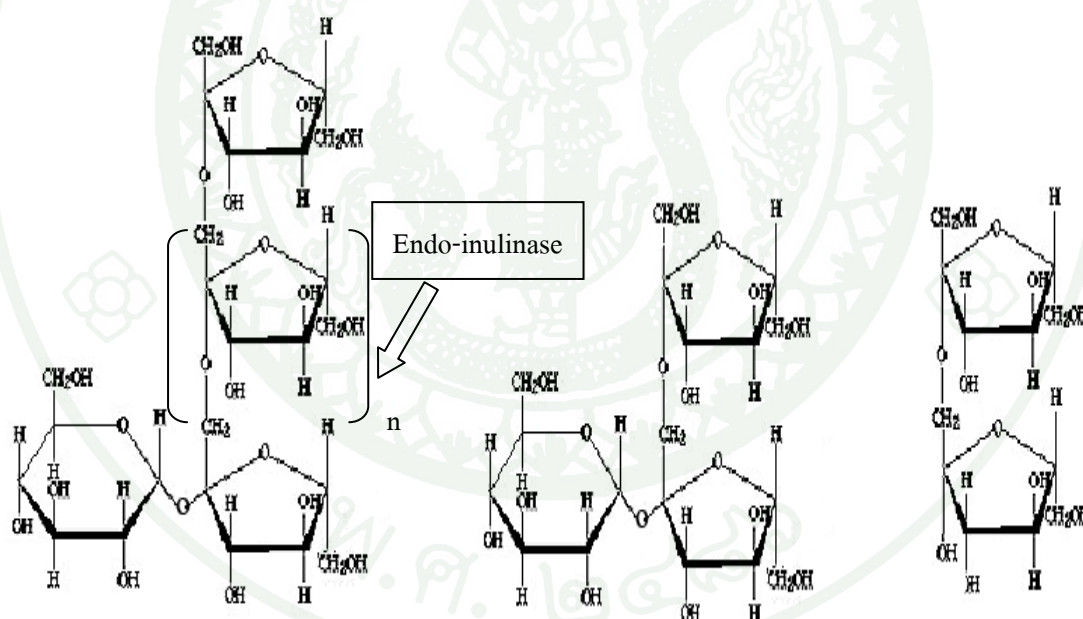
จากองค์ประกอบทางเคมีของเยรูซาเล็มอาร์ทิโช๊คจะเห็นว่า เกือบร้อยละ 80 ของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในหัวเยรูซาเล็มอาร์ทิโช๊ค จะเป็นอินูลินและอินโดไลโกแซ็กคาไรด์ แต่เนื่องจากหากต้องการผลิตเป็นสารพรีไบโอติกส์ที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรไบโอติกส์ในระบบทางเดินอาหารแล้ว จำเป็นที่จะต้องเพิ่มอัตราส่วนของอินโดไลโกแซ็กคาไรด์

ในการสกัดเอาอินูลินและอินโดไลโกแซ็กคาไรด์จากเยรูซาเล็มอาร์ทิโช๊คทำได้หลายวิธี เช่น สกัดด้วยน้ำร้อนแล้วระเหยแห้ง (Bacon and Edelman, 1950) สกัดด้วยน้ำร้อนแล้วตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (Sangthongpinit and Sajjaanantakul, 2005) สกัดด้วยน้ำแล้วใช้กลิ่นไมโครเวฟ (Wei *et al.*, 2002) ปัจจัยสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการสกัดอินูลินจากเยรูซาเล็มอาร์ทิโช๊คคือ พีเอช เวลา อุณหภูมิ และอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ต่อปริมาณของแข็ง (Lingyun *et al.*, 2007)

6.3.2 การผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์

อินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผลิตได้จากการย่อยพันธะระหว่างโมเลกุลของ ฟรุคโทสกับฟรุคโทสภายในโมเลกุลของอินูลิน (inulin) ให้มีขนาดสั้นลงด้วยเอนไซม์เอนโดอินูลิเนส แสดงกลไกของเอนไซม์เอนโดอินูลิเนสในการผลิตอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์ดังภาพที่ 5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายอินูลินมีสองชนิด คือ GF_n และ F_n โดยที่ n มีค่าตั้งแต่ 1-6 และมีปริมาณของกลูโคส ฟรุคโทส และซูโครสในปริมาณน้อย (Vogel, 1993)

อินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์จัดเป็นฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ประเภทหนึ่ง เนื่องจากมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเหมือนกัน ต่างกันตรงสับสเทรตและกลไกของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต ดังนั้นอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์จึงมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์



ภาพที่ 5_ การทำงานของเอนไซม์เอนโดอินูลิเนสในการผลิตอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์

ระบบการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์มักแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่นในกรณีของ *Aspergillus niger* TISTR 3570 และ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้งอินูลิเนสและอินเวอร์เทส การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายสูง อาจจะไม่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ ทางเลือกของการพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมจึงควรเลือกเอนไซม์ที่มีรูปแบบการทำงานที่เหมาะสม การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือการใช้

เอนไซม์ผสมในการผลิตเพื่อลดปัญหาจากการทำงานของเอนไซม์เอกโซอินูลิเนสและเอนไซม์อินเวอร์เทส II

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ คือ คุณสมบัติของเอนไซม์และการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต ได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรต ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง อัตราการกวนหรือการเขย่าที่ใช้ในการผลิต สารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เพื่อให้ได้ผลได้ผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุด

7 การแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่าอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์

ผลิตภัณฑ์วัตถุดิบอาหารที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมักนิยมผลิตออกมาในลักษณะผงแห้ง หรือของเหลวที่มีความเข้มข้นสูง แล้วแต่ความเหมาะสมในการเก็บรักษาและความสะดวกในการนำไปใช้ที่แตกต่างกัน โดยวิธีการทำเป็นผงแห้งทำได้หลายวิธี เช่น โดยการอบแห้งแล้วบดให้เป็นผง การทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย การตกผลึกแล้วอบแห้ง เป็นต้น ส่วนการทำให้เป็นของเหลว ความเข้มข้นสูงส่วนมากจะใช้การระเหย การแปรรูปอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์นอกจากจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม ทำให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานมากขึ้น และยังช่วยเพิ่มการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค ที่จะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย

7.1 การแปรรูปเป็นผงแห้ง

ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงนั้นจะเหมาะแก่การนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย เก็บรักษาได้นาน เพราะมักจะมีกลิ่นที่ต่ำ แต่มีข้อเสียตรงที่มักจะใช้ความร้อนที่สูง (การอบแห้ง การทำแห้งแบบพ่นฝอย) หรือใช้เวลานาน (การตกผลึก) หรือทำได้ในปริมาณน้อย (การทำแห้งแบบเยือกแข็ง) ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสียคุณภาพได้ สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้การทำแห้งแบบพ่นฝอยในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เป็นผงแห้ง

การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) ใช้หลักการของการระเหยน้ำหรือของเหลวที่เป็นส่วนประกอบในของเหลวหรือ slurry ที่ต้องการทำแห้งให้กลายเป็นไอโดยจับพ่น ซึ่งเหมาะกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่เสถียรเมื่อสัมผัสความร้อนสูง เช่น อาหาร ยา เม็ดสี (Anonymous 3, 2009) โดย

ต้องฉีดของเหลวที่ต้องการทำให้แห้งพ่นเป็นละอองฝอยละเอียดเข้าไปในตู้ที่มีลมร้อนสูงผ่านเข้ามา น้ำหรือของเหลวจะระเหยโดยฉับพลันทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงละเอียดที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เช่น กาแฟผงสำเร็จรูป ไข่ผง น้ำผลไม้ผง และซุบผง เป็นต้น หัวฉีดสำหรับพ่นละอองมีอยู่ 3 ประเภท คือ

7.1.1 Single fluid nozzle or Pressure Nozzle

วิธีนี้ของเหลวจะไหลผ่าน orifice ภายใต้ความดันสูง ทำให้ของเหลวที่ออกมาจากหัวฉีดเป็นฝอยโดยไม่ใช้อากาศ อนุภาคที่ได้จะมีขนาดเฉลี่ย 120-250 ไมโครเมตร โดยขนาดอนุภาคจะแปรผันโดยตรงกับอัตราการไหลของของเหลว ความหนืด และแปรผกผันกับความดัน

7.1.2 Twos fluid nozzle

อุปกรณ์ชนิดนี้ของเหลวและอากาศจะไหลผ่านหัวของ nozzle ซึ่งจะทำให้ feed แยกเป็นละอองฝอยเนื่องจากการไหลผ่านของอากาศด้วยความเร็วสูงภายใน nozzle การปรับอัตราการไหลของอากาศ จะช่วยในการกระจายเป็นละอองของ feed วิธีนี้นิยมใช้กับ feed ที่มีความหนืดสูง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ มีค่าดำเนินการที่สูงและให้ผลผลิตที่ต่ำ สำหรับในกรณีการทำแห้งแบบพ่นฝอยของน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ในงานวิจัยนี้จะใช้หัวฉีดแบบนี้

7.1.3 Centrifugal disk atomizer

ใช้จานหมุนเหวี่ยงสารละลายให้กระจายออกไปเป็นฝอย วิธีนี้ไม่ต้องใช้ความดันสูงและไม่มีปัญหาเรื่องการสึกหรอหรืออุดตันของหัวฉีด สารละลายจะถูกปล่อยให้หยดลงไปที่บริเวณใกล้ ๆ ศูนย์กลางของจานที่หมุนด้วยความเร็วประมาณ 5,000-10,000 รอบต่อวินาที แรงหนีศูนย์กลางจะทำให้สารละลายไหลออกไปที่ขอบจานและถูกเหวี่ยงออกไปเป็นฟิล์มและแตกกระจายเป็นละอองต่อไป ละอองจะมีขนาดประมาณ 30-120 ไมโครเมตร

ละอองที่พ่นออกมาจะถูกทำให้แห้งโดยลมร้อน ซึ่งอาจจะเป่าสวนทางหรือไปทางเดียวกับละอองหรือไหลแบบผสมผสานก็ได้ช่วงเวลาที่ละอองมีอุณหภูมิสูงจะสั้นมาก เพราะเมื่อกระทบกับอากาศร้อนแล้วการระเหยของน้ำเกิดขึ้น ทำให้ละอองเย็นลงโดยเร็ว พงแห้งที่ตกลง

มาถึงกันภาชนะจะถูกดูดไปยัง cyclone เพื่อแยกออกจากลมแล้วจึงนำไปเข้าถังเก็บต่อไป (สุเมธ, 2009; มณฑล, 2010)

7.2 การแปรรูปเป็นของเหลวความเข้มข้นสูง

ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวความเข้มข้นสูงเหมาะกับการนำไปผสมอาหารขณะอยู่ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เหมาะกับผลิตภัณฑ์บางประเภทเท่านั้น มีข้อเสียตรงที่การเก็บรักษาได้ในระยะเวลาสั้นกว่าผงแห้ง มีปัญหาด้านการขนส่ง ใช้ความร้อนและพลังงานในการผลิตที่ต่ำกว่า ซึ่งจะส่งผลต่อการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้อยกว่า การผลิตในรูปของเหลวความเข้มข้นสูงทำได้โดย การระเหย และการกลั่น เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้การระเหยภายใต้สุญญากาศ

การระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator or rotavap) เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีเพื่อใช้สกัดและนำเอาสารตัวทำละลายออกจากสารละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความนุ่มนวล ส่วนประกอบสำคัญของ rotavap มี 3 ส่วนคือ อ่างน้ำร้อน เครื่อง rotavap และปั๊มเพื่อใช้สำหรับลดความดันภายในเครื่อง ในการทำงานของ rotavap จะใช้สภาพสุญญากาศในการลดจุดเดือดของสารละลาย เมื่อถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมสารตัวทำละลายจะระเหยและควบแน่นแยกออกมาสู่ขวดเก็บ เช่นเดียวกับการกลั่น โดยมากจึงมักใช้กับสารตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เฮกเซน เอทิลเอซิเตต ซึ่งด้วยกระบวนการแปรรูปที่ได้กล่าวข้างต้นจะมีความนุ่มนวลเพื่อถนอมรักษาผลิตภัณฑ์ได้เป็นอย่างดี และสามารถเป็นต้นแบบในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Anonymous 4, 2009)

8. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอินูลินและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์

สารจำพวกฟรุคแทนส่วนใหญ่แยกได้โดยการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ แต่โอลิโกจะต้องใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีหลักการพื้นฐาน คือ อาศัยการเคลื่อนที่ของสารหรือตามความสามารถในการกระจายของสารระหว่างสองวัฏภาค โดยจะมีวัฏภาคคงที่ (stationary phase) เป็นตัวดูดซับกับอีกวัฏภาคหนึ่งที่จะเป็นตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ (mobile phase) ผ่านไปบนวัฏภาคคงที่ ซึ่งสารที่ต้องการจะแยกจะต้องละลายได้ในตัวทำละลาย และมีความสามารถในการดูดซับบนตัวดูดซับต่าง ๆ สารใดละลายได้ดี และถูกดูดซับได้น้อยสารนั้นจะ

เคลื่อนที่ได้เร็ว และจะแยกออกมาจากคอลัมน์ได้ก่อน ในทางกลับกันหากสารใดละลายได้น้อย และถูกดูดซับได้ดีสารนั้นจะเคลื่อนที่ได้ช้า ซึ่งจะแยกออกมาจากคอลัมน์ทีหลัง สัดส่วน (fraction) ของสารแต่ละชนิดที่ถูกรวบรวมไว้เมื่อออกจากคอลัมน์เมื่อนำความเข้มข้นของสารที่ได้แต่ละชนิดที่ได้มาเขียนเป็นกราฟเทียบกับเวลาจะได้กราฟที่เรียกว่า “โครมาโทแกรม” จากโครมาโทแกรมจะทำให้ทราบถึงระยะเวลาที่ใช้ในการชะสารนั้นออกจากคอลัมน์ที่เรียกว่า “รีเทนชันไทม์” หรือเวลาการคงไว้ ซึ่งจะใช้ในการระบุชนิดของสารได้จากการเทียบรีเทนชันไทม์กับของสารละลายมาตรฐาน

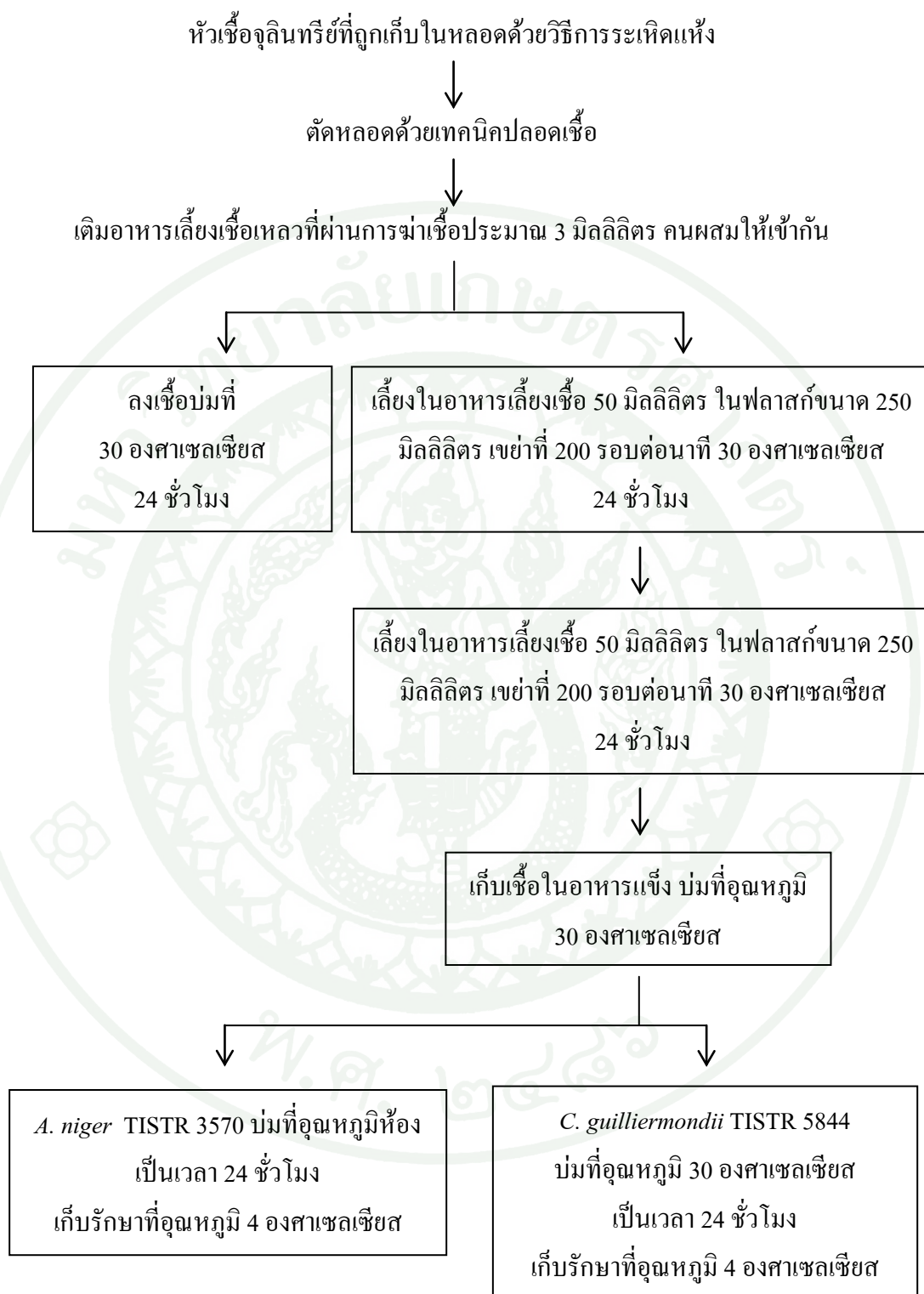
เทคนิคโครมาโทกราฟีมีหลากหลายวิธี หลากหลายเทคนิคซึ่งจะแบ่งประเภทได้หลายวิธี แต่ในที่นี้จะแบ่งเป็นสองวิธีคือ แบ่งตามลักษณะของวัฏภาค คือ โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-ของเหลว (GLC: gas-liquid chromatography) โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-ของแข็ง (GSC: gas-solid chromatography) โครมาโทกราฟีแบบของเหลว-ของเหลว (LLC: liquid-liquid chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบของเหลว-ของแข็ง (LSC: liquid-solid chromatography) อีกวิธีคือการแบ่งตามลักษณะของการแยก ซึ่งอาศัยแรงกระทำระหว่างสารที่ต้องการแยก คือ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange chromatography) ขึ้นกับสัมพรรคภาพของไอออนระหว่างเฟส ได้แก่ เจลโครมาโทกราฟี (gel chromatography) ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก และโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จะใช้แรงดันสูงช่วยในการแยก

สำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์ฟรุกแทนคือ แบบแผ่นบาง (TLC), ของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ทั้งแบบ normal phase และแบบ reverse phase, HPAEC (Suzuki และ Chatterton, 1993)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker, Model G25, New Brunswick, USA)
2. ถังหมัก (EYELA Mini Jar Fermenter Model M-100, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)
ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวนการให้อากาศและอุณหภูมิ
3. เครื่องควบคุมพีเอช (EYELA pH controller, Model FC-10, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)
4. เครื่องสูบบแบบ Peristaltic pump (EYELA Microtube pump, Model MP-3, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)
5. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Model I.1.5, memmert, Germany)
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Model 280 series, Pricision, USA)
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (PHOTOMECH, Model 301-D, OPTIMA. Germany)
8. เครื่องวัดค่าพีเอช (Model M-11, HORIBA, Japan)
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด (Model ED2248, Sartorius, Germany)
10. เครื่องกรองน้ำ Ultrapure (Direct - QTmTap - Feed System, Millipore, USA)
11. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (Model EM-11, Sharp, Japan)
12. เครื่องผสม (Vortex Genie 2, Model G560, Scientific industries, Inc., USA)
13. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (Shimadsu, Model LC 20, Kyoto, Japan) ที่ใช้ดีเทกเตอร์ชนิด refractive index (Shimadsu, Model RID 20, Kyoto, Japan)
14. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Eyela rotary evaporator, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.,Japan)
15. เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Niro atomizer, serial No. 1788, Copenhagen, Denmark)
16. เครื่องแก้ว อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองและวิเคราะห์



ภาพที่ 6 กระบวนการจัดการเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus niger* TISTR 3570 และ *Candida guilliermondii* TISTR 5844

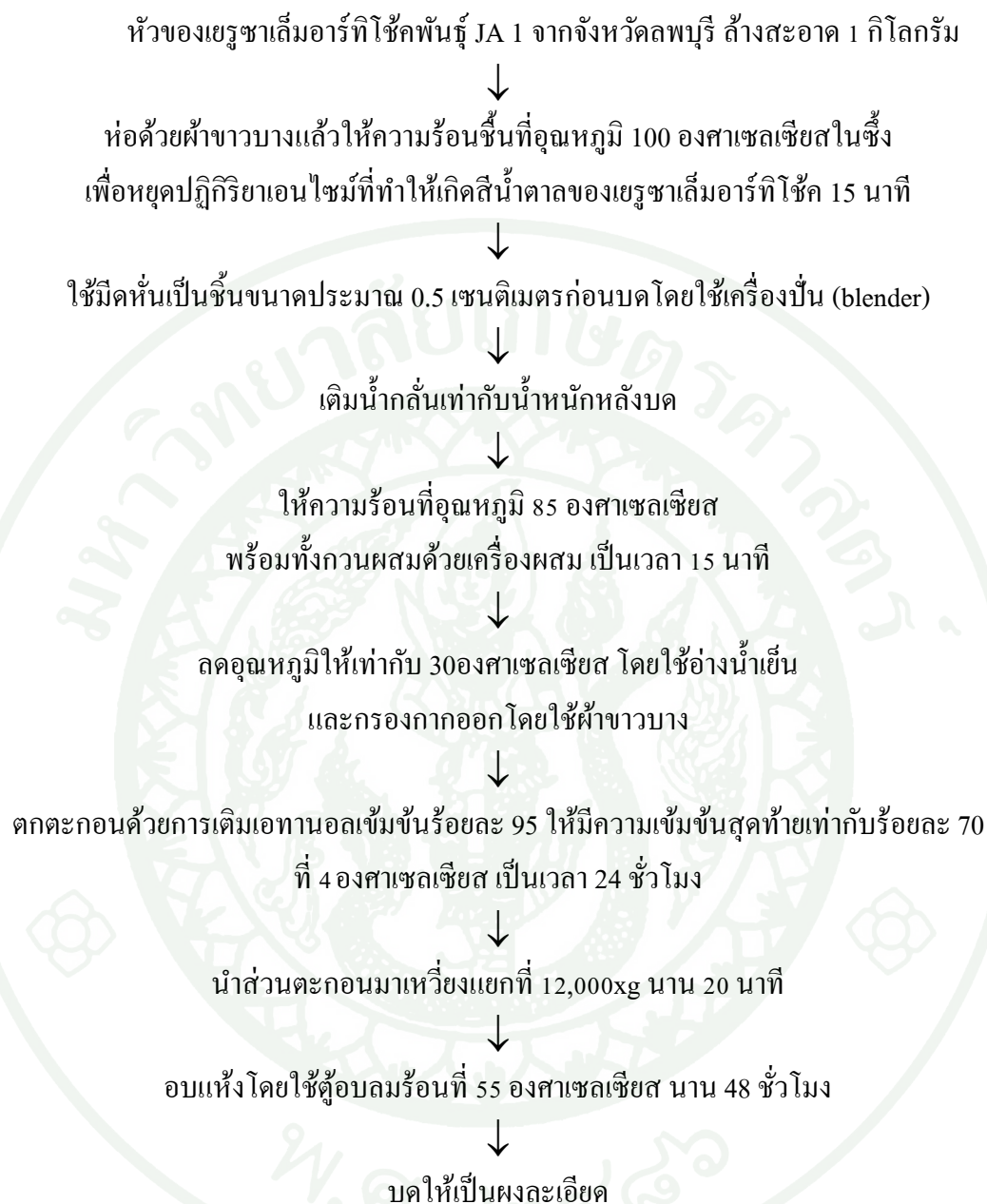
3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ สำหรับกล้าเชื้อและใช้ผลิตเอนไซม์ (ดัดแปลงจากทิฆัมพร, 2546) ประกอบด้วย น้ำสกัดจากเหูชาเต็มอาร์ทีไซค์ 500 มิลลิลิตร (หัวเหูชาเต็มอาร์ทีไซค์ล้างสะอาด ปอกเปลือก หั่นเป็นลูกเต๋ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร 100 กรัม เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาเฉพาะน้ำ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร) ยีสต์สกัด (Yeast extract) 12 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$) 2 กรัมต่อลิตร และวุ้น (agar, สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง) 15 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย McIlvain buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0

วิธีการ

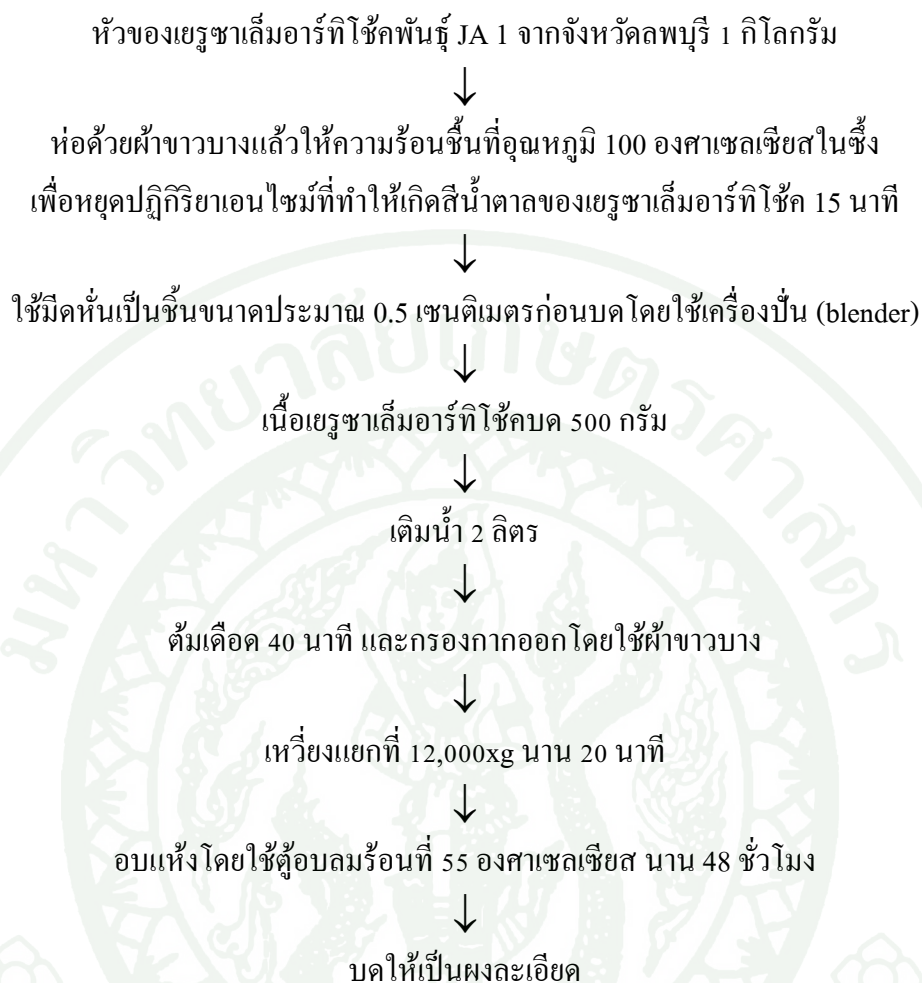
1. การศึกษาวิธีการสกัดและการทำแห้งแป้งอินูลินจากเหูชาเต็มอาร์ทีไซค์

เนื่องจากหัวของเหูชาเต็มอาร์ทีไซค์มีองค์ประกอบเป็นน้ำประมาณร้อยละ 80 คาร์โบไฮเดรตที่เป็นอินูลินและอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ประมาณร้อยละ 16 และมีสิ่งเจือปนอยู่น้อยเพียงแค่ร้อยละ 4 (Kays and Nottingham, 2008) ดังนั้นการสกัดแป้งอินูลินที่อยู่ในหัวเหูชาเต็มอาร์ทีไซค์จึงมีความเป็นไปได้ที่จะได้แป้งอินูลินที่มีความบริสุทธิ์สูงโดยไม่ต้องการขั้นตอนและเทคโนโลยีที่มีความซับซ้อนเพื่อแปรรูปแป้งอินูลินอีก จึงทำการเปรียบเทียบกรรมวิธีการสกัดอินูลินด้วยน้ำร้อน (Bacon and Edelman, 1950) กับกรรมวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนร่วมกับการใช้แอลกอฮอล์ในการตกตะกอน(วันเพ็ญ, 2548) โดยมีขั้นตอนแสดงดังแผนภาพที่ 7 และ 8 โดยเปรียบเทียบผลได้แป้งอินูลิน และลักษณะปรากฏของแป้งอินูลินที่ได้จากการสกัด



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการสกัดแป้งอินูลินโดยใช้น้ำร้อนร่วมกับแอลกอฮอล์

ที่มา: ดัดแปลงจากวันเพ็ญ (2548)



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการสกัดแป้งอินูลินโดยใช้น้ำร้อน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bacon and Edelman (1950)

2 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์

2.1 การเตรียมน้ำสกัดเอนไซม์จากเชื้อรา

การเตรียมน้ำสกัดเอนไซม์จากเชื้อราสำหรับใช้ในการผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ จะมีกระบวนการที่แตกต่างจากในการผลิตแป้งอินูลินเนื่องจากต้องการที่จะลดขั้นตอนของการผลิต และเพื่อให้การสกัดได้ปริมาณอินูลินมากขึ้น เพราะในระดับอุตสาหกรรมควรมีแค่ขั้นตอนที่จำเป็นที่สุดเท่านั้น เพราะแต่ละขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นนั้นหมายถึงระยะเวลาและเม็ดเงินที่ต้องสูญเสีย จึงใช้กระบวนการนี้สำหรับการเตรียมน้ำสกัดเอนไซม์จากเชื้อราเพื่อใช้เป็นขั้นตอนในการผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์ ซึ่งมีวิธีการสกัดดังแผนภาพที่ 9

หัวของเชื้อราเส้นใยพันธุ์ JA 1 จากจังหวัดลพบุรี ล้างสะอาด ปอกเปลือก

หั่นเป็นลูกเต๋าด้าน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร หนัก 600 กรัม



เติมสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.2 M พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 ลิตร



ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส

ทำการคน เป็นเวลา 40 นาที



ลดอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิห้องโดยใช้อ่างน้ำเย็น และแยกกากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง



ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร



นำไปวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

ภาพที่ 9 ขั้นตอนการเตรียมน้ำสกัดเอนไซม์จากเชื้อรา

ที่มา: ดัดแปลงจากวันเพ็ญ (2548)

2.2 การผลิตเอนไซม์อินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR 3570 และ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 ในถังหมัก

การผลิตเอนไซม์อินูลิเนสของ *A. niger* TISTR 3570 และ *C. guilliermondii* TISTR 5844 โดยใช้อาหาร 1 ลิตรที่ประกอบด้วย สารสกัดหัวเชื้อราเต็มอาร์ทิโชค (หัวเชื้อราเต็มอาร์ทิโชคล้างสะอาดปอกเปลือก หั่นเป็นลูกเต๋านาขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร 100 กรัม เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร ต้ม 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาเฉพาะน้ำ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร) 500 มิลลิลิตร ยีสต์สกัด 12 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$) 2 กรัม ปรับปริมาตรโดยใช้สารละลาย McIlvaine buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร จำนวน 2 ถัง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำไปวิเคราะห์ น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณอินูลิน กิจกรรมเอนไซม์อินูลิเนสและอินเวอร์เทส

เนื่องจากผลการเตรียมน้ำสกัดเชื้อราเต็มอาร์ทิโชคได้ความเข้มข้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดสูงกว่าความต้องการในสูตรอาหารที่ดัดแปลงจากทิมมพร(2546) ซึ่งต้องการเพียง 10 กรัมต่อลิตร จึงได้ปรับลดอัตราส่วนระหว่างเนื้อเชื้อราเต็มอาร์ทิโชคและน้ำลงดังสูตรการเตรียมข้างต้น

2.3 การศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์อินูลิเนสต่อการผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์จากเชื้อราเต็มอาร์ทิโชค

2.3.1 ทำการศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์อินูลิเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 ต่อการผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์

ผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำสกัดเชื้อราเต็มอาร์ทิโชค ใช้เอนไซม์อินูลิเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 เพียงชนิดเดียว ทำการแปรผันความเข้มข้นเป็น 0.2, 1.0, 2.0 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเชื้อราเต็มอาร์ทิโชคที่เวลาต่าง ๆ ซึ่งมีกระบวนการทำการทดลองดังแผนภาพที่ 10

เตรียมน้ำสกัดอินูลิน 70 มิลลิลิตร ที่ทราบความเข้มข้นของอินูลิน ใส่ฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร
 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



เติมเอนไซม์อินูลิเนสที่มีความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด
 ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



บ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ
 โดยตั้งความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



เก็บตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 และ 25 ชั่วโมง
 นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วแช่น้ำเย็นจัด 10 นาที



วิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ภาพที่ 10 ขั้นตอนการทดลองการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จากเชื้อราเส้นอาร์ทีโซค

2.3.2 ทำการศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์อินูลิเนสผสมจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 และเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 ต่อการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์

จากผลการศึกษาของนิศากรและคณะ (2548) ในการใช้เอนไซม์อินูลิเนสจากจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ และใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลิตน้ำเชื่อมฟรุทโทส โดยใช้เวลาในการผลิตนาน 25 ชั่วโมง ผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ และจากผลการทดลองผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อรา *Candida guilliermondii* TISTR 5844 พบว่าได้ผลผลิตที่มีคุณภาพไม่เหมาะสม จึงควรใช้เอนไซม์ที่ผสมกันในอัตราส่วน 10:1 (เชื้อรา:เชื้อยีสต์) ใช้ความเข้มข้นเป็น 0.2 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ซึ่งเป็นสภาวะที่อ้างอิงจากผลงานวิจัยของนิศากรและคณะ (2548) โดยมีวิธีการทดลองดังแสดงในภาพที่ 10 ข้างต้น

3. การแปรรูปอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์

3.1 การผลิตน้ำเชื่อมอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์

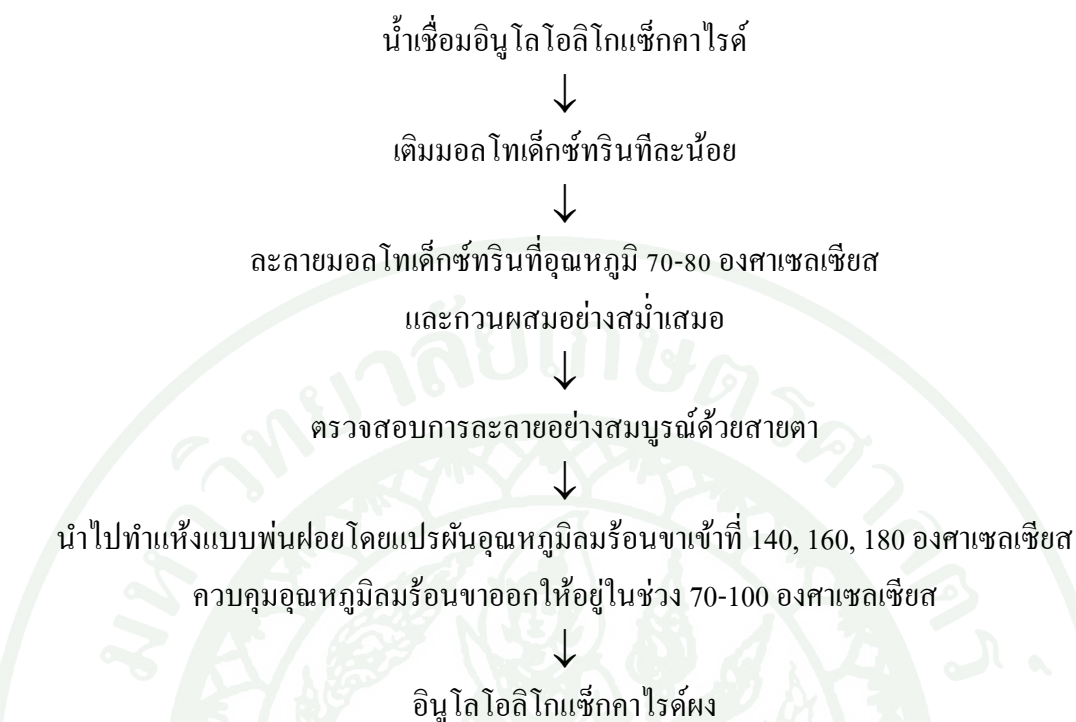
การผลิตน้ำเชื่อมอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์ใช้สภาวะที่ให้ผลได้อินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแปรรูปอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงและน้ำเชื่อมอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้น

3.2 การแปรรูปน้ำเชื่อมอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้น

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแปรรูปน้ำเชื่อมอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้นด้วยการระเหยภายใต้สุญญากาศ โดยแปรผันอุณหภูมิของอ่างน้ำร้อนตั้งแต่ 30-50 องศาเซลเซียส ควบคุมความดันสุญญากาศที่ใช้ให้อยู่ในช่วง (-25)-(-27) มิลลิเมตรปรอท และระเหยน้ำออกร้อยละ 60 เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีและใช้เวลาสั้นที่สุดในการระเหย

3.3. การแปรรูปอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผง

จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าการแปรรูปเป็นน้ำเชื่อมอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ส่งผลให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแปรรูปอินูลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผง โดยการทำแห้งแบบพ่นฝอยซึ่งใช้สารตัวพา (มอลโทเดกซ์ทริน) 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการแปรผันอุณหภูมิของลมร้อนขาเข้าและควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาออกให้อยู่ในช่วง 70-100 องศาเซลเซียส ซึ่งมีวิธีการทดลองดังแผนภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงขั้นตอนในการผลิตโพลีโพรพิลีน

4. วิธีการวิเคราะห์

4.1 น้ำหนักแห้งเซลล์

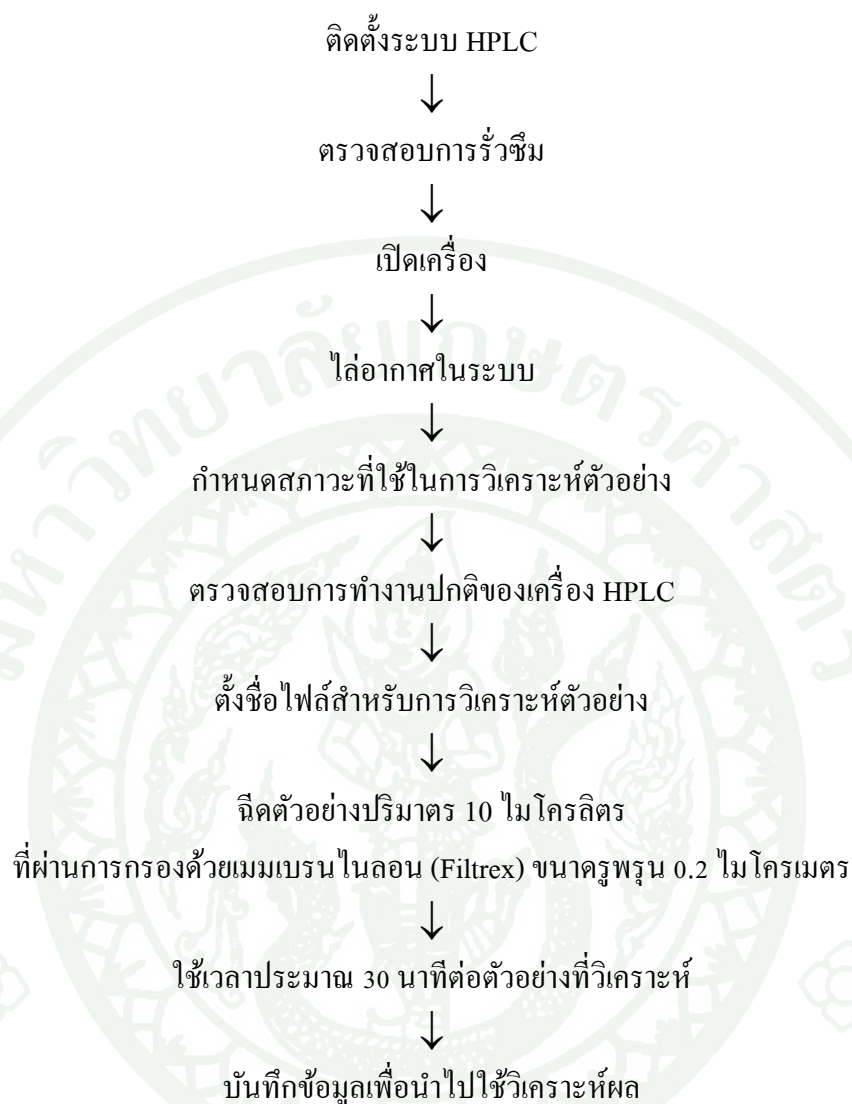
หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยการเหวี่ยงแยกน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแอปเพนดอร์ฟที่รู้น้ำหนักแห้งที่แน่นอน ที่ความเร็วรอบ 12000 xg นาน 15 นาที ดูเอาส่วนใสออกไปใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป นำแอปเพนดอร์ฟไปอบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

4.2 ปริมาณอินูลิน

หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dobois *et al.*, 1956) โดยใช้อินูลินเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ได้และปริมาณน้ำตาลที่วัดได้เพื่อใช้จำแนกและระบุองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์

4.3 การวิเคราะห์น้ำตาล

วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล ได้แก่ ฟรุคโทส (F), กลูโคส (G), ซูโครส (GF), 1-kestose (GF₂), นีสโทส (GF₃) และ 1^F-ฟรุคโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF₄) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (Shimadzu, LC 20) ที่ใช้ดีเทกเตอร์ชนิด refractive index (Shimadzu, RID 20) ใช้คอลัมน์ Inertsil NH₂ 5 ไมโครเมตร 4.6×150 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือ สารละลายอะซิโตนไตรล เข้มข้นร้อยละ 75 (CH₃CN, HPLC grade; Labscan) ความเข้มข้นการไหลที่ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที ความดันของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยมีขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ขั้นตอนในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC

หมายเหตุ คอลัมน์ที่ใช้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณอินูลิน

4.4 เอนไซม์อินูลิเนส

กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์อินูลิเนส คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา เอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด คือ สารผสม ปฏิกิริยาประกอบด้วยอินูลิน (Sigma, St. Louis) ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (ใช้สารละลาย McIlvain buffer ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ในการละลายอินูลินและเจือจางเอนไซม์) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) โดยใช้ฟรุคโทสเป็นสารมาตรฐาน (นิตากร, 2548)

4.5 เอนไซม์อินเวอร์เทส

กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์อินเวอร์เทส คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการ ไฮโดรไลซ์ซูโครสทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนดดังนี้ คือ สารผสมปฏิกิริยาประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (ใช้สารละลาย McIlvain buffer ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ในการ ละลายอินูลินและเจือจางเอนไซม์) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที วัดปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959) โดยใช้ฟรุคโทสและกลูโคสในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก เป็นสารมาตรฐาน (นิตากร, 2548)

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาวิธีการสกัดและการทำแห้งแป้งอินูลินจากเหูชาเล็มอาร์ทิโชค

ผลการสกัดอินูลินจากเหูชาเล็มอาร์ทิโชค โดยใช้วิธีสกัดด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ เปรียบเทียบกับวิธีสกัดด้วยน้ำร้อน แสดงดังตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 น้ำหนักในแต่ละขั้นตอนการเตรียมน้ำสกัดเหูชาเล็มอาร์ทิโชคโดยวิธีต่าง ๆ

ขั้นตอน	ผลลัพธ์ที่ได้	
	วิธีของวันเพ็ญ 2548	วิธีของ Bacon and Edelman 1950
น้ำหนักเริ่มต้น	1,000 กรัม	1,000 กรัม
ปอกเปลือก	984.25 กรัม	985.14 กรัม
น้ำหนักแป้งก่อนอบ	165.77 กรัม	9.17 กรัม
น้ำหนักแป้งหลังอบ	89.49 กรัม	4.88 กรัม
ความชื้นแป้งหลังอบ	1.69 เปอร์เซ็นต์	9.52 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 ผลเปรียบเทียบการสกัดแป้งอินูลินจากหัวเหูชาเล็มอาร์ทิโชคสด 1 กิโลกรัม

วิธีการสกัด	น้ำหนักแป้งอินูลิน (กรัม)	ปริมาณผลได้ (เปอร์เซ็นต์)	อ้างอิง
น้ำร้อนและแอลกอฮอล์	89.49	8.949	(วันเพ็ญ, 2548)
น้ำร้อน	4.88	0.488	(Bacon and Edelman, 1950)

หมายเหตุ แป้งอินูลินที่สกัดได้มีความชื้นเท่ากับร้อยละ 1.69 และ 9.52 ตามลำดับ ภายหลังจากอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

จากการเปรียบเทียบผลการสกัดแป้งอินูลินด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์กับการสกัดด้วยน้ำร้อน จากตารางที่ 3 จะพบว่าแป้งอินูลินที่ได้จากการสกัดโดยใช้น้ำร้อนและตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์จะให้น้ำหนักแป้งก่อนอบมากกว่า มีผลได้เท่ากับร้อยละ 8.95 ดังตารางที่ 4 เมื่อคำนวณจากปริมาณอินูลินในหัวเชื้อชาเต็มอาร์ทิไซค์ร้อยละ 14-19 ของน้ำหนักหัวสด (Franck and Leenheer, 2002) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 54.24 ของปริมาณแป้งอินูลินทั้งหมด ซึ่งมากกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนแต่เพียงอย่างเดียว เป็นผลมาจากการใช้แอลกอฮอล์ช่วยในการตกตะกอนทำให้ได้แป้งอินูลินที่มากกว่า เมื่อทำการเหวี่ยงแยกจึงได้ตะกอนอินูลิน แต่เมื่อเปรียบเทียบผลกับงานวิจัยอื่น ๆ พบว่า ในงานวิจัยต่าง ๆ เช่น Feng and Yi (2009); Yi et al. (2010) ได้ผลได้ที่สูง พบสิ่งที่เหมือนกันของทั้งสองงานวิจัย คือ การใช้อัตราส่วนเนื้อเชื้อชาเต็มอาร์ทิไซค์ต่อน้ำร้อนที่ใช้จะใช้น้ำร้อนมากกว่าเนื้อ โดยในงานวิจัยของ Feng and Yi (2009) ใช้อัตราส่วนเนื้อเชื้อชาเต็มอาร์ทิไซค์ต่อน้ำร้อนมากถึง 1:30 และใช้เวลานานกว่าในการสกัด (60 นาที) จึงเป็นสาเหตุหลักในการทำให้ได้ผลได้แป้งอินูลินที่ต่ำ จึงควรเพิ่มปริมาณน้ำร้อนที่ใช้ในการสกัด เพิ่มเวลาในการสกัดและทำการสกัดซ้ำ ตกตะกอนซ้ำเพื่อให้ได้ปริมาณผลได้แป้งอินูลินที่สูงขึ้น

แป้งอินูลินที่ได้ภายหลังการอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีสีน้ำตาล เมื่ออบได้ผงแป้งสีขาวอมเหลืองนวล ซึ่งมีสีที่ขาวกว่าแป้งอินูลินที่สกัดด้วยน้ำ อาจเป็นเพราะแอลกอฮอล์ระเหยได้ง่ายกว่าน้ำจึงทำให้การระเหยใช้เวลาน้อยกว่าซึ่งส่งผลต่อสีของแป้งอินูลินที่มีสีอ่อนกว่าด้วย สีที่เกิดขึ้นส่วนหนึ่งเป็นสีดั้งเดิมของน้ำสกัดเชื้อชาเต็มอาร์ทิไซค์ อีกส่วนหนึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงในการอบแห้ง ทั้งนี้อาจจะลดอุณหภูมิในการอบแห้งลงได้ แต่ต้องใช้เวลาในการอบแห้งนานขึ้น หรือเปลี่ยนกรรมวิธีในการทำแห้ง

2. การผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์

2.1 การเตรียมน้ำสกัดเชื้อชาเต็มอาร์ทิไซค์

น้ำสกัดจากเชื้อชาเต็มอาร์ทิไซค์เพื่อใช้ในการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จะมีการปรับเปลี่ยนวิธีการเตรียมจากวิธีของวันเพ็ญ (2548) ด้วยสาเหตุหลัก คือ การลดขั้นตอนการผลิตและการเพิ่มผลได้ของการสกัด ทำให้น้ำสกัดที่ได้มีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของน้ำสกัดอินูลินจากเชื้อราเส้นใยที่ใช้

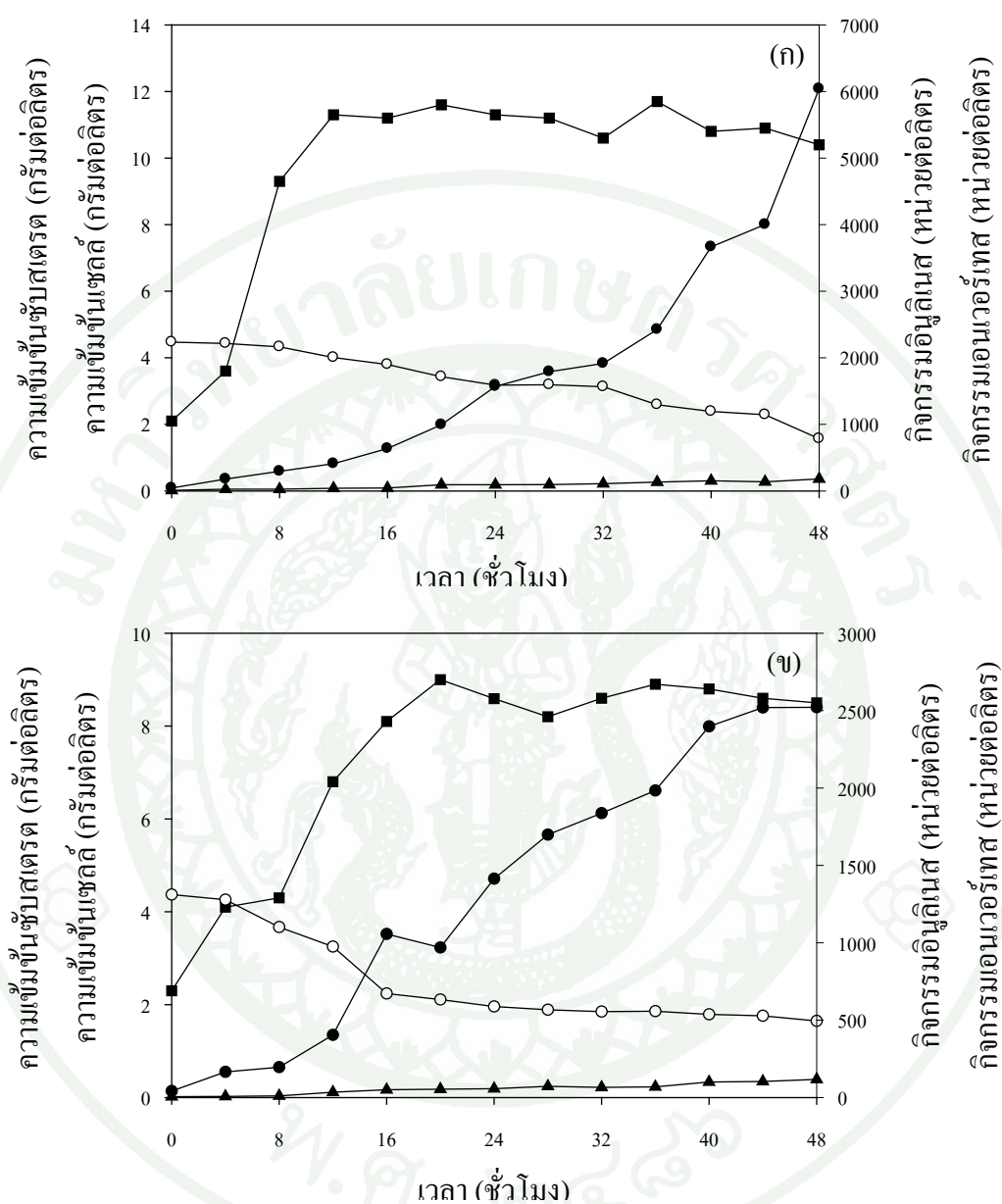
องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ร้อยละขององค์ประกอบ
กลูโคสและฟรุกโทส (G+F)	2.72	5.91
ซูโครส (GF)	10.51	22.85
1-แลคโทส (GF ₂)	3.33	7.24
นิสโทส (GF ₃)	4.58	9.96
1 ^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนิสโทส (GF ₄)	3.53	7.67
อื่นๆ (GF _n)	21.33	46.37
รวม	46.0	100

2.2 การผลิตเอนไซม์อินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR 3570 และ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 ในถังหมัก

ผลของการผลิตเอนไซม์อินูลิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์แสดงได้ดังภาพที่ 13 ซึ่งจะพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* เร็วกว่าของเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* โดยเชื้อรา *A. niger* ถึงช่วง stationary phase เมื่อชั่วโมงที่ 12 ส่วนของเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* อยู่ที่ชั่วโมงที่ 16 เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์อินูลิเนสและอินเวอร์เตสตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง แต่จะสังเกตได้ว่าเชื้อรา *A. niger* จะสร้างเอนไซม์อินเวอร์เตสได้ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* มากกว่า 2 เท่า ซึ่งเมื่อเทียบผลการเพาะเลี้ยงของนิสากร(2548) ที่เลี้ยงโดยใช้อินูลินผงทางการค้า โดยใช้ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่า ในงานวิจัยนี้ถึง 2 เท่า พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์อินูลิเนสของทั้งเชื้อรา *A. niger* และเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* ในปริมาณใกล้เคียงกับในงานวิจัยนี้ แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เตสน้อยกว่ามาก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่งานวิจัยนี้ได้ลดขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยความร้อน ทำให้เอนไซม์ในหัวเชื้อราเส้นใยที่ใช้ยังคงทำงานอยู่จนกระทั่งขั้นตอนการสกัด ซึ่งทำให้องค์ประกอบของอินูลินบางส่วนถูกเอนไซม์ในหัวเชื้อราเส้นใยที่ใช้ย่อยสลายทำให้ได้ขนาดโมเลกุลที่เล็กลง ทำให้ไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อินเวอร์เตสมากขึ้นกว่าในงานวิจัยของนิสากร(2548)

ค่าจนผลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* TISTR 3570 และ *C. guilliermondii* TISTR 5844 แสดงได้ดังตารางที่ 6 เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า I/S , μ , Y, Q กับงานวิจัยของนิศากร (2548) พบว่า ค่า I/S ของงานวิจัยนี้มีค่าต่ำกว่ามากสาเหตุเนื่องจากจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์มีการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงกว่าในงานวิจัยของนิศากร (2548) มากเมื่อเปรียบเทียบค่า μ พบว่าในงานวิจัยของนิศากรมีค่าสูงกว่าซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่งานวิจัยนี้ลดความเข้มข้นของอินูลินลงครึ่งหนึ่ง ส่งผลให้การเจริญเติบโตน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบค่า Y ในงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่าอันเป็นผลมาจากการที่ลดความเข้มข้นของอินูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนค่า Q มีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่า Y ซึ่งอาจอนุมานได้ว่าความเข้มข้นของอินูลินในอาหารแค่เพียงร้อยละ 5 ก็มีความเพียงพอที่จะใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่อาจต้องมีการปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์

ถ้าพิจารณาถึงการนำเอนไซม์ดิบไปใช้ในกระบวนการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จากอินูลินแล้วเอนไซม์จากทั้งสองแหล่ง อาจจะยังไม่ค่อยเหมาะสม เนื่องจากมีกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสที่สูงกว่าอินูลินสมาก ซึ่งจะทำได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพียงอย่างเดียวเพราะความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่ำกว่าร้อยละ 50 เอนไซม์อินเวอร์เทสมีแนวโน้มในการแสดงกิจกรรม hydrolase เพียงอย่างเดียว ซึ่งเหมาะสมกับการผลิตน้ำเชื่อมฟรุทโทสมากกว่า ดังที่นิศากร (2548) ได้รายงานไว้ ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการแยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์อินูลินสที่เตรียมได้ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ หรืออาจจะใช้ร่วมกับเอนไซม์ที่ได้จากแหล่งอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จากเยรูซาเล็มอาร์ทิโช๊คต่อไป



ภาพที่ 13 (ก) ผลการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* TISTR 3570 (ข) ผลการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของ *C. guilliermondii* TISTR 5844 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น เซลล์ (—■—) และ คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (—○—)

กิจกรรมเอนไซม์ อินูลินเอส (—▲—) และ อินเวอร์เทส (—●—)

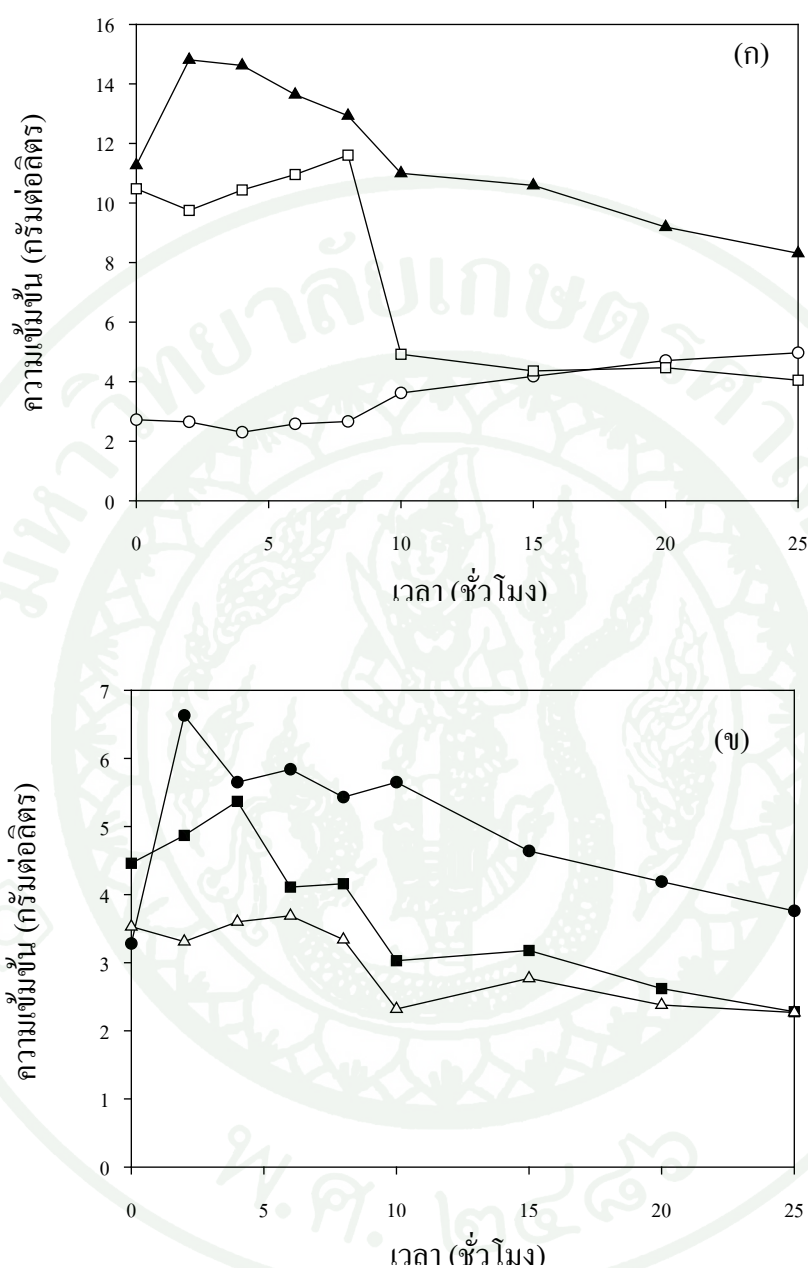
ตารางที่ 6 ค่าจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* TISTR 3570 และ *C. guilliermondii* TISTR 5844 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	<i>Aspergillus niger</i> TISTR 3570	<i>Candida guilliermondii</i> TISTR 5844
μ (h^{-1})	0.19	0.08
$Y_{x/s}$ (g/g)	2.87	2.28
$Y_{p/s}$ (Inu) (U/g)	59.48	41.15
$Y_{p/s}$ (Inv) (U/g)	2,069.92	911.03
Q_s (g/l h)	0.06	1.17
q_s (g/g h)	0.01	0.15
Q_p (Inu) (U/l h)	3.23	2.37
q_p (Inu) (U/g h)	0.32	0.33
Q_p (Inv) (U/l h)	111.58	54.92
q_p (Inv) (U/g h)	10.53	7.40
Inu/Inv	0.03	0.05

2.3 การศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์คิบินูลิเนสต่อการผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570

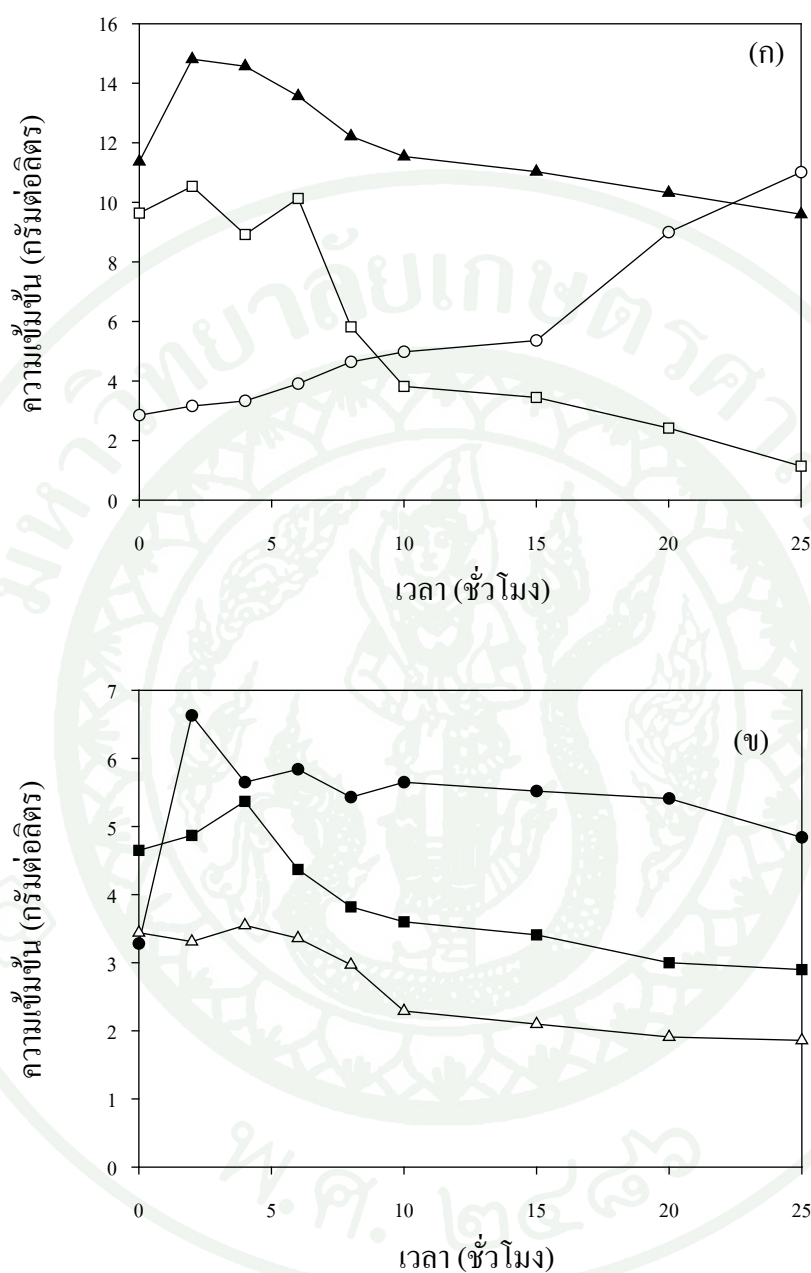
2.3.1 ทำการศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์คิบินูลิเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 ต่อการผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์

ผลของการผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์คิบินูลิเนสจาก *A. niger* TISTR 3570 แสดงดังภาพที่ 14-16



ภาพที่ 14 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์คิบอินูลิเนสจาก *A. niger* TISTR 3570 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัมอินูลิน ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์

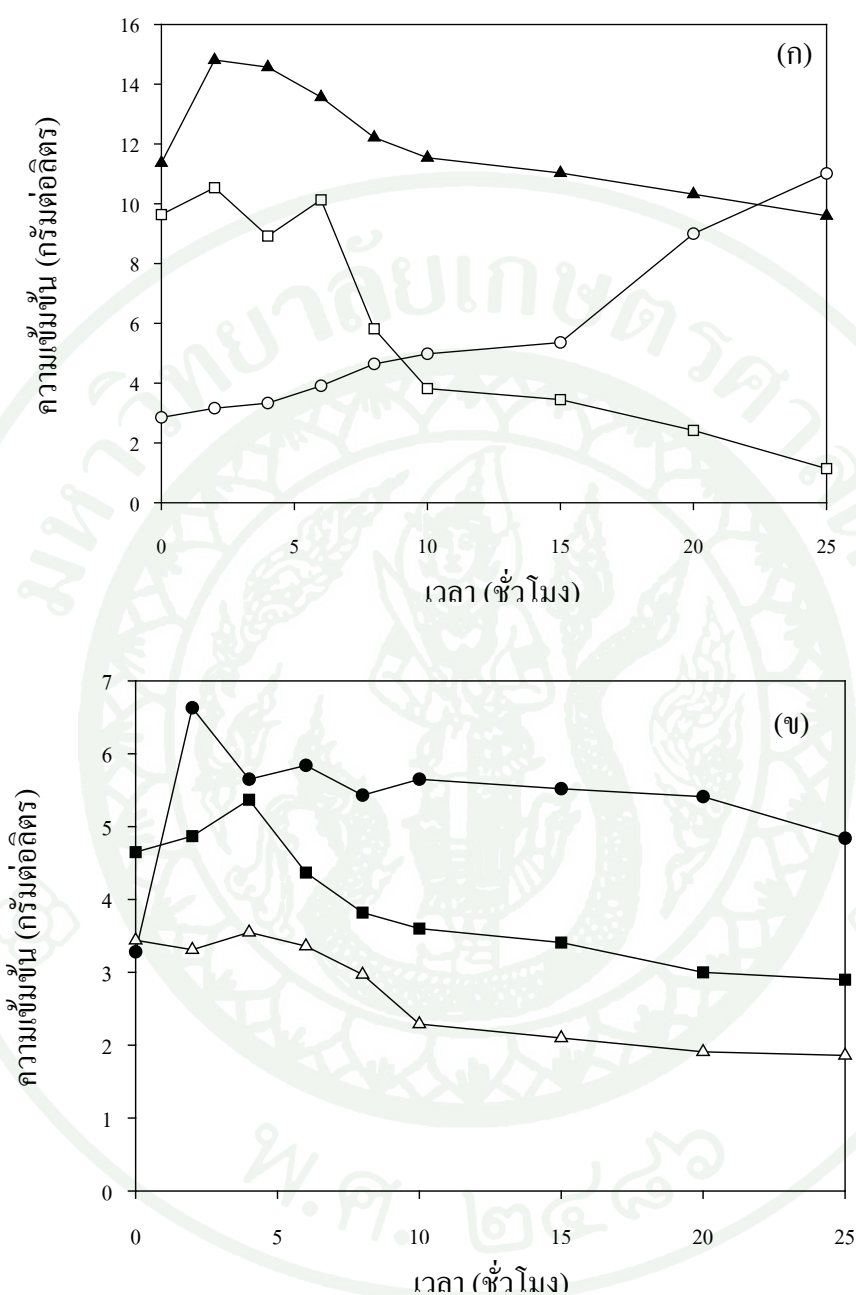
ความเข้มข้น กลูโคส+ฟรุคโทส (—○—) ซูโครส (—□—) และ อินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ (—▲—)
ความเข้มข้น 1-เคสโทส (—●—) นีสโทส (—■—) และ 1^F-ฟรุคโทฟูราโนซิด นีสโทส (—△—)



ภาพที่ 15 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์คิบอินูลิเนสจาก *A. niger* TISTR 3570 ความเข้มข้น 1.0 หน่วยต่อกรัมอินูลินชนิดผง ความดันอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์

ความเข้มข้น กลูโคส+ฟรุคโทส (—○—) ซูโครส (—□—) และ อินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ (—▲—)

ความเข้มข้น 1-kestose (—●—) kestose (—■—) และ 1^F-fructofuranosyl kestose (—△—)



ภาพที่ 16 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์ดิวอินูลิเนสจาก *A. niger* TISTR 3570 ความเข้มข้น 2.0 หน่วยต่อกรัมอินูลินชนิดผง ความดันอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์

ความเข้มข้น กลูโคส+ฟรุกโทส (—○—) ซูโครส (—□—) และ อินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ (—▲—)
ความเข้มข้น 1-kestose (—●—) nistose (—■—) และ 1^F-fructofuranose nistose (—△—)

เมื่อใช้เอนไซม์อินูลิเนสที่มีกิจกรรม 0.2 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (0.644 หน่วยต่อมิลลิลิตร) จะมีเอนไซม์อินเวอร์เตสที่มีกิจกรรม 21.505 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 2 โดยผลิตได้ 15.048 กรัมต่อลิตร และอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ที่ลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 9.701 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลได้ของน้ำตาลอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์มีค่าเท่ากับ 0.33 กรัมอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

เมื่อใช้เอนไซม์อินูลิเนสที่มีกิจกรรม 1.0 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (3.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร) จะมีเอนไซม์อินเวอร์เตสที่มีกิจกรรม 107.526 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 2 โดยผลิตได้ 15.048 กรัมต่อลิตร และอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ที่ลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 9.664 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลได้ของน้ำตาลอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์มีค่าเท่ากับ 0.33 กรัมอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

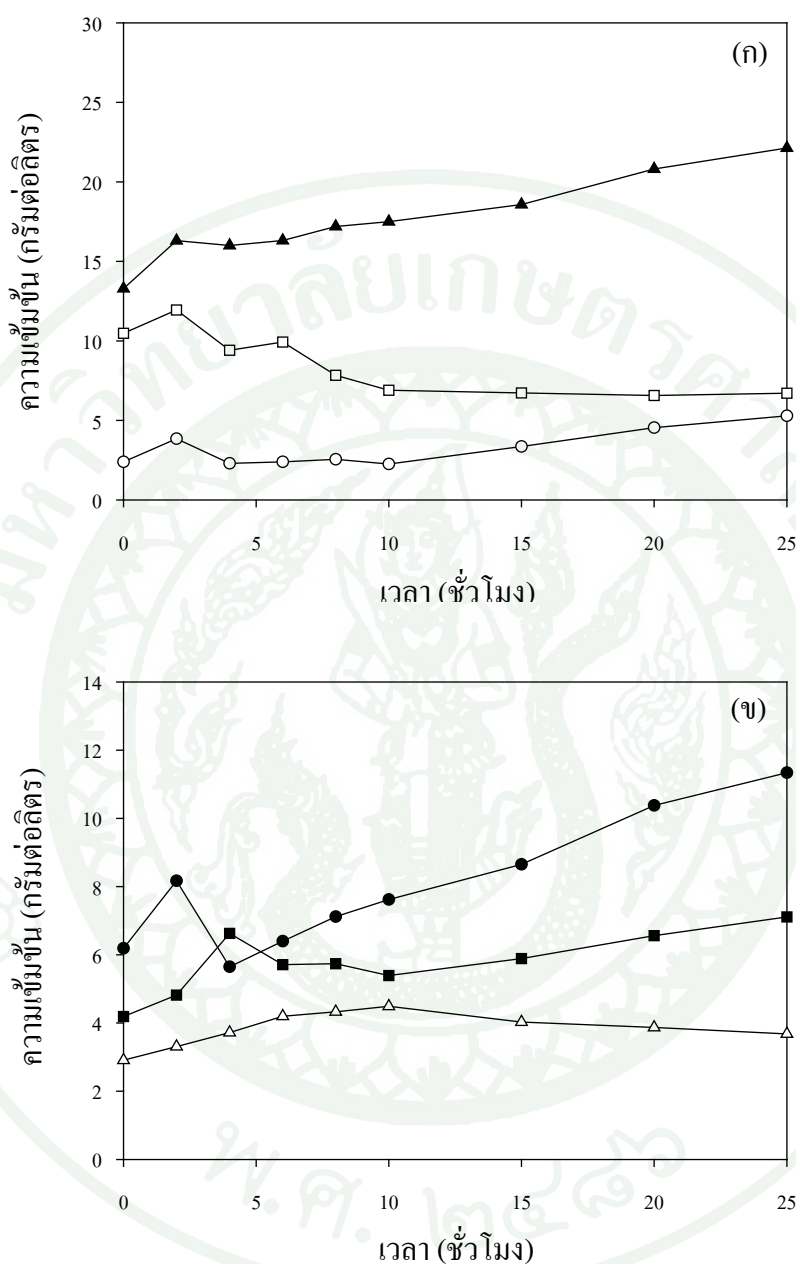
เมื่อใช้เอนไซม์อินูลิเนสที่มีกิจกรรม 2.0 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (6.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร) จะมีเอนไซม์อินเวอร์เตสที่มีกิจกรรม 215.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 10 โดยผลิตได้ 13.921 กรัมต่อลิตร และอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ที่ลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 7.051 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลได้ของน้ำตาลอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์มีค่าเท่ากับ 0.3 กรัมอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

จากการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์อินูลิเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 โดยแปรผันกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.2 1.0 และ 2.0 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด พบว่าสามารถย่อยสลายอินูลินเป็นอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดร้อยละ 32.71 โดยปริมาณของอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกแล้วลดลงเมื่อเพิ่มเวลาของปฏิกิริยา ซึ่งในช่วงแรกเกิดจากการย่อยอินูลินได้เป็นอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์โดยกิจกรรมของเอนโดอินูลิเนสเป็นหลัก ในช่วงเวลาถัดมาอินูลินและอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จะถูกย่อยโดยเอนไซม์เอ็กโซอินูลิเนสและอินเวอร์เตสได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคสและฟรุกโทส) ทำให้ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้เพิ่มขึ้น หากเพิ่มอัตราส่วนของกิจกรรมเอนไซม์อินูลิเนสต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด กลับยังเพิ่มการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวยิ่งขึ้นอีกทั้งยังลดปริมาณของอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ลงอีกด้วย ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากของเอนไซม์อินเวอร์เตส

จากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่าการย่อยอินูลินโดยใช้เอนไซม์ดิบจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 เพียงชนิดเดียวมีความไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์แต่เหมาะสมกับการนำไปผลิตฟรุคโทสไซรัป เพราะเอนไซม์ดิบจากเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนิศากร (2548)

2.3.2 ทำการศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์ดิบอินูลิเนสผสม จากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 และเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 ต่อการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์

ผลการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเยรูลาเต็มอาร์ทิโซคโดยเอนไซม์ผสมระหว่างเชื้อรา และเชื้อยีสต์ (10:1) แสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์คิบผสมอินูลเนส (เชื้อรา:เชื้อยีสต์) อัตราส่วน 10:1 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัมอินูลินชนิดผง ความคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง (ก) อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยรวม และ (ข) ชนิดของอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์

ความเข้มข้น กลูโคส+ฟรุกโทส (—○—) ซูโครส (—□—) และ อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (—▲—)
ความเข้มข้น 1-เคสโทส (—●—) นีสโทส (—■—) และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิล นีสโทส (—△—)

เมื่อใช้เอนไซม์อินูลินสผสมในอัตราส่วน 10:1 ที่มีกิจกรรม 0.2 หน่วยต่อกรัม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (0.59:0.06 หน่วยต่อมิลลิลิตร) คิดเป็นกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทส 20.993 (19.702:1.291) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตด้วยเอนไซม์ดิบจากเชื้อรา พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสต่ำกว่า เมื่อผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ถึงชั่วโมงที่ 25 (เมื่อสิ้นสุดการทดลอง) ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุดผลิตได้ 21.961 กรัมต่อลิตร มีผลได้เท่ากับ 0.48 กรัมโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

การผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ดิบผสมช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์อินูลินสจากเชื้อราเท่านั้น สามารถผลิตได้สูงที่สุด 15.048 กรัมต่อลิตร มีผลได้เท่ากับ 0.33 กรัมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด สอดคล้องกับผลของนิสากร (2548) ซึ่งเป็นผลมาจากการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสของเอนไซม์ดิบผสม

3. การแปรรูปอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์

จากการศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของเอนไซม์อินูลินสต่อการผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเชื้อราแลมอาร์ทิไซค์ จะทำให้ได้กระบวนการผลิตน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมที่สุด โดยการใช้เอนไซม์ดิบผสมจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ ทำการผลิตโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 ชั่วโมง เพราะได้ผลได้อินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงที่สุด

การผลิตอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเชื้อราแลมอาร์ทิไซค์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะแสดงดังภาพที่ 22 ผลิตภัณฑ์มีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำที่อุณหภูมิห้อง โดยมีองค์ประกอบของสารละลายอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์แสดงดังตารางที่ 7 น้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จะถูกใช้สำหรับการแปรรูปต่อไป

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของสารละลายอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์ดิบผสม
อินูลิเนสควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เวลา 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25
ชั่วโมง

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ร้อยละของ องค์ประกอบ	ร้อยละขององค์ประกอบ ที่เปลี่ยนแปลง
กลูโคสและฟรุกโทส (G+F)	5.56	12.09	+6.18
ซูโครส (GF)	6.94	15.09	-7.76
1-kestotriose (GF ₂)	11.52	25.04	+17.80
นีสโทส (GF ₃)	7.31	15.89	+5.93
1 ^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF ₄)	3.96	8.61	+0.94
อื่น ๆ (GF _n)	10.71	23.28	-23.09
รวม	46.00	100.00	

3.1 การผลิตน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการทำงานน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้นที่ได้สาร
ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีที่สุด โดยควบคุมอุณหภูมิอ่างน้ำร้อนที่ 35, 45, 55 องศาเซลเซียส ควบคุม
ความดันที่ -27 มิลลิเมตรปรอท ใช้สารละลายอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ 100 มิลลิลิตร สามารถลด
ปริมาตรลงได้ร้อยละ 60 และได้น้ำเชื่อม 40 มิลลิลิตร พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลาใน
การระเหยมากถึง 4 ชั่วโมง เมื่อใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการระเหย 2 ชั่วโมง และ
เมื่อใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสพบว่าการเดือดปะทุขึ้นในขวดน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคา
ไรด์จึงไม่สามารถที่จะใช้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในการระเหยได้ น้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็ก
คาไรด์เข้มข้นที่ได้จากการระเหยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีความหนืด
หนืดสูง ดังแสดงในภาพที่ 17 และพบว่ามีปริมาณองค์ประกอบของน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคา
ไรด์เข้มข้นดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้น

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ร้อยละขององค์ประกอบ
กลูโคสและฟรุกโทส (G+F)	13.90	12.09
ซูโครส (GF)	26.33	22.89
1-kestโทส (GF ₂)	28.8	25.04
นีสโทส (GF ₃)	18.28	15.89
1 ^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF ₄)	9.90	8.61
อื่นๆ (GF _n)	17.80	15.48
รวม	115.00	100

จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบก่อนและหลังแปรรูป โดยพิจารณาจากองค์ประกอบของสารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์ก่อนระเหย และคำนวณปริมาณของอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เปลี่ยนแปลงภายหลังการระเหยโดยใช้ความดัน พบว่าปริมาณของโอลิโกแซ็กคาไรด์ (GF₂-GF₄) ไม่เปลี่ยนแปลงแต่มีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น โดยเห็นได้จากน้ำเชื่อมมีสีเข้มมีความหนืดและเหนียวมากขึ้น

3.3. การแปรรูปอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผง

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า การเตรียมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงโดยไม่ได้เติมสารอื่น ๆ ลงไป จะไม่ได้ผลิตภัณฑ์เลยแต่จะเกิดเป็นฟิล์มบาง ๆ เคลือบภายในตัวเครื่อง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องเติมสารตัวพา โดยเติมสารมอลโตเด็คซ์ทรินลงในน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งในสิทธิบัตรของ Jenner และ Jackson 1990 ใช้มอลโตเด็คซ์ทรินผสมกับน้ำตาลซูคราโลสเพื่อทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้มอลโตเด็คซ์ทรินร้อยละ 40-60 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ซึ่งพบว่าใช้มากกว่างานวิจัยนี้ซึ่งใช้เพียงร้อยละ 25.56 เมื่อทำการระเหยโดยควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่ 140 องศาเซลเซียส พบว่าผงที่ได้ยังมีความชื้นสูง โดยสังเกตจากการจับผงที่ได้จะมีลักษณะหยาบ ๆ ไม่แห้งสนิท เมื่อทำการระเหยโดยควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าเพิ่มขึ้นที่ 160 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นผงแห้งสีขาว เมื่อทำการระเหยโดยควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าเพิ่มขึ้นที่ 180 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาวปนน้ำตาล มีกลิ่นน้ำตาลไหม้เล็กน้อย ดังนั้นอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่เหมาะสมที่สุดคือ 160

องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมิความร้อนขาออกที่ 75-86 องศาเซลเซียส จะได้อินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ 204.38 กรัม ซึ่งมีความชื้นร้อยละ 2.49 เมื่อคิดเป็นน้ำหนักแห้งของอินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงจะได้เท่ากับ 201.33 กรัมของน้ำหนักแห้ง และเมื่อคำนวณผลได้ของการทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยคิดจากน้ำหนักแห้งของอินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงที่ได้จากของแข็งที่มีอยู่ทั้งหมดในสารละลาย เท่ากับร้อยละ 98 มีองค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 9 เมื่อนำอินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงมาทดสอบการละลาย พบว่าผงมีการละลายได้ดีที่อุณหภูมิห้อง มีลักษณะเป็นสารละลายใสสีเหลืองอ่อน มีรสหวานเล็กน้อย

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของอินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงที่มีการเติมมอลโตเด็กซ์ทรินร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)	ร้อยละขององค์ประกอบ
กลูโคสและฟรุกโทส (G+F)	3.54	1.76
ซูโครส (GF)	4.13	2.05
1-เลสโทส (GF ₂)	6.48	3.22
นีสโทส (GF ₃)	4.12	2.05
1 ^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF ₄)	2.36	1.17
อื่นๆ (GF _n)	180.70	89.75
รวม	201.33	100

จากการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์อินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงกับน้ำเชื่อมอินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ก่อนการแปรรูป พบว่าปริมาณของโอลิโกแซ็กคาไรด์ (GF₂-GF₄) ลดลงร้อยละ 5.22 พบว่ามีองค์ประกอบอื่น ๆ เพิ่มขึ้นมากขึ้นเป็นผลมาจากการเติมมอลโตเด็กซ์ทรินลงไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

กรรมวิธีการผลิตแป้งอินูลินและอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์จากเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค (*Helianthus tuberosus*) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่เยรูซาเล็มอาร์ทิโชค จึงได้ทำการสกัดแป้งอินูลินด้วยวิธีของวันเพ็ญ และคณะ (2548) โดยใช้กระบวนการสกัดแบบเปียกซึ่งมีน้ำร้อนอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลาย ทำการแยกกากออกก่อนที่จะทำการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเอาไปอบแห้งเพื่อให้ได้แป้งอินูลินที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยจะได้ผลได้แป้งอินูลิน 8.95 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการบดเป็นผงแป้งจะมีสีขาวอมเหลืองนวล ซึ่งเป็นเพราะสีดั้งเดิมของน้ำสกัดที่มีสีน้ำตาล

ถ้าหากไม่ทำการตกตะกอน น้ำสกัดสามารถนำไปผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ คือ เอนไซม์อินูลินเอส โดยผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 และเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอนไซม์อินูลินเอส โดยใช้อาหารเหลวในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปผลิตอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์โดยวิธีทางเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ผสมในอัตราส่วน 10:1 เพื่อลดกิจกรรมของเอนไซม์เอนโคอินูลินเอสและเอนไซม์อินเวอร์เทส II ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3570 และจากเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 โดยมีองค์ประกอบและการควบคุมสถานะการผลิตดังนี้ น้ำสกัดจากเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค (มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 46 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1 ลิตร เอนไซม์ผสมที่มีกิจกรรมรวม 0.2 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยใช้ McIlvaine buffer 0.2 M ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการกวนผสมตลอดเวลาเป็นระยะเวลา 25 ชั่วโมง จะได้สารละลายอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ที่พร้อมนำไปแปรรูป

การแปรรูปที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติที่ดี คือการนำสารละลายอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ไปทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งจะต้องมีการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินเพื่อให้ยึดจับกับอินูโลลิโกแซ็กคาไรด์ ใช้สภาวะในการทำแห้งแบบพ่นฝอย ดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่ 160 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาออกที่ 75-86 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นผงละเอียดสี

ขาว คุณความชื้นได้เร็ว เมื่อละลายน้ำจะเป็นสารละลายใสสีเหลืองอ่อน มีรสหวานเล็กน้อย ซึ่งคาดว่าผู้บริโภคและอุตสาหกรรมอาหารสามารถยอมรับผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้นที่มีสีน้ำตาลดำเข้ม ถึงแม้จะมีความหวานสูงกว่าอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงแต่ใช้เวลาในการระเหยนานถึง 2 ชั่วโมงต่อปริมาณน้ำเชื่อม 100 มิลลิลิตร และด้วยสีที่เข้มข้นเองก็จะทำให้เกิดข้อจำกัดสำหรับการนำไปใช้ เพราะจะไปเพิ่มสีให้กับผลิตภัณฑ์

ข้อเสนอแนะ

สำหรับขั้นตอนการปอกเปลือกเยรูซาเล็มอาร์ทิโชคควรแช่หัวเยรูซาเล็มอาร์ทิโชคในน้ำเย็นระหว่างปฏิบัติงาน เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล ส่วนการสกัดแป้งอินูลินจากหัวเยรูซาเล็มอาร์ทิโชค ควรใช้อัตราส่วนน้ำร้อนต่อเนื้อมากขึ้นและควรนำส่วนใสหลังการตกตะกอนครั้งแรกมาทำการตกตะกอนซ้ำ จะช่วยเพิ่มผลได้ของแป้งอินูลินที่ได้สูงขึ้น เนื่องจากพบว่าเมื่อทิ้งส่วนใสหลังการตกตะกอนครั้งแรกไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเห็นตะกอนแป้งเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าขนาดของแป้งอินูลินมีความหลากหลายมาก จึงทำให้ตกตะกอนไม่หมดและควรศึกษาเพิ่มเติมในการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งแป้งอินูลินที่สกัดได้ หรือการพัฒนากรรมวิธีการทำแห้งแป้งอินูลินที่มีคุณภาพดีและประหยัดค่าใช้จ่าย

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC) โดยอาศัยคอลัมน์ Inertsil NH2 ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณของอินูลินได้ จึงทำให้ไม่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงขนาดของอินูลินเริ่มต้นได้ จำเป็นต้องใช้คอลัมน์ชนิดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณอินูลินได้ ได้แก่ เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูงแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก (HPAEC-CarboPac PA1) ซึ่งจะทำได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของอินูลินและอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

ข้อจำกัดของการวิเคราะห์น้ำตาลด้วย HPLC เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐาน GF_n (n= 5-10) จึงทำให้ไม่สามารถระบุชนิดน้ำตาลที่มี DP มากกว่า 5 ฉะนั้นจึงควรแก้ปัญหาด้วยการวิเคราะห์อินูลินด้วย HPAEC-CarboPac PA1

สีของน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้นมีสีเข้ม ซึ่งจะทำให้ไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคุณสมบัติในด้านสีหรือความขุ่นใส ซึ่งอาจแก้ไขโดยการฟอกสีด้วยสารดูดซับ

เช่น Activated carbon, ion exchange resin ซึ่งจะช่วยลดความเข้มข้นของน้ำเชื่อมอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้มข้นได้

การแปรรูปอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ผงควรลดการใช้มอลโตเด็คซ์ทรินลง หรือศึกษาหาปริมาณการใช้มอลโตเด็คซ์ทรินที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณความเข้มข้นของอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อคุณค่าและมูลค่าของผลิตภัณฑ์



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2547. วัตถุเจือปนอาหาร. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 281

กลุ่มส่งเสริมสนับสนุนวิชาการ สำนักโรคไม่ติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. 2553. สถานการณ์โรคไม่ติดต่อเรื้อรังและการบาดเจ็บ (ภาพรวมประเทศ).

ทิฆัมพร ต้นติวิมมงคล. 2546. การผลิตอินูลิโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิสกร วรวิธานันท์. 2548. การผลิตฟรุกโทสจากอินูลินด้วยเอนไซม์อินูลินส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ผู้จัดการออนไลน์. 2551. สถาบันอาหารเร่งเครื่องดันส่งออกอาหารไทยทะลุ 1 ล้านล้าน. แหล่งที่มา: <http://www.manager.co.th/SMEs/ViewNews.aspx?NewsID=9510000112136>, 13 เมษายน 2554.

ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. 2552. ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ (Functional Foods). คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แหล่งที่มา: [http://www.sc.mahidol.ac.th/scbt/articles/functional food-PL-12 Oct 09.pdf](http://www.sc.mahidol.ac.th/scbt/articles/functional%20food-PL-12%20Oct%2009.pdf), 12 ตุลาคม 2552.

มณฑล สุกใส. 2010. พื้นฐานการทำแห้งแบบพ่นฝอย. แหล่งที่มา: <http://thaifoodscience.com/พื้นฐานเรื่องการทำแห้งแบบพ่นฝอย.html>, 7 ธันวาคม 2553.

สุเมธ บุญเกิด. 2009. วิจัยอุตสาหกรรมกล้วยและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. แหล่งที่มา: <http://www.nathaphat.com/content/view/43/59/>, 7 ธันวาคม 2552.

Anonymous 1. 2005a. **Prebiotics**. Available Source: <http://www.supplementwatch.com/supatoz/supplement.asp?supplementId=221>, June 29, 2005.

- Anonymous 2. 2005b. **Chicory**. Available Source: <http://www.fastweightlossnews.com/Chick.pdf>, June 29, 2005.
- Anonymous 3. 2009a. **Spray drying**. Available Source : http://en.wikipedia.org/wiki/Spray_drying, June 8, 2009.
- Anonymous 4. 2009b. **Rotary evaporator**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Rotary_evaporator, June 8, 2009.
- Arand, M., A.M. Golubev, J.R.B. Neto, I. Polikarpov, R. Wattiez, O.S. Korneeva, E.V. Eneyskaya, A.A. Kulinskaya, K.A. Shabalin, S.M. Shishliannikov, O.V. chepurnaya and K.N. Neustroev. 2002. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. **Biochem. J.** 362: 131-135.
- Bacon, J.S.D. and J. Edelman. 1950. The Carbohydrates of the Jerusalem Artichoke and other Compositae. **Biochem J.** 48: 114-126.
- Baig, M.A., K. Shafiq, S. Mirza, S. Ali and I. Haq. 2003. Effect of urea on β -fructofuranosidase in *Saccharomyces* fermentation. **Pakistan J. Nutri.** 2(2): 106-108.
- Baratti, J. and M. Ettalibi. 1993. Thermostable inulinases from *Aspergillus ficuum*: Biochemical characterization and biotechnological applications. **Stud. plant sci.** Elsevier, Amsterdam. 3: 211-221.
- Belcarz, A., G. Ginalska, J. Lobarzewski and C. Penel. 2002. The novel non-glycosylated invertase from *Candida Utilis* (the properties and the conditions of production and purification). **Biochimi. Biophy. Acta.** 1594: 40-53.
- Dubois, M., K.a. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.

- Edelman, J. and T.G. Jefford. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytol.** 67: 517-531.
- Feng, H.J. and Q.S. Yi. 2009. Comparison of different inulin extraction technologies from Jerusalem artichoke. **Guizhou Agricultural Sciences.** 10: 181-183.
- Frank, A. and L.D. Leenheer. 2002. **Inulin.** In: **Vandamme EJ, De Baets S, Steinbüchel A (eds) Biopolymers, polysaccharides II: polysaccharides from eukaryotes**, vol 6. Wiley-VCH, Weinheim, pp 439–479.
- Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.** 125: 1401-1412.
- Gibson, G. R. and M. D. Collins. 1999. Concept of balanced colonic microbiota, prebiotics and synbiotics, pp. 139–153. In **Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora** L. A. Hanson and R. H. Yolken (Eds).. Raven Publishers, Philadelphia,.
- Hayashi, S., Y. Shimokawa, M. Nogoguchi, Y. Tasasaki, H. Ueno and K. Imada. 1993. Nutritional status of *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 for the production of fructofuranosidase. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 216-220.
- Hocine, L.L., Z. Wang, B. Jiang and S. Xu. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **J. of Biotechnology.** 81(1): 73-84
- IOM/NAS. 1994. **Opportunities in the Nutrition and Food Sciences**, ed. P.R. Thomas and R. Earl, p. 109. Institute of Medicine/National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C.

- Jenner, M.R., G. Jackson. 1990. Sucralose sweetening compositions. **United states patent**. Patent No. 4,927,646 May 22nd, 1990
- Jung, K., W. Henke, B.D. Schulze, K. Sydow, K. Precht and S. Klotzek. 1992. Practical approach for determining glomerular filtration rate by single-injection inulin clearance. **Clinic. Chem.** 38: 403-407
- Kawamura, M., T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura and K. Mizutani. 1989. Formation of cyclodextrin-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. **Carbohydr. Res.** 192: 83-90.
- Kays, S.J. and S.F. Nottingham. 2008. **Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke *Helianthus tuberosus* L.** CRC. Press
- Kim, B.W., J.W. Choi and J. W. Yun. 1998. Selective production of GF₄-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. **Biotechnol. Lett.** 20(11): 1031-1034
- Kim, Y. and S.S. Wang. 1999. Physicochemical properties of inulin; application of inulin in baking as a fat substitute. **The IFT annual meeting.**
- Ksmecare. 2009. ตลาดอาหารเพื่อสุขภาพของโลก. Available Source: <http://www.greenshopcafe.com/newsdetail.php?id=144>, April 13, 2011.
- Ku, M.A. and Y.D. Hang. 1993. Effect of inulin on yeast inulinase production in *sauerkraut* brine. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 10: 354-355.
- Lingyun, W., W. Jianhua, Z. Xiaodong, T. Da, Y. Yalin, C. Chenggang, F. Tianhua and Z. Fan. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. **J. Food Eng.** 79(3):1087-1093.

- McKellar, R.C. and H.W. Modler. 1989. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31: 537–541.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31 (3): 426–428.
- Niness, K.R. 1999. Inulin and oligofructose: What are they?. **J. Nutr.** 129: 1402-1406.
- Ohta, K., S. Hamada and T. Nakamura. 1992. Production of High Concentrations of Ethanol from Inulin by Simultaneous Saccharification and Fermentation Using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59(3): 729–733.
- Onodera, S. and N. Shiomi. 1988. Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. **Agric. Biol. Chem.** 52(10): 2569-2576.
- Roberfrid, M.B. and N.M. Delzenne. 1998. Dietary fructans. **Annu. Rev. Nutr.** 18: 117-143
- Saengthongpinit, W. and T. Sajjaanantakul. 2005. Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Post. Biol. Technol.** 37 : 93–100.
- Seifert, S. and B. Watzl. 2007. Inulin and Oligofructose: Review of Experimental Data on Immune Modulation. **J. Nutr.** 137(11): 2563s-2567s.
- Sirisansaneeyakul, S., T. Tantivimongkol and S. Lertsiri. 2002. Inulin and sucrose affecting on inulinase production from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **The 40th Kasetsart University Annual Conference.**
- Sharma, A.D., S. Kainth and P.K. Gill. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. **J. Food Eng.** 77(3): 486-491.

Suzuki, M. and N.J. Chatterton. 1993. **Science and Technology of Fructans**. CRC. Press, Inc. Boca Raton. Florida.

Thomson, T. 1818. **A System of Chemistry**, Vol. 4. 5th ed London edition. Abraham Small. Philadelphia.

Uchiyama, T. 1993. Metabolism in microorganisms part II. biosynthesis and degradation of fructans by microbial enzymes other than levansucrase, pp. 169-190. **In M. Suzuki and N.J. Chatterton, eds. Science and Technology of Fructans**. CRC Press, USA.

Vogel, M. 1993. A process for the production of inulin and its hydrolysis products from plant material, **In A. Fuchs, ed. Inulin and Inulin-containing Crops**. Elsevier, Amsterdam.

Wei, W.Q., Z.Jin, Z. Xia and L.W. Yi. 2002. Using the microwave to extract the inulin from Jerusalem artichoke. **Journal of Ningxia University(Natural Science edition)**. 4.

Welsch, S. 1996. **Nutrient standards, dietary guidelines, and food guides, in Present Knowledge in Nutrition**. 7 ed. ILSI Press, Washington, D.C.

WHO/FAO. 2003. **WHO/FAO release independent Expert Report on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases**. Available Source: <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr20/en/> , June 8, 2009.

Yi, H., L. Zhang, C. Hua, K. Sun and L. Zhang. 2010. Extraction and Enzymatic Hydrolysis of Inulin from Jerusalem artichoke and their Effects on Textural and Sensorial Characteristics of Yogurt. **Food Bioprocess Technol**. 3: 315–319.

Yoshikawa, J., S. Amachi, H. Shinoyama and T. Fujii. 2006. Multiple β -fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. **FEMS Microbiol. lett**. 265(2): 159-163.

Yun, J.W. 1996. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation, and application. **Enzyme Microb. Tech.** 19: 107-117.





ภาคผนวก



ตารางผนวกที่ ก1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Aspergillus niger* TISTR 3570 เพื่อผลิตเอนไซม์อินูลิเนส ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบ ต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง ต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Time	Cx (g/l)	Cs (g/l)	Inu (U/l)	Inv (U/l)
0	2.1	4.47	8.61	45.08
4	3.6	4.43	25.84	178.70
8	9.3	4.33	25.84	296.23
12	11.3	4.01	41.35	410.53
16	11.2	3.80	44.79	637.53
20	11.6	3.43	93.03	994.94
24	11.3	3.18	94.75	1569.68
28	11.2	3.19	96.47	1791.86
32	10.6	3.13	110.26	1915.82
36	11.7	2.59	132.65	2426.17
40	10.8	2.39	153.33	3665.82
44	10.9	2.29	137.82	4002.29
48	10.4	1.57	180.89	6040.47

ตารางผนวกที่ ก2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Candida guilliermondii* TISTR 5844 เพื่อผลิตเอนไซม์
 อินูลิเนสในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน
 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหาร
 เพาะเลี้ยงต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Time	Cx (g/l)	Cs (g/l)	Inu (U/l)	Inv (U/l)
0	2.3	4.37	5.17	41.86
4	4.1	4.26	6.89	165.82
8	4.3	3.67	10.34	196.41
12	6.8	3.25	34.46	404.09
16	8.1	2.24	49.96	1056.12
20	9	2.11	53.41	969.18
24	8.59	1.96	56.85	1413.52
28	8.2	1.89	72.36	1698.48
32	8.6	1.85	65.46	1836.93
36	8.9	1.86	68.91	1983.44
40	8.8	1.79	99.92	2397.19
44	8.6	1.76	103.37	2519.54
48	8.5	1.65	117.15	2521.15

ตารางผนวกที่ ก3 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์คิบินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR 3570 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ความคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
	G+F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄
0	2.72	10.48	3.28	4.46	3.53
2	2.65	9.75	6.63	4.87	3.31
4	2.30	10.44	5.65	5.37	3.60
6	2.58	10.96	5.84	4.11	3.69
8	2.66	11.61	5.43	4.16	3.34
10	3.62	4.92	5.65	3.03	2.32
15	4.18	4.36	4.64	3.18	2.77
20	4.71	4.47	4.19	2.62	2.38
25	4.97	4.05	3.76	2.28	2.27

ตารางผนวกที่ ๓4 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์คิบินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR 3570 ความเข้มข้น 1.0 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ความคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
	G+F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄
0	2.85	9.64	3.28	4.65	3.44
2	3.16	10.54	6.63	4.87	3.31
4	3.33	8.92	5.65	5.37	3.55
6	3.91	10.13	5.84	4.37	3.36
8	4.64	5.82	5.43	3.82	2.97
10	4.98	3.82	5.65	3.60	2.29
15	5.36	3.45	5.52	3.41	2.10
20	9.00	2.42	5.41	3.00	1.91
25	11.01	1.14	4.84	2.90	1.86

ตารางผนวกที่ ก5 การผลิตอินูลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์ดิบอินูลิเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR 3570 ความเข้มข้น 2.0 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ความคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
	G+F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄
0	2.85	9.64	3.28	4.65	3.44
2	3.16	10.54	6.63	4.87	3.31
4	3.33	8.92	5.65	5.37	3.55
6	3.91	10.13	5.84	4.37	3.36
8	4.64	5.82	5.43	3.82	2.97
10	4.98	3.82	5.65	3.60	2.29
15	5.36	3.45	5.52	3.41	2.10
20	9.00	2.42	5.41	3.00	1.91
25	11.01	1.14	4.84	2.90	1.86

ตารางผนวกที่ ๓6 การผลิตอินุโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ดีบผสมอินุเลนส (เชื้อรา:เชื้อยีสต์) อัตราส่วน 10:1 ความเข้มข้น 0.2 หน่วยต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ความคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลา 25 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
	G+F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄
0	2.39	10.48	6.19	4.19	2.91
2	3.85	11.94	8.17	4.82	3.31
4	2.30	9.41	5.65	6.63	3.72
6	2.39	9.93	6.40	5.71	4.20
8	2.55	7.84	7.12	5.74	4.33
10	2.26	6.90	7.62	5.39	4.49
15	3.36	6.73	8.65	5.89	4.03
20	4.54	6.57	10.38	6.56	3.87
25	5.29	6.71	11.34	7.11	3.68



ตารางผนวกที่ ข1 สรุปสูตรการคำนวณค่าพารามิเตอร์สำหรับการหมักเพื่อผลิตเอโนไซม์

พารามิเตอร์	หน่วย	สูตร
μ	1/h	$\mu = \frac{dC_x}{C_x dt} = \frac{C_{xt} - C_{x0}}{C_{x0}(t - t_0)}$
I_{nu}	U/l	$RS \times 0.75 \times [(106 \times \text{dil} \times 4)/(180 \times 30)]$
I_{nv}	U/l	$RS \times 0.75 \times [(106 \times \text{dil} \times 4)/(360 \times 30)]$
Q_s	g/l h	$Q_s = \frac{dC_s}{dt} = \frac{C_{st} - C_{s0}}{t - t_0}$
q_s	g/g h	$q_s = \frac{dC_s}{C_x dt} = \frac{C_{st} - C_{s0}}{C_x(t - t_0)}$
Q_p	U/l h	$Q_p = \frac{dC_p}{dt} = \frac{C_{pt} - C_{p0}}{t - t_0}$
q_p	U/g h	$q_p = \frac{dC_p}{C_x dt} = \frac{C_{pt} - C_{p0}}{C_x(t - t_0)}$
$Y_{x/s}$	-	$Y_{x/s} = \frac{dC_x}{dC_s} = \frac{C_{xt} - C_{x0}}{C_{st} - C_{s0}}$
$Y_{p/s}$	-	$Y_{p/s} = \frac{dC_p}{dC_s} = \frac{C_{pt} - C_{p0}}{C_{st} - C_{s0}}$
I/S	-	I_{nu}/I_{nv}



1. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก (DuBois *et al.*, 1956)

เป็นการวิเคราะห์ทางเคมีโดยการทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดสารประกอบที่ทำให้เกิดสี (colorimetric method) ซึ่งจะบอกถึงปริมาณของสาร (quantitative test) โดยมีหลักการคือการให้กรดซัลฟูริกทำการย่อยสารประกอบจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) และทำให้อยู่ในรูปปราศจากน้ำ (dehydrate) ในรูปของสารประกอบเฟอฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรัล (hydroxymethylfurfural) และทำปฏิกิริยากับฟินอลให้เกิดสารประกอบที่ทำให้เกิดสี ซึ่งสามารถวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

สารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ได้ คือ โมโนแซ็กคาไรด์ พอลิแซ็กคาไรด์ และสารอนุพันธ์ ยกเว้น น้ำตาลกรดอะมิโน (amino sugar) ไตรโอส (triose) และเตตราโอส (tetraose)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายฟินอล 5% เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

1.1.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

1.1.3 ชูโครส

วิธีการ

1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของชูโครส

เตรียมสารละลายชูโครสที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ค1

ตารางผนวกที่ ค1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครส

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายซูโครส (มิลลิลิตร)
0	1.0	0
10	0.9	0.1
20	0.8	0.2
30	0.7	0.3
40	0.6	0.4
50	0.5	0.5
60	0.4	0.6
70	0.3	0.7

1.3 วิธีการ

1.3.1 ใส่สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.6×150 มิลลิเมตร

1.3.2 ใส่สารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (vortex mixer)

1.3.3 ใส่กรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม

1.3.4 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวางในอ่างน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.3.5 นำไปวัดสีโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร

1.3.6 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น (standard curve) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟเส้นตรงที่ได้

1.3.7 เจือจางตัวอย่างโดยประมาณให้ความเข้มข้นอยู่ในระดับกราฟเส้นตรง

1.3.8 ดำเนินการตามข้อ 1.3.2-1.3.5

1.3 การคำนวณ

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) = $(A_{490} \times \text{dil})/\text{slope}$

A_{488} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

dil = ค่าการเจือจางตัวอย่าง

slope = ค่าความชันจาก standard curve

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

เป็นการวิเคราะห์ทางเคมีโดยการทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดสารประกอบที่ทำให้เกิดสี (colorimetric method) แสดงปริมาณของสาร (quantitative test) หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายดีเอ็นเอส (DNS: 3,5-Dinitrosalicylic acid)

เตรียมโดยการชั่งดีเอ็นเอส 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 ml เติมสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิกรัม) ลงไปที่ละน้อยคนให้เข้ากัน นำไปอังบนอ่างน้ำร้อน เติมโปแทสเซียมโซเดียมทาทเรต (KNa-tartrate) ลงไปที่ละน้อยจนครบ 600 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ใส่ขวดสีชาหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียม (Aluminium foil) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.1.2 สารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ค2

ตารางผนวกที่ ค2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายกลูโคส (มิลลิลิตร)
0	1.0	0
100	0.8	0.2
200	0.6	0.4
300	0.4	0.6
400	0.2	0.8
500	0.0	1.0

2.2 วิธีการ

- 2.2.1 ใส่สารละลายมาตรฐาน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร
- 2.2.2 ใส่สารละลายดีเอ็นเอสหลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (vortex mixer)
- 2.2.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
- 2.2.4 แช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที
- 2.2.5 ใส่น้ำกลั่น หลอดละ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม
- 2.2.6 นำไปวัดสีโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- 2.2.7 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น (standard curve) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟเส้นตรงที่ได้
- 2.2.8 เจือจางตัวอย่างโดยประมาณให้ความเข้มข้นอยู่ในระดับกราฟเส้นตรง
- 2.2.9 ดำเนินการตามข้อ 2.2.2-2.2.6

2.3 การคำนวณ

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(A_{540} \times \text{dil})/\text{slope}$

A_{540} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

dil = ค่าการเจือจางตัวอย่าง

slope = ค่าความชันจาก standard curve

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายอัครชัย ปริกมทะกุล
เกิดวันที่	8 มิถุนายน 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/รางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการสร้างกำลังคนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมระดับปริญญาโท (สกว.-สว.) ปี พ.ศ. 2550