



วิทยานิพนธ์

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นาริงิเนส
และการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

**SCREENING OF NARINGINASE-PRODUCING FUNGI AND
THEIR OPTIMIZATIONS FOR NARINGINASE PRODUCTION**

นางสาวกนกพรรณ ธรรมวัตร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นาริงจินเนสและการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

Screening of Naringinase-producing Fungi and Their Optimizations for Naringinase Production

นามผู้วิจัย นางสาวกนกพรรณ ธรรมวัตร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์กัษราพร วงศ์พิทยาพร, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์พงษ์สุดา ผ่องธัญญา, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์วิชชุพร จันทร์ศรี, Dr.Agr.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นาริงิเนส
และการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

Screening of Naringinase-producing Fungi and Their Optimizations for Naringinase Production

โดย

นางสาวกนกพรรณ ธรรมวัตร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

กนกพรรณ ธรรมวัตร 2550: การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินสและการปรับสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ปรชานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ภราพร วงศ์วิฑูรยาพร, ปร.ด. 159 หน้า

เอนไซม์นารินจินสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในการลดความขมของน้ำผลไม้โดยการกำจัดนารินจินซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่ทำให้ความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในปริมาณสูงซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอชต่ำแต่อุณหภูมิสูง และพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินสทำการแยกเชื้อราในระดับปฐมภูมิได้ 348 ไอโซเลทจาก 128 ตัวอย่าง ที่เก็บจาก 11 แหล่งในประเทศไทยและประเทศจีน โดยใช้อาหารคัดเลือกชนิดแข็ง การตรวจสอบระดับสุดท้ายโดยวิธีสลายนารินจินแสดงให้เห็นว่าส่วนในจากเชื้อรา 40 ไอโซเลท จาก 348 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิด synthetic minimal medium ที่มีนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร สลายนารินจินได้หมด ภายใน 23-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 การคัดเลือกระดับสุดท้ายมีผลของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นารินจินสและอัลฟา-แรมโนสซิเดสของเอนไซม์ดิบจาก 40 เชื้อรา ที่พีเอชต่ำและอุณหภูมิสูง เชื้อรา 4 ไอโซเลทถูกคัดเลือกและถูกจำแนกชนิดด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าเป็นเชื้อ *Aspergillus niger* ผลของการตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ดิบบ่งชี้ว่าแอกทิวิตีของทั้งเอนไซม์นารินจินสและอัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเอนไซม์ดิบของเชื้อรา PTK-BS1.4 และ PTK-BL9.1 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่ค่าพีเอชเดียวกัน ที่ 4.0 ขณะที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของทั้ง 2 เอนไซม์ของ PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 อยู่ที่ 3.0-4.0 และ 5.0-6.0 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของทั้ง 2 เอนไซม์ จาก PTK-BS1.4 PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 อยู่ที่อุณหภูมิเดียวกัน ที่ 60 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ PTK-BL9.1 อยู่ระหว่าง 60-70 องศาเซลเซียส ได้มุ่งเป้าในการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทั้งเอนไซม์นารินจินสและอัลฟา-แรมโนสซิเดสในอาหารเหลวของเชื้อราทั้ง 4 เชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทั้งเอนไซม์นารินจินสและอัลฟา-แรมโนสซิเดสจาก PTK-BS1.4 PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 คือ Czapek-Dox medium ที่มีนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ และมีแรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในปริมาณที่เหมาะสมคือ 3.75 กรัมต่อลิตรสำหรับทั้ง PTK-BS1.4 และ PTK-PS10 และ 5.0 กรัมต่อลิตรสำหรับ PTK-BL5.1 นอกจากนี้ สามารถใช้ไซโตลิมในเตรท หรือซอซยาเปปโตน อย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเพาะเลี้ยง PTK-BS1.4 PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 ในปริมาณที่เหมาะสมระหว่าง 1.25 ถึง 3.75 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยง PTK-BL9.1 คือ synthetic minimal medium ที่มีนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์และใช้เปปโตนแทนแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม 1.25 กรัมต่อลิตร

Kanokpan Thammawat 2007: Screening of Naringinase-producing Fungi and Their Optimizations for Naringinase Production. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Ms. Patjaraporn Wongvithoonyaporn, Ph.D. 159 pages.

Naringinase is an enzyme used for debittering of fruit juices by removal of naringin, the main bitter component of citrus fruit juices. This research is aimed to select fungi which was able to produce naringinase of high α -rhamnosidase-activity, well catalysing at low pH but high temperature, and optimize the media for naringinase production. Three hundred forty-eight fungal isolates were primarily screened for naringinase production from 128 various host samples, collected from 11 sources in Thailand and China, by using selective solid medium. Secondary screening performed by naringin hydrolysis showed that the culture filtrates from 40 fungal isolates, out of 348, cultivated in synthetic minimal medium containing 0.1% w/v naringin, completely hydrolysed naringin within 23-48 hours at pH 4.0, 40°C. Tertiary selection was based on the results of both naringinase and α -rhamnosidase catalysis of the crude enzymes from 40 fungi at low pH and high temperature. Four fungal isolates were selected and identified from base sequence analysis as *Aspergillus niger*. The results from the preliminary enzyme characterization indicated that both naringinase and α -rhamnosidase activities from crude enzymes of fungi PTK-BS1.4 and PTK-BL9.1 had the same optimum pH at 4.0, while the optimum pH for both activities of PTK-BL5.1 and PTK-PS10 were 3.0-4.0 and 5.0-6.0, respectively. The optimum temperature of both activities from PTK-BS1.4 PTK-BL5.1 and PTK-PS10 was the same at 60°C, while that of PTK-BL9.1 was in the range of 60-70°C. Study of the optimal media for both naringinase and α -rhamnosidase production in submerged fermentation of these 4 fungi was focused. The optimal medium for both naringinase and α -rhamnosidase production from PTK-BS1.4 PTK-BL5.1 and PTK-PS10 was Czapek-Dox medium containing 0.1% w/v naringin as an inducer and rhamnose as a supplemented carbon source at the optimum concentration of 3.75 g/l for both PTK-BS1.4 and PTK-PS10 and of 5.0 g/l for PTK-BL5.1. Moreover, either sodium nitrate or soya peptone could be used as a nitrogen source for cultivation of all fungi PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 and PTK-PS10 at the optimal concentration between 1.25-3.75 g/l. Whereas the suitable medium for cultivation of fungus PTK-BL9.1 was synthetic minimal medium containing 0.1% w/v naringin as an inducer and used peptone, instead of ammonium nitrate, as a nitrogen source at the optimum concentration of 1.25 g/l.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ภัชราพร วงศ์วิฑูรยาพร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พงษ์สุดา ผ่องธัญญา กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร.วิชชุพร จันทร์ศรี กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และอาจารย์ธรรณพ บรรณเจตเชิดชู ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิชัย โหมสิทธิ์ตัน และ ดร.เกษร ทวีเศษ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการส่งผลงานตีพิมพ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ โดยเงินงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับเงินสนับสนุนการทำวิจัยอีกส่วนหนึ่งจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการวิจัย 3 สาขา (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) รหัสโครงการวิจัย ว-ท (ค) 31.48 ชื่อโครงการ “การประยุกต์ใช้เอนไซม์ช่วยลดความขมของผลิตภัณฑ์จากผลไม้จำพวกส้ม” และขอขอบพระคุณคณะศิลปศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำงานวิจัย ตลอดจนเครื่องมือในการทดลอง ณ ห้องวิจัยสาขาชีวเคมี รวมทั้งสาขาจุลชีววิทยา และสาขาพฤกษศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้ให้อิสรภาพทางการศึกษาและเป็นความรัก กำลังใจที่ยิ่งใหญ่ให้แก่ข้าพเจ้า รวมทั้งน้องชาย และญาติที่มีพระคุณ ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ โดยเฉพาะคุณสุภาวิณี ปานสอาด และคุณพงษ์โรจน์ รัตนเสลานนท์ ที่คอยให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ตลอดมาจนการทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จด้วยดี พร้อมกันนี้ ข้าพเจ้าขอขอบคุณค่าที่พักมีอันเนื่องจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แต่มารดา บิดา คณาจารย์ที่ประสาทวิชาความรู้ตั้งแต่อดีตจนปัจจุบัน รวมทั้งผู้มีพระคุณทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

กนกพรรณ ธรรมวัตร

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	33
สรุปผลการทดลอง	111
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	117
ภาคผนวก	124
ภาคผนวก ก	125
ภาคผนวก ข	131

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	งานวิจัยการลดความขมของน้ำผลไม้ตระกูลส้มด้วยวิธีต่าง ๆ	11
2	จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเอส	14
3	ชนิดของตัวอย่างและจำนวนเชื้อราที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ	34
4	การเจริญของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ	42
5	ความสามารถในสลายสารนารินจินของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ	43
6	การเจริญของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะพีเอช 4.0 และ 3.0	44
7	ความสามารถในการสลายสารนารินจินของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะพีเอช 4.0 และ 3.0	45
8	ความสามารถในการสลายสารนารินจินของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกระดับทุติยภูมิ	46
9	ปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสของเชื้อรา 40 ไอโซเลท ที่ค่าพีเอช 3.0 และ 4.0 อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส	49
10	ลำดับเชื้อรา 10 ลำดับแรก ตามปริมาณเอนไซม์นารินจินเอส โดยพิจารณาจากหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (U/g dry cell weight) ที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 3.0 และ 4.0	53
11	ลำดับเชื้อรา 10 ลำดับแรก ตามค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์นารินจินเอส ที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 3.0 และพีเอช 4.0	54
12	ความถี่ในการติดลำดับ 10 ลำดับแรก เรียงตามความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นารินจินเอสที่สภาวะต่างๆ	55
13	ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 4.0 ของเชื้อรา 40 ไอโซเลท	57
14	กลุ่มของเชื้อราคัดเลือก 40 ไอโซเลท จัดแบ่งตามปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส	59
15	สรุปสมบัติของเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเอส	61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ของเอนไซม์ดิบแช่เยือกแข็งจากเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท	66
17	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหี่ยวที่เหี่ยวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินสจากเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 7 วัน	80
18	สรุปอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> ทั้ง 4 ไอโซเลท	116
ตารางผนวกที่		
1	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ที่มีในเอนไซม์ดิบรูปแช่เยือกแข็งของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท	132
2	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ที่ค่าพีเอช 3.0 ถึง 10.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท	134
3	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียสของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท	136
4	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร synthetic minimal medium และ Czapek-Dox medium	137
5	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ในเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ	138
6	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ในเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> เมื่อเติมแรมโนสความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ	142

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
7 ปริมาณเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ในเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ	146
8 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BS1.4	150
9 ผลของการเติมซอซยาเปปโตนความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BS1.4	151
10 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	152
11 ผลของการเติมกากถั่วเหลือง (soyabean meal) ความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	153
12 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟทความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	154
13 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-PS10	155
14 ผลของการเติมซอซยาเปปโตนความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-PS10	156

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
15 ผลของการเติมเปปโดนความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นารินจินัส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL9.1	157
16 ราคาต้นทุนการผลิตเอนไซม์นารินจินัส 1 ลิตร จากเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท	158

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างโมเลกุลของสารนารินจินและสารนารินจิน	7
2	ขั้นตอนการสลายสารนารินจินด้วยการทำงานของเอนไซม์นารินจินเอส	14
3	การทดสอบการสลายสารนารินจิน (Naringin hydrolysis)	39
4	ลักษณะเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทที่เจริญในอาหาร Sabouraud's dextrose agar	64
5	ลักษณะการเจริญของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทในอาหาร synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจินและปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0	65
6	ปริมาณเอนไซม์นารินจินเอส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสที่มีในเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งจากเชื้อราคัดเลือก	69
7	ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเอส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก	73
8	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเอส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก	76
9	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร synthetic minimal medium และสูตร Czapek-Dox medium ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์นารินจินของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน	83
10	ผลของการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BS1.4, PTK-BL5.1, PTK-BL9.1 และ PTK-PS10	86
11	ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BS1.4	91
12	ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	92
13	ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-PS10	93
14	ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้น 5 ถึง 25 กรัมต่อลิตร และการไม่เติมแรมโนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL9.1	94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิ- เดส และเอนไซม์นารินจินาส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BS1.4	97
16	ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิ- เดส และเอนไซม์นารินจินาส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	98
17	ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิ- เดส และเอนไซม์นารินจินาส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-PS10	99
18	ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิ- เดส และเอนไซม์นารินจินาส จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL9.1	100
19	ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อ การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BS1.4	103
20	ผลของการเติมซอซยาเปปโตนด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อ การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BS1.4	104
21	ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อ การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	105
22	ผลของการเติมกากถั่วเหลืองด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการ ผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	106
23	ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มี ต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL5.1	107
24	ผลของการเติมซอซยาเปปโตนด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อ การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-PS10	108
25	ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อ การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-PS10	109
26	ผลของการเติมเปปโตนด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิต เอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก <i>Aspergillus niger</i> PTK-BL9.1	110

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
PMSF	=	phenylmethanesulfonylfluoride
BSA	=	bovine serum albumin

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส และการปรับสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

Screening of Naringinase-producing Fungi and Their Optimizations for Naringinase Production

คำนำ

การผลิตน้ำผลไม้ในวงการอุตสาหกรรมพบว่า คุณภาพของวัตถุดิบและการรักษาความสดใหม่ของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ เป็นสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงพอๆ กับการลดต้นทุนการผลิตและค่าใช้จ่ายเกี่ยวเนื่อง โดยทั่วไปมักพบปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งในการผลิตน้ำผลไม้ โดยเฉพาะน้ำส้มและน้ำเกรปฟรุตคือ วัตถุดิบที่ป้อนเข้าสู่การผลิตจะมีความขม อันเนื่องจากสารจำพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืช ได้แก่ นารินจิน (naringin) ลิโมนิน (limonin) และนีโอเฮสเปอร์ดิน (neohesperidin) โดยนารินจินเป็นสารที่ให้ความขมมากที่สุดและพบได้มากที่สุดเช่นกันในผลไม้ส่วนใหญ่ การลดปริมาณสารนารินจินในน้ำผลไม้อาจใช้วิธีการต่างๆ ได้แก่ (1) การใช้สารดูดซับ (adsorptive debittering) (2) วิธีทางเคมี (3) การใช้เรซินชนิด polystyrene divinyl benzene styrene (DVB) ในการดูดซับให้ขม และ (4) การใช้เอนไซม์นารินจินเนส พบว่าวิธีการที่ 1 ถึง 3 จะมีข้อเสียและข้อจำกัดหลายประการ ข้อที่สำคัญที่สุดคือ คุณภาพของน้ำผลไม้ที่ได้เปลี่ยนไปทั้งในเชิงของคุณค่าทางโภชนาการ สี รสชาติ และความคงตัวของน้ำผลไม้ ดังนั้นการเลือกใช้เอนไซม์นารินจินเนสจึงน่าจะเป็นวิธีการที่ปลอดภัยและเหมาะสมในการผลิต

เอนไซม์นารินจินเนสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส (α -L-rhamnosidase) และเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส (β -D-glucosidase) โดยเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจะสลายสารนารินจินให้ผลิตผลเป็นสารพรุนิน (prunin) และน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) ในขั้นแรก ขั้นต่อมาเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสจะสลายสารพรุนินให้เป็นสารนารินเจนิน (naringenin) และน้ำตาลกลูโคสในขั้นสุดท้าย เมื่อเปรียบเทียบสารทั้ง 3 คือ นารินจิน พรุนิน และนารินเจนิน พบว่า สารพรุนินให้ความขมน้อยที่สุด และสารนารินเจนินมีความขมเป็น 1 ใน 3 ส่วนของสารนารินจิน ดังนั้นการลดความขมของน้ำผลไม้ที่ได้ผลมากที่สุดโดยการใช้เอนไซม์นารินจินเนส คือ การใช้เอนไซม์นารินจินเนสที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในปริมาณสูง เพื่อย่อยสลายนารินจินในขั้นแรกเท่านั้น

เอนไซม์นารินจินเนสสามารถสกัดได้จากพืชและจุลินทรีย์ แต่พืชเป็นแหล่งที่มีเอนไซม์ในปริมาณน้อย มีรายงานว่าเชื้อราหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ปริมาณพอควร เช่น *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อราเหล่านี้จะมีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสในปริมาณสูง

การศึกษานี้จึงเป็นการสืบค้นและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์นารินจินเนสโดยมีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในปริมาณสูง รวมทั้งมีสมบัติอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจริง เช่น ค่าพีเอชและ/หรืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ฯลฯ และปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสของเชื้อราที่ถูกคัดเลือก เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมให้ได้ปริมาณสูงและประยุกต์ใช้ในการลดความขมของน้ำผลไม้ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อประเทศในด้านเศรษฐกิจ ลดการสูญเสียเงินตราอันเนื่องจากการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์นารินจินเนสโดยมีเอกทิวทิของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในปริมาณสูงและมีสมบัติในการสลายความขมตามต้องการ
2. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้น
3. เพื่อปรับสภาวะการเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส

การตรวจเอกสาร

1. น้ำผลไม้ตระกูลส้ม

น้ำผลไม้เป็นอุตสาหกรรมการเกษตรแปรรูปประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญต่อประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่ผลผลิตผลไม้สดมีปริมาณมากเกินไปเกินความต้องการของตลาด ซึ่งทำให้ระดับราคตกต่ำ และเกิดความสูญเสียจากการเน่าเสียได้ง่าย ดังนั้นการนำผลไม้สดดังกล่าวมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตรให้สูงขึ้น และลดความเสียหายที่เกิดจากข้อจำกัดของอายุการเก็บรักษาลง

พืชตระกูลส้ม (citrus fruit) เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญ ปลูกได้ตลอดปี และเป็นที่ยอมรับไปทั่วโลกมาก เนื่องจากมีสีที่ดึงดูดใจ กลิ่นรสพิเศษเฉพาะตัว และที่สำคัญคือ เป็นแหล่งของวิตามินซี ดังนั้นพืชตระกูลส้มจึงเป็นผลไม้ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตน้ำผลไม้กันอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม ผลไม้ที่จัดอยู่ในพืชตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มพันธุ์ต่าง ๆ อาทิ พันธุ์เนเวล (navel orange) พันธุ์วาเลนเซีย (Valencia orange) พันธุ์แมนดาริน (mandarin) พันธุ์นัตซึไดได (natsudaidai) ฯลฯ เกรปฟรุ๊ต (grapefruit) เลมอน (lemon) มะนาว (lime) และส้มโอ (pummelo) (อรพิน, 2534) สำหรับน้ำผลไม้ตระกูลส้ม หมายถึง น้ำผลไม้สกัดจากพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มเกรปฟรุ๊ต มะนาว เป็นต้น (ปราณี, 2547)

ประเทศไทยมีการส่งออกสินค้าเครื่องดื่มน้ำผลไม้แปรรูปจากผลไม้ตระกูลส้มไปยังตลาดโลกคิดเป็นมูลค่า 95.8 และ 101.9 ล้านบาทในปี พ.ศ. 2547 และ 2548 ซึ่งมีอัตราการขยายตัวในการส่งออกของปี พ.ศ. 2547 และ 2548 เท่ากับ -23.53 และ 6.37 ตามลำดับ (ที่มา: ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร)

2. ความขมในน้ำผลไม้

พบความขมในสารประกอบหลายชนิดซึ่งเป็นรสชาติที่ไม่เป็นที่ต้องการในกระบวนการผลิตและแปรรูปผลไม้ โดยระดับความขมจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ปลูก (cultivar) สายพันธุ์ (strain) และความสุกของพืชผักและผลไม้ รวมทั้งสภาวะในการจัดเก็บ (Drewnoski and Carneros, 2000) โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมส้มพบปัญหาที่สำคัญคือ รสขมที่เกิดขึ้นในน้ำส้มและผลิตภัณฑ์จากส้ม ความขมจะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งระดับความขมที่สูงมากเกิดเนื่องมาจากการมีสาร

นารินจินและลิโมนอยด์เป็นหลัก เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์ถูกตีกลับ ผลไม้ในตระกูลส้มเป็นผลไม้ที่มักพบสารประกอบที่ให้ความขมดังกล่าวในการแปรรูปเป็นน้ำผลไม้ โดยเฉพาะในน้ำเกรปฟรุต (*Citrus paradisi*) จะมีปริมาณความขมสูงเนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดนารินจิน (Johnson, 1988) ในน้ำส้มคั้นใหม่ ๆ จะไม่มีรสขม แต่ถ้าตั้งทิ้งไว้นานๆ หรือได้รับความร้อนจะเกิดรสขมขึ้นทันที รสขมเพียงเล็กน้อยเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อกลิ่นรสในน้ำส้ม ซึ่งถ้ามีมากเกินไปย่อมไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (ปราณี, 2547) สารให้รสขมส่วนใหญ่จะอยู่ตามเปลือกชั้นใน พนักกลีบส้ม และเมล็ด ดังนั้นถ้าปอกเปลือกส้มด้วยมือ สารให้รสขมส่วนใหญ่จะถูกจัดออกไปกับเปลือก แต่วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ช้าและสิ้นเปลืองแรงงาน การผลิตในระดับอุตสาหกรรมมักใช้วิธีปอกเปลือกโดยใช้สารละลายต่าง ใช้เครื่องบีบอัด ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะได้ น้ำส้มที่มีรสขม (อรพิน, 2534) นอกจากจะพบความขมในผลิตภัณฑ์จากผลไม้ตระกูลส้มแล้ว ยังพบสารให้ความขมในผลไม้ชนิดอื่นซึ่งใช้ผลิตน้ำผลไม้ ได้แก่ แอปเปิ้ล เชอร์รี่ องุ่น ฝรั่ง มะนาว สับปะรด ลูกพลัม (prune) มะเขือเทศ และผลไม้จำพวกเบอร์รี่ (berry fruits) เช่น แบล็กเบอร์รี่ (blackberry) บลูเบอร์รี่ (blueberry) แครนเบอร์รี่ (cranberry) เคอแรนท์ (currant) ราสเบอร์รี่ (raspberry) และสตรอเบอร์รี่ (strawberry) สำหรับผลไม้ที่ใช้ผลิตน้ำดื่มที่ให้กลิ่นและรสต่างๆ (nectar) ก็มีความขมเช่นกัน ซึ่งได้แก่ แอปเปิ้ล แอปริคอต ทาลูว เชอร์รี่ ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ พืช แพร์ สับปะรด พลัม และลูกพรุน เป็นต้น (Johnson, 1988) และยังพบความขมในการแปรรูปน้ำองุ่น (*Vitis vinifera* L.) เป็นไวน์ขาวอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบความขมในพืชหลายชนิด เช่น มันฝรั่งและมันเทศ พืชตระกูลถั่ว กระหล่ำปลี และผักคะน้า พืชตระกูลแตง ฟักทอง ผักกาดหอม และผักขม เป็นต้น (Drewnoski and Careros, 2000)

3. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างคาร์บอนของฟลาโวน (flavone) โดยจะพบฟลาโวนอยด์ในทุกส่วนของพืช ได้แก่ ลำต้น ราก ผล ดอก ละอองเกสร เมล็ด เปลือกไม้ และเนื้อไม้ (Hendrix and Redd, 1995) นอกจากจะพบในพืชแล้ว ฟลาโวนอยด์ยังเป็นสารประกอบที่พบในจุลินทรีย์และเซลล์สัตว์ หน้าที่ของสารประกอบชนิดนี้ในพืชจะเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช (Manthey *et al.*, 2002) ได้แก่ เป็นตัวกรองแสงอัลตราไวโอเลต (Li *et al.*, 1993) เป็นสารเคมีที่ส่งสัญญาณสำหรับการตรึงไนโตรเจน (Baker, 1992) และการติดต่อกับเชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhizal relationship) นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ยังมีความสำคัญในการต่อต้านการเกิดโรคโดยฟลาโวนอยด์ชนิดไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) ในพืชบางชนิด (Dixon and

Paiva, 1995) และเป็นตัวควบคุมสรีรวิทยาภายใน (internal physiological regulators) หรือตัวส่งสัญญาณเคมี (chemical messengers) ในพืช (Woo *et al.*, 2002)

โดยทั่วไปสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชจะอยู่ในรูปของโมเลกุลคาร์บอนที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ (glycosides) ฟลาโวนอยด์ที่พบในผลไม้แบ่งได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ (1) ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เควอเซทิน-ไกลโคไซด์ (quercetin glycoside) ในแอปเปิ้ล ลูกพลัม และองุ่น (Hendrix and Redd, 1995) (2) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุสีแดงและสีน้ำเงิน อนุพันธ์ของแอนโทไซยานินพบในองุ่น เช่น ไซยานิดิน (cyanidin) พีโอนิดิน (peonidin) พีทูนิดิน (petunidin) มาลวิดิน (malvidin) และเดลฟิnidin (delphinidin) (Singleton, 1988) (3) ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูทีโอลิน (luteolin) ในเปลือกมะนาว และ (4) ฟลาโวนอน (flavonones) เช่น เฮสเปอร์ดินในส้ม และนารินจินในเกรปฟรุต

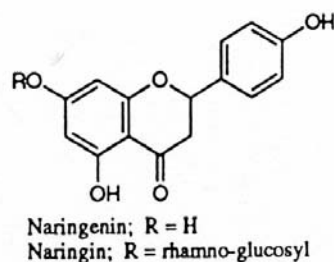
พบว่าสารฟลาโวนอนจะมีผลต่อสีของผลไม้ตระกูลส้ม ขณะที่สารจำพวกแอนโทไซยานินจะมีผลต่อสีของผลไม้ประเภทแบล็กเคอแรนท์ (blackcurrent) และแบล็กเบอรี่ (blackberry) (Hendrix and Redd, 1995) รวมทั้งเป็นฟีนอลที่สำคัญในไวน์แดง (Singleton, 1988) แอนโทไซยานินจะไม่ปรากฏอยู่อย่างอิสระแต่จะอยู่ในรูปของไกลโคไซด์ในองุ่นหรือไวน์ ซึ่งแอนโทไซยานินนี้จะมีการสะสมโดยมากภายในผนังชั้นนอกของกลีบดอก จนกระทั่งมีการบานของดอกซึ่งเป็นการสร้างสีเพื่อดึงดูดแมลงและสารเคมีอื่นๆ สำหรับการผสมเกสร (Woo *et al.*, 2002)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบที่ได้รับความสนใจทั้งในด้านเศรษฐกิจและเทคนิคในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ เนื่องจากฟลาโวนอยด์ชนิดนารินจินเป็นสาเหตุทำให้เกิดความขมในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเกรปฟรุต ส่วนเฮสเปอร์ดินจะไม่ทำให้เกิดความขมแต่สามารถจะทำให้เกิดตะกอนกับอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต ได้แก่ lines, heat exchangers and evaporators และมีผลทำให้ USDA grade score ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่กำหนดคุณภาพของน้ำผลไม้มีค่าน้อยลง (Hendrix and Redd, 1995) สำหรับปริมาณนารินจินในน้ำผลไม้ตระกูลส้มไม่มีการกำหนดค่ามาตรฐาน USDA (The U.S. Department of Agriculture) แต่จะรายงานความขมของนารินจินเป็นคะแนนของรสชาติ (flavor scores) อย่างไรก็ตาม กฎหมายของฟลอริดา (Florida Department of Citrus 1975) มีข้อกำหนดให้น้ำเกรปฟรุตเกรดเอต้องมีปริมาณนารินจินต่ำกว่า 600 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ขณะที่เกรดบีต้องมีปริมาณนารินจินต่ำกว่า 750 ส่วนในล้านส่วน (Kimball, 1999)

4. สารนารินจิน (Naringin)

นารินจินเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 580.53 มีสูตรเคมี $C_{27}H_{32}O_{14} \cdot 2H_2O$ (4,5,7-Trihydroxy-flavanone 7-rhamnoglucoside) นารินจินบริสุทธิ์จะมีลักษณะเป็นผงสีเหลือง มีความขมมาก สารนารินจินเกิดจากการเชื่อมกันของน้ำตาลกับสารนารินเจนินซึ่งมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลดังภาพที่ 1

สารนารินจินเป็นสารขมที่ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1857 โดย De Vry พบในเนื้อเยื่อทุกส่วน และพบมากในดอกต้นเกรปฟรุต (Sinclair, 1972) นารินจินมาจากคำว่า *narangi* (Marathi, *naangi*) ในภาษาสันสกฤต ซึ่งมีความหมายว่า “ส้ม” สารนารินจินสามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ อะซิโตน และน้ำร้อน สามารถตรวจพบความขมของนารินจินได้เมื่อมีสารนารินจิน 1 ส่วน ละลายอยู่ในน้ำ 50,000 ส่วน (Braverman, 1949)



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของสารนารินจินและสารนารินเจนิน

ที่มา: <http://www.ijmt.net/4-2/figure3.jpg>

นารินจินเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างจากฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นคือ โครงสร้างโมเลกุลหมู่ R จะเป็นคาร์โบไฮเดรต (Kimball, 1999) สารนารินจินพบมากในส้มกลุ่มเกรปฟรุต (*Citrus paradisi* MacFad.) ส้มโอ (*Citrus grandis* L.) และส้มเปรี้ยว (*Citrus aurantium*) Poore (1934) พบสารนารินจิน 0.06 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเกรปฟรุต ในน้ำส้มจะพบเฮสเปอร์ดินในปริมาณสูงกว่านารินจิน ทำให้มีผลต่อรสชาติของน้ำส้ม Fry และคณะ (1995) พบว่าในน้ำส้มจากส้มพันธุ์ Israeli แท้ จะมีปริมาณนารินจินอยู่ในช่วง 3-15 ส่วนในล้านส่วน แต่ในส้มเขียวหวาน (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) และส้มในสปีชีส์อื่นๆ จะพบฟลาโวนอยด์หลักคือเฮสเปอร์ดินซึ่งจะมีรสขมน้อยและไร้กลิ่น สำหรับในเกรปฟรุต (*Citrus paradisi* Macf.) จะพบสารนารินจินเป็นส่วนใหญ่

โดยพบในเยื่อหุ้มเซลล์และอัลบีโด (albedo) ในผลไม้ทั่วไป อันเป็นสาเหตุทำให้เกิดความขมในผลไม้สดและน้ำของผลไม้ชนิดนั้นๆ ปริมาณนารินจินที่ไม่ก่อให้เกิดความขมจะมีค่าประมาณ 50 ส่วนในล้านส่วน แต่โดยทั่วไปมักพบในปริมาณ 500 ส่วนในล้านส่วน และบางครั้งอาจพบได้สูงกว่า 900 ส่วนในล้านส่วน (Kimball, 1999) ซึ่งในกระบวนการผลิตน้ำเกรปฟรุตจะพบปริมาณสารนารินจินสูงกว่า 50 ส่วนในล้านส่วน และจะพบลิโมนิน (limonin) ในกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ในลักษณะที่มีการทำงานร่วมกันกับนารินจินทำให้เกิดความขมอย่างรุนแรง (Puri and Banerjee, 2000) นอกจากนี้ยังพบสารนารินจินมากในผลไม้ที่ยังไม่สุกดี (immature fruit) เมื่อผลไม้สุก ระดับความเข้มข้นของสารนารินจินจะลดลง (Yusof *et al.*, 1990)

นารินจินเป็นสารที่ให้ความขมมากที่สุดในการประกอบฟลาโวนอนที่พบในเกรปฟรุต พบว่าฟลาโวนอนในอัลบีโดช่วงแรกที่จะพบจะไม่มีอะไกลโคน (aglycones) อิสระ แต่จะพบในรูปแบบที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ต่ออยู่กับนีโอเฮสเปอริดิน (neohesperidin) หรือรูติโนส (rutinose) ในเวลาต่อมาจะเกิดไกลโคไซด์ (glycosides) ซึ่งจะมีรสขมและทำให้ผลไม้ไม่มีรสขม ดังเช่น 7- β -neohesperidoside ที่พบในเกรปฟรุต เป็นผลให้เกรปฟรุตมีรสขม อย่างไรก็ตาม อนุพันธ์ชาโลน (chalcone) และไดไฮโดรชาโลน (dihydrochalcone) ของนารินจินจะมีความหวานสูง (Shewfelt, 1986) โดยอนุพันธ์ไดไฮโดรชาโลนของฟลาโวนอยด์ชนิดนารินจิน และนีโอเฮสเปอริดินมีความหวานอย่างมาก สำหรับอนุพันธ์ไฟโลดูลซิน (phylodulcin) ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับฟลาโวนอนหรือฟลาโวน จะให้ความหวานและรสชาติคล้ายคลึงกับอนุพันธ์ไดไฮโดรชาโลน ในการทดสอบความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสารประกอบในกลุ่มนี้เมื่อใช้วิธี multifaceted approaches ควบคู่กับการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโดยใช้รังสีเอกซ์ (X-ray crystal structure analysis) และการคำนวณค่าทางพลังงาน (energy calculation) แล้วเปรียบเทียบหาโครงสร้างในรูปผลึก พบว่าอนุพันธ์ไดไฮโดรชาโลนของนารินจินจะมีโครงสร้างรูป “J” ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของไดไฮโดรชาโลนที่เหยียดเต็มที่ (fully-extended dihydrochalcone moiety) ในขณะที่อนุพันธ์ไดไฮโดรชาโลนของนีโอเฮสเปอริดิน ซึ่งมีโครงสร้างส่วนใหญ่คล้ายคลึงกับอนุพันธ์ไดไฮโดรชาโลนของนารินจิน แต่มีความแตกต่างที่โครงสร้างของไดไฮโดรชาโลน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จัดอยู่ในกลุ่มของไดไฮโดรชาโลนที่เหยียดออกเป็นบางส่วน (partially-extended dihydrochalcone moiety) (Shin *et al.*, 1995)

5. การกำจัดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม

ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ต้องจัดการกับวัตถุดิบที่มีจำนวนมากและมีคุณภาพที่แตกต่างกันและในการผลิตต้องมีต้นทุนต่ำ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังคงไว้ซึ่งคุณภาพและความสดใหม่

(Grassin and Fauquembergue, 1996) พบว่าสารประกอบหลักที่ให้รสขมในน้ำส้ม ได้แก่ สารนารินจิน (naringin) ลิโมนิน (limonin) และนีโอเฮสเปอริดิน (neohesperidin) โดยพบสารที่ให้ความขมเหล่านี้ได้ในทุกส่วนของเกรปฟรุตและส้มเปรี้ยว และจะพบนารินจินซึ่งเป็นสารที่ให้ความขมมากที่สุดและเป็นส่วนประกอบหลักในเกรปฟรุต

ความขมเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในด้านการยอมรับทางการตลาดของอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ ดังนั้นจึงมีนักวิจัยสนใจและพยายามแก้ไขปัญหเกี่ยวกับสารขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้มอยู่เรื่อยมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1968 จนถึงปัจจุบัน และด้วยวิธีการต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งการลดปริมาณสารนารินจินในน้ำผลไม้สามารถทำได้โดยวิธีการต่างๆ โดยสรุป ดังนี้

5.1 การใช้สารดูดซับ (adsorptive debittering)

5.2 วิธีการทางเคมี (chemical method)

5.3 การใช้เรซินชนิด polystyrene divinylbenzene styrene (DVB)

5.4 การใช้เอนไซม์ ซึ่งสามารถกระทำได้ 2 ทาง คือ

5.4.1 การใช้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบในน้ำส้ม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของน้ำส้ม เกิดการตกตะกอนของสารให้รสขม ดังเช่น น้ำตาลและเพกทินเป็นองค์ประกอบในน้ำส้มที่มีอิทธิพลต่อการละลายผลึกของลิโมนิน เมื่อใช้เอนไซม์เพกทิเนส (pectinase) ไปย่อยสารประกอบเพกทินในน้ำส้ม ทำให้สารที่แขวนลอยอยู่ตกตะกอน และดึงเอาสารให้รสขมตกตะกอนลงมาด้วย

5.4.2 การใช้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารให้รสขมคือ สารนารินจินที่มีอยู่ในน้ำส้ม แล้วเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ให้รสขม หรือรสขมน้อยลง โดยใช้เอนไซม์นารินจินเอส

พบว่าวิธีการที่ 5.1-5.3 มีข้อเสียและข้อจำกัดหลายประการ ดังนี้

1.) ต้องมีการกำจัดน้ำมัน ไช กาก ในน้ำผลไม้ และทำการผสมองค์ประกอบดังกล่าวรวมกันในสัดส่วนพอเหมาะ ร่วมกับการลดความขมและการทำให้น้ำผลไม้ใส ซึ่งการใช้วิธีการดังกล่าวไม่สะดวกต่อการผลิต

2.) คอลัมน์ที่ใช้ในการดูดซับ (adsorption columns) จะถูกเปลี่ยนรูปด้วยสารละลายอัลคาไลน์เจือจางเพื่อนำกลับมาใช้ต่อเนื่อง ซึ่งส่งผลกระทบต่อลักษณะเนื้อ (organoleptic properties) และคุณภาพของน้ำผลไม้ (Puri and Banerjee, 2000) โดยสูญเสียความเป็นกรด ความหวาน รสชาติ และเกิดความขุ่น เนื่องจากการขาดประสิทธิภาพของการใช้สารดูดซับความขม (Chien *et al.*, 2001)

3.) วิธีการที่ใช้อาจจะเปลี่ยนองค์ประกอบของน้ำผลไม้โดยปฏิกิริยาเคมีหรือการเปลี่ยนแปลง คุณค่าทางโภชนาการ สี และรสชาติ

4.) วิธีการที่ใช้อาจไม่มีความจำเพาะและไม่มีประสิทธิภาพ

5.) วิธีการในขั้นตอนการสกัดมีผลต่อผลผลิต คุณภาพและสมบัติของน้ำผลไม้ที่ผลิตได้ เช่น ในการสลายสารนารินจินด้วยกรด ผลผลิตที่ได้้นอกจากแรมโนสและกลูโคสแล้วยังได้อะไกลโคน (aglycon) และนารินเจนิน ดังนั้นการสลายด้วยกรดเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตในเชิงการค้า ทำนองเดียวกันภายใต้สภาวะที่มีการคัดเลือกพีเอชและอุณหภูมิ การใช้สารดูดซับประเภท activated charcoal สามารถกำจัดสารนารินจินออกจากสารละลายโดยส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า สารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรส รวมทั้งกลิ่นที่ต้องการจะถูกกำจัดไปในเวลาเดียวกันด้วย

ดังนั้น การใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารนารินจินน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการกำจัดสารให้ความขมมากกว่าวิธีที่กล่าวมาข้างต้น การใช้เอนไซม์ไม่เพียงแต่ลดความขมได้อย่างรวดเร็ว แต่ทำให้เกิดมลภาวะระหว่างการดำเนินการน้อยกว่าด้วย พบว่าการใช้เอนไซม์ในการลดความขมได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Puri and Banerjee, 2000) เอนไซม์นารินจินเนสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตน้ำส้มและน้ำเกรปฟรุตเพื่อลดความขมและทำให้น้ำผลไม้ใส

ตารางที่ 1 งานวิจัยการลดความขมของน้ำผลไม้ตระกูลส้มด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีลดสารขม และวิธีลดความขม	รายงานการวิจัยและ/หรือเทคนิคที่ใช้	คณะผู้วิจัย
1. วิธีตกตะกอน (ด้วยบทบาทเอนไซม์)	ทำโดยการใช้เอนไซม์เพ็กทินเอสลายสารเพ็กทินในน้ำผลไม้ให้เล็กลงจนเพ็กทินตกตะกอนพร้อมกับสารขม	Chandler (1971)
2. วิธีการดูดซับ	ใช้เซลลูโลสเอสเทอร์ กำจัดลิโมนินได้ร้อยละ 44-70 ในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง	Chandler (1977)
	ใช้เซลลูโลสอะซิเตตดูดซับสารลิโมนินได้ประสิทธิภาพสูงกว่าและสะดวกขึ้น แยกเซลลูโลสอะซิเตตได้ง่าย รวมทั้งใช้ซ้ำได้ แต่มีข้อเสียเพราะจะดูดซับกรดซิตริกไปด้วย	Johnson <i>et al.</i> (1983)
	ใช้พอลิเมอร์เรซินดูดซับลิโมนินได้ประสิทธิภาพไม่สูง ผู้ทดสอบยังรู้สึกขม (น้อยกว่า 6 ส่วนในล้านส่วน)	Chandler (1968)
	ใช้ polyvinylpyrrolidone (PVP) ดูดซับสารลิโมนินและสารนารินจินได้ถึงร้อยละ 78.1 และ 17.5 ตามลำดับ ในเวลา 1 ชั่วโมง	Nisperose <i>et al.</i> (1982)
	ใช้ β -cyclodextrin ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพ พบว่าสามารถลดสารขมได้ถึงร้อยละ 50	Shaw <i>et al.</i> (1984)
	ใช้ Amberlite XAD-7 ดูดซับสารนารินจินได้ร้อยละ 63 สำหรับสารลิโมนินได้ร้อยละ 85 เมื่อใช้สารดูดซับ 20 กรัมต่อน้ำผลไม้ 1 ลิตร ใน 1 ชั่วโมง แต่ต้องสูญเสียกรดในน้ำผลไม้ร้อยละ 3 อย่างไรก็ตาม ยังต้องพิจารณาการอนุญาตให้ใช้ในอาหารตามกฎหมายของ US.FDA ด้วย	Johnson and Chandler (1982)
	ใช้ Florisil หรือ activated magnesium silicate สามารถดูดซับจนผลิตภัณฑ์เป็นที่ยอมรับ รวมทั้งไม่ทำให้เกิดการสูญเสียวิตามินซี แต่มีรายงานว่า ผู้บริโภครู้สึกขมจากสารนารินจินที่ความเข้มข้น 600 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งค่อนข้างสูง	Barmore (1986)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วิธีลดสารขม และวิธีลดความขม	รายงานการวิจัยและ/หรือเทคนิคที่ใช้	คณะผู้วิจัย
2. วิธีการดูดซับ	ใช้เปลือกไข่ซึ่งเป็นสารชีวภาพมีส่วนของโปรตีนมิวโค-โพลีแซคคาไรด์และแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นองค์ประกอบหลัก สามารถลดสารลิโมนินได้ถึงร้อยละ 70 ประสิทธิภาพการดูดซับสารขมต่ำกว่าสารดูดซับสังเคราะห์ แต่มีความปลอดภัยในการใช้งาน	ณัฐภา ปรานี สุหรัย (2540a, 2540b)
3. การใช้สารเคมี	ใช้อนุพันธ์ของ triethylamine ยับยั้งการสังเคราะห์สารลิโมนอยด์ในปฏิกิริยาที่ใช้ปลูกต้นไม้	Hasegawa (1976)
4. การใช้สารบั้งรสขม (Bitterness modulators)	ใช้สาร neodiosamin (NEO) และสารนี้ไม่มีรสขม ใช้น้ำตาลซูโครส หรือสาร neohesperidin dihydrochalcone (NHD) aspartylphenylalanine methylester (AP) และกรดซิตริก	Guodogni (1976) Bruemmer (1980)
5. การใช้เอนไซม์	ใช้เอนไซม์ limonin dehydrogenase ย่อยสลายลิโมนิน ให้เซลล์ตรึงรูปของ <i>Corynebacterium fascians</i> ซึ่งมีเอนไซม์ limonin dehydrogenase โดยตรึงรูปเซลล์ด้วยวิธีห่อหุ้มในแคปซูลการจีแนน เพื่อทดลองลดปริมาณสารลิโมนินในน้ำมะนาวสด โดยได้รับความอนุเคราะห์เซลล์ <i>Corynebacterium fascians</i> จาก Dr. A.J. Lyons แห่ง USDA ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ Dr. Hasegawa และคณะใช้ทดลองลดลิโมนอยด์ในน้ำเกรปฟรุต พบว่าสามารถลดสารลิโมนอยด์ได้ถึง 42 เปอร์เซ็นต์ จากเดิม 12.21 ส่วนในล้านส่วน เหลือเพียง 7.07 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งผู้บริโภคมักรู้สึกขม	Hasegawa (1984)

ที่มา: ปรานี (2547)

เอนไซม์นารินจินเนสประกอบด้วยเอนทิโมของเอนไซม์แรมโนซิเดส (rhamnosidase) และกลูโคซิเดส (glucosidase) ที่ทำงานต่อเนื่องกัน มีรายงานการใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการลดความขมของน้ำเกรปฟรุตในบางประเทศ พบว่าได้ผลดี (Grassin and Fauquembergue, 1996)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการใช้ระบบเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme system) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) และเอนไซม์โพลีกลาแลกทูโรเนส (polygalacturonase) ที่ถูกตรึงรูปพร้อมกับ (co-immobilized) เอนไซม์นารินจินเนส ถูกนำมาใช้ในกระบวนการต่างๆ ของการผลิตน้ำจากพืชผักและผลไม้ ผลผลิตจากระบบการตรึงรูปร่วมกันยังทำให้เกิดการย่อยสลายของแป้งและโปรตีน รวมทั้งทำให้น้ำผลไม้ใสได้รวดเร็วกว่าการใช้ระบบตรึงรูปแบบอิสระซึ่งเตรียมจากเอนไซม์อะไมเลส (amylase) และเอนไซม์เพ็กทิเนส (pectinase) แยกกัน (Puri and Banerjee, 2000)

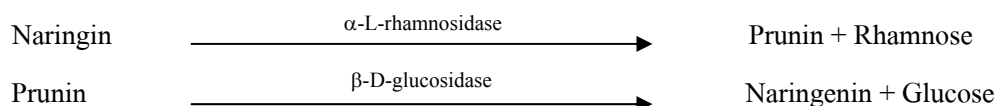
จากการประชุมของ Food technologists ประจำปี 1998 ณ มหาวิทยาลัยคอร์เนล ได้รายงานวิธีการที่ได้ผลอย่างมากในการกำจัดสารให้ความขม โดยใช้เอนไซม์นารินจินเนสที่ตรึงรูปกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate) ในขั้นตอนการห่อผลไม้ พบว่าวิธีนี้สามารถกำจัดความขมของสารนารินจินและสารลิโมนินได้โดยการดูดซับสารจำพวกนี้จากเซลลูโลสอะซิเตท (Kimball, 1999) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการตรึงรูปเอนไซม์นารินจินเนสที่ได้จากเชื้อรา *Penicillium* sp. ด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสอะซิเตท พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดความขมได้ถึง 23 เปอร์เซ็นต์ (Soares and Hotchkiss, 1998) ขณะที่ Prakash และคณะ (2002) ทำการตรึงรูปเอนไซม์นารินจินเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* บนโคโพลิเมอร์ (copolymer) ของสไตรีน (styrene) และมาลิก แอนไฮไดรด์ (maleic anhydride) เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารนารินจินในน้ำเกรปฟรุต พบว่าสามารถกำจัดความขมได้สูงสุดถึง 75 เปอร์เซ็นต์

6. เอนไซม์นารินจินเนส (Naringinase)

6.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนส

นารินจินเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิเดส (glycosidase) ที่ประกอบด้วยแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส (α -rhamnosidase; EC 3.2.1.40) และเอนไซม์ฟลาโวนอยด์ บีต้า-กลูโคซิเดส (flavonoid- β -glucosidase; EC 3.2.1.21) ที่ทำงานต่อเนื่องกัน จากกระบวนการสลายพบว่าเอนไซม์นารินจินเนสจะเปลี่ยนสารนารินจินให้เป็นสารนารินจินินด้วย 2 ขั้นตอน โดยเริ่มต้นด้วยขั้นตอนการสลายนารินจิน ($4'$ - $5'$, $7'$ -trihydroxyflavonone-7-rhamnoglucoside) จะถูกสลายโดยแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เพื่อให้ผลผลิตเป็นสารพรูนิ ($4'$ - $5'$, $7'$ -trihydroxyflavonone-7-glucoside) ขั้นตอนต่อมาจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารนารินจินิน ($4'$ - $5'$, $7'$ -trihydroxyflavonone) ด้วยแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟลาโวนอยด์ บีต้า-กลูโคซิเดส (ภาพที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบสารทั้ง 3 ชนิดคือนารินจิน พรูนิ และนารินจินิน พบว่านารินจินินเป็นสารที่มีความขมเป็น 1 ใน 3 ส่วนของสาร

นารินจิน ส่วนสารพรุณินเป็นสารที่ให้ความขมนที่น้อยกว่าสารนารินเจนนิน รวมทั้งเป็นสารตัวแรกที่ได้จากการสลายด้วยเอนไซม์นารินจินเนส และสารนารินจินเป็นสารที่มีความขมสูงที่สุด จึงเป็นสารที่สำคัญในขั้นตอนการกำจัดความขม



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการสลายสารนารินจินด้วยการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนส

6.2 การผลิตเอนไซม์นารินจินเนส

ในอดีต เราผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากพืช ได้แก่ เมล็ดคั้นชาวยและใบเกรปฟรุต (Puri and Banergee, 2000) แต่จากการศึกษาของกนกพรณ (2546) ได้ทำการตรวจสอบปริมาณและสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์นารินจินเนสในเมล็ดพืชและเนื้อผลของพืชจำนวน 30 ชนิด พบว่าพืชมีปริมาณเอนไซม์นารินจินเนสต่ำ ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อ ณ ปัจจุบัน สามารถผลิตเอนไซม์นารินจินเนสได้จากจุลินทรีย์ มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ชนิดนี้ในเชื้อราหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อราเหล่านี้ จะมีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส โดยเอนไซม์ทั้ง 2 แอกทิวิตีจะไปสลายสารนารินจินให้กลายเป็นสารที่ให้ความขมน้อยกว่าคือ สารนารินเจนนินและสารพรุณิน (Wiseman *et al.*, 1998)

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส

จุลินทรีย์	อ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. usamii</i>	Bram and Solomon, 1965; Kichi, 1955
<i>Cochiobolus miyabeanus</i>	Ito and Takiguchi, 1970
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	Nomura, 1965
<i>Penicillium decumbens</i>	Fukumoto and Okado, 1973
<i>Phanopsis citri</i>	Ito and Takiguchi, 1970
<i>Rhizotonia solani</i>	Ito and Takiguchi, 1970
<i>Rhizopus nigricans</i>	Shanmugam and Yadav, 1995

การใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์นารินจินเนสสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้ง 2 แบบคือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) และการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (solid-state fermentation)

6.2.1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture)

เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ซึ่งจะมีแหล่งคาร์บอนและธาตุอาหารอื่นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนั้นสามารถเพาะเลี้ยงได้ในถังหมัก (fermentor) ซึ่งจะสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ เช่น พีเอช การให้อากาศ และอุณหภูมิ และจะใช้พื้นที่น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid substrate fermentation) (Moo-Young *et al.*, 1975) จุลินทรีย์จำนวนมากถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส Thomas และคณะ (1958) ตรวจสอบสารสกัดจากเซลล์จุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์นารินจินเนส พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน (optimum pH) ที่พีเอช 5.0-6.0 และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีการสูญเสียแอกทิวิตีของเอนไซม์เพียง 16 เปอร์เซ็นต์ Kishi (1955) ทำการศึกษาเชื้อราจำนวน 96 สายพันธุ์ (strains) และพิสูจน์ว่า *Aspergillus niger* เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์นารินจินเนสได้ดีที่สุด ต่อมา Okada และคณะ (1963) ทำการสกัดแยกเอนไซม์นารินจินเนสให้มีความบริสุทธิ์จากเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวและรายงานสมบัติของเอนไซม์ไว้ จากการศึกษานี้เป็นพื้นฐานให้บริษัท Tanabe Pharmaceuticals ทำการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสที่ถูกขายในชื่อทางการค้าว่า Kumitanase

Bram และ Solomons (1965) สังเกตว่าเอนไซม์นารินจินเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* จะถูกยับยั้งด้วยกลูโคส การผลิตเอนไซม์มีปริมาณลดลงที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 4.0 และจะถูกกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะที่มีซับสเตรตคือสารนารินจิน อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดถูกนำมาตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ในฟลาสก์ที่มีการเขย่า (shake flask) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร cornsteep liquor-yeast extract medium ให้เอนไซม์ไตเตอร์ (titer) ที่ดีที่สุด และการเติมสารนารินจินในปริมาณน้อยเป็นการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ที่ได้ผลมากกว่าการเติมนารินจินที่ความเข้มข้นสูงกว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมัก สารละลายสปอร์ (spore suspension) 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรถูกใช้เริ่มต้นในกระบวนการหมักในถังหมัก (bioreactor) ขนาด 10 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยเบฟเฟิล (baffle) ที่มี disc turbine impellers รวมทั้งส่วนควบคุมอุณหภูมิและโฟมแบบอัตโนมัติ พบว่าการเติมกลูโคส แล็กเตท (lactate) และซิเตรท (citrate) มีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* NRRL 72-4 ส่วนซูโครส (sucrose) และแป้งก็มี

ผลเช่นเดียวกันในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ แม้ว่าส่วนประกอบดังกล่าวจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้เป็นอย่างดีก็ตาม เนื่องจากการรวมกันของแป้งเป็นคอร์นมีล (corn meal) อย่างสมบูรณ์จะไประงับการสังเคราะห์เอนไซม์ การผลิตเอนไซม์นารินจินเนสขึ้นอยู่กับตัวเหนี่ยวนำ (inducer) และวิธีการเติมตัวเหนี่ยวนำ ซึ่งเป็นแบบต่อเนื่อง (continuous) หรือเติมแบบเป็นขั้นๆ (stepwise) ในการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม การแทนที่ตัวเหนี่ยวนำด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่จะไม่มีเอนไซม์ถูกผลิตขึ้น

Coniothyrium diplodiella เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช ถูกใช้โดยบริษัท Sankyo ของญี่ปุ่นในการผลิตเอนไซม์ย่อยเพกทิน (pectic enzyme) ที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนส การเตรียมการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวถูกขายในชื่อ Sankyo naringinase และถูกรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูง (Puri and Banerjee, 2000) Ito และ Takiguchi (1970) ได้จดทะเบียนสิทธิบัตรสำหรับการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจาก *Phanopsis citri*, *Rhizoctonia solani*, *Coniothyrium diplodiella* โดยใช้การหมักเป็นระยะเวลา 5 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีถั่วเหลืองป่น (soybean meal) และเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส Fukumoto และ Okada (1973) รายงานการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจาก *Penicillium* sp. โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลือง (soybean residue) และ cornsteep liquor ได้ผลสรุปว่ากระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับตัวเหนี่ยวนำคือสารเฮสเปอริดิน (hesperidin) ซึ่งเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch) ที่ระยะเวลา 5 วัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ไม่มีรายงานการพัฒนาการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสในอาหารเหลว เป็นเวลาเกือบ 20 ปี จนกระทั่งในปี 1994 บริษัท Hoechst ได้จดทะเบียนสิทธิบัตรการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่แยกได้บริสุทธิ์ และตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์ที่ได้โดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *Penicillium* sp. DSM 6825 พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 60-100 กิโลดาลตัน (kDa) และมีลำดับเบสบริเวณปลายเอ็นที่จำเพาะเจาะจง (specific N-terminal sequence) เอนไซม์จะสลายพันธะระหว่างแรมโนสและอะไกลโคน (aglycon) ในโมเลกุลไกลโคไซด์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 5.0-5.5 และ 50-55 องศาเซลเซียสตามลำดับ

Shanmugam และ Yadav (1995) ทดลองผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อรา *Rhizopus nigricans* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งประกอบด้วยซูโครสและข้าวมาทำการเพาะเชื้อด้วยสารละลายสปอร์ (spore suspension) 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบแอกทิวิตี

ของเอนไซม์นารินจินเนสหลังการเพาะเชื้อเป็นเวลาเกือบ 50 ชั่วโมง ค่าพีเอชของอาหารลดลงตาม การเจริญของเส้นใยเชื้อรา (mycelia) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่ได้แสดงการตอบสนองตาม ค่าจลนศาสตร์ของ Michaelis-Menten เมื่อทดสอบกับ p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside ซึ่ง ใช้เป็นซับสเตรต ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ พีเอช 6.5 และ อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียสตามลำดับ เมื่อพิจารณารายงานทั้งหมดของกระบวนการหมัก พบว่า เอนไซม์นารินจินเนสถูกผลิตออกนอกเซลล์เชื้อรา (extracellular broth)

กระบวนการหมักแบบใช้อาหารเหลว (submerged culture) เป็นวิธีการที่นิยมใช้ ในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสเป็นการค้า เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่ายในการควบคุมและเพิ่ม ปริมาณ (scale up) นอกจากนั้นผลผลิตที่ได้จากวิธีนี้ยังมีปริมาณสูงและมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน ต่ำ (Puri and Banerjee, 2000)

6.2.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (solid-state fermentation)

เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแล้ว แทบจะไม่พบการเพาะ- เลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งสำหรับการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส (Chisti, 1999) Nomura (1965) ได้ รายงานการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อ *Coniothyrium diplodiella* บนอาหารแข็ง โดยเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์บนก้อนถั่วเหลือง (soybean cake) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 วัน ซึ่งก้อน โคจิ (koji cake) ที่ได้ถูกทำให้แห้ง บด และสกัดเอาเอนไซม์ดิบ (crude enzyme) แยกให้บริสุทธิ์เพื่อ กำจัดเอนไซม์เพ็กทิเนส (pectinase) ที่ปนเปื้อนอยู่ ออก พบว่าค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ การทำงานของเอนไซม์นารินจินเนสที่ได้ อยู่ที่ค่าพีเอช 4.2 และอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซูโครสและฟรุคโตสจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างมาก ขณะที่ซอร์บิทอล (sorbital) ยับยั้งการผลิตเอนไซม์ในระดับที่น้อยกว่า

6.3 การตรวจวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนส

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจวิเคราะห์เอนไซม์นารินจินเนส 4 วิธี คือ (1) ใช้เครื่องสเปกโทร- โฟโตมิเตอร์ในการตรวจวัดสารฟลาโวนอน (flavonones) ด้วยวิธี alkaline diethyl glycol ตามวิธี ของ Davis (1947) หลักการคือ เมื่อสารนารินจินทำปฏิกิริยาเคมีกับน้ำยาแล้ว จะทำให้เกิดสีเหลือง ขึ้นและวัดปริมาณความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (2) วัดการทำงานของเอนไซม์

นารินจินเอสด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งใช้หลักการวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส ตามวิธีการของ Horuichi *et al.* (1985) (3) ใช้ p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside วัดการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่เป็นองค์ประกอบในเอนไซม์นารินจินเอส ตามวิธีการของ Romero และคณะ (1985) และเปรียบเทียบสีที่ได้จากผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol ที่ได้จากการสลายซับสเตรต พบว่าการใช้ซับสเตรตสังเคราะห์นี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อค่าพีเอชและอุณหภูมิของเอนไซม์ (4) วัดแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเอสโดยใช้สารนารินจินเป็นซับสเตรต และใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณสารนารินจินและผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่เกิดขึ้น โดยใช้คอลัมน์ C_{18} (ชื่อทางการค้าคือ μ Bondapak หรือคอลัมน์อื่นๆ ชนิด reverse-phase column) แล้ววัดปริมาณสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (Puri and Banergee, 2000) การวิเคราะห์นี้นิยมใช้กันทั่วไป เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการวัดระดับของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่เปลี่ยนแปลงได้อย่างเด่นชัด (Kimball, 1999)

6.4 สมบัติของเอนไซม์นารินจินเอส

เอนไซม์นารินจินเอสที่ได้จากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีสมบัติเฉพาะที่ต่างกัน เช่น เอนไซม์ที่แยกได้จาก *Penicillium* sp. จะเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีหน่วยย่อยชนิดเดียวกัน (จากการศึกษาด้วยวิธี electrofocussing (IEF) gel electrophoresis และ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE) เอนไซม์นารินจินเอสประกอบด้วยแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และแอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของแอกทิวิตีทั้งสองที่พีเอช 4.5 และ 3.0 ตามลำดับ (Gabor and Pittner, 1984) Schalkhammer และ Pittner (1986) ได้ทำการหาฮาโลเอนไซม์ (haloenzyme) และโครงสร้างหน่วยย่อยของเอนไซม์นารินจินเอสโดยใช้วิธีการกระเจิงของแสง (light scattering) และวิธีการแยกโครมาโทกราฟีแบบคัดขนาดโมเลกุล (exclusion chromatography) ร่วมกับข้อมูลตัวแปรทางจลนศาสตร์ ได้แก่ K_m (Michaelis constant) อัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) และค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i) ของกลูโคสและแรมโนส รวมทั้งศึกษาบริเวณสลาย (catalytic site) 2 บริเวณ โดยการดัดแปลงทางเคมี (chemical modification) ที่ทั้ง 2 บริเวณ พบว่าบริเวณที่มีกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) เป็นบริเวณที่มีความจำเพาะต่อแอกทิวิตีทั้งสอง

ในทางการค้าจะใช้เอนไซม์นารินจินเอสที่แยกได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งมีแอกทิวิตีทั้งของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส โดยอัตราส่วนของแอกทิวิตีทั้งสองเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของโปรตีน ค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์

สำหรับแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 3.0-7.0 สำหรับแอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจะทำงานได้ดีที่สุดในช่วงค่าพีเอชที่ 4.0-6.0 เอนไซม์นารินจินเนสสามารถแยกเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomers) ได้มากมายด้วยวิธีเจลฟิเลทรชัน (gel filtration) พบว่าเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* จะอยู่ในรูปเอนไซม์อิสระที่มีบริเวณเร่ง (active sites) 2 บริเวณ โดยบริเวณหนึ่งจะมีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส ส่วนอีกบริเวณหนึ่งจะมีแอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส

6.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์นารินจินเนส

เอนไซม์นารินจินเนสนอกจากจะนำมาใช้ในการกำจัดความขมในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลมาแล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ในด้านอื่นๆ ได้ ดังนี้

6.5.1 การเตรียมยาปฏิชีวนะคลอโรโพลีสโพริน ซี (chloropolysporin C)

แอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในเอนไซม์นารินจินเนสจะตัดคาร์โบไฮเดรต (deglycosylation) ออกจากยาปฏิชีวนะคลอโรโพลีสโพริน (chloropolysporin) ที่สกัดได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Faenia interjecta* เป็นคลอโรโพลีสโพริน เอ บี และซี ซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดดีไกลโคไซด์ (deglycosylated) การใช้คลอโรโพลีสโพริน ซี กับยาปฏิชีวนะประเภทบีต้า-แลกแทม (β -lactam) จะมีฤทธิ์เสริมซึ่งกันและกันในการช่วยต่อต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Staphylococcus* ที่ต้านทานต่อเมทิลซิลลิน (methicillin) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Enterobacteria* ได้อีกด้วย

6.5.2 การเตรียมสารพูนิน

สารฟลาโวนอยด์ชนิดพูนินสามารถผลิตได้จากสารนารินจินโดยใช้เอนไซม์นารินจินเนสที่ถูกตรึงรูป (immobilized naringinase) ด้วยอัลคาไลน์บัฟเฟอร์ (alkaline buffer) วิธีการนี้จะให้ผลผลิตปริมาณสูง สารพูนินมีประโยชน์โดยสามารถต่อต้านไวรัสได้ (antiviral activity) ทั้งดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอไวรัส (RNA virus) เช่น respiratory syncytial virus (RSV), polio virus, parainfluenza virus type3 (Pf-3) และ herpes simplex virus type 1 (HSV-1)

รวมทั้งต่อต้านการเกิดการอักเสบ (antiflammatory) และอาจใช้เป็นสารให้ความหวานแก่ผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ (Puri and Banerjee, 2000)

6.5.3 การเตรียมน้ำตาลแรมโนส

แอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในเอนไซม์นารินจินเนสจะสลายสารนารินจินได้ผลิตเป็นแอล-แรมโนส (L-rhamnose) เอนไซม์นารินจินเนสที่ใช้จะเป็นเอนไซม์ที่ถูกสกัดแยกให้มีความบริสุทธิ์เพียงบางส่วน และมีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสสูงกว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส น้ำตาลแรมโนสเป็นสาร chiral intermediate ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์และใช้ในการผลิตยารวมทั้งผลิตเป็นสารปกป้องพืช (Daniels *et al.*, 1990)

6.5.4 การเตรียมนารินจิน

สารฟลาโวนโกลโคไซด์ (flavonone glycoside) ชนิดนารินจินถูกรายงานว่าสามารถป้องกันการเกิดแผลเปื่อยในเยื่อบุกระเพาะอาหาร (gastric mucosal ulceration) ส่วนสารนารินจินก็มีรายงานว่า ใช้ปกป้องกระเพาะอาหารจากผลกระทบของเอทานอล (ethanol) ซึ่งชักนำให้เกิดการบาดเจ็บของกระเพาะอาหารได้ (Puri and Banerjee, 2000) ทั้งสารนารินจินและสารนารินจินยังมีประโยชน์ในการยับยั้งการสะสมของ macrophage-lipid complex บน arterial endothelium และรักษาความผิดปกติเกี่ยวกับตับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Prakash *et al.*, 2002)

6.5.5 เพิ่มกลิ่นให้กับไวน์

แอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเอนไซม์นารินจินเนสที่ได้พร้อมกับเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และเอนไซม์อัลฟา-อะราบินโนสซิเดส (α -arabinosidase) พบว่าเหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มกลิ่นหอมให้กับไวน์ โดยการประยุกต์จะใช้เอนไซม์นารินจินเนสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Caldini *et al.*, 1994) เอนไซม์กลุ่มดังกล่าวจากเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถสลายโกลโคไซด์ของสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) กลุ่มเซสควิเทอร์พีน (sesquiterpenes) และแอลกอฮอล์ชนิดอื่นซึ่งทำให้เกิดกลิ่นหอมในเหล้าไวน์ใหม่ (must) ไวน์หญ้าฝรั่น (saffron) และผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล พลัม และมะละกอ เป็นต้น (Martino *et al.*, 2000)

6.5.6 การแปรรูปสเตอรอยด์

เมื่อทำการสลายสารนารินจินในเมล็ด fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) โดยใช้เอนไซม์นารินจินสตรังรูปและเอนไซม์เพ็กทีเนส (pectinase) จะได้ผลผลิตเป็นสารซาโปเจนิน (sapogenins) และสารไดออสเจนิน (diosgenin) ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตยาประเภทสเตอรอยด์ (steroid) พบว่าวิธีนี้จะไม่สูญเสียปริมาณสารไดออสเจนิน

เอนไซม์นารินจินสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจทางการค้า เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม และประยุกต์ใช้ในการแต่งกลิ่น (Puri and Banerjee, 2000) การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยา เช่น พีเอช และอุณหภูมิ ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงความจำเพาะของเอนไซม์นั้นมีบทบาทสำคัญในการกำจัดความขม (Olsen, 1995) และในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องทำการผลิตเอนไซม์ในระดับใหญ่ (large-scale) โดยกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งมีรายงานการผลิตเอนไซม์นารินจินสโดยกระบวนการหมักในระดับใหญ่ สำหรับใช้ในการกำจัดความขมของน้ำผลไม้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Puri and Banerjee, 2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ ได้แก่

1. เครื่องวัดค่าการดูดแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องวัดค่าการดูดแสงชนิดใช้กับไมโครเพลท (microplate reader)
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4. เครื่องปั่นผสมสาร (waring blender)
5. เครื่องกวนสารด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
7. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer หรือ lyophilizer)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9. เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (autopipette)
10. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
11. ตู้เป่าเชื้อ (microflow biological safety cabinet)
12. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
13. เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
14. ไมโครเพลทชนิด 24 และ 96 หลุม (24-wells and 96-wells microplates)
15. ตู้เก็บสารเคมีอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (deep freezer)
16. เครื่องชุดกรองน้ำชนิดให้น้ำเกรด RO (reverse osmosis) และชนิดให้น้ำเกรด 18 MΩ
17. ตู้เย็น (refrigerator)
18. เครื่องทำน้ำแข็ง
19. เครื่องแก้วต่าง ๆ
20. นาฬิกาจับเวลา

2. สารเคมี ได้แก่

ammonium dihydrogen phosphate, ammonium nitrate, ammonium sulphate, beef extract, bovine serum albumin (BSA), casein, citric acid, coomassie blue G-250, corn starch,

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), di-ammonium hydrogen citrate, diethylene glycol, disodium hydrogen phosphate, dithiothreitol (DTT), ethanol, fructose, glucose, glycerol, iron sulfate, maltose, manganese sulfate, magnesium sulfate, microbiological agar, naringenin, naringin, neopeptone, ortho-phosphoric acid, peptone, phosphoric acid, potassium chloride, phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), potassium dihydrogen phosphate, p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside, p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, rhamnose, skimmed milk, sodium acetate, sodium carbonate, sodium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, sodium nitrate, soyabean meal, soya peptone, starch soluble, sulfuric acid, sucrose, tapioca starch, tryptone, yeast extract, zinc sulfate

วิธีการ

1. แหล่งของเชื้อรา

เชื้อราแยกได้จากตัวอย่าง เช่น ดิน เปลือกไม้ ใบไม้ เปลือกผลไม้ โลเคนส์ น้ำ ฯลฯ ที่เก็บจากสิ่งแวดล้อมตามที่ต่าง ๆ ทั้งในประเทศไทยและประเทศจีน จำนวน 11 แหล่ง รวมทั้งหมด 128 ตัวอย่าง

2. การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส

2.1 การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสระดับปฐมภูมิ (Primary screening)

ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อในอัตราส่วน 1 : 100 เพื่อทำการแยกเชื้อราด้วยเทคนิค spread plate โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิด synthetic minimal medium (Ruiz *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นอาหารคัดเลือก (selective medium) ที่มีการเติมสารนารินจินและปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 5.8 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อราบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิด Sabouraud's dextrose agar ที่เติมสารนารินจิน เมื่อเชื้อเจริญนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป และทำการเก็บเชื้อราบริสุทธิ์ในรูปสารละลายสปอร์ (spore suspension) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด Potato dextrose broth ผสมกับสารละลายกลีเซอรอล

(glycerol) 30 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บรักษาเชื้อแบบถาวรสำหรับเป็น stock culture

2.2 การคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินในระดับทุติยภูมิ (Secondary screening)

2.2.1 การทดสอบการสลายนารินจิน (Naringin hydrolysis)

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2.1 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดเดียวกับข้อ 2.1 แต่ปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 4.0 เลี้ยงในหลอด vial ด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ปิเปตส่วนใส (culture filtrate) เก็บและเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) ชนิดต่างๆ ได้แก่ 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ส่วนเซลล์เชื้อราที่แยกออกจากส่วนใสนำไปอบจนแห้ง และชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อไป สำหรับส่วนใสซึ่งเป็นเอนไซม์ดิบนำไปทดสอบการย่อยสลายนารินจิน โดยทำการบ่มส่วนใสปริมาตร 250 ไมโครลิตรกับสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายใน citrate-phosphate buffer (McIlvaine buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในไมโครเพลทชนิด 24 หลุม (24-wells microplate) เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง และสังเกตการย่อยที่เกิดขึ้นในหลุมเอนไซม์ที่หยอดไว้สำหรับเชื้อราที่จัดเป็นเชื้อราที่ให้ผลบวก ซึ่งจัดเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินส คือ เชื้อราที่มีส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของเอนไซม์ดิบ สามารถสลายสารนารินจินได้หมด

2.2.2 การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์

นำเชื้อราที่ให้ผลบวก (positive) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินจากการทดสอบข้อ 2.2.1 จำนวน 10 ไอโซเลท และเชื้อราที่ให้ผลลบ (negative) หมายถึง เชื้อราที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินส จากข้อ 2.2.1 จำนวน 10 ไอโซเลท มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดต่างๆ จำนวน 7 สูตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 และ 7 วัน ทำการเก็บส่วนใสเพื่อตรวจสอบการย่อยสลายสารนารินจินตามวิธีการในข้อ 2.2.1 เพื่อพิจารณาคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์นารินจินสจากเชื้อรา และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในการคัดเลือกเชื้อราต่อเนื่องในการคัดเลือกระดับทุติยภูมินี้ตามวิธีเดียวกับข้อ 2.2.1

2.3 การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสระดับตติยภูมิ (Tertiary screening)

2.3.1 การคัดเลือกเชื้อราตามความสามารถของเอนไซม์นารินจินเนสที่ทำงานได้ในสภาวะที่ต้องการ

นำส่วนใสซึ่งเป็นส่วนเอนไซม์ดิบของเชื้อราที่ทำการคัดเลือกจากข้อ 2.2 ว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส มาตรวจวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนสตามวิธีการของ Davis (1947) แต่มีการดัดแปลงเล็กน้อยเพื่อให้เหมาะสม ดังข้อ 2.4.2 โดยทำการตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนสที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ ที่พีเอช 3.0 และ 4.0 ณ อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของแต่ละเชื้อ ตามวิธีทดสอบข้อ 2.4.3 แล้วเปรียบเทียบผล เพื่อพิจารณาคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์นารินจินเนสในปริมาณสูง และสามารถทำงานได้ในสภาวะที่ต้องการคือ พีเอชต่ำ แต่อุณหภูมิสูง เพื่อสำหรับใช้ศึกษาต่อไป

2.3.2 การคัดเลือกเชื้อราตามปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส

นำส่วนใสซึ่งเป็นส่วนเอนไซม์ดิบของเชื้อราที่ทำการคัดเลือกจากข้อ 2.2 ว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส มาตรวจวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์นารินจินเนสตามวิธีการของ Montreuil (1994) โดยใช้ซับสเตรตสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside และ p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside แต่มีการดัดแปลงเล็กน้อยเพื่อให้เหมาะสม ดังข้อ 2.4.1 โดยทำการทดสอบที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์และปริมาณโปรตีนตามวิธีทดสอบข้อ 2.4.3 แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ของแต่ละเชื้อ เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์นารินจินเนสซึ่งมีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในปริมาณสูง และสูงกว่าปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส

2.4 วิธีตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และการเจริญของเชื้อรา

2.4.1 การตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์ไกลโคซิเดส (Glycosidase assay)

นำส่วนใสซึ่งเป็นส่วนเอนไซม์ดิบของเชื้อรา ตรวจวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสตามวิธีของ Montreuil (1994) แต่มีการดัดแปลงวิธีการเล็กน้อยให้เหมาะสม ด้วยซับสเตรตสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside และ p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside ตามลำดับ โดยทำการบ่มเอนไซม์ดิบที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรกับซับสเตรตสังเคราะห์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (mM) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ร่วมกับ sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (M) พีเอช 4.0 ปริมาตร 275 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิที่กำหนด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งในการตรวจสอบจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณของเอนไซม์ที่มีในเอนไซม์ดิบ โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานที่มี p-nitrophenol เป็นสารมาตรฐาน

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถสลาย p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside หรือ p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside แล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol จำนวน 1 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิและค่าพีเอชที่ทำการทดสอบ ในเวลา 1 นาที และปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.4.2 การตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนส (Naringinase assay)

นำส่วนใสซึ่งเป็นส่วนเอนไซม์ดิบของเชื้อรา ตรวจวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนส โดยทำการบ่มเอนไซม์ดิบปริมาตร 50 ไมโครลิตรกับสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายใน sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 325 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่อุณหภูมิที่กำหนด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้น ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และตรวจสอบสารนารินจินที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาตามวิธีของ Davis (1947) แต่มีการดัดแปลงเล็กน้อยเพื่อให้เหมาะสม โดยเปิดสารผสมปฏิกิริยา (reaction mixture) จากข้างต้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ที่เติม diethylene glycol ความเข้มข้น 90

เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เรียบร้อย ต่อมาทำการเติม sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 4 นอร์มัล (N) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ซึ่งในการตรวจสอบจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์นารินจินสที่มีในเอนไซม์ดิบ โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานที่มีสารนารินจิน (อุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) เป็นสารมาตรฐาน

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถสลายสารนารินจินจำนวน 1 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิและค่าพีเอชที่ทำการทดสอบ ในเวลา 1 นาที และในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.4.3 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี dye-binding assay (Bradford, 1976) โดยปิเปตน้ำยาเบรดฟอร์ด (Bradford reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในเอนไซม์ดิบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานที่มี bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน

คำนวณหาค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์ จากค่าหน่วยเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของแต่ละเชื้อ

2.4.4 การตรวจสอบการเจริญของเชื้อรา

ทำการแยกเอนไซม์ดิบออกจากเซลล์และสปอร์เชื้อรา ด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักคงที่ของเซลล์เชื้อราเพื่อหาน้ำหนักแห้ง

คำนวณหาปริมาณเอนไซม์ในหน่วย Unit/g dry cell จากค่าหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์เชื้อรา

3. การจำแนกชนิด (Identification) เชื้อราคัดเลือก และการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ของเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก

ส่งเชื้อราคัดเลือกที่จะใช้ในการศึกษาต่อ จำนวน 4 ไอโซเลท ไปจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา ด้วยวิธีการหาลำดับเบสและเปรียบเทียบจากข้อมูล พร้อมทั้งตรวจสอบความเป็นพิษของเอนไซม์ดิบ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกบนอาหารแข็งชนิด potato dextrose agar และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราคัดเลือก สำหรับการตรวจสอบความเป็นพิษของเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก จะจัดส่งในรูปแบบสารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilized extract) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ชนิด synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจินและปรับพีเอชเป็น 4.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วทำการแยกเอนไซม์ดิบออกจากเซลล์และสปอร์เชื้อรา ด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งเอนไซม์ดิบจะถูกนำมาทำแห้งเป็นสารสกัดแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried extract หรือ lyophilized extract) และจัดส่งตรวจสอบความเป็นพิษ

4. การศึกษาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilized extract)

นำสารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็งซึ่งเป็นเอนไซม์ดิบที่ถูกนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ของเชื้อราคัดเลือกแต่ละเชื้อ มาทำการเจือจางด้วย sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แบบลำดับส่วน (serial dilution) คือ 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 และ 0.078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินตามวิธีตรวจสอบในข้อ 2.4.2 ตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสตามวิธีตรวจสอบข้อ 2.4.1 รวมทั้งหาปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 2.4.3

5. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราคัดเลือก

5.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum pH)

นำเอนไซม์ดิบที่ผลิตโดยเชื้อราคัดเลือกแต่ละเชื้อมาตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสตามวิธีตรวจสอบข้อ 2.4.1 และแอกทิวิตีของ

เอนไซม์นารินจินเนสตามวิธีตรวจสอบในข้อ 2.4.2 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ใช้ซับสเตรดที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชตั้งแต่ 3.0 ถึง 10.0 โดยใช้ citrate-phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สำหรับพีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 สำหรับค่าพีเอช 8.0 และ 9.0 จะใช้ Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และใช้ glycine-NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สำหรับพีเอช 10.0 เป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีน เพื่อใช้ในการคำนวณค่า specific activity ของแต่ละเอนไซม์ และใช้ค่าดังกล่าวในการพิจารณาคัดเลือกพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum temperature)

จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในข้อ 5.1 พบว่าแต่ละเชื้อมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน จึงใช้ค่าพีเอชที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อ ซึ่งได้จากข้อ 5.1 สำหรับการทดลองนี้และตลอดการทดลองต่อเนื่องนับจากนี้

สำหรับการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทำโดยนำเอนไซม์ดิบมาตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสตามวิธีตรวจสอบข้อ 2.4.1 และแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนสตามวิธีตรวจสอบในข้อ 2.4.2 โดยใช้ซับสเตรดที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในข้อ 5.1 วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็น 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน เพื่อใช้ในการคำนวณค่า specific activity ของแต่ละเอนไซม์ และใช้ค่าดังกล่าวในการพิจารณาคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เพื่อใช้เป็นอุณหภูมิสำหรับการทดลองต่อเนื่องนับจากนี้

6. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสของเชื้อราคัดเลือก

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของกล้าเชื้อ (inoculum) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

นำเชื้อราคัดเลือกมาทำการเตรียมกล้าเชื้อในรูปสารละลายสปอร์ (spore suspension) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร วิธีการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิด potato dextrose agar ที่บรรจุในหลอดทดลอง และขวดแก้วแบบแบน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้น

เติมสารละลาย normal saline ที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งเตรียมจากสารละลาย sodium chloride (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ทำการเชื้อสปอร์ให้หลุดจากเส้นใยโดยใช้เข็มเจาะเชื้อ เขย่าให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอ แล้วเจือจางสารละลายสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 10^4 ถึง 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสปอร์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อราสำหรับผลิตเอนไซม์ นารินจินส โดยเติมกล้าเชื้อสปอร์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชนิด synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเป็น 4.0 โดยเฉพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และปริมาณโปรตีน รวมทั้งวัดการเจริญของเชื้อราตามวิธีตรวจสอบข้อ 2.4 แล้วเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการใช้กล้าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

6.2 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

นำเชื้อราคัดเลือกมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวจำนวน 2 สูตร ได้แก่ สูตร synthetic minimal medium และ Czapek-Dox medium (Puri *et al.*, 2005) ซึ่งเติมสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเป็น 4.0 โดยใช้ความเข้มข้นของกล้าเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 6.1 เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และปริมาณโปรตีน รวมทั้งวัดการเจริญของเชื้อราตามวิธีตรวจสอบข้อ 2.4 และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับศึกษาต่อในขั้นต่อไป

6.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวสูตรคัดเลือกจากข้อ 6.2 ซึ่งมีสารนารินจินเป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) การผลิตเอนไซม์ โดยทำการทดสอบเติมแหล่งคาร์บอนเสริม (supplemented carbon source) ชนิดต่างๆ จำนวน 8 แหล่ง ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) ฟรุคโตส (fructose) มอลโทส (maltose) แรมโนส (rhamnose) แป้งมันสำปะหลัง (tapioca starch) แป้งข้าวโพด (corn starch) และสตาร์ชโซลูเบิล (starch soluble) ความเข้มข้นที่ใช้คือ 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7

วัน จากนั้นทำการตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน รวมทั้งวัดการเจริญเติบโตของเชื้อราตามวิธีตรวจสอบข้อ 2.4 ทำการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ใดๆ โดยจัดให้เป็นตัวควบคุม (control) กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ เพื่อพิจารณาคัดเลือกแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

6.4 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากข้อมูลในข้อ 6.3 เมื่อทราบชนิดของแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แล้ว จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมดังกล่าว โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 6.2 แต่ทำการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสม โดยให้มีระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25, 2.5, 3.75, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร หรือ 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะเดียวกับข้อ 6.3 จากนั้นตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน รวมทั้งวัดการเจริญของเชื้อราตามวิธีการในข้อ 2.4 เปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมด้วยความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนเสริมคัดเลือก

6.5 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่ผ่านการศึกษาชนิดและปริมาณคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในข้อ 6.4 แต่ทำการปรับเปลี่ยนชนิดของสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) แทนสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเดิม โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ดังนี้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ammonium dihydrogen phosphate, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate, NH_4NO_3) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรท (di-ammonium hydrogen citrate) โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate, NaNO_3) เปปโตน (peptone) ทริปโตน (tryptone) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) หางนม (skimmed milk) เคซีนชนิดย่อยด้วยกรด (casein acid hydrolysate) กากถั่วเหลือง (soyabean meal) และซอเยาเปปโตน (soya peptone) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร synthetic minimal medium จะใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 5 กรัมต่อลิตร (0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่สำหรับ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek-dox medium จะใช้ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำส่วนใส (เอนไซม์ดิบ) ตรวจสอบเอกลักษณ์ของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน รวมทั้งวัดการเจริญเติบโตของเซลล์เชื้อราตามวิธีตรวจสอบข้อ 2.4 เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดเดิม ซึ่งจัดเป็นตัวควบคุม (control) กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เพื่อพิจารณาคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

6.6 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากข้อมูลในข้อ 6.5 เมื่อทราบชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แล้ว จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมดังกล่าว โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 6.2 สำหรับแต่ละเชื้อราคัดเลือก แต่ทำการปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 3.75, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร หรือ 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะเดียวกับข้อ 6.5 จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนจากส่วนใส (เอนไซม์ดิบ) รวมทั้งวัดการเจริญของเซลล์เชื้อราตามวิธีการในข้อ 2.4 แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนคัดเลือก

7. สถานที่ทำการทดลอง

สาขาชีวเคมี (SC3-104) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

8. ระยะเวลาทำการทดลอง

ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2546 - ธันวาคม 2549

ผลและวิจารณ์

1. แหล่งของเชื้อรา

การเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมตามที่แตกต่างกัน ทั้งในประเทศไทยและประเทศจีน ทั้งหมดจำนวน 11 แหล่ง ได้ตัวอย่างรวม 128 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) สรุปตัวอย่างจากที่ต่างๆ คือ

- 1.) ประเทศจีน 37 ตัวอย่าง
- 2.) อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 2 ตัวอย่าง
- 3.) อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี 9 ตัวอย่าง
- 4.) อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี 6 ตัวอย่าง
- 5.) อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 2 ตัวอย่าง
- 6.) อำเภอป่าดัว จังหวัดอำนาจเจริญ 2 ตัวอย่าง
- 7.) อำเภอรามไทร จังหวัดศรีสะเกษ 3 ตัวอย่าง
- 8.) ชารน้ำร้อนบ่อคลึง จังหวัดราชบุรี 55 ตัวอย่าง
- 9.) โป่งยุบ จังหวัดราชบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง
- 10.) นำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (ได้ตัวอย่างจาก ดร. ฐิติยา แซ่ปั้ง) 4 ตัวอย่าง
- 11.) อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ตัวอย่าง

2. การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส

2.1 การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสระดับปฐมภูมิ (Primary screening)

จากการแยกเชื้อราด้วยอาหารคัดเลือกแบบแข็งชนิด synthetic minimal medium ที่มีสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อนำตัวอย่างจำนวน 128 ตัวอย่าง ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ รวม 11 แหล่ง ไปแยกเชื้อรา ได้จำนวนเชื้อรารวมทั้งสิ้น 348 ไอโซเลท (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิดของตัวอย่างและจำนวนเชื้อราที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ

ตัวอย่าง ที่	แหล่งตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนเชื้อรา (ไอโซเลต)	รหัสเชื้อ
1	อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	เปลือกไม้	9	PTK1.1-PTK1.9
2		เปลือกมะขามเทศ	4	PTK2.1-PTK2.4
3		เปลือกย่อย ตัวอย่างที่ 1	5	PTK3.1-PTK3.5
4		เปลือกย่อย ตัวอย่างที่ 2	11	PTK4.1-PTK4.11
5		กลีบดอกกระเจียวแดง	5	PTK5.1-PTK5.5
6	อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี	ใบคำลิ่ง	7	PTK6.1-PTK6.7
7		ดินร่วน ตัวอย่างที่ 1	10	PTK7.1-PTK7.10
8		ดินร่วน ตัวอย่างที่ 2	3	PTK8.1-PTK8.3
9	อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	เปลือกมะนาว	1	PTK9
10		ใบยูคาลิปตัส	7	PTK10.1-PTK10.7
11	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	ใบกระดังงา	6	PTK11.1-PTK11.6
12		ดินร่วน	3	PTK12.1-PTK12.3
13	อ.ป่าดัว จ.อำนาจเจริญ	ใบไม้	4	PTK13.1-PTK13.4
14		ดินทราย	5	PTK14.1-PTK14.5
15	อ.ราษีไศล จ.ศรีสะเกษ	ผิวขนุนผลเล็ก ตัวอย่างที่ 1	1	PTK15
16		ผิวขนุนผลเล็ก ตัวอย่างที่ 2	1	PTK16
17		ผิวขนุนผลเล็ก ตัวอย่างที่ 3	1	PTK17
18	อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี	ผิวมันแกว ตัวอย่างที่ 1	1	PTK18
19		ผิวมันแกว ตัวอย่างที่ 2	2	PTK19.1-PTK19.2
20		ผิวมันแกว ตัวอย่างที่ 3	8	PTK20.1-PTK20.8
21	อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	ผิวขนุนผลใหญ่ ตัวอย่างที่ 1	1	PTK21
22		ผิวขนุนผลใหญ่ ตัวอย่างที่ 2	1	PTK22
23	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	ดินร่วนจากแปลงพืชสวน	3	PTK23.1-PTK23.3
24		เปลือกกล้วย	3	PTK24.1-PTK24.3
25	ตัวอย่างจากประเทศจีน	ไลเคนส์	4	PCK1.1-PCK1.4
26		ไลเคนส์	1	PCK2
27		ไลเคนส์	2	PCK3.1-PCK3.2
28		ไลเคนส์	1	PCK4
29		เปลือกไม้	3	PCK5.1-PCK5.3
30		มอส	1	PCK6
31		ดิน	5	PCK7.1-PCK7.5

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	แหล่งตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนเชื้อรา (ไอโซเลต)	รหัสเชื้อ
32	ตัวอย่างจากประเทศจีน	ไลเคนส์	2	PCK8.1-PCK8.2
33		ใบไม้	2	PCK9.1-PCK9.2
34		มอส	2	PCK10.1-PCK10.2
35		มอส	4	PCK11.1-PCK11.4
36		ใบไม้	1	PCK12
37		ไลเคนส์	4	PCK13.1-PCK13.4
38		ไลเคนส์	1	PCK14
39		ใบไม้	1	PCK15
40		ดิน	6	PCK16.1-PCK16.6
41		ดิน	7	PCK17.1-PCK17.7
42		ดิน	3	PCK18.1-PCK18.3
43		ใบไม้	2	PCK19.1-PCK19.2
44		ดิน	4	PCK20.1-PCK20.4
45		ใบไม้	2	PCK21.1-PCK21.2
46		ดิน	3	PCK22.1-PCK22.3
47		ใบไม้	1	PCK23
48		ไลเคนส์	1	PCK24
49		ใบไม้	2	PCK25.1-PCK25.2
50		ใบไม้	2	PCK26.1-PCK26.2
51		ใบไม้	2	PCK27.1-PCK27.2
52		ดิน	1	PCK28
53		ดิน	3	PCK29.1-PCK29.3
54		ใบไม้	1	PCK30
55		ไลเคนส์	2	PCK31.1-PCK31.2
56		เปลือกไม้	1	PCK32
57		มอส	2	PCK33.1-PCK33.2
58		ไลเคนส์	4	PCK34.1-PCK34.4
59		ดิน	2	PCK35.1-PCK35.2
60		ดิน	3	PCK36.1-PCK36.3
61		ดิน	1	PCK37

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	แหล่งตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนเชื้อรา (ไอโซเลต)	รหัสเชื้อ
62	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 1	-	-
63		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 2	-	-
64		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 3	-	-
65		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 4	3	PTK-BW14.1-14.3
66		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 5	-	-
67		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 6	-	-
68		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 7	-	-
69		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 8	-	-
70		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 9	-	-
71		น้ำจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 10	-	-
72		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 1	5	PTK-BS1.1-1.5
73		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 2	5	PTK-BS2.1-2.5
74		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 3	1	PTK-BS3
75		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 4	2	PTK-BS4.1-4.2
76		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 5	5	PTK-BS5.1-5.5
77		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 6	6	PTK-BS6.1-6.6
78		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 7	2	PTK-BS7.1-7.2
79		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 8	3	PTK-BS8.1-8.3
80		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 9	5	PTK-BS9.1-9.5
81		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 10	3	PTK-BS10.1-10.3
82		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 11	1	PTK-BS11
83		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 12	3	PTK-BS25.1-25.3
84		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 13	2	PTK-BS26.1-26.2
85		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 14	4	PTK-BS27.1-27.4
86		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 15	3	PTK-BS28.1-28.3
87		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 16	6	PTK-BS29.1-29.6
88		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 17	2	PTK-BS30.1-30.2
89		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 18	3	PTK-BS31.1-31.3
90		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 19	4	PTK-BS32.1-32.4
91		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 20	3	PTK-BS33.1-33.3
92		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 21	3	PTK-BS34.1-34.3

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ตัวอย่าง ที่	แหล่งตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนเชื้อรา (ไอโซเลต)	รหัสเชื้อ
93	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 22	1	PTK-BS35
94		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 23	2	PTK-BS36.1-36.2
95		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 24	1	PTK-BS37
96		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 25	3	PTK-BS38.1-38.3
97		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 26	1	PTK-BS39
98		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 27	-	-
99		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 28	6	PTK-BS38.1-38.3
100		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 29	1	PTK-BS42
101		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 30	4	PTK-BS43.1-43.4
102		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 31	5	PTK-BS44.1-44.5
103		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 32	2	PTK-BS45.1-45.2
104		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 33	-	-
105		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 34	2	PTK-BS47.1-47.2
106		ดินจากธารน้ำร้อนบ่อคลึง 35	-	-
107		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง1	3	PTK-BL1.1-1.3
108		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง2	4	PTK-BL2.1-2.4
109		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง3	5	PTK-BL3.1-3.5
110		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง4	6	PTK-BL4.1-4.6
111		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง5	9	PTK-BL5.1-5.9
112		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง6	6	PTK-BL6.1-6.6
113		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง7	4	PTK-BL7.1-7.4
114		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง8	1	PTK-BL8
115		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง9	4	PTK-BL9.1-9.4
116		ใบไม้จากธารน้ำร้อนบ่อคลึง	4	PTK-BL10.1-10.4
117	อ.เมือง จ.นครปฐม	เปลือกส้มโออบ ตัวอย่างที่ 1	3	PTKT1.1-1.3
118		เปลือกส้มโออบ ตัวอย่างที่ 2	2	PTKT2.1-2.2
119		เปลือกส้มโออบ ตัวอย่างที่ 3	2	PTKT3.1-3.2
120	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	ดินจากโป่งยุบ ตัวอย่างที่ 1	-	-
121		ดินจากโป่งยุบ ตัวอย่างที่ 2	-	-
122		ดินจากโป่งยุบ ตัวอย่างที่ 3	1	PTK-PS7
123		ดินจากโป่งยุบ ตัวอย่างที่ 4	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

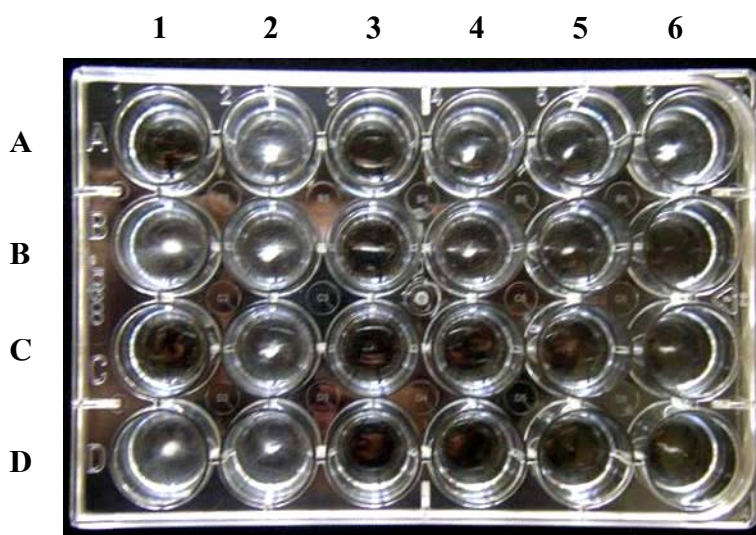
ตัวอย่าง ที่	แหล่งตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนเชื้อรา (ไอโซเลต)	รหัสเชื้อ
124	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	ดินจากโป่งยุบ ตัวอย่างที่ 5	1	PTK-PS10
125		น้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม ตัวอย่างที่ 1	-	-
126		น้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม ตัวอย่างที่ 2	-	-
127		น้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม ตัวอย่างที่ 3	-	-
128		น้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม ตัวอย่างที่ 4	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่สามารถแยกเชื้อราได้

2.2 การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสระดับทุติยภูมิ (Secondary screening)

2.2.1 การทดสอบการสลายสารนารินจิน (Naringin hydrolysis)

ได้เพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2.1 จำนวน 191 ไอโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด synthetic minimal medium ที่ปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 4.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำส่วนใสทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส โดยสังเกตการสลายสารนารินจิน ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของเอนไซม์นารินจินเนส พบว่ามีเชื้อราจำนวน 30 ไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารดังกล่าวได้ และมีเชื้อราจำนวน 30 ไอโซเลทที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีและมีตะกอนที่ก้นหลอด แต่ไม่มีการเจริญบนผิวอาหาร จึงนำเชื้อราดังกล่าวรวม 60 ไอโซเลท มาทำการทดสอบสมบัติการสลายสารนารินจิน (ภาพที่ 3) จากการทดสอบพบว่ามีเชื้อราที่มีความสามารถในการสลายสารนารินจินได้หมดภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง จำนวน 15 ไอโซเลท เชื้อดังกล่าวที่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อและให้ผลบวกต่อการทดสอบ และเชื้อที่เจริญได้แต่ให้ผลลบต่อการทดสอบจะถูกใช้เป็นเชื้อทดสอบในการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ในขั้นต่อไป



ภาพที่ 3 การทดสอบการสลายสารนารินจิน (Naringin hydrolysis)

หมายเหตุ A1 และ C1 คือ positive control ซึ่งเป็นสารละลาย McIlvaine buffer พีเอช 4.0

B1 และ D1 คือ negative control ซึ่งมีสารนารินจินละลายใน McIlvaine buffer พีเอช 4.0

ผลบวก (positive result) ได้แก่ A3, B3, B6, C3, C4, C5, D3, D4 และ D5

2.2.2 การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์

ได้ทดสอบความสามารถในการสลายนารินจินของเอนไซม์ดิบจากเชื้อราที่ให้ผลบวก ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส จากการทดสอบข้อ 2.2.1 จำนวน 10 ไอโซเลต (กลุ่ม ก) ได้แก่ เชื้อรารหัส PTK3.5, PTK4.6, PTK7.1, PTK7.4, PTK7.5, PTK7.10, PTK12.1, PTK20.1, PTK20.5 และ PTK 23.2 และเชื้อราที่ให้ผลลบ ซึ่งหมายถึง เชื้อราที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสได้หมดภายในเวลา 48 ชั่วโมง จากข้อ 2.2.1 จำนวน 10 ไอโซเลต (กลุ่ม ข) ได้แก่ เชื้อรารหัส PTK2.2, PTK4.5, PTK4.11, PTK10.7, PTK11.2, PTK11.3, PTK13.1, PTK14.3, PTK20.7 และ PTK20.9 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดต่างๆ จำนวน 7 สูตร คือ

- 1.) สูตร A¹ คือ synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0
- 2.) สูตร A² คือ สูตร synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 3.0
- 3.) สูตร B คือ Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0
- 4.) สูตร C คือ สูตร A¹ ที่มีการเติมเปปโตเนแทนแอมโมเนียมไนเตรท (NH₄NO₃)
- 5.) สูตร D คือ สูตร A¹ ที่มีการเติมสารนารินจินิน (naringenin) 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แทนสารนารินจิน
- 6.) สูตร E คือ สูตร A¹ ที่มีการเติมเปลือกส้มบด 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แทนการเติมสารนารินจิน
- 7.) สูตร F คือ Potato Dextrose Broth

ทำการเก็บเอนไซม์ดิบเมื่อเลี้ยงเชื้อราครบ 3 วันและ 7 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรข้างต้นและนำมาตรวจสอบการสลายสารนารินจิน พบว่าเชื้อราที่ให้ผลบวกทั้ง 10 ไอโซเลต (กลุ่ม ก) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ กัน สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตร (ตารางที่ 4) แต่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสเพื่อสลายสารนารินจิน แตกต่างกันไป (ตารางที่ 5) โดยตรวจพบว่าเชื้อราบางชนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะบางสูตรเท่านั้นที่มีความสามารถในการสลายนารินจิน ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการพิจารณาคัดเลือกเชื้อรา และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้

จากเชื้อกลุ่ม ก พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรากกลุ่ม ก ทั้ง 10 ไอโซเลตดังกล่าว และ สามารถกระตุ้นให้ส่วนใดจากเชื้อรากกลุ่ม ก ให้ผลบวกต่อการทดสอบมากที่สุดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร A¹ โดยสูตรอาหารนี้ให้ผลการทดสอบการสลายสารนารินจินเป็นผลบวกต่อเชื้อราที่ทดสอบ ทั้งหมด นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาข้อมูลที่ได้สำหรับเชื้อราที่ให้ผลลบทั้ง 10 ไอโซเลต (กลุ่ม ข) พบว่าเชื้อราที่ให้ผลลบทั้ง 10 ไอโซเลตไม่สามารถสลายสารนารินจินได้ไม่ว่าจะทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารสูตรใดๆ ก็ตาม ดังนั้นจึงพอจะสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A¹ เหมาะสมที่สุดต่อการ นำไปใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์นารินจินระดับทฤษฎี รวมทั้งสามารถอนุมานจากข้อมูลการทดสอบนี้ได้ว่า เชื้อราที่ผ่านการตรวจสอบความสามารถใน การผลิตเอนไซม์ระดับทฤษฎีนี้เมื่อให้ผลลบ จะเป็นเชื้อราที่ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ นารินจินสในระดับที่ตรวจพบได้ การที่เชื้อรากกลุ่ม ข ซึ่งเป็นกลุ่มที่ให้ผลลบทั้ง 10 ไอโซเลตจาก ข้อ 2.2.1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ทั้ง 6 สูตร พบการเจริญของเชื้อราใน อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงบางสูตรเท่านั้น แต่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตร A¹ ทุกไอโซเลต (ตารางที่ 4) อาจเป็นเพราะเชื้อราดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์นารินจินเอนออกมาสลายนารินจินซึ่งเป็นตัว เหนียวนาให้มีการผลิตเอนไซม์ขึ้น และเชื้อราใช้สารนารินจินดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการ เจริญ สำหรับสาเหตุที่ตรวจไม่พบการผลิตเอนไซม์อาจเป็นเพราะเชื้อรากกลุ่ม ข ดังกล่าวผลิต เอนไซม์นารินจินสในปริมาณต่ำ ภายในระยะเวลาที่ทำการตรวจสอบ (48 ชั่วโมง)

เมื่อทำการคัดเลือกอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบระดับทฤษฎีได้ แล้ว ต่อมาได้ทดสอบปรับค่าพีเอชสำหรับการเพาะเลี้ยง คือ ที่ค่าพีเอช 3.0 (สูตร A²) เปรียบเทียบ กับอาหารที่ค่าพีเอช 4.0 (สูตร A¹) และทำการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์โดยตรวจการสลายสาร นารินจินในลักษณะเช่นเดิม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 และ 7 เมื่อเปรียบเทียบความ สามารถในการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ระหว่างอาหารทั้ง 2 สูตร พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A¹ ซึ่งปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 4.0 ให้ผลการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์นารินจินสเป็นผลบวก มากกว่าอาหารสูตร A² (ค่าพีเอช 3.0) แสดงว่า เชื้อราที่นำมาทดสอบสามารถผลิตเอนไซม์นาริน- จินสได้ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเป็น 4.0 เมื่อปรับให้ค่าพีเอชลดลงเป็นกรดเพิ่มขึ้น เชื้อราจะไม่สามารถผลิตเอนไซม์นารินจินสได้ หรืออาจผลิตได้แต่ในปริมาณต่ำมากจนไม่สามารถ ตรวจพบการสลายนารินจินภายในเวลาที่ตรวจสอบ ดังนั้น ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยง เชื้อเพื่อใช้ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์นารินจินส คือ ค่าพีเอช 4.0 และเมื่อพิจารณาระยะเวลาใน การเพาะเลี้ยงเชื้อราระหว่าง 3 วัน กับ 7 วัน พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อ ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์นารินจินส คือ 7 วัน (ตารางที่ 5 และ 7)

ตารางที่ 4 การเจริญของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

รหัสเชื้อ	สูตร A ¹		สูตร B		สูตร C		สูตร D		สูตร E		สูตร F	
	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน
PTK3.5	+	+++	++	+++	++	+++	+	+	+	+	++	++
PTK4.6	++	+++	+	+++	+	+++	+	++	+	+	++	+++
PTK7.1	++	+++	++	+++	++	+++	+	++	+	+	++	+++
PTK7.4	++	+++	++	+++	+	+	++	+++	+	+	+	++
PTK7.5	++	+++	++	+++	++	+++	+	++	+	+	++	+++
PTK7.10	++	+++	++	+++	++	+++	+	+	+	+	++	+++
PTK12.1	+	+++	++	+++	++	+++	+	+	+	+	+	++
PTK20.1	++	+++	+	++	++	+++	+	+	+	+	+	++
PTK20.5	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PTK23.2	+	+++	+	+++	+	+++	+	+	+	+	++	+++
PTK2.2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
PTK4.5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
PTK4.11	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
PTK10.7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PTK11.2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
PTK11.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PTK13.1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
PTK14.3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PTK20.7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PTK20.9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ +++ หมายถึง เชื้อราเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี

++ หมายถึง เชื้อราเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปานกลาง

+

หมายถึง เชื้อราเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้น้อย

- หมายถึง ไม่พบการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 5 ความสามารถในการสลายสารนารินจินของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

รหัสเชื้อ	สูตร A ¹		สูตร B		สูตร C		สูตร D		สูตร E		สูตร F	
	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน
PTK3.5	-	++	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-
PTK4.6	++	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-	-
PTK7.1	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
PTK7.4	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-
PTK7.5	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
PTK7.10	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
PTK12.1	-	++	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-
PTK20.1	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
PTK20.5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK23.2	-	++	-	++	+	++	-	-	-	-	-	-
PTK2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK4.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK10.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK11.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK13.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK14.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK20.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTK20.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ผลบวก (positive) ต่อการสลายสารนารินจิน ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

++ หมายถึง ผลบวก (positive) ต่อการสลายสารนารินจิน ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

- หมายถึง ผลลบ (negative) ต่อการสลายสารนารินจิน คือไม่มีการย่อยสารนารินจิน

ตารางที่ 6 การเจริญของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะพีเอช 4.0 และ 3.0

รหัสเชื้อ	สูตร A ¹ พีเอช 4.0		สูตร A ² พีเอช 3.0	
	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน
PTK3.5	+	+++	-	++
PTK4.6	++	+++	+	+
PTK7.1	++	+++	+	+++
PTK7.4	++	+++	++	+++
PTK7.5	++	+++	++	+++
PTK7.10	++	+++	+	++
PTK12.1	+	+++	-	-
PTK20.1	++	+++	++	+++
PTK20.5	+	++	-	++
PTK23.2	+	+++	-	+
PTK2.2	+	+	-	-
PTK4.5	+	+	-	+
PTK4.11	+	+	-	-
PTK10.7	+	+	-	-
PTK11.2	+	+	-	-
PTK11.3	+	+	-	-
PTK13.1	+	+	-	-
PTK14.3	+	+	-	-
PTK20.7	+	+	-	-
PTK20.9	+	+	-	-

หมายเหตุ +++ หมายถึง เชื้อราเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี
 ++ หมายถึง เชื้อราเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปานกลาง
 + หมายถึง เชื้อราเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้น้อย
 - หมายถึง ไม่พบการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 7 ความสามารถในการสลายสารนารินจินของเชื้อราเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะพีเอช 4.0 และ 3.0

รหัสเชื้อ	สูตร A ¹ พีเอช 4.0		สูตร A ² พีเอช 3.0	
	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน
PTK3.5	-	++	-	++
PTK4.6	++	++	-	-
PTK7.1	++	++	+	++
PTK7.4	++	++	++	++
PTK7.5	++	++	++	++
PTK7.10	++	++	-	+
PTK12.1	-	++	-	-
PTK20.1	++	++	++	++
PTK20.5	-	+	-	+
PTK23.2	-	++	-	-
PTK2.2	-	-	-	-
PTK4.5	-	-	-	-
PTK4.11	-	-	-	-
PTK10.7	-	-	-	-
PTK11.2	-	-	-	-
PTK11.3	-	-	-	-
PTK13.1	-	-	-	-
PTK14.3	-	-	-	-
PTK20.7	-	-	-	-
PTK20.9	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ผลบวก (positive) ต่อการสลายสารนารินจิน ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

++ หมายถึง ผลบวก (positive) ต่อการสลายสารนารินจิน ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

- หมายถึง ผลลบ (negative) ต่อการสลายสารนารินจิน คือ ไม่มีการย่อยสารนารินจิน

ผลการทดสอบเมื่อนำเชื้อราคัดเลือกระดับปฐมภูมิจำนวนทั้งหมด 348 ไอโซเลทมาคัดเลือกระดับทุติยภูมิ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์นารินจินสคือ อาหารชนิด synthetic minimal medium ที่เติมนารินจิน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นระยะเวลา 7 วัน และนำส่วนใสตรวจสอบตามความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อสลายสารนารินจิน พบว่า มีเชื้อราจำนวนทั้งสิ้น 40 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์นารินจินส มาสลายสารนารินจินได้หมดภายในเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 8) ซึ่งเชื้อราทั้ง 40 ไอโซเลท ดังกล่าวนี้นี้ จะถูกคัดเลือกอีกในระดับตติยภูมิ

ตารางที่ 8 ความสามารถในการสลายสารนารินจินของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกระดับทุติยภูมิ

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งตัวอย่าง	การสลายนารินจิน
1	PTK3.5	เปลือกกล้วย	อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	++
2	PTK4.6			++
3	PTK4.7			+
4	PTK7.1	ดิน	อ.พระพุทธรบาท จ.สระบุรี	++
5	PTK7.4			++
6	PTK7.5			++
7	PTK7.8			++
8	PTK7.10			++
9	PTK10.6	ใบยูคาลิปตัส	อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	+
10	PTK11.4	ใบกระดังงา	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
11	PTK12.1	ดิน	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
12	PTK20.1	ผิวมันแกว	อ.พระพุทธรบาท จ.สระบุรี	++
13	PTK20.5			+
14	PTK23.2	ดิน	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	++
15	PTK24.1	เปลือกกล้วย	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	+
16	PTK-BS1.2	ดินจากธารน้ำร้อน	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	+
17	PTK-BS1.4	บ่อโคลิ่ง		++
18	PTK-BS2.1			++
19	PTK-BS2.2			++

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งตัวอย่าง	การสลายนารินจิน
20	PTK-BS5.2	ดินจากธารน้ำร้อน	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	+
21	PTK-BS5.4	บ่อคสัง		++
22	PTK-BS6.1			+
23	PTK-BS29.1			++
24	PTK-BS29.2			++
25	PTK-BS29.4			++
26	PTK-BS31.1			++
27	PTK-BS31.3			++
28	PTK-BS36.1			++
29	PTK-BS44.1			++
30	PTK-BS44.4			+
31	PTK-BS44.5			++
32	PTK-BL3.3	ใบไม้จากธาร	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	++
33	PTK-BL5.1	น้ำร้อนบ่อคสัง		++
34	PTK-BL5.2			++
35	PTK-BL5.4			++
36	PTK-BL6.3			++
37	PTK-BL9.1			++
38	PTK-BL10.4			++
39	PTK-PS10	ดินจากโป่งยุบ	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	++
40	PTKT2.1	เปลือกส้มโอ	อ.เมือง จ.นครปฐม	+

หมายเหตุ + หมายถึง ผลบวก (positive) ต่อการสลายสารนารินจิน ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

++ หมายถึง ผลบวก (positive) ต่อการสลายสารนารินจิน ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

2.3 การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสระดับตติยภูมิ (Tertiary screening)

2.3.1 การคัดเลือกเชื้อราตามความสามารถของเอนไซม์นารินจินเนสที่ทำงานได้ใน สภาวะที่ต้องการ

เมื่อนำเอนไซม์ดิบของเชื้อราที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบคัดเลือกเชื้อราระดับ
ทุติยภูมิ จากข้อ 2.2 ทั้ง 40 ไอโซเลท มาตรวจวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนส ด้วยการ
บ่มกับซับสเตรตนารินจินที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และที่ค่า
พีเอช 3.0 และ 4.0 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณสารนารินจินที่เหลื้อมตามวิธีของ Davis (1947)
ผลการตรวจสอบ พบว่า เชื้อราทั้ง 40 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสที่
ทำงานที่อุณหภูมิและค่าพีเอชแตกต่างกัน (ตารางที่ 9) เมื่อวิเคราะห์ผลโดยรวมด้วยการจัดลำดับ
เชื้อราตามความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสในปริมาณสูงที่สภาวะต่างๆ 10 ลำดับแรก
โดยพิจารณาจากปริมาณการผลิตเอนไซม์ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์เชื้อรา (U/g dry cell weight)
(ตารางที่ 10) และจากค่า specific activity (ตารางที่ 11) และวิเคราะห์ความถี่ของผลการจัดลำดับ
เชื้อราดังกล่าว (ตารางที่ 12) เพื่อให้การพิจารณาคัดเลือกเชื้อรากระทำได้ง่ายขึ้น พบว่า เชื้อรารหัส
PTK-BL5.1 เป็นไอโซเลทเดียวที่มีความถี่ในการติดลำดับสูงสุด แสดงว่าเชื้อราไอโซเลทนี้สามารถ
ผลิตเอนไซม์นารินจินเนสที่ทำงานได้ทั้งในสภาวะที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส
และที่ค่าพีเอชต่ำคือ ค่าพีเอช 3.0 และ 4.0 เชื้อราไอโซเลทนี้จึงเป็นเชื้อราที่เหมาะสมในการนำไป
ศึกษาต่อ เพราะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง แต่ที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งเป็น
สภาวะที่พบในกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องพิจารณาจากปริมาณเอนไซม์อัลฟา-
แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์นารินจินเนส ควบคู่
กันไปด้วย สำหรับเชื้อราที่มีความถี่ในการติดลำดับถัดมาและได้คัดเลือกเพื่อศึกษาร่วมด้วย คือ เชื้อ
รารหัส PTK-BL1.4 และ PTK-BL9.1

ตารางที่ 9 ปริมาณเอนไซม์นารินจินสของเชื้อรา 40 ไอโซเลท ที่ค่าพีเอช 3.0 และ 4.0 อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส											
		พีเอช 3.0						พีเอช 4.0					
		U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)			U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)		
		50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
1	PTK3.5	38.78	32.86	50.79	37.46	31.74	49.06	31.48	62.01	35.47	30.41	59.90	34.26
2	PTK4.6	18.62	12.86	2.59	19.47	13.45	2.71	17.98	8.43	7.36	18.80	8.82	7.69
3	PTK4.7	27.25	19.97	36.81	71.87	52.65	97.08	17.17	64.99	39.73	45.27	171.40	104.76
4	PTK7.1	40.22	43.84	68.23	9.55	10.41	16.19	47.73	58.28	29.40	11.33	13.83	6.98
5	PTK7.4	20.22	24.57	18.63	6.10	7.41	5.62	21.09	3.48	12.81	6.36	1.05	3.86
6	PTK7.5	23.79	27.58	10.74	8.07	9.35	3.64	38.24	32.83	3.96	12.97	11.13	1.34
7	PTK7.8	40.27	61.34	55.90	124.66	189.91	173.06	23.29	64.14	30.04	72.10	198.56	92.99
8	PTK7.10	43.55	38.20	75.17	67.61	59.31	116.70	63.01	69.87	34.46	97.82	108.47	53.50
9	PTK10.6	36.35	67.11	100.77	24.98	46.13	69.27	41.57	116.66	52.67	28.58	80.19	36.21
10	PTK11.4	36.36	33.47	18.73	48.35	44.51	24.91	47.53	15.54	48.24	63.21	20.67	64.15
11	PTK12.1	33.72	44.65	60.69	77.83	103.06	140.08	42.47	62.06	42.59	98.01	143.24	98.28
12	PTK20.1	39.42	33.11	22.01	7.71	6.48	4.31	44.19	34.13	8.88	8.65	6.68	1.74

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ปริมาณเอนไซม์นารินจินส											
		พีเอช 3.0						พีเอช 4.0					
		U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)			U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)		
		50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
13	PTK20.5	88.56	49.41	68.27	102.24	57.04	78.82	63.97	47.04	59.22	73.85	54.30	68.37
14	PTK23.2	15.72	25.00	3.60	31.41	49.95	7.20	41.20	24.34	12.79	83.32	48.62	25.56
15	PTK24.1	25.22	31.32	5.74	27.53	34.20	6.27	34.84	17.48	30.86	38.04	19.09	33.69
16	PTK-BS1.2	30.09	31.75	14.91	50.53	53.31	25.04	33.68	17.18	25.19	56.55	28.85	42.31
17	PTK-BS1.4	46.92	73.89	56.83	98.27	154.77	119.04	90.40	48.03	47.79	189.35	100.59	100.09
18	PTK-BS2.1	31.73	27.98	38.97	9.31	8.21	11.43	34.01	23.96	24.59	9.98	7.03	7.21
19	PTK-BS2.2	34.05	58.65	61.61	105.45	181.66	190.83	70.03	88.27	30.65	216.89	273.41	94.93
20	PTK-BS5.2	34.68	31.04	12.32	53.40	47.80	18.97	35.73	30.86	17.44	55.01	47.51	26.86
21	PTK-BS5.4	25.79	17.40	9.23	97.01	65.46	34.70	31.49	10.53	23.55	118.48	39.61	88.59
22	PTK-BS6.1	18.06	17.15	5.49	23.29	22.12	7.08	23.63	9.75	10.59	30.47	12.58	13.65
23	PTK-BS29.1	41.11	64.24	71.19	87.76	137.13	151.98	41.99	62.53	30.87	89.64	133.47	65.90
24	PTK-BS29.2	33.13	23.59	4.10	66.95	47.66	8.29	44.38	19.90	49.96	89.67	40.22	100.94

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ปริมาณเอนไซม์นารินจินัส											
		พีเอช 3.0						พีเอช 4.0					
		U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)			U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)		
		50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
25	PTK-BS29.4	24.77	71.84	78.27	10.68	30.97	33.74	52.91	55.61	27.33	22.81	23.97	11.78
26	PTK-BS31.1	74.29	66.28	100.99	8.72	7.78	11.86	76.66	94.99	37.28	9.00	11.15	1.61
27	PTK-BS31.3	36.86	21.88	41.29	8.65	5.13	9.68	27.49	14.05	43.16	6.45	3.29	8.74
28	PTK-BS36.1	26.79	24.18	7.19	5.92	5.34	1.59	37.34	18.39	43.16	8.25	4.06	9.53
29	PTK-BS44.1	74.75	62.43	107.63	19.18	16.02	27.62	56.98	80.54	40.54	14.62	20.67	10.40
30	PTK-BS44.4	4.84	6.52	4.91	10.46	14.07	10.60	4.73	5.61	2.83	10.22	12.11	6.12
31	PTK-BS44.5	63.23	70.30	71.88	12.77	14.20	14.51	76.85	57.39	45.49	15.52	11.59	9.19
32	PTK-BL3.3	22.15	37.06	12.66	4.09	6.85	2.34	46.57	29.38	58.98	8.60	5.43	10.89
33	PTK-BL5.1	48.69	77.32	81.79	85.24	135.35	143.16	89.92	123.15	94.95	157.40	215.57	166.20
34	PTK-BL5.2	16.97	43.32	18.18	5.84	14.92	6.26	32.91	33.33	23.34	11.33	11.48	8.04
35	PTK-BL5.4	51.89	50.75	54.75	40.81	39.91	43.06	40.08	36.30	36.55	31.52	28.55	28.75
36	PTK-BL6.3	11.75	28.42	34.45	2.31	5.60	6.78	27.18	15.83	7.43	5.35	3.12	1.46

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ปริมาณเอนไซม์นารินจินัส											
		พีเอส 3.0						พีเอส 4.0					
		U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)			U/g dry cell weight			specific activity (U/mg)		
		50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
37	PTK-BL9.1	46.82	67.62	60.02	121.36	175.27	155.58	75.79	107.04	52.58	196.45	277.44	136.28
38	PTK-BL10.4	30.22	38.09	26.84	8.16	10.29	7.25	32.16	55.37	62.81	8.69	14.96	16.97
39	PTK-PS10	76.97	84.06	80.14	46.24	50.50	48.15	117.48	136.34	109.32	7.56	81.91	65.67
40	PTKT2.1	23.13	17.26	4.31	68.99	51.46	12.86	19.04	16.86	21.35	56.78	50.29	63.68

ตารางที่ 10 ลำดับเชื้อรา 10 ลำดับแรก ตามปริมาณเอนไซม์นารินจินเอส โดยพิจารณาจากหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (U/g dry cell weight) ที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 3.0 และ 4.0

ลำดับ	ลำดับเชื้อราตามปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสในหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (U/g dry cell weight)					
	พีเอช 3.0			พีเอช 4.0		
	50 องศาเซลเซียส	55 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส	50 องศาเซลเซียส	55 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
1	PTK20.5	PTK-PS10	PTK-BS44.1	PTK-PS10	PTK-PS10	PTK-PS10
2	PTK-PS10	PTK-BL5.1	PTK-BS31.1	PTK-BS1.4	PTK-BL5.1	PTK-BL5.1
3	PTK-BS44.1	PTK-BS1.4	PTK10.6	PTK-BL5.1	PTK10.6	PTK-BL10.4
4	PTK-BS31.1	PTK-BS29.4	PTK-BL5.1	PTK-BS44.5	PTK-BL9.1	PTK20.5
5	PTK-BS44.5	PTK-BS44.5	PTK-PS10	PTK-BS31.1	PTK-BS31.1	PTK-BL3.3
6	PTK-BL5.4	PTK-BL9.1	PTK-BS29.4	PTK-BL9.1	PTK-BS2.2	PTK10.6
7	PTK-BL5.1	PTK10.6	PTK7.10	PTK-BS2.2	PTK-BS44.1	PTK-BL9.1
8	PTK-BS1.4	PTK-BS31.1	PTK-BS44.5	PTK20.5	PTK7.10	PTK-BS29.2
9	PTK-BL9.1	PTK-BS29.1	PTK-BS29.1	PTK7.10	PTK4.7	PTK11.4
10	PTK7.10	PTK7.8	PTK20.5	PTK7.1	PTK7.8	PTK-BS1.4

ตารางที่ 11 ลำดับเชื้อรา 10 ลำดับแรก ตามค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์นารินจินัส ที่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 3.0 และพีเอช 4.0

ลำดับ	ลำดับเชื้อราตามค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์นารินจินัส					
	พีเอช 3.0			พีเอช 4.0		
	50 องศาเซลเซียส	55 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส	50 องศาเซลเซียส	55 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
1	PTK7.8	PTK7.8	PTK-BS2.2	PTK-BS2.2	PTK-BL9.1	PTK-BL5.1
2	PTK-BL9.1	PTK-BS2.2	PTK7.8	PTK-BL9.1	PTK-BS2.2	PTK-BL9.1
3	PTK-BS2.2	PTK-BL9.1	PTK-BL9.1	PTK-BS1.4	PTK-BL5.1	PTK4.7
4	PTK20.5	PTK-BS1.4	PTK-BS29.1	PTK-BL5.1	PTK7.8	PTK-BS29.1
5	PTK-BS1.4	PTK-BS29.1	PTK-BL5.1	PTK-BS5.4	PTK4.7	PTK-BS1.4
6	PTK-BS5.4	PTK-BL5.1	PTK12.1	PTK12.1	PTK12.1	PTK12.1
7	PTK-BS29.1	PTK12.1	PTK-BS1.4	PTK7.10	PTK-BS29.1	PTK-BS2.2
8	PTK-BL5.1	PTK-BS5.4	PTK7.10	PTK-BS29.2	PTK7.10	PTK7.8
9	PTK12.1	PTK7.10	PTK4.7	PTK-BS29.1	PTK-BS1.4	PTK-BS5.4
10	PTK4.7	PTK20.5	PTK20.5	PTK23.2	PTK-PS10	PTK20.5

ตารางที่ 12 ความถี่ในการติดลำดับ 10 ลำดับแรก เรียงตามความสามารถในการทำงานของเอนไซม์
นารินจินเนสที่สภาวะต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ความถี่ในการติดลำดับ		
		พิจารณาจากค่าหน่วย	พิจารณาจากค่า	รวม
		เอนไซม์ต่อน้ำหนักแห้ง (U/g dry cell weight)	specific activity (U/mg protein)	
1	PTK-BL5.1	6	6	12
2	PTK-PS10	6	1	7
3	PTK-BL9.1	5	6	11
4	PTK-BS31.1	5	0	5
5	PTK-BS1.4	4	6	10
6	PTK7.10	4	4	8
7	PTK10.6	4	0	4
8	PTK-BS44.5	4	0	4
9	PTK-BS44.1	3	0	3
10	PTK-BS2.2	2	6	8
11	PTK-BS29.1	2	5	7
12	PTK7.8	2	5	7
13	PTK20.5	4	3	7
14	PTK-BS29.4	2	0	2
15	PTK-BS29.2	1	2	3
16	PTK7.1	1	0	1
17	PTK-BL5.4	1	0	1

2.3.2 การคัดเลือกเชื้อราตามปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส

เมื่อนำเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกระดับทุติยภูมิ จากข้อ 2.2 จำนวน 40 ไอโซเลท ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ด้วยการตรวจวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 4.0 รวมทั้งปริมาณโปรตีน และเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ทั้ง 2 ที่ผลิตได้จากเชื้อราคัดเลือก โดยพิจารณาจากค่า specific activity พบว่า เชื้อราทั้ง 40 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินสที่มีปริมาณทั้ง 2 แอกทิวิตีแตกต่างกัน (ตารางที่ 13) เมื่อทำการจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อราตามปริมาณเอนไซม์ทั้ง 2 แอกทิวิตีเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 14) โดยจัดให้กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงคือ มีค่า specific activity สูงกว่า 20 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Unit/mg protein) กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ระดับปานกลางคือ มีค่า specific activity ระหว่าง 10 ถึง 20 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และกลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ปริมาณต่ำคือ มีค่า specific activity ต่ำกว่า 10 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน พบว่า ได้เชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท ที่ให้ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสสูงกว่า 20 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คือ เชื้อรารหัส PTK-BS1.4, PTK-BL5.1, PTK-BL9.1 และ PTK7.8 และได้เชื้อราที่ให้ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสในปริมาณสูงกว่า 20 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จำนวน 5 ไอโซเลท คือ เชื้อรารหัส PTK-PS10, PTK-BS1.4, PTK-BS2.2, PTK-BL5.1 และ PTK12.1 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 แอกทิวิตีของเชื้อราทั้ง 40 ไอโซเลท พบว่า เชื้อรารหัส PTK-BS1.4 และ PTK-BL5.1 เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตทั้งเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสในปริมาณสูง ขณะที่เชื้อรารหัส PTK-BL9.1 และ PTK7.8 มีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสสูง แต่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสต่ำ และเชื้อรารหัส PTK-PS10, PTK-BS2.2 และ PTK12.1 เป็นเชื้อราที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสสูงกว่าเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

ผลการจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อราตามปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการทดลองข้อ 2.3.1 ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อราตามความสามารถของเอนไซม์นารินจินสที่ทำงานได้ในสภาวะที่ต้องการ พบว่ามีเชื้อราหลายไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่มซึ่งผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสในปริมาณสูงซึ่งเป็นเชื้อราไอโซเลทที่ตรงกับเชื้อราที่ถูกจัดลำดับไว้ในข้อ 2.3.1 ในอันดับต้นๆ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงคัดเลือกเชื้อราเพื่อนำมาศึกษาต่อจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ PTK-BL9.1 ซึ่งให้

ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสสูงที่สุด PTK-BS1.4 และ PTK-BL5.1 ซึ่งให้ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสใกล้เคียงกัน และ PTK-PS10 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อราที่ให้ปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสสูงกว่าเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

ตารางที่ 13 ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 4.0 ของเชื้อรา 40 ไอโซเลต

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส
1	PTK3.5	11.46	8.41
2	PTK4.6	0.67	3.12
3	PTK4.7	9.72	5.38
4	PTK7.1	0.88	0.36
5	PTK7.4	0.25	0.71
6	PTK7.5	0.41	0.57
7	PTK7.8	23.03	4.51
8	PTK7.10	5.91	3.49
9	PTK10.6	1.28	1.93
10	PTK11.4	12.52	16.35
11	PTK12.1	15.33	25.31
12	PTK20.1	0.48	0.18
13	PTK20.5	10.04	0.88
14	PTK23.2	2.17	2.34
15	PTK24.1	1.90	0.84
16	PTK-BS1.2	2.47	8.13
17	PTK-BS1.4	25.89	27.32
18	PTK-BS2.1	0.47	0.71
19	PTK-BS2.2	14.46	24.29
20	PTK-BS5.2	0.31	3.56
21	PTK-BS5.4	6.67	11.05
22	PTK-BS6.1	1.27	2.92

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ค่า specific activity (U/mg protein)	
		ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส	ของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส
23	PTK-BS29.1	5.26	19.68
24	PTK-BS29.2	2.93	4.07
25	PTK-BS29.4	0.84	5.74
26	PTK-BS31.1	0.83	0.49
27	PTK-BS31.3	0.23	0.48
28	PTK-BS36.1	0.15	0.68
29	PTK-BS44.1	1.06	3.54
30	PTK-BS44.4	0.54	0.48
31	PTK-BS44.5	0.75	0.33
32	PTK-BL3.3	0.52	1.38
33	PTK-BL5.1	21.01	22.75
34	PTK-BL5.2	0.43	1.75
35	PTK-BL5.4	1.85	1.64
36	PTK-BL6.3	0.37	0.52
37	PTK-BL9.1	39.06	5.95
38	PTK-BL10.4	0.43	7.29
39	PTK-PS10	5.65	22.95
40	PTKT2.1	1.09	2.96

ตารางที่ 14 กลุ่มของเชื้อราคัดเลือก 40 ไอโซเลท จัดแบ่งตามปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส

รหัสเชื้อ					
ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส			ปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส		
> 20 Unit/mg protein	10-20 Unit /mg protein	< 10 Unit/mg protein	> 20 Unit/mg protein	10-20 Unit /mg protein	< 10 Unit/mg protein
PTK-BS1.4	PTK3.5	PTK4.6	PTK-PS10	PTK11.4	PTK3.5
PTK-BL5.1	PTK11.4	PTK4.7	PTK-BS1.4	PTK-BS5.4	PTK4.6
PTK-BL9.1	PTK12.1	PTK7.1	PTK-BS2.2	PTK-BS29.1	PTK4.7
PTK7.8	PTK20.5	PTK7.4	PTK-BL5.1		PTK7.1
	PTK-BS2.2	PTK7.5	PTK12.1		PTK7.4
		PTK7.10			PTK7.5
		PTK10.6			PTK7.8
		PTK20.1			PTK7.10
		PTK23.2			PTK10.6
		PTK24.1			PTK20.1
		PTK-PS10			PTK20.5
		PTK-BS1.2			PTK23.2
		PTK-BS2.1			PTK24.1
		PTK-BS5.2			PTK-BS1.2
		PTK-BS5.4			PTK-BS2.1
		PTK-BS6.1			PTK-BS5.2
		PTK-BS29.1			PTK-BS5.4
		PTK-BS29.2			PTK-BS6.1
		PTK-BS29.4			PTK-BS29.2
		PTK-BS31.1			PTK-BS29.4
		PTK-BS31.3			PTK-BS31.1
		PTK-BS36.1			PTK-BS31.3
		PTK-BS44.1			PTK-BS36.1
		PTK-BS44.4			PTK-BS44.1

ตารางที่ 14 (ต่อ)

รหัสเชื้อ					
ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส			ปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส		
> 20 Unit/mg protein	10-20 Unit /mg protein	< 10 Unit/mg protein	> 20 Unit/mg protein	10-20 Unit /mg protein	< 10 Unit/mg protein
		PTK-BS44.5			PTK-BS44.4
		PTK-BL3.3			PTK-BS44.5
		PTK-BL5.2			PTK-BL3.3
		PTK-BL5.4			PTK-BL5.2
		PTK-BL6.3			PTK-BL6.3
		PTK-BL10.4			PTK-BL9.1
		PTKT2.1			PTK-BL10.4
					PTKT2.1

หมายเหตุ กลุ่มของเชื้อเราจัดตามปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มเชื้อเราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงคือ สูงกว่า 20 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Unit/mg protein)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มเชื้อเราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ปริมาณปานกลาง ระหว่าง 10 ถึง 20 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มเชื้อเราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ปริมาณต่ำ คือต่ำกว่า 10 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ตารางที่ 15 สรุปสมบัติของเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์
นารินจินเนส

ลำดับ	รหัสเชื้อรา	ความถี่ในการติด 10 ลำดับแรกของ ปริมาณเอนไซม์นารินจินเนส		แอกทิวิตีที่มีปริมาณสูง
		พิจารณาจากค่า	พิจารณาจากค่าหน่วย	
		specific activity	เอนไซม์ต่อน้ำหนักแห้ง	
		(U/mg protein)	(U/g dry cell weight)	
1	PTK-BL5.1	6	6	สูงทั้งสองแอกทิวิตี
2	PTK-BL9.1	5	6	อัลฟา-แรมโนสซิเดส
3	PTK-BS1.4	4	6	สูงทั้งสองแอกทิวิตี
4	PTK-PS10	6	1	บีต้า-กลูโคสซิเดส

เมื่อวิเคราะห์ความถี่ในการติดลำดับ 10 ลำดับแรก ของปริมาณเอนไซม์นารินจินเนส โดยพิจารณาจากค่า specific activity และค่าหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 15) พบว่า เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทมีความถี่ในการติดลำดับสูง และเมื่อพิจารณาปริมาณแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส ทั้ง 2 พบว่า เชื้อรา 2 ไอโซเลทคือ เชื้อรารหัส PTK-BL5.1 และ PTK-BS1.4 มีปริมาณแอกทิวิตีของ ทั้ง 2 เอนไซม์สูง ขณะที่เชื้อรารหัส PTK-BL9.1 มีปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสสูง และเชื้อรารหัส PTK-PS10 มีปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสสูง รายละเอียดของค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเอนไซม์ดิบของเชื้อราแต่ละ ไอโซเลท คือ

- 1.) เชื้อรารหัส PTK-BL9.1 มีปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 39.06 และ 5.95 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน ตามลำดับ
- 2.) เชื้อรารหัส PTK-BS1.4 มีปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 25.89 และ 27.32 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน ตามลำดับ
- 3.) เชื้อรารหัส PTK-BL5.1 มีปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 21.01 และ 22.75 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน ตามลำดับ

4.) เชื้อรารหัส PTK-PS10 มีปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-แรมโนซิเดสเท่ากับ 22.95 และ 5.65 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน ตามลำดับ

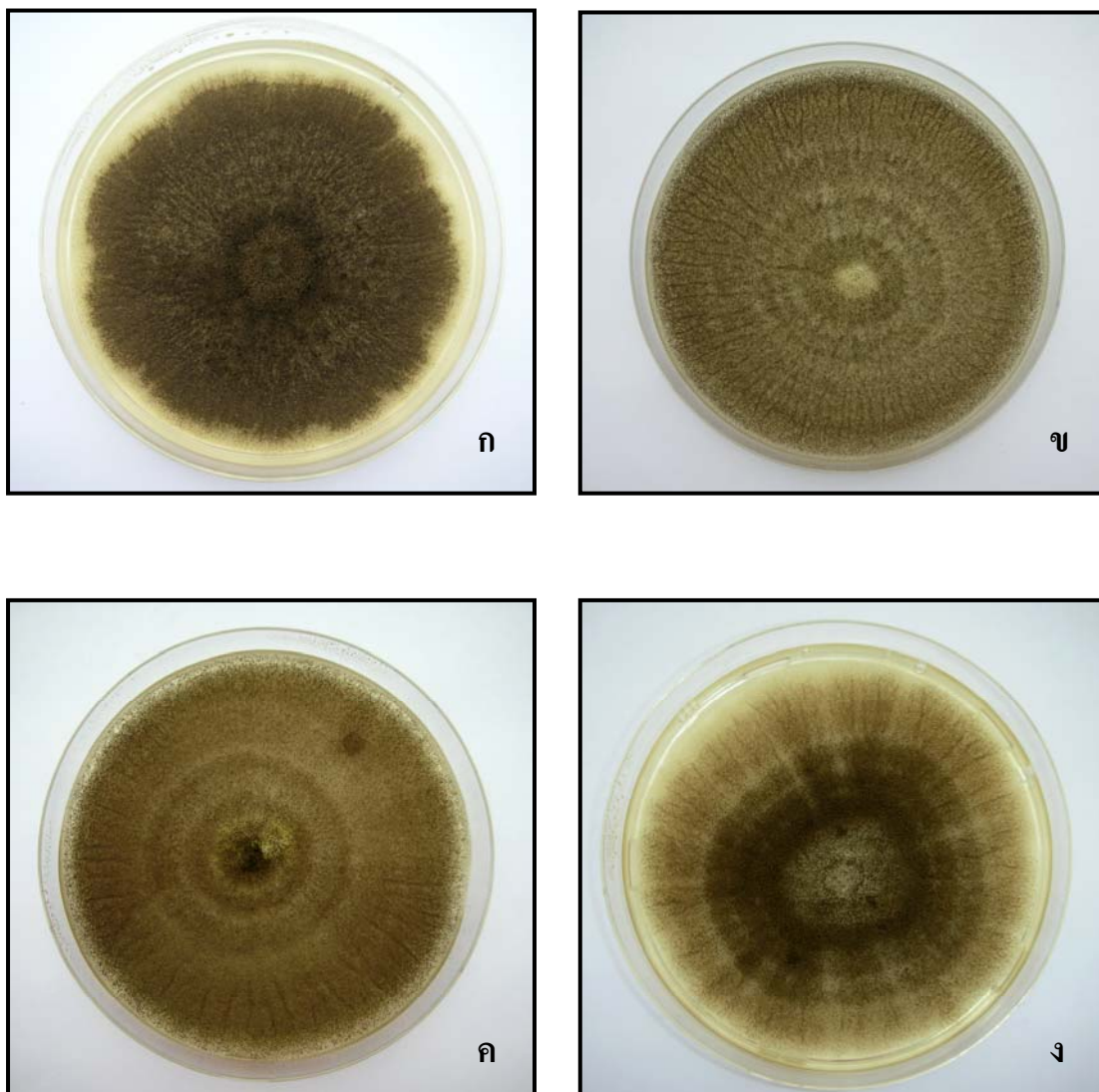
จากตารางที่ 13 พบว่าค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนซิเดสที่วิเคราะห์จากเอนไซม์ดิบของเชื้อราคัดเลือกไอโซเลท PTK-BL9.1, PTK-BS1.4 และ PTK-BL5.1 มีค่าสูงกว่าปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนซิเดสที่ผลิตได้จากเชื้อรากลุ่ม mesophilic หลายสายพันธุ์ (เมื่อเปรียบเทียบจากวิธีการตรวจวัดแอกทิวิตีแบบเดียวกัน) เชื้อรากลุ่ม mesophilic ที่กล่าวถึง ได้แก่ เชื้อ *Fusarium solani* (706), *Mucor racemosus* (709), *Trichoderma longibrachiatum* (708) เป็นต้น ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ (Scaroni *et al*, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท มีค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนซิเดสสูงกว่าเอนไซม์อัลฟา-แรมโนซิเดสของเชื้อรา *Aspergillus nidulans* ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้สารนารินจินเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท โดยที่เชื้อ *Aspergillus nidulans* ให้ค่า specific activity เท่ากับ 0.27 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน (Orejas *et al*, 1999) (เมื่อเปรียบเทียบจากวิธีการตรวจวัดแอกทิวิตีแบบเดียวกัน)

เมื่อเปรียบเทียบค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนสของเชื้อราคัดเลือกแต่ละเชื้อกับค่า specific activity ของเชื้อรา *Aspergillus niger* 1344 ซึ่งได้รายงานไว้โดย Puri และคณะ (2005) พบว่าปริมาณเอนไซม์นารินจินเนสที่ผลิตจากเชื้อราคัดเลือกไอโซเลท PTK-BL9.1, PTK-BS1.4 และ PTK-BL5.1 (ตารางที่ 9) มีค่าสูงกว่าปริมาณเอนไซม์นารินจินเนสที่ได้จากเอนไซม์ดิบของเชื้อรา *Aspergillus niger* 1344 (22.7 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน) เป็นอย่างมาก โดยเปรียบเทียบจากแอกทิวิตีที่สภาวะเดียวกันคือ ที่ค่าพีเอช 4.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3. การจำแนกชนิด (Identification) เชื้อราคัดเลือก และการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ของเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก

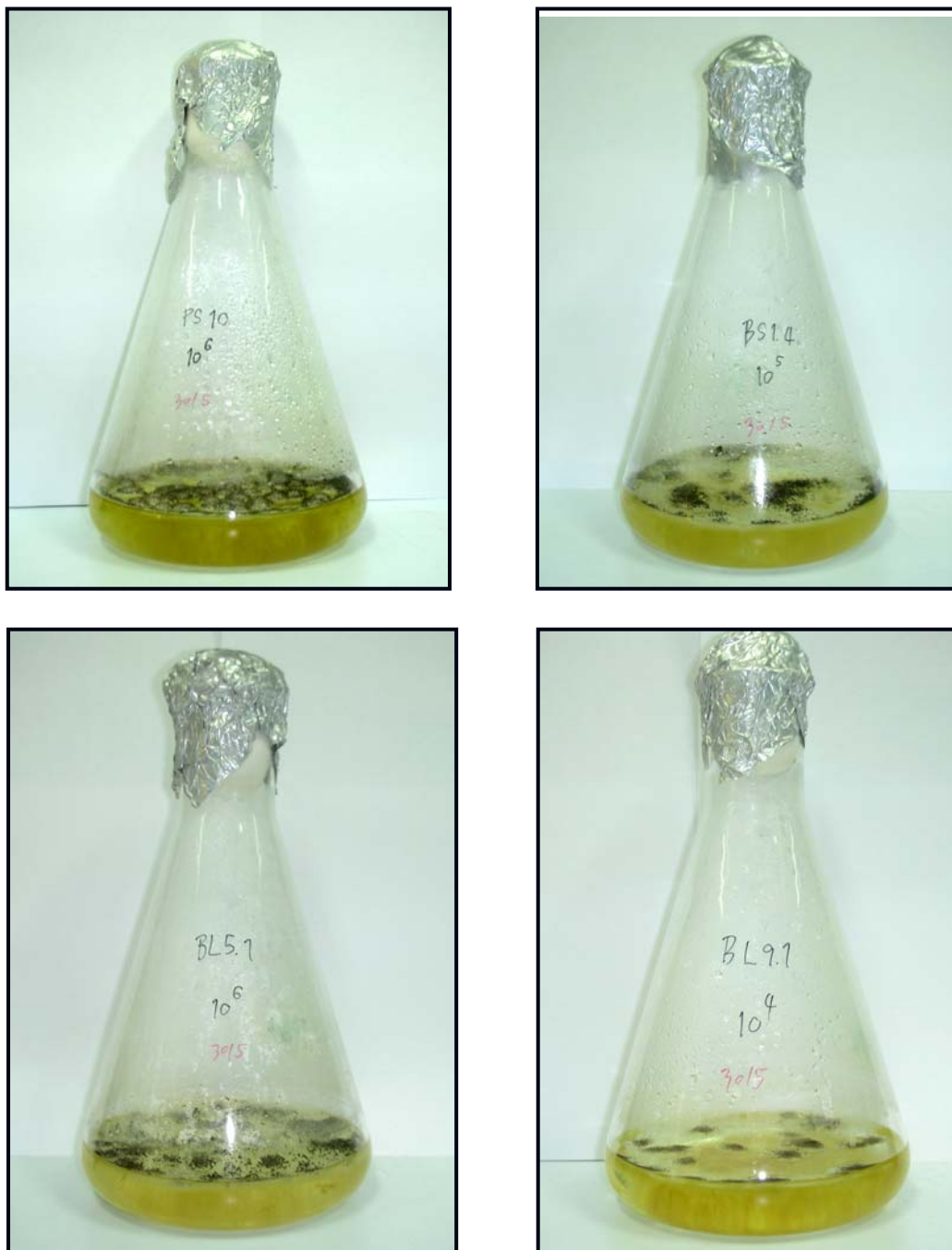
เพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท คือ เชื้อรารหัส PTK-BL9.1, PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 เชื้อราดังกล่าวถูกเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งชนิด potato dextrose agar (ภาพที่ 4) และส่งไปจัดจำแนกชนิดของเชื้อราตามการวิเคราะห์ลำดับเบส ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พบว่าเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท ถูกจำแนกชนิดเป็น *Aspergillus niger* ทั้งหมด

สำหรับการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของเอนไซม์ดิบที่ผลิตจากเชื้อราคัดเลือกได้จัด
 ส่งในรูปสารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilized extract) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกใน
 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจินและปรับค่าพีเอชเริ่ม
 ต้นของอาหารเป็น 4.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน (ภาพที่ 5) และแยก
 เอนไซม์ดิบออกจากเซลล์และสปอร์เชื้อรา ซึ่งเอนไซม์ดิบดังกล่าวถูกนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
 (freeze dry) และจัดส่งตรวจสอบความเป็นพิษ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่ง-
 ชาติ ซึ่งการตรวจสอบความเป็นพิษดังกล่าวใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีวัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์
 ทางอ้อม โดยใช้ tetrazolium dye หลักการคร่าวๆ คือ ถ้าเซลล์มีระบบเมแทบอลิซึมก็จะสามารถ
 เมแทบอลิซ์ tetrazolium dye ซึ่งมีสีเหลืองให้กลายเป็น formazan ที่มีสีฟ้า การเปลี่ยนแปลงของสีที่
 เกิดขึ้นสามารถวัดได้โดยการวัดค่าการดูดแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดังนั้นเซลล์ที่ขาด
 แคลนเมแทบอลิซึมจึงเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต สำหรับเซลล์ที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษ คือ
 เซลล์ L929 (mouse lung connective tissue), BHK21 (baby hamster kidney standard) และเซลล์
 HepG2 (human hepatocyte cell line) สำหรับตัวอย่างเอนไซม์ดิบซึ่งอยู่ในรูปแช่เยือกแข็งจะถูก
 ละลายให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และถูกเจือจางแบบลำดับส่วน (serial
 dilution) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 และ 0.078 มิลลิกรัม
 ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ผลการตรวจ
 แสดงในตารางที่ 16 การบ่งชี้ความเป็นพิษต่อเซลล์พิจารณาได้จากค่า IC_{50} (Inhibition
 concentration at 50%) เมื่อวิเคราะห์ผลพบว่า สารสกัดเอนไซม์ดิบแบบแช่เยือกแข็งของเชื้อรา
Aspergillus niger ทั้ง 4 ไอโซเลทมีความเป็นพิษต่อแต่ละเซลล์ไลน์ในระดับที่แตกต่างกัน โดยมีค่า
 อยู่ระหว่าง 1.28 ถึง 5.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลสรุปจากรายงานการตรวจสอบบ่งชี้ว่า ความ
 เข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบของเชื้อ *Aspergillus niger* ทั้ง 4 ไอโซเลทที่ส่ง
 ตรวจไปใช้คือ ไม่เกิน 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4 ลักษณะเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทที่เจริญในอาหาร Sabouraud's dextrose agar

- ก. เชื้อราไอโซเลท PTK-PS10
- ข. เชื้อราไอโซเลท PTK-BS1.4
- ค. เชื้อราไอโซเลท PTK-BL5.1
- ง. เชื้อราไอโซเลท PTK-BL9.1



ภาพที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลตในอาหาร synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจินและปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0

- ก. เชื้อราไอโซเลต PTK-PS10
- ข. เชื้อราไอโซเลต PTK-BS1.4
- ค. เชื้อราไอโซเลต PTK-BL5.1
- ง. เชื้อราไอโซเลต PTK-BL9.1

ตารางที่ 16 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ของเอนไซม์ดิบแช่เยือกแข็ง
จากเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท

1. เชื้อราหัตถ์ PTK-PS10

Cells	%Survival at each concentration (mg/ml) compared to control								IC ₅₀ (mg/ml)
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078	
L929	8±0	33±1	47±1	56±2	63±1	69±1	78±1	85±0	1.84
BHK21	11±0	57±3	67±1	69±1	81±0	81±1	86±1	85±3	5.24
HepG2	9±0	59±4	97±4	94±1	90±2	83±2	91±0	100±3	5.09

2. เชื้อราหัตถ์ PTK-BS1.4

Cells	%Survival at each concentration (mg/ml) compared to control								IC ₅₀ (mg/ml)
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078	
L929	16±1	39±3	54±4	60±2	71±0	80±1	89±6	94±1	2.75
BHK21	16±1	40±1	52±5	58±1	69±1	83±1	83±2	92±3	2.63
HepG2	11±1	48±1	70±4	90±1	92±6	98±5	>100	>100	4.74

3. เชื้อรา PTK-BL5.1

Cells	%Survival at each concentration (mg/ml) compared to control								IC ₅₀ (mg/ml)
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078	
L929	7±0	27±1	40±0	52±1	58±2	69±1	79±1	92±3	1.28
BHK21	5±1	41±1	67±3	73±1	78±3	90±1	90±1	>100	4.38
HepG2	6±1	53±2	83±3	92±8	97±5	>100	>100	>100	5.14

4. เชื้อราหัตถ์ PTK-BL9.1

Cells	%Survival at each concentration (mg/ml) compared to control								IC ₅₀ (mg/ml)
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078	
L929	1±0	30±1	49±1	54±3	63±1	79±1	84±2	86±2	1.86
BHK21	1±0	32±1	51±0	62±1	75±3	84±0	90±3	93±1	2.52
HepG2	1±0	30±2	74±4	93±3	100±3	>100	>100	>100	3.93

4. การศึกษาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilized extract)

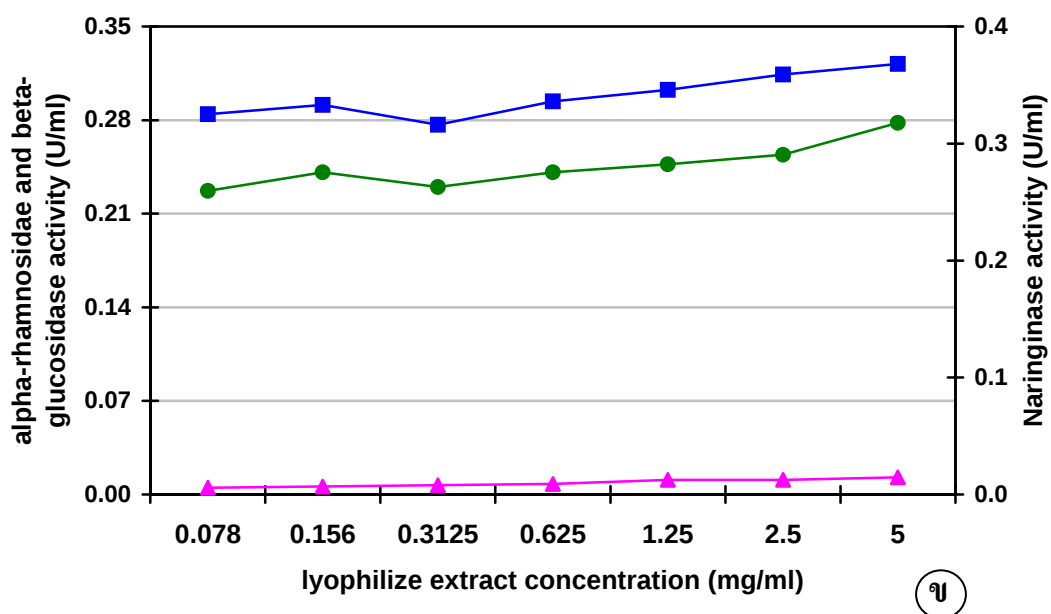
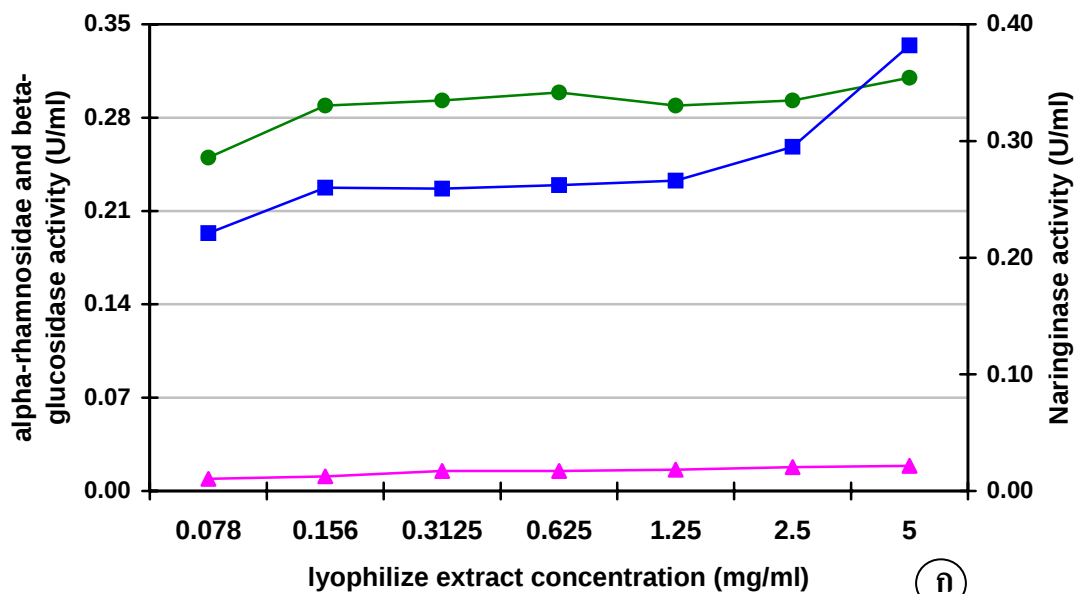
จากผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในข้อ 3 ทำให้ทราบปริมาณเอนไซม์ที่ปลอดภัยต่อการนำไปใช้ แต่เนื่องจากเอนไซม์ดิบที่ส่งไปตรวจอยู่ในรูปสารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำให้ไม่ทราบปริมาณเอนไซม์ที่แน่นอน ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการหาปริมาณเอนไซม์ที่มีในเอนไซม์ดิบซึ่งอยู่ในรูปแช่เยือกแข็ง ประกอบกับต้องการทราบปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสที่มีในตัวอย่างเอนไซม์ดิบแห้งรูปแช่เยือกแข็ง ซึ่งอยู่ในระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบไปใช้เพื่อการบริโภค ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นค่าความเข้มข้นที่ได้จากผลตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวทำโดยการละลายเอนไซม์ดิบที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วย sodium acetate buffer ค่าพีเอช 4.0 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางตัวอย่างแบบลำดับส่วน (serial dilution) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 และ 0.078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเอส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากสารละลายเอนไซม์ดิบความเข้มข้นต่างๆ เหล่านั้น (ภาพที่ 6) และเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์แอกทิวิตีต่างๆ ในเอนไซม์ดิบแช่เยือกแข็งกับค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ดิบแช่เยือกแข็งที่ได้จากผลการตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{50}) พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่มีในสารสกัดแช่เยือกแข็งที่ระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำไปบริโภคของเชื้อราคัดเลือกแต่ละไอโซเลตมีค่าแอกทิวิตีแตกต่างกันไป (ตารางที่ 16) ดังรายละเอียด

Aspergillus niger PTK-PS10 มีความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 1.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.266 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.289 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.016 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-BS1.4 มีความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 2.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.359 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.254 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.011 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-BL5.1 มีความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.286 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.261 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.022 หน่วยต่อมิลลิลิตร

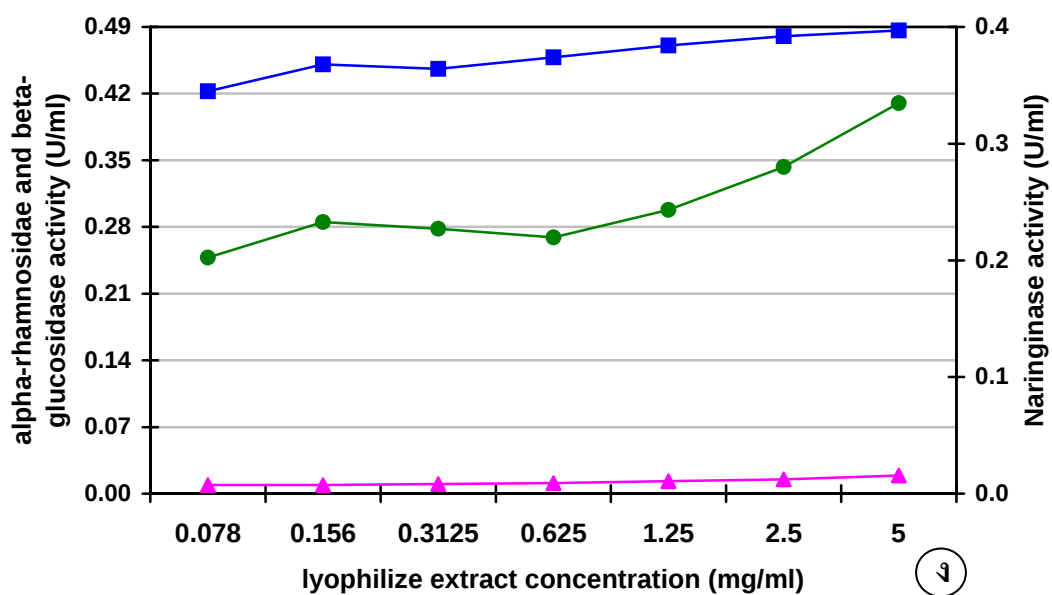
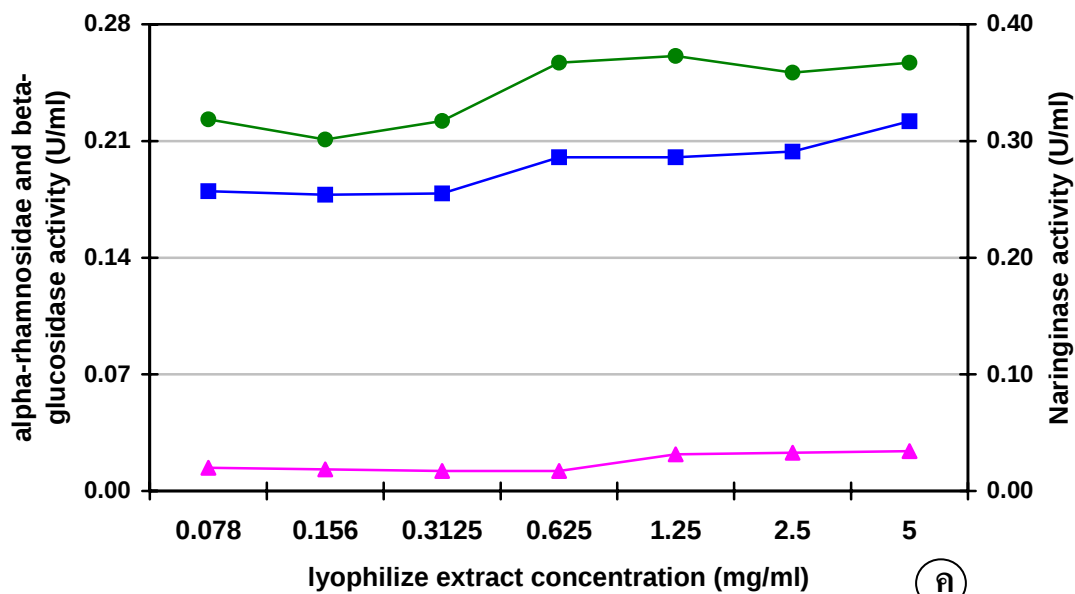
Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 1.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.384 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.298 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.013 หน่วยต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 6 ปริมาณเอนไซม์นาริงิเนส (—■—) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส (—●—) และเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส (—▲—) ที่มีในเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งจากเชื้อ

ก. *Aspergillus niger* PTK-PS10

ข. *Aspergillus niger* PTK-BS1.4



ภาพที่ 6 (ต่อ)

ก. *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

ง. *Aspergillus niger* PTK-BL9.1

5. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดเลือก

5.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum pH)

เมื่อนำเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือกรวมทั้ง 4 ไอโซเลท ตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์ อัลฟา-แรมโนสซิเดส เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และเอนไซม์นารินจินเนส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ซับสเตรดที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 พบว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดอยู่ในช่วงพีเอช 3.0 ถึง 5.0 (ภาพที่ 7) โดยที่เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจะมีแนวโน้มเป็นเช่นเดียวกันคือ เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นสูงกว่าพีเอช 4.0 หรือ 5.0 ทั้ง 2 เอนไซม์จะมีแอกทิวิตีลดลงเรื่อยๆ แต่แนวโน้มของเอนไซม์นารินจินเนสพบว่าจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่าพีเอชสูงกว่า 5.0 จนถึงพีเอช 7.0 หลังจากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์กลับสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงค่าพีเอช 10.0 การที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะการละลายสารนารินจินในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชค่อนข้างเป็นด่าง จะทำให้สารนารินจินเกิดสีเหลืองขึ้นตั้งแต่ยังไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ซึ่งสารสีเหลืองดังกล่าวเป็นสารประเภทชาโลโคน (chalcone) ซึ่งตรงกับการตรวจวัดผลผลิตตามวิธีการของ Davis (1947) ที่ใช้ เป็นผลให้การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์นารินจินเนสสูงเกินความเป็นจริง เมื่อบ่มเอนไซม์กับซับสเตรดที่ค่าพีเอชสูงกว่า 7.0 ดังนั้นการพิจารณาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนสจะพิจารณาค่าพีเอชในช่วงระหว่าง 3.0 ถึง 7.0 เท่านั้น เมื่อวิเคราะห์ผลจากภาพที่ 7 พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และเอนไซม์นารินจินเนส ที่พีเอชเดียวกันคือ 4.0

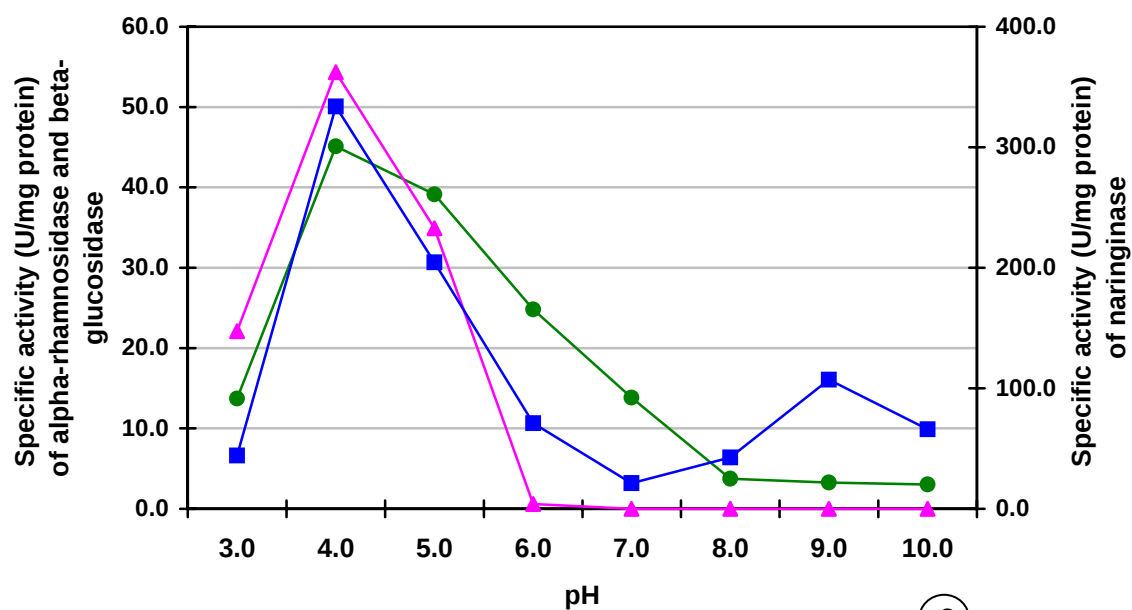
Aspergillus niger PTK-BL5.1 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่พีเอช 4.0 และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนสที่พีเอช 3.0 สำหรับเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสมีปริมาณเอนไซม์ต่ำมากจึงไม่นำมาพิจารณา

Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์นารินจินเนสที่พีเอชเดียวกันคือ 4.0 สำหรับเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสมีปริมาณเอนไซม์ต่ำมากจึงไม่นำมาพิจารณา

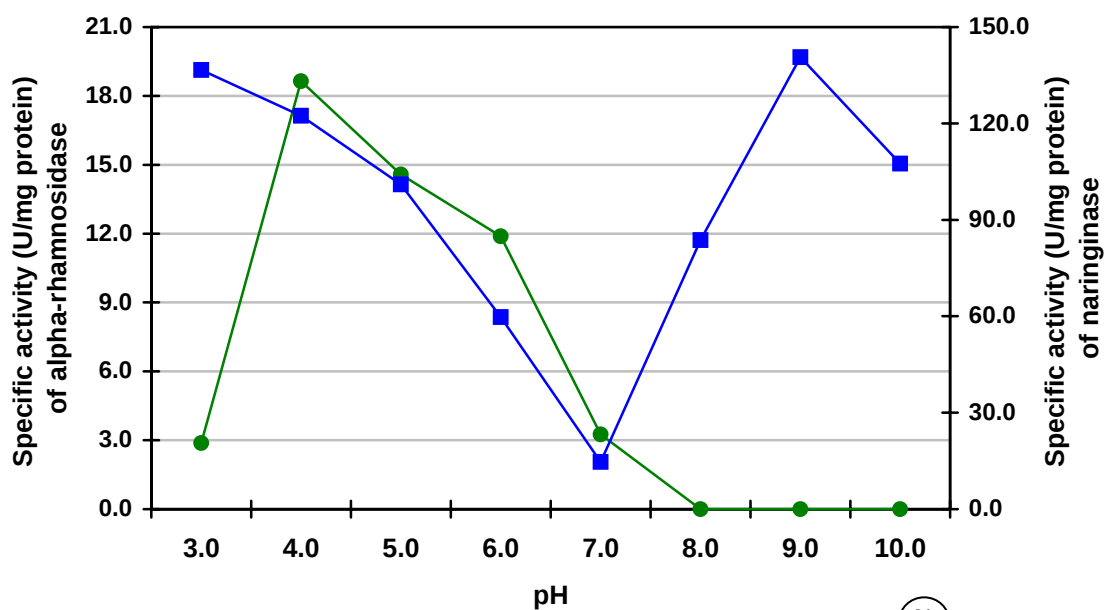
Aspergillus niger PTK-PS10 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่พีเอช 5.0 และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสที่พีเอช 4.0 สำหรับเอนไซม์นารินจินเนสมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่างพีเอช 4.0-6.0

จากการวิเคราะห์ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อราชนิดต่างๆ ตามที่มีรายงานไว้ พบว่าเอนไซม์นารินจินเนสที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* 1344 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 4.0 (Puri and Kalra., 2005) ซึ่งตรงกับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจากเชื้อราคัดเลือกที่ทำการศึกษา 2 ไอโซเลท คือ *Aspergillus niger* PTK-BS1.4 และ PTK-BL9.1 นอกจากนี้ ยังพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนสดังกล่าวจากเชื้อราคัดเลือกนี้มีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์นารินจินเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อรา *Penicillium decumbens* PTCC 5248 ซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.5 (Norouzian *et al.*, 2000) แต่เมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* จากการศึกษาของ Bram และ Solomons (1965) ซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 4.5 ถึง 7.5 พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อราคัดเลือก 3 ไอโซเลท คือ *Aspergillus niger* PTK-BS1.4 PTK-BL5.1 และ PTK-BL9.1 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมดังกล่าวต่ำกว่า

เมื่อวิเคราะห์ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่ามีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 4.0 ถึง 5.0 ซึ่งต่ำกว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อราที่ได้มีรายงานไว้ ได้แก่ เชื้อรา *Rhizopus nigricans* ซึ่งได้รายงานไว้ว่ามีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 6.5 (Shanmugam and Yadav, 1995) เชื้อรา *Aspergillus nidulans* ซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 4.5 ถึง 8.0 (Orejas *et al.* 1999) และจากเชื้อรา *Aspergillus nidulans* ซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 4.5 ถึง 6.0 (Manzanares *et al.*, 2000)



(ก)

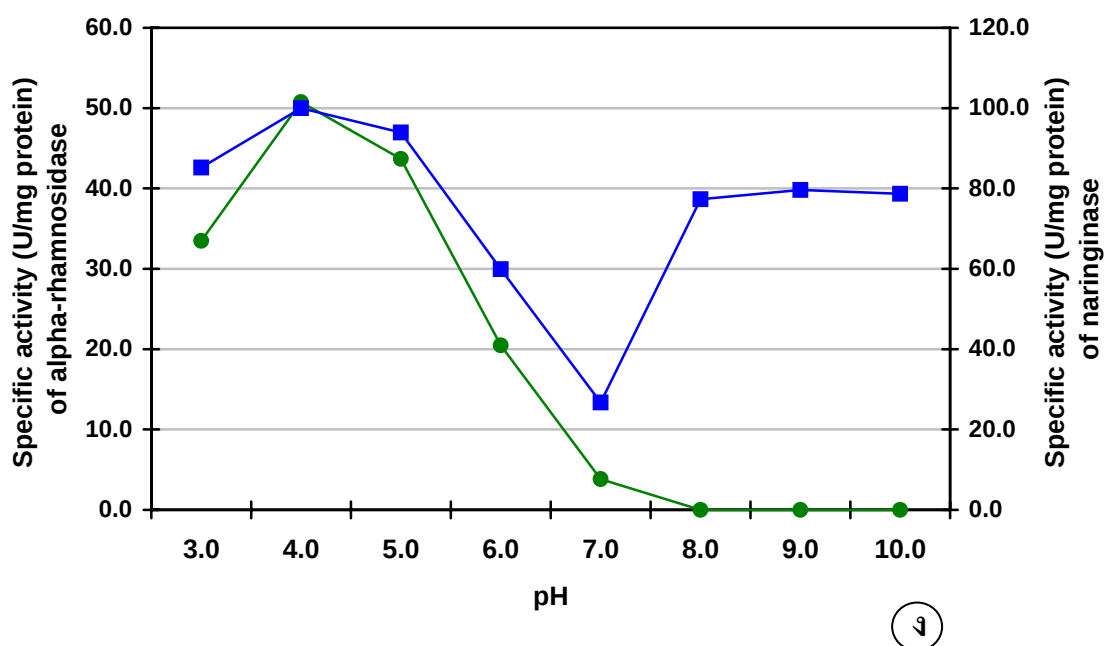
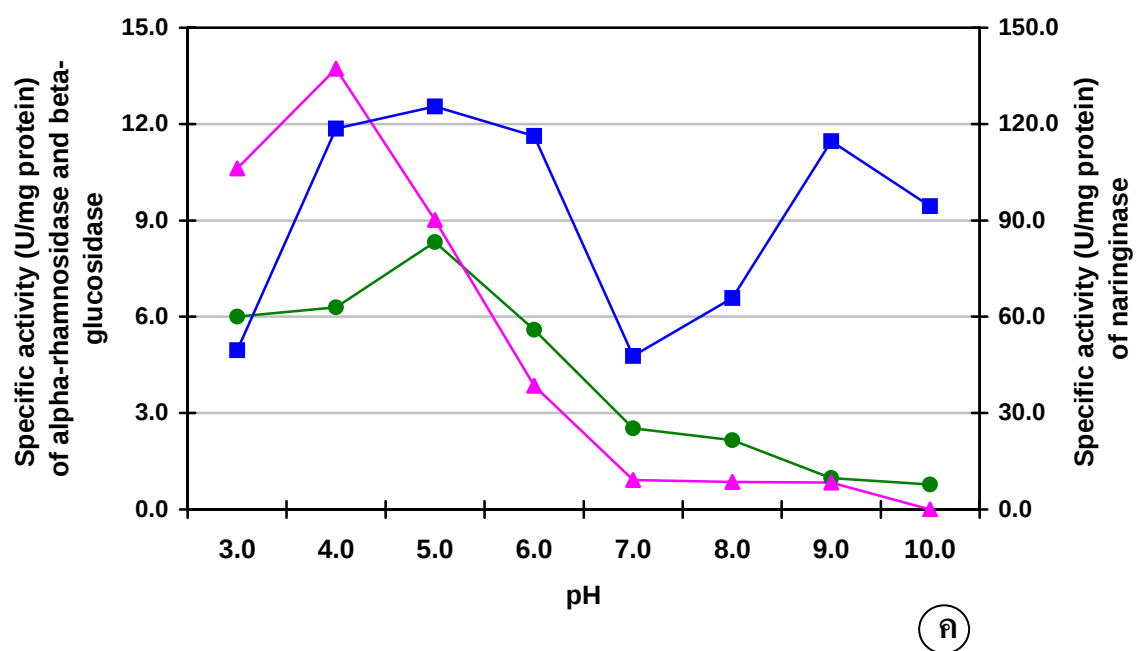


(ข)

ภาพที่ 7 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเนส (—■—) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส (—●—) และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส (—▲—) จากเชื้อราคัดเลือก

ก. *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

ข. *Aspergillus niger* PTK-BL5.1



ภาพที่ 7 (ต่อ)

ก. *Aspergillus niger* PTK-BL9.1

จ. *Aspergillus niger* PTK-PS10

5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum temperature)

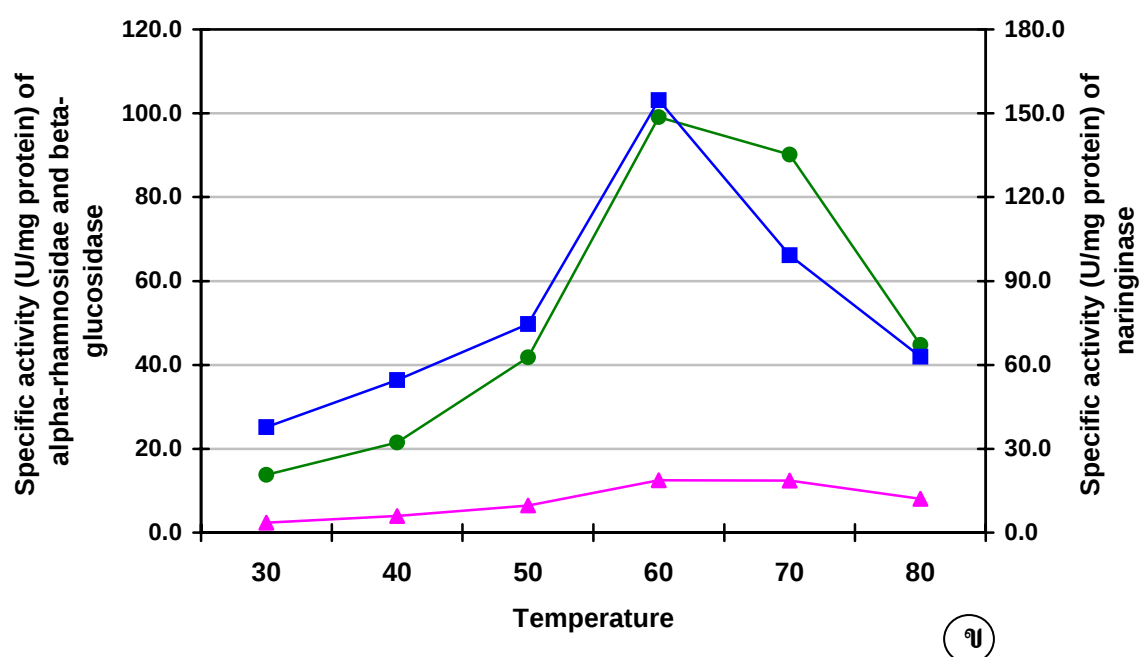
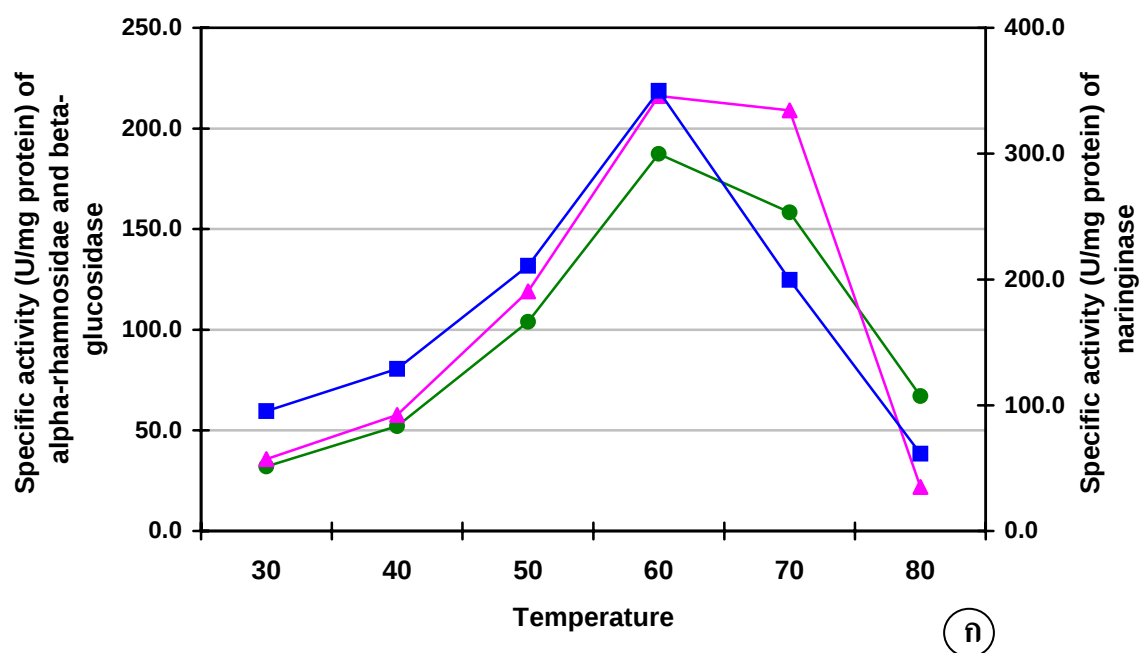
เมื่อนำเอนไซม์ดิบที่ผลิตโดยเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท ตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และเอนไซม์นารินจินเอส ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ตามชนิดของเชื้อราคัดเลือก โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ที่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 จะเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 8) และจะมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 หรือ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่านี้ พบว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์จะมีค่าลดลงจนถึงอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละแอกทิวิตี ดังนี้

Aspergillus niger PTK-BS1.4 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์นารินจินเอสที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 60 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส

Aspergillus niger PTK-BL5.1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์นารินจินเอสที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 60 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส

Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินเอสอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส

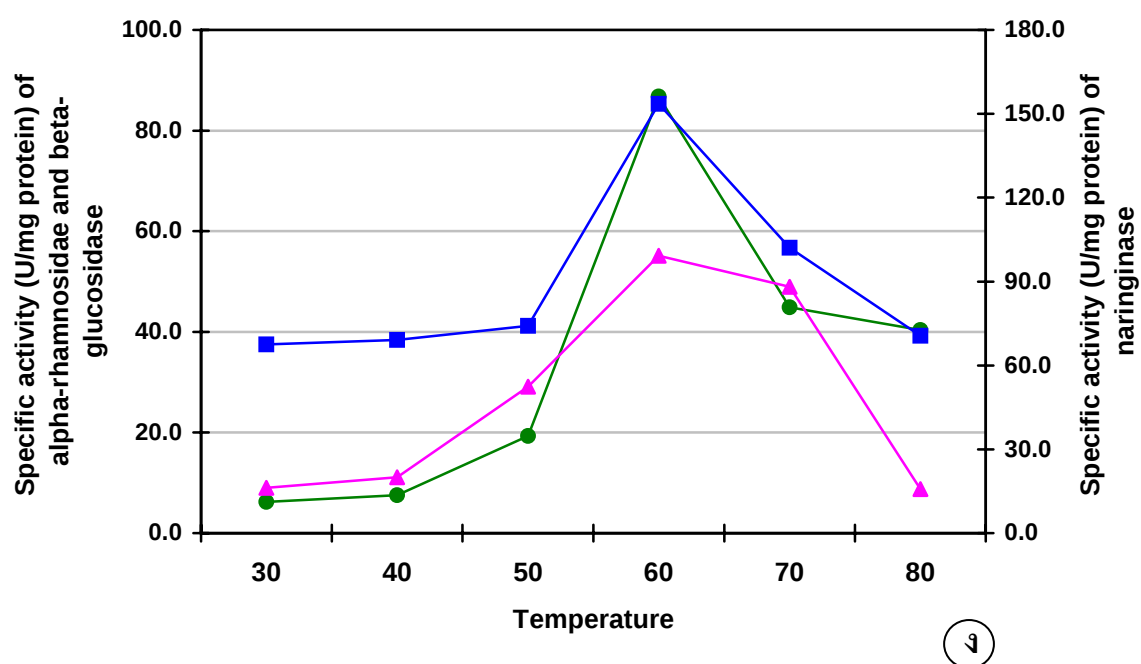
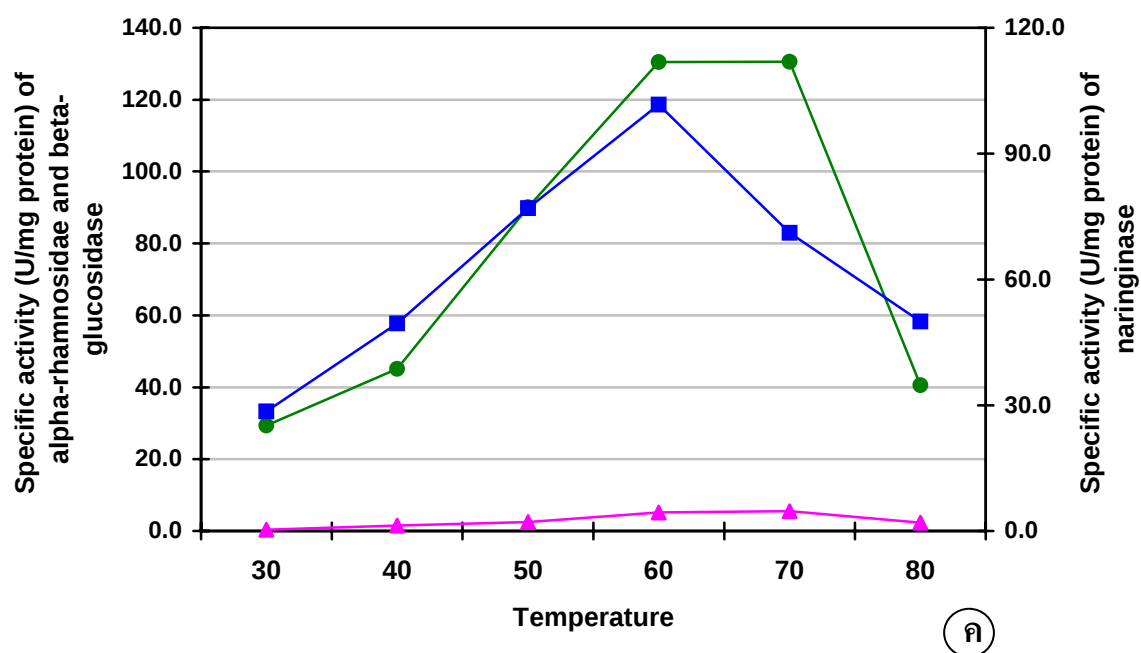
Aspergillus niger PTK-PS10 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์นารินจินเอสที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 60 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นาริงินเนส (—■—) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส (—●—) และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส (—▲—) จากเชื้อราคัดเลือก

ก. *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

ข. *Aspergillus niger* PTK-BL5.1



ภาพที่ 8 (ต่อ)

ก. *Aspergillus niger* PTK-BL9.1

จ. *Aspergillus niger* PTK-PS10

เมื่อวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินสที่ได้จากเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินส (60 องศาเซลเซียส) มีค่าสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อ *Penicillium decumbens* PTCC 5248 ซึ่งได้รายงานไว้ว่าอยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส (Norouzzian *et al.*, 2000) และมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ *Aspergillus niger* 1344 ซึ่งรายงานไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส (Puri and Kalra., 2005)

เมื่อวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือกไอโซเลท PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 พบว่ามีค่าตรงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ *Aspergillus nidulans* (60 องศาเซลเซียส; Manzanares *et al.*, 2000) แต่มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานต่ำกว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ตามการศึกษาของ Manzanares และคณะ (1997) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท มีค่าสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus nidulans* ตามการศึกษาของ Orejas และคณะ (1999) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าอยู่ระหว่าง 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่ผลิตจากเชื้อ *Rhizopus nigricans* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่สูงระหว่าง 60 ถึง 80 องศาเซลเซียส (Shanmugam and Yadav, 1995) ซึ่งจัดว่ามีช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่าเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสที่ผลิตได้จากเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท

ค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละแอกทิวิตีของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทนี้ จะใช้ในการตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ในการศึกษาตลอดการทดลองนับจากนี้

6. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินสของเชื้อราคัดเลือก

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของกล้าเชื้อ (inoculum) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ก่อนการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของกล้าเชื้อที่เหมาะสม โดยนำเชื้อราคัดเลือกมาทำการเพาะเลี้ยงด้วยกล้าเชื้อในรูปสารละลายสปอร์ (spore suspension) ที่ระดับความเข้มข้น 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากความขมของสารพูนินเป็นหนึ่งในสามส่วนของสารนารินจิน (Norouzian *et al.*, 1999) และต้องการให้เชื้อผลิตเอนไซม์นารินจินสที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสสูง ดังนั้น การพิจารณาข้อมูลที่ได้จะพิจารณาจากแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ระหว่างการใช้กล้าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 17) พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4 มีความเข้มข้นของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-BL5.1 มีความเข้มข้นของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีความเข้มข้นของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-PS10 มีความเข้มข้นของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นของกล้ำเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 7 วัน

รหัสเชื้อรา	ความเข้มข้นของ กล้ำเชื้อ (สปอร์ต่อ มิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
		นารินจินเนส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BS1.4	10 ⁴	54.30	10.15	7.65
	10 ⁵	77.38	14.57	6.56
	10 ⁶	62.50	13.59	4.84
	10 ⁷	62.43	12.95	2.69
	10 ⁸	51.69	6.99	1.39
PTK-BL5.1	10 ⁴	20.07	9.67	1.02
	10 ⁵	39.85	22.91	1.04
	10 ⁶	55.47	26.09	2.93
	10 ⁷	46.12	22.49	1.42
	10 ⁸	39.59	18.81	3.78
PTK-BL9.1	10 ⁴	8.84	45.67	0.00
	10 ⁵	14.99	44.99	0.00
	10 ⁶	12.04	34.44	0.97
	10 ⁷	25.04	33.50	2.32
	10 ⁸	54.99	33.48	6.41
PTK-PS10	10 ⁴	29.02	9.73	10.28
	10 ⁵	40.39	14.26	12.61
	10 ⁶	59.59	18.09	19.48
	10 ⁷	46.04	13.87	12.87
	10 ⁸	56.77	15.98	18.68

เมื่อพิจารณารายงานการศึกษาการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อราชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* MTCC 1344 ได้รายงานความเข้มข้นของกล้ำเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส มีค่าประมาณ 5×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Puri *et al.*, 2005) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นของกล้ำเชื้อที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger*

(10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ตามการศึกษาของ Bram และ Solomons (1965) ค่าความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังกล่าวเป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BS1.4 และค่าความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 มีค่าตรงกับที่มีรายงานไว้จากเชื้อรา *Rhizopus nigricans* (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ตามการศึกษาของ Shanmugam และ Yadav (1995) แต่ก็มีรายงานพบว่าเชื้อรา *Penicillium decumbens* PTCC 5248 (10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร; Norouzian *et al.*, 2000) ใช้ความเข้มข้นของกล้าเชื้อสูงกว่าค่าความเข้มข้นของกล้าเชื้อจากเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท

6.2 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เมื่อนำเชื้อราคัดเลือกมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวจำนวน 2 สูตร ได้แก่ สูตร synthetic minimal medium และสูตร Czapek-Dox medium ซึ่งเติมสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 โดยใช้ความเข้มข้นของกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเชื้อซึ่งได้จากข้อ 6.1 เป็นเชื้อเริ่มต้น เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีส่วนประกอบที่แตกต่าง ดังนั้นการพิจารณาคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จะพิจารณาจากค่าหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (Unit/g dry cell weight) ซึ่งเป็นการพิจารณาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการผลิตเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร (ภาพที่ 9) พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์สูตรเดียวกันคือ Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร

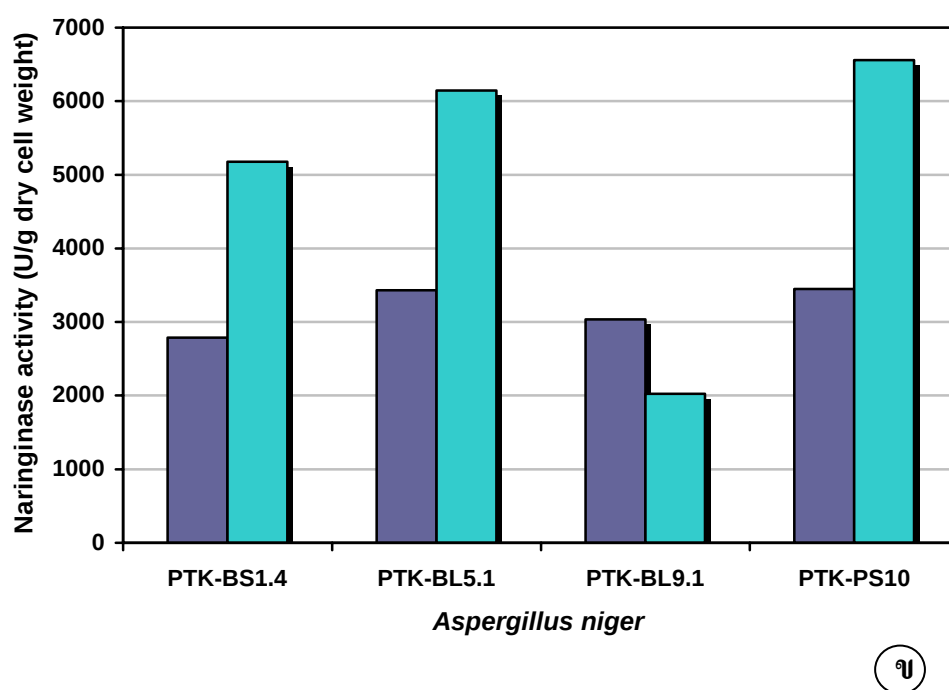
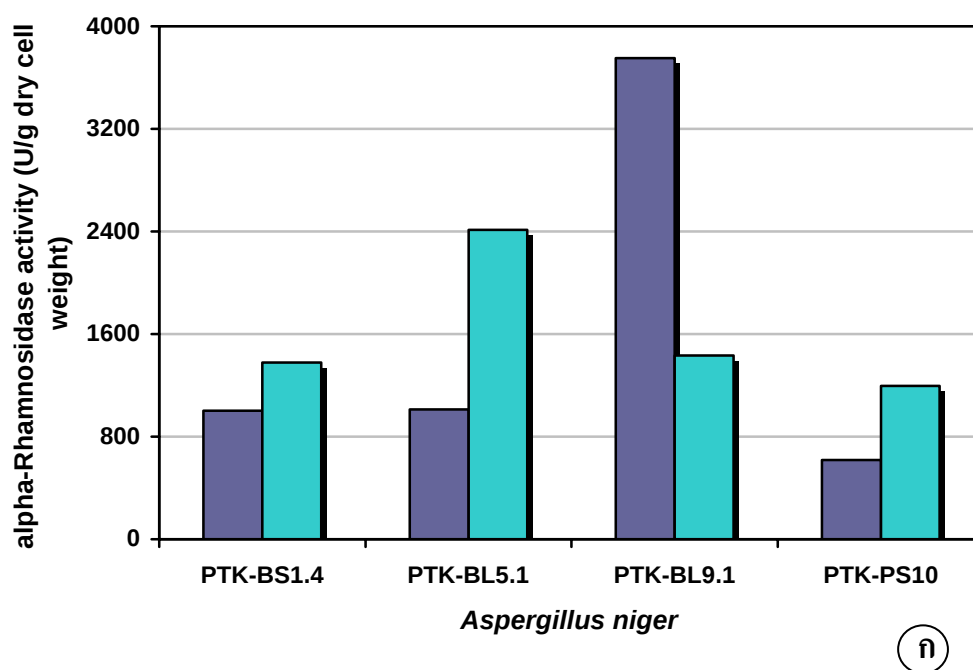
Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek-Dox medium ซึ่งเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกไอโซเลท PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 เพื่อผลิตเอนไซม์นารินจินเนส พบว่านอกจากจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราแล้วยังเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนส-

ซิดิสและเอนไซม์นารินจินสีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อของทั้ง 2 สูตร (ภาคผนวก ก) พบว่า อาหารสูตร synthetic minimal medium มีแร่ธาตุต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบมากกว่าสูตร Czapek-Dox medium แต่สูตร Czapek-Dox medium มีปริมาณสารอาหารมากกว่าสูตร synthetic minimal medium ซึ่งสูตรอาหารนี้เป็นอาหารคัดเลือก (selective medium) ที่มีการเติมปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในปริมาณน้อย เพื่อคัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่ต้องการให้เจริญเท่านั้น ดังนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตรนี้จึงต่ำกว่าการเจริญในอาหารสูตร Czapek-Dox medium ซึ่งมีปริมาณสารอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่า เพราะฉะนั้นอาหารสูตร Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรจะถูกใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกทั้ง 3 ไอโซเลตดังกล่าวข้างต้น สำหรับการทดสอบต่อเนื่องนับจากนี้

การศึกษาของ Bram และ Solomons (1965) ได้รายงานการใช้อาหารสูตร Czapek-Dox medium เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราสำหรับผลิตเอนไซม์นารินจินส จากเชื้อ *Aspergillus niger* ไม่เพียงแต่เท่านั้น อาหารสูตร Czapek-Dox medium ยังเป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาของ Puri และคณะ (2005) ซึ่งศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินสจากเชื้อ *Aspergillus niger* MTCC 1344 แต่มีความแตกต่างจากการทดลองนี้คือ สารนารินจิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ถูกเติมแทนที่สารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ใช้ในการทดลองนี้

นอกจากนั้น อาหารสูตรอื่นๆ ก็ถูกใช้ในการผลิตเอนไซม์นารินจินส เช่น อาหารสูตร Sabouraud's dextrose agar ซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Penicillium decumbens* PTCC 5248 (Norouzian *et al*, 2000) และอาหารสูตร *Aspergillus* minimal medium (AMM) ซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus nidulans* เพื่อผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส (Orejas *et al.*, 1999) ส่วนอาหารสูตร minimal medium มีรายงานว่าใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อ *Aspergillus nidulans* เพื่อนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์ (Manzanares *et al*, 2000) อาหารสูตร minimal medium ดังกล่าวมีคล้ายคลึงกับอาหารสูตร synthetic minimal medium ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกไอโซเลต PTK-BL9.1 แต่มีความแตกต่างกันที่อาหารสูตร minimal medium มีการเติมแรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนและช่วยเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส ขณะที่อาหารสูตร synthetic minimal medium ที่ใช้ในการทดลองนี้จะเติมสารนารินจินเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์นารินจินสและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อรา



ภาพที่ 9 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร synthetic minimal medium (■) และสูตร Czapek-Dox medium (■) ต่อการผลิต (ก) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ข) เอนไซม์นารินจินส จากเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

6.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

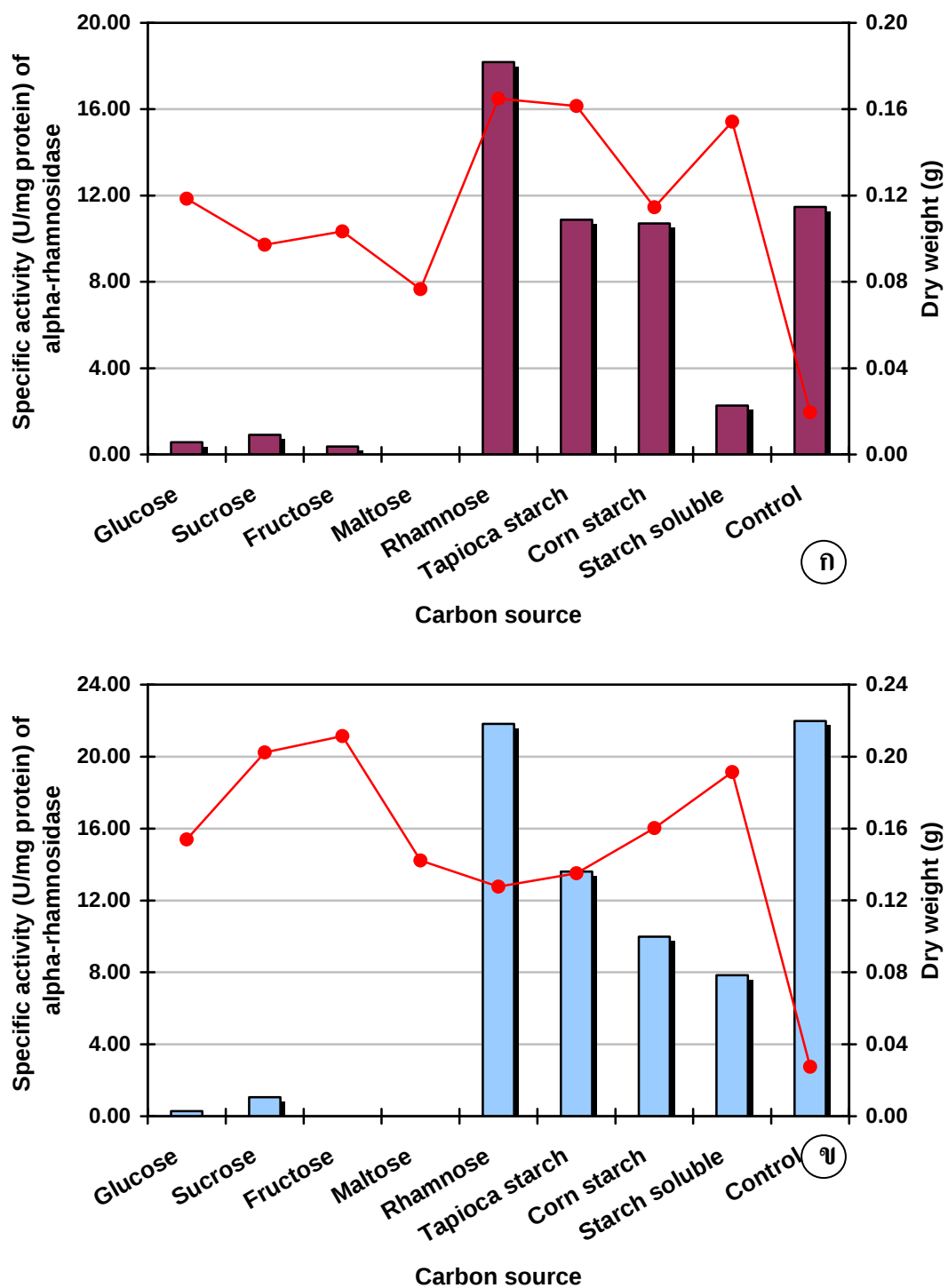
ได้เพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวสูตรที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเชื้อจากข้อ 6.2 ซึ่งมีสารนารินจินเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ และเติมแหล่งคาร์บอนเสริม (supplemented carbon source) ชนิดต่างๆ เพิ่มลงในอาหารดังกล่าว แหล่งคาร์บอนเสริมที่นำมาศึกษามี 8 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) ฟรุคโตส (fructose) มอลโทส (maltose) แรมโนส (rhamnose) แป้งมันสำปะหลัง (tapioca starch) แป้งข้าวโพด (corn starch) และสตาร์ชโซลูเบิล (starch soluble) โดยใช้ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ ซึ่งจัดให้เป็นตัวควบคุม (control) กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ (ภาพที่ 10) พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 ควรเติมแรมโนส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0

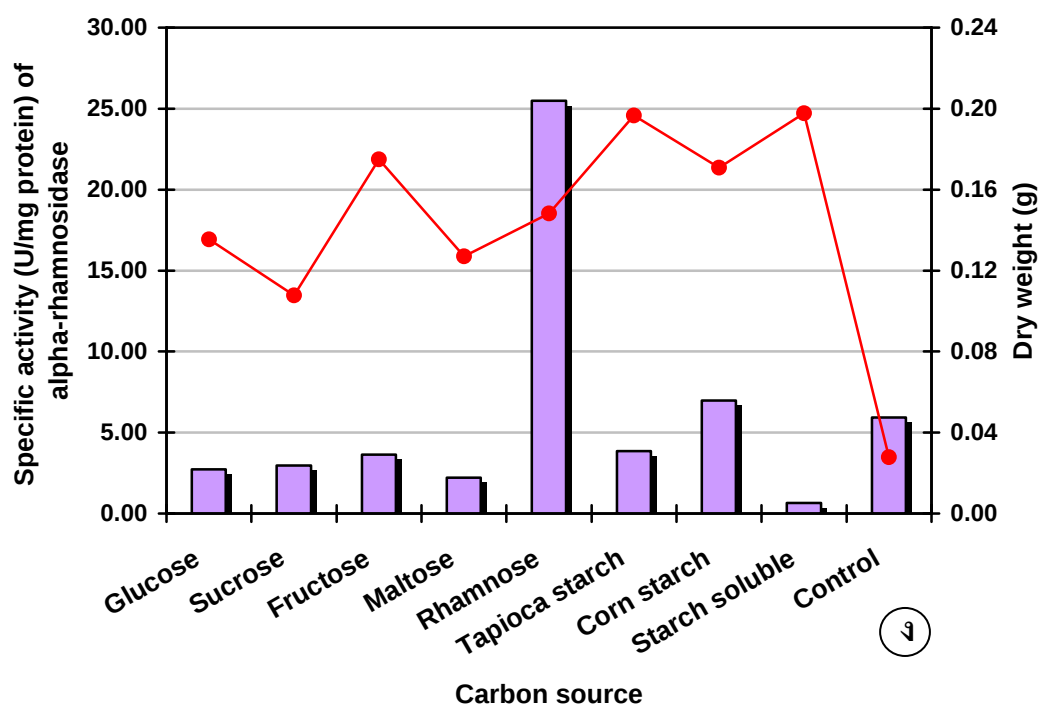
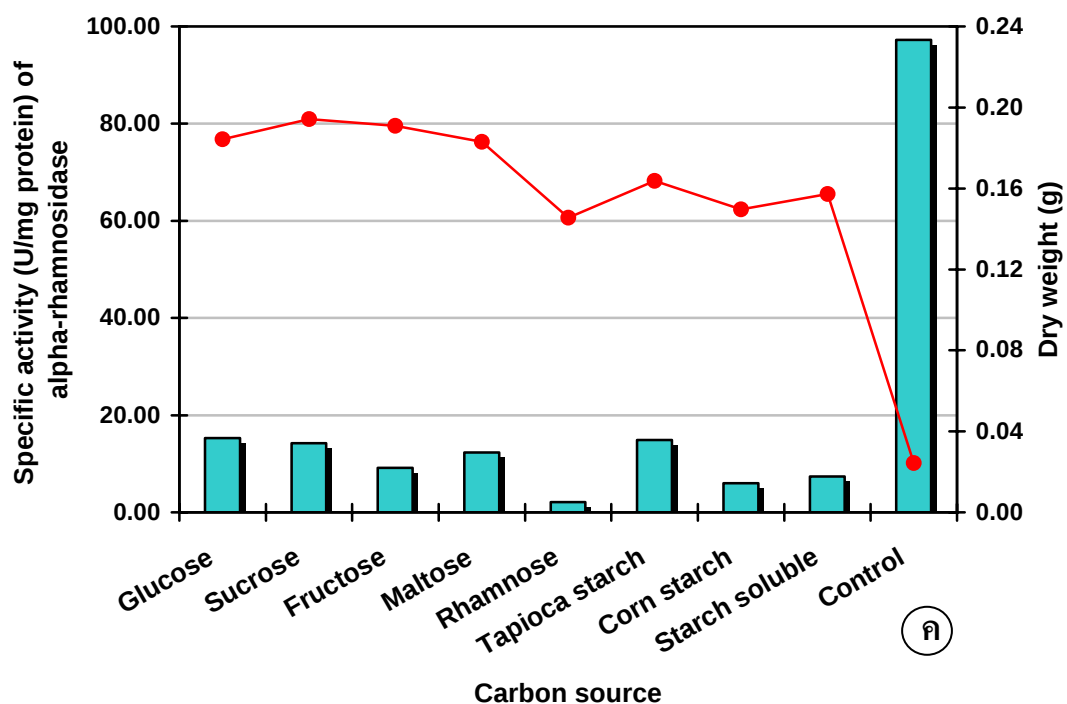
Aspergillus niger PTK-BL9.1 ไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ ลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0

สำหรับการทดลองนี้ได้ทดสอบโดยเติมสารนารินจินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส ซึ่งตรงกับงานวิจัยการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อราหลายรายงาน แต่จากการศึกษาของ Puri และคณะ (2005) ซึ่งทำการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* MTCC 1344 ในอาหาร Czapek-Dox medium ได้เติมสารนารินจิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ จากการเปรียบเทียบราคาของสารนารินจินและสารนารินจินิน พบว่าสารนารินจินินมีราคาแพงมาก หากต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณสูงจะเสียค่าใช้จ่ายสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารนารินจินซึ่งราคาถูกกว่ามากแทน ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารนารินจินเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ามีบางรายงานที่ใช้แรมโนสเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาพบว่าแรมโนสมีราคาสูงกว่าสารนารินจินเช่นเดียวกัน สารนารินจินจึงเป็นสารที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองมากที่สุด

ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งคาร์บอนเสริมต่างๆ พบว่า กรณีของเชื้อราคัดเลือก 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Aspergillus niger* PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 เมื่อเติมคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ ลงในอาหารสูตร Czapek-Dox medium คาร์บอนต่างๆ เหล่านี้ทำให้เชื้อราเจริญเติบโตมากขึ้น ซึ่งพิจารณาได้จากค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (control) ซึ่งไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ และเมื่อพิจารณาจากค่า specific activity จะพบว่าเฉพาะแรมโนสเท่านั้นที่ทำให้บางเชื้อมีค่า specific activity สูงกว่าตัวควบคุม เชื้อที่กล่าวถึงนี้ได้แก่ เชื้อราไอโซเลท PTK-PS10 และ PTK-BS1.4 สำหรับเชื้อราคัดเลือก PTK-BL5.1 พบว่ามีค่า specific activity ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากตัวควบคุม ผลการทดสอบที่ได้บ่งชี้ว่าเมื่อเติมแรมโนสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แรมโนสจะช่วยส่งเสริมให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี และกระตุ้นให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งพิจารณาได้จากค่า specific activity ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากหน่วยเอนไซม์ (Unit) หารด้วยปริมาณโปรตีน แสดงให้เห็นว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงเมื่อเทียบอัตราส่วนกับโปรตีนตัวอื่นๆ ทั้งหมด และเมื่อพิจารณาสัดส่วนค่า specific activity ระหว่างการเติมแรมโนสกับตัวควบคุมจะพบว่า การเติมแรมโนสส่งผลให้ค่า specific activity สูงกว่าตัวควบคุมประมาณ 2 ถึง 3 เท่า แต่เมื่อเทียบสัดส่วนน้ำหนักแห้งจากข้อมูลระหว่างการเติมแรมโนสกับตัวควบคุมพบว่า น้ำหนักแห้งของเชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแรมโนสจะสูงกว่าตัวควบคุมประมาณ 3 เท่าขึ้นไป จะเห็นว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ในสัดส่วนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นหลายเท่า จึงพออนุมานได้ว่าเชื้อราใช้แรมโนสในการนำไปใช้ในการเจริญหรือสร้างเซลล์มากกว่าการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ดี ปริมาณเอนไซม์ที่ได้จากการเติมแรมโนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็ยังคงมากกว่าตัวควบคุม ดังนั้นจึงควรเติมแรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมให้แก่เชื้อราไอโซเลท PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-PS10 แม้ว่าการเติมแรมโนสจะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์ก็ตาม แต่การจำกัดการเจริญของเชื้อมากเกินไปเป็นผลดีแก่เชื้อเช่นกัน ในทางตรงกันข้าม สำหรับเชื้อราไอโซเลท PTK-BL9.1 เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมแต่ละชนิดเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนใดๆ มีแต่เฉพาะสารนารินจิน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า การเติมแหล่งคาร์บอนเสริมทุกชนิดจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อรา แต่ไม่เพิ่มการผลิตเอนไซม์ตามน้ำหนักเซลล์ที่เพิ่มขึ้น แสดงว่า เชื้อราใช้แหล่งคาร์บอนที่เติมไปในการสร้างเซลล์สูงกว่าการผลิตเอนไซม์ ฉะนั้นสำหรับเชื้อราไอโซเลทนี้จึงพอสรุปได้ว่า ไม่จำเป็นต้องเพิ่มแหล่งคาร์บอนเสริมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 10 ผลของการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อรา
 คัดเลือก *Aspergillus niger* (ก) PTK-BS1.4 (ข) PTK-BL5.1 (ค) PTK-BL9.1 และ (ง) PTK-PS10 —●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)
 Control หมายถึง อาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ



ภาพที่ 10 (ต่อ)

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ

มีรายงานการศึกษาแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus niger* MTCC 1344 ซึ่งใช้อาหารสูตร Czapek-Dox medium พบว่า ใช้โมลาส (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในการผลิตเอนไซม์นารินจินเอส (Puri *et al.*, 2005) สำหรับการศึกษาของ Bram และ Solomons (1965) ได้ใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* เพื่อผลิตเอนไซม์นารินจินเอส ในขณะที่มีหลายรายงานซึ่งใช้ แรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์นารินจินเอสเช่นเดียวกับการทดลองที่ได้นี้ อาทิ การศึกษาของ Manzanares และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อ *Aspergillus nidulans* และการศึกษาของ Orejas และคณะ (1999) ซึ่งศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อ *Aspergillus nidulans* ด้วยเช่นเดียวกัน สำหรับการศึกษาของ Elinbaum และคณะ (2002) ได้ใช้สารนารินจินหรือแรมโนสเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus terreus* บนอาหารแข็ง ซึ่งได้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาของ Norouzian และคณะ (2000) ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อ *Penicillium decumbens* PTCC 5248 เพื่อผลิตเอนไซม์นารินจินเอส คือ ใช้ทั้งแรมโนสหรือสารนารินจินเป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีรายงานการศึกษาเพิ่มเติมในรายงานดังกล่าวว่า สารนารินจินเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งนอกจากสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์นารินจินเอสได้ดีแล้ว ยังสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์นารินจินเอสได้ดีอีกด้วย จากผลการทดลองของ Norouzian และคณะ (2000) นี้จะตรงกับผลที่ได้จากเชื้อไอโซเลท PTK-BL9.1 ซึ่งพบว่าไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ แต่ใช้สารนารินจิน ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอนไปในตัวด้วย

นอกจากงานที่กล่าวถึง Bram และ Solomons (1965) ยังรายงานว่า น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแป้ง มีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์นารินจินเอส ถึงแม้ว่าสารประกอบดังกล่าวจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อได้เป็นอย่างดีก็ตาม ซึ่งการทดลองครั้งนี้ก็ได้ใช้สารต่างๆ ดังกล่าวเช่นกัน และได้ผลที่ตรงกับผลจากรายงานดังกล่าว และตรงกับรายงานของ Puri และคณะ (2005) ซึ่งได้รายงานถึงผลการยับยั้งของกลูโคส ซูโครส และแป้งที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ด้วยเช่นเดียวกัน

6.4 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

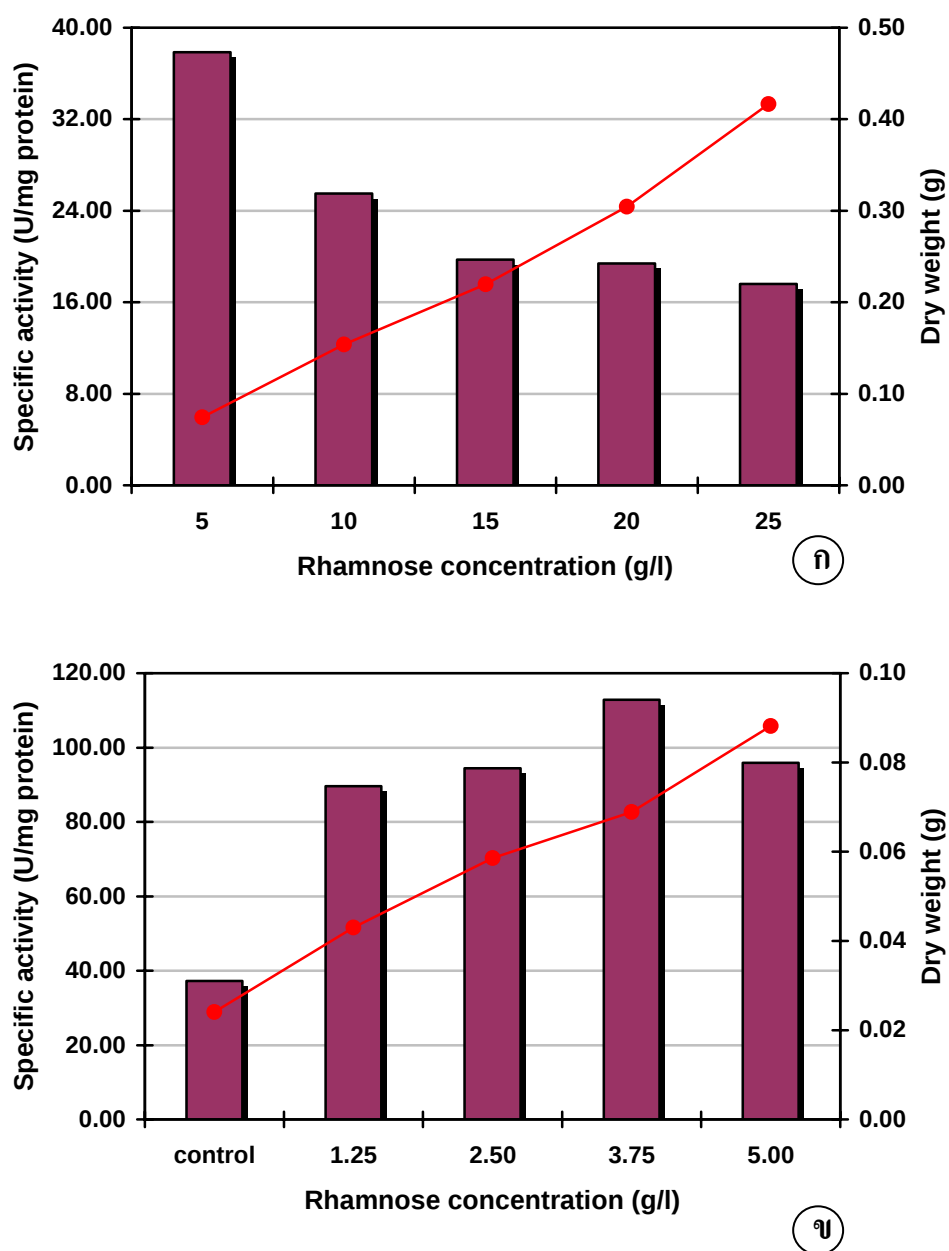
จากผลสรุปสำหรับชนิดของแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก 3 ไอโซเลท ซึ่งบ่งชี้ว่า แรมโนส เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสม จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของแรมโนสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ด้วยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นเป็น 1.25, 2.5, 3.75, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร หรือ 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งได้ทดสอบครั้งแรกโดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแรมโนสเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 11ก, 12ก และ 13ก) เมื่อพิจารณาจากค่า specific activity พบว่าปริมาณแรมโนสที่ให้แอกทิวิตีสูงสุด คือ 5 กรัมต่อลิตร จึงได้ทำการทดสอบครั้งต่อมา โดยลดปริมาณแรมโนสลงอีกเป็น 1.25, 2.5, 3.75 และ 5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 11ข, 12ข และ 13ข) และพิจารณาจากค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เนื่องจากการคัดเลือกรั้งที่ผ่านมา จะพิจารณาจากข้อมูลของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เป็นเกณฑ์ การคัดเลือกรั้งนี้ได้พิจารณาจากปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเช่นเดียวกัน สำหรับกรณีคัดเลือกสูตรอาหารในข้อ 6.2 ปัจจัยที่มีผลเข้ามาเกี่ยวข้องคือ น้ำหนักแห้ง เพราะอาหารแต่ละสูตรมีผลต่อการเจริญของเชื้อแตกต่างกัน ค่าที่นำมาพิจารณาคัดเลือกจึงใช้ค่าหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (Unit/g dry cell weight) แทน จากข้อมูลที่ได้พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4 และ PTK-PS10 ควรเติมแรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในปริมาณ 3.75 กรัมต่อลิตร

สำหรับ *Aspergillus niger* PTK-BL5.1 ควรเติมแรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในปริมาณ 5.0 กรัมต่อลิตร

เนื่องจากผลการทดลองจากขั้นที่แล้วพบว่า ไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ ให้แก่เชื้อ *Aspergillus niger* PTK-BL9.1 และเมื่อเปรียบเทียบผลจากเชื้อราไอโซเลทนี้กับเชื้อราคัดเลือก 3 ไอโซเลทที่เหลือ พบว่าผลการทดลองที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* PTK-BL9.1 ไม่เป็นไปในแนวเดียวกับเชื้อราไอโซเลทอื่นที่มีการเติมแรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ฉะนั้นเพื่อต้องการตรวจสอบเพิ่มเติมให้มั่นใจว่าไม่จำเป็นต้องเติมแรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมจริง จึงทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* PTK-BL9.1 อีกครั้งโดยปรับเพิ่มความเข้มข้นของแรมโนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร โดยมีแนวคิดว่า การทดสอบขั้นที่แล้วอาจใช้แรมโนสในปริมาณที่ต่ำเกินไป ผลการทดสอบจึงไม่เป็นในทางเดียวกับเชื้อราคัดเลือกอื่นๆ

จากผลการทดสอบจากเชื้อรา *Aspergillus niger* PTK-BL9.1 (ภาพที่ 14) พบว่า การเติมแรมโนสช่วยให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น โดยพิจารณาได้จากน้ำหนักแห้งของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแรมโนสความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีการเติมแรมโนส แต่เมื่อพิจารณาผลการผลิตเอนไซม์จากค่า specific activity พบว่า ตัวควบคุมยังคงให้ปริมาณเอนไซม์สูงที่สุด แต่เมื่อความเข้มข้นของแรมโนสเพิ่มขึ้น ปริมาณเอนไซม์ก็ลดลง ผลการทดสอบนี้บ่งชี้ว่า แรมโนสเป็นสารยับยั้งการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือกไอโซเลท PTK-BL9.1 และให้ผลการทดสอบที่จูงใจยืนยันว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนเสริม การที่ผลจากเชื้อราไอโซเลทนี้ ไม่เป็นไปในแนวเดียวกับเชื้อราคัดเลือกไอโซเลทอื่น อาจเป็นเพราะสภาวะการเลี้ยงจากการศึกษาและได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่างชนิดกับสูตรอาหารสำหรับเชื้อราคัดเลือก 3 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* PTK-BL9.1 ใช้สูตรอาหาร synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจินเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์และเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม ขณะที่เชื้อรา 3 ไอโซเลท ใช้สูตรอาหาร Czepek-Dox medium ที่เติมสารนารินจินเป็นตัวเหนี่ยวนำและใช้แรมโนสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม



ภาพที่ 11 ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

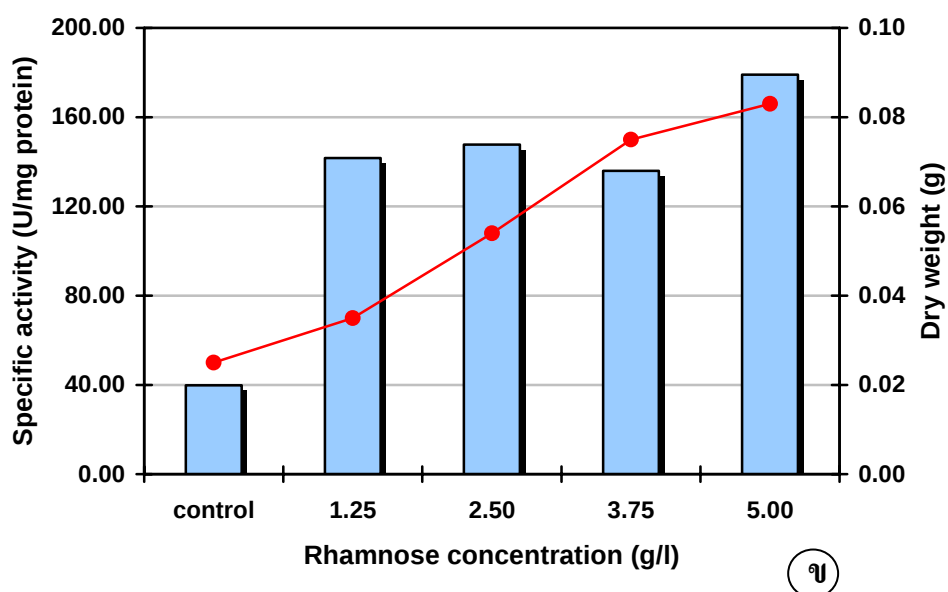
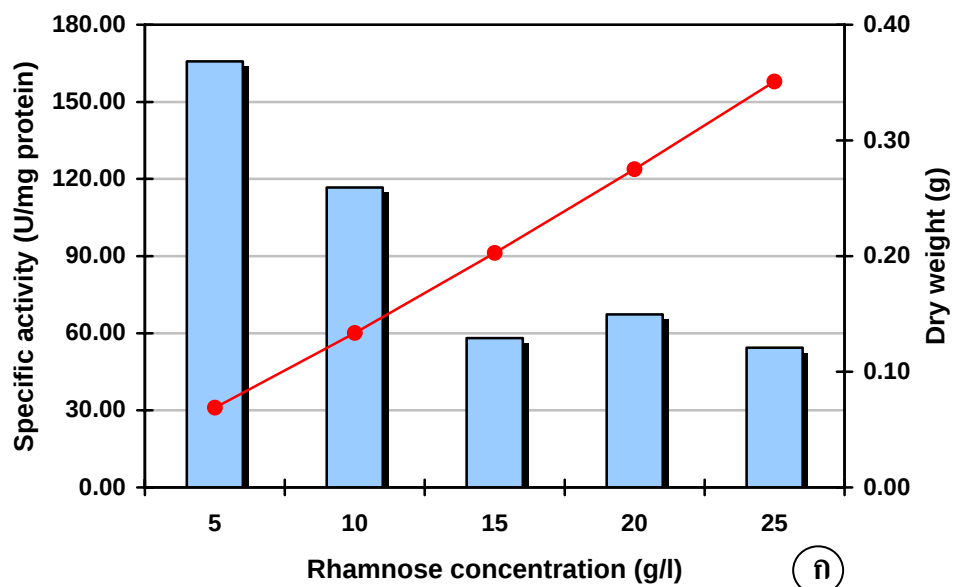
(ก) แรมโนสความเข้มข้น 5 ถึง 25 กรัมต่อลิตร

(ข) แรมโนสความเข้มข้น 1.25 ถึง 5 กรัมต่อลิตร

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่ไม่มีการเติมแรมโนส



ภาพที่ 12 ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

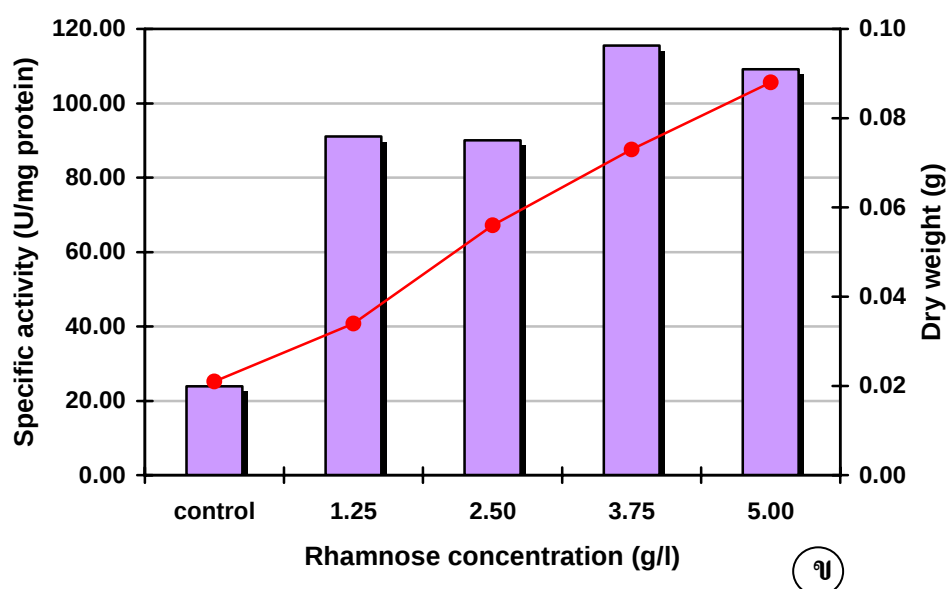
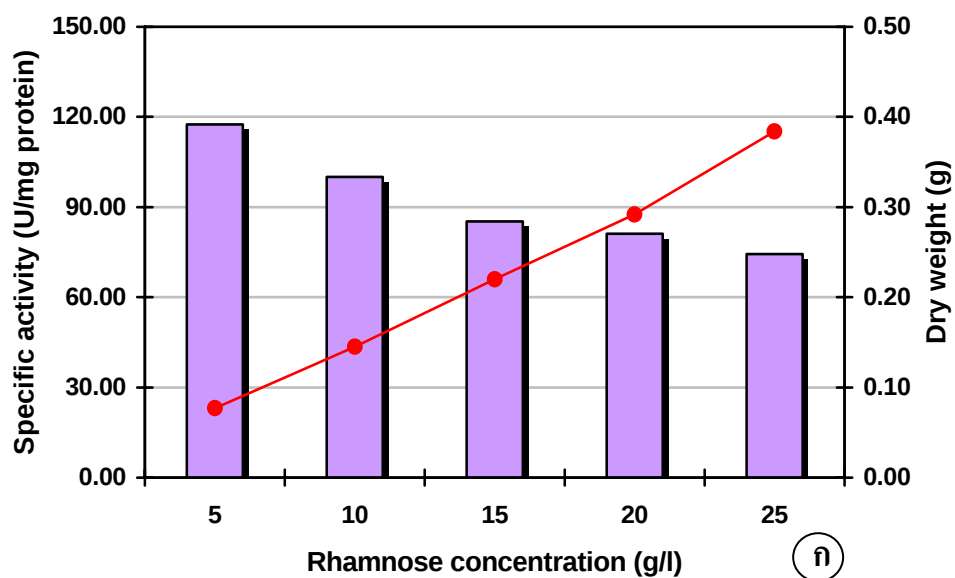
(ก) แรมโนสความเข้มข้น 5 ถึง 25 กรัมต่อลิตร

(ข) แรมโนสความเข้มข้น 1.25 ถึง 5 กรัมต่อลิตร

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่ไม่มีการเติมแรมโนส



ภาพที่ 13 ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-PS10

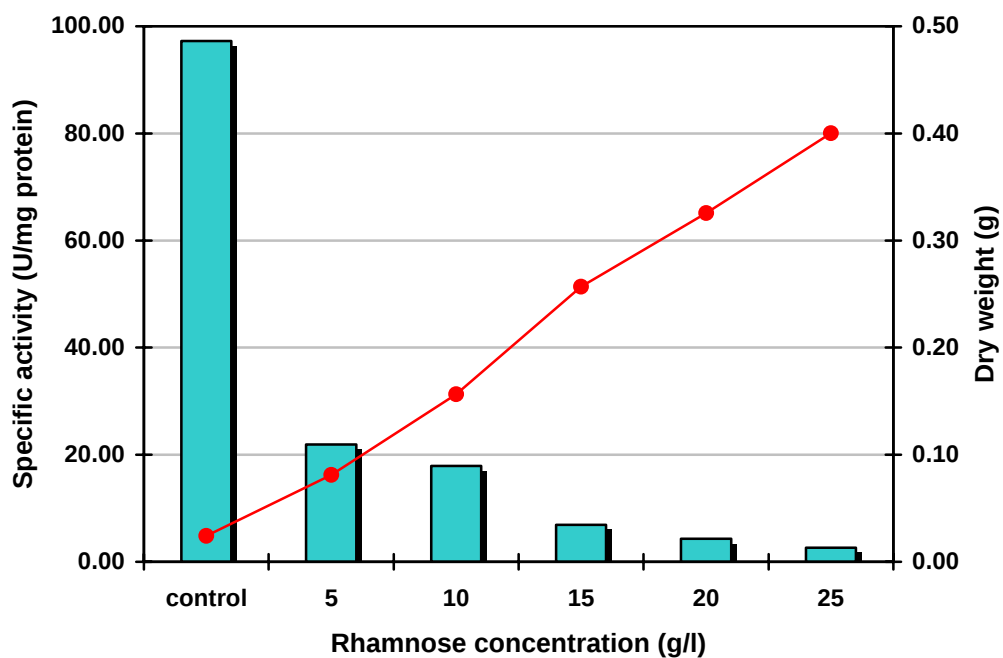
(ก) แรมโนสความเข้มข้น 5 ถึง 25 กรัมต่อลิตร

(ข) แรมโนสความเข้มข้น 1.25 ถึง 5 กรัมต่อลิตร

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่ไม่มีการเติมแรมโนส



ภาพที่ 14 ผลของการเติมแรมโนสด้วยความเข้มข้น 5 ถึง 25 กรัมต่อลิตร และการไม่เติมแรมโนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสจากเชื้อราคัตเลือก

Aspergillus niger PTK-BL9.1

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหารชนิด synthetic minimal medium ที่ไม่มีการเติมแรมโนส

6.5 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราคัดเลือกแต่ละไอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมแบบเหลวที่เดิมชนิดและปริมาณคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ด้วยการปรับเปลี่ยนชนิดของสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเดิม แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ใช้ปรับเปลี่ยน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ammonium dihydrogen phosphate, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate, NH_4NO_3) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรท (di-ammonium hydrogen citrate) โซเดียมไนเตรท (ammonium nitrate, NaNO_3) เปปโตน (peptone) ทริปโตเน (tryptone) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) หางนม (skimmed milk) เคซีนที่สกัดด้วยกรด (casein acid hydrolysate) กากถั่วเหลือง (soyabean meal) และซอเยาเปปโตน (soya peptone) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร synthetic minimal medium ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 5 กรัมต่อลิตร (0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek-dox medium ใช้ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับการใช้เกณฑ์พิจารณาสำหรับคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน ได้ใช้ค่าหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เนื่องจากสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนบางชนิดมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ทำให้การพิจารณาจากค่า specific activity มีความผิดพลาด เนื่องจากปริมาณโปรตีนและ/หรือสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร ซึ่งรบกวนปฏิกิริยาการวัดปริมาณโปรตีน เช่น แอมโมเนียม เป็นต้น จากการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดเดิม ซึ่งจัดเป็นตัวควบคุม (control) กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่า

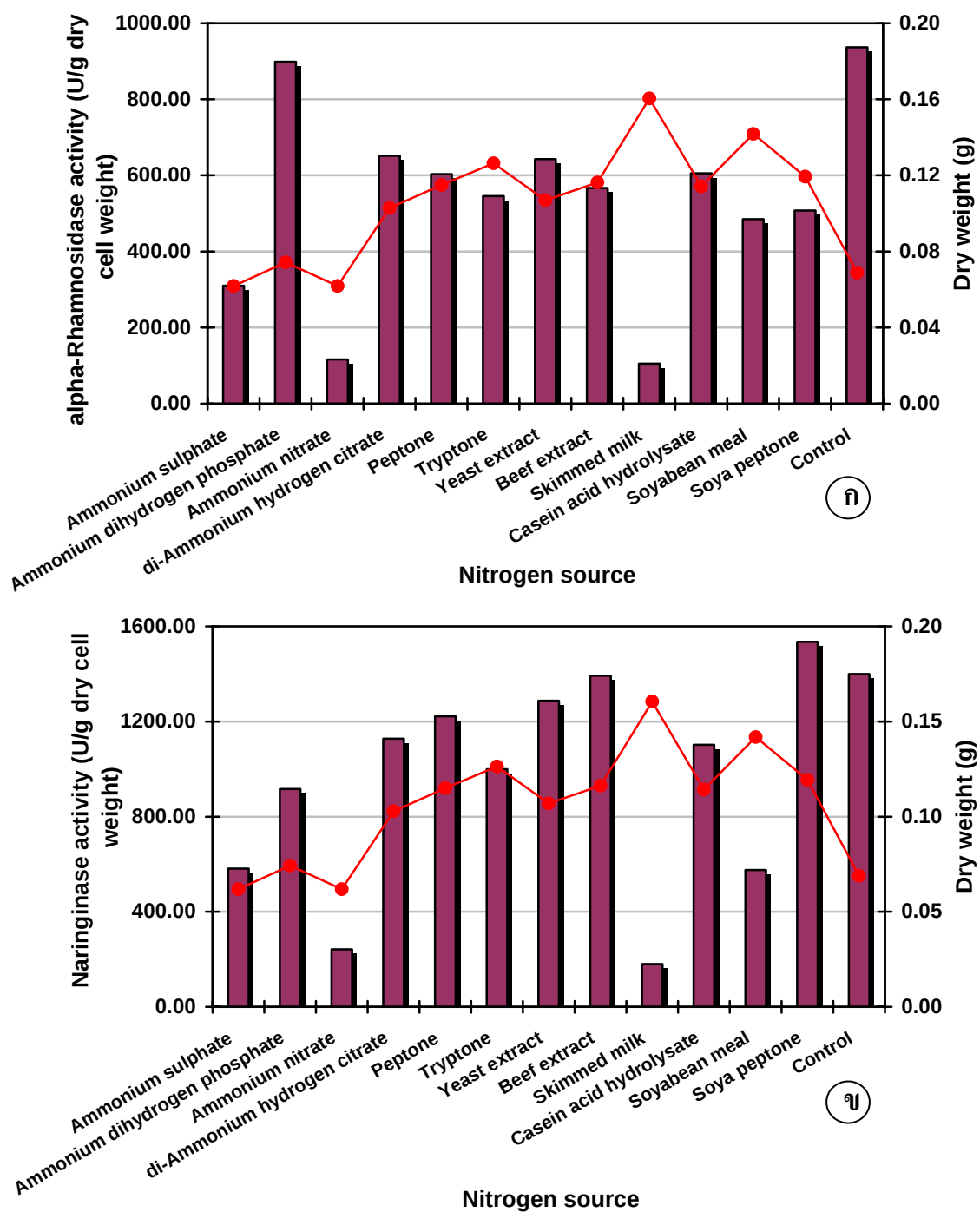
Aspergillus niger PTK-BS1.4 ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสให้มีปริมาณสูง (ภาพที่ 15ก) แต่ใช้ซอเยาเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสในปริมาณสูง (ภาพที่ 15ข)

Aspergillus niger PTK-BL5.1 ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสให้มีปริมาณสูง (ภาพที่ 16ก) แต่ถ้าต้องการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสในปริมาณสูง สามารถใช้ได้ทั้งกากถั่วเหลือง (soyabean meal) หรือแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาพที่ 16ข) เพราะทั้ง 2 แหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณเอนไซม์นารินจินเนสสูงใกล้เคียงกัน

Aspergillus niger PTK-PS10 ใช้ขอยยาเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสให้มีปริมาณสูง (ภาพที่ 17ก) แต่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสในปริมาณสูง (ภาพที่ 17ข)

Aspergillus niger PTK-BL9.1 ใช้เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสหรือเอนไซม์นารินจินเนสให้ได้ปริมาณสูง (ภาพที่ 18)

จากการศึกษาของ Puri และคณะ (2005) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* MTCC 1344 ในอาหารสูตร Czapek-Dox medium คือ เปปโตน ซึ่งตรงกับการศึกษาการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อรา *Penicillium decumbens* PTCC 5248 ของ Norouzian และคณะ (2000) และการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวจากเชื้อราคัดเลือกไอโซเลท PTK-BL9.1 ที่ได้ทำการศึกษาในการทดลองนี้ นอกจากนี้ Bram และ Solomons (1965) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* และพบว่ากากถั่วเหลืองและสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ซึ่งคล้ายกับผลการทดสอบที่ได้จากเชื้อราไอโซเลท PTK-BL5.1 สำหรับการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส มีรายงานการศึกษาโดย Manzanares และคณะ (2000) ซึ่งพบว่าสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus nidulans*

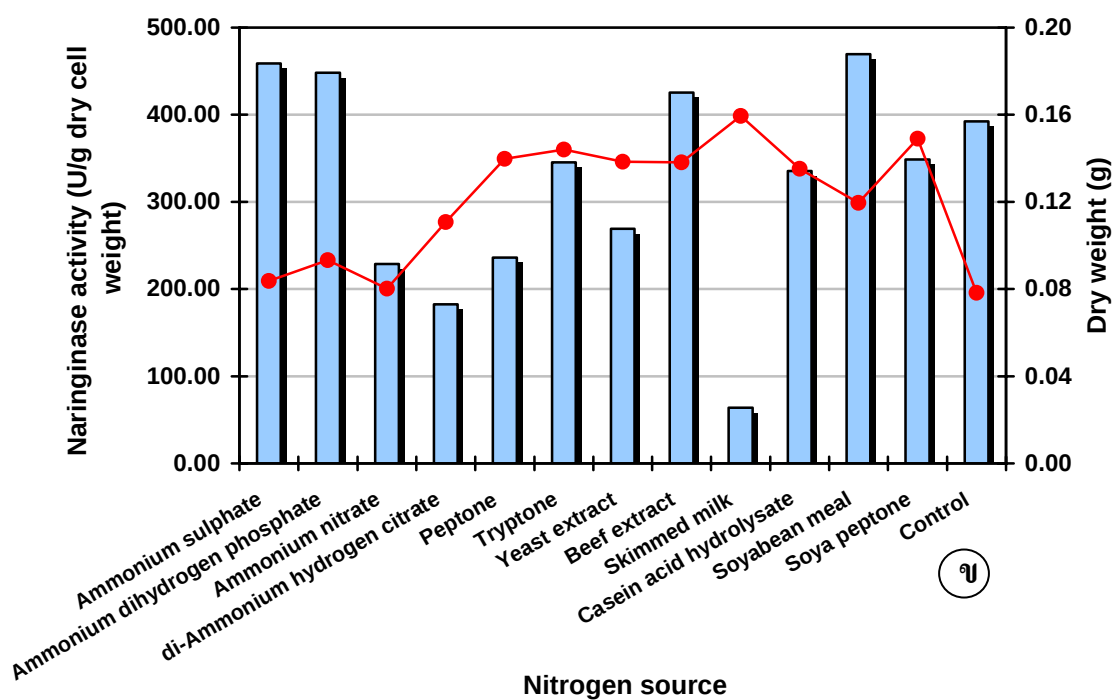
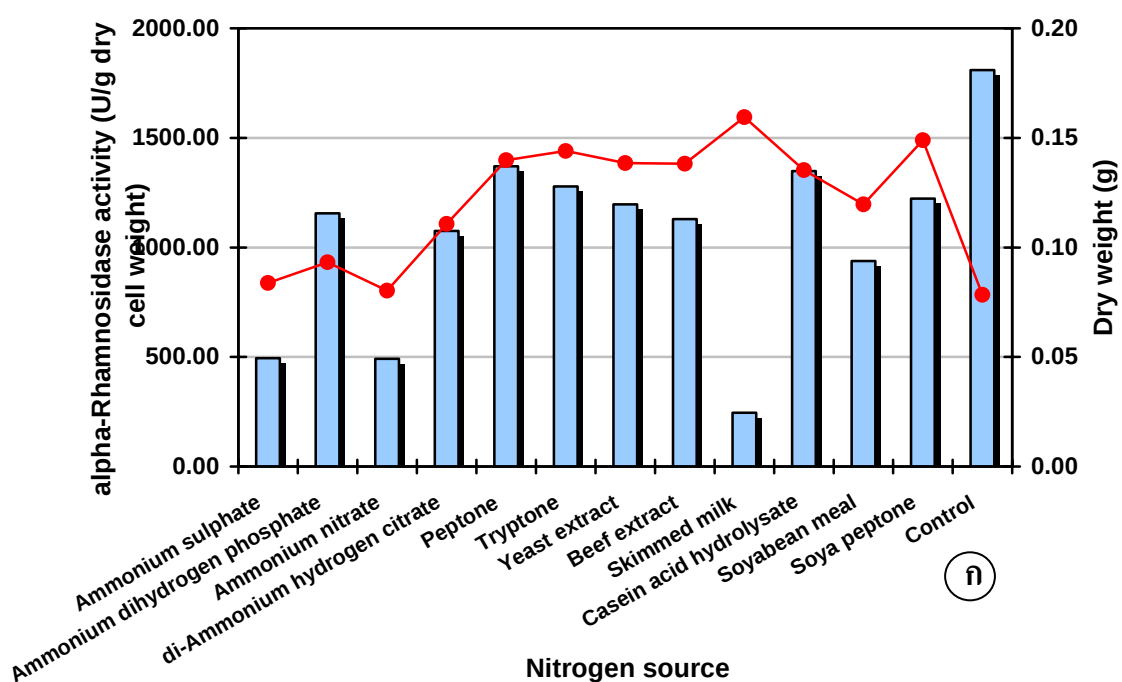


ภาพที่ 15 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิต (ก) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ข) เอนไซม์นาริงิเนส จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

■ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหาร Czapek-Dox medium ที่เติมโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

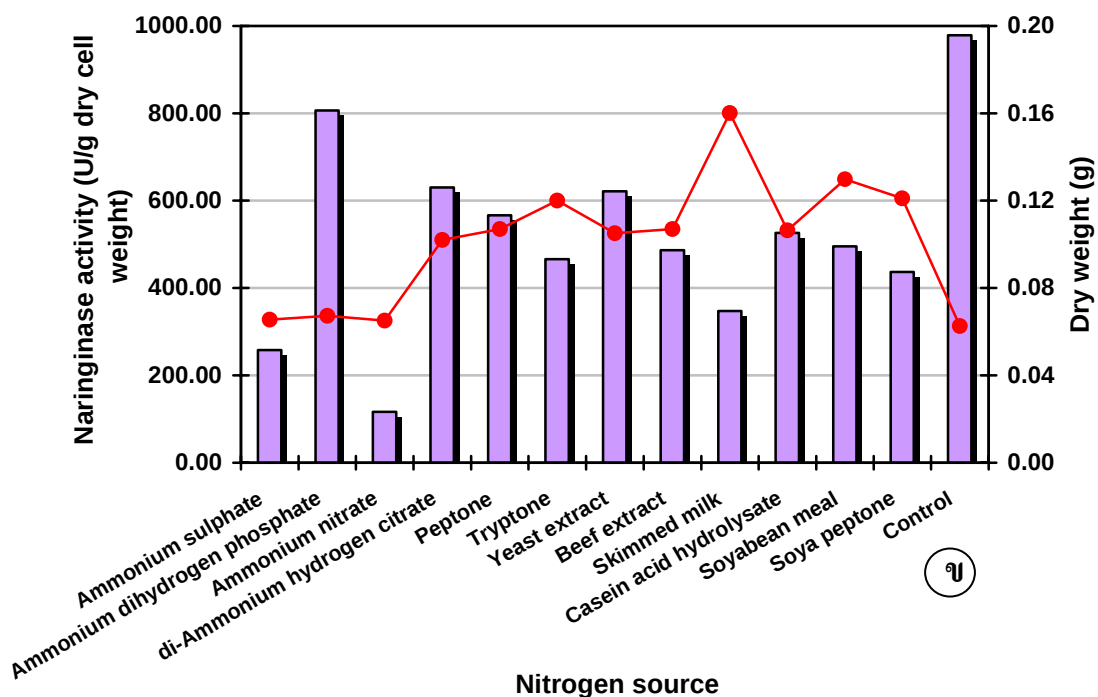
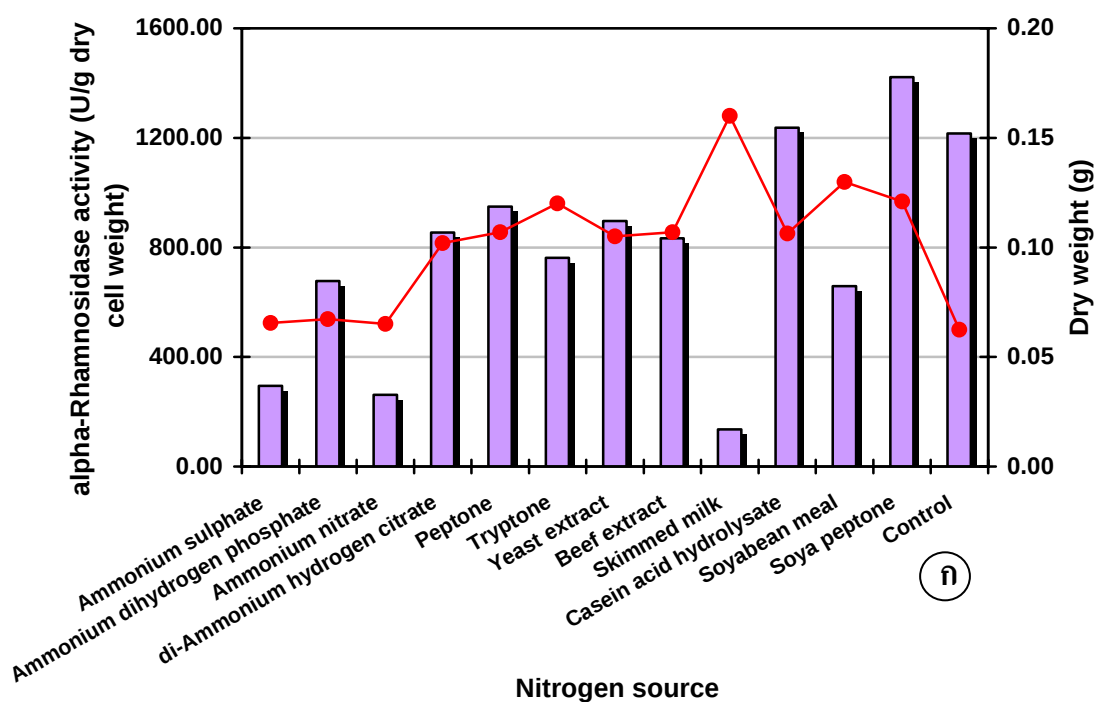


ภาพที่ 16 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิต (ก) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิดส และ (ข) เอนไซม์นาริงินส จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

■ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหาร Czapek-Dox medium ที่เติมโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

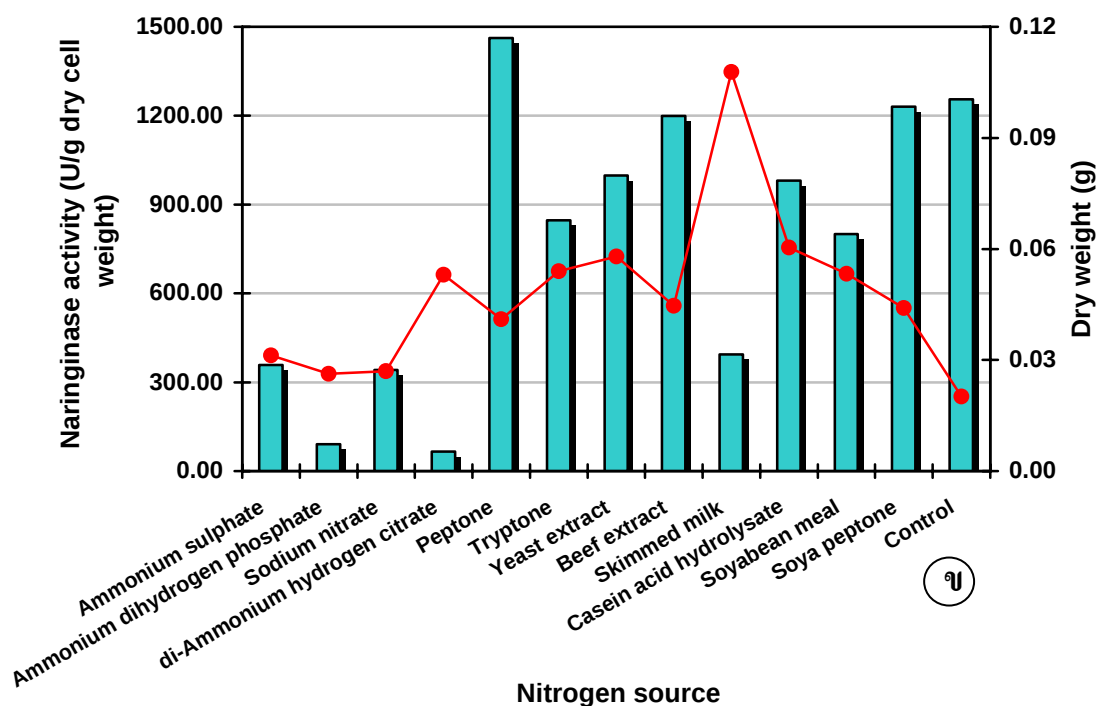
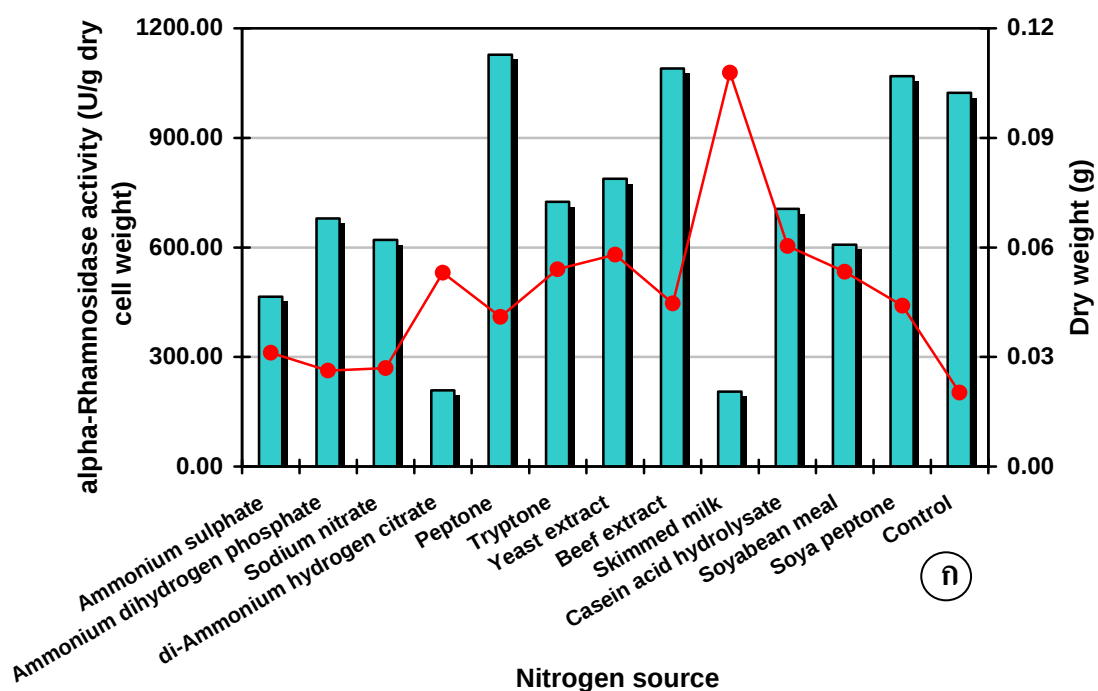


ภาพที่ 17 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิต (ก) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ข) เอนไซม์นาริงินเนส จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-PS10

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

■ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหาร Czapek-Dox medium ที่เติมโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 18 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิต (ก) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ข) เอนไซม์นาริงจินเนส จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL9.1

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

■ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

Control หมายถึง อาหาร synthetic minimal medium ที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

6.6 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

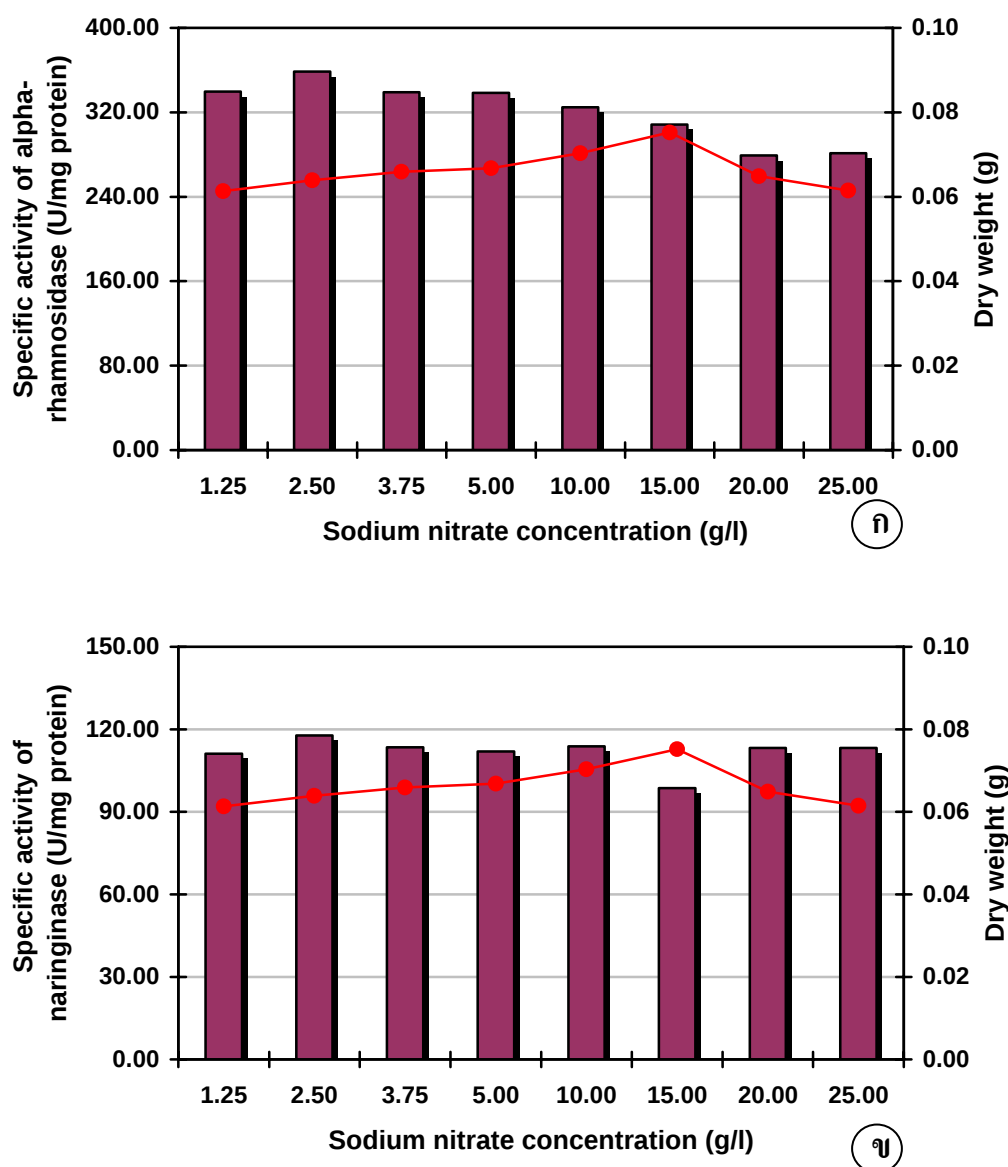
เมื่อทราบชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ จึงได้ศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมดังกล่าวสำหรับเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยทำการปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนด้วยความเข้มข้น 1.25, 2.5, 3.75, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร หรือ 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ สำหรับเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาคัดเลือก จะพิจารณาจากค่า specific activity เนื่องจากการพิจารณาปริมาณเอนไซม์จากสารชนิดเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้ระหว่างการเติมแหล่งไนโตรเจนด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยพิจารณาจากค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์นารินจินาส พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4 มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 2 แหล่งคือ โซเดียมไนเตรทเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสให้มีปริมาณสูง และชอยยาเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อต้องการผลิตเอนไซม์นารินจินาสในปริมาณสูง จากผลการทดสอบโดยพิจารณาปริมาณเอนไซม์ทั้งเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์นารินจินาส พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท (ภาพที่ 19) และชอยยาเปปโตเน (ภาพที่ 20) ที่เหมาะสมมีค่าเท่ากัน คือ 2.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง; ตารางผนวกที่ 8 และ 9) ทั้ง 2 เอนไซม์ที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดข้างต้นคือ โซเดียมไนเตรทและชอยยาเปปโตเน พบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด ให้ปริมาณเอนไซม์ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงสามารถเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้ง 2 ชนิดในปริมาณเท่ากันคือ 2.5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อราไอโซเลท PTK-BS1.4

Aspergillus niger PTK-BL5.1 มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 3 แหล่งคือ โซเดียมไนเตรท (ภาพที่ 21) กากถั่วเหลือง (soyabean meal; ภาพที่ 22) และแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาพที่ 23) ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 เรียงตามลำดับ คือ 3.75, 2.5 และ 1.25 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง; ตารางผนวกที่ 10, 11 และ 12) ทั้ง 2 เอนไซม์ที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดข้างต้น คือ โซเดียมไนเตรท กากถั่วเหลือง (soyabean meal) และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า โซเดียมไนเตรท ให้ปริมาณเอนไซม์ทั้ง 2 แยกตัวที่สูงกว่ากากถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นอย่างมาก ดังนั้น สำหรับเชื้อราไอโซเลท PTK-BL5.1 ควรเลือกใช้เฉพาะโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนด้วยความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร

Aspergillus niger PTK-PS10 มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 2 แหล่งคือ ซอยยาเปปโติน (ภาพที่ 24) และโซเดียมไนเตรท (ภาพที่ 25) โดยพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของซอยยาเปปโติน คือ 1.25 กรัมต่อลิตร ขณะที่โซเดียมไนเตรทมีความเข้มข้นที่เหมาะสม 2 ค่า คือ ถ้าต้องการผลิตเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในปริมาณสูง ควรใช้ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 25 ก) แต่ถ้าต้องการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสในปริมาณสูง ควรใช้ความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 25 ข) และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง; ตารางผนวกที่ 13 และ 14) ทั้ง 2 เอนไซม์ที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดข้างต้น คือ ซอยยาเปปโติน และโซเดียมไนเตรท จะพบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด ให้ปริมาณเอนไซม์ใกล้เคียงกัน ฉะนั้น สำหรับเชื้อราไอโซเลท PTK-PS10 จึงสามารถเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้ง 2 ชนิดคือ ซอยยาเปปโตินใช้ในปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร ส่วนโซเดียมไนเตรทใช้ในปริมาณระหว่าง 2.5 ถึง 3.75 กรัมต่อลิตร

Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพียงอย่างเดียว คือ เปปโติน และควรใช้ที่ความเข้มข้น 1.25 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 26)



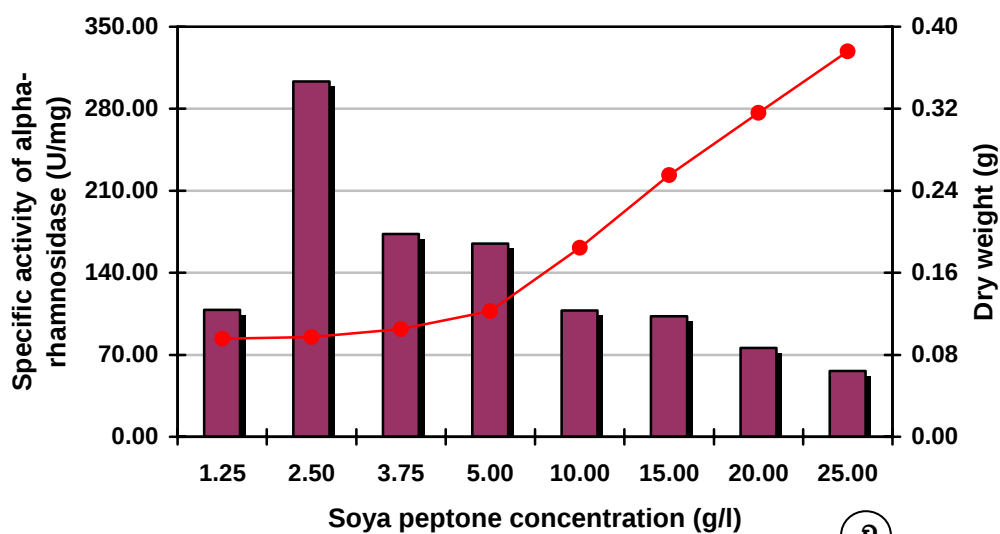
ภาพที่ 19 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรดด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

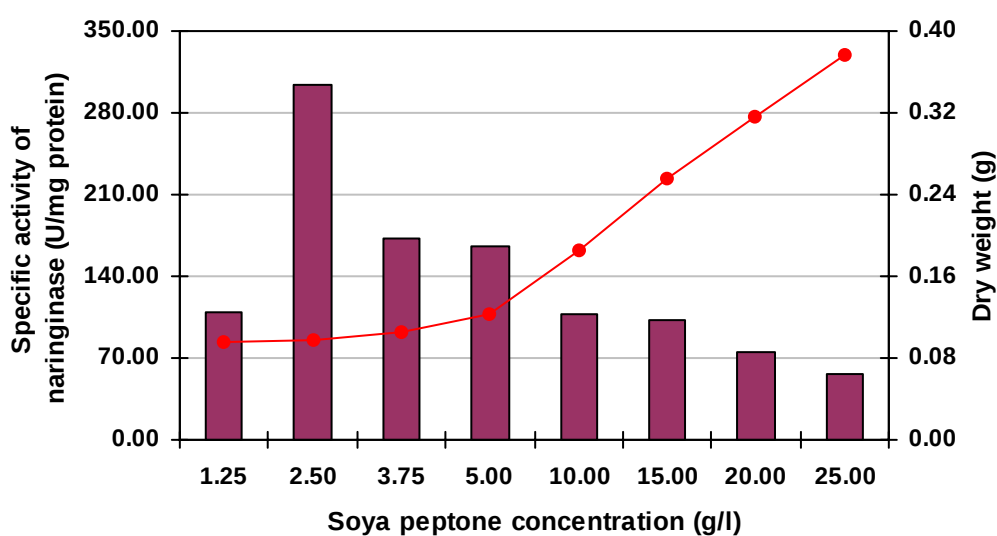
(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)



(ก)



(ข)

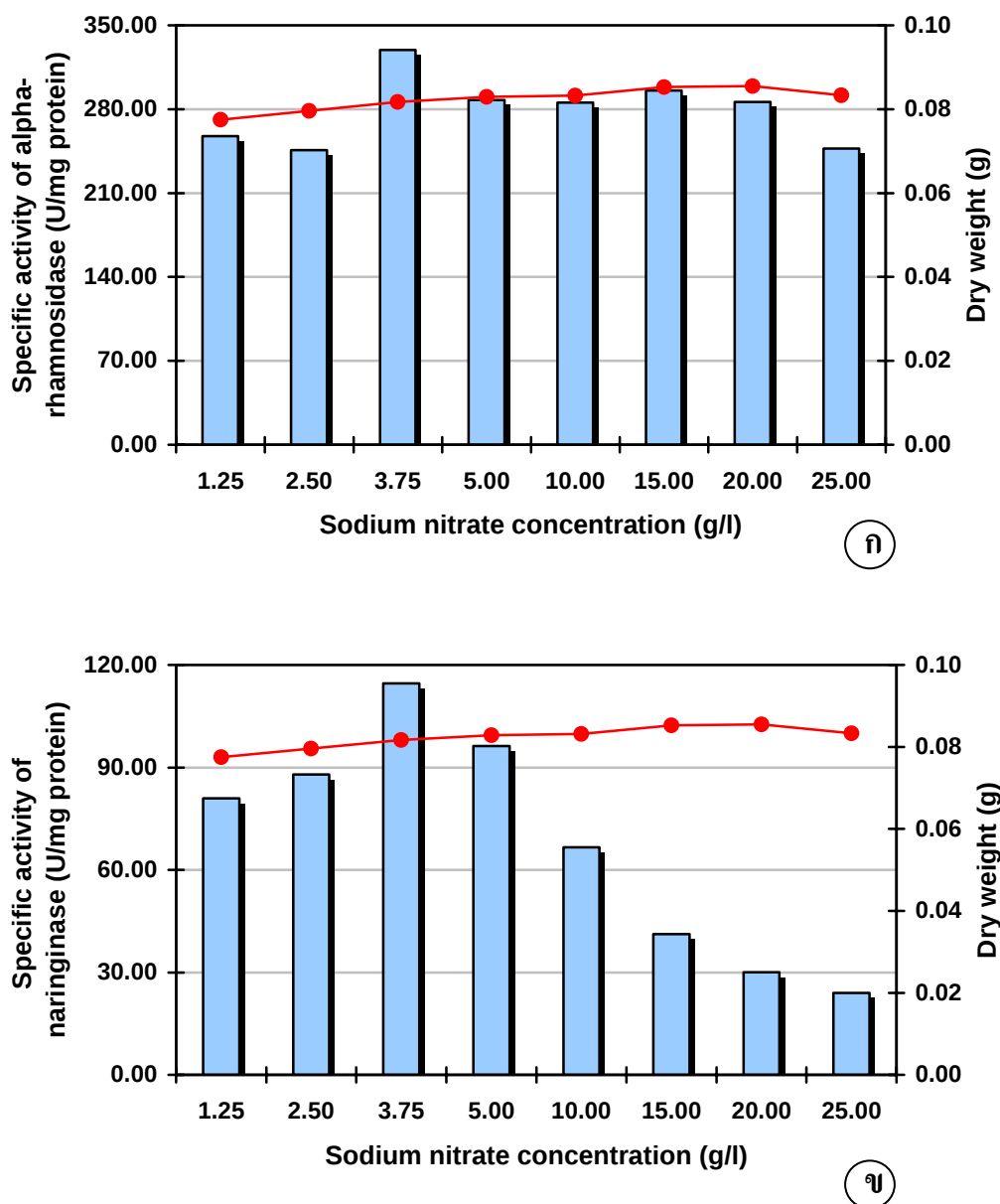
ภาพที่ 20 ผลของการเติมขอยาเปปโตนด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเอส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)



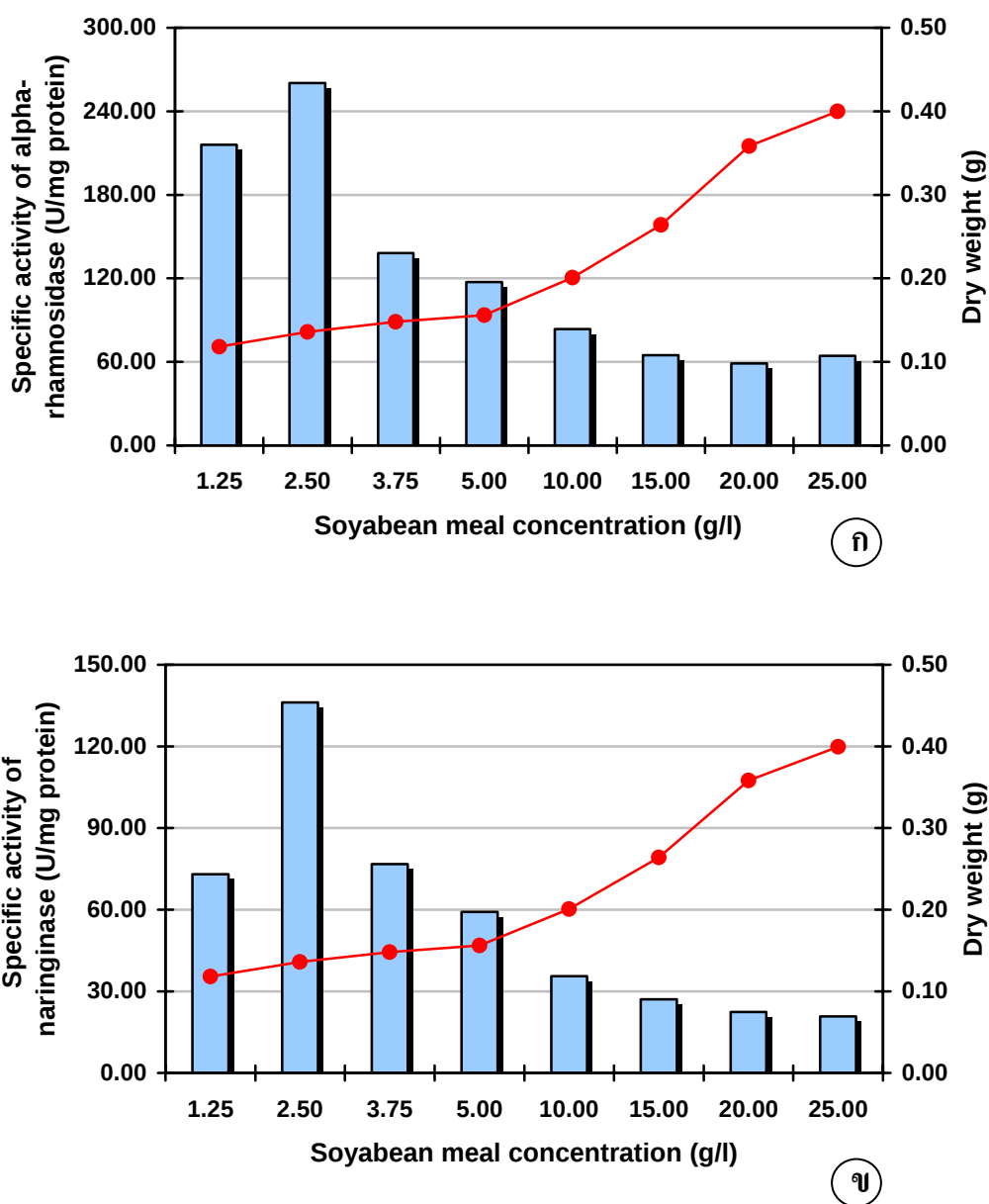
ภาพที่ 21 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรดด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)



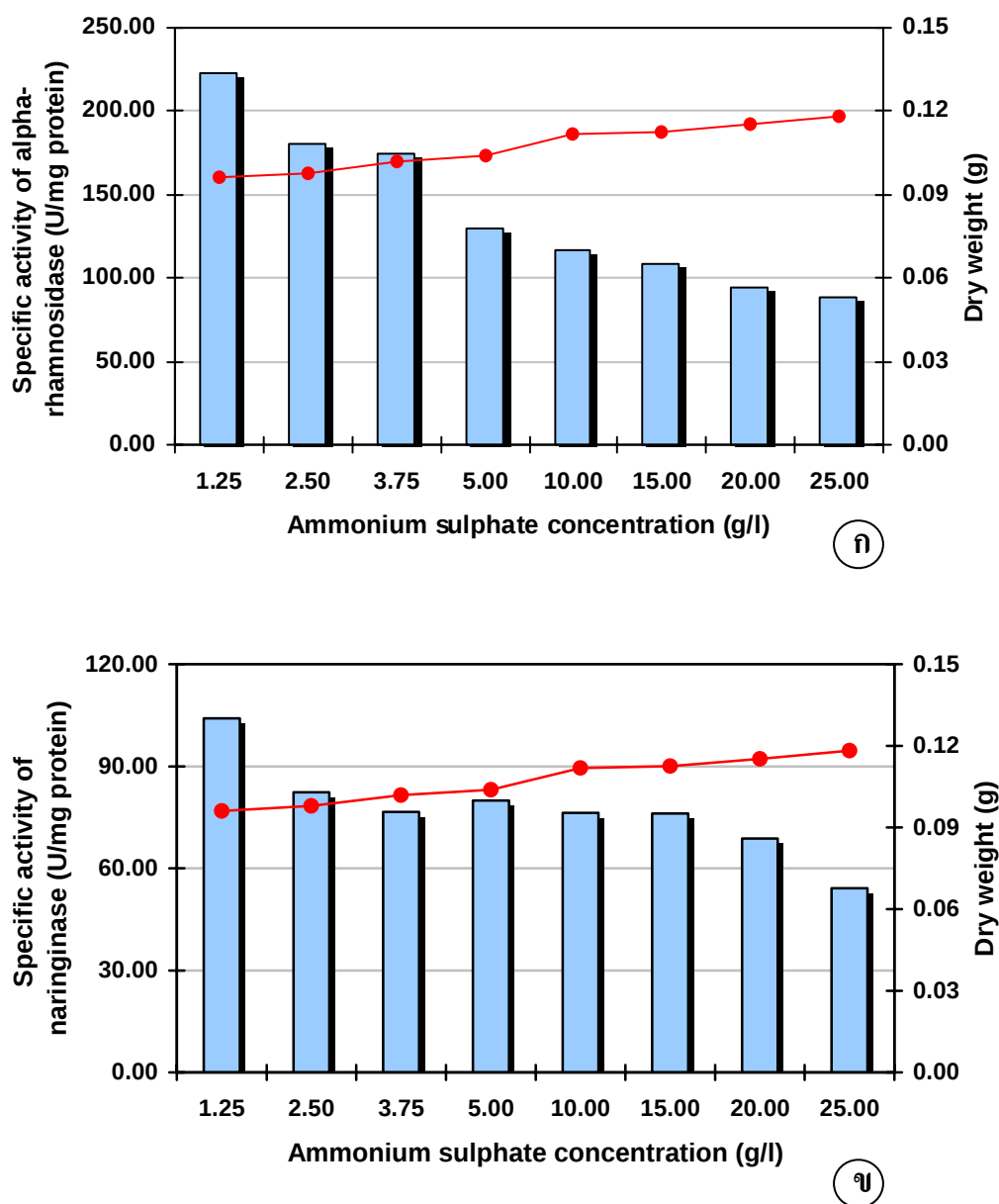
ภาพที่ 22 ผลของการเติมกากถั่วเหลืองด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัคเคิล *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)



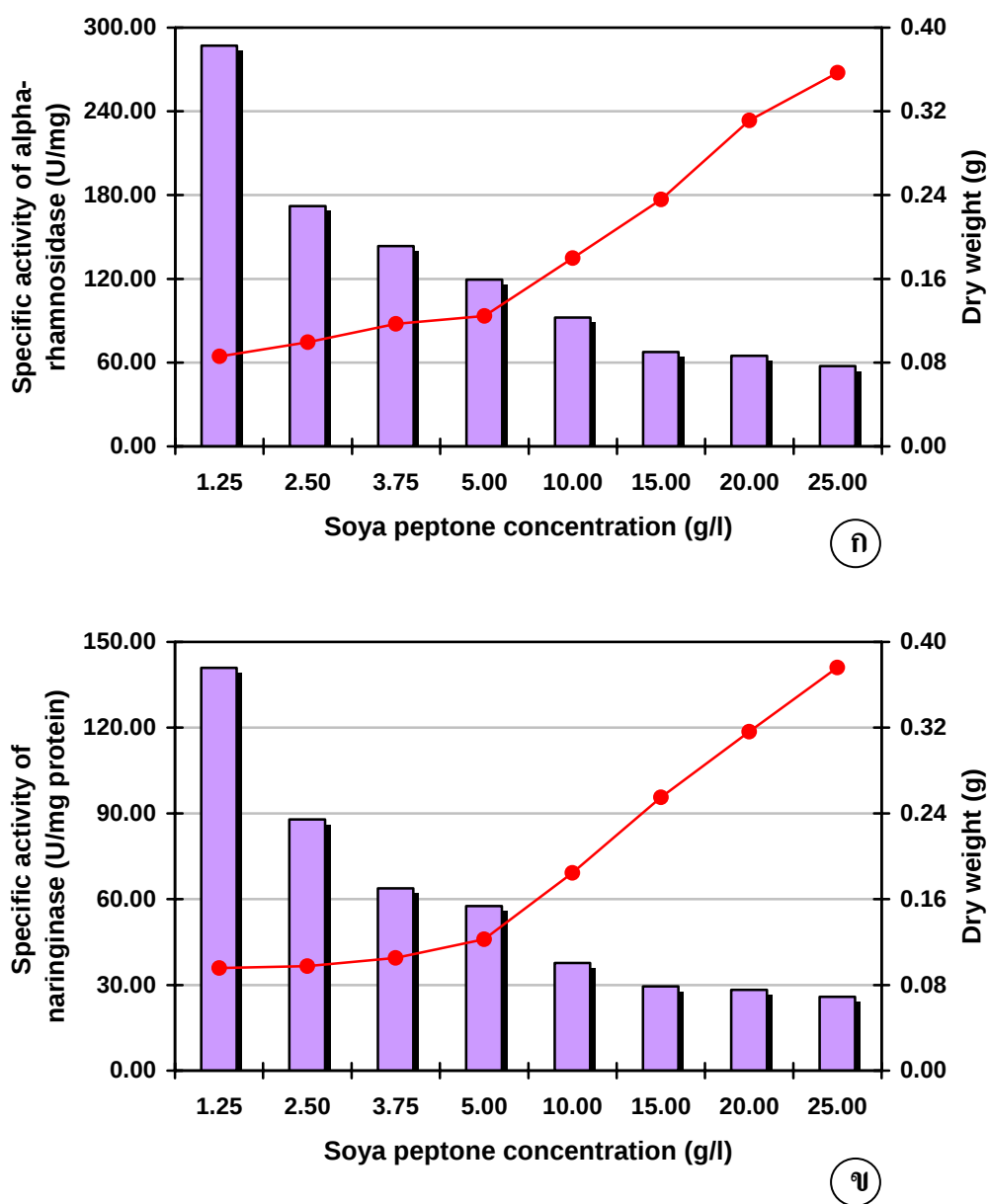
ภาพที่ 23 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)



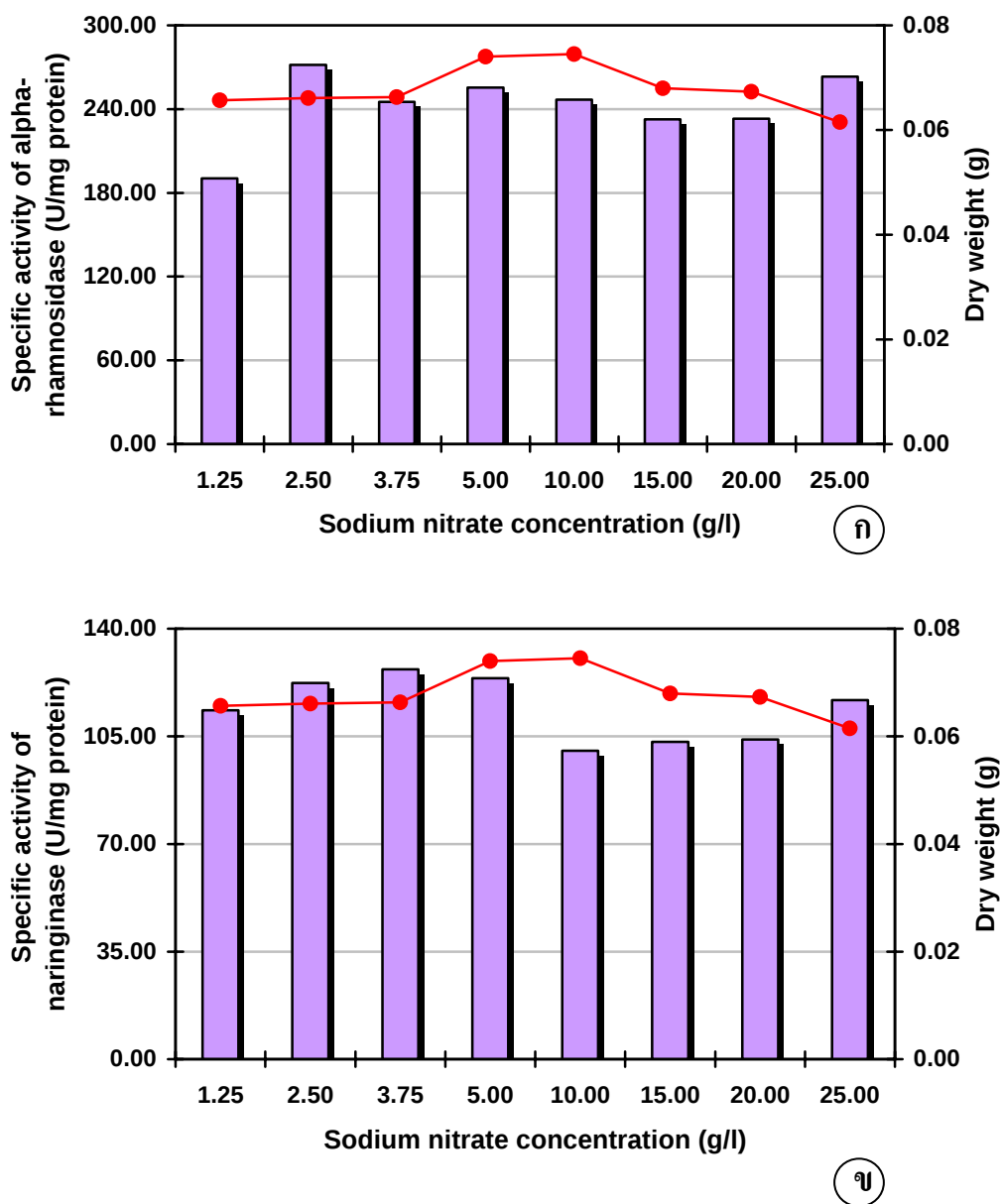
ภาพที่ 24 ผลของการเติมขอยาเปปโตนด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัคลีอิก *Aspergillus niger* PTK-PS10

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)



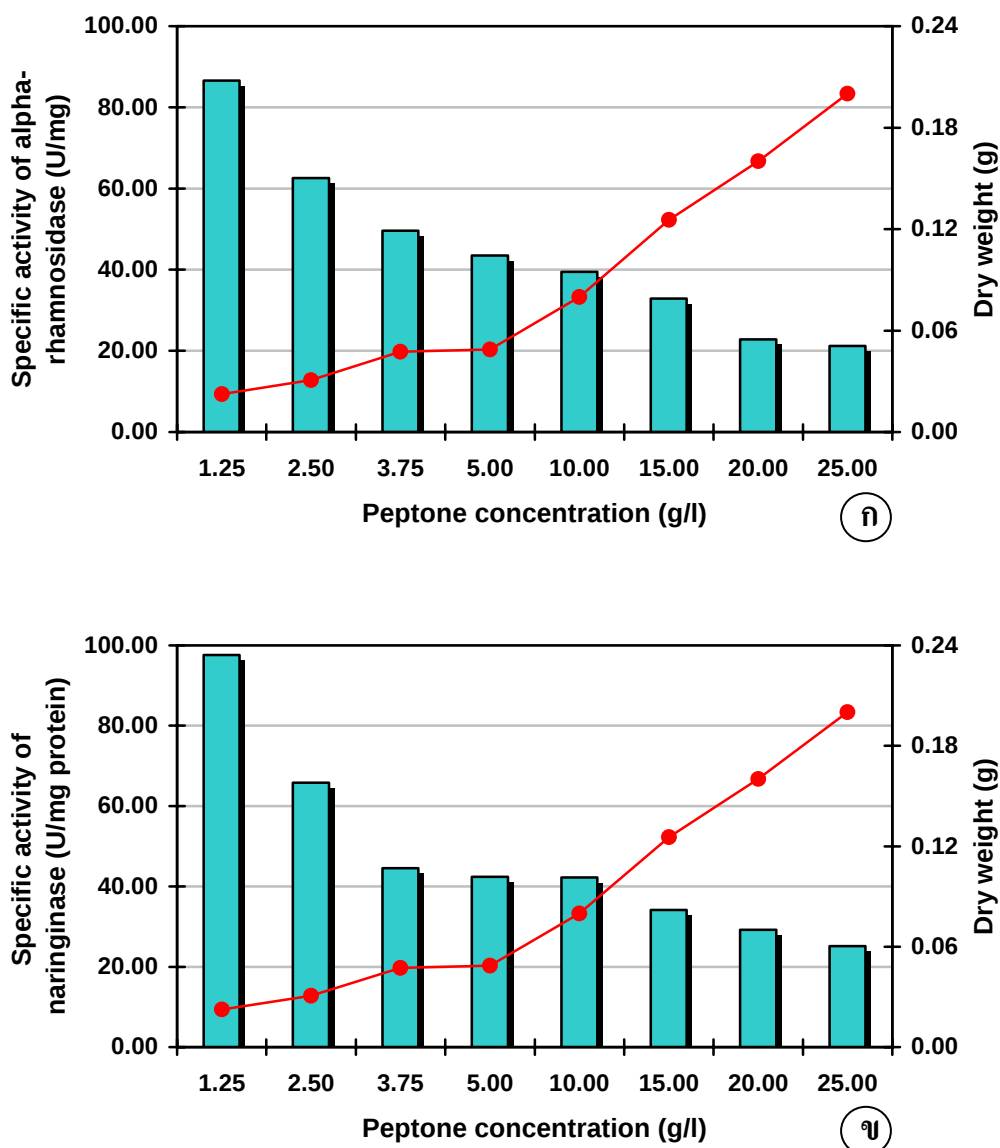
ภาพที่ 25 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรดด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-PS10

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

● หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)



ภาพที่ 26 ผลของการเติมเปปโตนด้วยความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL9.1

(ก) ค่า specific activity ของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

(ข) ค่า specific activity ของเอนไซม์นารินจินเนส

■ หมายถึง ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์

—●— หมายถึง น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

สรุปผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมตามที่ตั้งต่างๆ ทั้งในประเทศไทยและประเทศจีน มีจำนวนรวมทั้งสิ้น 11 แหล่ง ได้ตัวอย่างรวม 128 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทำการคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินในระดับปฐมภูมิด้วยการเลี้ยงบนอาหารแข็งคัดเลือกที่มีสารนารินจินเป็นแหล่งคาร์บอน แยกได้เชื้อราบริสุทธิ์จำนวน 348 ไอโซเลท

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์นารินจินระดับทุติยภูมิจากเชื้อรา คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจิน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินระดับทุติยภูมิ จะทดสอบความสามารถในการสลายสารนารินจิน ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์นารินจินส ของเชื้อราที่แยกได้จากการคัดเลือกระดับปฐมภูมิ ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวสูตร synthetic minimal medium ที่มีสารนารินจินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 ด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 7 วัน พบเชื้อราที่มีความสามารถในการสลายสารนารินจินที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 จำนวน 40 ไอโซเลท จากเชื้อราจำนวนทั้งหมด 348 ไอโซเลท

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นารินจินระดับตติยภูมิเป็นการคัดเลือกเชื้อราตามความสามารถของเอนไซม์นารินจินสที่ทำงานได้ในสภาวะที่ต้องการ ได้แก่ สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงคือ 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส แต่มีค่าพีเอชต่ำคือ พีเอช 3.0 และ 4.0 ซึ่งต้องทำการพิจารณาผลการทดลองเพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อาร่วมกับผลการตรวจสอบปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสและเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีคุณสมบัติตรงตามต้องการซึ่งจะนำไปศึกษาต่อในขั้นต่อไป จำนวน 4 ไอโซเลท จากเชื้อราทั้งหมด 40 ไอโซเลท ได้แก่ PTK-PS10, PTK-BS1.4, PTK-BL5.1 และ PTK-BL9.1 โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีคุณสมบัติดังนี้

เชื้อราไอโซเลท PTK-BL9.1 ให้ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสสูงที่สุด แต่มีปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสต่ำ

เชื้อราไอโซเลท PTK-BS1.4 และ PTK-BL5.1 ให้ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสใกล้เคียงกับปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส

เชื้อราไอโซเลท PTK-PS10 ให้ปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสในปริมาณสูงกว่าเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทเป็นชนิด *Aspergillus niger*

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้ cell lines 3 ชนิด ได้แก่ L929 (mouse lung connective tissue), BHK21 (baby hamster kidney standard) และ HepG2 (human hepatocyte cell line) ผลการตรวจพบว่า เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 1.28 ถึง 5.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบของเชื้อ *Aspergillus niger* ทั้ง 4 ไอโซเลทไปใช้คือ ไม่เกิน 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาปริมาณเอนไซม์ของสารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilized extract) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่มีในเอนไซม์ดิบแช่เยือกแข็งกับผลตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์จากค่า IC_{50} พบว่า

Aspergillus niger PTK-PS10 ให้ค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 1.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.266 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.289 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.016 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-BS1.4 ให้ค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 2.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.359 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.254 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.011 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-BL5.1 ให้ค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบ ในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.286 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.261 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.022 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Aspergillus niger PTK-BL9.1 ให้ค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการนำตัวอย่างเอนไซม์ดิบ ในรูปแช่เยือกแข็งไปใช้คือ ไม่เกิน 1.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเอนไซม์นารินจินเอสเท่ากับ 0.384 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Unit/ml) ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสเท่ากับ 0.298 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสเท่ากับ 0.013 หน่วยต่อมิลลิลิตร

การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และเอนไซม์นารินจินเอส ที่ค่าพีเอชเดียวกันคือ 4.0

Aspergillus niger PTK-BL5.1 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์นารินจินเอส ที่พีเอช 4.0 และ 3.0 ตามลำดับ

Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์นารินจินเอสที่ค่าพีเอชเดียวกันคือ 4.0

Aspergillus niger PTK-PS10 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส และเอนไซม์นารินจินเอส ที่ 5.0, 4.0 และระหว่างพีเอช 4.0 ถึง 6.0 ตามลำดับ

การศึกษากิจกรรมที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่า

Aspergillus niger PTK-BS1.4, *Aspergillus niger* PTK-BL5.1 และ *Aspergillus niger* PTK-PS10 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์

นารินจินสที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสมีค่าอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส

Aspergillus niger PTK-BL9.1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นารินจินสอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส

Aspergillus niger PTK-PS10 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์นารินจินสที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 60 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส

การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นารินจินส และปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท สรุปได้ดังตารางที่ 18

ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือ สามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์นารินจินสในปริมาณสูง และเอนไซม์ดังกล่าวทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกรดและอุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่พบในกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ในระดับอุตสาหกรรม รวมทั้งสามารถพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังได้ประโยชน์เพิ่มจากผลจากงานวิจัยครั้งนี้ โดยสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำงานวิจัยต่อเนื่องในอนาคตในการผลิตเอนไซม์นารินจินสในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ถังหมัก (fermentor) ในการผลิต

งานวิจัยต่อเนื่องที่ควรศึกษา คือ (1) สภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น อาทิ สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อรา และอัตราการให้อากาศ เป็นต้น (2) ชนิดและความเข้มข้นของซับสเตรตที่ใช้ในการหมักย่นำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ควรศึกษาเช่นเดียวกัน เพื่อให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงสุด โดยเริ่มศึกษาจากชนิดของซับสเตรตหมักย่นำที่เหมาะสม และนำไปสู่การศึกษาความเข้มข้นของซับสเตรตหมักย่นำที่เหมาะสม (3) ตัวยับยั้งการผลิตเอนไซม์ (inhibitor) ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง โดยเริ่มศึกษาในระดับฟลaskก่อน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตระดับถังหมัก (4) ลักษณะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิต เช่น ควรหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) หมักแบบต่อเนื่อง

(continous culture) หรือแบบกึ่งเบ็ดเสร็จ (fed-batch culture) เป็นต้น และ (5) ลักษณะการเติมตัวเหนี่ยวนำ ซึ่งเป็นแบบต่อเนื่อง (continuous) หรือเติมแบบเป็นขั้นๆ (stepwise) เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์นารินจินเนส ซึ่งการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราทั้งหมดที่กล่าวถึงดังกล่าวจะต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิตควบคู่ไปด้วย จากการศึกษาต้นทุนในการผลิตเอนไซม์นารินจินเนสที่มีเอกทิวทิของเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดสในปริมาณสูงของเชื้อราคัดเลือกทั้ง 4 ไอโซเลท (ตารางผนวกที่ 12) พบว่า

Aspergillus niger PTK-BL9.1 ใช้ต้นทุนในการผลิตประมาณ 69.45 บาทต่อลิตร

Aspergillus niger PTK-PS10 ใช้ต้นทุนในการผลิตประมาณ 628.60-629.92 บาทต่อลิตร กรณีเลือกใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง 2.5-3.75 กรัมต่อลิตร ขณะที่ต้นทุนการผลิตจะมีค่าประมาณ 630.53 บาทต่อลิตร กรณีเมื่อเลือกชอยยาเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสม 1.25 กรัมต่อลิตร

Aspergillus niger PTK-BS1.4 ใช้ต้นทุนในการผลิตประมาณ 628.60 บาทต่อลิตร กรณีเลือกโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสม 2.5 กรัมต่อลิตร ขณะที่ต้นทุนการผลิตมีค่าประมาณ 635.08 บาทต่อลิตร กรณีเลือกชอยยาเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร

Aspergillus niger PTK-BL5.1 ใช้ต้นทุนในการผลิตประมาณ 819.92 บาทต่อลิตร

ราคาคำนวณการผลิตข้างต้นแตกต่างกันในแต่ละเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราแต่ละชนิดใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่างกัน และใช้องค์ประกอบที่เติมลงในอาหารปริมาณต่างกัน นอกจากนี้ ราคาคำนวณการผลิตอาจเปลี่ยนแปลงได้ ขึ้นอยู่กับราคาของสารที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการพัฒนาให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราคัดเลือกแต่ละเชื้อในแต่ละปี

ตารางที่ 18 สรุปอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* ทั้ง 4 ไอโซเลต

เชื้อรารหัส	ความเข้มข้น กล้าเชื้อ (spores/ml)	specific activity (U/mg protein)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ เหมาะสม	ปริมาณ เอนไซม์ (U/g dry weight)	แหล่ง คาร์บอน เสริมที่ เหมาะสม	ความเข้มข้น ของ คาร์บอน เสริม (g/l)	specific activity (U/mg protein)	แหล่ง ไนโตรเจนที่ เหมาะสม	ความเข้มข้นของ ไนโตรเจน (g/l)	specific activity (U/mg protein)
PTK-BS1.4	10 ⁵	77.38 ¹	Czapek-Dox	5177.12 ¹	แรมโนส	3.75	79.89 ¹	โซเดียมไนเตรท	2.5	117.77 ¹
		14.57 ²	medium	1377.12 ²	(rhamnose)		112.83 ²	(NaNO ₃) หรือ ซอเยาเปปโตน	2.5	358.73 ² 110.11 ¹
								(soya peptone)		303.20 ²
PTK-BL5.1	10 ⁶	55.47 ¹	Czapek-Dox	6142.49 ¹	แรมโนส	5.0	64.30 ¹	โซเดียมไนเตรท	3.75	114.58 ¹
		26.09 ²	medium	2412.26 ²	(rhamnose)		179.12 ²	(NaNO ₃)		329.47 ²
PTK-BL9.1	10 ⁴	18.84 ¹	synthetic	3037.53 ¹	ไม่เติม	ไม่เติม	-	เปปโตน	1.25	97.62 ¹
		45.67 ²	minimal medium	3751.08 ²				(peptone)		86.56 ²
PTK-PS10	10 ⁶	59.59 ¹	Czapek-Dox	6557.92 ¹	แรมโนส	3.75	87.34 ¹	โซเดียมไนเตรท	2.5-3.75	126.81 ¹
		18.09 ²	medium	1196.45 ²	(rhamnose)		115.52 ²	(NaNO ₃) หรือ ซอเยาเปปโตน	1.25	271.77 ² 140.92 ¹
								(soya peptone)		287.05 ²

หมายเหตุ ¹ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์นารินจินัส และ ² หมายถึง ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส ณ สภาวะที่ใช้ทดสอบ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กนกพรรณ ธรรมวัตร. 2546. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์นารินจินเนสจากพืชเพื่อประยุกต์ใช้ในการลดความขมของน้ำผลไม้. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. ครั้งที่ 4. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- อรพิน ชัยประสพ. 2534. การกำจัดรสขมในน้ำผลไม้จากพืชตระกูลส้ม. *อาหาร*. 2: 87-93.
- Baker, M.E. 1992. Evolution of regulation of steroid-mediated intercellular communion in vertebrates: insights from flavonoids, signals that mediate plant-rhizobia symbiosis, **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.** 41: 301-308.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Bram, B. and G.L. Solomons. 1965. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol.** 13: 842-845.
- Braverman, J.B.S. 1949. **Citrus Products: Chemical Composition and Technology**. 16th ed. Interscience Publ., Inc., New York and London.
- Chien, P.J., F. Sheu and Y.T. Shiyu. 2001. Monitoring enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. **J. Food and Drug Anal.** 9: 115-120.
- Chisti, Y. 1999. Solid substrate fermentation, enzyme production, food enrichment, pp. 2446-2462. In M.C. Flickinger and S.W. Drew, eds. **Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation**. Wiley, New York.

- Daniels, L., R.J. Linhardt, B.A. Bryan and F. Mayerl. 1990. **Method for producing rhamnose.** U.S. Patent 4, 933, 281.
- Davis, D.W. 1947. Determination of flavonones in citrus juice. **Anal. Chem.** 19 : 46-48
- Dixon, R.A. and N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant cell.** 7: 1085-1097.
- Drewnowski, A. and C.G. Carneros. 2000. Bitter taste, phytonutrients and the consumer: a review. **Am. J. Clin. Nutr.** 72 : 1424-1435.
- Elinbaum, S., H. Ferreyra, G. Ellenrieder and C. Cuevas. 2002. Production of *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase by solid state fermentation. **Lett. Applied Microb.** 34: 67-71.
- Fry, J., G.G. Martin and M. Less. 1995. Authentication of orange juice. pp. 1-52. *In* P.R. Ashurst, ed. **Production and Packaging of non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Beverages.** St. Edmundsbury, London.
- Fukumoto, J., S. Okada. 1973. **Naringinase production by fermentation.** Japanese Patent 7, 306, 554.
- Gabor, F. and F. Pittner. 1984. Characterization of naringinase from *Penicillium* sp. **Physiol. Chem.** 365: 914-916.
- Grassin, C. and P. Fauquembergue. 1996. Fruit juices. pp. 227-260. *In* T. Godfrey and S. West, eds. **Industrial Enzymology.** The Bath, UK.

- Hendrix, C.M. and J.B. Redd. 1995. Chemistry and technology of citrus juices and by-product. pp. 53-87. In P.R. Ashurst, ed. **Production and Packaging of non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Beverages**. St. Edmundsbury, London.
- Hoechst. 1994. **Alpha-rhamnosidase production by *Pencillium* sp., and purification and characterization**. German Patent EP 559, 159.
- Horuichi, S., H. Yamamoto, T. Asakochi and T. Tanaka. 1985. High pressure liquid chromatographic determination of naringinase activity. **J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.** 32: 582-585.
- Ito, T. and Y. Takiguchi. 1970. **Naringinase production by *Cochiobolus miyabeanus***. Japanese Patent 7, 014, 875.
- Johnson, R.L. 1988. Bitterness in fruit juice: Assay of bitter principles in citrus juices. pp. 80-101. In H.F. Linskens and J.F. Jackson, eds. **Analysis of non-Alcoholic Beverages**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Kimball, D.A. 1999. **Citrus Processing: A Complete Guide**. 2nd ed. Aspen Publ., Inc., USA.
- Kishi, K. 1955. Production of naringinase from *Aspergillus niger*. **Kagaku to Kogyo** (Chemistry and Industry, Japan). 29: 140.
- Li, J., T.O. Lee, R. Raba, R. Amundson and R.L. Last. 1993. Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. **Plant Cell**. 5: 171-179.
- Manthey, J.A., B.S. Buslig and M.E. Baker. 2002. **Flavonoids in Cell Function**. Plenum, New York.

Martino, A., C. Schiraldi, A.D. Lazzaro, I. Fiume, G. Spagna, P.G. Pifferi and M.D. Rosa.

2000. Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. **Process Biochem.** 36: 93-102.

Manzanares, P., L.H. Graaff and J. Visser. 1997. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. **FEMS Microb. Lett.** 157: 279-283.

_____, M. Orejas, E. Ibanez, S. Valles and D. Ramon. 2000. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. **Lett. Applied Microb.** 31: 198-202.

Montreuil, J., S. Bouquelet, H. Debray, J. Lemoine, J.C. Michalski, G. Spik and G. Strecker. 1994. Glycoprotein, pp. 181-293. In M.F. Chaplin and J.F. Kennedy, eds. **Carbohydrate analysis: A Practical Approach.** IRL Press, Oxford.

Moo-Young, M., A.R. Moreina and R.P. Tengerty. 1975. Principles of solid-substrate Fermentation. In J.E. Smith and D.R. Berry, eds. **The Filamentous Fungi.** Edward Arnold, London.

Nomura, D. 1965. Studies on the naringinase produced by *Coniothyrium diplodiella* I. The properties of naringinase and the removal of co-existing pectinase from the enzyme preparation. **Enzymologia.** 29: 272-282.

Norouzian, D., A. Hosseinzadeh, D.N. Inanlou and N. Moazami. 1999. Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World J. Microb. Biotechnol.** 15: 501-502.

_____, _____, _____ and _____. 2000. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World J. Microb. Biotechnol.** 16: 471-473.

- Okada, S., K. Kishi, M. Higashigara and J. Fukumoto. 1963. Studies on the purification properties of naringinase from *Aspergillus niger*. **J. Agric. Chem. Soc.** 37: 142.
- Olsen, H.S. 1995. Enzyme in food processing. pp. 666-729. In H.J. Rehm and G. Reed, eds. **Biotechnology : Enzymes; Biomass, Food and Feed.** VCH, New York.
- Orejas, M., E. Ibanez and D. Ramon. 1999. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produce an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest. **Lett. Applied Microb.** 28: 383-388.
- Poore, H.D. 1934. Recovery of naringin and pectin from grapefruit residue. **J. Ind. and Eng. Chem.** 26: 637-639.
- Prakash, S., R.S. Singhal and P.R. Kulkarni. 2002. Enzymatic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradisi*) juice. **J. Sci. Food and Agr.** 82: 394-397.
- Puri, M., A. Banerjee and U.C. Banerjee. 2005. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. **Process Biochem.** 40: 195-201.
- _____ and U.C. Banerjee. 2000. Production, purification and characterization of the debittering enzyme naringinase. **Biotechnol. adv.** 18: 207-217.
- _____ and S. Kalra. 2005. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids.) **World J. Microb. Biotechnol.** 21: 753-758.
- Romero, C., A. Manjon, J. Bastida and J.L. Iborra. 1985. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. **Anal. Biochem.** 149: 566-71.

- Ruiz, M.C., A.D. Pietro and I.G. Roncero. 1997. Purification and characterization of an acidic endo- β -1,4-xylanase from the tomato vascular pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **FEMS Microbiol. Lett.** 148: 75-82.
- Scaroni, E., C. Cuevas, L. Carrillo and G. Ellenrieder. 2002. Hydrolytic properties of crude α -L-rhamnosidases produced by several wild strains of mesophilic fungi. **Lett. Applied Microb.** 34: 461-465.
- Schalkhammer, T., F. Pittner. 1986. Characterization of rhamno-glucosidase from *Pencillium* sp. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler.** 1: 364-367.
- Shanmugam, V., K.D.S. Yadav. 1995. Extracellular production of alpha-rhamnosidase by *Rhizopus nigricans*. **Ind. J. Exp. Biol.** 33: 705-707.
- Shewfelt, R.L. 1986. Flavor and color of fruits as affected by processing. pp. 481-521. In J.G. Woodroof and B. Luh, eds. **Commercial Fruit Processing**. AVI, Westport.
- Shin, W., S.J. Kim, J.M. Shin and S.H. Kim. 1995. Structure-taste correlations in sweet dihydrochalcone, sweet dihydroisocoumarin and bitter flavone compound. **Medicinal Chem.** 38: 4325-4331.
- Sinclair, W.B. 1972. **The Grapefruit; its Composition, Physiology and Products**. University of California press, California.
- Singleton, V.L. 1988. Wine Phenols. pp. 173-218. In H.F. Linskens and J.F. Jackson, eds. **Wine analysis**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Soares, N.F.F. and J.H. Hotchkiss. 1998. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. **J. Food Sci.** 63: 1.

Thomas, D.W., C.V. Smythe and M.D. Labbee. 1958. Enzymatic hydrolysis of naringin, The bitter principle of grapefruit. **Food Res.** 23: 591-598.

Wiseman, A., T. Ridgway and H. Wiseman. 1998. Added enzymes in the food industry. pp. 216-248. *In* C.J. Suckling, C.L. Gibson and A.R. Pitt, eds. **Enzyme Chemistry: Impact and Application**. St. Edmundsbury, London.

Woo, H.H., G. Kuleck, A.M. Hirsch and M.C. Hawes. 2002. Flavonoids: Signal molecules in plant development. pp. 51-60. *In* B.S. Buslig and J.A. Manthey, eds. **Flavonoid in Cell Function**. Plenum, New York.

Yusof, S., H.M. Gazali and G.S. King. 1990. Naringin content in local citrus fruit. **Food Chem.** 37: 113-121.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. การเตรียมสารละลาย sodium acetate buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลาย A: 0.2 โมลาร์ (M) acetic acid (CH_3COOH 11.55 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 โมลาร์ (M) sodium acetate (CH_3COONa 16.4 กรัม หรือ $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 27.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	ค่าพีเอช
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.5	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

2. การเตรียมสารละลาย citrate-phosphate buffer (McIlvaine buffer)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลาย A: 0.1 โมลาร์ (M) citric acid (19.21 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 โมลาร์ (M) dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	ค่าพีเอช
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.0	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

3. การเตรียมสารละลาย Tris-HCl buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

สารละลาย A: 0.2 โมลาร์ (M) Tris (hydroxymethyl) aminomethane (24.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 โมลาร์ (M) HCl

B (มิลลิลิตร)	ค่าพีเอช
44.2	7.2
41.4	7.4
38.4	7.6
32.5	7.8
26.8	8.0
21.9	8.2
16.5	8.4
12.2	8.6
8.1	8.8
5.0	9.0

4. การเตรียมสารละลาย glycine-NaOH buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

สารละลาย A: 0.2 โมลาร์ (M) glycine (15.01 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 โมลาร์ (M) NaOH

B (มิลลิลิตร)	ค่าพีเอช
4.0	8.6
6.0	8.8
8.8	9.0
12.0	9.2
16.8	9.4
22.4	9.6
27.2	9.8
32.0	10.0

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราชชนิดต่างๆ

1. Synthetic minimal medium (Ruiz *et al.*, 1997) ประกอบด้วย

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	0.4	กรัมต่อลิตร
KCl	0.2	กรัมต่อลิตร
NH ₄ NO ₃	5.0	กรัมต่อลิตร
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัมต่อลิตร
ZnSO ₄	0.01	กรัมต่อลิตร
MnSO ₄	0.01	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร
Naringin	1.0	กรัมต่อลิตร
Tetracyclin	50.0	มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดรวมกันยกเว้นสารนารินจิน (naringin) และ tetracyclin จากนั้นทำการปรับค่าพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.8 (กรณีเตรียมอาหารแข็ง) จากนั้นเติมนารินจิน และอุ่นส่วนผสมให้ละลายเข้ากัน แล้วนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิเย็นลง จึงเติม tetracyclin ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และกรองผ่านเมมเบรนขนาดรู 0.2 ไมครอน (μ) เรียบร้อยแล้ว สำหรับอาหารเหลวให้ปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 4.0 และไม่เติม agar กับ tetracyclin

2. Sabouraud's dextrose agar ประกอบด้วย

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัมต่อลิตร
Neopeptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
Agar	20.0	กรัมต่อลิตร
Tetracyclin	50.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Naringin	1.0	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดรวมกันขกเว้น tetracyclin แล้วอุ่นส่วนผสมให้ละลายเข้ากัน จากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิเย็นลง จึงเติม tetracyclin ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และกรองผ่านเมมเบรนขนาดรู 0.2 ไมครอน (μ) เรียบร้อยแล้ว

3. Czapek-Dox medium ประกอบด้วย

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
NaNO_3	2.0	กรัมต่อลิตร
FeCl_3	0.1	กรัมต่อลิตร
Naringin	1.0	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดรวมกัน แล้วอุ่นส่วนผสมให้ละลายเข้ากัน จากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Potato dextrose agar

ชั่งอาหารสำเร็จรูป potato dextrose agar (microbiology grade) 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร อุ่นให้ละลายเข้ากัน จากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ที่มีในเอนไซม์ดิบรูปแช่เยือกแข็งของเชื้อรา
คัดเลือก 4 ไอโซเลท

เชื้อรารหัส	ความเข้มข้นของ lyophilized extract (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)		
		เอนไซม์นารินจินส	เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส	เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-PS10	0.078	0.221	0.250	0.009
	0.156	0.260	0.289	0.011
	0.3125	0.259	0.293	0.015
	0.625	0.262	0.299	0.015
	1.25	0.266	0.289	0.016
	2.5	0.295	0.293	0.018
	5.0	0.382	0.310	0.019
PTK-BS1.4	0.078	0.325	0.227	0.005
	0.156	0.333	0.241	0.006
	0.3125	0.316	0.230	0.007
	0.625	0.336	0.241	0.008
	1.25	0.346	0.247	0.011
	2.5	0.359	0.254	0.011
	5.0	0.368	0.274	0.013

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ชื่อรารหัส	ความเข้มข้นของ lyophilized extract (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)		
		เอนไซม์นารินจินส	เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส	เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BL5.1	0.078	0.257	0.223	0.014
	0.156	0.254	0.211	0.013
	0.3125	0.255	0.222	0.012
	0.625	0.286	0.257	0.012
	1.25	0.286	0.261	0.022
	2.5	0.291	0.251	0.023
	5.0	0.317	0.257	0.024
PTK-BL9.1	0.078	0.345	0.248	0.009
	0.156	0.368	0.285	0.009
	0.3125	0.364	0.278	0.010
	0.625	0.374	0.269	0.011
	1.25	0.384	0.298	0.013
	2.5	0.392	0.343	0.019
	5.0	0.397	0.410	0.019

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ที่ค่าพีเอช 3.0 ถึง 10.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ของเชื้อรา คัดเลือก 4 ไอโซเลท

เชื้อรารหัส	พีเอช	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
		นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BS1.4	3.0	44.17	13.70	22.09
	4.0	333.69	45.13	54.34
	5.0	204.56	39.13	34.91
	6.0	71.08	24.82	0.61
	7.0	21.31	13.84	0.00
	8.0	42.54	3.75	0.00
	9.0	107.06	3.27	0.00
	10.0	65.87	7.02	0.00
PTK-BL5.1	3.0	136.62	2.88	0.00
	4.0	122.38	18.64	0.00
	5.0	101.05	14.57	0.00
	6.0	59.70	11.88	0.00
	7.0	14.69	3.25	0.00
	8.0	83.68	0.00	0.00
	9.0	140.63	0.00	0.00
	10.0	17.52	0.00	0.00
PTK-BL9.1	3.0	85.18	33.45	0.00
	4.0	99.95	50.75	0.00
	5.0	93.93	43.68	0.00
	6.0	59.96	20.45	0.00
	7.0	26.72	3.85	0.00
	8.0	77.28	0.00	0.00
	9.0	79.67	0.00	0.00
	10.0	78.65	0.00	0.00

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ชื่อสารหัส	พีเอช	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
		นารินจินเนส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-PS10	3.0	49.54	6.00	10.63
	4.0	118.60	6.29	13.73
	5.0	125.48	8.33	9.02
	6.0	116.25	5.60	3.85
	7.0	47.74	2.53	0.92
	8.0	65.86	2.15	0.86
	9.0	114.69	0.98	0.83
	10.0	74.48	0.78	0.00

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสที่อุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส ของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท

เชื้อรารหัส	อุณหภูมิ (องศา- เซลเซียส)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
		นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BS1.4	30	95.47	32.08	35.79
	40	129.03	52.19	57.68
	50	210.70	103.90	119.11
	60	349.92	187.32	216.09
	70	199.54	158.24	208.96
	80	61.61	67.12	21.95
PTK-BL5.1	30	37.72	13.79	2.38
	40	54.54	21.48	4.00
	50	74.65	41.77	6.50
	60	154.73	99.09	12.48
	70	99.26	90.18	12.44
	80	62.88	44.74	8.07
PTK-BL9.1	30	28.57	29.39	0.39
	40	49.54	45.17	1.52
	50	76.96	90.06	2.50
	60	101.66	130.45	5.18
	70	71.10	130.53	5.51
	80	49.94	40.56	2.30
PTK-PS10	30	67.49	6.23	9.02
	40	69.08	7.55	11.14
	50	74.19	19.35	29.12
	60	153.51	86.75	55.11
	70	102.08	44.91	48.93
	80	70.60	40.35	8.79

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณเอนไซม์นารินจินเอส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ของเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลทเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร (ก) synthetic minimal medium และ (ข) Czapek-Dox medium

เชื้อรารหัส	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
			นารินจินเอส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BS1.4	ก	193.48	2789.25	1002.79	280.62
	ข	329.89	5177.12	1377.35	1367.17
PTK-BL5.1	ก	161.61	3429.42	1012.14	290.20
	ข	497.51	6142.49	2412.26	1352.76
PTK-BL9.1	ก	707.09	3037.53	3751.08	112.99
	ข	534.09	2024.23	1433.55	713.50
PTK-PS10	ก	101.62	3445.95	619.20	848.06
	ข	257.37	6557.92	1196.45	2223.59

ตารางผนวกที่ 5 ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ในเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรารหัส	แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BS1.4	กลูโคส	0.1185	0.033	19.73	0.57	0.00
	ซูโครส	0.0972	0.022	27.72	0.91	0.82
	ฟรุคโทส	0.1033	0.020	24.87	0.36	1.07
	มอลโทส	0.0766	0.035	28.16	0.00	0.00
	แรมโนส	0.1649	0.035	29.10	18.18	5.68
	แป้งมันสำปะหลัง	0.1615	0.019	36.89	10.88	5.27
	แป้งข้าวโพด	0.1146	0.023	41.20	10.71	5.71
	สตาร์ชไซลูเบล	0.1543	0.028	19.26	2.26	1.02
	ควบคุม (control)	0.0195	0.026	42.24	11.46	9.42

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

เชื้อรารหัส	แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินเนส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BL5.1	กลูโคส	0.1540	0.051	4.99	0.28	0.17
	ซูโครส	0.2024	0.024	7.32	1.06	1.64
	ฟรุโทส	0.2114	0.015	9.14	0.00	3.47
	มอลโทส	0.1423	0.043	4.90	0.00	0.35
	แรมโนส	0.1277	0.049	30.19	21.82	22.29
	แป้งมันสำปะหลัง	0.1351	0.016	29.98	13.61	5.06
	แป้งข้าวโพด	0.1602	0.020	26.52	9.99	7.24
	สตาร์ชไซลูเบล	0.1915	0.023	21.80	7.85	9.11
	ควบคุม (control)	0.0276	0.019	41.97	21.98	8.74

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

เชื้อรารหัส	แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินเอส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BL9.1	กลูโคส	0.1843	0.007	52.17	15.32	2.32
	ซูโครส	0.1942	0.006	43.46	14.21	0.00
	ฟรุโทส	0.1909	0.007	35.72	9.17	0.00
	มอลโทส	0.1830	0.005	34.32	12.27	0.00
	แรมโนส	0.1455	0.006	16.66	2.09	0.97
	แป้งมันสำปะหลัง	0.1637	0.005	30.78	14.87	0.00
	แป้งข้าวโพด	0.1497	0.009	11.69	6.02	0.00
	สตาร์ชโซลูเบิล	0.1573	0.007	18.14	7.38	0.53
	ควบคุม (control)	0.0243	0.004	131.74	97.25	10.81

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด synthetic minimal medium ที่เติมนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

เชื้อรารหัส	แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินเอส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-PS10	กลูโคส	0.1355	0.035	6.76	2.72	0.92
	ซูโครส	0.1077	0.032	5.48	2.96	1.26
	ฟรุโทส	0.1749	0.023	13.83	3.64	2.32
	มอลโทส	0.1270	0.025	12.11	2.22	0.95
	แรมโนส	0.1482	0.035	46.13	25.49	25.48
	แป้งมันสำปะหลัง	0.1967	0.025	12.29	3.86	9.06
	แป้งข้าวโพด	0.1708	0.025	63.13	6.98	41.58
	สตาร์ชไซลูเบล	0.1977	0.028	24.21	0.65	3.49
	ควบคุม (control)	0.0279	0.031	51.83	5.93	15.97

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 6 ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ในเอนไซม์คิบจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* เมื่อเติมแรมโนสความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรารหัส	ความเข้มข้นแรมโนส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BS1.4	1.25	0.0430	0.016	101.48	89.63	30.12
	2.50	0.0586	0.024	69.01	94.45	26.46
	3.75	0.0689	0.021	79.39	112.83	41.02
	5.00	0.0882	0.026	60.33	95.88	33.94
	ควบคุม (control)	0.0241	0.011	82.81	37.22	20.65
	5.00	0.0744	0.031	46.48	37.85	16.48
	10.0	0.1541	0.046	30.99	25.49	21.43
	15.0	0.2195	0.059	23.84	19.73	17.93
	20.0	0.3043	0.059	24.76	19.39	14.52
	25.0	0.4165	0.065	20.13	17.60	8.70

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

เชื้อรารหัส	ความเข้มข้นแรมโนส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BL5.1	1.25	0.0348	0.015	104.65	141.67	42.11
	2.50	0.0544	0.018	81.91	147.73	40.88
	3.75	0.0748	0.025	58.32	135.86	34.20
	5.00	0.0830	0.020	64.30	179.12	55.66
	ควบคุม (control)	0.0254	0.014	38.42	39.89	16.07
	5.00	0.0689	0.025	35.12	165.79	10.76
	10.0	0.1334	0.039	18.99	116.63	33.53
	15.0	0.2028	0.080	8.75	58.10	20.87
	20.0	0.2750	0.096	7.96	67.28	30.49
	25.0	0.3510	0.109	7.06	54.32	30.55

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

เชื้อรารหัส	ความเข้มข้นแรมโนส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินัส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-PS10	1.25	0.0339	0.016	108.79	91.06	86.17
	2.50	0.0555	0.019	89.75	90.04	80.59
	3.75	0.0727	0.020	87.34	115.52	90.91
	5.00	0.0876	0.023	76.54	109.19	90.86
	ควบคุม (control)	0.0211	0.016	108.14	23.91	40.55
	5.00	0.0765	0.029	53.14	117.56	40.02
	10.0	0.1448	0.041	35.62	100.04	49.60
	15.0	0.2201	0.050	28.80	85.19	43.72
	20.0	0.2919	0.056	27.01	81.19	48.39
	25.0	0.3835	0.056	25.95	74.36	48.55

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีเติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

เชื้อรารหัส	ความเข้มข้นแรมโนส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์		
				นารินจินัส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BL9.1	5.00	0.0812	0.006	98.82	21.92	0.58
	10.0	0.1564	0.007	33.37	17.93	0.13
	15.0	0.2569	0.016	14.63	6.93	0.23
	20.0	0.3255	0.022	10.07	4.28	0.19
	25.0	0.4003	0.031	5.35	2.62	0.07
	ควบคุม (control)	0.0243	0.004	131.74	97.25	10.81

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรและไม่มีสารเติมแต่งคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 7 ปริมาณเอนไซม์นารินจินส เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และเอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส ในเอนไซม์ดิบจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรารหัส	แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (U/g dry cell weight)		
				นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BS1.4	แอมโมเนียมซัลเฟต	0.0619	0.007	310.30	580.62	117.65
	แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.0743	0.016	898.68	915.68	287.91
	แอมโมเนียมไนเตรท	0.0619	0.004	116.25	241.09	18.16
	ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิงเตรท	0.1028	0.046	651.34	1127.12	886.71
	เปปโตน	0.1150	0.049	603.09	1221.76	1372.63
	ทริบโตน	0.1264	0.048	545.32	998.39	1153.71
	สารสกัดจากยีสต์	0.1069	0.054	642.88	1286.89	1731.46
	สารสกัดจากเนื้อ	0.1162	0.050	566.63	1392.53	1269.29
	หางนม	0.1605	0.027	104.85	180.07	33.19
	เกี๊ยว	0.1142	0.040	605.69	1101.35	1360.85
	กากถั่วเหลือง	0.1418	0.083	485.31	575.62	1076.44
	ซอซยาเปปโตน	0.1194	0.046	507.99	1534.50	1463.96
	ควบคุม (control)	0.0688	0.025	963.49	1399.02	516.46

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร และใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

ชื่อรารหัส	แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (U/g dry cell weight)		
				นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BL5.1	แอมโมเนียมซัลเฟต	0.0837	0.015	459.06	494.99	144.82
	แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.0932	0.016	448.36	1154.95	359.05
	แอมโมเนียมไนเตรท	0.0802	0.003	228.69	491.81	19.50
	ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซัลเฟต	0.1107	0.054	182.50	1074.79	899.52
	เปปโตน	0.1398	0.056	236.18	1370.13	1360.23
	ทรีปโตน	0.1440	0.058	345.39	1277.90	1137.04
	สารสกัดจากยีสต์	0.1384	0.066	269.09	1196.35	991.88
	สารสกัดจากเนื้อ	0.1382	0.060	425.52	1128.77	1379.51
	หางนม	0.1595	0.024	63.89	245.45	127.27
	เคซีน	0.1352	0.046	335.59	1347.34	1129.35
	กากถั่วเหลือง	0.1196	0.110	469.59	937.88	1765.69
	ซอเยาเปปโตน	0.1490	0.055	348.85	1222.77	1358.25
	ควบคุม (control)	0.0783	0.026	392.27	1809.59	913.02

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

ชื่อสารหัตถ์	แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (U/g dry cell weight)		
				นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-PS10	แอมโมเนียมซัลเฟต	0.0655	0.009	258.05	294.00	258.93
	แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.0672	0.008	806.79	676.89	778.96
	แอมโมเนียมไนเตรท	0.0649	0.003	116.62	261.58	14.31
	ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรท	0.1021	0.036	630.29	854.01	1122.88
	เปปโตน	0.1070	0.047	566.62	948.28	2076.08
	ทริบโตน	0.1201	0.048	465.63	761.83	1521.62
	สารสกัดจากยีสต์	0.1049	0.044	621.33	895.82	2048.38
	สารสกัดจากเนื้อ	0.1069	0.047	486.81	833.04	1756.76
	หางนม	0.1601	0.024	347.21	135.34	246.16
	เคซีน	0.1064	0.042	525.95	1236.75	2050.73
	กากถั่วเหลือง	0.1298	0.122	495.04	658.33	1618.02
	ซอซยาเปปโตน	0.1210	0.067	436.40	1420.90	1982.64
	ควบคุม (control)	0.0625	0.028	978.52	1216.29	1506.94

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร และใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

เชื้อรารหัส	แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (U/g dry cell weight)		
				นารินจินส	อัลฟา-แรมโนสซิเดส	บีต้า-กลูโคสซิเดส
PTK-BL9.1	แอมโมเนียมซัลเฟต	0.0312	0.006	357.76	464.91	104.75
	แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.0263	0.008	90.86	679.48	84.12
	โซเดียมไนเตรท	0.0265	0.018	342.15	620.95	69.23
	ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซัลเฟต	0.0528	0.012	66.33	208.49	19.19
	เปปโตน	0.0409	0.039	1462.63	1127.13	1052.21
	ทรีโบน	0.0538	0.024	846.63	724.42	591.96
	สารสกัดจากยีสต์	0.0581	0.042	998.05	788.03	855.92
	สารสกัดจากเนื้อ	0.0446	0.046	1199.69	1090.01	1023.93
	หางนม	0.1078	0.037	394.03	204.71	58.99
	เคซีน	0.0604	0.028	980.88	705.09	784.24
	กากถั่วเหลือง	0.0533	0.032	800.54	607.83	355.02
	ซอเยาเปปโตน	0.0440	0.040	1230.60	1068.72	1052.22
	ควบคุม (control)	0.0202	0.009	1255.77	1023.49	107.43

หมายเหตุ ควบคุม (control) หมายถึง อาหารชนิด synthetic minimal medium ที่เติมนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่เติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ แต่ใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางผนวกที่ 8 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินเอส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

เชื้อรารหัส	ปริมาณโซเดียม-ไนเตรท (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์			ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค
PTK-BS1.4	1.25	0.0613	0.014	111.19	339.49	39.24	1001.59	3057.99	353.48
	2.50	0.0639	0.014	117.77	358.73	39.12	1011.59	3081.45	336.04
	3.75	0.0659	0.014	113.43	339.07	62.26	993.64	2970.13	545.37
	5.00	0.0668	0.014	112.01	338.28	72.61	962.48	2906.69	623.87
	10.0	0.0703	0.015	113.81	324.81	96.20	955.76	2727.69	807.88
	15.0	0.0752	0.018	98.57	308.52	76.38	925.45	2896.59	717.11
	20.0	0.0649	0.014	113.24	279.17	62.41	991.99	2445.55	546.75
	25.0	0.0615	0.013	113.21	281.19	60.64	982.32	2439.82	526.11

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 9 ผลของการเติมซอซยาเปปโตนความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินาส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BS1.4

เชื้อรารหัส	ปริมาณซอซยา- เปปโตน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์						ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค			
PTK-BS1.4	1.25	0.0958	0.006	94.74	108.45	51.76	242.15	277.20	132.31			
	2.50	0.0975	0.016	110.11	303.20	209.64	711.11	1958.04	1353.82			
	3.75	0.1052	0.032	54.74	173.03	163.55	661.54	2091.01	1976.41			
	5.00	0.1227	0.034	51.11	164.81	173.09	570.49	1839.52	1931.93			
	10.0	0.1844	0.048	35.61	107.71	150.49	373.01	1128.24	1576.36			
	15.0	0.2551	0.060	28.74	102.89	138.81	270.88	969.59	1308.08			
	20.0	0.3162	0.069	24.43	75.77	128.27	211.85	657.14	1112.41			
	25.0	0.3760	0.070	24.28	56.11	126.67	181.47	419.34	946.58			

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 10 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินเอส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

เชื้อรารหัส	ปริมาณโซเดียม-ไนเตรท (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์			ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค
PTK-BL5.1	1.25	0.0775	0.019	80.94	257.57	73.93	897.46	2538.60	728.62
	2.50	0.0796	0.018	87.89	245.75	77.95	907.18	2254.68	715.13
	3.75	0.0817	0.015	114.58	329.47	88.16	940.61	2404.11	643.30
	5.00	0.0829	0.016	96.28	287.59	89.90	859.51	2282.05	713.39
	10.0	0.0832	0.015	66.63	285.54	115.28	548.77	2090.54	843.97
	15.0	0.0853	0.014	41.18	295.60	106.33	295.72	1887.04	678.79
	20.0	0.0855	0.014	30.07	285.90	127.27	215.48	1820.89	810.59
	25.0	0.0833	0.013	23.96	247.14	92.22	172.56	1581.86	590.27

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 11 ผลของการเติมกากถั่วเหลือง (soyabean meal) ความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินเนส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

เชื้อรารหัส	ปริมาณกากถั่ว เหลือง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์			ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค
PTK-BL5.1	1.25	0.1183	0.006	73.02	215.86	6.37	141.99	419.76	12.39
	2.50	0.1360	0.012	136.12	260.30	208.01	464.57	888.39	709.89
	3.75	0.1482	0.022	76.79	138.30	160.98	456.39	821.85	956.63
	5.00	0.1561	0.026	59.16	117.37	174.35	391.20	776.09	1152.86
	10.0	0.2008	0.046	35.58	83.50	154.06	323.57	759.43	1401.21
	15.0	0.2641	0.062	27.11	64.88	127.34	253.56	606.77	1190.96
	20.0	0.3583	0.073	22.44	58.99	117.53	183.98	483.62	963.51
	25.0	0.3998	0.080	20.86	64.38	120.68	167.18	516.06	967.33

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 12 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินัส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL5.1

เชื้อรารหัส	ปริมาณแอมโม- เนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์			ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค
PTK-BL5.1	1.25	0.0960	0.006	104.06	223.07	57.74	268.55	575.65	149.00
	2.50	0.0979	0.007	82.29	180.95	47.52	251.89	553.83	145.45
	3.75	0.1019	0.008	76.57	174.76	47.28	249.09	568.54	153.81
	5.00	0.1038	0.009	79.87	129.15	45.62	263.23	425.66	150.36
	10.0	0.1119	0.009	76.29	117.19	68.41	258.19	396.59	231.49
	15.0	0.1126	0.010	76.13	108.78	74.02	259.23	370.40	252.05
	20.0	0.1152	0.011	68.69	94.63	88.22	257.49	354.69	330.65
	25.0	0.1182	0.012	54.14	88.75	102.11	215.58	353.41	406.61

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 13 ผลของการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินาส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-PS10

เชื้อรารหัส	ปริมาณโซเดียม-ไนเตรท (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์			ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค
PTK-PS10	1.25	0.0657	0.014	113.44	190.23	28.62	998.75	1674.82	251.94
	2.50	0.0661	0.014	122.34	271.77	147.84	1034.71	2298.62	1250.12
	3.75	0.0663	0.014	126.81	245.19	192.82	1038.85	2008.60	1579.56
	5.00	0.0740	0.014	123.89	255.34	153.93	915.06	1885.90	1136.91
	10.0	0.0745	0.018	100.23	246.77	122.71	943.14	2321.99	1154.65
	15.0	0.0680	0.012	103.13	232.74	138.75	740.81	1671.84	996.68
	20.0	0.0673	0.012	104.02	233.05	135.13	721.57	1616.61	937.33
	25.0	0.0615	0.009	116.81	263.33	137.05	707.16	1594.23	829.69

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 14 ผลของการเติมซอซยาเปปโตความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินัส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดสจากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-PS10

เชื้อรารหัส	ปริมาณซอซยา- เปปโตน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์			ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค
PTK-PS10	1.25	0.0861	0.012	140.92	287.05	310.67	786.46	1601.95	1487.28
	2.50	0.0995	0.019	87.89	172.09	244.89	685.96	1342.98	1911.15
	3.75	0.1170	0.027	63.82	143.37	193.02	588.19	1321.46	1779.03
	5.00	0.1245	0.030	57.56	119.42	160.26	555.95	1153.39	1547.80
	10.0	0.1797	0.046	37.64	92.35	136.22	388.80	953.95	1407.07
	15.0	0.2359	0.058	29.52	67.71	113.00	289.09	663.14	1106.67
	20.0	0.3113	0.059	28.25	64.89	73.95	215.05	494.36	563.36
	25.0	0.3569	0.066	25.82	57.42	72.45	190.44	423.53	534.45

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด Czapek-Dox medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และแรมโนส ความเข้มข้น 3.75 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 15 ผลของการเติมเปปโตความเข้มข้น 1.25 ถึง 25 กรัมต่อลิตรต่อปริมาณการผลิต (ก) เอนไซม์นารินจินส (ข) เอนไซม์อัลฟา-แรมโนสซิเดส และ (ค) เอนไซม์บีต้า-กลูโคสซิเดส จากเชื้อราคัดเลือก *Aspergillus niger* PTK-BL9.1

เชื้อรารหัส	ปริมาณเปปโตน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่า specific activity (U/mg protein) ของเอนไซม์			ปริมาณเอนไซม์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเอนไซม์ (U/g dry cell weight)		
				ก	ข	ค	ก	ข	ค
PTK-PS10	1.25	0.0225	0.014	97.618	86.56	61.24	2826.60	2506.52	1773.38
	2.50	0.0307	0.022	65.786	62.55	51.39	2148.03	2042.39	1678.22
	3.75	0.0474	0.035	44.558	49.58	50.94	1464.78	1629.84	1674.69
	5.00	0.0487	0.036	42.383	43.52	49.62	1406.28	1444.07	1646.55
	10.0	0.0799	0.037	42.258	39.51	48.49	870.19	813.66	998.55
	15.0	0.1254	0.043	34.120	32.92	47.74	526.13	507.61	736.21
	20.0	0.1602	0.051	29.219	22.85	45.61	417.13	326.18	651.11
	25.0	0.2001	0.054	25.157	21.17	43.66	307.79	258.94	534.09

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิด synthetic minimal medium ที่เติมสารนารินจิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และไม่เติมแหล่งคาร์บอนเสริมใดๆ

ตารางผนวกที่ 16 ราคาต้นทุนการผลิตเอนไซม์นารินจินัส 1 ลิตร จากเชื้อราคัดเลือก 4 ไอโซเลท

เชื้อรารหัส	ส่วนประกอบของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ (กรัมต่อ ลิตร)	ราคา (บาทต่อหน่วย)	ราคา (บาท) ของสาร ที่ใช้ต่อการผลิต เอนไซม์ 1 ลิตร
PTK-BL9.1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	820 บาท/1,000 กรัม	0.1640
(อาหารสูตร	KH ₂ PO ₄	0.40	650 บาท/1,000 กรัม	0.2600
synthetic	KCl	0.20	535 บาท/1,000 กรัม	0.1070
minimal	NH ₄ NO ₃	5.00	920 บาท/500 กรัม	9.2000
medium)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	692 บาท/500 กรัม	0.0138
	ZnSO ₄	0.01	693 บาท/100 กรัม	0.0693
	MnSO ₄	0.01	1,510 บาท/250 กรัม	0.0604
	Peptone	1.25	2,150 บาท/500 กรัม	5.3750
	Naringin	1.00	7,600 บาท/50 กรัม	54.2000
			รวมราคาต้นทุน	69.4495
PTK-PS10	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	820 บาท/1,000 กรัม	0.4100
(อาหารสูตร	KH ₂ PO ₄	1.00	650 บาท/1,000 กรัม	0.6500
Czapek-Dox	KCl	0.50	535 บาท/1,000 กรัม	0.2675
medium)	FeCl ₃	0.10	450 บาท/100 กรัม	0.4500
	Naringin	1.00	5,420 บาท/100 กรัม	54.2000
	Rhamnose	3.75	7,600 บาท/50 กรัม	570.0000
กรณีเติม	NaNO ₃	2.50-3.75	525 บาท/500 กรัม	2.6250-3.9375
			รวมราคาต้นทุน	628.60-629.92
กรณีเติม	Soya peptone	1.25	1,820 บาท/500 กรัม	4.5500
			รวมราคาต้นทุน	630.5275

ตารางผนวกที่ 16 (ต่อ)

รหัสเชื้อรา	ส่วนประกอบของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ราคา (บาทต่อหน่วย)	ราคาสารที่ใช้ (บาท)
PTK-BS1.4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	820 บาท/1,000 กรัม	0.4100
(อาหารสูตร	KH ₂ PO ₄	1.00	650 บาท/1,000 กรัม	0.6500
Czapek-Dox	KCl	0.50	535 บาท/1,000 กรัม	0.2675
medium)	FeCl ₃	0.10	450 บาท/100 กรัม	0.4500
	Naringin	1.00	5,420 บาท/100 กรัม	54.2000
	Rhamnose	3.75	7,600 บาท/50 กรัม	570.0000
กรณีเต็ม	NaNO ₃	2.50	525 บาท/500 กรัม	2.6250
			รวมราคาคำนวณ	628.6025
กรณีเต็ม	Soya peptone	2.50	1,820 บาท/500 กรัม	9.1000
			รวมราคาคำนวณ	635.0775
PTK-BL5.1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	820 บาท/1,000 กรัม	0.4100
(อาหารสูตร	KH ₂ PO ₄	1.00	650 บาท/1,000 กรัม	0.6500
Czapek-Dox	KCl	0.50	535 บาท/1,000 กรัม	0.2675
medium)	FeCl ₃	0.10	450 บาท/100 กรัม	0.4500
	Naringin	1.00	5,420 บาท/100 กรัม	54.2000
	Rhamnose	5.00	7,600 บาท/50 กรัม	760.0000
	NaNO ₃	3.75	525 บาท/500 กรัม	3.9375
			รวมราคาคำนวณ	819.9150